

密级：

论文编号：

中国农业科学院 学位论文

桃离体培养及叶片再生体系的建立

Plant Regeneration of Peach from Leaflet Cultured *in Vitro*

硕士研究生：闫承璞

指导教师：王志强 研究员

申请学位类别：农学硕士

专 业：果树学

研 究 方 向：生物技术育种

培 养 单 位：中国农业科学院研究生院

中国农业科学院郑州果树研究所

提交日期 2006 年 12 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Master Dissertation

Plant Regeneration of Peach from Leaflet Cultured *in Vitro*

Ms. Candidate : Yan Chengpu

Advisor : Wang zhiqiang

Major : Pomology

Specialty : Biotechnology Breeding

Chinese Academy of Agricultural Sciences

December, 2006

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

摘 要

本文以油桃品种曙光、野生毛桃、毛桃品种试材砂子早生、蟠桃品种早露蟠桃和甘肃桃为试材,在建立稳定高效的桃组织培养与快繁技术体系基础上,优化叶片再生不定梢的组织培养体系,提高植株再生率,建立了高频植株再生体系。主要结果如下:

(1) 建立、优化了桃离体快繁体系。研究了取材时间、基本培养基、培养条件和消毒方法对初代培养的影响,结果表明:曙光、砂子早生、野生毛桃和早露蟠桃的外植体于 3、4、5、9 和 10 月份取材,萌发率较高,而甘肃桃在 3~10 月份取材,萌发率无显著差异,均保持在 79% 以上;理想的初代培养基是 LP 培养基,萌发率是 MS 培养基的 2.1 倍;光照强度 1000lx 有利于外植体的萌发;探明一种污染率仅 2%且外植体伤害轻的消毒方案;在继代培养过程中,基本增殖培养基、不同浓度植物生长调节物质组合和 pH 经 3 次继代筛选,得出较好的基本培养基和植物生长调节物质组合分别为 LP 培养基、BAP0.75mg/L+IBA0.3 mg/L,而 SH+TDZ0.75mg/L+NAA0.3 mg/L 是甘肃桃最佳增殖培养基,适宜的 pH5.4~5.8;

(2) 研究了以桃叶片为外植体再生不定梢的条件与技术,建立了一套高频再生体系。分析了 3 种不同来源的叶片、再生培养基、叶片成熟度和试材在树冠上的位置对叶片再生的影响,研究表明:理想的外植体是来自再生不定梢上的幼嫩叶片,不定芽再生率达到最高 45%,而来自增殖培养新梢和预培养茎尖的叶片,再生率均低于 33%;较佳的再生培养基:SH+TDZ3.0mg/L+NAA0.3mg/L;充分扩展的幼嫩叶片以 1.0~1.5cm 长最好,再生率高出 0.5~1.0cm 长 3 倍以上;试材取材母株树冠的形态学下部有利于叶片再生。所有再生不定芽均能成苗并表现出正常的形态特征。

(3) 对再生的不定梢进行生根研究,获得了再生植株。研究了培养条件、基本培养基和植物生长调节物质对不定梢生根的影响,结果表明:不定梢在温度 24 ± 1 ,光照强度为 300lx 环境中培养 10d,再转到 2500lx 环境中培养 20d,其生根率达 100%,平均每个新梢产生 3.86 条有效根;最适生根培养基是 1/2LP+NAA1.0mg/L+IBA1.0mg/L。

关键词 桃 再生不定梢 离体培养 叶片 再生体系

Abstract

In order to optimize tissue culture system of peach (*Prunus persica* L.) and to improve plantlet regeneration rate and to establish high efficient plant regeneration system from leaves, leaves was used as explants on the basis of establishment of a rapid technique system of stable and high efficient micropropagation. Wild peach seedling [*Prunus persica* (L.) Batsch.], Gansutao (*P. kansuensis* Rehd.), Sunagowase [*P. persica* (L.) Batsch.], Shuguang (*P. persica* var. *nectarina* Maxim) and Zaolupantao (*P. persica* var. *platycarpa* Bailey) were used as tested materials. The results were as follows:

(1) A rapid technique system of micropropagation *In Vitro* culture was established. The effect of sampling time, basic media, cultural condition and the method of disinfection on pre-culture were distinguished. The results were as follows: As to Shuguang, Sunagowase, Wild peach seedling, and Zaolupantao, explants were sampled on March, April, May, September and October, the rate of germination was very high, but to Gansutao, sampled from March to October, the rate of germination kept higher than 79% and no significant difference. Ideal pre-culture media was LP media, the rate of germination was 210% of MS media; light intensity of 1000lx was beneficial to explants germination; the project of disinfection in which the rate of contamination was 2% and injury very little was proved up. The research was focused on basic proliferation media and 3 types of NAA and BAP combination or TDZ and NAA combination and pH in continuous 3 times subculture. In conclusion, the optimum media was LP media with 0.75mg/L BAP and 0.3mg/L IBA for Shuguang, Sunagowase, Wild peach seedling and Zaolupantao, but SH with 0.75mg/L BAP and 0.3mg/L IBA for Gansutao. The favorable pH for proliferation culture was 5.4-5.8 for peach.

(2) A high efficient regeneration system from leaves was established. The technique and condition of adventitious shoot from leaves *in Vitro* culture were studied. The effects of 3 kinds of different source of leaves, regeneration media, leaves maturity and material on the position of crown of a tree on regeneration were analyzed. The results showed that, with ideal explants from the tender leaves of adventitious shoot the regeneration rate was the highest-45%. But from proliferated leaves or pre-conditioned leaves, the regeneration rate was under 33%. The better regeneration media was SH+TDZ3.0mg/L+KT0.3mg/L. The regeneration rate of 1.0-1.5cm long fully expanded leaves was 3 times than 0.5-1.0cm long. The material from the bottom of crown of a tree was propitious to adventitious shoot regeneration from leaves. All the plantlets developed into complete plants with normal morphological characteristics.

(3) The adventitious shoots were rooted and plantlets were obtained. The effects of cultural condition, basic media and hormone on the rooting were studied. The results were as follows: After 10 days of 300lx light intensity treatment transferred to 2500lx light intensity and cultured for 20d, amount of effective roots were 3.86 per shoot and the rate of rooting was 100%. The best rooting medium was 1/2LP supplemented with 1.0mg/L NAA and 1.0mg/L IBA.

Key Word: peach, *Prunus persica* L., adventitious shoot regeneration, leaf explant, *In vitro* culture, regeneration system

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	II
英文缩略表	V
第一章 绪论	1
1.1 研究目的和意义	1
1.2 国内外研究进展	1
1.2.1 以幼胚及其各部分（子叶、胚乳、胚轴）为外植体再生 ...	2
1.2.2 以叶片为外植体再生	3
1.2.3 桃的遗传转化	4
1.3 研究内容	5
1.3.1 研究内容	5
第二章 桃组织培养与快繁技术研究	6
2.1 材料和方法	6
2.1.1 材料与处理	6
2.1.2 初代培养方法	6
2.1.3 继代增殖培养	7
2.1.4 培养基的制备	8
2.1.5 培养条件	8
2.1.6 统计分析	8
2.2 结果与分析	9
2.2.1 初代培养	9
2.2.2 继代培养	13
2.3 小结	18
第三章 叶片离体再生不定芽的研究	20
3.1 材料和方法	20
3.1.1 试验材料	20
3.1.2 培养基的制备	20
3.1.3 不定梢再生的研究	21
3.1.4 不定梢的生根研究	24
3.1.5 统计分析	24
3.2.结果与分析	25
3.2.1 增殖叶片离体再生	25
3.2.2 预培养茎尖叶片离体再生	30

3.2.3 以再生叶片为外植体再生不定芽的研究	33
3.2.4 不定梢的生根	34
3.3 小结	35
第四章 讨 论	37
第五章 结 论	40
参考文献	42
致 谢	46
作 者 简 历	47

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
AdSO ₄	Adenine Sulfate.	硫酸腺嘌呤,
BAP	6-Benzylaminopurine	6-苄氨基腺嘌呤
GA	Gibberellic	赤霉素
GUS	β-glucuronidase	-葡萄糖苷酸酶
IBA	Indole butyric acid	吲哚丁酸
KT	Kinetin	激动素
NAA	-Naphthalene acetic acid	-萘乙酸
NPT	Neomycin phosphotransferase	新霉素磷酸转移酶
TDZ	Thidiazuron	噻苯隆

第一章 绪论

1.1 研究目的和意义

随着现代基因工程技术的高速发展,许多转基因果树产生了并投入到田培研究。但桃树的遗传转化停滞不前,主要是因为缺乏稳定高效的再生系统。目前,仅以桃幼胚及其各部分(包括胚乳、子叶和胚轴)为外植体初步建立了再生体系,但不稳定且再生频率低,因为以上外植体在离体再生植株过程中本身就存在变异的可能;再者幼胚及其各部分再生植株都为实生树,与其母体性状相比,某些性状发生分离。如果对其进行遗传转化,很难做到定向改良性状。如果外植体是来源于成熟基因型的无性器官,以其建立的再生体系,进行遗传转化,该体系即保持母体性状又能体现被转化基因的优良性状。再生体系是遗传转化的基础。利用良好的再生体系进行转基因研究,可以缩短育种时间,提高育种效率,扩大种质资源。迄今,仅有一例以桃树叶片为外植体再生不定梢,其再生频率低且重复性差,实验操作复杂,并未对影响再生的主要因素进行分析,也未解释叶片和叶柄再生不定芽组织学起源和发生过程。本项研究以桃的成熟组织——叶片和叶柄为外植体进行离体再生研究,探明影响再生的内外因素,建立稳定高效的再生系统,为桃遗传转化奠定基础。

1.2 国内外研究进展

传统果树育种周期长、工作量大,如何缩短果树的育种时间和提高育种效率是果树育种工作者长期追求的目标。20世纪80年代发展起来的转基因技术,使人类达到这一目标成为可能。转基因所用的是成龄离体的无性繁殖材料,获得的转基因植株不存在童期问题,也不受季节限制,因此转基因技术可以缩短育种周期;转基因技术是在不改变多数优良性状的前提下,仅对个别或少数几个性状进行改良,因此只对个别性状进行选择即可获得理想的个体。以上两点都可以极大地提高育种效率。而且转基因技术可以打破物种间的界限。无论是来自植物、动物还是微生物的基因都可以转化受体,极大地丰富了基因的来源。以上这些都是常规育种方法无法相比的。因此,自从首例转基因果树——核桃诞生以来(Mcgranahan et al. 1988),随后,James等获得了转基因苹果(1989),Uematsu等和Rugini等分别通过根癌农杆菌和发根农杆菌介导成功转化了猕猴桃(1991),李、杏、樱桃等也已经获得转基因植株(Mante et al. 1991; da Camara Machado A et al. 1992; Scorza 1998),而且转基因李、杏、猕猴桃等已进入田间试验阶段。随着转基因技术的发展,转基因番木瓜投入大田生产(Fitch et al. 1992),我国农业部已批准转基因苹果可以投入大田试验。以上转基因果树所用的遗传转化受体主要为叶片。但桃树在转基因方面停滞不前,究其原因,是因为桃树没有稳定、高效的再生体系。离体再生技术是遗传转化的基础,因此建立高效、稳定的以成熟基因型无性组织为外植体的再生体系是最关键的。

自 20 世纪 80 年代中期以来,对桃树组织培养研究很多,但主要集中在胚培养和茎尖培养,并有多部著作对此进行论述,但对桃树离体再生研究报道不多,本文综述了这方面的进展,探讨了应深入的工作,以供以后研究参考。

1.2.1 以幼胚及其各部分(子叶、胚乳、胚轴)为外植体再生

1.2.1.1 幼胚

桃幼胚再生方式是经过诱导愈伤组织和体细胞胚发生两条途径完成的(Sorza et al.1992),但多数再生是经过愈伤组织阶段发生的。

Hammerschlag 等(1985)利用两个晚熟桃不同试材日高和日冠的幼胚通过愈伤组织途径获得再生植株,结果表明:幼胚再生不定梢能力取决于愈伤组织类型,并将愈伤组织分为粉状和结球状愈伤组织两种类型,而结球状愈伤组织在近表面处富含高密度分生组织细胞,具有分生能力,可诱导产生不定芽。姚强等(1989)利用早熟桃不同试材新端阳幼胚的圆球状愈伤组织获得了试管苗,但愈伤组织经过多代培养以后,其再生力下降。姚强等(1990)成功获得中晚熟不同试材花后 60 天的幼胚再生植株,研究发现:愈伤组织形态特征有粉状、颗粒状和球状三种类型。球状愈伤组织可以分化不定梢。验证了桃幼胚再生能力取决于愈伤组织的类型(Hammerschlag et al.1985;Schneider et al.1992),同时还发现:不同培养基诱导的球状愈伤组织分化不定梢的能力也有差异,以 1/2MS 附加 1.0mg/L BA 培养基诱导的球状愈伤组织再生不定梢的能力最强。张永庆等(2001)研究表明,6—BA 诱导愈伤组织分化不定芽的效果优于 KT,以浓度为 1.0—1.5mg/L 的 6—BA 对幼胚愈伤组织分化不定芽的效果最佳。当 6-BA 高于 1.5mg/L 时,不定梢玻璃化现象严重,生长缓慢,难以成株。李曜东和魏玉凝(2003)以肥城桃花后 40-50d 的幼胚为试材,也成功地诱导出再生株。

桃幼胚也可以通过体细胞胚产生再生植株。生长 90—120d 的未成熟胚经过培养,从未成熟胚的子叶上直接诱导出体细胞胚,经分化产生再生植株(Schneider et al.1992)。闫国华和周宇(2002)初步建立了桃体细胞胚发生和增殖的三阶段程序,即胚性愈伤组织诱导,体细胞胚发生和发育,体胚萌发成植株以及次级体细胞的增殖。综上所述,对桃体细胞胚发生诱导子叶直接再生不定芽,这是一种高效率的再生途径;桃花后 55—75d 幼胚在光照条件下最适合胚性愈伤组织的诱导。

1.2.1.2 子叶

桃的子叶离体再生植株主要通过直接分化途径产生,也可以通过愈伤组织途径产生。

桃子叶再生植株的研究起步于 1989 年(Mante et al.). Scorza 等(1995)以桃砧木成熟种子的子叶为试材,研究表明:子叶在暗中 MS 培养基培养三周能有效地诱导再生,且该培养基附加 2.5%蔗糖、1.25microM 或 2.5microM IBA 和 6.25microM 或 12.5microM TDZ,能获得最大再生率。国内也有许多子叶再生植株成功的报道。孙清荣等(1999)对九月菊桃子叶再生进行研究并

获得再生植株,但再生率极低。孙清荣等(2000)选用 1/2MS 培养基具有较高浓度的细胞分裂素(BA 10mg/L)比较低浓度(BA 5mg/L)更有利于子叶不定梢的产生;在相同水平 BA 5mg/L 的条件下,生长素 IBA 和 BA 适当配比比 NAA 与 BA 的配合更有利于子叶再生不定梢。闫国华和周宇(2002)对子叶再生研究发现:苯脲类细胞分裂素(CPPU 和 TDZ)对桃幼胚子叶直接再生植株的诱导活性大于嘌呤类细胞分裂素(6-BA、激动素和玉米素),还发现不同发育时期的子叶再生能力不同,对京艳不同试材而言,最佳取材时期为花后 70d,而花后 55d 的子叶不具备再生能力,成熟胚的子叶再生能力很低,仅为 3.8%。孙跃峰等(2003)研究影响油桃再生植株因子发现:子叶暗培养时间长短和取材时期是影响再生的关键因素,

