

桃离体培养与植株再生的优化研究

尚霄丽^{1,2}, 汪妮², 李明泽², 张建鹏³, 李靖¹

(1. 河南农业大学, 河南 郑州 450002; 2. 濮阳职业技术学院, 河南 濮阳 457000; 3. 河南心连心化肥有限公司, 河南 新乡 453731)

摘要:以桃杂种单株‘2-7’带腋芽茎段为试材,对桃离体培养进行优化。结果表明:MS+1.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA 培养基中腋芽诱导率最高达 88.89%;MS+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA 培养基增殖系数最高 2.37;试管内培养出的健壮新梢,接种于 0.5 mg/L IBA 的 1/2MS 培养基中 10 d 后转入无生长调节剂的 1/2MS 培养基中光/暗(12 h/12 h)周期下生根效果较好,生根率达 90.6%。

关键词:桃;离体培养;植株再生

中图分类号:S 662.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)03-0163-03

桃(*Prunus pesriea* L)属于蔷薇科(Rosaceae)李属植物。我国是桃的原产地和主产国,不仅种质资源丰富,而且产量位居世界各国之首,占世界总产量 20%以上。随着国民经济的发展和人民生活水平的不断提高,人们对桃的需求量愈来愈大,但由于桃不耐贮藏、病害严重等因素制约了桃生产的发展。因此,培育耐贮藏、抗病能力强的桃新品种已成为迫在眉睫的任务,但传统的杂交育种周期长且效率低,基因工程技术为桃育种开辟了新的育种途径。现以桃杂种单株‘2-7’茎段为外植体,优化了适宜桃茎段培养的启动、增殖、生根培养基,针对桃生根困难筛选出了高效的生根方式,建立了桃离体快繁体系,为桃遗传转化提供材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选用中国农业科学院郑州果树研究所桃资源圃杂种植株‘2-7’,4~6月取 5 cm 左右的正常新梢。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理和启动培养 将新梢去掉叶片,用洗衣粉冲洗后进行表面消毒,70%的酒精溶液浸泡 30 s,0.1% HgCl₂ 5 min,无菌水冲洗 5 次,然后剪成 0.5~1 cm 的单芽茎段,接种于以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的 6-BA、IBA 的诱导培养基,30 d 调查芽诱导情况。诱导培养后获得的新梢长至 3~4 cm 时,将其接种在以

MS 为基本培养基附加不同植物生长调节剂的增殖培养基中,30 d 后调查其生长及增殖情况。培养条件:温度为 25℃,光照时间为 12 h。

1.2.2 生根培养处理 将新梢接种于不同生长调节剂的生根培养基中,筛选适宜的生根培养基;全光照或暗培养 5、10 d,7 d 后转入无生长素的培养基中,30 d 调查生根率、根条数,确定适宜的暗培养时间;以 1/2MS 大为基本培养基附加 0.5、2.0 mg/L IBA 为生根培养基。设计 4 种不同的处理方法研究不同处理对生根的影响,方法分别为:A 直接接种到无生长素的培养基中;B 在有生长素的培养基中 5 d 后转移到无生长素的培养基中;C 在有生长素的培养基中 10 d 后转移到无生长素的培养基中;D 一直在有生长素的培养基中。

2 结果与分析

2.1 不同 6-BA、IBA 浓度组合桃杂种单株‘2-7’的有效萌芽率

茎段接种在启动培养基上,10 d 左右时茎段基部逐渐膨大;15 d 后腋芽开始萌发,露出淡绿色的小芽;30 d 后芽伸长到 3~4 cm,叶片展开。启动培养过程中,植物生长调节剂对比对腋芽的萌发有显著影响(表 1)。表 1 的极差分析结果表明,6-BA 浓度变化较 IBA 对启动培养的影响大。各处理萌芽率只有处理 4、9、10 与处理 3 差异显著,其它未达到显著水平。其中处理 10 的有效萌芽率最高为 88.89%。因此,适宜启动培养基为 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA。

