



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102919125 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 13

(21) 申请号 201210450106. 2

(22) 申请日 2012. 11. 13

(71) 申请人 云南省农业科学院花卉研究所

地址 650205 云南省昆明市龙头街桃园村

(72) 发明人 彭绿春 解玮佳 张艺萍 瞿素萍

李世峰 苏艳 宋杰

(74) 专利代理机构 昆明合众智信知识产权事务

所 53113

代理人 康珉

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 5 页

### (54) 发明名称

云南杜鹃高效再生体系的建立方法

### (57) 摘要

本发明为一种云南杜鹃高效再生体系的建立方法,属于植物生物技术育种领域。该方法以云南杜鹃无菌苗的中上部叶片为材料,在 WPM 培养基的基础上,主要配有激素 TDZ、ZT、2, 4-D、NAA、IAA、水解酪蛋白中一种或几种及适宜的浓度,通过叶片直接再生和间接再生两条途径获得完整植株。本发明首次对云南杜鹃建立了高效再生体系,为云南杜鹃的基因工程育种工作提供了良好的理论基础和实验依据,同时将有效推动杜鹃花生物技术育种进程。

1. 云南杜鹃高效再生体系的建立方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 无菌苗的获得

取侧芽饱满的云南杜鹃半木质化茎段,剪成带有1~2个侧芽的茎段,用洗衣粉水清洗之后,清水漂洗干净,在无菌条件下依次用质量分数为0.12%的升汞溶液浸泡15min,质量分数为2%的次氯酸钠溶液浸泡8min,无菌水冲洗3~5次,切去茎段两头接种于诱导培养基上诱导侧芽萌发,待不定芽长至2~3cm时切下不定芽转入增殖培养基上培养获得无菌苗,所述的诱导培养基为:MS+6-BA 1mg/L+NAA 0.1 mg/L,pH值为5.4;所述的增殖培养基为:WPM+ZT 2 mg/L,pH值为5.4;

(2) 再生体系的建立

①叶片直接再生不定芽

将步骤(1)中获得的28~32天苗龄无菌苗的中上部叶片,切成 $0.5\text{cm}^2 \sim 0.8\text{cm}^2$ 的叶盘,并在叶盘背面划伤口,叶盘背面朝下接种于叶盘分化培养基A中或叶盘分化培养基B中,叶盘分化培养基A为:WPM+TDZ 0.4 mg/L+NAA0.05 mg/L+蔗糖3%+琼脂0.6%,pH值为5.4,叶盘分化培养基B为:WPM+ZT 2~4mg/L+NAA0.01mg/L+蔗糖3%+琼脂0.6%,pH值为5.4;

或②叶片间接再生不定芽

A. 将步骤(1)中获得的28~32天苗龄无菌苗的中上部叶片,切成约 $0.5\text{cm}^2 \sim 0.8\text{cm}^2$ 的叶盘,并在叶盘背面划伤口,叶盘背面朝下接种于愈伤组织诱导培养基中培养,所述的愈伤组织诱导培养基为:WPM+TDZ 0~0.5 mg/L+2,4-D1.0 mg/L+水解酪蛋白0~500 mg/L+蔗糖3%+琼脂0.6%,pH值为5.4;

B. 将步骤(2)②A中得到的愈伤组织转接入愈伤组织分化培养基中诱导不定芽,所述的愈伤组织分化培养基为:WPM+ZT4.0mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖3%+琼脂0.6%,pH值为5.4;

(3) 壮苗培养

将步骤(2)①叶片直接再生不定芽培养出的不定芽或将(2)②叶片间接再生不定芽培养出的不定芽分棵切开或切成3~5棵为一丛放入壮苗培养基中培养20~25天,所述的壮苗培养基为:WPM+蔗糖3%+琼脂0.6%,pH值为5.4;

(4) 生根培养

将经步骤(3)壮苗培养的苗分棵切开,接种于生根培养基中培养,所述的生根培养基为:1/2 WPM+ IAA1.0~1.5mg/L+蔗糖3%+琼脂0.6%,pH值为5.4;

以上各步骤培养条件均为:温度为 $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ,光照强度为2000 lx,光照时间 $12\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ ,各培养基中蔗糖和琼脂含量的百分数为质量百分数。

2. 根据权利要求1所述的云南杜鹃高效再生体系的建立方法,其特征在於:步骤(2)①所述的叶盘分化培养基B为:WPM+ZT4mg/L+NAA0.01mg/L+蔗糖3%+琼脂0.6%,pH值为5.4。

3. 根据权利要求1或2所述的云南杜鹃高效再生体系的建立方法,其特征在於:步骤(2)②A所述的愈伤组织诱导培养基为:WPM+TDZ 0.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+水解酪蛋白500 mg/L+蔗糖3%+琼脂0.6%,pH值为5.4。