1.2.1.3 胚乳和胚轴

孟新法和周维燕(1981)报道早熟桃不同试材‘北农早艳’的幼嫩胚乳培养在附加 0.5-1ppm 2,4-D 和 0.25ppm BA 的 MS 培养基上均诱导产生了愈伤组织,并在附加有 0.5-1.0ppm 2,4-D 和 0.5ppm BA 的培养基上分化出了胚状体。将胚状体转移到加有 0.01-0.05ppm NAA 和 0.5-2.0ppm BA 的 MS 培养基上后,胚状体很快发育出小植株。闫国华和周宇以花后 70d 下胚轴为外植体进行离体培养产生高频率的再生植株(2002)。结果表明,苯脲类细胞分裂素 TDZ 5mg/L 和 NAA 0.01mg/L 配合对下胚轴再生具有很强的诱导活性,诱导再生率高达 95.2%,平均不定芽数达每外植体 25.3 个。组织学观察表明不定芽起源于皮层薄壁细胞,属直接再生方式。田增胜(2005)报道以早熟油桃华光、曙光为试验材料,对影响其胚轴再生的外源生长调节剂浓度及组合、培养基、胚发育时期、低温处理等因素进行了研究。结果表明,胚发育时期在盛花后 74d(74DAFB)更适合于做为胚轴再生的外植体。幼胚经过 75d 的低温处理,能够提高胚的萌发率,而且幼苗生长状态良好。胚轴能够直接再生植株。上、下胚轴无显著差异。华光油桃胚轴再生以 G + TDZ 3.0mg/L + KT 1.0mg/L + NAA 3.0mg/L 效果最好,曙光油桃胚轴再生以 QL + TDZ 2.0mg/L + NAA 0.5mg/L 效果最好。

1.2.2 以叶片为外植体再生

迄今,关于以桃树叶片或叶柄等成熟组织为外植体的离体再生植株在国内文献中未见报道,而在国外仅有一篇关于叶片离体再生较为成功的报道(Gentile et al.2002),但研究者们以成熟组织为外植体的离体再生研究已进行了多年。

Veronique 等(1996)研究结果表明:TDZ 能诱导叶片产生绿色愈伤组织;BA 和玉米素诱导叶片产生小的愈伤组织;对于生长素处理,2,4-D 和麦草畏诱导叶片产生白色到黄色脆性的愈伤组织;而激动素处理叶片,不能诱导愈伤组织。还研究不同碳源对愈伤组织形成的影响,发现含有葡萄糖的培养基相对于含蔗糖和果糖的培养基所诱导产生的绿色紧凑型愈伤组织频率高,但未产生再生植株。

Hammerschlag 等(1998)报道了成熟桃叶片通过诱导能产生愈伤组织和根,并发现:叶片在含有 0.27mM NAA 和 2.2mM BA 能诱导产生较大的愈伤组织,叶片的预培养和在预培养过程中所用培养基附加 2,4-D 也是诱导叶片产生愈伤组织的关键因素,而光照抑制根的形成。

Gentile 等首次报道桃树叶再生不定梢 (2002)。以长期预培养的成熟基因型 842 standard 再生率最高可达 30.0%。研究发现：影响叶片再生不定梢内在因素是基因型，外在因素是离体叶片预培养的培养基成分及生长条件和叶柄组织；因为诱导叶片产生的愈伤组织着生于叶柄，没有叶柄或太小无法着生愈伤组织，叶柄的存在是李属叶片再生的关键，这种现象在其他果树种类中叶片再生也有报道 (Antonelli and Druat 1990; Miguel et al. 1996)，而没有经过预培养的叶因没有叶柄不能再生，Gentile 等认为；预培养的叶片再生时，提高 BA 浓度，交替光和生长素的供给会刺激有不定梢再生能力的细胞发生形态学反应 (尚需进一步验证)；交替生长素和光的供给会诱导形态反应产生，这个结论与 Korban 等 (1992) 和 Miguel 等 (1996) 报道是一致的，这些作者报道暗培养或低光强度培养在提高外源生长素水平的基础上能诱导发生形态反应。

1.2.3 桃的遗传转化

桃树遗传转化进展较慢，目前仅有文献报道转基因植株产生，无生产应用转基因植株。其转化方式是通过农杆菌介导和基因枪法，桃的遗传转化主要以农杆菌介导法为主。

1.2.3.1 农杆菌介导法转化桃

Smigicki 等 (1987) 首先开展了桃的遗传转化工作，随后，Hammerschlag 和 Owens (1989) 用农杆菌 *tms::Tn5* 转化桃 2cm 长茎段，产生肿瘤组织，转化体 DNA 探针杂交结果显阳性。Scorza 等 (1989) 用含有 pGA472 质粒的农杆菌株 A281 感染桃叶片、幼胚和长期的胚性愈伤组织，Southern 杂交显示有外源 DNA 转入叶片、幼胚和胚性愈伤组织，但未获得再生植株。Hammerschlag 和 Smigicki (1991) 用 *tms328::Tn5* 感染桃幼胚，诱导产生愈伤组织，愈伤组织还分化成芽。经卡那霉素筛选的芽比对照分支少，不易生根。Ognjanov 等 (1994) 用带有 *GUS* 基因的农杆菌感染桃子叶，转化体 *GUS* 荧光检测，与阳性对照明显不同。Hammerschlag 和 Smigicki (1998) 对转基因桃苗在温室和试管内的生长进行研究，凡是转入 *ipt* (细胞分裂素合成) 基因的苗不论在试管还是在温室中，他们的生长习性和腋芽的形成都发生了改变；转基因植株显示出鲜重和腋芽数量显著得高出对照；可以忍受高浓度的 BA，87% 的转化植株在没有 BA 时能推迟衰老。

国内在桃的遗传转化方面也取得了进展。李曜东和魏玉凝 (2003) 报道获得转基因桃苗，但此基因在转化体中是否表达还未知。吴延军等 (2004) 用幼胚作为根癌农杆菌介导转化受体，通过 *GUS* 瞬时表达率分析发现，预培养 1d、感染 15min、共培养 42h 和不添加 AS 时 *GUS* 瞬时表达率最高。

1.2.3.2 基因枪轰击法转化桃

Ye 等 (1998) 用基因枪轰击桃幼胚、胚轴、子叶、茎尖、叶片和长期胚性愈伤组织转化 *GUS/NPG* 嵌合基因，所有类型的外植体均获得了 *GUS* 基因的瞬时表达，并在长期胚性愈伤组织中得到固定表达，未获得转基因芽。纵观桃遗传转化受多种因素干扰。所用转化外植体类型和发育阶段、转化方法及培养条件、桃的基因型都会影响遗传转化率。

综上所述,迄今为止,桃树离体再生所用外植体大多是幼胚及其各部分。很少来源于成熟的无性组织,这或许是离体再生不稳定的因素。要建立高效、稳定的再生体系,外植体应该是成熟基因型的无性组织。首先,幼胚或合子胚各部分离体再生植株过程中,易发生基因突变;再者,幼胚及其各部分是实生后代,再生植株与母体相比发生性状分离。因此,以幼胚或合子胚各部分为外植体建立的再生体系不稳定,而且在桃树定向改良方面受到局限。目前,以成熟无性组织为外植体再生植株的技术发展缓慢,仅有一例桃树叶片离体再生不定梢,其再生频率低,实验操作复杂,并未对影响再生的主要因素进行分析,也没解释叶片不定芽的组织学来源。为进一步认识桃树成熟叶片离体再生机制,建立稳定、高效的离体再生体系,今后研究应注意以下几个方面:(1)研究叶片再生机理,研究非基因型依赖性的离体再生操作方式,以消除基因型依赖性,增大遗传改良的普遍性和应用范围;(2)研究影响叶片高频再生的主要外在因素;(3)对于基因型特异性很强且具有优良性状的不同试材,为其特定的基因型建立适合的高效的再生体系;(4)植物解剖学研究,愈伤组织学起源及其对再生的影响。

1.3 研究内容

1.3.1 研究内容

以油桃品种曙光、野生毛桃、毛桃品种砂子早生、蟠桃品种早露蟠桃和甘肃桃为试材,在建立稳定高效的桃组织培养与快繁技术体系基础上,优化叶片再生不定梢的组织培养体系,提高植株再生率,建立高频植株再生体系。

第二章 桃组织培养与快繁技术研究

桃常规繁殖法繁殖系数相对较低,易感染病毒,给生产带来很大的损失。现许多国家在桃砧木生产上应用了组培苗商业化生产技术(Loreti and Morini, 1982, Loreti et al, 1991),而在栽培品种方面的组培苗商品化尚未见报道。其中主要原因之一是桃不同试材试管苗在微繁过程中很难驯化,所建立的快繁体系一般不稳定,限制了其试管苗商业化的发展,也制约了茎段、叶片和根离体再生不定梢的研究。本文以毛桃品种砂子早生、油桃品种曙光、蟠桃品种早露蟠桃、野生毛桃和甘肃桃为试材,采用不同培养基、植物生长调节物质及其浓度的组合和培养条件,以期建立高效稳定的离体快繁技术体系,为今后的组培苗商品化生产提供技术支撑,更重要的是为再生研究奠定基础。

2.1 材料和方法

2.1.1 材料与处理

供试材料曙光(*Prunus persica* var. *nectarina* cv. Shuguang)、野生毛桃 (*Prunus persica* L. wild peach sideling)、砂子早生(*Prunus persica* cv Sunagowase)、早露蟠桃(*Prunus persica* var. *platycarpa* cv. Zaolupantao)和甘肃桃(*Prunus Kansuensis* Rehd.)均来自中国农业科学院郑州果树研究所桃育种试验园。取材时间始于3月份,每隔一月均取材一次,直至10月份。9月份的试材需要打破休眠处理,先剪除枝条的叶子,自来水冲洗1h,再用5%KNO₃和25mg/L GA₃喷施试材以打破试验材料的休眠(田莉莉等,2002;方金豹等,2005),再将试材放在24℃温室水槽中抽枝,每3天换一次水,每次剪取基部2—3mm,直至枝条抽出小的枝条(王力荣等,1995)。10月份的试验材料先放在4℃冰箱冷处理2个月(Hammerschlag,1982)。

2.1.2 初代培养方法

2.1.2.1 试材处理

取当年生新梢、叶芽和1年生枝条(9和10月份的试材),先用除菌肥皂水漂洗,再用流水冲洗一小时,然后,剪取叶芽或截取顶芽和具有2/3叶片的茎段(约1.5cm长且1/3木质化)。

2.1.2.2 几种消毒方法的比较

于超净工作台采用4种消毒方法进行灭菌处理:

(1) 75%酒精浸润30s, 0.1%升汞灭菌6min, 无菌水冲洗5遍;

(2) 50%酒精浸润 30s, 0.1%升汞灭菌 6min, 无菌水冲洗 5 遍;

(3) 50%酒精浸润 30s, 0.1%升汞灭菌 5min, 无菌水冲洗 5 遍, 再用爱尔施牌强氯杀星消毒片(上海利康化工公司出产, 有效氯 50mg/g) 以 1.5g/L 浓度灭菌 15min, 无菌水漂洗 5 遍;

(4) 50%酒精浸润 30s, 再用爱尔施牌消毒片以 1.5g/L 浓度灭菌 20min, 无菌水漂洗 5 遍; 对于冷处理的顶芽和侧芽的消毒程序, 仅须用爱尔施牌消毒片以 1.5g/L 浓度多处理 15min, 其他灭菌步骤同(4), 以上在消毒过程中须不断地摇动实验材料。

2.1.2.3 筛选初代培养基

选取 LP、SH、G 和 MS 培养基, 植物生长调节物质 BAP1.0mg/L+IBA0.2mg/L+GA₃0.1mg/L, 确定初代培养的最适培养基。

2.1.2.4 取材时间筛选

根据前期摸索试验, 以下初代培养均采用 LP+ BAP1.0mg/L+IBA0.2mg/L+GA₃0.1mg/L 培养基, 选取材时间为 3、4、5、6、7、8、9 和 10 月份, 探讨取材时间对外植体萌发率的影响, 从而确定适宜的取材时期。

2.1.2.5 消毒方法对试材萌发率的影响

采用 4 种消毒方法, 比较其对试材萌发率的影响和继代培养中污染情况, 从而得出最优的消毒方法。

2.1.2.6 光照强度的筛选

在初代培养过程中, 采用 6 种光照强度处理, 分别为 0、500、1000、1500、2000 和 2500lx, 调查不同光照条件对外植体萌发率的影响, 确定最佳的光照强度。

2.1.2.7 取材部位的筛选

以 4 月份取材为例, 选用曙光和砂子早生为试材, 人为地将树冠分上、中和下三个部位, 以树冠水平高度为基准, 0—50cm 为下层, 50—100cm 为中层, 100cm 以上为上层, 调查不同取材部位对外植体萌发率的影响, 从而确定最佳的取材部位。

2.1.3 继代增殖培养

2.1.3.1 继代增殖培养基的筛选

选用 LP、SH、MS 和 G 培养基为基本培养基, 大量元素分别依 LP、SH、MS 和 G 培养基, 铁盐、微量元素和有机物质依据 MS 培养基, 植物生长调节物质组合 BAP0.5mg/L+IBA0.2mg/L+AdSO₄1.5mg/L+GA₃0.1mg/L。以全部应试基因型(曙光、砂子早生、野生毛桃、早露蟠桃和甘肃

桃)为试材,对基本培养基连续筛选三代,每代30天。在每种培养基中接种每种基因型30个试管苗,每个处理重复3次,以期筛选出适合各基因型的基本增殖培养基。

2.1.3.2 pH 的筛选

以曙光和砂子早生为试材,大量元素依据LP培养基,微量元素、维生素类和肌醇依据MS培养基,植物生长调节物质组合BAP0.75mg/L+IBA0.2mg/L+GA₃0.1mg/L+AdSO₄1.5mg/L,选取pH为4.6、5.0、5.4、5.8和6.2,每种pH连续筛选3代,每代30天,每个处理接种30个新梢且重复3次。每30d统计1次增殖系数,调查不同pH环境对组培苗增殖系数的影响,以期筛选出最适pH,并观察在以上pH环境下组培苗的生长动态。

2.1.3.3 筛选不同的植物生长调节物质组合

根据前期摸索试验,曙光、砂子早生、早露蟠桃和野生毛桃采用LP培养基,甘肃桃采用SH培养基。每种基因型于每种培养基上连续培养3代,每代30d。每个处理重复3次。

2.1.4 培养基的制备

初代培养基:大量元素按照LP、SH、MS和G培养基,微量元素、维生素类和肌醇依MS培养基,植物生长调节物质BAP、IBA、GA₃和AdSO₄,蔗糖30g/L,用pH计(上海雷磁公司出产,型号PHSJ—3F)加1MKOH或HCl调pH至5.8,再加5.5g/L琼脂,高压灭菌121 20min。

继代培养基:大量元素如LP、SH、MS和G培养基配方,微量元素、有机物质等依据MS培养基配方,蔗糖30g/L,用KOH调pH至5.6,然后加琼脂5.3g/L。高压灭菌121 20min。GA₃和AdSO₄均需过滤灭菌,在母液定溶前用KOH或HCl调pH至5.6,母液定溶后过滤灭菌,二者均在培养基高压灭菌后加入。以上大量元素、微量元素和有机物质均为上海生物工程技术有限公司产品,植物生长调节物质为Sigma公司产品。

2.1.5 培养条件

本文中,如无特殊说明,均按以下培养条件:培养温度24±1,光周期16h/d,光照强度约为2500lx。

2.1.6 统计分析

初代培养30d后统计污染率和萌发率。污染率为污染的外植体数与接种的外植体总数之比;萌发率为未污染、萌发的外植体与接种的外植体总数之比,将曙光、野生毛桃、砂子早生和早露蟠的污染率混合统计。

增殖系数是继代增殖培养30d后,每个试管苗产生有效芽(长度1cm)的数量。数据分析

采用邓肯氏最小显著差数法，在增殖培养中每个处理接种 30 个茎段，重复 3 次。

本文数据处理采用 SAS6.12 统计分析软件和 Excel 软件作图。

2.2 结果与分析

2.2.1 初代培养

2.2.1.1 消毒效果

由表 2.1 可以看出，采用第 4 种消毒方法最佳，外植体的污染率为 2%，消毒彻底；第 3 种消毒方法的污染率也是 2%，但消毒不彻底，而采用第 1 种和第 2 种消毒方法，外植体的污染率达 50%，二者的消毒效果无显著差别，因此，75%酒精与 50%的浸润效果相同，但分别采用此二种消毒方法后，外植体表现却有很大的差异：75%酒精较 50%酒精有较大的损伤，叶片褐化且茎段变黑。

表 2.1 消毒方法对萌发率的影响
Table 2.1 The effect of disinfect method on explant germination capacity

消毒方法 Disinfect method	外植体 (个) No. of explants	发芽个数 (个) No. Of germination	平均萌发率 (%) Means of rate of germination	污染率 (%) Rate of contamination	消毒彻底否* Sterilized completely or not
第 1 种	100	35	35C	50	否 No
第 2 种	100	36	36C	49	否 No
第 3 种	100	33	33B	2	否 No
第 4 种	100	83	83A	2	彻底 Yes

*消毒彻底是指组培苗始终保持高度无菌状态；消毒不彻底是指表示初代培养结束无污染，但在继代培养过程中，45 天后出现规律性的某种菌伴随污染现象

Completely sterile means that shoots *in vitro* culture always keep no contamination; on the contrary, no contamination when pre-culture, but there is contamination with some bacteria after 45d subculture.

