

桃砧木 GF677 离体快繁技术体系研究

李洪雯^{1,2}, 刘建军², 邓家林², 陈克玲², 李旭峰^{1*}

(1 四川大学 生命科学学院, 成都 610064; 2 四川省农业科学院 园艺研究所, 成都 610066)

摘要:以桃砧木 GF677 新梢茎尖和带腋芽的茎段为外植体, 用 MS、WPM、G、RO、改良的 DKW 和 QL 等 6 种培养基分别添加不同激素, 进行离体快繁技术研究。结果表明: 初代培养试验材料为水培的嫩梢茎尖, 其污染率低于 20%。最适初代诱导培养基、继代增殖培养基和生根培养基均为改良的 QL 培养基: QL(大量元素)+MS(微量元素)+DKW 铁盐+RO 有机成份。在改良的 QL 培养基上, 添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃, 诱导簇生芽 3~8 个; 添加 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, 继代培养的不定梢增殖率 4~7 倍。1/2 大量元素的 MS 液体培养基附加 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 在 10 d 内能显著地拉长不定梢。同样, 在改良的 QL 培养基上添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA+ $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PG+ $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭, 10 d 生根率可达 96.7%, 平均根长 0.4 cm; 生根幼苗移栽到温室后的第一周, 严格控制温度在 $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$ 和相对湿度 95%, 2~3 周后幼苗长出新根和新叶, 成活率可达 85%。

关键词: 砧木; GF677; 簇生芽; 不定梢; 离体快繁; 成活率

中图分类号: Q813.1⁺2 **文献标识码:** A

in vitro Rapid Propagation of GF677 Peach Rootstock

LI Hong-wen^{1,2}, LIU Jian-jun², DENG Jia-lin², CHEN Ke-ling², LI Xu-feng^{1*}

(1 College of Life, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2 Horticulture Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

Abstract: The technology of *in vitro* rapid propagation of GF677 peach rootstock was studied using new shoots and stem sections with axillary bud as explants. There were 6 kinds of basal medium (MS, WPM, G, RO, Modified DKW, Modified QL) with different ration hormones. The results showed that the good materials for the primary culture came from the hydroponics. The polluted rate was lower than twenty percent. The optimal basal medium for the primary culture and subculture and induction root was modified QL. It include QL(macro-element)+MS(micro-element)+DKW(FeNa₂EDTA)+RO(Organic content). Modified QL supplemented with $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ was the most suitable for the fascicular buds induced with 3~8 buds. At the same time, modified QL supplemented with $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA was the most suitable for the adventitious shoots multiplication and the propagation rate reached 4~7 times. Half-strength MS liquid media supplemented with $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA for 10 days, length of shoots were notably elongated. Also, modified QL supplemented with $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA+ $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PG+ $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AC was the most suitable medium for elongated shoot rooting with 96.7% of rooting rate and 0.4 cm of average root length after 10 days. After the plantlets were transplanted into the greenhouse, the temperature $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$ and relative humidity (95%) must be carefully controlled in the first week. The new rooting and new leaf occurred in the greenhouse af-

收稿日期: 2008-06-17; 修改稿收到日期: 2008-10-07

基金项目: 四川省“十一五”果树育种攻关(2006YZGG-7-7); 四川省农科院青年基金(05-果树)

作者简介: 李洪雯(1972-), 男(汉族), 副研究员, 在读博士研究生, 主要从事果树遗传育种与生物技术研究。E-mail: sc_lhw@163.com

* 通讯作者: 李旭峰, 教授, 主要从事植物遗传与分子生物学研究。E-mail: lixufeng0507@gmail.com

ter 2~3 weeks. The survival rate was up to 85%.

