

果梅离体繁殖技术研究

谭志刚¹, 陈红¹, 张绿萍², 程秀枝¹

(1. 贵州大学喀斯特山地果树资源研究所, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省果树科学研究所, 贵州 贵阳 550100)

摘要:以优选果梅黔荔1号单株为材料, 对外植体灭菌时间、腋芽启动和增殖培养进行了研究。结果表明:以0.1% HgCl₂消毒8 min效果最好, 其存活率为75%;适合腋芽启动培养的基本培养基是WPM;最有利于腋芽启动和增殖的培养基是WPM+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃, 有效增殖系数高达1.51。

关键词:果梅;腋芽;离体繁殖;生长调节剂

中图分类号:S 662.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)03-0118-03

果梅为蔷薇科李属(*Prunus* L.)植物, 亦称酸梅、梅子, 是我国特产果树。梅果对人体具有解毒、净血、杀菌的功能, 且是生理碱性食品, 故被誉为“健康食品”^[1]。同时果梅可作为水土保持的先锋树种。传统的果梅繁育主要是通过扦插、嫁接等无性繁殖方式进行, 繁育周期长, 且受季节限制, 而组织培养具有繁育速度快, 不受季节和气候等因素的影响, 可以获得基因型、长势一致的优良种苗。同时, 组织培养还可以对现有的特色果梅

种质资源进行离体保存。目前, 果梅离体培养的研究工作进展缓慢, 仅有果梅胚培养的相关报道^[2]。为此, 该试验对果梅外植体灭菌和腋芽启动培养作了相关研究, 以为进一步建立和完善果梅组织培养繁殖体系提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以优选果梅黔荔1号单株为材料。

1.2 试验方法

1.2.1 不同灭菌时间比较 取带腋芽的枝条, 切成0.5~1 cm左右带芽茎段, 在流水中冲洗2~4 h, 用0.1% HgCl₂灭菌, 分别处理4、6、8、10 min, 然后用无菌水冲洗4次, 接种在培养基中, 每个处理接种10瓶, 每瓶2个外植体, 重复3次。7 d后, 统计外植体污染率、15 d后统计存活率和死亡率, 因污染而造成的死亡计入污染率中。

1.2.2 基本培养基的筛选 以WPM、1/2WPM、MS、1/2MS为基本培养基, 添加1.0 mg/L 6-BA、0.2 mg/L NAA, 从中筛选出最佳的基本培养基。每处理接种10瓶, 每瓶3个带芽茎段, 重复3次。

第一作者简介:谭志刚(1979-), 男, 河南周口人, 在读硕士, 研究方向为果树生物技术。E-mail: tanzhigang213@163.com。

通讯作者:陈红(1975-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事生物技术与园艺植物遗传育种研究工作。E-mail: chenh96@yahoo.com.cn。

基金项目:贵州省科技攻关资助项目(黔科合NY字[2007]3039号);贵州省省长基金资助项目(黔省专合字2007-18号);贵州省果树学科科技创新人才团队建设资助项目(黔科合人才团队[2008]88007号);贵州省特色农业产业人才培养基地建设资助项目;贵州省果树工程技术研究中心建设资助项目(黔科合农G字[2007]4001号)。

收稿日期:2009-10-09

Abstract: During the study of molecular biology research in cabbage by using SSR technology, The first step was to explore much more SSR primers suitable to cabbage(C genome) and screen the optimized the PCR appropriate PCR conditions. In present study, we collected 78 pairs of SSR primers developed in different *Brassica* crops and explored the general use of these primer sets in cabbage with 3 random selected materials. Results showed that 11 among them had difference, and 5 pairs of primers showed no difference but had clear bands.

Key words: *Brassica*; cabbage; SSR

1.2.3 腋芽启动及增殖培养基的筛选 以 WPM 为基本培养基,添加不同浓度的 6-BA、NAA、GA₃,进行正交设计(表 3)。从中筛选启动及增殖培养基,每处理接种 10 瓶,每瓶 3 个带芽茎段,重复 3 次。所有培养基,均附加 30 g/L 蔗糖和 7.0 g/L 琼脂粉,pH 5.8~6.0,在 121℃下高压灭菌 25 min。培养条件为温度(25±2)℃,光周期 14 h/d,光照强度约为2 000 lx。

1.2.4 数据统计与分析 一定时间后统计污染率、死亡率、存活率、启动率、增殖系数、有效增殖系数等,用 SAS V9.0 软件进行方差分析,并进行多重比较。污染率(%)=(污染外植体数/接种外植体数)×100%;死亡率(%)=(死亡外植体数/接种外植体数)×100%;存活率(%)=(存活外植体数/接种外植体数)×100%;启动率(%)=启动芽数/接种芽数×100%;增殖系数=不定芽总数/启动芽数。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌时间对芽存活的影响

