

顾地周,刘宇,王曼宁,等.牛尾菜种胚发育调控和育苗技术[J].江苏农业科学,2016,44(1):71-74.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.018

牛尾菜种胚发育调控和育苗技术

顾地周,刘宇,王曼宁,沈红梅,陆爽,朱俊义

(通化师范学院生命科学学院,吉林通化 134002)

摘要:以牛尾菜果实成熟后的种子为供试材料,通过多因子交叉重复试验对影响牛尾菜种胚发育的主要因素及其水平进行了探讨,筛选并确定调控牛尾菜种胚快速发育的主要因素及水平。结果表明,牛尾菜种胚发育成熟的方法、主要因素及其水平为种子用4.50 mg/L 2,4-D和5.75 mg/L 6-BA混合溶液浸泡72 h,将种子与河沙按1:3混合,进行80 d的变温处理,变温幅度和时间为白天温度(22±2)℃、处理10 h,夜间温度(13±2)℃、处理14 h,盾形胚发生率99.7%,子叶胚发生率98.3%,种子发芽率95.8%以上。解决了牛尾菜种胚发育调控和育苗技术,该技术适合于牛尾菜种苗的工厂化生产。

关键词:牛尾菜;种胚;发育;调控技术;激素;变温

中图分类号:S647.04 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)01-0071-03

牛尾菜(*Smilax riparia* DC.)别称心叶牛尾菜、龙须菜、鞭杆子菜,属百合科菝葜属多年生宿根植物,为长白山药食同源的重要植物资源。牛尾菜早春幼嫩的茎叶可以食用,口感好,无异味,是极具营养价值的山野菜,为我国野菜出口品种之一。有研究证明其嫩茎叶中含有的总氨基酸量远超过一般蔬菜,其嫩叶中还含有丰富的Ca、Zn、Fe、维生素类等营养物质^[1],也是提供膳食纤维的很好来源;全草含白须根皂苷、葱醌苷、皂角苷等,其根和根茎入药,有活血化瘀、祛痰止咳等功效,主治风湿性关节炎、筋骨酸痛、偏瘫、头晕、头痛、咳嗽吐血和骨结核等症。除食用和药用外,牛尾菜的根茎可提取淀粉,富含鞣质,可用来提取栲胶,种子里还含有种子油,是酿造等工业的重要原材料。

牛尾菜果实成熟后,种子中的种胚处于球形胚阶段,这样的种子播种当年不萌发,需要2~3年才能少量发芽^[2],生产和开发利用受到极大限制。为解决种胚发育和种苗繁育存在的难点,开展了变温处理,但种胚发育仍然存在发育缓慢、子叶胚发生率较低等缺点。大量研究表明,在组织培养中,2,4-D和6-BA搭配使用可诱导植物体细胞形成胚性愈伤组织,胚性愈伤组织可进一步分化出胚胎,胚胎相当于种子中的种胚,可直接发育形成完整的植株^[3-6]。因此,本研究应用植物组织培养技术中的体细胞胚胎发生发育理念对牛尾菜种胚发育进行激素和变温同步调控的方法,以期筛选确定影响种胚发育的主要因素及其水平,从而解决牛尾菜种子萌发和育苗等存在的困难,为牛尾菜大规模人工栽培提供种子处理方法和技术。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

收稿日期:2014-12-23

基金项目:吉林省科技发展计划(编号:20140204002NY);吉林省大学生创新创业训练计划(编号:2015033)。

作者简介:顾地周(1973—),男,吉林通化人,讲师,主要从事珍稀濒危、经济、观赏和药用植物研究。E-mail:gudizhou@163.com。

秋季(10月中旬),采集牛尾菜果实(果实变黑后),将果实用清水浸泡3~5 d后,去除果皮、果肉、果穗及漂浮在水面的种子后,取水底的种子倒入不同质量浓度的2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)和6-苄氨基嘌呤(6-BA)混合溶液中浸泡72 h后,捞出种子与河沙按1:3拌匀后装入透气性好的木槽中,覆盖塑料薄膜置于处理室中进行变温处理。