4. 根据权利要求1或2所述的云南杜鹃高效再生体系的建立方法,其特征在於:步骤(4)所述的生根培养为:1/2WPM + IAA 1.5mg/L+蔗糖3%+琼脂0.6%,pH值为5.4。

5. 根据权利要求3所述的云南杜鹃高效再生体系的建立方法,其特征在于:步骤(4)所述的生根培养为:1/2WPM + IAA 1.5mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%, pH 值为 5.4。

## 云南杜鹃高效再生体系的建立方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于杜鹃花生物技术育种领域,具体涉及一种云南杜鹃高效再生体系的建立方法,可用于云南杜鹃基因工程和无性突变系筛选。

### 背景技术

[0002] 云南杜鹃(*Rhododendron yunnanense*)为杜鹃花科,杜鹃属灌木或小乔木,主要分布于云南(西、西北、北、东北部)、陕西南部、四川西部、贵州西北、西藏东南部,境外缅甸东北部也有分布。生于山坡杂木林、灌丛、松林、松-栎林、云杉或冷杉林缘,海拔 1600 米—4000 米。

[0003] 本发明人于 2008 年开始从云南的中甸、大理、师宗、梁王山引种云南杜鹃至云南省农科院花卉所资源圃(昆明),发现云南杜鹃是杜鹃花基因工程育种理想的基因表达受体材料,因云南杜鹃植株移栽易于成活,次年即可开花,播种实生苗 3 年后也可开花,可见云南杜鹃抗逆性强,具有很强的适应性和比较广的适应范围。

[0004] 植物遗传转化即转基因技术是近四十年来发展起来的一项生物技术。利用转基因技术可以在保持木本植物原有较好遗传背景的前提下定向改变某些性状,同时还能大大缩短育种时间,这为克服木本植物传统育种局限性,加速木本植物遗传育种进展提供了便利。目前转基因技术已成为木本植物遗传育种的主要研究领域。然而转基因技术极大的依赖于体外培养物能够高效稳定再生成完整植株的技术,建立高效稳定的遗传转化受体系统是转基因育种的基础。而木本植物组织培养和植株再生的难度较大。如缺乏合适的转化受体材料,难以建立高效稳定的遗传转化体系。其次是基因型依赖性较强,转化效率不高。因此,系统深入研究影响云南杜鹃植株再生因子、诱导植株再生的方法并获得再生植株,建立专门针对云南杜鹃的高效稳定的再生体系,具有重要意义,可为云南杜鹃转基因育种工作提供理论基础和实验依据,同时将有效推进杜鹃花生物技术育种进程。云南杜鹃的再生体系研究至今未见报道。

### 发明内容

[0005] 本发明目的是提供一种专门针对云南杜鹃的高效再生体系的建立方法。

[0006] 本发明所述的云南杜鹃高效再生体系的建立方法,包括以下步骤:

#### (1) 无菌苗的获得

取侧芽饱满的云南杜鹃半木质化茎段,剪成带有 1~2 个侧芽的

茎段,用洗衣粉水清洗,之后清水漂洗干净,在无菌条件下依次用质量分数为 0.12% 的升汞溶液浸泡 15min,质量分数为 2% 的次氯酸钠溶液浸泡 8min,无菌水冲洗 3~5 次,切去茎段两头接种于诱导培养基上诱导侧芽萌发,待不定芽长至 2~3cm 时切下不定芽转入增殖培养基上培养获得无菌苗,所述的诱导培养基为 MS + 6-BA 1mg/L + NAA 0.1 mg/L, pH 值为 5.4;所述的增殖培养基为:WPM + ZT 2 mg/L, pH 值为 5.4;

#### (2) 再生体系的建立

### ①叶片直接再生不定芽

将步骤(1)中获得的 28 ~ 32 天苗龄无菌苗的中上部叶片,切成  $0.5\text{cm}^2 \sim 0.8\text{cm}^2$  的叶盘,并在叶盘背面划伤口,叶盘背面朝下接种于叶盘分化培养基 A 中或叶盘分化培养基 B 中,叶盘分化培养基 A 为:WPM+TDZ 0.4 mg/L+ NAA0.05 mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%,pH 值为 5.4,叶盘分化培养基 B 为:WPM+ZT 2 ~ 4mg/L+NAA0.01mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%, pH 值为 5.4;

### 或②叶片间接再生不定芽

A. 将步骤(1)中获得的 28 ~ 32 天苗龄无菌苗的中上部叶片,切面积约  $0.5\text{cm}^2 \sim 0.8\text{cm}^2$  的叶盘,并在叶盘背面划伤口,叶盘背面朝下接种于愈伤组织诱导培养基中培养,所述的愈伤组织诱导培养基为:WPM+TDZ 0 ~ 0.5 mg/L+2,4-D1.0 mg/L+ 水解酪蛋白 0 ~ 500 mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%, pH 值为 5.4;

