

早熟桃胚珠离体培养研究

刘用生* 胡霓云 路广明

(西北农业大学园艺系, 陕西杨陵)

摘 要 胚发育指数分别为0.15和0.40的‘西农早蜜’桃幼胚在胚珠离体培养条件下维持胚性生长, 转移胚培养后各获得77.8%和100%的成苗率, 克服了桃幼胚营养中存在的早熟萌发、成苗率低等问题。此外, 取盛花后10 d (胚处于二细胞原胚期)、17 d (球形胚)、24 d (球形胚)、31 d (心形胚)、38 d 和 45 d (肉眼看不到的幼胚) 的胚珠进行培养, 分别获得1.7%, 3.4%, 14.3%, 22.4%, 53.4% 和 57.9% 的成苗率, 为克服李属果树种间杂交桃胚早期败育的障碍, 提供了新方法。本文还研究了影响胚珠培养的有关因素。

关键词 桃, 早生品种, 胚珠, 离体培养

中图分类号 Q 944.6, S 662.103.5

80年代以前早熟桃胚胎培养多采用发育较完善的胚进行培养。近年来, 不少人将胚发育指数为0.1~0.42的幼胚培养成苗^[1,2], 但因培养中极易发生早熟萌发, 成苗率低, 苗细弱、畸形, 很难移栽成活。因此, 如何使幼胚维持胚性生长, 克服早熟萌发, 一直是引人注目的问题^[1-3]。此外, 在李属果树种间杂交中, 以桃为母本的杂交组合往往发生胚的早期败育^[4], 采用幼胚培养已无能为力。

Ramming^[5]利用胚珠培养技术使小于1mm的早熟桃幼胚进一步生长, 但未能使其萌发成苗。姚强等^[6]使盛花后48 d以前的早熟桃幼胚, 在胚珠培养条件下未能取得成功。本试验采用胚珠培养方法, 旨在克服幼胚培养的早熟萌发, 提高成苗率, 并使更早期的胚珠培养成功, 为极早熟桃育种和李属种间杂交育种奠定基础。

1 材料与方法

试验于1988~1989年在西北农业大学园艺系进行。试材为自然授粉的‘西农早蜜’桃果实内的胚珠。从盛花后第3天开始, 每周取样一次, 共9次。田间采样后取出一部分胚珠保存在Sanfelice固定液中, 用石蜡切片法观察接种时胚所处的发育时期; 另各取20个胚、胚珠测其长度并称重; 其余样品在室内经表面消毒后, 剖出胚珠接种。每瓶接种4~6个, 每个处理12~14瓶。接种后的胚珠在 $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 1000 lx, 每天16 h光照条件下培养, 20~60 d后将长大的胚转至新培养基中(盛花后31 d以前接种的胚珠, 其胚转至M9培养基中; 38 d以后的转至TM培养基中)。经 $1 \sim 5^\circ\text{C}$ 70 d低温处理, 再在室内($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 3000 lx, 每天16 h光照)培养4周, 观察胚萌发成苗情况。盛花后不同

文稿收到日期: 1990-08-29。

*现在河南职业技术学院园艺系任教。

时期还做了取样时期、基本培养基种类和培养基状态、蔗糖浓度、有机附加物、外源激素等比较试验。

2 结 果

2.1 桃胚、胚珠的生长发育状况

通过石蜡切片观察到,盛花后10, 17~24, 31, 38~45 d分别为二细胞原胚、球形胚、心形胚及肉眼看不到的幼胚;盛花后52, 59 d为可见胚,其胚发育指数分别为0.15和0.40。胚珠在盛花后3~45 d内迅速增大,至第59天达到最大值(见图1和图2)。