1.2 影响种胚发育的主要因素及水平筛选

种子处理液中含有的2,4-D和6-BA质量浓度分别初步控制在1.00~3.25 mg/L和2.50~4.75 mg/L范围内(由预试验后设定),处理期限初步为20~65 d,变温幅度和时间:白天温度为(22±2)℃、处理10 h,夜间温度为(13±2)℃、处理14 h。为提高牛尾菜种胚发育的速度和各时期胚胎发生率,通过均匀设计法设计试验^[7-10],选用 $U_{10}(10^3)$ 、 $U_6(6^3)$ 和 $U_6(6^2)$ 均匀表,每处理100粒种子,重复3次,取平均值,确定牛尾菜种胚发育过程中2,4-D和6-BA溶液的质量浓度及处理时间对盾形胚和子叶胚发生的影响。对照组采用同样数量的种子用清水浸泡72 h后仅采用变温处理(处理时间和变温幅度同上),在处理过程中每5 d取种子观察种胚形态,按每100粒种子形态发育到下一阶段胚胎的百分率为考察对象,种胚形态发生计算公式为:盾形胚发生率=含有盾形胚的种子数/100×100%;子叶胚发生率=含有子叶胚的种子数/100×100%。

1.3 播种和苗期管理

经过处理后已形成子叶胚的种子可直接播种至畦上,覆盖细土,土层为0.5~0.8 cm,浇透水,再用适量松针覆盖保湿,待种子发芽。种子完全萌发后,每隔20 d用喷壶于叶面喷施1次0.5%磷酸二氢钾溶液,苗期可根据情况喷施2%乐果乳油以防止菜青虫。秋季枯萎后可将根茎翻出定植,行距15 cm,株距8 cm,第2年春可发出整齐芽苗。

1.4 数据处理与分析

通过均匀设计法进行试验设计,试验所得数据经分析处理后摸索出影响牛尾菜种胚发育各阶段胚胎发生率主要因素的显著性,在此基础上再进一步补充试验筛选确定影响牛尾

菜种胚发育各阶段胚胎发生率主要因素的适宜水平,均匀设计软件采用 Uniform Design 3.0。

2 结果与分析

2.1 影响牛尾菜种胚形态后熟的主要因素显著性初步筛选

试验所得数据(表1)经均匀设计软件分析处理后可得回归方程为 $y_1 = 28.6 + 9.17x_1 + 1.87x_2 + 0.449x_3$, 显著性水平 $\alpha = 0.05$, 复相关系数 $R = 0.9885$, 剩余标准差 $s = 1.5400$, 检验值 $F_t = 85.35 >$ 临界值 $F_{0.05,3,6} = 4.757$, 回归方程具有显著性,且2,4-D、6-BA和变温处理时间对牛尾菜种胚盾形胚发生的影响均显著。通过计算2,4-D、6-BA和变温处理时间对牛尾菜种胚盾形胚发生的贡献值和贡献率可知, $U_1 = 353, U_1/U = 58.4\%$; $U_2 = 14.6, U_2/U = 2.42\%$; $U_3 = 367, U_3/U = 60.6\%$, $U = 605$ 。

表1 影响牛尾菜种胚形态发育主要因素筛选的 $U_{10}(10^3)$

处理号	因素			盾形胚发生率 y_1 (%)	子叶胚发生率 y_2 (%)
	x_1 :2,4-D 浓度(mg/L)	x_2 :6-BA 浓度(mg/L)	x_3 :处理时间 (d)		
1	1.00	3.50	50	67.3	80.0
2	1.25	4.75	30	60.2	74.8
3	1.50	3.25	65	77.5	81.8
4	1.75	4.50	45	73.7	79.5
5	2.00	3.00	25	64.0	68.3
6	2.25	4.25	60	85.4	83.5
7	2.50	2.75	40	75.8	72.3
8	2.75	4.00	20	71.5	71.6
9	3.00	2.50	55	83.6	78.0
10	3.25	3.75	35	80.3	75.9
CK	0	0	65	33.7	21.4

数据(表1)经分析处理后可得回归方程为 $y_2 = 53.3 + 2.07x_2 + 0.311x_3$, 显著性水平 $\alpha = 0.05$, 复相关系数 $R = 0.9781$, 剩余标准差 $s = 1.1500$, 检验值 $F_t = 77.11 >$ 临界值 $F_{0.05,2,7} =$

