

不同种系梅花品种组织培养繁殖研究

吕英民 曹 亮 张启翔

(北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心)

摘要:梅花组培离体繁殖生根非常困难,为了解决不同梅花种系离体组织培养生根困难的问题,为生产梅花脱毒苗和进行转基因操作,该文以‘铁骨红’梅(真梅系)、“美人”梅(樱李梅系)和“燕杏”梅(杏梅系)为试验材料,建立了梅花的外植体生长、扩繁、生根的基本培养程序。其中适合‘铁骨红’生长的最佳培养基是改良 QL 培养基,即 QL 大量元素 + P 培养基微量元素 + MS 有机成分 + 2 倍 MS 铁盐 + 30 g/L 葡萄糖,该培养基解决了黄化、顶端死亡等组织培养中比较严重的问题;最佳的增殖培养基是改良 QL + 1.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA + 0.5 mg/L GA₃;最佳的生根培养基是 1/2 改良 QL + 0.3 mg/L NAA + 0.1 mg/L IBA。‘美人’梅和‘燕杏’的增殖培养基分别是 WPM + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 和 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L IBA;生根培养基分别是 1/2 WPM + 0.5 mg/L NAA 和 1/2 MS + 0.5 mg/L IBA。

关键词: 梅花; 组织培养; 茎段外植体; 离体快繁

中图分类号: S685.17; S722.3⁺7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1522(2008)03-0074-06

LÜ Ying-min; CAO Liang; ZHANG Qi-xiang. **Micro-propagation of *Prunus mume* cultivars for different groups in vitro**. *Journal of Beijing Forestry University* (2008) 30 (3) 74-79 [Ch, 6 ref.] National Floriculture Engineering Research Centre, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China.

It is very difficult to make *Prunus mume* root *in vitro*. In order to resolve this problem, produce virus-free *Prunus mume* seedlings and handle in gene engineering, three *Prunus mume* groups including ‘Tie Guhong’ (Zhenmei Group), ‘Meiren’ (Yinglimei Group) and ‘Yanxing’ (Xingmei Group) are chosen as materials to be micro-propagated *in vitro*. A complete micro-propagation protocol is developed for these three *Prunus mume* cultivars. The optimum *in vitro* growing medium for ‘Tie Guhong’ was observed on modified Quoirin and Lepoivre medium (QL) supplemented with QL large elements, Perez medium trace elements, Murashige and Skoog medium (MS) organic compounds, double MS Fe salt and 30 g/L glucose. This modified medium is used to resolve the serious problems in ‘Tie Guhong’ tissue culture such as seedling chlorosis and shoot tip death. The optimum proliferation medium for ‘Tie Guhong’ was observed on improved QL medium supplemented with 1.0 mg/L 6-BA, 0.05 mg/L NAA and 0.5 mg/L GA₃. The optimum rooting medium for ‘Tie Guhong’ was observed on improved 1/2 QL supplemented with 0.3 mg/L NAA and 0.1 mg/L IBA. The optimum proliferation medium for ‘Meiren’ was improved WPM medium supplemented with 1.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA. The optimum proliferation medium for ‘Yanxing’ was improved MS medium supplemented with 0.5 mg/L 6-BA and 0.05 mg/L IBA. The optimum rooting medium for ‘Meiren’ was improved 1/2 Woody Plant Medium (WPM) supplemented with 0.5 mg/L NAA and the optimum rooting medium for ‘Yanxing’ was improved 1/2 MS medium supplemented with 0.5 mg/L IBA.

Key words *Prunus mume*; tissue culture; shoot section explants; fast micro-propagation *in vitro*

收稿日期: 2007-03-02

<http://www.bjfujournal.cn>, <http://journal.bjfu.edu.cn>

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371187)。

第一作者: 吕英民, 博士, 副教授。主要研究方向: 园林植物资源与育种。电话: 010-82376017 转 601 Email: Luyingmin@bjfu.edu.cn 地址: 100083 北京林业大学园林学院。

梅花是我国的传统名花,在我国有悠久的栽培历史和丰富的栽培品种。但是梅花还只是在世界少数几个国家栽培应用^[1],其中限制梅花出口的重要因素就是病毒,所以培育无病毒梅花苗木是十分重要的。与此同时梅花的离体快繁工作是建立梅花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,同时也是下一步愈伤组织诱导分化成苗培养试验中的一部分^[2]。