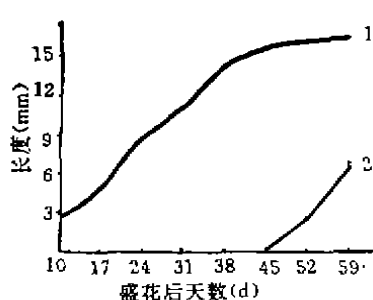


图1 胚、胚珠长度的变化
1. 胚珠; 2. 胚

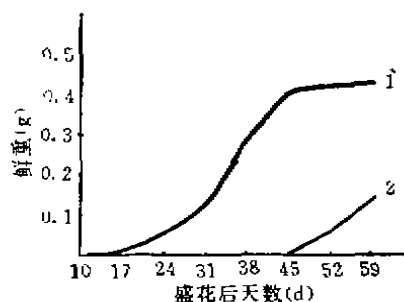


图2 胚、胚珠鲜重变化
1. 胚珠; 2. 胚

2.2 胚珠培养因子试验

2.2.1 取样时期 从盛花后第3~59天的胚珠分9次接种在改良BT₂固体培养基中〔附加蔗糖4%, BA 0.5, TRIA (卅烷醇) 0.5, LH 250〕, 培养后将胚再转移培养(见表1)。从表1看出, 盛花后3~10 d的胚珠培养未能得到可见胚, 盛花后17~59 d的胚珠培养, 随着时间的延长, 可见胚率、成苗率呈升高的趋势。盛花后59 d的培养效果最好。从不同取样时期的胚珠培养效果(表2)可以看出, 可见胚率、成苗率和正常苗率随着胚发育程度的提高而逐渐增高。

表1 不同取样时期对胚发育及成苗的影响

盛花后天数 (d)	接种数	可见胚率 (%)	平均胚长 (mm)	成苗率 (%)
3	60	0.0	—	0.0
10	45	0.0	—	0.0
17	58	3.4	3.0	3.4
24	12	41.7	2.4	8.3
31	52	40.4	3.4	9.6
38	54	51.9	4.7	10.9
45	47	80.8	7.0	43.9
52	47	100.0	7.4	50.0
59	45	100.0	11.6	100.0

2.2.2 基本培养基 在盛花后3, 24, 38, 59 d的胚珠培养中, 分别采用Nitsch, N6, MT, SH, 改良BT₁和改良BT₂ 6种基本培养基(均附加BA 0.5, TRIA 0.5, LH 250, 4%蔗糖)进行比较试验。结果表明, 盛花后3 d在所有培养基上均未获得可

见胚。盛花后24 d在各种培养基上都获得了较低的可见胚率和成苗率,培养基间无显著差异。其中在改良BT₁培养基上获得了23.8%的可见胚率和14.3%的成苗率。盛花后

表2 不同取样时期的成苗效果

%

盛花后天数(d)	接种数	可见胚率	成苗率	正常苗率
10	58	1.7	1.7	0.0
17	58	3.4	3.4	0.0
24	21	23.8	14.3	14.3
31	49	36.7	22.4	22.4
38	55	76.4	53.4	50.9
45	39	82.0	57.9	53.1
52	36	100.0	77.8	77.8
59	51	100.0	100.0	97.2

38 d在N₆培养基上效果最佳(见表3)。盛花后59 d的胚珠,其平均胚长为6.4 mm,胚经培养后得到了较好的发育。在N₆培养基上,平均胚长为13.0 mm,比原来增长了

表3 培养基对胚发育及成苗的影响*

%

培养基	接种数	可见胚率	平均胚长(mm)	成苗率	正常苗率
Nitsch	48	52.1 ^c	5.2	17.4 ^{c d}	13.9 ^{c d}
N ₆	55	76.4 ^{a b}	7.0	53.4 ^a	50.9 ^a
MT	40	57.5 ^{b c}	6.1	31.4 ^{b c}	26.1 ^{b c d}
SH	47	68.1 ^{a b c}	6.9	36.2 ^{a b c}	27.7 ^{b c}
改良BT ₁	61	78.7 ^{a b}	7.3	44.1 ^{a b}	38.4 ^{a b}
改良BT ₂	54	51.8 ^c	4.7	10.9 ^d	8.2 ^d

* 盛花后38 d.

