

文章编号 :1003-8701(2009)03-0003-02

玉米愈伤组织诱导影响因素的研究

刘小红

(西华师范大学生命科学学院,四川 南充 637002)

摘 要 :选用了 6 种培养基,分析了 7 种优良玉米自交系的愈伤组织诱导情况。结果表明,黄早 4 的愈伤组织诱导频率较低,不适合作为转基因研究的受体,而旱 21、18-599 红、8103、先早 17、501 和吉 853 的愈伤组织诱导频率较高,且生长状态也很好,是用于遗传转化的理想材料。此外,LM6 是本次试验优良的培养基,除黄早 4 外,在所有材料中都有较高的愈伤组织诱导频率和较好的愈伤组织表型。

关键词 :玉米 ;愈伤组织 ;基因型 ;培养基配方

中图分类号 :S513

文献标识码 :A

Studies on the Influence Factors in Callus Induction of Maize

LIU Xiao- hong

(College of Life Sciences, China West Normal University of Sichuan Province, Nanchong 637002, China)

Abstract: In this study, six media were used to evaluate seven elite maize inbred lines on their callus-induction characteristics. The results showed that ‘Huangzao 4’ had the lowest callus induction rate and was unsuitable for genetic transformation. But other materials, including ‘Han 21’, ‘18-599 (red)’, ‘8103’, ‘Xianzao 17’, ‘501’ and ‘Ji 853’, had high callus induction frequency and elite callus phenotypes and could be used for transgenic researches. Moreover, LM6 had been proved the best callus initiation media, because all the experimental genotypes but ‘Huangzao 4’ showed high callus induction frequency and good phenotypes.

Key words: Maize (*Zea mays* L.); Callus; Genotype; Media compositions.

玉米(*Zea mays* L.)是世界上最重要的粮食作物之一,它的农艺性状可以通过优良基因的导入得到有效改良,但遗传转化的成功依赖于高效再生体系的建立,愈伤组织的诱导是建立这一体系的基础和前提。目前,多种形式的玉米外植体都已成功诱导出愈伤组织,如未成熟合子胚,成熟合子胚及叶片等^[1-3]。但是,以未成熟合子胚作为外植体具有实验操作简单、诱导频率高等优点,因而在玉米遗传转化研究中仍然是最常用的^[4]。

许多研究表明,基因型和培养基组成是影响从未成熟合子胚诱导出愈伤组织的两个重要因素^[5-6],如 Hodges 等发现 A188 的再生能力明显高于其他自交系,而且它的杂交后代也表现出较高的愈

伤组织诱导频率^[7]。在玉米组织培养方面,N6、B5、MS、8114 及 RTU 是几种经典的基本培养基,目前实验中用到的培养基大多由这几种培养基改良而成^[8-10]。但是任何一种培养基都有自己的适用范围,因此,探索出一种适用于特定玉米材料的优良培养基配方是非常有意义的。

在本试验中,设计了 6 种培养基用于 7 个优良自交系的未成熟合子胚愈伤组织诱导研究,目的是了解这几个材料的愈伤组织诱导特性,获得一种理想的培养基配方。

1 材料与方法

1.1 供试材料

玉米优良自交系 18-599 红由四川农业大学玉米研究所提供,黄早 4、旱 21、8103、先早 17、501 和吉 853 由北京农林科学院北京农业生物技术研究中心提供。

收稿日期 :2009-02-23

基金项目 :四川省教育厅资助科研项目(08ZA020)

作者简介 :刘小红(1975-),男,副教授,主要从事玉米遗传育种研究。

1.2 培养基配方

本实验中，共设计了 6 种培养基用于玉米愈

表 1 诱导培养基及其成分

培养基	成分										mg/L
	大量无机元素	微量无机元素	大量有机元素	2,4- D	脯氨酸	水解酪蛋白	肌醇	硝酸银	蔗糖	植物凝胶	
LM1	N6	N6	N6	2	690	500	100	10	30 000	2 600	
LM2	N6	B5	B5	2	690	500	100	10	30 000	2 600	
LM3	MS	MS	MS	2	690	500	100	10	30 000	2 600	
LM4	8114	B5	B5	2	690	500	100	10	30 000	2 600	
LM5	MS	B5	B5	2	690	500	100	10	30 000	2 600	
LM6	N6	B5	RTU	2	690	500	100	10	30 000	2 600	

伤组织诱导研究(表 1)。

1.3 玉米未成熟合子胚的接种及愈伤组织诱导

田间播种 7 个玉米自交系,自交授粉后 10~12 d 摘取雌穗,去掉苞叶后置于盛有 70%浓度的酒精烧杯中消毒处理 10 min。在操净工作台上先用无菌刀片削去一层玉米胚乳 (不能伤及未成熟合子胚),再用无菌镊子挑取直径大小为 1~2 mm 的未成熟合子胚接种于无菌诱导培养基上,置于 28℃ 黑暗条件下诱导愈伤组织。

