

文章编号: 1003-8701(2015)01-0019-04

CuSO₄和烯效唑对寒地粳稻成熟胚培养的影响

山 禾¹, 邹德堂^{1*}, 萨日娜², 张皓政¹

(1. 东北农业大学水稻研究所, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院南繁基地, 哈尔滨 150086)

摘 要: 为了建立寒地粳稻成熟胚的高频再生体系, 以寒地粳稻空育 131 和东农 425 为试验材料进行成熟胚培养, 研究 CuSO₄ 和烯效唑的单独和组合使用对水稻成熟胚培养的影响。结果表明: 在培养基中单独添加 15.0 μmol/L 的 Cu²⁺ 或添加 0.50 mg/L 的烯效唑有助于寒地粳稻成熟胚的诱导继代和分化; 在诱导和分化培养基中同时添加 CuSO₄ 和烯效唑时, 空育 131 在 CuSO₄ 浓度为 20.0 μmol/L 且烯效唑浓度为 1.00 mg/L 时, 愈伤组织的诱导率和分化率都达到最高; CuSO₄ 浓度为 10.0 μmol/L, 烯效唑浓度为 1.00 mg/L 时, 东农 425 愈伤组织的诱导率最高, CuSO₄ 浓度为 15.0 μmol/L, 烯效唑浓度为 1.00 mg/L 时, 东农 425 愈伤组织的分化率最高。

关键词: 寒地粳稻; 成熟胚; 组织培养; CuSO₄; 烯效唑

中图分类号: S511

文献标识码: A

DOI:10.16423/j.cnki.1003-8701.2015.01.005

Effect of CuSO₄ and Uniconazole on Culture of Mature Embryos of Japonica Rice

SHAN He¹, ZOU De-tang^{1*}, Sa Ri-na², ZHANG Hao-zheng¹

(1. Institute of Rice Research, Northeast Agricultural University, Harbin 150030;

2. South Breeding Base, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: In order to establish the system of high frequency plant regeneration for japonica rice mature embryos, effects of different concentrations of CuSO₄ and Uniconazole on in vitro culture of mature embryos were studied using two rice cultivars of Kongyu 131 and Dongnong 425. The results showed that callus induction and plantlet differentiation rate of japonica rice mature embryos were apparently improved on the medium with 15.0 μmol/L CuSO₄ or 0.50 mg/L Uniconazole. When 20.0 μmol/L CuSO₄ and 1.00 mg/L Uniconazole were added simultaneously in the induction and differentiation medium, the callus induction and plantlet differentiation rate of Kongyu 131 was the highest. When the concentration of CuSO₄ was 10.0 μmol/L and concentration of Uniconazole was 1.00 mg/L, the callus induction rate of Dongnong 425 was the highest. For the plantlet differentiation rate of Dongnong 425, the ideal concentrations of CuSO₄ and Uniconazole were 15.0 μmol/L and 1.00 mg/L.

Keywords: Japonica rice; Mature embryos; Tissue culture; CuSO₄; Uniconazole

自 Nishi 和 Yamada 第一次从成熟胚诱导出愈伤组织并分化出小植株以来, 水稻的组织培养工作进展较快, 也获得了较大的成就^[1-3], 与此同时水稻组织培养中存在一些问题, 如低再生率。影响水稻成熟胚愈伤组织再生率的因素很多, 其中某些金属离子和生长调节剂对提高再生能力具有

重要作用。铜离子是植物体内一些重要酶类的成分, 也是植物生长发育所必需的元素。调节培养基中的铜离子浓度, 不仅可以提高再生植株的数量, 同时也提高再生植株的质量^[4]; 烯效唑作为一种高效植物生长调节剂, 近年来它的使用范围从大田扩展到植物组织培养领域, 已经被用于水稻花药、玉米、草莓等试管苗的生长^[4-6], 但是在水稻成熟胚培养中的应用较少。

前人研究重点一般在铜离子或者烯效唑单独使用对水稻成熟胚愈伤组织培养的影响, 本试验以寒地粳稻品种空育 131 和东农 425 为试验材料, 在培养基中添加不同浓度铜离子及烯效唑, 筛选

