

文章编号 :1003-8701(2014)03-0001-04

玉米杂交种高效再生体系的建立及其影响因素

林 凡^{1,2}, 张 云^{2,3}, 蒋明义²

(1. 福建中医药大学中西医结合学院,福州 350122; 2. 南京农业大学生命科学学院,南京 210095;
3. 福建教育学院理科研修部,福州 350025)

摘 要: 选取 8 种玉米基因型的幼胚为外植体,以改良 MS 培养基为基本培养基,对基因型、幼胚大小、培养基激素配比等影响因素进行分析,研究玉米杂交种高效再生体系。结果表明:各试验材料均能诱导出一定量数的愈伤组织,但不同基因型愈伤组织的诱导率、愈伤组织的胚性诱导和保持能力存在差异,具有显著的基因型依赖性。在本试验条件下,杂交种登海 11 号愈伤组织的诱导率、胚性性状及其保持能力均十分优秀,是一个理想的供试材料。此外,一些重要影响因素的优化,如选用 1~2 mm 长的幼胚,在诱导培养基中添中 2~3 mg/L 2,4-D 以及分化培养基中添加 0.5 mg/L 6-BA,可分别显著提高登海 11 号愈伤组织的诱导率和分化率。

关键词: 玉米;再生体系;杂交种;基因型

中图分类号:S513.035.3

文献标识码:A

Setting up of Effective Regeneration System of Hybrid Maize and Influencing Factors

LIN Fan^{1,2}, ZHANG Yun^{2,3}, JIANG Ming-yi²

(1. College of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122;
2. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;
3. Fujian Institute of Education, Fuzhou 350025, China)

Abstract: Using eight maize lines as target genotypes, a highly efficient regeneration system was developed with MS being used as basal culture medium. Effects of genotypes, immature embryos size and hormone concentrations on the induction of embryogenic callus were investigated in this work. The results showed that all experimental maize materials could be induced to form callus. However, the rates of callus induction, embryogenic callus induction and retention were different among different genotypes. Under our experimental conditions, the best induction and subculture of embryogenic callus was obtained from 'Denghai No.11' maize hybrid. Furthermore, some important factors were optimized. The results showed that the immature embryos of 1.0-2.0 mm in length in DH11 were optimal explants. Addition of 2-3 mg/L 2,4-D in induction medium significantly stimulated embryogenic callus of DH11. And the differentiation medium supplemented with 0.5mg/L 6-BA had very great promoting effect on inducing differentiation.

Keywords: Maize; Regeneration system; Hybrid; Genotype

玉米是世界上最重要的粮食作物之一,其产量居世界第一。作为全球推广面积第二的转基因作物,基因工程技术无疑已成为玉米育种的一种重要策略和途径^[1]。但目前玉米的遗传转化仍然存在一定困难,没有一套完整的广泛使用的转化体系,其中主

要限制因素之一就是受体玉米的再生体系。目前,玉米幼胚诱导形成的胚性愈伤组织,继代能力强、再生率高,是遗传转化的较理想受体^[2]。但多年来,玉米高效再生体系主要限于少数自交系,如 A188、H99、Z3、Z31 等^[3-4],而在我国大面积使用的优良玉米自交系的再生系统往往产生率低,难以转化。另一方面,转基因自交系需经杂交选育才能获得符合生产要求的优良品种,育种周期长^[5]。通过对生产上大

收稿日期 2013-10-14

作者简介 林 凡(1976-)男,博士,讲师,从事植物分子生物学研究。

面积种植的优良杂交品种进行转基因定向改造,再通过多代自交选育方式则有望缩短育种周期,获得理想的优质新品种^[5]。

目前,我国在玉米杂交品种的高效再生体系建立方面的研究鲜有报道,且较为零散^[6-7]。对此,本研究选取了 8 种适合于长江流域栽培的基因型材料,以改良 MS 培养基为基本培养基,研究了基因型、幼胚大小、激素浓度等对幼胚组织培养的影响,以期建立并优化生产上大面积使用的优良玉米杂交品种的高效再生体系,为玉米基因工程技术供应良好受体,提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材 料

