

文章编号: 1005-0906(2008)06-0079-04

玉米幼胚培养及植株再生的研究

张慧英¹, 张耀华², 农友业³, 薛艳霞¹

(1. 广西大学农学院, 南宁 530004; 2. 中北大学化工与环境学院, 中北大学图书馆, 太原 030051; 3. 广西大学支农开发中心, 南宁 530004)

摘要: 以不同玉米自交系幼胚为外植体, 研究不同 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导、6-BA 浓度对愈伤组织分化和 6-BA 与 NAA 配合使用对试管苗生根的影响。结果表明: 不同 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导率影响差异不明显, 但对胚性率诱导有明显影响, 其诱导最佳培养基为 MS + 2,4-D 2 mg/L + 水解酪蛋白 500 mg/L + 脯氨酸 500 mg/L; 愈伤组织分化的最佳培养基是 MS + 6-BA 0.5 mg/L + 水解酪蛋白 500 mg/L + 谷氨酰胺 200 mg/L + PP₃₃₃ 2 mg/L; 试管苗生根的最佳培养基是 1/2 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L + PP₃₃₃ 2.0 mg/L + 活性炭 0.2%。

关键词: 玉米; 幼胚; 愈伤组织; 组织培养

中图分类号: S513.01

文献标识码: A

Studied on Tissue Culture and Plant Regeneration of Maize Immature Embryos

ZHANG Hui-ying¹, ZHANG Yao-hua², XUE Yan-xia¹

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004;

2. Chemical Industry and Ecology Institute of North University of China, Library of North University of China, Taiyuan 030051, China)

Abstract: The inducement, differentiation and plantlet roots of callus were studied from immature embryos of the different maize inbred lines in vitro on different medium with the different 2,4-D concentration. The results showed that the inducement rate of callus was not significant with the different 2,4-D concentration, but the rate of inducement of EC was significant, and the medium was MS + 2,4-D 2 mg/L + CH 500 mg/L + Pro 500 mg/L. The differentiation of callus was best on the culture medium of 1/2 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L + PP₃₃₃ 2.0 mg/L + active carbon MS + 6-BA 0.5 mg/L + CH 500 mg/L + GLU 200 mg/L + PP₃₃₃ 2 mg/L. The plantlet rooting was best on the culture medium of 1/2 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L + PP₃₃₃ 2.0 mg/L + active carbon 0.2%.

Key words: Maize; Immature embryo; Callus; Tissue culture

玉米是我国主要的粮食、饲料和工业原料, 玉米产业发展对我国国民经济和农业生产具有重要的战略意义。加入 WTO 后, 世界经济浪潮对我国玉米产业的冲击日益严重。常规遗传育种技术已不能满足日常需求, 采用植物细胞工程技术对玉米进行遗传改良势在必行。本实验对玉米幼胚离体培养及试管苗分化的影响因素进行系统研究, 进一步完善玉米

组织培养技术, 筛选出胚性率高的基因型材料, 为玉米转基因受体体系的建立提供可参考的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以适应性强的 7 个玉米自交系 540、7932、9313、7313、5010、HQ₂、综 31 为材料。

1.2 实验方法

将 7 个玉米自交系授粉后 9 ~ 12 d 的玉米幼胚接种在以 MS+ 水解酪蛋白 500 mg/L+ 脯氨酸 500 mg/L 为基本培养基、分别附加不同浓度的 2,4-D (0、1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L) 诱导培养基上, 观察并记录愈伤组织的诱导情况。

挑选生长旺盛的胚性愈伤组织, 用镊子夹成适

收稿日期: 2007-12-18; 修回日期: 2008-06-27

基金项目: 广西大学博士启动基金(XO61182)

作者简介: 张慧英(1955-), 女, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事生物技术育种研究。

E-mail: zhanghy955@sina.com

当大小接种在以 MS+ 水解酪蛋白 500 mg/L+ 谷氨酰胺 200 mg/L+PP₃₃₃ 2 mg/L 为基本培养基并分别附加不同浓度的 6-BA(0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L)分化培养基上进行愈伤组织的分化及植株再生, 观察记录根和芽的分化情况。

待试管苗长到 5 cm 左右时, 分割成单株移至以 1/2 MS+NAA 2.0 mg/L+PP₃₃₃ 2.0 mg/L+ 活性炭 0.2% 为基本培养基, 并分别附加不同浓度的 6-BA(0、0.5、1.0、2.0 mg/L)的培养基中进行生根培养, 观察记录试管苗生根的情况。

以上各实验的培养基均加琼脂 0.5%、蔗糖 3.0%, pH 为 5.8。

1.3 培养条件

愈伤组织诱导采用暗培养; 愈伤组织分化、生根实验采用光照培养, 光强 1 500 lx, 培养温度均采用 (25 ± 2)℃。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的 2,4-D 对玉米自交系愈伤组织诱导的影响