B. 将步骤(2)② A 中得到的愈伤组织转接入愈伤组织分化培养基中诱导不定芽,所述的愈伤组织分化培养基为:WPM+ZT4.0mg/L+NAA 0.1 mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%, pH 值为 5.4;

### (3) 壮苗培养

将步骤(2)①叶片直接再生不定芽培养出的不定芽或将(2)②叶片间接再生不定芽培养出的不定芽分棵切开或切成 3-5 棵为一丛放入壮苗培养基中培养 20 ~ 25 天,所述的壮苗培养基为:WPM+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%, pH 值为 5.4;

### (4) 生根培养

将经步骤(3)壮苗培养的苗分棵切开,接种于生根培养基中培养,所述的生根培养基为:1/2 WPM+ IAA1.0 ~ 1.5mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%, pH 值为 5.4;

以上各步骤培养条件均为:温度为  $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ,光照强度为 2000lx,光照时间为  $1 \sim 2 \text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ ,各培养基中蔗糖和琼脂含量的百分数为质量百分数。

[0007] 步骤(2)①优选的叶盘分化培养基 B 为:WPM+ZT4mg/L+NAA0.01mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%, pH 值为 5.4。

[0008] 步骤(2)② A 优选的愈伤组织诱导培养基为:WPM+TDZ 0.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+ 水解酪蛋白 500 mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%, pH 值为 5.4。

[0009] 步骤(4)优选的生根培养为:1/2WPM + IAA 1.5mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%, pH 值为 5.4。

[0010] 本发明的有益效果是:

1、本发明首次针对云南杜鹃叶片诱导植株再生进行了系统深入的研究,采用叶片直接诱导或间接诱导植株再生两条途径,以及特定的培养基,使叶片直接诱导不定芽的诱导率可达 62 ~ 73%,每个叶盘上的平均芽数可达 6.93 个,叶片愈伤组织的诱导率达 62 ~ 100%,愈伤组织疏松、体积大,质量好,愈伤组织分化成不定芽的分化率在 70% 以上,叶片直接诱导或间接诱导的不定芽的生根率均达 69 ~ 89%,图 1- 图 9 也表明,本发明方法所建立的云南杜鹃高效再生体系能使云南杜鹃叶片在叶片直接再生不定芽或叶片间接再生不定芽,不定芽的壮苗培养、生根培养各个环节均生长表现良好,培养的植株健壮、根系发达,表明本发明方法建立了能高频率产生愈伤组织和不定芽,并能高频率生根获得完整植株的云南杜鹃再生体系。表明本发明方法建立云南杜鹃高效再生体系是切实可行和有效的。

[0011] 2、叶盘和愈伤组织两种材料是进行目的基因浸染的常用材料,本发明能高效地诱导不定芽和愈伤组织,为云南杜鹃后续的转基因育种工作,实现高频转化提供了良好的再生体系及其建立的方法。

#### 附图说明

- [0012] 图 1 是云南杜鹃叶盘直接诱导不定芽过程中诱导出的不定芽点。  
[0013] 图 2 是云南杜鹃叶盘直接诱导不定芽过程中不定芽点长成不定芽。  
[0014] 图 3 是云南杜鹃叶盘间接诱导不定芽过程中诱导愈伤组织。  
[0015] 图 4 是云南杜鹃叶盘间接诱导不定芽过程中愈伤组织增殖。  
[0016] 图 5 是云南杜鹃叶盘间接诱导不定芽过程中愈伤组织分化不定芽。  
[0017] 图 6 是云南杜鹃叶盘间接诱导不定芽过程中愈伤组织分化的不定芽长大。  
[0018] 图 7 是云南杜鹃壮苗培养的生长表现。  
[0019] 图 8 是云南杜鹃生根培养的生长表现。  
[0020] 图 9 是云南杜鹃生根培养的生长表现。

#### 具体实施方式

[0021] 以下各实施例所用的材料及试剂均为市售,各实施例无特殊说明均为常规方法。

[0022] 本发明提供一种云南杜鹃高效再生体系的建立方法,具体实施步骤如下:

##### 1、无菌苗的获得

取侧芽饱满的云南杜鹃半木质化茎段,剪成带 1~2 个侧芽的小段,洗衣粉水振荡清洗之后用清水漂洗干净,无菌条件下消毒,依次用质量分数为 0.12% 的升汞溶液浸泡 15min,质量分数为 2% 的次氯酸钠溶液浸泡 8min,其间不断摇晃,之后无菌水冲洗 3~5 次,切去茎段两头接种于 MS + 6-BA (6-苄基腺嘌呤) 1mg/L + NAA (萘乙酸) 0.1 mg/L, pH 值为 5.4 的诱导培养基上诱导侧芽萌发,20d 后待不定芽长至 2~3cm 时切下不定芽转入 WPM + ZT 2 mg/L, pH 值为 5.4 的增殖培养基上获得无菌苗,用于再生体系建立的材料为 28~32 天苗龄的无菌苗的中上部叶片。

