

文章编号: 1005-0906(2007)02-0067-06

玉米自交系愈伤组织诱导及植株再生研究

姚 丹¹, 郝文媛², 沈 刚³, 关淑艳¹, 王丕武¹

(1. 吉林农业大学生物技术学院, 长春 130118; 2. 吉林省农业科学院生物技术研究中心, 长春 130124;

3. 通榆县农业局植保植检站, 吉林 通榆 137200)

摘 要: 以玉米自交系 7922、H99、P2、Mo17、吉 846、吉 63 等的幼胚为外植体诱导愈伤组织, 研究了不同培养基、不同激素种类和浓度及不同碳源的种类和浓度对愈伤组织诱导的影响。结果表明: NB 培养基的胚性愈伤组织诱导率最高; 对于不同基因型玉米自交系 2,4-D 浓度为 2 mg/L 时胚性愈伤组织诱导率均最高; 在以 20 g/L 蔗糖和 20 g/L 葡萄糖及 30 g/L 蔗糖和 10 g/L 葡萄糖作碳源的诱导培养基上愈伤组织诱导率最高, 但不能长期继代使用。对不同激素组合对玉米愈伤组织再生分化的影响进行了探讨。

关键词: 玉米; 培养基; 愈伤组织; 诱导率**中图分类号:** S513.035.2**文献标识码:** A

Study on Induction Embryogenic Callus and Plant Regeneration in Maize Inbred Lines

YAO Dan¹, HAO Wen-yan², SHEN Gang³, GUAN Shu-yan¹, WANG Pi-wu¹

(1. College of Biotechnology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118;

2. Institute of Biology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130124;

3. Plant Protection and Quarantine, Agricultural Bureau of Tongyu County, Tongyu 137200, China)

Abstract: In experiment, factors influencing the callus induction of immature embryos in maize inbred lines 7922, H99, P2, Mo17, Ji846, Ji63, etc. Such as different media, different concentrations of phytohormone, different carbon sources and their concentrations were studied. The results showed that NB was optimal media of callus induction on immature embryos in different maize inbred lines, concentration of 2,4-D 2 mg/L could obviously enhance inducing frequency, concentration of sucrose 20 g/L and 20 g/L glucose or sucrose 30 g/L and 10 g/L glucose was the better conditions of callus induction, but could not be used in long period. More over, this paper discussed the effects of different hormone on regeneration of maize callus.

Key words: Maize; Media; Embryogenic calli; Transformation frequency

玉米组织培养的研究已有几十年的历史。1954 年, Straus 等尝试在组织培养水平上对玉米进行研究。我国在 70 年代初开始了玉米花药培养选育纯系的研究。中国科学院遗传所于 1975 年首次诱导出玉米的花粉植株。1977 年, 中国科学院植物所和广西玉米研究所合作获得了花粉植株的自交果穗。1980 年, 吴甲林等以群单 105 的花药为外植体, 成功的

获得了“群花”玉米自交系。

目前, 在玉米的遗传转化中, 受体材料主要包括外植体、胚性愈伤组织、悬浮细胞系和原生质体。其中悬浮细胞的建立和原生质体因培养周期长、技术复杂、而且长期的继代培养可能使细胞丧失再生能力或产生突变, 限制了玉米悬浮细胞和原生质体转化的应用和发展; 外植体的来源部位和生理状态对植株再生有较大的影响。对玉米幼胚而言, 授粉 10 ~ 15 d、幼胚长度为 1.0 ~ 2.0 mm 时再生能力最强, 是理想的受体材料。但由于取材周期较短, 受季节性影响较大, 目前并没有得到广泛地应用。

胚性愈伤组织由外植体诱导形成, 目前应用最多的是以幼胚为外植体诱导愈伤组织。但由于玉米

收稿日期: 2006-10-03**基金项目:** “国家植物转基因中试及产业化基地”专项课题(J99-B-001)**作者简介:** 姚 丹(1977-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事玉米遗传转化研究。Tel: 13578754277