玉米(*Zea mays* L.):综 3、综 31(内蒙古达拉特旗种业有限公司惠赠)、苏玉糯 1 号、登海 9 号、登海 11 号(购自南京红太阳种业有限公司)、农大 108(购自南京神州种业有限公司)、Hi II(中国科技大学向成斌教授惠赠)、W64A(实验室自备)。

1.2 主要试剂和培养基

2,4-二氯苯氧乙酸(2-(2,4-dichlorophenoxy)acetic acid, 2,4-D)、核黄素、萘乙酸、L-脯氨酸、天冬氨酸、对氨基苯甲酸、酸水解干酪素购自 Amresco 公司;其余试剂均为国产分析纯。

诱导培养基:MS 基本培养基+0.5 g/L 酸水解干酪素+0.2 g/L L-天冬氨酸+1.4 g/L L-脯氨酸+0.5 mg/L 泛酸钙+1~4 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+5.8 g/L 琼脂,pH 5.8~6.0;

继代培养基:MS 基本培养基+0.5 g/L 酸水解干酪素+0.2 g/L L-天冬氨酸+0.7 g/L L-脯氨酸+2~3 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+5.8 g/L 琼脂,pH 5.8;

分化培养基:MS 基本培养基+0.2 g/L L-天冬氨酸+0.2 g/L 酸水解干酪素+0.5 mg/L 6-BA+30 g/L 蔗糖+5.8 g/L 琼脂,pH 5.8;

生根培养基:1/2 N6 基本培养基+0.2 mg/L NAA+15 g/L 蔗糖+5.8 g/L 琼脂,pH 5.8。

1.3 方 法

1.3.1 诱导玉米胚性愈伤组织

摘取授粉后一定天数的玉米幼穗,无菌条件下取出幼胚,接种于诱导培养基上,于 25℃ 暗培养;待诱导出愈伤组织后,挑选生长旺盛、生活力强、呈现明显颗粒状、颜色鲜艳的材料继代。

1.3.2 愈伤组织的分化、生根、炼苗和移栽

将诱导的胚性愈伤组织移入分化培养基中,于 28℃,光周期 12/12 h(昼/夜)的条件下培养。

约 15 d 后,愈伤组织可分化出绿芽点,而后再生出小植株。再生苗转入生根培养基,28℃,光周期 12/12 h(昼/夜)培养至生根。而后敞开瓶口,于日光下炼苗 3 d,除去培养基,移栽于混有蛭石的营养土(营养土:蛭石=3:1)中。用薄膜罩住花盆以保持湿度,给予充足的光照,每 2 d 浇一次适当浓度的营养液,待新叶长出后撤去薄膜。

1.3.3 愈伤组织诱导率主要影响因素的确定

将各基因型的玉米幼胚接种于诱导培养基上,25℃ 避光培养。约 3 d 后盾片膨大,并有小芽生出。及时去除小芽,夹碎幼胚,7 d 左右可诱导出愈伤组织,统计各基因型愈伤组织的诱导率。对于主要激素 2,4-D,本试验设置了 1,2,3,4 mg/L 的不同浓度的诱导培养基,每种诱导培养基接入 40 个幼胚,10 d 后统计出愈情况,每个处理重复 3 次。对于玉米幼胚大小,选取了 3 类不同大小的幼胚(长度 <1 mm、1~2 mm、>2 mm),将幼胚置于含 2 mg/L 2,4-D 的诱导培养基上,每种长度类型的幼胚接入 40 个,10 d 后统计出愈情况。每个处理重复 3 次。

1.3.4 6-苄氨基腺嘌呤(6-Benzylaminopurine, 6-BA)对愈伤组织分化能力的影响

本试验设置了不同浓度 6-BA 的分化培养基,其浓度分别为 0 mg/L、0.5 mg/L 和 1 mg/L。将胚性愈伤组织分别转入上述分化培养基中,每种培养基接入 30 块愈伤组织,每个处理重复 3 次。于 28℃,光周期 12/12 h(昼/夜)的条件下培养 20 d,统计分化绿芽点数和再生植株出苗率。

