

文章编号: 1005-0906(2007)02-0073-03

玉米幼胚离体培养体系的建立

杜文平, 徐利远, 余桂容, 王 一, 钟昌松

(四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 成都 610066)

摘 要: 以 78599、A189 和糯杂 3 号的幼胚为外植体进行幼胚培养, 研究最佳培养基配方及培养程序。结果表明: 用改良的玉培培养基 +2 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L KT + 5 mmol CaCl₂ + 600 mg/L 脯氨酸 + 500 mg/L 水解酪蛋白 + 7 g/L 琼脂 + 30 g/L 糖进行诱导培养, 3 种基因型中 78599 最易诱导出愈伤组织。在其它条件不变的情形下, 2,4-D 浓度降到 1 mg/L, 胚性愈伤组织呈颗粒状分散且颗粒细小, 呈黄绿色。此种胚性愈伤组织接种在加 KT 或加 BA 的分化培养基中, 以加 KT 的绿苗数多。

关键词: 玉米; 幼胚; 愈伤组织; 组织培养

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

System Establishment of Maize Immature Embryos Culture in Vitro

DU Wen-ping, XU Li-yuan, YU Gui-rong, WANG Yi, ZHONG Chang-song

(Institute of Biotechnology & Nuclear Techniques, Sichuan Academy of Agricultural Sciences,
Chengdu 610066, China)

Abstract: It was studied to find out the best composition of medium and propagation procedure with the immature embryos of 78599, A189 and Nuoza No.3. The results showed that using the modified corn media with 2 mg/L, KT 0.2 mg/L, CaCl₂ 5 mmol, Pro 600 mg/L and CH 500 mg/L as initiation medium, 78599 easy to be initiated the callus. When the concentration of 2,4-D was 1 mg/L, the embryonic callus was yellow green dispersive grain. In plant regenerating period, it was higher plant regeneration rate with KT than BA.

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

用遗传转化技术进行玉米品种的改良一直受到重视。遗传转化中如何通过组织培养获得高频率的胚性愈伤组织是重要的环节。自 1975 年美国 Green 和 Philips 以 A188 的幼胚为材料诱导出二倍体愈伤组织并首次获得玉米再生植株以来, 已在幼叶、幼穗、根尖、成熟胚、幼胚等外植体上诱导出愈伤组织。幼胚仍是最理想的外植体材料。迄今对玉米幼胚培养做了许多工作, 并取得了很大的进展。本文探讨获得高频率的胚性愈伤组织以及绿苗分化率的最佳培养条件, 为玉米的遗传转化研究建立基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

收稿日期: 2006-04-24

基金项目: 四川省应用基础项目(04JY029-004-2)

作者简介: 杜文平(1973-), 女, 硕士, 主要从事作物遗传育种研究。

Tel: 028-84504541 13541080109

E-mail: duwenping1@163.com

徐利远为本文通讯作者。

玉米品种为 78599、A189 和糯杂 3 号。

1.2 材料消毒处理

植株在田间套袋自交, 授粉后 10 ~ 13 d 摘取果穗, 室内剪去花丝, 剥去最外层苞叶, 于超净工作台上用 75% 酒精擦拭苞叶, 擦一层, 剥一层, 直至剥出果穗, 再将子粒的顶部切去, 露出胚乳, 最后用镊子取出 1.5 ~ 2.0 mm 的幼胚, 盾片向上接种于诱导培养基中。

1.3 培养基

基本培养基为 Y0、N6 和正 14, 其中 Y0 包括玉培(大量元素)和 N6(有机物、铁盐、微量元素、肌醇)。在基本培养基的基础上添加其它成分。其中 Y1、Y2、Y3、Y4、Y5、Y6、Y7、Y8 为诱导培养基, Y9 为胚状体继代培养基, Y10、Y11、Y12 为分化培养基。

1.4 数据统计

接种 10 d 后将玉米幼胚转入其原来的诱导培养基中。4 周后除去已污染的幼胚后所剩下的胚为接种幼胚数, 统计诱导出愈伤组织的幼胚数和胚性愈伤组织数, 按公式计算出愈率、胚愈率和绿苗数。

$$\text{出愈率} = \frac{\text{诱导的愈伤组织数}}{\text{接种幼胚数}} \times 100\%$$

(愈伤组织转入分化培养基 30 d 后统计)

