

玉米组织培养及植株再生研究进展

唐毅成, 罗红兵

(湖南农业大学农学院, 长沙 410128)

摘 要: 玉米组织培养及再生, 目的是让外植体能够高频率地诱导出愈伤组织, 建立高效的体细胞再生体系, 为玉米遗传转化和细胞工程研究创造有利条件。主要综述了玉米组织培养研究进展, 并就玉米组织培养存在的问题提出了解决方法。

关键词: 玉米; 组织培养; 植株再生

中图分类号: S513.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5280(2007)05-0629-05

植物细胞具有该植物体全部遗传的可能性, 在一定条件下具有发育成完整植物体的潜在能力。1902 年提出的细胞学说和细胞全能性学说为组织培养技术的产生奠定了理论基础, 对组织培养技术的建立进行了有益的探索。植物组织培养已经过了近百年的历史, 尤其是从 20 世纪 60 年代以来, 组织培养得到了迅速发展。2006 年第 11 届国际植物组织培养和生物技术大会在北京召开, 研讨的主要内容包括组织培养在生物多样性保存中的作用, 更加引起了世界对植物组织培养的重视, 此后玉米组织培养也有重要的进展。

1 玉米组织培养研究简要回顾

Larue 在 1949 年用甜玉米的胚乳作外植体, 首次诱导出玉米愈伤组织, 但未获得再生植株。1975 年, Green 和 Phillips 首次用 A188 的幼胚作外植体, 诱导出二倍体愈伤组织, 并再生得到第一株无性系植株^[1]。从此玉米组织培养技术不断发展完善, 现在已经能从多种外植体中诱导出愈伤组织, 并再生出植株。例如: 幼胚、成熟胚、花药、幼苗切段、幼苗叶基部、幼苗基部叶片、幼胚的芽顶分生组织、雌雄幼穗、雄幼穗颖片、未成熟花序、幼苗芽顶分生组织及中胚轴、节间芽组织、茎节切段等^[2~6]。大量研究表明, 虽然玉米可诱导出愈伤组织的外植体较多, 但幼胚和幼穗是使用最多的、也是诱导率最高和再生能力最强的^[7~11]。郭新梅等在 2007 年为研究不同基因型玉米自交系幼胚愈伤组织的培养特性, 得出 Reid、旅大红骨和其他种质 8 个自交系具有较好的幼胚培养特性和植株再生特性, 愈伤组织诱导率高, 且愈伤整齐、大小适中、植株再生

率高, 适宜作为受体材料进行遗传转化。由于玉米的体细胞再生能力受基因型和培养条件的影响较大, 所以玉米的遗传转化诱导率高的受体多年来只限于 A188, B73, BMSCz 等少数几个品系^[35]。

2 影响玉米组织培养中愈伤组织诱导的因素

基因型是影响玉米愈伤组织产生的关键因素, 受体系统中存在再生率低、基因型依赖性强等缺陷。Spencer 等研究发现^[12], 玉米的基因型、幼胚大小及植株的发育状态是影响玉米幼胚培养及植株再生的重要因素, 其中玉米的基因型影响特别大。另外, 外植体的类型和外植体原来在植株上所处的位置(反映了内源激素水平)对愈伤组织诱导的影响也较大。相同自交系在不同培养基上胚性愈伤的诱导率存在显著或极显著的差异; 不同自交系材料在相同 MS 和 N6 培养条件下其愈伤诱导率存在显著或极显著差异。张颖等在研究中发现, 不同基因型要求的最适培养基存在差异, 2, 4-D 对愈伤组织的诱导率影响显著^[13]。前人试验证明, 细胞和愈伤组织的形态发生, 主要受外植体本身、培养基和培养环境等三大类因素的调控^[14]。

