

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.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.015

桃抗重茬砧木 GF677 组培快繁技术

赵剑波,郭继英,姜全,任飞,王真,李新越
(北京市农林科学院林业果树研究所,北京 100093)

摘要:通过不同激素配比试验,研究桃抗重茬砧木 GF677 组培快繁的适宜条件。结果表明,桃抗重茬砧木 GF677 茎段初代最佳培养基为 $F_{14} + 1.0\text{ mg/L } 6-BA + 0.1\text{ mg/L IBA}$,继代增殖最佳培养基为 $F_{14} + 1.0\text{ mg/L } 6-BA + 0.1\text{ mg/L IBA} + 0.1\text{ mg/L GA}_3$ 。不定芽在 $1/2MS + 1.0\text{ mg/L IBA}$ 的生根培养基上,30 d 后生根率为 89.40%,移栽成活率达 60%。

关键词:桃;抗重茬;砧木;组织培养

中图分类号: S662.104+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0060-02

在解决北京市平谷区老桃园品种更新时的重茬问题上,抗重茬砧木繁殖与利用将提供一种有效途径。平谷区桃产业在区政府的领导、科研单位的支持和果农的精心管理下,经过 20 年以上的努力,目前种植面积达 1.12 万 hm^2 ,桃产业已成为平谷区农村产业结构调整、农民增收的主要经济支柱。但是,为了在土地有限的条件下保持桃产业的这种优势地位,老桃园的改造成为平谷区桃树发展中面临的重要课题。众所周知,桃不耐重茬,在老桃园继续栽种会出现再植病,严重影响日后的树体生长、产量和品质^[1-3]。在国外通过 GF677 等一些抗重茬砧木的利用,可以很好地解决桃的重茬问题,对老园的更新改造有重要意义,而且作为优良砧木,其繁殖也应易于操作和推广。GF677 这样的砧木只有通过无性繁殖才能保持其抗性,除了用扦插等传统方法以外,组织培养是最常用也是最有效的繁殖方法。在国外,GF677 的组织培养研究已经进行了多年,组培苗已应用到生产中,但是由于商业的原因,其增殖、生根的培养基配方以及移栽的操作程序均没有文字报道。在国内,GF677 组培快繁也未见报道,组培快繁工厂化育苗的技术体系还远未形成^[4-5]。近几年来,北京市农林科学院林业果树研究所通过引入 GF677 砧木,率先开展了组培繁殖研究,有良好的工作基础和技术条件作保障,为项目顺利实施奠定了良好基础。本试验旨在通过对 GF677 组织培养各环节进行研究,以期建立 GF677 从外植体到成苗的完整组培快繁体系,以达到能够在生产中大规模应用的目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以北京市农林科学院林业果树研究所试验园中的成龄 GF677 的茎段为试验材料,进行组织培养研究。

1.2 试验方法

收稿日期:2015-05-13

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划(编号:2013BAD02B03-1-03)。

作者简介:赵剑波(1973—),女,河北乐亭人,博士,副研究员,从事桃资源与育种研究。Tel:(010)82598763;E-mail:zjianb@126.com。

1.2.1 外植体的灭菌和培养方法 用自来水将采集的茎段冲洗干净,先用体积分数为 0.1% 的新洁尔灭灭菌 10 min;再用质量分数为 0.1% 的 HgCl_2 灭菌 6 min;最后用无菌水清洗 3~4 次。将灭菌后的茎尖迅速接种到培养基上,培养温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照度 2 000 lx,光/暗周期为 16 h/8 h。

1.2.2 茎段初代培养基的筛选 以 F_{14} 为基本培养基,附加 0.5 mg/L 细胞分裂素 6-苄基嘌呤(6-BA)、0.2 mg/L 生长素 3-吲哚丁酸(IBA),进行基本培养基筛选试验;以 F_{14} 为基本培养基,附加不同浓度的 6-BA、IBA,组成 16 种处理组合(表 1)。每个处理接种 10 个外植体,3 次重复。茎尖培养 30 d 后统计结果。