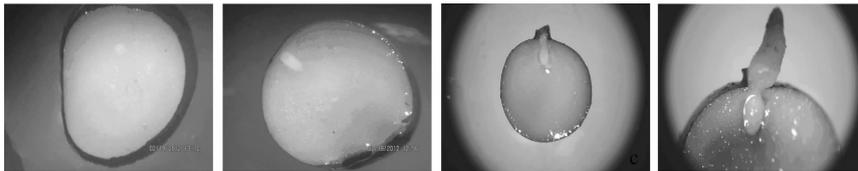


图1 牛尾菜果实成熟后种胚及发育各阶段的形态

2.2 6-BA和变温处理时间对牛尾菜种胚子叶胚发育的影响

由“2.1”节中筛选结果可知,6-BA和变温处理时间对牛尾菜种胚子叶胚发育影响显著,2,4-D对牛尾菜种胚子叶胚发育影响不显著。因6-BA和变温处理时间与子叶胚发生率均呈正相关,由此推测,6-BA质量浓度高于4.75 mg/L、变温处理超过65 d时,可能牛尾菜有更高的子叶胚发生率。为验证此推测,又以6-BA质量浓度为4.75、5.00、5.25、5.50、5.75、6.00 mg/L,变温处理时间为65、70、75、80、85、90 d开展6个处理的补充试验,重复3次,取平均值(表3)。操作过程同“1.1”“1.2”节方法,结果发现6-BA

4.737,回归方程具有显著性,6-BA和变温处理时间均对牛尾菜种胚子叶胚发生的影响显著,2,4-D对牛尾菜种胚子叶胚发生的影响不显著。同理,计算6-BA和变温处理时间对牛尾菜种胚子叶胚发生的贡献值和贡献率可知, $U_2 = 37.9, U_2/U = 18.7\%$; $U_3 = 191, U_3/U = 94.1\%$, $U = 203$ 。

2.2 2,4-D、6-BA和变温处理时间对牛尾菜种胚盾形胚发育的影响

由“2.1”节中筛选结果可知,2,4-D、6-BA和变温处理时间对牛尾菜种胚盾形胚发育影响显著。因2,4-D、6-BA和变温处理时间与盾形胚发生率均呈正相关,由此推测,2,4-D、6-BA质量浓度分别高于3.25、4.75 mg/L以及变温处理时间超过65 d,可能牛尾菜有更高的盾形胚发生率。为验证此推测,又以2,4-D质量浓度为3.25、3.50、3.75、4.00、4.25、4.50 mg/L,6-BA质量浓度为4.75、5.00、5.25、5.00、5.25、5.50 mg/L,变温处理时间为65、70、75、80、85、90 d开展6个处理的补充试验,重复3次,取平均值(表2)。操作过程同“1.1”“1.2”节方法,结果发现2,4-D质量浓度为4.50 mg/L、6-BA为5.75 mg/L、变温处理时间为80 d时,种胚可发育至盾形胚(图1-b),且盾形胚发生率较高,平均发生率最高可达99.7% ($P < 0.05$),比表1所列10个处理和对照组的盾形胚发生率均高。

表2 影响牛尾菜种胚盾形胚发生主要因素筛选的 $U_6(6^3)$

处理号	因素			y_1 :盾形胚发生率 (%)
	x_1 :2,4-D 浓度(mg/L)	x_2 :6-BA 浓度(mg/L)	x_3 :处理时间 (d)	
1	3.25	5.00	75	85.6
2	3.50	5.50	90	92.3
3	3.75	6.00	70	91.6
4	4.00	4.75	85	82.9
5	4.25	5.25	65	91.4
6	4.50	5.75	80	99.7
CK	0	0	90	52.6

质量浓度为5.75~6.00 mg/L,变温处理时间为65~80 d时,种胚可历经盾形胚发育至子叶胚(图1-c),且子叶胚发生率较高,平均发生率最高可达98.3% ($P < 0.05$),比表1所列10个处理和对照组子叶胚发生率均高。

