

玉米耐盐愈伤组织变异体的筛选及生理特性分析

韦小敏^{1,2}, 王 鹏¹, 季良越², 胡彦民²

(1 郑州牧业工程高等专科学校 生物工程系, 河南 郑州 450011; 2 河南农业大学 农学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 用 9 个组合的玉米幼胚为外植体, 诱导出胚性愈伤组织。继代 5 次后, 用 200 mmol/L NaCl 和 5.5 mmol/L Hyp(羟基脯氨酸) 连续筛选 3 次, 获得耐盐愈伤组织变异体。试验结果表明: 用 Hyp 筛选得到的愈伤组织, 其分化频率高于用 NaCl 筛选的, Hyp 的选择频率是 NaCl 的 2 倍; 2 种耐盐愈伤组织变异体中的可溶性糖含量和脯氨酸含量都高于对照, 3 种愈伤组织细胞的渗透势排序为: 用 Hyp 筛选到的变异体 < 用 NaCl 筛选到的变异体 < 对照。

关键词: 玉米; 筛选; 耐盐愈伤组织变异体; 生理特性

中图分类号: S513 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2007)03-0137-04

Selection of Salt-tolerant Callus Variants and Analyses of their Physiological Characters in Maize

WEI Xiao-min^{1,2}, WANG Peng¹, JI Liang-yue², HU Yan-min²

(1. Department of Biology, Zhengzhou Animal Husbandry Engineering College, Zhengzhou 450011, China;

2. College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The embryogenic calli were induced from immature embryos of 9 combinations of maizes. After 5 generations culture, salt-tolerant variants were obtained through three generations of continuous selection with 200 mmol/L NaCl and 5.5 mmol/L Hyp. The results showed that the differentiation frequency of calli selected by Hyp were two times as much as that by NaCl. The contents of soluble sugar and Proline in two variants were higher than in CK. The order of osmotic potential was: the variant selected with Hyp < the variant selected with NaCl < CK, indicating that the variant selected with Hyp had higher osmoregulation ability.

Key words: Maize; Selection; Salt-tolerant callus variants; Physiological characters

利用细胞培养体系, 直接以盐作为选择压力进行耐盐变异体的筛选, 已经在多种作物中得到应用^[1-3]。但是用这种方法选择, 生长在含盐培养基上的细胞往往发生代谢紊乱, 雌、雄器官发育不协调, 导致细胞形态发生改变并丧失分化能力^[3]; 另外, 在含盐培养基上筛选获得的细胞耐盐性, 在长期继代培养过程中或在再生植株后代中消失或降低。这些问题限制了离体选择技术在提高植物耐盐性方面的应用。人们对植物耐盐生理的研究表明, 脯氨酸可以作为植物对盐胁迫的一种耐性生理指标。以脯氨酸类似物羟基脯氨酸(Hyp)为选择压力, 选择对脯氨酸反馈抑制钝感的耐该类似物的变异体, 表现出脯氨酸含量增加, 耐盐性增强。用这种间接选择的方法, 已获得羊草^[4]、葡萄^[5]等的变异细胞系,

但在玉米上还没有类似报道。本研究采用 NaCl 和 Hyp 筛选玉米耐盐变异体, 对 2 选择剂的选择效果做比较, 并对变异体的生理特性做进一步分析, 旨在为离体选择耐盐作物新类型, 寻找合适的选择途径。

1 材料和方法

1.1 材料

配制 9 个适于幼胚培养的玉米杂交组合: 郑 22 × 综 3、综 3 × 郑 22、郑 22 × A188、综 3 × A188、87-1 × 综 3、综 3 × 87-1、87-1 × 郑 22、郑 22 × 87-1、87-1 × A188。春播于郑州市中原区沟赵乡农科所试验场。取授粉后 11~13 d 的玉米幼胚为外植体。

1.2 愈伤组织的诱导、继代和分化

在无菌条件下, 用 70% 酒精把雌穗表面消毒

收稿日期: 2006-10-24

基金项目: 河南省科技攻关项目(99160103)