$$\text{胚愈率} = \frac{\text{胚性愈伤组织数}}{\text{接种幼胚数}} \times 100\%$$

1.5 培养条件

诱导培养和继代培养均为暗培养, 温度为 25 ~ 28℃; 分化培养为光照培养, 光照强度为 1 500 ~ 2 000 lx, 每天光照时间为 12 h, 温度为(25 ± 2)℃。

$$\text{绿苗分化率} = \frac{\text{分化成绿苗的愈伤组织数}}{\text{接种愈伤组织数}} \times 100\%$$

表 1 各种培养基及其成分

Table 1 Media and their components

培养基代号 Media code	基本培养基 Media	2,4-D (mg/L)	KT (mg/L)	BA (mg/L)	NAA (mg/L)	CaCl ₂ (mmol/L)	脯氨酸(mg/L) Proline	水解酪蛋白 (mg/L) CH	AgNO ₃ (mg/L)	琼脂(g/L) Agar	糖(g/L) Sugar
Y1	N6	2				5	600	500		7	30
Y2	正 14	2				5	600	500		7	30
Y3	Y0	2				5	600	500		7	30
Y4	Y0	2	0.2			5	600	500		7	30
Y5	Y0	2	2.0			5	600	500		7	30
Y6	Y0	2	0.2			5	600	500	5	7	30
Y7	Y0	2	0.2			5	600	500		5	30
Y8	Y0	2	0.2			5	600	500		3	30
Y9	Y0	1	0.2			5	600	500		7	30
Y10	Y0	0		1.0	0.01		500	100		7	20
Y11	Y0	0	1.0		0.01		500	100		7	20
Y12	Y0	0	1.0	0.2	0.01		500	100		7	20

2 结果与分析

2.1 玉米幼胚的诱导培养

将 78599、A189 和糯杂 3 号玉米的幼胚接种在不同的诱导培养基中, 2 d 后幼胚开始陆续膨大, 有的幼胚出现胚根和胚芽; 10 d 后将幼胚的胚根和胚芽切除并转入与原来相同的诱导培养基中; 4 周后可见玉米幼胚的诱导情况各不一致, 有的幼胚产生

黄绿色、颗粒状、结构致密且生长较快的胚性愈伤组织, 该愈伤组织易分化出绿苗, 有的幼胚则产生质地柔软、呈水浸状的非胚性愈伤组织, 该愈伤组织经过一段时间的培养后颜色逐渐变灰暗, 表面产生大量粘液, 最后褐化死亡。统计各基因型玉米的愈伤组织诱导频率(出愈率)与胚性愈伤组织诱导频率(胚愈率)并对其进行方差分析(表 2 和表 3)。

表 2 不同培养基对玉米幼胚诱导的影响

Table 2 Effect of different media on inducing of maize immature embryo

%

培养基 Media	78599		A189		糯杂 3 号		平均出愈率 Average callus induction rate	平均胚愈率 Average induction rate of embryonic callus
	出愈率 Callus induction rate	胚愈率 Induction rate of embryonic callus	出愈率 Callus induction rate	胚愈率 Induction rate of embryonic callus	出愈率 Callus induction rate	胚愈率 Induction rate of embryonic callus		
Y1	95.00	15.00	85.71	7.14	78.57	7.14	15.00	85.71
Y2	78.94	10.53	73.33	6.67	81.82	0.00	78.03	5.73
Y3	86.36	18.18	93.33	13.33	76.92	0.00	85.54	10.50
Y4	84.21	21.05	88.24	11.76	73.68	10.52	82.04	14.44
Y5	73.91	21.74	76.92	15.38	80.00	13.33	76.94	16.82
Y6	72.22	11.11	64.29	0.00	83.33	0.00	73.24	3.70
Y7	76.47	5.88	68.75	6.25	69.23	0.00	71.48	4.04
Y8	66.67	14.29	69.23	0.00	66.67	6.67	67.52	6.99
平均值	79.22	14.72	77.48	7.57	76.28	4.71	77.65	9.00

表 2 数据表明, 基因型是影响玉米幼胚培养较

为重要的因素之一。在 3 个玉米品种中, 78599 的出

愈率和胚愈率都是最高的,而糯杂 3 号的出愈率和胚愈率都较低,并且 3 种基因型的胚性愈伤组织诱导频率达到极显著差异,只是三者之间的愈伤组织诱导率差异不明显。基本培养基对玉米幼胚培养的诱导试验分析表明,基本培养基的不同,玉米的出愈率或胚愈率都有明显差异,其中胚性愈伤组织诱导频率达到极显著差异。同时在培养基中添加适当的 KT 有助于胚性愈伤组织的获得,但当 KT 浓度过高

