

# ‘黄金冠’桃组织培养的初步研究

郭伟伟<sup>1</sup>, 孟庆杰<sup>1</sup>, 黄 勇<sup>1</sup>, 王光全<sup>1</sup>, 高菲娅<sup>2</sup>

(1. 聊城大学 生命科学院, 山东 聊城 252059; 2. 扬州大学 生物科学与技术学院 江苏 扬州 225009)

**摘 要:** 分别以‘黄金冠’桃的未萌发芽、幼叶、幼茎为外植体, 研究了不同培养基对芽诱导和生根诱导的影响。结果表明: ‘黄金冠’黄桃的最佳基本培养基为 WPM 培养基, pH 6.0; 最佳生芽培养基为 WPM+NAA 0.1 mg/L+KT 2.5 mg/L, 蔗糖 30 g/L; 最佳生根培养基为 WPM+NAA 0.2 mg/L+IBA 0.3 mg/L, 蔗糖 15 g/L。

**关键词:** ‘黄金冠’黄桃; 组织培养; 激素

**中图分类号:** S 662.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)19-0142-03

‘黄金冠’桃新品种是聊城大学生命科学学院从‘锦绣黄桃’自然杂交实生种中选出来的黄桃优系, 于 2006 年 9 月通过山东省科技厅组织的专家鉴定<sup>[1]</sup>。‘黄金冠’

抗干旱, 耐瘠薄, 抗穿孔病强, 果肉黄色, 不溶质, 不褐变, 香气浓, 果实抗挤压耐贮存, 罐藏加工性能好<sup>[2]</sup>。该品种自选育以来, 在山东、江苏等地已推广 1 400 hm<sup>2</sup>, 产值 2 亿元以上<sup>[1]</sup>, 创造了较大的经济效益。但桃子的常规繁殖方法为嫁接, 繁殖系数较低, 而组织培养作为分子水平研究的基础技术, 可加快桃的育种进程, 筛选优良品种, 提高育种效率等。该试验通过筛选‘黄金冠’桃的多种外植体, 得到发芽率较高的最佳外植体, 进而筛选黄桃组织培养的最佳基本培养基、生芽培养基和生根培养基。

**第一作者简介:** 郭伟伟(1985-), 女, 山东聊城人, 在读硕士, 研究方向为资源植物与演化植物。E-mail: qdwwguo@126.com。

**通讯作者:** 王光全(1957-), 男, 本科, 教授, 研究方向为园艺植物种质资源。E-mail: wgq@lcu.edu.cn。

**基金项目:** 山东省“十一五”农业科技成果转化基金和山东省科技攻关资助项目(2009GG10009031); 聊城大学重点科研基金资助项目(X071006)。

**收稿日期:** 2010-06-10

RAPD 分析中, 扩增反应的引物长度一般是 10 bp, 常用复性温度一般为 35~45℃, Williams 等<sup>[4]</sup>认为 40℃以上的复性温度会使引物和模板结合不上而抑制 RAPD 扩增。引物、dNTPs 以及循环次数都是影响反应体系的关键, 各个反应因子都制约着 PCR 扩增结果。确立最佳 RAPD 反应体系才能更准确更稳定的用于枸杞相关的遗传分析研究。

## 参考文献

- [1] McClendon T. Nitrogen and phosphorus effects on secondary succession dynamic on a semiarid sagebrush site [J]. Ecology, 1991, 72(6): 2016-2024.
- [2] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 彭建营, 宋怀瑞, 孙仲序, 等. 中国枣种质资源的 RAPD 分析 [J]. 园艺学报, 2000, 27(3): 171-176.
- [4] 白莹莹, 魏松红, 刘大旻, 等. 辽宁省草坪杂草调查初报 [J]. 杂草科学, 2007(2): 38-39.

## The Optimization of RAPD Reaction System in *Lycium barbarum* L.

REN Xian, ZHANG Lei, LUO Cai-jie, MA Yan-tao, ZHANG Peng

(College of Life Science and Engineering, The North University for Ethnic, Yinchuan, Ningxia 750021)

**Abstract:** Taking the genomic DNA of *Lycium barbarum* L. as template, we optimized and establish the best RAPD reaction system of *Lycium barbarum* L. The result showed that in the system of 25 μL amplification, the best result of RAPD amplification and clear DNA fingerprinting, concluding the reaction condition of 2.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 25 ng template DNA, 0.6 μM primer, 0.25 mmol/L dNTPs and 2 U *Taq* DNA polymerase.

