

油桃组织培养及再生材料的原生体制备研究^①

韩沙沙, 张凌媛, 何 桥, 周明佳, 季俊华,
王 佳, 李晓林, 梁国鲁, 郭启高

西南大学 园艺园林学院, 重庆 400715

摘要: 以油桃茎段为试验材料进行组织培养, 诱导不定芽的增殖和进行愈伤组织诱导, 获得茎段、叶片、愈伤组织等大量无菌材料, 给原生质体制备及后续细胞融合工作提供了可重复性的试验材料. 初始培养的最适培养基为: MS+1.5 mg/L BA+0.1 mg/L IBA, 诱导率达 82.9%; 诱导不定芽增殖的最适培养基配方为 MS+1.5 mg/L BA+0.2 mg/L IBA; 诱导愈伤组织的最佳培养基配方为 MS+1.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L NAA+0.3 mg/L BA. 原生质体制备以嫩叶为分离原生质体的最佳材料, 而最佳的分离酶组合为纤维素酶 1%+果胶酶 2%, 在此条件下, 原生质体的产量和活性分别为 9.2×10^7 个/g 和 80.4%.

关 键 词: 油桃; 组织培养; 原生质体

中图分类号: S662.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)05-0023-08

桃属于蔷薇科(Rosaceae)桃属(*Prunus* L.)植物, 已有 4000 余年的栽培历史^[1], 其基因组特性对果树和林木遗传研究具有重要作用^[2]. 由于其染色体数目少($2n=2x=16$), 自交育性高, 单基因控制的质量性状多, 幼年期相对较短, 现有品种中基因间的加性效应小, 是果树遗传学和分子生物学的理想材料, 也是鉴定和分离核果果树重要农艺性状基因和果树基因组研究的模式植物^[3-6]. 此外, 在蔷薇科中存在染色体基数为 7, 8, 9 和 17 等多种亚科, 而不同亚科之间有可能通过杂交产生出原始的苹果亚科的染色体基数 $x=17$ 的植物^[7], 且这种假设得到不少学者认可^[8]. 因此, 桃在苹果亚科染色体基数起源演化研究中也具有重要意义.

油桃是桃的一个变种, 其营养既丰富又均衡, 是人体保健比较理想的果品, 具有广阔的市场前景^[9]. 但我国的油桃生产起步较晚, 早期的品种多引自欧美, 味道较酸, 在产业化生产中受到较大的影响, 进行油桃的新品种选育是一个亟待解决的问题. 多倍体具有提高营养元素含量、改善品质、提高抗性等特性, 因此, 倍性育种是果树品种改良的主要途径之一^[10]. 目前, 已有油桃自然多倍体突变体的选育研究报道^[11], 但植物多倍体自然筛选的频率较低, 且如果获得的群体小也难以获得商品性状优良的单株; 而传统的不同倍性间杂交育种的方式需较长的年限; 此外, 化学诱导的方式则会产生较多的嵌合体, 难以进行纯化和稳定, 且耗费较大的人力物力. 利用细胞融合的方式可从本质上减少嵌合体等干扰, 大大缩短育种年限^[12]; 此外, 细胞融合所获得的产物还是极佳的遗传学研究对象, 这对于遗传理论研究和育种实践均有重要的价值^[13-15].

油桃细胞融合培养研究在国内外尚未见报道, 现仅有关于桃组织培养及原生质体培养的报道^[16-18]. 因此, 本试验为了给原生质体制备及后续细胞融合工作提供叶片、嫩芽、茎段及愈伤组织等大量的无菌

① 收稿日期: 2014-08-21

基金项目: 教育部博士学科点专项科研项目(20050625011).

作者简介: 韩沙沙(1989-), 女, 河南开封人, 硕士研究生, 主要从事果树多倍体育性相关研究.

通信作者: 郭启高, 副研究员.

材料,对油桃茎段进行了组织培养的研究,并在此基础上进行原生质体提取以及活力测定的研究,为后续细胞融合提供理论依据,并最终为油桃种质资源创新和苹果科染色体基数起源等遗传演化的进一步研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

组织培养研究以油桃带芽茎段为试材,取自西南大学校园内.原生质体制备试验以通过组织培养获得的油桃无菌苗的叶片、茎段、愈伤组织为材料.

1.2 方法

1.2.1 初代培养基的筛选

选取生长健壮、无病虫害,当年或上一年生直径为 0.3~0.5 cm 的半木质化油桃带芽枝条为试材.将野外采回的枝条,用 0.1% 的洗涤剂浸泡 15 min 以清除表面污垢,经自来水反复漂洗干净,修剪成长 15~20 cm 左右的枝段.在无菌条件下,将芽段用 75% 乙醇表面消毒 30 s 后,用 0.1% 的升汞消毒 10 min,再用无菌水冲洗 4~6 次,在无菌条件下修剪成 1~2 cm 带芽茎段,接种在初代培养基上.

