

文章编号:1003-8701(2013)04-0059-04

金光杏梅胚挽救最佳取样时期的研究

李桂荣, 张玉园, 朱自果, 张传来

(河南科技学院园艺园林学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 本试验以金光杏梅胚为材料, 从落花后至成熟共 13 个取材时期, 并采用胚龄和果实体积为衡量指标研究了金光杏梅胚挽救最适宜的时期。结果表明: 金光杏梅胚挽救最佳时期是在落花后 49 d 左右, 此期胚乳开始退化, 幼胚出现畸形, 核开始出现木质化, 果实的体积达到总体积的 77.9%, 是第一个缓慢生长阶段到第二个快速生长阶段的转折期。

关键词: 金光杏梅; 胚挽救; 取样时期

中图分类号: S662.4

文献标识码: A

Determination of Proper Sampling Period for Embryo Rescue of 'Jinguang' Plum

LI Gui-rong, ZHANG Yu-yuan, ZHU Zi-guo, ZHANG Chuan-lai

(Department of Horticulture and Ornaments, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Embryo of 'Jinguang' plum was used as materials and 13 sampling dates from pollination to maturation were adopted to study the best date of embryo rescue, using embryonic age and fruit volume for measurement index. The results showed that the best time of embryo rescue was 49 days after pollination. In this period, endosperms began to degeneration, young embryo abnormality and the stone lignifications began. Fruit volume reached 77.9% of the total volume, and this time was the transition of the first slow growth period and the second fast growth period.

Keywords: 'Jinguang' plum; Embryo rescue; Sampling period

核果类果树传统育种周期长、工作量大, 而现代生物技术, 特别是胚培养和转基因技术的发展, 大大加快了核果类果树的育种进程。胚培养在克服远缘杂交育种胚的早期败育, 胚挽救、诱导体细胞胚胎发生和形成诱变植株, 作为基因转移的受体, 生产无病毒苗木等研究领域发挥着重要作用, 而且借助于胚培养技术可以获得优良的特早熟品种。目前, 桃^[1-4]、杏^[5]、樱桃^[6-7]等核果类果树的胚培养都已经有一定的研究报道, 而杏梅的胚培养在国内外尚处于空白。

杏梅(*Prunus mume* var. *bungo*) 属杏与李的自然杂交种后代^[8], 正在被开发利用的核果类果树。

金光杏梅是从杏梅中选育出的优良品种^[9], 具有较强的栽培性和生态适应性, 果实营养成分含量高, 风味酸甜, 品质优良且耐贮运性强, 具有较大的市场开发潜力。由于杏梅为杂交种, 其种胚退化、败育严重, 常规播种不能成苗或萌芽率低, 使得该资源不能得到充分利用。本试验以金光杏梅为材料, 进行了胚挽救, 获得了胚挽救植株, 确定了金光杏梅最适宜取材时期, 为杏梅的杂交育种获得新品种、新资源提供了理论依据和技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

以金光杏梅落花后至成熟各个不同时期的胚为试验材料, 取自河南科技学院东区杏梅资源圃。树龄为五年生, 金太阳杏为授粉树。

收稿日期: 2012-11-02

作者简介: 李桂荣(1974-), 女, 回族, 硕士, 副教授, 从事园艺植物育种与生物技术教学与科研工作。

1.2 处理方法

于落花后上午 8:30 每隔 7 d 取一次材料,直至果实成熟,共取材 13 次。在硬核期以前对整个幼果进行消毒处理,75%的酒精处理 30 s,0.1%的升汞处理 10 min,无菌水冲洗 5 次后接种;在硬核期以后,先剥离种胚再进行消毒处理,75%的酒精处理 20 s,0.1%的升汞处理 8 min,无菌水冲洗 5 次后接种。

