

玉米成熟胚愈伤组织诱导与继代培养的影响因素研究

赵锦慧¹, 陈 龙¹, 牛子敬²

(1. 周口师范学院 生命科学系, 河南 周口 466000; 2. 周口市种子技术服务站, 河南 周口 466000)

摘要: 以 28 个不同基因型的玉米成熟胚为试验材料, 初步研究了培养基种类、基因型、消毒时间、切胚方式、变温处理、蔗糖质量浓度、酸水解酪蛋白质量浓度、2,4-D 质量浓度等因素对愈伤组织诱导与继代的影响。结果表明: 培养基、酸水解酪蛋白质量浓度、2,4-D 质量浓度等因素对愈伤组织诱导率的影响不显著, 但对继代过程中愈伤组织质量影响较大; 其余 5 个因素对愈伤组织诱导率的影响显著, 并且对继代培养中的愈伤组织质量也有明显影响。最终选出了 3 个高培养力材料, 初步确定了比较适合玉米成熟胚愈伤组织诱导与继代的培养基。

关键词: 玉米; 成熟胚; 愈伤组织; 因素

中图分类号: S513 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2009)07-0038-05

Factors Influencing Induction and Subculture of Calli from Maize Mature Embryo

ZHAO Jin-hui¹, CHEN Long¹, NIU Zi-jing²

(1. Department of Life Sciences, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466000, China;

2. Zhoukou Seeds Service Station, Zhoukou 466000, China)

Abstract: Twenty-eight maize genotypes were selected as experimental materials to study the factors (culture medium type, genotype, disinfection time, cut pattern of embryo, temperature, sucrose concentration, CH concentration, 2,4-D concentration) affecting the induction and subculture of calli from mature embryo. The results showed that culture medium, CH concentration and 2,4-D concentration had no significant on callus induction, but had obvious effects on quality of calli in the course of subculture; Other five factors greatly affected the induction and subculture of calli. Three materials with high cultivating ability were selected, and the suitable media were initially established.

Key words: Maize; Mature embryo; Callus; Factor

近年来, 随着生物技术的不断完善和发展, 禾谷类作物的组织培养技术作为基础性工作广泛应用于各种突变体筛选和转基因研究。玉米作为我国一种重要的禾谷类粮食作物, 其组织和细胞培养研究受到人们的重视并取得了巨大的进步。在玉米的外植体培养中, 对幼胚培养的研究很多, 并已建立了比较完善的组织培养体系, 但对成熟胚的研究报道^[1-10]较少。玉米成熟胚组织培养因为存在诱导率低、愈伤组织质量不稳定等困难, 所以在成熟胚的利用上受到很大限制, 玉米成熟胚愈伤组织培养一旦成功,

以玉米组织培养为基础的研究将不再受玉米生长季节的限制, 从而加快工作进程。本试验针对影响玉米成熟胚愈伤组织诱导和继代培养的一些因素进行初步研究, 以期筛选出高培养力材料及确定比较适合成熟胚培养的培养基。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为齐 319(1)、郑 22(2)、昌 7-2(3)、3168(4)、8722(5)、87-1(6)、黄 C(7)、郑 22×Hi(A

收稿日期: 2009-01-04

基金项目: 周口师范学院青年科研基金项目(zknuqn200721)

作者简介: 赵锦慧(1979-), 女, 河南周口人, 讲师, 硕士, 主要从事作物遗传育种研究。

×B) (8)等 8 个自交系和郑 22× Hi II A (9)、郑 22×综 31 (10)、郑 22×黄 C (11)、齐 319× Hi II A (12)、齐 319×87-1 (13)、齐 319× A188 (14)、8722× Hi II A (15)、8722× 郑 22 (16)、8722× R53 (17)、8722×综 31 (18)、87-1× 郑 22 (19)、87-1× Hi II A (20)、87-1×黄 C (21)、综 31×黄 C (22)、综 31× Hi II A (23)、综 3× 昌 7-2 (24)、综 3×许 178 (25)、3168× A188 (26)、Hi II A×黄 C (27)、昌 7-2×独 321 (28)等 20 个杂交组合, 由河南农业大学提供。表 1 中材料名称分别用序号 (1~28) 代表。

基本培养基: N₆、MN (MS 大量元素+MS 微量元素+N₆ 有机物)

