

早熟桃胚培养技术的研究

杨增海 胡霓云 路广明

(西北农学院园艺系)

引言

早熟桃和极早熟桃种胚发育时间短,只有65—90天左右,积累的干物质少,因而播种不能萌发或萌发率极低,这是早熟桃和极早熟桃育种工作的一大难题。国内外果树育种家极重视应用种胚培养方法,促进种子发芽,解决早熟桃杂交育种和实生选种的问题,以便培育出更早熟的高产优质桃新品种,满足人民生活的需要。

近年来,胚培养的技术日渐发展^[1,2,10,11,12,13,19,20]在桃胚培养方面进行了不少研究工作^[3,4,16,17,18]。一些研究报告指出,早熟桃果实发育日数在100天以内的种胚发育不充实,萌发率极低。许多胚培养试验^[3,9,16]表明,果实发育70—75天左右的品种,胚培养可以成功。Hesse & Kester^[18]认为胚的发育指数($PF_1 = \text{胚长}/\text{种子长}$)接近0.7时,是胚培养成功的最低值。S. W. Zagaja (1960)^[9]报道早熟桃以果实硬熟期取胚培养成苗率高。Brooks & Hough^[18]试验指出,种胚不行春化处理多发生莲座状叶。早熟桃和极早熟桃胚培养试管成苗率和入土成苗率都很低,前者在66%以下^[4,7],后者在50%左右^[3,6,7,9]。胡征令等^[3]最新报道,培养果实生育期为68—78天的杭州早水蜜等桃胚,获得入土成苗率50.86%。李安根等^[8]采用带培养基移植的方法,入土成苗率平均45%。庄恩及等^[11]指出,试管苗入土后大量死亡,但通过练苗,保湿及保持8℃以上的昼夜温差,可提高移栽成活率达69.2%。

早熟桃胚必须经过一定的低温春化阶段才能正常萌发生长。J. W. Lesley 和 J. Bonner (1952)^[18]是在2℃下贮藏果实7周, H. J. Brooks 和 L. F. Hough 则把接种后的胚放在4℃下2—4周。有的报告指出^[3,6,9,11],早熟桃胚培养经过60—70天低温(2—4℃)较为适宜。

本试验在前人研究的基础上,针对极早熟桃和早熟桃试管萌发率和入土成苗率低的问题,研究了胚发育程度,低温处理时间及试管苗入土等与成苗的关系,探寻胚培技

注 本文曾经中国科学院植物研究所王伏雄研究员、沈阳农学院景士西副教授及上海农科院果树研究室主任庄恩及同志审阅并提出修改意见,仅此致谢。

术, 提高胚培养成苗率, 期望达到育种上实用的目的。

材 料 和 方 法

本试验于1981年, 选用新端阳(Amsden June)、早香玉、1—3(桔早生实生)、东王母、凯旋(Triumph)、桔早生、4—11(晚黄金×早黄金)等品种(系)的自然传粉种子, 分别在果实硬熟前, 硬熟期和软熟期*采收, 于采收后的1—3天内除去果肉, 用小锤砸开种核, 再用无菌小镊子迅速将种胚置于事先灭过菌的磨口三角瓶中。带入接种室后, 用70%酒精消毒1分钟, 5%NaClO消毒5—8分钟, 0.1%升汞消毒10分钟。整个消毒过程, 均用手轻轻摇动。最后用无菌水冲洗4—5次, 然后去掉种皮, 立即接种。试管口用棉塞塞紧, 外包一层牛皮纸。

除不经低温处理的对照外, 于接种的当日将种胚置于1—5℃的冷库中, 进行不同时间的低温处理。

种胚经低温处理后, 放在培养室培养。培养室温度, 白天 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 晚上 $18 \pm 2^\circ\text{C}$, 用3—5支40瓦日光灯补充光照, 光照强度1500—3000勒克斯, 每天照光16小时。

经4周培养, 检查试管胚萌发和生长情况。试管成苗后在室内自然光下锻炼3—5天, 开口锻炼2—3天, 洗净培养基, 移入3份土、1份砂的塑料钵中。培养土在 120°C 烘箱中处理4小时。入土后的幼苗先置于 $16-20^\circ\text{C}$ 的较低温度、70%相对湿度和1500勒克斯的光照条件下, 两周后温度和光照逐渐升高到 20°C 和3000勒克斯。后期浇灌适量的 $\frac{1}{2}$ Tukey培养液。

