

# 梅雌蕊激光捕获显微切割体系 及微量RNA提取方法的建立

潘振朋, 侍 婷, SHAHID IQBAL, 高志红\*

(南京农业大学园艺学院, 南京 210000)

**摘 要:**【目的】建立一套利用激光捕获显微切割技术切取梅(*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)的雌蕊并提取微量RNA的技术体系。【方法】以梅品种‘大嵌蒂’和‘龙眼’的花芽和雌蕊为实验材料,制作石蜡切片,比较不同厚度条带的切割效果并选取最佳的条带厚度制作切片;以Leica LMD 7 000激光捕获显微切割系统为实验核心,比较不同激光强度的切割效果,选取切割效果最好的激光强度,分别切取2个梅品种的雌蕊,比较常温保存与液氮保存切割后样品所提取的RNA质量,最终建立适合于梅的激光捕获显微切割提取微量RNA的最佳体系。【结果】在石蜡切片制作过程中,改进了试验材料的贮藏条件(在4℃冰箱低温贮藏),即除渗蜡和制片之外,其他如脱水、透明等步骤都在4℃冰箱中进行,而后再切片制片。经过反复比较,成功确定石蜡切片的最佳条带厚度为10 μm,激光捕获显微切割效果最好的激光强度为30,并且明确切割后液氮保存的切割材料所提取RNA的RIN值比常温保存的高。【结论】改进了石蜡切片制作过程中某些步骤中材料的贮藏温度,确定了适合于梅花芽的切片厚度以及显微切割激光强度,建立了相对简单、稳定且重复性好的利用石蜡切片并联合激光捕获显微切割系统提取微量RNA的体系,为梅等木本植物开展微量RNA提取及后续分子试验的研究提供了基础依据。

**关键词:**梅;石蜡切片;激光捕获显微切割;条带厚度;激光强度

中图分类号:S662.4

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2020)10-1584-09

## Establishment of trace RNA extraction from pistils by the Laser Capture Microdissection in Japanese apricot

PAN Zhenpeng, SHI Ting, SHAHID IQBAL, GAO Zhihong\*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210000, Jiangsu, China)

**Abstract:** 【Objective】The purpose of the experiment is to establish a technology system that is suitable for the extraction of trace RNA by laser capture microdissection in Japanese apricot. The paraffin section was used as a carrier, and the sample material was separated with the help of the laser capture microdissection system, and then the cut tissue was used to extract trace RNA. The aim was to solve the problems that the pistil was too small to separate the tissues and the trace RNA was not easy to extract by general extraction method. 【Methods】Using the flower buds and pistils of Japanese apricot varieties ‘Daqiandi’ and ‘Longyan’ as experimental materials, the paraffin sections were made. The strips with different thicknesses of 6, 8, 10, 12 and 14 μm were set, and then the cutting effects of strips were compared with different thicknesses and the best strip thickness was selected to make slices. The Leica LMD 7000 laser capture microdissection system was used as the core of the experiment. Different laser intensities of 20, 30 and 40 were set up under the premise of determining the best strip thickness, and the cutting effect of different laser intensities on the slice was compared, the laser intensity with the best cutting effect was selected to cut the pistils, and then the quality of the RNA extracted from the material

收稿日期:2020-03-03

接受日期:2020-06-15

基金项目:国家自然科学基金(31772282、31971703)

作者简介:潘振朋,男,在读硕士研究生,研究方向:果树分子生物学。Tel:17714925544, E-mail:2017104013@njau.edu.cn

\*通信作者 Author for correspondence. Tel:13016938014, E-mail:gaozhihong@njau.edu.cn

was compared after either normal temperature or liquid nitrogen preservation. Finally, an optimal system for extracting trace RNA from paraffin sections and laser capture microdissection was established. **【Results】**Two varieties of full flower buds were selected to make paraffin sections. In the process of paraffin section production, the tested materials should be stored in a 4 °C refrigerator, except for the wax infiltration and slices making processes. Other steps, such as dehydration, transparency and so on were operated in the 4 °C refrigerator, before making slices. The section method of this experiment was longitudinal cutting. After repeated comparisons, the 10 μm, 12 μm, and 14 μm strips can be attached to the PEN membrane completely, which were not easy to break, and there was no gap between the strip and the membrane; However, 6 μm and 8 μm strips were easy to break when they were contacted with water, and they were not easy to stick; Slices with a thickness of 14 μm cannot be cut directly at one time; When the thickness of the slice was 12 μm, sometimes it can be cut off at one time, but sometimes the reverse was true; When the thickness of the slice was 10 μm, it can be cut off at one time; The optimal slice thickness of paraffin sections was determined to be 10 μm in this experiment. When the laser intensity was set to 20, it was not enough to cut off the material at one time; when the laser intensity was set to 30, the material can be cut off at one time, and the cutting edge had less loss to the tissue; When the laser intensity was set to 40, the material can be cut off at one time, but the cutting edge was more burnt than the laser intensity set at 30, which affected the integrity of the tissue; After comparison, the laser intensity was finally set to 30 in this experiment. The RIN value of the RNA extracted from the cutting material stored in liquid nitrogen was 4.1, and the RIN value of the RNA extracted from the cutting material stored at room temperature was 2.4, and the concentration of the former was much higher than that of the latter. And it was clear that the RIN value of the RNA extracted from the cutting material stored in liquid nitrogen was higher than that stored at room temperature. **【Conclusion】**This experiment improved the storage temperature of materials in certain steps during the paraffin section making process, and determined the slice thickness suitable for Japanese apricot buds and the laser intensity for laser capture microdissection. Therefore, a relatively simple, stable and reproducible system using paraffin sections with the laser capture microdissection to extract trace RNA was established, which could provide a basis for the study on trace RNA extraction and subsequent molecular experiments of woody plants like Japanese apricot. However, the experimental results of paraffin sections were not as good as frozen sections. Paraffin sections manufacture was more complicated and required longer cycles, and could not avoid the negative effects of organic solvents on RNA, so it should be studied further how to streamline the paraffin section production process and production cycle, to reduce the negative impact of organic solvents on RNA, and to apply the frozen section technology to plants in a complete manner without adversely affecting the plant materials, like the effect of frozen section on plant big vacuole.

**Key words:** Japanese apricot; Paraffin section; Laser capture microdissection; Strip thickness; Laser intensity

梅(*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)是原产于中国的蔷薇科李属多年生核果类果树,其果实营养丰富,具有很高的加工价值和保健价值,但是大多并不适合鲜食,主要用于果脯类食品的加工和果梅酒的浸泡等,是物美价廉的保健食品。近年有研究者发现,梅果实中含有可以抑制癌细胞增殖的成分B-1<sup>[1]</sup>。生产中发现,梅花经常出现雌蕊发育异常的现象,从

而造成果梅产量偏低,严重制约了果梅产业化发展。

植物的花是形成果实的基础,梅生长发育过程中不完全花的出现使花不能完成受精,所以不能形成果实,是造成梅果实产量严重降低的原因之一。梅不完全花的形式主要表现为花器官中雌蕊萎缩、缺失,或者子房枯萎、瘦小,花柱褐化或短

