

文章编号: 1005-0906(2004)01-0111-03

糖液预处理对提高玉米花药诱导率的研究

付迎军,任海祥,白艳凤,王延峰,孙殷会,黄艳胜,邵广忠,孙广权

(黑龙江省农科院牡丹江农业科学研究所,黑龙江 牡丹江 157041)

摘要: 对不同材料用蔗糖溶液预处理花药,使之产生质壁分离,再接种于不同蔗糖浓度的培养基上。探讨了玉米花药胚状体(愈伤组织)产生情况,指出胚状体(愈伤组织)与基因型关系很大,用 25%浓度蔗糖预处理花药 6~7 min 及培养基中加 15%浓度蔗糖诱导频率最高。

关键词: 玉米;花药培养;愈伤组织;胚状体;蔗糖;诱导频率

中图分类号: S513.035.2

文献标识码: A

Study on Increasing Anther Culture Induction Frequency of Soaking Maize Anther with Sucrose

FU Ying-jun, REN Hai-xiang, BAI Yan-feng, WANG Yan-feng, et al.

(Sciences Research Institute of Mudanjiang Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Mudanjiang 157041, China)

Abstract: The paper discussed the effects on soaking anther of different materials and liquor of different concentration first to make cytoplasm break away from cell wall, then inoculating the anther in medium of different concentration sucrose. Results showed that it is different about the embryo (callus) induction frequency of different materials. The induction frequency of soaking anther with media of 25% sucrose for 6~7 minute and inoculating 15% sucrose medium is the highest.

Key words: Maize; Anther culture; Callus; Embryo; Sucrose; Induction frequency

近年来,利用花药育种已在烟草、水稻和小麦等作物中应用;玉米花药培养虽有进展,但因为玉米的花药培养频率较低,花粉植株基因型之间差异大,难以获得足够的选择群体而严重限制了该技术在育种实践中的应用。因此,大幅度提高玉米花药培养效率,获得大量的加倍纯系,是目前玉米花药培养及单倍体育种中亟待解决的问题。为提高玉米花药培养的诱导频率,于 2002 年和 2003 年在玉米组培中采用高浓度 25%蔗糖溶液预处理花药,产生质壁分离再行接种,使之产生较高的诱导频率,并从理论上进行初步探讨分析。

1 材料和方法

1.1 诱导材料

收稿日期: 2004-01-06

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(C0221)

作者简介: 付迎军(1966-),女,硕士,黑龙江省农科院牡丹江农科所玉米研究室,从事玉米组培研究。Tel:0453-6402578
13836368772

共选取 23 种基因型的玉米作为诱导材料,杂交种分别为牡单 9、嫩单 8、克单 8、哲单 37、东农 248、龙单 13、白单 9、牡单 10、四单 19、T13×白 69、本育 9、LD984、庆试 4 号、育单 003、LD6006、杜蒙 1 号、LD66、LD9013、LD999 和 LD9002,自交系为单倍体 69、黄早四和合 344。

1.2 培养基

诱导培养基: Y2301、Y2302、Y2312 和 Y2311,以上培养基在 121℃高压锅内灭菌 25 min。

1.3 材料处理与方法

1.3.1 花药予处理方法

以杂交种 T13×白 69 为材料,先用显微镜和 25%蔗糖溶液(加少许 I-Ik 溶液)检查花药,找出发育适期花粉质壁分离所需浸泡的时间,把配好的蔗糖溶液预先高压灭菌,之后再在无茵条件下统一浸泡花药,经 6~8 min 左右,迅速接种于各种培养基中。每个处理 20 瓶,每瓶接种 50~60 枚花药,培养于恒温 28℃、相对湿度 80%的无光照条件下,一个月后陆续产生愈伤组织(胚状体)。

1.3.2 诱导愈伤组织(胚状体)

用 Y2301、Y2302、Y2312 和 Y2311 为基本培养基,将蔗糖浓度分别调整为 6%、10%、12.5%、15%、17.5%和 20%,配制成含糖量不同的 6 种培养基,以同雄穗混合花药,分别接种进行常规花药培养。

