

玉米幼胚组织培养及其转化的研究

赵云云¹,周小梅^{2*},王国英³

(1.首都师范大学 生物系,北京 100037;2.山西大学 生命科学与技术学院,太原 030006;
3.中国农业大学 农业生物技术国家实验室,北京 100094)

摘要:对6个玉米自交系和15个杂交组合的幼胚在不同培养基中进行了愈伤组织诱导、继代、分化培养,所试材料都能诱导出状态良好的愈伤组织,并在继代培养中生长正常.使用Dicamba和AgNO₃能促进和改善愈伤组织的诱导数量和质量,二者对愈伤组织的良好状态和分化能力的保持具有协同效应.在分化培养基中提高蔗糖的浓度和附加细胞分裂素有利于胚状体的形成和苗的分化.杂交组合的愈伤组织生长状态遗传了双亲的特点,正反交试验表明,其特征更接近母本.对自交系Z3和Z31进行基因枪转化,PCR及PCR-Southern检测证实外源基因的导入.

关键词:玉米;组织培养;转化

中图分类号:Q813 **文献标识码:**A

玉米(*Zea mays*)是重要的粮食、饲料和工业用粮作物,它的组织培养、再生植株和遗传转化一直受到人们的普遍重视.建立高效的体细胞再生系统是进行突变体筛选、抗性、育种工作,特别是转基因研究的基础.自Green等^[1]首次报道从幼胚培养诱导出愈伤组织并再生植株以来,玉米的组织培养研究得到了迅速发展.但是,玉米的体细胞再生能力受基因型和培养条件的影响较大,以致玉米的遗传转化受体多年来只限于A188、B73、BMS^[2~4]等少数几个品系.如何克服基因型的限制,扩大材料范围,建立良好的组织培养体系是开展玉米基因工程的基础.本研究以6个玉米自交系和15个杂交组合的幼胚为材料,探索玉米的组织培养及其转化方法.

1 材料和方法

1.1 供试材料

植物材料为玉米6个自交系:综3、综31、P9-10、齐31、获白、L1029(即Z3、Z31、P9-10、Q31、HB和L1029)及其由此而配合的15个杂交组合(包括4个正反交,见表1)幼胚的愈伤组织.

表1 本试验所用的玉米自交系及其杂交组合

♀	♂	Z3	Z31	P9-10	Q31	HB	L1029
Z3		●				▲	
Z31		★	●		▲		
P9-10		★		●			
Q31		★	▲		●		▲
HB		▲			★	●	▲
L1029		★	★	★	▲	▲	●

●表示自交;★表示杂交;▲表示正反交

pAMB质粒载有玉米矮花叶病毒(MDMV)的外壳蛋白(CP)基因,如图1.

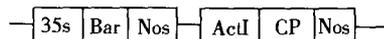


图1 pAMB质粒图

收稿日期:2005-09-12;修回日期:2005-09-20

基金项目:北京市教育委员会科技发展计划项目(01KJ-112)

作者简介:赵云云(1961-),女,北京人,副教授,研究方向为植物学.*通讯联系人:E-mail:zhouxm@sxu.edu.cn.

1.2 玉米幼胚的组织培养

取授粉后 10 d~12 d 的玉米雌穗,去苞叶后在 70 % 的乙醇中浸泡 2 min,取出后在超净台上吹干,剥幼胚接种于诱导培养基上。

1.3 培养基

用于自交系的诱导培养基为 D 培养基^[5],用于杂交组合的是 N₆ 培养基并附加 2,4-D 2 mg/L 或 Dicamba 2 mg/L,脯氨酸 690 mg/L,水解酪蛋白 200 mg/L,蔗糖 30 g/L,琼脂 7 g/L,pH 5.8。继代培养基中分别使用 N₆、B₅、MS 的微量成分以及 N₆ 和 R 有机成分。分化培养基中设计了三种细胞分裂素和两个蔗糖浓度的组合。生根培养基比较了 MS、N₆、B₅ 大量元素、微量及有机成分的影响。