注：大写字母表示 $\alpha=0.05$ 水平下差异显著性，同列不同字母表示差异显著。下同。

Note: Capital letter represents significance at 0.05. Different letters within one column showed significance at 0.05 levels by Duncan's LSD test. The same as below.

2.2.1.2 消毒方法对萌发率的影响

外植体消毒是获得无菌苗的关键，消毒方法直接影响外植体的萌发率。据表 2.1 所示：第四种消毒方法最佳，污染率为 2%，而且该消毒方法对外植体的萌发影响最小，外植体萌发率高达 83%，显著的高于其它 3 种消毒方法。该方法对外植体的伤害小，如图 2.1 所示，在消毒 20d 后，外植体上的叶片保持浓绿，未显现受到损伤的迹象，而且消毒彻底，试管苗在继代培养过程中处于高度的无菌状态；虽然使用第 3 种消毒方法污染率也为 2%，但该消毒方法严重影响萌发率，仅为 33%。采用第一种、第二种和第三种消毒方法，萌发率无显著差别，但消毒不彻底，在继代培养 45d 后出现规律性的某种菌伴随污染现象。

2.2.1.3 不同培养基对外植体萌发的影响

LP 和 SH 培养基上的茎段, 7d 后从叶腋处萌发出黄绿色小芽点 (图 2.2), 15d 后进入快速生长阶段, 30d 已发育成不定梢 (图 2.3), 叶片浓绿, 富有光泽而舒展, 萌发芽健壮, 伸长生长快; 而在 G 培养基上, 萌发芽叶片黄且基部的叶片很大, 向上生长较慢, 这与报道 (曹孜义和刘国民, 1996, 张满让等, 2005) 外植体在 G 培养基上萌发芽生长快, 叶色浓绿不一致; 在 MS 培养基上, 萌发芽较 LP 和 SH 培养基的小且瘦弱, 叶片暗绿而不舒展。



图 2.1 消毒 20d 的外植体

Fig.2.1 Explants 20d after disinfected

由表 2.2 可知, 虽然曙光、砂子早生、甘肃桃、野生毛桃和早露蟠桃在 LP、SH、MS 和 G 培养基上的萌发率差异很大 (33-82%), 但应试基因型却表现出相同的趋势, 即在 LP 培养基上萌发率都达最高, 曙光、砂子早生、甘肃桃、野生毛桃和早露蟠桃的外植体萌发率分别为 85%、80%、83%、81%和 82%; 其次是 SH 培养基, 曙光、野生毛桃、砂子早生、早露蟠桃和甘肃桃在 SH 培养基的萌发率均显著高于 MS 和 G 培养基, 分别是 70%、73%、65%、67%和 75%; 在 MS 和 G 培养基上, 各外植体萌发率都保持在较低水平, 一般仅在百分之三十左右, 此结果与胡霓云 (1990) 报道的茎段启动培养结果相一致。

表 2.2 不同培养基对外植体萌发的影响

Table 2.2 Effect of different media on explant germination (%)

培养基 Medium	萌发率(%) Rate of germination				
	曙光 Shuguang	砂子早生 Sunagowase	甘肃桃 Gansutao	野生毛桃 Wild peach	早露蟠桃 Zaolupantao
LP	83a	80a	83a	81a	82a
SH	70b	65b	80a	73b	67b
G	45c	35c	34b	42c	37c
MS	37c	33c	29b	39c	34c

根据以上统计结果和组培苗的观察结果可得出：LP 培养基是全部应试不同试材的适宜初代培养基，外植体萌发率高，芽生长旺盛；SH 培养基也适合做初代培养，而 MS 和 G 培养基是否适合做初代培养基，尚需进一步验证。

2.2.1.4 不同取材时间对外植体萌发率的影响



图 2.2 叶芽初代培养 7d 后萌发出新芽
Fig.2.2 Shoot apices from bud after 7d pre-culture



图 2.3 茎段的萌发芽在初代培养 28d 后发育成新梢
Fig. 2.3 New shoot developing from bud of stem after 28d pre-culture

由图 2.4 可以看出，除甘肃桃外，应试基因型在不同月份取材萌发率差异很大，3、4、5、9 月份萌发率无显著差异且保持在 70%以上，但显著高于 6、7、8 和 10 月；其次是 6 和 10 月取材，萌发率分别是 43%和 50%，6 和 10 月萌发率显著高于 7、8 月份；7、8 月份取材时，萌发率低至 11%和 10%，因此可得：3、4、5 和 9 月是应试材料（除甘肃桃外）的适宜取材时期；但甘肃桃在上述取材时间萌发率均在 79%以上水平，3 月份取材萌发率最高(85%)，9 月份其萌发率最低(79%)，不同月份间无显著差异。

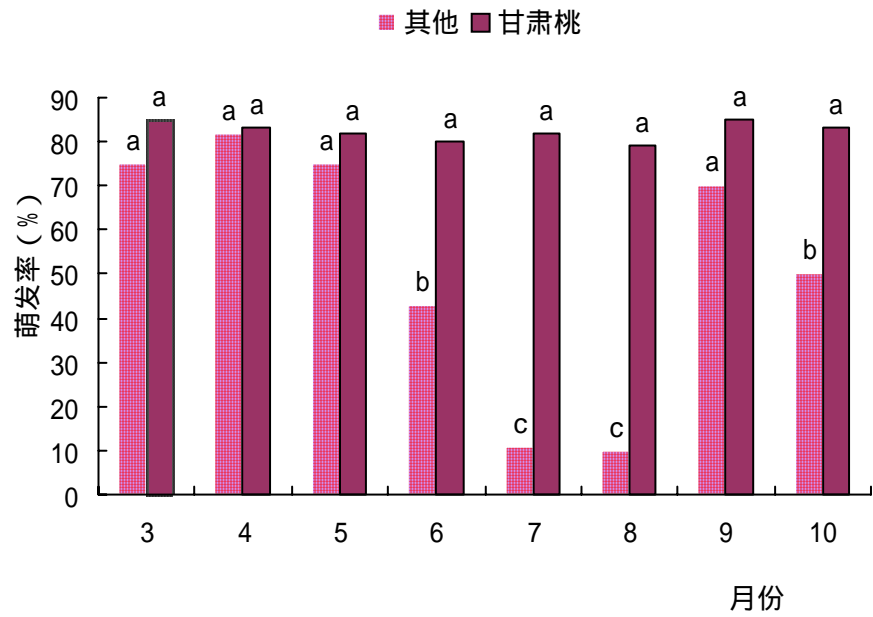


图 2.4 取材时间对萌发率得影响

Fig.2.4 The effect of sampling date on germination percentage

2.2.1.5 不同光照强度处理对外植体萌发率的影响

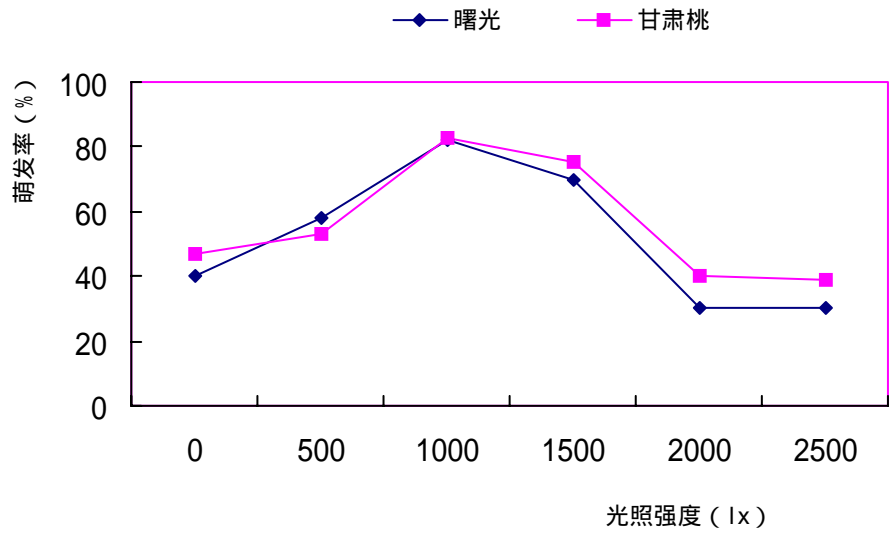


图 2.5 光照强度对外植体萌发的影响

Fig. 2.5 The effect of light intensity on the germination percentage of explants

由图 2.5 可以看出，光照强度显著影响应试基因型的萌发率，同时在不同的光照强度下，各基因型的萌发规律相同，即：光照强度在 0 至 2500lx 变化区间内，萌发率都呈现先升后降的趋势，

光照强度在 0-1000lx，萌发率呈升高趋势，在 1000lx 光照强度下，曙光和甘肃桃的萌发率都达最高，分别是 82%和 83%；在光照强度 1000-2500lx 下，萌发率呈下降趋势，在 2000 和 2500lx 时，萌发率最低。

外植体在 6 种光照强度下的具体表现：当光照强度 0lx 时（暗培养），萌发率低，萌发芽黄白色，在转到光培养后，叶片不舒展且很难恢复绿色；500lx 光照强度下外植体变黄甚至变褐，萌发芽黄白色且生长弱；1000lx 光照强度下（图 2.3），顶芽和茎段上的叶片鲜绿而舒展，萌发芽生长旺盛；在 2000 和 2500lx 光强下，顶芽 90%以上褐化死亡，茎段形态学上端褐化且基部变黑，叶片枯萎，无法为萌发芽提供养分，部分叶芽枯萎死亡且存活者芽小而弱；根据以上可得：初代培养适宜的光照强度 1000lx。

2.2.2 继代培养

2.2.2.1 基本培养基和继代次数对增殖的影响

表 2.3 基本培养基和继代次数对继代增殖的影响
Table2.3 The effect of basic medium and subculture times on the proliferation

培养基 medium	继代 次数	增殖系数 Proliferation index				
		曙光 Shuguang	砂子早生 Sunagowase	甘肃桃 Gansutao	野生毛桃 Wild seedling peach	早露蟠桃 Zaolupantao
LP	1	2.87	3.03	1.02	3.78	2.98
	2	4.35	4.56	1.10	5.23	3.27
	3	5.13	4.15	1.11	4.36	4.07
SH	1	2.77	3.13	2.13	4.33	2.07
	2	2.90	3.33	2.43	3.78	2.49
	3	3.15	3.41	3.10	4.17	2.16
G	1	1.57	2.13	0.98	3.13	1.23
	2	1.74	2.73	1.23	3.17	1.05
	3	0.53	0.82	0.40	1.04	0.23
MS	1	1.53	1.98	1.36	2.89	1.50
	2	2.54	2.06	1.22	3.03	1.45
	3	0.72	1.00	0.63	0.57	0.76

表 2.3 可以看出：不同培养基和继代次数对增殖培养的影响差异很大，但遵循的规律是相似的，除甘肃桃外，其它 4 种基因型即：曙光、砂子早生、野生毛桃和早露蟠桃在 LP 培养基上增殖系数较高，增殖系数随着继代次数的递增而显著的提高；而在 SH 培养基，以上 4 种基因型随着继代次数的增加，增殖系数也显著地提高，但各基因型在 SH 培养基平均增殖系数比在 LP 培养基低；在 G 和 MS 培养上，这 4 种基因型的增殖系数很低，随继代次数的增加呈现先增加再显著降低。

LP 和 SH 培养基中的试管苗：叶片舒展，叶色浓绿，生长旺盛，节间明显（图 2.5 和图 2.6）；试管苗在 MS 培养基上第一、二代表现与 LP 和 SH 培养基相似，增殖系数呈增加趋势，叶片舒展，叶色浓绿，生长旺盛，节间明显，但是到了第三代（图 2.7），叶片皱缩，叶色黄绿，增殖能力下降，试管苗的木质化程度很高，增殖苗在第三代很容易衰老，中下部的叶子黄化伴随茎尖枯死，这与相关报道的结果相吻合（覃兰英，1995）；试管苗（图 2.8）在 G 培养基的表现：叶片黄绿且皱缩，而且叶片薄而大，茎尖向上生长缓慢，苗高基本上保持 1.2cm，再无向上生长的趋势，伴随苗的中下部叶片黄白色，同时培养基褐变，本研究中的试管苗在 G 培养基的表现与前人报道（田增胜，2005）的大相径庭，至于何种原因引起，有待进一步研究。

甘肃桃的增殖生长：在 LP、G 和 MS 培养基几乎不分枝，伸长生长始终缓慢并伴随茎尖枯死，但叶色鲜绿，接种 10d 后，培养基褐变；但在 SH 培养基上分枝 2-3 个腋芽，苗向上生长旺盛，随继代次数增加，增殖系数显著性的提高，培养基未出现褐变现象，由此得出 SH 培养基适宜甘肃桃的继代培养。

综上所述，曙光、砂子早生、野生毛桃和早露蟠桃属同一个种，亲缘关系较近，其适宜的增殖培养基均首选 LP 培养基，其次是 SH 培养基；甘肃桃属另一个种，与曙光、砂子早生、早露蟠桃、野生毛桃亲缘关系较远，其适宜的培养基为 SH 培养基，这与报道的“具有相同的遗传背景对基本培养基的要求相似”（王关林，2005）这一结论是相吻合的。

2.2.2.2 不同基本培养基对新梢平均增殖的影响

表 2.4 不同培养基对新梢的平均增殖影响

Table 2.4 The effect of different media on shoot multiplication .