[0023] 2、再生体系的建立

##### (1) 叶片直接再生不定芽

将步骤 1 中 30 天苗龄的无菌苗的中上部叶片,切成  $0.5\text{cm}^2 \sim 0.8\text{cm}^2$  的叶盘,并在叶盘叶背面划“井”字伤口,叶盘背面朝下接种于表 1 所列的激素组合的各叶盘分化培养基中培养。

表 1 不同激素组合和浓度对比对叶盘分化不定芽的影响

编号	植物激素 (mg/L)			接种数 (个)	不定芽诱导率 (%)	平均芽数 (个)
	TDZ	ZT	NAA			
1	0.4	0	0.05	40	62.5 <sup>a</sup>	3.86 <sup>a</sup>
2	0.8	0	0.05	40	39.5 <sup>a</sup>	2.60 <sup>a</sup>
3	1.2	0	0.05	40	14.9 <sup>a</sup>	2.45 <sup>a</sup>
4	0	2	0.01	40	66.7 <sup>a</sup>	2.00 <sup>a</sup>
5	0	3	0.01	40	68.8 <sup>a</sup>	3.82 <sup>a</sup>
6	0	4	0.01	40	73.0 <sup>a</sup>	6.93 <sup>a</sup>

注：表 1 中各编号的培养基中均有：WPM（基本培养基）+蔗糖 3%+琼脂 0.6%，各培养基的 pH 值均为 5.4。表 1 中同列不同小写字母表示在 5% 水平上差异显著。

[0024] 叶盘培养一周后，可见切口边缘出现皱缩、膨大，25 天左右切口处开始有芽点冒出，50 天左右时，有的叶盘上形成大量丛芽，部分芽点已长成正常植株，可用于壮苗培养。由此可知，TDZ（噻二唑苯基脲）或 ZT（玉米素）均有利于诱导叶盘直接分化不定芽，随浓度增加，两种激素对不定芽的诱导能力表现出相反的变化趋势：在 TDZ 为 0.4 ~ 1.2 mg/L 浓度范围内，随 TDZ 浓度增加，不定芽诱导率和平均芽数均降低，而在 ZT 为 2 ~ 4 mg/L 浓度范围内，随 ZT 浓度增加，不定芽诱导率和平均芽数提高。因此，叶片直接再生不定芽可以分别接种于以下两种叶盘分化培养基并获得高诱导率和较多芽数的有益效果，两种叶盘分化培养基为：

叶盘分化培养基 A：WPM+TDZ 0.4 mg/L+ NAA0.05 mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%，pH 值为 5.4。

[0025] 或叶盘分化培养基 B：WPM+ZT 2 ~ 4mg/L+NAA0.01mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%，pH 值为 5.4。叶盘分化培养基 B 中诱导叶盘分化不定芽的最佳激素组合为 ZT 4 mg/L + NAA 0.1 mg/L，其不定芽诱导率和平均芽数最高，分别为 73.0% 和 6.93 个，与其他激素组合的诱导率在 0.5% 水平有显著差异。（图 1、图 2）。

[0026] 除上述叶片直接再生不定芽外，还可以采用叶片间接再生不定芽的培养，具体是：

或进行（2）叶片间接再生不定芽，由以下步骤 A 和步骤 B 组成：

A. 将步骤 1 中 30 天苗龄的无菌苗的中上部叶片，切成 0.5cm<sup>2</sup> ~ 0.8cm<sup>2</sup> 的叶盘，并在叶盘叶背面划“井”字伤口，叶盘背面朝下接种于表 2 所列的激素组合的愈伤组织诱导培养基中。

表 2 不同激素组合和浓度对比对叶盘诱导愈伤组织的影响

编号	植物激素 (mg/L)			接种数 (个)	愈伤组织诱导率 (%)	生长情况
	TDZ	2,4-D	水解酪蛋白			
1	0.5	1.0	0	40	70.8 <sup>a</sup>	愈伤粉白色, 较疏松, 体积较小
2	0.5	1.0	500	40	100.0 <sup>a</sup>	愈伤粉白色, 疏松, 体积大
3	0	1.0	0	40	62.4 <sup>b</sup>	愈伤白色, 较疏松, 体积小
4	0	1.0	500	40	89.7 <sup>b</sup>	愈伤白色, 疏松, 体积大
5	0.5	0	0	40	35.8 <sup>c</sup>	愈伤白偏褐色, 水状, 体积小
6	0.5	0	500	40	48.8 <sup>c</sup>	愈伤白偏褐色, 水状, 体积小

注: 表 2 中各编号的培养基中均有: WPM (基本培养基) +蔗糖 3%+琼脂 0.6%, 各培养基的 pH 值均为 5.4. 表 2 中同列不同小写字母表示在 5%水平上差异显著。