1.3 培养条件

以 MS 为基本培养基,琼脂 7.5 g/L,蔗糖 50 g/L,调 pH 值为 5.8。4 种培养基如下: MS+1 mg/L6-BA+IAA0.1 mg/L; MS+3 mg/L6-BA+IAA0.1 mg/L; MS+0.02 mg/LGA₃+IAA0.1 mg/L; MS+0.5 mg/LGA₃+IAA0.1 mg/L。30 d 后分别转接到相同的培养基上,添加的蔗糖减少到 30 g/L。光照强度 2 000 lx,光照时间 14 h/d,温度(26 ± 1)℃。转接 25 d 后观察并进行数据统计。

1.4 数据统计

每次取样时用游标卡尺随机测量 10 个果实的纵径(2a)、横径(2b)、侧径(2c),按照椭球体积公式 $V_{\text{椭}} = 4\pi abc/3$ 计算杏梅果实的平均体积,考察果实体积大小对接种的影响,萌发率 = (萌发的外植体数 / 接种外植体数) × 100%,愈伤组织诱导率 = (形成愈伤组织的外植体数 / 接种外植体数) × 100%。

2 试验结果

2.1 不同取样时期金光杏梅果实果径和体积的变化

金光杏梅果实的 3 径(纵径、横径、侧径)表现出相同的生长规律(图 1),总体上是 14 日胚龄以前处于第一快速生长阶段(0 ~ 14 日胚龄),此阶段纵径、横径的生长量大于侧径的生长量,所以在落花后横径和侧径区分不明显,而在落花一周以后横径与侧径能明显区分;这一时期没有形成幼胚。14 日胚龄后 3 径生长速度逐渐下降,并在 21 日胚龄后处于缓慢生长阶段,一直持续到 49 日胚龄段,这一时期大约持续 30 d,为第一缓慢生长阶段(14 ~ 49 日胚龄);落花两周后即开始出现幼胚,生长一个月时开始出现硬核,42 d 后胚乳开始退化,生长到 49 d 时胚出现畸形(附图 1)、核的木质化程度高。随后又出现第二个快速生长阶段(49 ~ 63 日胚龄),约持续两周时间,然后进入第二缓慢生长阶段(63 日胚龄至成熟),生长速度又逐渐降低,直至成熟。

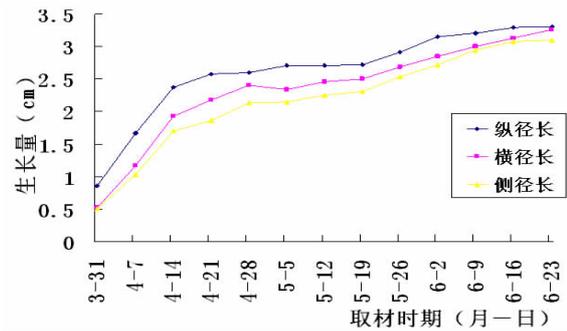


图 1 不同取材时期杏梅果果径变化曲线

金光杏梅果实体积的变化曲线与三径的生长曲线相类似(图 1、图 2),也表现出两个生长高峰阶段,两个缓慢生长阶段。在落花后两周是果实体积增大最快的时期,平均每天增加 0.616 cm³;第一缓慢生长阶段(14 ~ 49 日胚龄)体积变化不明显,但果实内部发生了本质性的变化,胚从出现到畸形,果核从开始出现到果核木质化,胚乳也开始退化,该末期果实的体积达到总体积的 77.9%,这一时期对于杏梅的胚培养是一个关键的时期;随后又进入第二个快速生长阶段,平均每天增加 0.119 cm³;最后进入成熟期。

