

玉米胚性愈伤组织诱导与分化的影响因素

高武军¹,孙富丛¹,魏开发¹,卢龙斗¹,王景雪²

(1. 河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007;2. 山西农业生物技术研究中心,山西 太原 030021)

摘要:以玉米自交系黄早 4、综 31、金黄 96B、GY237、478 及海 921 为材料,通过改良培养基上附加成分的组成及浓度,对影响玉米胚性愈伤组织的诱导及分化等几个关键因素进行了研究。结果表明,基因型对玉米胚性愈伤诱导的影响是显著的,而且基因型和基本培养基之间存在互作;在培养基上附加水解酪蛋白(casein hydrolysate,CH)、L-脯氨酸(L-proline)对于玉米胚性愈伤组织的诱导分化是必要的,而附加 L-谷氨酰胺、甘露醇、AgNO₃ 对提高胚性愈伤组织的诱导作用不显著;结果还发现胚性愈伤组织诱导培养基和胚性愈伤组织分化培养基的组合对成苗率有明显的影响作用。

关键词:玉米;胚性愈伤;诱导与分化

中图分类号:SS13.01 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2005)01-0027-04

Factors of Influencing Maize Embryogenic Callus Induction and Differentiation

GAO Wu-jun¹,SUN Fu-cong¹,WEI Kai-fa¹,LU Long-dou¹,WANG Jing-xue²

(1. College of Life Science of Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Agricultural Biotechnology Research Centre of Shanxi, Taiyuan 030031, China)

Abstract: In this article, young embryo of maize inbred lines huangzao 4, zong 31, jinhuang 96B, GY237, 478, and hai 921 were cultured *in vitro* and some important factors affecting maize embryogenic callus induction and differentiation were studied. The results indicated that genotype has remarkable effect on embryogenic callus induction, moreover there is interactive relation between genotype and base medium. Supplementary CH(casein hydrolysate) and L-proline was requisite to embryogenic callus induction on medium. L-Glutamine, inositol, mannitol, AgNO₃ had little effect on embryogenic callus induction. The combination of embryogenic callus induction and differentiation base medium had a large effect on embryogenic callus differentiation.

Key words: Maize; Embryogenic callus; Induction and differentiation

玉米是世界上主要的粮食作物之一,自 20 世纪 80 年代以来植物转基因技术为培育优良的玉米品种资源提供了全新的途径,其中组织培养是这一技术的关键环节之一。自 1975 年^[1]以来已经从包括玉米幼胚^[2,3]、未成熟花序^[4]、小孢子^[5]、胚叶^[6]、雌雄幼穗^[7]等多种外植体诱导出愈伤组织。但是由于玉米品系众多、遗传背景复杂、离体培养影响因子多且相互作用等因素的影响,仍存在玉米组织培养愈伤诱导率低、质量不稳定、实验重复性差、再生植株成活率低等

多重困难。因此,本实验选用多个优良玉米自交系系统研究了玉米愈伤组织的诱导和分化条件,为以后的基因转化工作打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

玉米自交系黄早 4、综 31、金黄 96B、GY237、478 及海 921 由山西农业生物技术研究中心王景雪研究员提供。

收稿日期:2004-08-11

基金项目:河南省科技攻关项目(0124160310);河南师范大学青年基金项目(20040011);河南师范大学青年骨干教师项目资助

作者简介:高武军(1973-),男,山西芮城人,讲师,主要从事植物分子遗传和基因工程研究工作。

1.2 实验用培养基

基本培养基改良 MS、改良 N6、MB 和 NB 的组成见文献[8]。

胚性愈伤组织诱导培养基:改良 N6/改良 MS/MB/NB+1.5 mg/L 2,4-D+500 mg/L 水解酪蛋白+700 mg/L L-脯氨酸+30 g/L 蔗糖+10 mg/L AgNO₃+300 mg/L L-谷氨酰胺+6.5 g/L 琼脂。