王丕武为本文通讯作者。

愈伤组织的诱导及培养受其基因型的影响较大,对于不同的玉米品系或品种的愈伤组织的诱导和继代培养、分化、生根等过程所要求的培养基成分、激素浓度、培养条件等许多因素有所不同,且以玉米自交系的幼胚为外植体诱导愈伤组织的难度远大于玉米的杂交种的幼胚为外植体的诱导愈伤组织。目前,有关利用东北地区常用的玉米自交系的幼胚为外植体诱导玉米的二倍体愈伤组织培养物的报道还甚少。

本实验以东北地区常用玉米自交系 7922、H99、P2、Mo17、吉 846、吉 63 等的幼胚为外植体对诱导胚性愈伤组织的几个重要影响因素进行研究,进一步扩大受体基因型范围,建立适应性强、稳定性好、适于农杆菌转化的受体系统。

1 材料与方法

1.1 供试材料

优良玉米自交系 7922、H99、P2、吉 63、吉 846、Mo17、综 31 及对照玉米自交系 E28 等,播种于吉林农业大学实验地中,7~8 月份进行人工授粉,取授粉 10~14 d 的雌幼穗作为诱导愈伤组织的受体材料。

1.2 培养基

基本培养基:MS 改良培养基

诱导培养基:基本培养基 +L- 脯氨酸 700 mg/L + 水解酪蛋 500 mg/L + 2,4-D 2 mg/L

继代培养基:基本培养基 +L- 脯氨酸 700 mg/L + 水解酪蛋 500 mg/L + 2,4-D 1 mg/L

以上培养基中均含 4% 蔗糖和 0.8% 琼脂,pH 5.8。

1.3 实验方法

取授粉 10~14 d 的雌幼穗扒去最外层数片苞叶,留 3~5 个苞叶,切去雌果穗头部无子粒部分,用

70%酒精浸泡 5~10 min,扒去所有苞叶及花丝后再用 5%的 NaCl 溶液浸泡 15~20 min,然后将果穗置于在超净工作台中,用无菌水冲洗 3 次,并割去中部子粒的上面 1/3 胚乳,挑出大小约 1.5~2.0 mm 的幼胚,盾片朝上接种于诱导培养基上,每皿约接种 15~20 个幼胚,26℃暗培养。20 d 后观察愈伤组织诱导状况,并统计愈伤组织诱导率。

2 结果与分析

2.1 培养基种类对愈伤组织诱导的影响

将授粉 10~14 d 不同基因型玉米幼胚分别接种于 MS、N₆、B5、MB、NB、NMB (NMB 为 N₆ 大量、MS 微量及 B5 有机;MB 为 MS 大量、B5 微量;NB 为 N₆ 大量、B5 微量)6 种诱导培养基中,20 d 后观察愈伤组织诱导情况,此时多为 I 型愈伤组织,统计愈伤组织出愈率;继代 2~3 次,大多数愈伤组织转化为稳定的 II 型愈伤组织时,统计胚性愈伤组织诱导率,统计结果见表 1。通过对 MS、N₆、B5、MB、NB 和 NMB 等 6 种培养基比较分析发现,对于不同基因型的玉米愈伤组织的诱导,这 6 种培养基均可诱导出胚性愈伤组织,但胚性愈伤组织的诱导率却有明显差异。综合以上 5 种基因型分析得出,NB 培养基的胚性愈伤诱导率最高,并且愈伤组织鲜黄色或浅黄色,虽然有轻微的生根现象,但愈伤组织表现良好的胚性;其次是 MB、N₆ 和 MS 培养基,胚性愈伤诱导率也较高,但不同基因型间存在一定的差异。自交系 7922 愈伤组织诱导中 MB>N₆>MS;自交系 H99 愈伤组织诱导中 N₆>MB>MS;自交系吉 63 愈伤组织诱导中 MS>N₆>MB。实验结果显示,愈伤组织诱导效果最差的是 NMB 培养基,不但愈伤组织诱导率较低,而且愈伤组织多为水渍状,并且多褐化和生根现象。

