

甜玉米成熟胚的组织培养及其植株再生研究

陈莉^{1,2}, 奚秉德^{1,2}, 阮元元¹, 沈芳¹, 张永霞¹, 李亚林¹, 曹俊梅²

(1. 淮阴师范学院生物系, 江苏淮安 223300; 2. 新疆农业大学农学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

摘要: 以45种甜玉米为材料, 对成熟胚愈伤组织的诱导和继代培养、植株再生、再生苗移栽等方面进行了研究。45种基因型玉米成熟胚经诱导多可产生愈伤组织, 但各种基因型之间愈伤组织诱导率差异较大, 变异范围为0~100%。不同基因型愈伤组织的增殖力也有显著差异。将愈伤组织转入分化培养基, 选系B12-2-2和A50可再生出完整植株。

关键词: 甜玉米; 成熟胚; 基因型; 再生植株

中图分类号: S513.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1302(2006)06-0075-03

玉米是一种重要的粮饲作物, 利用现代生物技术进行玉米品种改良的研究已日趋深入, 并取得了令人瞩目的成就。1975年, Green和Phillips^[1]用玉米幼胚做外植体, 诱导出二倍体愈伤组织, 首次获得再生植株。随着体细胞培养技术的不断改进, 目前已经能从幼穗^[2]、芽尖^[3]、幼嫩花序^[4]、花药^[5]、幼苗切段^[6]等诱导愈伤组织并再生植株, 其中幼胚是最易诱导也是目前使用最多的外植体^[7-8]。玉米组织培养是遗传转化中一个基础而重要的环节。玉米组织培养及再生研究, 目的是让外植体能够高效率地诱导出愈伤组织, 建立高效的体细胞再生体系, 为玉米外源基因的转化创造有利条件^[9]。

甜玉米 [*Zea mays* (L.) *Saccharata* Sturt] 是玉米种的一个亚种, 子粒含有丰富的蔗糖、还原性糖、水溶性植物糖原以及维生素A、E和植物纤维素。甜玉米在食疗保健, 改善人们食品结构, 增加食品工业原料方面都有重要地位^[10]。近10多年来, 国际上甜玉米的研究越来越深入, 中、美、法、英、巴西等国家极重视利用生物技术对甜玉米的选育及品质改良。母秋华^[11]、孙敬三^[12]分别发表了甜玉米组织培养及原生质体培养的结果。但迄今为止, 成功建立再生及转化体系的大多是一些常规自交或杂交玉米, 对于甜玉米再生体系的研究报道不多。幼胚虽是外植体中最易诱导和目前使用最多的外植体, 但

幼胚取材的时间受到严格的季节限制, 因为只有取授粉后10~14d的幼胚进行培养, 才能得到质量较好的胚性愈伤组织, 而成熟胚不受季节限制。本试验以45种不同基因型甜玉米的成熟胚作为外植体, 用N6为基本培养基, 在相同光照和温度条件下对其愈伤组织的诱导及植株再生能力进行了研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料共45份(表1)。

1.2 外植体的获得

挑选大而饱满的具有发芽能力的成熟种子, 采取两步消毒法。剥胚前用0.1%升汞消毒10min, 无菌水冲洗, 成熟胚盾片向上接种在培养基上。每基因型设10个重复。

1.3 培养基及培养条件

1.3.1 培养基 愈伤诱导培养基: N6 + 2, 4 - D 2.0 mg/L + 脯氨酸 0.7 mg/L + CH 500 mg/L + 0.7% 琼脂; 愈伤改良培养基: N6 + 2, 4 - D 2.0 mg/L + 脯氨酸 0.7 mg/L + CH 500 mg/L + 2% 甘露醇 + 0.7% 琼脂; 分化培养基: N6 + KT 1.0 mg/L + CH 100 mg/L + 0.7% 琼脂; 壮苗培养基: 1/2MS 盐 + 0.1% 活性炭 + 0.5% 琼脂。以上各种培养基中, 加3% 蔗糖, 调pH值5.8~6.0, 121℃下灭菌20min。

