

### 提高树莓种子萌发率方法研究

杨国慧<sup>1</sup>, 农学博士, 教授

李铁梅<sup>2</sup>, 农学博士, 讲师

<sup>1,2</sup> 东北农业大学园艺园林学院, 哈尔滨, 中国

<sup>1</sup> [yangguohui@msn.com](mailto:yangguohui@msn.com), <sup>2</sup> [litiemei2011@163.com](mailto:litiemei2011@163.com)

**摘要:** 树莓为蔷薇科 (Rosaceae) 悬钩子属 (*Rubus*) 灌木类小浆果果树。其果实属于聚合小核果, 种皮厚而坚硬, 种子萌发率低且萌发生时间长, 因而影响了杂种实生苗的获得。本研究采用硫酸、外源激素、热激等不同方法结合不同天数的低温层积处理树莓种子, 同时开展树莓成熟胚培养, 目的在于寻找打破树莓种子休眠的方法。结果表明, 硫酸处理可以提高树莓种子萌发率, 最好的处理为 95%硫酸 10 min、层积 30d 后播种, 出苗率达 18.00%; 成熟胚培养也可以有效打破种子休眠, 其培养方法为: 2% 的 NaClO 消毒 12 min, 对种子进行两端切削, 种胚萌发生长的最佳培养基为 1/2MS + 6-BA 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L, 最佳生根培养基配方为 1/2MS+ IBA 0.3 mg/L + NAA 0.4 mg/L + IAA 0.2 mg/L

**监测:** 树莓, 种子, 萌发率, 硫酸处理, 成熟胚培养

УДК 634.7

EDN OLQANX

<https://doi.org/10.22450/978-5-9642-0639-2-235-245>

### Методы повышения всхожести семян малины

Ян Гохуэй<sup>1</sup>, доктор философии в области агрономии, профессор

Ли Темей<sup>2</sup>, доктор философии в области агрономии, преподаватель

<sup>1,2</sup> Школа садоводства и ландшафтной архитектуры, Северо-Восточный

сельскохозяйственный университет, провинция Хэйлунцзян, Харбин, Китай

<sup>1</sup> [yangguohui@msn.com](mailto:yangguohui@msn.com), <sup>2</sup> [litiemei2011@163.com](mailto:litiemei2011@163.com)

**Аннотация.** Исследования проводились различными методами – с помощью серной кислоты, экзогенных гормонов и теплового стресса. Для обработки семян малины использовалась низкотемпературная стратификация в разные сроки; параллельно проводилось культивирование зрелых зародышей

малины. Результаты показывают, что обработка серной кислотой может улучшить всхожесть семян малины. 95-процентная серная кислота в течение 10 минут и посев после 30-дневной стратификации обеспечивают процент прорастания 18,00 %. Культивирование зрелых зародышей также может эффективно нарушить период покоя семян. Рекомендуется использовать способ культивирования: дезинфекция 2 % NaClO в течение 12 минут, семена срезаются с обоих концов. Авторами предложена наилучшая среда для прорастания и роста зародышей семян, а также наилучшая формула среды для укоренения.

**Ключевые слова:** малина, семена, всхожесть, обработка серной кислотой, культура зрелых зародышей

### **Methods of increasing the germination of raspberry seeds**

**Yang Guohui**<sup>1</sup>, PhD in Agronomy, Professor

**Li Temei**<sup>2</sup>, PhD in Agronomy, Lecturer

<sup>1, 2</sup> School of Horticulture and Landscape Architecture, Northeast Agricultural University, Heilongjiang Province, Harbin, China

<sup>1</sup> [yangguohui@msn.com](mailto:yangguohui@msn.com), <sup>2</sup> [litiemei2011@163.com](mailto:litiemei2011@163.com)

**Abstract.** The research was carried out using various methods – with the help of sulfuric acid, exogenous hormones and heat stress. Low-temperature stratification was used for processing raspberry seeds at different times; in parallel, the cultivation of mature raspberry embryos was carried out. The results show that sulfuric acid treatment can improve the germination of raspberry seeds. 95% sulfuric acid for 10 minutes and sowing after 30 days of stratification provide a germination rate of 18.00%. The cultivation of mature embryos can also effectively disrupt the dormancy period of seeds. It is recommended to use the cultivation method: disinfection of 2% NaClO for 12 minutes, the seeds are cut off at both ends. The authors have proposed the best environment for germination and growth of seed germs, as well as the best formula for rooting.