2.1 材料本身

2.1.1 遗传型

选择和建立良好的植物受体系统是进行基因转化成功的关键, 愈伤组织是植物基因转化常用的受体系统之一。建立玉米愈伤组织的受体系统的关键是选择合适的外植体, 只有合适的外植体才能诱导出胚性愈伤。材料的基因型对愈伤组织的器官分化有决定性的影响。不同植物种的器官分化明显不同, 许多研究者对玉米不同基因型的幼胚进行离体培养研究, 认为玉米愈伤组织的诱导能力较为普遍, 但诱导率因基因型的不同有明显差异。1999 年付凤玲等研究得出, 杂交种的诱导率大于自交系, 自交系的诱导率大于远源杂交后代。杜文平等用改良培养基进行诱导培养, 所选材料 3 种基因型中 78599 愈伤

收稿日期: 2007-10-30

作者简介: 唐毅成(1983—), 男, 湖南常德人, 硕士研究生。
通讯作者: 罗红兵。

基金项目: 湖南省自然科学基金项目, 编号 04JJ3022, 05JJ3034。

诱导率最高^[15]。一基因型雌幼穗的诱导频率高于雄幼穗。同一基因型不同外植体其诱导率有一致性。1999年付凤玲等选用杂交种、自交系、远缘杂交后代为材料,得出雌幼穗诱导率较高的基因型,雄幼穗的诱导率也较高。自交系5022雌幼穗不能诱导愈伤组织,雄幼穗也不能诱导成功。不同基因型在相同2,4-D浓度培养基上诱导,诱导率也有较大差别。徐立华等用玉米胚性愈伤组织作转化受体时,材料齐319愈伤诱导率最高。综上所述,基因型是影响愈伤组织诱导的一个重要因素。

2.1.2 器官和部位

玉米的不同器官或组织所形成的愈伤组织有明显差异,目前用于玉米组织培养的外植体主要是幼胚和幼穗。外植体长度不同,对愈伤组织的诱导率有影响。授粉后10~20 d的1~2 mm的幼胚愈伤组织的诱导率最高,小于1 mm的幼胚愈伤组织的诱导率低甚至不能诱导出,大于2 mm的通常会直接萌发出芽鞘和根,影响出愈率及愈伤组织的质量。付凤玲等认为最适宜的幼胚是1.0~1.5 mm。李慧芬等得出1.2~1.5 mm的幼胚形成颗粒状、黄色、表面较干的胚性愈伤组织,诱导频率高达96.7%,并得到再生植株。外植体部位不同,对愈伤组织的诱导率有影响。在幼穗诱导愈伤组织研究中,吴家道等认为玉米的雌、雄幼穗均可诱导出愈伤组织,且以1~2 cm大小的雌、雄幼穗为最适宜的外植体。2005年王昌涛等以玉米自交系材料幼胚、茎尖、成熟胚和下胚轴为外植体,对愈伤组织的诱导和植株再生进行了研究,结果所取4种外植体均可诱导出愈伤。但仅从幼胚和茎尖诱导出胚性愈伤组织,转入分化培养基后获得再生植株,而成熟胚和下胚轴不能获得再生植株^[16]。2006年陈莉等发现玉米的成熟胚和茎尖愈伤诱导率相关,但两种外植体诱导出的愈伤组织状态明显不同,茎尖诱导出的愈伤组织状态普遍比成熟胚的好;两种外植体的愈伤分化率差异明显,成熟胚愈伤组织最高分化率为2.13%,茎尖愈伤组织最高分化率可达21.2%^[17]。

2.1.3 年龄

同一材料的外植体在不同时段甚至不同年份,诱导愈伤组织的频率也会有很大差异。年龄较幼的外植体,不仅易于诱导形成愈伤组织,而且也容易诱导分化成植株。1999年付凤玲等研究表明,诱导愈伤组织的雌雄幼穗,以小穗分化期,植株发育大约在13~14片叶期为宜。2006年,徐立华等证明胚龄对诱导率的影响较大,10 d左右最易诱导,过大或过小均不易诱导胚性愈伤。选择幼胚的大小和基因型及采样季节有很大关系,一般早熟品种授粉后幼胚生长较快,晚熟品种生长较慢,夏季高温季节授粉后幼胚长得快,秋季温度较低时,幼胚生长较慢。因此,采样时间要根据基因型、生长季节和幼胚的长度来决定。