时,尽管胚性愈伤组织有一定的提高,愈伤组织的诱导频率却明显降低,实验发现添加 0.2 mg/L 的 KT 对玉米幼胚的诱导效果较好。实验结果还表明,在其它条件相同的情况下,N6 和玉培培养基适合玉米的幼胚培养,两者的差异不明显,正 14 不太适合玉米幼胚培养。另外,添加 AgNO₃ 不仅降低出愈率,且胚性愈伤组织的诱导频率也下降,有许多幼胚还可直接形成完整植株,且根特别细长。

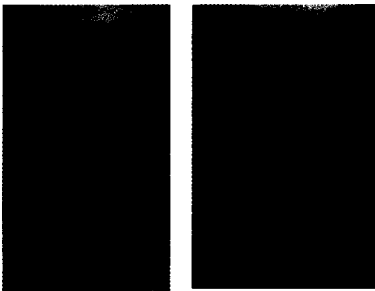
表 3 愈伤组织、胚性愈伤组织诱导频率和绿苗分化率的方差分析

Table 3 Analysis of callus, embryonic callus induction rate and plant regeneration rate

变异来源 Sources	愈伤组织诱导率 Callus induction rate				胚性愈伤组织诱导率 Embryonic callus induction rate				绿苗分化频率 Plant regeneration rate			
	SS	DF	MS	F 值	SS	DF	MS	F 值	SS	DF	MS	F 值
品种间	35.095 4	2	17.547 7	0.39	425.825 5	2	212.912 8	18.27**	148.586 8	2	74.293 4	6.93*
培养基	956.544 1	7	136.649 2	3.04*	482.747 4	7	68.963 9	5.92**	32.849 7	2	16.424 5	1.53
误差	629.904 6	14	44.993 2		163.190 7	14	11.656 5		42.901 0	4	10.725 3	
总计	1 621.544 1	23			1 071.763 6	23			224.337 5	8		

注:绿苗分化率数据来源于表 4,另两组数据来源于表 2。* 为 5%显著水平,** 为 1%极显著水平。
Note: Data of plant regeneration rate were from Table 4, and the other two data sets were from Table 2. *and** indicated the significant at 5% and 1% level respectively.

2.2 愈伤组织的继代培养



a: 非胚性愈伤组织 b: 胚性愈伤组织
a: none embrgonic callus b: embryonic callus

图 1 玉米胚性愈伤组织与非胚性愈伤组织比较
Fig.1 The difference of maize embryonic callus and none embryonic callus

将经过诱导培养基诱导的胚性愈伤组织转移到 Y4 和 Y9 两种不同的培养基中。两周后发现 Y9 上的愈伤组织呈黄绿色,结构致密,呈颗粒状分散,颗粒细而小,易分化成苗;在 Y4 上继续培养的愈伤组织部分颜色逐渐变灰暗,表面开始产生粘液,逐渐转变为非胚性愈伤组织,失去分化能力(图 1)。1 个月 after 在 Y9 上继代的愈伤组织增殖明显,少部分变成非胚性愈伤组织;而 Y4 上培养的愈伤组织增殖效果差,且很大部分变为非胚性愈伤组织。表明当玉米的幼胚经过 1 个月左右的初始诱导培养后,愈伤组织应该转入继代培养基中,这样其胚性愈伤组织

才很少失去胚性。

2.3 愈伤组织的分化培养

将愈伤组织接种到含有不同激素的分化培养基中,10 d 后陆续有绿苗从颗粒状的胚性愈伤组织中分化出绿苗。由于分化培养基中激素组合的不同以及浓度的差异,导致愈伤组织的分化有一定的差异,但差异不明显(表 3)。表 4 表明,在 KT 和 BA 相同的浓度条件下,KT 分化频率明显高于 BA;在不改变 KT 浓度的条件下,适当添加一定浓度的 BA 分化频率变化不大。另外,实验发现基因型的差异对玉米的分化频率有较大的影响。其中 78599 分化频率最高,而糯杂 3 号最小,其差异达到显著水平。

表 4 玉米愈伤组织在不同分化培养基上的分化频率

Table 4 Plantlet regeneration frequencies of maize callus in different media

培养基 Media	78599	A189	糯杂 3 号	平均值 Average
Y10	8.11	11.11	0.00	6.41
Y11	17.24	8.83	6.90	10.99
Y12	15.63	8.57	4.35	9.52
平均值	13.66	9.50	3.75	8.97