培养基 Media	平均增殖系数 Means of proliferation index				
	曙光 Shuguang	砂子早生 Sunagowase	甘肃桃 Gansutao	野生毛桃 Wild seedling peach	早露蟠桃 Zaolupantao
LP	3.08A	3.63A	1.08B	3.86A	3.11A
SH	2.94A	3.29A	2.55A	4.09A	2.24A
G	1.28B	1.89B	0.94B	2.45B	0.84B
MS	1.59B	1.68B	1.07B	2.16B	1.24B

如表 2.4 所示：不同基本增殖培养基对桃茎段的平均增殖效应是不同的，LP 和 SH 培养基对曙光、砂子早生、野生毛桃和早露蟠桃的增殖效果较好，且二者间无显著差异，曙光、砂子早生、野生毛桃和早露蟠桃在 LP 培养基的平均增殖系数分别为：3.08、3.63、3.86 和 3.11，LP 和 SH 培养基的增殖效应显著大于 MS 和 G 培养基；试管苗在 MS 和 G 培养基增殖系数较低，且二者间无显著差异。

根据研究结果及观察，LP 和 SH 培养基比较适宜做曙光、砂子早生、野生毛桃和早露蟠桃的增殖基本培养基；但 LP 培养基不适宜甘肃桃的增殖培养，甘肃桃在 SH 培养基中，增殖系数高且

生长状态良好，因此，SH 培养基较适合甘肃桃增殖培养。



图 2.6 SH 培养基增殖培养的苗
Fig2.6 Shoot proliferation cultured on SH media



图 2.7 LP 培养基增殖培养的苗
Fig2.7 Shoot proliferation cultured on LP media



图 2.8 MS 培养基增殖培养的苗
Fig2.8 Shoot proliferation cultured on MS media

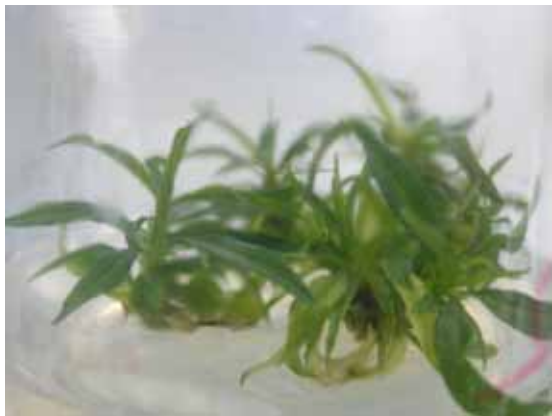


图 2.9 试管苗于 G 培养基增殖培养
Fig.2.9 Shoot proliferation cultured on G media

2.2.2.3 基因型对桃的增殖影响

表 2.5 基因型对其增殖的影响
Table 2.5 The effect of genotype on shoot multiplication

不同试材 Genotype	增殖系数 (LP 培养基) Proliferation index (on LP media)	增殖系数 (SH 培养基) Proliferation index (on SH media)
曙光 Shuguang	3.08B	2.94B
砂子早生 Sunagowase	3.63A	3.29B
甘肃桃 Gansutao	1.08C	2.55C
早露蟠桃 Zaolupantao	3.11B	2.24C
野生毛桃 Wild seedling peach	3.86A	4.09A

据表 2.5 可知，尽管曙光、砂子早生、野生毛桃和早露蟠桃在 LP 培养基上其增殖生长优于其

它培养基,但在 LP 培养基和相同的培养条件下,不同不同试材的增殖能力具有显著差异,野生毛桃和砂子早生的增殖系数较高,但二者无显著差异,其次是曙光和早露蟠桃,甘肃桃的增殖能力最差;在 SH 培养基上,野生毛桃的增殖能力最强,其增殖系数为 4.09,是增殖培养中最高的,显著大于其他应试基因型;增殖能力次之的是曙光和砂子早生;增殖能力最差的是甘肃桃和早露蟠桃。但有趣的是,虽然甘肃桃在 SH 培养基上的增殖能力远远大于其它培养基,但如果与其它 4 个不同试材比较,其增殖能力仍然最差,这可能是培养基和培养条件不适合于甘肃桃的快繁培养,尚须进一步研究论证。

2.2.2.4 不同 pH 值对增殖的影响

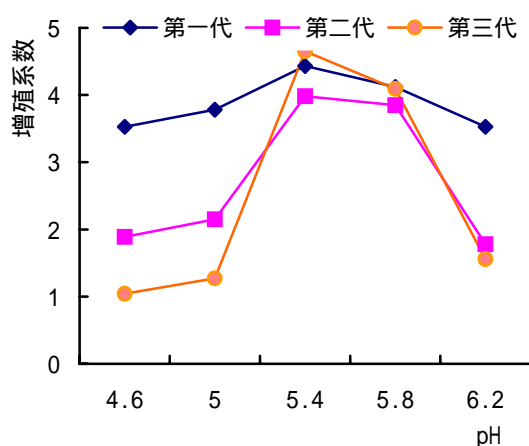


图2.10 pH对砂子早生增殖的影响
Fig2.10 The effect of pH on the shoot proliferation of Sunagowase

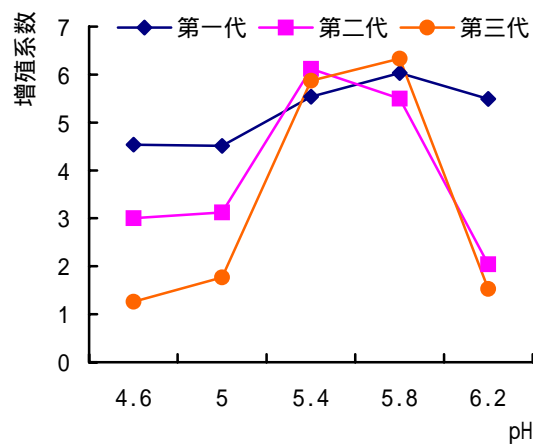


图2.11 pH对曙光增殖的影响
Fig2.11 The effect of pH on the shoot proliferation of Shuguang

由图 2.10 和图 2.11 可以看出：pH 在 5.4—5.8 时，砂子早生和曙光的增殖系数在连续 3 次继代培养中无显著差异，增殖曲线处于平缓状态；pH 在 4.6-5.4 时（不含 5.4），增殖系数随 pH 的升高而增大，但随着继代次数的增加，增殖系数显著降低；pH 在 5.8-6.2 时，增殖系数随 pH 的升高而降低，但随着继代次数的增加，增殖系数在第二代显著降低，第三代降低不明显。

试管苗在上述 pH 环境下的生长动态：在 pH 为 5.4-5.8 环境下，试管苗在第一至三代，增殖生长正常，节间明显，叶片浓绿而舒展，茎段健壮，茎尖向上生长旺盛，苗的基部愈伤组织较大且结构紧凑，培养基未发生褐变。

在 pH 为 4.6-5.4（不含 5.4）环境下，第一代试管苗生长正常，培养基也未显现异常；第二代表现出异常情况，接近培养基的茎段变黑且少部分茎段成水渍状，培养基发生褐变，大部分的试管苗接近培养基的叶片变黄；第三代表现最为突出，伸长生长缓慢甚至不生长，短于 1.5cm 的试管苗茎尖先变黄，在继代末期死亡，多数试管苗基部呈水渍状，接触培养基的叶片呈黑色，培养基褐变严重，在继代结束后，培养基软且含水量高，出现上述症状的原因，可能因为培养基的酸性强以及植物体中某些元素富集，致使试管苗的内部代谢发生紊乱，影响试管苗的增殖生长，这与许多果树栽培学报道的施肥症状相似；但有一种情况与上述相反，当试管苗在继代接种时，

苗高于 2.5cm，试管苗的增殖能力和生长一直保持正常的水平，增殖的腋芽及本身茎段比正常的 pH 环境（pH 在 5.4~5.8）增殖芽更健壮，茎尖明显的较正常环境向上生长，



图 2.12 增殖苗在 pH5.4 状态
Fig.2.12 Shoots grew on the media with pH5.4



图 2.13 增殖培养在 pH4.5 的状态
Fig.2.13 Shoots grew on the media with pH4.5.

pH 在 6.2 时，第一代增殖生长正常，第二代和第三代分枝少，节间明显，植株黄绿色，整个茎段木质化。

综上，适合继代培养的 pH 范围是 5.4-5.8。

2.2.2.6 不同浓度的生长调节剂组合及继代次数对桃增殖的影响

甘肃桃的基本培养基为 SH 培养基，曙光、砂子早生、早露蟠桃和野生毛桃的基本培养基为 LP 培养基。采用的 2 种植物生长调节物质组合是 TDZ 和 NAA 同 BAP 和 IBA。

表 2.6 不同浓度的生长调节物质组合及继代次数对桃的增殖影响
Table 2.6 The effect of different combination of plant growth regulators and subculture times on shoot multiplication

处 理 Treatment	(mg/L)	(mg/L)	继代 次 数 subculture times	曙5 光 Shuguang 5.15	砂5 子早生 Sunagowase 4.15	早2 露蟠桃 Zaolupantao 4.07	甘3 肃桃 gansutao 2.17	野生毛桃 Wild peach sideling 4.36
5	BAP0.75	IBA0.3		4.33	3.69	6.24	2.23	5.35
1	TDZ0.5	NAA 0.3	增殖系数 proliferation index	5.86	4.98	5.66	2.99	5.98
			1	4.89	4.93	5.78	2.63	6.93
			2	5.68	4.36	6.68	2.35	6.89
2	TDZ0.75	NAA 0.4	1	6.79	6.98	6.83	2.33	7.69
			2	6.57	7.93	7.97	2.06	8.38
			3	6.59	7.54	7.85	2.64	8.37
3	TDZ1.0	NAA 0.5	1	6.52	7.63	9.58	2.55	9.36
			2	12.13	10.52	12.37	2.19	13.69
			3	2.43	1.24	0.97	1.98	0.69
4	BAP0.5	IBA0.2	1	2.87	3.03	2.98	2.13	3.78

由表 2.6 可以看出,不同浓度的 TDZ 和 NAA 组合对供试五种基因型的增殖效应是不同的,处理 2 的增殖效应显著地高于处理 1 和处理 3,并且处理 2 对应试不同试材在连续继代培养过程中的增殖效应稳定;处理 1 和 2 基本适合于各种基因型的增殖生长,二者对同一不同试材在连续继代培养过程中的增殖规律相同,即增殖系数随着继代次数的增加有提高的趋势,这符合试管苗在培养基中的驯化规律;但处理 3 增殖系数变化趋势异常,增殖系数先猛然升高再下降。

组培苗表现:处理 1 和处理 2 的组培苗在连续继代培养过程中,叶片鲜绿且略卷曲,茎未出现木质化,节间较短,平均茎高 2.5cm,表现为生长丛矮化,茎基部的愈伤组织很大;处理 3 的组培苗第一代表现同处理 1 和处理 2,第二代增殖培养时,有大量无效芽的产生,第三代增殖培养时,许多茎尖发生玻璃化现象。

根据上述的统计和观察结果可得出结论,处理 2 即 TDZ0.75mg/L+ NAA 0.4 mg/L 适合于本试验五种基因型的增殖生长。

由表 2.6 可以看出,除甘肃桃外,不同浓度的 BAP 和 IBA 组合对供试不同试材的增殖效果是不同的,处理 4 和处理 5 适合于各种基因型的增殖生长,且增殖规律相似,随着继代次数的增加,平均增殖系数也不同程度的增大,但处理 5 对应试不同试材的增殖效应大于处理 4,并且增殖效果稳定;处理 6 对应试不同试材的第一代和第二代增殖效应显著地高于处理 4 和 5,但对第三代的增殖效应显著的低于处理 4 和 5,稳定性差。处理 4、5 和 6 对甘肃桃的增殖效果无差别。

组培苗表现:除甘肃桃外,处理 4 和处理 5 的组培苗在连续继代培养过程中,生长健壮,叶片鲜绿且伸展,茎尖偏向上生长,茎基部木质化,支撑能力好,节间长,平均茎高 3.5cm,茎基部的愈伤组织小;处理 3 第一代组培苗表现同处理 1 和处理 2,第二代增殖培养时,有大量无效芽的产生,第三代增殖培养时,许多茎尖发生玻璃化现象。甘肃桃组培苗在每一代均分枝 2 个左右,叶片卷曲,黄绿色,茎平均高 1.53cm,未发现高出 2cm 的茎。

处理 2 与处理 5 对桃的增殖而言,处理 2 对桃的增殖效应大于处理 5,但就组培苗的生长状况,除甘肃桃外,处理 5 对桃各不同试材的增殖培养效果更好。

综上,处理 5 即 BAP0.5mg/L+ IBA0.3 mg/L 适合各供试基因型(甘肃桃外)生长,处理 2 对甘肃桃的增殖效果最好。

2.3 小结

本节以油桃不同试材曙光、野生毛桃、毛桃不同试材砂子早生、蟠桃不同试材早露蟠桃和甘肃桃为试材,建立、优化了桃离体快繁体系,并为叶片离体再生不定梢的研究奠定基础。

研究了取材时间、基本培养基、培养条件和消毒方法对初代培养的影响,结果表明:曙光、砂子早生、野生毛桃和早露蟠桃的外植体于 3、4、5、9 和 10 月份取材,萌发率较高,而甘肃桃在 3~10 月份取材,萌发率无显著差异,均保持在 79%以上;理想的初代培养基是 LP 培养基,萌发率是 MS 培养基的 2.1 倍;光照强度 1000lx 有利于外植体的萌发;探明一种污染率仅 2%且

外植体伤害轻的消毒方案；在继代培养过程中，基本增殖培养基、不同浓度植物生长调节物质组合和 pH 经 3 次继代筛选，得出较好的基本培养基和植物生长调节物质组合分别为 LP 培养基、BAP0.75mg/L+IBA0.3 mg/L，而 SH+ TDZ0.75mg/L+NAA0.3 mg/L 是甘肃桃最佳增殖培养基，适宜的 pH 值为 5.4 ~ 5.8。

第三章 叶片离体再生不定芽的研究

桃同其他果树一样,因为童期长和基因高度杂合等特点使其常规育种效率低。现代遗传转化技术可以克服常规育种的局限,加速品种改良进程,提高育种效率(汤浩茹和王永清,2000)。在很多情况下,缺乏高效的再生体系是多年生作物转基因研究的主要限制因子(Dandekar, 1992),而以成熟组织为外植体建立稳定高效的离体再生体系是木本植物遗传转化研究的前提(litz and Gray, 1992)。桃的离体再生研究(Meng and zhou., 1981; 闫国华等, 2003)已有若干篇报道,但研究较多且较为成功的是子叶再生培养(Scorza et al., 1989,1990b;Mante et al., 1989;Raj Bhansali et al., 1991;Schneider et al., 1992;姚强和庄恩及, 1991;刘青荣等, 1997a,1999b;张永庆等, 2001;吴延军等, 2004)。迄今,只有罗马果树所(Genetile et al., 2002)在桃叶片离体再生研究取得了突破进展,获得了再生不定梢。而在无性组织茎段、根等方面的再生研究尚未见成功的报道。目前国内尚未见有关桃无性组织离体再生研究的成功报道。本研究以曙光、砂子早生、早露蟠桃和野生毛桃的试管苗叶片为材料,试图建立再生率高且培养方法简单的再生体系,并探明影响桃叶片再生不定梢的内外因素,以期为桃的遗传转化研究奠定基础。

3.1 材料和方法

3.1.1 试验材料

以曙光、野生毛桃、砂子早生和早露蟠桃的试管苗为材料。该苗始于 2005 年 3 月培养,每 21 天继代培养 1 次,试管苗保持在快繁培养基中。

3.1.2 培养基的制备

快繁采用 LP 培养基,并做了适当调整,具体成分见表 3.1。

茎尖预培养包括暗培养和光培养两个阶段,其中,暗培养采用 LP1^a (Genetile et al., 2002) 或 SH1 培养基,光培养采用 LP2^{a,c} (Genetile et al., 2002) 或 SH2 培养基,具体成分见表 1。

再生培养基:大量元素同 LP 或 SH 培养基配方,微量元素同 LP 培养基配方,维生素类及肌醇等有机物质同表 1 的 LP1^a 配方,附加不同浓度的 TDZ 和 NAA 组合或 BAP 和 IBA 组合,具体如表 2 所示。用 KOH 调 pH 至 5.5,然后加 5.5g/L 琼脂。蔗糖 20g/L。

叶片再生培养采用 2 种基本再生培养基,如果暗培养采用 LP 基本培养基,光培养则采用不含生长素但其它成分同暗培养基;如果暗培养采用 SH 基本培养基,则光培养采用相同培养基。

生根培养基:以 1/2MS、1/2LP 为基本培养基,附加不同浓度的 IBA 和 NAA pH5.8,琼脂 5.5g/L,蔗糖 20g/L。

表 3.1 快繁和茎尖预培养培养基

Table 3.1 Salts and hormonal content of proliferation and preconditioned apices media used in the different experiments

	快繁培养基	LP1 ^a	SH1 ^a	LP2 ^{a,c}	SH2 ^b
	Proliferation media				
大量元素 Macroelement	LP	LP	LP	LP	LP
微量元素 Microelement	MS	MS	MS	MS	MS
FeNa ₂ EDTA (mg/L)	MS	MS	MS	MS	MS
盐酸吡哆酸(mg/L) Pyridoxine	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
甘氨酸 (mg/L) Glycine	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
肌醇(mg/L) Myo-inositol	100	150	150	150	150
泛酸钙(mg/L) Ca-pantothenate	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
生物素(mg/L) Biotin	-	1.0	1.0	1.0	1.0
核黄素(mg/L) Riboflavin	-	0.2	0.2	0.2	0.2
烟酸(mg/L) Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
BAP(mg/L)	0.75	2.0	2.0	2.0	2.0
NAA (mg/L)	-	0.2	0.2	-	-
IBA (mg/L)	0.3	-	-	-	-
GA ₃ (mg/L)	0.1	-	-	-	-
AdSO ₄ (mg/L)	1.5	-	-	-	-
蔗糖(g/L) Sucrose	30	20	20	20	20

注：快繁培养基和 LP2^{a,c}, Genetile et al. (2002) ; LP1^a, Caboni et al. (1999); LP, Quoirin 等 (1977); SH, Schenk 和 Hildebrandt (1982); MS, Murash 和 Skoog (1962); LP1^a和 SH1^a培养基只用于茎尖暗培养; LP2^{a,c}和 SH2^b用于茎尖暗培养。