2.2 培养基

在外部因素中,培养基的成分是影响诱导率的主要因素之一,不同培养基的诱导能力和继代能力有很大差异。培养基的各种成分和物理性质,都对器官发生产生一定影响,但起决定作用的是植物生长激素,特别是生长素和细胞分裂素的配比。1993年周洪生的研究表明,同一材料在MS培养基上继代变褐,在MSZ培养基上能够继代,最后得到再生植株。1994年母秋华等以甜玉米的幼胚为外植体,接种在Zhang14, Cj7, 8114, MS, N6培养基上,以Cj7, 8114, Zhang14培养基上胚性愈伤组织的形成频率较高;在8114, Zhang14上的外植体不仅诱导率高,且质量好,易形成结构致密、成颗粒状的胚性细胞团,在MS上的外植体易产生褐变与畸形器官分化;在N6上的外植体易形成根系较多的白色松散愈伤组织。2002年王宏伟等用不同培养基对不同基因型的玉米试验材料进行愈伤组织诱导和分化培养,选出改良MS培养基为最佳诱导培养基和分化培养基;同时找出了成活率达80%以上的玉米组培苗栽培方法^[18]。

2.2.1 生长激素

腺嘌呤与IAA的比例是控制芽和根形成的重要条件之一,IAA对芽的抑制作用可为腺嘌呤或腺苷所克服。腺嘌呤与IAA比例高时,有利于芽形成。反之,有利于根形成。这样通过变换激素的种类和浓度,可有效地调节培养组织的器官分化。不同生长素和细胞分裂素,对生根和长芽的效果是不同的。如NAA对生根的作用比IAA和IBA的效果好,但用IAA和IBA处理,产生的根比较健壮,而用NAA处理,产生的根则较纤细。2,4-D往往对生根不利,特别是在较高浓度下。2003年,肖莉杰等以幼胚为外植体诱导愈伤组织发现2,4-D浓度范围为1~3 mg/L时诱导率较高。KT和BA能广泛地诱导芽的形成,但BA比激动素的效果好。2006年,徐立华等用玉米胚性愈伤组织作转化受体时,发现培养基中2,4-D的浓度对玉米愈伤组织的诱导率有极大影响,不同基因型的最大胚性愈伤组织诱导率所需的2,4-D浓度也不相同,一般为0.5~1.0 mg/L。2007年姚丹等研究了不同培养基、不同激素种类和浓度及不同碳源的种类和浓度对愈伤组织诱导的影响。结果证明NB培养基的胚性愈伤组织诱导率最高;对不同基因型玉米自交系2,4-D浓度2 mg/L时胚性愈伤组织诱导率均最高。2007年杜文平等以78599、A189和糯杂3号的幼胚为外植体进行幼胚培养,研究最佳培养基配方及培养程序。发现在其它条件不变的情形下,2,4-D浓度降到1 mg/L,胚性愈伤组织呈颗粒状分散且颗粒细小,呈黄绿色。此种胚性愈伤组织接种在加KT或加BA的分化培养基中,以加KT的绿苗数多。愈伤组织分化时不同基因型所需最适6-BA浓度不同。玉米素的作用范围较窄,所以多数植物采用BA和KT来诱导芽的形成。

2.2.2 无机营养元素

在植物组织培养中,和整体植物一样,细胞的生长也要求满足植物生长的必要元素,若完全缺乏或过多或不足,也会影响细胞生长和分化。不过其影响不如激素的影响明显。但是各种类型的植物,器官所需要的每种元素的量,特别是大量元素是有区别的,如生根培养要求无机离子浓度小一些,所以常用1/2MS或White培养基。如有些植物要求的氮,以硝酸态形式供应为佳;而有些植物要求的氮,以铵态氮的形式供应为佳。

