

早熟桃胚退化的相关因子研究

万春雁^{1,2}, 韩明玉², 糜林¹, 赵彩平², 徐金涛², 杨勇², 李国平¹

(1 江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 江苏 句容 212400; 2 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**研究早熟桃品种“华光”种胚退化过程中形态指标、内源激素(GA3, IAA, 6-BA)含量的变化情况, 为探索胚退化机理及早熟桃的胚挽救育种提供理论依据。**【方法】**以早熟桃品种“华光”为试材, “曙光”为对照, 从幼果期至后熟期, 观测种胚的形态指标和内源激素水平的变化。**【结果】**“华光”、“曙光”的种胚鲜、干质量, 纵、横径及胚性指数均随果实发育呈增长趋势, “华光”上述指标在花后 65 d 达到最大值后迅速下降, 同时出现种胚退化现象, 而“曙光”上述指标仍呈小幅上升趋势; 6-BA 在 2 个桃品种种胚发育初期含量最高, 花后 45 d 降到最低, 到硬核期后达到次峰值, 随后下降, 其中“华光”在花后 65 d 出现第 3 个小高峰; 2 个桃品种 GA3 和 IAA 含量的变化趋势相似, 随着种胚的发育, 其含量均先上升后下降, 在硬核期达到最高, 其中“华光”在花后 65 d 后快速下降。**【结论】**“华光”种胚在花后 65 d 后外观形态指标呈下降趋势, 种胚开始退化, 应选择此时进行“华光”的胚培养; “华光”种胚中 6-BA 含量第 3 峰值出现时间与种胚退化时期一致, GA3 和 IAA 含量快速下降时其种胚开始退化, 因此在“华光”桃后期胚培养时应适当增加外源激素含量, 以提高胚萌芽率。

【关键词】 早熟桃; 胚退化; 形态指标; 激素

【中图分类号】 S662.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)12-0185-05

Factors on the seed embryos' degradation of early-ripening peach (*Prunus persica* L.)

WAN Chun-yan^{1,2}, HAN Ming-yu², MI Lin¹, ZHAO Cai-ping², XU Jin-tao²,
YANG Yong², LI Guo-ping¹

(1 Zhenjiang Institute of Agricultural Sciences of Jiangsu Hilly Area, Jurong, Jiangsu 212400, China;

2 College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to research the changes of morphological index and endogenous hormone level of “Huaguang” during the development of seed embryos, to find the mechanism of embryos' degradation and adopt corresponding countermeasures for breeding. **【Method】** The experiment was conducted with “Huaguang” and “Shuguang” to study different factors: morphological index and endogenous hormone level from the young fruit period to post-ripening period. **【Result】** The results showed that with the development of peach, the embryos' fresh weight, dry weight, vertical diameter, transverse diameter and index increased. But when all the indexes reached the top 65 days post-anthesis, they decreased with the phenomenon of embryos' degradation on “Huaguang”. Endogenous hormones had a close relationship with the development of seed embryos, 6-BA reached a top level at the beginning, another top at the stone hardening stage, then decreased, while “Huaguang” reached the third top 65 days post-anthesis; GA3 and IAA had similar variation tendency. With the development of seed embryos, they increased at the early time, then decreased and reached top level at the stone hardening stage, however, “Huaguang” decreased more quickly

* [收稿日期] 2010-04-28

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2008K01-11)

[作者简介] 万春雁(1984—), 女, 江苏涟水人, 助理研究员, 主要从事果树遗传育种研究。E-mail: yanzi525811@yahoo.com.cn

[通信作者] 韩明玉(1962—), 男, 陕西扶风人, 教授, 主要从事果树种质资源与遗传育种研究。E-mail: hanmy@nwsuaf.edu.cn

than “Shuguang” 65 days post-anthesis. 【Conclusion】 Therefore, all the indexes of morphological index decreased 65 days post-anthesis, with the phenomenon of embryos’ degradation on “Huaguang”, we proposed to take this period as the best embryo culture’ period of “Huaguang”; The third peak of 6-BA in the embryos of “Huaguang” was consistent with the period of embryos’ degradation, as well as the rapid decrease of GA3 and IAA, we suggested to take proper increase of exogenous hormone to improve the ratio of embryo’ germination on the later period of “Huaguang”.