3.1.3 不定梢再生的研究

本文以 3 种不同来源的叶片为外植体，进行再生不定梢的研究，以比较其再生能力。

1. 增殖叶片：从增殖培养新梢上剥取前四片完全展开的幼嫩叶片（图 3.1）。以这种途径获得的外植体叶片，本文以下简称增殖叶片。
2. 预培养茎尖叶片：从增殖新梢剥取 2mm 长的茎尖，接种在茎尖培养基（表 3.1）上，进行暗培养 20d,再光培养 20d, 以这种途径获得的茎尖，本文简称预培养茎尖。从预培养茎尖上剥取前四片完全展开的幼嫩叶片，以这种途径获得的外植体叶片，本文以下简称预培养茎尖叶片。
3. 再生叶片：从再生的不定梢上剥取前四片完全展开的幼嫩叶片。以这种途径获得的外植体叶片，本文以下简称再生叶片。

表 3.2 再生培养基的大量元素和植物生长调节物质成分
Table 3.2 Macroelement and hormonal content of media used in the different experiments

培养基的名字 Name of media	大量元素 Macroelement	TDZ (mg/L)	KT (mg/L)	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)
SI	SH	2.0	0.2		
L1	LP			2.0	2.0
S2	SH	2.5	0.25		
L2	LP			2.5	0.25
S3	SH	3.0	0.3		
L3	LP			3.0	0.3
S4	SH	4.0	0.4		
L4	LP			4.0	0.4

3.1.3.1 以增殖叶片为外植体再生不定芽

以曙光、砂子早生、早露蟠桃和野生毛桃增殖培养的新梢(图 3.1)为试材,用解剖刀剥离增殖新梢上前 4 片充分扩展的幼嫩叶片(图 3.2),垂直叶脉横切 2 或 3 刀且叶片不分离(李梦玲等, 2001),叶背面(远轴面, abaxia surface)接触再生培养基,于 9cm 的培养皿中培养,叶片暗培养 3 周后,转接到新鲜培养基中,光培养 3 周,统计再生率,并将不定芽接种在快繁培养基中,30d 后统计不定芽的增殖系数。

每个培养皿包含 25 个叶片,每个处理为 1 个培养皿且重复 4 次。



图 3.2 微繁新梢上展开的叶片

Fig. 3.2 The first four expanded leaves of shoot

3.1.3.2 预培养茎尖叶片再生不定芽

于解剖镜(北京福凯仪器有限公司出产,型号 XSZ-HS)下用解剖刀剥取快繁新梢上的茎尖(约 2mm 长)(图 3.3),分别接种到表 1 的 LP1^a或 SH1^a,暗培养 20d 后,再将其接种到无生长素

的新鲜培养基中，光培养 20d，获得预培养 40d 的茎尖。

在解剖镜下用解剖刀剥取经过 40d 预培养的茎尖上前 4 片叶片（约 2-3mm 长），接种到再生培养基且叶背面接触再生培养基，同时将茎尖接种到与其光培养相同的新鲜培养基中，使茎尖继续光培养，而叶片先暗培养 21d 后，再光培养 21d，然后统计叶片再生率。每个培养皿中接种 25 个叶片为一个处理，重复 4 次。

长期预培养茎尖(long-preconditioned apices):预培养 60d 的野生毛桃和曙光茎尖在 LP2^{a,c} 培养基培养大约 40d (图 3.4)，每 20 天继代一次。用解剖刀于解剖镜下剥离茎尖上的前四片充分展开的叶片（3-5mm 长），并接种到再生培养基中，暗培养 21 天后，再转到新鲜培养基中，光培养 21 天，统计再生率，并将不定梢接种到快繁培养基中，增殖培养 30d 后，统计不定梢的增殖系数。

每个处理包含 25 枚叶片，重复 4 次。

3.1.3.3 再生叶片离体再生不定芽

以曙光和野生毛桃再生不定梢上的幼嫩叶片为外植体，用解剖刀剥离茎尖上前 4 幼嫩叶片，垂直中脉切叶片到中脉 2-3 刀且保持叶片不断，接种再生培养基，全部叶背面接触再生培养基。叶片的培养方法同 3.1.2.1。

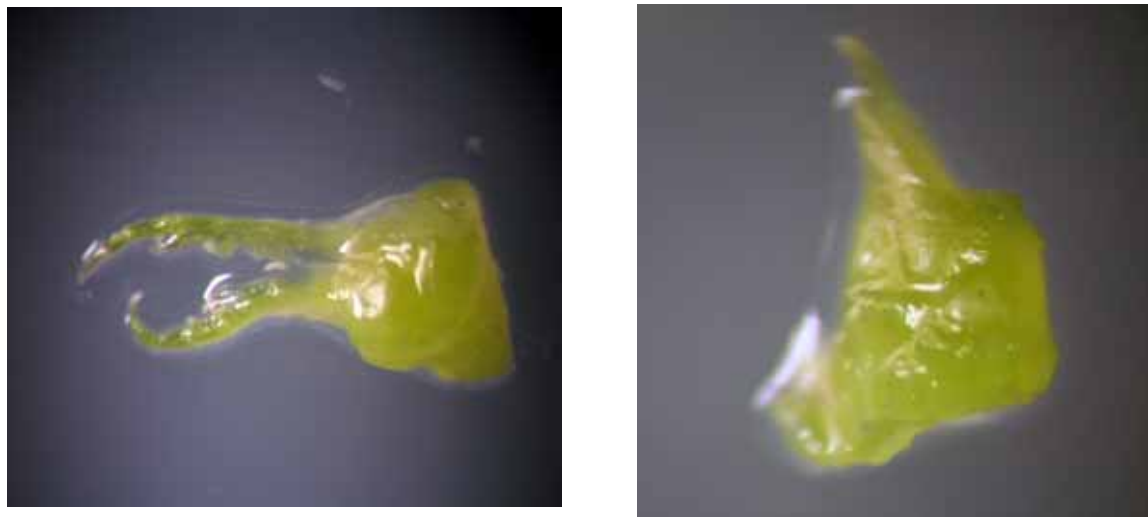


图 3.3 茎尖（约 2mm 长）

Fig.3.3 shoot apex(about 2mm long)



图 3.4 茎尖预培养 60-d

Fig.3.4 60-d preconditioned apices

每个处理包含 25 枚叶片，重复 4 次。叶片培养 40d 后，统计叶片再生率。并将不定芽接种到快繁培养基，进行增殖培养。

3.1.4 不定梢的生根研究

切取生长相对一致的不定梢（大约 1.0-1.5cm 高），先在不含任何生长调节物质的培养基继代 3 周，再转接到生根培养基中。选取 1/2MS、1/2LP 为基本生根培养基，不同浓度的生长素 IBA 和 NAA 组合，光照强度设 2500lx、500lx 两个处理，光周期 16h/d，培养温度 24 ± 1 。

3.1.5 统计分析

再生率=再生不定芽的叶片数目/接种叶片的数目。

生根培养 30d 后统计每个新梢产生根的数量。

生根率=（生根外植体数/接种外植体数）*100%。

数据分析采用 SAS6.12 软件以及 Excel 作图。

3.2. 结果与分析

3.2.1 增殖叶片离体再生

3.2.1.1 不定芽发生过程

LP 培养基上,所有不同试材的叶片暗培养 21d,叶柄着生黄白色愈伤组织,培养基中 BAP 浓度越高,愈伤组织越大,但光培养 5d 后,80%的愈伤组织变浅紫色,14d 后全部供试不同试材的外植体死亡。这说明增殖叶片在 LP 培养基上不能再生。

SH 培养基上所有不同试材的增殖叶片都可再生不定芽,发生过程如下:暗培养的第 6d,叶片膨大,叶柄处着生愈伤组织;在第 12d,部分叶柄直接再生芽点;21d 后发育成不定芽,并且外植体、愈伤组织和不定芽都呈黄白色(图 3.5,图 3.8);愈伤组织有 2 种类型:一种是表面富含水分、颗粒状、排列松散的愈伤组织,不具有再生不定芽的能力;另一种是表面干燥、粉状、排列紧密的愈伤组织,具有再生不定芽的能力,光培养 5d 后,表面富含水分、颗粒状、排列松散的愈伤组织变紫色,21d 后紫色愈伤组织变黑而死亡;而表面干燥、粉状、排列紧密的愈伤组织变绿色(图 3.7),着生绿色愈伤组织的叶片膨大变绿,9d 后,愈伤组织变浓绿且结构紧凑,并出现绿色芽点(图 3.6),21d 后发育成不定梢。光培养 21d 但未再生出芽的绿色愈伤组织,将其转接到 TDZ 浓度更高的培养基中,再光培养 7d 左右,愈伤组织生出不定芽点,21d 后发育成不定梢(图 3.10)。



图 3.5 暗培养 21d 叶片生长愈伤组织
Fig.3.5 Callus from leaf after 21d in the dark



图 3.6 暗培养 21d 绿色愈伤组织长出不定芽
Fig.3.6 Adventitious buds developing from callus



图 3.7 光培养 5d 后愈伤组织变绿
Fig3.7 Callus turned green 5d in the light



图 3.8 叶片在暗培养 12d 生出不定芽点
Fig3.8 Adventitious bud developed from leaves 21d
in the dark

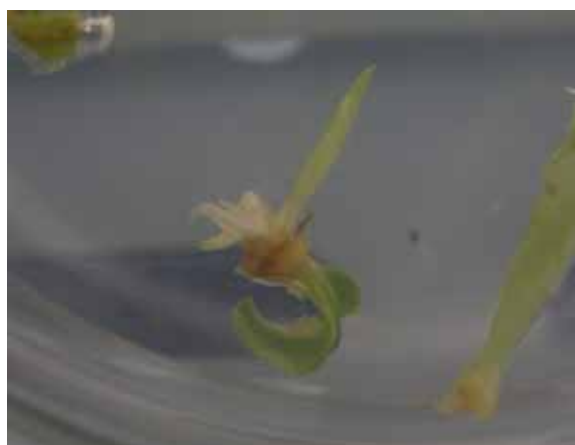


图 3.9 叶片再生出不定芽暗培养 21d
Fig.3.9 Adventitious bud regenerated from
Leaves 21d in the dark



图 3.10 愈伤组织生出不定芽光培养 21d
Fig.3.10 Callus regenerated bud 21d in the
light

3.2.1.2 不同基本培养基对桃叶片再生不定芽的影响

培养在 LP 基本培养基上的叶片仅再生愈伤组织，未再生出不定芽，这与 Genetile 等（2002）报道的结论是一致的。但在 SH 基本培养基上，供试不同试材在 S1、S2、S3 和 S4 种培养基上均可再生不定芽。

3.2.1.3 不同浓度的生长调节物质对桃叶片再生不定芽的影响

表 3.6-1 不同浓度的生长调节物质组合对桃叶片再生不定芽的影响

Table 6-1 Effects of varying concentrations of hormonal combination on adventitious shoot regeneration from leaves

培养基 media	曙光 Shuguang			野生毛桃 Wild peach sideling		
	外植体数 Number of explants	分化的外植体数 Number of differentiated explants	平均再生率 (%) Regeneration percentage	外植体数 Number of explants	分化的外植体数 Number of differentiated explants	平均再生率 (%) Regeneration percentage
S1	100	22	22A	100	4	4B
S2	100	22	22A	100	13	13B
S3	100	26	26A	100	33	33A
S4	100	15	15A	100	30	30A

表 3.6-2 不同浓度的生长调节物质对桃叶片再生不定芽的影响

Table 3.6-2 Effects of varying concentrations of hormonal combination on adventitious shoot regeneration from leaves

培养基 media	砂子早生 Sunagowase			早露蟠桃 Zaolupantao		
	外植体数 Number of explants	分化的外植体数 Number of differentiated explants	平均再生率 (%) Regeneration percentage	外植体数 Number of explants	分化的外植体数 Number of differentiated explants	平均再生率 (%) Regeneration percentage
S1	100	1	1A	100	1	1A
S2	100	5	5A	100	3	3A
S3	100	10	10A	100	3	3A
S4	100	9	9A	100	2	2A

由表 3.6-1 和表 3.6-2 可以得出：曙光、野生毛桃、砂子早生和早露蟠桃在 4 个处理中，叶片都能再生出不定芽。但不同浓度的 TDZ 和 NAA 组合对曙光、野生毛桃、砂子早生和早露蟠桃叶片再生效应不同，以处理 3 即：TDZ3.0mg/L+NAA0.3mg/L 叶片再生效果最好，曙光、野生毛桃、砂子早生和早露蟠桃叶片再生率分别达 26%、33%、11%、3%。TDZ 浓度在 1-3mg/L 时，随着 TDZ 浓度增大，各不同试材叶片再生率逐渐提高，表明 TDZ 可促进叶片分化不定芽，但 TDZ 浓度达 4.0mg/L 时，各不同试材叶片再生率均下降，并且再生芽和愈伤组织玻璃化，这表明 TDZ 浓度超过叶片分化的所需适宜浓度，抑制外植体分化不定芽，导致再生率下降。可将轻微玻璃化不定芽转接到 TDZ 浓度低的培养基中，玻璃化不定芽可恢复到正常的生长状态。

3.2.1.4 不同基因型对叶片再生不定梢的影响

表 3.7. 不同试材对叶片再生不定梢的影响

Table 3.7 The effect of variety on shoot regeneration from leaves

不同试材 variety	TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)	平均再生率 (%) Regeneration percentage
曙光 Shuguang	3.0	0.3	26A
野生毛桃 Wild peach sideling	3.0	0.3	33A
砂子早生 Sunagowase	3.0	0.3	10B
早露蟠桃 Zaolupantao	3.0	0.3	3B

据表 3.7 可知,在相同的培养基和培养条件,不同试材的再生能力存在显著差异,野生毛桃和曙光的叶片再生率较高,但二者间无显著差异,再生率分别是 33%和 26%;而砂子早生和早露蟠桃的叶片再生不定梢的能力显著低于野生毛桃和曙光,砂子早生和早露蟠桃的再生率分别为 10%和 3%,二者间无显著差异。

3.2.1.5 外植体取材位置对叶片再生不定梢的影响

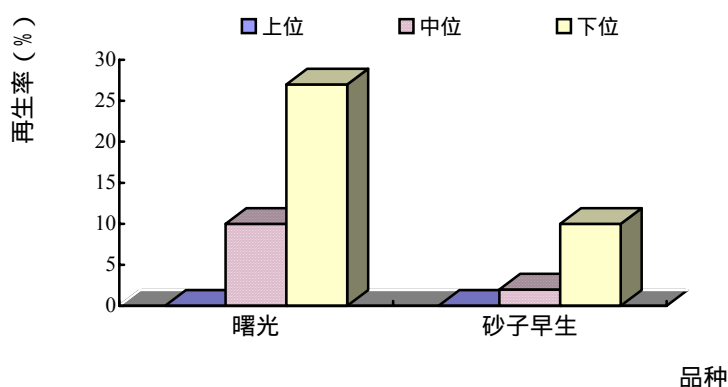


图 3.11 母体位置对叶片再生影响 Fig.3.11 Effect of donor position on regeneration percentage

关于“树冠位置”已在第二章讨论过。

据图 3.11 所示,外植体在树冠的位置显著影响叶片再生率,当曙光和砂子早生的初代培养材料来源树冠上位,叶片无再生植株能力,而来源树冠下位,叶片再生能力最强,曙光和砂子早生的再生率分别是 27%和 10%,而二者初代培养材料来源母株中位,叶片再生率显著低于母株下位的。因此,对叶片再生研究而言,外植体的适宜取材部位是树冠的下位。

3.2.1.6 叶龄对叶片再生的影响

本实验根据增殖新梢上完全展开的叶片长度,将叶片分为 0.5-1cm、1-1.5cm 和 1.5-2cm 3 类叶龄段对叶片再生的影响。

据图 3.12 所示:叶片长度显著影响叶片的再生能力,叶片 0.5-1.0cm 长,曙光和野生毛桃的再生率均最低,再生率分别为 5%和 7%;对曙光而言,叶片长度 1.0-1.5cm 时,其再生率最高—24%,叶片长度 1.5-2.0cm,再生率为 11%,但可通过提高 TDZ 的浓度提高 1.5-2.0cm 长的叶片分化率;对野生毛桃而言,叶片长度 1.0-1.5cm 或 1.5-2.0cm,再生率均 30%。所以,在叶片离体再生研究中,曙光的适宜叶片长度 1.0-1.5cm,而野生毛桃的适宜叶片长度 1.0-1.5cm 或 1.5-2.0cm。