1.4 玉米基因枪转化

玉米愈伤组织的基因枪转化方法参见文献^[6]。轰击后的愈伤组织转至附加 bialaphos 6 mg/L 的选择培养基上进行 3~4 次选择培养,每次 3 周。抗性愈伤组织转移到分化培养基上分化出苗,将小苗移至生根培养基中生根壮苗。当小植株根系较发达且长至三叶一心时移到花盆中(蛭石:腐殖质=2:1),3~4 周后移栽到大田。

1.5 转化体的分子检测

PCR 引物 1: 5' GGTC AAAGAGACAAAGACGTTGAC 3' 引物 2: 5' GATTCGCTGAA-GACCGTATCTTG 3' 可特异扩增 CP 基因的一段编码区(400bp)。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,循环 35 次;72 °C 延伸 10 min。扩增产物在 1.2 % 琼脂糖凝胶上电泳,观察照相。PCR-Southern blot 是在 PCR 电泳检查的基础上,将凝胶中的 DNA 按 Sambrook 等^[7]所述转移到杂交膜上,与³²P 标记的 MDMV CP 基因片段探针进行杂交。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导及其继代培养

6 个自交系及其 15 个杂交组合的玉米幼胚在不同培养基中进行愈伤组织的诱导培养,其愈伤组织的生长情况如下。

2.1.1 不同基因型的影响

6 个自交系在诱导培养基上都易产生愈伤组织,在愈伤组织的继代过程中,Z31、Z3 常保持良好的生长状态,色泽鲜黄,属于结构致密的 Type I 型愈伤组织;Q31 和 HB 在继代培养中易分化,显示了这两个自交系具有较强的分化能力;P9-10 常处于良好的黄色愈伤组织状态,但分化不明显;而 L1029 自交系总处于褐化状态,培养基中使用 Dicamba 和 AgNO₃ 可减缓褐化。

杂交组合的愈伤组织生长状态同亲本相似,遗传了两个亲本的特征,如 L1029 同其它 5 个自交系的组合在同一种培养基上的生长状态,以 L1029×Z31 最好,L1029×P9-10 处于不分化状态,L1029×Q31 和 L1029×HB 易分化,L1029×Z3 较 L1029×Z31 差。从正反交的结果来看,愈伤组织特性更接近母本,如 Q31×L1029 比 L1029×Q31 好、HB×Z3 比 Z3×HB 好。再有,愈伤组织状态具有累加效应,即 HB×Q31 最好,HB×Z3 次之,HB×L1029 较差(Q31×Z31、Q31×Z3 和 Q31×L1029 也类同)。

2.1.2 培养基成分的影响

比较了 N₆、B₅、MS 的微量成分以及 N₆ 和 R 有机成分对玉米愈伤组织继代和分化的影响。在愈伤组织的继代生长上,B₅ 微量和 N₆ 微量均可使之保持良好的状态,但 B₅ 微量组分更全面,而在含 MS 微量元素的培养基上生长的愈伤组织易颜色发黄、质地变硬,更有利于分化。

R 有机成分除含有常见培养基中的 VB₁、VB₆、VPP 外,还附加了许多有机物质,共达 10 种。对于如此丰富的有机营养来说,不同基因型的愈伤组织对其的反应不同,Z3、Z31 在含有 R 的 D 培养基上生长状况很好,Q31 和 HB 在含 N₆ 有机的培养基上也保持了良好的生长状态,而杂交组合则完全没有必要使用 R 有机成分。特别是对于分化来说,丰富的有机营养只会使愈伤组织保持高度分裂状态,而不利于分化。

在玉米自交系的组织培养中,使用 Dicamba 和 AgNO₃ 能改善愈伤组织的生长状态。但对有些材料,在用 2,4-D 和用 Dicamba 上没有明显差别,如 Q31 和 HB。培养基中添加 AgNO₃ 可以改善愈伤组织的质量,显

著提高 Type I 型胚性愈伤的产量和质量. 但若连续使用, 则可能使其效果变得越不明显, 因此可以采用间断添加法. 然而, 对于一些特殊的组合如 L1029×P9-10, 则在不加 AgNO₃ 的培养基上生长得更好.