Key words: Early-ripening peach; embryos’ degradation; morphological index; endogenous hormone

桃(*Prunus persica* L.)是世界性重要果树,我国是桃主产国,产量位居世界各国之首。桃是夏熟水果,其早熟品种成熟于水果淡季,深受消费者的欢迎;同时又因其果实发育期短,发育消耗的营养少,有利于树体恢复和花芽分化,能保证翌年的产量,而又受到生产者的喜爱^[1]。因此,选育优良的早熟、极早熟桃品种意义深远。在以成熟期目标的桃育种中,选择早熟品种作为亲本,后代出现早熟单株的比率较高,有利于培育出极早熟的品种^[2]。因此,利用早熟或极早熟桃品种作亲本,借助胚培养技术,是目前常用的选育早熟桃的育种方法。在胚培养过程中,提高胚的萌发率和成苗率非常重要^[3]。在早熟桃的胚培养研究中发现,极早熟桃“华光”在成熟后期,随着果实顶部的软化、成熟,胚出现退化现象,而与“华光”生育期相近的“曙光”未出现胚退化现象。在胚退化期,“华光”的胚萌发率为 0,这严重影响了早熟桃的育种工作^[4]。前人对桃^[5-7]、葡萄^[8]、甜樱桃^[9]、猕猴桃^[10]、刺梨^[11]、枣^[12]等果树种胚发育机理的研究,大都涉及到外观形态和内源激素含量的变化。本试验以“华光”、“曙光”为供试材料,从胚的形态指标和激素水平 2 个方面进行了比较研究,以期探索胚退化机理和早熟桃的胚挽救育种研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试植物 试验于 2008-04-06 进行,以 6 年生的桃品种“华光”、“曙光”为供试植物材料,其土、肥、水按常规管理,栽植密度为 3 m×4 m,均定植于西北农林科技大学桃种质资源圃。

1.1.2 仪器和试剂 LC-2010A HT 高效液相色谱仪(日本岛津公司),KQ-100DE 型超声波脱气机,PHS-3C 型精密 pH 计和 SENCOR 系列旋转蒸发器。赤霉素(GA3)、生长素(IAA)和 6-苄氨基嘌呤(6-BA)标样由美国科邦生物公司生产,甲醇、乙酸乙酯和冰乙酸由科密欧公司生产,以上药品均为色

谱纯;石油醚为西安化学试剂厂生产(分析纯),试验用水为超纯水。

1.2 方 法

1.2.1 样果的采集 试验采用单株小区,选取长势一致的“华光”、“曙光”桃树各 3 株,从盛花后的 20 d 起,每 5 d 取 1 次样,每次每株取果 30 个,重复 3 次,08:00—09:00 采样,用冰盒带回实验室,其中用于激素测定的样果立即用液氮速冻后置于超低温冰箱中储存备用^[9]。

1.2.2 形态指标的测定 从每次采得的样果中取 10 个用于称量胚珠的鲜、干质量,并测定胚珠的纵、横径和胚的纵径,计算胚性指数:胚性指数=胚纵径/胚珠纵径。

1.2.3 激素含量的测定 (1)色谱条件。色谱柱为 Waters-Symmetry C18(4.6×250 mm),流动相为 V(甲醇):V(体积分数 0.075% 冰乙酸水溶液)=45:55,检测波长 254 nm,流速为 0.5 mL/min,进样量 10 μ L,柱温为 30 $^{\circ}$ C。

(2)标准曲线的绘制。根据 GA3、IAA 和 6-BA 的单标峰高情况,结合预备试验检测的桃胚中各激素含量范围,确定各激素标样质量浓度。以流动相为溶剂,分别配制 0.2 g/L GA3、0.2 g/L IAA 和 1.0 g/L 6-BA 标准溶液备用。取上述标准溶液,进行色谱检测,进样量分别为 1,2,3,4,5 μ L,根据各种激素的进样量和峰面积,绘制标准曲线。

(3)样品的处理和激素含量的检测。参照杨途熙等^[13]的方法处理样品。称取 1 g 鲜样品于研钵中,用液氮研磨成浆,加入体积分数 80% 甲醇 20 mL,保鲜膜密封,于 4 $^{\circ}$ C 冰箱里冷浸过夜。浸提液抽滤;用 10 mL 甲醇润洗研钵 2 次,过滤后与浸提液合并,40 $^{\circ}$ C 下减压蒸发至没有甲醇残余,将剩余水相转移到三角瓶中,用 30 mL 石油醚萃取脱色 2 次,弃去醚相,调水相 pH 为 6.4,加 0.15 g PVP,超声 30 min,抽滤。将滤液 pH 调至 2.9,用 30 mL 乙酸乙酯萃取 3 次,合并酯相,40 $^{\circ}$ C 下减压蒸干。用流动相溶解残渣并定容至 2 mL,经 0.45 μ m 微孔