缩弯曲<sup>[2]</sup>。在生理水平上,有学者对梅雌蕊发育及其影响因素进行了初步的探究,结果表明,在南京地区,10月上旬是梅雌蕊心皮原基分化的高峰期,是雌蕊发育调控的关键时期<sup>[3-4]</sup>;梅雌蕊形成过程中的蛋白质、碳水化合物、赤霉素和钙调素水平均能影响雌蕊的正常发育<sup>[5-6]</sup>。在分子水平上,有关于梅雌蕊发育的研究也取得了一些进展,王珊<sup>[7]</sup>在果梅的完全花与不完全花中鉴定出4个和蛋白质、糖代谢、淀粉代谢以及光合作用有关的差异表达蛋白;王万许<sup>[8]</sup>探究了 *PmTCP4* 基因在雌蕊发育中的作用,结果表明 *PmTCP4* 基因在褐化雌蕊中的表达量高于正常雌蕊;李艳林<sup>[9]</sup>对梅生长素响应因子 *PmARF13* 和 *PmARF17* 进行克隆并对其功能进行分析发现, *PmARF13* 基因在梅花生长发育过程中可能通过调控雄蕊 IAA 水平影响梅的雌蕊发育,通过负调控 GA<sub>3</sub> 含量影响花瓣的生长发育,进而影响梅的花发育进程, *PmARF17* 基因可能通过负向调控雌蕊、雄蕊及花瓣中 ABA 的含量来影响梅的花发育及雌蕊败育进程, *PmARF17* 基因可能通过正向调控雌蕊、雄蕊、萼片中 ZT 含量来影响梅的花发育。

激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)是在不破坏试验材料组织结构,保存要捕获的细胞和其周围组织形态完整的前提下,直接从冰冻或石蜡包埋组织切片中获取目标组织或细胞。激光捕获显微切割技术与现代分子生物学技术相结合,可以研究植物发育过程中特定组织或细胞中发生的分子和生化过程<sup>[10]</sup>,尤其是当研究的目标组织或细胞不易分辨和难以获取、分布散、不规则时,激光捕获显微切割技术的准确性就具有显著的优势。当前,LCM 技术已经较广泛地应用在动物学及医学领域,但是在植物学上的研究应用时间不长,Asano 等<sup>[11]</sup>首次应用了该技术对水稻韧皮部的表达基因进行综合分析,王英旗等<sup>[12]</sup>运用 LCM 技术已经成功分离了松胚珠雌配子体,Casson 等<sup>[13]</sup>切割并分析了拟南芥胚胎发生过程中的基因表达,Ishimaru 等<sup>[14]</sup>通过激光显微切割分离水稻糊粉层和淀粉胚乳中的靶细胞,并且在早期储存期从每个胚乳组织提取 RNA,Harrop 等<sup>[15]</sup>利用激光显微切割技术建立了早稻种花序中繁殖分生组织类型的基因表达谱,Thakare 等<sup>[16]</sup>切割玉米发育中央淀粉胚乳细胞并进行了 RNA-Seq 分析,胡晓<sup>[17]</sup>建立了棉花显微切割技

术体系,并对着丝粒序列进行了探索研究,张文超等<sup>[18]</sup>建立了杨树花药的激光捕获显微切割体系,显示了该技术在植物细胞及组织分离中有着广阔的应用前景。Cai 等<sup>[19]</sup>用改良的石蜡切片方法和激光捕获显微切割技术成功在拟南芥长角果中获取了所需细胞并提取了 RNA,笔者借鉴了其石蜡切片结合激光捕获显微切割的思路,并结合自身的实验材料对石蜡切片的一些步骤做出了改进。

本研究建立了一个石蜡切片和激光捕获显微切割技术联用分离梅的花芽不同发育时期的雌蕊的技术体系,此方法技术体系尚未应用到梅的研究领域。本试验采用石蜡直接包埋新鲜花芽,改进了试验材料的贮藏条件(在 4℃ 冰箱低温贮藏),即除渗蜡和制片之外,其他如脱水、透明等步骤都在 4℃ 冰箱中进行,避免了样品取材季节和时间的限制性,简化了实验流程,也避免了 RNA 的降解,简化了实验流程,明确了切片的厚度和切割的激光强度,得到了产量和质量都较高的 RNA,微量的 RNA 经线性扩增后可用于下游的分子生物学研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

材料为梅栽培品种‘大嵌蒂’和‘龙眼’的花芽和雌蕊,种植于南京农业大学国家果梅杨梅种质资源圃,采取常规栽培管理方法。于 2017 年 11 月 17 日开始至 2018 年 3 月 1 日结束,每隔 1 个星期采 1 次样,样品置于冰盒中带回实验室保存。

### 1.2 实验仪器及耗材

Leica 石蜡(熔点 56℃)、Leica PEN Membrane Slide(RNase-free)、轮转切片机、烘箱、烘片机、Leica LMD 7000 激光捕获显微切割仪(德国 Leica 公司生产制造)、手术刀。

### 1.3 石蜡切片的制备

选取形态饱满的花芽,将花芽用卡诺固定液( $V_{\text{无水乙醇}}:V_{\text{乙酸}}=3:1$ )<sup>[20]</sup>于 4℃ 冰箱中固定 24 h,渗蜡、包埋、切片、制片等石蜡切片常规操作参考文献[21],脱水、透明等操作参考文献[22]。具体操作流程如下:

脱水:除去固定液,然后梯度脱水,将花芽按先后顺序置于 50%乙醇中 1 h,70%乙醇中 2 h,85%乙醇中 1.5 h,95%乙醇中 1 h,100%乙醇中 2 h(于 4℃ 冰箱中进行);

透明:除去乙醇,然后梯度透明,将花芽按先后顺序置于 3/4 乙醇+1/4 二甲苯中 1 h,1/2 乙醇+1/2 二甲苯中 1 h,1/4 乙醇+3/4 二甲苯中 1 h,二甲苯中 2 h (于 4 ℃冰箱中进行);

渗蜡:本步骤在 65 ℃烘箱中完成并开始过夜,并且每隔 4 h 换 1 次石蜡,共换 3 次,最后一次更换石蜡后直接进行过夜处理;

包埋:用油纸制作简易小纸盒,将花芽完全浸没于石蜡中充分接触,并使每个花芽之间有一定的距离,保证制片时有充分的空间处理花芽。包埋时,调整好花芽的位置,以便切片时找好下刀的位置(本实验为纵切)。

切片制作:此步骤分为切片、展片、烘片,分别制作 6、8、10、12 和 14 μm 不同梯度厚度的切片条带,经研究比较,最终选取切片条带厚度为 10 μm,切片前用酒精擦拭切片机刀片表面,本步骤中用到的手术刀、刀片、镊子、解剖针等用具均经高温灭菌并用 0.1%焦碳酸二乙酯 DEPC 水处理;

切片脱蜡:将制作好的切片进行梯度脱蜡,先后置于二甲苯中 20 min,1/2 乙醇 +1/2 二甲苯中 2 min,无水乙醇中 2 min,95%乙醇中 2 min,85%乙醇中 2 min,70%乙醇中 2 min,50%乙醇中 2 min,然后在 0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)水浸泡 6 min,最后 42 ℃烘片 24 h。

石蜡切片制作过程中所有使用的水均为 0.1% 焦碳酸二乙酯(DEPC)水。

1.4 激光捕获显微切割

使用激光显微切割仪 Leica LMD 7000 进行显微切割。切割前对显微切割室喷洒些许 0.1% 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水以清除菌,保证环境中无

RNase 污染。然后按下述操作过程进行切割:

(1)开启电脑,打开 CTR6500 控制器,等待显微镜自检,待自检结束后,前面触摸屏显示基本信息,再打开 laser 控制器,将钥匙拧至 on 的位置,使 laser 控制器预热 5~10 min,待指示灯变绿即可。双击显微切割软件,进入软件。

(2)TL-BF 明场切割过程:

① 点击样品夹 unload,选择样品夹类型,放上制作好的切片,将切片磨面朝下,点击 continue,样品夹退回机器;

② 点击收集管 unload,选择收集管类型(本实验选择 200 μl PCR 管),安装好收集管,每个收集管中加入 10 μl 裂解液,点击 continue,收集管退回机器;

③ 选择收集管盖。点击对话框左下方的收集装置,选择收集管盖(A、B、C 或 D,根据自己安装好的数量选择),被选中的收集管盖,颜色由红变绿;

④ 点击 micro control,选择 TL-BF,选择物镜的倍数(本实验选择的物镜倍数为 6.3×),FL 调到最大;

⑤ 找到样品画面,对焦,调出清晰画面,如果画面效果不好,点击 camera 菜单下的 setting window,调节自动白平衡,调好画面后,关闭界面;

⑥ 找到目标区域后,选择 single(单图切割),选择 draw+cut,可用 line、椭圆或矩形画出要切割的区域(本试验采用 line 切割)。画完区域选择指定的收集管,颜色与区域一样,在 shape list 中可以看到收集管的位置;

⑦ 点击 laser menu 下的 laser control,调节激光的设置,在 6.3×物镜下,经反复试验调试,切割果梅雌蕊的参数设置见表 1;

表 1 梅花芽的显微切割参数

Table 1 Laser microdissection parameters of Japanese apricot buds

参数 Parameter	光照强度 Light intensity	激光切割孔径 Aperture	切割速度 Speed	发射强度 Head current/%	脉冲频率 Pulse Frequency	样品平衡 Specimen Balance	激光能量 Power
数值 Value	255	20	10	100	3 100	10	30

⑧ 点击 start cut 开始切割;

⑨ 切割结束后,点击 collector,查看收集管中切割的样品,找到样品,点击 unload,退出收集管并立即将收集管放入液氮中保存,进行后续实验;

⑩ 点击 specimen,回到样品界面;如果要导出数据,点击 summary,export 输出数据。

此激光捕获显微切割仪为紫外切割参数。

1.5 RNA 的提取及检测

所切取的雌蕊的样品利用试剂盒 Applied Biosystems™ PicoPure™ RNA Isolation Kit<sup>[23]</sup> 提取微量 RNA,然后将提取好的微量 RNA 送至华大基因公司,利用 2100 Bioanalyzer (Agilent, America) 检测



RNA的浓度、纯度和完整性<sup>[24]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 切片条带厚度的选择

分别制作6、8、10、12、14  $\mu\text{m}$ 不同梯度厚度的切片条带,以探讨最佳的条带厚度(图1)。发现10、12、14  $\mu\text{m}$ 的条带(C、B、A)可以完整地贴合在膜上,不易断裂且条带与膜之间无空隙;6、8  $\mu\text{m}$ 的条带(E、D)在贴片时遇水易断裂,不易贴合,影响试验效率和载玻片的利用率。

在激光强度设置为30切割时(图2),不能一次性直接切落14  $\mu\text{m}$ 厚度的切片,从而延长了切割时间,严重影响切片的切割效率;切片厚度为12  $\mu\text{m}$ 时,同一切片上的68个花芽样品中,有41个能一次

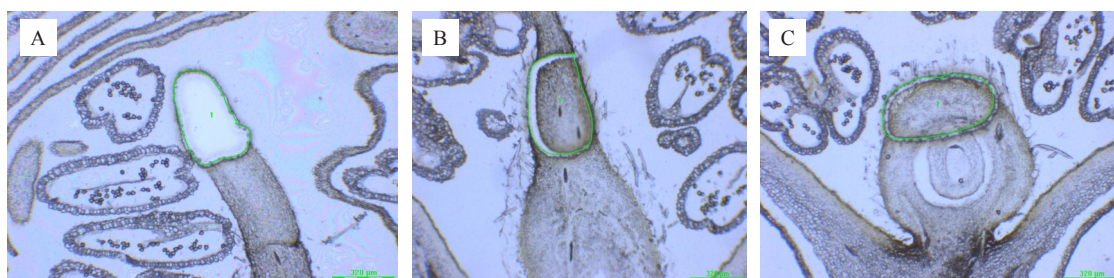


A. 14  $\mu\text{m}$ ; B. 12  $\mu\text{m}$ ; C. 10  $\mu\text{m}$ ; D. 8  $\mu\text{m}$ ; E. 6  $\mu\text{m}$ .

图1 不同厚度条带的制片效果

Fig. 1 Production effect of strips of different thickness

性切落,一次性切落比率为60.29%;切片厚度为10  $\mu\text{m}$ 时,同一切片上的56个花芽样品中,有52个能一次性切落,一次性切落比率高达92.86%,减少了切片切割所消耗的时间。本试验最终选取切片厚度为



A. 厚度10  $\mu\text{m}$ 的切割效果; B. 厚度12  $\mu\text{m}$ 的切割效果; C. 厚度14  $\mu\text{m}$ 的切割效果。

A. Cutting effect with 10  $\mu\text{m}$  thickness; B. Cutting effect with 12  $\mu\text{m}$  thickness; C. Cutting effect with 14  $\mu\text{m}$  thickness.

图2 不同厚度的切片的切割效果

Fig. 2 Cutting effect of different slices thickness

10  $\mu\text{m}$ 。

### 2.2 石蜡切片

此外,制片时将花芽周围的石蜡用手术刀修整齐,保持方形,以保证切片时条带的整齐,从而充分利用好载玻片上的膜。以选定好的切片厚度10  $\mu\text{m}$ ,并在载玻片膜上铺满0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)水,将切好的条带整齐地贴合在膜上,置于烘片机上烘干24 h。脱蜡要彻底,否则会直接影响切片的观察和切割。烘片时用灭过菌并且经0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)水处理过的塑料盒覆盖住切片,避免切片与空气的接触。

### 2.3 激光捕获显微切割

分别设置激光强度为20、30和40,比较切片切割的效果(图3)。当激光强度设为20时,不足以一次性切落样品;当激光强度设为30时,基本可以一次性切落样品,并且切割边缘对样品组织损耗较小;

当激光强度设为40时,可以一次性切落样品,不过切割边缘与激光强度设置为30时相比,颜色更深,焦糊状态较为严重,影响样品组织完整性;所以经过比较,本试验最终设置激光强度为30(本次试验使用的显微切割仪的激光能量的单位为 $10^6\text{ J}$ )。

切割完立即将PCR管置入液氮中速冻能相对保证RNA的质量。尽量使切片上的材料整齐密集,最大程度上利用好切片,不过在6.3 $\times$ 倍镜下,每次只能切割一个组织,尽量将一张切片的切割时间控制在30 min左右。本试验每个样品收集5张PEN膜载玻片的量。图4显示了激光捕获显微切割过程中选取的梅雌蕊的组织,选定组织目标区域并进行切割的过程。