第一作者简介:尚霄丽(1982-),女,河南濮阳人,在读博士,现从事园艺植物遗传育种工作。E-mail: xiaoli820218@163.com。

通讯作者:李靖(1950-),女,教授,现主要从事果树育种研究工作。E-mail: binlijing@163.com。

收稿日期:2010-11-01

表1 不同 6-BA、IBA 浓度组合桃杂种单株‘2-7’的有效萌芽率

处理	BA/mg · L ⁻¹	IBA/mg · L ⁻¹	有效萌芽率/%
1	1 (0.5)	1(0.1)	33.3ab
2	1 (0.5)	2(0.3)	38.9ab
3	1 (0.5)	3(0.5)	14.8b
4	1 (0.5)	4(1.0)	71.4a
5	2 (1.0)	1(0.1)	70.3ab
6	2 (1.0)	2(0.3)	50ab
7	2(1.0)	3(0.5)	43.3ab
8	2(1.0)	4(1.0)	67.7ab
9	3(1.5)	1(0.1)	76.77a
10	3(1.5)	2(0.3)	88.89a
11	3(1.5)	3(0.5)	59.26ab
12	3(1.5)	4(1.0)	50ab
13	4(2.0)	1(0.1)	35.48ab
14	4(2.0)	2(0.3)	45.45ab
15	4(2.0)	3(0.5)	40.62ab
16	4(2.0)	4(1.0)	53.3ab
X ₁	39.6	53.96	
X ₂	57.83	55.81	
X ₃	68.73	39.49	
X ₄	43.71	60.6	
R	29.13	21.1	

2.2 不同 6-BA、IBA 浓度组合对桃杂种单株‘2-7’增殖的影响

由表2可知,6-BA在1.0~1.5 mg/L浓度与IBA组合时,增殖倍数随BA浓度的增加而增加,而且植株顶端优势明显;但当6-BA浓度为2.0 mg/L时,试管玻璃化苗现象严重,导致试管苗质量和增殖倍数下降。生长素浓度在0.3~0.5 mg/L,浓度越大,增殖倍数越大,而且植株节间较大,植株较高,有效新梢数增加。当浓度超过0.5 mg/L时,随浓度的升高,嫩茎的增殖倍数呈下降趋势,基部愈伤组织逐渐增大,严重影响植株生长。芽的增殖和生长也取决于6-BA与IBA的相对比例,培养基20、21增殖倍数较高,分别为2.34、2.37;从苗的高度来看,培养基18、21长势最好,顶端优势明显,植株节间较长;因此,MS+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA为最佳增殖培养基。

表2 不同浓度 6-BA、IBA 组合对桃杂种单株‘2-7’增殖的影响

处理	BA/mg · L ⁻¹	IBA/mg · L ⁻¹	增殖倍数	平均苗高/cm
17	1.0	0.3	2.09bc	1.44bc
18	1.0	0.5	2.29ab	1.675a
19	1.0	0.7	1.41f	1.38bc
20	1.5	0.3	2.34a	1.42bc
21	1.5	0.5	2.37a	1.58ab
22	1.5	0.7	1.68e	1.46abc
23	2.0	0.3	1.8de	1.34c
24	2.0	0.5	1.92cd	1.27c
25	2.0	0.7	1.21f	1.32c

2.3 不同培养基、培养方式对生根培养的影响

2.3.1 不同基本培养基对桃杂种单株‘2-7’生根培养的影响 由表3可看出,将新梢接种到每个培养基里都不

同程度的生根,其中以1/2MS_大和1/2G_大效果较好。1/2MS_大生根率、平均根条数最高,分别为87.1%、3.46,且与其它处理差异显著。

表3 不同基本培养基对桃杂种单株‘2-7’生根的影响

培养基	接种数/个	生根数/条	生根率/%	平均根条数/条
1/2MS	30	17	56.7c	2.6
1/2G	30	19	63.3b	2.7
1/2MS _大	31	27	87.1a	3.46
1/2G _大	31	22	71b	3.1