胚性愈伤组织分化培养基:改良 N6(NB)+0.5 mg/L 6-BA+1 mg/L KT+1 mg/L ABA+6.5 g/L 琼脂。

壮苗培养基:1/2 NB+1 mg/L NAA+6.5 g/L 琼脂(最后一次 5 g/L)。

培养基 pH 值均调整到 5.8。

1.3 方法

1.3.1 基因型和基本培养基对胚性愈伤组织诱导的影响 取人工授粉后 9~12 d 的雌穗,在室内剥去苞叶,先用 70% 酒精擦拭表面,然后用 0.1% HgCl₂ 浸泡 5 min,再用无菌水冲洗 4~5 次,用刀片切去 3/5 子粒,挑出幼胚,盾片朝上分别接种于诱导愈伤组织培养基诱导愈伤,温度为 25 ℃,暗培养,14 d 继代 1 次,28 d 后统计愈伤率,每处理 3 个重复,求其平均

值。

1.3.2 不同附加物对胚性愈伤组织诱导的影响 将水解酪蛋白、L-脯氨酸、L-谷氨酰胺、肌醇、甘露醇、AgNO₃ 6 种附加物以 9 种组合方式,添加在以 N6 为基本培养基的胚性愈伤组织诱导培养基上(含 2,4-D 1.5 mg/L),培养基的编号分别为 1,2,3,4,5,6,7,8,9,以不加附加物的培养基作为对照。取综 31 幼胚按照 1.3.1 方法接种在上述培养基上,27 ℃ 暗培养 14 d。14 d 后继代 1 次,培养温度降为 25 ℃,光照 12 h,28 d 后统计胚性愈伤组织诱导率,每处理 3 次重复,取平均值作为胚性愈伤组织诱导率。

1.3.3 愈伤组织分化培养基对成苗率的影响 取综 31 幼胚按照 1.3.1 方法接种在 N6 和 NB 上分别诱导胚性愈伤,暗培养,温度 25 ℃,14 d 继代 1 次,28 d 后分别交叉在 N6 和 NB 上诱导分化,激素均为 KT(1 mg/L)+BA(0.5 mg/L),温度 25 ℃,光照 12 h,21 d 后统计成苗率。

1.3.4 再生苗的壮苗移栽 胚性愈伤分化苗长至 3 cm 左右移栽到壮苗培养基上,至 10 cm 左右在无菌环境下缓慢洗净根上的琼脂块移栽到疏松潮湿的无菌土壤中,遮荫培养 7 d 后再移栽到温室中。

表 1 不同附加物的胚性愈伤组织诱导培养基的组成

Tab.1 Composition of different supplementary medium

编号 No.	水解酪蛋白(mg/L) CH	L-脯氨酸(mg/L) L-proline	L-谷氨酰胺(mg/L) L-Glutamine	肌醇(mg/L) Inositol	甘露醇(g/L) Mannitol	AgNO ₃ (mg/L) AgNO ₃
ck	0	0	0	0	0	0
1	500	700	0	0	0	0
2	500	700	300	0	0	0
3	500	700	300	100	0	0
4	500	700	300	100	10	0
5	500	700	300	100	0	5
6	500	700	300	100	0	10
7	500	700	300	100	0	15
8	500	700	300	100	0	20
9	500	700	300	100	10	10

2 结果与分析

2.1 基因型和基本培养基对胚性愈伤组织诱导的影响

表 2 结果表明了基因型和基本培养基对胚性愈伤组织诱导频率的影响。同一基因型在不同的基本培养基上其胚性愈伤组织诱导率(胚性愈伤组织诱导率(%)=胚性愈伤总数/外植体总数×100)是不同的,如综 31 在 4 种基本培养基上,最高胚性愈伤组织诱导率为 56.3%,最低为 42.2%。在相同的培养基 MS 上,6 种基因型的玉米的胚性愈伤组织诱导率差异也达到显著水平,如 GY237 胚性愈伤率为 63.2%,而 478 只有 7.3%。试验中除 478 外,其他 5 个基因型都能诱导出 I 型和 II 型愈伤组织,但诱