目前通过茎段培养建立植物无性快繁体系,已经成为科研及生产育苗的重要手段。而在梅花上取得的进展还很小,只是个别梅花品种实现了组织培养离体繁殖^[3-5]。梅花目前有300多个品种,分属不同的系和型^[1],各个品种在组织培养过程中存在很大差异,同时在培养过程中经常出现黄化、增殖系数低、顶端死亡等问题^[2]。因此,本研究旨在探寻适合不同种系梅花离体培养的基本培养基,并且找到合适的激素种类以及浓度,解决培养中遇到的黄化等问题,建立若干梅花品种的离体快繁体系,尤其是真梅品种群的离体快繁体系,从而为进一步愈伤组织诱导再生植株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用的外植体取材于北京林业大学梅菊圃和无锡梅园,分别是杏梅系单瓣杏梅型的‘燕杏’、樱李梅系美人梅型的‘美人’梅以及真梅系朱砂型的‘铁骨红’共3个品种。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体预处理

春季(无锡地区4月上中旬、北京地区5月份)选取优良的梅花栽培品种生长期生长旺盛的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。用洗洁精浸泡10~20 min,流水冲洗30 min,之后在超净工作台上进行表面灭菌。其他季节(花芽开始分化以后)则选取生长健壮的徒长枝为外植体,用75%的酒精表面消毒30 s,用无菌水冲洗1次,接着用0.1%的升汞消毒3~6 min(根据不同材料种类选择不同的消毒时间),吐温1~2滴,无菌水冲洗5~6次,之后放在事先灭过菌的培养瓶中待接种。

1.2.2 外植体的启动培养

基本培养基选择1/2MS,附加1.0 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA + 3%蔗糖 + 0.6%琼脂粉,pH值5.8~6.0,121℃高压灭菌20 min。培养条件为:培养温度

(23±2)℃,空气相对湿度为60%左右,光照强度为1 500~2 000 lx,光照时间为14 h/d。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(1/2MS + 0.5 mg/L BA + 0.05 mg/L NAA)进行培养,观察其生长情况。

1.2.3 结果统计

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。

2 结果与分析

2.1 启动培养

2.1.1 不同基因型与诱导率之间的关系

不同种系、型和品种之间都存在着一定的差异。属于真梅系朱砂型的‘铁骨红’的诱导率为66.2%,樱李梅系美人梅型的‘美人’梅的诱导率为90.7%,杏梅系单瓣杏梅型的‘燕杏’梅的诱导率为82.5%,诱导率大小的顺序为樱李梅系>杏梅系>真梅系,这说明基因型对梅花的组织培养有着重要的影响。

2.2 增殖培养

2.2.1 梅花品种的初培养

梅花在诱导培养基中萌发以后,将其萌发的茎段从原先的外植体上切割下来,移入初代培养基中(1/2MS培养基)进行观察,根据试管苗茎的伸长,叶片是否平展、叶片的颜色以及基部切口愈伤组织的量、颜色及致密度来判断初次继代培养基的激素配比。表1是3个梅花品种初代培养的情况。

表1 3个梅花品种初代培养情况
TABLE 1 The preliminary culture situation of three *Prunus mume* cultivars

品种	茎伸长情况	莲座	叶片生长状况	基部愈伤组织
‘铁骨红’	较低	无	叶片黄化及茎尖端死亡	有
‘美人’梅	正常	无	叶片生长情况正常	有
‘燕杏’	正常	有	正常,无黄化现象	有

2.2.2 增殖培养基的选择

2.2.2.1 ‘铁骨红’增殖基本培养基的选择

研究发现,在‘铁骨红’增殖培养过程中,培养基大量元素的种类直接影响试管苗发芽的数量以及质量,其中QL培养基是生长情况最好(生长量较大、芽的数量较多、芽的平均长度较长)的培养基,而MS则是生长情况最差的培养基,不仅芽的数量少而且整个试管苗的增殖系数较低,而M₂培养基虽然从生长量上来说与QL相比略高,但是其增殖系数相对较低,并且试管苗伴随着一定的玻璃化,因此也不