[0027] 叶盘培养一周后, 切口边缘开始膨大, 叶片逐渐增厚, 15d 后, 在切口边缘观察到黄绿色的愈伤组织, 之后愈伤组织继续长大, 到 50 天时, 未见愈伤组织上分化出不定芽, 各激素组合的愈伤组织诱导率在 5% 水平上差异显著。在编号 1 和编号 2 两培养基中 TDZ 与 2,4-D 浓度分别相同时, 添加水解酪蛋白的处理比不添加者愈伤组织诱导率高(愈伤组织诱导率 100%), 说明水解酪蛋白在该条件下对诱导愈伤组织具有促进作用。从表中试验数据得出将步骤 1 中获得的 28 ~ 32 天苗龄无菌苗的中上部叶片, 切成约 0.5cm<sup>2</sup> ~ 0.8cm<sup>2</sup> 的叶盘, 并在叶盘背面划“井”字伤口, 叶盘背面朝下接种于以下愈伤组织诱导培养基中培养, 其愈伤组织诱导率可达到 62.4% 以上的好效果, 所述的愈伤组织诱导培养基为: WPM+TDZ 0 ~ 0.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+ 水解酪蛋白 0 ~ 500 mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%, pH 值为 5.4。

[0028] 所述的愈伤组织诱导培养基的最佳组合为: WPM+TDZ 0.5mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+ 水解酪蛋白 500 mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%, pH 值为 5.4, 其愈伤组织诱导率达到了 100%, 诱导出来的愈伤组织粉白色, 较疏松, 体积大。

[0029] B. 根据上述试验, ZT 有利于诱导叶盘直接分化不定芽的结果, 将步骤 2 (2) A 中得到的愈伤组织转接入愈伤组织分化培养基中培养, 所述的愈伤组织分化培养基为: WPM+ZT 4.0mg/L+NAA 0.1 mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%, pH 值为 5.4, 30d 后可见愈伤组织局部变绿, 开始有丛芽分化, 50d 后丛芽长成小植株。愈伤组织分化成丛芽的比例可达 70% 以上。(图 3、图 4、图 5、图 6)

### 3、壮苗培养



将步骤 2 (1) 叶片直接再生不定芽培养出的不定芽或步骤 2 (2) 叶片间接再生不定芽培养出的不定芽分棵切开, 或切成 3-5 棵一小丛放入不添加任何激素的 WPM 壮苗培养基中培养 20-25 天, 所述的壮苗培养基为: WPM+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%, pH 值为 5.4。由于不添加任何激素, 在一定程度上抑制了不定芽的增殖, 有利于不定芽长成健壮、舒展植株。(图 7)

#### 4、生根培养

经壮苗培养后, 将小苗分棵切开, 接种于表 3 所列生根培养基中。

表 3 不同 IAA 浓度对云南杜鹃生根的影响

IAA 浓度 (mg·L <sup>-1</sup> )	0	0.5	1.0	1.5
接苗数 (棵)	75	75	75	75
生根率 (%)	8.0	36.7	69.3	88.7

注: 表 3 中各培养基中均有: 1/2 WPM (基本培养基) + 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%,

各培养基的 pH 值均为 5.4。

[0030] 培养一周后, 发现小苗茎基部长出少量愈伤组织, 两周后, 最先在 IAA (吲哚乙酸) 浓度为 1.5mg/L 的生根培养基中观察到在小苗茎基部和愈伤组织上有白色极细的须根冒出。30 后统计生根率, 随 IAA 浓度增加, 生根率提高, 云南杜鹃适宜的生根培养基为: 1/2 WPM+ IAA 1.0 ~ 1.5mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%, pH 值为 5.4; 其最佳的生根培养基为: 1/2 WPM + IAA 1.5mg/L+ 蔗糖 3%+ 琼脂 0.6%, pH 值为 5.4。在此培养基中小苗最先发根, 且生根率最高, 达 88.7% (图 8、图 9)。

[0031] 以上各步骤培养条件均为: 温度为 23℃ ± 2℃; 光照强度为 2000lx 光照时间为 12 h · d<sup>-1</sup>, 各培养基中蔗糖和琼脂含量的百分数为质量百分数。其余不定芽诱导率、愈伤组织诱导率、生根率等百分数为数量百分数。

[0032] 图 1- 图 9 也表明, 本发明方法所建立的云南杜鹃高效再生体系能使云南杜鹃叶片在叶片直接再生不定芽或叶片间接再生不定芽, 不定芽的壮苗培养、生根培养各个环节均生长表现良好, 培养的植株健壮、根系发达, 表明本发明方法建立的云南杜鹃高效再生体系是切实可行和有效的。

所述的WPM基本培养基的配方是：（单位：mg/L）

成分	含量	成分	含量
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	400	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{K}_2\text{SO}_4$	990	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	37.3
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	556	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	96	肌醇	100
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	烟酸	0.5
$\text{H}_3\text{BO}_4$	6.2	盐酸吡哆醇	0.5
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	盐酸硫胺素	0.1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	甘氨酸	2.0

