

极早熟油桃幼胚离体培养成苗相关因素探讨

董晓颖¹, 孟新法², 李培环^{1*}, 王永章¹, 刘成连¹

(¹莱阳农学院园艺学院, 山东青岛 266109; ²中国农业大学农业与生物技术学院, 北京 100094)

摘要: 以极早熟油桃‘超红短枝’的幼胚为试材, 在离体培养条件下, 研究了不同胚龄、低温处理时间、蔗糖浓度、6-BA、GA₃浓度配比及种皮等因素对幼胚发育和成苗的影响。结果表明: 果实发育 56 d 时, 平均 PF 值仅为 0.086。在各处理中, 以低温处理 80 d、糖浓度 6% 对幼胚的发育和成苗效果最佳。6-BA、GA₃ 对比对经 80 d 低温处理的幼胚影响较小, 9 mg/L 的 6-BA 对 30 d 低温处理的幼胚发育有一定的促进作用。在低温条件下, 带种皮培养对幼胚 PF 值增大和提高成苗率的效果明显好于不带种皮培养的。

关键词: 油桃; 幼胚培养; PF 值; 成苗率

中图分类号: S 662.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 03-0739-04

Studies on the Correlative Factors for Normal Seedling Development in Immature Embryo Culture of Ultra-early Maturing Nectarine

DONG Xiao-ying¹, MENG Xin-fa², LI Pei-huan^{1*}, WANG Yong-zhang¹, and LU Cheng-lian¹

(¹ College of Horticulture, Laiyang Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; ² College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The effects of different embryo developmental stages, treatment time of low temperature, 6-BA and GA₃ levels, sucrose concentration in culture medium and seed coats on immature embryo development and normal seedling rate were studied with ultra-early maturing nectarine variety Super Red Spur. The results indicated that the average PF value was only 0.086 when fruits developed up to 56 days. Among the all treatments, the treatment with low temperature for 80 days and 6% sucrose concentrations in the culture medium had the highest effects on immature embryo growth and normal seedlings rate. Moreover, different 6-BA and GA₃ concentrations showed little influence on the immature embryos cultured for 80 days in low temperature; but 9 mg/L 6-BA had some promotion on the immature embryos development for 30 days. The PF value and the percent of normal seedling of immature embryos with seed coats were found better compared with the embryo without seed coats when cultured at low temperature condition.

Key words: Nectarine; Immature embryo culture; PF value; Normal seedling rate

极早熟桃因果实发育期短, 种胚发育不完全, 常需通过幼胚离体培养获得其杂交苗 (庄恩及等, 1982)。早期研究认为胚的发育指数 (PF 值, 胚长度/种子长度) 接近 0.7, 是桃胚培养成功的最低值 (Hesse & Kester, 1955)。后来杨增海等 (1983) 将 PF 值为 0.42 的桃幼胚, 通过改良培养基培养成苗。Ramming (1990) 将 PF 值仅 0.25 的幼胚培养成功。但果实发育期在 65 d、PF 值 0.2 以下的桃幼胚培养成功的报道极少。

作者以果实发育期 56 d、幼胚 PF 值仅为 0.1 的极早熟优良油桃 [*Prunus persica* (L.) Batsch var. *nectarina* Maxim] 品种‘超红短枝’ (李培环等, 2002) 为试材, 利用离体培养技术, 研究了影响极低 PF 值桃幼胚发育成苗的相关因素, 旨在为极早熟桃育种提供参考依据。

收稿日期: 2007 - 01 - 31; 修回日期: 2007 - 04 - 16

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: dxyph@163.com)

1 材料与方法

试验于 2003~2004 年在莱阳农学院生物技术中心进行。分别取花后 40、48 和 56 d 的‘超红短枝’油桃果实为试材。取出果核，洗净，在超净工作台上用 75% 酒精漂洗 30 s，0.1% 升汞灭菌 15 min，无菌水冲洗 5 遍。分别取 48 d 和 56 d 的种子各 20 粒，取出幼胚，测定胚发育指数 PF 值（幼胚长度/种子长度的比值）。