基本诱导与继代培养基: N₆ (MN)+30g/L 蔗糖+2mg/L 2,4-D+500 mg/L 脯氨酸(Pro)+500 mg/L 酸水解酪蛋白(CH)+7.2 g/L 琼脂粉, pH5.8~6.0。

1.2 方法

成熟玉米种子→70%酒精消毒 30s→0.1%氯化汞消毒→无菌蒸馏水冲洗 5~6 次→无菌蒸馏水中浸泡 36h→在超净工作台上取成熟胚接种于诱导培养基上, 每 15~20d 继代一次(诱导与继代过程采用暗培养)。诱导培养 1 周后统计愈伤组织诱导率(出愈率=出愈胚数/接种胚数×100%), 不同处理下各个材料均统计 10 皿, 表中数据为 10 皿的平均数。试验数据采用计算机统计软件 SPSS (SPSS 10.0 for windows) 进行分析。

2 结果与分析

2.1 HgCl₂ 消毒时间对成熟胚污染率的影响

本试验采用 0.1% 的 HgCl₂, 设置长短不同的消毒时间对种子消毒, 在无菌水中浸泡 36h 后取胚接种到 N₆ 培养基, 3d 后调查胚污染情况(表 1), 从表 1 看出, 消毒时间在 5min 以上时, 胚无污染现象, 但 8min 以上时, 胚周围均有发黑现象, 消毒时间越长, 发黑症状越严重。HgCl₂ 是一种杀伤力很强的消毒剂, 消毒时间过长, 会对细胞产生毒害作用, 抑制细胞生长。对不同消毒时间下成熟胚的诱导与继代培养的观察表明, 消毒时间越长, 愈伤组织诱导率越低, 并且愈伤组织的质量很差, II 型愈伤组织很少, 消毒时间超过 17min 后, 供试 6 个材料除 1(齐 319)和 15(8722× Hi II A)有小部分能继代存活外, 其余 4 个材料继代 2 次均褐变死亡。因此, 综合污

染情况以及诱导与继代情况, 确定最适合的消毒时间为 5~7min。

表 1 不同 HgCl₂ 消毒时间下胚污染率 (%)

消毒时间 (min)	材料						备注
	1	4	2	15	11	10	
3	4	18	11	7	13	9	各材料胚部正常
5~7	0	0	0	0	0	0	各材料胚部正常
8~9	0	0	0	0	0	0	各材料胚轻微变黑
12	0	0	0	0	0	0	各材料胚发黑较明显
17~20	0	0	0	0	0	0	各材料胚严重变黑

2.2 切胚方式和培养基对成熟胚愈伤组织诱导与继代的影响

本试验设计了 4 种切胚方式: I 是将成熟胚完整的取出后放于诱导培养基上; II 是将胚取出后, 切去芽鞘和根鞘后放于诱导培养基上; III 是将切去芽鞘和根鞘的胚沿胚轴纵切为两部分; IV 是在 III 的基础上将每部分再横切一次, 最终分为四部分。不同培养基上不同切胚方式各个材料的愈伤组织诱导率统计结果见表 2。设变量 X 为诱导率, 变量 A 为不同切胚方式, 变量 B 为不同培养基, 进行双因素方差分析(表略)可知: 不同切胚方式愈伤组织诱导率的差异极其显著; 不同培养基愈伤组织诱导率差异不显著。由表 2 知, 4 种切胚方式中, II 切胚方式的平均诱导率最高, I 方式最低, 表明一定的损伤反而可以刺激愈伤组织的诱导; 相同的切胚方式下不同材料之间诱导率也不同, 其中材料 1(齐 319)和 26 (3168× A188)的诱导率最高, 在 III 切胚方式下均达到 90% 以上, 表明这 2 个材料比较容易诱导出愈伤组织。虽然 N₆ 和 MN 2 种培养基对愈伤组织诱导率的影响没有显著差异, 但材料 1 和 26 在 MN 培养基中的诱导率稍高, 其余 4 个材料在 N₆ 培养基中的诱导率较高; 继代过程中观察到材料 6(87-1)、7 (黄 C)、19(87-1× 郑 22)继代 2 次后均褐变死亡, 材料 1 和 26 在 MN 培养基中继代情况较好, 而材料 9(郑 22× Hi II A)在 N₆ 培养基中继代情况较好, 表明不同的材料适合的诱导和继代培养基有所不同。