表 1 茎段初代培养基处理组合

6-BA 浓度 (mg/L)	不同 IBA 浓度的组合编号			
	0 mg/L	0.05 mg/L	0.10 mg/L	0.20 mg/L
0	1	2	3	4
0.5	5	6	7	8
1.0	9	10	11	12
2.0	13	14	15	16

1.2.3 茎尖继代培养基的筛选 以 F_{14} 为基本培养基,附加不同浓度的 6-BA、IBA、赤霉素(GA_3),组成 9 种处理组合(表 2)。每个处理接种 10 个外植体,3 次重复,茎尖培养 30 d 后统计结果。

表 2 茎尖继代培养基处理组合

处理组合编号	6-BA 浓度 (mg/L)	IBA 浓度 (mg/L)	GA_3 浓度 (mg/L)
1	0.5	0.1	0.1
2	0.5	0.3	0.5
3	0.7	0.5	1.0
4	0.7	0.1	0.1
5	0.7	0.3	0.5
6	0.7	0.5	1.0
7	1.0	0.1	0.1
8	1.0	0.3	0.5
9	1.0	0.5	1.0

1.2.4 生根培养基的筛选 当芽在诱导培养基上生长到 2 cm 左右时,从幼芽的基部切下,接种在以 1/2MS 为基本培

培养基,附加生长素 IBA、GA₃ 组成的 8 种处理中(表 3),每个处理接种 10 个芽,3 次重复,30 d 后统计结果。

表 3 不同生根培养基处理组合

GA ₃ 浓度 (mg/L)	不同 IBA 浓度的组合编号			
	0.6 mg/L	0.8 mg/L	1.0 mg/L	1.5 mg/L
0	1	2	3	4
0.2	5	6	7	8

1.2.5 移栽 当苗高 3 cm 以上时,将试管苗培养瓶转移至室外散射光下炼苗,3 d 后用清水洗去黏附在试管苗根部的琼脂,定植于装有蛭石的苗床中。栽好后,立即用洒水壶浇水,并扣上塑料小拱棚保温、保湿,注意每天喷水。10 d 后,当试管苗长出新根、新芽时,逐渐揭开小拱棚通风、降温,增加光照时间,15 d 后去掉薄膜,20 d 后可喷施 0.1% 营养液。当小苗在苗床上生长 1 个月左右、植株抽出 2~3 张新叶、根系发达、叶片浓绿、生长旺盛时,即可移入富含有机质、排水良好的苗圃地定植。小苗移到大田时注意遮阴、浇透水、保墒,待缓苗 3~4 d 后再揭去遮阴物。根据试管苗根长的不同进行分级:A 级,≤0.5 cm;B 级,0.5~1.5 cm;C 级,1.6~2.5 cm;D 级,2.6~3.5 cm;E 级,3.6 cm 及以上。根据试管苗根数的不同进行分级:1 级为 1~2 条;2 级为 3~4 条;3 级为 5 条及以上。

1.2.6 统计数据 增殖系数:单个外植体在 1 个培养周期内增殖形成的嫩茎数(>0.5 cm)。其他数据计算方法如下:

生根率=生根植株数/植株总数×100%;

生根系数:单个植株的生根数;

生根效应=生根系数×单个植株平均长度(cm)。

2 结果与分析

2.1 初代培养

在本试验中,以处理 11 培养基组合对芽的分化最为有利,为初代培养的最佳激素组合。

2.2 继代培养

由表 4 可见,在设计 的 9 种激素组合中,GF677 的增殖系数都超过 4.00,以处理 7 最高,达到 5.90,且苗粗壮、叶片浓绿,不仅有利于试管苗的增殖,而且大大提高了粗壮苗的比例。

表 4 茎尖继代增殖系数

继代培养基编号	增殖系数		
	试验 1	试验 2	平均值
1	5.2	4.7	4.95
2	4.6	4.7	4.65
3	4.3	4.6	4.45
4	5.8	5.5	5.65
5	5.1	4.6	4.85
6	4.6	4.8	4.70
7	6.1	5.7	5.90
8	5.9	5.6	5.75
9	5.7	5.5	5.60