通过以上试验数据处理和分析可知,影响盾形胚的因素及水平是2,4-D质量浓度4.50 mg/L、6-BA质量浓度5.75 mg/L和变温处理时间80 d,而影响子叶胚的因素及水平是6-BA质量浓度为5.75~6.00 mg/L和变温处理时间65~80 d。因此,可以确定牛尾菜种子后熟的条件为种子用4.50 mg/L 2,4-D和5.75 mg/L 6-BA混合溶液浸泡72 h后,将种子与河沙按1:3拌匀后装入透气性好的木槽中,覆

表3 影响牛尾菜种胚子叶胚发生主要因素筛选的 $U_6(6^2)$

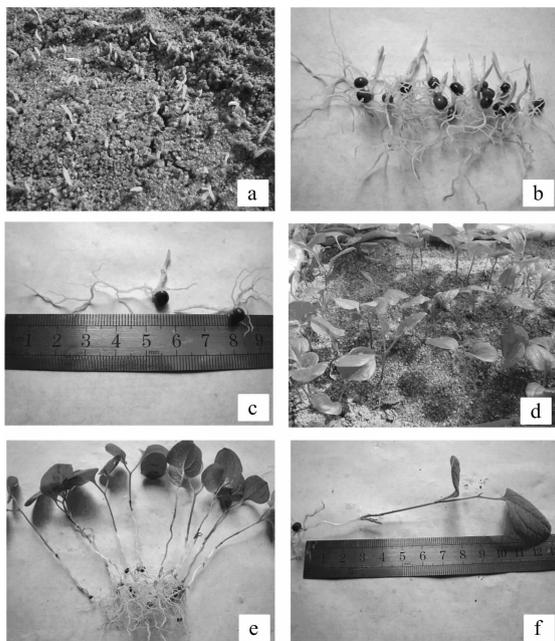
试验设计与结果

处理号	因素		子叶胚发生率 y_2 (%)
	x_2 :6-BA 浓度(mg/L)	x_3 :处理时间 (d)	
1	4.75	75	85.1
2	5.00	90	89.4
3	5.25	70	84.3
4	5.50	85	93.2
5	5.75	65	98.3
6	6.00	80	95.7
CK	0	90	46.2

盖塑料薄膜置于室内进行80 d的变温处理,变温幅度和时间:白天温度为 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、处理10 h,夜间温度为 $(13 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、处理14 h后,牛尾菜种胚由球形胚历经盾形胚发育形成可萌发的子叶胚。

2.4 播种和苗期管理

根据“1.2”节中的方法,经过含有4.50 mg/L 2,4-D和5.75 mg/L 6-BA的混合溶液浸泡72 h后,变温处理80 d的种子不需再低温冷冻或赤霉素处理(生理后熟)即可直接播种,播种35 d后发芽(图2-a,图2-b),发芽率可达到95.8%以上,此时,芽可长至1.0 cm,根长可达2.0~4.5 cm(图2-c),15 d后,子叶完全展开(图2-d,图2-e),苗高可达8.0 cm以上,每隔20 d用喷壶于叶表面和背面喷施1次0.5%磷酸二氢钾溶液,苗期可根据情况喷施2%乐果乳油以防止菜青虫的侵袭。秋季,待地上部分枯萎后,可将当年的根茎翻出定植于土床上,行距15 cm,株距8 cm,第2年春宿根可发出整齐的芽苗。



a—种子萌发; b、c、d、e、f—种子萌发后芽、苗及根长度

图2 牛尾菜种子萌发和苗的各阶段形态

3 结论与讨论

由试验结果可知,牛尾菜种子后熟的条件和方法是种子用4.50 mg/L 2,4-D和5.75 mg/L 6-BA混合溶液浸泡

72 h后,将种子与河沙按1:3拌匀后装入透气性好的木槽中,覆盖塑料薄膜置于室内进行80 d的变温处理,变温幅度和时间:白天温度为 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、处理10 h,夜间温度为 $(13 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、处理14 h。牛尾菜种胚由球形胚历经盾形胚发育形成可萌发的子叶胚。种子不需再低温冷冻或赤霉素处理(生理后熟)即可直接播种萌发。