1.3.5 数据统计分析

利用 SPSS 11.5 软件对试验中所得数据作 Duncan 多重检验(Duncan's multiple range test)或单因子方差分析(single-factor analysis of variance, ANOVA),以 $P \leq 0.05$ 示为显著差异。

2 结果与分析

2.1 基因型和诱导培养基激素(2,4-D)浓度对玉米愈伤组织诱导的影响

基因型是影响玉米胚性愈伤组织发生与再生的主导因素^[8]。为了建立高效的再生体系,本研究选取了 8 份不同基因型的材料。结果如表 1 所示,所有的基因型都能诱导出愈伤组织。其中杂交种苏玉糯 1 号、农大 108 和自交系 W64A 的诱导率相对较低(<80%),而其它几种基因型在本试验条件下,均表现出高诱导率(>85%),呈现出明显的基因型依赖性。

此外,诱导培养基激素(2,4-D)的含量也影响

着玉米愈伤组织的诱导。本试验根据表 1 的结果,统计了 2,4-D 浓度对 5 种基因型玉米的愈伤组织诱导率的影响。如图 1 所示,诱导培养基中含有 2、3 mg/L 2,4-D 会具有较佳诱导效果。

表 1 不同基因型玉米的愈伤组织诱导率

基因型	接种幼胚数	出愈幼胚数	诱导率 (%)
W64A	200	156	78
综 3	200	191	95.5
综 31	200	179	89.5
登海 11 号	200	193	96.5
登海 9 号	200	186	93
苏玉糯 1 号	200	31	15.6
农大 108	200	45	22.5
Hi	200	197	98.5

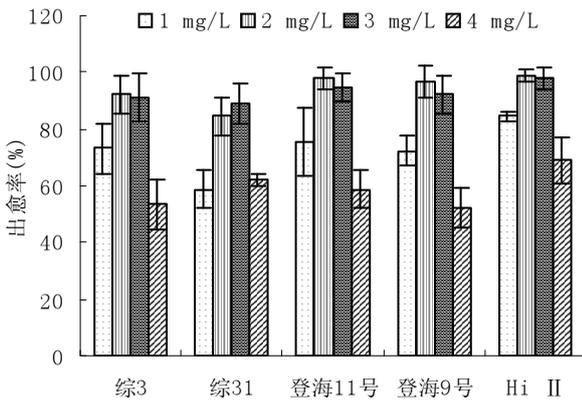


图 1 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导率的影响
数据为 3 个独立试验的平均值,同一字母表示 P>0.05 水平不显著,下同

2.2 幼胚大小对玉米胚性愈伤组织诱导的影响

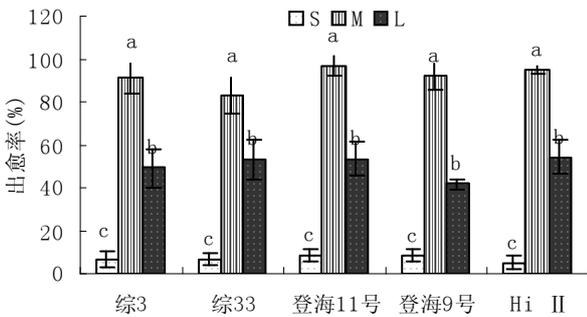


图 2 幼胚大小对愈伤组织诱导率的影响
幼胚按照大小分成 3 组:S:<1 mm、M:1~2 mm、L:>2 mm;每组 40 个幼胚

结果如图 2 所示,幼胚长度亦影响愈伤组织的诱导率,不同大小幼胚的诱导率差异显著。在供试的 5 种基因型中,1~2 mm 大小的幼胚均具有较高诱导率;较大的幼胚(>2 mm)虽然也有一定的诱导率,但后继培养中不易产生胚性愈伤组织,

常萌发出胚芽和胚根;较小的幼胚(<1 mm)诱导率很低,不适合作为外植体。

2.3 基因型对愈伤组织的胚性保持的影响

利用愈伤组织作为受体进行遗传转化,通常需要较大的数量。为此需要对诱导产生的愈伤组织进行继代培养,增加其数量。这一过程中愈伤组织胚性的保持是其遗传转化成功的关键性因素之一。因此,本试验比较了上述高诱导率的 5 种基因型愈伤组织的继代培养特性。结果如表 2 所示,在本研究试验条件下,登海 11 号在继代过程中大部分生长良好,结果最为理想。

