

李海霞, 谢久凤, 孙金花. 玉米幼胚胚性愈伤组织诱导和继代研究[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(7): 74-77.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.07.013

# 玉米幼胚胚性愈伤组织诱导和继代研究

李海霞, 谢久凤, 孙金花

(河南农业大学, 河南郑州 450002)

**摘要:**以玉米自交系 87-1、郑 22、齐 319、昌 7-2 和杂交种齐 319 × Hi II A、齐 319 × 87-1、郑 22 × 87-1、昌 7-2 × Hi II A 等的幼胚为外植体诱导愈伤组织, 研究了玉米不同基因型对愈伤组织诱导和继代的影响。结果表明, 不同基因型的胚性愈伤诱导率、继代能力有着显著差异。郑 22 × 87-1 胚性愈伤诱导率为 83.86%, 而昌 7-2 × Hi II A 胚性愈伤诱导率为 41.15%, 相差很多。但在继代能力上由于昌 7-2 × Hi II A 高度松散, 具有明显的颗粒状, 其继代扩繁能力明显高于郑 22 × 87-1, 这说明胚性愈伤诱导率和继代繁殖能力之间没有必然的联系, 昌 7-2 × Hi II A 繁殖能力强, 是最好的组培材料。自交系中只有 87-1 诱导出较好的 II 型愈伤组织, 但诱导率比较低。刚诱导出的愈伤组织比较坚硬, 经过 3~4 次继代后, 愈伤组织生长旺盛, 色泽鲜亮, 增殖快, 是进行基因转化的最好时期。

**关键词:**玉米; 基因型; 胚性愈伤组织; 诱导率; 继代

**中图分类号:** S513.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)07-0074-04

玉米幼胚是目前基因工程使用较多的外植体, 已有报道可用新鲜的幼胚(IE)<sup>[1-2]</sup>或由幼胚诱导形成的 I 型<sup>[3]</sup>和 II 型<sup>[4]</sup>愈伤组织作为玉米转基因的受体材料。基因型对玉米幼胚愈伤组织的诱导影响很大。杂种诱导能力明显强于自交系<sup>[5]</sup>, 尽管就创造、筛选突变体和基因转化的快速应用而言, 利用自交系具有明显的优势, 但是玉米组织培养的研究多数选用杂交种作为试验材料。植株再生频率直接决定于愈伤组织的类型, 继代过程中胚性愈伤组织的频率与植株再生率有着直接的联系。而杂交种的愈伤组织在继代过程中胚性不容易丧失, 而且再生频率高, 对于植物的遗传转化具有重要的意义。

优良的愈伤组织关系到培养体系的长期培养能力和植株的再生能力, 是玉米高效组织培养体系的基础。愈伤组织的划分一般参照 Amstrong 等的标准<sup>[6]</sup>: 具有再生能力的愈伤组织根据生长状况和再生途径分为 2 类, 即 I 型愈伤组织和 II 型愈伤组织。I 型愈伤组织白色块状、坚硬、干燥、结构紧密, 难以长期继代培养, 主要通过器官发生途径再

生植株; II 型愈伤组织乳白色或浅黄色、结构松散易碎、呈颗粒状、易产生胚状体, 适合长期继代培养, 主要通过胚状体途径再生植株, 是理想组织培养材料。后来根据不同试验者的观察又把结构松软、白色透明或半透明, 水渍状, 不容易继代培养, 且丧失了分化能力, 不能再生成苗的愈伤组织划分为 III 型<sup>[7-9]</sup>。愈伤组织的诱导率受基因型、激素、培养条件等许多因素的影响, 其中基因型对愈伤组织诱导率的影响更为明显, 不同基因型的继代能力及繁殖能力区别也很大。本试验选用 4 个玉米自交系和 7 个玉米杂交种为材料, 进行了愈伤组织的诱导试验。在试验中认真观察不同基因型的诱导过程中的不同状态, 并对出愈率和胚性愈伤率进行了统计分析, 对齐 319 × 87-1、郑 22 × 87-1、昌 7-2 × Hi II A 这 3 个基因型进行了继代繁殖的试验, 以期选出愈伤诱导率、胚性愈伤率、繁殖能力都比较高的基因型, 为下一步遗传转化奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验选用 4 个玉米自交系 87-1、郑 22、齐 319、昌 7-2 和 4 个杂交种郑 22 × 87-1、齐 319 × 87-1、昌 7-2 × Hi II A、齐 319 × Hi II A 的幼胚为外植体, 进行愈伤组织的诱导和继代培养。