### 2.4 RNA质量检测

在激光捕获显微切割过程中收集到的雌蕊组织样品,提取RNA并且经过检测后,其质量如表2所

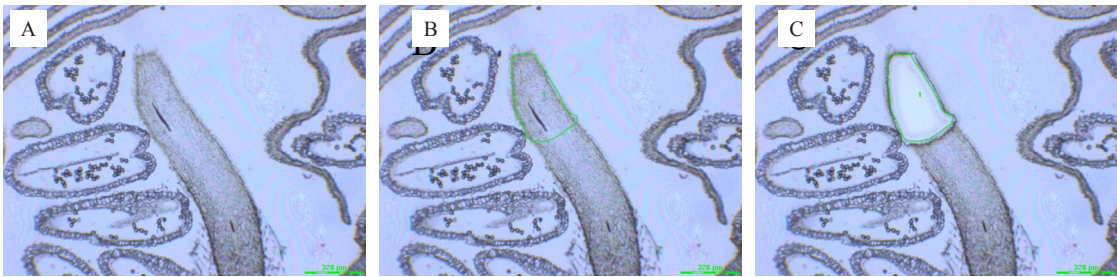


A. 激光强度为 20 的切割效果;B. 激光强度为 30 的切割效果;C. 激光强度为 40 的切割效果。图 C 中切割边缘的颜色比图 B 中的深,且焦糊比较严重。

A. Cutting effect with laser intensity of 20; B. Cutting effect with laser intensity of 30; C. Cutting effect with laser intensity of 40. The colour of the cut edge in Figure C is darker than that in Figure B,and the scorching is more serious.

图 3 不同激光强度的切割效果

Fig. 3 Cutting effect of different laser intensity



A. 切割前;B. 选定切割目标和区域;C. 切割后。

A. Before cutting; B. Selected cutting target and area; C. After cutting.

图 4 显微切割雌蕊组织的过程

Fig. 4 Laser microdissection of pistil tissue

表 2 RNA 样本 2100 生物分析仪质检报告

Table 2 RNA sample agilent 2100 bioanalyzer QC report

样品编号 Sample serial number	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1})$	体积 Volume/ $\mu\text{L}$	总量 Total amount/ $\mu\text{g}$	$A_{260}/A_{280}$	RIN 值 RIN value
1	3.942	15.0	0.059 1	1.58	4.1
2	0.472	17.5	0.008 3	1.30	2.4

注: RIN(RNA integrity number)表示 RNA 的完整度。

Note: RIN (RNA integrity number) indicates the integrity of RNA.

示。比较切割完成后未将PCR管置入液氮与切割完成立即将PCR管置入液氮保存的两种情况,提取的RNA经过检测后表明,未置入液氮保存而获得的样品(2号)RIN值较低, RNA降解比较严重,且浓度较低,完整度也较低,而置入液氮保存中而获得的样品(1号)RIN值较高, RNA质量相对较好,浓度高,完整度也比较好。本试验中每个样品所获得的RNA产量约为60 ng。RIN(RNA Integrity Number)为RNA的完整性计数,RIN范围为1~10,代表不同的RNA质量,其中,1代表RNA降解,10代表RNA的完整性高。

3 讨 论

通过激光捕获显微切割技术研究特定组织或单一细胞并进行相关分子生物的实验的前提是获得质量合格的RNA,所有影响RNA质量的因素都应该在实验中予以考虑并避免。考虑到石蜡切片的稳定性和易操作性,结合已发表的文献报道,笔者采用了卡诺固定液固定新鲜花芽材料和4℃冰箱保存的方法,确立了适合梅花芽的切片条带厚度和切割时的激光强度,并且切割结束时立即将PCR管置入液氮保存,从始至终都能获得质量较为稳定的RNA。不



过在制作石蜡切片的过程中,花芽会不可避免地大量有机试剂长时间接触,从而导致RNA会发生一定程度的降解。本试验在常规石蜡切片的制作基础上,主要改进了制片之前材料的保存温度,即于4℃冰箱中低温贮藏,除渗蜡和制片过程之外,其他如脱水、透明等都在4℃冰箱中进行,待制片时再取出于室温中操作,董甜甜等<sup>[25]</sup>在黄梁木显微切割的方法建立过程中,固定、脱水和透明这三个步骤也是在4℃中进行的,与本试验类似。本试验最终花芽的石蜡切片厚度选取10 μm,这与刘涛等<sup>[26]</sup>制作菊花花芽的石蜡切片最佳厚度一致。

本试验中,在石蜡切片厚度选取为10 μm的前提下,激光强度最终确定为30。在王雪等<sup>[27]</sup>建立的黄梁木维管组织细胞激光显微切割体系中,其形成层、韧皮部和木质部的激光强度分别为44、42和44,董甜甜等<sup>[25]</sup>建立的黄梁木不定根原基显微切割的体系中,激光强度为38,不过不同的是,这两者的石蜡切片厚度是14 μm,比本试验厚。因此,在切片厚度为10 μm左右时,激光强度可以在30~40选择,根据切割效果确定最终的激光能量。在切割完成后,用液氮保护样品可以有效减少RNA的降解,从而提高RNA质量,陆叶<sup>[28]</sup>在用冰冻切片的方法建立显微切割体系时,采用液氮冷冻的方法制片,其目的与本研究相同,本试验所得RNA的RIN值为4.1, Dini等<sup>[29]</sup>从福尔马林固定、石蜡包埋的马胎盘中提取的RNA的完整性平均值为2.3,且其RNA将用于下游转录组分析。

本系统方法的主要优点在于新鲜材料包埋后置于4℃冰箱中保存待使用,并且除渗蜡和制片过程之外,其他如脱水、透明等过程也都在4℃冰箱中进行,待制片时再取出于室温中操作,这样不仅避免了实验受材料成长发育季节性的限制,延长了实验的可操作时间,而且还减少了RNA的降解;选取饱满的花芽利于制片,方便切割且便于切割时观察所需的目的组织;确立了适用于梅花芽的切片条带厚度和切割的激光强度,提高了重复试验的效率;将条带整齐紧凑地铺满在PEN膜上,缩短物镜寻找材料的时间,从而控制切割时间,缩短切片与空气的接触时间;在显微切割完成后立即将PCR管放入液氮瞬时冷冻,起到了避免RNA降解的作用。切片不经过染色直接上机切割,减少了一些步骤,进一步减少了RNA的降解。根据本试验所建立的试验方法,笔者

分别切割了2个梅品种‘龙眼’和‘大嵌蒂’从11月17日至3月1日的雌蕊的柱头、花柱和子房,得到了所有样品的微量RNA,并利用得到的微量RNA于后续试验中比较分析了*PmTCP4*在梅2个品种雌蕊不同部位的表达差异,说明本试验所建立的方法是相对简单、稳定且重复性好的。

由于试验条件的限制以及现实因素的影响,本试验最终采用石蜡切片的制片方法,不过和冰冻切片相比较,石蜡切片的试验效果不如冰冻切片,石蜡切片的制片过程更为繁琐,周期更长,而且避免不了有机溶剂对RNA的负面影响,所以对于如何进一步精简石蜡切片的制作过程以及制作周期,进一步减少有机溶剂对RNA的负面影响,如何完整地将冰冻切片的技术应用到植物中并且不对植物材料产生不良影响,如冰冻切片对植物大液泡的影响等等,有待更深入的研究。