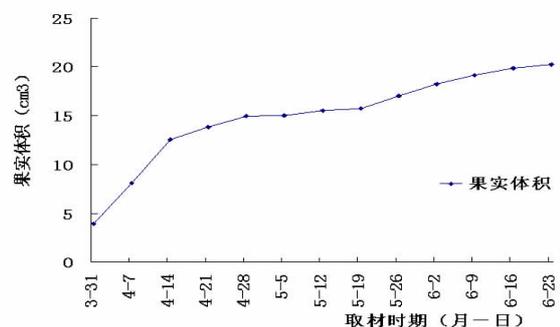


图 2 不同取材时期杏梅果实体积变化曲线

2.2 不同取样时期对金光杏梅胚的萌发及愈伤组织诱导的影响

在胚挽救过程中,取样时期的确定是影响胚挽救成功率的关键因素之一。从表 1 可以看出,在胚龄为 0、7、14 d 时种胚完全不能萌发,并且在两个时期完全不能诱导出愈伤组织,在胚龄为 14 d 时仅能诱导出极少的愈伤组织,且愈伤组织的质量差,增殖能力弱。在胚龄为 21、28、35 d 时有较少数的胚能够萌发,萌发的幼苗瘦弱(附图 3),生长两个月后幼苗死亡,即这 3 个胚龄段的幼胚易发生早熟萌发,最终也不能形成再生植株;这一时期幼胚的愈伤组织诱导率较高,单个幼胚产生愈伤组织量也较大,整体的愈伤组织的质量好,再生能力强(附图 2)。当胚龄达到 42 d 时,幼胚的萌

发率明显提高,其萌发的速度相当缓慢,但幼苗矮壮、绿色,子叶浅绿色,在胚龄为 49 d 时幼胚的萌发率达到最大值,幼胚能够正常萌发形成健壮的再生植株(附图 4);以后随着胚龄的增大萌发率逐渐降低,在果实成熟时其萌发率降低到最小,但此期的萌发率仍然高于 35 日胚龄以前的任何时期。愈伤组织的最大诱导率不是与最大萌发率同时出

现的,在 35 日胚龄以上时,愈伤组织的诱导率明显提高,在 56 日胚龄和 63 日胚龄时达到最大值,分别为 90.65%和 88.57%;以后愈伤组织诱导率又有所下降,这主要是由于胚接近成熟或已经成熟,胚脱分化能力减弱。各个取材时期的愈伤组织的诱导率都明显高于萌发率,说明杏梅的胚易于诱导愈伤组织。



附图 1 49 日胚龄的金光杏梅胚与正常杏胚的比较



附图 2 金光杏梅胚诱导出的愈伤组织
(接种 30 d 后在 号培养基上形成的)



附图 3 35 日胚龄的金光杏梅胚早熟萌发形成的幼苗



附图 4 49 日胚龄的金光杏梅胚正常萌发形成的健壮植株

表 1 取样时期不同对杏梅胚的萌发及愈伤组织诱导的影响

接种日期	胚发育天数	接种数	萌发数 *	萌发率(%)	愈伤组织诱导数 **	愈伤组织诱导率(%)
03-31	0	140	0	0	0	0
04-07	7	138	0	0	0	0
04-14	14	143	0	0	2	1.39
04-21	21	137	3	2.19	9	6.57
04-28	28	140	12	8.57	25	17.86
05-05	35	141	31	21.99	42	29.79
05-12	42	140	47	33.57	67	47.86
05-19	49	140	56	40.00	108	77.14
05-26	56	139	52	37.41	126	90.65
06-02	63	140	48	34.29	124	88.57
06-09	70	140	36	25.71	104	74.29
06-16	77	141	39	27.66	82	58.16
06-23	84	140	35	25.00	65	46.43

注: * 子叶张开,子叶呈绿色或浅绿色;** 胚或子叶表面形成凸凹不平的瘤状物。

2.3 不同培养基种类对金光杏梅胚的萌发及愈伤组织诱导的影响

不同种类和水平的激素对胚培养产生不同的影响,由表 2 可知:在含有 GA_3 的培养基上胚的

萌发率明显高于没有添加 GA₃ 的培养基,这说明 GA₃ 能够促进幼胚的萌发,而且是较高浓度的 GA₃ 促进萌发的效果更好;但是在含有 GA₃ 的培养基上愈伤组织的诱导率较低,相反在不含 GA₃ 的培养基上愈伤组织诱导率高。适宜浓度的 6-BA(1 mg/L)有利于愈伤组织的诱导,但不利于