Key words: rootstock; GF677; fascicular bud; adventitious shoot; *in vitro* rapid propagation; survival rate

GF677(*P. amygdalus* × *P. persica*)桃砧木由法国 INRA(Institut National de la Recherche Agronomique) 于 20 世纪 60 年代杂交选育而成,根系发达,长势健壮,树冠高大,与桃/油桃品种间嫁接亲和力强,并具有抗钙质碱性土缺铁性黄化、耐重茬、耐旱等优良特性^[1,2]。

GF677 通过营养繁殖的方式才能保持其优良的遗传特性,扦插育苗成活率较低、季节性强、一致性差,在短期内不能大量繁殖。法国、意大利、西班牙、土耳其等国都通过组培快繁大量的 GF677 用于生产;据意大利 Dr. Giuliano Dradi 介绍,仅 Vivai Battistini 在 2004~2007 年间,每年组培快繁 GF677 桃砧木 200 万株以上。尽管国外 GF677 组培快繁技术较为成熟,但关于 GF677 的组培快繁技术核心极少报道,同样关于桃不定梢再生的相关实际报道也很少^[3]。目前国内也仅见一篇关于桃再生的报道^[4],而关于 GF677 的组培快繁技术研究还没有相关报道。桃树生产周期较短,老龄桃树重茬果园及一些碱性土壤的新植桃园急需 GF677 这类优良抗性砧木。本研究通过建立 GF677 离体快繁技术体系,为 GF677 的工厂化育苗提供参考,为 GF677 等桃砧木种质资源离体保存奠定技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

采自四川果树无毒苗木繁育中心(中国-意大利政府间合作项目)隔离网室的脱毒桃砧木 GF677 的一年生健壮枝条。试验时间:2003 年 3 月至 2008 年 3 月。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养条件 试验选用 MS(1#)、改良 DKW(用 MS 铁盐,2#)、WPM(3#)、G(4#)、改良 QL(用 MS 微量元素、DKW 铁盐、RO 有机成分,5#)和 RO(6#)6 种基本培养基^[5-10]和一种大量元素减半的 MS 液体培养基^[11,12]。培养基中添加琼脂 $6.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (液体培养基中无琼脂),蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 6.0,121℃ 高压灭菌 15 min。光照 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$,光照度 2500 lx ,温度 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养。

1.2.2 外植体预培养 将 GF677 的一年生健壮枝条用 70%代森锰锌 600 倍液浸泡 5 min,仔细漂洗

后,插于无菌水瓶并置于无菌培养室黑暗水培,促发新梢。

1.2.3 外植体消毒及初代培养 将水培促发的新梢(1.5 cm 左右)去掉叶片、2/3 叶柄,用无菌去离子水漂洗 2 次,再用 0.1%升汞加 2 滴吐温-80 消毒 6 min,然后用无菌去离子水漂洗 4 次,每次在磁力搅拌器作用下漂洗 2 min。无菌滤纸吸干多余水分。

水培促发的新梢 0.4 cm 左右的茎尖(带有 4~7 个叶原基)经消毒后接种于 6 种簇生芽诱导培养基(表 1)进行无菌初代培养。每处理接种 30 个茎尖外植体。

1.2.4 继代增殖 初代培养 3 周后,85%的茎尖产生出 3~6 个簇生芽,5 周时不定梢达 $(1.8 \pm 0.3) \text{ cm}$ 。取此时的不定梢短茎切段(带有 2 腋芽)接种于 6 种继代增殖培养基(表 2)。3 周继代一次,达到一定数量后,一部分继续继代增殖;另一部分在继代增殖 3 周后直接加入液体培养基培养 10 d。每处理接种 30 个茎段外植体。

1.2.5 生根培养与移栽 将经过液体培养的不定梢(每处理 30 个)接种于 4 种生根培养基(表 3)。10 d 后取出生根苗,并移栽到富含有机质的营养土中(泥炭:蛭石=4:1),控温保湿,5 周后统计移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 外植体来源及消毒对初代培养体系的影响

直接取自隔离网室的嫩梢(春梢),由于暴露于外界时间较长,易受到细菌、真菌等病害的侵染,甚至感染到植物组织内部,导致消毒、灭菌非常困难,这样的外植体在初代诱导培养基中的污染率一度高达 90%以上。采用广谱杀菌剂预先杀灭病原微生物,黑暗无菌室、无菌去离子水培法促生的嫩梢(2~3 cm)受病害感染率降低。针对 0.1%升汞对幼嫩外植体的毒害作用及预试验消毒效果,采用 0.1%升汞加 2 滴吐温-80 在均匀搅动下消毒 5~6 min 为宜,无菌去离子水 4 次漂洗,即可基本灭菌。

2.2 不同初代培养基培养的效果

茎尖外植体太小,操作较困难,容易失水枯死,或者萌发时间较长;外植体太大,易产生顶端优势,不容易形成簇生芽。经过多次预试验,选取 0.4 cm 左右的茎尖作外植体最适。外植体在 6 种初代培养