1.4 数据统计分析

7 种玉米基因型材料用 6 种诱导培养基进行愈伤组织诱导培养,每种处理接种 10 皿,每皿 15 个未成熟合子胚。1 个月 后,计算每种处理的愈伤组织诱导频率,用 SPSS11.5 软件作方差分析和多重比较;观察愈伤组织形态,以确定较理想的诱导培养基配方。

2 结果与分析

2.1 基因型对愈伤组织诱导频率的影响

表 2 不同玉米材料在不同培养基上的愈伤组织诱导频率 %

基因型	培养基					
	LM1	LM2	LM3	LM4	LM5	LM6
黄早 4	9.5	8.9	7.3	7.5	8.6	10.0
旱 21	100	100	100	100	100	100
8103	60.3	57.4	59.7	49.8	52.1	65.0
先早 17	74.7	69.3	57.8	61.9	67.3	76.6
18- 599 红	71.1	77.0	73.9	75.2	76.8	71.5
501	69.7	70.3	53.3	60.9	57.1	71.1
冀 853	91.1	73.4	70.5	60.9	100	90.3
平均值	68.1	65.2	60.4	59.5	66.0	69.2

表 3 基因型处理愈伤组织诱导频率的方差分析

数据来源(表 1)	自由度	平方和	均方	F 值	显著 F 值
基因型处理间	6	2.901	0.484	94.667**	F _{0.01(6,35)} =3.37
误差	35	0.179	0.05		
总计	41	3.080			

7 种基因型材料在不同诱导培养基上诱导的结果如表 2。对表 2 数据作方差分析,结果表明愈伤组织诱导频率在不同基因型间的差异达到极显著水平(表 3),多重比较的结果如表 4 所示。旱 21 在不同培养基上的诱导频率高达 100%, 极显著

高于其他基因型材料;冀 853、18- 599 红、先早 17、501 和 8103 的平均愈伤组织诱导频率介于 57.4%~81.0%;而黄早 4 的愈伤组织诱导频率最低,平均诱导率仅为 8.6%,极显著低于其他基因型材料。此试验的结果表明基因型将显著影响愈伤组织诱导频率。

表 4 基因型处理差异的多重比较

基因型	平均值	差异显著性	
		0.01	0.05
旱 21	100.0	A	a
冀 853	81.0	B	b
18- 599 红	74.3	BC	bc
先早 17	67.9	C	c
501	63.7	C	cd
8103	57.4	C	d
黄早 4	8.6	D	e

2.2 培养基配方对愈伤组织诱导的影响

表 2 的数据显示,这 6 种培养基在 7 个基因型材料上的平均愈伤组织诱导频率由高到低依次为 LM6、LM1、LM5、LM2、LM3 和 LM4,但是这种差异没有达到统计上的显著水平。

实验发现,在 LM2、LM3、LM4 及 LM5 培养基上诱导出的愈伤组织呈现出黄褐色、水渍状,生长缓慢,甚至在部分愈伤组织上长出了白色的根。但是在 LM1 和 LM6 培养上诱导出的愈伤组织,具有典型的 II 型愈伤组织特征,即表现为淡黄色、松脆状和生长较快。比较 LM1 和 LM6 两种培养基成分,其差异体现在微量元素和有机元素(表 1)。此试验结果表明,培养基的选择在一定程度上对于提高愈伤组织的诱导频率是有效的,但更主要的是影响愈伤组织的质量,LM1 和 LM6 都能从玉米未成熟合子胚诱导出理想的愈伤组织,但 LM6 的诱导频率略高于 LM1。

3 讨论与结论

玉米在作为转基因受体材料时,其外植体可以是未成熟合子胚、成熟合子胚、花粉及叶组织等^[1-3],而应用较多的仍然为未成熟合子胚^[4]。实验发现用于愈伤组织诱导的未成熟合子胚(下转第 7 页)

群防群治为辅的原则。

A. 叶瘟 :每年 7 月中旬用富士一号 40%乳油或可湿性粉剂,1 500 g/hm²,兑水 300 kg 喷雾。

B. 稻颈瘟 :抽穗前 5~7 d 用富士一号 40%乳油或可湿性粉剂 1 500 g/hm²,兑水 300 kg 喷雾,稻瘟病发生严重时齐穗期再喷一次。

④稻曲病 :发生稻曲病的地块,在抽穗前 5~7 d,用铜高尚乳油喷雾 ;或者每公顷用 1 875 gDT 杀菌剂兑水 600 kg 喷雾。

5 主要核心措施(各区通用)