是最理想的培养基(见表2)。

表2 ‘铁骨红’增殖基本培养基的培养结果比较

TABLE 2 The comparison of culture results among basic proliferation media of ‘Tie Guhong’

培养基	芽的数量	芽的平均长度/mm	生长量/mm	增殖系数
QL	4.17a	9.23a	36.88a	3.23a
MS	1.90c	11.95a	21.52b	1.78c
WPM	2.31bc	9.75a	20.17b	2.45bc
M ₁	2.90b	9.03a	24.27b	2.83b
M ₂	3.72a	10.88a	37.67a	2.90b
M ₃	2.40bc	8.99a	20.71b	1.97c

注:在同一列数值后的不同字母表示 $P=0.05$ 水平差异显著。表3、5、6、8、9 同此。

2.2.2.2 ‘美人’梅、‘燕杏’增殖基本培养基的筛选

从表3可以看出,‘美人’梅、‘燕杏’各自最佳的增殖培养基分别是WPM以及MS培养基,其生长情况良好,增值系数均已达到3倍以上,符合离体培养的基本要求。对于‘美人’梅而言,MS培养基的增殖系数非常低,并且芽的数量也较少;‘燕杏’两种培养基的差异不是十分显著,MS培养基的生长量略高于WPM培养基,生产中两种都可以用,方便起见选用MS培养基。

表3 ‘美人’梅、‘燕杏’增殖基本培养基的筛选

TABLE 3 Selection of optimal media on proliferation for ‘Meiren’ and ‘Yanxing’

品种	培养基	芽的数量	试管苗的平均高度/cm	生长量/cm	增殖系数
‘美人’梅	MS	2.34b	2.63b	6.15b	1.48b
	WPM	3.25a	3.05a	10.22a	3.05a
‘燕杏’	MS	3.68a	4.25a	16.64a	3.45a
	WPM	3.36a	4.05a	13.61a	3.32a

2.2.2.3 ‘铁骨红’增殖培养过程中黄化问题的解决

木本植物组织培养过程中试管苗黄化是一个经常遇见的问题,通常的解决方案有降低培养基中铁盐的浓度以确定植物是否因为缺铁而导致叶片黄化。此外,离体培养中的植物组织会产生和散发乙烯,而乙烯在培养容器中的积累会影响培养物的生长和分化,严重时会导致培养物的衰老和落叶。 AgNO_3 中的 Ag^+ 通过竞争性地结合细胞膜上的乙烯受体蛋白,从而可起到抑制乙烯活性的作用。本文同时研究了铁盐和乙烯抑制剂硝酸银不同浓度对改善梅花试管苗黄化现象的效果。由表4可见,在低浓度(1水平)铁盐MS培养基中,3个浓度的硝酸银培养条件下,试管苗黄化都没有得到改善,而在较高浓度(2水平和3水平)铁盐MS培养基中,不同浓度的硝酸银培养条件下,梅花试管苗黄化都得到了改善,尤其是在硝酸银2水平,即 AgNO_3 的浓度为4 mg/L时试管苗的黄化现象最不明显。综合以上结果认为,引起梅花试管苗黄化的主要原因是缺铁导

致的,在增加铁盐浓度后,黄化得到很大改善;乙烯引起黄化不是主要原因,但是硝酸银浓度过低或过高反过来影响铁元素发挥改善作用。

表4 不同浓度铁盐和 AgNO_3 对梅花试管苗生长的影响

TABLE 4 Effects of different concentrations of AgNO_3 and Fe on Mei flower culture *in vitro*

培养基	铁盐	AgNO_3 浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	试管苗黄化情况			
			I	II	III	$\bar{x}$
1	1(1倍MS)	1(2)	1.7	1.6	1.8	1.7
2	1	2(4)	2.2	2.3	2.4	2.3
3	1	3(8)	1.8	1.7	1.6	1.7
4	2(2倍MS)	1	3.8	3.7	3.9	3.8
5	2	2	4.3	4.1	4.5	4.3
6	2	3	3.6	3.7	3.4	3.57
7	3(3倍MS)	1	4.2	4.1	4.2	4.17
8	3	2	4.5	4.4	4.4	4.43
9	3	3	3.8	3.6	3.5	3.63
K1	5.70	9.67				
K2	11.67	11.03				
K3	12.23	8.90				
k1	1.900	3.057				
k2	3.723	3.677				
k3	4.077	2.967				
R	2.177	0.710				