滤膜过滤得待测液,保存于 4 ℃ 冰箱中。取待测液 10 μ L,在上述色谱条件下注入高效液相色谱仪($n=3$),积分法求色谱峰面积,以标准曲线计算样品中各种激素的含量。

2 结果与分析

2.1 生育期内“华光”和“曙光”种胚的发育

图 1 显示,“曙光”种胚的鲜质量在生长发育期

内呈上升趋势,其中花后 30~45 d 增长最快,45 d 后增长平缓。“华光”种胚的鲜质量在花后 65 d 前呈上升趋势,65 d 后快速下降。观察结果表明,从花后 70 d 起,“华光”的种胚开始出现退化现象,种胚逐渐皱缩变瘪,种皮变为黄褐色,随后该现象继续加重。“华光”、“曙光”胚的干质量与其鲜质量变化趋势基本一致,不再详述。

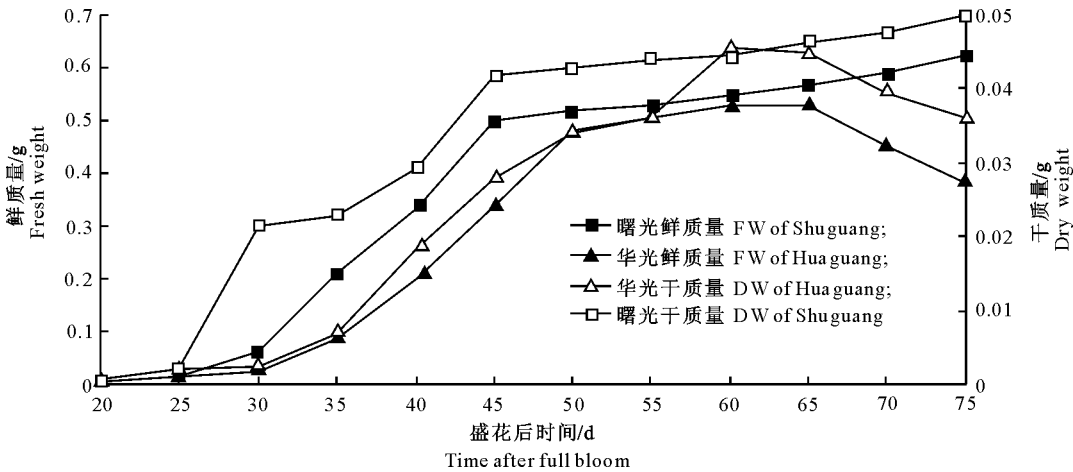


图 1 生育期内“华光”和“曙光”种胚鲜、干质量的变化

Fig. 1 Changes of embryos' fresh weight, dry weight of "Huaguang", "Shuguang" during the growth period

由图 2 可以看出,随着胚的发育,“曙光”胚珠的纵径总体呈上升趋势;而“华光”胚珠的纵径在花后 65 d 前呈上升趋势,65 d 后开始下降。“曙光”胚珠的横径总体也呈上升趋势,且在胚发育后期横径的

增加幅度变大;“华光”胚珠的横径在花后 65 d 后前呈上升趋势,65 d 后开始下降。总体而言,“华光”、“曙光”种胚的纵径明显大于横径。

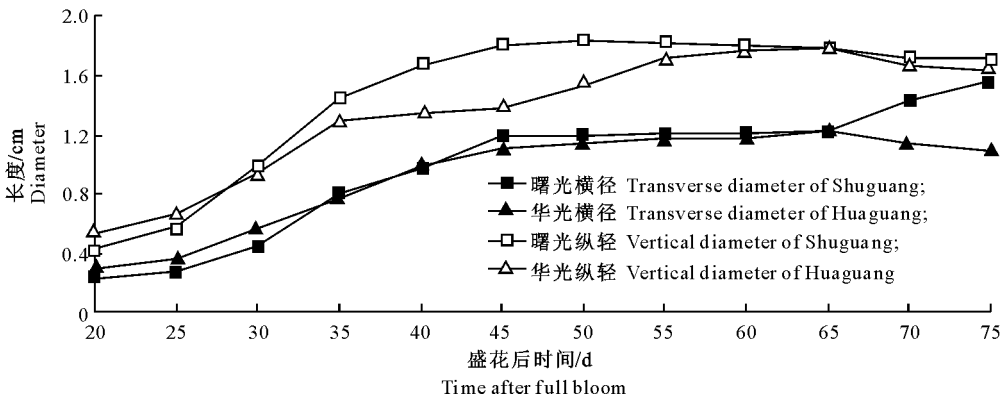


图 2 生育期内“华光”和“曙光”胚珠纵径、横径的变化

Fig. 2 Changes of embryos' vertical diameter, transverse diameter of "Huaguang", "Shuguang" during the growth period

