

文章编号: 1003-8701(2000)06-0018-05

向日葵幼胚营养土培养的研究

张 义, 牛庆杰, 刘 铎, 李 伟, 孙 敏, 李慧英

(吉林省向日葵研究所, 吉林 白城 137000)

摘 要:系统地研究了向日葵幼胚营养土培养基所涉及的各项关键技术及完整的培养方法, 提出了培养向日葵幼胚最佳配方 T₃ 营养土。明确了营养土的适宜 pH 值为 6~7, 适宜的接胚时期以油用型材料授粉后 7~8 d 和食用型授粉后 8~9 d, 培养温度以 25℃, 光照 4 000 lx 为宜, 同时室温下室内光照营养土培养幼胚获得了成功。

关键词:向日葵; 生物技术; 幼胚; 营养土

中图分类号: S 565.503.53

文献标识码: A

为了加速向日葵的育种进程, 提高育种效率, 各国向日葵育种工作者努力寻求新的育种途径, 其中利用培养基进行向日葵幼胚培养就是加速育种进程的重要手段之一。但该手段操作复杂, 易污染, 影响成活率和受设备条件等因素限制, 故仅局限在设备先进的育种单位中应用, 推广范围很小。而利用营养土进行向日葵幼胚培养可因陋就简, 提高可操作性, 减少污染, 提高成活率。因此, 此种方法可扩大育种规模, 增大优良基因的选育概率, 加速向日葵育种进程。

1 试验材料

1.1 向日葵材料

试验选用 4 种不同类型的向日葵材料。油用型杂交种为白葵杂 4 号, 食用型品种为匈 4, 杂交后代 RHA274×SRB296 和自交系 84103B。

1.2 培养原土

培养原土取自吉林省向日葵研究所试验地耕层土壤, 为淡黑钙土。培养原土的常见化学指标为: 有机质含量 1.90%、全氮 1.91%、全磷 0.08%、全钾 2.95%、速效氮 85.0 mg/kg、速效磷 13.2 mg/kg、速效钾 101.4 mg/kg, 土壤 pH 值为 7.4。

2 研究实施与结果

2.1 营养土元素配方设计与筛选试验

2.1.1 营养土元素配方设计

营养土 N、P₂O₅ 和 K₂O 含量的指标是根据培养向日葵幼胚的琼脂培养基的含量为基础而设计, 共 4 个处理(原土、T₁、T₂ 和 T₃), 除原土外, 其它处理的 N、P₂O₅、K₂O 三要素的含量相

收稿日期: 2000-03-31, 修回日期: 2000-07-18

基金项目: 本文是农业部“九五”重点课题的部分研究内容(95 农-01-01-01)。

作者简介: 张 义(1957-), 男, 吉林省洮南市人, 副研究员, 主要从事向日葵遗传育种研究。

同,微量元素不同。根据原土化学指标的测定结果,对三要素的含量进行调整,T₁处理是在原土养分的基础上补加P₂O₅和K₂O;T₂处理是T₁处理补加主要微量元素MnSO₄·H₂O、ZnSO₄·7H₂O和H₃BO₃;T₃是T₂处理补加微量元素Na-EDTA·2H₂O和FeSO₄·7H₂O(表1)。

表1 原土三要素含量和各处理土壤的营养成分

成分	原土(CK)	T ₁	T ₂	T ₃
速效氮(N)	85.0			
速效磷(P ₂ O ₅)	13.2	75.5	75.5	75.5
速效钾(K ₂ O)	101.4	50.2	50.2	50.2
MnSO ₄ ·H ₂ O	—	—	16.9	16.9
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	—	—	8.6	8.6
H ₃ BO ₃	—	—	6.2	6.2
Na-EDTA·2H ₂ O	—	—	—	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	—	—	—	27.9
有机质(%)	1.9			

注:各处理的成分是加入原土的营养量。

表2 不同培养土培养幼胚成苗率和发育状况(1997年)

培养土	成苗率(%)	接胚-真叶(d)	叶片色	移栽成活率(%)	接胚-开花(d)
CK	65	5	绿	94	56
T ₁	87	5	绿	97	56
T ₂	92	4	绿	96	52
T ₃	98	4	深绿	99	52

2.2 培养土 pH 值的筛选

只有 pH 值在一定的范围内,幼胚才能正常生长。要培养出健壮的幼苗,应选择适宜的 pH 值范围。因此,对向日葵幼胚生长相适应的 pH 值最大范围进行了研究。

试验材料选用杂交种白葵杂 4 号(F₂)和自交系 84103B。授粉后第 8 天取胚接种,每个试材接种不同 pH 值水平的营养土 20 杯,每杯接种 5 枚胚。在温度 25℃,4 000 lx 光照条件下培养。记载成苗率、接胚后 50%的幼苗第一对真叶出现(达到 3 mm)的天数,培养第 10 天