2.3 生根培养

由表 5 可见,8 种不同激素组合的生根培养基中,7 种 GF677 生根率均超过 50%,其中处理 4、处理 3 生根率达到 80% 以上,处理 3 生根率最高,为 89.40%。

表 5 不同生根培养基处理生根率和生根系数比较

生根培养基 编号	生根率(%)							平均生根系数 (条)
	1	2	3	4	5	6	平均值	
1	80.00	50.00	55.56	75.00	100.00	70.00	71.76	2.73
2	75.00	63.64	60.00	100.00	77.78	91.67	78.01	3.92
3	100.00	80.00	88.89	87.50	100.00	80.00	89.40	3.78
4	66.67	90.91	100.00	45.45	88.89	91.67	80.60	4.16
5	88.89	77.78	60.00	40.00	60.00	70.00	66.11	2.89
6	44.44	22.22	44.44	54.55	63.64	62.50	48.63	3.07
7	44.44	66.67	37.50	80.00	60.00	55.56	57.36	3.72
8	50.00	63.64	77.78	60.00	63.64	81.82	66.14	4.51

2.4 移栽

由表 6 可以看出,总体移栽成活率约为 60%,移栽过程中不同根长、根数处理对移栽成活率有一定影响,根长越长、

根数越多,移栽成活率也相应越高。GF677 砧木组培快繁流程见图 1。

表 6 不同根长、根数对移栽成活的影响

根长级别	根数级别 1			根数级别 2			根数级别 3		
	移栽苗数 (株)	成活苗数 (株)	成活率 (%)	移栽苗数 (株)	成活苗数 (株)	成活率 (%)	移栽苗数 (株)	成活苗数 (株)	成活率 (%)
A	36	6	16.67	35	10	28.57	31	11	35.48
B	34	15	44.12	29	14	48.28	30	19	63.33
C	34	20	58.82	26	18	69.23	33	25	75.76
D	52	36	69.23	34	26	76.47	22	19	86.36
E	34	27	79.41	25	21	84.00	16	14	87.50

其亚细胞定位,发现它极有可能定位于细胞的液泡中。

植物细胞相对于动物细胞而言,普遍含有液泡这一特殊的细胞器^[11-13]。液泡由单层质膜包围而成并充满液体,与植物细胞的各种重要的生命活动息息相关,如参与细胞渗透压和膨压的维持与调节、帮助稳定细胞内 pH 值、消除由某些有毒物质导致的毒害作用、存储营养物质及其多种代谢产物、保证细胞生物合成原料的稳定供应等。

NiZE583 基因的发现表明,在烟草合子的发育过程中有一种独特的未知功能的蛋白存在于液泡中并发挥了重要作用。本研究利用染色体步移技术对 *NiZE583* 基因的 5' 侧翼序列进行了克隆,将包括启动子、5' UTR 区的序列连接 GFP 后瞬时转化洋葱表皮细胞,能观察到极强的绿色荧光。说明获得的表达调控序列具有较强的启动子活性,为今后使用 RNA 干扰 (RNAi) 和过表达等基因功能分析手段对 *NiZE583* 基因在合子发育中的功能进行研究提供了帮助,将丰富我们对植物早期胚胎发生过程中的分子调控机制的认识。

4 结论

本试验成功克隆了烟草合子表达基因 *NiZE583*, 并获得了具有启动子活性的 5' 侧翼序列, 为阐明 *NiZE583* 基因参与早期胚胎发生的机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Le B H, Wagmaister J A, Kawashima T, et al. Using genomics to study legume seed development [J]. *Plant Physiology*, 2007, 144 (2): 562 - 574.
- [2] Lopes M A, Larkins B A. Endosperm origin, development, and function [J]. *The Plant Cell*, 1993, 5 (10): 1383 - 1399.
- [3] Olsen O A. Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2004, 16 (Suppl): 851 - 856.