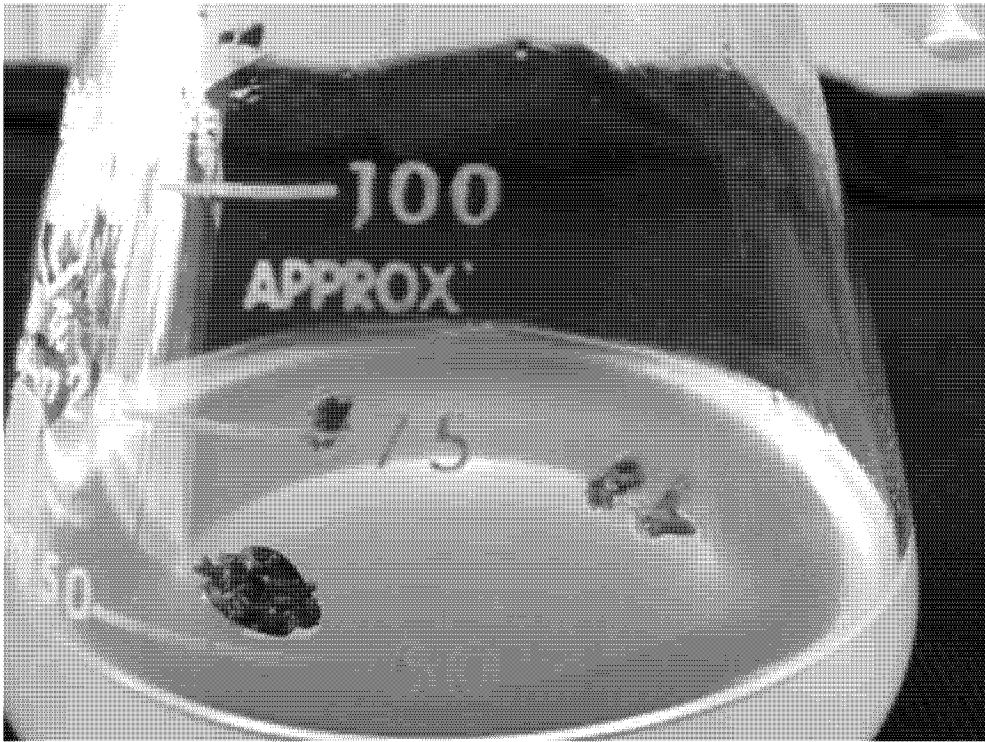


图 1

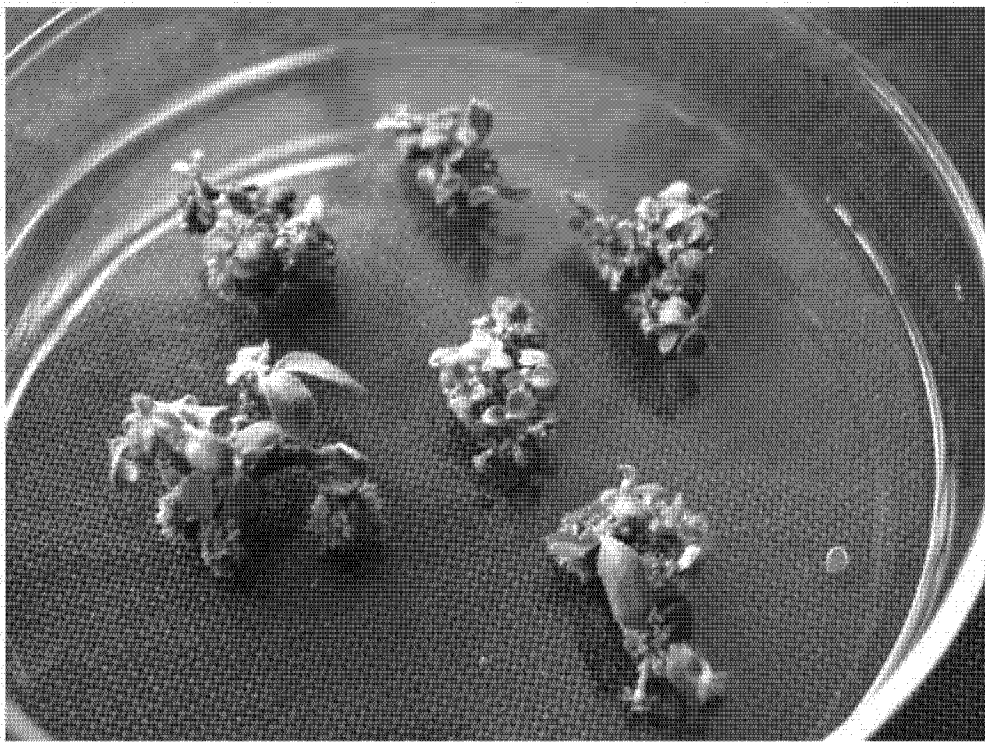


图 2

