

文章编号: 1005-0906(2005)03-0028-04

东北春玉米骨干自交系组织培养再生系统研究

袁 鹰¹, 曲喜云², 王玉民¹, 郝文媛¹, 谭 化¹, 张光弟³, 刘德璞¹

(1. 吉林省农业科学院生物技术重点实验室, 吉林 公主岭 136100; 2. 长春市种子管理站; 3. 吉林省梨树县农业技术推广站)

摘 要: 东北玉米骨干自交系在诱导愈伤组织和植株再生中, 基因型差异非常显著。自交系 7922 最高愈伤诱导率达 89.1%, 芽苗率为 66.4%; 而最低的 921 诱导率仅有 18.9%, 芽苗率为 0。再生途径主要有两种: 7922 主要以体胚发生途径为主, 4122、8902 主要以器官发生途径为主。2,4-D 是体胚诱导不可缺少的植物生长激素, 适当的细胞分裂素能促进诱导 4112、8902 不定芽的产生。而且, 再生途径并不是一成不变的, 在一定条件下可以相互转变。

关键词: 玉米; 自交系; 组织培养; 再生系统

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Study on Regeneration of Spring Maize Inbred Lines in Northeast of China

YUAN Ying, QU Xi-yun, WANG Yu-min, et al.

(Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: There existed great differences among maize genotypes when immature embryos were cultured for plant regeneration. 7922 showed the highest frequencies of callus induction and shoot formation which were 89.1%, and 66.4% respectively. While the lowest was found in 921, the induction and regeneration frequencies were 18.9% and 0 respectively.

There are two regeneration pathways. 7922 tended to regenerate via somatic embryogenesis, 4112, 8902 are likely to regenerate via organogenesis. 2,4-D was essential for inducing somatic embryoids, and suitable cytokin can promote adventitious shoot formation of 4112 and 8902. Furthermore, the regeneration pathways are interchangeable under different culture conditions.

Key words: Maize; Inbred; Tissue culture; Regeneration

从 1975 年 Green 等首次用幼胚为外植体诱导出胚性愈伤组织并再生植株以来, 玉米组织培养研究发展非常迅速, 已从花药、幼穗、幼胚等不同的外植体获得再生植株, 特别是近几年发展起来的玉米遗传转化工作取得了很大的进展。已经成功地获得抗玉米螟的 Bt 转基因玉米、抗除草剂转基因玉米等。而转基因体系的建立, 其中最重要的一个环节是如何建立一个良好的受体系统, 受体系统中如何提高玉米体细胞的再生能力尤为关键。由于诱导愈伤和植株再生一直受到基因型的限制, 诱导再生频率不高, 因而限制了玉米遗传转化的研究。我们就此问题开展研究, 主要选择了在东北农业生产上常用的

玉米骨干自交系为材料, 根据不同的基因型选择不同的诱导方法, 走不同的再生途径, 建立起了适合于遗传转化的高频再生系统, 为东北玉米自交系的遗传转化奠定了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

东北春玉米骨干自交系 8902、4112、7922、921、853、835、444、846、J002 和 Mo17。

1.2 实验方法

取授粉 10~15 d 的玉米幼穗, 在无菌条件下挑取 0.8~1.5 mm 的幼胚接种在诱导培养基上, 3 d 后盾片膨大, 及时切除伸长的胚根和胚芽, 15 d 后幼胚上逐渐长出愈伤组织和小不定芽, 45 d 后小不定芽变绿, 愈伤组织上逐渐长出黄色的颗粒状的胚状体。将不定芽和胚状体取下放在去掉生长素或少加细胞分裂素的分化培养基上, 将长出一个完整的小植

收稿日期: 2004-08-03

基金项目: 国家转基因植物中试及产业化基地(吉林)专项资助(JY03-17-1)

作者简介: 袁 鹰(1964-), 女, 副研究员, 主要从事植物遗传转化和分子育种工作。Tel: 0434-6283098

E-mail: yuanying2003@sohu.com

株,然后将植株放入生根培养基上生根,生根后进行移栽。

1.3 培养条件

- 诱导培养:26℃微弱光下。
- 继代培养:26℃、16 h 散射光下。
- 分化培养:26℃、16 h 光照,空气相对湿度 70%。
- 生根培养:白天 26℃,夜间 20℃,强光照,空气

