

苜蓿(*Medicago sativa* L.)体细 胞胚发生与成苗研究*

II. 人工种子贮藏与种植

黄上志 傅家瑞 孙景欣 陈润政
(生物学系)

摘 要 苜蓿人工种子在60%RH中脱水3天,仍保持100%萌发和62.5%的成苗率,贮藏5天时失去发芽力。在45%RH中干燥3天后无萌发能力。非脱水状况下,人工种子保存在4℃中1个月,其发芽率和成苗率分别为91%和87%。人工种子直接播种于添加营养液的灭菌混合土中发芽率达100%,成苗率为41.6%。播种在无附加营养的混合土中虽然发芽率达100%,人工种子存活2个月以上,但不能转换成苗。人工种子在转换培养基上转化成苗后,移植至混合土中盆栽3个星期后幼苗成活率达80%以上。盆栽幼苗再移植至试验小区,成活率达98%以上。3个月后形成39cm高的致密草层,平均株高为48.8cm。

关键词 苜蓿,人工种子,贮藏,成苗,移植,种植

人工种子技术在植物优良品种的快速繁殖、固定杂种优势等方面具有许多优越性,有着广阔的应用前景。然而,人工种子含水量高,常温下易萌发,贮藏难度较大。目前对体细胞胚的贮藏研究较多^[1~4]。Senaratna等^[4]的研究表明,苜蓿体细胞胚可以在含水量10%~15%时存活3周。Redenbaugh等^[5]研究表明用海藻酸钠包裹制作的苜蓿人工种子在4℃下经1周贮藏后转换率明显下降。李凡等^[6]将人工种子经一定程度干燥后贮藏2个月成苗率达80%。苜蓿人工种子长时间贮藏还在探索中。苜蓿或胡萝卜人工种子直接播种于未消毒砾石或土壤中的转换率仍然很低^[5,7]。因此,在目前条件下,经一定时间贮藏或未经贮藏的人工种子经试管转换成苗后,进一步移栽到大田,不失为一条尽早转向应用领域的路径。本文报道了苜蓿人工种子的贮藏与种植的研究结果。

1 材料与方 法

1.1 植物材料与体细胞胚培养

苜蓿(*Medicago sativa* L.)种子由山西省畜牧兽医科学研究所牧草室提供。种子播种于装有壤土的花盆中培育幼苗,约4周后采集营养生长阶段完全发育的叶柄作为外植

本文1991年4月27日收到

• 国家863高技术发展计划资助课题。本工作承李宝健教授的指导和支持

体。体细胞胚诱导和培养按前文方法进行^[8]。

1.2 雏形人工种子构建

用1/2 SH+1.5%麦芽糖配制液体培养基,再加入3%海藻酸钠和3%活性炭作为人工胚乳。取成熟体细胞胚,按黄学林等^[9]方法滴制人工种子。

1.3 人工种子和体细胞胚的贮藏

人工种子的干燥脱水试验在盛有 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和KCNS饱和溶液的干燥器中进行。在25℃下,上述两种饱和盐溶液调节的环境相对湿度(RH)分别为60%和45%。将人工种子置于培养皿中放入干燥器中,第3和第5天取出作萌发试验。

未经脱水的人工种子或体细胞胚,置于培养皿中,用蜡膜密封后,置于4℃中贮藏1个月后,测定发芽率和转换率。部分体细胞胚直接浸泡在体细胞胚发生的液体培养基中贮于4℃。经贮藏后的体细胞胚制成人工种子作转换试验。

1.4 人工种子转换成苗

人工种子转换成苗培养基为1/2 SH附加1.5%麦芽糖、0.9%琼脂,按40ml培养基分装于150ml三角瓶中,每瓶接种5粒人工种子,在每天16h光照和25℃下培养,接种10天后统计发芽率,第6周统计成苗率。

人工种子直接播种于消毒的混合土,混合土为塘泥、珍珠岩、河沙,按比例各一份混合后装入150ml三角瓶中,每瓶装土50~60ml,然后加入蒸馏水或1/2 SH+1.5%麦芽糖转换培养基使混合土湿润,每瓶接种4粒人工种子,培养条件同上。

