

多效唑在水稻试管苗离体调控技术中的应用

赵成章 戚秀芳 郑康乐 徐星明 (中国水稻研究所, 杭州 310006)

Study of Regulation Technique of Rice Plantlet *in vitro* with Multi-Effect Triazole

ZHAO Chengzhang, QI Xiufang, ZHENG Kangle, and XU Xingming

(China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006)

Abstract: The results indicated that: (1) Multi-Effect Triazole (MET) inhibited the callus induction from immature embryo. However, the callus redifferentiation and green plantlet formation were promoted significantly, especially with lower concentration of MET (2.5mg/l); (2) MET inhibited the plant height obviously and promoted the development of the root system of plantlet, such effect usually maintained for about 2 months But the effect of MET on leaf age was not significant; (3) The survival rate of MET hardened plantlets was about 95% and the plantlets grew more vigorously after transplanting; (4) compared with the control, the MET treated plantlets contained bigger vascular, thicker mesophyll cells, denser surface cells and more inclusion in the vascular cells

Key words: Multi-Effect Triazole; Immature embryo; Callus induction; Plant tissue culture; Rice

提 要: 研究了植物生长延缓剂多效唑在组织培养中对水稻愈伤组织诱导、分化以及壮苗培养的影响。结果表明: (1) 多效唑 (MET) 能抑制未成熟胚愈伤组织的诱导率而能明显地提高愈伤组织的绿苗形成率, 以 MET 2.5 mg/l 时效果较好; (2) MET 明显地抑制再生苗地上部生长而促进根系的发育, 这种抑制效果通常保持 2 个月左右, 不过 MET 对叶龄的影响不大, (3) MET 处理的再生苗移栽后成活率为 95% 左右而且生长健壮; (4) 与对照相比, MET 处理的再生苗具有较大的维管束、较厚的叶肉细胞、致密的表皮细胞, 并在维管束细胞中有较多的营养物质。

关键词: 多效唑; 未成熟胚; 愈伤组织诱导; 组织培养; 水稻

在植物组织和细胞培养中所产生的试管苗通常比较细弱, 根系不发达, 移栽后成苗较低, 因此促使试管苗健壮生长、减少死亡率, 对提高试管苗培养效率具有普遍意义。

多效唑 (Multi-Effects Triazole) 是一种良好的植物生长延缓剂, 它具有多方面的生理效应⁽¹⁾, 本文研究了多效唑 (MET) 对水稻未成熟胚的愈伤组织诱导、分化以及

壮苗培养的影响, 取得比较满意的实验结果, 为植物生长延缓剂在生物技术中应用提供了新的化学调控措施和思路。

材料和方法

供试材料为授粉后 15 天左右的早粳

1989 年 9 月 25 日收到。Received Sept. 25, 1989

T53 (*Oryza sativa* L. subsp. japonica) 未成熟胚, 早粳 87-5-0 (*Oryza sativa* L. subsp. indica) 的再生绿芽 (0.2 厘米)。

将早粳 T53 乳熟期穗头上谷粒取下, 先用 75% 酒精浸泡 1 分钟, 然后在 0.1% 的升汞溶液中灭菌 20 分钟, 用无菌水冲洗 2~3 次后, 吸干取出幼胚, 再用医用双氧水灭菌 15 分钟, 最后用无菌水冲洗 2~3 次后, 吸干后将未成熟胚接种在固体培养基上进行暗培养, 培养温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 3 周后, 当愈伤组织长到一定大小时, 转入分化培养基。

诱导培养基为 N6⁽¹⁾, 附加 2,4-D 2 mg/l, NAA 0.5 mg/l, 6-BA 0.5 mg/l, 蔗糖 3%, 洋菜 0.8%, 并附加不同浓度的多效唑。

分化培养基为 N6, 附加 6-BA 2 mg/l, NAA 0.2 mg/l, 蔗糖 2%。

移栽试验在自然光照型人工气候箱中进行, 试管苗为 5 龄期, 苗高 10 厘米左右, 不经练苗直接从试管中取出移栽。

试验处理如下。

1) 不同培养时期: 诱导期、分化期、壮苗培养期。

2) 不同多效唑浓度: 0, 2.5, 5, 10 和 50 mg/l。

结 果

(一) 多效唑对未成熟胚愈伤组织诱导

表 1 多效唑对未成熟胚愈伤组织诱导和分化的影响

Table 1. Effect of MET on induction and redifferentiation of callus from immature rice embryo

处 理 Treatment	多效唑浓度(毫克/升) MET concentration (mg/l)				
	0	2.5	5.0	10	50
外植体数 No. of explant	90	90	90	90	90
愈伤组织诱导率 Callus induction	66.7	55.6	50.0	28.0	5.5
愈伤组织分化率 % Callus redifferentiation	35.0	100	25	0	0
绿苗形成率 % Green plantlet	5	60	20	0	0