注:考核指标试管苗生长情况分为3个等级:即好、中、差,分别记为5(叶片全绿生长完全正常)、4(叶片有黄化现象,但是生长正常)、3(有黄化,生长不正常有掉叶现象)、2(黄化现象严重,掉叶现象严重)、1(黄化严重,植株死亡)。

2.2.2.4 碳源对‘铁骨红’茎顶端死亡的影响

在不同碳源的对比试验中,使用蔗糖以及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,则顶端死亡的现象得到了很好的控制。因此在下一步的试验中碳源使用葡萄糖或者山梨醇,但是考虑到成本因素,还是使用葡萄糖作为‘铁骨红’离体培养的碳源。

综上所述,‘铁骨红’最佳的增殖生长的基本培养基为改良QL培养基,即QL大量元素+P培养基微量元素+MS有机成分+2倍MS铁盐+30 g/L葡萄糖。该培养基解决了组培苗黄化、顶端死亡等组培中比较严重的问题。‘铁骨红’增殖苗见图1。

2.2.2.5 增殖培养基最佳激素配比的筛选

2.2.2.5.1 ‘铁骨红’细胞分裂素种类的筛选

在QL改良基本培养基中添加3种细胞分裂素6-BA、KT、ZT,每个细胞分裂素选取两个浓度,生长素选用NAA,浓度0.1 mg/L。在转接后40~50 d观察两培养基对‘铁骨红’芽的增殖效果,结果见表5。

组织培养常用的细胞分裂素有6-BA、KT和ZT,对梅花的增殖有不同的效果。从表5可以看出,这3种细胞分裂素培养的‘铁骨红’试管苗综合效果6-BA和ZT优于KT,而且增殖系数也差异显著,尤其是当6-BA和ZT浓度都在0.5 mg/L时,增殖系数

远高于 KT 0.1 mg/L 浓度的增殖系数。但是试管苗高度随着细胞分裂素种类和浓度变化差异不是十分明显,综合考虑在‘铁骨红’的增殖培养过程中细胞分裂素选用 6-BA,虽然 ZT 的效果好于 6-BA,但是考虑到成本因素还是选用 6-BA 作为首选的激素。

表 5 细胞分裂素种类对试管苗生长的影响

TABLE 5 Effects of cytokinin on the growth of plantlets

细胞分 裂素	浓度/ (mg·L ⁻¹)	平均增 殖系数	平均株 高/cm	生长状况
6-BA	0.1	1.56c	3.25b	试管苗较健壮,丛生芽少
	0.5	2.86a	2.34d	植株丛生芽紧密,有的枯萎
KT	0.1	1.23d	2.68c	丛生芽少,生长正常
	0.5	2.27b	2.53cd	丛生芽多,生长正常
ZT	0.1	2.36b	3.67a	试管苗较健壮,丛生芽少
	0.5	2.97a	1.86e	丛生芽多,无枯萎

2.2.5.2 ‘铁骨红’生长素种类的确定

组织培养常用的生长素有 IAA、IBA 和 NAA。从表 6 可以看出,在培养基中添加不同种类和浓度的生长素时,试管苗的增殖、增高和试管苗整体表现都有差异,总体表现是 3 种生长素的高浓度(0.20 mg/L)对试管苗增殖效果都优于各自的低浓度(0.05 mg/L),但是综合表现最好的是 NAA 的 0.05 mg/L 浓度,培养效果最好,不仅增殖系数高,平均株高明显,而且生长状况也最理想。

表 6 生长素种类对试管苗生长的影响

TABLE 6 Effects of plant growth regulators on the growth of plantlets

生长素	浓度/ (mg·L ⁻¹)	平均增 殖系数	平均株 高/cm	生长状况
IAA	0.05	2.08c	3.40b	基部叶片发黄
	0.20	2.88a	2.00e	植株丛生芽紧密,有的枯萎
IBA	0.05	2.23c	2.50cd	丛生芽紧密,不枯萎
	0.20	2.63b	2.30d	丛生芽多,基部呈水渍状
NAA	0.05	2.52b	3.80a	丛生芽多,无枯萎
	0.20	3.08a	2.70c	丛生芽少,有枯萎现象