1.3.2 培养条件 无菌条件下剥取试验材料的成熟胚, 在愈伤诱导培养基上于(25±1)℃下暗培养, 20d后对愈伤组织进行改良继代2次, 记录有关数据。之后转入分化培养基, 温度(25±1)℃, 光照2700~3000lx, 每天光照时间13h, 20d后统计分化相关的芽点数及出苗数。再生植株转到壮苗培养

收稿日期: 2006-06-08

基金项目: 江苏省高校高新技术产业化项目(编号: JH03-003)。

作者简介: 陈莉(1980—), 女, 山西运城人, 硕士, 从事玉米生物技术研究。通信作者: 奚秉德。Tel: (0517) 3525097; E-mail: doubd@163.com。

表1 培养所用试材

序号	试材	序号	试材	序号	试材	序号	试材	序号	试材
1	A36 单 3-5	10	A49-5-2	19	D1-1-2	28	A50	37	C4-1-2
2	A77-2-3	11	C4-1-1	20	B6-2-1	29	B2-4-3	38	A67-2-2
3	A8-01(21)	12	B18-6-2	21	A66-4-1	30	A71-1-1	39	A29-8-5
4	B5-1-1	13	B12-4-1	22	A82-1-1	31	A53-2-1	40	A67-2-4
5	A43-2-1	14	B12-2-2	23	A10(5)-4-2	32	A47-4-1	41	B2-12-2
6	A23-2-3	15	C3-5-2	24	A37-1-1	33	17(18)-2-2	42	B6-6-2
7	A19(8)-6-2	16	B12-1-1	25	A83-5-6	34	B6-1-2	43	B18-5-4
8	A39-2-2	17	B2-4-2	26	A79-1-1	35	A10-1-2	44	C2-2-1
9	N29p-3-1	18	TD08	27	B18-2-5	36	D12-4-4	45	A21-3-1

基上,培养条件同分化培养,待苗长出些许健壮的根时,驯化后移入土中。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

成熟胚接种3~7 d后,开始产生愈伤组织,15 d后明显增大(图版 I)。出愈率是以长出愈伤组织胚(个)分别占接种胚(个)的百分数来表示。对45种基因型的出愈率进行了方差分析(表2)。表2结

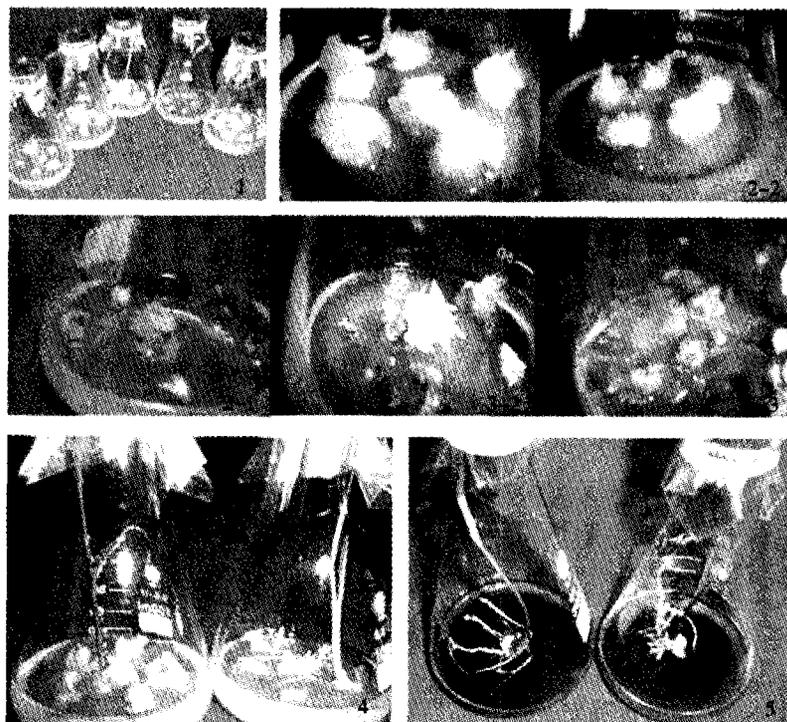
表2 不同基因型的出愈率方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	显著水平
基因型间	285 606.066	44	6 491.047	23.352	极显著
基因型内	92 839.115	334	277.961		
总变异	378 445.181	378			