从表 1 结果可以看出, 在没有 2,4-D 的培养基上不能诱导出愈伤组织; 在不同浓度的 2,4-D 培养基上培养, 愈伤组织诱导率差异不明显, 基本达 90% 以上。胚性愈伤组织诱导率随着 2,4-D 浓度的升高而变化, 如综 31 在 2,4-D 浓度为 2 mg/L 时胚性率达 90% 以上; 2,4-D 浓度为 4 mg/L 时胚性率下降为 22%。7 个自交系材料的胚性愈伤组织诱导率差异明显, 7932 和 9313 没有胚性愈伤组织产生; 5010 的胚性率仅 7.2%; HQ₂ 的胚性率达到 63.1%; 7313 的胚性率最高达 82.5%, 比 5010 的胚性率提高了 75%。因此玉米幼胚愈伤组织的 2,4-D 最佳诱导浓度为 2 mg/L。

表 1 不同浓度的 2,4-D 对玉米自交系愈伤组织诱导的影响
Table 1 Effects of inducement rate from the callus with the different 2,4-D concentration and maize Inbred line

自交系 Inbred lines	2,4-D 浓度 (mg/L) Consistency of 2,4-D	接种幼胚数 (个) No.of embryos	诱导愈伤组织数 (块) No.of callus	愈伤组织诱导率 (%) Rate of induc-ement	胚性愈伤组织数 (块) No.of EC	胚性率 (%) Rate of EC
540	0.0	90	0	0.0	0	0.0
	1.0	90	87	96.7	13	15.0
	2.0	90	89	98.9	17	19.1
	3.0	90	87	96.7	10	11.5
	4.0	90	85	94.4	3	3.5
7932	0.0	90	0	0.0	0	0.0
	1.0	90	86	95.6	0	0.0
	2.0	87	84	96.6	0	0.0
	3.0	89	86	96.6	0	0.0
	4.0	87	84	96.6	0	0.0
9313	0.0	90	0	0.0	0	0.0
	1.0	90	89	98.9	0	0.0
	2.0	97	97	100.0	0	0.0
	3.0	90	87	96.7	0	0.0
	4.0	93	62	66.7	0	0.0
7313	0.0	90	0	0.0	0	0.0
	1.0	87	80	92.0	2	77.5
	2.0	88	87	98.9	85	97.7
	3.0	85	74	87.1	68	91.9
	4.0	82	68	83.0	40	58.8
5010	0.0	80	0	0.0	0	0.0
	1.0	47	45	95.7	4	8.8
	2.0	46	46	100.0	7	15.2
	3.0	47	46	97.9	1	2.1
	4.0	50	43	86.0	1	2.3

续表 1 Continued 1

自交系 Inbred lines	2,4-D 浓度 (mg/L) Consistency of 2,4-D	接种幼胚数 (个) No.of embryos	诱导愈伤组织数 (块) No.of callus	愈伤组织诱导率 (%) Rate of induc-ement	胚性愈伤组织数 (块) No.of EC	胚性率 (%) Rate of EC
HQ ₂	0.0	80	0	0.0	0	0.0
	1.0	72	71	98.6	52	73.2
	2.0	74	72	97.3	68	94.4
	3.0	74	72	97.3	42	58.3
	4.0	76	72	94.7	19	20.7
综 31	0.0	80	0	0.0	0	0.0
	1.0	87	85	97.7	76	89.4
	2.0	88	85	97.7	79	92.9
	3.0	87	81	93.1	66	81.5
	4.0	88	82	93.2	18	22.0

注:诱导率(%)= 产生愈伤组织的幼胚数 / 接种胚数 × 100%;胚性率(%)= 产生胚性愈伤组织的幼胚数 / 接种胚数 × 100%。
Notes: induction rate= The immature embryo number of produced callus/ The number of inoculation embryo × 100% ;Rate of EC= The immature embryo number of produced embryo callus/ The number of inoculation embryo × 100%.

2.2 不同浓度的 6-BA 对玉米自交系愈伤组织分化的影响

白 500 mg/L + 谷氨酰胺 200 mg/L + PP₃₃₃ 2 mg/L 的基本培养基上, 附加不同浓度的 6-BA, 7 d 后愈伤组织表面出现绿芽点。

将以上产生胚性愈伤组织较多的 7313、综 31、HQ 自交系的胚性愈伤组织接种在以 MS+ 水解酪蛋

表 2 不同浓度的 6-BA 对胚性愈伤组织分化的影响
Table 2 Effects of Consistency of 6-BA on differentiation rate

自交系 Inbred lines	6-BA 浓度(mg/L) Consistency of 6-BA	接种胚性愈伤组织数(块) No.of callus	分化芽数(个) No.of differentiation	分化率(%) Rate of differentiation	试管苗健壮状况 Situation of plantlet
7313	0.0	55	0	0.0	较差
	0.1	55	18	32.7	一般
	0.5	55	49	89.1	良好
	1.0	55	39	70.9	较好
	2.0	55	11	20.0	一般
	3.0	55	4	7.3	差
HQ ₂	0.0	40	0	0.0	较差
	0.1	40	11	27.5	一般
	0.5	40	40	100.0	良好
	1.0	40	33	82.5	较好
	2.0	40	27	67.5	一般
	3.0	40	16	40.0	差
综 31	0.0	30	0	0.0	较差
	0.1	30	7	23.3	差
	0.5	30	25	83.3	良好
	1.0	30	12	40.0	一般
	2.0	30	8	26.6	差
	3.0	30	7	23.3	差

注:分化率(%)= 分化出芽的胚性愈伤组织块数 / 接种胚性愈伤组织块数 × 100%。
Note: Rate of Differentiation= The embryo callus number of Differentiation / No.of Callus × 100%.

