

突尼斯软籽石榴幼胚培养条件的研究

陈延惠¹, 刘 丽¹, 胡青霞¹, 张立辉¹, 李东伟², 谢文贵³

(1. 河南农业大学, 河南 郑州 450002; 2. 新郑市林业局, 河南 新郑 451100;

3. 河南省退耕还林和天然林保护工程管理中心, 河南 郑州 450003)

摘要: 以突尼斯软籽石榴幼胚为材料, 研究了不同接种时期对幼胚萌发率及成苗率的影响。结果表明, 在附加椰汁的 MS 培养基上, 9月4日接种并经过 GA₃ 处理的幼胚其萌发率和成苗率分别达到 48.3% 和 93.1%。突尼斯软籽石榴幼胚的最适宜的接种时期为 8 月中下旬到 9 月初。

关键词: 石榴; 幼胚; 接种时间; GA₃

中图分类号: S665.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)07-0084-03

Studies on Immature Embryo Culture Conditions of Soft-seed *Punica granatum* L. from Tunisia

CHEN Yan-hui¹, LIU Li¹, HU Qing-xia¹, ZHANG Li-hui¹, LI Dong-wei², XIE Wen-gui³

(1. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Xinzheng Forestry Bureau,

Xinzheng 451100, China; 3. Management Center of Conversion of Gropland to Forest and

Natural Forest Conservation Project in Henan Province, Zhengzhou 450003, China)

Abstract: The immature embryos of soft-seed *Punica granatum* L. from Tunisia were inoculated on MS culture media to research different inoculating dates on germination rate and seedling rate. When being inoculated on MS culture media with coconut juice on September 4, the embryo's germination rate and seedling rate could reach 48.3% and 93.1%, respectively. The most suitable inoculating date was from the mid-August to the beginning of September.

Key words: *Punica granatum* L.; Immature embryo; Inoculating date; GA₃

突尼斯软籽石榴于 1986 年从突尼斯引入我国, 历经 20 多年的栽培试验和观察, 各方面的性状表现优异, 如成熟早、软籽、色泽鲜, 果个大、果实美观等, 经济效益非常可观^[1], 是优质的软籽石榴种质资源, 在以软籽为育种目标的杂交育种中具有特殊的价值。利用软籽石榴为母体, 有望获得除软籽以外综合性状优良的杂交石榴新品种。在果树杂交育种中, 成熟种子一般需要经过低温处理打破休眠促进种子萌发; 在一些早熟品种为母本或软籽石榴为母本的杂交组合中, 又存在着种胚的退化与萌发率较低的现象, 这就给杂交苗的培育带来了困难。

胚培养在果树育种工作中具有非常重要的地位。在果树杂交育种中, 利用胚培养技术可以提高

杂种胚的成苗率, 避免杂交胚退化造成杂交失败; 胚培养可以通过打破休眠使种子发芽, 缩短果树的育种周期, 提前成苗。本试验旨在利用组织培养的方法, 对突尼斯软籽石榴天然杂交幼胚进行胚培养, 研究不同取材时间对突尼斯软籽石榴杂交幼胚萌发率和成苗率的影响, 从而选择出适合幼胚萌发的最佳取材时间和培养方法。

1 材料和方法

1.1 材料

试验于 2007 年 6—12 月在河南农业大学园艺系果树实验室进行。供试材料为突尼斯软籽石榴天然杂交种幼胚, 材料取自郑州市荥阳刘沟村河南农

收稿日期: 2008-03-03

基金项目: 河南省科技攻关项目(072102150001)

作者简介: 陈延惠(1963-), 女, 河南南阳人, 副教授, 硕士, 主要从事果树遗传育种学科研究和教学工作。

业大学石榴试验园。

1.2 方法

1.2.1 灭菌方法 取样后立即接种,初期灭菌采用整果灭菌即先用自来水将果实冲洗1h,然后置于超净工作台上用75%酒精漂洗30s^[2],用无菌水漂洗3~5次,将灭菌后的果实切开,用镊子取出籽粒,用解剖针捣碎果肉后接种。后期因籽粒汁液过多,自8月14日起采的果实灭菌采用籽粒灭菌,即取出籽粒,用干净的纱布挤净果汁后,在超净工作台上利用不同的灭菌方法进行灭菌,设置8个处理组合(表1)。

表1 不同灭菌方法的处理组合

| 处理编号 | 处理组合 |
|------|---|
| I | 50% NaClO 5min |
| II | 50% NaClO 5min+0.025% HgCl ₂ 5min |
| III | 50% NaClO 10min |
| IV | 50% NaClO 10min+0.025% HgCl ₂ 5min |
| V | 75% 乙醇 30s+0.025% HgCl ₂ 5min |
| VI | 75% 乙醇 30s+0.025% HgCl ₂ 10min |
| VII | 0.025% HgCl ₂ 5min |
| VIII | 0.025% HgCl ₂ 10min |

