

杨丽青, 杨洁, 毛庆山, 等. “小绿萼”梅离体快繁体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 62–64.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.020

“小绿萼”梅离体快繁体系的建立

杨丽青¹, 杨洁¹, 毛庆山², 包满珠¹, 张俊卫¹

(1. 华中农业大学园艺林学学院, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 湖北武汉 430070; 2. 中国梅花研究中心, 湖北武汉 430074)

摘要:以梅花品种小绿萼 1 年生枝条为试验材料, 研究了采样时间、初代培养基、基本培养基和激素组合等对带芽茎段离体繁殖的影响。结果表明: (1) 最佳采样时间为 4—6 月; (2) 最佳腋芽诱导培养基为 $1/2\text{ MS} + 1.0\text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.5\text{ mg/L KT} + 0.1\text{ mg/L NAA}$; (3) 最佳增殖培养基 $\text{QL} + 0.5\text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.05\text{ mg/L NAA}$, 增殖系数为 4.27; (4) 无茵苗在 200 mg/L IBA 浸渍处理数秒后, 移植到 $1/2\text{ QL}$ 培养基中, 生根率为 80%。

关键词: 梅花; 离体快繁; 茎段; 培养基

中图分类号: S685.170.4⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0062-03

梅是原产中国的传统名花, 有悠久的栽培历史和丰富的栽培品种, 具有极高的观赏价值和经济价值。在生产上, 梅花以扦插、嫁接等无性繁殖为主, 虽然能保持品种的优良性状, 但是繁殖系数小, 周期长。利用组培快繁技术, 不仅可在短期内快速大量繁殖基因型一致的优质苗木, 而且可获得无病毒苗木, 大大加快了育苗进程和提高了苗木质量。自 Harada 等^[1]开展梅茎段离体繁殖以来, 国内外在梅的离体快繁上取得了较快的进展^[2-5], 但目前仍存在建立快繁体系的梅花品种少, 部分品种在快繁过程中出现顶芽坏死、叶片黄化等难题。小绿萼是武汉地区的梅花老品种, 具有极高的观赏价值。本研究旨在分析茎段采集时间、启动和增殖培养基对小绿萼离体繁殖的影响, 以期建立其快繁体系, 为该品种的应用推广提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料采于武汉市磨山中国梅花研究中心, 除 8—9 月份停止采样, 分别在 3—11 月中旬采集梅花品种小绿萼 (图 1-A) 1 年生枝条, 用冰盒带回实验室。

1.2 方法

1.2.1 外植体灭菌及初代培养 采集回来的枝条剪成 1~2 cm 长的具节茎段, 每茎段 1~2 个腋芽。用洗洁精浸泡 10~20 min, 流水冲洗 30 min 后在超净工作台上用 75% 乙醇浸润 30 s, 转入 0.1% HgCl_2 中消毒 8~15 min, 然后用无菌水冲洗 6~7 次, 无菌滤纸拭干后接种于初代培养基 ($1/2\text{ MS} + 1.0\text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.1\text{ mg/L NAA}$); 为分析不同初代培养基对腋芽诱导的影响, 以 4 月中旬采集的小绿萼枝条为材料, 灭菌后接种至 2 种不同初代培养基: $1/2\text{ MS} + 1.0\text{ mg/L } 6\text{-BA} +$

0.1 mg/L NAA 和 $1/2\text{ MS} + 1.0\text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.1\text{ mg/L NAA} + 0.5\text{ mg/L KT}$ 。每处理 20 个外植体, 重复 3 次, 接种 30 d 后统计诱导率, 污染率在接种后 10~15 d 内统计。

1.2.2 腋芽增殖培养 将伸长到 1~2 cm 的腋芽切下, 分别转入添加了 $1.0\text{ mg/L } 6\text{-BA}$ 和 0.1 mg/L NAA 的 3 种基本培养基和添加不同浓度 6-BA 和 NAA 组合的 QL 培养基中, 观察腋芽的增殖, 每处理 10 个外植体, 重复 3 次, 记录植株高度, 生长情况, 接种 5 周后统计腋芽增殖情况。

