

楚海娇,李 闯,关淑艳. 4 种玉米自交系幼胚遗传再生体系的建立[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):66-68.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.014

4 种玉米自交系幼胚遗传再生体系的建立

楚海娇¹, 李 闯², 关淑艳³

(1. 吉林农业科技学院生物工程学院,吉林吉林 132101; 2. 吉林农业科技学院,吉林长春 136105;
3. 吉林农业大学生物技术学院,吉林长春 130118)

摘要:选取 4 种玉米自交系 H99、A188、7922 和 1322 的幼胚作为外植体,接种于 10 种不同诱导培养基上,诱导愈伤组织并建立遗传再生体系,同时探讨了不同基因型、培养基种类、幼胚大小、蔗糖浓度、激素浓度和对比对愈伤组织诱导率的影响。结果表明:基因型对愈伤组织诱导率高低影响显著,4 种基因型玉米幼胚在诱导培养基中均产生了愈伤组织,但继代培养后只有 H99 能诱导出胚性愈伤组织,诱导率为 46.2%;对于不同基因型培养基诱导效果依次为 N₆ > MB > MS;选择幼胚长度为 1.5 ~ 2.0 mm、添加蔗糖浓度为 30 g/L、2,4-D 浓度为 2.0 mg/L 及 AgNO₃ 浓度为 10 mg/L 时玉米愈伤组织诱导率最高且质量较好。

关键词:玉米;再生体系;自交系;愈伤组织诱导率

中图分类号: S513.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0066-03

我国是世界玉米大国,玉米作为重要的粮、饲作物对我国经济发展和市场稳定具有举足轻重的作用^[1]。可以通过基因工程手段改良玉米的品种和农艺性状,而建立高效的体细胞再生体系是遗传转化的关键。玉米优良基因型遗传再生体系的建立一直是人们研究的热点^[2]。玉米首次诱导出愈伤组织是 Larue 在 1949 年用甜玉米的胚作为外植体,但未获得再生植株。直到 1975 年,Green 等用 A188 的未成熟胚作外植体,诱导出二倍体愈伤组织,并获得再生植株,从而得到了第 1 株无性系植株^[3]。目前,已从多种外植体中诱导出愈伤组织,并再生植株。而以玉米幼胚为外植体进行培养,诱导愈伤组织的效率高、再生能力强,可大大提高育种效率。玉米组织培养的影响因素较为复杂,一些优良自交系的组织培养还存在一定困难。本试验设计了 10 种不同诱导培养基对 4 种优良玉米自交系的愈伤组织进行诱导,并再生植株,目的是探寻出这 4 种玉米自交系遗传再生体系建立的条件,为建立高效的玉米转基因受体系统奠定基础。

1 材料与与方法

收稿日期:2015-11-10
基金项目:吉林农业科技学院青年基金项目(编号:吉农院合字[2013]第 210 号)。
作者简介:楚海娇(1984—),女,吉林辽源人,硕士,助教,研究方向为玉米遗传转化。E-mail:chuhaijiao1227@163.com。
通信作者:关淑艳,博士,副教授,主要从事生物技术在作物遗传育种中的应用研究。E-mail:fengrongl@163.com。

[7]Klauck S M, Felder B, Kolb - Kokocinski A, et al. Mutations in the ribosomal protein gene *RPL10* suggest a novel modulation disease mechanism for autism [J]. *Molecular Psychiatry*, 2006, 11 (12) : 1073 - 1084.

[8]田 媛,张俊平. 核糖体蛋白质的新功能及其与相关疾病的关系[J]. *生命科学*, 2011, 31(4):488 - 491.

- 1.1 材料
优良玉米自交系 H99、A188、7922 和 1322 的幼胚。
- 1.2 培养基
1.2.1 诱导培养基 本试验设计了 10 种基本培养基进行愈伤组织的诱导研究(表 1)。

表 1 诱导培养基及其成分

培养基	成分(mg/L)			
	基本培养基	2,4-D	硝酸银	6-BA
N ₆ 1	诱导 N ₆	1	0	0
N ₆ 2	诱导 N ₆	2	0	0
N ₆ 3	诱导 N ₆	3	0	0
N ₆ 4	诱导 N ₆	4	0	0
N ₆ 5	诱导 N ₆	2	10	0
N ₆ 6	诱导 N ₆	2	10	0.5
MB1	诱导 MB	1	0	0
MB2	诱导 MB	2	0	0
MB3	诱导 MB	3	0	0
MS	诱导 MS	2	0	0

- 1.2.2 继代培养基 继代培养基添加 2,4-D 的浓度为 1 mg/L。
- 1.2.3 分化培养基 分化培养基添加 IBA 0.8 mg/L 和 6-BA 1.5 mg/L。
- 1.2.4 生根培养基 生根培养基添加 NAA 1.5 mg/L 和活性炭 1.5 g/L。
- 1.3 方法
1.3.1 玉米幼胚的剥离 在超净工作台上对授粉 13 d 左右

[9]杨爱初,李森华,陈 刚,等. 苯中毒与多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶假基因多态等的相关性研究[J]. *中国职业医学*, 2005, 32(4): 15 - 17.