作者简介: 韦小敏(1969-), 女, 河南洛阳人, 讲师, 在读博士, 主要从事植物组织培养和遗传育种的教学及研究工作

通讯作者: 季良越(1944-), 女, 上海人, 教授, 主要从事玉米遗传研究工作。

后,剥离穗中部的幼胚,将盾片向上接种于诱导培养基上。诱导培养基成分是 N₆+ 2 mg/L 2, 4-D + 500 mg/L CH+ 500 mg/L Pro+ 30 g/L 蔗糖。从诱导出的愈伤组织中挑选不透明、淡黄色、颗粒状的胚性愈伤组织区域,夹碎到 2~ 3 mm 大小,每 20 d 继代 1 次,共继代 5 次。继代培养基同诱导培养基。

1.3 耐盐变异体的筛选

然后向继代培养基中分别加入 200 mmol/L NaCl, 4. 5, 5. 5 和 6. 5 mmol/L Hyp, 组成 4 种筛选培养基。根据观测结果,选择一个和 200 mmol/L NaCl 的选择强度相当的 Hyp 浓度继续进行第 2 次和第 3 次筛选,获得 2 种耐盐愈伤组织变异体,即 NaCl 变异体和 Hyp 变异体。同时在普通继代培养基上培养愈伤组织作为对照。

将愈伤组织接种到分化培养基(N₆+ 1 mg/L KT + 0. 5 mg/L BA+ 0. 2 mg/L NAA+ 500 mg/L CH+ 500 mg/L Pro+ 30 g/L 蔗糖)上,先在黑暗条件下培养 15 d 左右,然后在光下培养,光照时间 12 h/d,光照强度 2 500 lx。40 d 后即可分化出绿苗。

所有培养基中加入琼脂 7. 5~ 8 g/L, pH 值均为 5. 8。愈伤组织的诱导、继代和筛选都是在遮光条件下进行,培养温度(24±1) ℃,相对湿度 60%~ 70%。

1. 4 各项指标的观测统计与测定

1. 4. 1 统计指标 诱导率(%) : 产生愈伤组织的幼胚数占接种幼胚总数的百分率; 愈伤组织生长量(g) : 20 d 后愈伤组织的重量- 愈伤组织始重; 愈伤组织存活率(%) : 存活的愈伤组织块数占接种的愈

伤组织块数的百分率; 胚性愈伤组织百分率(%) : 胚性愈伤组织块数占接种的愈伤组织块数的百分率; 分化频率(%) : 分化出绿苗的愈伤组织块数占接种的愈伤组织块数的百分率; 选择频率(%) : 每次筛选的胚性愈伤组织百分率之积×分化频率。

1. 4. 2 测定指标 可溶性糖含量的测定采用蒽酮法,游离脯氨酸含量的测定采用茆三酮法, 3 次重复。渗透势的测定采用质壁分离法,用 $\phi_s = - iCRT$ 计算细胞液渗透势。具体步骤参见文献[6]。

2 结果与分析

2. 1 玉米幼胚愈伤组织的诱导

幼胚接种到诱导培养基上, 20 d 后有愈伤组织产生。参照 Armstrong 等^[7]的标准结合实际观察,把诱导出的愈伤组织划分为 3 种类型: I 型,结构紧密、坚硬,主要通过器官发生途径分化根和芽; II 型,结构松散、易碎、颗粒状,具有分化胚状体的能力,适于长期继代而仍然不丧失胚性,是理想的愈伤组织类型; II型,结构松软,水渍状,丧失了分化能力。

表 1 为玉米幼胚的愈伤组织诱导情况。从结果看,不同基因型间诱导率几乎没有差别,但愈伤组织的质量差别很大,郑 22× 综 3、87-1× 综 3、87-1× 郑 22 这 3 种基因型的愈伤组织生长较差,基本上属于 II型,不易进行下一步的继代培养。原因是接种时幼胚太大。所以取材时期一方面以授粉天数来衡量,另一方面还要看这个基因型的幼胚生长速度的快慢,幼胚长 1. 0~ 2. 5 mm 为宜。