### 1.2 培养基

诱导培养基:  $N_6 + 2.0 \text{ mg/L } 2,4-D + 500 \text{ mg/L}$

收稿日期: 2019-03-28

基金项目: 2019 年河南农业大学教学质量工程项目(编号: 18jx0101)。

作者简介: 李海霞(1972—), 女, 河南辉县人, 硕士, 实验师, 主要从事植物生理生化研究和实验室教学与管理工。E-mail: lihaixia@henau.edu.cn。

脯氨酸 + 500 mg/L 水解酪蛋白 + 30 g/L 蔗糖;继代培养基:  $N_6$  + 2.0 mg/L 2,4-D + 700 mg/L 脯氨酸 + 500 mg/L 水解酪蛋白 + 30 g/L 蔗糖;再生培养基:  $N_6$  + 1.0 mg/L KT + 1.0 mg/L 6-BA + 700 mg/L 脯氨酸 + 700 mg/L 水解酪蛋白 + 30 g/L 蔗糖;分化预处理培养基:  $N_6$  + 700 mg/L 脯氨酸 + 500 mg/L 水解酪蛋白 + 30 g/L 蔗糖。

### 1.3 方法

1.3.1 愈伤组织的诱导 取人工套袋授粉 10 ~ 14 d 的不同基因型玉米幼雌穗,将果穗剥去苞叶,用 70% 乙醇溶液浸泡 1 ~ 2 min,在无菌条件下取

出,并用无菌水冲洗 3 遍,用解剖刀切除籽粒顶部。取长度 1 ~ 2 mm 的幼胚,接种在诱导培养基上。每个基因型根据材料的多少重复 20 ~ 30 皿。在无光照、26 °C 条件下进行愈伤组织诱导。根据幼胚的生长状况,4 ~ 7 d 进行切芽处理。切芽后全部转入新鲜培养基中,15 d 后调查,计算愈伤组织诱导率即出愈率。之后,将膨大后的愈伤夹碎成 2 块转入新鲜培养基中。2 周后调查胚性愈伤块数除以 2,记为产生胚性愈伤的胚数,并计算胚性愈伤率。诱导过程如图 1 所示。

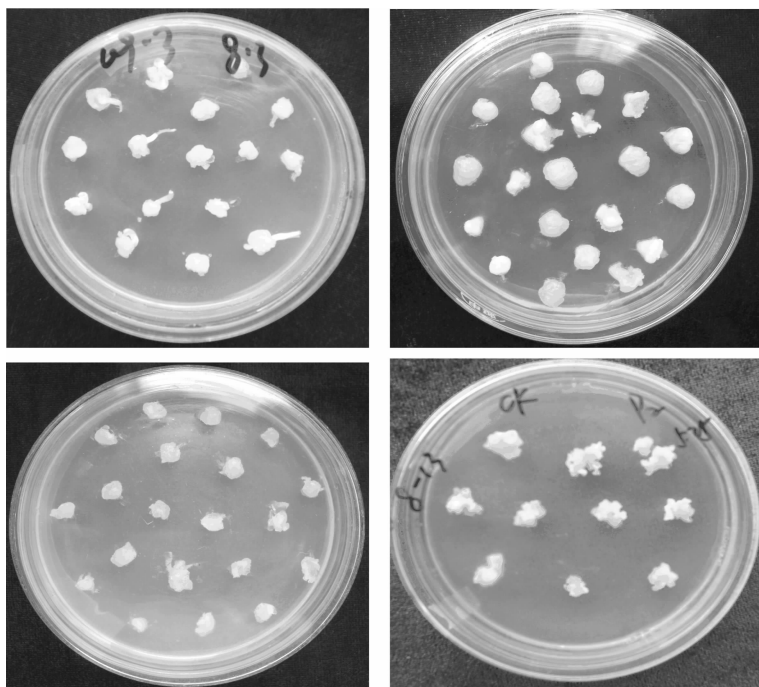


图1 愈伤组织的诱导过程

愈伤组织按 Armstrong (1994) 描述的玉米愈伤组织分类标准调查愈伤类型。本研究愈伤组织诱导率(出愈率)和胚性愈伤组织诱导率(胚性愈伤率)计算公式为:

$$\text{愈伤组织诱导率} = \frac{\text{产生愈伤组织胚数}}{\text{接种幼胚总数}} \times 100\% ;$$

$$\text{胚性愈伤组织诱导率} = \frac{\text{产生胚性愈伤组织胚数}}{\text{接种幼胚总数}} \times 100\% .$$

1.3.2 愈伤组织的继代 不同基因型的愈伤组织继代能力不同,繁殖力也有很大的区别。根据诱导的结果,进一步的继代试验选取了齐 319 × 87 - 1、郑 22 × 87 - 1、昌 7 - 2 × Hi II A 这 3 个基因型作为试验材料,各挑选生长较一致的愈伤组织 5 皿,将其分成绿豆大小的小块,每皿放入 20 块愈伤,尽量保