**Keywords:** raspberries, seeds, germination, sulfuric acid treatment, culture of mature embryos

树莓为适合中国北方寒地栽培的一种特色小浆果果树。中国树莓最早的栽培是在上世纪 20 年代由俄罗斯人带入黑龙江省尚志市石头河子镇种植的。20 世纪 90 年代, 树莓的种植逐渐扩大到北京、天津、山东、宁夏等地, 种植面积扩大到近万公顷 [1]。在中国树莓生产中, 采用的品种主要以国外引入为主, 因此, 开展具有自主知识产权品种选育势在必行。

树莓育种目前仍以杂交育种为主，但其种子发芽率低且发芽时间长，从而影响杂种实生苗的获得。本课题组在前期的研究中已经明确，树莓种子难以发芽既有因厚而致密的内果皮造成的物理性机械障碍，也有因种胚、胚乳中含有的抑制物引起的生理性休眠，属于混合型休眠 [2]。在此基础上，本研究采用硫酸、外源激素、热激等不同方法处理树莓种子，同时开展树莓成熟胚培养，目的在于提高树莓种子萌发率，推动树莓杂交育种进程。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验中树莓种子的显微观察和硫酸等不同处理对种子萌发的影响采用的为夏果型树莓品种 ‘DNS1’，胚培养采用的为秋果型树莓品种 ‘秋萍’。其中，对种子的显微观察采集了三种不同成熟期（青果期、白果期、成熟期）的果实 [3]，其余试验皆采用的为成熟种子。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 种子显微结构的观察

种子采收后放入 FAA 固定液中固定，固定液的配比为 70% 的乙醇：福尔马林：冰醋酸 = 90:5:5。采用常规石蜡切片法制片，番红亮绿对染，切片厚度 10~12  $\mu\text{m}$ ，用 OLYMPUS 显微镜进行观察拍照。

#### 1.2.2 不同处理对种子萌发的影响

（1）硫酸处理对树莓种子萌发影响。收集已干燥的树莓种子分别用 75%、95% 硫酸处理 10、20 和 30 min，之后蒸馏水反复冲洗，以清水浸泡作对照。将处理后的种子与细湿沙按 1:3 比例混匀，于 4 °C 冰箱中分别层积 0、30、60、90 和 120d。将层积后的种子播入基质中，基质的成分是草炭土、蛭石和珍珠岩，比例为 3:1:1。播种后放于温室中，调查种子出苗率及出苗速率，出苗情况以露出两片子叶为准 [4]。

（2）外源激素处理对树莓种子萌发影响。将干燥后种子放入 4 °C 冰箱

中冷藏 0、30、60、90 和 120d，再用不同浓度的外源激素于 28 °C 下浸泡 48h 后与湿沙混合播种。外源激素浓度分别为：赤霉素 400、800、1600 mg/L，6-BA 浓度为 100、200、300 mg/L，乙烯利浓度为 400、500、600 mg/L，以清水处理为对照。

(3) 热激处理对树莓种子萌发影响. 将干燥后种子置于 4 °C 冰箱中冷藏 45d，取出放于不同温度的恒温箱中处理不同时间后，再放回于 4 °C 冰箱冷藏 90d，取出与湿沙混合后播种。

不同温度不同时间的搭配组合为：25 °C – 24 h、40 °C – 60 min、50 °C – 60 min、60 °C – 60 min、70°C – 30 min、80°C – 2 min、90°C – 2 min、100 °C – 2 min、110 °C – 2 min、120 °C – 2 min，以常温处理的种子作对照。

以上处理以 50 粒种子为一组，每个处理三次重复。

### 1.2.3 树莓成熟胚培养

(1) 不同灭菌时间对种胚萌发影响. 用流水冲洗种子 12 h，然后用刀片切破种皮，置于超净台上用 75% 酒精消毒 30 s，再用 2% 的 NaClO 浸泡并不断搅拌，随后用无菌水冲洗 3–4 次，用无菌滤纸吸附残留的水分接种到培养基上。NaClO 灭菌时间分别为 5、8、10、12 和 15 min。