5.1 关键环节

浸种时一定要严格正确操作,严防恶苗病 ;育苗控制播种量在 250~300 g/m² 催芽种子 ;本田施肥量适当多、适当早 ;增加磷、钾、硅肥用量 ;加强灌水管理水平,后期要适当烤田,注重后期地下根系发育 ;及时注意防治二化螟虫、水象甲、稻瘟病和冷害。

5.2 重大病虫害及自然灾害应对策略

5.2.1 稻瘟病

吉林省每年均不同程度地发生叶瘟、穗颈瘟、粒瘟危害,针对稻瘟病的发生,采取如下措施 :

(上接第 4 页)的直径大小应该介于 1~2 mm,太小很难诱导出愈伤组织,太大只能诱导出质地较硬的乳白色的Ⅲ型愈伤组织。

基因型是影响愈伤组织诱导的一个重要因素^[4-5],不同玉米材料在不同培养基中的愈伤组织诱导状况存在明显差异,对于黄早 4,不管用哪种培养基,其愈伤组织诱导率均很低 ;而对于旱 21 这一优良材料,其愈伤组织诱导频率在所有的培养基中都高达 100%。由此表明,基因型是影响玉米愈伤组织诱导的重要因素,黄早 4 不适合作为遗传转化的受体,其他 6 个材料的愈伤组织诱导频率都高于 50%,是较理想的受体材料。

培养基配方是影响玉米愈伤组织诱导的另一个重要因素^[6,9],通过设计的 6 种培养基应用于 7 个基因型材料的愈伤组织诱导分析,筛选出了一种较好的培养基 LM6,在试验材料中,LM6 培养基比经典的 N6 培养基表现出更高的平均愈伤组织诱导频率,除了黄早 4 外,所有材料的愈伤组织诱导频率都高于 70%,该实验结果可为其他玉米材料建立体外再生体系提供参考依据。

参考文献 :

[1] Aulinger IE, Peter SO, Schmid JE, et al. Gametic embryos of maize as a target for biolistic transformation: comparison to immature

A. 农业防治 :及时处理病谷、病稻草,以减少菌源 ;施足基肥,分次追肥,避免过量过迟施用 N 肥,适当增加磷钾肥,灌水以湿润灌溉为主,促进稻株健壮,增强抗病力。

B. 药剂防治 :以预防为主,群防群治,分别在 7 月中旬左右,抽穗前 5~7 d 和齐穗期用富士一号或铜高尚预防稻瘟病。

5.2.2 冷害防止应对策略

①选用抗冷性强的品种 ;②培育壮秧,确保安全齐穗期 ;③深水护胎,在减数分裂期深灌水到 15 cm 防止低温 ;④增施磷肥,控制氮肥用量。冷害年份减少氮肥施用量 20%~30% ;⑤拔烟增温驱寒措施。

参考文献:

[1] 陈温福 . 日本水稻超高产育种新进展 [J] . 中国农学通报, 1991,7(2) :40-48 .
[2] 杨守仁,张龙步 . 水稻超高产育种的理论和方法[J] . 中国水稻科学,1996,10(2) :115-120 .
[3] 黄耀祥 . 水稻超高产育种研究[J] . 作物杂志,1990(4) :1-2 .
[4] 熊振民 . 我国水稻超高产品种选育的理论与实践[J] . 水稻文摘,1992,11(4) :1-8 .
zygotice mbryos[J]. Plant Cell Rep, 2003, 21(6):585-591.
[2] Ahmadabadi M, Ruf S, Bock R. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (Zea mays L.) [J]. Transgenic Res, 2007, 16(4):437-448.
[3] Huang XQ, Wei ZM. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (Zea Mays L.) [J]. Plant Cell Rep, 2004, 22(11):793-800.
[4] Binott JJ, Songa JM, Ininda J, et al. Plant regeneration from immature embryos of Kenyan maize inbred lines and their respective single cross hybrids through somatic embryogenesis [J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(8):981-987.
[5] Frame BR, McMurray JM, Fonger TM, et al. Improved Agrobacterium-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts [J]. Plant Cell Rep, 2006, 25(10):1024-1034.
[6] 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) :77-79,87.
[7] Hodges TK, Kamo KK, Imbrie CW, et al. Genotype Specificity of Somatic Embryogenesis and Regeneration in Maize [J]. Bio/Technology, 1986(4) :219-223 .
[8] 李慧芬, 李芬, 宋桂茹, 等. 玉米优良自交系 E28 愈伤组织继代及再生[J]. 吉林农业大学学报, 1999, 21(2):10-12.
[9] Sairam RV, Parani M, Franklin G, Lifeng Z, et al. Shoot meristem: an ideal explant for Zea mays L. [J]. transformation. Genome, 2003, 46 (2):323-329 .
[10] 母贵琴, 潘光堂, 刘玉贞, 等. 玉米基因型与幼胚培养胚性愈伤组织发生能力的初步研究[J]. 四川农业大学学报, 2003, 21 (1):13-17 .