

文雅杜鹃组织培养研究

陈平芬¹, 刘家迅², 李兴贵³, 高飞², 梁明泰²

(1. 昆明金科艺花卉公司, 云南 昆明 650213; 2. 云南省农业科学院 园艺研究所, 云南 昆明 650205; 3. 中国科学院 昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要:以文雅杜鹃 1 a 生半木质化茎段作外植体, 以 WPM 为基本培养基, 研究不同激素浓度和组合对文雅杜鹃不定芽诱导和生根的影响。结果表明: 外植体在 WPM+ZT 2.0 mg/L(单位下略)+IAA 0.5 添加蔗糖 30 g/L, 琼脂 4 g/L, pH 5.0 的培养基上诱导率达 83.33%; 最佳继代培养基为 WPM+ZT 0.8+NAA 0.05+蔗糖 30 g/L+琼脂 4 g/L, pH 5.0; 最适生根培养基为 WPM+IBA 1.0+NAA 0.5+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L+活性炭 3 g/L, pH 5.0, 生根率为 93%。

关键词:文雅杜鹃; 组织培养; 繁殖

中图分类号:S 685.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)17-0134-03

文雅杜鹃(*Rhododendron facetum* Balf. f. et Ward)为杜鹃花科杜鹃花属无鳞杜鹃亚属常绿灌木至小乔木, 又名绵毛房杜鹃, 高 2~6 m, 树形优美。叶革质, 光亮, 长 9~24 cm, 宽 3~6 cm, 侧脉 15~20 对, 叶柄长 2~2.8 cm。总状伞形花序顶生, 有花 9~14 朵, 花冠筒状钟形, 长 3.5~5 cm, 花期 5~7 月, 花色鲜红。产于云南西北部海拔 2 400~2 800 m 的常绿阔叶季雨林中。文雅杜鹃广泛用于园林绿化及高档盆栽, 同时也是培育鲜红色高山杜鹃品种的优秀亲本。但其野生数量少, 多分布在交通不便的深山密林中, 种子出苗率低, 繁殖困难。

有关杜鹃组织培养研究方面的报道国内外均有^[3-5], 但未见文雅杜鹃组织培养研究相关报道。该研究以文雅杜鹃半木质化茎段作外植体进行组织培养技术研究, 目的在于寻找一套新的高效可行的方法来进行繁殖, 以满足迁地保护研究、育种研究及园林园艺市场的需求。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采自昆明金科艺花卉公司杜鹃引种试验站。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌外植体材料的获得 取生长健壮腋芽饱满的 1 a 生嫩枝, 用洗洁精清洗, 再用自来水冲洗 2 h, 用消毒滤纸吸干附着水分, 去除叶片叶柄, 剪成长 6 cm 茎段, 在无菌室超净工作台上用 75% 的酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 然后用 0.1% 的 HgCl₂ 消毒

15 min, 无菌水冲洗 5 次, 用灭菌的滤纸吸干材料表面的水分, 将外植体切成长 0.5 cm, 带 1 个腋芽的茎段。

1.2.2 不定芽的诱导 外植体接种到 1~6 号诱导培养基上, 每瓶接种 1 个外植体, 培养 45 d 进行结果统计分析。诱导培养基以 WPM 为基本培养基, 附加不同浓度的生长素 IAA 和细胞分裂素 ZT, 添加蔗糖 30 g/L, 琼脂 4 g/L, 调 pH 至 5.0。

1.2.3 培养条件 每天光照 8 h, 光照强度 1 200~1 500 lx, 培养温度(23±2)℃。

1.2.4 继代培养 芽苗长 2~3 cm, 从基部切割, 接种到 7~17 号培养基, 50 d 继代 1 次, 培养条件同上。继代培养基以 WPM 为基本培养基, 附加不同浓度的生长素 IAA、NAA 和细胞分裂素 ZT、KT, 添加蔗糖 30 g/L, 琼脂 4 g/L, 调 pH 至 5.0。