持大小均匀一致,转入新鲜培养基中继代 2 周。连续 3 次继代观察愈伤的形态变化并统计扩繁的皿数,每次继代都选取颗粒状优良胚性愈伤。第 3 次继代时,选出 5 皿称其初始愈伤质量  $G_1$ ,继代 2 周后再称愈伤质量  $G_2$ ,计算愈伤的生长量。

$$\text{愈伤组织生长量} = (G_2 - G_1) / G_1 .$$

## 2 结果与分析

### 2.1 基因型对愈伤组织诱导的影响

影响玉米愈伤组织诱导的内在因素是基因型。为了获得产生胚性愈伤组织的优良基因型,为进一步的转化试验奠定基础,在同一培养基上对 4 个自交系和组配的 4 个杂交种的幼胚愈伤组织诱导效果进行了筛选试验,并对筛选过程中不同基因型的愈

伤状态做了详细观察。试验中不同的基因型材料胚性愈伤诱导率及愈伤的状态差别很大(表 1)。这些基因型幼胚接种在愈伤组织诱导培养基上 2 d 左右出现白色、浅黄色或无色愈伤组织。不同基因型的出愈率不同,愈伤组织的质量和状态不同。杂交

种出愈率明显高于自交系。就单个自交系而言,愈伤组织出愈率均低于由其作母本配制的杂交种的出愈率。母本出愈率高的杂交种出愈率也高,母本出愈率较低的杂交种的出愈率也低,而且杂交种胚性愈伤的形态与母本有很大的相似之处。

表 1 脱分化 14 d 愈伤组织生长状况

基因型	愈伤组织生长状况
87-1	顶部发白,膨大透明且较硬,其中有少数膨大不明显,白色,硬
郑 22	部分亮黄色,部分乳白色且较硬
昌 7-2	膨胀不大但呈开裂状,较软
齐 319	有的膨大明显,呈开裂状,白色
齐 319×HiⅡA	有的膨大明显,乳白色
齐 319×87-1	膨胀大小不一致,小的较多,白色,硬且显得干燥。部分有芽
郑 22×87-1	圆形膨大,黄色,均匀一致,芽粗短,有的几乎没芽
昌 7-2×HiⅡA	膨大明显,乳白色,芽长

从表 2 可以看出,杂交种齐 319×87-1、郑 22×87-1、昌 7-2×HiⅡA 都有较高的出愈率和胚性愈伤率。自交系 87-1、郑 22 也能诱导出胚性愈伤,但郑 22 诱导出的愈伤大都是较硬的块状,属于Ⅰ型愈伤的范畴,不耐继代,再生率低。自交系中只有 87-1 诱导出较好的Ⅱ型愈伤组织,但胚性愈伤率较低。

表 2 不同基因型愈伤组织诱导效果

基因型	幼胚数 (个)	出愈率 (%)	胚性愈伤率 (%)
齐 319	1 120	87.50	0.00
87-1	780	94.62	16.86
郑 22	360	85.28	54.03
昌 7-2	540	92.41	0.00
齐 319×HiⅡA	720	97.22	0.28
齐 319×87-1	1 020	86.57	27.70
郑 22×87-1	920	92.83	83.86
昌 7-2×HiⅡA	540	92.41	41.15

2.2 不同基因型的继代能力

从表 3 可以看出,昌 7-2×HiⅡA 的继代繁殖能力强,明显高于另外 2 个基因型,这与昌 7-2×HiⅡA 的愈伤组织的状态有关。昌 7-2×HiⅡA 愈伤十分松散,呈明显的颗粒状。试验中还发现,诱导出的愈伤,进行 3 次继代,愈伤的繁殖能力逐渐增强,经过几次继代后愈伤的色泽也更鲜亮,状态更好。

从表 4、表 5 可知,齐 319×87-1、郑 22×87-1、昌 7-2×HiⅡA 这 3 个基因型之间愈伤组织的生长量存在极显著差异,不同基因型由于其愈伤状态及内在因素的影响,其继代生长能力存在很大的不同。

3 讨论与结论

基因型是玉米组织培养过程中的一个重要因素。本试验中通过对不同基因型的自交系及杂交

表 3 不同基因型繁殖能力的比较

基因型	第 1 次继代		第 2 次继代		第 3 次继代	
	皿数	繁殖倍数	皿数	繁殖倍数	皿数	繁殖倍数
齐 319×87-1	6	1.2	7	1.4	7	1.4
郑 22×87-1	7	1.4	9	1.8	10	2.0
昌 7-2×HiⅡA	13	2.6	16	3.2	19	3.8