收稿日期: 2014-08-26

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题(2013BAD20B04); 科技部科技攻关项目(2011BAD35B02-01); 科技部科技支撑项目(2011BAD16B11)

作者简介: 山 禾(1989-), 女, 在读硕士, 研究方向: 作物遗传育种。

通讯作者: 邹德堂, 男, 教授, 博士, E-mail: zoudt@163.com

出最适宜的铜离子和烯效唑浓度,再探讨最适宜铜离子浓度和烯效唑浓度的配比,从而为提高水稻成熟胚的诱导率和分化率,优化水稻组织培养体系,进一步为开展水稻遗传转化研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

空育 131 和东农 425 的成熟胚作为试验材料。

1.2 试验设计

1.2.1 试验方法

选取成熟饱满的种子,除去颖壳后,用 75%的酒精浸洗 1 min,再用 0.1%的升汞溶液灭菌 10 min,用无菌水洗涤 3 次。消毒后的外植体材料分别放在加有 3 张无菌滤纸的培养皿中,自然吹干后接种至诱导培养基中。每皿接种 20~25 粒,在 (26±2)℃暗培养 12 d,观察统计出愈率。形成愈伤组织后,转入继代培养基中,(26±2)℃时 14 d 后转移到分化培养基上。分化培养时,每个培养基接种 4~5 块愈伤组织,分化期间的光照强度为 3000 lx,光照每天 16 h。20 d 观察绿点情况,统计绿苗分化率。培养基成分见表 1。

表 1 愈伤组织的诱导培养基和分化培养基

培养基	成 分
诱导培养基	NMB 培养基(N6 大量元素+MS 微量元素+MS 铁盐+B5 有机成分)+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L +CH 300 mg/L +Pro 500 mg/L+3%蔗糖+0.7%琼脂
继代培养基	NMB 培养基+2,4-D 1.0 mg/L +6-BA 0.5 mg/L +CH 500 mg/L+ Pro 500 mg/L +3%蔗糖+ 0.7%琼脂
分化培养基	MS 培养基+NAA 0.5 mg/L +6-KT 2.0 mg/L +3%蔗糖+0.7%琼脂

1.2.2 CuSO₄和烯效唑单独使用对水稻成熟胚培养的影响

在诱导和继代培养基中分别添加浓度 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0μmol/L 的 CuSO₄·5H₂O 和 0.25、0.50、1.00、2.00 mg/L 浓度的烯效唑,并以不添加铜离子和烯效唑培养基为对照对成熟胚进行诱导和分化培养。统计诱导率和绿苗分化率。

1.2.3 CuSO₄和烯效唑浓度的组合使用对水稻成熟胚培养的影响

将筛选出的能够获得较高的愈伤组织诱导率和绿苗分化率的 3 个 CuSO₄浓度和 2 个烯效唑浓度进行相互组合,并以不添加铜离子和烯效唑的培养基为对照,再次对成熟胚进行诱导和分化培养。统计诱导率和绿苗分化率。

1.3 统计数据及数据处理

愈伤组织诱导率(%)=(出愈的外植体数目/接种外植体数目)×100%

绿苗分化率(%)=(具有绿点的愈伤组织块数/转移的愈伤组织块数) ×100%

所获数据分析采用 DPS v7.05 和 Excel 2007 进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同 CuSO₄浓度和烯效唑浓度对愈伤组织的诱导和分化的影响

由表 2 可知,在添加不同浓度铜离子和烯效唑的培养基上,2 个品种的愈伤组织诱导率和绿苗分化率因基因型的不同而有差异。2 个品种在添加铜离子的培养基中,其愈伤组织诱导率和绿苗分化率均高于对照。在试验的浓度范围内,2 个品种的诱导率和绿苗分化率均随铜离子浓度的增加呈先上升趋势,进一步增加铜离子浓度而呈下降趋势。2 个品种的愈伤组织诱导率在浓度为 15.0μmol/L 时达到最高,与其他处理均呈极显著差异,与对照相比分别提高了 8.0%和 22.0%。空育 131 和东农 425 的绿苗分化率在铜离子浓度为 15.0μmol/L 时达到最高,与培养基中不添加铜离子的对照相比分别提高了 26.4%和 27.0%。这说明在培养基中提高铜离子的浓度,有助于提高水稻成熟胚愈伤组织的诱导率和绿苗分化率。