以Tukey培养基为主。(新端阳的极小胚培养采用了Tukey和Norstog两种培养基)。为了防止铁盐沉淀, 采用Fe—Na—EDTA代替培养基中的 FeSO_4 。培养基在1公斤/[厘米]²下灭菌25分钟, 灭菌前用1N NaOH和Hcl调pH值到5.8。

在试管培养的同时, 留出样本进行种胚干重分析和 PF_1 (胚长/种子长)值测量。

试 验 结 果

一、应用胚培养技术提高早熟桃种子萌发率和成苗率

在陕西武功地区, 新端阳6月中旬成熟, 果实发育65天时, 种胚很小(图5), PF_1 值仅0.42(表1), 种子多为胚乳充满, 经层积处理后播种, 不能发芽。即使果实充分成熟时(发育74天), 常规播种也不能发芽出苗。早香玉和1—3, 6月22日采收, 果实发育73天, 东王母6月27日采收, 果实发育82天, 种胚瘦小, 播种都不发芽。凯旋和桔早生分别于7月3日和7月6日采收, 果实发育88天和90天, 种胚发育较为充实, 但常规播种发芽率极低, 分别为3.3%和6.7%(表2)。

在我们的试验中, 通过胚培养显著地提高了早熟桃种胚的萌芽率和成苗率(表3)。

- * 硬熟前: 果实尚未达到最大体积, 底色绿或无红色, 涩不能食。
- 硬熟期: 果实接近最大体积, 底色转黄较鲜艳, 质硬而脆, 酸度下降。
- 软熟期: 果实达到最大体积和固有风味, 质软或富弹性, 色泽艳丽。

表1 早熟桃不同发育天数种胚比较

品 种	胚发育 天数	种子平均 湿重 (mg)	种子平均 干重 (mg)	干物质 %	PF ₁ 值
新 端 阳	65	415	35	8.43	0.42
早 香 玉	72	561	51	9.09	0.67
1—3	70	522	54	10.34	0.89
东 王 母	82	604	77	12.75	0.89
凯 旋	88	630	119	18.89	0.91
桔 早 生	90	709	100	14.10	0.93

表2 早熟桃种子层积处理后播种出苗情况*

品 种	胚发育天数	播 种 数	萌 芽 数	萌芽率(%)	成 苗 数	成苗率(%)
新 端 阳	65	30	0	0	0	0
1—3	70	30	0	0	0	0
早 香 玉	72	30	0	0	0	0
东 王 母	82	30	0	0	0	0
凯 旋	88	30	1	3.3	1	3.3
桔 早 生	90	30	2	6.7	2	6.7

* 种子采收后沙藏于花盆,埋于背阴处地面1尺以下,次年2月下旬挖出播于温室营养钵中。

表3 胚培养对早熟桃成苗的影响

品 种	胚发育天数	接 种 数	萌 芽 数	萌 芽 %	成苗数**	入土成苗%
新 端 阳*	65	32	28	87.5	24	85.7
1—3	70	87	71	81.6	37	52.1
早 香 玉	72	23	19	82.6	15	78.9
东 王 母	82	98	70	71.4	67	95.7

凯 旋	88	87	69	79.3	57	82.6
桔 早 生	90	61	58	95.1	42	72.4
平 均				82.9		77.9

• 新端阳在 Tukey 培养基中培养25天后，转入 Norstog 培养基中再培养 2—3 周。
** 苗高 2—5 厘米，5—7片真叶，具较发达的根系。

二、果实不同熟期对胚萌发生长的影响。

1—3、东王母、凯旋、桔早生、4—11等 5 个品种，在三个不同熟期胚培比较试验中，三个熟期都能成苗（图 1、2、3），以硬熟期的胚成苗率最高（表 4），表明胚培养果实采收的成熟度以硬熟期为宜。胚发育期 100 天以内的早熟桃种子，每个品种三个熟期平均试管成苗率在70%以上。硬熟前和软熟期胚的成苗率无显著差异，但早熟桃除 1—3 软熟期成苗率比硬熟前略高外，其余几个品种软熟期均比硬熟前稍低些。总的来看，5 个供试品种的成苗率随胚发育天数的增加有提高的趋势。依胚苗生长势而言，胚发育时期越长的品种，胚苗也越健壮。其中 4—11最强，其次是凯旋和桔早生，东王母和 1—3 较弱。