表 4 不同基因型生长量的方差分析

变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
基因型	32.509 2	2	16.254 6	213.089	0.000 1
误差	0.915 4	12	0.076 3		
总变异	33.424 6	14			

表 5 不同基因型生长量的差异显著性分析

基因型	生长量平均值	5% 显著水平	1% 显著水平
齐 319 × 87 - 1	1. 514 0	c	C
郑 22 × 87 - 1	2. 150 4	b	B
昌 7 - 2 × Hi II A	4. 906 1	a	A

种诱导发现,不同基因型的胚性愈伤诱导率、继代能力有着显著差异,且具有一定的母本效应。胚性愈伤诱导率高的自交系,由其组配的杂交种的诱导率也高,愈伤状态也十分相似。本试验中郑 22 × 87 - 1 胚性愈伤诱导率为 83. 86%,而昌 7 - 2 × Hi II A 胚性愈伤诱导率为 41. 15%,相差很多。但在继代能力上由于昌 7 - 2 × Hi II A 高度松散,具有明显的颗粒状,其继代扩繁能力明显高于郑 22 × 87 - 1,这说明胚性愈伤诱导率和继代繁殖能力之间没有必然的联系,这与曹墨菊等研究提出的愈伤组织的诱导率和继代力之间相关不显著,二者可能受不同的遗传因子所控制的结果<sup>[10]</sup>一致。愈伤的质量状态是影响愈伤继代的关键因素。有些材料虽然诱导出了愈伤,但继代过程中逐渐褐化死亡,无法继代下去。昌 7 - 2 × Hi II A 繁殖能力强,是最好的组培材料。郑 22 × 87 - 1、齐 319 × 87 - 1 诱导率和胚性愈伤率都较高,愈伤状态良好,Ⅱ型愈伤居多,扩繁能力也较好,也可以作为组培材料。自交系中只有 87 - 1、郑 22 诱导出了胚性愈伤组织,但郑 22 的愈伤组织属于Ⅰ型愈伤的范畴,不耐继代,再生率低,自交系中只有 87 - 1 诱导出较好的Ⅱ型愈伤组织。在试验中还发现,足够黑暗的条件下有利于愈伤的生长,愈伤组织表现为健壮、色泽鲜黄。暗度不够时,愈伤容易转成硬块状,失去颗粒结构,向Ⅰ型愈伤转变。刚诱导出的愈伤组织比较坚硬,经过 3 ~ 4 次继代后,愈伤组织生长旺盛、色泽鲜亮、增殖快,是进行基因转化的最好时期。

基因转化最终要落实到转入后的再生,怎样让带有目的基因的愈伤组织成苗,以及壮苗生根,到最后移栽到大田都是很关键的因素。特别移栽是最后也是最重要的一步,对于组培苗来说,特别幼嫩,生理机能弱,温度、湿度、水分、透气性等方面的

因素都会影响移栽的成活率,水分和透气不易控制,稍微操作不当,就易死苗。如何提高玉米再生率<sup>[11]</sup>以及再生后组培苗的移栽成活率都值得进一步研究,健全一套完备的诱导、继代、再生以及移栽程序是非常必要的。

参考文献:

[1] Ishida Y, Satto H, Ohta S, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Nat Biotech, 1996, 14: 745 - 750.

[2] Songstad D D, Armstrong C L, Petersen W L, et al. Production of transgenic maize plants and progeny by bombardment of Hi - II immature embryos [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 1996, 32: 179 - 183.

[3] Wan Y, Widholm J M, Lemaux P G. Type I callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (*Zea mays* L.) [J]. Plant, 1995, 196: 7 - 14.

[4] Walters D A, Vetsch C S, Potts D E, et al. Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants [J]. Plant Mol Biol, 1992, 18: 189 - 200.

[5] 于晓明. 玉米自交系亲本及其杂交种的体细胞克隆变异研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2007.

[6] Armstrong C L, Green C E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L - proline [J]. Planta, 1985, 164 (2): 207 - 214.

[7] 周洪生. 甜玉米胚愈伤组织的诱导、继代、植株再生的研究 [J]. 作物学报, 1993, 19 (1): 55 - 62, 99.

[8] 孙世孟, 宋再华, 何忠诚, 等. 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.

[9] 胡建广, 李余良, 方志伟, 等. 超甜玉米自交系幼胚高效成株系统的建立 [J]. 中国农学通报, 2004, 20 (2): 73 - 75.

[10] 曹墨菊, 张颖, 刘玉贞, 等. 玉米幼胚培养胚性愈伤的影响因素分析 [J]. 西南农业学报, 2005 (5): 145 - 150.

[11] 李海霞, 孙金花, 邢国珍, 等. 提高玉米愈伤组织再生率的研究 [J]. 河北农业科学, 2017, 21 (2): 57 - 60, 108.