和分化的影响

结果表明 (表 1), 多效唑对水稻未成熟胚愈伤组织诱导有明显的抑制作用, 其抑制程度随多效唑处理浓度的提高而加剧, 特别是高浓度 (50 mg/l) 组的外植体全部变褐, 少数已长大的小愈伤组织也不能继续长大。低浓度 (2.5 mg/l) 组则对愈伤组织的诱导率影响较小。

多效唑对愈伤组织的绿苗形成率影响十分明显。低浓度 (2.5~10 mg/l) 多效唑处理能成倍地提高愈伤组织绿苗形成率。例如 2.5 mg/l 多效唑处理组的绿苗形成率为其对照组的 12 倍, 主要表现在其愈伤组织色泽好, 长势旺, 转移后第五天就开始绿苗分化, 而且每块愈伤组织上绿芽多, 生根快。

不同时期使用多效唑的效果也不相同 (表 2), 诱导期进行多效唑处理的绿苗形成率明显地高于分化期处理组。在分化培养基中附加一定量 (2.5~10 mg/l) 的多效唑浓度也能促进愈伤组织绿苗形成频率的提高, 但效果不及前者, 当然浓度过高 (50 mg/l) 愈伤组织就会变褐死亡, 在诱导期和分化期都使用多效唑者则其愈伤组织绿苗形成率也有明显促进作用。

(二) 多效唑对再生苗生长和发育的影响

将 0.2 厘米长的再生绿芽分别转移到含不同浓度多效唑的壮苗培养基上进行培养,

表 2 不同时期使用多效唑对愈伤组织绿苗形成率的影响

Table 2. Effect of MET on the frequency of green plantlet in various period

处理时期 Treatment Period	多效唑浓度 (毫克 / 升) MET Concentration (mg / l)				
	0	2.5	5	10	50
诱导期 Induction	5	60	20	0	0
分化期 Redifferentiation	5	25	15	10	0
诱导期+分化期 Induction+Redifferentiation	5	50	35	30	0

注 (Note): 每个处理 40 块愈伤组织, 40 callus for each treatment

表 3 多效唑对再生苗生长和发育的影响

Table 3. Effect of MET on the growth-development of the plantlet

项 目 Item	多效唑浓度 (毫克 / 升) MET Concentration (mg / l)				
	0	2.5	5	10	50
苗高 (厘米) Plant height	11.4	5.4	3.5	2.3	0.2
叶龄 Age of leaf	5.70	5.66	5.60	5.42	—
根数 (条) No. of roots	0.4	7.6	5.4	4.4	0
根长 (厘米) Root length (cm)	0.2	1.50	1.45	0.67	0
绿芽数 / 每块愈伤 No. of green bud per callus	4.0	3.8	3.7	5.3	1.1

表 4 多效唑对试管苗移栽成活率的影响

Table 4. Effect of MET on the plantlet survival after transplanting

品 种 Variety	87-5-0 (籼)		T53 (粳)	
	CK	MET	CK	MET
移栽苗数 No. of planting	150	95	40	40
成活苗% Survival %	40	94.7	37.5	95.0
新根数 / 苗 No. of new roots / plantlet	0.4	7.6	—	—

注 (Note): 多效唑浓度为 5mg / l。MET concentration 5mg / l。

四周后测定其结果 (表 3): (1) 多效唑能明显地抑制试管苗地上部的生长, 处理浓度越高抑制越明显。MET 2.5 mg / l 处理的苗高只有其对照组的一半, 当多效唑浓度增加到 50 mg / l 时, 再生绿芽的生长完全被抑制, 并产生死亡现象。这种抑制作用一般影响 4~5 张叶片, 要持续二个月左右。当然抑制时间的长短还与处理浓度有关。值得指

出的是, 一旦药效期一过, 秧苗又能迅速恢复生长; (2) 多效唑对再生苗根系生长的促进作用尤为明显。除 50 mg / l 处理组外, 其他各处理组的根数, 根长都较对照组有明显的促进作用, 其中以 2.5 mg / l 处理组最佳, 为对照的 19 倍; (3) 尽管多效唑对苗高有明显地抑制作用, 但对其叶龄的影响较小。据移栽后 51 天测定, 一般叶龄都