2.2.3 有机成分

在培养基中加糖、肌醇和甘氨酸等,可以满足愈伤组织的生长和分化的要求。各种氨基酸和嘌呤、嘧啶类物质,可以促进器官分化。其中酰胺类往往有促进器官形成的作用。水解酪蛋白中含有多种氨基酸,在进行器官分化培养时,加入一定量是有益的。幼胚在附加4 mg/L 2,4-D且去掉水解酪蛋白和L-脯氨酸的N6改良培养基上,幼芽及根的数量少、出愈率高、愈伤组织质地好,并减少了幼胚自发性芽分化的趋势,有利于保持愈伤组织胚性、提高再生植株频率,为玉米自交系幼胚诱导的适宜培养基。在以20 g/L蔗糖和20 g/L葡萄糖及30 g/L蔗糖和10 g/L葡萄糖作碳源的诱导培养基上愈伤组织诱导率最高,但不能长期继代使用。糖的种类和浓度,对培养组织的增殖及以后的器官分化均有明显影响,它不仅可作为碳源,而且也是培养基渗透调节剂。

在组织培养过程中加一些植物器官的汁液,也常常产生良好的效应。如椰子汁、麦芽汁、酵母提取物、番茄汁、荸荠汁、马铃薯汁、青玉米汁等等,其中用得最多而有效的是椰子汁。这些汁液不仅提供了一些生理活性物质,而且也补充了一些未知的微量成分。

2.2.4 物理性质

培养基的物理性质(固体状态或液体状态,渗透压和pH)对形态发生有明显的影响。培养基中的渗透压,对细胞增殖和胚状体的形成都有十分明显的影响,在花药培养中受到普遍的重视。2005年邓士政等研究发现,愈伤组织在植株再生前经过48 h震荡洗脱加48 h吸湿干燥处理、或仅进行48 h吸湿干燥处理均可普遍提高植株再生苗率,加快植株再生进程,但易发生愈伤组织先生根现象。震荡洗脱加干燥处理可以更快促进植株再生。各处理对不同基因型愈伤组织在植株再生率、植株再生进度和愈伤组织生根的影响程度上存在差异^[19]。

2.3 培养环境条件

影响愈伤组织的诱导率除上述因素外,还与以下因素有关:培养温度的高低、光照的长短等均对诱导和继代有明显的作用。

2.3.1 光照

在离体无菌培养条件下,光照的作用并不是提供光

合作用的能源,因为培养基中已有足够的碳源供利用,这时细胞是处在异养条件下。因此,光对器官的作用是一种诱导反应。一定的光照对小苗的形成、根的发生、枝的分化和胚状体的形成有促进作用。

2.3.2 温度

在玉米组织培养中,一般采用25±1℃的恒温条件进行外植体的培养,对一般植物来讲,都可较好地形成芽和根。但是很多资料表明,温度高低对器官发生的数量和质量仍有影响。

3 玉米组织培养中存在的问题及解决的办法

3.1 诱导愈伤组织的频率

玉米组织培养中许多基因型材料都存在着愈伤组织诱导频率低、质量差、分化再生植株困难或畸形苗多等现象,直接影响着遗传转化技术的运用范围及遗传转化中转化体的筛选和植株再生。改良培养条件可以克服基因型材料所带来的这一障碍。1985年Duncan研究通过改良培养基成分,使90%以上的材料都可诱导出愈伤并再生植株。1999年黄璐等研究了细胞分裂素在玉米愈伤组织诱导和植株再生中的作用,结果表明低浓度(0.2 mg/L)的细胞分裂素能促进玉米幼胚诱导的愈伤组织再生植株的能力,且6-BA的效果好于KT,高浓度的脯氨酸有利于维持胚性愈伤组织,高比例的确态氮有利于植株再生。1999年付凤玲等研究结果得出,适量的L-脯氨酸和水解酪蛋白,具有提高胚性愈伤组织诱导率的作用。植株再生因基因型不同,其再生途径有所不同。1999年黄璐等报道普甜1号以器官发生为主要途径,苏玉1号则以体胚发生途径为主,长期继代的愈伤组织易失去再生能力。选择愈伤组织诱导率高且再生能力强的基因型材料,采用适宜的外植体、培养基、培养条件和培养方式等可以提高愈伤组织的诱导频率。高武军等发现在培养基上附加水解酪蛋白、L-脯氨酸对于玉米胚性愈伤组织的诱导分化是必要的,而附加L-谷氨酰胺、甘露醇、AgNO₃对提高胚性愈伤组织的诱导作用不显著;另外还发现胚性愈伤组织诱导培养基和胚性愈伤组织分化培养基的组合对成苗率有明显的影[20]。而孙红炜等发现8 mg/L的AgNO₃可以明显提高玉米再生率。MET可以有效抑制玉米苗徒长,大大提高玉米再生苗的移栽成活率^[21]。马丽等研究得出高胚性率的材料一般具有较强的植株分化能力,低胚性率的材料其分化能力很低或没有分化成株的能力。