注:1/2MS_大、1/2G_大均为培养基中大量元素减半。

2.3.2 生长素对桃杂种单株‘2-7’生根培养的影响 由表4可看出,附加生长素IAA生根效果较好,根较粗壮且基部无愈伤组织;0.5~2.0 mg/L浓度间生根率差异显著,其中以1.0 mg/L的生根率和平均根条数最高,分别为87.1%、3.46;单因子IBA处理,基部形成较多愈伤组织,以0.5 mg/L的处理最好,生根率和平均根条数分别为90.1%、3.61;随着IBA浓度的增加,愈伤组织分化越多,不利于根的形成,生根率较低。当IBA、IAA、NAA混合使用时,生根率及根生成数量明显低于单独使用生长素的处理,且达到显著水平,可能是因为生长素配合使用不利于生根。

表4 不同生长素类型、浓度对桃杂种单株‘2-7’生根的影响

激素浓度/mg · L ⁻¹			生根率/%	平均根条数/条
IBA	IAA	NAA		
0			54.5g	2.59
0.5			90.1a	3.61
1.0			83.3b	3.83
2.0			70e	2.08
	0.5		77.8cd	2.61
	1.0		87.1ab	3.46
	2.0		84.4b	3.34
0.5	0.5		64.9f	2.3
0.5		0.5	78.1c	1.42
1.0		1.0	73.3de	2.15

2.3.3 暗培养对桃杂种单株‘2-7’生根的影响 将新梢置于附加IBA 0.5 mg/L的1/2MS_大培养基中保持黑暗时间依次为5、10 d,随后于光下培养(表5)。处理间比较,一直光照的生根率与平均根条数最高,并且叶片较绿,植株正常;生根率和平均根条数分别为90.1%、3.83;10 d暗培养生根率下降明显,而且茎基部产生大量愈伤组织,叶片发黄,茎尖有坏死现象。可见黑暗时间较长对生根不利。

表5 暗培养对桃杂种单株‘2-7’生根的影响

处理	生根率/%	平均根条数/条
一直光照	90.1a	3.83
5 d暗培养后光照	88.6a	3.4
10 d暗培养后光照	77.4b	2.9

2.3.4 不同处理方法对杂种单株‘2-7’生根的影响 由表6可知,IBA浓度为0.5 mg/L时,10 d后转移生根率最高为90.6%;5 d后转移生根率最低;当IBA浓度为

2.0 mg/L, 5 d 后转移效果最好, 未转移的生根率最低, 基部愈伤组织较大。

表 6 不同处理方法对桃杂种单株
'2-7'生根的影响

处理	IBA/mg · L ⁻¹	处理方法	生根率/%	平均根条数/条
1	0	未转移	54.5	2.59
2	0.5	5 d 后转移	80.6	2.75
3	0.5	10 d 后转移	90.6	2.9
4	0.5	未转移	86.7	3.4
5	2.0	5 d 后转移	75	3.2
6	2.0	10 d 后转移	68.75	2.8
7	2.0	未转移	61.7	1.7

3 结论与讨论

试验中的最佳启动、增殖、生根培养基分别为 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA、MS+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA、1/2MS_x+0.5 mg/L IBA。但董义虎等^[1]进行山桃茎尖培养时发现 G 培养基附加 1.0 mg/L BA、0.5 mg/L IBA 增殖生长较好, 1/2MS 培养基中附加 0.1 mg/L NAA 生根率高; 陈宗礼等^[2]以晚蜜桃为材料, 最佳初代、继代培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA, MS+1.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA+0.2 mg/L IAA。孙俊等^[3]以'青研 1 号'桃为材料, 增殖培养基生长调节剂配比为 1.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA, 最佳生根培养基为 1/2MS+0.4 mg/L NAA。尚敏克等^[4]以晚熟桃 90-11-36 为材料, 诱导新梢增殖的最佳培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L IBA, 生根以 1/2MS+IBA 0.5 或 1.0 mg/L 效果较好。孙其宝等^[5]以安农水蜜为试材, 6-BA、IBA 浓度分别在 1~2、0.5~1 mg/L, 随着二者浓度的升高, 增殖倍数相应增加。白美发^[6]以京玉桃品种为试材, MS 培养基中添加 2.5 mg/L 6-BA、1.0 mg/L IBA 为诱导增殖培养基, 诱导出芽率 78%; 以 MS 附加 0.5 mg/L IBA 和 0.2 mg/L NAA 为生根培养基, 生根率为 98%。因此, 桃不同品种启动增殖培养时大多以 MS 为基本培养基, 细胞分裂素大多使用 6-BA, 浓度为 1.0~2.5 mg/L, 生长素大多使用 IBA、NAA, 浓度差异比较大; 生根培养时以 1/MS 为

