

# 桃新品系‘保佳俊’茎尖培养再生体系建立的初步研究

江珊, 张玉, 康同洋, 韩雪雨, 李青青, 马晓月, 张学英

(河北农业大学园艺学院, 河北保定 071000)

**摘要:** ‘保佳俊’桃是河北农业大学选育的桃新品系。为加快其推广应用和进一步开展组织培养、基因工程、从分子水平探讨其抗褐化机理等研究,通过试验探讨不同培养基配比对‘保佳俊’茎尖培养的影响,筛选出适宜的培养基配方,建立其茎尖培养再生体系。结果表明,以‘保佳俊’茎尖为外植体,用 75% 的酒精消毒 30 s,再用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  溶液消毒 9 min,成活率为 50%,高于其他处理;继代培养阶段,MS 基本培养基比 1/2MS 更适宜,6-BA 与 IBA 的适宜配比为 6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.2 mg/L,增殖系数达 3.0,苗高达 2.3 cm;继代培养基添加 0.05 mg/L 的  $\text{GA}_3$ ,可促进组培苗的伸长生长,苗高达 3.2 cm;生根培养适宜的 NAA 浓度为 0.4 mg/L。

**关键词:** 桃;外植体;组织培养;组培快繁;植物生长调节剂

中图分类号: S 792.19

文献标志码: A

## Preliminary study on establishment of shoot tip culture regeneration system of new peach strain ‘Baojiajun’

JIANG Shan, ZHANG Yu, KANG Tongyang, HAN Xueyu, LI Qingqing,  
MA Xiaoyue, ZHANG Xueying

(College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

**Abstract:** ‘Baojiajun’ is a new peach strain bred by Hebei Agricultural University. Taking the shoot tips of ‘Baojiajun’ as materials, the effects of different medium on tissue-cultured seedling were researched. The optimal medium was selected to establish the shoot tip culture regeneration system. The results showed that the optimal sterilization method for explants was sterilization with 75% alcohol for 30 s and 0.1%  $\text{HgCl}_2$  for 9 min, in the condition of which the survival rate was 50%, higher than that of the other treatments. In the subculture stage, the MS was better than 1/2 MS as basic medium, and the optimal 6-BA and IBA in medium were 6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.2 mg/L, under which the coefficient of multiplication reached 3.0, and the height of plantlet was 2.3 cm. When 0.05 mg/L  $\text{GA}_3$  was supplemented in subculture medium, the height of plantlet reached 3.2 cm. The optimal plant growth regulator for rooting was NAA 0.4 mg/L.

**Key words:** peach; explant; tissue culture; rapid micropropagation; plant growth regulator

收稿日期: 2017-05-09; 修回日期: 2017-05-15

基金项目: 河北农业大学大学生创新创业训练计划项目“桃新品系‘保佳俊’茎尖培养再生体系的建立”(国家级 201610086021, 校级 20160806)。

第一作者: 江珊(1995-), 女, 河北永年人, 在读本科生, 主要从事果树组织培养方面的研究。

通讯作者: 张学英(1972-), 女, 河北迁西人, 博士, 教授, 主要从事果树生物技术、果树栽培生理与生态方面的研究。

桃(*Amygdalus persica* L.)在中国栽培历史悠久,面积和产量均居世界首位<sup>[1]</sup>。采用传统的育种方法进行桃品种改良,因周期长、工作量大等原因而受到制约。而现代生物技术,尤其是植物组织培养和基因工程的发展,为缩短育种周期、加快桃性状改良提供了可能。通过茎尖培养获得再生植株,操作简便,繁殖系数高,能较好地保持遗传稳定性,在苗木快繁与脱毒、种质离体保存中有广泛应用<sup>[2-3]</sup>。目前,国内外对桃的组织培养已有不少报道,研究结果因所用品种、外植体类型和培养条件而异,尤其品种不同,适宜的培养基配比不同,组培苗的诱导率、增殖系数和生根率等有较大差异<sup>[4-6]</sup>。