1.2.3 从生长度对继代的影响 待腋芽增殖形成的丛生芽伸长到不同长度 (0.1、0.5~1、1~2 cm) 时, 将其从基部切下, 放入继代培养基 ($1/2\text{ MS} + 1.0\text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.1\text{ mg/L NAA} + 0.5\text{ mg/L KT}$) 中观察其生长, 每处理 5 个外植体, 重复 3 次。

1.2.4 生根与移栽 选择生长健壮, 株高超过 2 cm 的试管苗在 5 种生根培养基中进行生根培养。移栽时先将生根苗连培养瓶一起置于温室内进行为期 10 d 的炼苗, 在此期间逐渐松开并揭去培养瓶的盖子, 而后将植株根系上的培养基洗净, 移栽到含有泥炭: 蛭石 = 1:1 (体积比) 的塑料盆中。移栽后的第 1 周塑料盆上覆盖塑料薄膜以保湿, 1 周后慢慢揭去。

1.2.5 培养条件 培养室温度为 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, 空气相对湿度为 60% 左右, 光照度为 $1\,500 \sim 2\,000\text{ lx}$, 光照周期为 14 h/d。

2 结果与分析

2.1 采样时间对腋芽诱导率的影响

茎段接种 1 周后腋芽开始萌发, 2 周后腋芽开始伸长, 叶片逐渐展开, 叶色浓绿 (图 1-B)。不同时间采集的枝条在初代培养时, 污染率和腋芽诱导率差异显著 (表 1), 4 月至 6 月中旬是最佳采样时期, 既可以保证较高的腋芽诱导率, 而且污染率相对较低, 其他时期采集的枝条污染率高, 腋芽诱导率低, 不适宜用作离体培养的外植体。

2.2 初代培养基对腋芽诱导的影响

4 月采集的小绿萼枝条, 接种于 2 种不同初代培养基中 (表 2), 培养于添加 KT 的初代培养基中的外植体, 不仅腋芽诱导率高, 而且芽伸长快, 叶色浓绿, 无顶芽死亡、黄化问题。

收稿日期: 2014-05-09

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31070624); 国家“863”计划 (编号: 2011AA100207)。

作者简介: 杨丽青 (1986—), 女, 山西朔州人, 硕士, 从事园林植物遗传育种研究。E-mail: 1270063665@qq.com。

通信作者: 张俊卫, 博士, 副教授, 从事园林植物遗传育种研究。E-mail: zjw@mail.hzau.edu.cn。

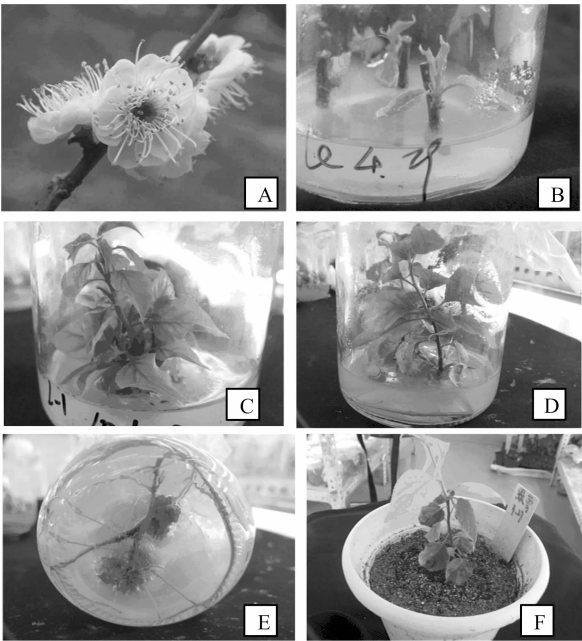


图1 小绿萼离体快繁及植株生根

表 1 采样时间对小绿萼腋芽诱导的影响

取样时间	3 月	4 月	5 月	6 月	7 月	10 月	11 月
诱导率(%)	16.70 ± 0.15c	75.00 ± 0.16b	80.00 ± 0.06ab	95.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00c	3.70 ± 0.06c	14.70 ± 0.13c
污染率(%)	83.00 ± 0.15a	10.00 ± 0.08b	19.70 ± 0.06b	19.60 ± 0.06b	100.00 ± 0.00a	96.30 ± 0.06a	85.00 ± 0.13a