[10]唐录英,任泽舫,庄志雄,等. 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶假基因多态性分布及其与肺癌易感性的关系[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2002, 19(2):124 - 126.

的幼胚进行消毒,冲洗。挑取不同大小的幼胚接种于诱导培养基上,每皿接种 30 个幼胚,25 ℃ 避光条件下培养 15 d 左右(其中经过 2 次去芽处理),产生 I 型初始愈伤组织。筛选出淡黄色、颗粒状、表面干燥的愈伤组织进行继代培养、分化培养、生根培养及移栽。

1.3.2 愈伤组织诱导率的计算 公式如下:

愈伤组织诱导率 = 愈伤组织块数/接种幼胚数 × 100% ;
胚性愈伤组织诱导率 = 胚性愈伤组织块数/接种幼胚数 × 100% 。

2 结果与分析

4 种基因型玉米幼胚在最适培养基中均能产生初始愈伤组织。继代培养后,自交系 H99 形成了松脆、淡黄色颗粒状的 II 型愈伤组织;自交系 A188 和 7922 的愈伤组织多为乳白色、硬壳状,不易继代;1322 产生的愈伤组织结构松软、黏稠状,继代后易褐变,后两者为非胚性愈伤组织。

2.1 基因型对诱导率的影响

基因型不同,愈伤诱导率存在差异^[4]。继代 2 ~ 3 次后,统计胚性愈伤组织诱导率。其中 H99 的诱导率最高,达 46.2%,最低为 A188,只有 10.0%。随着继代次数的增加,只有 H99 能保持良好的生长状态,形成结构松散的 II 型愈伤组织;A188 和 7922 逐渐褐化死亡;1322 在继代后多出现松软黏稠状的愈伤组织,诱导率下降(表 2)。说明继代中愈伤组织的生长对基因型的依赖性很强。

表 2 基因型对诱导率的影响

基因型	最适培养基	胚性愈伤组织诱导率 (%)
H99	N ₆ 5	46.2
A188	MB3	10.0
7922	N ₆ 5	10.3
1322	N ₆ 5	26.7

2.2 培养基对诱导率的影响

分别采用 3 种基本培养基对玉米幼胚进行诱导,从表 3 中可以看出,采用不同的培养基,诱导情况差异显著。使用 N₆ 培养基,4 种基因型的诱导率均较高。但 H99 和 1322 在 N₆ 培养基中出愈率最高,分别为 46.2% 和 26.7%;对于 A188 而言,最适培养基为 MB;对于 7922 来说,N₆ 和 MB 培养基均可诱导出愈伤组织,但胚性均不高;4 种基因型在 MS 培养基中均诱导不出胚性愈伤组织。

2.3 幼胚长度对诱导率的影响

有研究证明,基因型相同时幼胚大小对愈伤组织诱导率有影响^[5]。本试验挑取基因型 H99 和 A188 不同长度幼胚进行愈伤组织诱导发现:幼胚长度为 2.0 mm 时,愈伤组织诱导率最高,且生长良好;当幼胚长度小于 1.5 mm 时,愈伤生长缓慢,诱导率呈下降趋势;当幼胚长度大于 2.0 mm 时,幼胚根芽分化现象比较严重,用镊子将根芽夹去,可以提高幼胚出愈率(表 4)。因此认为,幼胚长度为 1.5 ~ 2.0 mm 时较适宜接种。

2.4 蔗糖浓度对诱导率的影响

在植物组织培养的培养基中,需要碳源为植物组织提供能量,实验室多采用蔗糖作为碳源物质。因为蔗糖能更好地

表 3 培养基对诱导率的影响

基因型	诱导培养基	接种幼胚数(个)	愈伤数(个)	愈伤诱导率(%)	胚性愈伤数(个)	胚性愈伤诱导率(%)
H99	N ₆	130	70	53.9	60	46.2
	MB	60	23	38.3	1	1.7
	MS	50	15	30.0	0	0.0
A188	N ₆	100	72	72.0	5	5.0
	MB	60	40	66.6	6	10.0
	MS	60	18	30.0	0	0.0
7922	N ₆	450	212	47.0	65	14.4
	MB	70	8	11.4	4	5.7
	MS	70	1	1.4	0	0.0
1322	N ₆	60	40	66.7	16	26.7
	MB	60	16	26.7	0	0.0
	MS	60	9	15.0	0	0.0