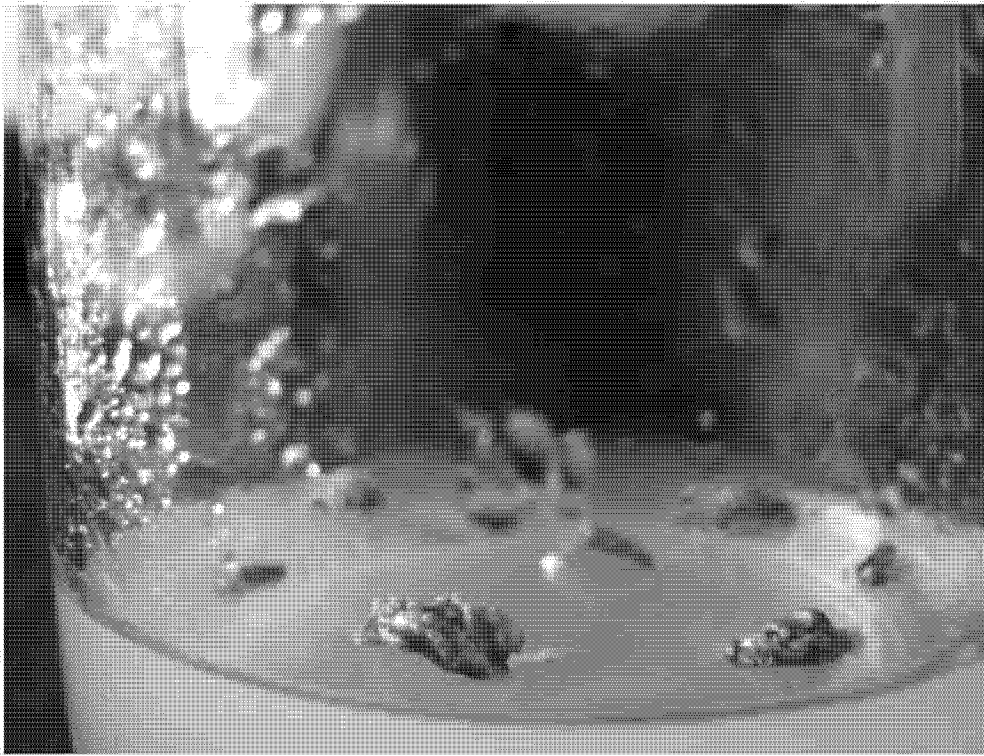


图 3

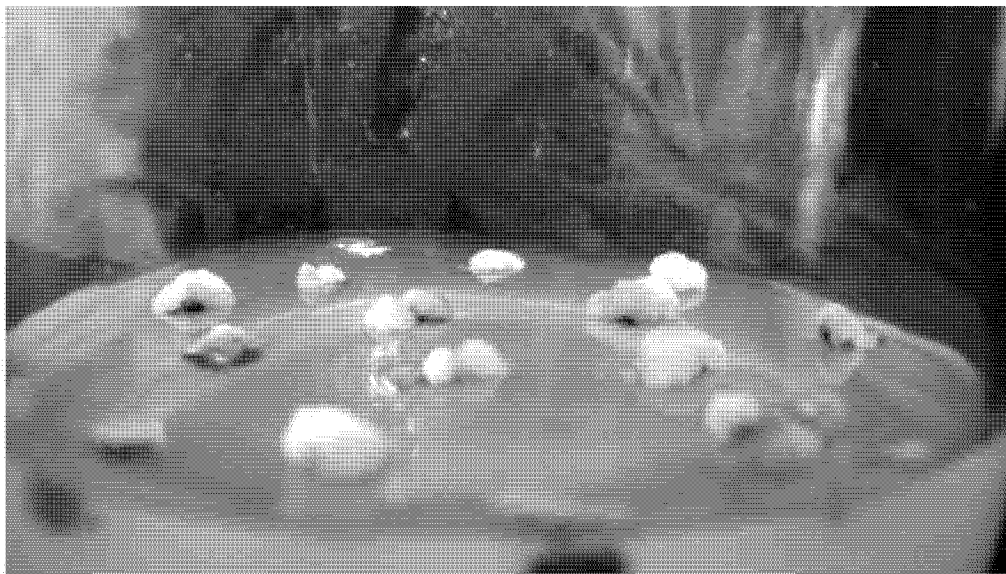


图 4



图 5