注:同行不同小写字母表示在 0.05 水平上存在显著差异。

表 2 初代培养基对小绿萼腋芽诱导的影响

编号	培养基	萌芽率(%)
1	1/2MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA	66.70 ± 0.08a
2	1/2MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KT + 0.1 mg/L NAA	78.30 ± 0.10a

注:同列不同小写字母表示在 0.05% 水平上存在显著差异。

表 3 基本培养基对小绿萼腋芽增殖的影响

基本培养基	平均芽个数(个)	丛生芽平均高度(cm)	生长状态
改良 N ₆	1.17 ± 0.29b	0.63 ± 0.12b	叶嫩绿,簇生在基部,茎极度短缩
1/2MS	1.50 ± 0.50b	1.20 ± 0.08a	叶黄绿,愈伤团褐化
QL	3.16 ± 0.77a	1.38 ± 0.43a	叶嫩绿,平展,生长势很强

注:同列不同小写字母表示在 0.05 水平上存在显著差异。

后上升,且变化值均达到显著差异。最终选用 QL+0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA 作为小绿萼增殖培养基,在此培养基上丛生芽的数量多,且生长正常(图 1-C)。

2.5 丛生芽长度对继代培养的影响

将腋芽增殖培养后不同伸长长度的丛生芽,从基部切离后接种于继代培养基,生长表现出显著差异(表 3),长度为 1~2 cm 的腋芽伸长长度最大,生长健壮,叶片平展;而长度为 0.1~1 cm 的腋芽生长瘦弱,叶片黄化脱落,最后死亡。

2.6 试管苗的生根培养和移栽

切取高度 2~3 cm 的试管苗,转入不同生根培养基(表 6)中生根,培养 30~40 d 后形成根系(图 1-D、图 1-E)。植物生长调节剂的种类和浓度对试管苗生根有显著影响,只

这与朱军等的结果^[6]相一致,即 KT 对长蕊绿萼腋芽的伸长生长有促进作用。

2.3 基本培养基对腋芽增殖的影响

将伸长长度达到 1~2 cm 的腋芽接种到添加了 1.0 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA 的 3 种基本培养基(表 3)中,芽的增殖和伸长表现出显著差异(表 4),QL 上培养的腋芽出芽数显著高于改良 N₆ 和 1/2MS,伸长长度显著高于改良 N₆。比较 3 种培养基上腋芽的生长状态以及出芽数和丛生芽平均高度,在增殖培养中采用 QL 作为基本培养基。

2.4 激素组合对增殖的影响

将伸长长度达到 1~2 cm,且长势一致的腋芽转入添加不同 6-BA 和 NAA 浓度组合的 QL 培养中基中(表 5),在 6-BA 浓度为 0.2 mg/L 时,丛生芽平均高度随着 NAA 浓度的升高而下降,但没有达到显著差异,而增殖系数基本没有变化,表明低浓度 6-BA 不能诱导腋芽增殖;当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,丛生芽平均高度和增殖系数,随着 NAA 浓度的升高先上升后下降,但丛生芽平均高度的变化没有达到显著水平,而增殖系数达到显著差异;而当 6-BA 浓度为 0.5 mg/L 时,植株平均高度和增殖系数,随着 NAA 浓度的升高先下降

表 4 BA 和 NAA 组合对腋芽增殖的影响

编号	6-BA 浓度(mg/L)	NAA 浓度(mg/L)	丛生芽平均长度(cm)	增殖系数
1	0.2	0.05	0.96 ± 0.27cd	1.00 ± 0.00d
2	0.2	0.1	0.85 ± 0.10de	1.04 ± 0.00d
3	0.2	0.2	0.63 ± 0.08d	1.00 ± 0.00d
4	0.5	0.05	2.02 ± 0.25a	4.27 ± 0.64a
5	0.5	0.1	0.95 ± 0.05d	1.13 ± 0.06d
6	0.5	0.2	1.28 ± 0.14cb	1.50 ± 0.35c
7	1	0.05	1.26 ± 0.11cb	1.00 ± 0.00d
8	1	0.1	1.52 ± 0.27b	1.90 ± 0.50b
9	1	0.2	1.43 ± 0.03b	1.00 ± 0.00d