1.2.5 生根培养 切割高度为 3 cm 以上的健壮芽苗进行生根培养, 接种到 18~28 号培养基, 培养 45 d 后观察统计生根情况, 培养条件同上。生根培养基以 WPM 为基本培养基, 添加不同浓度的生长素 IBA、NAA、蔗糖 30 g/L, 琼脂 7 g/L、活性炭 3 g/L, pH 调至 5.0。

1.2.6 练苗与移栽 根长 0.5 cm 以上, 即可出瓶练苗。组培瓶苗在室内散射光条件下放置 3 d, 用镊子取出组培苗, 洗去根部粘连的培养基, 移栽到草炭+腐叶土(1:1)的基质中, 遮光 75%, 温度 20~25℃, 保湿。

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度对不定芽诱导的影响

该研究发现, 文雅杜鹃外植体在诱导培养基中 10 d 腋芽开始萌动伸长, 23 d 出现第 1 对展开叶, 此时不定芽基部开始形成 2~3 个丛生芽, 45 d 芽苗高 3 cm (图 1), 具 3 对以上展开叶。文雅杜鹃外植体在以 WPM 为基本培养基, 附加不同激素浓度的 1~6 号培养基上诱导均获成功, 在 ZT 0.5~2.0, 随着 ZT 浓度的增加, 诱导率呈上升趋势, ZT 2.5 以上没有表现出诱导率同步上升的趋势(表 1)。文雅杜鹃最适合的诱

第一作者简介:陈平芬(1966-), 女, 本科, 高级农艺师, 现从事植物组织培养与工厂化育苗研究工作。

责任作者:刘家迅(1967-), 男, 本科, 副研究员, 现从事植物组织培养与栽培生理研究工作。E-mail: kmflower@vip.sina.com。

基金项目:国家星火计划资助项目(2010GA830033); 昆明市科技计划资助项目(10S040204)。

收稿日期:2011-05-27

导培养基为 WPM+ZT 2.0+IAA 0.5 添加蔗糖 30 g/L,琼脂 4 g/L,pH 5.0,诱导率达 83.33%。

表 1 不同激素浓度对不定芽诱导的影响

培养基号	激素/mg·L ⁻¹	接种数/瓶	诱导数/瓶	诱导率/%
1	ZT 0.5+IAA 0.5	30	12	40.00
2	ZT 1.0+IAA 0.5	30	15	50.00
3	ZT 1.5+IAA 0.5	30	22	73.33
4	ZT 2.0+IAA 0.5	30	25	83.33
5	ZT 2.5+IAA 0.5	30	20	66.67
6	ZT 3.0+IAA 0.5	30	21	70.00

2.2 不同激素组合对继代培养的影响

文雅杜鹃继代培养最适合培养基为 14 号培养基: WPM+ZT 0.8+NAA 0.05 添加蔗糖 30 g/L,琼脂 4 g/L,pH 值 5.0,芽苗生长健壮,形态正常,增殖系数适中,保持在 4~5 倍,有效苗比例高。随着 ZT 的增加,基部大量萌发丛生芽,增值系数变大,芽苗变细变

弱,将来可用于生根的有效苗减少,不利于优质种苗的生产。由表 2 可看出,在文雅杜鹃继代培养中,ZT 效果优于 KT。图 2 中展示了在 14 号培养基中继代培养的文雅杜鹃芽苗。

表 2 不同激素组合对不定芽诱导的影响

培养基号	KT/mg·L ⁻¹	ZT/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	长势
7	0.3	0	0.05	*
8	0.5	0	0.05	*
9	0.8	0	0.05	***
10	1	0	0.05	*
11	0	0.1	0.05	*
12	0	0.3	0.05	***
13	0	0.5	0.05	*****
14	0	0.8	0.05	*****
15	0	1	0.05	***
16	0	1.5	0.05	***
17	0	2	0.05	**