(上接第 61 页)

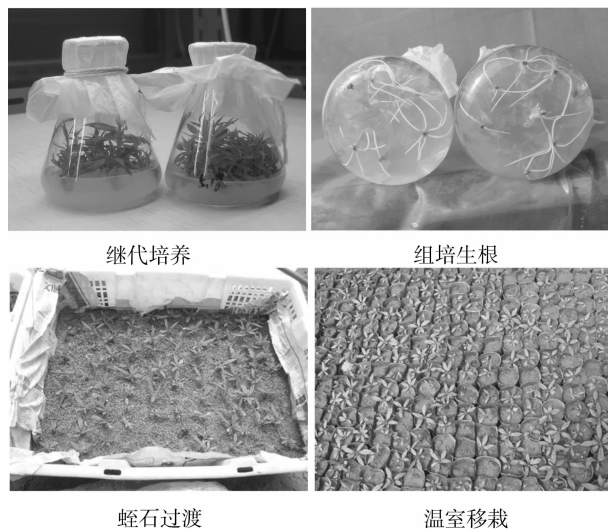


图1 GF677砧木组培快繁技术

- [4] Engel M L, Annie C, Christian D, et al. Sperm cells of *Zea mays* have a complex complement of mRNAs [J]. *Plant Journal*, 2003, 34 (5): 697 - 707.
- [5] Nodine M D, Bartel D P. Maternal and paternal genomes contribute equally to the transcriptome of early plant embryos [J]. *Nature*, 2012, 482 (7383): 94 - U120.
- [6] Anderson S N, Johnson C S, Jones D S, et al. Transcriptomes of isolated *Oryza sativa* gametes characterized by deep sequencing: evidence for distinct sex - dependent chromatin and epigenetic states before fertilization [J]. *The Plant Journal*, 2013, 76 (5): 729 - 741.
- [7] Domoki M, Szűcs A, Jäger K, et al. Identification of genes preferentially expressed in wheat egg cells and zygotes [J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32 (3): 339 - 348.
- [8] Zhang J E, Luo A, Xin H P, et al. Genes of both parental origins are differentially involved in early embryogenesis of a tobacco interspecies hybrid [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (8): e23153.
- [9] Fu C M, Sun M X, Zhou C, et al. Isolation of fertilized embryo sacs and zygotes and triggering of zygote division *in vitro* in *Nicotiana tabacum* [J]. *Acta Bot Sin*, 1996, 38: 262 - 267.
- [10] Zhao J, Xin H, Qu L, et al. Dynamic changes of transcript profiles after fertilization are associated with de novo transcription and maternal elimination in tobacco zygote, and mark the onset of the maternal - to - zygotic transition [J]. *The Plant Journal*, 2011, 65 (1): 131 - 145.
- [11] 李红, 李波, 陈雪梅, 等. 苜蓿愈伤组织细胞学观察及芽分化的研究 [J]. *江苏农业科学*, 2015, 43 (6): 49 - 51.
- [12] 宋晓慧, 陆引罡, 何丹, 等. 烟草对镉的吸收及镉在亚细胞中的分布 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42 (5): 116 - 117.
- [13] 梁魁景, 侯晓杰, 刘海鹏. 苯磺隆诱导甘蓝型油菜中双 2 号雄性不育的花药细胞学观察 [J]. *江苏农业科学*, 2015, 43 (9): 128 - 129.

3 结论

由本试验结果可知,桃抗重茬砧木 GF677 茎段初代最佳培养基为 $F_{14} + 1.0 \text{ mg/L } 6 - \text{BA} + 0.1 \text{ mg/L IBA}$; 继代增殖最佳培养基为 $F_{14} + 1.0 \text{ mg/L } 6 - \text{BA} + 0.1 \text{ mg/L IBA} + 0.1 \text{ mg/L GA}_3$; 不定芽在 $1/2\text{MS} + 1.0 \text{ mg/L IBA}$ 生根培养基上培养 30 d 后生根率为 89.40%, 移栽成活率达 60%。

参考文献:

- [1] 李勇, 朱更瑞, 方伟超, 等. 桃设施栽培研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42 (7): 162 - 166.
- [2] 陈尚平, 苏家乐, 何丽斯. 我国观赏桃的栽培起源和发展 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42 (3): 128 - 130.
- [3] 蔡婧茹. 我国 26 个观赏桃花主推品种的特征特性、栽培技术和生产应用 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42 (4): 146 - 148.