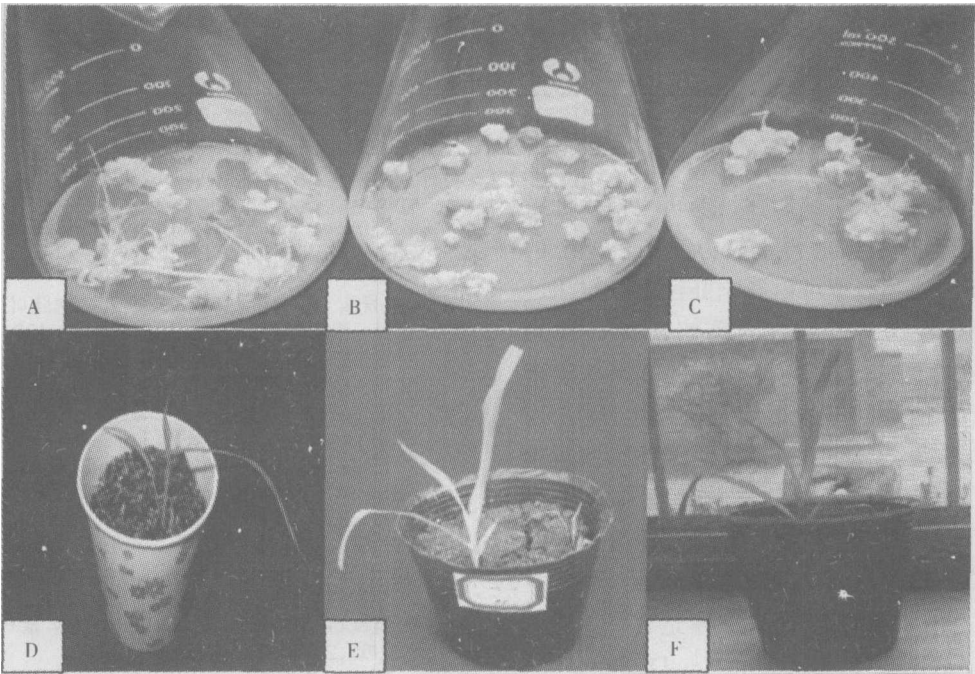
导频率相差很大,如 GY237 在 NB 培养基上胚性愈伤组织诱导率可达 71.3%。而农艺性状较好的 478 即便改进培养条件也难诱导出典型的胚性愈伤组织。试验中还发现不同基因型的胚性愈伤组织的发生不一样,黄早 4 在 NB 上一开始就能诱导出的胚性愈伤组织(图 1-B),且大多为 II 型愈伤,淡黄色,分散性很好,极易扩增。综 31 在改良 N6 培养基上虽然容易产生须状不定根,但是和在 NB 培养基上一样可以诱导出白色、坚硬、表面有皱褶的 I 型和 II 型愈伤,这些愈伤组织在随后的继代培养中,逐渐产生淡黄色的胚性愈伤组织,并有较强的继代能力(图 1-A,C)。由此看来,胚性愈伤组织的诱导频率与基因型和基本培养基的选择密切相关,与基因型关系更为密切,但是这种数据上显示的基因

型对胚性愈伤组织诱导的决定作用,到底是玉米组 要进一步研究。
织内在物质决定还是培养条件没有达到最佳状态需

表 2 基因型和基本培养基对胚性愈伤组织诱导的影响
Tab.2 Effect of different genotype and base medium on embryogenic callus induction

基因型 Geno- type	MS			N6			MB			NB		
	外植体数	胚性愈伤	诱导率	外植体数	胚性愈伤	诱导率	外植体数	胚性愈伤	诱导率	外植体数	胚性愈伤	诱导率
	(个) No. EP	(个) No. EC	(%) FEC	(个) No. EP	(个) No. EC	(%) FEC	(个) No. EP	(个) No. EC	(%) FEC	(个) No. EP	(个) No. EC	(%) FEC
黄早 4	121	70	59.5	111	72	64.9	147	81	55.1	121	51	42.1
综 31	135	61	45.2	135	69	51.1	135	57	42.2	135	76	56.3
金黄 96B	104	48	46.1	147	53	36.1	139	64	46.1	108	48	44.4
478	137	10	7.3	156	19	12.2	121	6	4.9	139	7	5.0
GY237	155	98	63.2	102	60	58.8	104	70	67.3	143	102	71.3
海 921	169	61	36.1	136	19	24.0	159	53	33.3	133	40	30.1