初代培养以 MS 为基本培养基,添加不同质量浓度组合的 BA, IAA, IBA, 培养基组合见表 1. 培养温度为 25 ± 2 °C, 光/暗周期是 16/8 h, 光照强度 2 000~2 500 Lx., 每个处理接种 10 个, 重复 3 次. 30 d 时观察统计诱导率、增殖数和有效芽的长度.

1.2.2 不定芽的增殖

将初代培养获得的 1~2 cm 的幼茎切成 0.5~1.0 cm 的带芽小段, 分别接种在如表 2 的继代培养基上, 每个处理接种 10 个, 重复 3 次, 在培养 30 d 后, 观察并统计其增殖情况, 筛选出最适的继代培养基.

1.2.3 愈伤组织的诱导与继代

将无菌苗的叶片、茎段、去皮茎段及嫩芽转到诱导愈伤的培养基上进行培养, 叶片切成 0.5 cm 大小, 茎段切取 1 cm 左右大小, 将部分茎段在无菌条件下去皮. 采用正交设计不同的培养基激素组合(表 1), 每个处理接种 10 个, 重复 3 次. 置于 26 °C 连续黑暗条件下培养. 30 d 后统计愈伤组织诱导率.

1.2.4 油桃原生质体的制备

1.2.4.1 不同材料对原生质体分离的影响

分别取油桃组培苗完全展开的幼嫩叶片、茎段、愈伤组织各 0.2 g, 在超净台内用镊子将叶片切成约 1 mm 宽的细条, 茎段切成小段, 愈伤组织切成 0.5×0.5 cm 的小块, 分别放置于盛有不同组成的混合酶液的培养皿中. 于恒温摇床(50 r/min, 26 °C)上, 遮光酶解 8~10 h, 之后用 300 目不锈钢丝网过滤酶液以除去组织碎片. 滤液在 800 r/min 条件下离心 5 min, 收集沉淀并用 0.7 mol/L 的甘露醇溶液洗涤, 在 600 r/min 下离心 4 min, 重复 2 次. 最后将原生质体重新悬浮于甘露醇溶液中, 从制备的原生质体悬浮液中取样, 用血球计数板统计原生质体的数目, 计算原生质体的产量与存活率.

1.2.4.2 不同酶液组合对原生质体分离的影响

将纤维素酶、果胶酶以不同的浓度溶解于 0.5~1 mol/L 的甘露醇溶液中(表 6), pH 值为 5.4~5.8. 溶解后的酶液先在 10000 r/min 的转速下离心 20 min, 而后将上清液通过装有 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜的无菌过滤器, 得到无菌酶液贮存于 4 °C 冰箱中备用. 此后将 1.2.4.1 中最佳的原生质体分离材料用上述不同酶液组合进行处理, 统计分析不同组合对分离的影响.

1.2.4.3 原生质体存活率测定

取一滴原生质体悬浮液于载玻片上, 滴加一滴 0.025% 伊文思蓝染色液于悬液中, 即盖上盖玻片, 显微镜下观察, 被染成蓝色的即为受损原生质体, 活原生质体不着色, 每个样品观察 3 个视野, 计算原生质体活力.

$$\text{原生质体存活率} = \frac{\text{未染成蓝色的原生质体数}}{\text{观察的原生质体总数}} \times 100\%$$

1.2.4.4 原生质体产量的测定

将收集到的原生质体悬浮液取出 1 mL, 稀释 5 倍后, 滴加在血球计数板上, 计算四角及中央大格(共 5 个大格)内的原生质体数, 然后按下式计算原生质体数, 每个样品重复 3 次取平均值.

原生质体密度(个 /mL) = (5 个大格内原生质体总数 /5) × 10⁴ × 稀释倍数

原生质体产量(个 /g) = $\frac{\text{存活的原生质体数密度(个 /mL)} \times \text{所得原生质体悬液的总体积 mL}}{\text{制备原生质体所用材料的鲜质量 /g}}$

1.3 试验结果观察及数据统计方法

外植体诱导率 = $\frac{\text{萌发或茎段膨大的外植体数}}{\text{成活的外植体数}} \times 100\%$

增殖系数 = $\frac{\text{分化产生的总芽数}}{\text{分化出芽的外植体数}}$

愈伤组织的诱导率 = $\frac{\text{产生愈伤组织的外植体数}}{\text{接种外植体数}} \times 100\%$

采用 SPSS 统计分析软件对上述试验结果所得数据进行统计分析.