**Key words:** *Lycium barbarum* L.; optimization system; RAPD

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为聊城大学生命科学学院黄桃试验基地的‘黄金冠’品种。3月中旬,取未萌发‘黄金冠’芽;4月份,剪取‘黄金冠’幼嫩枝条,取其幼茎和幼叶。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的选择 I:未萌发芽;II:幼茎;III:幼叶。将剪取的‘黄金冠’桃外植体材料,先用洗衣粉漂洗10 min后,于自来水下冲洗2 h左右,在超净工作台上,用70%的酒精消毒30 s,无菌水冲洗3次,然后用0.1%升汞消毒5~10 min,用无菌水冲洗5次,每次至少1 min,再用无菌滤纸吸干材料表面的水分。未萌发芽剥去鳞片;幼茎切成1 cm左右的小段;幼叶切成0.5 cm×0.5 cm规格,处理好的外植体接种到相应培养基上。

1.2.2 基本培养基的筛选 分别选取MS、1/2MS和WPM 3种培养基,30 d后比较各种外植体的生长增殖状况。

1.2.3 培养条件和激素的筛选 以WPM为基本培养基(蔗糖30 g/L,琼脂8 g/L,抗坏血酸100 mg/L),将pH、VB<sub>1</sub>和激素(NAA/KT)浓度比例为筛选因素,每个因素取3个水平,3次重复,30 d后观察统计‘黄金冠’生长增殖情况。采用三因素三水平正交设计表L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)设计‘黄金冠’生芽培养基试验方案(表1)。

表 1 ‘黄金冠’增殖培养正交实验				
水平	因 素			
	A(pH)	B(VB <sub>1</sub> )	C(NAA/KT)/mg·L <sup>-1</sup>	
1	5.1	0	0.05/2.5	
2	5.6	0.1	0.1/2.5	
3	6.1	1.0	0.1/5.0	

注 培养条件:光周期16 h/d,光照强度2 000~2 500 lx,培养温度(25±2)℃。

2 结果与分析

2.1 筛选外植体

分别将休眠芽、幼茎和幼叶接种到MS+NAA 1.0 mg/L+KT 2.5 mg/L培养基上,其中蔗糖30 g/L,琼脂8 g/L,pH 5.8。

表 2 MS培养基对不同外植体的影响				
外植体种类	接种数	污染率/%	褐变率/%	出芽率/%
休眠芽	50	44	42	0
幼茎	50	30	52	8
幼叶	50	28	58	0

休眠芽被鳞片层层包裹,在去鳞片过程中,易染菌,污染率较茎段与幼叶高。木本植物含有较高的酚类物质,易褐变。由表2可看出,茎段作为外植体诱导出芽率为8%,较休眠芽与幼叶高,从而筛选出幼茎为最佳外

植体。

2.2 筛选基本培养基

将茎段分别接种到MS<sup>[4]</sup>培养基、1/2MS<sup>[4]</sup>培养基、WPM<sup>[5]</sup>培养基,其中蔗糖30 g/L,琼脂8 g/L,抗坏血酸100 mg/L,pH 5.8。

表 3 不同基本培养基对茎段的影响

培养基	接种数	污染率/%	褐变率/%	出芽率/%
MS培养基	50	30	6	4
1/2MS培养基	50	32	4	8
WPM培养基	50	30	2	28

以幼茎作为外植体,筛选基本培养基,由表3可知WPM与MS、1/2MS相比,出芽率高,说明该品种适于WPM培养基。在以后的试验中,可以选择WPM作为‘黄金冠’桃的基本培养基。

2.3 筛选生芽培养基

表4为各种培养基的配比。幼茎接入生芽培养基后,根据培养基各因素不同,各组合有不同程度的发芽。从总体看,生长素与细胞分裂素比例对生芽影响大,2、4、9号发芽率高达70%以上;pH和VB<sub>1</sub>对生芽影响不大,1、3、5、6、7、8号发芽率都在40%以下。由此可选择WPM+NAA 0.1 mg/L+KT 2.5 mg/L,蔗糖30 g/L,琼脂8 g/L,抗坏血酸100 mg/L,pH 5.8,作为生芽培养基。

表 4 不同生芽培养基对茎段生芽的影响

培养基编号	pH	VB <sub>1</sub>	NAA/KT	接种数	出芽率/%
		/mg·L <sup>-1</sup>	/mg·L <sup>-1</sup>		
1	5.1	0	0.05/2.5	50	32
2	5.1	0.1	0.1/2.5	50	70
3	5.1	1.0	0.1/5.0	50	42
4	5.6	0	0.1/2.5	50	76
5	5.6	0.1	0.1/5.0	50	40
6	5.6	1.0	0.05/2.5	50	36
7	6.1	0	0.1/5.0	50	38
8	6.1	0.1	0.05/2.5	50	34
9	6.1	1.0	0.1/2.5	50	72