将发育 56 d 的种子接种在基本培养基（1/3MS + 6% 糖）上，置于 2~5℃ 低温下分别经过 30、50、65、80、95、110 d 后取出幼胚，测定 PF 值。分别取 48、56 d 不同胚龄的种子接种于不同蔗糖浓度（3%、6%、9%）的 1/3MS 基本培养基中，经 80 d 低温处理后测 PF 值。取发育 56 d 的种子和不带种皮的幼胚接种在基本培养基上，低温处理 50、65、80、95、110 d 后测 PF 值。将发育 56 d 的种子分别接种于附加 6-BA、GA₃ 不同浓度配比的基本培养基中，置于低温 30、80 d 培养后测 PF 值。每处理接 60 个材料，每瓶接 3 个。

将经以上处理后的幼胚转入成苗培养基（3/4G + 6-BA 0.3 mg/L + BA 0.3 mg/L + 3% 蔗糖）中，置于 20~25℃ 常温下培养。光照 2 000~2 500 lx，12 h/d。调查测定各处理幼胚的发育情况和成苗率。

试验数据用邓肯氏新复极差法进行差异显著性测验。

2 结果与分析

2.1 果实发育期与种胚发育的关系

果实发育 40 d 时，果核未变硬，种子小，肉眼只看到透明的胚乳看不到胚。48 d 时，种子增大，果核变硬，已有可见的胚，平均大小仅为 0.05 cm，PF 值为 0.036。56 d 时种子虽无增大，但幼胚平均增大到 0.12 cm，PF 值为 0.086（表 1）。

表 1 不同发育时期油桃果实和种胚变化

Table 1 Changes of fruit and embryos in nectarine at different developmental periods

花后天数 Days after anthesis (d)	果实纵径 Vertical diameter (cm)	果实横径 Horizontal diameter (cm)	种子大小 Length of the seed (cm)	幼胚大小 Length of the embryos (cm)	PF	果核硬度 Seed hardness
40	3.09	3.16	1.2	0	0	不硬 Not hard
48	4.39	4.88	1.4	0.05	0.036	较硬 Slight hard
56	4.88	5.63	1.4	0.12	0.086	硬 Hard

2.2 低温处理时间对幼胚发育及成苗的影响

发育 56 d 的初始幼胚 PF 为 0.086，经 30 d 以上低温处理后 PF 达 0.228 以上（表 2）。对 PF 值的影响以 65~95 d 处理的效果最好，PF 值达 0.262~0.293。

表 2 低温处理时间对幼胚生长发育及成苗率的影响

Table 2 Effects of low temperature treatment time on immature embryo development and normal seedling rate

低温处理时间 Days of treatment in low temperature (d)	PF	胚转绿天数 Days of embryo turning green (d)	发芽天数 Seeding days (d)	转绿胚率 Rate of embryo turning green (%)	发芽率 Germinating rate (%)	成苗率 Rate of normal seedling (%)
30	0.228 b	8	12	43.3 C	20.0 C	13.3 C
50	0.246 b	7	8	46.7 B	26.7 C	20.0 B
65	0.293 a	5	8	56.7 B	36.7 B	23.3 B
80	0.269 a	5	7	66.7 A	50.0 A	43.3 A
95	0.262 a	5	7	33.3 C	26.7 C	16.7 C
110	0.203 b	5	9	33.3 C	23.3 C	6.7 D

注：A、B、C、D 分别表示 =0.01 水平下的差异显著性；a、b、c、d 分别表示 =0.05 水平下的差异显著性。下同。

Note: A, B, C, D indicated the significance at the level of =0.01; a, b, c and d indicated the significance at the level of =0.05. The same below.