2 结果与分析

2.1 初代培养基激素配对外植体出芽的影响

将消毒后的油桃带芽茎段接种于不同处理的初代培养基上, 接种一周后芽逐渐膨大, 茎段基部转变为灰白色, 原有的腋芽在大约 15 d 逐渐展开幼叶(图 1-1), 并有部分茎段能从基部再生不定芽(图 1-2). 由表 1 可知, 不同的激素组合对初代培养的出芽率和增殖系数有极大的影响, 对其进行方差分析发现, 有无外源激素及外源激素的配比对诱导率和增殖系数的影响显著. 不加任何激素时, 油桃外植体虽然可以分化膨大, 但是其增殖系数很低. 可见激素是诱导芽的关键物质, 内源激素可以提供营养供外植体膨大分化, 但其进一步生长所需养分仍需添加外源激素.

表 1 不同培养基对出芽的影响及显著性检验

培养基组合/(mg · L ⁻¹)	出芽个数	诱导率平均值	显著性检验	增殖系数平均值	显著性检验
MS	8	34.0	g	0.9	k
MS+BA1.0+IAA0.05	0	0.0	k	0.0	l
MS+BA1.0+IAA0.1	10	29.7	i	1.2	i
MS+BA1.0+IBA0.05	22	49.3	e	2.1	f
MS+BA1.0+IBA0.1	25	54.2	d	1.8	g
MS+BA1.5+IAA0.05	28	73.3	c	2.6	d
MS+BA1.5+IAA0.1	20	55.1	d	3.4	c
MS+BA1.5+IBA0.05	30	79.0	b	3.9	b
MS+BA1.5+IBA0.1	30	82.9	a	4.7	a
MS+BA2.0+IAA0.05	2	20.1	j	0.5	j
MS+BA2.0+IAA0.1	18	37.7	f	1.4	h
MS+BA2.0+IBA0.05	13	30.4	h	2.3	e
MS+BA2.0+IBA0.1	18	48.5	e	2.5	d

注: 不同小写英文字母表示差异达到显著水平($p<0.05$), 下同.

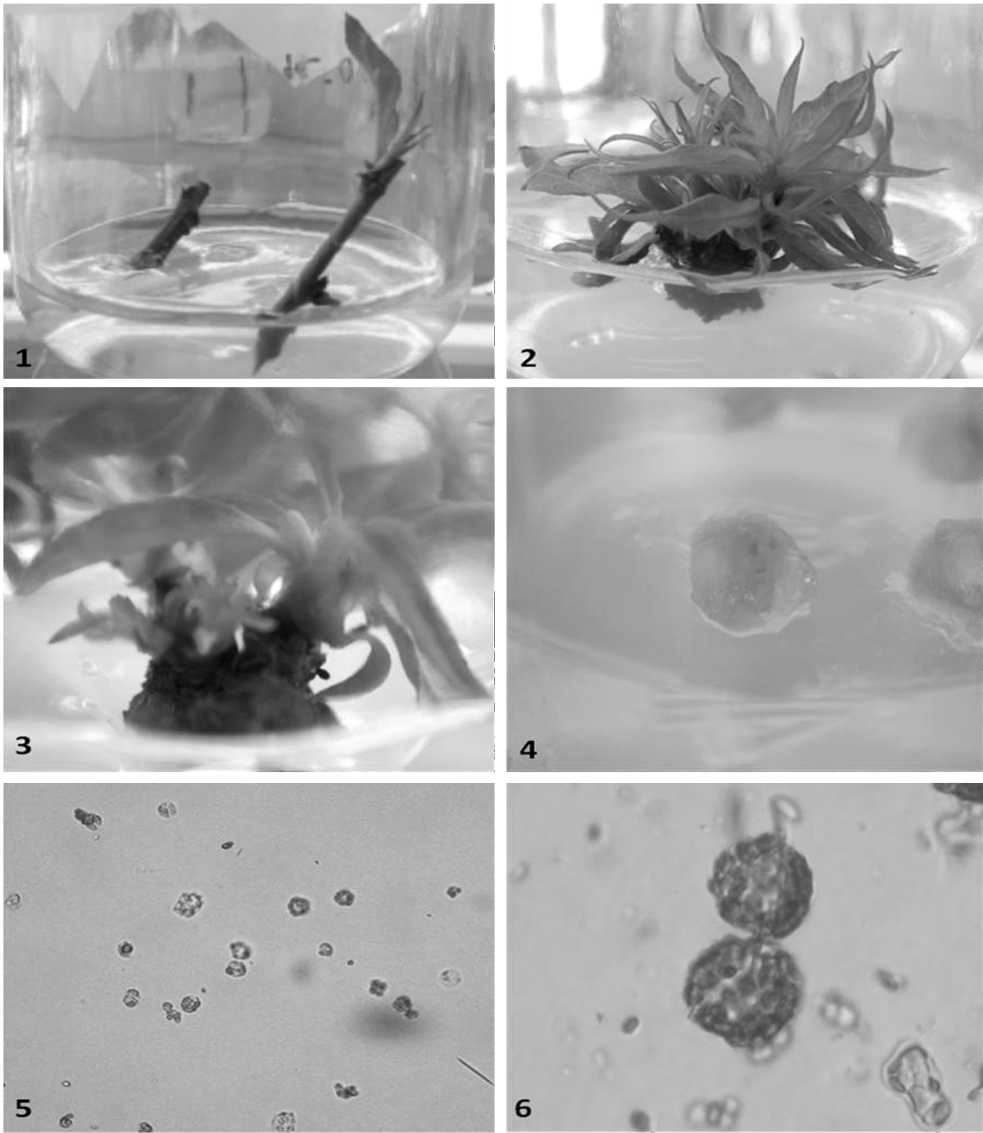
此外, 当 BA 质量浓度为 1.5 mg/L 时, 外植体的长势最好, 其他的浓度梯度虽也能分化生长, 但存在芽生长势差、出芽数少或增殖系数低等现象. 以 BA 质量浓度为 1.5 mg/L, 来筛选其他激素的最适浓度, 发现 IBA 对芽诱导的效果好, 且出芽数、诱导率、增殖系数值普遍比 IAA 的高. 且 BA 质量浓度相同时, 随着 IBA 质量浓度的增加, 观察数据均呈增长趋势. 综合出芽数、诱导率和增殖系数, IBA 质量浓度为 0.1 mg/L 时三者达到最大值, 且芽生长健壮. 由此笔者认为油桃初代培养的最适培养基为: MS+BA1.5 mg/L+IBA0.1 mg/L.