(2) 不同切法对种胚萌发影响. 采用三种不同方法对种子进行切削处理后置于培养基上：(A) 种子两端同时切；(B) 切胚乳端；(C) 切胚端 [5]，以不切种子为对照。

(3) 胚培养基本培养基筛选. 分别用 MS 培养基、1/2MS 培养基、WPM 培养基作为基本培养基筛选，培养基中添加蔗糖 30 mg/L，琼脂 7.5 mg/L，筛选出效果最好的培养基。

(4) 6-BA 浓度对种胚萌发影响. 采用的激素主要为 6-BA 和 IAA，其中 6-BA 设置了五个浓度分别为：0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mg/L，IAA 浓度为 0.2 mg/L，以不添加任何激素为对照 (CK)。3–4 周后调查试验结果，选出

最好的激素处理进行继代培养。以上试验每个处理均 20 粒种子，3 次重复。

(5) 激素浓度对种胚生根影响。将萌发的种胚转入继代培养基培养 5–6 周后，再转入到生根培养基。生根培养用 1/2MS 作为基本培养基，添加 IBA、NAA、IAA 三种激素进行正交试验设计  $L_9(3^4)$ ，这三种激素浓度分别为 IBA (0.1、0.3 和 0.5 mg/L)、IAA (0.1、0.2 和 0.3 mg/L)、NAA (0.2、0.4 和 0.6 mg/L)。每处理接种 5 瓶，每瓶 2 株，3 次重复，20d 后调查生根率。

### 1.3 数据分析

用 Excel 2007 和 SPSS 17.0 对数据进行方差分析和多重比较 (Duncan 法)，小写字母表示  $P < 0.05$  水平差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 树莓种子显微结构观察

对种子解剖结构观察表明，树莓种子由内果皮、种皮、胚乳与胚三部分组成。内果皮较厚且表面坚硬，呈齿轮状包裹在种子外侧。随着种子不断发育，内果皮逐渐变薄。种皮紧贴内果皮，随着种子发育，种皮逐渐增厚。

胚乳层较厚，与种皮紧密结合，随着种子发育胚乳层逐渐变薄，营养物质被胚吸收。白果期时，两片子叶开始发育分离，到成熟期时，子叶完全分离 (表 1)。

表 1 不同发育时期树莓种子解剖观察

	青果期	白果期	成熟期
内果皮厚度 ( $\mu\text{m}$ )	169.98a	161.52b	133.40c
种皮厚度 ( $\mu\text{m}$ )	11.98c	22.89b	25.05a
胚乳层厚度 ( $\mu\text{m}$ )	83.71a	74.56b	54.79c
子叶间隔 ( $\mu\text{m}$ )	0c	24.98b	35.16a

### 2.2 不同处理对种子萌发影响

#### 2.2.1 硫酸处理

如表 2 所示，采用不同层积时间、未用 75% 硫酸处理的对照树莓种子均

未萌发。用硫酸处理萌发率最高的为层积 90 天、硫酸处理 30 min，其平均、最高、最低出苗率分别达到 14.67%、26%、2%，出苗速率为 0.025%；其次为层积 30 天处理 30 min 和层积 90 天处理 20 min，出苗率都达到 12.67%；再次为层积 90 天处理 10 min，出苗率达到 11.33%；其余处理出苗率都低于 10%，且大多数处理均未出苗。

表 2 75% 硫酸处理树莓种子出苗情况

层积天数 (d)	处理时长 (min)	平均出苗率 (%)	最高出苗率 (%)	最低出苗率 (%)	出苗速率 (%)
0	0 (CK)	0.00	0.00	0.00	0.00
0	10	0.00	0.00	0.00	0.00
0	20	0.00	0.00	0.00	0.00
0	30	0.00	0.00	0.00	0.00
30	0 (CK)	0.00	0.00	0.00	0.00
30	10	1.33f	4.00	0.00	0.014d
30	20	9.33d	14.00	6.00	0.028c
30	30	12.67b	24.00	4.00	0.027c
60	0 (CK)	0.00	0.00	0.00	0.00
60	10	2.67e	6.00	0.00	0.027c
60	20	0.67f	2.00	0.00	0.010d
60	30	8.00d	20.00	0.00	0.20a
90	0 (CK)	0.00	0.00	0.00	0.00
90	10	11.33b	22.00	2.00	0.020c
90	20	12.67b	20.00	8.00	0.020c
90	30	14.67a	26.00	2.00	0.025c
120	0 (CK)	0.00	0.00	0.00	0.00
120	10	2.00e	4.00	0.00	0.15b
120	20	1.30f	10.00	0.00	0.14b
120	30	2.00e	4.00	0.00	0.17b