果表明,不同基因型间的出愈率有极显著差异。将愈伤组织转入分化培养前,出愈率高的基因型有C2-2-1[44](即基因型序号44,下同)、A10(5)-4-2[23]、B12-4-1[13]、A36 单 3-5[1]、A50[28]、B12-2-2[14]。最差的为B18-2-5[27],几乎不长愈伤组织。可见,甜玉米不同基因型在成熟胚诱导愈伤组织的频率方面存在着较大差异。

2.2 愈伤组织的继代与状态

愈伤组织最初多呈水浸状,质量较差,经过改良继代,其表面长出白色或黄色的愈伤组织,并迅速增殖。不同基因型所诱导出的愈伤组织质量有所不同(图版 I)。愈伤组织20 d继代1次,接种培养40 d后调查愈伤状态。45种基因型的愈伤组织可大致



图版 I

图版说明:1.从不同基因型成熟胚诱导出来的愈伤组织;2.继代、改造后得到的不同基因型的愈伤组织状态;3.转入分化培养不同基因型形成的芽点情况;4.愈伤组织形成的再生植株;5.壮苗培养中的再生植株。

分为 A、B、C 与其他共 4 种。A 型愈伤组织淡黄色, 结构松散, 生长迅速, 如 A36 单 3-5[1], A10(5)-4-2[23] 等 4 种, 其中尤以 A36 单 3-5[1] 愈伤组织质量为好; B 型愈伤组织淡黄色或白色, 结构松软, 水浸状, 生长缓慢, 如 A43-2-1[5]、TD08[18]、A50[28]、A29-8-5[39] 等 10 种; C 型愈伤组织白色, 结构松软, 水浸状, 部分愈伤组织周围有黏性物质产生, 生长缓慢, 如 A8-01(21)[3]、N29p-3-1[9]、B12-2-2[14] 等 16 种。除上述基因型外, 很多如 A39-2-2[8]、B2-4-3[29]、D12-4-4[36]、A21-3-1[45] 等 15 种产生的愈伤组织状态很差, 这些愈伤组织质地柔软, 水浸状, 几乎不长。看来仍需对其进行改良培养。

2.3 愈伤组织的增殖力

愈伤组织的增殖力(或称愈伤组织克隆力)是衡量愈伤组织质量的一个重要指标。通过 20 d、40 d 及 60 d 的培养, 分别以转接前后三角瓶的重量差来确定胚或愈伤组织重量。推算每日每胚愈伤生长量, 再分别取平均值进行比较。

方法为: 接种前称出新鲜培养基重 M_1 , 接种后立即再称重 M_2 , 培养 20 d 后, 先称出培养瓶重 M_3 , 后立即将材料全部转出并再称原瓶重 M_4 , 由 $[(M_3 - M_4)/N - (M_2 - M_1)/N]/20$, N 代表每瓶接种胚数, 则得出愈伤组织的增殖力, 后依此类推。本试验以愈伤增殖力经统计观察达稳定状态即接种 40 d 为标准进行分析, 结果见表 3。表 3 表明, 不同基因型之间的愈伤增殖力也存在极显著差异。

表 3 40 d 平均每胚愈伤增殖力

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
基因型间	9.815	44	0.223 1	33.041	极显著
基因型内	2.255	334	0.006 8		
总变异	12.069	378			

按照愈伤组织增殖力数值排序, 愈伤增殖力高的基因型有 A36 单 3-5[1]、B6-6-2[42]、B12-4-1[13]、B12-1-1[16]、A50[28]、B12-2-2[14] 等, 其中最好的基因型是 A36 单 3-5[1], 最差的为 B18-6-2[12]。