从表 1 可以看出,随着 HgCl₂ 处理时间的延长,污染率明显下降。HgCl₂ 处理 10 min,污染率最低,为 10%,与灭菌 4、6 min 相比,差异达到显著水平,污染率从 60%下降至 10%;死亡率最低的为灭菌 4 min,为 3.3%,与 10 min 存在显著差异,死亡率从 3.3%上升到23.3%;灭菌时间 8 min 与 4、6 min 之间存活率达到显著差异,存活率达到 75%。综合污染率和成活率考虑,以 0.1% HgCl₂ 灭菌 8 min 为最适宜的灭菌时间。

表 1 不同消毒时间对芽存活的影响

时间/min	接种数/个	污染率/%	死亡率/%	存活率/%
4	60	54a	3.3b	42.7c
6	60	34.7b	6.7b	58.6bc
8	60	16.7c	8.3b	75a
10	60	10c	23.3a	66.7ab

注:不同字母表示差异达 0.05 显著水平。下同。

2.2 不同基本培养基对外植体启动的影响

从表 2 可知,在相同培养时间里,不同基本培养基对果梅萌发影响不同。在添加相同生长调节剂组合的条件

下,WPM 基本培养基启动率最高达 85%,明显高于 1/2WPM和 1/2MS 基本培养基。WPM 与 MS 没有达到显著水平,但 WPM 启动数高于 MS 基本培养基启动数。

表 2 不同基本培养基对腋芽启动的影响

基本培养基	生长调节剂组合	接种数 /个	启动数 /个	启动率 /%
WPM	6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L	90	77	0.85a
1/2WPM	6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L	90	68	0.76bc
MS	6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L	90	71	0.78ab
1/2MS	6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L	90	62	0.68c

2.3 不同激素比对腋芽启动及增殖的影响(见图 1A~C)

不同生长调节剂 NAA、6-BA、GA₃ 的配合使用对腋芽的启动及增殖有明显的影响。根据观察,培养 15 d 左右,部分枝条基部产生愈伤组织,培养 20 d 左右外植体腋芽萌动并伸长,其中萌发 2 种类型的芽,一种是有明显、健壮主茎的有效芽,可以用于继代培养;一种是从缩的无效芽,继代培养时仅叶片长大或长出新的丛缩叶片,并随着继代次数增加出现落叶或者死亡。

由表 3 可知,高质量浓度 6-BA 可以提高腋芽的启动率,6-BA 浓度在 1.0、1.5 mg/L 时启动率均在 81%以上,显著高于浓度在 0.5 mg/L 的 6-BA,其它处理间无显著差异。随着 6-BA 质量浓度的提高,增殖系数逐步提高,以 6-BA1.5 mg/L 增殖系数最高,为 1.74,显著高于 6-BA0.5 mg/L 处理,而与 6-BA 1.0 mg/L 处理差异不显著。试验结果发现高质量浓度 1.5 mg/L 6-BA 处理丛缩芽数量显著增加,大多数为无效芽,平均有效增殖系数呈现出随 6-BA 质量浓度升高而先升高后降低的趋势,其中以 6-BA 1.0 mg/L 处理,有效增殖系数最高,显著高于其它处理。说明 6-BA 对增殖影响较大。而 NAA、GA₃ 不同质量浓度间差异不显著,其中以 WPM+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L 有效增殖系数最高,为 1.51,且不定芽叶片平展、嫩绿,主茎明显、生长健壮。

表 3 不同激素比对腋芽启动的影响

处理	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	GA ₃ /mg·L ⁻¹	启动率 /%	平均增 殖系数	平均有效 增殖系数	不定芽 生长状态
1	0.5	0.2	0.0	64.4c	1.29bc	0.98cd	叶片平展
2	0.5	0.5	0.5	67.7bc	1.18c	1.01c	叶片平展,健壮
3	0.5	1.0	1.0	58.9c	1.28bc	0.96d	叶片嫩绿,愈伤较少
4	1.0	0.2	0.5	86.6a	1.57ab	1.19a	主茎明显,健壮
5	1.0	0.5	1.0	87.7a	1.58ab	1.51a	主茎明显,健壮,叶展
6	1.0	1.0	0.0	84.4a	1.52ab	1.47a	主茎健壮,愈伤少
7	1.5	0.2	1.0	81.1ab	1.73a	1.34b	芽丛缩,主茎弱,叶窄
8	1.5	0.5	0.0	83.3ab	1.74a	1.37b	芽丛缩,叶窄狭长
9	1.5	1.0	0.5	85.5a	1.72a	1.36b	有愈伤,芽丛生