河北农业大学桃课题组选育的桃新品系‘保佳俊’,表现出丰产性强、果实可溶性固形物含量高、色泽鲜艳、耐贮运、果肉硬质、抗褐化等突出优点,具有很好的市场发展前景<sup>[7-8]</sup>。为加快其推广应用和进一步开展‘保佳俊’的组织培养、基因工程、从分子水平探讨其抗褐化机理等研究,建立高效的茎尖培养再生体系十分必要。为此,以‘保佳俊’为试材,研究不同培养基配比对茎尖培养的影响,以筛选出适宜的培养基配方,建立其茎尖培养再生体系,为桃种苗的组培快繁、种质资源的离体保存以及品种改良等研究打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2016年2月29日,自河北省顺平县滕家庄‘保佳俊’桃试验园,剪取1a生枝条,抹掉花芽,置于光照培养箱内水培,定期(2~3d)更换清水,叶芽萌发后取大于1.5cm的新梢,用流水冲洗干净,备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 将冲洗后的新梢放入洁净的三角瓶中,置于超净工作台上,用75%的酒精消毒30s,再用0.1%  $\text{HgCl}_2$  溶液消毒不同时间,设置7min、8min、9min、10min、11min共5个处理,用无菌水洗4~5次后,接种到MS+蔗糖30g/L+琼脂6g/L+6-BA 1.0mg/L的诱导培养基上。每个处理接20个新梢。将接种好的材料在培养室内培养,培养室的温度(25±2)°C、光照强度1500~2000lx[30~40  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ]、光/暗周期12h/12h。接种10d后,调查污染株数,统计污染率,并经常观察外植体的成活及生长情况。

1.2.2 以MS与1/2MS作基本培养基对组培苗继

代培养的影响比较 选取诱导培养中生长一致的组培苗,分别接种至以下2种基本培养基:(1)1/2MS培养基+蔗糖20g/L+琼脂6g/L;(2)MS培养基+蔗糖30g/L+琼脂6g/L,均附加6-BA 0.5mg/L+IBA 0.2mg/L。每种培养基接20株,设3次重复,培养条件同诱导培养。接种30d后,调查组培苗的生长状况。

1.2.3 6-BA和IBA的配比对组培苗继代培养的影响 以MS培养基为基本培养基(添加蔗糖30g/L,琼脂6g/L),加入不同浓度的6-BA和IBA,共设6个处理,分别为:(1)6-BA 0.5mg/L;(2)6-BA 0.5mg/L+IBA 0.1mg/L;(3)6-BA 0.5mg/L+IBA 0.2mg/L;(4)6-BA 0.5mg/L+IBA 0.3mg/L;(5)6-BA 1.0mg/L+IBA 0.2mg/L;(6)6-BA 1.5mg/L+IBA 0.2mg/L。每个处理10株,3次重复,培养条件同诱导培养。接种30d后,调查生长状况,测量苗高,统计增殖系数。

增殖系数等于增殖茎尖数与接种茎尖数的百分比。

### 1.2.4 不同浓度 $\text{GA}_3$ 对组培苗伸长生长的影响

选取生长一致的继代苗,分别接种至下述不同浓度  $\text{GA}_3$  处理的培养基中,MS+蔗糖30g/L+琼脂6g/L+6-BA 0.5mg/L+IBA 0.2mg/L,再分别加入0mg/L、0.05mg/L、0.10mg/L的  $\text{GA}_3$ ,共3个处理。每个处理10株,3次重复,培养条件同诱导培养。接种30d后,调查组培苗的生长状况,统计增殖系数和苗高。

1.2.5 不同浓度NAA对组培苗生根的影响 选取继代培养中生长旺盛、叶色深绿、高度为2~3cm的健壮芽苗,分别接种至1/2MS+蔗糖20g/L+琼脂6g/L,附加不同浓度NAA的生根培养基中,NAA浓度设0.2mg/L、0.4mg/L、0.6mg/L、0.8mg/L共4个处理。每个处理10株,3次重复,培养条件同诱导培养,接种20d后统计生根率和生根数。