在盾形胚发育过程中,由回归分析结果可知,2,4-D、6-BA和变温处理时间均对牛尾菜种胚盾形胚发育影响显著。通过计算可知,2,4-D、6-BA和变温处理时间对牛尾菜种胚盾形胚发育影响的贡献率分别是58.4%、2.42%和60.6%,变温处理时间和2,4-D远大于6-BA的贡献,说明变温处理时间和2,4-D对盾形胚发育起主要调控作用,这可能是因为2,4-D和变温处理在调控过程中导致细胞产生一定量的乙烯类或过氧化物酶、超氧化物歧化酶及淀粉酶等酶类活性发生变化^[11-15],从而加速和促进了胚性细胞的发育进程;适当浓度的6-BA对牛尾菜盾形胚发育起到不可缺少的辅助调控作用,可能是因为乙烯类或酶类需要6-BA的协同作用才能完成牛尾菜种胚盾形胚的发育。而在子叶胚发育过程中,6-BA和变温处理时间对牛尾菜种子子叶胚发育影响显著,2,4-D对牛尾菜种子子叶胚发育影响不显著,6-BA和变温处理时间对牛尾菜种子子叶胚发育影响的贡献率分别是18.7%和94.1%,变温处理时间远大于6-BA的贡献,6-BA尽管对子叶胚的发育贡献较小,但影响显著。这可能是因为种胚子叶胚形成需要适当浓度的6-BA以促进和调控牛尾菜胚性细胞的进一步趋向功能和器官分化,并经盾形胚最终发育形成可萌发的子叶胚。

种子通过适当浓度的2,4-D和6-BA浸泡后,进行合理的变温处理,即可播种,可能是牛尾菜种子不具有生理休眠的本身特性决定的,也可能是2,4-D、6-BA和变温处理的共同作用,致使种子中促进萌发的相关酶或赤霉素产生变化^[16],6-BA具有“许可”促使物质(GA_3)起作用的能力,导致生理休眠的解除或促进生理后熟。

牛尾菜是我国珍贵的经济植物资源,因其育苗存在的难点,导致至今未得到大规模人工栽培和推广应用,本研究解决了牛尾菜种胚发育调控和育苗技术,该技术具有方法简便、成本低和可操作性强等优点,适合于牛尾菜种苗的工厂化生产,对牛尾菜进一步人工规模化栽培生产、带动农民栽培致富、拉动农业经济和推动野生经济植物产业化发展具有重要意义。

参考文献:

- [1] 邵美妮,李天来,徐树军,等. 牛尾菜的资源利用与研究现状[J]. 安徽农业科学,2006,34(12):2722-2723.
- [2] 邵美妮,徐树军,李楠,等. 牛尾菜种子发芽特性的初步研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(23):6166-6167.
- [3] 冉佳鑫,王玉宇,宋丹,等. 领春木体细胞胚胎发生及植株再生[J]. 植物生理学报,2012,48(10):993-996.
- [4] 付伟,叶嘉,张浩,等. 不同因素对中华卷柏愈伤组织诱导的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):39-41.
- [5] 龚雪琴,由翠荣,曲复宁,等. 朱顶红体细胞胚胎发生及植株再生研究[J]. 园艺学报,2012,39(2):381-386.
- [6] 姚进,黄坚钦,胡恒康,等. 香榧体细胞胚胎发生的初步研究[J]. 浙江农林大学学报,2013,30(1):129-135.

吕艳东,汪浩,郭晓红,等. 肥水互作对寒地水稻产量构成因素及产量的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):74-78.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.019

肥水互作对寒地水稻产量构成因素及产量的影响

吕艳东¹,汪浩^{1,2},郭晓红¹,李红宇¹,周健¹,潘世驹¹,姜玉伟¹,王龙¹,姜红芳¹,郑桂萍¹

(1. 黑龙江八一农垦大学农学院/黑龙江省教育厅寒地作物种质改良与栽培重点实验室,黑龙江大庆 163319;

2. 黑龙江省前哨农场,黑龙江同江 156400)

摘要:采用随机区组法,以龙庆稻2号和垦鉴稻5号为试验材料,研究肥水互作对寒地水稻产量构成因素及产量的影响。结果表明:2个品种的肥料与水分处理间在穗数、结实率、千粒质量及产量上均存在互作关系;高肥及有效分蘖末至收获以-10 kPa为控水下限的水分管理有利于龙庆稻2号产量的提高,低肥及全生育期常规的水分管理不利于其产量的提高;低肥及全生育期常规的水分管理有利于垦鉴稻5号产量的提高。