表3 不同 pH 值培养幼胚第 10 天成苗率与生长情况(1997年)

pH 值	白葵杂 4 号(F ₂)				84103B			
	成苗率(%)	接胚~真叶(d)	根系长度(mm)	胚轴长度(mm)	成苗率(%)	接胚~真叶(d)	根系长度(mm)	胚轴长度(mm)
3	3	无真叶	10.2	2.1	2	无真叶	12.2	3.5
4	47	7	50.4	18.4	33	8	41.9	10.6
5	76	5	51.7	18.7	69	5	40.3	15.0
6	92	4	57.1	19.6	88	4	48.2	13.4
7	89	4	59.2	24.2	96	4	48.4	13.1
8	94	4	53.6	21.1	91	5	31.2	11.2
9	66	5	31.2	21.3	53	5	27.5	11.0
10	4	6	12.5	12.0	13	6	17.5	11.0

2.1.2 筛选试验

将上述 4 个处理培养土的酸碱度调整为 pH=6.0,灭菌后装杯,浸蒸馏水至饱和备用。选用 RHA274×SRB296 的 BC₂ 作统一试验试材,授粉后第 8 天取胚,每个处理接胚 20 杯,每杯接种 5 枚胚。在温度 25℃,4 000 lx 全光照条件下培养。记载成苗率、接胚后 50%的幼苗第一对真叶出现(达到 3 mm)的天数、叶片色(移栽前观察记载,分浅绿、绿、深绿)和移栽成活率。移栽成活后,每个处理留 10 株,测验接胚到开花的天数。

表 2 试验结果表明,各处理的成苗率差异较大,T₃ 最高为 98%,其次是 T₂ 为 92%,原土最低为 65%。接胚后出现第一对真叶的天数,原土和 T₁ 处理为 5 d,T₂ 和 T₃ 为 4 d。移栽前 T₃ 处理幼苗叶片色比其它 3 个处理深。各处理的移栽成活率差异不大。从接胚到开花的天数,原土和 T₁ 处理是 56 d,T₂ 和 T₃ 是 52 d,可以看出,培养土的养分条件对后期的生长有显著的影响。

随机取 20 株调查根系长度(主根)和胚轴长度(表 3)。

表 3 结果说明,向日葵幼胚耐酸和碱的能力较强,当 pH 值 4 和 9 时,仍可发育成幼苗。最佳的 pH 值是 6 和 7,这时的成苗率高,生长发育速度快,根系发达,获得的幼苗健壮。两个试材的幼胚在 pH 值为 11~12 的条件下,只是子叶变绿,根系和上胚轴均不生长;当 pH 值为 3 时,成苗率极低,两个试材分别为 3%和 2%,生长极为缓慢;当 pH 值为 4 和 10 时,根系和上胚轴可以发育,但植株发育明显迟缓,幼苗较弱,成苗率较低。因此,幼胚营养土培养的最佳 pH 值应是 6 和 7。

2.3 培养土灭菌与操作要求

用于试验的培养土为 T₃ 营养土,品种为白葵杂 4 号,利用授粉后第 5、8 和 10 d 这 3 个水平的幼胚。试验分 3 个处理,每个处理接种 3 个水平的幼胚各 20 杯,每杯接种 5 枚胚。

① 无菌:培养土用高压灭菌锅灭菌,温度 125℃,压力 15 万 Pa(帕斯卡),时间 1.5 h。灭菌后在无菌条件下(超净工作台)装入杯底打孔的塑料杯中(一次性水杯,底径 4.8 cm,口径 6.5 cm,杯高 9.5 cm,杯底打孔直径 0.3 cm),装土距离杯口 1.5 cm。同时用直径 8.0 cm 培养皿盖好,放入无菌搪瓷盘中,采用杯下吸水法吸蒸留水达到最大持水量。摘取的幼胚在超净工作台上用 3%的次氯酸钠(NaOCl)浸泡灭菌 10 min,然后用蒸馏水漂洗 2~3 次。在无菌条件下将果皮和种皮剥去后接种幼胚。

② 半无菌:培养土灭菌与①相同,其它操作都在室内条件下完成,将培养土装入塑料杯中,采用杯下吸水法吸无菌水达到最大持水量,然后接种幼胚(幼胚不消毒)。接种的用具镊子、刀子和操作者的手用 75%酒精消毒。