2.2 继代培养基的激素配比对不定芽增殖的影响

将诱导形成的芽, 接种到含有不同激素组合的 MS 培养基上, 不定芽可在 7~10 d 开始萌动, 且增殖系数在 1~5 之间.

表 2 不同培养基对芽增殖的影响及显著性检验

培养基成分/ (mg · L ⁻¹)	分化总芽数/ 个	增殖系数 平均值	显著性 检验	丛芽生长情况
MS+BA1.0+IBA0.1	24	2.6	f	芽少
MS+BA1.0+IBA0.2	20	3.2	d	芽少但壮
MS+BA1.0+IBA0.4	23	1.8	g	芽少、徒长
MS+BA1.5+IBA0.1	28	3.9	b	芽多、矮小
MS+BA1.5+IBA0.2	29	4.7	a	芽多且壮
MS+BA1.5+IBA0.4	28	4.8	a	芽多、徒长
MS+BA2.0+IBA0.1	29	3.5	c	芽矮小细弱
MS+BA2.0+IBA0.2	22	2.9	e	芽少但壮
MS+BA2.0+IBA0.4	27	3.7	b	芽多细弱



1. 油桃茎段腋芽诱导; 2. 初代培养基上的再生不定芽; 3. 增殖培养; 4. 愈伤组织; 5. 分离获得的完整及破碎的原生质体(20×); 6. 完整的原生质体(40×).

图 1 油桃组织培养和原生质体制备

由表 2 可知, 通过对增殖系数方差分析发现, 不同激素组合培养基的增殖系数有显著差异. 且当 BA 质量浓度恒定时, IBA 对油桃分化数和增殖系数的影响没有明显的变化规律, 但从芽的生长状况来看, 当 IBA 质量浓度为 0.1 mg/L 时芽矮小, 而质量浓度为 0.4 mg/L 时则徒长纤细, 当质量浓度为 0.2 mg/L 时芽生长健壮, 芽高介于二者之间. 此外, 当以 1.5 mg/L BA+0.4 mg/L IBA 组合时, 增殖系数达到最高值为 4.8, 增殖的芽多呈丛生状, 但长出的苗徒长纤细. 而 1.5 mg/L BA+0.2 mg/L IBA 的组合, 增殖系数为 4.7, 与 IBA 质量浓度为 0.4 mg/L 时的增殖系数差异不显著, 且芽粗壮, 生长好, 叶片深绿, 高度适中(图 1-3). 因此, 我们认为诱导不定芽增殖的最适激素组合为 1.5 mg/L BA+0.2 mg/L IBA.