注:同列不同小写字母表示在 0.05 水平上存在显著差异。

表 5 丛生芽长度对继代培养的影响

编号	丛生芽长度(cm)	继代培养后丛生芽长度(cm)	生长状况
1	0.1	0.44 ± 0.12a	叶极度卷曲,生长势差
2	0.5~1	1.76 ± 0.53b	叶嫩绿,平展,有轻微玻璃化,边缘黄化
3	1~2	2.70 ± 0.56c	叶嫩绿,平展,生长势极好

注:同列不同小写字母表示在 0.05 水平上存在显著差异。

添加了生长素 IBA 的培养基生根率很低,仅为 3.33%,且愈伤组织多。同时添加 NAA 和 IBA 的培养基以及添加 IBA 和活性炭的培养基,生根率、平均生根数和平均根长显著增加,但生根效果最佳的是试管苗先用 200 mg/L IBA 浸渍,再培养于 1/2QL 培养基的处理,生根率达到最高(80%),与其他处理相比差异显著,且平均根长和根数也显著增加。生根后的植株先在温室炼苗 10 d 左右,然后移栽入塑料盆中(图 1-F),移

表 6 生根培养基对小绿萼试管苗生根的影响

编号	生根培养基	生根数(条)	根长(cm)	生根率(%)
1	1/2QL+0.2 mg/L IBA+0.3 mg/L NAA	1.60 ±0.17b	5.88 ±2.42a	36.67 ±0.15b
2	1/2QL+0.5 mg/L IBA	0.33 ±0.58b	0.84 ±1.46b	3.33 ±0.06c
3	1/2QL+0.05 mg/L IBA	0.33 ±0.58b	0.67 ±1.16b	3.33 ±0.06c
4	1/2QL+200 mg/L IBA 浸渍	3.81 ±1.78a	4.82 ±1.10a	80.00 ±0.10a
5	1/2QL+0.1 mg/L IBA+1 g/L 活性炭	1.00 ±0.00b	3.29 ±1.14ab	36.67 ±0.06b

注:同列不同小写字母表示在 0.05% 水平上存在显著差异。
栽存活率可达 90%。

3 讨论

3.1 外植体生理状态对启动培养的影响

3 月份梅花枝条上的叶芽开始膨大,萌发抽生新枝,但此时的枝条过于幼嫩,容易受灭菌剂的影响而褐化死亡,同时污染率也较高,因此本试验中 3 月取样的茎段萌芽率低;4—6 月为梅新梢生长旺盛期,本试验在此阶段取样的茎段萌芽率最高可达 90%,且新叶嫩绿,生长强健。这一结果与傅萼辉等、曲春苗等的研究相一致,即早春萌动的腋芽是比较理想的离体培养外植体,因为此时内源 IAA 浓度较高^[7-9],有利于腋芽的萌发与生长。但与 Yonemitsu 等的试验结果相反,他们认为当年 11 月到翌年 2 月在休眠枝上采集的冬芽,离体繁殖的成功率高,造成这种差异的具体原因尚需进一步的分析^[10]。

3.2 基本培养基对增殖培养的影响

在其他培养条件相同的情况下,果梅品种 Nanko 早春萌发的新芽,在 WPM 培养基上离体微繁时能增殖且生长健壮,而在 MS 培养基上的芽会逐渐褐化死亡^[1]。而吕英民等离体培养铁骨红 1 年生枝具节茎段时,通过比较外植体在 6 种基本培养基(QL、MS、WPM、M1、M2、M3)上腋芽增殖系数、平均伸长长度等指标的差异,认为 QL 是适合铁骨红生长的最佳基本培养基^[4,11]。本试验在小绿萼腋芽的增殖培养时,比较了改良 N₆、1/2MS 和 QL 基本培养基对其增殖和生长的影响,也发现 QL 基本培养基显著优于改良 N₆ 和 1/2MS。