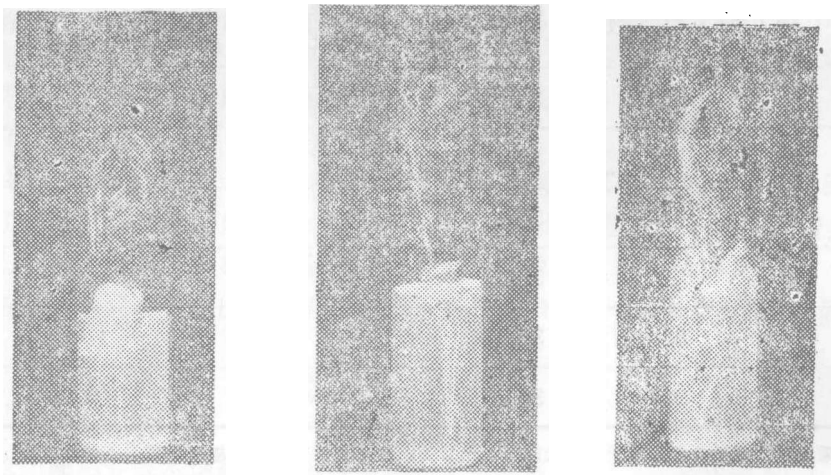


图 1 硬熟前

图 2 硬熟期

图 3 软熟期

表 4 不同发育时期对胚苗的影响

品 种	成 熟 度	胚发育天数	采 收 期	接种 胚数	试 管 苗		平 均
					数	%	
1—3	硬 熟 前	66	14/6	30	20	66.7	74.8
	硬 熟 期	70	18/6	29	25	86.2	
	软 熟 期	75	23/6	28	20	71.4	

东王母	硬熟前	78	23/6	35	27	77.1	70.0
	硬熟期	82	27/6	35	29	82.9	
	软熟期	86	1/7	28	14	50.0	
凯 旋	硬熟前	84	29/6	34	23	67.6	71.6
	硬熟期	88	3/7	30	26	86.7	
	软熟期	92	7/7	33	20	60.6	
桔早生	硬熟前	86	2/7	35	29	82.9	79.2
	硬熟期	90	8/7	34	31	91.2	
	软熟期	94	10/7	33	21	63.6	
4—11*	硬熟前	108	24/7	35	26	74.3	86.7
	硬熟期	112	28/7	35	35	100	
	软熟期	112	28/7	35	30	85.7	

注：上述品种均在1—5℃下处理80天，试管苗指高1cm以上，具有3片以上真叶的健全苗。

* 同一天在同一棵树上采收的硬熟期和软熟期果实。

三、低温处理时间长短对胚转绿及萌发生长的影响

通过对早香玉、东王母、凯旋、桔早生四个品种不同天数(0, 40, 60, 80, 100, 120天)的低温处理(1—5℃)(表5、6、7)可以看出, 不经低温处理胚也能转绿, 供试4个品种东王母转绿40%, 其余三个品种均在95%以上。经低温处理的胚随发育天数的增加, 转绿率也倾向于增加, 但东王母这个品种胚发育比早香玉多10天, 胚转绿率反低。

不经低温处理的早香玉, 东王母无正常苗, 凯旋、桔早生也极少, 仅9.4%和3.0%; 但莲座苗占相当比例, 早香玉4.8%, 东王母25.7%, 凯旋46.9%, 桔早生54.5%, 早熟桃胚发育期越长, 莲座苗越多。经低温处理莲座苗即减少以至消失。早香玉、东王母处理40天即全部消失, 凯旋、桔早生随处理时间延长逐渐消失, 前者80天, 后者120天全部消失。到一定的低温限度以后, 如果继续低温处理, 胚就会在低温处理过程中萌发生长。

需要低温处理的最适天数, 因品种胚的发育时期长短不同。胚发育期在82天以内的早香玉、东王母80—100天为宜(正常苗62.5—70.8%); 88天的凯旋40—80天为宜(正常苗74.3—83.3%); 90天的桔早生40天即可(正常苗70%)。胚发育期短的需低温时间长, 反之则短。