1.2.2 幼胚接种时间 自6月24日(即花后40d)起每隔10d采样一次,消毒后再用抽滤灭菌过的500mg/LGA₃处理,然后接种。观察记载幼胚的萌发率、萌发时间及成苗率,比较不同接种时期的差异,确定它们的最佳培养时期。

萌发率=发芽个数/总接种数×100%

成苗率=成苗个数/发芽个数×100%

1.2.3 胚培养 接种选用的培养基为MS培养基附加200mg/L椰汁^[3],加入蔗糖30g/L,琼脂6g/L。每个处理接种5瓶,每瓶接种10~20个幼胚。接种完成后放入光照培养箱中培养,温度(25±2)℃,光照时间16h/d,光照强度为1500~2000lx。

1.2.4 炼苗和移栽 待幼苗在培养基中长出具有4~5^[4]个茎节时即开瓶炼苗进行移栽。移栽时用温水冲洗掉琼脂,栽入盛有基质(蛭石:草炭土:珍珠岩=1:2:1)的营养钵内,基质高温灭菌。浇透水,苗子扣烧杯保湿,放入温室内,室温为25~28℃,每天光照12~14h^[3],浇水2次,30d后去掉烧杯。隔10d喷营养液一次,营养液成分为0.3mg/LKH₂PO₄+0.3mg/L尿素。

1.2.5 数据处理 试验数据采用邓肯氏新复级差测验法进行比较,显著水平P≤0.05。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌方法对灭菌效果的影响

2.1.1 整果灭菌的效果 灭菌后在无菌条件下取

出幼胚直接接种,污染率为0。但因为此种方法需在灭菌后于超净工作台上用解剖针将每一颗籽粒的果肉捣碎,费工费时。故在幼果长到一定时期后不再采用。

2.1.2 籽粒灭菌的效果 从表2可以看出,不同灭菌方法效果不一样。灭菌方法V和VI的污染率最高,I,III,VI和VIII的污染率次之,而II和IV均无污染。由于处理II可节约灭菌时间,减少对幼胚的损害,所以自8月14日起采的果实可采用灭菌方法II进行灭菌。

表2 不同灭菌方法对污染率的影响

| 处理编号 | 污染率(%) |
|------|--------|
| I | 20b |
| II | 0c |
| III | 20b |
| IV | 0c |
| V | 80a |
| VI | 20b |
| VII | 80a |
| VIII | 20b |

2.2 不同接种时间对经GA₃处理的幼胚萌发率的影响

从表3可以看出,经过GA₃处理的幼胚,除了在6月24日接种的在整个培养时期无萌发外,在其余7个接种时期都能萌发。相同培养时间,9月4日接种的萌发率均较高,7月4日接种的萌发率较低,随着培养时间的增长幼胚的萌发率不断增高。所以突尼斯软籽石榴幼胚比较适合的培养时期为8月中下旬到9月初。

表3 不同接种时期对经GA₃处理的幼胚萌发率的影响(%)

| 接种时期 (月-日) | 培养时间(d) | | | |
|---------------|---------|-------|-------|-------|
| | 40 | 60 | 80 | 100 |
| 06-24 | 0.0d | 0.0g | 0.0f | 0.0g |
| 07-04 | 0.0d | 3.3f | 5.0e | 8.3f |
| 07-14 | 3.9b | 7.8e | 13.7d | 17.6e |
| 07-24 | 5.8a | 13.4b | 17.3c | 21.2d |
| 08-04 | 5.3a | 8.8d | 14.0d | 17.5e |
| 08-14 | 0.0d | 14.8a | 24.1b | 35.2c |
| 08-24 | 2.0c | 11.8c | 30.3a | 42.8b |
| 09-04 | 6.0a | 13.3b | 30.0a | 48.3a |

幼胚在培养过程中,有的先萌发子叶,有的先萌发胚根,有的子叶和胚根一起萌发,初具植株形态。当幼胚萌发出胚根后,将其转入到附加200mg/L椰汁的MS培养基上继续培养,幼胚能形成发育正常的子叶和胚根,且生长旺盛(如图1-1,1-2,1-3)。