表 4 幼胚长度对诱导率的影响

基因型	幼胚长度(mm)	接种数(个)	接种 2 周的愈伤数(个)	愈伤诱导率(%)
H99	1.0	50	22	44.0
	1.5	50	23	88.0
	2.0	50	24	92.0
	3.0	50	25	76.0
	4.0	50	26	62.0
A188	1.0	30	2	6.7
	1.5	30	22	73.3
	2.0	30	26	86.7
	3.0	30	20	66.7
	4.0	30	11	36.7

调节培养基内的渗透压,同时在一定程度上能减少微生物的污染。

本试验选用 4 种蔗糖浓度梯度对基因型 H99 和 A188 进行诱导。由表 5 可见,蔗糖浓度为 30 g/L 时玉米愈伤组织和胚性愈伤组织的诱导率都较高。蔗糖浓度增大,愈伤组织逐渐变成白色而死亡;蔗糖浓度越小,愈伤组织由于渗透压过低会出现水渍化状态,胚性愈伤率降低。

表 5 蔗糖浓度对诱导率的影响

基因型	蔗糖浓度(g/L)	幼胚数(个)	愈伤数(个)	愈伤诱导率(%)	胚性愈伤数(个)	胚性愈伤率(%)
H99	20	150	68	45.3	39	26.0
	30	150	82	54.7	64	42.7
	40	150	78	52.0	58	38.7
	50	150	56	37.3	31	20.7
A188	20	150	43	28.7	8	5.3
	30	150	60	40.0	15	10.0
	40	150	51	34.0	2	1.3
	50	150	22	14.7	0	0.0

2.5 不同激素浓度及对比对诱导率的影响

激素的选择影响愈伤组织的生成^[6]。本试验研究了生长素 2,4 - D、细胞分裂素 6 - BA 和 AgNO₃ 的不同浓度、不同对比对愈伤组织诱导的影响。

生长素是愈伤组织生长的必需激素,2,4 - D 能诱发细胞分裂活性,引起细胞脱分化和无序增殖,产生愈伤组织,2,4 - D 浓度会影响愈伤组织的生长状态。由表 6 可以看出,H99

和 1322 在 N₆5 中诱导率最高,且生长状态最好,认为 2,4-D 浓度为 2 mg/L 时较适宜;品种 7922 的最适 2,4-D 浓度为 1 mg/L;而 A188 的最适 2,4-D 浓度为 3 mg/L。黄璐等研究认为,2,4-D 浓度过大对愈伤组织有伤害作用,在组培过程中会增加无性系变异^[7]。而 2,4-D 浓度过低会导致愈伤组织生长缓慢或者死亡。

诱导培养基中添加 AgNO₃ 可以提高胚性愈伤诱导率和植株再生率。1988 年,Songstad 研究发现向 N6 或 MS 培养基中添加 AgNO₃,可提高Ⅱ型愈伤组织的诱导率及植株再生率^[8]。由表 6 可以看出,H99、7922 和 1322 在 N₆5 培养基中的胚性诱导率均较高,说明诱导培养基中添加 AgNO₃ 能够提高胚性诱导率;而在 N₆6 培养基中,H99 和 1322 诱导率明显降低,说明添加 10 mg/L AgNO₃ + 0.5 mg/L 6-BA 的配比对愈伤组织诱导没有促进作用。

表 6 不同激素和激素浓度对诱导率的影响

基因型	诱导培养基	接种幼胚数(个)	愈伤数(个)	愈伤诱导率(%)	胚性愈伤数(个)	胚性愈伤诱导率(%)
H99	N ₆ 1	73	22	30.1	6	8.2
	N ₆ 2	140	76	54.3	23	16.4
	N ₆ 3	100	43	43.0	10	10.0
	N ₆ 4	120	62	51.7	11	9.2
	N ₆ 5	130	70	53.9	60	46.2
	N ₆ 6	50	21	42.0	2	4.0
A188	MB1	60	23	38.3	1	1.7
	MB2	60	32	53.3	2	3.3
	MB3	60	40	66.6	6	10.0
7922	N ₆ 1	450	212	47.0	65	14.4
	N ₆ 2	450	188	41.8	52	11.6
	N ₆ 3	60	12	20.0	0	0
	N ₆ 5	93	62	66.7	10	10.8
	MB1	70	8	11.4	4	5.7
	MB3	50	10	20.0	2	4.0
1322	N ₆ 1	60	14	23.3	1	1.7
	N ₆ 2	60	31	51.7	12	20.0
	N ₆ 3	62	26	41.9	5	8.1
	N ₆ 4	60	18	30.0	4	6.7
	N ₆ 5	60	40	66.7	16	26.7
	N ₆ 6	60	21	35.0	2	3.3