3.2 试管苗的移栽

玉米组织培养技术发展试管苗存活率一直较低,成功的移栽试管苗比较困难。1993年周洪生探索了简单高效的移栽方法,将再生苗直接移入温室或大田土中,存活率达80%以上,所得再生植株生长健壮,抽穗吐丝正常。2000年张莉萍等用高温灭菌的大田土和河沙按4:1

的比例混合,盛入小营养钵中,将生长旺盛,根系较发达的小植株移入,用农用薄膜封起来,开2~3个透气小孔,于光照条件下炼苗,间隙掀开薄膜透气,并补充灭菌后十分之一去有机成分的MS液体培养基,7 d后拆去薄膜,将苗移至散射自然光下,待植株长至4~5片叶、较健壮时带土移入大田。4~5片叶移栽,此时生长点距第一节间只有1~2 cm,埋得过深、湿度温度过高或土壤通透性差等原因都会导致茎基部腐烂,引起生长点的死亡,所以移栽时尽量浅植,保湿时注意经常掀开薄膜,待叶片略有萎焉时重新覆上,如此反复多次,以达到保湿和通气防腐。另外,移入营养钵的植株对营养和光照也有一定的要求,对补充的MS液体培养基,应防止营养过高而烧苗。通过该方法的应用,移栽成活率可达到近80%。

3.3 污染

污染在组织培养过程中经常出现,污染率的高低决定组织培养能否正常进行。污染有两条途径:(1)外植体带菌,(2)各操作环节带菌。玉米常用75%的乙醇作为外植体表面的杀菌剂,75%的乙醇对细胞有很强的穿透性和杀伤力,灭菌时间不宜过长,约6 s即可杀死外植体表面大部分微生物,一般因材料不同控制在5~60 s,延长灭菌时间会增加外植体损伤程度^[47]。操作环节可通过严格操作来控制,如对培养基、培养皿、镊子等工具彻底灭菌,工作环境定期打扫、熏蒸,超净工作台开启15 min后用75%的乙醇擦拭台面;接种的镊子,接完1瓶(或2瓶)要消毒1次;操作人员在操作中要经常用75%的乙醇擦洗手部等;配制培养基要注意使各种化合物、激素等完全溶解,避免产生沉淀等。

3.4 褐化

在组织培养中,褐化可导致不能产生愈伤组织,即使产生白色颗粒状的愈伤,质地也很硬,无分化能力。继代过程中,褐化会使愈伤组织生长受到抑制,其发育质量受到影响,愈伤组织难以保存^[48]。分化过程中,褐化影响根的形成和发育,甚至腐烂死亡。选择适宜的外植体、培养基和培养周期可控制某些组织培养过程中的褐化问题。1997年徐振彪建立一种半固体培养系统,可以控制分化过程中的褐化,半固体培养系统中琼脂的用量是一个关键因素,1.0~1.5 g/L琼脂效果最佳。1999年姚洪军等指出,适量的无机盐成分、激素、蔗糖、温度及在黑暗条件下培养,可以显著减轻材料的褐变。王宏伟等证明基因型不同的材料发生褐化的程度不同。培养基添加20 g/L甘露醇后褐化率由高于30%降到10%以下;培养温度为24~25℃时,幼胚褐化率最低^[22]。