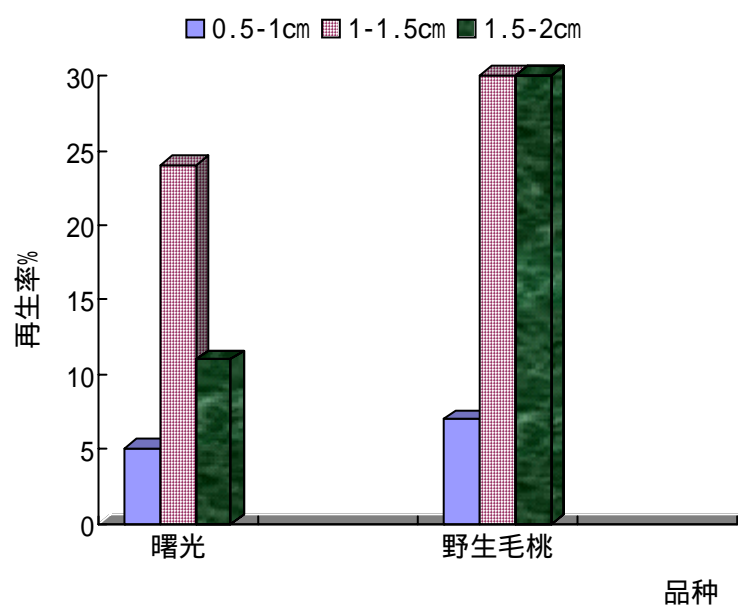


图 3.12 成熟度对叶片再生影响

Fig.3.12 Effect of leaf size on regeneration percentage

3.2.1.7 叶片暗处理对叶片再生的影响

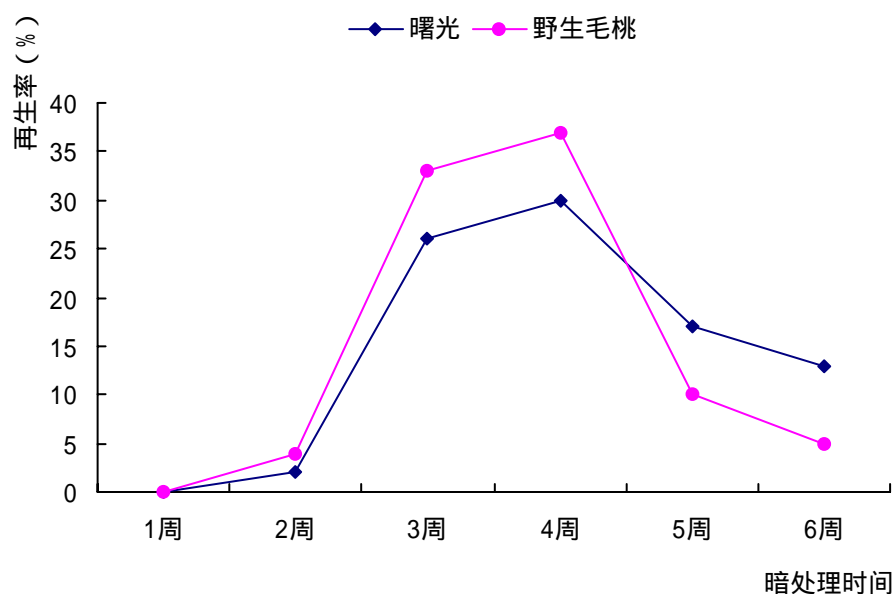


图 3.13 叶片暗处理周数对再生率的影响

Fig.3.13 The effect of different weeks in the dark on the regeneration percentage

在其它培养条件完全相同的条件下，暗处理时间的长短对叶片再生能力和生长状况产生显著的影响，甚至影响到再生不定芽的存活和愈伤组织的分化能力。以曙光和野生毛桃为例（图 3.13），

在 1-4 周暗处理时间范围内，再生率随着暗处理周数的延长而呈现比较有规则的递增趋势；但在 4-6 周暗处理时间范围，再生率呈现递减趋势，愈伤组织无分化能力，再生芽光培养后，成活率低；在所试验的 6 个处理中，暗处理以 3 和 4 周 两个处理中的叶片具有较强的再生不定梢能力，愈伤组织在光培养时保持分化能力，再生的不定芽健壮且形态正常，成活率 100%。其中，暗处理 4 周的叶片再生率均达最高，野生毛桃和曙光 的再生率分别是 37%和 30%。

3.2.2 预培养茎尖叶片离体再生

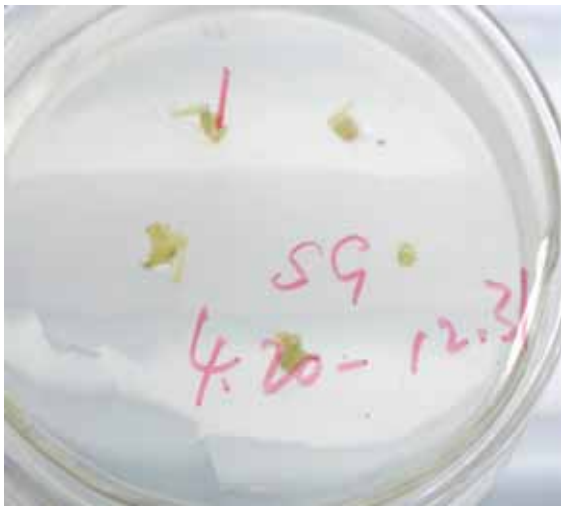


图 3.14 茎尖暗培养 20d
Fig.3.14 Shoot apices incubated for 20d in the dark



图 3.15 叶片暗培养 21d 再生不定梢
Fig.3.15 Adventitious shoot regeneration from Leaf cultured 21d in the dark



图 3.16 不定芽从愈伤组织长出
Fig.3.16 Adventitious buds developing from callus after 7d exposure to the light



图 3.17 光培养 3d 愈伤组织变绿
Fig.3.17 Callus turned green 3 days incubated in the light

预培养茎尖叶片可通过 2 种途径再生不定芽，一种是直接再生不定芽，另一种是经过愈伤组

织再生不定芽。经过 10d 暗培养，叶片黄白且叶柄着生黄白色的愈伤组织，部分叶片直接再生不定芽点，21d 发育成不定芽（图 3.15）；光培养 3d 后，愈伤组织变绿（图 3.15），10d 后，结构紧凑的绿色愈伤组织生出黄绿色芽（图 3.16），光培养 21d 后，叶片再生出健壮的不定芽（图 3.18）；而无叶柄的叶片只增大了面积，不能生长出有效的愈伤组织。

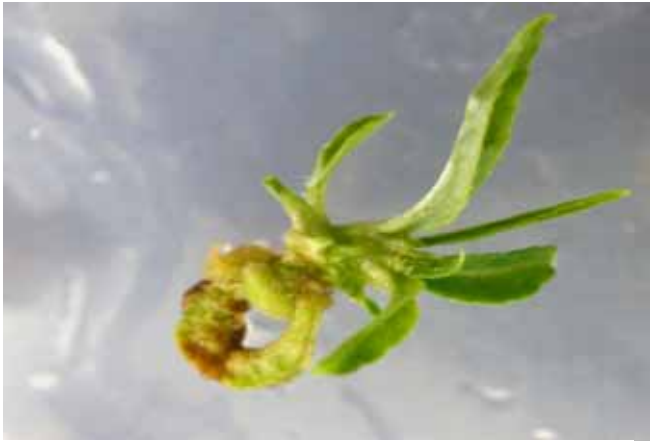


图 3.18 光培养 21d 愈伤组织再生不定芽
Fig3.18 Adventitious buds developing from callus 21d in the light

3.2.2.1 不同的再生培养基与植物生长调节物质组合对叶片再生不定芽的影响

表 3.8 不同培养基与植物生长调节物质组合对桃预培养茎尖叶片再生影响
Table3.8 Influence of Macroelements and hormonal contents in media on adventitious shoots from leaves of peach

基本培养基 Basal media	生长调节物质 hormonal contents	叶片能否再生 Whether leaves could regenerate
SH	TDZ、NAA、	能 Yes
SH	BAP、NBA	否 No
LP	TDZ、NAA、	否 No
LP	BAP、NBA	能 Yes

注：相同植物生长调节物质的浓度是一致的
Note: Concentration of the same hormonal contents was equal.

据表 3.8 可知，SH 为基本再生培养基，TDZ 和 NAA 组合能使预培养茎尖叶片再生不定梢，而 BAP 和 NAA 组合不能使预培养茎尖叶片再生不定梢；LP 为基本再生培养基，TDZ 和 NAA 组合不能使预培养茎尖叶片再生不定梢，而 BAP 和 NAA 组合能使预培养茎尖叶片再生不定梢。由此可得，基本再生培养基相同，附加不同的植物生长调节物质组合，供试不同试材的预培养茎尖叶片的再生能力呈现大相径庭的结果。因此，在相同的培养条件下，基本培养基和植物生长调节物质组合共同影响桃叶片再生不定梢的能力。

3.2.2.2 以 LP 为基本再生培养基，不同浓度生长调节物质的组合对桃预培养茎尖叶片再生不定芽的影响

表 3.9 不同浓度 BAP 和 NAA 对桃叶片再生不定芽的影响
Table3.9 Effect of different concentration BAP and NAA on regeneration percentage

处理 Treatment	培养基 media	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	曙光 Shuguang	再生率 (%) Regeneration percentage		
					野生毛桃 wildpeach	砂子早生 Sunagowase	早露蟠桃 Zaolupantao
1	L1	2.0	0.2	4B	6A	0A	0A
2	L2	2.5	0.25	15A	13A	3A	7A
3	L3	3.0	0.3	18A	15A	5A	10A
4	L4	4.0	0.4	17A	9A	1A	9A

注：显著水平为 0.05，相同字母代表差异不显著。

由表 3.9 可以看出，所有不同试材的叶片在再生培养基中，随着 BAP 和 IBA 浓度的增高，其再生率呈现先上升再下降的趋势。不同处理即不同浓度的 BAP 和 IBA 组合对曙光、野生毛桃、砂子早生叶片再生的效应是不同的。以处理 3 即：BAP3.0mg/L+IBA0.3 mg/L 的效果最好，曙光、野生毛桃、砂子早生和早露蟠桃的叶片再生率分别为 18%、15%、5%和 10%；处理 1 对应试不同试材的再生效应最差，再生率分别为 4%、6%、0 和 0；曙光和野生毛桃在所进行的 4 种处理中，叶片都能再生不定芽，而砂子早生和早露蟠桃的叶片在处理 1 中不能再生不定芽。

3.2.2.3 以 LP 为基本再生培养基，不同试材对桃预培养茎尖叶片再生的影响

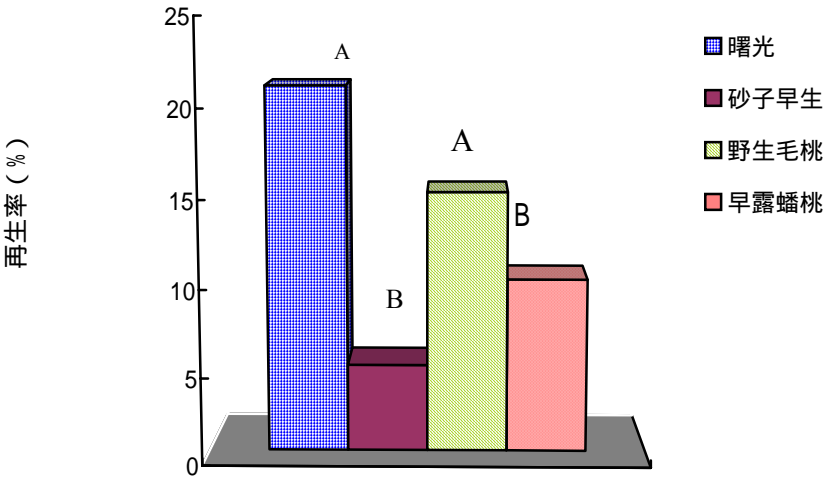


图3.19 不同不同试材对桃叶片再生率的影响
Fig.3.19 Genotype effect on regeneration rate

由 3.19 可知，在相同培养条件下，不同不同试材的预培养茎尖叶片再生不定梢的能力存在显著差异，曙光叶片再生率最高-21%，显著的高于早露蟠桃和砂子早生，但与野生毛桃无显著差异，早露蟠桃和砂子早生叶片再生率分别 10%和 5%。

3.2.2.4 以 SH 为基本培养基，不同浓度的 TDZ 和 NAA 组合对桃预培养茎尖叶片再生不定梢的影响

据表 3.10 所示：以 SH 为基本培养基，不同浓度的 TDZ 和 NAA 组合对曙光、野生毛桃、砂子早生和早露蟠桃叶片再生不定梢的效应不同，TDZ 浓度在 1-3 mg/L 时，叶片再生率呈上升趋势，TDZ 浓度超过 3 mg/L，再生率下降；以 S3 培养基即：TDZ3.0mg/L+NAA0.3 mg/L 的再生效果最理想，野生毛桃再生率高达 35%，曙光、砂子早生和早露蟠桃的再生率分别是 30%、17%和 13%。

表 3.10 不同浓度的植物生长调节物质组合对桃叶片再生不定梢的影响
Table3.10 The effect of different combination of hormones on adventitious shoot regeneration

培养基 media	TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)	再生率 (%) Regeneration percentage (%)			
			曙光 Shuguang	野生毛桃 wildpeach	砂子早生 Sunagowase	早露蟠桃 Zaolupantao
S1	2.0	0.2	25A	17B	5B	6A
S2	2.5	0.25	30A	21AB	15A	9A
S3	3.0	0.3	30A	35A	17A	13A
S4	4.0	0.4	16B	35A	19A	14A

3.2.3 以再生叶片为外植体再生不定芽的研究

3.2.3.1 不同基本培养基对叶片再生能力的影响

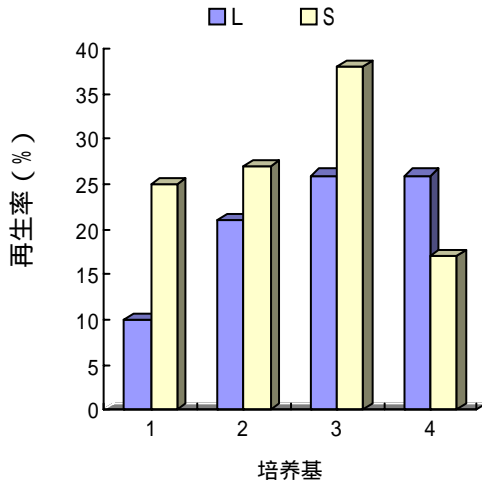


图 3.21 不同培养基对曙光叶片再生的影响
Fig3.21 The effect of different media on adventitious shoot regeneration from leaf

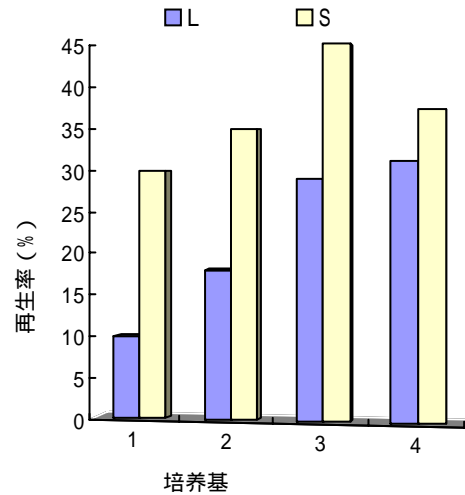


图 3.22. 不同培养基对野生毛桃叶片再生的影响
Fig3.22 The effect of different media on adventitious shoot regeneration from leaf

据图 3.21 和图 3.22 可示：曙光的叶片再生率在 LP 培养基和 SH 培养基上随着细胞分裂素的浓度增加呈现先升后降的趋势；野生毛桃的叶片再生率在 SH 培养基上随着细胞分裂素的浓度增加呈现先升后降的趋势，而在 LP 培养基上随着细胞分裂素的浓度增加，其再生率一直呈现上升趋势。曙光和野生毛桃在 SH 培养基上叶片再生不定芽的能力高于在 LP 培养基上叶片再生能力。

3.2.3.2 三种不同来源叶片再生不定梢能力的比较

据表 3.11 显示：在培养条件和培养基相同的情况下，不同来源的叶片再生能力存在明显差异。L3 为再生培养基时，曙光和野生毛桃以增殖叶片为外植体，二者均未产生不定芽；而以再生叶片和预培养茎尖叶片为外植体，曙光和野生毛桃均能再生不定梢，并且均以再生叶片的再生能力最强，曙光和野生毛桃的再生率分别为 26%和 29%，曙光的再生叶片再生率同预培养茎尖叶片无显著差异，而野生毛桃的再生叶片再生率显著大于预培养茎尖叶片；S3 为再生培养基时，3 种来源的叶片均能再生出不定梢，曙光以再生叶片为外植体，再生率最高达 38%，其再生能力同预培养茎尖叶片无显著差异，但显著大于增殖叶片，再生叶片的再生率是增殖叶片的 1.7 倍多；同样，S3 为再生培养基时，野生毛桃以再生叶片为外植体，再生率达最高（45%），显著大于增殖叶片和预培养茎尖叶片，增殖叶片和预培养茎尖叶片的再生率无显著差异，增殖叶片再生率最低。由此可见：不同来源的叶片再生不定梢的能力不同，其中，以再生新梢的叶片为外植体，再生率最高。

表 3.11 叶片来源对叶片再生不定梢的影响
Table3.11 The effect of the source of explants on adventitious shoot regeneration from leaf

叶片的来源 Source of leaf	培养基 media	TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)	BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	曙光再生率 (%) Regeneration of Shuguang	野生毛桃再生率 (%) Regeneration of Wild peach
增殖叶片 Leaf from Proliferation	S3 L3	3.0	0.3		0.3	26B 0C	33B 0C
预培养茎尖叶片 Leaf from pre-conditioned apex	S3 L3	3.0	0.3		0.3	30A 21B	35B 15C
再生叶片 Leaf from adventitious shoot	S3 L3	3.0	0.3		0.3	38A 26B	45A 29B

3.2.4 不定梢的生根

3.2.4.1 不同培养基对桃生根的影响

由表 3.12 可以看出 :以 1/2MS 和 1/2LP 为生根基本培养基都能使曙光和野生毛桃不定梢生根 ,但 1/2LP 生根效果更好。

表 3.12 不同培养基对桃生根的影响
Table3.12 The effect of different media on rooting of peach shoots.