相对湿度 80%。

1.4 培养基

- (1)诱导培养基。CIS:MS 大量+BS 微量+2,4-D 0.5 ~ 2.0 mg/L+蔗糖 4%(w/v)。CIZ:MS 大量+BS 微量+2,4-D 0.5 ~ 2.0 mg/L+KT 0.1 ~ 0.3 mg/L+6BA 0.1 ~ 0.3 mg/L+蔗糖 4%(w/v)。
- (2)继代培养基。ECS:MS 大量+BS 微量+2,4-D 0.5 ~ 2.0 mg/L+蔗糖 3%(w/v)。EW:MS 大量+BS 微量+2,4-D 0.5 ~ 2.0 mg/L+KT 0.1 ~ 0.3 mg/L+6BA 0.1 ~ 0.3 mg/L+蔗糖 3%(w/v)。
- (3)分化培养基。ER:MS 大量+B5 微量+KT 0.1 ~ 0.3 mg/L+蔗糖 3%(w/v)。
- (4)生根培养基。R:N6+IBA 0.5 mg/L+蔗糖 2%(w/v)。pH 5.8,培养基按常规消毒灭菌。

2 结果与分析

2.1 基本材料的选择

良好的受体系统是玉米遗传转化的一个关键技术环节,它直接影响转化再生频率的高低。目前,一般是以幼胚诱导的胚性愈伤组织作为转化受体。但受体系统的建立是受多种因素影响的,例如,我们供试的 10 个玉米自交系的幼胚大多数都能形成愈伤组织,但形成胚性愈伤组织的能力却有很大差异,其中 7922 的胚性愈伤诱导率可达 80%,而 921 为 0;另外幼胚的大小、基本培养基的成分、激素的配比、培养条件等都有影响。最后我们根据初始愈伤组织的诱导、后期愈伤组织的分化及再生频率,从中选出 4 个作为我们建立再生系统的基因型。

2.2 愈伤组织类型研究及发育途径

取授粉 10 ~ 13 d,0.8 ~ 1.5 mm 大小的玉米自交系 7922 的幼胚,在无菌条件下接种在诱导培养基 CIS、CIZ 上,暗培养 3 d 后,切除伸长的芽。15 d 后接种在 CIS 培养基上的幼胚在膨大的盾片上出现了白

色的较硬的紧密的 I 型愈伤组织,30 d 后在愈伤组织上长出了黄色颗粒状的胚性愈伤组织;CIZ 培养基上的幼胚盾片开始形成淡黄色的不定芽点,不定芽点在 EW 继代培养基上增殖、长大、变绿。分别将黄色颗粒和绿色的不定芽点取下后放在分化培养基上,一周后在黄色颗粒形成的类似盾片上开始有胚芽伸出,另一侧有胚根伸出,不定芽芽苗逐渐伸长,待小苗长至 4 ~ 5 cm 高时开始移栽。

通过研究,幼胚在诱导、继代、分化过程中愈伤组织的类型是不同的,而愈伤组织类型的不同导致了发育途径的不同,其中一种愈伤组织的类型比较适合体胚发生途径,另一种愈伤组织的类型较适合器官发生途径。

近几年来,通过胚状体途径再生研究的人越来越多。因为胚性细胞具有较强的再生能力,且能长期保持,是遗传转化的良好受体系统。而体胚诱导及其频率的高低受基因型、培养基、培养条件等影响很大。我们从中筛选了一个基因型比较适合建立体胚再生系统的材料 7922。

器官发生途径与体胚发生途径一样受基因型限制,但不如体胚途径严格。8902、4112、340 和 7922 在适合条件下,都能以器官发生途径再生植株。而体胚途径只有 7922 幼胚诱导胚性愈伤突破了 60%,其它基因型和外植体还有待于研究。此途径虽然成苗快、简单,但不定芽不宜长期保存。

2.3 影响各系统诱导、培养、再生的因素研究

2.3.1 基因型与再生芽苗的关系

不同基因型玉米自交系的幼胚在诱导愈伤组织的过程中有很大差异,不但愈伤组织的诱导率不同,而且形成芽苗时发生途径亦不同。接种 15 d 后幼胚的表面就开始形成愈伤组织。表 1 中结果列出了在 CIS 诱导培养基上,7922 形成的愈伤组织表面干燥,边缘呈花边状,白色,结构紧密,几天后在其上长出黄色颗粒状的 II 型愈伤组织,此时最适宜扩繁、增殖。将其置于分化培养基上,颗粒状的体细胞胚就会从类似的盾片上抽出绿芽,另一侧伸出胚根,如同种子的萌发过程,芽苗率达 66.4%。而 8902、4112 诱导出来的愈伤组织表面发散,诱导率与 7922 虽然相差不太多,但芽苗率很低只有 8.2%和 12.7%,且多数是丛状的畸形苗。921 的出愈率只有 18.9%,芽苗率为 0。