表 1 不同培养基对玉米愈伤组织诱导的影响

Table 1 The effect of different media on inducing maize callus

基因型	诱导培养基	接种幼胚数	产生愈伤组织数	愈伤组织诱导率(%)	胚性愈伤组织数	胚性愈伤组织诱导率(%)
Genotypes	Induction media	Number of immature embryos	Number of callus	Induction frequency of callus	Number of embryogenic	Induction frequency of embryogenic
7922	MS	55	48	87.27	19	34.55
	N ₆	52	47	90.38	21	40.38
	B5	55	32	58.18	13	23.64
	MB	60	50	83.33	27	45.00
	NB	60	52	86.67	32	53.33
	NMB	58	13	22.41	6	10.34
H99	MS	60	51	85.00	29	48.33
	N ₆	60	56	93.33	35	58.33
	B5	57	40	70.18	21	36.84

续表 1 Continued 1

基因型	诱导培养基	接种幼胚数	产生愈伤组织数	愈伤组织诱导率(%)	胚性愈伤组织数	胚性愈伤组织诱导率(%)
Genotypes	Induction media	Number of immature embryos	Number of callus	Induction frequency of callus	Number of embryogenic	Induction frequency of embryogenic
H99	MB	55	51	92.73	29	52.73
	NB	55	50	90.91	31	56.36
	NMB	58	21	36.21	12	20.69
	MS	60	52	86.67	31	51.67
	N ₆	60	56	93.33	36	60.00
	B5	57	31	54.39	19	33.33
	MB	55	52	94.55	34	61.82
	NB	58	54	93.10	38	65.52
	NMB	60	19	31.67	9	15.00
吉 63	MS	54	46	85.19	22	40.74
	N ₆	57	45	78.95	21	36.84
	B5	60	32	53.33	5	8.33
	MB	60	51	85.00	23	38.33
	NB	59	45	76.27	19	32.20
	NMB	60	15	25.00	2	3.33
E28	MS	60	56	93.33	28	46.67
	N ₆	60	58	96.67	32	53.33
	B5	60	49	81.67	21	35.00
	MB	52	48	92.31	23	44.23
	NB	58	53	91.38	39	67.24
	NMB	56	37	66.07	11	19.64

2.2 不同碳源对愈伤组织诱导及继代的影响

表 2 不同碳源对玉米愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of different carbon sources on inducing maize callus

基因型	碳源组合	接种幼胚数	产生愈伤组织数	愈伤组织诱导率(%)	胚性愈伤组织数	胚性愈伤组织诱导率(%)
Genotypes	Different carbon source	Number of immature embryos	Number of callus	Induction frequency of callus	Number of embryogenic	Induction frequency of embryogenic
综 31	I	47	37	78.72	15	31.91
	II	56	26	46.43	7	12.50
	III	52	29	55.77	9	17.31
	IV	57	19	33.33	17	29.82
	V	60	18	30.00	19	31.67
	VI	60	33	55.00	21	35.00
	VII	45	21	46.67	7	15.56
	VIII	55	20	36.37	3	5.45
	IX	49	14	28.57	5	10.20
Mo17	I	60	58	96.67	13	21.67
	II	57	55	96.49	14	24.56
	III	48	48	100.00	19	39.58
	IV	59	59	100.00	21	35.76
	V	55	53	96.36	23	41.82
	VI	51	48	94.12	3	5.88
	VII	60	57	95.00	11	18.33
	VIII	45	43	95.56	4	8.89
	IX	54	53	98.15	2	3.70
吉 846	I	59	58	98.31	25	42.37
	II	60	57	95.00	9	15.00

续表 2 Continued 2

基因型	碳源组合	接种幼胚数	产生愈伤组织数	愈伤组织诱导率(%)	胚性愈伤组织数	胚性愈伤组织诱导率(%)
Genotypes	Different carbon source	Number of immature embryos	Number of callus	Induction frequency of callus	Number of embryogenic	Induction frequency of embryogenic
吉 846	Ⅲ	55	55	100.00	8	14.55
	Ⅳ	47	46	97.87	18	38.30
	Ⅴ	60	58	96.67	21	35.00
	Ⅵ	51	50	98.04	5	9.80
	Ⅶ	49	47	95.92	11	22.45
	Ⅷ	53	50	94.34	3	5.66
	Ⅸ	57	54	94.74	3	5.26
	Ⅰ	48	48	100.00	19	39.58
	Ⅱ	55	54	98.18	13	23.64
E28	Ⅲ	60	57	95.00	17	28.33
	Ⅳ	54	53	98.15	31	57.41
	Ⅴ	57	56	98.25	23	40.35
	Ⅵ	45	43	95.56	13	28.89
	Ⅶ	41	36	87.80	9	21.95
	Ⅷ	58	57	98.28	4	6.90
	Ⅸ	55	53	96.36	7	12.73

