

一种快速而有效的‘舞美’苹果种子繁殖体系的建立

杨海玲 曹敏格 孙扬吾 阿不都热扎克 张文 朱元娣

(中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100094)

摘要 为提高胚败育率高的苹果品种‘舞美’种子成苗率、缩短种子休眠时期、加速种子有性繁殖进程的种子繁殖体系,以‘舞美’自然授粉的果实和种子为试材,研究了胚龄(接种时期)、播前处理及培养基配比对‘舞美’杂种种子萌发率和成苗率的影响。结果表明:随果实成熟,种皮颜色由红色、红白色、红褐色至褐色转变;离体培养不同胚龄的种子,盛花后 76 d 种皮红色,种子可萌发但生长畸形;96 d 后,种皮红褐至褐色,有 56.7% 的萌发率和 23.3% 的直接成苗率,且添加 1 mg/L GA₃ 的 H2 培养基比未添加 GA₃ 的 H1 培养基(1/2MS + 10 g/L 蔗糖 + 9 g/L 琼脂)可显著提高成苗率。盛花后 130 d 的饱满种子在 H2 培养基上离体培养萌发快,萌发率和直接成苗率分别达 100% 和 97.6%,且显著高于未经层积处理和 4 层积处理 20 和 30 d 后直接播种在蛭石中的种子。因此,自盛花 96 d 后的杂种胚在 H2 培养基上培养,至胚苗移栽成活需 4~5 个月时间,种子直接成苗率在 40% 以上。

关键词 苹果; 种子繁殖; 胚败育; 胚培养; 层积处理

中图分类号 S 602.8; S 661.1

文章编号 1007-4333(2007)04-0025-04

文献标识码 A

Establishment of a rapid and efficient system for propagating the apple cultivar ‘Maypole’ by seed

Yang Hailing, Cao Min'ge, Sun Yangwu, Abudu Rezhake, Zhang Wen, Zhu Yuandi

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract In order to increase the rate of germination of apple cultivars with higher embryonic malfunction, reduce seed dormancy and enhance sexual propagation, fruits and seeds of the cultivar ‘Maypole’ were studied. We explored the influence of seed development stages, pre-sowing treatments and different culture media, on germination and growth of new seedlings in vitro, from the embryo. The result showed that the color of seed capsule changed from red, red-white, red-brown to brown as fruits matured. Seeds at different developing stages were inoculated in two different culture media. Developing seeds with red capsule color were fairly capable of germination, 76-days after full bloom but grew abnormally from the embryo culture; seeds with red-brown capsule color germinated fairly well 96-days after full bloom, into direct seedlings. The ratio of direct generation of seedlings in vitro from embryo was increased markedly on the culture medium H2 with 1 mg/L GA₃ than H1 (containing 1/2 MS + 1% sucrose + 0.9% agar). Mature seeds with brown capsule color germinated rapidly 130-days after full bloom through embryo culture in the H2 medium. The ratio of germination and seedling generation were 100% and 97.6% respectively, being significantly higher than those of seeds grown on vermiculite without stratification or after 20 and 30 days with stratification at 4°C. Therefore, ‘Maypole’ seeds at 96-days after full bloom, cultivated in H2 culture medium directly produced seedlings in a high portion, and seed culture by this approach can shorten the breeding process. Compared with traditional seed propagation methods, the process can be shortened 3-4 months and the seedling vigor increased by more than 40%.

Key words apple; seed propagation; embryo abortion; embryo culture; seed stratification

收稿日期: 2007-01-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671445)