从表 2 结果可以看出,不同浓度的 6-BA 对愈伤组织的分化率有明显的影响。6-BA 浓度为 0.1 mg/L 时分化率比较低,7313、HQ₂、综 31 自交系的分化率都不到 35%;当 6-BA 的浓度升高到 0.5 mg/L 时分化率达到最大,3 个自交系的分化率分别为 89.1%、100%和 83.3%,均提高 50%以上;随着 6-BA 浓度的继续增加,分化率反而下降,6-BA 浓度为 3.0 mg/L 时,3 个自交系的分化率分别降低到 7.3%、

40.0%和 23.3%,所以 3 个自交系愈伤组织芽分化的最佳 6-BA 浓度是 0.5 mg/L。

2.3 6-BA 与 NAA 配合使用对试管苗生根的影响
以生长健壮的分化苗为材料,接种在以 1/2 MS + NAA 2.0 mg/L + PP₃₃₃ 2.0 mg/L + 活性炭 0.2%的基本培养基上,添加不同浓度的 6-BA(0、0.5、1.0、2.0 mg/L)进行生根实验,20 d 后观察再生植株的生根情况并记录每个处理的生根数、根长等(表 3)。

表 3 不同浓度的 6-BA 对试管苗根系的影响
Table 3 Effects of different concentration of 6-BA on plantlet roots

自交系 Inbred lines	6-BA 浓度(mg/L) Consistency of 6-BA	接种株数(株) No.of plantlet	平均每株生根数(条) No.of root	根长(cm) Length of root
7313	0.0	30	2.2	3.0
	0.5	30	5.0	7.0
	1.0	30	2.3	3.8
	2.0	30	2.1	3.5
HQ ₂	0.0	30	0.0	0.0
	0.5	29	5.6	5.0
	1.0	30	2.9	3.2
	2.0	25	3.1	2.5
综 31	0.0	30	3.0	1.2
	0.5	30	7.0	5.5
	1.0	35	3.6	3.2
	2.0	28	3.0	1.2

从表 3 可以看出,不同浓度的 6-BA 对试管苗生根有明显的影响。当 6-BA 浓度为 0.5 mg/L 时根数最多、最长,7313、HQ₂、综 31 的根数和根长分别为 5.0 条和 7.0 cm、5.6 条和 5.0 cm、7.0 条和 5.5 cm,比浓度为 0 时分别提高 2.8~5.6 条和 4.0~5.0 cm。随着 6-BA 浓度的增加,根数下降、根长变短、植株的长势也弱;当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,根数和根长分别为 2.3~3.6 条和 3.2~3.8 cm,比浓度为 0.5 mg/L 时的根数降低了 50%左右,根长缩短了 40%左右。再生植株生根时,6-BA 与 NAA 配合使用的最佳浓度为 0.5 mg/L。

3 结论与讨论

玉米幼胚诱导愈伤组织具有普遍性,试验所采用的 7 个玉米自交系都诱导出愈伤组织。不同浓度的 2,4-D 对玉米幼胚愈伤组织诱导率无明显差异,这与胡彦民等的研究结果类似。没有 2,4-D 或 2,4-D 浓度过高都不利于愈伤组织的产生,这与张

慧英等人的观点相似。
细胞分裂素能明显促进芽的形成,6-BA 对不同基因型的效果不同。在实验中 HQ₂ 自交系的分化率较高,而综 31 的分化率相对较低。资料表明,高浓度的 6-BA 也是导致试管苗变异的一个主要因素,所以在分化过程中 6-BA 浓度不应太高,这与马莲菊等的观点相似。

参考文献:

[1] 王 雷,张 君,于彦春,等. 胚龄和 2,4-D 浓度对玉米自交系幼胚愈伤组织诱导率的影响[J]. 玉米科学,2001,9(3):26-28 .
[2] 张慧英,王小敏,庾韦花. 玉米幼胚离体培养和植株再生[J]. 广西农业生物科学,2004,23(3):190-213 .
[3] 胡彦民,季良越,韦晓敏. 玉米幼胚离体培养的影响因素研究[J]. 河南农业大学学报,2000,34(4):305-308 .
[4] 马莲菊,高 峰,于翠梅,等. 玉米自交系幼胚离体培养及植株再生研究[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版),2004,22(1):61-64 .

(责任编辑:张 英)