注: Ⅰ: N₆ + 40 g/L 蔗糖; Ⅱ: N₆ + 40 g/L 葡萄糖; Ⅲ: N₆ + 40 g/L 果糖; Ⅳ: N₆ + 20 g/L 蔗糖 + 20 g/L 葡萄糖; Ⅴ: N₆ + 30 g/L 蔗糖 + 10 g/L 葡萄糖; Ⅵ: N₆ + 20 g/L 蔗糖 + 20 g/L 果糖; Ⅶ: N₆ + 30 g/L 蔗糖 + 10 g/L 果糖; Ⅷ: N₆ + 20 g/L 葡萄糖 + 20 g/L 果糖; Ⅸ: N₆ + 30 g/L 葡萄糖 + 10 g/L 果糖。

Note: Ⅰ: N₆ + 40g/L Sucrose; Ⅱ: N₆ + 40 g/L Glucose; Ⅲ: N₆ + 40 g/L Fructose; Ⅳ: N₆ + 20 g/L Sucrose + 20 g/L Glucose; Ⅴ: N₆ + 30 g/L Sucrose + 10 g/L Glucose; Ⅵ: N₆ + 20 g/L Sucrose + 20 g/L Fructose; Ⅶ: N₆ + 30 g/L Sucrose + 10 g/L Fructose; Ⅷ: N₆ + 20 g/L Glucose + 20 g/L Fructose; Ⅸ: N₆ + 30 g/L Glucose + 10 g/L Fructose.

由表 2 可知,以蔗糖、葡萄糖、果糖及其相应组合分别为诱导培养基碳源时,不同玉米基因型间存在一定的差异。综合实验结果分析发现,在以 20 g/L 蔗糖和 20 g/L 葡萄糖及 30 g/L 蔗糖和 10 g/L 葡萄糖作碳源的诱导培养基上愈伤组织诱导率较高,且愈伤组织鲜黄色或浅黄色,虽有轻微的褐化现象,但胚性愈伤组织状态较好。实验发现,保持此碳源浓度和组合不变对愈伤组织继代培养 1~2 次后,愈伤组织胚性有明显从Ⅱ型向Ⅰ型转变的趋势,愈伤组织由原来的有光泽、质地紧密逐渐转为质地松软、半透明块状,颜色发白,并且愈伤组织褐化较严重,这说明以 20 g/L 蔗糖和 20 g/L 葡萄糖及 30 g/L 蔗糖和 10 g/L 葡萄糖作碳源对愈伤组织诱导有一定的促进作用。但由于不能较好的保持愈伤组织胚性,因此,不能作为长期继代的碳源使用。以 40 g/L 蔗糖作碳源的培养基愈伤组织诱导率也较高,愈伤组织生长旺盛、无水渍现象,呈现致密坚硬状,颜色鲜黄,个别愈伤组织为黄白色,并且长期继代发现愈伤组织能保持其良好的胚性,这说明以 40 g/L 蔗糖为唯一碳源,既适合玉米愈伤组织的诱导及长期继代使用,又可以较好的保持愈伤组织的胚性。实验中还发现,单纯以 40 g/L 葡萄糖或 40 g/L 果糖作唯一碳源时,愈伤