表 1 玉米幼胚愈伤组织的诱导情况

Tab 1 The induction of calli from nine kinds of genotypes

基因型 Genotypes	授粉日期/月- 日 Pollination date	接种日期/月- 日 Transplantation date	幼胚长/ cm The length of immature embryos	20 d 后诱导率/ % Induction percentage after 20 days	愈伤组织质量 The quality of calli
郑 22× 综 3 Zheng22× Zong3	06- 26	07- 10	4. 2	100	生长较差
综 3× 郑 22 Zong3× Zheng22	06- 30	07- 11	2. 0	99	生长好,淡黄色颗粒状
郑 22× A188 Zheng22× A188	07- 03	07- 14	2. 2	100	白色松脆,易生根
87-1× 综 3 87-1× Zong3	07- 02	07- 14	3. 7	100	褐变不长
综 3× 87-1 Zong3× 87-1	07- 04	07- 15	1. 7	99. 4	松脆,淡黄色菜花状
87-1× 郑 22 87-1× Zheng22	07- 04	07- 15	3. 0	100	褐变不长
郑 22× 87-1 Zheng22× 87-1	07- 04	07- 15	1. 0	100	生长好,松脆颗粒状
87-1× A188 87-1× A188	07- 06	07- 17	1. 5	100	白色,松脆
综 3× A188 Zong3× A188	07- 07	07- 19	2. 5	100	白色,松脆,菜花状

表 2 耐盐愈伤组织变异体的筛选

Tab 2 The selection of salt-tolerant callus variants					
项目 Item	对照 CK	NaCl 200	Hyp 4.5	Hyp 5.5	Hyp 6.5
第 1 次筛选时的愈伤组织生长量/g The calli growth quantity(g) of first selection	1.355	0.484	1.205	1.167	1.142
第 1 次筛选时的愈伤组织存活率/% The calli survival ratio of first selection	100	73.99	78.15	74.23	70.67
第 1 次筛选时的胚性愈伤组织百分率/% The embryogenic calli proportion of first selection	94.64	66.17	69.43	65.91	63.83
第 2 次筛选时的胚性愈伤组织百分率/% The embryogenic calli proportion of second selection	95.11	69.05	71.83		
第 3 次筛选时的胚性愈伤组织百分率/% The embryogenic calli proportion of third selection	93.87	70.94	72.67		

2.2 耐盐愈伤组织变异体的筛选

愈伤组织经过 5 次继代后, 挑选其中的胚性愈伤组织接种到 4 种筛选培养基上, 20 d 后统计愈伤组织的生长量、存活率和胚性愈伤组织百分率(表 2)。从表中看出, 在筛选培养基上, 这 3 个数值均低于对照, 说明筛选剂具有明显的筛选效果。从选择强度看, 在含有 200 mmol/L NaCl 和 5.5 mmol/L Hyp 的培养基上, 愈伤组织存活率和胚性愈伤组织百分率的数值高低适中, 是较为合适的筛选浓度; 两者数值相近, 因而选择强度相当。但在加有 NaCl 的培养基上, 愈伤组织的生长量最小, 只有 0.484 g; 在加有

Hyp 的培养基上, 愈伤组织的生长量虽然低于对照, 但高于在 NaCl 培养基上的。说明 NaCl 对愈伤组织生长产生的抑制作用比 Hyp 大。

用 200 mmol/L NaCl 和 5.5 mmol/L Hyp 继续进行第 2、3 次筛选, 获得耐盐愈伤组织变异体。每次筛选时的胚性愈伤组织百分率也列于表 5。

2.3 筛选效果的比较

把耐盐愈伤组织和对照愈伤组织接种到分化培养基上, 统计不同处理的分化频率。根据每次筛选时统计的胚性愈伤组织百分率和分化频率, 计算出选择频率, 结果见表 3。总体上看, 分化频率是偏低的。无论筛选与否, 郑 22× 综 3 的分化频率最高, 87-1× A188 的最低, 呈现出基因型之间的差异。经过筛选的愈伤组织, 其分化频率比对照低, 用 NaCl 筛选的比用 Hyp 筛选的更低。

在选择强度相当的情况下, 5.5 mmol/L Hyp 的选择频率是 200 mmol/L NaCl 的 2 倍。而且经 Hyp 筛选得到的愈伤组织分化出的幼苗, 叶子较宽大, 颜色鲜绿, 生长较旺盛; 用 NaCl 筛选得到的愈伤组织, 分化出的幼苗叶子细长, 呈灰绿色, 生长较瘦弱。