图 3 表明,花后 40 d 前,“华光”、“曙光”的胚性指数均为 0,水渍状的胚乳充满种胚;“华光”种胚在 40 d 后开始发育,“曙光”种胚在 45 d 后开始发育,在胚发育的前期,“曙光”胚的胚性指数没有华光大;65 d 后,“华光”胚不再发育,胚性指数呈下降趋势,

此时胚开始出现退化现象,而“曙光”胚的胚性指数继续增大,最终达到 1。

2.2 “华光”和“曙光”种胚发育不同时期内源激素的变化

由图 4 可见,在“华光”、“曙光”2 个桃品种种胚

发育的初期,6-BA 含量均较高,其中“曙光”更高(296.71 ng/g);“华光”在花后 50 d 时 6-BA 含量达次峰值(138.73 ng/g),而“曙光”则在花后 55 d 达到最大值,这 2 个时期是“华光”和“曙光”的硬核期;在测定的大部分生育期内,“华光”种胚的 6-BA 含量低于“曙光”。在果实成熟后期,“华光”和“曙光”种胚内的 6-BA 含量均呈下降趋势,但“曙光”下降

较为平缓,而“华光”在花后 65 d 出现一个小高峰,其后也呈下降趋势,同时伴随有种胚的退化现象。

图 5 和图 6 显示,随着种胚的生长发育,GA3 和 IAA 含量在“华光”和“曙光”2 个桃品种中均呈先上升后下降的变化趋势,二者在“华光”中含量的峰值均出现在花后 50 d,在“曙光”中含量的峰值均出现在花后 55 d,即其硬核期。

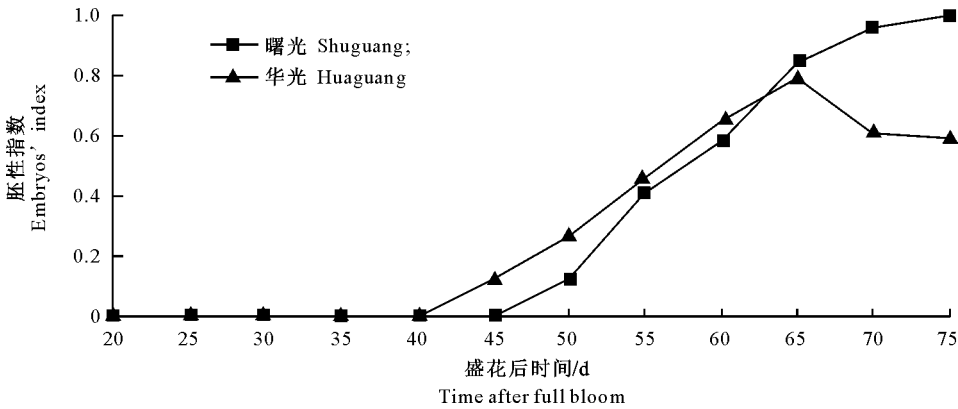


图 3 生育期内“华光”和“曙光”胚性指数的变化

Fig. 3 Changes of embryos' index of “Huaguang”, “Shuguang” during the growth period

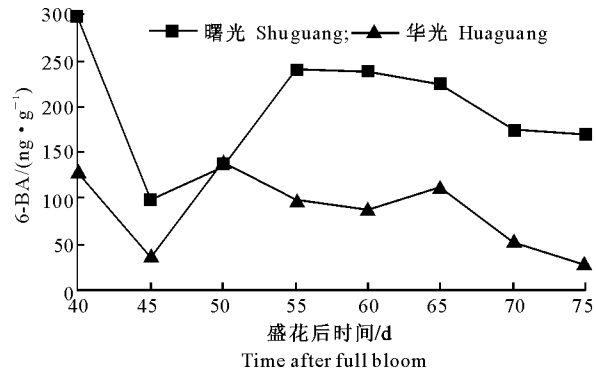


图 4 生育期内“华光”、“曙光”种胚中 6-BA 含量的变化

Fig. 4 Changes of embryos' 6-BA of “Huaguang”, “Shuguang” during the growth period