3.3 KT 和 BA 对腋芽萌发和伸长的影响

组织培养中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。从铁骨红试管苗增殖培养的结果看,6-BA 和 ZT 优于 KT,而且增殖系数差异显著。但增殖培养基中不添加 IAA、IBA 或 NAA 等生长素,增殖芽的伸长生长慢,影响试管苗正常生长。细胞分裂素浓度过高,增殖芽数量虽然明显增加,但多呈丛生状,茎难以伸长,且生长细弱,叶小且叶色异常,甚至出现玻璃化苗^[12]。为克服增殖苗生长瘦弱,不得不采用壮苗培养基^[7]。本试验在小绿萼腋芽增殖培养中所选用的 3 个 6-BA 浓度中,最适的浓度为 0.5 mg/L,在添加此浓度 6-BA 的培养基中,不仅增殖系数最大,且丛生芽平均伸长长度也较大,当 6-BA 浓度提高到 1.0 mg/L,虽然产生了大量的丛生芽,但是继代培养时丛生芽往往发生严重的褐化和黄化,渐渐死亡,同时玻璃化或畸形现象也逐渐加强,因此,在增殖培养中 6-BA 的浓度选定为 0.5 mg/L。

3.4 浸渍法对生根培养的影响

在诱导梅试管苗生根时,既有单独使用 IBA 或 NAA 的报道,也有同时使用 IBA 和 NAA 的报道^[1,4,6,11]。Harada 等在研究生长素对 Nanko 试管苗生根影响时发现,高浓度的 IBA

(1~2 mg/L)或 NAA(0.9~1.9 mg/L)容易使试管苗基部形成愈伤,本试验在生根培养基中添加 0.5 mg/L 也易导致小绿萼试管苗形成大团愈伤。吕英民等在进行铁骨红试管苗生根培养时,观察到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;同时使用 2 种植物生长调节剂时不仅发根多,而且生长粗壮。但在本试验中,IBA 和 NAA 同时使用虽然生根数和生根率较单独使用有所增加,但生根率偏低,而用 200 mg/L IBA 浸渍试管苗后培养于 1/2QL,其生根率可达 80%,且平均生根数有显著增加,此结果与新疆野生巴旦杏的生根试验相似^[13],其试管苗用 100 mg/L IBA 浸渍处理 60 min 后转入 1/2MS 培养基中培养,暗培 2 周后生根率可达 100%。

参考文献:

[1] Harada H, Murai Y. Micropropagation of *Prunus mume* [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1996, 46(3): 265-267.
[2] 傅萼辉, 徐惠珠, 王豫兰, 等. ‘美人梅’茎段离体培养[J]. 北京林业大学学报, 1995, 17(增刊 1): 75-78.
[3] 蒋泽平, 梁珍海, 朱 军, 等. 不同基因型梅花组织培养增殖率差异[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2005, 6(6): 550-552.
[4] 吕英民, 曹 亮, 张启翔. 真梅系梅花品种“铁骨红”离体培养[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 1047-1049.
[5] Ning G G, Fan X L, Huang W J, et al. Micropropagation of six *Prunus mume* cultivars through axillary shoot proliferation, and ISSR analysis of cloned plants [J]. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 2007, 49(1): 25-31.
[6] 朱 军, 郭立春. “长蕊绿萼”梅花具节茎段组织培养初报[J]. 江苏林业科技, 2003, 30(2): 16-17.
[7] 傅萼辉, 徐惠珠, 王豫兰, 等. 梅花离体快速繁殖研究[J]. 武汉植物学研究, 1991, 9(3): 275-280, 313.
[8] 曲春苗, 陈瑞丹, 吕晓倩. 梅花杂交种茎段培养影响因素的研究[J]. 北京林业大学学报, 2012, 34(增刊 1): 92-95.
[9] Murai Y, Harada H, Mochioka R, et al. Relationships between rooting in softwood cuttings of mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) and sorbitol in shoots [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1999, 68(3): 648-654.
[10] Yonemitsu H, Nishi K, Sagan S, et al. *In vitro* propagation of mature Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) [J]. Horticultural Research, 2003, 2: 77-82.
[11] 吕英民, 曹 亮, 张启翔. 不同种系梅花品种组织培养繁殖研究[J]. 北京林业大学学报, 2008, 30(3): 74-79.
[12] 朱 军, 张宇实, 郭立春, 等. ZT、IAA 对梅花试管苗增殖与生长的影响[J]. 江苏林业科技, 2004, 31(2): 18-19.
[13] 曾 斌, 罗淑萍, 李 疆. 新疆野生巴旦杏的组织培养和植株再生[J]. 新疆农业大学学报, 2006, 29(4): 27-31.