2.2 愈伤组织的分化培养

设计了不同的分化培养基(表 2)以比较细胞分裂素种类、蔗糖浓度和生长素对愈伤组织分化的影响结果见表 2.

表 2 玉米愈伤组织在分化培养基中的生长情况

培养基编号	蔗糖 (%)	2,4-D (mg/L)	6-BA (mg/L)	KT (mg/L)	ZT (mg/L)	愈伤组织状况	出苗	生根
1	3							++
2	3		2				++	
3	3			2			+++	
4	3				2		+	
5	6					结构致密		+
6	6	0.5				疏松		
7	6		2			胚状体	+	

+为数量较少, ++为数量较多, +++为数量很多

玉米愈伤组织在不加激素的分化培养基中容易分化根, 尤其是在低蔗糖浓度情况下更是如此. 提高蔗糖浓度, 会使愈伤组织结构致密, 而加入少量的 2,4-D 则有利于调整愈伤组织的疏松状态.

分化培养基中加入细胞分裂素有利于出苗, 在所试的三种分裂素中, 以 KT 出苗最多, ZT 较少, 但 KT 诱导的苗较细, BA 和 ZT 诱导出的苗较壮. 细胞分裂素的浓度一般以 2 mg/L 为宜, 过高时易形成次生苗, 因此, 在高浓度下培养的时间不易过长.

高糖下有利于胚状体的诱导, 低糖下则有利于分化苗. 高糖培养基上生长的苗更粗壮.

诱导苗分化时, 培养基中不宜加入生长素类激素, 如 IAA、IBA, IAA 会使根系膨大, IBA 则会形成黄化苗.

除分化培养基中的成分对苗的形成有影响外, 分化还受继代培养基和不同材料及其生理状态的影响(自交系、杂交种、Type I/Type II 愈伤组织的比例等). 若愈伤组织中 Type II 型较多时, 分化可在不含激素的培养基中直接成苗, 否则需要提高蔗糖浓度来诱导胚状体或加分裂素促进苗分化. 自交系比杂交种更需要激素诱导分化, 继代时间长的材料也要用分裂素来促进分化.

2.3 小苗生根诱导及植株再生

将培养皿中的小苗移入生根培养基中诱导根的分化和壮苗. 一个月后测量苗高和根长. 从表 3 中看出, 生根培养基中仍需加入一定量的蔗糖补充碳源. 随着糖浓度增高, 根长增加, 在 MS 和 N₆ 培养基中生长的苗高虽然没有明显差别, 但 MS 更为适于壮苗培养. 此外也可在生根培养基中加入 0.5 mg/L~1 mg/L 的 NAA 促进生根.

表 3 玉米组培苗在生根培养基中的生长情况

培养基	大量元素	微量元素	有机成分	水解酪蛋白 (mg/L)	L-脯氨酸 (mg/L)	蔗糖 (%)	平均苗高 (cm)	平均根长 (cm)
R1	N ₆	B ₅	N ₆	100	700	5	12.3	7.0
R2	MS	MS	MS	100	700	2	12.5	4.0
R3	1/2MS	MS	MS	100	700	0	8.5	2.2

组织培养过程见图 2(P311).