作者简介: 杨海玲, 硕士研究生; 朱元娣, 副教授, 通讯作者, 主要从事果树育种与分子生物学研究, E-mail: zhuyd@cau.edu.cn

‘舞美’是观赏性极佳的柱型苹果品种,为苹果育种的良好材料,但其种子发育过程中具有较高的种胚败育率^[1],以‘舞美’作为母本的有性杂交种子的成苗率较一般品种低,同时成熟种子长时间的休眠特性导致苹果种子常规繁殖过程耗时长,影响了‘舞美’苹果杂交育种的效率。因此,探索一种既能有效提高成苗率,又能缩短‘舞美’苹果种子发育和常规种子繁殖所需时间的种子繁殖方法,对提高苹果有性杂交效率、缩短育种周期,有重要的生产应用价值。为了解除常规生产中苹果种子休眠,通常采用温水浸泡、去种皮、低温处理、生长调节剂处理、胚培养等多种方法。特别是离体胚培养技术,通过对剥离胚进行体外培养可短期正常萌发成苗^[2],杏杂种的胚培苗童期比常规层积播种所获得实生苗的童期缩短1~2年^[3]。胚培养技术广泛应用于果树育种中,不仅可以克服核果类早熟品种、葡萄无核品种的胚败育,挽救柑橘多胚品种的有性胚^[4-5],还能促进果树良种及砧木繁殖^[6-7]。在胚培养过程中,胚龄(取种时期)、低温(1~4℃)处理、培养基成分配比是影响胚培养成功的关键因子^[2,4],苹果M9砧木的种子幼胚在盛花后80d才具有离体萌发能力,低温4℃处理60d或在添加赤霉素和细胞分裂素的MS培养基中均能提高幼胚的成苗率^[8];离体培养苹果成熟的种子,用1/2MS培养基添加赤霉素能促进种胚萌发,而添加细胞分裂素则抑制种胚苗的生根^[7,9]。不同的离体胚培养过程将影响种胚苗的成苗率和种胚从萌发至成苗的时间^[3,6]。以幼胚为外植体,经过胚性愈伤或不定芽的再生、继代培养、组培苗生根后再驯化移栽成苗,该过程虽然提高了苹果种胚的成苗率,但不能有效地缩短成苗时间^[6];离体培养完全成熟的种子,虽能获得较高的种胚苗成苗率,却不能挽救种胚败育和有效地缩短果实及种子发育时间^[7]。目前对‘舞美’种子的离体胚培养尚未见研究报道,本研究旨在探讨‘舞美’等胚败育高的品种为母本杂交育种过程中如何提高杂种种子成苗率,并有效地缩短种子成苗时间,为提高苹果育种效率和良种砧木快速繁育服务。

1 材料与方法

1.1 材料

‘舞美’苹果(栽种于中国农业大学科学园内)自然授粉的果实及种子。

1.2 果实生长发育的观测及种子处理

自盛花后49d始,取自然授粉的果实,每5d取样1次,每次取5个果实测定平均单果重,并观察种子形态及种皮颜色。种子形态分为饱满、半饱满、干瘪3类,种子两端均充实的为饱满,种子一端充实一端不充实的为半饱满,两端均不充实的为干瘪种子。

盛花后76~116d,每5d取样1次,分别取饱满种子10粒在H1和H2培养基中进行离体培养。3次重复,30d后统计萌发率、生根率和成苗率。

胚培养的初接种过程:参考王力超^[8]方法并修改。在超净台上,以75%(体积分数)的酒精消毒完整果实30min以上,用无菌水冲洗3~4次。消毒后将果实剖开取出种子,用灭菌的解剖刀、解剖针轻轻去除种皮(注意不要伤及胚),接种到培养基上。

盛花后130d,取成熟饱满种子进行以下3种处理:1)直接播种:取30粒种子,将种皮外表充分洗净,直接播种到湿润的蛭石中,20d后统计萌芽、成苗率;2)层积处理:取60粒种子,将1份种子与3份干净的湿沙混匀(湿沙以手握成团,触之能散为度),于4℃冰箱中保存,分别于20和30d后取出30粒,将种皮外表充分洗净,直接播种到湿润的蛭石中,20d后统计萌芽、成苗率;3)胚培养:取30粒种子,无菌消毒后,剥离种胚接种到H2培养基上,20d后统计萌芽、成苗率。

1.3 培养基的选择及种胚苗的培养

初接种培养基 H1:1/2MS(基础培养基)+10g/L蔗糖+9g/L琼脂;H2:1/2MS+10g/L蔗糖+9g/L琼脂+1mg/L GA₃,其中1/2MS为大量元素减半,其他成分与MS相同。

生长培养基 MS+30g/L蔗糖+6.5g/L琼脂+0.5mg/L BA+0.5mg/L IBA。

将胚培养直接萌发的种胚苗转入生长培养基,幼苗根长3~5cm,苗高3cm以上并具有完全展开叶5片以上时,在自然光照充足的室内光照锻炼5d后取出,去除培养基,清洗根部并移栽到营养土(营养土、蛭石、沙体积比2:1:1)中,保持光照和湿度。