注: * 弱; ** 较弱; *** 中; ***** 良; ***** 优。



图 1 文雅杜鹃不定芽诱导



图 2 文雅杜鹃继代培养

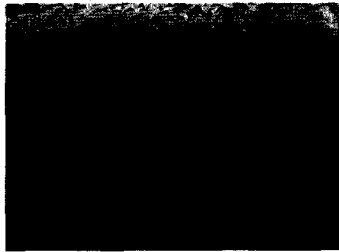


图 3 文雅杜鹃 1a 生根培养

2.3 不同激素组合对生根培养的影响

生长素 IBA 与 NAA 单独使用均可使部分幼苗发根,IBA 促根效果优于 NAA,2 种生长素混合使用呈现明显的放大效应^[2],生根效果明显增强。从表 3 可知,文雅杜鹃在 24 号培养基中生根效果最好。培养基组成: WPM+IBA 1+NAA 0.5 添加蔗糖 30 g/L,琼脂 7 g/L,活性炭 3 g/L,pH 5.0,45 d 生根率高达 93%。

表 3 不同激素组合对生根率的影响

培养基号	IBA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	总数/株	生根数/株	生根率/%
18	0.5	0	100	46	46
19	1.0	0	100	53	53
20	1.5	0	100	57	57
21	2.0	0	100	69	69
22	2.5	0	100	47	47
23	0.5	0.5	100	55	55
24	1.0	0.5	100	93	93
25	1.5	0.5	100	87	87
26	2.0	0.5	100	78	78
27	0	1.0	100	23	23
28	0	2.0	100	25	25

3 结论与讨论

外植体在 WPM+ZT 2.0+IAA 0.5 添加蔗糖

30 g/L,琼脂 4 g/L,pH 5.0 的培养基上诱导率达 83.33%;最佳继代培养基为 WPM+ZT 0.8+NAA 0.05+蔗糖 30 g/L+琼脂 4 g/L,pH 5.0;最适生根培养基为 WPM+IBA 1.0+NAA 0.5+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L+活性炭 3 g/L,pH 5.0,生根率为 93%。

文雅杜鹃继代培养过程中,通过提高细胞分裂素浓度,可以迅速提升芽苗的繁殖系数,达 15~20 倍,但随着丛生芽数量的增加,芽苗变弱,质量急剧下降,质量与数量较理想的平衡点是保持增殖率 4~5 倍,此时芽苗均匀健壮,可为快速繁殖优质种苗(图 3)奠定良好基础。

参考文献

[1] 冯国楣. 中国杜鹃花[M]. 第一册. 北京: 科学出版社, 1988: 51-52.
[2] 韦三立. 花卉组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000: 24-25.
[3] 罗彭, 庄平, 白洁. 大白杜鹃、美容杜鹃和喇叭杜鹃的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(2): 326.
[4] 张小雅, 孙红梅, 田颖辉. 杜鹃组织培养技术研究进展[J]. 北方园艺, 2006(4): 76-77.
[5] John E P, Miles R I. Plant Regeneration from Leaf Explants of Rhododendron PJM Hybrids[J]. Scientia Horticulturae, 1999, 48: 159-170.

国兰 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化

刘 菲¹, 李 萍¹, 何俊荣², 蒋 或², 卓碧萍², 孙淑霞²

(1. 西南交通大学, 四川 成都 610031; 2. 四川省农业科学院 园艺研究所, 四川 成都 610066)

摘 要:采用正交设计与单因素结合法, 对国兰 ISSR-PCR 反应体系中的 4 个因素(dNTPs、引物浓度、 Mg^{2+} 、*Taq* DNA 聚合酶)进行优化试验, 结果用 DPS 软件进行分析。结果表明: 各因素对 PCR 结果均有显著影响, 其中 *Taq* DNA 聚合酶对反应的影响最大; 筛选出了各反应因素的最佳水平, 建立国兰 ISSR-PCR 的最佳反应体系 (25 μ L) 为: dNTPs 0.2 mmol/L、引物 1.0 μ mol/L、 Mg^{2+} 2.5 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 1 U。