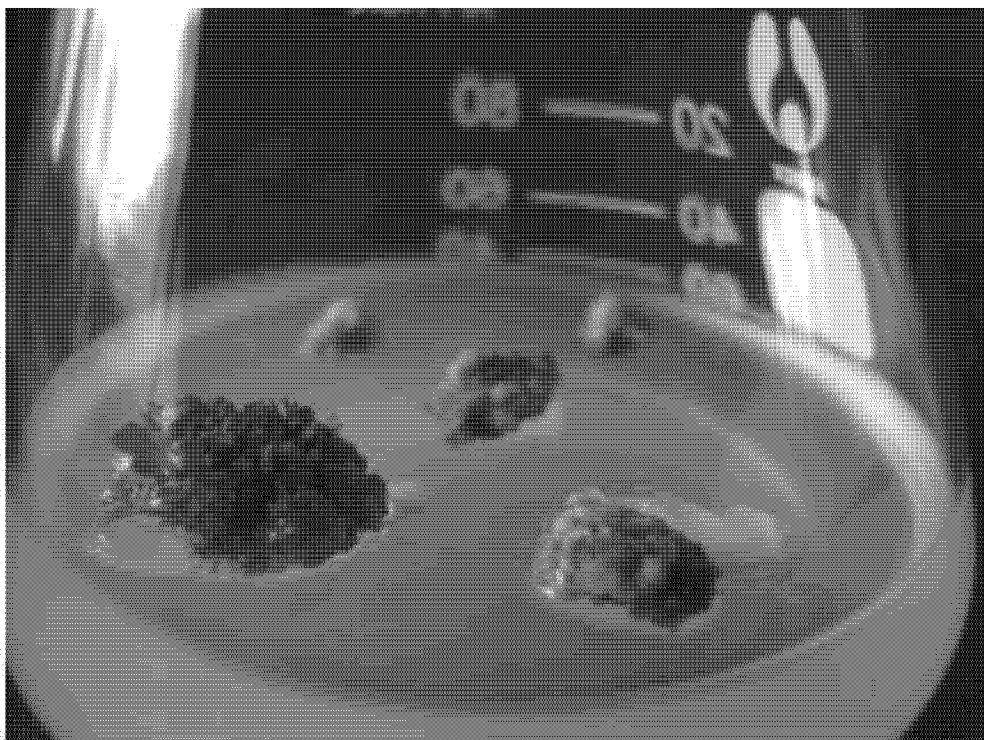


图 6



图 7



图 8

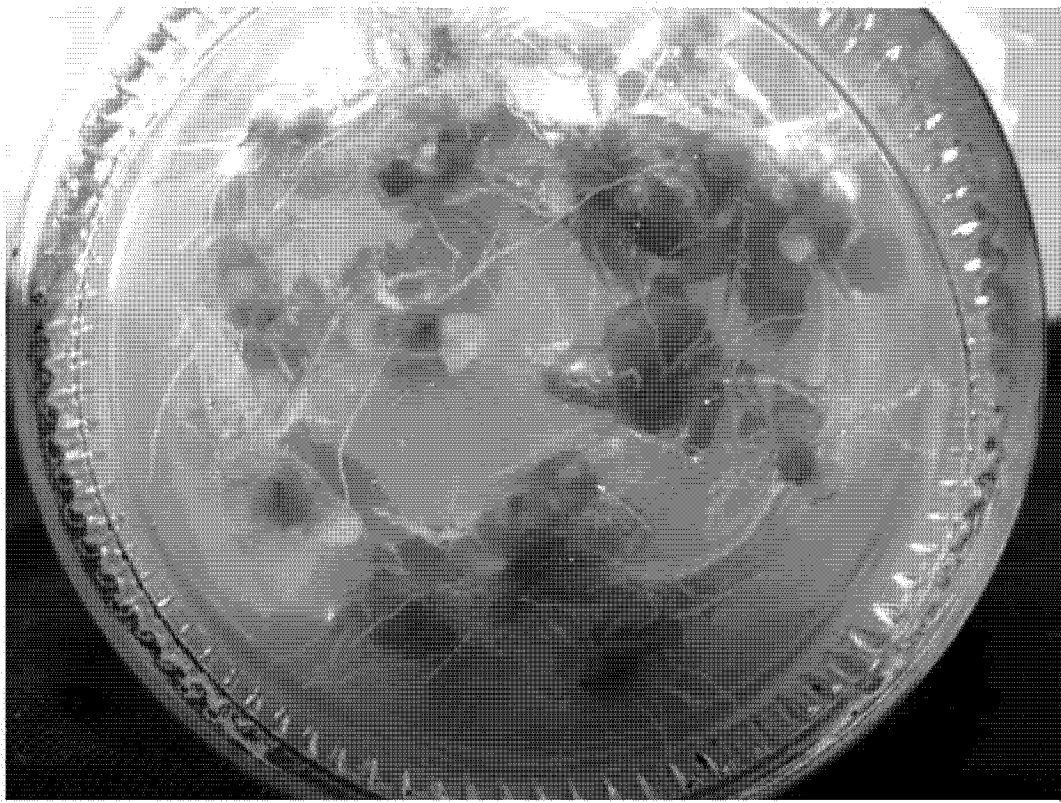


图 9