组织诱导率较低,愈伤组织水渍现象较严重,并且愈伤组织有褐化现象,这可能是由于葡萄糖或果糖不能作为渗透调节物质,致使培养基渗透压较小而引起的。

2.3 不同激素种类和浓度对玉米愈伤组织诱导及继代的影响

在愈伤组织生长不同时期选择一个合适的激素浓度及配比,是诱导愈伤组织的关键。研究了生长素 2,4-D 及细胞分裂素 6-BA 和 KT 的不同浓度、不同配比对愈伤组织诱导的影响。结果表明,2,4-D 是玉米幼胚诱导愈伤组织必不可少的生长调节剂,对于不同基因型玉米自交系 2,4-D 浓度为 2 mg/L 时胚性愈伤组织诱导率均最高,并且愈伤组织生长旺盛、颜色鲜艳、多呈颗粒状,表现出愈伤组织具有良好的胚性。但继续培养愈伤组织发现,2,4-D 浓度降为 1 mg/L 时有利于愈伤组织保持其胚性。另外在继代过程中还应根据愈伤组织的生长状态及时调整 2,4-D 浓度,当分化明显时,适当提高 2,4-D 浓度;当愈伤组织生长缓慢、颜色变暗时,应适当增加 2,4-D 浓度。2,4-D 浓度为 1 mg/L 时幼胚易萌发,但胚性愈伤组织诱导率偏低;2,4-D 浓度高于 2 mg/L 时,愈伤组织诱导率明显下降,愈伤组织多为水渍、粘稠状态;

当 2,4-D 浓度达到 4 mg/L 时,愈伤组织诱导率极低甚至不能诱导出愈伤组织;少量的6-BA 和 KT 对愈

伤组织诱导没有明显地促进作用, 并且发现其愈伤组织不稳定,极易分化。

表 3 不同激素对玉米愈伤组织诱导的影响
Table 3 The effect of different phytohormone on inducing maize callus

基因型 Genotypes	激素组合 Different Phytohormone	接种幼胚数 Number of immature embryos	产生愈伤组织数 Number of callus	愈伤组织诱导率(%) Induction frequency of callus	胚性愈伤组织数 Number of embryogenic	胚性愈伤组织诱导率(%) Induction frequency of embryogenic
7922	①	59	14	23.73	0	0
	②	45	39	86.67	3	6.67
	③	52	31	59.62	2	3.85
	④	55	47	85.45	6	10.91
	⑤	49	41	83.67	4	8.16
	⑥	57	48	84.21	26	45.61
	⑦	59	18	30.51	2	3.39
	⑧	60	56	93.33	18	30.00
Mo17	①	55	18	32.73	0	0
	②	60	24	40.00	5	8.33
	③	49	17	34.69	2	4.08
	④	51	46	90.20	3	5.88
	⑤	59	55	93.22	2	3.39
	⑥	45	45	100.00	13	28.89
	⑦	56	21	37.50	0	0
	⑧	60	57	95.00	7	11.67
吉 846	①	60	56	93.33	4	6.66
	②	59	54	91.53	6	10.17
	③	57	53	92.98	13	22.81
	④	49	46	93.88	5	10.20
	⑤	52	50	96.15	10	19.23
	⑥	60	58	96.67	31	51.67
	⑦	55	53	96.36	0	0
	⑧	45	43	95.56	5	11.11
E28	①	55	18	32.73	0	0
	②	59	28	47.46	7	11.86
	③	46	15	32.61	4	8.70
	④	51	17	33.33	6	11.76
	⑤	60	35	58.33	4	6.66
	⑥	60	57	95.00	34	56.67
	⑦	49	22	44.90	2	4.08
	⑧	57	56	98.25	27	47.37

注:①:N₆ + 4 mg/L 2,4-D + 2 mg/L 6-BA; ②:N₆ + 4 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L KT; ③:N₆ + 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L 6-BA; ④:N₆ + 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L KT; ⑤:N₆ + 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA; ⑥:N₆ + 2 mg/L 2,4-D; ⑦:N₆ + 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA; ⑧:N₆ + 1 mg/L 2,4-D。

2.4 玉米愈伤组织再生、分化培养

研究发现,体细胞组织的体外再生主要取决于培养基环境能否满足外植体细胞脱分化及在分化过程中生理及代谢上的需要。在以 MS 改良培养基为分化基本培养基的基础上,将 P 2 的胚性愈伤组织分别接种于含有 6-BA、IBA、KT 3 种不同外源激素组合的分化培养基上,30 d 后统计愈伤组织在不同外源激素组合分化培养基上的出苗率,确定不同激