1.4 萌发率、生根率、成苗率的统计及数据处理

萌发率=(萌发种子数/接种种子数)×100%;

生根率=(生根种子数/接种种子数)×100%;

成苗率=(种子直接成苗数/接种种子数)×100%。

数据利用SASV8统计分析,各处理间进行One-Way ANOVA分析。

2 结果与分析

2.1 果实生长发育进程与种子成熟度的变化

‘舞美’果实生长发育大致分为3个阶段,盛花后60 d之前为缓慢生长期,60~110 d为快速生长期,110~130 d为成熟期。在果实快速生长期,随着胚龄的增大,种子逐渐成熟,种皮颜色逐渐变深。盛花后49~86 d,种皮红色,平均单果重8.82~22.71 g;91 d,种皮红白色,平均单果重23.28 g;96~101 d,种皮红褐色,平均单果重29.62~32.74 g;116 d,种皮褐色,平均单果重36.58 g。

统计不同胚龄果实中饱满、半饱满、未发育及瘪种子数,各时期果实种胚败育率均在30%以上(表1),与果实生长发育进程无关。

表1 不同胚龄‘舞美’苹果种子发育状况

Table 1 Seed development at different growth stages

胚龄/d	饱满种子率/%	半饱满种子率/%	干瘪与未发育种子率/%
49	46	18	36
53	60	8	32
76	26	30	44
81	26	32	42
86	30	24	46
91	32	28	40
96	30	40	30
101	36	28	36
116	34	22	44

注:胚龄以盛花后天数表示,下同。

表2 不同胚龄和 GA₃ 处理对‘舞美’苹果种胚萌发、生长的影响

Table 2 Effect of different embryonic ages and GA₃ treatments on germination and development of apple embryos

胚龄/d	培养基 H1			培养基 H2(H ₁ + 赤霉素 GA ₃)		
	萌发率/%	生根率/%	成苗率/%	萌发率/%	生根率/%	成苗率/%
76	23.3 e	0.0 c	0.0 C	26.7 d	0.0 C	0.0 D
81	33.3 ed	0.0 c	0.0 C	33.3 cd	0.0 C	0.0 D
86	33.3 ed	0.0 c	0.0 C	36.7 cd	0.0 C	0.0 D
91	43.3 cd	16.7 b	0.0 C	46.7 c	0.0 C	0.0 D
96	56.7 cb	23.3 b	23.3 B	66.7 b	20.0 B	40.0 B
101	60.0 b	20.0 b	20.0 B	66.7 b	20.0 B	23.3 C
116	80.0 a	53.3 a	53.3 A	90.0 a	73.3 A	76.7 A
P	0.05	0.05	0.01	0.05	0.01	0.01

注: 同列字母相同者差异不显著,不相同字母者差异显著; 差异显著程度。

2.2 胚龄对种胚离体培养条件下萌发生长的影响

胚龄对种胚离体培养的萌发率、成苗率有显著影响。在 H1 和 H2 培养基上培养不同胚龄的种子胚,盛花后76~91 d的饱满种子,种皮为红色至红白色,离体培养时只能部分萌发,多数畸形,极少生根,均不能直接发育成苗(表2);盛花后96和101 d的种子,种皮红褐色,离体培养时多数胚可正常萌发,但直接成苗率较低;盛花后116 d的种子,种皮褐色,离体胚培养时可正常萌发,且种胚苗生长良好。

在接种操作过程中对种胚造成伤害,或接种时胚根未插入到培养基中,种胚均不能正常萌发、生长。

2.3 赤霉素 GA₃ 对种胚萌发生长的影响

盛花后96 d,取饱满种子进行离体培养,在添加 GA₃ 的 H2 培养基上的萌发率为66.7%、成苗率为40%,比在 H1 培养基上分别高10%和16.7%;盛花后116 d,离体培养的种胚的萌发率为90%,成苗率为76.7%,比在 H1 上分别高10%和23.4%(表2)。结果表明:添加 GA₃ 更有利于种子胚的离体萌发和直接成苗;在种子发育早期,即盛花后76~91 d,添加赤霉素虽能提高种胚的萌芽率,但不能诱导其直接成苗。