## 4 结 论

通过将新鲜花芽包埋后置于4℃冰箱中保存以及切割后有无液氮保存的比较发现,低温不仅可以有效减缓RNA的降解,而且能明显改善RNA的完整度。最终探究出适用于梅花芽的试验条件。最终获得RNA的RIN值为4.1,质量浓度为3.942 μg·μL<sup>-1</sup>,总量约为60 ng。该结果获得RNA可以进一步进行后续的分子试验研究,如转录组测序等等。该方法可以推广到果梅其他组织以及其他植物的发育过程和分子生物学研究中。

## 参考文献 References:

- [1] JENOG J T, MOON J H, PARK K H, SHIN C S. Isolation and characterization of a new compound from *Prunus mume* fruit that inhibits cancer cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(6): 2123-2128.
- [2] 褚孟娜. 中国果树志: 梅卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999: 32-33.  
CHU Mengzhang. Chinese fruit trees: Plum mei[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1999: 32-33.
- [3] 徐汉卿, 王庆亚, 胡金良, 黄清渊. 梅雌蕊发育和受精作用的研究[J]. *云南植物研究*, 1995, 17(1): 61-66.  
XU Hanqing, WANG Qingya, HU Jinliang, HUANG Qingyuan. Studies on the development of pistil and fertilization in *Prunus mume*[J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 1995, 17(1): 61-66.
- [4] 徐汉卿, 胡金良, 王庆亚, 黄清渊. 梅花芽形成的发育解剖学研究[J]. *北京林业大学学报*, 1992, 14(S4): 18-22.  
XU Hanqing, HU Jinliang, WANG Qingya, HUANG Qingyuan.

- studies on the developmental anatomy of flower bud for mation in Mei tree (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) [J]. Journal of Beijing Forestry University, 1992, 14(S4): 18-22.
- [5] 褚孟娜,黄金城. 梅树花芽形态分化及其物质代谢的研究[J]. 北京林业大学学报, 1995, 17(S1): 68-74.
- CHU Mengzhang, HUANG Jincheng. Studies on the morphological differentiation and the substance metabolism in Meizi (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) [J]. Journal of Beijing Forestry University, 1995, 17(S1): 68-74.
- [6] 孙文全,褚孟娜. 梅树花芽生理分化期木质部液中赤霉素和细胞分裂素的变化[J]. 园艺学报, 1988, 15(2): 73-76.
- SUN Wenquan, CHU Mengzhang. The influence of cytokinin and gibberellin in the xylem sap on floral initiation of Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1988, 15(2): 73-76.
- [7] 王珊. 果梅完全花与不完全花相关性状的差异及其蛋白质组学的初步分析[D]. 南京:南京农业大学, 2008.
- WANG Shan. Preliminary studies on differences of related characteristics between perfect flower and imperfect flower and proteomics in Japanese apricot [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008.
- [8] 王万许. 梅 *Pm-miR319a* 及其靶基因 *Pm-TCP4* 在雌蕊发育中的调控作用[D]. 南京:南京农业大学, 2017.
- WANG Wanxu. The role of Pm-MIR319a and its target gene Pm-TCP4 on regulation of pistil development in Japanese apricot [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
- [9] 李艳林. 梅生长素响应因子的克隆及其在花发育中的功能分析[D]. 南京:南京农业大学, 2018.
- LI Yanlin. Isolation and functional analysis of auxin responsive factors related to floral development in *Prunus mume* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018.
- [10] 陆叶,席梦利,刘光欣,徐进,施季森. 激光显微切割技术在植物细胞和分子生物学研究中的应用进展[J]. 南京林业大学学报, 2007, 31(2): 113-117.
- LU Ye, XI Mengli, LIU Guangxin, XU Jin, SHI Jisen. Review on laser microdissection techniques for plant cell and molecular biology research [J]. Journal of Nanjing Forestry University, 2007, 31(2): 113-117.
- [11] ASANO T, MASUMURA T, KUSANO H, KIKUCHI S, KURITA A, SHIMADE H, KADOWAKI K I. Construction of a specialized cDNA library from plant cells isolated by laser capture microdissection: toward comprehensive analysis of the genes expressed in the rice phloem [J]. The Plant Journal, 2002, 32(3): 401-408.
- [12] 王英旗,姚阳,陈彬丽,张淑静,李芳,郑彩霞. 不同的固定方法对激光显微切割分离油松胚珠雌配子体的影响[J]. 植物生理学报, 2013, 49(2): 195-199.
- WANG Yingqi, YAO Yang, CHEN Binli, ZHANG Shujing, LI Fang, ZHENG Caixia. Effects of different fixing methods on isolation of ovules in female gametophyte of *Pinus tabulaeformis* Carr. by laser capture microdissection [J]. Plant Physiology Journal, 2013, 49(2): 195-199.
- [13] CASSON S, SPENCER M, WALKER K, LINDSEY K. Laser capture microdissection for the analysis of gene expression during embryogenesis of *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2005, 42(1): 111-123.
- [14] ISHIMARU T, IDA M, HIROSE S, SHIMAMURA S, MASUMURA T, NISHIZAWA N K, NAKAZONO M, KONDO M. Laser microdissection-based gene expression analysis in the aleurone layer and starchy endosperm of developing rice caryopses in the early storage phase [J]. Rice, 2015, 8(1): 22-37.
- [15] HARROP T W R, UD D I, GREGIS V, OSNATO M. Gene expression profiling of reproductive meristem types in early rice inflorescences by laser microdissection [J]. The Plant Journal, 2016, 86(1): 75-88.
- [16] THAKARE D, YANG R, STEFFEN J G, ZHAN J, WANG D, CLARK R M, WANG X, YADEGARI R. RNA-Seq analysis of laser-capture microdissected cells of the developing central starchy endosperm of maize [J]. Genomics Data, 2014, 2: 242-245.
- [17] 胡晓. 棉花显微切割技术体系的建立及着丝粒序列探索研究 [D]. 武汉:华中农业大学, 2011.
- HU Xiao. Study on the microdissection and centromere in cotton [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011.
- [18] 张文超,曹媛,武佳叶,郝瑞芝,荆艳萍. 杨树花药激光显微切割体系的建立 [J]. 北京林业大学学报, 2013, 10(1): 139-143.
- ZHANG Wenchao, CAO Yuan, WU Jiaye, HAO Ruizhi, JING Yanping. Laser microdissection system of poplar anther [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2013, 10(1): 139-143.
- [19] CAI S, LASHBROOK C C. Laser capture microdissection of plant cells from tape-transferred paraffin sections promote recovery of structurally intact RNA for global gene profiling [J]. The Plant Journal, 2006, 48(4): 628-637.
- [20] CHAVAN S, SCHNABEL E, SASKI C, FRUGOLI J. Fixation and laser capture microdissection of plant tissue for RNA extraction and RNA seq library preparation [J]. Current Protocols in Plant Biology, 2018, 3(1): 14-32.
- [21] 侍婷,张其林,高志红,章镇,庄维兵. 2个果梅品种雌蕊分化进程及相关生化指标分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(4): 35-41.
- SHI Ting, ZHANG Qilin, GAO Zhihong, ZHANG Zhen, ZHUANG Weibing. Analyses on pistil differentiation process and related biochemical indexes of two cultivars of *Prunus mume* [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2011, 20(4): 35-41.
- [22] 张勇. 基于 RIP-seq 分析梅多雌蕊形成和发育的关键基因 [D]. 南京:南京农业大学, 2019.
- ZHANG Yong. Analysis of key genes of pistil formation and development in meadow based on RIP-seq [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019.