2 结果与分析

2.1 不同基因型之间诱导频率的差异

表 1 不同基因型的诱导频率

材料	接种花药数	产生愈伤组织数(胚状体)	诱导频率(%)	位次
牡单 9	680	32	4.70	4
嫩单 8	520	14	2.69	
克单 8	720	25	3.47	
哲单 37	880	32	3.63	
东农 248	760	26	3.42	
龙单 13	200	4	2.00	
白单 9	360	0	0.00	
牡单 10	880	44	5.00	2
四单 19	360	8	2.22	
T13×白 69	200	16	8.00	1
本育 9	800	15	1.87	
LD984	880	20	2.27	

材料	接种花药数	产生愈伤组织数(胚状体)	诱导频率(%)	位次
庆试 4	800	17	2.13	
育单 003	320	0	0.00	
LD6006	400	19	4.75	3
杜蒙 1 号	400	8	2.00	
LD66	600	14	2.33	
LD9013	880	35	3.98	5
LD999	920	17	1.85	
LD9002	280	3	1.07	
单倍体 69	160	0	0.00	
黄早四	80	0	0.00	
合 344	200	0	0.00	

注:诱导培养基 y2311、蔗糖浓度 15%。

2.2 高浓度 25%蔗糖浸泡对诱导频率的效应

用 25%蔗糖溶液浸泡 6~8 min 的花药和不经浸泡的花药分别投入到含糖量均为 15%的培养基 Y2301、Y2302、Y2311 和 Y2312 中(表 2),其经浸泡的平均诱导频率分别为 6.43%、2.69%、5.77%和 8.33%,比不用蔗糖浸泡的诱导频率分别高出 3.93%、0.19%、0.77%和 1.60%,说明用蔗糖预处理的花药诱导频率提高 1~2 倍,但在繁殖过程中易污染。

2.3 蔗糖浓度对花药培养的效应

表 2 高浓度浸泡诱导频率

培养基	接种花药数		胚状体数		诱导频率(%)	
	有蔗糖浸泡	无蔗糖浸泡	有蔗糖浸泡	无蔗糖浸泡	有蔗糖浸泡	无蔗糖浸泡
y2301	280	280	18	7	6.43	2.50
y2302	520	520	14	13	2.69	2.50
y2311	260	220	15	211	5.77	5.00
y2312	120	180	10	8	8.33	6.67

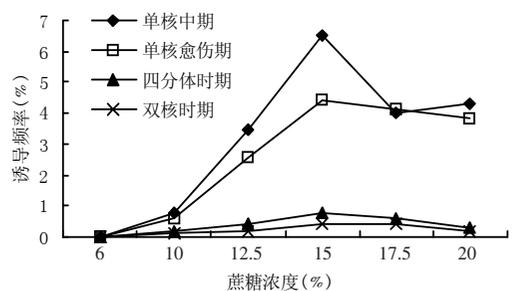
为了找出最适宜花药培养的蔗糖浓度,我们实验了一系列蔗糖浓度(6%、10%、12.5%、15%、17.5%和 20%)对花药培养的效应。

2.3.1 花粉发育时期和蔗糖浓度对愈伤组织(胚状体)诱导频率的影响

图 1 结果表明,当蔗糖浓度为 6%时,所列花药均未启动;当蔗糖浓度为 10%、12.5%、15%和 20%

不同基因型的玉米,其花药培养的诱导频率差异非常明显。结果如表 1 所示,其中 85%的材料均能产生胚状体或愈伤组织,而以杂交种 T13×白 69、牡单 10 和 LD6006 诱导频率最高,分别为 8.00%、5.00%和 4.75%,且以 T13×白 69 产生愈伤组织最多,其余均产生各种形状的胚状体;自交系黄早四和合 344 愈伤组织(胚状体)诱导率均为 0。总的来说,杂交种的诱导频率要比纯系高。

的情况下,以单核中期诱导频率最高,其次是单核靠边期;在蔗糖浓度为 15%时,对各发育时期的花粉的启动均能产生较好的效果,对于花药培养来说,在此浓度下愈伤组织(胚状体)的平均诱导频率最高,可达 5%以上,但有时在蔗糖浓度为 12.5%、17.5%和 20%时,因其基因型不同,其诱导频率也较高。



注:材料 T13×白 69

图 1 高浓度浸泡诱导频率

2.3.2 不同材料在系列蔗糖浓度各种培养基上对胚状体(愈伤组织)平均诱导影响

表 3 结果表明,当培养基蔗糖浓度为 15%时,对花药培养最适宜,在此浓度下各基因型材料的胚状体(愈伤组织)的诱导频率平均最高为 4.40%,其个别品种如牡单 9、T13×白 69 诱导频率高达 9.61%和 9.24%。当蔗糖浓度为 17.5%、20%、12.5%和 10%时,诱导频率逐渐降低;蔗糖浓度达到 6%时,其诱导频