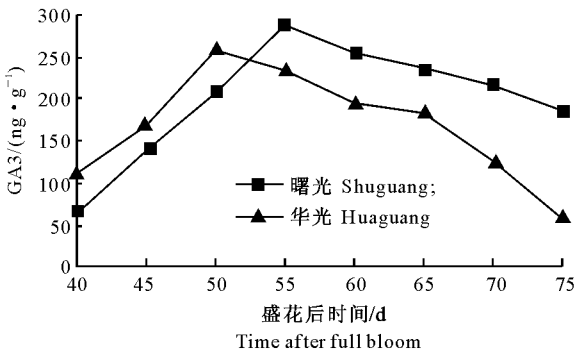


图 5 生育期内“华光”、“曙光”种胚中 GA3 含量的变化

Fig. 5 Changes of embryos' GA3 of “Huaguang”, “Shuguang” during the growth period

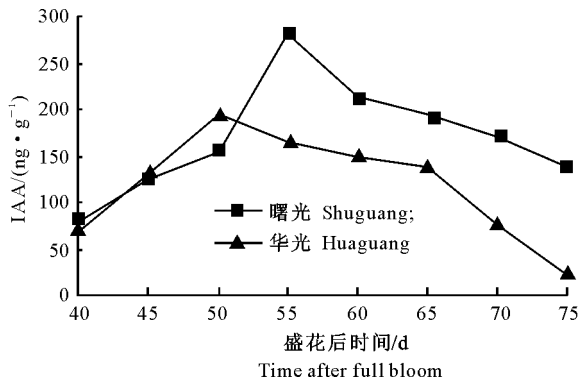


图 6 生育期内“华光”、“曙光”种胚中 IAA 含量的变化

Fig. 6 Changes of embryos' IAA of “Huaguang”, “Shuguang” during the growth period

3 讨论

对“华光”、“曙光”桃生育期内种胚外部形态变化的测定发现,二者种胚的鲜、干质量,纵、横径及胚性指数均随着果实的发育呈增长趋势,且种胚的鲜、干质量与纵、横径呈正相关关系,但“华光”的上述指标在花后 65 d 达到最大值后呈下降趋势,同时伴随着胚的退化现象,种胚逐渐皱缩变瘪,质量下降,干物质的量也急剧下降,种皮变为黄褐色。沈德绪等^[6]的研究表明,种胚干质量与种子的萌芽率呈正相关。早熟桃种胚干质量本来就较中、晚熟品种小,而且“华光”种胚在成熟后期出现退化现象,这严重

影响着胚的萌芽率。“华光”花后 65 d 左右是胚发育的最好时期,种胚纵、横径均发育到最大,鲜、干质量也最大,胚性指数最高,因此胚培养时的最佳取样期应选择这一时期。采取称量种胚质量和测量种胚纵、横径的方法来衡量早熟桃种胚的发育变化情况,简单可行并且也较为准确。

GA₃、IAA 和 6-BA 在种胚发育过程中扮演着重要角色。6-BA 含量在桃胚发育的前期最高,有利于种胚分裂、生长和发育所需养分的吸收;而随着果实的发育,6-BA 含量降低,这可能是生长中心转移到中果皮的原因;到硬核期,其含量出现小高峰,原因可能与胚、胚乳迅速生长有关;随后 6-BA 含量又下降,这可能是生长中心又转移到中果皮的缘故;“华光”在花后 65 d 出现另一个小高峰,可能与其胚发育出现退化有关,这与张雪等^[7]在障碍果(缝合线处软化的桃)中玉米素(Z)含量变化的报道相似。本研究发现 IAA 和 GA₃ 含量的变化趋势相同,且其含量与种胚发育有同步性,在种胚发育的初期和中期,二者含量不断增加,在种核硬化后,种胚中 IAA、GA₃ 含量开始降低,且在“华光”中,花后 65 d 后二者降速更为明显,这说明种胚发育过程中需要 IAA 和 GA₃ 的参与。Vizzotto 等^[14]和 Masia 等^[15]的研究表明,在桃核的硬化过程中,随着木质素的大量合成,IAA 的含量逐渐下降至最小值,硬核期后至果实成熟,IAA 含量又呈上升趋势。“华光”种胚中 IAA 含量在种胚发育初期明显低于“曙光”,到花后 65 d,“华光”种胚中 IAA 含量大幅下降,同时伴随着胚退化现象,表明 IAA 与后期种胚的萌芽率有一定的相关关系,这有待于进一步研究。