表 1 玉米不同基因型幼胚愈伤组织诱导与植株再生情况

基因型	接种幼胚数量	诱导愈伤数	愈伤诱导频率(%)	再生植株数(株)	再生植株频率(%)
7922	110	89	80.9	73	66.4
8902	110	72	65.5	9	8.2
4112	110	87	79.1	13	12.7
921	110	20	18.9	0	0

2.3.2 培养基和培养条件

不同的基因型和不同的外植体，必须在合适的培养基中和培养条件下才能诱导出不定芽和胚状体，进而再生出植株。基本培养基成分有很大影响，在激素不变的条件下，诱导和继代阶段 MS 大量+B5 微量好于 MS、B5、N6 培养基，而生根时 N6 明显好于其它培养基。在不定芽再生途径中，细胞分裂素选

用 6BA(0.1 ~ 0.3 mg/L)或 KT(0.1 ~ 0.3 mg/L)，生长素多为 2,4-D(0.5 ~ 2 mg/L)或 IBA(0.2 ~ 0.5 mg/L)，而体胚再生研究中，2,4-D(1 ~ 2 mg/L)是必不可少的生长素。一般情况下，诱导阶段在微弱光条件下进行培养，继代培养需散射光下，而分化和生长在强光下进行培养，且空气相对湿度要达到 70%以上。

2.3.3 激素的不同配比对再生途径的影响

表 2 不同的外源激素对再生途径的影响

品 种	激素(mg/L)	幼胚数量	诱导愈伤数	诱导频率(%)	再生植株数	再生频率(%)
7922	2,4-D 0.5	110	35	31.8	1	0.9
	2,4-D 2.0	110	98	89.1	84	76.4
	2,4-D 2.0+KT 0.1+6BA 0.1	110	89	80.9	73	66.4
4112	2,4-D 0.5	110	13	11.8	0	0.0
	2,4-D 2.0	110	87	79.1	13	12.7
	2,4-D 2.0+KT 0.1+6BA 0.1	110	83	76.4	67	60.9
921	2,4-D 0.5	110	5	4.5	0	0.0
	2,4-D 2.0	110	20	18.9	5	4.5
	2,4-D 2.0+KT 0.1+6BA 0.1	110	17	15.5	4	3.6

表 2 结果可以明显看出，2,4-D 在诱导玉米愈伤组织和胚性细胞的过程中起着决定性的作用。在 2,4-D 0.5 mg/L 诱导培养基中，只有 7922 诱导率达到 31.8%，并且接种的幼胚只能限制在 1 mm 以下，但诱导出的愈伤组织大多是 III 型愈伤，水渍状，分化能力很低。而其它幼胚的胚根胚芽一起生长，没能诱导出愈伤组织。

在 2,4-D 2.0 mg/L 的诱导培养基上，7922、4112 的愈伤诱导率都较高，且 7922 的出苗率也较高达到 76.4%，可是 4112 只有 12.7%，921 更低只有 4.5%。它们形成芽苗时主要以体胚发生方式为主。在 2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.1 mg/L+6BA 0.1 mg/L 的诱导培养基上，7922 以体胚发生方式形成芽苗，而 4112 在诱导愈伤组织的过程中表面直接形成绿色的不定芽，待绿芽点长到一定时候转入分化培养基，直接分化出小苗，小苗长至 3 ~ 4 cm 高时放入生根培养基生根。而 921 出愈率只有 18.9%，极易长出红色的气生根，形成苗时与 4112 一样是器官发生途径。

对于自交系 4112 生长素和细胞分裂素的相互协同作用，虽然诱导率比不加分裂素时要低，却可明显的提高芽苗率，可由 12.7%提高到 60.9%，如果 6BA 和 KT 的浓度和大于 0.5 mg/L，胚芽生长迅速，就会影响愈伤组织的诱导。

2.3.4 胚状体发生能力的保持

玉米幼胚一旦诱导出胚性愈伤组织，如果进行定期的继代和增殖培养，其胚发生能力可长期保持，这有利于玉米的遗传转化研究。我们将继代保持了 4 年之久的胚性愈伤组织齐 319 (山东大学提供)置于不含生长素的培养基上，几天后就能产生大量的

胚状体，胚状体进一步发育长大，形成独立的个体，最后形成完整的植株。

但随着继代次数的增加，胚发生能力和分化能力都有所下降。7922 的胚性愈伤组织继代 10 次以下和继代 25 次以上(每 15 d 继代一次)，同时用来分化，结果继代 10 次以下的比继代 20 次以上的愈伤组织早发生 4 d，且分化率和出苗率都高 30%以上。随着继代次数的增加，畸形苗比例也增加。如果在继代时挑选的组织块胚性不好，在今后的保持继代中也很容易丧失胚性。所以在长期继代保持中尽量挑选胚性好的组织块，减少继代次数。保持胚状体能力的期限到底是多长时间，有待于今后的研究和探讨。