不同浓度烯效唑对水稻成熟胚愈伤组织诱导率的影响较为明显,由表 2 可知在试验的浓度范围内,2 个品种的愈伤组织诱导率均随着烯效唑的浓度增加呈先上升趋势,进一步提高烯效唑浓度愈伤组织诱导率反而降低。空育 131 和东农 425 在烯效唑浓度为 0.50 mg/L 时的诱导率最高,与对照相比提高了 6.0%和 9.2%,与其他浓度间的差异达到极显著水平。以上结果表明在诱导培养基中添加适量烯效唑有助于提高水稻成熟胚愈伤组织的诱导率。

表2 不同铜离子浓度和烯效唑对水稻愈伤组织诱导和绿苗分化的影响

品种	铜离子浓度 (μmol/L)	愈伤组织 诱导率(%)	绿苗分化率 (%)	烯效唑浓度 (mg/L)	愈伤组织 诱导率(%)	绿苗分化率 (%)
空育 131	0	74.0fF	32.1fF	0	74.0eE	32.1eE
	5.0	75.5eE	41.1eE	0.25	79.0bB	45.4cC
	10.0	80.0bB	50.3cC	0.50	80.0aA	52.5aA
	15.0	82.0aA	58.5aA	1.00	76.5cC	47.5bB
	20.0	79.0cC	57.1bB	2.00	75.0dD	35.0dD
	25.0	76.5dD	45.9dD			
东农 425	0.0	42.0 fE	33.6eE	0	42.0eE	33.6eE
	5.0	48.4 eD	45.3dD	0.25	49.6bB	46.0cC
	10.0	50.4 cC	58.3bB	0.50	51.2aA	71.8aA
	15.0	54.4 aA	60.6aA	1.00	47.6cC	50.0bB
	20.0	51.5 bB	57.7bB	2.00	45.6dD	42.9dD
	25.0	49.6 dC	50.8cC			

与对照相比,烯效唑对2个品种的绿苗分化均有促进作用,在一定浓度范围内,随着烯效唑浓度的增加促进作用呈上升趋势,而进一步增加烯效唑浓度促进作用下降。在浓度为0.50 mg/L时,空育131和东农425的绿苗分化率最高,与对照相比提高了20.4%和38.2%,与其他浓度间的差异达到极显著水平。

2.2 CuSO₄和烯效唑浓度组合使用对愈伤组织的诱导和分化的影响

如前所述,CuSO₄和烯效唑的单一因素对水稻成熟胚愈伤组织诱导和分化有明显效应,但其效应的强度及其效应方向(正效应或负效应)则与浓度和基因型密切相关。以下将进一步揭示它们的组合效应。将选出的3个CuSO₄浓度(10.0、15.0和20.0μmol/L)和2个烯效唑浓度(0.50、1.00 mg/L)进行两两组合,并以不添加铜离子和烯效唑的培养基为对照,将不同处理进行编号,如表3。

不同浓度的铜离子和烯效唑组合对不同品种

表3 组合效应对愈伤组织诱导率和绿苗分化率的影响

品种	编号	铜离子浓度(μmol/L)	烯效唑浓度(mg/L)	愈伤组织诱导率(%)	绿苗分化率(%)
空育 131	a	0	0	74.0eD	32.1gG
	b	10.0	0.50	74.3dD	49.4eE
	c	10.0	1.00	79.0 cC	47.9fF
	d	15.0	0.50	79.3cC	56.5cC
	e	15.0	1.00	79.1cC	55.4dD
	f	20.0	0.50	83.0bB	57.2bB
	g	20.0	1.00	83.8aA	58.1aA
	h	0.00	0.00	42.0fF	33.6gG
	i	10.0	0.50	48.6dD	66.5eE
东农 425	j	10.0	1.00	52.7aA	74.1bB
	k	15.0	0.50	47.0eE	78.9aA
	l	15.0	1.00	51.5bB	73.5cC
	m	20.0	0.50	49.6cC	68.8dD
	n	20.0	1.00	49.8cC	62.3fF