③ 不灭菌:操作均在室内条件下完成。直接将未灭菌的培养土装杯,杯下吸水法吸无菌水达到最大持水量,然后接种幼胚。

以上 3 个处理的培养条件一致,接胚后放在光照培养箱中,在温度 25℃,4 000 lx 光照条件下培养。第 5 天调查记载污染率,第 10 天调查记载成苗率。

从表 4 的结果可以看出,污染率和成苗率与操作条件和胚龄有密切关系,随着胚龄的增大污染率明显降低,这是因为胚龄大,组织的抗菌能力增强。不灭菌操作的污染率明显高于无菌操作,其成苗率显著低于无菌操作。另外,值得强调的是培养土不灭菌长杂草,个别杯自身也有霉变。无菌和半无菌操作之间成苗率差异不大。半无菌操作污染率虽然高于无菌操作,但污染的程度不重,5 d 的胚污染率为 8%,8 d 和 10 d 的胚污染率均为 2%。而其它因素造成死亡胚主要是生理原因或接种时人为损伤。

综上所述,半无菌操作成苗率较高,方法简便易行,可操作性强,虽有一定量的污染率,但对移栽的影响不大。因此,半无菌操作法可作为推广应用的操作方法。

2.4 最佳取胚时期和培养条件的研究

授粉后幼胚达到某一发育阶段,因材料不同和发育时期不同而有差异。食用型发育慢,油用型发育较快。幼胚的大小(发育阶段)直接影响成苗率,过小不能成活,过大要进入休眠

表 4 白葵杂 4 号幼胚培养成苗率和污染率与操作条件的关系 (1997 年)

处 理	取胚时期 (d)	成苗率 (%)	污染率 (%)	其它因素造 成死亡胚(%)
无 菌	5	20	1	79
	8	95	0	5
	10	91	0	9
半无菌	5	17	8	75
	8	90	2	8
	10	94	2	4
不灭菌	5	0	100	0
	8	21	79	0
	10	70	23	7

期,但从缩短育种周期这一目的出发,应在能够获得幼胚培养成苗的情况下,尽量提前取胚时间。

2.4.1 取胚时期

培养试材:食用型品种匈4、油用型杂交种白葵杂4号、杂交后代RHA274×SRB296和自交系84103B。为了得到不同时期的幼胚和便于试验,各试材错期播种。胚龄:授粉后3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13和14d的幼胚。培养土:T₃培养土,pH值7,采用半灭菌操作法,每个试材各水平接胚20杯,每杯5枚。在温室25℃,4 000 lx光照条件下培养6d。记载培养成苗率,结果见表5。

表5 不同胚龄的幼胚成苗率(%) (1998年)

胚龄(d)	匈4	白葵杂4号	RHA274×SRB296	84103B	平均
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	8	2.0
5	0	17	19	26	15.5
6	0	18	13	56	21.8
7	33	70	80	77	65.0
8	64	90	92	95	85.3
9	61	93	96	91	85.3
10	90	95	82	90	89.3
11	95	88	94	93	92.5
12	87	94	95	97	93.3
13	93	96	89	94	93.0
14	87	91	88	90	89.0

从表5中可以看出,幼胚的成苗率与试材、发育阶段密切相关。就试材来说,食用型前期胚发育较慢,油用型前期胚发育较快。由于幼胚的大小(发育阶段)直接影响成苗率,所以授粉后油用型早期培育成苗率高于食用型。油用型材料授粉后5d幼胚成苗率都在15%以上,授粉后4d个别材料就有成苗能力。如果油用型特殊优良材料或性状转育可以考虑用授粉后4~5d的幼胚,这样可以节省时间,但在普通的育种程序中,建议授粉后7~8d进行接胚,食用型授粉后8~9d进行接胚。各种基因型随着胚龄的增大成苗率亦随着提高,但到授粉后14d幼胚成苗率有下降的趋势,这可能是子仁中产生休眠物质所致。

2.4.2 培养条件

试材为自交系84103B,授粉后第8天取胚接种,培养用T₃营养土,pH值7.0,半无菌法操作,每个处理接胚20杯,每杯5枚。光照培养箱培养,光照强度均为4 000 lx,培养期间连续光照。培养温度24℃、25℃和26℃,以室温下室内光照培养架培养为对照。培养10d,记载成苗率,随机取10株测量幼茎高(mm)和移栽成活率。

表6 培养温度对胚生长的影响(1998)

培养温度(℃)	成苗率(%)	接胚~真叶(d)	幼茎高(mm)	移栽成活率(%)
24	92	5	9.7	97.8(2)
25	90	4	12.5	95.6(4)
26	94	4	14.8	92.6(7)
室温	88	5	28.4	85.2(13)

注:室温为25~31℃,括号内的数字为死亡株数。

表6的结果表明,各培养温度对成苗率的影响不大,培养温度对幼茎高、移栽成活率影响较大。培养温度以25℃为宜,低温生长速度减缓,温度过高幼苗有徒长的趋势,不利于获得壮苗。室温下室内培养平均幼茎高最高,说明幼苗徒长,成苗率和移栽成活率最低,但也有移栽成活率较高的,为85.2%,说明室温下也可进行幼胚培养。

