

越橘种子胚培养技术研究

富晶晶, 张志东, 孙海悦, 宗洪雨, 李亚东, 刘海广

(吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118)

摘要:以“蓝丰”越橘为试材,研究了其自然授粉果实中不同发育阶段种子的培养效果。结果表明:成熟越橘种子在 1/2 改良 WPM+赤霉素 600 mg/L 萌发培养基上培养效率为 32.0%;幼嫩种子在 1/2MS 发育培养基上培养 30 d 之后转入萌发培养基的两步培养法的培养效率为 19.0%;发育期 42~50 d 果实中的幼嫩种子培养效率为 16.3%~19.0%。在发育培养过程中用 $(2\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 20 d、 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 10 d 或 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 10 d、 $(2\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 20 d 2 种处理的培养效率分别为 23.1%和 28.8%。另外在发育期 50 d 的成熟果实中成熟种子、幼嫩种子和发育不良种子分别占 52.1%、32.4%和 15.5%。

关键词:越橘;育种;种子;萌发

中图分类号:S 663.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)18-0097-04

越橘属杜鹃花科(Ericaceae)越桔属(*Vaccinium* L.)灌木^[1],20 世纪 70 年代引入我国。随着我国越橘种植面积和区域的增加,对越橘品种适应性和多样性提出了更高要求。通常采用层积、变温、赤霉素浸种等^[2]方法可促进越橘成熟种子萌发,但一般要等到第 2 年春季播种。另外越橘杂交果实中的种子也很少。而采取组织培养方法可在果实发育当年提早介入种子发育过程,促进不同成熟度种子获得较好的发育,达到提高育种效率的目的。目前关于采用组织培养方法促进越橘种子成熟及萌发方面的研究尚鲜见报道。该试验研究了越橘种子胚培养的技术条件和方法,以期为提高越橘育种的工作效率提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2012 年在吉林农业大学小浆果试验基地进行,供试越橘品种“蓝丰”(Bluecrop)采自其田间自然授粉果实。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 用解剖刀分别将果实的萼片端和

果蒂端连带少部分果肉切除,余下果实放入浓度为 50% 的 84 消毒液中浸泡 10 min,并不停晃动。取出果实转入 95%酒精溶液浸泡 1 min 后,用无菌水冲洗 3 次,在超净工作台上用镊子和解剖针取出种子接种于培养基内。

1.2.2 果实发育阶段与种子类型 Galletta 等^[3]根据越橘果实表面色泽及果实硬度将越橘果实发育过程划分为 5 个阶段:生绿、熟绿、蓝-粉红、蓝和全蓝。在实际观察中,每个阶段取 10 个果实,根据种子大小及颜色差异,将种子分为 3 种类型:成熟种子(体积大,深褐色)、幼嫩种子(体积小,白或黄白色)和发育不良种子(体积极小,白色)。

1.2.3 幼嫩种子的两步培养法 果实中的幼嫩种子采用两步培养法^[4]培养,即先将种子接种于发育培养基上培养 30 d,促进种子的发育成熟(简称“发育培养”);之后再发育的种子转接至萌发培养基上培养 40 d,促进种子萌发(简称“萌发培养”)。

1.2.4 不同发育阶段果实中幼嫩种子培养 按照果实发育的 5 个阶段分别采集果实,分离出幼嫩种子后采用两步培养法培养使其萌发。幼嫩种子经过 30 d 发育培养后,部分种子体积增大、种皮表面由淡黄色变为黑褐色,形态及颜色均与成熟种子相似。而没有发育的种子主要表现为 2 种类型:一类是幼嫩种子没有发生变化,仍然保持接种时的颜色和大小,此类型所占比例极小;一类是幼嫩种子萎缩、干瘪、并逐渐转变成黑色。

1.2.5 幼嫩种子的低温发育培养 将熟绿阶段果实中的幼嫩种子接种在发育培养基内。在发育培养的 30 d 内将种子放置在变温处理环境中,之后同时转入萌发培养基继续培养至其萌发。环境温度及处理时间为:

第一作者简介:富晶晶(1987-),女,硕士研究生,研究方向为果树育种。E-mail:1014199885@qq.com.