培养基 Media	曙光 Shuguang		野生毛桃 Wild peach sideling	
	生根率 (%)	平均有效根数 (条/茎段)	生根率 (%)	平均有效根数 (条/茎段)
	Rate of rooting	Means No. of effective roots	Rate of rooting	Means No. of effective roots
1/2MS	80	3.45B	56	1.98B
1/2LP	100	5.71A	80	3.90A

3.2.4.2 不同浓度的 IBA 和 NAA 组合对曙光和野生毛桃生根的影响

据表 3.13 所示 ,以 1/2LP 为基本培养基 ,不同浓度的 IBA 和 NAA 组合对桃生根的影响不同。综合分析 ,以处理 6 即 IBA1.0mg/L+ NAA1.0mg/L 的生根效果最好 ,曙光最高生根率达 100% ,每个茎段产生的平均有效根的数量为 5.71 个 ;野生毛桃最高生根率为 80% ,每个茎段的有效根数量多达 8 条。

表 3.13 不同浓度的 IBA 和 NAA 组合对曙光和野生毛桃生根的影响
Table3.13 The effect of different IBA and NAA concernment on rooting of peach shoots

处理 Treatment	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)	曙光 Shuguang		野生毛桃 Wild peach seedling	
			生根率 (%)	平均有效根数 (条/茎段)	生根率 (%)	平均有效根数 (条/茎段)
			Rate of rooting	Means No. of effective roots	Rate of rooting	Means No. of effective roots
1	0.5	0	50	2.56C	30	1.59C
2	0.5	0.5	65	3.23C	34	1.86C
3	0	0.5	45	2.05C	26	1.05C
4	1.0	0	100	5.33A	75	3.32AB
5	0	1.0	80	4.64B	43	2.95AB
6	1.0	1.0	100	5.71A	80	3.90A

3.2.4.3 不同弱光处理时间对曙光和野生毛桃生根的影响

表 3.14 不同弱光处理时间对桃生根的影响
Table 3.14 The effect of different days of low light intensity treatment on rooting of peach shoots

处理 Treatment	弱光处理天数 Weak light	曙光 Shuguang		野生毛桃	
		生根率 Rate of rooting	平均有效根数 (条/茎段) Means No. of effective roots	生根率 Rate of rooting	平均有效根数 (条/茎段) Means No. of effective roots
1	0	50B	1.11B	30B	1.07B
2	5	55B	1.26B	38B	1.11B
3	10	75A	2.11A	50A	1.25B
4	15	85A	2.87A	60A	1.89A
5	20	87A	2.93A	71A	2.01A

以曙光和野生毛桃不定梢为试材，1/2LP 为基本培养基,植物生长调节物质组合为 IBA0.5mg/L+NAA0.5mg/L, 研究弱光（500Lx）处理时间对生根的影响。结果表明，一定时间的弱光处理可促进桃不定梢生根，由表 3.14 可以看出,随着弱光处理天数的增多,曙光和野生毛桃的生根率和平均有效根数呈增加趋势,经过 15d 弱光处理,能有效提高曙光和野生毛桃的生根率和生根条数。

3.3 小结

本文研究了以桃叶片为外植体再生不定梢的条件与技术，不仅验证了罗马果树所的研究结果，还创新了一套高频再生体系。

分析了 3 种不同来源的叶片、再生培养基、叶片成熟度和试材在树冠上的位置对叶片再生的影响，研究表明：理想的外植体是来自再生不定梢上的幼嫩叶片，不定芽再生率达到最高 45%，而来自增殖培养新梢和预培养茎尖的叶片，再生率均低于 33%；较佳的再生培养基：SH+TDZ3.0mg/L+KT0.3mg/L；充分扩展的幼嫩叶片以 1.0~1.5cm 长最好，再生率高出 0.5~1.0cm 长 3 倍以上；试材取材母株树冠的形态学下部有利于叶片再生。所有再生不定芽均能成苗并表现出正常的形态特征。

对再生不定梢进行生根研究，获得了再生植株。研究了培养条件、基本培养基和植物生长调节物质对不定梢生根的影响，结果表明；不定梢在温度 24±1℃，光照强度为 300lx 环境中培养 10d，再转到 2500lx 环境中培养 20d，其生根率达 100%，平均每个新梢产生 3.86 条有效根；最生根培养基是 1/2LP+NAA1.0mg/L+IBA1.0mg/L。



图 3.23 不定梢在 1/2LP 培养生根
Fig.3.23 peach rooting on 1/2LP media



图 3.24 左 不定梢在附加浓度为 1.0mg/LIBA 和 1.0mg/L NAA 的 1/2LP 培养基上生根
Fig.3.24 on the left. Shoot rooted on the LP medium supplemented with NAA and IBA
图 3.24 右 不定梢在附加浓度为 1.0mg/LIBA 和 1.0mg/L NAA 的 1/2MS 培养基上生根
Fig.3.24 on the right. Shoot rooted on the MS medium supplemented with NAA and IBA

第四章 讨论

本文以油桃不同试材曙光、毛桃不同试材砂子早生、蟠桃不同试材早露蟠桃、野生毛桃和甘肃桃为试材,在建立稳定高效的桃组织培养与快繁技术体系基础上,优化叶片再生不定梢的组织培养体系,提高植株再生率,建立了高频植株再生体系。

Hammerschlag (1982) 在桃离体快繁时,建立了污染率仅 2%消毒体系,目前国内外尚未有突破这一体系的报道,其消毒体系为:0.5%次氯酸钠表面杀菌 20min+0.01%吐温浸泡 20 分钟,然后加 100mg/L 青链霉素处理 15min,再用双蒸无菌水冲洗 3 次。本文经反复探索,建立了污染率仅 2%,且外植体萌发率达 83%的消毒方法,萌发率明显高于 Hammerschlag 报道的 57%,且组培苗在继代 30 代后,仍处于高度的无菌状态。此方法为:50%酒精浸润 30s,再用爱尔施牌消毒片以 1.5g/L 浓度灭菌 20min,无菌水漂洗 5 遍。

覃兰英等 (1997) 试验表明:桃休眠后期取材,其萌发率均高于生长期、休眠前期,而本研究发现,3、4、5 和 9 月是曙光、野生毛桃、砂子早生、早露蟠桃的适宜取材时期,而甘肃桃的萌发率不受取材时间限制,均保持在 79%以上。许多研究表明外植体萌发率的高低受取材时间的影响,这可能有些偏颇,根据甘肃桃取材时间与萌发率之间的关系来看,其萌发率与取材时间无必然联系。我们推论:如果初代培养基的配方更适合其启动培养,实验材料的获得就不会受到自然因素的控制了。

桃在增殖培养过程中很难驯化,本研究对继代培养过程中,基本增殖培养基和不同浓度植物生长调节物质经 3 次继代筛选发现,MS 和 G 培养基在前 2 代培养过程中,组培苗表现正常,但第 3 代组培苗黄化,部分苗死亡且培养基褐化严重,这一结果肯定了覃兰英等 (1997) 研究报道的 MS 培养基不适合桃的组织培养,与田增胜等 (2005) 报道的 G 培养基适合于曙光增殖培养结果是相反的。我们在试验中得出 LP 培养基有利于桃的快繁培养这一结果,与 Genetile 等 (1995) 报道的结果相吻合。

对 pH 连续继代 3 代筛选发现,pH5.4-5.8 有利于桃的增殖生长,这与许多研究结果相一致。但发现了一个有趣的现象:在 pH 为 4.6-5.4 (不含 5.4) 环境下,试管苗在继代接种时,如果苗高于 2.5cm,试管苗的增殖能力和生长一直保持正常的水平,增殖的腋芽及本身茎段比正常的 pH 环境 (pH 在 5.4~5.8) 增殖芽更健壮,茎尖明显的较正常环境向上生长,可能有两方面的原因,苗高抵抗能力强,再者,在高酸性的环境下,培养基的生长调节物质处于最佳水平,TDZ 和 BAP 易溶于高浓度的酸中。

本研究发现曙光、野生毛桃、砂子早生和早露蟠桃对基本培养基和植物生长调节物质的要求很相似,但与甘肃桃对培养基和植物生长调节物质的要求完全不同。我们分析认为,曙光、砂子早生、野生毛桃和早露蟠桃属同一个种,亲缘关系较近,而甘肃桃属另一个种,与曙光、砂子早生、早露蟠桃、野生毛桃亲缘关系较远 (杨新国等,2001),曙光、野生毛

桃、砂子早生和早露蟠桃适宜的基本培养基为 LP 培养基, 植物生长调节物质组合 BAP 和 IBA, 而甘肃桃理想的基本培养基 SH, 植物生长调节物质组合 TDZ 和 NAA, 这表明遗传背景相似的种质材料对培养基和植物生长调节物质的要求也相似, 验证了王关林等 (2005) 的研究结果。

关于 BAP 和 IBA 对桃的增殖影响, Hannersschlag(1982)和 Found 等(1995)认为 BAP (0.5-0.1mg/L) 和 IBA 适合桃的增殖生长, 本研究结果与上述结论相吻合; 对于 TDZ 和 NAA 对桃的增殖影响方面, 本文研究结果与田增胜等 (2005) 报道的结果有很大的出入, 田增胜等 (2005) 认为 TDZ 浓度 1.0-1.5mg/L 适合桃的增殖生长, 但本文发现 TDZ 浓度 1.0-1.5mg/L 适合桃的第一代和第二代增殖生长, 但不适合第三代及以后的增殖生长。

曙光、野生毛桃、砂子早生和早露蟠桃在适宜的培养基上进行增值培养, 其平均增殖系数可保持在很高水平, 但甘肃桃在适宜的培养基上平均增殖系数很低, 组培苗几乎不分枝, 出现这一结果推测有二方面的原因, 一是本研究所谓最适合甘肃桃的培养基事实上不是甘肃桃的最佳培养基, 二是甘肃桃是增殖系数很低的种, 具体有待进一步研究。

本研究发现叶片能否再生不定梢, 主要有 3 个关键因素, (1) 培养基和培养条件; (2) 叶片的生理状态; (3) 叶柄的存在。叶柄的存在是核果类果树叶片再生不定梢的必要条件 (Antoneli and Druart, 1990; Escalettes and Dosba, 1993; Miguel et al., 1996), 愈伤组织着生在叶柄上, 缺乏叶柄的叶片无再生能力。

Genetile 等 (2002) 曾报道增殖叶片不能再生出不定梢, 但本试验发现, 增殖叶片在 SH 培养基上能再生出不定梢。以再生叶片为外植体, 新梢的再生率可高达 45.0%, 远高于 Genetile 等 (2002) 研究结果 (28.3%)。同时, 本文重复出 Genetile 等 (2002) 的研究内容, 验证了其报道的结果。

在 TDZ 诱导叶片再生不定梢方面, 原有报道差异很大, Antoneli and Druart (1990) 和 Miguel 等报道的 TDZ 能有效地使李属果树叶片再生出不定梢, 而 Genetile 等 (2002) 认为, TDZ 不能使桃叶片离体再生出不定梢。本研究发现 TDZ 有利于叶片再生出不定梢。

在试验中, 我们得出了叶片的成熟度、叶片来源和叶片在母体树冠的位置都能影响叶片再生率, 叶片长 1.0-1.5cm, 叶片再生能力最强, 这与 Escalettes V 和 Dosba F (1995) 报道的结果相符; 叶片来源于再生不定梢, 再生率最高, 肯定了 Duarte 等 (1993) 双系统研究结果, 而增殖叶片和与培养茎尖叶片的再生率无显著差异; 叶片来源母体树冠下部, 叶片再生能力最强。

桃的组织培养苗生根困难是影响其在生产中的应用的一个障碍, 北农早艳的生根率为 75% (江虎军, 1993), 晚熟桃“90-11-36”的组织培养中, 新梢生根率达 91.7%。本研究发现, 使用 1/2LP 培养基 (大量元素减半), 附加不同浓度的 IBA 和 NAA 组合, 对曙光和野生毛桃的生根效果很好, 曙光未经弱光处理, 二者的生根率均达 100%, 且基部几乎无愈伤组织,

可直接应用生产。

稳定高效的再生体系是进行遗传转化的前提和基础。然而迄今为止,桃的再生体系的研究和建立主要是以幼胚及其各部分(包括胚乳、子叶和胚轴)为外植体,而且不稳定,再生频率低。由于胚及其各部分在形成过程中发生了基因重组和性状变异,以其为外植体进行遗传转化在定向改良不同试材方面的价值要比以成熟基因型的无性器官(叶片、茎段、根等)为外植体小得多。

然而以桃成熟基因型的无性器官(叶片、茎段、根等)为外植体进行再生体系的研究进展缓慢,迄今,只有意大利罗马果树所(Genetile 等,2002)在桃叶片离体再生研究方面取得了突破性进展,获得了再生不定梢。而在无性组织茎段、根等方面的再生研究尚未见成功的报道。目前,国内尚未见有关桃无性组织离体再生研究的成功报道。本研究不仅重现了 Genetile 等的研究,肯定了其研究结果,而且更重要的是创新了一种研究方法,使新梢再生率大幅度提高(可达 45.0%),为未来桃遗传转化体系的建立和不同试材的定向改良奠定了坚实的基础。

第五章 结 论

本研究以油桃不同试材曙光、野生毛桃、毛桃不同试材砂子早生、蟠桃不同试材早露蟠桃和甘肃桃为试材,在建立稳定高效的桃组织培养与快繁技术体系基础上,优化叶片再生不定梢的组织培养体系,提高植株再生率,建立了高频植株再生体系。主要结论如下:

外植体消毒是离体培养的关键技术之一,还直接影响外植体的萌发率,本研究建立一种污染率仅 2%且对外植体伤害最轻的消毒方法:50%酒精浸润 30s,再用爱尔施牌消毒片以 1.5g/L 浓度灭菌 20min,无菌水漂洗 5 遍。

取材时间影响萌发率,曙光、野生毛桃、砂子早生和早露蟠桃的外植体于 3、4、5、9 和 10 月份取材,萌发率较高,而甘肃桃在 3~10 月份取材,萌发率无显著差异,均保持在 79%以上。