- [23] ZHANG S, THAKARE D, YADEGARI R. Laser-capture microdissection of maize kernel compartments for RNA-seq-based expression analysis[M]. New York: Humana Press, 2018: 153-163.
- [24] FLEIGE S, WALF V, HUCH S, PRGOMET C, SEHM J, PFAFFL M W. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(19): 1601-1613.
- [25] 董甜甜, 王雪, 刘思雯, 张立定, 龙健梅, 彭昌操. 激光显微切割分离黄梁木不定根原基的技术体系建立[J]. 植物生理学报, 2019, 55(5): 685-695.
- DONG Tiantian, WANG Xue, LIU Siwen, ZHANG Liding, LONG Jianmei, PENG Changcao. Establishment of advanceless root primordia cells capture system by laser microdissection in *Neolamarckia cadamba*[J]. Plant Physiology Journal, 2019, 55(5): 685-695.
- [26] 刘涛, 任莉萍, 曹沛沛, 陈发棣, 房伟民, 陈素梅, 管志勇, 滕年军, 张飞, 赵爽, 王海滨, 宋爱萍, 蒋甲福. 菊花不同时期各组织器官石蜡切片制作条件的优化[J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(5): 739-746.
- LIU Tao, REN Liping, CAO Peipei, CHEN Fadi, FANG Weimin, CHEN Sumei, GUAN Zhiyong, TENG Nianjun, ZHANG Fei, ZHAO Shuang, WANG Haibin, SONG Aiping, JIANG Jiafu. The paraffin section making conditions of chrysanthemum different tissues in different period[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2016, 39(5): 739-746.
- [27] 王雪, 龙健梅, 董甜甜, 郑丹菁, 张立定, 彭昌操. 黄梁木维管组织细胞激光显微切割技术体系建立[J]. 广西植物, 2020, 40(3): 1-11.
- WANG Xue, LONG Jianmei, DONG Tiantian, ZHENG Danjing, ZHANG Liding, PENG Changcao. Establishment of vascular tissue cells capture system by laser microdissection in *Neolamarckia cadamba*[J]. Guihaia, 2020, 40(3): 1-11.
- [28] 陆叶. 杉木、杨树激光显微切割体系的建立及 RNA 质量的控制[D]. 南京: 南京林业大学, 2007.
- LU Ye. Establishment of laser microdissection system of Chinese fir and poplar and control of RNA quality[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2007.
- [29] DINI P, ESTELLER- VICO A, SCOGGIN K E, DAELS P, BALL B A. Extraction of RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded equine placenta[J]. Zuchthygiene, 2019, 54(3): 627-634.

### 欢迎订阅 2021 年《中国种业》

《中国种业》是由农业农村部主管, 中国农业科学院作物科学研究所和中国种子协会共同主办的全国性、专业性、技术性种业科技期刊。全国优秀农业期刊、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊。

刊物目标定位: 以行业导刊的面目出现, 具有权威性、真实性和及时性的特色。主要栏目有: 种业论坛、专题综述、种业管理、研究论文、品种选育、良种良法等; 报道内容范围: 最新种业政策、各地种业管理经验、种业企业经营之道、新品种新技术等, 信息量大, 技术实用。

读者对象: 各级种子管理、经营企业的领导和技术人员, 各级农业科研、推广部门人员, 大中专农业院校师生, 农村专业户和广大农业生产经营者。

月刊, 大 16 开, 每期 20 元, 全年 240 元。国内统一连续

出版物号: CN 11-4413/S, 国际标准连续出版物号: ISSN 1671-895X, 全国各地邮局均可订阅, 亦可直接汇款至编辑部订阅, 挂号需每期另加 3 元。邮发代号: 82-132。

地址: (100081) 北京市中关村南大街 12 号

中国种业编辑部

电话: 010-82105796(编辑部)

010-82105795(广告发行部)

网址: [www.chinaseedqks.cn](http://www.chinaseedqks.cn)

E-mail: [chinaseedqks@163.com](mailto:chinaseedqks@163.com)

微信公众号: 中国种业

中国种业编辑部 QQ 群: 115872093

中国种业读者 QQ 群: 289113905

## 中熟白肉桃新品种‘中桃5号’的选育

牛 良, 孟君仁, 崔国朝, 潘 磊, 曾文芳, 鲁振华, 王志强\*

(中国农业科学院郑州果树研究所·国家桃、葡萄改良中心, 郑州 450009)

**摘 要:** ‘中桃5号’是以‘朝晖’为母本、‘双佛’为父本, 通过人工杂交培育出的白肉鲜食桃新品种。果实圆形, 果顶圆平或微凹, 缝合线浅, 两半部对称。果实大, 平均单果质量263 g, 大果质量500 g以上。果实表面茸毛中等, 底色浅绿白, 成熟时多数果面着红色。果肉白色, 溶质, 肉质细, 多汁, 风味甜, 近核处花色苷中等, 黏核。可溶性固形物含量(w, 后同)12.6%~13.9%, 总糖含量10.9%, 总酸含量0.27%, 维生素C含量11.56 mg·100 g<sup>-1</sup>, 品质优。花为蔷薇型, 有花粉。在郑州地区, ‘中桃5号’一般2月底3月初叶芽萌动, 3月下旬开花, 花期5~7 d, 果实在7月下旬成熟, 果实发育期120 d左右。

**关键词:** 桃; 新品种; ‘中桃5号’; 白肉

中图分类号: S662.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2020)10-1593-04

## Breeding of a middle ripening, white-fleshed peach cultivar ‘Zhongtao 5’

NIU Liang, MENG Junren, CUI Guochao, PAN Lei, ZENG Wenfang, LU Zhenghua, WANG Zhiqiang\*

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Peach & Grape Improvement Center, Zhengzhou 450009, Henan, China)

**Abstract:** The traditional cross breeding is one of the most effective ways to breed new peach cultivars although many new technology occurred. Aiming at white-fleshed peach with round shape, big fruit and good quality, we choose ‘Zhaohui’, bred by Horticulture Research Institute, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, as female parent and ‘Sunfre’, a nectarine cultivar from USA for pollen donation. The pollen which was collected in March 1989 from the male parent ‘Sunfre’ was used for pollination in the balloom stage of the female parent ‘Zhaohui’ after artificial emasculation. 50 hybrid fruits were harvested after matured and the stone were cleared and stratificated under 2-7 °C in refrigeration house for about 90 days. When some of the seeds began to germinate, took out and sowed all the seeds in greenhouse. Finally, 32 hybrid seedlings were obtained. In early April of the next year, the seedlings were planted by 2.0 m×4.0 m in breeding nursery according to the conventional cultivation management. Three years later, most of the trees began to flower and fruit. ‘89-4-32’, one of the hybrid seedlings, exhibited round, sweet and large fruit, accord with our breeding aim. The main economic and agronomic characters were stable, which were prior to the controls in the followed 4 fruited years. In 1996, it was upper-position grafted and evaluation was carried out for several fruiting years. The results showed that the main traits remained stable compared to the mother plant. In 2006, we choosed several orchard for production tests in Henan province. The comprehensive performance was stable and showed strong market competitiveness. In 2015, the selection was authorized to release and named ‘Zhongtao 5’. The fruit of ‘Zhongtao 5’ is round and the top is flat or dimple, the suture is shallow and the two sides are symmetrical, mature degree is uniform. The fruit is large with average fruit mass of 263 g and the biggest ones are more than 500 g. The fruit background is light-green or white, with medium fuzz. Most

