

[文章编号] 1005-0906(2001)03-0026-03

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

王 雷,张 君,于彦春,王丕武*

(吉林农业大学生物技术中心,长春 130118)

Influence of Embryo Age and 2,4-D Concentration on Callus Induction Ratios in Inbred Lines of Maize

WANG Lei, ZHANG Jun, et al.

(Biotechnology Center of Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The initiation of maize immature embryo is more difficult than other crops because it is influenced by more factors. Besides genotype and physical conditions, the concentration of 2,4-D and embryo age are important factors. In this paper, we analyzed their influence on the process of initiation, and concluded the proper concentration of 2,4-D and the proper embryo ages of inbred lines of Ji853, Ji842, 4112.

Key words: Immature embryo; Tissue culture; Embryo age; Concentration of 2,4-d.

[摘 要] 玉米幼胚愈伤组织的诱导由于受多种因素的影响使其相对于其它禾本科植物而言较为困难,其中胚龄和 2,4-D 浓度是影响玉米幼胚愈伤组织诱导的两个较为主要的因素。本文分析了胚龄和 2,4-D 浓度对玉米幼胚愈伤组织诱导率的影响,提出了玉米幼胚组织培养的最适的胚龄因自交系而异,对于吉 853, 吉 842 两种自交系胚龄以 11~13 d 为宜,而 4112 自交系则以 12~14 d 为宜;3 种自交系诱导的适宜 2,4-D 浓度都为 1 mg/L,自交系间差异不大。为进一步研究能长期继代的玉米幼胚胚性愈伤组织的诱导,建立胚性愈伤组织的培养体系提供了参考依据。

[关键词] 玉米幼胚;组织培养;胚龄;2,4-D 浓度

[中图分类号] S 513;S 336.1

[文献标识码] A

玉米是我国重要的农作物之一,玉米产业对发展我国农业经济具有重要的战略意义,而我国玉米品种的品质和产量与美国等发达国家相比还有一定的差距。随着我国加入 WTO 的日程越来越近,加速对玉米的品质和产量进行改良,使我国的玉米产业能够经受世界经济浪潮的冲击已迫在眉睫。但常规遗传育种技术已不能满足这种急迫的需要,采用现代生物技术特别是基因工程技术对玉米进行遗传改

良势在必行。利用基因工程技术对玉米的品种和产量进行遗传改良首先必须建立适宜的组织培养体系,但由于玉米组织培养的影响因素较为复杂,使玉米的愈伤组织诱导与其它禾本科植物相比较为困难^[3]。现在一般采用玉米的幼胚^[1,2,3,4,5,6]和芽尖为外植体进行诱导,而玉米幼胚愈伤组织的诱导受其基因型及胚龄等因素的影响。对我国东北地区骨干玉米自交系的幼胚愈伤组织诱导研究的报道还较少。东北地区为我国玉米的主产区,开展对该区玉米自交系以幼胚为外植体的愈伤组织诱导的研究,从而建立具有胚性的愈伤组织培养体系具有重要的理论和实践意义。

本文探讨了胚龄和 2,4-D 浓度对东北骨干玉米自交系 853,842,4112 幼胚愈伤组织诱导率的影响,

[收稿日期] 2000-12-25

[作者简介] 王 雷,(1976-),男,吉林农业大学 99 级在读硕士生,现在该校生物中心从事玉米遗传转化研究。

[基金项目] “国家转基因植物中试与产业化基地建设”专项基金 (J99-13-001)

* 本文通讯作者: Author for correspondence

观察了胚龄和幼胚大小的关系,分析了愈伤组织诱导率与胚龄和 2,4-D 浓度之间的关系,为进一步研究能长期继代培养的玉米幼胚胚性愈伤组织的诱导,建立胚性愈伤组织的培养体系提供了参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为吉林省玉米骨干自交系吉 853、吉 842 和 4112,1999 年种于吉林农大科学实验站。

1.2 方法

供试材料种植在吉林农业大学科学实验站的试验地内。人工套袋授粉后 10 d,11 d,12 d,13 d,14 d 取自交系果穗,在无菌条件下剥取幼胚,进行培养。

诱导培养基为 MS + 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L 2,4-D + pro 700 mg/L + AgNO₃ 50 mg/L