基本培养基附加生长素 NAA 或 IBA, 浓度为 0.1~1.0 mg/L。

尚敏克等^[4]诱导生根以 1/2MS 为基本培养基附加 IBA 0.5 或 1.0 mg/L 接种 10 d 后转到无生长素的生根培养基效果较好, 生根率及生根效果值均最高。张恒涛^[7]以桃化砧木为材料, 生根培养时发现一直在有生长素的培养基中生根效果较好。周玉碧等^[8]生根培养时以 1/2MS 附加 100 mg/L IBA 培养液浸阴丛生芽基部, 然后于 18℃ 室温下暗培养, 生根率可达 85%。该试验结果表明, 生根培养时一定的生长素浓度和一定的处理时间范围内二者成反比: 即浓度低时处理的时间要长些或者一直置于附加生长素的培养基中, 浓度高时处理时间应短些, 否则影响根原基的形成、抑制根系生长。

光照对不定根发生的影响十分复杂, 研究报道结果不一。一般认为产生根不需光照, 暗培养可以促进一些树种的生根率。试验中暗培养降低了生根率, 而且茎尖变黄导致植株死亡, 这与 Antonopoulou 以 GF677 砧木为材料研究一致^[9]。

参考文献

- [1] 董义虎, 杨增海, 胡宽云, 等. 山桃茎尖培养研究[J]. 果树科学, 1985(3): 10-14.
- [2] 陈宗礼, 冯晓东, 云涛, 等. 晚蜜桃离体培养初探[J]. 延安大学学报, 2002, 21(4): 60-61.
- [3] 孙俊, 孙其宝, 俞飞飞, 等. 桃快速繁殖技术体系的研究[J]. 安徽农业科学, 2003, 31(5): 731-732.
- [4] 尚敏克, 尹伟伦. 晚熟桃的离体组织培养[J]. 辽宁林业科技, 2002(3): 5-7.
- [5] 孙其宝, 俞飞飞, 孙俊, 等. 安农水蜜的离体培养[J]. 安徽农业科学, 2002, 30(6): 950-964.
- [6] 白美发. 桃树的组培快繁试验[J]. 落叶果树, 2004(3): 7-8.
- [7] 张恒涛, 李靖, 宋尚伟, 等. 桃矮化砧木的组织培养及植株再生[J]. 河南农业大学学报, 2004, 38(1): 77-79.
- [8] 周玉碧, 李唯. 晚熟桃微繁殖技术的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2005(6): 745-749.
- [9] Antonopoulou C. The influence of radiation quality on the *in vitro* rooting and nutrient concentrations of peach rootstock[J]. Biologia Plantarum, 2004, 48(4): 549-553.

Study on Optimization of the Conditions for *in vitro* Culture and Plant Regeneration of Peach

SHANG Xiao-li^{1,2}, WANG Ni², LI Ming-ze², ZHANG Jian-peng³, Li Jing¹

(1. Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002; 2. Puyang Vocational and Technical College, Puyang, Henan 457000; 3. Henan xinlianxin fertilizer limited company, Xinxiang, Henan 453731)

Abstract: Stem segments with a single bud of peach were used as explants in culture *in vitro* and for rapid propagation. The results showed that suitable medium for initial culture, proliferation were MS+1.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA, MS+1.5 mg/L BA+0.5 mg/L IBA. *In vitro* rooting of cultured vigorous shoot of '2-7' was successful in the light all along by using the 1/2MS salts medium that included 0.5 mg/L IBA and transferred to 1/2MS salts medium without IBA.

Key words: peach ; tissue culture ; plant regeneration