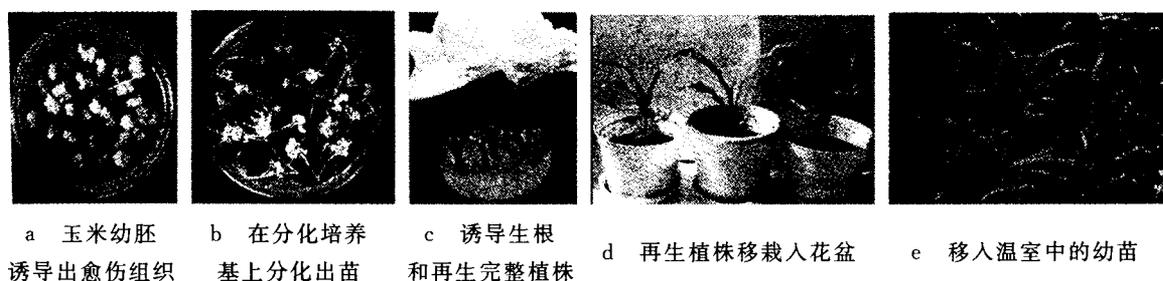
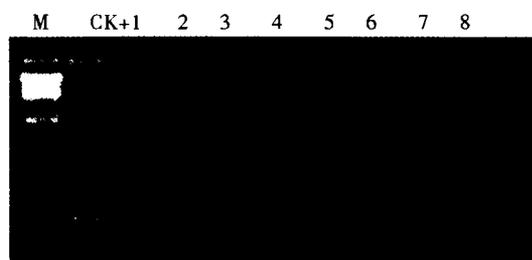


图2 组织培养过程

2.4 玉米自交系的转化和转化植株的分子检测

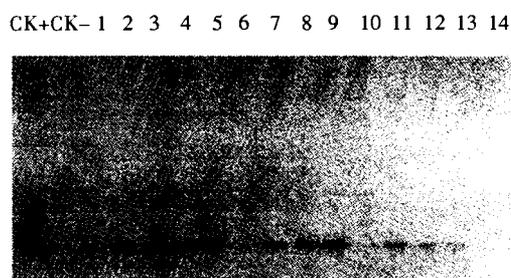
本试验重点转化了玉米自交系 Z3 和 Z31. 两个自交系的幼胚在 D 培养基上诱导出的愈伤组织生长快、色泽鲜亮, 经基因枪转化后及 3 个月的抗性筛选, 抗性愈伤转至分化培养基中分化出苗, 再转到生根培养基中诱导生根. 再生小植株先移入花盆, 继而移栽到温室.

用设计的 PCR 引物, 以质粒 DNA、未转化植株的 DNA 和转化植株的 DNA 为模板进行 PCR 扩增(图 3), 结果表明, 在转化植株中部分株系呈阳性反应. PCR-Southern 结果也证实外源基因已插入玉米的基因组中(图 4).



M: EcoRI/HindIII 双酶切 λ -NDA
 CK+: 阳性对照 (质粒 pAMB)
 CK-: 阴性对照 (质粒 pAMB)
 1-8: 转化再生植株

图3 部分转化再生植株的 PCR 扩增结果



CK+: 阳性对照 (质粒 pAMB)
 CK-: 阴性对照 (未转化植株)
 1-14: 转化再生植株

图4 部分转化再生植株的 PCR-Southern 结果

3 讨论

用于转基因的玉米受体材料受基因型的影响较大, 建立和完善玉米自交系的组织培养及其转化系统是植物转基因的基础. 与杂交种相比, 玉米自交系的转化有相当的难度. 玉米自交系大多数在一般的培养条件下, 组织培养性状不够理想, 诱导出的愈伤组织状态差, 或不易分化. 在玉米 P9-10 自交系的转化系统中, 通过改良培养基(采用 MS 微量元素, 附加肌醇)使难以再生的愈伤组织分化出了胚状体, 获得了转基因植株^[8]. 由此看来, 通过调整培养基优化组织培养再生体系仍有一定的潜力. 在我们的实验中, 根据不同的自交系调整培养基中的微量元素组分和有机成分、添加 AgNO_3 、使用 Dicamba 等, 使所试的玉米自交系都诱导出了状态良好的愈伤组织, 并保持了相当长的时间.