1.5 幼苗移植

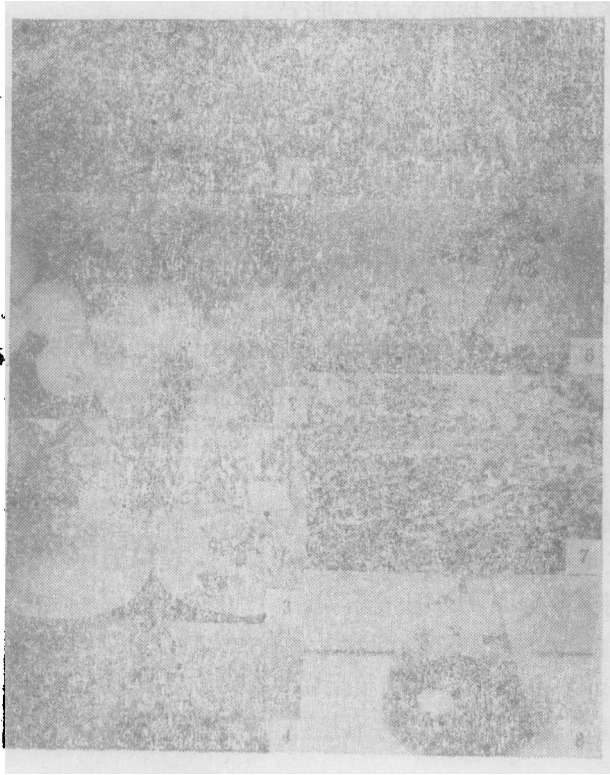
人工种子的瓶苗生长6周后,将三角瓶的封口铝箔纸揭松,以调节瓶内的湿度,使幼苗得到一定锻炼。5~6天后,将瓶内幼苗取出,洗去根部人工胚乳残余物和固体培养基,移植到装有混合土(成份同上)的花盆中,置于室外阴蔽处不少于1周,每天浇淋自来水,隔天施MS无机营养液一次。3~4周后再将这些幼苗移植到中山大学内的试验小区定植,按20×15cm打穴,每穴种1~2株幼苗。

2 结果

2.1 人工种子贮藏

本试验选用在体细胞胚发生培养基(SHO)液体培养12天、大小在12~16目之间的体细胞胚(图版I-1),体胚被包埋在人工胚乳中制成人工种子(图版I-2)。经包埋的体细胞胚在25℃中分别置于45%和60%RH的环境中干燥3至5天,人工种子的失水率、发芽率和转换率见表1。在45%RH中3天或5天的人工种子在无菌转化培养基上均失去萌发能力。而在60%RH中3天时,种子的失水率为30.6%,其发芽率和成苗率分别为100%和62.5%。在60%RH中5天,人工种子丧失发芽力。不过,在60%RH中干燥3天的人工种子萌发后幼苗生长速度较慢(图版I-3),6周后幼苗移植至室外盆栽可以成活,但生长也慢(图版I-4)。

在未经脱水情况下,包埋或未经包埋的体细胞胚在4℃下贮藏1个月后仍保持其萌发和转化成苗的能力(表2)。结果表明,人工种子和在培养皿中保存的体细胞胚经1个月贮藏后仍然保持较高的发芽率和转化率。但是,在液体培养基中保存的体细胞胚在



图版 I

1. 在SHO液体培养基中培养12天的首蓓体细胞群。
2. 用海藻酸钠包裹的人工种子。
3. 人工种子在6% RH中干燥后在1/2 SHO培养基上5周的成苗。左为干燥5天, 右为干燥3天。
4. 经干燥处理后人工种子转换幼苗在混合土中生长3周。
- 5~7. 人工种子保湿低温贮藏1个月后的成苗与移植(5. 在1/2 SHO培养基上5周的成苗; 6. 转换幼苗在混合土中生长3周; 7. 转换幼苗在混合土生长后再移植于试验小区中50天的植物苗)。
8. 人工种子播种于添加1/2 SHO营养的灭菌混合土中100天的成苗情况

表1 人工种子在不同相对湿度下干燥处理后的失水率、发芽率及成苗率*

Tab.1 The water-loss rate, germination rate and conversion rate of artificial seeds after drying treatment