生根率等于生根芽苗数与接种芽苗数的百分比。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同 $\text{HgCl}_2$ 消毒时间对接种外植体成活率的影响

不同  $\text{HgCl}_2$  消毒时间对接种外植体成活率的影响调查结果见表1。

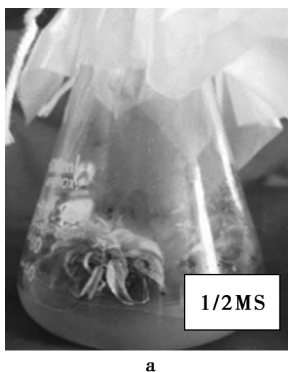
表 1 不同 HgCl<sub>2</sub> 消毒时间对接种外植体成活率的影响Table 1 Effects of different disinfection time of HgCl<sub>2</sub> on the explants survival rate

消毒时间/min Disinfection time	接种数 Number of vaccinations	污染数 Number of pollution	污染率/% Pollution rate	成活数 Number of survivals	成活率/% Survival rate
7	20	18	90	2	10
8	20	12	60	8	40
9	20	9	45	10	50
10	20	9	45	9	45
11	20	6	30	6	30

由表 1 可以看出,接种外植体消毒时间在 7~11 min 范围内,随着 0.1% HgCl<sub>2</sub> 处理时间的延长,污染率由 90% 降至 30%,成活率呈现先升高后降低的趋势。消毒时间在 9 min 时,接种外植体成活率最高,为 50%;消毒时间为 11 min 时,污染率最低,为 30%,但成活率仅为 30%。消毒时间为 10 min 时的污染率为 45%,与消毒时间为 9 min 时的相同,但成活率低于消毒 9 min 的处理。综合接种外植体的污染率和成活率,认为较适宜‘保佳俊’外植体灭菌处理的 HgCl<sub>2</sub> 消毒时间为 9 min。

## 2.2 MS 与 1/2MS 作基本培养基对组培苗继代培养的影响比较

2 种基本培养基对桃茎尖培养的影响见图 1。



a



b

图 1 不同基本培养基对桃茎尖培养的影响

Fig. 1 Effects of different basic medium on shoot tip culture of new peach strain Baojiajun

由图 1 可以看出,以 1/2MS 培养基为基本培养基的组培苗生长不良,节间短,叶片嫩黄,根部出现愈伤组织;以 MS 培养基为基本培养基的组培苗生长健壮,叶片较厚且呈深绿色,节间伸长正常。因此认为,适宜‘保佳俊’桃组培苗继代培养的基本培养基为 MS 培养基。

## 2.3 不同浓度植物生长调节剂配比对桃茎尖培养的影响

2.3.1 6-BA 和 IBA 的配比对组培苗增殖培养的影响 不同浓度 6-BA 和 IBA 配比对组培苗增殖系数和苗高的影响见表 2。

表 2 不同浓度的 IBA 和 6-BA 配比对继代培养的影响

Table 2 Effects of different concentrations of 6-BA and IBA on the multiplication of new peach strain ‘Baojiajun’

6-BA 浓度/(mg · L <sup>-1</sup> ) Concentration of 6-BA	IBA 浓度/(mg · L <sup>-1</sup> ) Concentration of IBA	增殖系数 Multiplication coefficient	苗高/cm Height of plantlets
0.5	0	1.5	1.0
0.5	0.1	2.0	1.5
0.5	0.2	3.0	2.3
0.5	0.3	2.2	2.0
1.0	0.2	2.7	2.0
1.5	0.2	2.0	1.8

由表 2 可知,当 6-BA 浓度为 0.5 mg/L, IBA 浓度分别为 0 mg/L、0.1 mg/L、0.2 mg/L 时,组培苗的增殖系数随 IBA 浓度的增加而增加,其中 IBA 浓度为 0.2 mg/L 时组培苗增殖系数达到最大,为 3.0,同时组培苗株高为 2.3 cm,也是最大。IBA 浓度增加至 0.3 mg/L 时,组培苗增殖系数下降为 2.2,同时苗高也略有下降,为 2.0 cm。当 IBA 浓度为 0.2 mg/L, 6-BA 的浓度分别为 0.5 mg/L、1.0

mg/L、1.5 mg/L 时,随着 6-BA 浓度的增加,组培苗增殖的芽苗数量增加,但芽苗较矮,茎叶变黄,叶片易脱落。由此认为,适宜‘保佳俊’桃继代培养的 6-BA 和 IBA 配比为 6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.2 mg/L。