基上先经过3周弱光照培养(光照度1 000 lx),各培养基上的外植体都产生簇生芽,但发生的数量、速度在不同培养基上差异明显(表1)。1#、2#培养基上的外植体少量产生簇生芽,很快黄化褐化并死亡;3#、4#培养基上的簇生芽缓慢生长,长势弱,3#培养基上的簇生芽还出现部分黄化现象;5#、6#培养基上的簇生芽达5~6个,长势较好(图版I, 1)。4周时(光照度2 500 lx),3#、4#培养基上的簇生芽几乎停止生长;5#培养基上的不定梢长势强于6#,高度为(1.2±0.3) cm,颜色浓绿(图版I, 2)。以上结果可以看出在相同外源激素条件下基本培养基对簇生芽的诱导和生长势有直接影响。由于1#、2#培养基的 NH_4^+ 是其他4种培养基的3~4倍,可以推断 NH_4^+ 对GF677的生长影响很大,对GF677而言 NH_4^+ 的浓度在400 mg·L⁻¹左右为宜。相对其它培养基而言,5#培养基最适GF677茎尖诱导培养。

2.3 不同继代增殖培养基的培养效果

在继代增殖培养中,培养基和茎段腋芽(底部和上部腋芽)的部位不同,腋芽处萌发的簇生芽数量和长势出现明显的差异(表2)。1#和2#培养基上的短茎切段在培养10 d后虽然发出少量簇生芽,但很快黄化,3周后几乎褐化、死亡。3#、4#培养基上

发出的簇生芽数量相对较少,长势也较弱;6#培养基上的簇生芽相对3#、4#多些,但长势相似。5#培养基上的簇生芽最多,长势也最旺,叶色浓绿(图版I, 3)。3周后5#培养基上的不定梢经过液体培养基(1/2 MS+1.2 mg·L⁻¹ 6-BA)处理10 d,不定梢的高度明显增加,粗度也有一定增加(图版I, 4)。分析以上结果得出与初代培养的相似结论,即在相同外源激素条件下,基本培养基对GF677继代增殖也有重要影响,高浓度的 NH_4^+ 极大地抑制GF677生长;液体培养基短时间内改变了其生长条件,加速不定梢对营养成分的吸收,高度和粗度显著增加。不定梢高度增加利于生根接种操作;其粗度增加有利于切口面增大,利于缩短生根时间和增大生根量。

2.4 生根培养与移栽

GF677试管苗生根较难^[13]。当经过继代增殖3周、液体培养基培养10 d后的不定梢(2.0±0.5) cm时,将其切下并除去幼梢下部叶片,接种到生根培养基中培养(表3)。5 d时幼梢底部开始出现白色的细小根尖生长点,10 d时发根3~8条,长度2~5 mm,无须根,生根率达96.7%(图版I, 5)。试验表明,生根培养基中加入mg·L⁻¹ PG 80^[14]有助于根的形成和发育。利用1/2MS培养基生根,植株叶片容易黄化、茎尖易坏死。GF677生根试管苗在

表1 不同初代培养基对GF677茎尖簇生芽诱导的影响

Table 1 Effects of different primary medium on fascicular bud induction of GF677 stem tip

基本培养基 Basal medium	6-BA /(mg·L ⁻¹)	NAA /(mg·L ⁻¹)	GA ₃ /(mg·L ⁻¹)	接种外植体数 No. of explants	萌芽的外植体数 No. of explants with budding	外植体萌芽率 Budding of explant/%	外植体萌发的簇生芽数 No. of fascicular buds
1#	1.0	0.01	0.1	30	6	20	2~4
2#	1.0	0.01	0.1	30	5	17	2~5
3#	1.0	0.01	0.1	30	12	40	3~6
4#	1.0	0.01	0.1	30	16	53	3~6
5#	1.0	0.01	0.1	30	25	84	3~8
6#	1.0	0.01	0.1	30	17	59	3~5

表2 GF677在不同继代培养基和同一液体培养基上的增殖倍数、拉长效果

Table 2 Multiplication and elongation of GF677 in the different subculture medium and the same liquid medium