1倍。在MT, SH, 改良BT₁和改良BT₂培养基上获得了100%的成苗率,其中在MT, SH培养基上分别获得了97.2%和96.6%的正常苗率,其效果最佳(见表4)。

表4 培养基对胚发育及成苗的影响*

%

培养基	接种数	平均胚长(mm)	成苗率	正常苗率
Nitsch	44	10.5	72.2 ^b	44.4 ^c
N ₆	47	13.0	86.2 ^{a b}	68.9 ^b
MT	51	11.8	100.0 ^a	97.2 ^a
SH	45	11.8	100.0 ^a	96.6 ^a
改良BT ₁	39	11.7	100.0 ^a	87.0 ^{a b}
改良BT ₂	45	11.6	100.0 ^a	75.0 ^b

* 盛花后59 d.

2.2.3 培养基状态 盛花后10, 31, 52 d的胚珠分别接种在固体(0.6%琼脂)和液体(脱脂棉作支撑物)的改良BT₂培养基中)均附加BA 0.5, TRIA 0.5, LH 250, 4%蔗糖(糖)。结果表明,盛花后10 d仅在液体培养基上得到一个可见胚,将其转移培养后得到株畸形苗。盛花后31 d在液体培养基上未获可见胚,而在固体培养基上得到了40.4%的可见胚率和9.6%的成苗率。盛花后52 d的培养效果,固体培养基上的显著优于液体培养(见表5)。

2.2.4 蔗糖浓度 将盛花后17, 24, 38, 52 d的胚珠接种在附加不同浓度蔗糖的改良BT₂培养基上进行培养。结果表明,盛花后17 d仅在4%, 6%两个处理中得到了很低

的可见胚率和成苗率。盛花后24 d在5个处理中均获得较低的可见胚率和成苗率。盛花

表5 培养基状态对胚发育及成苗的影响

盛花后天数	培养基状态	接种数	可见胚率(%)	平均胚长(mm)	成苗率(%)
10	固	45	0.0	—	0.0
	液	58	1.7	4.0	1.7
31	固	52	10.4	3.4	9.6
	液	60	0.0	—	0.0
52	固	47	100.0	7.4	56.0
	液	29	100.0	6.5	10.3

后38 d在2%处理中所得可见胚率显著低于其它4种处理的,8%和10%两处理的成苗率和正常苗率显著高于前3个处理的(见表6)。此外,在8%和10%两处理中,出现

表6 蔗糖浓度对胚发育及成苗的影响*

%

蔗糖浓度	接种数	可见胚率	平均胚长(mm)	成苗率	正常苗率
2	50	10.0 ^b	3.3	0.0 ^c	0.0 ^c
4	54	51.8 ^a	4.7	10.9	8.2 ^{b,c}
6	40	62.5 ^a	6.7	27.5 ^b	25.0 ^b
8	47	57.4 ^a	6.5	55.2 ^a	45.5 ^a
10	46	93.0 ^a	6.3	52.6 ^a	44.1 ^a

*盛花后38d.

了一些三子叶苗。盛花后52 d在6%,8%,10%三处理中所得成苗率和正常苗率显著高于2%,4%两处理,其中以6%,8%效果较好(见表7)。

表7 蔗糖浓度对胚发育及成苗影响*

%

蔗糖浓度	接种数	可见胚率	平均胚长(mm)	成苗率	正常苗率
2	38	100.0	6.8	43.8 ^b	31.2 ^c
4	47	100.0	7.4	50.0 ^b	41.7 ^{b,c}
6	27	100.0	8.0	83.3 ^a	66.7 ^a
8	36	100.0	7.5	77.8 ^a	77.8 ^a
10	36	100.0	6.7	66.7 ^a	58.3 ^{a,b}

*盛花后52d.

2.2.5 果糖、葡萄糖及活性炭 盛花后45 d的胚珠,分别接种在附有1%果糖,1%葡萄糖,0.1%活性炭的改良BT₂固体培养基(附加BA 0.5, TR⁺A 0.5, 4%蔗糖)中,结果表明,附加1%果糖或葡萄糖可显著提高成苗率和正常苗率;附加0.1%活性炭也可提高成苗率与正常苗率,但未达显著水平(见表8)。