的水稻成熟胚愈伤组织的影响均表现不同,说明存在基因型的差异。与对照相比,各浓度组合对愈伤组织的诱导率和分化率均有一定的促进作用。如表3,空育131在处理为 Cu^{2+} 浓度为 $20\mu\text{mol/L}$ 且烯效唑浓度为 1.0 mg/L 时,愈伤组织的诱导率和分化率达到最高,与其他处理的差异达到极显著水平,与对照相比分别提高了9.2%和26.0%,在试验浓度范围内,烯效唑浓度一定时,随着 Cu^{2+} 浓度的增加,诱导率和分化率均呈上升趋势。但是 Cu^{2+} 浓度一定时,随着烯效唑的浓度增加,诱导率和分化率变化不同:b和c处理的诱导率呈增加趋势,分化率呈下降趋势;d和e处理下诱导率和分化率均呈下降趋势,f和g处理下诱导率和分化率均呈上升趋势。

Cu^{2+} 浓度为 $10.0\mu\text{mol/L}$,烯效唑浓度为 1.00 mg/L 时,东农425愈伤组织的诱导率最高, Cu^{2+} 浓度为 $15.0\mu\text{mol/L}$,烯效唑浓度为 0.50 mg/L 时,东农425愈伤组织的绿苗分化率最高,与其他组合的差异都达到了极显著水平,与对照相比分别都提高了12.7%和45.3%。在试验浓度范围内,当烯效唑浓度一定时,随着 Cu^{2+} 浓度的增加,各组合间对诱导率和分化率的作用差异较大,没有明显的规律。在一定的 Cu^{2+} 浓度下,随着烯效唑浓度的提高,愈伤组织的诱导率呈升高趋势,愈伤组织的分化率都是随着烯效唑浓度的增加而呈下降的趋势,除去当 Cu^{2+} 浓度为 $10.0\mu\text{mol/L}$ 时的愈伤组织的分化率反而是随着烯效唑浓度的增加而升高。

3 讨论与结论

Cu^{2+} 是植物生长发育所必须的元素,也是植物体内多种重要的酶类的辅助因子,含有 Cu^{2+} 的各种酶在植物生长过程中参与重要的生理生化代谢活动^[8]。赵宏伟^[8]和黄绿红^[9]等研究发现在继代培养基和分化培养基中添加 Cu^{2+} 可以有效地降低愈伤组织褐化率和提高愈伤组织分化频率。本试验研究指出,在诱导培养基和继代培养基中添加适宜铜离子浓度($10.0\sim 15.0\mu\text{mol/L}$),2个品种均显著提高愈伤组织诱导率,与对照相比分别提高8.0%、17.2%,明显改善愈伤组织的质量;在分化培养基中添加 $10.0\sim 15.0\mu\text{mol/L}$ 铜离子可以显著提高愈伤组织的分化率。当培养基中的 Cu^{2+} 浓度高于最适浓度后,铜离子的促进作用减弱。这与前人研究的结果是相一致的。结果表明:在培养基中适度增加 Cu^{2+} 浓度,能够有效地提高愈伤组织的胚性状态,使愈伤组织的诱导率及绿苗分化

率显著提高,但浓度过高则影响愈伤组织的诱导及分化。

烯效唑是一种高效植物生长延缓调节剂,生理机制在于它影响贝壳杉烯氧化酶活性,阻抑内源 GA_3 的合成从而降低内源 GA_3 和 IAA 的水平^[10],使细胞的伸长受到抑制,从而影响植株形态。付凤玲^[5]和王尚军^[11]在培养基中添加适宜浓度烯效唑可以提高胚性愈伤组织的诱导率和分化率,且使愈伤组织生长情况明显优于对照。本试验研究表明在培养基中单独添加烯效唑浓度在 $0.25\sim 1.00\text{ mg/L}$ 时,对水稻成熟胚愈伤组织的诱导和继代生长起到促进作用,提高愈伤组织的分化率,但是烯效唑浓度为 2.00 mg/L 时,对愈伤组织产生一定毒害作用,影响了成熟胚的诱导率和分化率。研究结果与前人较为一致,说明在培养基中添加适宜浓度的烯效唑可以提高愈伤组织的诱导率和绿苗分化率,浓度过高时会对愈伤组织的诱导率和分化率产生抑制作用。