责任作者:张志东(1962-),男,硕士,教授,硕士生导师,现主要从事果树育种和生物技术等研究工作。E-mail:currant1985@163.com.

基金项目:吉林省财政厅育种资助项目(2012004);公益性行业(农业)科研专项资助项目(201103037);吉林省科技厅资助项目(20080713);吉林省教育厅资助项目(吉教科合字 2008309)。

收稿日期:2013-04-15

(2±2)℃培养 30 d;(2±2)℃培养 20 d;(25±2)℃培养 10 d;(2±2)℃培养 10 d;(25±2)℃培养 20 d;(25±2)℃培养 10 d;(2±2)℃培养 20 d;(25±2)℃培养 30 d(CK)。

1.2.6 培养条件 试验采用的发育培养基为 1/2MS 培养基;萌发培养基为 1/2 改良 WPM+赤霉素 600 mg/L。所有萌发的种子转入增殖培养基中继代培养。各种培养基中均含蔗糖 30 g/L、琼脂 4 g/L;培养基 pH 为 5.8;培养室温度为(25±2)℃;相对湿度保持在 60%~80%;光照强度 2 000~3 000 lx,光照时间 16 h/d;每个培养瓶内接种 20~25 粒种子。

1.3 项目测定

发育率=发育种子数/接种种子数×100%,种子接种到发育培养基内 30 d 后,观察种子的体积和表皮颜色。种子体积增大,表面颜色变深,且与成熟种子相似的,可视为种子发育;萌发率=萌发种子数/发育种子数(接种数)×100%,种子接种到萌发培养基内 40 d

后,观察种子的萌发情况。种子长出胚根,且胚根长度大于 1 mm,可视为种子萌发。培养效率=萌发种子数/接种数×100%。

2 结果与分析

2.1 果实发育阶段与种子类型比例

由表 1 可知,在不同发育阶段越橘果实中种子的发育进程不同,各阶段果实中均有成熟种子、幼嫩种子和发育不良种子存在。从花后 30 d 生绿至花后 50 d 全蓝各阶段果实中成熟种子的比例逐渐增高,全蓝阶段果实中成熟种子比例最高,为 52.1%;花后 35 d 熟绿阶段果实中幼嫩种子的比例最高,为 50.6%;花后 47 d 蓝阶段果实中发育不良种子的比例最小,仅为 8.5%。在接近成熟和成熟的越橘果实内仍存在大量幼嫩的种子。因此,使这部分幼嫩种子能继续发育,萌发生长成单株,以提供后代成活率是研究的重要内容。

表 1 果实发育阶段划分及各阶段种子特征

Table 1 Fruit development phases and the seeds characteristics at each stage

发育阶段	果实描述	果实发育天数/d	平均种子总数	成熟种子比例/%	幼嫩种子比例/%	发育不良种子比例/%
生绿	果实硬,表面 100%呈暗绿色	30	93	27.8	28.4	43.8
熟绿	果实变软,表面 100%呈浅绿色	35	97	37.6	50.6	11.8
蓝-粉红	蓝色为主,果蒂端带粉红色	42	99	42.0	42.8	15.2
蓝	几乎完全呈蓝色,仅在果蒂痕周围略带粉红色	47	110	45.5	46.3	8.5
全蓝	表面 100%呈蓝色,果实成熟	50	103	52.1	32.4	15.5

注:果实发育天数从末花期(95%的花开放时)开始计算。

2.2 2 种培养途径对种子萌发的影响

对花后 42 d 蓝-粉红阶段果实中的成熟种子、幼嫩种子和发育不良种子分别采用直接萌发培养和两步培养法进行培养,从表 2 可以看出,成熟种子经过两步培养法后萌发率为 16.7%,萌发效率仅为 1.7%,而直接萌发培养的萌发率为 32.0%,远高于两步培养法。这可能是因为在这两步培养法的发育培养过程中种子进入了休眠状态,即使在萌发培养过程中加入赤霉素(600 mg/L)也没能打破种子的休眠。该试验结果表明成熟种子不适用两步培养法。