表8 果糖、葡萄糖等对胚发育及成苗影响

%

处理	接种数	可见胚率	平均胚长(mm)	成苗率	正常苗率
CK	37	76.9 ^a	5.4	22.8 ^c	19.9 ^b
1%果糖	37	86.5 ^a	7.1	64.1 ^a	44.8 ^c
1%葡萄糖	34	91.2 ^a	6.7	56.6 ^{a,b}	34.6 ^{a,b}
0.1%活性炭	56	69.6 ^a	7.2	41.1 ^{b,c}	26.8 ^{b,c}

2.2.6 有机附加物 盛花后10, 31, 52 d的胚珠分别接种在附加LH, CH, GLN(浓度均为250, 500, 1000 mg/L)及YE(0.05%, 0.2%, 1.0%)的改良BT₂固体培养基

基中。结果表明,盛花后10 d 各处理均未得到可见胚。盛花后31 d,在附加GLN 250处理中获得82.4%的可见胚率,显著高于对照;而附加1.0% YE则仅获得11.4%的可见胚率,显著低于对照。在附加LH 1000、CH 1000、YE 0.2%和YE 1.0%的处理中未能成苗。盛花后52 d,在培养基中附加CH 250和CH 500可显著提高成苗率,但附加1.0% YE则显著降低了成苗率。

2.2.7 外源激素 盛花后17, 45 d的胚珠接种在附加BA (0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5)、IAA 0.5, TRIA 0.5以及BA 0.5+IAA (0.1, 0.5, 2.5)和BA 0.5+TRIA (0.1, 0.5, 2.5)的改良BT₂固体培养基中。结果表明,盛花后17 d只有在BA 0.5+TRIA 0.5的处理中得到了很低的可见胚率和成苗率。盛花后45 d的成苗率和正常苗率以BA 0.5+TRIA 2.5的最高,分别为57.9%和53.1%。

3 讨论

3.1 胚珠培养的意义

胚珠培养是幼胚培养技术的重要改进。胚珠在离体培养条件下既能维持胚性生长,又不发生早熟萌发,待胚充分发育后再行胚培养便极易成功。如果幼胚在胚珠离体培养条件下发育得很充实,还可直播于土中,不但简化了培养程序,而且能减少试管苗移栽时造成的损失。我们采用胚珠培养,使盛花后10~59 d内发育不同的幼胚都得到进一步生长,并取得不同程度的成苗率,对于特早熟桃育种以及李属果树种间杂交都有重要意义。随着此项研究的继续和深入,若能使盛花后10 d内的胚珠培养取得成功,则采用试管受精技术克服李属果树种间杂交不亲和性的障碍将成为可能。因此,更早期的胚珠培养技术值得进一步研究。

3.2 早熟桃胚珠培养的影响因素

3.2.1 取样时期 一般认为,取样时期越早,则胚所处的发育阶段越早,也就越难培养。培养球形胚期的胚珠成功例子较多,而培养受精后不久的胚珠成功的却很少^[1]。姚强等对盛花后48 d以前的桃胚珠培养未能成功^[6]。本试验虽使盛花后10~45 d的桃胚珠培养成功,但仍存在取样时期越早,成苗率越低的问题。我们认为,在育种实践时,应使胚在植株体内发育到最大限度再行离体培养,以取得最佳效果。对于早熟和极早熟桃品种,在硬熟期取胚珠培养效果最好;在克服种间杂交不育时,应在杂种胚即将败育之前进行胚珠离体培养。当然,杂种胚败育越早,取样时期亦越早,成苗效果越差。应通过改进培养技术以提高成苗效果。

3.2.2 培养基种类及状态 Ramming、姚强等进行桃胚珠培养时采用SH培养基^[5,8]。本试验表明,不同取样时期采用不同培养基效果差异显著,盛花后38, 59 d分别以N₆、MT为宜,棉花胚珠培养几乎全采用液体培养基^[6]。Gray、姚强等人认为固体培养基优于液体培养基^[6,7]。本试验表明,‘西农早蜜’桃后期的胚珠培养,固体培养基显著优于液体培养基。