Notes:No. EP:No. of explant;No. EC:No. of embryogenic Callus;FEC:Frequency of embryogenic callus



A:综 31 在改良 N6 上的胚性愈伤;B:黄早 4 号在 NB 上的胚性愈伤;C:综 31 在 NB 上的胚性愈伤;D,E,F 移栽成活的玉米植株
A:Zong 31 embryogenic callus(refine N6);B:Huangzao 4 embryogenic callus(NB);C:Zong 31 embryogenic callus(NB);
D,E,F: Maize plant of transplant

图 1 玉米愈伤组织和移栽植株

Fig.1 Maize callus and transplants

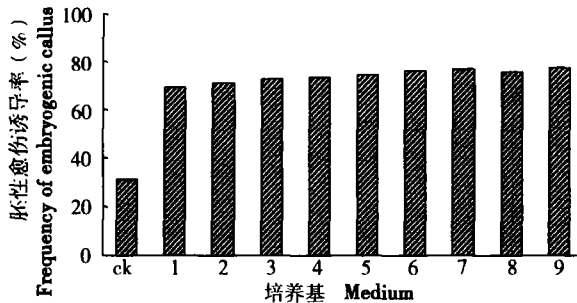


图 2 不同附加物对胚性愈伤组织诱导率的影响

Fig.2 Effect of different supplementary to embryogenic callus induced frequency

2.2 不同附加物对胚性愈伤组织诱导的影响

由图 2 可以看出,500 mg/L 的水解酪蛋白与 700 mg/L 的 L-脯氨酸对提高胚性愈伤率的作用是显著而且必要的,L-谷氨酰胺、甘露醇和 AgNO₃ 对胚性愈伤的诱导率的提高作用不显著。由 6,7,8 号培养基的试验结果可以看出,AgNO₃ 的作用明显存在一个临界值,当超过 15 mg/L 时胚性愈伤诱导率会降低。试验中还发现,虽然甘露醇和 AgNO₃ 对胚性愈伤诱导率提高作用不显著,但是他们的存在有助于改善胚性愈伤的质量。对于 AgNO₃ 在植物组织培养中的作用也一直是研究者所关注的重要问

题,一般认为 Ag^+ 是一种乙烯合成的抑制剂,它可以通过竞争性结合与细胞膜上的乙烯受体蛋白从而阻止或降低乙烯的作用^[8],从而降低植物细胞的死亡。在油菜的组织培养中我们也发现 $AgNO_3$ 的存在是必须的而且同样存在一个临界值^[9],这主要是由于 Ag^+ 对于植物组织的毒害作用所致。

2.3 愈伤组织分化培养基对成苗率的影响

表3的结果表明,胚性愈伤组织诱导和分化培

养基对于植株成苗率(成苗率(%) = 正常苗总数/胚性愈伤总数 $\times 100$)有明显的影响,如在其他条件相同的情况下,综31在NB上诱导愈伤并分化的成苗率可达70.7%,而在NB上的诱导组织愈伤在N6上分化的成苗率最高也只有31.1%,出苗率低且时间较长。试验中发现,4号培养基的成苗率虽然也达到51.8%,但是分化速度较慢,苗纤细。移栽成活的苗见图1(D,E,F)。

表3 愈伤组织分化培养基对成苗率的影响

Tab.3 Effect of frequency of plant on embryogenic callus differentiation medium

编号 No.	愈伤诱导培养基 Induction medium	分化培养基 Differentiation medium	胚性愈伤总数(个) Embryogenic callus	正常苗总数(个) No. plant	成苗率(%) Frequency of plant
1	NB	N6	106	33	31.1
2	NB	NB	99	70	70.7
3	N6	N6	78	8	10.3
4	N6	NB	83	43	51.8