收稿日期: 2020-03-03 接受日期: 2020-06-04

基金项目: 国家重点研发项目(2019YFD1000801); 中国农业科学院科技创新工程项目[CAAS-ASTIP-2015-ZFRI-(01)]

作者简介: 牛良, 研究员, 博士, 主要从事桃遗传育种与栽培技术研究。Tel: 13783634196, E-mail: niuliang@caas.cn

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13703841063, E-mail: wangzhiqiang@caas.cn

surface of the fruit is covered with rose-red when ripening. The flesh is white, melting and juicy. The flavour is sweet with light aroma. The anthocyanin near the stone is medium. Soluble solid content is 12.6%-13.9%, total sugar content is 10.9%, total acid content is 0.27%, vitamin C content is 11.56 mg·100 g<sup>-1</sup>. The eating quality is excellent. The stone is cling, elliptical. The flower type is showy with 5 petals. It is fertile and yield high and stable. In Zhengzhou area, the leaf bud of 'Zhongtao 5' begin to break at the end of February to the beginning of March, and blooms in the late March, lasting 5-7 days. The fruits get into mature period in late July, and the fruit development period is about 120 days. The leaves begin to fall in early November. The growth period is 230 days approximately.

**Key words:** Peach; New cultivar; 'Zhongtao 5'; White flesh

桃为呼吸跃变型果实,在成熟阶段会出现乙烯的跃变而引发呼吸高峰,使果实迅速软化<sup>[1]</sup>。目前,我国市场上的鲜食桃以溶质型居多<sup>[2-3]</sup>,因其自身特点导致货架期较短,不能长时间持续供应鲜果市场。因此,培育不同成熟期的系列品种是应对市场需求的重要手段,同时也是桃品种改良的重要目标。

我国作为桃生产大国,也是世界桃生产和研究中心。几十年来,我国桃育种工作者已经培育出一系列桃新品种,主要有'春蜜'<sup>[4]</sup>、'春美'<sup>[5]</sup>、'霞脆'<sup>[6]</sup>、'京玉'<sup>[7]</sup>、'秦王'<sup>[8]</sup>等,但生产中优质、着色好的中熟桃品种仍相对短缺。为了满足生产与消费需求,中国农业科学院郑州果树研究所选择国内优质桃与欧美引进品种进行杂交,历时20余年,选育出了符合目标的中熟桃新品种'中桃5号'(图1)。



图1 白肉桃新品种'中桃5号'

Fig. 1 A new white-fleshed peach cultivar 'Zhongtao 5'

## 1 选育经过

以着色好、果形端正、大果、优质等为育种目标,选择江苏省农业科学院园艺研究所培育的'朝晖'为母本(中熟桃,白肉,品质优),以美国油桃品种'双佛'('Sunfre')为父本,于1989年3月,采集父本'双

佛'蕾期的花粉,在母本'朝晖'大蕾期时人工去雄,进行点授杂交。当年采收杂交果实50个,取出桃核,去净果肉,于2~7℃低温下层积90 d左右。11月份种子开始少量萌芽时,于温室播种育苗,最终培育成苗32株,次年4月上旬定植到中国农业科学院郑州果树研究所桃育种圃中,南北行定植,株行距2.0 m×4.0 m,按常规方法栽培管理。

杂种实生苗于1993年开始大量开花结果,编号为'89-4-32'的单株坐果率高,果形圆整,果个较大,品质优,连续对母树观察4 a(年),果实各项经济性状和重要农艺性状表现稳定。1996年选为优株,并进行高接观察,各性状与母树基本一致,受栽培条件影响,单果质量、着色、品质等有一定提升。2006年,选择毛桃为砧木,繁殖部分苗木,在河南开封、焦作、驻马店等地进行品种比较试验。种植密度依据当地土壤气候条件及整形方式稍有不同,对照品种为'大久保'等。试验结果表明,'中桃5号'在河南省各地综合表现优良,单果质量、果面着色等方面优于对照,深受生产者和消费者好评。2015年申请通过了河南省林木品种审定(良种编号:豫S-SV-PP-012-2015)。

## 2 主要性状

### 2.1 植物学特征

'中桃5号'生长势中等(表1),树姿较开张,萌发力中等,成枝率中等。一年生新梢绿色,阳面紫红色,中果枝节间长平均1.89 cm。叶片长椭圆披针形,叶面呈绿色,叶背浅绿色,叶基锐尖或近直角,叶缘具浅锯齿;叶片平均长度17.1 cm,宽度4.25 cm,叶柄长0.8~1.5 cm。叶腺肾形,2~4个。花蔷薇型,粉色,花瓣5枚,花粉多。

### 2.2 果实主要经济性状

'中桃5号'桃果实圆形,稍扁,果顶圆平,微凹;



表 1 ‘中桃 5 号’ 与对照品种树体生长量对比  
Table 1 Plant growth of ‘Zhongtao 5’ and the control cultivar

品种 Cultivar	树龄 Tree-age/a	干周 Trunk diameter/cm	树高 Tree height/m	冠幅(南北×东西) Crown diameter (South-north× East-west)/m
中桃 5 号 Zhongtao 5	3	12.6	1.78	1.87×2.03
	4	17.2	1.95	2.14×2.64
	5	22.6	2.28	2.33×3.12
大久保 Okubo	3	11.3	1.81	1.96×2.11
	4	17.8	2.02	2.11×2.67
	5	23.6	2.32	2.28×3.17

注:株行距 2.0 米×4.0 米。  
Note: Spacing and intra-spacing 2.0 m×4.0 m.

表 2 ‘中桃 5 号’ 与对照品种主要经济性状比较  
Table 2 Comparison of main economic characters for ‘Zhongtao5’ and the control

品种 Cultivar	成熟期 Maturing period	果形 Fruit shape	着色 Skin color	平均单果质量 Ave. fruit mass/g	w(可溶性固形物) Soluble solid content/%	风味 Flavour	丰产性 Yield	核黏离性 Stone adhesion
中桃 5 号 Zhongtao 5	7 月下旬 Late July	圆正 Round	多 Much	263	13.5	浓甜 Sweet rich	高 High	黏核 Cling stone
大久保 Okubao	7 月中旬 Middle July	圆 Round	中 Middle	230	12.6	甜 Sweet	高 High	离核 Free stone

新梢生长量有一定程度减小。‘中桃 5 号’成花容易，早果能力较强，速生苗或芽苗春天定植，当年即可形成良好花芽，中等密度(每 666.7 m<sup>2</sup> 86 株)栽培情况下，第二年可开始结果，第三年后逐渐进入丰产，每 666.7 m<sup>2</sup>产量超过 1 100 kg(表 3)。该品种各类果枝均能结果，以中长果枝结果为主。

2.4 物候期

在郑州地区，‘中桃 5 号’一般 2 月底至 3 月初花芽开始萌动，3 月下旬开花，花期持续 5~7 d。果实 在 7 月下旬成熟，果实发育期 120 d 左右。11 月初开始落叶，全年生育期 230 d 左右(表 4)。

表 4 ‘中桃 5 号’ 与对照品种物侯期比较  
Table 4 Phenological stages of ‘Zhongtao 5’ and the control cultivar