关键词:肥水互作;寒地;水稻;产量;产量构成

中图分类号: S511.04 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0074-05

在农业生态系统中,水分和养分是密不可分的,合理的水肥交互作用能促进作物生长,提高产量^[1]。水稻是世界上最重要的粮食作物之一,土壤水分和养分是影响其产量的重要因子,水是发展水稻生产的先决条件。水稻的产量是由单位面积穗数、每穗粒数、结实率、千粒质量等因素构成,因为产量性状是在不同生育阶段形成,所以不同生育时期干旱会对不

同的产量性状产生影响^[2-4]。另有研究表明,适宜的水肥条件可以促进作物生长,提高产量,在土壤水分很少的情况下,通过协调土壤水分和养分的关系,可获得较为理想的产量^[5-7]。多年来,国内外关于水分和养分对水稻产量的作用的研究已有丰富的报道^[8-11]。然而水分和肥料对产量的交互作用报道很少^[12],尤其是有关水分和肥料对寒地水稻产量的交互作用报道更少^[13]。本试验以土壤水势为指标严格监测土壤水势,研究有效分蘖末至成熟期控水及不同的肥料处理对寒地水稻产量的影响,以期节水栽培提供理论基础和技术支持。

收稿日期:2014-12-09

基金资助:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201303007);国家科技支撑计划(编号:2011BAD16B11、2013BAD07B01);黑龙江省博士后资助经费项目(编号:LBH-Z13167);黑龙江省农垦总局科研项目(编号:HNK125B-07-08、HNK12A-02-18);黑龙江八一农垦大学省作物学重点学科学术骨干科研启动金项目(编号:ZWXQDJ-8);黑龙江八一农垦大学博士启动金项目(编号:XDB2012-03);黑龙江八一农垦大学大学生创新创业训练计划项目(编号:201310223009)。

作者简介:吕艳东(1978—),男,黑龙江肇州人,博士,副研究员,主要从事水稻节水栽培研究。E-mail: luyandong336@sohu.com。

通信作者:郑桂萍,博士,教授,主要从事水稻生理生态研究。E-mail: dqzgp@163.com。

1 材料与与方法

1.1 试验时间、地点

试验于2013年在庆安水利试验站进行。

1.2 供试品种和肥料

供试品种为龙庆稻2号和垦鉴稻5号,均为12叶品种。供试肥料为46.4%尿素、46%磷酸二铵、50%硫酸钾、99%七水硫酸镁。

[7] 顾地周,邓志刚,蔡茂伟,等. 苞叶杜鹃离体培养及种质试管保存体系的建立[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2009,33(3):20-24.

[8] 顾地周,冯颖,顾美影,等. 基于均匀设计优化手参体细胞胚胎发生及植株再生体系[J]. 中草药,2010,41(6):989-993.

[9] 顾地周,高捍东,王艳萍,等. 基于均匀设计优化绶草体细胞胚胎发生发育体系及扫描电镜观察[J]. 华南农业大学学报,2010,31(1):60-64.

[10] 顾地周,王秋爽,张学士. 展枝唐松草种子育苗关键技术研究[J]. 种子,2014,33(6):122-124.

[11] 安娜,朱艳,崔秀明,等. 三七种子后熟期生理生化的动态研究 III. 不同贮藏条件下种子酶活性分析[J]. 西南农业学报,2010,23(5):1477-1480.

[12] Ryu J S, Kim J I, Kunkel T, et al. Phytochrome-specific type 5 phosphatase controls light signal flux by enhancing phytochrome stability and affinity for a signal transducer[J]. Cell,2005,120(3):

395-406.

[13] Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, et al. PHL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, 2004,16:3045-3058.

[14] Tan B C, Joseph L M, Deng W T, et al. Proteins and gibberellin regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol,2004,135:1008-1019.

[15] Gallardo K, Job C, Groot S P, et al. Importance of methionine biosynthesis for *Arabidopsis* seed germination and seedling growth [J]. Physiologia Plantarum,2002,116(2):238-247.

[16] Yamauchi Y, Ogawa M, Kuwahara A, et al. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds [J]. The Plant Cell,2004,16(2):367-378.