2.3 变温处理对成熟胚愈伤组织诱导和继代的影响

本试验设计了 2 个处理。处理 1: 成熟玉米种子消毒后在无菌水中浸泡并保存在 4℃ 冰箱中, 36h 后将胚取出接种于诱导培养基上, 于 34℃ 高温中诱导 3d。处理 2: 成熟玉米种子消毒后置于常温 (25℃) 下浸泡, 36h 后取出, 于常温下诱导 3d。不

表 2 不同切胚方式和培养基下愈伤组织诱导率 (%)

培养基	切胚方式	材料						平均诱导率
		6	1	7	9	19	26	
N ₆	I	8.00	14.29	4.00	6.00	6.12	23.53	10.32
	II	67.35	82.35	30.61	37.25	34.69	86.00	56.38
	III	72.55	92.00	27.45	42.86	46.00	90.20	61.84
	IV	42.00	54.90	19.61	30.00	31.37	48.00	37.65
MN	I	6.00	21.57	7.84	9.80	8.00	26.53	13.29
	II	52.94	93.88	22.45	31.37	30.61	88.24	53.25
	III	69.39	90.00	32.00	46.00	41.67	96.00	62.51
	IV	54.00	60.78	18.00	26.53	30.00	54.00	40.55

同材料在 2 个处理下的出愈率见表 3。对 2 种处理进行 t 检验表明, 处理 1 和处理 2 的愈伤组织诱导率差异极显著, 在继代过程中观察到经变温处理的各个材料胚性愈伤组织数量增加。这可能由于变温刺激促进了成熟胚脱分化和胚性愈伤组织的形成。

表 3 不同处理下愈伤组织诱导率 (%)					
处理	材料				t 值
	21	27	22	23	
1	82.35	94	74	83.67	3.892*
2	40.38	67.35	39.22	60.00	

注: 培养基为 N₆, t_{0.01} = 3.707

2.4 基因型和蔗糖质量浓度对成熟胚愈伤组织诱导与继代的影响

本试验采用了 N₆ 和 MN 2 种基本培养基, 设定了 4 种蔗糖质量浓度: 10g/L、20g/L、30g/L、40g/L, 不同蔗糖浓度下各材料的诱导率见表 4。设

变量 X 为诱导率, 变量 A 为不同材料(不同基因型), 变量 B 为不同蔗糖浓度, 进行双因素方差分析(结果略)可知: 不同材料之间及不同蔗糖质量浓度之间愈伤组织诱导率差异都极显著。由表 4 知, 蔗糖质量浓度为 10g/L 时, 平均诱导率最低; 就不同材料而言, 最适的蔗糖质量浓度也有所不同; 虽然 2 种培养基对出愈率的影响差异不显著, 但材料在 MN 培养基中的出愈率较高。继代培养中观察到, 供试材料在蔗糖质量浓度为 10g/L 时, 愈伤组织黏软, 大部分褐变, 在蔗糖质量浓度为 40g/L 时, 愈伤组织大部分褐化; 材料 20(87-1×Hi II A)在蔗糖质量浓度为 30g/L 时, 愈伤组织长势良好, 其余 4 种材料在蔗糖质量浓度为 20g/L 时长势较好。由此认为, 在成熟胚愈伤组织的诱导与继代过程中, 蔗糖质量浓度以 20~30g/L 比较适宜。这与郭丽红等^[2] 研究结果基本一致。

表 4 不同基因型和蔗糖质量浓度下愈伤组织诱导率 (%)

培养基	蔗糖质量浓度 (g/L)	材料					平均诱导率
		5	3	20	24	16	
N ₆	0	16.33	22.00	64.81	46.00	37.25	37.28
	20	23.53	44.23	77.55	52.94	48.00	49.25
	30	20.41	34.62	82.69	52.08	53.06	48.57
	40	26.00	44.90	83.33	55.10	46.00	51.07
MN	10	27.08	28.00	50.98	39.58	42.86	37.70
	20	32.69	42.86	75.47	62.00	60.42	54.69
	30	38.78	39.58	82.98	70.21	57.45	57.80
	40	31.25	47.06	82.35	61.22	58.00	55.98

2.5 酸水解酪蛋白质量浓度对成熟胚愈伤组织诱导与继代的影响

本试验采用了 MN 基本培养基, 设定了 4 组 CH 质量浓度: 50mg/L、100mg/L、200mg/L、500mg/L, 不同浓度下各材料的诱导率见表 5。设变量 G 为 4 组不同的 CH 质量浓度, 变量 X 为不同浓度下诱导