2.2.5.3 ‘铁骨红’最佳增殖激素配比的筛选

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 1.0mg/L6-BA + 0.05mg/L

NAA(见表 7)。

表 7 ‘铁骨红’最佳增殖激素配比的筛选

TABLE 7 Selection of optimal growth regulators on proliferation for ‘Tie Guhong’

培养基	6-BA 浓度/ (mg·L ⁻¹)	NAA 浓度/ (mg·L ⁻¹)	试管苗平均增殖系数			
			I	II	III	$\bar{x}$
1	1(0.2)	1(0.05)	1.68	1.72	1.54	1.65
2	1	2(0.1)	1.83	1.65	1.74	1.74
3	1	3(0.2)	1.33	1.21	1.12	1.22
4	2(0.5)	1	2.34	2.12	1.84	2.10
5	2	2	2.22	2.38	2.16	2.25
6	2	3	1.89	2.14	2.01	2.01
7	3(1.0)	1	3.20	2.84	2.90	2.98
8	3	2	2.88	3.10	2.76	2.91
9	3	3	2.69	2.83	3.02	2.85
K1	4.61	6.73				
K2	6.36	6.90				
K3	8.74	6.08				
k1	1.537	2.243				
k2	2.120	2.300				
k3	2.913	2.027				
R	1.376	0.273				

2.2.5.4 ‘美人’梅、‘燕杏’最佳增殖激素配比的筛选

研究发现(表 8),‘美人’梅的增殖培养过程中生长素 IBA 与 NAA 对试管苗的增殖系数差异不显著,因而在试验中可以选择 NAA 作为增殖培养基中的生长素。当 6-BA 浓度达到 1.0 mg/L 时试管苗丛生芽相对较多,但是苗相对 6-BA 0.5 mg/L 时细弱,仅仅作为增殖培养基可以使用,试管苗生根时可以增加一个壮苗阶段。因此在增殖阶段可以选择 WPM + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA。‘燕杏’的最佳增殖培养基选择中,IBA 的效果好于 NAA,其增殖系数明显大于 NAA 的数值,因此选择 IBA 作为增殖培养基中的生长素。当培养基中的激素浓度水平较高时 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IBA,试管苗基部有较多的愈伤组织生成,影响试管苗的正常生长,因此‘燕杏’最佳增殖培养基选择 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L IBA(‘美人’梅、‘燕杏’增殖苗见图 2、3)。

表 8 ‘美人’梅和‘燕杏’最佳增殖激素配比的筛选

TABLE 8 Selection of optimal growth regulators on proliferation for ‘Meiren’ and ‘Yanxing’

品种	激素浓度/(mg·L ⁻¹)	增殖系数	试管苗生长情况
‘美人’梅	6-BA1.0 + NAA0.1	4.51a	试管苗细弱,增殖系数较高
	6-BA0.5 + NAA0.05	3.12c	试管苗生长健壮
	6-BA1.0 + IBA0.1	4.13a	试管苗细弱,增殖系数较高
‘燕杏’	6-BA0.5 + IBA0.05	3.42b	试管苗生长健壮
	6-BA1.0 + NAA0.1	3.96a	试管苗细弱,基部多愈伤组织
	6-BA0.5 + NAA0.05	3.12c	试管苗生长健壮
	6-BA1.0 + IBA0.1	4.13a	试管苗细弱,基部多愈伤组织
	6-BA0.5 + IBA0.05	3.42b	试管苗生长健壮

2.2.5.5 GA₃ 对芽体生长的影响

从表 9 的数据可以看出,GA₃ 在一定浓度上对试管苗的高生长起到了促进作用,但是对组培苗增殖起了一定的抑制作用。当 GA₃ 浓度达到 1.0 mg/L 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,最终导致组培苗生长的畸形。因此,在使用 GA₃ 时浓度不能过高,用 0.5 mg/L 即可。

综上所述,‘铁骨红’的最佳增殖培养基为改良 QL + 1.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA + 0.5 mg/L GA₃。

表 10 不同浓度的植物生长素对‘铁骨红’生根的影响
TABLE 10 Effects of plant growth regulators on ‘Tie Guhong’ rooting