相对湿度	处理天数	失水率(%)	发芽率(%)	成苗率(%)
45%	3	47.8	0	0
	5	73.9	0	0
60%	3	30.6	100	62.5
	5	47.2	0	0

* 失水率(%) = (种子失水量/种子原重) × 100%

表2 人工种子和体细胞胚在4℃下贮藏1个月后的发芽率与成苗率

Tab.2 The germination rate and conversion rate of artificial seeds after storage for one month at 4℃

贮藏处理	发芽率(%)		成苗率(%)
	5d	10d	
包埋体细胞胚(人工种子)	33	91	87
体细胞胚在液体培养基保存	40	85	50
体细胞胚在培养皿中保存	38	88	84

贮藏1个月后,萌发率与人工种子的比较差异不大,而转换成苗率则下降。在液体培养基中贮藏的体细胞胚经更长时间贮藏后,体细胞胚的绿色渐渐褪去,转变为黄褐色,并变肥大肿胀,失去萌发能力,到第2、3个月后,体细胞胚的萌发率为10%左右。经1个月贮藏的人工种子转换成苗的速度与生长状况与未经贮藏的人工种子无大的差异。贮藏过的人工种子在转换培养基上成苗后(图版I-5),进一步移栽至花盆中,最后移植至田间种植获得成功(图版I-6,7)。在田间试验小区上生长的苜蓿苗生长茂盛,移栽2个月后平均株高达48cm,形成的草层高度为37cm,与未贮藏人工种子比较无差异(表4)。

2.2 人工种子播种在无菌土壤中萌发和成苗

人工种子播种在无菌转化培养基(1/2 SHO)或混合土中的发芽率和转化率见表3。播种10天后,在1/2 SHO培养基上或在灭菌的混合土中的发芽率均达100%,到第6周时统计在1/2 SHO上的成苗率为82.6%。人工种子播种在混合土中的成苗速度和幼苗生长速度较慢。播种3个月后,在加蒸馏水湿润的混合土上的人工种子均不能转化成苗,而在加有1/2 SH并附加1.5%麦芽糖培养基湿润的混合土上的人工种子转化成苗率达41.6%。与在1/2 SHO培养基上的转化情况比较,混合土中的转化率为1/2 SHO培养基的50.3%。人工种子在附加营养的混合土中转化的幼苗生长3个月后幼苗的高度约相当于在1/2 SHO培养基上生长5~6星期的幼苗(图版I-8)。在不加营养的混合土上的人工种子可以存活2~3个月,显示子叶端极有限的伸长,但终不能转化成苗。附加营养混合土上的人工种播种3个月后,其存活率达72.2%。

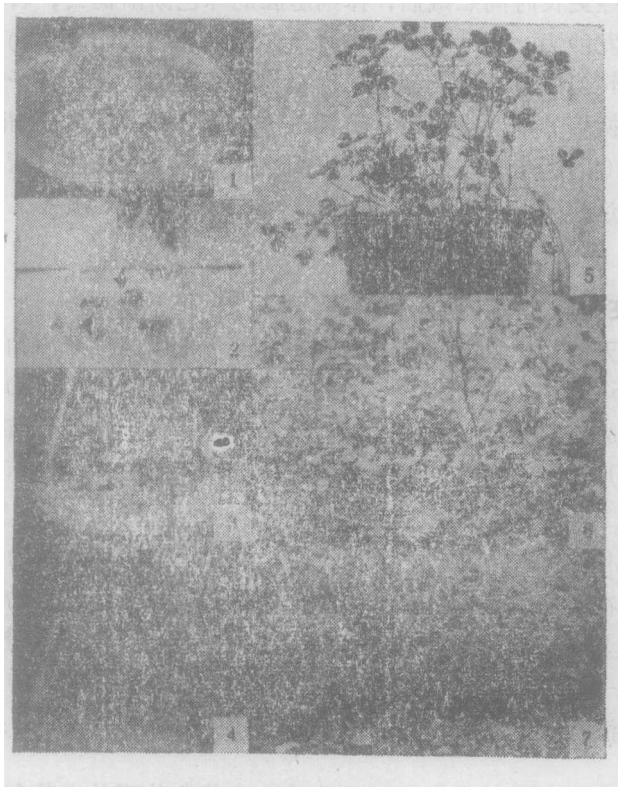
表3 苜蓿人工种子在不同播种基质和无菌条件下的发芽和成苗率

Tab.3 The germination rate and conversion rate of artificial seeds on different media under sterile conditions