表 2 直接萌发培养和两步培养法对种子萌发的影响

Table 2 Influence of direct method germination and two step method on seed germination

培养途径	种子类型	接种数 /个	发育数 /个	发育率 /%	萌发数 /个	萌发率 /%	培养效率 /%
两步培养法	成熟种子	59	6	10.2	1	16.7	1.7
	幼嫩种子	310	170	54.8	59	34.7	19.0
	发育不良	35	16	45.7	1	6.3	1.6
直接萌发培养	成熟种子	25			8	32.0	32.0
	幼嫩种子	32			4	12.5	12.5
	发育不良	49			0	0.0	0.0

幼嫩种子经过两步培养法后发育率和萌发率分别为 54.8%和 34.7%,培养效率为 19.0%,其发育率远高于成熟种子和发育不良种子,发育后的种子的萌发率高于成熟种子,这表明幼嫩种子经过发育培养后,可以达到生理成熟,萌发为新植株。幼嫩种子直接萌发培养的效果较差,萌发率为 12.5%,幼嫩种子由于没有完全成熟,应该采用两步培养法使其萌发。

发育不良种子经过两步培养法,虽然从外部形态观察到有种子发育,发育率为 45.7%,但发育种子的萌发率很低,说明发育不良种子发育后,其种胚可能仍然没有发育至成熟形态。发育不良种子经过直接萌发培养没有萌发,也说明发育不良种子在内部结构上和成熟种子有较大差异。

2.3 不同发育阶段果实中幼嫩种子的萌发

由表 3 可知,经过两步培养法培养后,不同发育阶段果实中的幼嫩种子都有部分发育成熟,但种子的发育率、萌芽率和培养效率间存在差异。各果实发育阶段中,全蓝阶段果实中幼嫩种子的发育率最低,为 36.5%;熟绿阶段果实中幼嫩种子的发育率最高,为 59.3%。生绿阶段果实中幼嫩种子的萌发率和培养效率最低,分别为 2.4%和 1.3%,主要因为幼嫩种子的发育程度普遍较

低,即使经过发育培养后幼嫩种子的发育率达到53.1%,但由于胚发育程度不高、或已进入休眠状态,造成萌发率很低。而且这一阶段果实中的幼嫩种子萌发后的幼苗生长发育不良、质量差,即出现所谓的胚早熟萌发现象。熟绿阶段果实中幼嫩种子的培养效果与生绿阶段果实中幼嫩种子相似,但略好于生绿阶段。蓝-粉红阶段果实中幼嫩种子的发育率和萌发率比较高,分别为54.8%、34.7%,培养效率最高,达到19.0%,之后随着果实接近成熟,在蓝与全蓝阶段幼嫩种子培养效率分别为16.4%和16.3%。因此,对接近成熟和成熟果实中幼嫩种子采用两步培养法一定程度上可以到达提高种子成熟度使其萌发生长的目的。

表3 不同发育阶段果实中幼嫩种子的培养效率

Table 3 Efficiency of young seeds at different fruit development phases

果实发育阶段	接种数 /个	发育数 /个	发育率 /%	萌发数 /个	萌发率 /%	培养效率 /%
生绿	160	85	53.1	2	2.4	1.3
熟绿	243	144	59.3	18	12.5	7.4
蓝-粉红	310	170	54.8	59	34.7	19.0
蓝	298	127	42.6	49	38.6	16.4
全蓝(成熟)	301	110	36.5	49	44.5	16.3

2.4 低温处理对幼嫩种子培养效果的影响

由表4可以看出,低温处理培养的发育率均低于对照,但 $(2\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养20 d、 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养10 d与 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养10 d、 $(2\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养20 d 2个处理得到的萌发率却明显高于其它处理和对照,这2个处理的培养效率分别为23.1%和28.8%,也明显高于其它处理。处理 $(2\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养30 d的培养效率最差,为2.8%。说明发育培养阶段适当的 $(2\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 处理有利于幼嫩种子萌发培养成功。

表4 发育培养过程中低温处理对幼嫩种子培养效果的影响

Table 4 Influence of low temperature in the culture process on the young seeds germination