玉米的愈伤组织诱导和植株再生能力受遗传因素的控制, 这种组培差异的遗传效应主要以加性效应为主, 在某些组合中, 也存在一定的显性效应^[9]. Bronsdema 等^[10]用正反交分析比较研究愈伤组织形成和植株再生, 发现核质效应的存在. Kamo 等通过 B73 与 A188 正反交实验发现玉米愈伤组织的诱导频率和再生能力存在母性效应^[11]. 在我们的试验中也观察到了玉米组培的核效应和质效应的存在. 随着玉米自交系培养的逐步完善, 通过改变培养基中的成分和培养条件来克服基因型的限制仍有相当的潜力, 更多生产上常用的自交系有望在植物遗传工程操作中得到利用, 从而与常规育种接轨向产业化方向发展.

参考文献:

- [1] GREEN C E, PHILLIPS R L. Plant Regeneration from Tissue Cultures of Maize[J]. *Crop Sci*, 1975, 15: 417-421.

- [2] ISHIDA Y, SAITO H, OHTA S, *et al.* T. High Efficiency Transformation of Maize (*Zea mays* L.) Mediated by *Agrobacterium Tumefaciens*[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, **14**: 745-750.
- [3] SONGSTAD D D, ARMSTRONG C L, PETERSON W L. Production of Transgenic maize Plants and Progeny by Bombardment of Hi-II Immature Embryos[J]. *In Vitro cell dev. Biol-Plan*, 1996, **32**: 179-183.
- [4] RUSSELL D R, WALLACE K M, BATHE J H, *et al.* Stable Transformation of Phaseolus Vulgaris via Electric Discharge Mediated Particle Acceleration[J]. *Plant Cell Reports*, 1993, **12**(3): 165-169.
- [5] DUCAN D R, WILLIAMS M E, ZEHR B E, *et al.* The Production of Callus Capable of Plant Regeneration from Immature Embryos of Numerous Zea Mays L. genotypes[J]. *Planta*, 1985, **165**: 322-332.
- [6] 王国英, 杜天兵, 张宏, 等. 用基因枪将 Bt 毒蛋白基因转入玉米及转基因植株再生[J]. *中国科学(B 辑)*, 1995, **25**(1): 71-77.
- [7] SAMBROOD J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] 周逢勇, 王国英, 谢友菊, 等. 玉米自交系 P9-10 遗传转化体系的建立[J]. *科学通报*, 1998, **43**(23): 2517-2520.
- [9] 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.
- [10] BRONSEMA T B F VAN, OOSTVEEN W J G VAN, LAMMEREN A A M VAN. Comparative Analysis of Callus Formation and Regeneration on Cultured Immature Maize Embryos of the Inbred Lines A188 and A632[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, **50**(1): 57-65.
- [11] KAMO K K, HODGES T K. Establishment and Characterization of long-term Embryogenic Maize Callus and Cell Suspension Cultures[J]. *Plant Science*, 1986, **45**: 111-117.

Study on Tissue Culture and Transformation of Maize

ZHAO Yun-yun¹, ZHOU Xiao-mei², WANG Guo-ying³

(1. Department of Biology, Capital Normal University, Beijing 100037, China;

2. School of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

3. State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agriculture University, Beijing 100094, China)

Abstract: Immature embryos of 6 inbred and 15-hybrid maize (*Zea mays*) were cultured on modified D or N₆ medium. Callus was induced from all the genotypes tested and grow normally. The supplement of silver nitrate and Dicamba in media were found to improve both the quality and the quantity of the embryogenic calli. A synergistic effect between AgNO₃ and Dicamba was observed for callus initiation and maintenance. High concentration of sucrose and cytokinin show to be most favorable for the formation of the embryogenic callus and shoot differentiate. The result of hybrid combination indicated that the capacity to form regenerable callus cultures in maize had a heritable basis. The study for 4 reciprocal crosses showed that there were probably some maternal effects on maize callus cultures. The lines of Z3 and Z31 were used for transformation by bombardment. PCR and PCR-Southern hybridization demonstrated that the extrogenous gene had integrated into the maize genome.

Key words: Maize; tissue culture; transformation