播种基质	播种粒数	发芽率(%)	不同生长时间的成苗率(%)		
			42d	70d	90d
1/2 SHO	115	100	82.6		
混合土 + H ₂ O	27	100		0	0
混合土 + 1/2 SHO	36	100		30.5	41.6

2.3 人工种子转化幼苗及田间种植

苜蓿人工种子播种在无菌的1/2 SHO培养基上,其转化成苗率达80%~90%。图版Ⅰ中图1~4显示人工种子播种在转化培养基上萌发、成苗的过程。萌发后5~6周的幼苗移植到混合土中,只要保证充足水分和营养供给,幼苗生长迅速,转苗后3周,成活率在80%以上,植株上长出一些新枝和新叶(图版Ⅰ-5)。经盆栽3~4周的幼苗,根系发达,适于移栽至大田中。我们在1991年1~3月份共移植4批人工种子转化的幼苗,种植面积共12m²。尽管第一、二批在移植后遇到连续低温天气,仍保持良好的生长,各批成活率均在98%以上。幼苗移植时平均株高为8.8cm,移植后10天内生长迟缓,20~30天后迅速生长,株高达16~20cm(表4)。1个月内的苜蓿苗尚未形成草层,但移植后50~60天,由于分枝的迅速生长,株形扩大,开始形成草层(表4,图版Ⅰ-6)。移植60天后平均株高为43.6cm,形成35cm高的草层。90天时平均株高达48.8cm,形成39cm高的致密草层(表4,图版Ⅰ-7)。



图版Ⅰ 苜蓿人工种子在无菌培养基上成苗与幼苗的移植

1. 人工种子播种在1/2 SHO培养基上
2. 人工种子萌发,胚根伸长(箭头所指)
3. 人工种子在转换培养基上10天长成的小植株
4. 人工种子在转换培养基上5周的转换幼苗
5. 转换幼苗移植到混合土中盆栽3周
6. 盆栽幼苗在试验地中生长50天后开始形成草层
7. 盆栽幼苗在试验地中生长80天形成致密草层

表4 人工种子转化幼苗移植试验小区后的生长情况
Tab.4 The growth of alfalfa seedlings converted from artificial seeds in experimental plot

种植批号	I	II	III	IV
移植日期	1月20日	2月20日	3月20日	3月30日
生长时间(d)	90	60	30	20
种植穴数	57	42	48	37
幼苗成活率(%)	98.2	100	100	100
平均株高(cm)	48.8	43.6	20.3	15.8
草层高度(cm)	39	35	—	—

3 讨论

与自然的作物种子一样,人工种子的贮藏是其生产中的重要环节。但是,人工种子含水量高,常温下易于萌发,也易于失水收缩,贮藏难度大。目前对人工种子的贮藏主要有干燥后贮藏和保湿低温下贮藏。李凡等^[6]将胡萝卜人工种子在失水率为67%或未经脱水的情况下贮于2℃中,2个月后人工种子的成苗率分别为80%和86%。Redenbaugh等^[6]报道,用海藻酸钠包裹后制成的苜蓿人工种子在4℃中贮存28天,其成苗率显著下降,且下降速度比不包裹的体细胞胚快。不过,苜蓿的体细胞胚在风干后存活力很强,保存数月甚至1年后仍可在湿润滤纸上发芽^[1~3]。本研究结果表明,苜蓿人工种子在60%RH中干燥3天后,发芽力仍为100%,而成苗率为62.5%,成苗速度下降,幼苗生长缓慢。干燥5天后失去发芽力。将苜蓿人工种子在保湿和低温下贮藏1个月,仍保持较高的发芽率和成苗率。成苗速度与贮藏前种子差异不大,幼苗移至试验地种植,生长良好。说明保湿低温保存人工种子方法在短期内对体细胞胚的活力没有明显影响,干燥贮藏则会造成体胚活力的下降。