2.5 幼苗移栽

2.5.1 炼苗方法

炼苗期间主要进行温度和湿度管理,使生长条件逐步接近户外条件或室内条件。具体措施:从培养箱取出培养土培养的幼苗放置于用塑料薄膜搭成的拱棚内,拱棚的大小根据材料的多少而定,温室控制在24~30℃。第1天要遮光,避免阳光直射,在棚下部一侧将薄膜掀开1/5的缝。第2天加大通风,在两侧各掀开1/5的缝。第3天遮盖物减少,加大透光和通风量。第4天掀去薄膜,使温湿条件逐渐与外部条件相同。在炼苗的过程中一定要注意观察幼苗的失水程度,如出现萎蔫应立即减少通风量或光强度。

2.5.2 移栽试验

幼胚无论是在光照培养箱中还是室温下培养,都是在保湿条件下培养的(培养杯加透明盖),因此,要从培养杯直接移栽到温室中或室外,湿度剧降,这种湿度的显著差异导致幼苗严重失水而死亡,另外温度也有一定的变化。所以,幼苗移栽前一定要进行适应性锻炼。

表7结果表明,炼苗与否,材料之间差异不明显。炼苗与直接移栽之间成活率有显著的差异。直接移栽成活率较低,平均为28.3%,炼苗2 d平均成活率为72.5%,炼苗3 d平均成活率为91.7%,炼苗4 d平均成活率为97.5%。所以,炼苗的时间应在3~4 d为宜。

2.6 移栽后管理

为了使苗期快速生长,提早开花,在盆栽幼苗成活后,除了灌水、松土等正常的管理外,冬季要补光,每天光照应达到16 h左右。定期浇营养液,营养液用化肥配制即可。N:P₂O₅:K₂O的比例为8:8:6,浓度0.75%,每两周浇一次,一次每盆浇200 mL,一般在开花前浇2~3次。

表7 幼苗适应性锻炼后移栽

与直接移栽成活率(%) (1997)

炼苗时间(d)	匈4	白葵杂4号	84103B	RHA ²⁷⁴ ×SRB ²⁹⁶ BC ₅	平均
2	66.7	76.7	76.7	70.0	72.5
3	90.0	96.7	93.3	86.7	91.7
4	100.0	96.7	93.3	100.0	97.5
CK	30.0	33.3	26.6	23.3	28.3

注:每个材料各炼苗处理移栽30株幼苗。

3 结论

T₂和T₃营养土均适宜幼胚培养,T₃营养土最佳。接胚后出现第一对真叶为4 d,达到2对真叶的培养周期为10 d左右,从接胚到开花为52 d。

营养土最佳pH值范围为6~7,以中性偏酸为宜。

最佳的操作方法是半无菌操作法,即:培养土用高压灭菌锅灭菌,温度125℃,压力15万Pa,时间1.5 h。其它操作都在室内条件下完成,将培养土装入塑料杯中,采用杯下吸水法吸水达到最大持水量,然后接种幼胚(幼胚不消毒)。接种的用具镊子、刀子和操作者的手用75%酒精消毒。该方法的优点是简便易行,可操作性强,污染率较低,因此,半无菌操作法可以作为推广应用的操作方法。另外,污染率与幼胚的大小有关,在一定的范围内幼胚越大污染率越低。

幼胚的成苗率与试材、发育阶段密切相关。食用型前期胚发育较慢,油用型前期胚发育较快。授粉后油用型早期培育成苗率高于食用型。油用型材料授粉后5 d幼胚成苗率都在15%以上,授粉后4 d个别材料就有成苗能力。较适宜的接胚时间为油用型授粉后7~8 d、食用型授粉后8~9 d。各种基因型随着胚龄的增大成苗率亦随之提高,但到授粉后14 d幼胚成苗率有下降的趋势。

光照培养箱中幼胚培养条件,温度25℃为宜,培养期间全光照,光照强度要达到4 000 lx。室温下室内光照培养架培养,成苗率和移栽成活率虽然低于光照培养箱,但移栽成活率也较高,为85.2%,说明室温下进行幼胚培养是可行的。可节省大量的设备开支,有利于大规模的后代选育。

幼胚培养4~5 d可生长出1对真叶,8~10 d一般有2对真叶。2对真叶期是移栽的较适宜阶段。移栽前进行炼苗3~4 d。

从以上的结论可以看出,本研究成果优于培养基的培养效果。与之相比,本方法可因陋就简,提高了可操作性,减少污染,提高成活率,可极大的降低成本。因此,可扩大推广范围,加速我国的向日葵育种进程,为向日葵育种工作提供了一条经济实用和快速有效的途径。