温度处理	接种数 /个	发育数 /个	发育率 /%	萌发数 /个	萌发率 /%	培养效率 /%
$(2\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 30 d	71	17	23.9	2	11.8	2.8
$(2\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 20 d $\rightarrow(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 10 d	65	29	44.6	15	51.7	23.1
$(2\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 10 d $\rightarrow(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 20 d	62	22	35.5	8	36.4	12.9
$(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 10 d $\rightarrow(2\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 20 d	80	39	48.8	23	59.0	28.8
$(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 30 d(CK)	243	144	59.3	18	12.5	7.4

3 讨论与结论

胚培养过程中胚能否正常萌发生长取决于培养时胚的成熟度、植物的基因型、培养基的组成及培养环境等几方面的因素。尚忠海^[5]、田玲等^[6]、杨红花等^[7]对葡萄、扁桃、李子的研究表明,花后胚发育时间越长,胚的发育率与成苗率越高。该试验得到的结果在幼嫩种子

的发育率上与之存在差异,可能是由于试验材料种类存在差异。该试验还表明,发育时间长的越橘种子总体上萌发率也较高,这与上述试验结论一致。Hirsch等^[8]在早熟桃的胚培养中采用花后65 d的幼胚进行培养,萌发率可以达到91.7%。该试验对花后42 d蓝-粉红至花后50 d全蓝3个阶段越橘果实中幼嫩种子进行萌发培养,其萌发率为34.7%~44.5%。2个试验萌发率间的差异除由于树种存在差异外,还与越橘种子小,同一个果实中有多粒种子,种子发育阶段不一致,不容易严格区分发育天数等有关。

胚培养过程中对胚低温处理,可以有效地提高胚的萌发率。贺普超等^[9]研究提出,葡萄的胚要先经过 4°C 低温处理60 d再进行培养,其萌发率和成苗率才能达到最高;不经低温处理的胚萌发率要比前者低80%以上。该试验得出的结论与之相似,说明在越橘幼嫩种子的发育培养阶段,适当的低温处理 $(2\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 有利于幼嫩种子的萌发培养。所不同的是越橘幼嫩种子先进行20 d室温培养再转入低温 $(2\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 处理培养10 d的培养效率(28.8%)好于先用低温 $(2\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 处理20 d再转入室温培养10 d后的培养效果(23.1%)。

不同发育阶段的越橘果实中种子的发育进程差异较大,成熟种子、幼嫩种子和发育不良种子所占比例不尽相同。成熟种子可直接用萌发培养基促进萌发。各发育阶段果实中的幼嫩种子采用先发育培养后萌发培养的两步培养法均可获得一定萌发率,发育期42 d以上的果实(蓝-粉红至全蓝)中幼嫩种子培养效率高。在发育培养过程中给予幼嫩种子20 d的 $(2\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 低温处理能够获得较高的培养效率。

参考文献

- [1] 郝瑞. 长白山区笃斯越橘资源调查[J]. 园艺学报, 1979, 6(2): 87-93.
- [2] 顾娟, 贺普安. 蓝浆果与蔓越桔[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [3] Galletta G J, Himelrick D G. Small fruit crop management[M]. New Jersey: Prentice Hall Career, 1990.
- [4] Emershad R L, Ramming D W. In-ovule embryo development and plant formation from stenospice icgenotypes of *Vitis vinifera*[J]. Amer J Bot, 1989, 76(3): 397-402.
- [5] 尚忠海. 巨峰葡萄胚培养技术的研究[J]. 河南科学, 2007(6): 405-408.
- [6] 田玲, 郭春会, 罗梦, 等. 扁桃杂交幼胚培养初报[J]. 西北农业学报, 2007, 16(3): 116-118.
- [7] 杨红花, 陈学森. 利用远缘杂交创造核果类果树新种质的研究II-李杏远缘杂种的胚抢救与杂种鉴定[J]. 中国农业科学, 2004, 37(8): 1203-1207.
- [8] Hirsch A M, Testolin R, Brown S, et al. Embryo rescue from interspecific crosses in the genus *Actinidia* (kiwi fruit)[J]. Plant Cell Rep, 2001, 20(6): 508-516.
- [9] 贺普超, 蓝晓玲. 极早熟葡萄胚珠培养技术的研究[J]. 果树科学, 1989, 6(4): 199-204.