2.3 愈伤组织的诱导

2.3.1 不同材料愈伤组织的诱导效果

本试验中, 分别用茎段、幼芽、去皮茎段及叶片进行愈伤组织的诱导, 其结果如表 3 所示. 研究结果发现, 不同的材料诱导愈伤组织的差异显著, 其中, 幼芽为诱导愈伤组织的供试材料中的最佳材料, 其诱导率平均值为 65.8%. 去皮茎段和茎段的诱导率稍低为 59.2%和 50.0%, 诱导率最低的是叶片, 平均为 27.5%. 试验也表明, 以幼芽为材料在不同培养基配方中的愈伤诱导率都较高(表 4), 且幼芽中诱导率最高的培养基配方为 1.5 mg/L 2, 4-D+1.0 mg/L NAA, 达到 86.7%. 同时幼芽出愈时间短, 愈伤组织增殖的速度快, 愈伤颜色较浅, 呈浅黄绿色, 质地较为疏松, 具有极好的分化能力(图 1-4). 而叶片与茎段的增殖速度慢, 形成的愈伤颜色较深, 呈球状或颗粒状, 质地较硬.

2.3.2 不同激素对比对愈伤组织诱导的影响

不同激素种类对愈伤组织的诱导效果差异较大. 如图 2 所示, 2, 4-D 质量浓度为 1.5 mg/L 时, 油桃诱导愈伤的诱导率最高, 为 71.6%. 当 2, 4-D 质量浓度为 0 时, 诱导率最低仅为 19.2%. 各质量浓度间诱导率差异显著, 且随着其质量浓度的升高, 诱导愈伤的诱导率也逐渐增加. NAA 各质量浓度对油桃愈伤组织的诱导率的影响不大, 当质量浓度为 1.5 mg/L 时诱导率最高为 55.9%, 其他各质量浓度之间的差异不大且呈逐渐升高的趋势. 但试验中发现, 随着 NAA 浓度的升高, 其愈伤组织的颜色较深, 质地硬, 质量较差. NAA 浓度为 0.5 mg/L 时, 愈伤组织的诱导率和生长状况的综合情况都较好. 而 BA 各质量浓度的诱导率差异也不大, 最大的是当 BA 质量浓度为 0.8 mg/L 时的诱导率, 为 51.7%, 由此可见, 在各激素种类中, 2, 4-D 的质量浓度对愈伤组织诱导率的影响最大, 而油桃诱导愈伤组织的最佳培养基配方为 MS+1.5 mg/L 2, 4-D+0.5 mg/L NAA+0.8 mg/L BA.

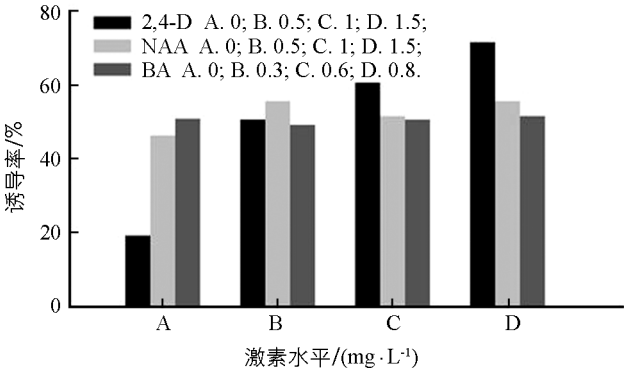


图 2 不同激素对诱导率的影响

表 3 不同材料的愈伤组织诱导

材料类型	诱导率均值	显著性检验	出愈平均时间/d	显著性检验	愈伤增殖速度	愈伤组织特性
茎段	50.0	c	14.5	c	慢	深绿、颗粒状、硬
幼芽	65.8	a	14.8	c	快	浅黄绿、较疏松
去皮茎段	59.2	b	21.3	b	较快	绿色、疏松
叶片	27.5	d	26.8	a	慢	深绿、球状

表 4 不同处理对愈伤组织的诱导的影响

培养材料	培养基成分/ (mg·L ⁻¹)	出愈总数/ 个	出愈时间/ h	平均诱导率	显著性检验
茎段	MS+2, 4D0.0+NAA0.5+BA0.3	4	20	13.3	g
茎段	MS+2, 4D0.5+NAA0.0+BA0.0	15	17	43.3	e
茎段	MS+2, 4D1.0+NAA1.0+BA0.6	20	25	66.7	d