表 5 低温处理时间对胚萌发生长的影响

品种	低温处理 天数	胚发 育期	接种 胚数	胚 转 绿		正 常 苗		莲 座 苗		枯 顶 苗		其 它 苗*	
				数	%	数	%	数	%	数	%	数	%
早 香 玉	0	72	21	20	95.2	0	0.0	1	4.8	1	4.8	19	90.5
	40		29	26	89.7	16	55.2	0	0	4	13.8	9	31.0
	60		25	24	96.0	15	60.0	0	0	3	12.0	7	28.0
	80		23	19	82.6	15	65.2	0	0	0	0	8	34.8
	100		15	12	80.0	10	66.7	0	0	0	0	5	33.3
	120		14	12	85.7	10	71.4	0	0	0	0	4	28.6
东 王 母	0	82	35	14	40.0	0	0.0	9	25.7	5	14.3	24	68.6*
	40		35	25	71.4	8	22.9	0	0	3	8.6	24	68.6
	60		33	18	54.5	17	51.5	0	0	1	3.0	15	45.5
	80		32	23	71.9	20	62.5	0	0	1	3.1	11	34.4
	100		24	17	70.8	17	70.8	0	0	0	0	7	29.2
	120		46	31	67.4	30	65.2	0	0	1	2.2	15	32.6
凯 旋	0	88	32	31	96.9	3	9.4	15	46.9	4	12.5	10	31.3
	40		35	35	100.0	26	74.3	1	2.9	0	0	8	22.9
	60		32	31	96.9	24	75.0	1	3.1	0	0	7	21.9
	80		30	29	96.7	25	83.3	0	0	0	0	5	16.7
	100		27	26	96.3	17	63.0	0	0	0	0	10	37.0
	120		29	29	100.0	25	86.2	0	0	0	0	4	13.8
桔 早 生	0	90	33	32	97.0	1	3.0	18	54.5	11	33.3	3	9.1
	40		30	29	96.7	21	70.0	1	3.3	0	0	8	26.7
	60		31	31	100.0	9	29.0	15	48.4	0	0	7	22.6
	80		35	35	100.0	21	60.0	3	8.6	2	5.7	9	25.7
	100		30	29	96.7	20	66.7	3	10	3	10.0	4	13.2
	120		34	34	100.0	13	38.2	0	0	7	20.6	14	41.2

• 包括胚芽或胚根伸长、或未转绿的胚在内。

表6 4个桃品种之间的差异

品 种	胚转绿%	正常苗%	莲座苗%	枯顶苗%
早 香 玉	89.0 b	53.1 a	0.8 b	5.1 a
东 王 母	63.0 c	45.5 a	4.3 a	5.2 a
凯 旋	98.3 a	65.2 a	8.8 a	2.1 a
桔 早 生	98.9 a	44.5 a	20.8 a	11.6 a

注：采用新复极差测验，显著水平5%。

表7 不同低温处理时间之间的差异

低温时间 (天)	胚转绿%	正常苗%	莲座苗%	枯顶苗%
0	87.3 a	3.1 b	33.0 a	16.2 a *
40	92.6 a	55.6 a	1.6 b	5.6 a
60	92.0 a	53.9 a	12.9 a b	3.8 a
80	91.3 a	67.8 a	2.2 b	2.2 a
100	88.1 a	66.8 a	2.5 b	2.5 a
120	93.2 a	65.3 a	0 b	5.7 a

注：采用新复极差测验，显著水平5%。

四、提高胚苗移栽入土成活率

试管苗移入土中后，常致幼苗大量死亡^[1,8]。我们以前的试验，入土阶段死亡率也很高。这主要表现为：①幼苗根颈部变褐皱缩，②试验苗根系虽好，而根毛发育不良，③试管苗叶片角质层很薄，极其嫩弱。胚培苗从试管中移入土壤中，死亡的主要原因是环境条件发生了根本变化。

国外研究人员强调：①钵土消毒，②幼苗遮盖保湿或间歇喷雾，③试管苗锻炼。但缺乏系统的研究报告，我们经过多次小型试验，采取以下措施，收到较好效果。

1. 锻炼：当种胚在培养室内培养2—3周后，试管苗高2厘米以上，具有5—7片真叶时，在3000勒克斯的较强光照下培养一周，再在室内自然光下锻炼3—5天，然后打开管口练苗2—3天，每天用吸管滴入2滴蒸馏水。