2.4 耐盐愈伤组织变异体的生理特性

测得变异体及对照愈伤组织的可溶性糖含量和脯氨酸含量列于表 4。从表 4 可以看出, 2 种变异体的可溶性糖含量分别是对照的 1.44 倍和 1.45 倍, 脯氨酸含量是对照的 3.7 倍和 3.2 倍。经 LSR 测验,

表 3 2 种筛选剂选择效果的比较

处理 Treatment	各基因型的分化频率/% Differentiation frequency of each genotypes				各基因型的选择频率/% Selection frequency of each genotypes				平均选择频率/% Average selection frequency
	郑 22× 综 3 Zheng22× Zong3	87-1× 综 3 87-1× Zong3	郑 22× 87-1 Zheng22× 87-1	87-1× A188 87-1× A188	郑 22× 综 3 Zheng22× Zong3	87-1× 综 3 87-1× Zong3	郑 22× 87-1 Zheng22× 87-1	87-1× A188 87-1× A188	
对照 CK	46.67	44.85	34.44	27.94					
NaCl 变异体 NaCl variants	20.28	10.22	8.15	4.2	6.57	3.31	2.64	1.36	3.47
Hyp 变异体 Hyp variants	33.33	21.25	19.44	7.65	11.47	7.31	6.69	2.63	7.02

表 4 变异体及对照愈伤组织的可溶性糖含量和脯氨酸含量

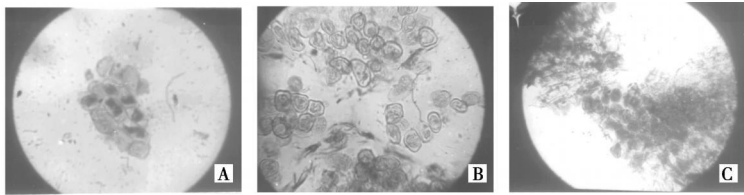
处理 Treatment	对照 CK		NaCl 变异体 NaCl-Variant		Hyp 变异体 Hyp-Variant	
	可溶性糖/% The content of soluble sugar	脯氨酸/(mg/g) The content of Proline	可溶性糖/% The content of soluble sugar	脯氨酸/(mg/g) The content of Proline	可溶性糖/% The content of soluble sugar	脯氨酸/(mg/g) The content of Proline
1	5.87	1.701	8.09	5.599	8.07	4.512
2	5.77	1.289	8.12	5.880	7.97	4.665
3	5.28	1.459	8.27	5.139	8.53	5.204
平均 Average	5.64	1.483	8.16	5.359	8.19	4.794
与对照比值 Ratio to CK	1.44	3.7	1.45	3.2		
LSR 测验 LSR Test B	B	A	A	A	A	

注: 可溶性糖: LSR_{0.01,3} = 0.807 LSR_{0.01,2} = 0.779 脯氨酸: LSR_{0.01,3} = 2.636 LSR_{0.01,2} = 2.544
Note: The soluble sugar: LSR_{0.01,3} = 0.807 LSR_{0.01,2} = 0.779 Pro: LSR_{0.01,3} = 2.636 LSR_{0.01,2} = 2.544

变异体的可溶性糖含量和脯氨酸含量与对照差异显著,但2种变异体之间差异不显著。这说明变异体细胞内积累了较多的可溶性糖,合成了大量的脯氨酸,增加了细胞液的浓度,为抵抗外界盐分胁迫奠定了基础。

图1为3种不同处理的愈伤组织细胞在蔗糖溶液中的质壁分离情况。从图中看出,对照愈伤组织

的细胞呈不规则长方形,而变异体细胞为卵圆形至圆球形。图1-A为对照细胞在0.55 mol/L的蔗糖溶液中发生初始质壁分离的情况,图1-B为在0.65 mol/L的蔗糖溶液中,NaCl变异体细胞刚刚发生质壁分离的情况,而在同一浓度的蔗糖溶液中,Hyp变异体细胞则没有发生质壁分离(图1-C)。