表5 多效唑对再生苗叶片结构的影响

Table 5. Effect of MET on leaf structure of plantlet

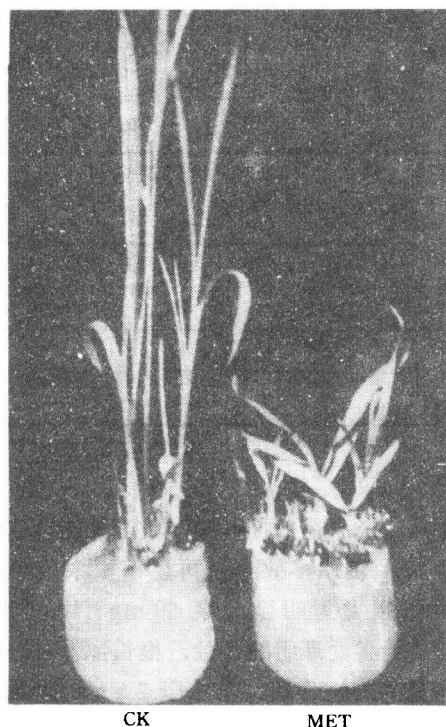
项目 Item	叶片厚度(μm) leaf thickness		维管束直径 (μm) Vascular size	泡状细胞 μm Blister Cell	表皮细胞数 / $100\mu\text{m}^2$ No. of surface cells / $100\mu\text{m}^2$
	最大 Max	最小 Min			
MET 处理 Treatment With MET	80	38	40	19	250
对照 Control	41	20	22	10	147

在 5.5 左右, 各处理间差异很小; (4) 多效唑使再生苗粗壮, 叶色加深。

(三)多效唑对再生苗移栽成活率的影响

将多效唑处理的再生苗与不处理的对照再生苗同时移栽到人工气候箱中, 箱内温度为 $23\sim 28^{\circ}\text{C}$ (白天 28°C 、夜晚 23°C 变温)、相对湿度为 $75\sim 80\%$, 自然光照, 移栽后 10 天统计它们的成活率。从表 4 结果可看出, 多效唑处理组的再生苗移栽后成活

率都在 95% 左右, 而且扎根快, 返青迅速, 基本上没有退黄转青过程, 从而使分蘖早生, 而对照组再生苗则大半枯死, 活着的再生苗转色缓慢, 基部枯叶多。多效唑处理能提高试管苗成活率有二个比较明显的原因, 一是多效唑处理的试管苗发根力强, 扎根快, 保持了移栽后植株体内水份平衡; 其次是单株叶面积明显减少, 叶片加厚, 表皮细胞致密, 有利于水分蒸发量的减少。