2. 幼苗移栽及土壤处理：洗净幼苗根上的培养基，移入3份土、1份砂的塑料营养钵中，培养土在120℃烘箱中处理4小时。

3. 管理: 幼苗移栽后灌透底水, 培养室保持18—20℃的较低温度, 70%以上的空气相对湿度和1500勒克斯的光照强度及16/8小时的光周期。2—3天后表层撒上细干土, 根据需要, 在盛营养钵的搪瓷盘内浇渗水。两周后逐渐升高温度和光照强度到20—25℃和3000勒克斯。幼苗开始旺盛生长时, 补充浇灌 $\frac{1}{2}$ Tukey营养液。

在上述同样的管理条件下, 作了下面的药剂处理试验。

(1) 代森锌处理: 移栽时洗净幼苗根部培养基, 用0.1%代森锌浸根3—5分钟, 或移栽后向根颈部滴0.1%代森锌3—5滴, 每隔3天滴一次, 连续数次。

(2) IBA处理: 50 ppm IBA液浸根20分钟。

(3) IBA与GA₃处理: 50 ppm IBA液浸根20分钟, 清水冲洗后移栽, 栽后用0.25 ppm GA₃喷叶。

(4) 对照: 水浸根20分钟。

结果表明药剂处理者均比对照成活率高, 以0.1%代森锌浸根3—5分钟入土成苗率最高(表8、图4)甚至象新端阳等发育极弱的胚培苗入土成活率也很高。



图4 凯旋入土成活植株

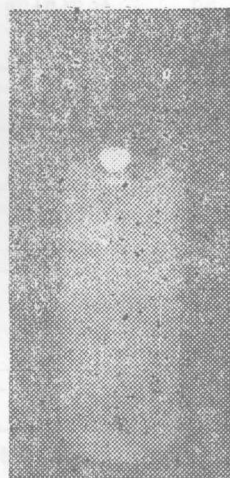


图5 刚接种的新端阳幼胚

表8 不同药剂处理对胚苗移栽成活的影响

试验号	药剂处理方法	移苗数	成活数	成活率 %
1	50ppm IBA 浸根20分钟	20	15	75
2	50ppm IBA 浸根20分钟, 叶面喷0.25ppm GA ₃	39	35	89.7
3	0.1%代森锌浸根3—5分钟	37	37	100
4	对照: 水浸根20分钟	35	24	68.6

讨 论

有些早熟桃胚培报道^[3,9,16],果实发育70—75天的品种胚培养可以成功。Hesse & Kester^[18]认为胚发育指数(PF₁)接近0.7时是胚培养成功的最低值。我们以新端阳为材料,果实发育天数为65天,胚发育指数为0.42,用Tukey培养基培养25天后转入Norstog培养基培养2—3周,萌芽率达87.5%,入土成苗率为试管萌芽数的85.7%(图6、7)。早熟桃幼胚培养成功,除与胚发育天数和胚的发育指数有关外,与培养基成份也有密切关系。培养基的比较试验很少报告,今后应作广泛研究。



图6 新端阳试管苗

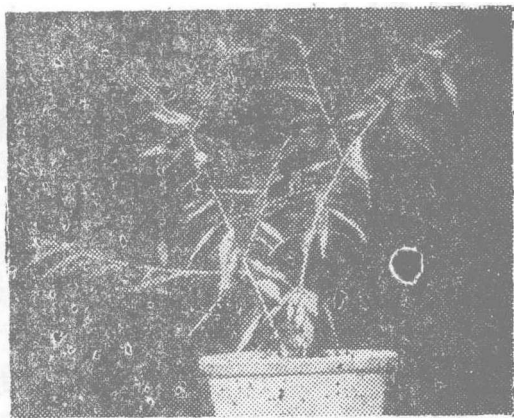


图7 新端阳入土幼苗

许多试验报道^[3,9,9,14]早熟桃胚培经过60—70天低温(2—4℃)适当,我们试验显示,低温处理最适时间因品种的熟期而异,熟期早的品种如早香玉、东王母80—100天最好,熟期较晚的凯旋40—80天最好,桔早生40天即可满足对低温的要求。

果实发育程度与试管成苗的关系,我们用1—3等5个品种试验结果,均以硬熟期萌芽率最高,达82.9—100%,这与查格耶等及其它研究结果一致。硬熟前,软熟期成苗率均低,前者与果实发育期短、胚发育不完全、干物质累积少有关,后者可能与果实发育终止、胚中抑制物质含量高于生长素类物质含量有关。

