

文章编号: 1005-0906(2010)01-0066-04

甜、糯玉米耐热性体细胞的筛选

梁雪莲, 张 庚, 姚冬梅, 冯颖竹

(仲恺农业技术学院生命科学院, 广州 510225)

摘 要: 以不同品种甜玉米和糯玉米幼胚为供试材料, 研究了不同培养基对愈伤组织诱导、继代和分化的影响, 并在高温条件下筛选玉米耐热性变异体。结果表明: 采用含有低浓度 2,4-D 的 N_6 为玉米幼胚诱导培养基, 可产生一定比例的变异, 愈伤组织诱导率高, 质量较好; MS 培养基适于分化; 温度渐变法可以保证幼胚能够在产生耐热变异的同时不至于死亡, 并在最后进行了恢复培养, 即温度恢复到适温, 淘汰不稳定愈伤组织, 得到相对稳定的耐热性变异体; 通过测定愈伤组织游离脯氨酸浓度、再生植株叶片质膜相对透性和叶片相对失水率, 确定玉米胚变异体的耐热程度。

关键词: 玉米; 体细胞筛选; 耐热性

中图分类号: S513.01

文献标识码: A

Screening of Heat Tolerant Somatic Clone on Sweet Corn and Waxy Corn

LIANG Xue-lian, ZHANG Geng, YAO Dong-mei, FENG Ying-zhu

(College of Life Science, Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou 510225, China)

Abstract: The paper induced callus from immature embryos of sweet corn and waxy corn. The effect of media on the callus induction, subculture, quality of embryogenic callus and the frequency of plantlet regeneration were studied. The paper also cultured callus under different high temperature to improve heat tolerance of maize callus. The results showed that the high quality and high induction rate of celli were obtained when N_6 was used as the induction medium. At the same time, the frequency of callus induction could be greatly improved when 2 mg/L 2,4-D were added, and it also generates a few variations. MS was suitable for regeneration of callus. In the period of callus induction, temperature should be raised step by step to a high of 40°C and remain for 12 h. Finally return to the original environmental temperature. This way can help callus improve heat tolerance, with keeping health. The paper analyzed the degree of heat tolerance of these treated calluses by testing concentration of proline and ion conduction rate.

Key words: Corn; Body cell-based screening; Heat resistance

玉米体细胞突变体筛选已成功的例子大多集中在普通玉米材料上, 有关甜、糯玉米这方面的研究未见报道。本研究从甜、糯玉米的愈伤组织筛选出耐热突变体, 利于进一步培育耐热品系。

1 材料与方法

收稿日期: 2008-11-04; 修回日期: 2009-05-06

基金项目: 广东省农业厅“优质蛋白玉米品种和耐旱玉米品种的引进”[粤财农(2005)117]、“耐寒性糯玉米良种的引进筛选与技术配套”项目(2007A020300002-3)

作者简介: 梁雪莲(1969-), 女, 山西文水人, 副研究员, 博士, 主要从事作物抗逆性基因转化工作。Tel: 13424101002

E-mail: liangxuelian2005@sina.com.cn

1.1 供试材料

试验以玉米自交系仲糯 1 号(N1)、仲甜 1 号(T5)、仲甜 2 号(T6)作为试验材料。从人工套袋授粉后 10 ~ 13 d 的幼穗选取 1.0 ~ 2.0 mm 大小一致的幼胚。

1.2 植株再生

愈伤组织诱导培养基: N_6 +L- 谷氨酰胺 300 mg/L+ 水解酪蛋白(CH) 500 mg/L+L 脯氨酸(pro)500 mg/L+2,4-D 2 mg/L+ 蔗糖 30 g/L+ 琼脂 6.5 g/L, pH 值 5.8。

分化培养基: MS+ 水解酪蛋白(CH) 500 mg/L+ L- 脯氨酸(Pro) 500 mg/L+ 肌醇 100 mg/L + 6-BA 1 mg/L+ KT 0.5 mg/L+ 蔗糖 30 g/L+ 琼脂 6.5 g/L, pH 值 5.8。

