

# 外源激素在玉米离体培养中的作用研究

高武军<sup>1</sup>, 胡楠<sup>2</sup>, 魏开发<sup>1</sup>, 卢龙斗<sup>1</sup>

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 南阳理工学院, 河南 南阳 473004)

**摘要:** 以玉米自交系黄早4、综31的幼胚为材料, 对外源激素在玉米离体培养中的作用进行了研究。结果表明, 2.0 mg/L 的 2,4-D 可以诱导出高频率的胚性愈伤组织, 而添加高浓度的 6-BA 不利于胚性愈伤的诱导; 6-BA (0.5 mg/L) + KT (1.0 mg/L) + NAA (0.2 mg/L) 的激素组合对于胚性愈伤组织的分化明显优于其他的激素组合; 单独使用 1.0 mg/L 的 NAA 有利于根的生长和发育, 虽然 NAA 1.0 mg/L + 多效唑 2.0 mg/L 的激素组合中, 根的平均数量和平均长度不如单独使用 1.0 mg/L 的 NAA, 但是幼苗的移栽成活率二者无显著差异。

**关键词:** 玉米; 离体培养; 外源激素; 胚性愈伤

**中图分类号:** S513      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2007)01-0031-04

## Function of Exogenous Hormones on Maize Tissue Culture *in Vitro*

GAO Wu jun<sup>1</sup>, HU Nan<sup>2</sup>, WEI Kai fa<sup>1</sup>, LU Long dou<sup>1</sup>

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

2. Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China)

**Abstract:** The young embryos of maize inbred lines Huangzao4, Zong31 were cultured *in vitro* and the important functions of plant hormones were studied. The results indicated that medium for high frequency embryogenic callus was MS+2.0 mg/L 2,4-D; MS+6-BA 0.5 mg/L+KT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L was better for the callus differentiation; MS+1.0 mg/L NAA was good for root development and got almost the same survival rate as MS+NAA 1.0 mg/L+MET 2.0 mg/L did.

**Key words:** Maize; Culture *in vitro*; Exogenous hormone; Embryogenic callus

自 1975 年<sup>[1]</sup>以来, 玉米组织培养已经从包括幼胚<sup>[2,3]</sup>、未成熟花序<sup>[4]</sup>、花药<sup>[5]</sup>、小孢子<sup>[6]</sup>、叶片<sup>[7,8]</sup>、雌雄幼穗<sup>[9]</sup>、茎尖<sup>[10]</sup>等多种外植体诱导出愈伤组织。在玉米的离体培养中, 胚性愈伤组织诱导和分化、幼苗的状态以及根的质量对于其最终的移栽成活率至关重要, 其中, 植物外源激素的影响是重要因子之一。本研究在对基本培养基、基因型、不同培养基附加物试验<sup>[11]</sup>的基础上, 进一步对不同的植物激素的作用进行了系统的研究, 报道如下。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

玉米自交系黄早4、综31由山西省农科院农业生物技术研究中心王景雪研究员提供。

基本培养基 MS, NB, 改良 N6 的组成见文献 [12]。培养基 pH 为 5.8。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 玉米幼胚的制备 玉米材料在每年的 5 月

收稿日期: 2006-07-17

基金项目: 河南师范大学青年基金项目(20040011)

作者简介: 高武军(1973-), 男, 山西芮城人, 在读博士研究生, 主要从事植物遗传学研究。

上旬和下旬播种于河南师范大学试验田内, 每隔 10 d 播种一次, 7~8 月人工授粉。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, 然后在 0.1% HgCl<sub>2</sub> 中浸泡 5 min, 再用无菌水冲洗 4~5 次, 用刀片切去 3/5 籽粒, 挑出幼胚, 盾片朝上分别接种于相应的培养基上。