“曙光”在硬核期后,种胚内的激素水平一直高于“华光”,维持了种胚正常发育的先决条件,这可能也是“曙光”未出现胚退化现象的主要原因。本试验结果还表明,内源激素在“华光”、“曙光”硬核期后种胚中的含量达峰值,随后下降,且“华光”在花后 65 d 后下降幅度较大。硬核期后,种胚中的子叶开始发育变大,种胚鲜、干质量和纵、横径及胚性指数随果实的发育一直呈增长趋势,而“华光”上述指标在花后 65 d 后有所下降,同时伴随着胚退化现象,这可能与激素水平快速下降有关。

[参考文献]

[1] 张上隆,沈德绪. 早熟桃育种与若干遗传学问题 [J]. 中国果树,1985(4):26-29.

Zhang S L, Shen D X. Early mature peach breeding and its in-

heritable characters [J]. China Fruits, 1985(4):26-29. (in Chinese)

[2] 俞明亮,马瑞娟,汤秀莲. 杂种(F₁)成熟期的遗传研究 [J]. 江苏农业学报,1997,13(3):176-181.

Yu M L, Ma R J, Tang X L. Inheritance of ripenings season in F₁ hybrids of Peach [J]. Jiangsu J of Agr Sci, 1997, 13(3):176-181. (in Chinese)

[3] 许建兰,马瑞娟,杜平,等. 早熟桃的胚培养技术 [J]. 江苏农业学报,2005,21(4):354-358.

Xu J L, Ma R J, Du P, et al. Technique of embryo culture in early-ripening peach [J]. Jiangsu J of Agr Sci, 2005, 21(4):354-358. (in Chinese)

[4] 万春雁,韩明玉,赵彩平,等. 影响不同成熟期桃胚培养的相关因子研究 [J]. 西北农业学报,2009,18(1):248-251.

Wan C Y, Han M Y, Zhao C P, et al. Factors affecting embryo rescue for the different ripening stage in peach (*Prunus Persica* L.) [J]. Acta Agriculturae Boreal. -Occident Sinic, 2009, 18(1):248-251. (in Chinese)

[5] 董晓颖,孟新法,李培环,等. 极早熟油桃幼胚离体培养成苗相关因素探讨 [J]. 园艺学报,2007,34(3):739-742.

Dong X Y, Meng X F, Li P H, et al. Studies on the correlative factors for normal seedling development in immature embryo culture of ultra-early maturing nectarine [J]. Acta Horticulturae Sinic, 2007, 34(3):739-742. (in Chinese)

[6] 沈德绪,陈华清. 桃果实和种胚发育的研究 [J]. 园艺学报,1962(1):41-47.

Shen D X, Chen H Q. Research the development of fruit and embryo on peach [J]. Acta Horticulturae Sinic, 1962(1):41-47. (in Chinese)

[7] 张雪,刘志民,陈华君,等. 桃果实缝合线软化过程中内源激素的变化 [J]. 果树学报,2008,25(2):172-177.

Zhang X, Liu Z M, Chen H J, et al. Changes of endogenous hormones during suyre softening of peach fruit [J]. Journal of Fruit Science, 2008, 25(2):172-177. (in Chinese)

[8] 王飞. 葡萄无核品种及其杂种胚败育机理与胚挽救技术研究 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2002.

Wang F. Mechanism of embryo abortion in stenospemic seedless grapes and embryo rescue with seedless grapes [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2002. (in Chinese)

[9] 刘丙花,姜远茂,彭福田,等. 甜樱桃果实发育过程中激素含量的变化 [J]. 园艺学报,2007,34(6):1535-1538.

Liu B H, Jiang Y M, Peng F T, et al. Dynamic changes of endogenous hormone contents in the pulp and seeds of sweet cherry fruit during growth and development [J]. Acta Horticulturae Sinic, 2007, 34(6):1535-1538. (in Chinese)

[10] 陶汉之,高丽萍,陈佩穗,等. 猕猴桃果实发育中内源激素水平变化的研究 [J]. 园艺学报,1994,21(1):35-40.

Tao H Z, Gao L P, Chen P C, et al. Changes of endogenous hormones contents in fruit on the fruit development of Kiwi fruit [J]. Acta Horticulturae Sinic, 1994, 21(1):35-40. (in Chinese)

(下转第 196 页)