壮苗生根培养基: 1/2 MS+ 水解酪蛋白(CH)500

mg/L+L- 脯氨酸(Pro) 500 mg/L+ 肌醇 100 mg/L+ NAA 0.5 mg/L+ 活性炭 3 mg/L+ 蔗糖 30 g/L+ 琼脂 6.5 g/L, pH 值 5.8。

1.3 耐热性筛选

将愈伤组织分成两份,一份一直在 25℃ 中进行培养,作为对照;另一份在人工气候培养箱中,采用多步诱导选择法进行筛选,以 30℃(6 d)为筛选起始温度,依次提高到 35℃(4 d)、40℃(3 d)培养,后转入 25℃ 回复培养 6 d, 淘汰此时生长不稳定的愈伤组织,最后存活下来的愈伤组织定为耐热性变异体。记录、统计分析 3 次筛选、1 次回复培养后愈伤组织的相对生长量,6 d 后愈伤组织相对生长量 = (培养或筛选后愈伤组织的鲜重 - 原鲜重)/ 原鲜重 × (6/ 天数)。筛选后将变异体和对照进行耐热性检测,测定游离脯氨酸含量。

1.4 再生植株培养

将筛选的变异体接入分化培养基,当分化苗长至 5 cm 左右时,将其移入生根培养基;当根长到 4 cm 时移入大田进行大棚培养。电导仪测定再生植株叶片失水率及质膜相对透性。

1.5 游离脯氨酸含量的检测

将耐热筛选的 T5、T6 及其 CK 分成 4 批,共 14 个培养皿,分别置于 25℃(24 h)、35℃(12 h)、40℃(12 h)下避光培养。分别取 T5、T5CK、T6、T6CK(每处理 3 个重复)的愈伤组织 0.2 g,加入适量 80%乙醇于研钵中研磨成匀浆,移至 25 mL 刻度管中,用 80%乙醇洗研钵,并定容至 10 mL,混匀;80℃ 水浴提取 20 min,向提取液中加入约 0.4 g 人造沸石和 0.2 g 活性炭,强烈振荡 5 min,过滤;吸取提取液 2 mL,加入 2 mL 冰醋酸、2 mL 茚三酮试剂,沸水浴中加热 15

min,冷却后测定 520 nm 处的 OD 值。

1.6 再生植株叶片失水率的测定

称取对照和变异体再生植株的叶片 0.2 g,分别进行以下处理:处理 1 为 38℃ 轻干热胁迫,相对湿度为 65%;处理 2 为 42℃ 湿热胁迫,相对湿度为 80%,于人工气候箱中分别进行胁迫处理 1 h 和 4 h 后,测定叶片失水率及质膜相对透性。叶片失水率 = (处理前叶片鲜重 - 处理后叶片鲜重)/ 处理前叶片鲜重 × 100%。

1.7 再生植株叶片质膜相对透性检测

将叶片剪成长约 1 cm 长段装入具塞试管中,用玻棒压住叶片,加入 25 mL 去离子水浸泡 4 h,然后用电导仪测定电导率(R1);后将试管转入沸水浴中 20 min,冷却至室温后测定总电导率(R2),相对电导率 = R1/R2 × 100%。

实验中统计分析均采用 SPSS 14.0 数据处理程序进行。

2 结果与分析

2.1 MS 与 N₆ 培养基的比较

I 型愈伤组织的细胞团结构致密、白色、坚硬,生长缓慢,分生能力较强,易发生器官分化,多通过器官发生途径分化芽和根,继代效果差,胚性逐渐丧失,难以分化再生而死亡;II 型愈伤组织的细胞团结构松散,分散性好,黄绿色、易碎,呈颗粒状,生长较快,长期继代有胚性,能通过胚状体再生;III 型愈伤组织的细胞团粘软、水浸状、软散无结构,形似冰针或绵软似絮,白色透明或半透明,容易继代,但几乎丧失分化能力,为非胚性愈伤组织。