激素	浓度/(mg·L ⁻¹)	平均生根数	平均根长/cm	生根率/%	根的生长情况
NAA	0.1	3.3b	2.7c	56.7b	根生长较慢
	0.3	3.7a	3.0b	63.3ab	发根较多,有根毛
	0.5	2.1d	2.5d	38.7d	基部愈伤组织较多,根部褐化严重
IBA	0.1	2.6c	2.8c	43.5c	发根较少,根粗壮
	0.3	3.5b	3.1b	52.5b	发根较多,粗壮
	0.5	2.0d	2.2e	36.4d	愈伤组织多,根呈褐色
NAA + IBA	0.3 + 0.1	3.9a	3.2b	63.6ab	发根较多,根粗壮,有根毛
	0.3 + 0.3	3.5b	3.8a	75.5a	基部愈伤组织较多,根部褐化严重

‘铁骨红’试管苗的生根培养结果表明(表 10),生长素种类对生根影响显著,其中 NAA 生根率较高,并且试管苗须根较多,但是根系比较细弱。添加 IBA 的试管苗根比较粗壮,但是根系较少。试管苗生根质量是炼苗移栽成活的关键,选择适当的生长素浓度非常重要。从表 10 中可以看出,分别添加 NAA 和 IBA 时,低浓度(0.1 mg/L)和高浓度(0.5 mg/L)时都比 0.3 mg/L 浓度时的生根数、根长和生根率低,所以单独使用 NAA 和 IBA 的最佳浓度为 0.3 mg/L。NAA 和 IBA 联合使用时,同时考虑根的生长情况,最适合的生根培养基为 1/2 改良 QL + 0.3 mg/L NAA + 0.1 mg/L IBA。总之,‘铁骨红’属于比较难

表 11 不同浓度的植物生长素对‘美人’梅和‘燕杏’生根的影响
TABLE 11 Effects of plant growth regulators on ‘Meiren’ and ‘Yanxing’ rooting

品种	激素	浓度/(mg·L ⁻¹)	平均生根数	平均根长/cm	生根率/%	根的生长情况
‘美人’梅	NAA	0.3	5.8b	3.8a	88.6b	发根较多,有二级根,有根毛
		0.5	6.2a	3.5b	90.2a	基部愈伤组织较多,发根较多,二级根明显
	IBA	0.3	3.4d	3.0c	80.4d	发根较多,粗壮
		0.5	4.3c	3.5b	85.5c	愈伤组织多,分根较多,粗壮
‘燕杏’	NAA	0.3	3.3d	4.0a	72.5d	发根较多,有二级根,有根毛
		0.5	4.1c	3.5c	85.63b	基部愈伤组织较多,发根较多
	IBA	0.3	4.9b	3.8b	80.25c	发根较多,粗壮
		0.5	5.4a	3.6c	90.36a	愈伤组织多,分根较多,粗壮

3 讨论与结论

梅花属于离体难以生根的顽拗型植物类型,同

表 9 GA₃ 对‘铁骨红’组织培养的影响

GA ₃ 浓度/ (mg·L ⁻¹)	增殖系数	试管苗平均 高度/cm	试管苗生长情况
0(CK)	2.5a	3.1c	芽体高度较低
0.1	2.7a	3.5b	芽体高度较低
0.5	2.3b	4.0a	有一定的高生长, 试管苗生长正常
1.0	2.0c	4.2a	试管苗较高,芽体开始 出现透明状玻璃化现象

2.3 生根培养

2.3.1 ‘铁骨红’的生根培养

生根剂选用 NAA 以及 IBA,对比其不同的生根效果,试验结果见表 10。

生根的品种(‘铁骨红’生根情况见图 4)。

2.3.2 ‘美人’梅和‘燕杏’的生根培养

从表 11 可以看出,‘美人’梅相对于‘铁骨红’而言生根较为容易,使用 NAA 时平均生根率可以达到 85%以上,其中 0.5 mg/L NAA 生根率最高,并且有明显的二级根,IBA 的生根率相对于 NAA 较少,达到显著性差异。因此,在‘美人’梅生根时选用 WPM + 0.5 mg/L NAA(‘美人’梅生根情况见图 5)。

对于‘燕杏’IBA 的生根效果好于 NAA,并且在 0.5 mg/L IBA 时生根率达到 90%以上,因此在‘燕杏’的生根培养时选择 1/2MS + 0.5 mg/L IBA(‘燕杏’生根情况见图 6)。