表 2 不同基因型玉米幼胚愈伤组织的培养特性

基因型	愈伤生长情况
综 3	浅黄色,愈伤大小适中,继代过程中易褐化
综 31	浅黄色,愈伤大小适中,继代过程中易褐化
登海 11 号	浅黄色,愈伤大小适中,继代过程中增殖速度较快
登海 9 号	浅黄色,愈伤较大,继代过程中色泽变暗,表面有褐色斑点
Hi	白色,愈伤大小适中,继代过程中迅速褐化死亡

这些结果表明,基因型、胚的生理状态、诱导培养基及三者相互效应协同影响玉米胚性愈伤组织的诱导和培养。其中,筛选适宜培养的基因型是玉米遗传转化工作的重点。综合愈伤组织诱导率和胚性性状及保持能力这些重要指标,大面积种植的玉米杂交种登海 11 号 1~2 mm 的幼胚是一个比较理想的材料。

2.4 6-BA 对登海 11 号玉米愈伤组织分化的影响

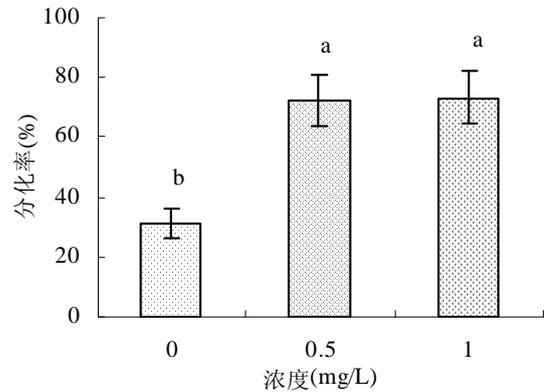


图 3 6-BA 浓度对愈伤组织分化的影响

6-BA 是一种诱导愈伤组织产生分化的常用激素。对于不同基因型的材料,其最佳使用浓度是一个值得探讨的问题。图 3 表明,添加 6-BA 对提高登海 11 号胚性愈伤组织的分化率有显著效应。应用含有 0.5 或 1 mg/L 6-BA 的分化培养基,愈伤组织的分化率分别达到 72.2%和 73.3%,与不添加 6-BA 的对照组(31.1%)相比有显著提高。但

是 1 mg/L 6-BA 处理组的分化苗出现一定比例的畸形, 而 0.5 mg/L 6-BA 处理组未观察到此现象(数据未显示)。因此, 采用含 0.5 mg/L 6-BA 的分化培养基既能显著提高愈伤组织的分化率, 又能避免所诱导分化苗的畸形。

3 讨论与结论

建立良好的受体系统是进行玉米遗传转化的关键环节。众多研究表明, 多种因素可影响玉米幼胚的组织培养, 其中基因型依赖性较为显著, 不同基因型的再生能力存在极大差异, 直接影响其遗传转化的结果^[9-11]。如玉米 A344 的幼胚无法再生出完整的植株, 而 A619 表现出良好的再生能力^[12]; 苏玉 1 号和普甜 1 号的愈伤组织形成芽苗的频率可达 75.83% 和 78.33%, 而掖单 9 号和糯玉米仅有 8.33% 和 10%^[13]。

本研究采用 MS 为基本培养基, 综合愈伤组织诱导率和胚性性状及保持能力这些重要指标, 对 8 种基因型材料进行评价, 以期建立优良玉米杂交品种的高效再生体系。其中登海 11 号、登海 9 号、苏玉糯 1 号和农大 108 均为生产中大面积种植的玉米杂交种, 对照采用文献报道的易于诱导愈伤自交系综 3 和综 31^[14]。结果表明, 各试验材料均能诱导出一一定数量的愈伤组织, 说明玉米幼胚诱导愈伤组织具有一定普遍性, 这与田晓娥等^[6]报道的结果相符。但不同基因型愈伤组织诱导率、愈伤组织胚性诱导和保持能力差异显著, 具有显著的基因型依赖性。其中 5 种材料(综 3、综 31、登海 11 号、登海 9 号和 Hi)的愈伤组织诱导率较高(>85%)。同时, 在本试验条件下, 登海 11 号胚性愈伤组织形态、胚性性状的保持能力均优于其他基因型(表 2)。