素对玉米愈伤组织再生分化的影响,统计结果见表 4。实验结果表明,在组合④MS+6-BA 1 mg/l+KT 2 mg/L 的分化培养基中出苗率最高,且苗较壮,多为单生苗,生根培养时根系较好,易成活;组合①、②、⑦、⑨的分化出苗率也较高,但多为丛生苗,常因过分拥挤而生长不良,生根培养时根系生长较差,不易成活;组合⑤、⑥中仅添加 IBA 时,发现愈伤组织不易变绿,且分化率极低。

表 4 不同激素组合对玉米愈伤组织再生分化的影响
Table 4 Effects of different hormone to regeneration of maize callus

不同激素组合 Different hormone	愈伤组织块数 Number of callus	愈伤组织出苗数 Number of callus with shoot	愈伤组织出苗率(%) Percentage of callus with shoot
①MS+1 mg/L 6-BA	60	22	36.7
②MS+6-BA 1 mg/L + IBA 0.4 mg/L	60	20	33.3
③MS+6-BA 1 mg/L+ KT 1 mg/L	60	15	25.0
④MS+6-BA 1 mg/L+ KT 2 mg/L	60	32	53.3
⑤MS+IBA 0.5 mg/L	60	4	6.7
⑥MS+IBA 1 mg/L	60	4	6.7
⑦MS+KT 1 mg/L	60	18	30.0
⑧MS+KT 2 mg/L	60	10	16.7
⑨MS+IBA0.5 mg/L+KT 1 mg/L	60	27	45.0

3 结 论

玉米自交系幼胚受体系统的诱导国内外已进行了大量的研究，但目前报道的农杆菌介导法转化的玉米外植体材料多为 A118、B73 及其衍生系，有很大的基因型限制。本实验以玉米自交系 7922、H99、P2、吉 846、吉 63 等授粉 10 ~ 14 d 的幼胚为受体材料,通过优化培养条件,对以幼胚为外植体诱导愈伤组织的几个重要影响因素进行研究。结果发现,对于不同基因型的玉米愈伤组织的诱导,MS、N₆、B5、MB、NB 和 NMB6 种培养基均可诱导出胚性愈伤组织,但诱导愈伤组织的转化率却有明显的差异,其中 NB 培养基的胚性愈伤诱导率最高，并且愈伤组织表现良好的胚性；对于不同基因型玉米自交系 2,4-D 浓度为 2 mg/L 时胚性愈伤组织诱导率均最高;同时实验还证明,在以蔗糖、葡萄糖、果糖及其相应组合分别为诱导培养基碳源时，不同玉米基因型间存在一定的差异，在以 20 g/L 蔗糖和 20 g/L 葡萄糖及 30 g/L 蔗糖和 10 g/L 葡萄糖作碳源的诱导培养

基上愈伤组织诱导率较高，且胚性愈伤组织状态较好,但不能长期继代使用。

参考文献:

[1] Strolus J, et al. Maize endosperm tissue grown in vitro cultural requirements[J]. American Joviral of Botany, 1954, 41: 687-694.

[2] 吴甲林. 花药培养育成玉米纯系及其杂交组合的试种[J]. 中国科学, 1983, 13(2): 154-161 .

[3] 中国科学院遗传研究所组织培养实验室. 诱导玉米花粉植株的初步研究[J]. 遗传学报, 1975, 2(2): 138-143 .

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

[5] 吕芝香,等. 碳源种类和浓度对愈伤组织生长的影响[J]. 植物生理学通讯, 1981, 7(6): 1-5 .

[6] 孙宗修,等. 麦芽糖提高水稻花药培养效率的研究[J]. 中国水稻科学, 1993, 7(4): 227-231 .

[7] Fowler M W, Waston R, Lyons J. Cong.plant Tissue and Cell Culture[J]. Plant Tissue Culture. 1982, 6(5): 221- 225.

[8] 梁海曼. 农作物组织培养[M]. 上海:上海科技出版社, 1991 .

(责任编辑: 朴红梅)