Redenbaugh等^[5,10]报告苜蓿人工种子已获得高于80%的成苗率,并指出苜蓿为无胚乳植物,营养储存在子叶中,体胚可以直接播种在土壤中能发芽和成苗。但是,在我们的试验中,苜蓿人工种子在不加营养的混合土中不能转化成苗,加入营养液后则可使成苗率提高到41.6%。不过,其成苗的速度比在1/2 SHO培养基上的相差很大,这些结果说明,添加营养对苜蓿人工种子转换成苗是十分必要的。Drew^[10]发现蔗糖对胡萝卜体细胞胚的发芽和成苗是必不可少的。我们也发现维生素C及一些生长调节物能促进苜蓿体细胞胚转换率的提高^[8]。目前,在体细胞胚外包装的“人工胚乳”的质和量,远未能满足人工种子的萌发和幼苗的生长对营养物质的需求。因此,人工胚乳的构建仍然是急待研究和解决的课题。

现阶段用于制备人工种子的体细胞胚的成熟度和健壮度不高,而人工胚乳中含有糖等有机物质。一般播种在未经灭菌土壤中的人工种子,往往在其“胚乳”中加入抗菌剂,成苗率很低^[7,12]。我们的试验表明,播种在灭菌的添加营养的混合土中的人工种子转化成苗的速度比在1/2 SHO培养基上的慢。可见,要使人工种子推向应用领域,还有许

多困难和障碍。我们建立的首蓿人工种子在无菌条件下转化成苗,进一步移植至大田种植的模式,与理想人工种子的要求甚远。实际上,人工种子的胚乳包括了少量的包裹介质和大量的培养基成分。然而,人们在一定程度上通过这一途径,可以使具有重要商业价值或科学意义的体细胞胚和人工种子技术及早应用到生产实践中去。

参 考 文 献

- 1 Mckersie B D *et al.* In Vitro Cell Dev Biol, 1989, 25: 1138
- 2 Senaratna T *et al.* Plant Sci, 1989, 65: 253
- 3 Senaratna T *et al.* In Vitro Cell Dev Biol, 1990, 26: 85
- 4 Gray D J. In Vitro Cell Dev Biol, 1989, 25: 1173
- 5 Redenbaugh K *et al.* Hortscience, 1987, 22(5): 803
- 6 李凡等. 植物人工种子研究(李修庆主编). 北京: 北京大学出版社, 1990. 71
- 7 李修庆等. 植物人工种子研究(李修庆主编). 北京: 北京大学出版社, 1990. 52
- 8 孙景欣等. 中山大学学报(自然科学版), 1991, 29(2): 18
- 9 黄学林等. 中山大学学报论丛(自然科学), 1989, 18(9): 99
- 10 Redenbaugh K *et al.* Bio/Tech, 1986, 4: 797
- 11 Drew R L K. Hortie Res, 1979, 19: 79
- 12 张天宏等. 植物人工种子研究(李修庆主编). 北京: 北京大学出版社, 1990. 41

Studies on Alfalfa Somatic Embryogenesis and Seedling Formation

I. Storage and planting of artificial seeds

Huang Shangzhi* Fu Jiarui Sun Jingxin Chen Renzheng

Abstract After Alfalfa (*Medicago sativa* L.) artificial seeds were desiccated in 60% RH for 3 days, 100% of germination and 62.5% of conversion rate were obtained in these seeds. None of them survived after drying in 45% RH for 3 days. The artificial seeds those were not desiccated had 91% of germination rate, and 87% of these seeds converted to seedlings after storage for 30 days at 4°C. 100% of artificial seeds germinated and 41.6% of the seeds converted to seedlings on the mixed soil wetted with 1/2 SHO medium under sterile conditions. When the artificial seeds were sowed in the mixed soil without 1/2 SHO medium under sterile conditions, 100% of the seeds germinated and most of them survived in 2 to 3 months, but they did not convert into seedlings. The seedlings converted from artificial seeds had 80% of emergence rate after transferring to pots filled with mixed soil after 3 weeks. The seedlings grown in pots for 3 to 4 weeks were further planted in experimental plot. 98% of seedlings grew well. After 3 months the grass layer of seedlings reached 39 cm height, and the height of the plantlet was 48.8 cm.

Keywords alfalfa, artificial seed, storage, conversion, transfer, planting

* Department of Biology