关键词: 国兰; 分子标记; ISSR-PCR; 反应体系; 正交设计

中图分类号: S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)17-0136-04

中国兰花习称国兰, 兰科 (Orchidaceae) 兰属 (*Cymbidium*) 植物, 包括春兰 (*Cymbidium goeringii*)、蕙兰 (*C. faberi*)、建兰 (*C. ensifolium*)、墨兰 (*C. sinense*)、寒兰 (*C. kanran*)、莲瓣兰 (*C. tortisepalum*) 和春剑 (*C. tongibracteatum*) 7 个种^[1]。具有极高的经济价值和观赏价值。近年来对于国兰的育种进行了大量研究, 选育出了很多优质品种, 但是仅凭传统的判断标准来识别并对新品种进行分类以及注册登记等, 存在很大的困难。

分子标记技术可以在很大程度上弥补传统判断标准的缺陷, 因此广泛应用于植物品种的鉴定。ISSR (Inter

Simple Sequence Repeat) 即简单序列重复区间, 又称 Inter ISSR, 是 1944 年 Zietkiewicz 等发明的一种新分子标记技术^[2]。其基本原理是在 SSR 的 5' 或 3' 加上 2~4 个随机核苷酸, 在 PCR 反应中与特定的引物结合, 对结合引物互补区两侧具有反向排列 SSR 的一段基因组 DNA 序列进行扩增。ISSR 引物设计比较简单, 无需知道 SSR 两端的单拷贝序列。和 SSR 标记相比种特异性不强; 与 RAPD 相比其多态性更高; 可以与 RFLP 的精确度相媲美, 而且检测十分方便。目前, ISSR 标记已广泛应用于植物品种鉴定^[3]、遗传作图^[4]、基因定位^[5]、遗传多样性^[6]、进化及分子生态学研究^[7]。但是由于其反应是基于 PCR, 其反应条件容易受到 Mg^{2+} 、模板、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 以及引物浓度各种因素的影响, 所以需要针对不同物种进行反应体系优化。该研究采用正交设计和单因素试验相结合的方法对 dNTPs、引物浓度、 Mg^{2+} 以及 *Taq* DNA 聚合酶 4 个因素进行筛选, 对国兰 ISSR 反应体系进行优化, 以期获得适合于国兰 ISSR 反应的最佳体系, 为国兰的 ISSR 分子标记提供一定的参考。

第一作者简介: 刘菲 (1986-), 女, 硕士, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: yblf1987@163.com。

责任作者: 李萍 (1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向为生物化学与分子生物学。

基金项目: 四川省科技支撑计划资助项目 (09ZC1745); 四川省育种工程花卉资助项目; 四川省财政厅“草本花卉”资助项目。

收稿日期: 2011-06-09

Study on Tissue Culture of *Rhododendron facetum* Balf. f. et Ward

CHEN Ping-fen¹, LIU Jia-xun², LI Xing-gui³, GAO Fei², LIANG Ming-tai²

(1. Kunming King-Keys Flower Limited Company, Kunming, Yunnan 650213; 2. Institute of Horticulture, Yunnan Academy of Agriculture Science, Kunming, Yunnan 650205; 3. Kunming Institute of Horticulture, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650204)

Abstract: Taking the semi-lignification stems segments of annual *Rhododendron facetum* Balf. f. et Ward as explants and WPM as the basic medium to study on the effect of different hormone concentrations and combinations on bud induction and rooting of *Rhododendron facetum* Balf. f. et Ward. The results showed that the best medium for explants induction was WPM+ZT 2.0+IAA 0.5 add sucrose 30 g/L, agar 4 g/L, pH 5.0. The stem segments of *Rhododendron facetum* Balf. f. et Ward on inductivity had highly reached 83%. The best multiplication medium was WPM+ZT 0.8 mg/L+NAA 0.05 mg/L add sucrose 30 g/L, agar 4 g/L, pH 5.0. The optimal rooting medium was WPM+IBA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, add sucrose 30 g/L, agar 7 g/L+activated carbon 3 g/L, pH 5.0, rooting rate was 93%.

Key words: *Rhododendron facetum* Balf. f. et Ward; tissue culture; propagation