2.4 不同播种前处理对成熟种子萌发生长的影响

盛花后130 d的成熟饱满种子,未经层积处理和4层积处理20 d后直接播种在蛭石中,种子不能萌发;4层积处理30 d的种子直接播种后可萌发成苗,但成苗率仅3%;H2培养基进行离体胚培

养的种子,8 d 即可萌发,19 d 成苗率可达 97.6%,显著高于直接播种和 4 层积处理(20 和 30 d)种子的成苗率(表 3)。

表 3 播前不同处理对‘舞美’苹果成熟种胚萌发、生长的影响($n=30$)

Table 3 Effect of different pre-treatments on seed germination and development of seedlings

处理方法	萌发率/ %	始萌发天数/ d	成苗率/ %
直接播种	0	0	0
层积处理 20 d	0	0	0
层积处理 30 d	3	11	3
H2 培养基接种	100	8	97.6

将胚培养直接萌发的种胚苗转入生长培养液中,经 10~15 d 生长培养后,进行 5 d 室内锻炼,可获得 90%的移栽成活率。

3 讨论

1) 种子繁殖广泛应用在苹果杂交育种、实生选种及砧木的繁殖中^[8]。随果实的成熟,种子内源激素的变化及种胚发育成熟度,对种子萌发、成苗有很大的影响。通常正常授粉受精的幼胚就具有直接成苗的能力,但由于植物自身保护或适应环境的需要,种子在生长发育的中后期 ABA 含量急剧增加^[10],本能地形成“休眠或抑制”期,从而使种子发育过程变得复杂、漫长。适宜的低温处理和外用赤霉素能拮抗种子内 ABA 的作用,促进种子萌发生长^[11]。

2) ‘舞美’观赏性极佳,是良好的育种材料。在自然授粉情况下,种子数量少,种胚败育率高达 30%以上,成熟种子率仅为 30%~40%,且‘舞美’杂交育种仍采用常规的种子播种繁殖,耗时长。本试验发现舞美种子在盛花 96 d(种皮红褐色),种胚基本成熟,具有直接萌发成苗的能力。种子胚龄越大,则成苗率越高,这与以前研究报道一致^[3,8]。以发育基本成熟的种胚进行离体胚培养直接成苗技术

代替常规的种子繁殖,可以提高舞美有性杂交种子成苗率。通过离体胚培养,省去了种子发育耗时,减少了种子发育中的抑制物积累,缩短了种子休眠时期。从种子离体胚培养至种胚苗移栽成活只需 4~5 周时间,比常规的种子播种繁殖可缩短 3~4 个月。本研究得到了‘舞美’种子胚培养过程中提高种子成苗率及缩短种子成苗时间的适宜取种时期和培养方法,为‘舞美’及苹果杂交育种及种子繁殖提供参考。

参 考 文 献

- [1] 张文,李光晨,朱元娣,等. 芭蕾(舞美)苹果杂种苗几个形态指标的遗传分析[C]. 中国园艺学会. 中国园艺学会第九届学术年会论文集. 北京:中国科学技术出版社,2001
- [2] Ramming D W. The use of embryo culture in fruit breeding[J]. Hortscience, 1990, 19(4):393-398
- [3] 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
- [4] 祁业凤,刘孟军,王玖瑞,等. 果树胚培养研究进展[J]. 生物技术,2002,12(3):46-48
- [5] 梁青,陈学森,刘文,等. 胚抢救在果树育种上的研究及应用[J]. 园艺学报,2006,33(2):445-452
- [6] Richard M S Mulwa, Prem L Bhalla. In vitro plant regeneration from immature cotyledon explants of macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. Johnson) [J]. Plant Cell Reports,2006,25:1281-1286
- [7] 何林,李林光,张志宏,等. 苹果三倍体成熟胚的离体培养研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(16):3926-3928
- [8] 王力超,江宁拱,周志钦. 苹果矮化砧木 M9 的幼胚培养[J]. 果树科学,1996,13(4):241-242
- [9] 陈建中,盛炳成,徐惠瑛,等. 早熟苹果杂交一代的种胚培养[J]. 南京农业大学学报,1998,21(2):30-33
- [10] 陈尚武,张大鹏. ABA 和 Fluridone 对苹果果实成熟的影响[J]. 植物生理学报,2000,26(2):123-129
- [11] 龙秀琴. 贵州主要野生苹果砧木种子解除休眠对低温的需求[J]. 种子,2003(3):9-10