1.2.2 胚性愈伤组织的诱导与分化 将黄早 4 幼胚接种在表 1 中的 10 个激素组合的胚性愈伤诱导培养基上, 27℃, 暗培养, 7 d 继代一次, 继代后温度降为 25℃, 12 h 光照培养 2 周后统计胚性愈伤率, 试验设置 3 次重复, 取平均值作为胚性愈伤组织诱导率(胚性愈伤率=胚性愈伤外植体数/总外植体数×100%)。将黄早 4 和综 31 的 II 型愈伤转移到表 2 中的 9 个激素组合的胚性愈伤组织分化培养基上, 每试验设 3 次重复, 温度 25℃, 光照 12 h, 2 周继代一次, 4 周后统计分化率(分化率=正常出苗愈伤数/总胚性愈伤数×100%)。

表 1 胚性愈伤组织诱导培养基上不同外源激素的组合

组合	激素成分及浓度(mg/L)					
	2,4-D	KT	6-BA	NAA	ABA	ZT
1	2.0	0	0	0	0	0
2	2.0	4.0	1.0	0	0	0
3	2.0	2.0	1.0	0	0	0
4	2.0	0	0	0.2	0	0
5	2.0	0	0.5	0	0	0
6	2.0	1.0	0.5	0	0	0
7	2.0	0	0	1.0	0	0
8	2.0	1.0	0.5	0.2	0	0
9	2.0	1.0	0.5	0.2	1.0	0
10	2.0	1.0	0.5	0.2	1.0	0.2

注: 基本培养基为 NB+500 mg/L+700 mg/L; 蔗糖浓度为 30 g/L, 琼脂粉 7.5 g/L

1.2.3 胚状体幼苗的生根 待综 31 的胚状体幼苗 2~3 cm 高时将其转移到生根培养基上生根培养, 温度 20℃, 光照 8 h, 2 周后统计主根数量和根长。当幼苗生长至 10 cm 高度时进行移栽, 统计成活率

表 2 胚性愈伤组织分化培养基上不同外源激素的组合

组合	激素成分及浓度(mg/L)				
	6-BA	KT	NAA	ABA	GA <sub>3</sub>
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0.2	0	0
3	0.5	0	0.2	0	0
4	1.0	0	0.2	0	0
5	3.0	0	0.2	0	0
6	0.5	1.0	0	0	0
7	0.5	1.0	0.2	0	0
8	0.5	1.0	0.2	1.0	0
9	0.5	1.0	0.2	0	0.5

注: 基本培养基为改良 N6+500 mg/L+700 mg/L; 蔗糖浓度为 30 g/L, 琼脂粉 7.5 g/L

(成活率=移栽后 20 d 成活数/移栽总数×100%)。设 3 次重复, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 外源激素对胚性愈伤组织诱导的影响

为了确定胚性愈伤组织诱导的最佳外源激素组合, 设置了 6 种外源激素的 10 种组合。结果发现(图 1), 以 2.0 mg/L 2,4-D 在本试验条件下能够有效诱导黄早 4 胚性愈伤发生(图 2 A, B), 而且愈伤组织的分散性好, 质量较高。添加不同 KT, 6-BA, NAA, ABA, Zeatin 激素在相同培养条件下对于胚性愈伤率的提高并未达到显著水平。这说明 2,4-D 在脱分化过程中起关键的作用, 2,4-D 与内源激素相互作用, 即可完成脱分化过程。相反, 细胞分裂素 6-BA 的补充特别是当 6-BA 的浓度达到 1.0 mg/L 时, 严重抑制了胚性愈伤的发生, 同时导致愈伤组织褐化程度增加。