3.2.3 蔗糖浓度及其它碳源 Ramming认为6%蔗糖对油桃胚珠培养效果最好^[5]。姚强认为4%蔗糖对盛花后48 d的桃胚珠培养效果最好^[6]。本试验表明,盛花后38, 52 d的胚珠在较高浓度蔗糖(8%)的培养基中成苗效果最好。此外,盛花后38 d的胚

珠在附加较高浓度蔗糖(8%~10%)的培养基中产生了一些三子叶苗,值得进一步研究。Beasley 发现在培养基中加入果糖或葡萄糖时可防止棉花胚珠变褐,且不会限制胚珠膨大^[8]。本试验表明,在培养基中附加1%果糖或葡萄糖,虽不能阻止胚珠变褐,但能显著提高成苗率与正常苗率。

3.2.4 有机附加物 一般认为,有机附加物中含有多种氨基酸和生长物质,对胚珠培养是有利的^[1]。本试验表明,仅在特定的取样时期,某些有机附加物对桃胚珠培养有利。

参 考 文 献

- 1 杨增海. 园艺植物组织培养. 北京: 农业出版社, 1987. 130~178
- 2 朱际君, 汪祖华, 蔡兴元. 特早熟桃幼胚培养技术. 江苏农业学报, 1985, 1 (3) : 41~43
- 3 Hesse C O. Peaches. In: Janick J, Moore J N. *Advances in fruit breeding*. Purdue: The Univ. Pr, 1975. 285~335
- 4 Perez S, Moore J N. Prezygotic endogenous barriers to interspecific hybridization in *Prunus*. *J Amer Soc Hort Sci*, 1988, 110 (2) : 267~273
- 5 Ramming D W. In ovule embryo culture of early-maturing *Prunus*. *Hortscience*, 1985, 20 (3) : 419~420
- 6 姚强, 路广明, 胡霓云等. 早熟桃胚珠培养技术研究初报. 果树科学, 1988, 5 (4) : 164~168
- 7 Gray D J, Fisher L G, Mortensen J H. Comparison of methodologies for in ovule embryo rescue of seedless grapes. *Hortscience*, 1987, 22 (6) : 1334~1335
- 8 Beasley C A, Ting I P. The effects of plant growth substances on in vitro fiber development from fertilized cotton ovules. *Amer J Bot*, 1973, 60 (2) : 130~139

Research on Ovule Culture in Vitro of Early-maturing Peach

Liu Yongsheng Hu Niyun Lu Guangming

(Department of Horticulture, Northwest Agricultural
University, Yangling, Shaanxi)

Abstract Young embryo of "Xinong early-maturing honey peach" with embryo developing indexes of 0.15 and 0.40 can maintain the embryo growth under the conditions of in vitro culture of ovule. After the transfer culture, the obtained plantlet survival rates were 77.8% and 100% respectively, thus, solving the problems of early-maturing germination existed in the young embryo culture, and low normal plantlet ratio. In addition, the ovules taken from 10 days (embryo with two cells), 38 days (globular embryo), 24 days (globular), 31 days (heart-shaped), 38 days and 45 days (immature embryo invisible by naked eyes) were cultured, the plantlet survival rates were 1.7%, 3.4%, 14.3%, 22.4%, 53.4%, and 57.9% respectively, thus, providing a new method to overcome the barriers of the early abortion of peach embryo in interspecific cross of *Prunus*. Also, the paper deals with some other elements affecting ovule culture.

Key words peach, early-maturing variety, ovule, culture in vitro

· 简 讯 ·

西瓜新品种“西农8号”

荣获全国首届西甜瓜优良品种评选第四名

由农业部主持和组织的全国首届西甜瓜优良品种评选活动,经过河南、河北及连云港三个试验点的田间试验及室内鉴定评比,在全国各地选送的54个参加评选的新品种中,评选出了前10名。我校西瓜甜瓜研究室(主持人王鸣教授,主要参加人张兴平讲师)经多年试验选育的“西农8号”被评为第四名,其得分远超过对照品种台湾益农“新红宝”。“西农8号”以抗病、丰产、外观美、含糖量高、质细味甜、商品性好等优点受到广泛好评。该品种近年来在陕西、甘肃、山东、上海、北京、天津、武汉、吉林等地试种或示范均表现良好。