2.4 愈伤组织的分化和植株再生

对继代改良培养 2 次后(培养 60 d), 对其分化培养 20 d 后的愈伤组织上长出的芽点数进行方差分析, 结果见表 4。表 4 表明, 不同基因型的芽点数间同样存在着极显著差异。

表 4 不同基因型的芽点数方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
基因型间	140.943 3	44	3.203 3	4.505	极显著
基因型内	225.421 4	317	0.711 1		
总变异	366.364 6	361			

在统计观察中将供试材料不同基因型转入分化培养基的出芽点情况进行降序排列。供试材料 A71-1-1[30]、C2-2-1[44]、B12-2-2[14]、A67-2-2[38]、B2-4-2[17]、A50[28] 等基因型出芽点较好(图版 3), 而 A36 单 3-5[1]、A8-01(21)[3]、B5-1-1[4]、N29p-3-1[9]、B12-4-1[13]、TD08[18]、A10(5)-4-2[23]、B2-4-3[29]、D12-4-4[36]、A21-3-1[45] 等 10 种基因型未见有芽点迹象。基因型 A71-1-1[30] 出芽点数情况最好, 但此种基因型最终并未分化绿苗, 从而认为分化出芽点仅是植株再生的前提条件之一。供试的 45 种材料中只有选系 B12-2-2[14] 和 A50[28] 可再生出完整植株(图版 I), 这可能与较高的出愈率、愈伤增殖力以及较多的芽点数有关。

3 讨论与结论

在玉米的组织培养中, 利用幼胚作为外植体在取材时间上有很大的局限性, 曹俊梅等(2005)研究表明, 在任何时间都可以利用成熟胚的培养及愈伤组织再分化率进行大量初选, 选择愈伤分化率高的基因型, 在甜玉米生长季节再利用其幼胚进行培养再生和转化研究, 从而提高幼胚培养和转化的目的性和效率^[13]。本试验则在此研究基础上, 以 45 种不同基因型甜玉米的成熟胚作为外植体对其再生能力相关指标进行了筛选和探讨。

愈伤组织诱导生长及分化结果表明, 甜玉米不同基因型成熟胚出愈率、愈伤组织增殖力和芽点数方面均存在显著差异, 说明成熟胚脱分化和再分化能力上的差异, 与前人所报道的玉米植株再生对基因型具有依赖性的结论相一致。

再生能力最终体现在获得分化绿苗的效率上, 在愈伤组织继续生长过程中一般不应该过早地断言进行改良是再分化的条件之一。再生能力与良好的培养特性即胚性愈伤诱导频率和绿苗的分化率有直接关系, 也是评价基因型能否作为适宜遗传转化受体体的重要指标。

通过再生基因型的分析认为, 高出愈率、高愈伤(下转第 78 页)

优质鲜食糯玉米南农紫玉糯1号的特征特性与栽培要点

徐勇, 刘金波, 徐福海, 王建华, 曾旭辉

(南京神州种业有限公司, 江苏南京 210095)

关键词: 糯玉米; 品种; 特征特性; 栽培要点

中图分类号: S513.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1302(2006)06-0078-02

南农紫玉糯1号是南京农业大学玉米育种室1997年选育出的高品质杂交种鲜食糯玉米。2002年通过江苏省审定, 审定编号: 苏审玉200202。2000年授予国家新品种保护, 公告号: CNA000083E。该品种在江苏、安徽等地种植, 均表现高产、优质。

1 主要特征特性

1.1 特征特性

该品种果穗圆锥形, 子粒尖端颜色为深红色, 子粒背面颜色为红色, 子粒煮熟后色泽鲜亮。株高

210 cm, 穗位高105 cm, 总叶数为19~21张, 叶片绿色, 后期熟相好。鲜穗穗长17 cm, 穗粗4 cm, 每穗14行, 无秃顶, 千粒重270 g, 单穗重182 g。一般鲜穗产量750 kg/667m²左右。该品种全生育期比苏玉糯1号迟2 d。收鲜穗生育期春播95 d左右, 夏播85 d左右。成熟时田间茎叶保持绿色。