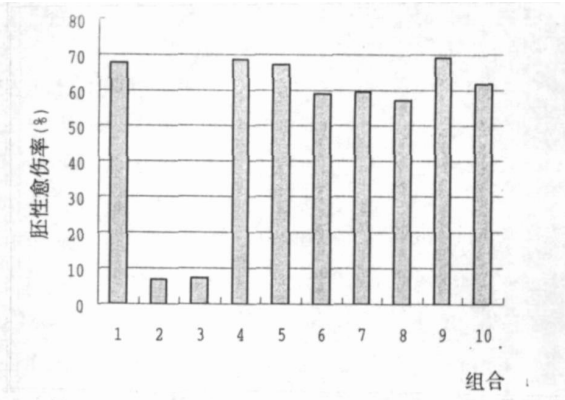


图 1 不同激素对胚性愈伤组织诱导率的影响

2.2 外源激素对胚性愈伤组织分化的影响

试验中发现, 分散性好的胚性愈伤在不加任何激素的条件下也能出苗。由表 3 的结果可以看出, 对于黄早 4 来说, 在 NAA 浓度为 0.2 mg/L 时, 将 6-BA 由 0.5 mg/L 提到 1.0~3.0 mg/L 后出苗率急剧下降, 一部分甚至褐化死亡, 显然高浓度细胞分裂素不利于胚性愈伤组织的分化。在培养基中补充了 ABA, 可以改善胚性愈伤组织的状态。在本试验中, 激素组合 7 的正常出苗最高。综 31 在试验中也表现出类似的结果, 分化 4 周后, 只有激素组合 7 能产生最高的分化率。显然以 6-BA (0.5 mg/L)+KT (1.0 mg/L)+NAA (0.2 mg/L) 的激素组合, 能较好保持愈伤的分化状态(图 2 d); 在激素组合 9 中没有观察到 GA<sub>3</sub> 有利于胚性愈伤分化的作用, 相反, GA<sub>3</sub> 对 II 型愈伤的分化有抑制作用, 多数愈伤产生根毛, 继代后大部分死亡。

表 3 外源激素对胚性愈伤组织分化的影响

组合	黄早 4			综 31		
	胚性愈伤数	分化数	分化率 (%)	胚性愈伤数	分化数	分化率 (%)
1	62	10	16.1	-	-	-
2	64	16	25.0	-	-	-
3	60	30	50.0	63	11	17.5
4	62	2	3.1	60	8	13.3
5	58	6	10.3	80	10	12.5
6	60	18	30.0	78	14	17.9
7	80	52	65.0	79	46	58.5
8	82	54	65.9	81	40	49.5
9	56	2	3.5	78	2	2.7

2.3 外源激素对再生苗生根的影响

为了提高胚状体苗的生根质量, 采用了 4 种激素组合进行试验。结果发现(表 4), 生根培养基中使用 NAA1.0mg/L 的组合有利于根的生长和发育(图 2E1, 2), 试验结果还显示, 虽然 NAA 1.0mg/L + 多效唑 2.0mg/L 的组合中, 根的数量和长度不如前者, 但是对于幼苗的移栽成活率二者无显著差异。多效唑可以使幼苗更壮实, 但是明显抑制了根的生长发育(图 2E4, 5)。本试验中的移栽成活率最高达到 55.2%, 对于进行玉米的遗传转化仍不够高, 需要进一步优化条件, 提高移栽成活率。

表 4 外源激素对胚状体幼苗生根的影响

编号	激素 (mg/L)	根平均数量 (条)	平均根长 (cm)	移栽成活率 (%)
1	NAA1.0	5.4	5.6	55.2
2	IBA1.0	1.6	2.0	-
3	IBA1.0+多效唑 2.0	2.4	2.1	28.3
4	NAA1.0+多效唑 2.0	3.5	2.0	52.8