续表 4

培养材料	培养基成分/	出愈总数/ 出愈时间/		平均诱导率	显著性检验
	(mg · L ⁻¹)	个	h		
茎段	MS+2, 4D1.5+NAA1.5+BA0.8	23	22	76.7	bc
幼芽	MS+2, 4D0.0+NAA0.0+BA0.6	9	15	30.0	f
幼芽	MS+2, 4D0.5+NAA0.5+BA0.8	21	19	70.0	cd
幼芽	MS+2, 4D1.0+NAA1.5+BA0.3	23	10	76.7	bc
幼芽	MS+2, 4D1.5+NAA1.0+BA0.0	26	16	86.7	a
去皮茎段	MS+2, 4D0.0+NAA1.0+BA0.8	8	27	26.7	f
去皮茎段	MS+2, 4D0.5+NAA1.5+BA0.6	19	18	63.3	d
去皮茎段	MS+2, 4D1.0+NAA0.5+BA0.0	20	20	66.7	d
去皮茎段	MS+2, 4D1.5+NAA0.0+BA0.3	24	20	80.0	ab
叶片	MS+2, 4D0.0+NAA1.5+BA0.0	2	28	6.7	g
叶片	MS+2, 4D0.5+NAA1.0+BA0.3	8	23	26.7	f
叶片	MS+2, 4D1.0+NAA0.0+BA0.8	10	27	33.3	f
叶片	MS+2, 4D1.5+NAA0.5+BA0.6	13	29	43.3	e

2.4 原生质体分离

2.4.1 不同材料对原生质体分离的影响

由于分离材料的不同,经酶解后游离原生质体的产量、活性及达到最高产量的时间差异显著(表 5).从叶片游离原生质体的产量显著高于茎尖、愈伤组织来源的原生质体,为 5.7×10^7 个/g,茎尖为材料的产量最低,仅为 9.2×10^6 个/g.活性也是以嫩叶分离所得的原生质体最高,为 82.2%,其他两种材料的活性差异不显著.从达最高产量时间来看,茎尖所需时间最长,嫩叶和愈伤组织所需时间差异不大.综合产量、活性和达到最高产量的时间 3 个指标来衡量,嫩叶为分离原生质体的最佳材料.

表 5 不同材料对原生质体分离的影响

分离材料	产量/(个 · g ⁻¹)	显著性检验	活性/%	显著性检验	达到最高产量时间/h
嫩叶	5.7×10^7	a	82.2	a	10
茎尖	9.2×10^6	c	69.5	b	14
愈伤组织	4.2×10^7	b	72.1	b	9

2.4.2 不同酶液组合对原生质体分离的影响

以油桃的无菌嫩叶为材料,用不同酶液组合的混合酶液将其在遮光条件下酶解 10 h.结果如表 6 所示,不同酶液组合处理原生质体的产量和活性差异显著.最高产量为 4 号处理,为 9.8×10^7 个/g,但其活性较低仅为 69.9%.而 3 号处理的产量和 4 号差异不显著为 9.2×10^7 个/g,且活性值较高,为 80.4%.因此,用于油桃原生质体分离的最佳酶的组合为纤维素酶 1%+果胶酶 2%(图 1-5,6).

表 6 不同酶液组合对油桃原生质体分离的影响

酶液组合 (纤维素酶%+果胶酶%)	产量/ (个 · g ⁻¹)	显著性检验	活性/ %	显著性检验
1.0+1.0	4.9×10^7	c	82.2	a
1.0+1.5	5.2×10^7	c	52.1	c
1.0+2.0	9.2×10^7	a	80.4	a
2.0+1.0	9.8×10^7	a	69.9	b
2.0+1.5	8.5×10^7	b	54.7	c
2.0+2.0	3.4×10^7	d	42.1	d

3 结 论

研究表明,油桃诱导芽的最适培养基为 MS+1.5 mg/L BA+0.1 mg/L IBA.其诱导率平均值 82.9%.诱导不定芽增殖的最适培养基配方为 MS+1.5 mg/L BA+0.2 mg/L IBA 的组合,且芽生长健壮,叶片深绿.诱导愈伤组织的最佳材料为幼芽,其诱导率平均值为 65.8%,同时幼芽出愈时间短,愈伤组

组织增殖的速度快, 愈伤颜色较浅, 呈浅黄绿色, 质地较为疏松, 具有分化能力. 诱导愈伤组织的最佳培养基配方为 MS+1.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L NAA+0.8 mg/L BA.

嫩叶为分离原生质体的最佳材料, 而最佳的分离酶组合为纤维素酶 1%+果胶酶为 2%, 在此条件下, 产量、活性分别为 9.2×10^7 个/g 和 80.4%.