基本培养基 Basal medium	6-BA /(mg·L ⁻¹)	NAA /(mg·L ⁻¹)	外植体切段数 Cutting No. of explants	10 d后底部/ 顶部簇生芽 No. fascicular buds with the bottom and top axilla after 10 d	3周后簇生芽 No. fascicular buds with the bottom and top axilla after 3 weeks	3周后不定梢高度 Height of the adventitious shoots after 3 weeks/cm	液体培养基10 d 不定梢高度 Height of the adventitious shoots in the liquid medium after 10 d/cm
1#	0.8	0.01	30	1~2/0,致病 Etiolation	褐化,死亡 Brown, dying	—	—
2#	0.8	0.01	30	1~2/0,致病 Etiolation	褐化,死亡 Brown, dying	—	—
3#	0.8	0.01	30	1~3/1	2~4/1	0.8±0.3	1.2±0.3
4#	0.8	0.01	30	2~3/1	2~4/1	0.8±0.5	1.5±0.3
5#	0.8	0.01	30	2~5/1~2	4~7/1~2	1.5±0.5	2.0±0.5
6#	0.8	0.01	30	2~4/1	2~5/1	1.2±0.3	1.8±0.3

表 3 GF677 在不同培养基中生根培养 10 d 后的效果

Table 3 Effects of different medium on rooting induction of GF677 after 10 days

基本培养基 Basal medium	IBA /(mg·L ⁻¹)	NAA /(mg·L ⁻¹)	PG /(mg·L ⁻¹)	活性炭 CA/(mg·L ⁻¹)	生根 10 d 后 Rooting after 10 days		
					叶色 Leaf color	根数量 No. of root	根长度 Length of root/cm
1# (1/2 Macro-elements)	1.0	0.05	—	50	致病 Etiolation	1~2	0.1~0.2
1# (1/2 Macro-elements)	1.0	0.05	80	50	致病 Etiolation	2~4	0.1~0.3
5#	1.0	0.05	—	50	绿色 Green	2~6	0.2~0.4
5#	1.0	0.05	80	50	绿色 Green	3~8	0.2~0.5

根长度 0.2~0.5 cm 时移栽成活率相对最高。因为根系太长容易折断、损伤,需长时间恢复;根系太短,适应时间长。

移栽 2 周后,幼苗开始发出新根,然后长出新叶。随幼苗生长而逐渐增施一定浓度的复合肥营养液。及时移去死掉的幼苗并补上规格一致的幼苗。5 周时温室移栽成活率达 85% 左右,幼苗根系发达,有 5~8 片新展叶(图版 I, 6、7),此时可以移栽到苗圃。加强苗圃病害防治和水肥管理,3 个半月幼苗可以长到 40~50 cm,成活率 95% 以上(图版 I, 8)。

3 讨论

本实验中采用水培法促生的嫩梢作为试材,降低了外源病菌的浸染几率,利于消毒灭菌。基本培养基对 GF677 的诱导、继代增殖有重要影响,特别是一些培养基的大量元素含量对其影响很大。采用改良后的培养基,可能降低了一些不必要的营养元素,同时使各营养元素的比例更为合理,以利于生长。由于生根苗上的培养基极容易被污染,影响移栽成活;生根试管苗的生长环境在 pH 值和温湿度过高或过低环境下也容易死亡。移栽时需先将生根试管苗上的培养基洗净后,及时移栽到有机质丰富、pH 5.6 左右营养土的穴盘中进行育苗。移栽后及

时转入温室小拱棚中,保湿、控温^[15],1 周后逐渐改变温湿度,使其逐渐适应环境,提高成活率。另外,由于营养土中含有一些病菌,容易导致幼苗发生病害,因此移栽后第二天喷施一次 800 倍的 70% 多菌灵或代森锰锌,以后根据情况喷施 1~2 次,病害发生降低了 80% 左右。

虽然国外组培快繁 GF677 桃砧木技术体系较为成熟,并广泛应用于多种土壤类型的桃树果园,产生了巨大的社会、经济和生态效益,但是关于该项组培快繁技术体系国外较为保密,不易引进。国内也没有任何关于 GF677 离体快繁技术的研究报道。在本试验中,通过水培法促生嫩梢,减少了外植体的污染;通过茎尖诱发簇生芽,再利用不定梢的短茎切段继代增殖培养;液体培养基拉长培养,生根、移栽。操作方便,重复性好,成苗率高,遗传性状稳定,繁育时间大大缩短,极大地降低了生产技术成本,为工厂化繁育 GF677 奠定了技术基础。同时,该项技术的成功研究,能为其他核果类果树砧木的离体快繁提供良好的借鉴,同时为我国现代农业产业技术体系建设(桃)、国家公益性行业(农业)科研专项项目(桃)的顺利开展有重要的促进作用,为中国桃产区大面积应用推广这一优良砧木提供了可靠的技术保证。