注: 基本培养基为 1/2NB; 蔗糖浓度为 30g/L, 琼脂粉 6.5g/L

3 结论与讨论

本试验表明, 对于玉米的胚性愈伤组织的诱导来说, 2.0mg/L 的 2, 4-D 可以诱导出胚性愈伤, KT, 6-BA, NAA, ABA, Zeatin 的添加并未明显提高胚性愈伤率, 而且添加 6-BA 抑制了胚性愈伤的诱导, 这和 Kamada 和 Harada 报道的细胞分裂素可以抑制胚状体的诱导的结果是一致的<sup>[13]</sup>; 也有研究认为, 细胞分裂素在玉米胚性愈伤组织的诱导上有明显的促进作用, 这可能和玉米的基因型有关<sup>[14]</sup>。在改良 N6 的基本培养基上添加 0.5mg/L 6-BA + 1.0mg/L KT+ 0.2mg/L NAA+ 1.0mg/L 的 ABA 可以诱导出较高的胚性愈伤组织的分化率。玉米的愈伤组织的分化是个复杂的问题, 这种复杂性主要是由愈伤组织的多型性造成的, 分化率的高低与分化苗的质量也与基因型<sup>[11]</sup> 和培养基<sup>[3]</sup> 有很大的关系。玉米离体培养的幼苗移栽的成活率一直是限制玉米组织培养的难题, 其中, 关键问题之一是根的诱导和质量问题。本试验对胚状体发生苗和器官发生苗的根也进行培养条件的初步优化, 发现胚状体幼苗的根纤细, 影响了其移栽成活率, 而试验中通过器官发生的幼苗诱导出的根粗壮, 但是根的长度和数量不足。

总之, 玉米的组织培养是个复杂的问题, 多年来的研究已经在一些关键问题上取得一致的结论, 但是由于玉米组织培养中的影响因子多、遗传背景复杂, 因此, 对于多种因素之间的互作关系以及组织培养和玉米基因组之间的相关性还有待于进一步的深入研究。

参考文献:

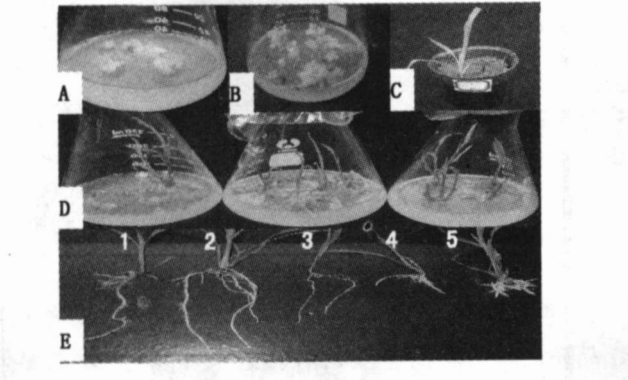
[ 1 ] Green C E, Rhodes C A. Plant regeneration from tissue cultures of maize[ J ] . Crop Sci, 1975, 15 : 417 - 421.

[ 2 ] Armatrong 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 ] 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 ] . 河南农业大学学报, 2000, 34( 4): 305 - 308.

[ 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.

( 下转第 38 页 )



A, B 黄早 4 胚性愈伤组织; C: 移栽成活的幼苗; D: 黄早 4 胚性愈伤分化的幼苗; E: 生根培养后幼苗的根系( 1, 2: NAA1.0mg/L; 3: IBA1.0mg/L; 4, 5: NAA1.0mg/L+ 多效唑 2.0mg/L)

图 2 玉米自交系胚性愈伤组织诱导、分化及生根情况

殖。另外, 当外源基因进入受体细胞后, 整合与表达以及表达量的积累都需要有一个过程。因此, 筛选压的时间即共培养后延迟多长时间进行选择也会影响转化频率。本试验中, 延迟 6d 筛选的转化频率最高。我们在试验过程中还发现, 羧苳青霉素与头孢霉素对于生根的影响, 在时间上没太大差异, 只是根的形态不同。