胚的萌发;较高浓度的 6-BA(3 mg/L)有利于胚的萌发,但诱导的愈伤组织较少,且愈伤组织有一定程度的玻璃化。因此,MS+0.5 mg/LGA₃+IAA0.1 mg/L 培养基适于幼胚的挽救萌发,MS+1 mg/L6-BA+IAA0.1 mg/L 培养基适于愈伤组织诱导发生。

表 2 不同种类和水平的激素对胚培养产生的影响

培养基	接种数	萌发数	萌发率(%)	愈伤组织诱导数	愈伤组织诱导率(%)
	454	43	9.50	318	70.04
	453	57	12.56	203	44.81
	455	105	23.07	109	23.96
	457	154	33.70	124	27.13

3 结论与讨论

本试验研究结果表明,杏梅胚的发育天数即胚龄是杏梅胚挽救成功的限制性因子之一,此外不同的培养基种类也影响着杏梅胚挽救的成功与否。GA₃ 能够促进胚的萌发,但不利于愈伤组织的形成。金光杏梅胚挽救最佳时期是在落花后 49 d 左右,此期胚乳开始退化,幼胚出现畸形,核开始出现木质化,是第一个缓慢生长阶段到第二个快速生长阶段的转折期。适合胚培养的培养基为 MS+0.5 mg/LGA₃+IAA0.1 mg/L,初代培养蔗糖为 50g/L,继代培养蔗糖浓度为 30 g/L。杏梅的胚易于诱导愈伤组织,以落花后 56 d 胚诱导的愈伤组织量最大,最适于诱导愈伤组织的培养基为 MS+1 mg/L6-BA+IAA0.1 mg/L。

大量研究表明,桃、杏、李、樱桃等核果类幼胚的胚龄是胚培养成功的关键因素之一。Hesse 等^[10]对不同胚龄桃幼胚培养研究表明,胚龄大小直接影响胚培养成苗率的高低和胚培苗的生长势。较多的研究将胚龄和胚的发育指数(PF₁=胚长/种子长)来评价幼胚培养的成功与否,本试验采用胚龄和果实体积双重因子来衡量杏梅胚挽救的适宜时期,取得了较好的评价效果。结果表明以 49 日胚

龄即果实体积达到总体积的 77.9%时是金光杏梅胚挽救的最佳时期。

参考文献:

- [1] 李曜东,魏玉凝.肥城桃组培苗诱导、基因转化及其增殖[J].果树学报,2003,20(1):70-72.
- [2] 张永庆,陈大明,金勇丰,等.桃离体组织分化再生植株的研究[J].园艺学报,2001,28(4):342-344.
- [3] 吴延军,张上隆,谢鸣,等.桃幼胚及幼胚子叶再生的研究[J].林业科学,2005,41(5):45-51.
- [4] 闫国华,周宇.桃幼胚离体培养再生植株的研究[J].园艺学报,2002,29(5):480-482.
- [5] 王玉柱,张大鹏,杨丽,等.未成熟杏离体胚培养技术的研究[J].农业生物技术学报,2000,8(4):389-391.
- [6] 李文生,闫国华,张晓明,等.樱桃种间杂种胚培养及子叶植株再生[J].园艺学报,2004(5):690.
- [7] 刘焕芳,陈学森,段成国,等.甜樱桃与中国樱桃杂种的胚抢救及杂种鉴定[J].园艺学报,2004,31(3):303-308.
- [8] 俞德浚.中国果树分类学[M].北京:农业出版社,1979.
- [9] 苗卫东,扈惠灵,晋新生,等.杏梅品种金光主要性状调查[J].中国果树,2002(5):18-20.
- [10] Hesse CO, Kester DE. Embryo culture of peach varieties in relation to season of ripening[J]. 1955(65):265-273.
- [11] 刘用生,殷桂琴,汪涛. GA₃, 6-BA, IBA 与活性炭对李胚萌发及幼苗生长影响(简报)[J]. 植物生理学通讯,1993,29(1):32-34.
- [12] 李健恒.金光杏梅带芽茎段初代培养的研究[J].吉林农业科学,2010,35(2):43-45.