参考文献:

- [1] GIORGI M, CAPOCASA F, SCALZO J, MURRI G, BATTINO M, MEZZETTI B. The rootstock effects on plant adaptability, production, fruit quality, and nutrition in the peach (cv. 'Suncrest')[J]. *Scientia Horticulturae*, 2005, 107(12): 36-42.
- [2] ZHAO J B(赵剑波), JIANG Q(江全), GUO J H(郭继华). Research advances in peach stock 'GF677'[J]. *Hebei Fruits*(河北果树), 2006, (2): 1-2, 6(in Chinese).
- [3] GENTLE A, MONTICEUL S, DAMIANO C. Adventitious shoot regeneration on peach [*Prunus persica* (L.) Batsch][J]. *Plant Cell Rep.*, 2002, 20(11): 1 011-1 016.
- [4] LIU H K(刘航空), HAN M Y(韩明玉), YU T(禹婷). Factors affecting embryonic callus from leaves of early season nectarine cultivars [J]. *Journal of Fruits Science*(果树学报), 2006, 23(3): 370-374(in Chinese).
- [5] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiol. Plant.*, 1962, 15: 473-497.

- [6] DRIVER J A, KUNIYUKOI A H. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock[J]. *Hort Science*, 1984, **19**(4):507-509.
- [7] LLOYD G, McCOWN B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture[J]. *Int. Plant Prop. Soc. Proc.*, 1980, **30**:421-427.
- [8] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京:高等教育出版社, 1986:303-310.
- [9] QUOIRIN M, LEPOIVRE P. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* spp. [J]. *Acta Horti.*, 1977, **78**(6):437-442.
- [10] RUGINI E. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos[J]. *Scientia Horticulturae*, 1984, **24**:123-134.
- [11] TEWARY P K, OKA S. Simplified clonal multiplication of mulberry using liquid shake culture[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, **3**(4):223-226.
- [12] CAO D H, KRYSZYNA J, FRASER T. Liquid culture for efficient micropropagation of *Wasabia Japonica* (MIQ.) matsumura[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2006, **42**(6):548-552.
- [13] VAEZ-LIVARI B, SALEHI-SOGHADI Z. *In vitro* rooting of hybrid GF677 (*Prunus dulcis* × *Prunus persica*) [J]. *Acta Horti.*, 2006, **726**(10):171-178.
- [14] DUCHEFA B B V. Biochemicals plant cell and tissue culture[J]. *Catalogue*, 2003-2005:136.
- [15] BATTISTINI A, DE P G. Large scale micropropagation of several peach rootstocks[J]. *Acta Horti.*, 2002, **592**(11):29-33.



图版 I 1. 不同培养基的初代诱导培养(从左到右为:1#~6#); 2. GF677 茎尖外植体在 6#(左图)和 5#(右图) 诱导培养基上培养 4 周后产生的簇生芽; 3. 不定梢在 5# 继代培养 3 周(左图)和 4 周(右图); 4. 不定梢在液体培养基条件下拉长培养 10 d; 5. 生根培养 10 d; 6, 7. 幼苗温室移栽 5 周时的根系和叶片; 8. 温室幼苗移栽在苗圃 3 个半月。

Plate I Fig. 1. Induction culture in different primary media(from left to right: 1#~6#); Fig. 2. Fascicular buds formation from GF677 stem tip explants cultured with 6#(left) and 5#(right) for 4 weeks; Fig. 3. Subculture of adventitious shoots with 5# for 3 weeks(left) and 4 weeks(right); Fig. 4. Adventitious shoots culture with liquid medium for 10 days; Fig. 5. Rooting of plantlet for 10 days; Fig. 6, Fig. 7. The roots and leaves of plantlet after transplanted into greenhouse for 5 weeks; Fig. 8. Young plants from the greenhouse transplant into the nursery for three months and half a month.