

真梅系梅花品种‘铁骨红’的离体繁殖

吕英民^{1,2*}, 曹亮¹, 张启翔^{1,2}

(¹北京林业大学园林学院, 北京 100083; ²国家花卉工程技术研究中心, 北京 100083)

摘要: 适合真梅系梅花品种‘铁骨红’生长的最佳培养基是改良 Q & L 培养基, 即 Quoirin and Lepoivre 培养基大量元素 + Perez 培养基微量元素 + MS 有机物 + 2 倍 MS 铁盐 + 4 mg · L⁻¹ AgNO₃ (注意 AgNO₃ 长时间使用会导致试管苗生长畸形), 最佳的增殖培养基是改良 Q & L 培养基 + 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.05 mg · L⁻¹ NAA + 0.5 mg · L⁻¹ GA₃; 最佳的生根培养基是 1/2 改良 Q & L 培养基 + 0.3 mg · L⁻¹ NAA + 0.1 mg · L⁻¹ IBA。

关键词: 梅; 组织培养; 离体快繁

中图分类号: S 685.17 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 04-1047-03

In Vitro Propagation of Prunus mume Cultivar ‘Tiegu Hong’

LÜ Ying-min^{1,2*}, CAO Liang¹, and ZHANG Qi-xiang^{1,2}

(¹College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ²China National Centre for Flower Engineering Technique, Beijing 100083, China)

Abstract: The optimum *in vitro* shoot section explants growing medium for *Prunus mume* cultivar Tiegu Hong was the modified Quoirin and Lepoivre medium supplemented with Quoirin and Lepoivre medium large elements, Perez medium trace elements, Murashige and Skoog medium (MS) organic compounds, and double MS Fe salt. This modified medium was used to resolve a series of problems faced in Tiegu Hong tissue culture such as seedling chlorosis and shoot tip death. The optimum proliferation medium for Tiegu Hong was the improved Quoirin and Lepoivre medium supplemented with 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA, 0.05 mg · L⁻¹ NAA and 4 mg · L⁻¹ AgNO₃. Attention should be paid to the application of AgNO₃ because of long period of use may lead to the plantlets malformation. The optimum rooting medium for Tiegu Hong was the improved 1/2 Quoirin and Lepoivre medium supplemented with 0.3 mg · L⁻¹ NAA and 0.1 mg · L⁻¹ IBA.

Key words: *Prunus mume*; Tissue culture; Fast *in vitro* micro-propagation

梅花是我国的传统名花, 有悠久的栽培历史和丰富的栽培品种, 但仅在世界少数几个国家栽培应用, 其中限制梅花出口的重要因素之一是病毒病, 所以培育无病毒梅花苗木十分重要。

梅花的离体快繁是建立遗传转化体系的前提, 无性系的建立以及试管苗的获得可以为下一步的转基因育种工作提供重要的试材, 也是愈伤组织诱导分化成苗培养试验中的一部分。

在梅花的离体培养中, 不同种系表现差异较大, 通常真梅系品种较难进行组织培养 (曹亮和吕英民, 2004)。

为解决真梅系朱砂型梅花品种‘铁骨红’组织培养过程中的黄化和茎顶端坏死等难题进行了本研究, 旨在探寻适合‘铁骨红’离体培养的基本培养基, 并且找到合适的植物生长调节剂种类及浓度, 解决培养中遇到的黄化等问题, 为进一步进行愈伤组织诱导再生植株奠定基础。

收稿日期: 2007-01-08; 修回日期: 2007-04-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371187)

* E-mail: luyingmin@bjfu.edu.cn

1 材料与方法

真梅系朱砂型梅花品种‘铁骨红’(图版, 1)的外植体取自无锡梅园。

4月上中旬选取当年生半木质化枝条, 去除表面污垢后剪成1~2 cm长的具节茎段, 每个茎段1~2个腋芽。

茎段用洗洁精浸泡10~20 min, 流水冲洗30 min, 用75%的酒精表面消毒30 s, 无菌水冲洗1次, 接着用0.1%的升汞消毒3~6 min, 吐温1~2滴, 无菌水冲洗5~6次, 之后放在灭过菌的培养瓶中待接种。