4 讨 论

植物细胞融合不依赖有性杂交重组基因, 扩展了遗传物质的重组范围, 对创造新种质有重要作用^[19], 同时也是用于植物育种和基础遗传理论分析的简便途径^[20]. 但是目前尚存在原生质体再生困难、杂种表现不稳定^[21]、杂种染色体丢失^[22]及杂种不育等问题, 且这些复杂的过程易受双亲的多种因素影响^[23], 因此, 如何保持双亲的稳定性, 进一步扩大原生质体培养材料的种类及基因型, 加强对原生质体再生植株无性系变异的细胞遗传学研究等, 是促进细胞融合在植物育种中取得突破性进展的关键. 本研究从进行油桃的组织培养着手, 能获得稳定一致的亲本材料, 这对后续的细胞融合研究具有重要意义; 此外, 后续通过对油桃与蔷薇科其他染色体基数的材料进行细胞融合的杂种进行研究, 能为蔷薇亚科染色体基数 $x=17$ 的起源与演化提供新的理论依据.

不同材料的愈伤组织诱导率有极大差异, 一些研究结果认为, 幼茎作为外植体对愈伤组织的诱导较容易而幼叶则较难^[24]. 本次试验通过对茎段、幼芽、去皮茎段、叶片等 4 种材料进行诱导比较, 也证实了在油桃中, 幼芽为诱导愈伤组织的最佳材料, 其出愈时间短, 愈伤组织增殖的速度快, 愈伤颜色较浅, 呈浅黄绿色, 质地较为疏松, 具有分化能力. 而去皮茎段和茎段的诱导率稍低, 而诱导率最低的是叶片, 其中叶片与茎段的增殖速度慢, 其原因可能是幼芽一直处于旺盛分裂状态的缘故.

原生质体游离的材料来源非常丰富. 迄今为止已从大田植株、温室植株和试管植株的各种器官、组织以及愈伤组织、悬浮细胞中分离出了原生质体^[25]. 原生质体的制备技术可用于多方面的理论研究, 但其最为主要的意义在于可以实现体细胞杂交在植物育种方面的应用, 并为后续细胞融合奠定基础以及利用其作为理想的受体系统进行各种遗传操作的研究.

本试验采用试管苗为对象, 在分离前不必灭菌处理, 且试管苗可以在人为控制条件下生长, 可提高试验的重复性. 从试验得出油桃叶片游离原生质体的产量显著高于茎尖、愈伤组织等来源的原生质体, 且活性高, 达到最高产量的时间较短. 同时从所获得的原生质体的一致性出发, 一般认为由叶肉组织分离的原生质的遗传性较为一致. 而以愈伤组织和悬浮培养物作为原生质体的优点是它们易承受酶的作用, 而且在分离处理后增殖性强. 但它们在遗传上常常是不稳定的, 由于受到培养条件和继代培养时间的影响, 细胞间常常会发生遗传和生理差异^[26]. 试管苗的茎尖具无菌、相对幼龄、保持大量的材料来源等特点, 而且由于它们处于一种分化状态保持了原来的基因型, 但试验发现其原生质体产率低下, 愈伤组织和茎尖都不是获得原生质体的理想材料. 因此, 本研究对于油桃种质创新研究及品种选育有极为重要的理论意义及实践价值.

参考文献:

- [1] FAUST M, TIMON B. Origin and Dissemination of Peach [J]. Hort Rev, 1995, 17: 331—379.
- [2] The International Peach Genome Initiative. The High-Quality Draft Genome of Peach (*Prunus persica*) Identifies Unique Patterns of Genetic Diversity, Domestication and Genome Evolution [J]. Nature Genetics, 2013, 45(5): 487—494.
- [3] 李扬汉. 植物学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1978.
- [4] DIRLEWANGER E, MOING A, PRONIER V, et al. Detection of QTLs Controlling Peach Fruit Acidity and Sweetness [C] //IV International Peach Symposium, 1997, 465: 89—98.
- [5] LU Z X, SOSINSKI B, REIGHARD G L, et al. Construction of a Genetic Linkage Map and Identification of AFLP Markers for Resistance to Root-Knot Nematodes in Peach Rootstocks [J]. Genome, 1998, 41(2): 199—207.
- [6] JOOBEUR T, VIRUEL M A, DE VICENTE M C, et al. Construction of a Saturated Linkage Map for Prunus Using an Almond× Peach F2 Progeny [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 97(7): 1034—1041.
- [7] SAX K. Chromosome Relationships in the Pomoideae [J]. In Journ Arnold Arbor, 1932(13): 363—367.
- [8] 林顺权. 试论枇杷属植物的起源与演化——来自苹果亚科出露化石和枇杷属野生种的地理分布的证据 [G] //中国园艺学会. 第四届全国枇杷学术研讨会论文集, 2009: 52—63.