理想的初代培养基是 LP 培养基,萌发率是 MS 培养基的 2.1 倍;适宜的初代培养条件为光照强度 1000lx,温度 24℃。

除甘肃桃外,适宜的继代培养基为 LP 培养基附加 BAP0.75mg/L+IBA0.3 mg/L,而 SH+TDZ0.75mg/L+NAAA0.3 mg/L 是甘肃桃最佳增殖培养基。适宜的 pH 值为 5.4~5.8,在此 pH 区间,茎段的平均增殖效率高且稳定。

基因型直接影响增殖能力,曙光、野生毛桃、砂子早生和早露蟠桃在适宜的培养基增殖培养,平均增殖系数都能保持在 3.50 以上;而甘肃桃在适宜的培养基增殖培养,平均增殖系数仅 2.0。

不同来源的叶片再生新梢的能力不同。以再生新梢上的叶片为外植体,可获得高达 45.0%的再生率,而增殖叶片和预培养茎尖叶片的新梢再生率则低于 33.0%,增殖叶片和预培养茎尖叶片的再生能力无显著差别。

外植体在树冠中的位置影响叶片的再生能力,源于树冠下方的外植体,叶片再生能力最强,且显著高于树冠中部的;源于树冠上方的外植体,叶片无再生能力。

培养基是叶片离体再生不定芽的关键,叶片只有在适宜的培养基再生培养,才能再生不定梢。三种来源的叶片均表现:在 SH 培养基再生率显著高于 LP 培养基;适宜的培养基配方为 SH 培养基大量元素配方,LP 培养基微量元素配方,肌醇 150mg/L,泛酸钙 1.0 mg/L,生物素 1.0 mg/L,1.0 mg/L,核黄素 0.2 mg/L,烟酸 0.5 mg/L,生长调节物质为 TDZ3.0mg/L+NAA0.3mg/L。

不同培养基对三种来源的叶片影响是不同的:供试不同试材在 LP 培养基上进行增殖培养,增殖叶片无再生能力,预培养茎尖叶片和再生叶片具有再生不定芽的能力;在 SH 培养基上,三种叶片都具有再生不定芽的能力。

理想的生根培养基为 1/2LP 培养基，供试不同试材的生根率 100%，较佳的植物生长调节物质组合为 NAA1.0 mg/L + IBA1.0 mg/L。适宜的培养条件为温度 24℃，先弱光处理 10d，再正常光照培养，生根率 100%，平均每个新梢可萌发 3.86 条有效根。

参考文献

1. 陈君帜, 李青, 李属植物脱毒技术及病毒检测研究进展 北京林业大学学报, 2001, 23(5): 71-74.
2. 方金豹, 顾红, 乔宝营, 陈锦永, 张威远. 不同化学物质打破葡萄、桃休眠的研究[J]. 果树学报, 2005, (05): 470-473.
3. 李桂荣, 孙丽, 孙俊逢, 油桃组织培养过程中防止褐变的研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(5): 827-828
4. 李梦玲, 李嘉瑞, 陶正平, 袁仕禄, 战景仁, 杏叶片离体繁殖研究[J]. 中国农学通报, 2001, 02: 8-10.
5. 李曜东, 魏玉凝. 肥城桃组培苗诱导、基因转化及其增殖. 果树学报, 2003, 20(1): 70-72.
6. 刘翠琼, 汤浩茹. 梨叶片培养与转基因研究进展. 果树学报, 2003, 373-377.
7. 孟新法, 周维燕. 桃胚乳离体培养再生植株的研究. 北京农业大学学报, 1981, 7(4): 95~97.
8. 宁淑香, 张春明, 姜长阳. 六种樱桃砧木无性系的建立与再生能力的比较[J]. 辽宁农业科学, 2001, (5). 15-17
9. 孙俊, 孙其宝, 俞飞飞. 桃快速繁殖技术体系的研究[J]. 安徽农业科学, 2003, (5): 731-732.
10. 孙清荣, 石荫坪, 赵红军. 九月菊桃成熟胚诱导不定梢的研究. 山东农业科学, 1999, 2: 18-19.
11. 孙清荣, 孙洪雁, 石荫坪. 青州蜜桃、冬桃成熟胚子叶再生不定植株的研究. 山东农业科学, 2000, 2: 11-12.
12. 孙跃峰, 韩明玉, 范崇辉, 张满让, 王淑莉. 影响油桃子叶再生植株因子的研究. 全国第九次桃遗传育种与栽培技术学术研讨会论文汇编 2003, 141-147.
13. 孙跃峰, 韩明玉, 范崇辉, 张满让, 王淑莉. 油桃子叶再生植株影响因子研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004,
14. 覃兰英, 李青, 邓世秀, 黄宇, 李明福, 张成良, 李桂芬, 贺森林, 牛长占, 核果类病毒识别鉴定及脱毒技术. 北京农业科学 1997, 15(5): 23-28.
15. 汤浩茹, 王永清, 任正隆, G.Krczal, 德国核桃 'No. 120' 幼胚胚轴与子叶体细胞胚胎发生及其植株再生[J]. 园艺学报, 2000, (01): 59-61.
16. 田莉莉, 方金豹, 陈锦永, 顾红, 化学物质打破桃休眠的效应初探[J]. 落叶果树 2002 02: 4-6.
17. 田增胜, 韩明玉, 张满让, 田玉命, 影响早熟油桃胚轴培养及再生因素的研究, 西北植物学报 2005, 07: 1452-1457.
18. 田增胜, 韩明玉, 张满让, 田玉命, 影响早熟油桃茎尖培养增殖效率的因素[J]. 果树学报 2005. 22(3): 279-282.
19. 王关林, 刘秀梅, 方宏筠, 李红, 李华刚, 蝶形花亚科 8 种槐树的组织培养及再生能力的基因型效应[J]. 园艺学报, 2005, 32(05): 79-83.
20. 王力荣, 朱更瑞, 左覃元. 中国桃不同试材需冷量的研究[J]. 园艺学报, 1997(02): 36-39.
21. 吴延军, 张上隆, 张岚岚, 沈淦卿, 吴大军, 桃幼胚子叶不定芽发生的初步研究, 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2003(01): 35-39
22. 吴延军, 张上隆, 徐昌杰, 李南羿, 金勇丰. 根癌农杆菌介导的桃幼胚转化实验参数研究. 果树学报, 2004, 21(5): 477-479.

23. 闫国华, 周宇, 张开春.核果类果树转基因研究进展[J]. 果树学报 2001,18 (6) :358-364.
24. 闫国华, 周宇.桃幼胚离体培养再生植株的研究. 园艺学报,2002, 29 (5) : 480-482.
25. 杨新国, 张开春, 秦岭, 王永熙, 桃种质亲缘演化关系的 RAPD 分析[J]果树学报 2001 , 18 (5) : 276-279
26. 杨增海,胡霓云,路广明.桃试管实生苗茎尖培养的研究[J].园艺学报,1984,11(1):7-13.
27. 尚敏克,姜国斌,尹伟伦,李明亮.晚熟桃的离体组织培养[J].辽宁林业科技,2002,(3):5-7.
28. 张永庆,陈大明,金勇丰,张上隆.桃离体组织分化再生植株的研究[J].园艺学报,2001,(4):342-344.
29. 姚强,胡霓云,路广明.早熟桃幼胚愈伤组织再生植株技术研究.果树科学,1989,6(2):85-90.
30. 姚强,王德春,吴钰良,庄恩及.桃、油桃和蟠桃幼胚愈伤组织诱导和植株再生.上海农业学报,1990,(3):23-29.
31. 张满让,韩明玉,王西玲,田玉命,王淑莉,王安柱,朱晓蓉,影响早熟油桃胚培养的几个因子.果树学报 2004, 04
32. 张素,周建涛,陆维忠,桃无性系砧木 GF43 微繁技术研究,江苏农业学报,1993,9(03):51-55.
33. 张永庆,陈大明,金勇丰,张上隆.桃离体组织分化再生植株的研究,2001,28(4):342-344.
34. 钟晓红,戴思慧,马定渭,核果类果树茎尖培养研究进展[J]果树学报,2003,20(05):388-392.
35. Antoneli M, Druart Ph. The use of 2,4-D treatment to induce leaf regeneration on *Prunus anescens* Biois. Acta Hort,1990, 280:45-50.
36. Battistini A. De paoli G.Large scale micropropagation of several peach rootstocks[J].Acta Hort 2002(592):29-33.
37. Bhansali RR.,Driver JA.,Durzan DZ. Adventitious embryogenesis and plant regeneration from rescued embryos of peach. *Prunus persica* (L.) Acta Horticulturae ,1992,(300):265-268.
38. Camara Machado ML., da Camara Machado A., Hanzer V., et al. Regeneration of transgenic plants of a *prunus rmeniaca* containing the protein gene of pox virus. Plant Cell Rep,1992, 11:25-29.
39. Declerck V. ,Korban SS. Influence of growth reglulators and carbon sources on callus induction, growth and morphogenesis from leaf tissues of peach[*Prunus persica*(L.)Batsch]. Journal of Horticultural Science,1996,71(1):49-55.
40. Escalettes V.,Dosba F.In Vitro adventitious shoot regeneration from leaves of *Prunus* spp. Plant Sci,1993,90:201-209.
41. Fitch MMM., Manshardt RM.,Gonsalves D., et al. (Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. Bio/Technol,1992, 10:1 466-472.
42. Fouad M.M Gomaa A.H. and Abd El Zaher M.H.Factors influencing *in vitro* estalishment and multiplication stages of peach[J]. Acta Horticulturae 1995 ,(409)191-196.
43. Gentile A.,monticell S.,Damiano C.Adventitious shoot regeneration in peach [*Prunus persica*(L.) Batsch].Plant Cell Rep,2002,20:1011-1016.
44. Hammerschlag FA. Callus and root formation from leaves of mature peach plants propagated *in vitro*. HortScience,1988b, 23:756.
45. Hammerschlag FA.,Mccanna IJ.,Smigocki AC. Characterization of transgenic peach plants

- containing a cytokinin biosynthesis gene. *Acta Horticulturae*,1997, 447:569-574.
46. Hammerschlag FA.,Owens LD. *Agrobacterium*-mediated transformation of peach cells derived from mature plants that were propagated *in vitro*. *J Amer Soc Hort Sci* ,1989,114(3):508-510.
47. Hammerschlag FA.,Smigocki AC. Growth and *in vitro* propagation of peach plants transformed with the shooty mutant strain of *A grobacterium tumefaciens*. *HortScience* ,1998,33(5):897-899.
48. Hammerschlag FA.Factors involved in callus and root formation from leaves of mature peach plants propagated *in vitro*. *In vitro Cellular and Developmantal Biology*,1988a, 24:39.
49. Hammerschlag Factors affecting establishment and growth of peach shoots *in Vitro*[J].*Hortscience* 1982 17(1):85-86.
50. Hammschlag F.A., Bauchan G., Scorza R, Regeneration of peach plant from cellus drived from immature embryos.Theoretical and Applied Genetic ,1985,70:248-251.
51. James DJ.,Passey AE.,Barbara DJ., et al. Genetic transformation of apple(*Malus pumila* Mill.) using a discarded Ti-binary vector. *Plant Cell Rep*,1989,7:658-661.
52. Korban S.S., O'Connor P.A., Elobeidy A. Effects of thidiazuron, naphthaleneacetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from *Malus* leaves. *J Hortic Sci*,1992,67:341-349.
53. Kornova K. Study of *in Vitro* rooting in some peach varieties. *Rasteniev dni Nauki*, 1995,32:7-8,109-111.
54. Mante S., Morgens PH., Scorza R., et al. A grobacterium-mediated transformation of plum (*Prunus domestica* L.) hypocotyls slices and regeneration of transgenic plants. *Bio/Technology*,1991,9:853-857.
55. Mante S., Scorza R., Cordts JM. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica* ,*Prunus cerasus*.*Plant Cell Tissue Organ Cult* ,1989,19:1-11.
56. McGranahan GH., Leslie CA., Uratsu S., et al. A grobacterium-mediated transformation of transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Bio/Technology*,1988,6:800-804.
57. Miguel CM., Druart Ph.,Oliveira MM. Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond(*Prunus dulcis* Mill.) explant. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*,1996, 32:148-153.
58. Murashige,T.and Skoog,F.1962. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures[J]. *Physiol.Plant*.15:473-497.
59. Ognjanov V., Vujanic VD., Macet K., et al. Tissue culture approaches to peach improvement. Progress in temperate fruit breeding. Proceedings of the Eucarpia Fruit Breeding Section meeting,Wadenswil-Einsiedeln,Switzerland,1994, 389-393.
60. Pooler MR.,Scorza R. Regeration of peach[*Prunus persica*(L.)Batsch]rootstock cultivars from cotyledons of mature stored seed. *HortScience*,1995,30:355-356.
61. Quorin, M. and Lepoivre, P. Etude de milieux adaptes aux culture “in vitro” de *Prunus*[J].*Acta Hort*.78:437-442.
62. Rgini E., Pellegrineschi A., Mencuccini M., et al. Increase of rooting ability in woody species kiwi (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) by transformation with *A grobacterium-media rhizogenes*. *Plant Cell Rep*,1991,10:291-295.
63. Schneider KE., Speranzini D., Biggs AR. Ontogeny of shoot regenerants on excised immature peach embryos. *Canadian Journal of Plant Science* ,1992,72(2):497-506.

64. Scorzan JM., Morgens PH., Cordts JM. transformation of peach [*Prunus persica*(L.)Batsch]leaf segment , immature embryos and loogterm embryogenig callus. In vitro Cellular and Developmental Biology,1990,26(8):829-834.
65. Smigocki AC., Hammerschlag FA. Regeneration of plants from peach embryo cells infected with a shooty mutant strain of *A grobacterium*. J Amer Soc Hort Sci ,1991,116(6):1092-1097.
66. Smigocki AC.,Owins LD.,Hammerschlag FA.In Vitro transformation of peach,*Prunus persica*(L.)Batsch. using *A grobacterium tumefaciens*. Hortscience,1987, 22:150-153.
67. Uematsu C., Murase M., Ichikawa H., et al. A grobacterium-mediated transformation and regeneration of kiwifruit. Plant Cell Rep ,1991,10:286-290.
68. Veronique Declerck and Korban S.S. Influence of growth regulators and carbon sources on callus induction, growth and morphogenesis from leaf tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). Journal of Horticultural Science ,1996,71(1): 49-55.
69. Werner DJ, Okie WR. A history and description of the *Prunus persica* Plant introduction collection. HortScience ,1998,33:787-793.
70. Ye XJ, Brown SK, Scorza R, et al. Genetic transformation of peach tissues by particle bombardment. J Amer Soc Hort Sci ,1994,119(2):367-373.

致 谢

本论文是在我的导师王志强研究员悉心指导下完成的。在我三年的学习和研究工作中，从课程学习、论文设计到论文的写作都得到了导师的教诲和关怀。先生渊博的知识、严谨的科学态度和敬业精神，给予我极大的鼓舞和启迪。导师对我几年来学业上的指导和生活上的种种关怀，学生将铭记再心，并在此致以衷心的感谢。

几年来，牛良老师及其爱人田莉莉博士，在我的学习生活方面，给予了诸多的指导和帮助，在此一并表示由衷的谢意。

本论文研究工作在郑州果树所生物技术中心完成的，得到了古勤生博士的大力支持，还得到了实验室工作人员李莉老师、刘利锋和彭宾提供的方便，并得到李鹏、孟娟、楚宗丽、马新艳和陈威给予的帮助，在此，向他们表示诚挚的感谢。

在论文完成的过程中，得到了桃育种课题组宗学普研究员、刘淑娥和宋银花三位老师的积极支持，感谢他们对我的关照。

特别感谢我的丈夫周国江和我的儿子及我的家人，对我求学过程的支持和理解。

最后，非常感谢中国农科院郑州果树所对我的培养和所有关心和帮助我的老师和朋友们！

作 者 简 历

姓名：闫承璞

性别：女

出生年月：1975.07

籍贯：内蒙古锡盟多伦县

专业：果树学

研究方向：果树遗传育种

主要经历：

2003.09—2006.07 于中国农业科学院研究生院，攻读果树学专业硕士

1995.09—1999.07 于内蒙古民族大学，攻读植物保护学士学位

1999.12—2003.09 于内蒙古锡盟多伦县组织部工作