表 1 不同培养基对愈伤组织生长的影响
Table1 Effects of different medium on callus growth %

培养基 Medium	出芽率 Rate of bud	出愈率 Rate of callus	出根率 Rate of rooting	褐化率 Rate of browning
MS	100.00 a A	100 a A	44.52 a A	18.56 a A
N ₆	59.80 b B	100 a A	13.88 b B	0.00 b B

注:表中同列不同小写字母表示 0.05 水平差异显著,大写字母表示 0.01 水平差异显著。下表同。
Note: Lowercases in the same row indicate significance at the level of 5%, the letter case indicate significance at the level of 1%.
The same as the following tables.

由表 1 可以看出, MS 和 N₆ 培养基均能诱导愈伤组织,且诱导率为 100%,说明玉米的幼胚诱导具有普遍性。N₆ 培养基诱导的愈伤组织质量比 MS 好,其出芽率、出根率及褐化率均明显低于 MS,多为 II 型愈伤组织;而 MS 诱导的质量较差,其愈伤组织

出芽率达 100%,其芽很长,多为 I 型愈伤组织,不适合诱导和继代。表明 N₆ 培养基比较适合愈伤组织的诱导和继代,而 MS 培养基比较适合愈伤组织的分化。

2.2 2,4-D 的作用

2,4-D 是变异的主要诱发因素，为愈伤组织的诱导及继代所必需。在诱导的第 1、第 2 次继代中均使用 2,4-D 2 mg/L，在第 3 次继代中全部愈伤组织被分成 3 批，经筛选过的愈伤组织及其对照均用 2,4-D 2 mg/L，多余的愈伤组织则用 2,4-D 1 mg/L 浓度。

表 2 2,4-D 对愈伤组织的影响
Table 2 Effects of different concentration of 2,4-D on callus types %

2,4-D 浓度(mg/L)	I 型	II 型	III 型
2,4-D content	Type I	Type II	Type III
4	50.45 a A	16.98 d D	32.57 b B
3	37.95 b B	24.55 c C	37.50 a A
2	14.53 d D	57.12 a A	28.35 c C
1	20.53 c C	40.77 b B	38.70 a A

由表 2 可以看出,2,4-D 2 mg/L 能够培养出高质量的愈伤组织,而 3 mg/L 与 4 mg/L 时其愈伤多为 I 型和 III 型，只有 2,4-D 2 mg/L 的 II 型愈伤数显著高于其他浓度。尽管高浓度 2,4-D 可使细胞产生变异,但变异方向不稳定,且浓度太高会导致细胞活性降低,所以选择 2,4-D 2 mg/L 浓度既可产生变异,又不致因变异而死亡,而且愈伤组织胚性率也高。

2.3 耐热性筛选过程中的相对生长量变化

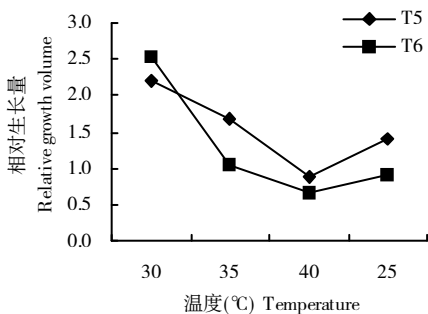


图 1 愈伤组织筛选过程中的相对生长量
Fig.1 Relative growth volume of callus in temperature selecting procedure

从图 1 中可以看出,随着温度的增加,T5、T6 的相对生长量都降低,且 T6 降低的程度大于 T5;当回复培养时,T5、T6 的相对生长量都开始回升。通过 3 次高温筛选后,淘汰了大量愈伤组织,得到耐热的愈伤组织,再经过回复培养,又淘汰了大量不适应的愈伤组织,最后得到的愈伤组织则是耐热的。由此可以看出，愈伤组织在筛选过程中生长正常，温度升高时,生长会相对缓慢。