1.2 品质和功效

该品种鲜穗糯性好、香味纯正、甜度适中且保持期长、口感好、营养丰富, 蕊嫩、细又甜, 出籽率高, 略带香味。富含维生素、蛋白质、赖氨酸和矿物质, 有利于降血压、利尿、助消化和改善营养结构。

鲜穗采收后, 绿色茎叶可作青贮饲料。鲜穗可速冻冷藏后进行反季节销售, 成熟子粒可进行深加工。

收稿日期: 2006-04-18

作者简介: 徐勇(1962—), 男, 江苏吴江人, 副教授, 主要从事作物遗传育种与种子开发工作。Tel: (025)84396540; (025)84396385。

(上接第77页)

增殖力及高芽点数, 虽然不能直接决定再生力, 但至少是甜玉米成熟胚愈伤再分化的条件。宋芸(2004)通过研究幼胚再生, 认为出愈率、克隆力、分化率之间由不同的遗传系统所控制。为了探讨有关成熟胚的出愈率、器官量、愈伤组织增殖力、芽点分化数、绿苗分化数之间的关系, 值得用统计学方法进行进一步探讨。

参考文献:

- [1] Green C E, Phillips R I. Plant regeneration from tissue cultures of maize[J]. *Crop Science*, 1975, 15:417-418.
- [2] 李效宇, 徐龙珠, 张根发. 玉米幼穗离体培养体细胞胚高频发生的研究[J]. *西北植物学报*, 1997, 17(3):405-409.
- [3] 李学红, 张举仁. 玉米茎尖离体培养直接产生雌、雄花序的研究[J]. *中国科学(C辑)*, 1999, 29(2):186-193.
- [4] Rhodes C L, Green C E, Phillips R I. Factors affecting tissue culture initiation from maize tassels[J]. *Plant Sci*, 1986, 46:225-232.
- [5] 杜娟, 母秋华, 贾玉峰. 利用桥接组合的转育方法提高玉米花

药培养诱导率的研究[J]. *玉米科学*, 1999, 7(3):16-18.

- [6] Potrykus I, Harms C T, Lorz H. Callus formation from cell culture protoplasts of Corn (*Zea mays* L.)[J]. *Theor Appl Genet*, 1979, 54:209-214.
- [7] 杜娟, 余云舟, 张领兵. 玉米自交系Ⅱ型胚性愈伤组织诱导及遗传转化初报[J]. *吉林农业大学学报*, 2000, 22(4):41-44.
- [8] Prioli L M, Sondahl M R. Plant regeneration from an recover of fertile plants protoplasts of maize[J]. *Bio Tech*, 1989, 7(3):589-594.
- [9] 贾利敏, 张红梅, 贾利欣. 玉米组织培养和植株再生的研究现状[J]. *内蒙古农业科技*, 2002(3):10-13.
- [10] 母秋华, 张新生, 杜娟, 等. 超甜玉米细胞和组织培养及其后代育种[J]. *吉林农业科学*, 1994(2):6-9.
- [11] 母秋华. 玉米生物技术育种的改革与研究[J]. *吉林农业科学*, 1988(3):15-18.
- [12] 孙敬三. 超甜玉米原生质体培养和植株再生[J]. *植物学报*, 1989, 31(2):909-915.
- [13] 曹俊梅, 窦秉德, 陈莉, 等. 玉米幼胚和成熟胚愈伤组织分化反应性比较[J]. *新疆农业大学学报*, 2005, 28(2):10-13.
- [14] 石太渊, 杨立国, 杜艳艳. 玉米体细胞培养中不同基因型和外植体的反应[J]. *国外农业-杂粮作物*, 1999, 19(5):11-14.