率为 0。在表 3 中还可以看出, 由于基因型不同, 其诱导频率因蔗糖浓度不同而不同。在蔗糖含量为 20% 时, 如材料牡单 9 其诱导频率平均高达 8.09%;

育单 003 在蔗糖浓度为 17.5% 时, 其诱导频率为 6.25%; T13×白 69 在蔗糖浓度为 12.5%, 诱导频率达 6.67%。

表 3 不同蔗糖浓度对诱导频率的影响(2003 年)

材料	蔗 糖 浓 度 (%)																		总花药数	总愈伤数	总诱导频率 (%)
	6			10			12.5			15			17.5			20					
	花药数	愈伤数	诱导频率 (%)	花药数	愈伤数	诱导频率 (%)	花药数	愈伤数	诱导频率 (%)	花药数	愈伤数	诱导频率 (%)	花药数	愈伤数	诱导频率 (%)	花药数	愈伤数	诱导频率 (%)			
牡单 9	180	0		400	1	0.25	280	7	2.05	460	42	9.61	120	7	5.83	160	13	8.09	1 600	70	4.38
嫩单 8	340	0		160	1	0.63	300	5	1.66	320	13	4.06	120	3	2.50	320	6	1.89	1 560	28	1.79
克单 8	200	0		260	0	0.00	420	7	1.67	400	21	5.25	60	3	4.75	300	10	3.33	1 640	41	2.50
哲单 37	260	0		380	6	1.63	380	7	1.67	400	17	4.25	300	10	3.33	240	11	4.58	1 960	51	2.60
东农 248	300	0		360	5	1.39	420	7	1.67	480	15	3.13	380	6	1.58	100	3	2.78	2 040	36	1.76
龙单 13	120	0		230	0	0.00	230	5	2.20	240	16	6.67	80	4	5.00	140	4	2.85	1 040	29	2.79
白单 9	340	0		200	3	1.50	100	2	2.01	420	14	3.33	120	3	2.50	220	4	1.82	1 400	26	1.86
牡单 10	750	0		510	7	1.37	680	17	2.50	780	30	3.85	660	8	1.21	460	12	2.30	3 840	74	1.93
四单 19	300	0		280	3	1.07	300	12	4.00	320	16	5.00	480	10	2.08	400	8	2.01	2 080	49	2.36
T13×白 69	440	0		100	1	1.00	120	8	6.67	460	43	9.24	280	14	5.00	560	14	2.57	1 960	80	4.08
本育 9	320	0		240	2	0.83	240	5	2.08	400	13	3.25	320	7	2.19	240	10	2.78	1 760	37	2.10
LD984	450	0		280	0	0.00	220	10	4.55	680	38	4.71	90	5	5.97	760	22	2.89	2 480	75	3.02
庆试 4	220	0		320	3	0.98	380	6	1.49	540	11	2.04	320	17	5.85	260	6	2.47	2 040	43	2.11
育单 003	40	0		120	2	1.67	320	13	4.06	440	27	6.14	40	5	6.25	160	8	6.67	1 120	55	4.91
LD6006	670	0		540	7	1.29	360	15	4.17	840	43	5.12	250	6	2.40	260	9	3.46	2 920	80	2.74
杜蒙种子	90	0		430	5	1.16	420	19	4.52	240	11	4.58	240	3	1.29	120	5	4.17	1 640	43	2.62
LD66	780	0		680	2	0.29	920	23	2.50	1 300	27	2.08	200	5	2.49	480	7	1.46	4 360	64	1.47
LD9013	300	0		360	2	0.56	220	7	3.18	480	33	6.88	40	2	5.04	160	7	4.38	1 560	51	3.27
LD999	920	0		920	7	0.76	1 200	17	1.42	1 300	35	2.19	100	2	1.93	520	8	1.54	4 960	69	1.39
LD9002	120	0		180	0	0.00	240	3	1.25	120	4	3.33	180	1	0.58	320	5	1.56	1 160	13	1.12
Σ	7 420	0		6 950	57	0.82	7 750	195	2.55	10 620	469	4.40	4 380	121	3.00	6 180	172	2.94	43 120	1 014	2.35