如表 3 所示，采用不同层积时间、未用 95% 硫酸处理的对照树莓种子也均未萌发。硫酸处理的萌发率最高的为层积时间 30d、处理 10 min，其平均、最高、最低出苗率分别为 18.00%、30.00%、4.00%，出苗速率为 0.028%；其次是层积 30d 处理 20 min，平均出苗率为 15.33%；再次是层积 90d 硫酸处理 20 min 和 30 min 的种子，平均出苗率分别为为 14.00% 和 11.33%；其余处理出苗率也都低于 10%，且大多数处理均未出苗。

表 3 95% 硫酸处理树莓种子出苗情况

层积天数 (d)	处理时长 (min)	平均出苗率 (%)	最高出苗率 (%)	最低出苗率 (%)	出苗速率 (%)
0	0 (CK)	0.00	0.00	0.00	0.00
0	10	0.00	0.00	0.00	0.00
0	20	0.00	0.00	0.00	0.00
0	30	0.00	0.00	0.00	0.00
30	0 (CK)	0.00	0.00	0.00	0.00
30	10	18.00a	30.00	4.00	0.028a
30	20	15.33b	22.00	4.00	0.029a
30	30	0.00	0.00	0.00	0.00
60	0 (CK)	0.00	0.00	0.00	0.00
60	10	2.67e	6.00	0.00	0.024b
60	20	0.00	0.00	0.00	0.00
60	30	0.00	0.00	0.00	0.00
90	0 (CK)	0.00	0.00	0.00	0.00
90	10	6.67d	16.00	0.00	0.002d
90	20	14.00b	11.33	4.00	0.019c
90	30	11.33c	14.00	2.00	0.017c
120	0 (CK)	0.00	0.00	0.00	0.00
120	10	0.00	0.00	0.00	0.00
120	20	0.00	0.00	0.00	0.00
120	30	0.00	0.00	0.00	0.00

### 2.2.2 其它不同方法处理

(1) 三种外源激素试验. 分别用 400、800、1600 mg/L 的赤霉素, 100、200、300 mg/L 的 6-BA, 400、500、600 mg/L 的乙烯利处理不同层积时间的树莓种子, 其处理与对照均未出苗。

(2) 热激处理试验. 先将种子置于 4 °C 冰箱中冷藏 45d, 取出放于不同温度的恒温箱中, 一定时长后取出再放回于 4 °C 冰箱冷藏 90d, 其种子均未出苗, 70 °C 以上处理的种子表面呈黑色, 种子死亡。

## 2.3 树莓成熟胚培养

### 2.3.1 不同消毒时间对灭菌效果影响

用 2% 的 NaClO 对 ‘秋萍’ 种子灭菌后进行胚培养。由表 4 可知, 随着灭菌时间的加长, 污染率降低, 消毒效果最好, 但消毒 15 min 和 12 min 相比, 其褐化率也显著升高。因此, 确定灭菌时间为 12 min。



表 4 2% NaClO 处理时间对胚培养消毒效果影响

灭菌时间 (min)	种子数	污染率 (%)	褐化率 (%)
5	20	41.67±1.21a	0
8	20	35.42±2.04b	0
10	20	24.20±0.93c	46.67±1.64a
12	20	13.75±0.59d	10.00±0.35c
15	20	12.50±1.31e	23.75±0.28b

### 2.3.2 破皮部位对种胚萌发影响

探究切削胚端、胚乳端及两端（图 1）对种胚发芽效果。三种切法种胚萌发差异显著，切两端的方法发芽率最好，为 55.71%，其次为胚乳端和胚端，发芽率分别为 40%、25.23%。切胚乳端出现了污染，污染率为 13.33%（表 5）。