2.4 筛选后愈伤组织的游离脯氨酸含量测定

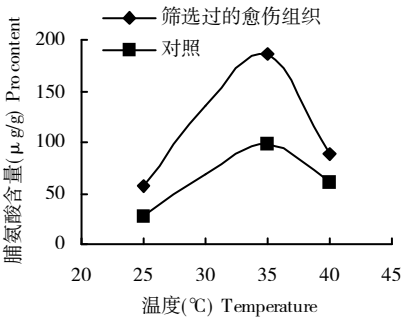


图 2 筛选后 T5 脯氨酸的含量
Fig.2 Content of T5 with proline curve

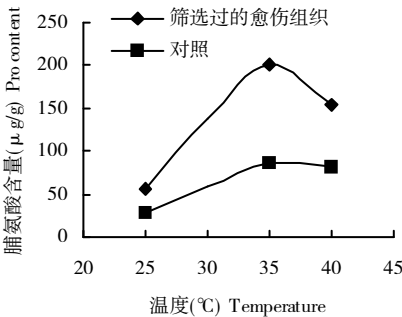


图 3 筛选后 T6 脯氨酸的含量
Fig.3 Content of T6 with proline curve

表 3 T5 和 T6 在不同温度下愈伤游离脯氨酸的含量

Table 3 Proline concentrations of T5 and T6 callus after selection μg/g

处 理	25℃	35℃	40℃
Treatment			
T5	56.57	185.79*	89.02
T5 CK	28.15	97.90	60.23
T6	55.34	200.87*	154.54*
T6 CK	28.75	86.02	82.50

注:* 为 p<0.05。Note: * indicates p<0.05.

脯氨酸是耐热指标,易溶于水,浓度越高其耐热性越强。脯氨酸作为植物渗透作用最为有效的物质,无论是干旱、冰冻、高温、低温和盐渍等逆境因素都可造成植物体内脯氨酸的大量积累,在一定程度上反映植物受环境胁迫状况以及植物对胁迫的忍耐及抵抗能力。从图 2、图 3 可以看出，经耐热筛选的 T5、T6 愈伤组织以及对照的脯氨酸含量都有所增加。表 3 进一步说明经耐热筛选的愈伤组织脯氨酸含量的增加幅度大于对照,其中 35℃时 T5、T6 的增幅均比对照显著,40℃时 T6 的增幅也达显著水平。说明经过耐热筛选的愈伤组织的抗逆性已经得到提高,具备一定的耐热性,但在 40℃高温条件下,测定的脯氨酸含量明显低于35℃条件下的脯氨酸含量，

且经耐热筛选的愈伤组织脯氨酸含量的降低幅度大于对照。其原因可能是 40℃ 的高温抑制了生物合成反应,导致脯氨酸含量没有继续升高而是降低了。

2.5 再生植株叶片失水率及质膜相对透性的测定

表 4 不同处理下再生植株叶片失水率的变化

Table 4 Leaf dehydration under different treatment %

品 种 Variety	处理一(h) Treatment 1		处理二(h) Treatment 2	
	1	4	1	4
T5	46.71 b B	51.18 b B	40.29 b B	67.27 b B
T5 CK	57.81 a A	78.05 a A	60.21 a A	85.29 a A

表 5 不同处理下再生植株相对电导率的变化

Table 5 Relative electro conductivity %

品 种 Variety	处理一(h) Treatment 1		处理二(h) Treatment 2	
	1	4	1	4
T5	62.50 b B	66.05 b B	49.98 b B	57.19 b B
T5 CK	73.29 a A	89.38 a A	54.36 a A	78.00 a A