3 结 论

玉米幼胚愈伤组织的诱导率和植株再生都因品种而异。本文所用 3 个品种的幼胚培养(下转第 78 页)

吐丝后 15、20、10 d,甜、糯、四单 19 的含糖量分别达到最大值,以后有缓慢降低。对于甜玉米和糯玉米来说,乳熟中期鲜食或制罐头是最好的时期。对于蔗糖含量来说,三种类型春玉米子粒中蔗糖含量呈单峰曲线,随着子粒灌浆过程的进行,含糖量升高,至吐丝后 15、20、10 d,甜、糯、四单 19 的含糖量分别达到最大值,以后有缓慢降低。综合试验结果与方差分析:甜玉米、糯玉米和高淀粉玉米在吐丝后 15、20、10 d 可溶性糖和蔗糖分别均达到了最大值,是鲜食或商业利用的最好时期。

参考文献:

- [1] 李晓亮. 特用型玉米的研究进展及综合开发利用[J]. 国外农学——杂粮作物, 1998, 18(2): 15-20.
- [2] 钱洪辉. 特用玉米的引进和利用[J]. 内蒙古农业科技, 2002(5): 38.
- [3] 文贞顺. 高淀粉玉米杂交种“四单 19”丰产性、稳产性及适应分析[J]. 玉米科学, 1995, 3(3): 19-22.
- [4] 安伟. 高淀粉玉米的品质改良[J]. 山西农业科学, 2002, 30(2): 25-27.
- [5] 宋宝辉. 优质专用玉米及栽培技术[J]. 杂粮作物, 2001, 21(2): 20-21.
- [6] 徐敏. 特种玉米引种初报[J]. 杂粮作物, 2001, 21(3): 35-36.
- [7] 黄高宝. 不同玉米品种氮素营养效率差异的生态生理机制[J]. 植物营养与肥料科学, 2002, 28(4): 492-498.
- [8] 白宝璋. 甜玉米子粒营养成分的动态变化[J]. 吉林农业科学, 1998(3): 8-11.
- [9] 韩俊. 国内外甜玉米生产的现状与发展趋势[J]. 海南大学学报, 1989, 7(3): 1-6.

(责任编辑:朱玉芹)

(上接第 75 页)都能诱导出愈伤组织,但诱导率和再生率有明显差异。78599 易诱导出愈伤组织和胚性愈伤组织,且植株再生频率都相应高;而糯杂 3 号诱导率和再生率都最低,糯杂 3 号诱导效果或再生效果差可能与它含有较高的糯质基因有关。就培养基来说,基本培养基对幼胚愈伤组织形成的影响较大, N6 和玉培培养基的出愈率高些,这与张红伟等人的研究结果相同。但傅作申认为 8114 比 N6、MB 等更易诱导愈伤组织。另外,在愈伤组织的诱导培养基中,添加一定的 KT 也有利于胚性愈伤组织的形成,这与张红梅等人的观点不同。也有一些研究认为,适宜浓度的 2-iP 与 KT 或 6-BA 搭配可明显增强胚状体的形成。

参考文献:

- [1] Green C E, Phillips. Plant regeneration from tissue cultures of maize[J]. Crop Sci., 1975, 15: 417-421.
- [2] 傅作申,徐振彪,母秋华. 玉米幼胚愈伤组织诱导及植株再生[J]. 玉米科学, 1998, 6(3): 32-34.
- [3] 李效宇,卢龙斗,张根发. 玉米幼穗两种愈伤组织的比较研究[J]. 广西植物, 1998, 18(1): 62-64.
- [4] 付凤玲,李晚忱,荣廷昭,等. 提高 N6 培养基钙浓度对玉米幼胚培养的影响[J]. 西北农林科技大学学报, 2003, 31(1): 81-84.
- [5] 付凤玲,李晚忱,荣廷昭,等. N6 培养基添加钙和稀效唑对玉米幼胚培养的作用[J]. 作物学报, 2005, 31(5): 634-639.
- [6] 张红梅,刘小红,张红伟,等. 不同杂种优势类群玉米幼胚愈伤组织的诱导及植株再生特性的研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(1): 50-55.
- [7] 谷祝平,郑国辑. 玉米幼胚愈伤组织培养中体细胞胚发生的研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 1990, 26(4): 121-126.
- [8] 季良越,孙晓丽,韦小敏,等. 玉米幼胚愈伤组织诱导和植株再生研究[J]. 河南农业大学学报, 2002, 36(2): 101-105.

(责任编辑:张英)