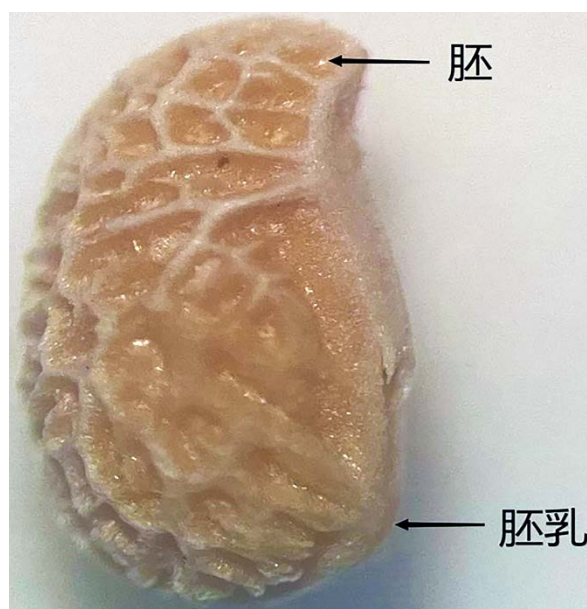


图 1 树莓种子

表 5 破皮部位对种胚萌发影响

破皮部位	种子数	污染率 (%)	萌发率 (%)
两端	20	0	55.71±2.06a
胚	20	0	25.23±1.89c
胚乳	20	13.33±0.64	40.00±1.35b
CK	20	0	0

### 2.3.3 基本培养基筛选

在三种基本培养基中，WPM 培养基萌发率最高，为 48.33%；其次为 1/2MS 培养基和 MS 培养基，萌发率分别为 41.66% 和 23.33%。但 WPM 培



培养基的胚苗生长一般，叶片微黄，1/2MS 培养基生长健壮，叶片浓绿，因此选择 1/2MS 为基本培养基（表 6）。

表 6 基本培养基筛选

基本培养基	萌发率 (%)	胚苗生长情况
1/2MS	41.66±1.38b	生长健壮、叶片浓绿
MS	23.33±0.37c	生长良好、叶片淡绿
WPM	48.33±0.51a	生长一般、叶片微黄

#### 2.3.4 6-BA 对种胚萌发及生长影响

由表 7 可知，不同浓度 6-BA 对胚发芽效果差异明显。当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时，发芽率最高，达 56.68%，对照只有 6.67% 的发芽率，但萌发苗生长情况却随着 6-BA 浓度的升高而下降。综合来看，确定适宜 6-BA 浓度为 1.0 mg/L。

表 7 不同浓度 6-BA 对种胚萌发影响

6-BA 浓度 (mg/L)	种子数	萌发率 (%)	生长情况
0.5	20	38.34±0.35b	生长健壮，叶片浓绿
1.0	20	56.68±1.09a	生长良好，叶片淡绿
1.5	20	16.67±1.24e	生长一般，叶片淡绿
2.0	20	31.67±0.83	生长一般，叶片微黄
2.5	20	22.24±0.55d	生长矮小，叶片微黄
0 (Ck)	20	6.67±1.41f	生长一般，叶片微黄

#### 2.3.5 激素浓度对种胚生根影响

由表 8 的正交结果可知，不同浓度激素处理对生根影响较大，处理 5 的生根率最高，达 64.48%，处理 1 的生根率最低，仅 14.29%。由生根率的 R 值可知，3 因素对种胚生根影响的顺序为 IBA 浓度 >NAA 浓度 >IAA 浓度，综合分析最优处理为 IBA 0.3 mg/L+NAA 0.4 mg/L + IAA 0.2 mg/L。

### 3 讨论与结论

研究者将种子休眠通常分为五种：形态休眠（morphological dormancy, MD）、生理休眠（physiological dormancy, PD）、形态生理休

眠（morphophysiological dormancy, MPD）、物理休眠（physical dormancy, PY）、混合（PY + PD）[6, 7]。