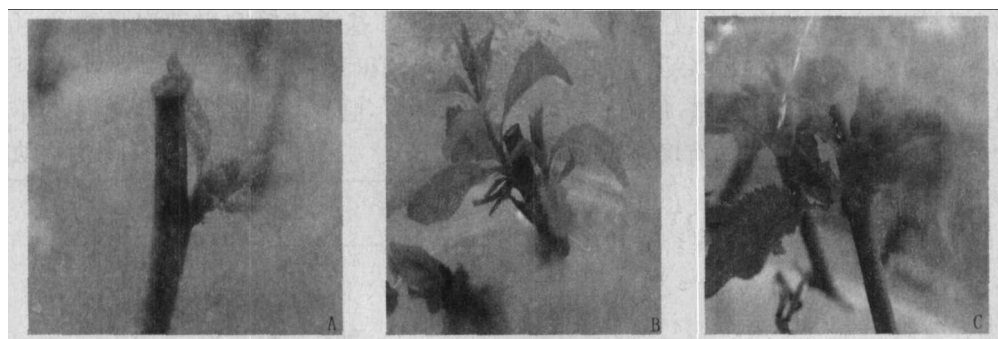


图1 果梅腋芽启动生长(A:腋芽启动;B:腋芽萌发;C:腋芽增殖)

3 讨论

木本植物组织培养中无菌材料的建立比较困难^[3],因此常常应用不同的消毒方式来筛选灭菌效果好的方法。该试验发现,采用0.1% HgCl₂作为消毒剂,处理时间过短,消毒不彻底,外植体污染率高,而时间过长,外植体受到伤害,甚至出现死亡现象。同时兼顾污染率和存活率,用0.1% HgCl₂消毒8 min对果梅外植体进行灭菌比较合适。

从几种基本培养基的筛选结果来看,以WPM为基本培养基最有利于果梅腋芽的启动,这可能是由于WPM培养基中氮的含量比较低,有利于木本植物组织的生长和分化^[4],这在其它李属植物组织培养研究中已有类似结果^[5-8]。

植物在生长发育期间,植物生长调节剂对其生长和分化起着重要调节作用。该试验结果表明,一定浓度的6-BA可以促进果梅腋芽的启动萌发和增殖,随着浓度的增加增殖越快,但当浓度达到1.5 mg/L时,虽然增殖系数高,但能够用于继代培养的有效芽较少。这是因为高浓度的细胞分裂素加速了带芽茎段基部愈伤组织的形成,从而导致腋芽萌发生长后得不到足够的营养而形成丛缩的无效芽。在启动培养基中添加GA₃对腋芽无明显

的促进作用,这与Kris等^[9]发现GA₃不能打破‘Chokecherry’和‘Pincherry’腋芽的休眠、促进启动培养的研究结果一致。但该试验GA₃处理浓度较低,GA₃对腋芽是否有促进作用,尚需要作进一步试验。

参考文献

- [1] 褚孟娜. 中国果树志. 梅卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999: 2.
- [2] 柴明良, 沈德绪, 林伯年. 梅品种胚培养研究[J]. 浙江农业大学学报, 1988(4): 434-440.
- [3] 陈正华. 木本植物组织培养与应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986: 30-31.
- [4] 王蒂. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 25.
- [5] 金为民. 梅花“美人梅”组织培养中无菌体系建立的初步研究[J]. 江苏林业科技, 2007, 34(4): 9-12.
- [6] 邹英宁, 李国怀, 吴强盛. “海湾红宝石”李茎段离体培养研究[J]. 江西农业大学学报, 2008, 30(4): 230-233.
- [7] Joseph C, Goffreda J, Scopel A. Factors affecting regeneration and rooting of apricot shoots derived from immature embryos[J]. Hortiscience, 1994, 29: 514.
- [8] Goffreda J, Scopel A, Fiola J. Indole butyric acid induces regeneration of phenotypically normal apricot plant from immature embryos[J]. Plant Growth Regulation, 1995, 17(1): 41.
- [9] Kris W P, Tina L, Tess A, et al. Micro propagation of Chokecherry and Pincherry cultivars[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 63: 93-100.

A Preliminary Study of *Prunus mume* in Vitro Propagation

TAN Zhi-gang¹, CHEN Hong¹, ZHANG Lv-ping², CHENG Xiu-zhi¹

(1. Research Institute for Fruit Resources of Karst Mountain Region of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. Pomology Research Institute of Guizhou, Guiyang Guizhou 550100)

Abstract: Using better single plant (Qian Li NO. 1) from *Prunus mume* as materials, explants sterilization, and proliferation culture of axillary buds were studied. The results showed that the optimal sterilization time of explant was about 8 minutes with 0.1% HgCl₂, and its survival rate was 75%. The basal medium of axillary buds was WPM. The best medium for and proliferation of axillary buds was WPM+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃, and its effective multiplication coefficient was 1.51.

Key words: *Prunus mume*; axillary bud; in vitro propagation; plant growth regulator