- [9] 张谷雄. 我国油桃的育种历程和良种选用 [J]. 长江果树, 2003(1): 35—38.
- [10] 石庆华, 刘平, 刘孟军. 果树倍性育种研究进展 [J]. 园艺学报, 2012, 39(9): 1639—1654.
- [11] 王尚德, 王晓川, 刘佳琴, 等. 油桃三倍体种质的硬枝扦插技术研究 [J]. 北方园艺, 2013(23): 8—11.
- [12] 李培夫. 体细胞杂交技术在作物育种上的开发利用 [J]. 种子科技, 2005(4): 215—216.
- [13] RUSSELL S D. Isolation and Characterization of Sperm Cells in Flowering Plants [J]. Ann Rev Physiol Plant Mol Biol, 1991(42): 189—204.
- [14] 杨弘远, 周嫔. 被子植物离体受精与合子培养研究进展 [J]. 植物学报, 1998, 40(2): 95—101.
- [15] CASS DAVID D. An Ultrastructural and Nomarski-Interference Study of the Sperm of Barley [J]. Can J Bot, 2011, 51(3): 601—605.
- [16] 张永庆, 陈大明, 金勇丰, 等. 桃离体组织分化再生植株的研究 [J]. 园艺学报, 2001, 28(4): 342—344.
- [17] 马锋旺, 李嘉瑞. 山桃原生质体培养再生愈伤组织 [J]. 西北农业学报, 1999, 8(3): 73—76.
- [18] 甘霖, 邓秀新, 章文才. 桃原生质体培养再生愈伤组织 [J]. 植物生理学通讯, 1993, 29(3): 72—73.
- [19] 李春艳, 李妮亚, 陈少良. 植物原生质体培养与融合的研究进展 [J]. 海南师范学院学报: 自然科学版, 2005, 18(3): 264—268.
- [20] 刘玉鲲鹏, 刘东玉, 周安佩, 何承忠. 植物细胞融合及应用概述 [J]. 植物学研究, 2013(2): 99—105.
- [21] CLARKE J H L, CHÈVRE A M, LANDGREN M, et al. Characterization of Sexual Progenies of Male-Sterile Somatic Cybrids Between *Brassica napus* and *Brassica tournefortii* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 99(3—4): 605—610.
- [22] WANG M, PENG Z, WANG L, et al. Different Rates of Chromosome Elimination in Symmetric and Asymmetric Somatic Hybridization Between *Festuca arundinacea* and *Bupleurum scorzoniferifolium* [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2011, 58(1): 133—141.
- [23] EVANS D, SHARP W, FLICK C. Plant regeneration from cell cultures. Horticultural Reviews, 2011, 3: 214—314.
- [24] 陈振光. 园艺植物离体培养学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [25] 梅新, 易干军, 蔡礼鸿. 原生质体技术与果树育种 [J]. 长江果树, 2003(5): 31—36.
- [26] 金晓弟. 植物原生质体分离和培养中几个问题的探讨 [J]. 太原师范学院学报: 自然科学版, 2002, 1(2): 82—83, 94.

Study on Tissue Culture and Protoplast Preparation of Nectarine (*Prunus persica* var. Nectarine)

HAN Sha-sha, ZHANG Ling-yuan, HE Qiao, ZHOU Ming-jia,
JI Jun-hua, WANG Jia, LI Xiao-lin, LIANG Guo-lu, GUO Qi-gao

School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Nectarine stems were used as explants for tissue culture, and protoplasts from virus-free regenerated plantlets were obtained to be used in subsequent cell fusion. Stem explants were induced on MS medium added with different growth regulators to produce adventitious buds and calli. Large numbers of stems, leaves and calli were obtained and these could offer enough reproducible materials for protoplast preparation and cell fusion. The result indicated that the best medium for bud differentiation was MS+1.5 mg/L BA+0.1 mg/L IBA. A total of 30 buds were obtained on this medium, the average induction rate being 82.9%; the optimal medium for bud multiplication was MS+1.5 mg/L BA+0.2 mg/L IBA; and the optimal medium for callus induction was MS medium supplemented with 1.5 mg/L 2, 4-D+0.5 mg/L NAA+0.3 mg/L BA. Tender leaves were the most suitable materials for protoplast preparation, and the best mixed enzyme was 1% cellulose+2% pectinase. Under this condition, 9.2×10^7 protoplasts per gram material were obtained, and 80.4% protoplasts were viable.

Key words: nectarine; tissue culture; protoplast

责任编辑 欧 宾