目前, 经过初步分子生物学检测, 已得到部分转基因植株。脂肪酸含量分析以及其他性状的检测仍需进一步进行, 期望筛选出高油酸的转基因植株, 并将这些基础材料应用于育种实践。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 吴正达. 高油酸向日葵[ J ]. 粮油食品, 2001, 71( 3 ): 49 - 51.
- [ 2 ] Waterhouse P M, Graham M W, Wang M. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA [ J ]. Proc Natl Acad Sci USA , 1998, 95( 23 ): 13959 - 13964.
- [ 3 ] 程振东, 卫志明, 许智宏. 根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化及转基因植株的再生[ J ]. 植物学报, 1994, 36( 9 ): 657 - 663.
- [ 4 ] 石淑稳, 周永明, 孙学成, 等. 甘蓝型油菜遗传转化体系的研究[ J ]. 华中农业大学学报, 1998, 17( 3 ): 205 - 210.
- [ 5 ] Wang Y, He B, Zeng Y - L. Improving high frequency plant regeneration of the explant of cotyledon with petiole rapeseed( Brassica napus ) [ J ]. Chin J Oil Crop Sci, 2004, 26( 4 ): 86 - 90.
- [ 6 ] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant[ J ]. DNA Nucl Acid Res, 1980, 8: 4321 - 4325.
- [ 7 ] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system[ J ]. Plant Mol Biol Rep, 1987, 5: 387 - 405.
- [ 8 ] 韩德俊, 袁本威, 胡甘, 等. 农杆菌介导的油菜遗传转化研究进展[ J ]. 西北农林科技大学学报( 自然科学版 ), 2005, 33( 11 ): 18 - 22.
- [ 9 ] Tony W, Petri S, Lidia T, *et al.* Agrobacterium mediated transformation and stable expression of the green fluorescent protein in Brassica rapa[ J ]. Plant Physiology and Biochemistry, 2003, 41: 773 - 778.
- [ 10 ] 石东乔. 油菜脂肪酸调控基因工程研究及杨树叶绿体表达载体的构建[ D ]. 北京: 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 2000.
- [ 11 ] 陆万香, 李名扬, 裴炎, 等. 玉米几丁质酶基因导入甘蓝型油菜的研究[ J ]. 西南农业大学学报, 2001, 23( 2 ): 130 - 133.
- [ 12 ] 高武军, 王景雪, 卢龙斗, 等. 根癌农杆菌介导的油菜基因转化研究进展[ J ]. 生物学通报, 2002, 37( 6 ): 10 - 12.
- [ 13 ] 周小梅, 李君剑, 赵军良, 等. 抗生素对农杆菌的抑制和对油菜外植体分化的影响[ J ]. 西北植物学报, 2005, 25( 1 ): 52 - 56.
- [ 14 ] 傅荣昭, 贾士荣, 孙勇如. 植物遗传转化技术[ M ]. 北京: 科学技术出版社, 1994.
- [ 15 ] Moloney M M, Walker J M, Sharma K K. High efficiency transformation of Brassica napus using Agrobacterium vectors[ J ]. Plant Cell Reports, 1989, 8( 4 ): 238 - 242.
- [ 5 ] 杜娟, 母秋华, 贾玉峰, 等. 利用桥接组合的转育方法提高玉米花药诱导率的研究[ J ]. 玉米科学, 1999( 3 ): 16 - 18.
- [ 6 ] 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.
- [ 7 ] 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.
- [ 8 ] Ray DS, Ghosh PD. Somatic embryo genetics and plant regeneration from cultured leaf of Zea mays L. [ J ], Annals of Botany. 1990, 66: 497 - 500.
- [ 9 ] 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.
- [ 10 ] 高树仁, 李彦舫, 杜鹃. 玉米茎尖培养诱导愈伤组织及植株再生的研究[ J ]. 东北农业大学学报, 2005, 36( 3 ): 283 - 285.
- [ 11 ] 高武军, 孙富丛, 魏开发, 等. 玉米胚性愈伤组织诱导与分化的影响因素[ J ]. 华北农学报, 2005, 20( 1 ): 27 - 30.
- [ 12 ] Mckeronta, Yang S F. Biosynthesis and metabolish of ethylene[ M ]. Davies P J (ed). Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development Dordrecht, the Netherlands: Martinus Nijhoff Publ, 1989: 94 - 112.
- [ 13 ] Kamada H, H Harada. Studies on the organogenesis in carrot tissue culture I . effect of growth regulation on somatic embryogenesis and root formation[ J ]. Z. Pflanzphysiol. 1979, 91: 255 - 266.
- [ 14 ] 李效宇, 徐龙珠, 张根发. 玉米幼穗离体培养体细胞胚高频发生的研究[ J ]. 西北植物学报, 1997, 17( 3 ): 405 - 409.

(上接第 33 页)