2.3.2 不同浓度  $GA_3$  对组培苗苗高的影响 不同浓度  $GA_3$  对组培苗苗高的影响见表 3。

表 3 不同浓度  $GA_3$  对组培苗苗高的影响

Table 3 Effects of different concentration of  $GA_3$  on the height of plantlets

6-BA 浓度/(mg · L <sup>-1</sup> ) Concentration of 6-BA	IBA 浓度/(mg · L <sup>-1</sup> ) Concentration of IBA	$GA_3$ 浓度/(mg · L <sup>-1</sup> ) Concentration of $GA_3$	苗高/cm Height of plantlets
0.5	0.2	0	2.3
0.5	0.2	0.05	3.2
0.5	0.2	0.10	3.0

由表 3 可知,培养基中添加 0.05 mg/L、0.10 mg/L 的  $GA_3$ ,组培苗苗高与对照相比均有所增加,其他生长指标差异不明显。当  $GA_3$  浓度为 0.05 mg/L 时,苗高略高于 0.10 mg/L 的处理,为 3.2 cm,而不添加  $GA_3$  的处理苗高仅为 2.3 cm。由此看来,添加  $GA_3$  促进了组培苗苗高的增长。综合认

为,适宜‘保佳俊’桃组培苗继代增殖培养的植物生长调节剂配比为 6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.2 mg/L +  $GA_3$  0.05 mg/L。

2.4 不同浓度 NAA 对组培苗生根的影响

NAA 浓度对组培苗生根的影响调查结果见表 4。

表 4 NAA 浓度对组培苗生根的影响

Table 4 Effects of different concentrations of NAA on the rooting of plantlets

NAA 浓度/(mg · L <sup>-1</sup> ) Concentration of NAA	生根率/% Rate of rooting	生根数目/条 Number of rooting
0.2	30.0	1.7
0.4	55.0	2.8
0.6	45.5	2.5
0.8	29.5	2.0

由表 4 可知,当 NAA 浓度为 0.4 mg/L 时,生根率最高,为 55.0%,平均每株生根数也最多,为 2.8 条,且发根较粗壮,芽苗基部愈伤化轻,总体生根效果较好。而 NAA 浓度为 0.2 mg/L 时,生根率为 30.0%,生根数为 1.7 条,与 0.4 mg/L 的处理相比,根的长势也弱。NAA 的浓度在 0.4~0.8 mg/L 范围内,组培苗的生根率、生根数和根的长势均随着 NAA 浓度的升高而降低。由此认为,适宜生根培养的 NAA 浓度为 0.4 mg/L。

2.5 炼苗与移栽

组培苗生根培养 3 周后,将其转移至温室中,7 d 后,解开封口膜,3 d 后,从瓶中取出组培苗,用清水冲洗掉根部的培养基。将育苗基质放入营养钵中,添加量为 2/3。将生根的组培苗移栽到营养钵中,再用育苗基质填满营养钵。栽后即 0.1% 的多菌灵溶液充分浇透。搭小拱棚用塑料薄膜覆盖,用遮阳网遮阴。每隔 2 d 喷多菌灵溶液 1 次,2 周后,移栽组培苗长出新叶,统计成活率在 85% 以上。

### 3 结论与讨论

经研究认为,以桃新品系‘保佳俊’茎尖为外植体,适宜的消毒处理为用75%的酒精消毒30 s,再用0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液消毒9 min。继代培养阶段,MS基本培养基比1/2MS培养基更适宜,6-BA与IBA的适宜配比为6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.2 mg/L;继代培养基添加0.05 mg/L的GA<sub>3</sub>,可促进组培苗的伸长生长。生根培养适宜的NAA浓度为0.4 mg/L。