2.3 不同接种时期对幼胚成苗率的影响

从表4可以看出,7月24日-9月4日接种的

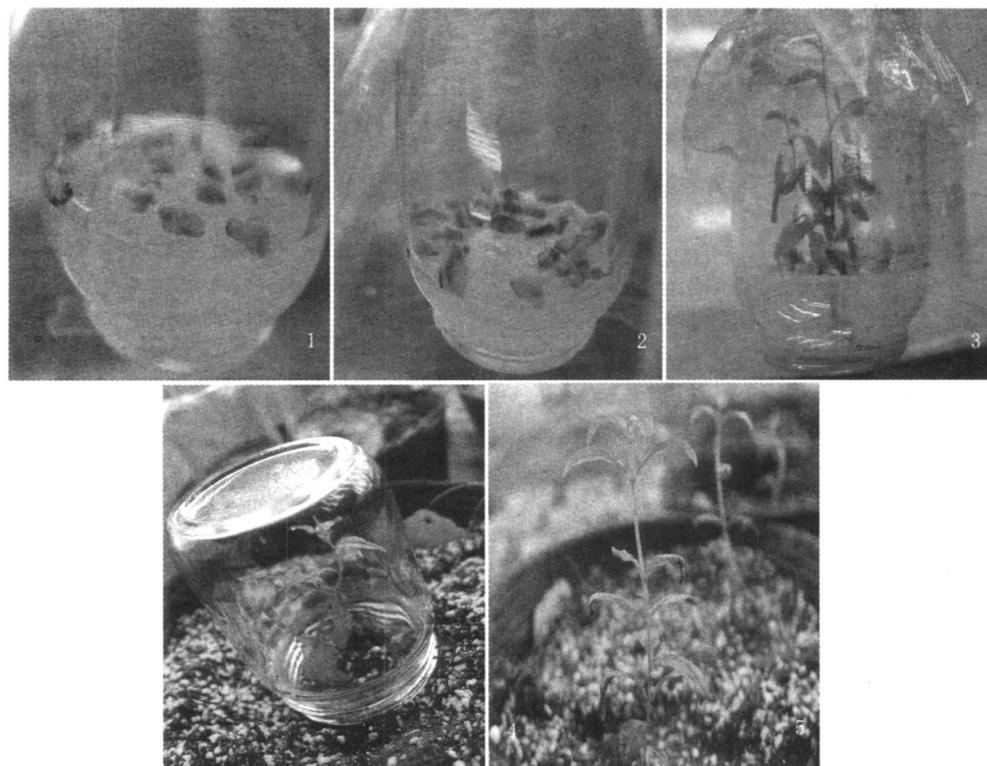
表 4 不同接种时期对经 GA₃ 处理的幼胚成苗率的影响 (%)

| 接种时期 (月-日) | 成苗率 (%) | 幼苗生长情况 |
|---------------|------------|---------------------|
| 07-04 | 0.0g | — |
| 07-14 | 44.4f | 长势稍弱, 部分有黄化落叶现象 |
| 07-24 | 63.6d | 长势稍弱, 部分有黄化落叶现象 |
| 08-04 | 60.0e | 长势稍弱, 部分有黄化落叶现象 |
| 08-14 | 84.2c | 生长旺盛, 部分有黄化落叶现象 |
| 08-24 | 92.3b | 生长旺盛, 部分有黄化落叶现象 |
| 09-04 | 93.1a | 苗壮, 生根力强, 部分有黄化落叶现象 |

突尼斯软籽石榴的幼胚都有较高的成苗率, 其中 9 月 4 日接种的成苗率最高。说明自 7 月下旬对突尼斯软籽石榴的幼胚进行培养即可获得成苗, 从而缩短了育种时间。

2.4 炼苗及移栽成苗

在所移栽的 30 棵幼苗中, 经炼苗(图 1-4)后成活率可达 90% 以上。若光温水肥管理适当, 还可提高其成活率。说明经胚培养的幼苗很容易成活(图 1-5)。



1——幼胚培养; 2——幼小胚萌发; 3——幼胚成苗; 4——试管炼苗; 5——试管苗成活

图 1 突尼斯软籽石榴胚培养

3 结论与讨论

通过对突尼斯软籽石榴幼胚的培养, 可以发现, 在幼胚培养初期, 幼果可整果灭菌。但因为整果灭菌费工费时, 幼胚生长到一定程度, 从 8 月 14 日起, 在对幼胚进行灭菌时可采用籽粒灭菌, 即用 50% NaClO 5min+0.025% HgCl₂ 5min 进行灭菌。幼胚接种时间为 8 月中下旬到 9 月初, 在 9 月 4 日接种培养 100d 时其萌发率可达 48.3%。不同的接种时间对幼胚的成苗率的影响表明, 7 月下旬接种可成苗, 9 月 4 日接种成苗率最高。胚培养苗木很容易成活, 适当的炼苗移栽成活率可达 90% 以上。

利用幼胚组培, 接种后污染率低, 在适当的接种时间接种后萌发率较高, 而且萌发后的组培苗根系

发达, 生长健壮。所以获得的组培苗还可以为筛选适合突尼斯软籽石榴茎段生长的培养基及多倍体研究奠定基础。

参考文献:

- [1] 曹尚银. 优质石榴无公害丰产栽培[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2005: 105.
- [2] 沈海龙. 植物组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 2005: 60-62.
- [3] 陈延惠, 陈海燕, 李东伟, 等. 不同植物生长调节物质配比及有机添加物对泰山红石榴外植体生长分化的影响[J]. 河南农业大学学报, 2006, 40(2): 152-155.
- [4] 刘海琳, 廖康, 尚忠海, 等. 无核白葡萄胚挽救机理的研究[J]. 河南科学, 2006, 24(4): 512-516.