红金银花组培快繁技术研究

王文静, 王 鹏, 李伟强

(河南牧业经济学院, 河南 郑州 450011)

摘 要:以红金银花顶芽为试材, 利用仿自然气候的培养条件, 通过诱导生芽、增殖培养、诱导生根对红金银花进行离体培养, 研究了红金银花组培快繁技术体系。结果表明: 红金银花适宜的诱导生芽培养基为 MS+KT 1.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+ α -NAA 0.1 mg/L, 适宜的增殖培养基为 MS+KT 1.5 mg/L+6-BA 1.5 mg/L+ α -NAA 0.3 mg/L, 适宜的生根培养基为 1/2MS+ α -NAA 2.0 mg/L+IAA 0.15 mg/L 和 1/2MS+ α -NAA 2.0 mg/L+IAA 0.20 mg/L。

关键词:红金银花; 组培快繁; 激素; 培养基

中图分类号:Q 943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)18-0100-03

红金银花(*Lonicera japonica* var. *chinensis*)属忍冬科忍冬属半常绿灌木, 是金银花(*Lonicera japonica* Thund.)的变种。因枝、叶、茎淡紫色, 花蕾红色而盛名。红金银花同金银花一样具有清热解毒的作用; 其花期较金银花的长, 且具有浓郁的香味; 栽培中耐寒、耐旱、耐瘠薄, 对环境的适应性较强, 且生长较快的树种, 在园林绿化和环境保护中较受欢迎。同金银花一样, 红金银花的主要繁殖方法是扦插繁殖, 常规的营养繁殖方法容易使金银花植株携带病毒、杂菌等, 常常会使金银花植株生长不良, 产量下降, 有效成分积累减少。采用植物组织培养繁育种苗可以有效地脱除红金银花植株

病毒, 而且育苗速度快, 繁殖系数高, 种苗质量好, 是为规模化栽培提供高质量种苗的有效途径^[1-3]。

目前对金银花组织培养快繁已有很多研究^[4-6], 但对红金银花组培快繁技术的研究报道却较少^[7-9], 且大多以幼茎和枝条为研究对象。现以红金银花顶芽为试材, 对红金银花组培快繁技术进行研究, 以期为红金银花的快繁及遗传研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以 5 a 生红金银花春季新萌发的顶芽为试材, 采自河南省封丘县金银花生产基地。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 将取回的带顶芽的红金银花枝条放到水池中浸泡、冲洗, 洗净表面的灰尘和杂物, 再用无菌水反复冲洗干净; 将洗净的顶芽剪下(保留 1.0 cm

第一作者简介:王文静(1970-), 女, 河南新乡人, 硕士, 副教授, 研究方向为植物生理生化。

基金项目:河南省重点科技攻关计划资助项目(112102110035)。

收稿日期:2013-05-28

Study on Embryo Culture of Blueberry Seeds

FU Jing-jing, ZHANG Zhi-dong, SUN Hai-yue, ZONG Hong-yu, LI Ya-dong, LIU Hai-guang

(College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Taking blueberry 'Bluecrop' as material, the natural pollination seed germination efficiency at different fruit development stages were studied. The results showed that the mature blueberry seed germination efficiency in medium composition of 1/2WPM+GA₃ 600 mg/L was 32.0%; young seed germination efficiency at two steps germination medium composition of 1/2MS and 30 d development cultivate was 19.0%; the young seed from fruit development phases of 42~50 d seed development efficiency was 16.3%~19.0%. The development cultivate in two kinds of dispose (2±2)°C 20 d, (25±2)°C 10 d and (25±2)°C 10 d, (2±2)°C 20 d seed germination efficiency was 23.1% and 28.8% respectively. At fruit development stage of 45 d, the mature, young and stunting seeds was 52.1%, 32.4% and 15.5% respectively.

Key words: blueberries; breeding; seeds; germination