由表 4、表 5 可以看出,在轻干热和湿热胁迫下 1 h 后,经耐热筛选的玉米叶片的相对电导率、失水率均显著低于对照;经热胁迫 4 h 后两值明显低于对照,且膜透性增加幅度小。原因可能是由于玉米叶片经过耐热筛选后,热胁迫下细胞膜受到保护,具有较高的稳定性,能够适应较长时间的高温胁迫,耐热性比较好;而对照的稳定性及耐热性均比较差。

3 结论与讨论

本实验采用了温度渐变的多步诱导选择法进行耐热筛选,将诱导出的愈伤组织依次放在 3 个温度梯度上进行培养筛选,并在最后做 1 次回复培养,淘汰不稳定愈伤组织,最后获得仍然生长健康的愈伤并再生出植株。耐热筛选是检测的前提,在耐热筛选上,应尽量保持每一个培养物都处于同一条件下。另外,耐热筛选时间是关键问题,热温下时间太短不足以引发变异或获得耐热性,时间太长又会使愈伤组织致死,只有严格控制好时间才能筛选出好的愈伤组织。但是这样经过连续 3 个温度梯度培养筛选,最后存留下来的愈伤组织很少,且有部分呈水浸状,不

具有胚性,很难进行分化再生成植株。因此,进一步改善筛选步骤与热逆境压力,从而获得高比例的耐热性筛选苗是下一步研究的关键。同时,从本实验可知,温度渐变的筛选原理也可用于筛选耐寒性变异性。

经过热逆境筛选出来的愈伤组织与幼苗对胁迫的忍耐及抵抗能力比对照强,具有一定的耐热性。本实验采用测定游离脯氨酸含量的方法检测筛选出的愈伤组织耐热情况,结果证明在逆性环境中脯氨酸大量积累,有利于提高植物的抗逆性,也证实了经过耐热筛选的愈伤组织的抗逆性比对照高。另外,采用测定愈伤组织 Pro 含量和再生植株叶片失水率、质膜相对透性的方法对筛选结果进行检测。表明筛选过的再生植株叶片相对电导率、失水率比对照低。这也说明经耐热筛选植株在高温下稳定性比对照高,其很可能已经产生了耐热性变异性,或者它的脯氨酸合成能力得到了提高,需要继续跟踪再生苗进行大田筛选。

N₆ 与 MS 培养基各有优点,应在组培的不同时期分别选择使用。本实验证明,N₆ 适合愈伤诱导,而 MS 适合分化,尤其是生根壮苗阶段,无任何激素的 MS 培养基比 N₆ 更能培养出健壮的植株。

参考文献:

[1] B Szarka I, Göntér M, Molnár-Láng, et al. Mixing of maize and wheat genomic DNA by somatic hybridization in regenerated sterile maize plants[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2002 ,105(1): 1-7.

[2] 梁雪莲,梁 红,周玲艳. 玉米体细胞突变体筛选研究[J]. 生物技术通报,2006(5):33-36 .

[3] 郭丽红,吴晓岚,龚 明. 谷胱甘肽还原酶和超氧化物歧化酶在玉米幼苗热诱导的交叉适应中的作用[J]. 植物生理学通讯, 2005,41(4):8 .

[4] Armstrong C L, Green C E. Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-Proline[J]. Planta., 1985, 164: 207-214.

[5] 吴建慧,赵 军,孙国荣. 高温对玉米幼苗膜脂过氧化作用的影响[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报,2005,21(1):82-85 .

[6] 胡彦民,季良越,韦晓敏. 玉米幼胚离体培养的影响因素研究[J]. 河南农业大学学报,2000,34(4):305-308 .

[7] 池春玉,丁国华,连永权,等. 低温胁迫对三种冷季型草坪草脯氨酸含量及膜透性的影响[J]. 中国农学通报,2007, 23(1):101-104.

[8] 魏臻武,王槐三. 两种草坪草抗寒特性及其超氧化物酶的作用[J]. 草业科学,1997,15(2):62-66 .

(责任编辑:朴红梅)