关于桃的组织培养已有不少报道,适宜的培养基配比因所用品种、外植体类型而异,组培苗的诱导率、增殖系数和生根率等差异也较大<sup>[4-6, 9-14]</sup>。赵剑波等研究认为,桃抗重茬砧木GF677继代增殖最佳培养基为F14+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.1 mg/L,生根培养基选用1/2MS + IBA 1.0 mg/L,30 d后生根率为89.40%<sup>[5]</sup>;李佳莹研究表明,红花山桃和光核桃最佳增殖培养基为LP + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L,增殖系数分别达到5.77和5.29,筑波5号最佳增殖培养基为MS + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L,增殖系数为3.18,红花山桃和光核桃适宜的生根培养基为1/2MS + IAA 1.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L,生根率分别达到57.41%和42.80%,筑波5号生根困难,生根率仅12.40%<sup>[9]</sup>。杜保伟等以‘桃豫农矮砧1号’为外植体,选出最佳增殖培养基为MS + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 0.3 mg/L,增殖倍数为2.33倍<sup>[10]</sup>。李晓等报道,LP + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 0.2 mg/L适宜‘雨花2号’桃增殖培养,增殖倍数达3.8,MS + 1.5 mg/L IAA生根率最高,达55%<sup>[11]</sup>。在本研究中,‘保佳俊’桃的增殖系数为3.0,生根率为55.0%,与已有的报道相比略偏低,其中有所用品种的原因,也可能是所选培养基配比

未达到最适宜,所以应进一步优化培养基配比,以建立更高效的茎尖培养再生体系。

#### 参考文献:

- [1] 李绍华主编. 桃树学[M]. 北京:中国农业出版社,2013: 1-10.
- [2] 肖哲丽, 柳金凤. 植物组织培养的研究进展及新技术应用[J]. 宁夏农林科技, 2011 (1): 13-14, 47.
- [3] 刘书荣, 刘静, 吴曼. 植物组织培养及其在果树上的应用[J]. 现代农业科技, 2011 (22): 45-46, 49.
- [4] 郭伟伟, 孟庆杰, 黄勇, 等. ‘黄金冠’桃组织培养的初步研究[J]. 北方园艺, 2010 (19): 142-144.
- [5] 赵剑波, 郭继英, 姜全, 等. 桃抗重茬砧木GF677组培快繁技术[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 60-61, 68.
- [6] 齐贤. 三种基因型桃不同外植体再生能力初探[D]. 郑州:河南农业大学, 2015:2-6.
- [7] 刘艳萌, 李丹, 陈一凡, 等. 桃新品系“保佳俊”果实发育后期主要营养成分的动态变化[J]. 植物组学与功能基因, 2016, 35 (9): 2508-2512.
- [8] 李丹, 刘艳萌, 张学英, 等. 桃新品系‘保佳俊’果实发育后期可溶性糖含量及蔗糖代谢相关酶活性变化[J]. 河北农业大学学报, 2016, 39(6): 63-68.
- [9] 李佳莹. 三种桃离体再生体系建立及内源激素含量的变化研究[D]. 南京:南京农业大学, 2009:13-21.
- [10] 杜保伟, 方庆, 胡月华, 等. “桃豫农矮砧1号”快繁体系中增殖培养基的初探[J]. 北方园艺, 2014(21): 127-130.
- [11] 李晓, 俞明亮, 马瑞娟, 等. ‘雨花2号’桃离体微繁殖技术研究[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(3): 44-46.
- [12] 董义虎, 杨增海, 胡霓云, 等. 山桃茎尖培养研究[J]. 果树科学, 1985 (3): 10-14.
- [13] 韩沙沙, 张凌媛, 何桥. 油桃组织培养及再生材料的原生体制备研究[J]. 西南大学学报:自然科学版, 2015, 37 (5): 23-30.
- [14] 马常念, 张慧琴, 肖金平, 等. 三种桃砧木茎尖培养技术的研究[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(3): 503-508.

(编辑 潘秀华)