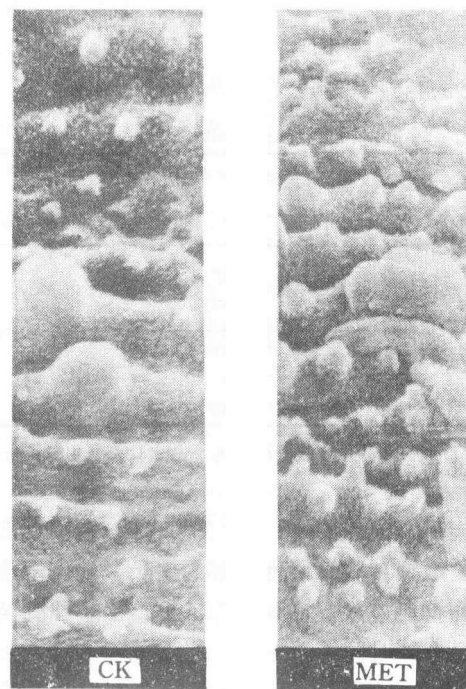


CK

MET

图1 水稻的再生植株

Fig. 1. Rice Plantlet with different treatment



CK

MET

图2 叶片表皮细胞电镜扫描

Fig. 2. Surface cells of leaf by Scanning Electron Microscope

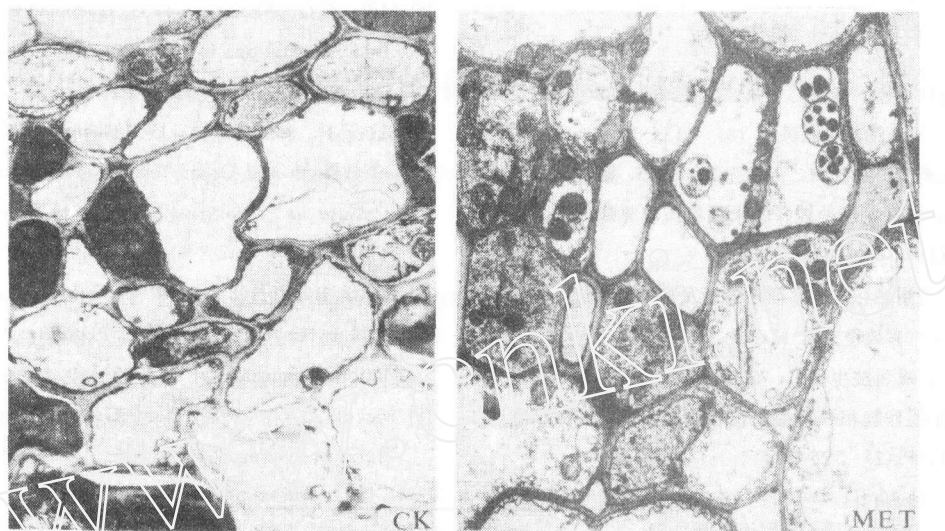


图3 叶片维管束细胞电镜透视

Fig. 3. Vascular cells of leaf by Transmission Electron Microscope

(四)多效唑对再生苗叶片结构的影响

对相同叶位的完全叶中部进行扫描电镜和透射电镜观察,可以发现 MET 处理的叶片细胞结构与其对照相比,具有以下几个明显特点(表 5,图 1-3): (1) 叶片明显增厚, MET 处理的再生苗叶片厚度较其对照增加一倍左右,主要是叶肉细胞层次增加; (2) 维管束直径明显变粗,增加近一倍; (3) 表皮细胞密度增加(图 2),每 $100\mu\text{m}^2$ 面积中有 250 个表皮细胞,而对照只有 147 个表皮细胞; (4) 气孔开度小; (5) 维管束细胞内含物较多,而对照细胞内含物少,多数细胞均为空胞,这是一个重要发现; (6) 不但叶绿体数较多,而且叶绿体片层结构间有明显的粗线,而对照则无。

讨 论

低浓度的多效唑(2.5 mg/l)配合适当浓度 6-BA、NAA,在诱导期和分化期使用可明显促进水稻愈伤组织绿苗形成频率,而在壮苗培养期使用则可抑制水稻试管苗地上部生长,促进根系生长,达到培育壮苗的目的,从而有效地解决了试管苗的移栽成活率低的难题。这一结果具有十分重要的普遍意

义,对促进花卉、果木试管苗生根、提高移栽成活率可能也会有明显效果,当然具体的使用浓度、使用时期因作物种类而异。

高浓度 ($5\sim 10\text{ mg/l}$) 多效唑配合 6-BA、NAA 处理则有利于绿芽较长期的保存,因为它的药效在二个月左右,而且随浓度的增加而延长,这对解决大批禾本科作物试管苗的越冬问题提供了简便的有效措施,同时对一些越冬作物像大麦、小麦油菜等的越夏问题也可能有效。对许多花卉、园艺作物再生苗的矮化、生根、保存以及长途运输也提供了新的思路。

叶片细胞电镜观察结果表明, MET 处理的再生苗叶片较其对照(未处理)具有表皮细胞密度大、叶肉细胞加厚,维管束加粗等特点,这些结构上的变化都有利于增加叶片对水分的贮存量,减少叶面水分的蒸发量,加速维管束的水分运输,值得注意的是维管束细胞中存在较多的营养物质,这无疑为移栽后再生苗的生根提供了一定的物质基础,而对照再生苗维管束细胞中则很少有营养物质,几乎被长期培养所耗尽,这可能是再生苗生根难、成活率低的主要内因之一。

参考文献

- [1] 汤日圣等, 1986. 多效唑对梗稻的生物学效应及其应用, 江苏农业科学 (8) : 13—15
- [2] 朱至清、王敬驹、孙敬三等, 1975, 通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基, 中国科学 (5) : 489—490
- [3] 吴光南, 1987. 多效唑的开发和前景, 江苏农业科学, 多效唑专辑 (1—2)
- [4] 浙江农科院生理组, 1974. 使用化学药剂萘乙酸控制连作晚稻秧苗生长试验的初步总结, 浙江农业科学 (2) : 25—30
- [5] Miller C O, Skoog F, 1953. Chemical Control of Bud Formation in Tobacco Stem Segments. *Amer.J.Bot.* 4 : 768—773
- [6] Skoog F, Miller C O, 1957. Chemical Regulation of Growth and Organ formation in Plant Tissue Culture *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11 : 118—130
- [7] Eastin F F, 1983. Plant Growth Regulation in Rice. In Nickell, L G (ed.): Plant Growth Regulation Chemicals. Vol 11, 149—159
- [8] Nickoll L G, 1982. Plant Growth Regulation, Springer-Verlag. P.109

欢迎订阅

中 国 水 稻 科 学

《中国水稻科学》为经国家科委批准的全国性水稻科学学术性季刊, 公开发行。16 开本, 48 页, 每期定价 1.50 元 (全年 6.00 元), 国内邮发代号 32—94, 请及时向当地邮(政)局订阅, 勿错过订期。

另外, 《中国水稻科学》在 1986 年至 1989 年间共出刊 3 卷, 每卷 3 期, 共 9 期, 现尚有部分余刊, 需补购者, 请向 310006 杭州市体育场路 171 号中国水稻研究所科技情报系购买 (每期 1.00 元)。

欢迎订阅! 欢迎赐稿!