低温处理时间对幼胚的子叶转绿和成苗有较大影响。低温处理 30 d 的，转入常温 8 d 后子叶开始转绿，12 d 后开始发芽；处理 80 d 的，5 d 子叶开始转绿，7 d 开始发芽。说明 30 d 低温处理对成苗已有一定效果，但要获得较高的成苗率，需经 80 d 左右的低温处理（转绿胚率及成苗率分别高达 66.7% 和 43.3%）。但低温处理超过 90 d，会对幼小的胚造成低温伤害，成苗率反而降低。

2.3 蔗糖浓度对不同胚龄幼胚生长发育及成苗的影响

胚龄为 48 d 的，3 种蔗糖浓度处理的 PF 值差异不显著；转绿胚率、发芽率和成苗率以 6% 糖处理的最高（表 3）。

表 3 蔗糖浓度对 48 d 和 56 d 胚龄幼胚生长发育及成苗率的影响

Table 3 Effects of sucrose concentrations on immature embryo development and normal seedling rate in the fruit 48 and 56 days after anthesis

胚龄 Days after anthesis (d)	蔗糖 Sucrose (%)	接种数 Inoculation number	PF	转绿胚率 Rate of embryo turning green (%)	发芽率 Germinating rate (%)	成苗率 Rate of normal seedling (%)	生长情况 Growth result
48	3	50	0.155b	32.0d	24.0d	12.0D	正常 Normal
	6	48	0.158b	41.7c	35.4c	20.8C	正常 Normal
	9	47	0.163b	38.3c	27.7d	17.0C	畸形 Abnormal
56	3	60	0.301a	50.0b	43.3b	30.0B	正常 Normal
	6	60	0.269a	68.3a	50.0a	43.3A	正常 Normal
	9	60	0.248a	60.0a	40.0b	33.3B	畸形 Abnormal

胚龄为 56 d 的，处理间 PF 值无显著差异；转绿胚率、发芽率和成苗率均以 6% 糖处理为好，并且生长发育正常；9% 与 6% 处理的转绿胚率无显著差异，但前者胚培苗生长发育不良，出现畸形苗，这可能是成苗培养基的糖浓度为 3%，两者糖浓度差异太大，幼胚不能适应新的生长环境所致；3% 糖浓度处理成苗率较低；相同蔗糖浓度处理，胚龄 56 d 的成苗率显著高于 48 d 的（图 1 和表 3）。

前人的研究认为，胚龄越小所需糖浓度越高，随着胚龄的增大，所需糖浓度逐渐减小。幼胚培养所需的糖浓度一般在 8% ~ 12%（刘庆昌和吴国良，2003）。本研究结果与前人结果趋势相同，但浓度较低。



图 1 蔗糖浓度（3%、6%和 9%）对胚培苗生长的影响

Fig. 1 Effects of sucrose concentration (3%, 6% and 9%) on the growth of embryo culture seedling

2.4 6-BA、GA₃浓度对比对幼胚发育及成苗的影响

在 30 d 低温处理中，6-BA、GA₃不同浓度配比处理以仅用 6-BA 9 mg/L 的效果较好，幼胚 PF 值从 0.086 增加到 0.333，转绿胚率达到 50%，成苗率为 16.6%。在 80 d 低温处理中，6-BA 和 GA₃配比的各处理对幼胚生长发育的影响均低于对照（表 4）。

未经低温处理的成熟种子中含有大量的 ABA 和微量的 GA，为打破休眠，可在培养基中加入一定量的 GA₃、6-BA 等与 ABA 有拮抗作用的植物生长调节剂（吉九平和王业遴，1987）。本试验中 GA₃、6-BA 对幼胚的发育及成苗作用不明显，是因为极早熟果实的幼胚正处在细胞分裂、体积扩大的旺盛时期，种子内 GA 含量高，ABA 含量较低，故此时使用外源 GA、6-BA 效果不明显。

表 4 6-BA、GA₃不同浓度对比对幼胚发育及成苗率的影响Table 4 Effects of 6-BA and GA₃ combined with different concentrations on embryo development and normal seedling rate

低温处理时间 In low temperature (d)	6-BA (mg/L)	GA ₃ (mg/L)	PF	转绿胚率 Rate of embryo turning green (%)	发芽率 Germinating rate (%)	成苗率 Rate of normal seedling (%)
30	9	0	0.333a	50.0A	26.6B	16.60B
	6	3	0.186b	36.7B	23.3B	10.00B
	3	6	0.214b	26.7C	16.7B	6.67C
	0	9	0.214b	20.0C	13.3B	6.67C
	对照	Control	0.228b	43.3B	20.0B	13.30B
80	9	0	0.129c	16.7C	10.0C	3.33C
	6	3	0.095c	13.3C	6.67C	3.33C
	3	6	0.214b	16.7C	6.67C	5.00C
	0	9	0.189b	20.0C	10.0C	5.00C
	对照	Control	0.269a	66.7A	50.0A	43.30A