3 讨 论

基因型是影响胚性愈伤组织诱导率的主要限制因子之一。基因型不同胚性愈伤诱导率和分化率有很大差异，且再生途径也不同。在供试的几个基因型中，7922 较适合体胚途径，而 8902、4112 较适合形成不定芽的器官发生再生途径。然而不定芽再生途径很难长期继代下来，在进行遗传转化时易形成嵌合体。而体胚途径形成的胚性细胞系可长期继代保存，只要在培养基中去掉 2,4-D 就可形成芽苗，在遗传转化时不受季节限制，是目前较为理想的遗传转化系统。但是随着继代次数的增加，变异率也随之增加。本实验中 7922 形成芽苗的频率为 76.4%，且主要以体胚发生为主，是遗传转化的良好受体材料。

2,4-D 在诱导愈伤组织中是起决定性作用的植物生长调节物质，无论是哪种再生途径诱导愈伤组织，2,4-D 都是不可缺少的，尤其是对胚状体诱导最

有效。在含 2,4-D 的培养基中诱导出胚性细胞团,此时是进行大量增殖和进行遗传转化的最佳时机,如果在培养基中去除 2,4-D 或降低细胞分裂素的含量就能产生大量的胚状体,胚状体进一步发育长大形成一个独立的个体,最后形成一株完整的植株。虽然此系统的胚胎发生频率较高,但还达不到完全同步,待今后继续研究。

细胞分裂素同样在以器官发生途径形成不定芽过程中是不可缺少的。8902、4112 在无分裂素的培养基内诱导出的愈伤组织,分化能力很差,形成的芽苗率极低,这对今后作为遗传转化系统是不利的。而在加入分裂素的培养基内诱导出的 4112 愈伤组织芽苗分化率高达 60.9%,但分裂素浓度不宜过高,最好控制在 0.3 mg/L 之内。而且再生途径并不是一成不变的,在一定的条件下是可以相互逆转的,例如,不同生理状态的幼胚再生途径就可能不一样,而不同大小的幼胚、不同的继代时间、不同的技术手法、不同的培养条件等都会导致再生系统的改变。我们必须根据实验的不同要求,掌握好时机和条件,使之向有利的再生系统转变。

本实验为玉米的遗传转化建立了良好的受体系统,我们正利用该系统进行东北玉米自交系的遗传转化工作,已取得了高效的瞬时表达,其它工作还正在进行中。

参考文献:

- [1] 李世润,张举人,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, 1990, 25(1): 116-124.
- [2] 周洪生. 甜玉米胚性愈伤组织诱导继代、植株再生的研究[J]. 作物学报, 1993, 19(1): 55-62.
- [3] 谢友菊,陈 鹏,戴景瑞. 玉米体细胞胚状体诱导及植株再生的研究[J]. 遗传学报, 1986, 13(2): 113-119.
- [4] 郭仲深,孔安慈,王玉英,等. 玉米花粉植株的诱导和雄核发育的研究[J]. 植物学报, 1978, 20(3): 204-208.
- [5] 周俊彦. 植物体细胞在组织培养中产生的胚状体 I. 植物体细胞的胚状体发生[J]. 植物生理学报, 1981, 7(4): 389-396.
- [6] 周俊彦. 植物体细胞在组织培养中产生的胚状体×影响植物体细胞的胚状体发生和发育的因素[J]. 植物生理学报, 1982, 8(1): 91-99.
- [7] 李 云,冯 慧,田砚亭. 葡萄再生系统研究进展[J]. 生物技术通报, 2001, (2): 28-31.
- [8] 裴新梧,王亚酸. 植物体细胞胚发生与作物育种[J]. 生物技术通报, 2000, (5): 15-17.
- [9] 袁 鹰,刘德璞,郑培和. 东北玉米自交系胚性愈伤组织的诱导[J]. 玉米科学, 2001, 9(1): 37-38.
- [10] Bhojwani S S, Hazdn M K. Plant tissue culture: theory and practice, Elsevier, Amsterdam, 1983, 91.
- [11] Matsuoko H, Hinata K. NAA Induced organogenesis and embryogenesis in hypocotyls callus of *Solanum melongena* L. J. Exp., 1979, 30: 363-370.
- [14] Lowe K, Taylor K B, Ryan P, et al. Plant regeneration via organogenesis and embryogenesis in the maize inbred line B73. Plant Science, 1985, 41: 125-132.
- [15] Rnodes C A, Green C E, Philips R L. Factors affecting tissue culture initiation from maize tassels. Plant Science, 1986, 46: 225-232.