接种时期亦是诱导玉米胚性愈伤组织的关键因素之一。不少研究者根据胚龄(授粉后天数)确定幼胚接种的时间。但在不同的生长季节, 玉米胚发育时期的差异很大, 因此仅以胚龄大小决定接种时期, 技术上不易准确把握。另一方面, 不同基因型的材料最佳接种时期变化较大, 过早接种易形成非胚性愈伤组织, 过迟则易导致早萌直接成苗^[13]。Ishida 等^[15]发现 A188 的幼胚在 1~2 mm 大小时, 最易受农杆菌感染。这表明, 最佳接种时期可以根据玉米幼胚的大小来确定。本研究也发现所接种的幼胚大小显著影响初始愈伤组织的诱导率, 5 种供试基因型材料均以 1~2 mm 大小的幼胚为最佳。

本试验的研究结果表明, 大面积种植的玉米杂交种登海 11 号 1~2 mm 的幼胚是一个比较理想的建立玉米高效再生体系的材料。登海 11 号是可以在市面上大量购种的商业化品种, 相对常用的转化品种 A188、B73、Hi 而言, 其性状优良, 给研究者带来了极大方便, 可作为玉米基因工程研究的良好受体。另一方面, 培养基的组成亦是关键因素。本试验中, 含有 2.3 mg/L 2,4-D 的诱导培养基和含 0.5 mg/L 6-BA 的分化培养基可以分别提高供试玉米幼胚愈伤组织的诱导率和分化率。玉米基因型、胚的生理状态和培养基组分及其三者相互效应, 共同影响着玉米高效再生体系的建立。

参考文献:

- [1] 李娜, 程贯召, 李学红, 等. 玉米转基因育种研究进展[J]. 江苏农业科学, 2012(11): 85-89.
- [2] 吕颖颖, 王宏伟, 李凤海, 等. 玉米幼胚组织培养体系优化[J]. 玉米科学, 2013(2): 58-61.
- [3] 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(4): 62-64.
- [4] Frame B R, Shou H, Chikwamba R K, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system [J]. Plant Physiology, 2002, 129(1): 13-22.
- [5] 任振胜, 卿冬进, 陈巧云, 等. 杂交玉米的丛生芽的诱导、植株再生和转化[J]. 分子植物育种, 2007(3): 324-328.
- [6] 田晓娥, 朱友银, 赵德刚. 贵州 10 种玉米基因型组织培养再生体系的建立[J]. 山地农业生物学报, 2012(3): 194-199.
- [7] 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(2): 101-105.
- [8] Ishida Y, Hiei Y, Komari T. Agrobacterium-mediated transformation of maize[J]. Nat Protoc 2007(2): 1614-1621.
- [9] Schlappi M, Hohn B. Competence of Immature Maize Embryos for Agrobacterium-Mediated Gene Transfer [J]. Plant Cell 1992(4): 7-16.
- [10] Brettschneider R, Becker D, Lorz H. Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos [J]. Theor Appl Genet 1997(94): 737-748.
- [11] Frame BR, Paque T, Wang K. Maize (*Zea mays* L.) [J]. Methods Mol Biol 2006(343): 185-199.
- [12] Todorova L, Kruleva M, Krapchev B, et al. Maize immature embryo culture[J]. Maize Newsletter Archives 1998(72): 72-76.
- [13] 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 (4) 332-338, 418.
- [14] 杨会, 王国英, 戴景瑞. 玉米优良自交系综 3、综 31 的转化研究[J]. 农业生物技术学报, 2001(4): 334-337, 410.
- [15] Ishida Y, Saito H, Ohta S, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens[J]. Nat Biotechnol, 1996(14): 745-750.