品种 Cultivar	叶芽萌动期 Sprouting stage	始花期 First flowering stage	盛花期 Full flowering stage	果实成熟期 Fruit maturation stage	果实发育期 Fruit development period/d	全年生育期 Growth period/d
中桃 5 号 Zhongtao 5	02-26—03-02	03-21—03-27	03-22—03-28	07-20—07-25	120	230
大久保 Okubo	02-27—03-01	03-22—03-28	03-23—03-29	07-15—07-20	115	230

蚜虫、红蜘蛛、桃小食心虫、桃蛀螟等虫害及白粉病、细菌性穿孔病等，未见‘中桃 5 号’对这些病虫害有明显抗性。经过多年、多点试验观察，以毛桃为砧木嫁接的‘中桃 5 号’在河南省各桃主栽区表现出较好的栽培适应性:花芽无明显冻害，无裂果，坐果率高，

缝合线浅，两半部对称，端正，成熟度一致。果实大，平均单果质量 263 g，大果质量 500 g 以上。果实表面茸毛中等，底色浅绿白，成熟时多数果面着红色，美观。果肉白色，溶质，肉质细，汁液中多，风味甜，近核处花色苷中等。可溶性固形物含量(w,后同) 12.6%~13.9%，总糖含量 10.9%，总酸含量 0.27%，维生素 C 含量 11.56 mg·100 g<sup>-1</sup>，品质优良。果核长，椭圆形，黏核(表 2)。

2.3 生长结果习性

‘中桃 5 号’一年可抽生 2~3 次副梢，新梢年平均生长量 41.5 cm。花芽起始节位多为 1~2 节，花芽着生密，以复花芽为主。盛果期后，树势趋于中庸，

表 3 ‘中桃 5 号’ 与对照品种产量比较  
Table 3 Comparison of yields between ‘Zhongtao 5’ and the control kg

品种 Cultivar	3 a 生 666.7 m <sup>2</sup> 产量 Yield per 666.7 m <sup>2</sup> of 3-year-old tree	4 a 生 666.7 m <sup>2</sup> 产量 Yield per 666.7 m <sup>2</sup> of 4-year-old tree	5 a 生 666.7 m <sup>2</sup> 产量 Yield per 666.7 m <sup>2</sup> of 5-year-old tree
中桃 5 号 Zhongtao 5	1 112.4	1 869.7	2 143.7
大久保 Okubo	1 021.7	1 875.1	2 118.3

2.5 抗逆性及栽培适应性

‘中桃 5 号’为中熟品种，正常年份 7 月下旬成熟，果实发育期稍长，容易造成危害的主要病虫害有

产量稳定。

3 栽培技术要点

3.1 建园定植

河南省淮河以北及山区干旱瘠薄地区可适当密

植,建议株行距(1.5~2.0) m × (4.5~5.0) m(2主枝Y字形),淮河以南及平原肥水充足地区应适当稀植,株行距(2.0~3.0) m × (5.0~6.0) m(多主枝Y字形);定植沟(穴)要求宽深各0.8 m,将原土与适量秸秆、农家肥等混匀回填,浇透水,等土壤沉实后再挖小穴定植。

### 3.2 整形修剪原则

培养强健主枝,控制侧枝和结果枝组大小。幼树期主枝延长头最好每40~50 cm时摘心一次,以促进主枝增粗和分枝;6月中旬以前,侧枝在长到15 cm时摘心控长,促进延长头生长,同时增加分枝,培养小型结果枝组。7月中旬开始,适当控氮控水,促进营养生长,促进花芽分化。

加强夏剪,控上促下:夏季树体营养生长旺盛,很容易出现上部“打伞”现象,背上枝、徒长枝等丛生导致中下部光照不足,因此,在生长季,要时刻注意及时疏除旺长大枝,打开光路,改善树冠中下部光照条件。盛果期树冬剪留中长果枝4 000~5 000个,果枝粗度0.5~0.8 cm。

### 3.3 土肥水管理

树势弱多施,树势强少施或不施肥。幼树期适当补充氮肥,促进树冠形成,生长季后期(7月份之后)控肥控水,促进枝条成熟和花芽分化;进入盛果期后,视树势强弱适当补充复合肥。根据土壤商情适时浇水,避免旱涝交替。采收前10 d以内不宜浇水,以防品质下降。

### 3.4 花果管理

以产定果,盛果期每666.7 m<sup>2</sup>产量建议控制在2 000~2 500 kg,将产量分配到树,再根据品种单果质量表现确定留果数。4月底至5月初,大、小果分明时,疏除畸形果、病虫果和多余果。病虫害多发地区可进行套袋栽培。

### 3.5 病虫害防控

桃树生产上常见的叶部虫害有蚜虫、红蜘蛛、梨

小食心虫、卷叶蛾、潜叶蛾等,果实虫害桃小食心虫、桃蛀螟、柑橘小实蝇等。河南省北方雨水较少地区虫害发生相对较重,应做好监测,根据害虫活动情况及时防治。

### 参考文献 References:

- [1] TONUTTI P, CASSON P, RAMINA A. Ethylene biosynthesis during peach fruit development[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1991, 116(2): 274-279.
- [2] CONNORS C H. Peach breeding-a summary of results[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1922, 19: 108-115.
- [3] SANDEFUR P, CLARK J R, PEACE C. Peach texture[J]. Horticultural Reviews, 2013, 41: 241-302.
- [4] 牛良, 王志强, 刘淑娥, 宋银花, 鲁振华, 宗学普. 早熟桃新品种‘春蜜’[J]. 园艺学报, 2010, 37(12): 2029-2030.  
NIU Liang, WANG Zhiqiang, LIU Shu'e, SONG Yinhua, LU Zhenhua, ZONG Xuepu. A new early maturing peach cultivar ‘Chunmi’ [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(12): 2029-2030.
- [5] 牛良, 刘淑娥, 鲁振华, 宋银花, 高昂, 王志强. 早熟桃新品种春美的选育[J]. 果树学报, 2011, 28(3): 540-541.  
NIU Liang, LIU Shu'e, LU Zhenhua, SONG Yinhua, GAO Ang, WANG Zhiqiang. A new early maturing peach cultivar Chunmei[J]. Journal of Fruit Science, 2011, 28(3): 540-541.
- [6] 马瑞娟, 俞明亮, 杜平, 宋宏峰, 张勇, 沈志军. 早中熟耐贮藏桃新品种‘霞脆’[J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 557.  
MA Ruijuan, YU Mingliang, DU Ping, SONG Hongfeng, ZHANG Yong, SHEN Zhijun. ‘Xiacui’, A early- mid ripening peach variety[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31(5): 557.
- [7] 陈青华, 姜全, 郭继英, 赵剑波. 京玉桃在我国桃育种中的应用[J]. 江苏农业科学, 2009(3): 185-187.  
CHEN Qinghua, JIANG Quan, GUO Jiying, ZHAO Jianbo. Applying of ‘Jingyu’ peach in peach breeding of China[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2009(3): 185-187.
- [8] 韩明玉, 田玉命, 于成哲, 张志平, 王淑莉. 耐贮藏晚熟桃新品种秦王[J]. 园艺学报, 2001, 28(2): 182.  
HAN Mingyu, TIAN Yuming, YU Chengzhe, ZHANG Zhiping, WANG Shuli. A new late-ripening peach variety ‘Qinwang’ [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2001, 28(2): 182.