率, 进行单因素方差分析表明(结果略), 4 组 CH 质量浓度之间的诱导率差异不显著。由表 5 知, CH 浓度为 50mg/L 时, 愈伤组织平均诱导率最低, 为 200mg/L 时平均诱导率最高, 不同材料最适合的 CH 浓度有差异。继代培养中观察到: 材料 1(齐 319)、13(齐 319×87-1)和 12(齐 319×Hi II A)

在CH浓度为100mg/L的培养基中长势较好,在其余浓度培养基中褐变严重,继代5次后,只有材料1能够维持愈伤组织的胚性,而材料13和12的胚性逐渐丧失。材料17(8722×R53)虽然出愈率很高,但继代培养中胚性愈伤组织很少,第2次继代就被淘汰,表明愈伤组织诱导率高低与继代培养中愈伤组织质量无明显的相关关系。材料25(综3×许

178)和20(87-1×HiIIA)在CH浓度为500mg/L的培养基中长势较好,但继代2~3次后,材料25因大部分褐变死亡而被淘汰。材料26(3168×A188)和8(郑22×Hi(A×B))在CH浓度为200mg/L的培养基中长势较好。结合诱导率与继代中的表现并从经济的角度考虑,CH浓度在100~200mg/L较合适。

表5 不同酸水解酪蛋白质量浓度下的诱导率 (%)

CH 浓度 (mg/L)	材料								平均诱导率
	1	17	26	25	13	12	20	8	
50	82.35	74.00	79.59	32.00	62.75	50.00	51.02	40.00	58.96
100	95.92	92.31	90.00	42.00	80.00	72.00	70.59	50.00	74.10
200	92.00	89.80	96.00	36.73	82.00	72.92	75.00	68.00	76.56
500	88.00	90.38	82.69	39.22	79.59	60.78	84.31	50.98	72.00

2.6 2,4-D 质量浓度对愈伤组织诱导与继代的影响

本试验采用了MN基本培养基,设定了5组2,4-D质量浓度:1mg/L、2mg/L、3mg/L、4mg/L、6mg/L,不同浓度下各材料的诱导率见表6。设变量G为5组不同的2,4-D质量浓度,变量X为不同浓度下诱导率,进行单因素方差分析(结果略),5组2,4-D质量浓度之间的诱导率差异不显著。由表6知,2,4-D浓度为2mg/L时平均诱导率最高,但不同材料最适合的2,4-D浓度有差别,材料26(3168×A188)、21(87-1×黄C)和2(郑22)在

2,4-D浓度为4mg/L时,诱导率较高;材料20(87-1×HiIIA)、14(齐319×A188)和28(昌7-2×独321)在2,4-D浓度为2mg/L时,诱导率较高;材料18(8722×综31)和7(黄C)在2,4-D浓度为3mg/L时,诱导率较高。继代培养中发现:材料28、7和2三个材料继代2次后,大部分褐变死亡,材料18继代3次后也大部分褐变死亡,其余的材料继代情况较好,2,4-D浓度为1mg/L和6mg/L时,8个材料的诱导率都较低,而且继代情况也很差。可以认为,诱导和继代中最适合的2,4-D浓度为2~4mg/L。

表6 不同2,4-D质量浓度下的诱导率 (%)

2,4-D 浓度 (mg/L)	材料								平均诱导率
	26	21	20	14	18	28	7	2	
1	75.00	48.00	70.59	62.00	34.00	28.00	2.00	60.00	47.45
2	82.98	74.00	78.85	72.55	46.94	45.10	4.08	75.51	60.00
3	86.00	81.25	58.00	68.00	50.00	42.00	7.84	78.43	58.94
4	92.16	81.63	46.94	58.00	41.18	30.61	4.00	92.00	55.81
6	78.43	58.00	40.38	46.94	24.00	18.00	6.12	65.31	42.15

3 小结

N6和MN2种基本培养基、酸水解酪蛋白质量浓度、2,4-D质量浓度等因素对愈伤组织诱导率的影响不显著,但对继代过程中愈伤组织质量影响较大;基因型、消毒时间、切胚方式、变温处理、蔗糖质量浓度等因素对愈伤组织诱导率的影响显著,并且对继代培养中的愈伤组织质量也有明显影响。