表 8 不同激素浓度（mg/L）对种胚生根影响

处理	IBA 浓度	NAA 浓度	IAA 浓度	生根率（%）
1	0.1	0.2	0.1	14.29±0.46h
2	0.1	0.4	0.3	25.56±1.35g
3	0.1	0.4	0.2	35.56±0.75e
4	0.3	0.2	0.3	34.89±0.29e
5	0.3	0.4	0.2	64.48±1.95a
6	0.3	0.6	0.1	54.44±1.08b
7	0.5	0.2	0.2	38.33±1.21d
8	0.5	0.4	0.1	43.21±2.03c
9	0.5	0.6	0.3	33.33±0.57f
K1	25.14	29.12	37.31	—
K2	51.22	44.42	46.12	—
K3	38.29	41.11	31.21	—
R	26.08	15.30	14.91	—

针对不同类型的休眠，采用不同的处理方法来打破休眠。如针对生理休眠，一般采用低温层积、GA 处理，而针对物理休眠，通常用机械处理或化学方法破坏坚硬的外壳来打破休眠 [8]。本研究采用不同的层积时间、硫酸、激素、热激处理来处理树莓种子，结果表明，只有硫酸处理有效，其中最好的为 95% 硫酸处理 10 min、层积 30d 后播种，出苗率达 18.00%。这同时也说明了，虽然树莓属于混合型休眠，但因种皮厚而致密造成的机械障碍对其出苗影响更大。

成熟胚培养技术主要为了解决种子萌发问题，它能破除种子的种皮障碍并在合适培养基中诱导种胚发芽，高效成苗等。选择适宜种胚的最佳培养基配方对种子发芽成苗具有十分重要的意义。谷晓峰等在罗田甜柿研究中表明，罗田甜柿胚培养时的最适培养基为 1/2MS 培养基 [9]，本研究的试验结果也表明，1/2MS 培养基最适宜树莓种胚萌发。杨艳敏等人在研究树莓胚培养试验中发现当 6-BA 浓度为 0.5 mg/L 时杂交种胚生长效果较好 [10]，本研究在基本培养基基础上添加 6-BA 和 IAA，表明当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时，萌

发效果较好，苗的长势也比较好，这也可能使用的品种不同有关。在植物组织培养中，同一植物的不同部位对激素的需求也不一样。本研究利用 3 种激素：IBA、NAA、IAA 进行正交试验设计以筛选适宜的生根培养基配方，结果表明 IBA 浓度对树莓生根影响最大。

最终确定，树莓成熟胚培养方法为：2% 的 NaClO 消毒 12 min, 对种子进行两端切削，种胚萌发生长的最佳培养基为：

1/2MS + 6-BA 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L

最佳生根培养基配方为：

1/2MS + IBA 0.3 mg/L + NAA 0.4 mg/L + IAA 0.2 mg/L

#### 参考文献

1. 吴林, 张强, 王颖, 李金英. 中国树莓科学研究和产业展望的回顾与展望. 吉林农业大学学报, 2021;43(03):265–274.
2. 杨国慧, 范珍珠, 李玲等. 树莓种子休眠原因探究. 东北农业大学学报, 2020;51(11):32–39.
3. 李红霞. 脱落酸对树莓果实成熟软化的作用及其与乙烯之间的关系. 东北农业大学, 2019.
4. Sang Y. K., Katherine M., Warpeha S. C. H. The brassinosteroid receptor kinase, BRI1, plays a role in seed germination and the release of dormancy by cold stratification, Elsevier GmbH, 2019, 241 p.
5. 李粤渤, 代汉萍, 王菲, 林莉娜. 影响树莓种子萌发关键因子的研究. 安徽农业科学, 2006;07:1354–1356.
6. 程鹏, 王平, 孙吉康, 费明亮, 杨辉. 植物种子休眠与萌发调控机制研究进展. 中南林业科技大学学报, 2013;33(05):52–58.
7. 张鹏. 种子休眠相关概念及分类研究进展. 种子, 2012;31(07):54–57, 61.
8. 李旭. 种子休眠类型及其破除方法. 现代农业科技, 2016;22:57.
9. 谷晓峰, 唐仙英, 罗正荣. 罗田甜柿幼胚培养条件的研究. 果树学报, 2001;02:80–83.
10. 杨艳敏, 魏鑫, 张舵等. 树莓成熟胚组织培养技术研究. 上海农业学报, 2021;37(6):65–69.

© 杨国慧, 李铁梅, 2024