外植体启动培养的基本培养基选用1/2MS, 附加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + 3%蔗糖 + 0.6%琼脂, pH 5.8~6.0, 121℃高压灭菌20 min。培养条件为温度 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, 空气相对湿度60%左右, 光照强度1500~2000 lx, $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

当分化出芽后, 将其从外植体茎段上剥落放置在初代培养基中($1/2\text{MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA)进行培养, 观察其生长情况(图版, 2、3)。之后进行增殖培养和生根培养。试验中同一处理为30瓶, 每瓶3~4株, 同一设计重复3次。

污染率在接种后10~15 d内统计, 萌芽率在培养30 d后统计。数据采用SPSS软件进行分析, 进行差异显著性检验(ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 增殖培养

研究发现, 在‘铁骨红’增殖培养过程中, 培养基的大量元素直接影响试管苗发芽的数量及质量, 其中Quoirin and Lepoivre培养基(Quoirin & Lepoivre, 1977)是生长情况最好(生长量较大、芽数量较多, 芽平均长度较长)的培养基, 而MS则是生长情况最差的培养基, 芽的数量少而且增殖系数低。

解决试管苗黄化问题, 碳源因素占主导地位, 铁盐次之, AgNO_3 再次之。

在不同碳源的对比试验中, 使用蔗糖和果糖的培养基, 试管苗出现明显的顶端死亡现象。而在葡萄糖以及山梨醇作为碳源的培养基上, 顶端死亡现象则得到了很好的控制。考虑到成本因素, 还是使用葡萄糖作碳源为好。

另外, 当铁盐为2倍MS铁盐, AgNO_3 的浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时试管苗的黄化情况最不明显。需要注意的是, AgNO_3 过量重复使用会导致试管苗生长畸形, 因此在消除黄化现象后暂停使用。

通过正交试验发现, 增殖培养基中6-BA占主导因子, 其最佳组合是 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA。

一定浓度的 GA_3 对试管苗的增高生长起到了促进作用, 但是对组培苗增殖产生了一定的抑制作用, 并且当浓度达到 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时出现玻璃化现象, 增殖苗的小苗叶子开展不完全, 这种现象随着浓度增大而加剧, 并且出现黄化的速度很快, 最终导致了组培苗生长的畸形。因此, 在使用 GA_3 时浓度不能过高, 用 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 即可。

综上所述, ‘铁骨红’最佳的增殖培养基为改良Q & L培养基(Quoirin and Lepoivre培养基大量元素 + 2倍MS铁盐 + MS有机物 + $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNO_3) + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_3 (图版, 4)。

2.2 生根培养

‘铁骨红’试管苗的生根培养结果表明,生长素种类对生根影响显著,其中添加 NAA 的培养基上生根率较高,并且试管苗须根较多,但根系比较细弱。添加 IBA 的试管苗根比较粗壮,但根系较少。

$0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$ 组合处理使‘铁骨红’生根良好且生根数最多,根的质量较好;其次是 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ 和 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$,但三者之间差异并不显著。随着 NAA 和 IBA 浓度的增高,‘铁骨红’的生根数逐渐减少,生根率降低,愈伤组织的数量逐渐增多,因此不适宜根的生长,所以最适合的生根培养基为 $1/2$ 改良 Q & L + $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$ (图版, 5)。

References

Cao Liang, Lü Ying-min. 2004. Present state and progress of tissue culture in *Prunus* spp. In: Zhang Qi-xiang ed. Advances in ornamental horticulture of China. Beijing: China Forestry Press; 163 - 171. (in Chinese)

曹 亮, 吕英民. 2004. 梅花等李属植物组织培养研究现状及展望. 见: 张启翔主编. 中国观赏园艺研究进展. 北京: 中国林业出版社: 163 - 171.

Quoirin M, Lepoivre P. 1977. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* spp. Acta Horti., 78: 437 - 442.



图版说明: 1. 梅花品种‘铁骨红’; 2, 3. 启动培养; 4. 增殖苗; 5. 生根。

Explanation of plates: 1. *Prunus mume* cultivar ‘Tiegu Hong’; 2, 3. Initial culture; 4. Proliferation plantlet; 5. Rooting.