CuSO_4 和烯效唑的单一因素对水稻成熟胚愈伤组织诱导和分化有明显效应,但其效应的强度及其效应方向(正效应或负效应)则浓度和基因型密切相关。本试验研究结果表明,各个组合处理下,2个品种愈伤组织的诱导率和分化率分别高于相应品种的对照组。空育131在处理为 Cu^{2+} 浓度为 $20.0\mu\text{mol/L}$ 且烯效唑浓度为 1.00 mg/L 时,愈伤组织的诱导率和分化率达到最高; Cu^{2+} 浓度为 $10.0\mu\text{mol/L}$,烯效唑浓度为 1.00 mg/L 时,东农425愈伤组织的诱导率最高, Cu^{2+} 浓度为 $15.0\mu\text{mol/L}$,烯效唑浓度为 1.00 mg/L 时,东农425愈伤组织的分化率最高。结果发现,与对照相比在培养基中同时添加 Cu^{2+} 和烯效唑,可以提高愈伤组织的诱导率和分化率,但是与单独添加 Cu^{2+} 或烯效唑时相比,并不是所有的组合处理都是起到促进作用的叠加。如空育131,处理b和c的愈伤组织诱导率和分化率均低于单独添加 Cu^{2+} 浓度或者烯效唑浓度时的愈伤组织诱导率和分化率, Cu^{2+} 和烯效唑表现为相互拮抗。处理e和f的愈伤组织诱导率和分化率也低于单独添加 Cu^{2+} 浓度时的愈伤组织诱导率和分化率,但与单独添加烯效唑浓度相比,愈伤组织的诱导率是降低的,但是分化率是提高了。处理f和g愈伤组织诱导率和分化率均高于单独添加 Cu^{2+} 浓度或者烯效唑浓度时的愈伤组织诱导率和分化率,此时两者之间表现为促进。东农425则表现在大部分组合处理为两者的促进作用。在培养基中添加 Cu^{2+} 有可能引起金属离子(下转第28页)

0.05),而胞间二氧化碳浓度(C_i)只有通科1的穗位叶在深松40 cm处理降低显著($P < 0.05$),说明深松促进了玉米光合作用,尤其深松40 cm处理效果明显。光合作用提高后,把光能更多地转化为干物质,促进产量的形成。郑单958和通科1两个品种连续两年在SS40和SS30处理时,都比对照增产显著。2011年郑单958的SS40和SS30处理分别比对照增产8.17%和5.54%,通科1增产8.11%和6.92%,2012年郑单958的SS40和SS30处理分别比对照增产14.58%和12.87%,通科1增产13.36%和11.07%。2011年郑单958、通科1在SS40处理与对照间差异均达到极显著水平,SS30处理与对照间差异均达到显著水平;2012年郑单958、通科1两个品种在SS40处理、SS30处理与对照间差异均达到极显著水平。

参考文献:

- [1] 包额尔敦嘎,张建华,张晋纯,等.通辽市玉米高产种植技术[J].内蒙古农业科技,2008(1):105-106.
- [2] 冯勇,侯旭光,苏二虎,等.内蒙古自治区玉米产业化生产的对策探讨[A].内蒙古农学会2004学术年会论文集[C].2004:48-49.
- [3] 江晓东,李增嘉,侯连涛,等.少免耕对灌溉农田冬小麦/夏玉米作物水、肥利用的影响[J].农业工程学报,2005,21(7):20-24.
- [4] 马国胜,薛吉全,路海东,等.不同类型饲用玉米群体光合生理特性的研究[J].西北植物学报,2005,25(3):536-540.
- [5] 冯春生,尹芝瑞,赵述文,等.耐密型玉米光合速率与产量的关系[J].核农学报,1994(2):24-27.
- [6] 刘开昌,王庆成,张秀清,等.玉米光合性能与耐密性关系的研究[J].山东农业科学,2001(6):25-29.
- [7] 金明华.玉米自交系的耐密性及其与株型和配合力关系的研究[J].玉米科学,1995,3(1):44-47.
- [8] 苏方宏.玉米耐密性的数学表达及其应用[J].玉米科学,1998,6(1):52-54,68.
- [9] 朱韵哲.不同基因型玉米品种光合物质生产和生理特性的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2012.
- [10] 鲍巨松,薛吉全,杨成书,等.不同株型玉米叶面积系数和群体受光态势与产量的关系[J].玉米科学,1993,1(3):50-54.
- [11] 胡昌浩,董树亭,王空军,等.我国不同年代玉米品种生育特性演进规律研究I.物质生产的演进[J].玉米科学,1998,6(2):44-48.
- [12] 王微.中耕分层深松技术研究及深松部件的有限元分析[D].沈阳:沈阳农业大学,2011.
- [13] 张西群,齐新,董文旭,等.玉米深松免耕播种对土壤性状及玉米生长发育的影响[J].河北农业科学,2010,14(3):26-28.
- [14] 米国华,陈范骏,春亮,等.玉米氮高效品种的生物学特性[J].植物营养与肥料学报,2007,13(1):155-159.
- [15] 孟庆秋,谢佳贵,胡会军,等.土壤深松对玉米产量及其构成因素的影响[J].吉林农业科学,2000,25(2):25-28.
- [16] 付国占,李潮海,王俊忠,等.残茬覆盖与耕作方式对夏玉米叶片衰老代谢和子粒产量的影响[J].西北植物学报,2005,25(1):155-160.

(上接第22页)的毒性胁迫,但培养基中的烯效唑可以保护愈伤组织免受胁迫,所以同时添加两者时,愈伤组织的诱导率和绿苗分化率与对照相比均有所提高,但是与单独添加 Cu^{2+} 和烯效唑时相比,2个品种均有不同表现。在成熟胚培养中,同时添加不同浓度配比的 Cu^{2+} 和烯效唑时,既要考虑品种间的基因型对 Cu^{2+} 和烯效唑的敏感程度,还要考虑 Cu^{2+} 和烯效唑之间的互作效应,可能两者同时添加比单一因素效果要好,也有可能反而不如单独使用时效果好。

参考文献:

- [1] 林艺.水稻组织培养的研究进展及存在问题[J].安徽农学通报,2010,16(1):78-79.
- [2] 樊秀霞.水稻不同品种组培再生和转基因频率研究[D].杭州:杭州师范大学,2013.
- [3] 杨闯,尚丽霞,李淑芳,等.水稻耐盐转基因研究进展[J].吉林农业科学,2010,35(3):21-26.
- [4] 季芝娟. $AgNO_3$ 、 GA_3 、S-3307对水稻花药培养的组合效应及染色体倍性鉴定新方法[D].杭州:浙江大学,2004.
- [5] 付凤玲,李晚忱,荣廷昭. N6培养基添加钙和烯效唑对玉米幼胚培养的作用[J].作物学报,2005,31(5):634-639.
- [6] 周恒,罗静.烯效唑在草莓组织培养中的应用研究[J].中国南方果树,2010,39(5):69-70.
- [7] Laszio Purnhauser, Gabor Gyulai. Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1993, 35(2):131-139.
- [8] 赵宏伟,宋彦超.寒地粳稻再生体系的优化研究[J].东北农业大学学报,2013(7):32-38.
- [9] 黄绿红,单杨,李高阳,等.铜元素对籼稻成熟胚组织培养的影响[J].湖南农业科学,2010(7):6-8,12.
- [10] 王熹,俞美玉,陶龙兴,等.烯效唑对水稻幼苗内源IAA含量的影响[J].Acta Botanica Sinica, 1997, 39(7):629-633.
- [11] 王尚军.水杨酸与烯效唑对盐胁迫下黑果枸杞愈伤组织生理生化特性的影响研究[D].兰州:兰州大学,2011.