2.4 生根培养

该品种生根很困难,多次预备试验得出,需先壮苗,再转入生根培养基,否则很难生根。当增殖达到一定数量后,可将长势良好的‘黄金冠’继代繁殖的无菌苗转入壮苗培养基。壮苗培养基是WPM+NAA 0.05 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.01 mg/L,蔗糖20 g/L,琼脂8 g/L,抗坏血酸100 mg/L。20 d后,将无菌苗转入生根培养基:WPM+NAA 0.2 mg/L+IBA 0.3 mg/L,蔗糖15 g/L,琼脂8 g/L,抗坏血酸100 mg/L后,即可生根培养。



图1 发芽的 黄金冠

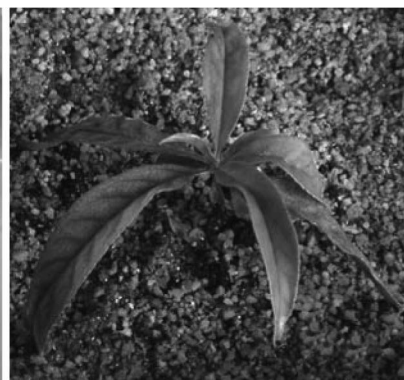


图2 发芽及生根的 黄金冠

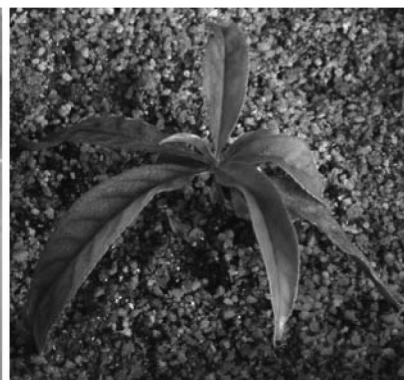


图3 转移大田的 黄金冠 幼苗

### 3 讨论

#### 3.1 消毒时间

不同部位的外植体因幼嫩程度不同,对其表面进行消毒处理的时间也不同。未萌发芽由于被多层鳞片包裹可以适当延长消毒时间,而幼叶则要缩短消毒时间。

#### 3.2 褐变处理方法

在该试验中,褐变是不可忽略的重要问题。常用防止褐变的方法有:(1)加入适量的活性炭(0.1%~0.3%)可以减缓外植体褐变<sup>[9]</sup>,但是活性炭在吸收酚类物质的同时还在吸收培养基中的激素,随时间推移,造成激素配比的不均,而且活性炭不溶于水,在配置培养基时很难均一。(2)在短时间内,连续2~3次转到新鲜培养基<sup>[9]</sup>,但每转1次培养基就增加了染菌的机会。(3)添加抗氧化剂<sup>[9]</sup>,如盐酸半胱氨酸(100 mg/L),抗坏血酸(50~100 mg/L),柠檬酸(150 mg/L)等,操作方便、简单、效果好。该试验选择加入的100 mg/L抗坏血酸,可明显降低褐变情况。

#### 3.3 壮苗培养

在桃的组织培养方面,由于组培苗诱导生根很困难,研究报道的也较少。该研究通过多次预备试验,先把生芽的幼苗转入壮苗培养基中,壮苗培养基要求生长素浓度提高,细胞分裂素浓度降低,蔗糖浓度降低,逐渐适应生芽培养基与生根培养基的环境差异,刺激生根效果较好。

#### 参考文献

- [1] 孟庆杰,王光全.黄桃新品种 黄金冠 亲缘关系分析研究[J].北方园艺,2008(8):178-180.
- [2] 孟庆杰,黄勇,王光全等.罐藏、鲜食兼用黄桃新品种 黄金冠[J].园艺学报,2007,34(2):525.
- [3] 彭星元.植物组织培养技术[M].北京:高等教育出版社,2006.
- [4] 孙敬三,钱迎倩.植物细胞学研究方法[M].北京:科学出版社,1987.
- [5] 孙敬三,朱至清.植物细胞工程实验技术[M].北京:化学工业出版社,2006.
- [6] 李俊明,朱登云.植物组织培养教程[M].北京:中国农业大学出版社,2005.

## Preliminary Study on Tissue Culture of Peach 'Huangjinguan'

GUO Wei-wei<sup>1</sup>, MENG Qing-jie<sup>1</sup>, HUANG Yong<sup>1</sup>, WANG Guang-quan<sup>1</sup>, GAO Fei-ya<sup>2</sup>

(1.School of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059; 2. Bioscience and Biotechnology College, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009)

**Abstract:** Taking ungerminated bud, young stem and leaf as explant, the effect of different culture medium to bud and root induced were studied. The results showed that the best basic culture medium was WPM culture medium, pH 6.0 the best culture medium for germination if WPM+NAA 0.1 mg/L+KT 2.5 mg/L, saccharose 3%, and the best culture medium for striking root was WPM+NAA 0.2 mg/L+IBA 0.3 mg/L, saccharose 1.5%.

**Key words:** Peach 'Huangjinguan'; tissue culture; hormone