不同材料的培养力存在很大差异,本试验筛选出的高培养力材料是:齐319、3168×A188、87-1×HiIIA。初步确定的成熟胚愈伤组织诱导与继代比较适合的培养基是:MN+2~4mg/L 2,4-D+500mg/L 脯氨酸+100~200mg/L 酸水解酪蛋白+20~30g/L 蔗糖+7.2g/L 琼脂粉。

本试验只研究了单一因素在愈伤组织诱导与继代中的影响,在选用的28个材料中,部分材料诱导

率比较理想,但继代培养质量很差,所以如何在继代培养中综合调控各个影响因素是今后有待解决的问题。此外,成熟种子的贮藏时间和贮藏条件对愈伤组织诱导与继代的影响也有待研究。

参考文献:

- [1] A Furini, D C Jewell. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature and mature embryos of tropical and subtropical *Zea mays* L. genotypes[J] . *Maykica*, 1994, 39: 155—164
- [2] 郭丽红, 陈善娜, 龚明, 等. 玉米根尖和成熟胚的愈伤组织培养及悬浮系的建立[J] . *云南大学学报*, 1999, 21(2): 141—144
- [3] 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] . *国外农学: 杂粮作物*, 1999, 19(5): 11—14
- [4] 曹俊梅, 奚秉德, 李生强, 等. 基因型及生长调节物质对玉米成熟胚培养的影响[J] . *淮阴师范学院学报*, 2005, 4(2): 54—158
- [5] 曹俊梅, 奚秉德, 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
- [6] 陈莉, 奚秉德, 阮元元, 等. 甜玉米成熟胚的组织培养及其植株再生研究[J] . *江苏农业科学*, 2006(6): 75—78
- [7] 张立军, 赵成昊, 葛超. 玉米再生体系建立及其影响因素的研究[J] . *玉米科学*, 2008, 16(2): 77—79
- [8] 王世玉, 郑用琰, 刘亚, 等. 玉米成熟胚胚性愈伤组织的诱导、高频再生及转化的研究[J] . *作物学报*, 2008, 34(3): 423—428
- [9] 高武军, 胡楠, 魏开发, 等. 外源激素在玉米离体培养中的作用[J] . *河南农业科学*, 2007(1): 33—35
- [10] 赵元增, 茹振钢, 李淦. 小麦幼胚胚性愈伤组织诱导和再分化研究[J] . *河南农业科学*, 2006(2): 33—36
- [11] 黄彩霞, 刘荣厚, 蔡均猛, 等. 生物质热裂解生物油性质的研究进展[J] . *农机化研究*, 2007(11): 6—9
- [12] 刘荣厚. 生物质快速热裂解制取生物油技术的研究进展[J] . *沈阳农业大学学报*, 2007, 38(1): 3—7
- [13] 马振英, 王英, 王健. 秸秆处理技术的发展与启示[J] . *中国资源综合利用*, 2007, 25(7): 33—37
- [14] 汪俊锋, 常杰, 阴秀丽, 等. 生物质间接液化制洁净燃料二甲醚[J] . *太阳能学报*, 2005, 26(3): 413—418
- [15] 石磊, 赵由才, 柴晓利. 我国农作物秸秆的综合利用技术进展[J] . *中国沼气*, 2005, 23(2): 11—19
- [16] 侯方安, 陈海燕. 发展秸秆循环经济建设节约型新农村的对策[J] . *农机化研究*, 2006(11): 11—14
- [17] 黄洪雷. 加强农村环境保护建设和谐新农村[J] . *安徽农业大学学报: 社会科学版*, 2007, 16(2): 6—9
- [18] 农业部环境保护科研监测所. 利用秸秆氮化饲料养牛减少甲烷排放的潜力[J] . *农业环境保护*, 1995, 14(3): 117—119
- [19] 李淑秀. 几种农业秸秆再利用技术的比较[J] . *安徽农学通报*, 2007, 13(9): 164—165
- [20] 杨建队. 农作物秸秆综合利用探讨[J] . *农业技术与装备*, 2007(6): 40—41
- [21] 孟庆福, 黄明智, 董德军. 综合利用秸秆资源发展农村循环经济[J] . *农村牧区机械化*, 2007(3): 26—27
- [22] 国家环保总局译. 21 世纪议程[M] . 北京: 中国环境科学出版社, 1993: 297
- [23] 国家环保总局. 关于加强农村环境保护工作的意见[J] . *环境教育*, 2007(6): 21—24

(上接第 26 页)