有的研究报告^[6]认为胚不经低温处理子叶不形成叶绿素。我们以早香玉、东王母、凯旋、桔早生四个品种试验,都得到相反的结果,不经低温处理除东王母胚转绿40%外,其余三个品种转绿都在95.2%以上,与低温处理的几乎没有什么区别。且低温处理120天的东王母未转绿的达32.6%,而未经低温处理的凯旋、桔早生未变绿者仅3.1%和3.0%。胚培叶绿素的合成可能因品种不同而异,大概与品种的遗传特性有关。

种胚转绿与胚发育天数有关,但并不单纯取决于胚发育期。早香玉胚发育期为72天,东王母为80天,前者转绿89%,后者反而还低(63%)(表5)。我们另一个试验,新端阳硬熟前的胚,发育期为65天,32个胚中有6个为部分转绿,其余26个全部子叶转绿。

参 考 文 献

〔1〕 中国科学院上海植物生理研究所细胞室, 1978, 植物组织和细胞培养, 上海科学技术出版社

〔2〕 沈德绪等主编, 1980, 果树育种学, 上海科学技术出版社

〔3〕 胡征令等, 1981, 早熟桃胚培养技术的研究, 中国果树 (3) 35—37

〔4〕 庄恩及等, 1981, 特早熟桃的育种, 上海农科院园艺研究所 (油印本)

〔5〕 上海农科院园艺研究所, 1975, 早熟桃胚培育种初报, 桃子罐藏品种与加工资料汇编 (1)

〔6〕 浙江农业大学园艺系, 1975, 桃胚培养试验报告 (油印本)

〔7〕 王文宽等, 1980, 早熟桃胚培养试验研究, 南京园林资料汇编 (2)

〔8〕 李安根等, 1981, 早熟桃胚培养, 山西果树, (2) 13—15.

〔9〕 路广明等, 1977, 早熟桃种胚人工培养试验, 西北农学院学报, 复刊号 39—44

〔10〕 章文才, 1981, 组织培养在果树科学上的应用, 园艺学文摘, (1) 1—4

〔11〕 王元裕等, 1981, 柑桔胚培养技术的研究, 园艺学报, 8 (1) 13—17

〔12〕 赵惠祥, 1979, 梨的胚培养, 中国农科院果树所科学研究年报, 127—129

〔13〕 王鸣, 1979, 现代育种学的发展, 农业出版社。

〔14〕 中国科学院北京植物研究所等, 1974, 早熟桃的培育, 植物学杂志,

I (4)

〔15〕 罗士韦, 1979, 植物组织培养在花卉上的应用, 植物生理学通讯, (3) 1—9

〔16〕 L. F. Hough, 1980, 果树育种, 北京农业大学

〔17〕 Calvin A. Smith, 1981, 从未成熟胚培养某些果树种苗的方法, 北京农业科技, (1) 19—27

〔18〕 J. Janick and J. N. Moore edited, 1975, Advances in Fruit Breeding, 《Purdue University press》

〔19〕 Narayanaswami, S. & Norstog, K. 1964, Plant Embryo Culture, Bot. Rev., 30 (4) 587—628

〔20〕 Бутенко Р. Г. 1979, Использование культуры тканей в сельскохозяйственной науке и практике, —С—Х.Биол., 14 (3)

Study on The Embryo Culture Techniques of Early Maturing peach In vitro

Yang Zenghai Hu Niyun Lu Guangming

Abstract

The Germination rate of early maturing peach embryoes cultured in vitro was the highest in the hard-ripe stage. The germination rate of the 4 varieties used in testing was above 82%.

The optimum stage for treating embryoes at the low temperature varies with varieties. Such varieties as Zao Xiang Yu and Dong Wang Mu require 80—100 days, respectively, Triumph 40—80 days and Ju Zao Sheng 40 days.

When Amsden June embryoes were cultured on Tukey medium for 25 days, then transplanted onto Norstog medium for 2—3 weeks, the germination rate was up to 87.5%.

Apart from attention paid to hardening seedlings, soil sterilization, temperature, humidity and illumination, the survival rate can be raised by soaking seedling roots in the concentration of 0.1% of Dai Sen Xin for 3—5 minutes before transplanted into the soil. Therefore, the survival rates of the 6 varieties used in testing were as follows: Amsden June: 85.7%; 1—3: 52%; Zao Xian8 Yu: 79%; Dong Wang Mu: 96%; Triumph: 83% and Ju Zao heng: 72.4%.