继代培养基为 MS + 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L 2,4-D + pro 700 mg/L

培养条件:26 ± 1℃,散射光培养。

接种时幼胚盾片朝上,继代时挑选不发粘、不软、颜色不发黑褐色的质地坚实、呈颗粒状、生长旺盛的愈伤组织继代^[2]。

2 结果与分析

2.1 胚龄对幼胚愈伤组织诱导率的影响

本文分别取胚龄为 10 ~ 14 d 的幼胚,幼胚大小为幼胚长轴的长度,用刻度尺量取 10 个幼胚的长轴长度,取其平均值。将幼胚接种到 MS + 1 mg/L 2,4-D + 50 mg/L AgNO₃ 的培养基上,3 ~ 5 d 时除去幼胚长出的小芽,10 天后继代到 MS + 1 mg/L 2,4-D 培养基上。结果见表 1 和表 2。

国内有学者认为幼胚的接种时期为幼胚诱导的关键因素之一,其主要考虑胚龄和幼胚大小两个因素,胚龄指果穗的花丝授粉后的天数,幼胚大小指幼胚长轴的长度,胚龄和幼胚大小有一定的相关性。在山东地区的 7 月份幼胚胚龄为 8 ~ 9 d,幼胚大小在 1.2 ~ 1.5 mm 之间时接种最为适宜,1 ~ 2 mm 都可以用,幼胚大小主要考虑技术的可操作性和培养性状^[3]。在东北地区的 7、8 月份胚龄一般在 11 d 以上能达到这一大小。胚龄对愈伤组织诱导率的影响与幼胚的大小有关,不同胚龄的幼胚大小不同,且自交系间有差异。

表 1 853、842 和 4112 胚龄与幼胚大小的关系

胚龄(d)	基因型	幼胚长度(mm)
10	853	0.76
	842	0.91
	4112	0.77
11	853	0.93
	842	1.07
	4112	0.89
12	853	1.14
	842	1.21
	4112	1.08
13	853	1.26
	842	1.50
	4112	1.24
14	853	1.58
	842	2.04
	4112	1.53

从表 1 可以看出,对吉 842 自交系,胚龄为 12 ~ 13 d 时可以达到这一大小;对 4112 自交系则需 13 ~ 14 d,表明基因型不同,相同胚龄的幼胚大小是有差异的。

不同胚龄的幼胚愈伤组织诱导率也不相同(见表 2)。从表 2 可以看出,在 2,4-D 浓度都为 1 mg/L 时,853、842 自交系幼胚的胚龄为 12 d 时愈伤组织诱导率最高,分别达到 85.1%,91.7%;而 4112 自交系在 13 d 时愈伤组织诱导率最高,达到 86.5%。综合幼胚大小和胚龄两个因素,853、842 自交系最适接种时间为胚龄在 12 d 左右,而 4112 自交系为 13 d。

不同胚龄的幼胚愈伤组织诱导率也不相同(见表 2)。从表 2 可以看出,在 2,4-D 浓度都为 1 mg/L 时,853、842 自交系在 12 d 时愈伤组织诱导率最高,分别达到 85.1%,91.7%;而 4112 自交系在 13 d 时愈伤组织诱导率最高,达到 86.5%。综合幼胚大小和胚龄两个因素,853、842 自交系最适接种时期为授粉后 12 d 左右,而 4112 自交系为 13 d。

表 2 吉 853、吉 842 和 4112 胚龄与愈伤组织诱导率的关系

胚龄(d)	基因型	接胚数	出愈数	出愈率(%)
10	853	24	17	70.8
	842	24	15	62.5
	4112	14	7	50.0
11	853	20	16	80.0
	842	19	11	63.2
	4112	15	12	80.0
12	853	24	22	91.7
	842	27	23	85.1
	4112	55	46	83.5
13	853	25	20	80.0
	842	32	19	51.3
	4112	37	32	86.5
14	853	30	16	53.3
	842	26	19	73.1
	4112	28	21	75.0

2.2 2,4-D 浓度对幼胚愈伤组织诱导率的影响

取胚龄为 12 d 的吉 853 和吉 842, 13 d 的 4112 自交系幼胚分别接种到:

MS + 1 mg/L 2, 4-D + pro 700 mg/L + AgNO₃ 50 mg/L;

MS + 2 mg/L 2, 4-D + pro 700 mg/L + AgNO₃ 50 mg/L;

MS + 3 mg/L 2, 4-D + pro 700 mg/L + AgNO₃ 50 mg/L。

三种诱导培养基上诱导, 15 d 后观察出愈情况。愈伤组织数以 I 型愈伤组织数计^[7]。

2,4-D(二氯苯氧乙酸)对于愈伤组织的诱导和生长非常有效, 在组织培养中一般常用其作为培养基中的生长激素。中国科学院上海植物生理研究所卫志明研究员认为 2,4-D 虽然可以起到诱导的作用, 但其对外植体及愈伤组织的伤害作用较大^[5], 故诱导时所采取的浓度不宜过大, 以减少组织培养中的无性系变异。山东大学张举仁教授认为在齐鲁地区采用的玉米自交系愈伤组织诱导时以 1~2 mg/L 2,4-D 为宜^[3]。

表 3 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导率的影响

2,4-D 浓度(mg/L)	基因型	接种数	出愈数	诱导率(%)
1	853	30	26	86.6
	842	30	26	86.6
	4112	30	24	80.0
	853	30	30	100.0
2	842	30	28	93.3
	4112	30	26	86.6
	853	30	19	63.3
3	842	30	23	76.6
	4112	30	17	56.6

由表 3 可以看出 2,4-D 浓度在 1~2 mg/L 时 853, 842 和 4112 三种自交系的愈伤组织诱导率都较高, 最低为 80%, 最高则达到 100%。表 3 的这一结果与山东大学张举仁教授在山东地区常用骨干自交系上所做的实验结果一致; 而在加有 3 mg/L 2,4-D

的 MS 培养基上两者的愈伤组织诱导率反而都有所下降, 这一点与卫志明研究员的观点相符合。

3 讨 论

(1) 853, 842 和 4112 自交系的接种时期。综合幼胚大小和胚龄两种因素对愈伤组织诱导率的影响效果, 对 853, 842 自交系而言, 接种幼胚的最适时间为授粉后 12 d; 而 4112 自交系的最适接种幼胚时间为授粉后 13 d。另外, 考虑到植株生理状态对幼胚的影响, 853, 842 自交系取幼胚的时间应在 11~13 d 之间为宜, 而 4112 自交系取幼胚的时间应在 12~14 d 之间为宜。

(2) 2,4-D 浓度。对 842 和 4112 两种自交系 2,4-D 浓度在 2 mg/L 时, 愈伤组织诱导率都达到最大值, 842 的愈伤组织诱导率为 93.3%, 4112 的愈伤组织诱导率为 86.6%; 但由于 2,4-D 对于愈伤组织有一定的伤害作用, 建议在对幼胚诱导愈伤组织时采用 1 mg/L 的浓度。

【参考文献】

- [1] 李世润, 张举仁, 陈惠民. 玉米胚性愈伤组织诱导和植株再生的研究[J]. 山东大学学报(自然版), 1990(25): 116-124.
- [2] 张举仁, 高树芳, 于家驹, 王兴安. 玉米耐盐愈伤组织的筛选及植株再生. 植物学报, 1991, 33(11): 887-893.
- [3] 李慧芬, 李 芬, 等. 玉米优良自交系 E-28 愈伤组织继代及再生. 吉林农业大学学报, 1999, 21(2): 10-12.
- [4] 向太和, 杨剑波, 吴家道. 水稻、玉米胚性悬浮细胞系的有效建立. 安徽农业科学, 1996, 24(1): 1-3, 8.
- [5] 黄 璐, 卫志明. 不同基因型玉米的再生能力和胚性与非胚性愈伤组织 DNA 的差异. 植物生理学报, 1999, 25(4): 332-338.
- [6] Fromm, M. E., et al. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation[J]. Nature. 1986, 319(27): 791-793.
- [7] Armstrong c L., et al. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline[J]. planta, 1985 (164): 207-214.