A. 对照细胞在 0.55 mol/L 的蔗糖溶液中发生初始质壁分离; B. 在 0.65 mol/L 的蔗糖溶液中, NaCl 变异体细胞刚刚发生质壁分离; C. Hyp 变异体细胞在 0.65 mol/L 的蔗糖溶液中没有发生质壁分离
A. The cell of CK began to plasmolysis in 0.55 mol/L sugar solution; B. The NaCl-variant cell began to plasmolysis in 0.65 mol/L sugar solution; C. The Hyp-variant cell did not plasmolysis in 0.65 mol/L sugar solution

图1 3种不同的愈伤组织细胞在蔗糖溶液中的质壁分离情况
Fig 1 Explanation of plates Three kinds of calli plasmolysis in sugar solution

根据质壁分离所确定的等渗浓度,计算不同处理细胞渗透势列于表5。3种细胞渗透势的顺序为:Hyp变异体<NaCl变异体<对照。结果表明:经过筛选得到的变异体,其细胞的渗透势比对照有所下降,所以渗透调节能力比对照有所提高。

表5 3种不同细胞的渗透势

Tab 5 The osmotic potential of three different kinds of cells			
项目	对照	NaCl 变异体	Hyp 变异体
Item	CK	NaCl-Variant	Hyp-Variant
等渗浓度/(mol/L)	0.76	0.65	0.70
Equal osmotic concentration			
渗透势/-MPa	1.33	1.57	1.69
Osmotic potential			

3 结论与讨论

组织培养中常常会产生体细胞无性系变异。变异系的变异频率随着离体培养时间的延长而增加。为了提高无性系变异的频率,在保障植株分化能力不丧失的前提下,继代培养的时间应当是长些为好^[8]。所以,我们是在继代培养了5次以后再进行耐盐性筛选的。

参考张举仁等^[2]的研究和多年实践,认为200 mmol/L NaCl 是进行玉米耐盐性筛选较为合适的浓度。对于未知的Hyp的筛选作用,设置了3个浓度,经过比较,5.5 mmol/LHyp具有与200 mmol/L NaCl相当的选择强度,选择频率却是后者的2倍;用这种选择剂筛选到的变异体分化出的植株,生长也较健壮。所以认为,用5.5 mmol/L Hyp进行玉米耐盐变异体的筛选较为合适。

干旱或渗透胁迫使细胞膜脂组成或物理性状发生变化,膜结构的完整性和膜的功能受到破坏^[9]。本试验中,经选择剂筛选得到的变异体细胞,其形状和对照有所差别,这可能也是因为选择剂对质膜的直接影响,使膜的结构和功能受到损害的缘故。

可溶性糖和脯氨酸在细胞质区域中积累,以保持整个细胞中水势的平衡,起到渗透调节作用^[10]。本试验所筛选到的变异体细胞中,可溶性糖和脯氨酸含量都高于对照,因而渗透调节能力得到提高。至于变异体的耐盐性,有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 郭岩,陈少麟,张耕耘,等.应用细胞工程获得受主效基因控制的水稻耐盐突变系[J].遗传学报,1997,24(2):122-126
[2] 张举仁,高树芳,于家驹,等.玉米耐盐愈伤组织的筛选及植株再生[J].植物学报,1991,33(11):887-893
[3] 周荣仁,杨燮荣,余叔文.利用组织培养研究植物耐盐机理及筛选耐盐突变体的进展[J].植物生理学通讯,1989(5):11-19
[4] 陈辉,匡柏健,王敬驹.羊草抗羟脯氨酸细胞变异系的筛选及其特性分析[J].植物学报,1995,37(2):103-108
[5] 丁惠敏,霍丽云,陈保金.葡萄耐羟脯氨酸细胞变异系筛选及其特性研究[J].植物生理学通讯,1998,10,34(5):352-355
[6] 邹琦.植物生理生化实验指导[M].北京:中国农业出版社,1995
[7] 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
[8] 李浚明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业大学出版社,2002:5
[9] 邱全胜.渗透胁迫对小麦根质膜脂质物理状态的影响[J].植物学报,1999,41:161-165
[10] 利容千,王建波.植物逆境细胞及生理学[M].武汉:武汉大学出版社,2002:7