时梅花不同种系的离体培养表现差异也非常大,通常真梅系品种最难进行离体组织培养。目前梅花的一个重要的育种方向就是培育出具有典型梅香且抗



图1 ‘铁骨红’增殖苗



图2 ‘美人’梅增殖苗



图3 ‘燕杏’增殖苗

FIGURE 1 Proliferation plantlets of ‘Tie Guhong’ FIGURE 2 Proliferation plantlets of ‘Meiren’ FIGURE 3 Proliferation plantlets of ‘Yanxing’



图4 ‘铁骨红’生根

FIGURE 4 Rooting of ‘Tie Guhong’



图5 ‘美人’梅生根

FIGURE 5 Rooting of ‘Meiren’



图6 ‘燕杏’生根

FIGURE 6 Rooting of ‘Yanxing’

寒能够在北方地区露地越冬的品种。要培育出这样的品种来,如果采用现代的转基因育种技术则需要从广大的真梅系里面选择香味浓郁的品种并且建立遗传转化再生体系,最终导入抗寒基因^[6]。而遗传转化体系建立的前提是必须有一个完整的离体快繁体系作为基础的技术支撑。因此,真梅系的组织培养对于梅花的育种工作来说有着重要的意义。

通过前面的试验发现真梅系品种组培有以下3个难点:试管苗叶片黄化问题、茎顶端死亡问题、增殖倍率低问题。而这些问题在前人关于真梅系品种组织培养过程未见成功解决的报道,因而组培的难度较大。通过本研究一系列的试验发现需要从培养基的大量元素(主要是培养基中铵态氮和硝态氮的比例以及 Ca^{2+} 的含量)、铁盐的浓度、碳源种类入手,而通常的尤其是草本植物的组织培养一般只需要研究激素的种类以及浓度问题就可以建立一个品种的离体快繁体系,因此抓住问题的主要矛盾及矛盾的主要方面至关重要。

通过对3个梅花品种的茎段诱导,筛选出最佳的外植体取材时间以及取材部位,并且发现茎段诱导培养的难易程度与品种的基因型有着密切的关系,通常情况下,诱导率大小顺序为樱李梅系>杏梅系>真梅系。

本研究建立了3个梅花品种的离体快繁体系,解决了真梅系品种‘铁骨红’组织培养过程中黄化、

茎顶端死亡的难题。‘铁骨红’最佳培养基组成:增殖阶段为改良 QL + 1.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA + 0.5 mg/L GA_3 ,生根阶段为 1/2 改良 QL + 0.3 mg/L NAA + 0.1 mg/L IBA;‘美人’梅最佳培养基组成:增殖阶段为 WPM + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA,生根阶段为 1/2 WPM + 0.5 mg/L NAA;‘燕杏’最佳培养基组成:增殖阶段为 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L IBA,生根阶段为 1/2 MS + 0.5 mg/L IBA。

参 考 文 献

- [1] 陈俊愉.中国梅花品种图志[M].北京:中国林业出版社,1989.
CHEN J Y. *Mei flower cultivars of China* [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1989.
- [2] 曹亮,吕英民.梅花等李属植物组织培养研究现状及展望[C]//张启翔.中国观赏园艺研究进展.北京:中国林业出版社,2004:163-171.
CAO L, LÜ Y M. Present state and progress of tissue culture in *Prunus* spp. [C]//ZHANG Q X. *Advances in ornamental horticulture of China*. Beijing: China Forestry Publishing House, 2004:163-171.
- [3] HARADA H, MURAI Y. Micropropagation of *Prunus mume* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1996, 36(4):265-267.
- [4] OLAYA P T, LORENZO B. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2000, 63(2):133-141.
- [5] QUOIRIN M, LEPOIVRE P. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* spp. [J]. *Acta Horti*, 1977, 78(6):437-442.
- [6] 吕英民,陈俊愉.梅花遗传育种研究进展[C]//张启翔.中国观赏园艺研究进展.北京:中国林业出版社,2004:143-148.
LÜ Y M, CHEN J Y. Genetic breeding of Mei flower (*Prunus mume*) [C]//ZHANG Q X. *Advances in ornamental horticulture of China*. Beijing: China Forestry Publishing House, 2004:143-148.

(责任编辑 董晓燕)