3 讨 论

(1) 高浓度糖液浸泡提高诱导率机制。首先植物细胞具有全能性是本质, 即一个分化成熟的细胞, 都携带有某种植物所特有的全部遗传信息, 具备着传递遗传信息、转录和转译的基本能力。但高等植物在其分化过程中, 由于受某种特定细胞质环境的影响, 即在酶的作用下, 局部遗传功能开放, 表现为一定的形态和器官的形成, 但它们的全部遗传潜力并没有丧失, 故它们保持着潜在的细胞的全能性。其次细胞的孤立化, 是改变其分化方向的前提。分化成熟的活细胞, 一旦脱离了原来器官或细胞的束缚, 胞间连丝的破坏或阻塞, 成为游离状态, 那么在另一些营养和激素的作用下就可能脱离分化而恢复遗传的全能性, 起着类似于分子的作用。花粉细胞, 最初在花粉囊内, 与其内壁毡绒层相联, 受其营养和激素影响, 随后落到柱头上受花柱营养和激素的影响, 从而决定其分化方向。在配子体发育和孢子体发育的相互转化中, 可能有一个细胞改组的过程, 即消除原来世代的影响, 和从预定的发育程序中解放出来。而蔗糖溶液的预处理对以上三种都有良好的促进作用。

首先高浓度糖溶液浸泡花药, 由于糖液的渗透压特高, 使花粉细胞产生质壁分离, 造成了花粉细胞进一步孤立化, 不但与药壁失去联系, 而与细胞壁之间的联系也遭到破坏, 从而加深了细胞的孤立化。其次, 在质壁分离时, 细胞质浓缩, 从而可能改变细胞质中某些蛋白质的空间结构, 使得一些特定的活化酶失去活化, 从而脱离了原有的细胞对其的影响。

(2) 培养基中的糖, 除了提供培养物的能量碳源以外, 还起着调节渗透压的作用, 而且对花粉的脱分化和再分化, 起着有利的效应。我们在实验室使用了各种蔗糖的浓度, 发现在 15% 的高浓度下, 玉米花药培养的诱导率最高。许多实验证据表明, 培养基的渗透压对花药培养诱导频率的影响非常大, 因为在花粉胚的不同发育时期, 其渗透压是不断变化的, 随着花粉胚的发育, 其内部的渗透压逐渐下降。所以我们在愈伤组织(胚状体)培养过程中将培养基的蔗糖浓度从高浓度逐渐往低浓度下调, 以提高培养基的渗透压, 来有效地改善花药培养的愈伤组织(胚状体)的诱导频率。今后我们仍将继续在这方面进行探索, 找到最适宜花药生长发育产生大量愈伤细胞(胚状体)的各生长阶段的渗透压和蔗糖浓度。(下转第 118 页)

(上接第 113 页)

参考文献:

- [1] 北京海淀区东北旺公社试验站. 玉米花药培养的研究初报[J]. 植物学报, 1975, (18): 180-181.
- [2] 蔡保田, 陈名玲, 祝虹, 金聿. 从湖北光敏核不育水稻的未受精卵子和花药培养出单倍体植株[J]. 实验生物学报, 1988, (21): 401-407.
- [3] 郭仲琛. 烟草和辣椒花药离体培养的研究[J]. 植物学报, 1973, (15): 37-48.
- [4] 姜立君, 宋建成, 王启柏, 王守义. 重金属盐处理对提高玉米花药培养效率的作用[J]. 西北植物学报, 1998, (18): 81-86.
- [5] 宋建成, 姜丽君, 王启柏, 王守义, 郭风法. 诱导培养基及其主要成分对玉米花药培养的影响[J]. 西北植物学报, 1998, (18): 16-22.
- [6] 刘仁来, 阎飞燕, 程伟东. 玉米花药组织培养[M]. 玉米科技, 2000. 32-39.
- [7] 中科院遗传所组织培养室. 诱导玉米花粉植株的初步研究[J]. 遗传学报, 1975, (2): 138-142.
- [8] 朱至清, 王敬驹, 孙敬兰. 通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基[J]. 中国科学, 1975, (18): 484-490.
- [9] 卢卫山. 玉米花粉诱导影响因素的研究[J]. 玉米科学, 1997, 5 (1): 4-6.