3 讨论

基因型是影响玉米组织离体培养再生植株的重要因素,现已明确外植体的再生能力受染色体上的基因调控。不同的基因型可以影响胚性愈伤组织的诱导率,影响胚性保持及胚性愈伤组织的分化频率^[10]。即使在相同的条件下,不仅有的基因型玉米具有显著高于其他基因型的细胞分化再生能力,而且以其为亲本的杂交后代也表现较高的体细胞再生能力^[11],说明玉米基因型对体细胞再生有决定作用。其次在近年来的玉米组织培养研究中寻找新的附加物来提高胚性愈伤组织的诱导率和质量也取得较大的进展,目前发现在培养基中补充有机氮^[12]、活性炭^[13]、 $AgNO_3$ ^[14]、Ethylene^[15]、Dicamba^[16]、 Vc ^[10]、高浓度的 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} ^[17] 等物质对于胚性愈伤组织的诱导与分化都有一定的作用。因此,就玉米材料本身的特殊性来说,对每一次试验进行包括培养基、激素、培养条件等因素的优化选择是必要的,其次建立一套重复性高、实用性强的玉米离体组织培养技术体系仍是今后玉米离体培养需要研究的主要问题之一。

参考文献:

- [1] Green C E, Phillips R L. Plant regeneration from tissue cultures of maize[J]. Crop Science, 1975,15:417-418.
- [2] 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.
- [3] 季良越,孙晓丽,韦小敏,等. 玉米胚性愈伤组织诱导和植株再生研究[J]. 河南农业大学学报, 2002,36(2): 101-105.
- [4] Songstad D D, Peterson W L, Armstrong C L. Establishment of friable embryogenic (type II) callus from immature tassels of *Zea mays* (Poaceae) [J]. Am J Bot, 1992,79:761-764.
- [5] M Nageli J E, Schmid P, Stamp B, et al. Improved formation of regenerable callus in isolated microspore culture of maize: impact of carbohydrates, plating density and time of transfer[J]. Plant Cell Reports, 1998, 19:177-184.
- [6] 王景雪,孙毅,高武军,等. 玉米胚叶再生植株研究[J]. 作物学报, 2002,28(1):136-139.
- [7] 吴家道,黄忠祥. 玉米体细胞培养中胚状体的发生[J]. 植物生理学通讯, 1985,(2):13-17.
- [8] Mckeronta, Yang S F. Biosynthesis and metabolism of ethylene[A]. In: Davies P J (ed). Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development[M]. Dordrecht, the Netherlands: Martinus Nijhoff Publ, 1989. 94-112.
- [9] 高武军,王景雪,卢龙斗. 硝酸银在油菜基因转化中的影响作用[J]. 中国农学通报, 2002,18(4):43-45.
- [10] 李世润,张举仁,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(自然科学版), 1990,25(1):116-124.
- [11] Hodges T K, Kamo K K, Imbrie C W, et al. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize[J]. Bio/Technol, 1986,4:219-223.
- [12] Kamada H, Harada H. Studies on the organogenesis in carrot tissue culture. II Effects of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis [J]. Z Pflanzenphysiol, 1979,91:453-467.
- [13] 郭仲琛,陆文梁. 玉米花粉愈伤组织产生胚状体的细胞形态学研究[J]. 植物学报, 1984,26(1):19-23.
- [14] Songstad D D, Armstrong C L, Peterson W L. Silver nitrate increases type II callus production from immature embryos of maize inbred B73 and its derivatives[J]. Plant Cell Rep, 1991,9:699-702.
- [15] Vain P, Flament P, Soudain P. Role of ethylene in embryogenic callus initiation and regeneration in *Zea mays* L[J]. J Plant Physiol, 1989,135:537-540.
- [16] Carvalho C H S, N Bohorova P N, Bordallo L, et al. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes[J]. Plant Cell Reports, 1997,17: 73-76.
- [17] S zhang R, Williams-Carrier P G, Lemaux. Transformation of recalcitrant maize elite inbreds using *in vitro* shoot meristematic cultures induced from germinated seedlings[J]. Plant Cell, 2002,21:263-270.