2.6 愈伤组织的继代培养

继代培养过程中,非胚性愈伤组织并不能长期继代生长。研究发现,基因型 A188 和 7922 在继代过程中色泽逐渐变暗,停止生长;基因型 1322 继代培养一段时间后呈愈伤黏稠状组织并逐渐褐化死亡,这可能受到基因型限制或者所用培养基及激素浓度配比使用不当造成。而 H99 在继代中大部分生长良好。通过继续培养发现,添加 1.0 mg/L 的 2,4-D 有利于愈伤组织保持其胚性。

3 结论与讨论

本试验以优良玉米自交系 H99、A188、7922 和 1322 在授粉 10~15 d 的幼胚作为受体材料,在最适诱导条件下诱导胚性愈伤组织,并再生成完整植株。同时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,得出以下结论:初步诱导时,4 种基因型玉米幼胚在诱导培养基中均产生了愈

伤组织;继代培养后,只有 H99 产生了淡黄色、颗粒状并且生长迅速的Ⅱ型胚性愈伤组织,另外 3 种玉米基因型没有诱导出胚性愈伤组织。

虽然玉米愈伤组织诱导具有普遍性,但是诱导率受多种因素影响,如基因型、培养基成分、激素浓度、幼胚大小以及人为因素等^[9-10]。诱导过程中基因型对愈伤组织的质量和出愈率有较大影响^[11],本试验的 4 种玉米自交系中,H99 的诱导率最高,为 46.2%,其次是 1322 和 7922,A188 最低,为 10%。因此,在进行玉米幼胚遗传再生体系建立时,选择易于培养的材料是至关重要的^[12]。

对于不同基因型愈伤组织的诱导,要选择适宜培养基进行培养,本试验采用 3 种基本培养基的诱导效果依次为 N₆ > MB > MS。对于一些玉米基因型,虽然愈伤初始诱导率较高,但在长期继代培养过程中胚性很难保持,使得植株再生率降低,原因可能与继代培养基不适宜或者人为操作不当有关,对此还需要进一步研究。同时也充分说明植株再生率与出愈率之间没有相关性,这与孙红炜等在影响玉米愈伤组织诱导和植株再生的有关因素中的研究^[13]相符。

本研究未涉及光照、温度等培养条件对玉米幼胚诱导的影响^[14],并且对于继代、分化和生根培养基未进行优化研究。因此本研究结果是否具有广泛适用性,还需进一步研究验证。

参考文献:

[1]王 雷,张 君,于彦春,等. 胚龄和 2,4-D 浓度对玉米自交系幼胚愈伤组织诱导率的影响[J]. 玉米科学,2001,9(3):26-28.

[2]贾秀萍,王汉宁,张金文,等. 2,4-D 和 NAA 对成熟玉米种子不同外植体胚性愈伤组织诱导效果的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2008,43(6):48-51.

[3]孙世孟,车书杰. 玉米组织培养及其遗传转化的研究进展[J]. 莱阳农学院学报,1995,12(1):31-36.

[4]朱友银,赵德刚,冯 怡,等. 不同基因型玉米愈伤组织诱导与植株再生研究[J]. 生物技术,2008,18(4):62-64.

[5]张桂玲,张素芝,荣廷昭,等. 影响玉米幼胚愈伤组织再生率的因素分析[J]. 核农学报,2009,23(3):385-390.

[6]徐立华,周柱华,张举仁,等. 玉米愈伤组织再生体系的研究[J]. 玉米科学,2006,14(6):96-99.

[7]黄 璐,卫志明. 不同基因型玉米的再生能力和胚性与非胚性愈伤组织 DNA 的差异[J]. 植物生理学报,1999,25(4):332-338.

[8]王宏伟,史振声,徐盛恩,等. 激素和附加物对玉米幼胚愈伤组织诱导的影响[J]. 西北农业学报,2007,16(5):105-108.

[9]王 雷,王丕武,张 君,等. 玉米自交系 7922 幼胚愈伤组织诱导条件的优化[J]. 玉米科学,2002,10(1):18-20.

[10]王洪振,于佳佳,程 军,等. 不同培养基对玉米自交系 4112 幼胚愈伤组织诱导的研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(30):13046-13047.

[11]郭祖宝,李学红,王成增. 影响玉米愈伤组织发生因素的研究[J]. 现代农业科技,2007(22):107,109.

[12]侯艳华,徐 仲,苍 晶,等. 玉米自交系愈伤组织的诱导及再生[J]. 吉林农业大学学报,2002,24(6):7-10.

[13]孙红炜,尚佑芬,杨崇良,等. 影响玉米愈伤组织诱导和植株再生的有关因素研究[J]. 山东农业科学,2002(6):30-31.

[14]胡彦民,季良越,韦小敏,等. 玉米幼胚离体培养的影响因素研究[J]. 2000,34(4):305-308.