2.5 去种皮与否对幼胚发育及成苗的影响

相同时间低温条件下,带种皮培养的 PF值和成苗率均高于不带种皮的。低温处理 65 d时,带种皮的 PF值比不带种皮的大 0.174。由于极早熟果实的发育期极短,种子中绝大部分是为幼胚发育提供营养物质的胚乳,种皮在起保护作用同时也为幼胚发育提供必要的营养物质。培养基中营养物质的种类和数量不能满足幼胚发育的需要,故去种皮培养的效果较差。

表 5 种皮对不同低温下幼胚发育及成苗的影响

Table 5 Effects of seed coats on embryo development at different low temperatures and normal seedling rate of nectarine embryo

处理 Treatment	PF					成苗率 Rate of normal seedling (%)				
	50 d	65 d	80 d	95 d	110 d	50 d	65 d	80 d	95 d	110 d
带种皮 With seed coat	0.246A	0.293A	0.269A	0.262A	0.203A	20.0A	23.3A	43.3A	16.7A	6.7A
不带种皮 Without seed coat	0.095B	0.119B	0.113B	0.113B	0.117B	3.3B	8.3B	6.7B	3.3B	0.0B

试验中发现,各处理后幼胚发育指数只有大于 0.2的,转入常温培养后子叶才能迅速生长并转绿,最终可能培养成苗;小于 0.2的幼胚不再发育,不转绿,不能成苗。因此研究延长幼胚发育的方法是极早熟桃胚培养成功的关键。

References

- Hesse C O, Kester D E. 1955. Embryo culture of peach varieties in relation to season of ripening. *Proc Amer Soc Hort Sci*, 65: 265 - 273.
- Ji Jiuping, Wang Ye-lin. 1987. Changes of stratification on the hormones and its relationship with dormancy in seed of peach. *Journal of Nanjing Agricultural University*, (1): 25 - 29. (in Chinese)
- 吉九平, 王业遴. 1987. 桃种子层积中激素的变化与破眠的关系. *南京农业大学学报*, (1): 25 - 29.
- Li Pei-huan, Dong Xiao-ying, Li Shu-hua. 2002. A new very early-ripening spurious nectarine cultivar 'Super Red Spur'. *China Fruits*, (6): 6 - 7. (in Chinese)
- 李培环, 董晓颖, 李书华. 2002. 极早熟短枝型甜油桃新品种 '超红短枝'. *中国果树*, (6): 6 - 7.
- Liu Qing-chang, Wu Guo-liang. 2003. *Plant cell and tissue culture*. Beijing: China Agricultural University Press: 65 - 67. (in Chinese)
- 刘庆昌, 吴国良. 2003. *植物细胞组织培养*. 北京: 中国农业大学出版社: 65 - 67.
- Ramming D W. 1990. The use of embryo culture in fruit breeding. *HortScience*, 25 (4): 393 - 398.
- Yang Zeng-hai, Hu Ni-yun, Lu Guang-ming. 1983. The embryo culture technique of early-ripening peaches. *Journal of Xibei Agricultural College*, (1): 15 - 25. (in Chinese)
- 杨增海, 胡霓云, 路广明. 1983. 早熟桃胚培养技术的研究. *西北农学院学报*, (1): 15 - 25.
- Zhuang En-ji, Xu Zhu-ying, Wu Jue-liang, Cai Xi-ping. 1982. The breeding of very early-ripening peaches. *Acta Horticulturae Sinica*, 9 (3): 1 - 8. (in Chinese)
- 庄恩及, 徐祝英, 吴珏良, 蔡奚平. 1982. 特早熟桃的育种. *园艺学报*, 9 (3): 1 - 8.