4 玉米组织培养前景展望

前人研究表明玉米幼胚愈伤组织的诱导及植株再生频率具有高达90%以上的遗传力。玉米植株的再生受多

种因素影响,包括培养基种类、基因型、培养条件、激素等。如改变培养基种类及激素等,对某些玉米基因型而言,可能会获得更高的再生频率。目前,玉米育种仍主要采用传统的方法。传统育种方法选育一个自交系至少需5~7年,育种周期长、工作量大。大多育种单位采取南繁加代来加快玉米品种选育进程,但南繁加代要耗费大量的人力物力。所以提高玉米组织培养技术的发展速度刻不容缓,而基础培养材料的选择,培养基配方的调整和污染褐化的控制等是玉米组织培养技术发展的主要空间^[43]。2006年第11届国际植物组织培养和生物技术大会在北京召开,随着现代生物技术特别是组织培养技术的发展,玉米高效快速育种进程将踏上新的台阶。

参考文献:

- [1] Green CE, Phillips RL. Plant regeneration from tissue culture of maize[J]. Crop Science, 1975, 15: 417—418.
- [2] 孙世孟. 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.
- [3] Duncan DR. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes[J]. Planta, 1985, 165: 322—332.
- [4] Hongchang MA. Direct generation of maize haploids via anther culture[J]. Cytologia, 1991, 56: 103—106.
- [5] Heng Zhong. In-vitro morphogenesis of corn (*Zea mays* L.) I. Differentiation of multiple shoot clumps and somatic embryos from shoot tips[J]. Planta, 1992, 187: 483—489.
- [6] Heng Zhong. In-vitro morphogenesis of corn (*Zea mays* L.) II. Differentiation of ear and tassel clusters from culture shoot apices[J]. Planta, 1992, 187: 490—497.
- [7] Armstrong CL, Green CE. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and involvement of L-proline[J]. Planta, 1985, 164: 207—414.
- [8] Welser E, Clayton DS, Miller AM, et al. Corpho-types of friable embryogenic maize callus[J]. Cell Report, 1995, 14: 742.
- [9] 李世润, 张举仁, 陈惠民. 玉米胚性愈伤组织诱导和植株再生的研究[J]. 山东大学学报, 1990, 25(1): 116—124.
- [10] 陈英, 曹毅, 周先礼, 等. 玉米幼胚的组织培养及其植株再生的研究[J]. 四川大学学报, 1999, 36(6): 1125—1129.
- [11] 袁鹰, 刘德璞, 郑培和, 等. 东北玉米自交系胚性愈伤组织的诱导[J]. 玉米科学, 2001, 9(1): 37—38.
- [12] Spencer TM, Gordon Kamm WJ, Daines RJ. Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture[J]. Theor Appl Genet, 1990, 79: 625—631.
- [13] 张颖, 孙庆泉, 刘玉贞, 等. 玉米胚性愈伤组织转基因

- 受体系统建立的研究初报[J]. 玉米科学, 2006, 14(4): 28—31.
- [14] 郭新梅, 张晓东, 韩立新, 等. 不同基因型玉米幼胚愈伤组织的培养特性[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(4): 68—72.
- [15] 杜文平, 徐利远, 余桂容, 等. 玉米幼胚离体培养体系的建立[J]. 玉米科学, 2007, 15(2): 73—75.
- [16] 王昌涛, 杨爱国, 高树仁, 等. 玉米不同外植体愈伤组织的诱导及植株再生的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(5): 515—518.
- [17] 陈莉, 窦秉德, 白光宏, 等. 玉米成熟胚和茎尖愈伤诱导及其植株再生能力比较[J]. 新疆农业大学学报, 2006, 29(3): 46—49.
- [18] 王宏伟, 史振声, 王志斌, 等. 玉米幼胚愈伤组织的诱导及植株再生的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(5): 321—323.
- [19] 邓士政, 付金峰, 季良越. 玉米愈伤组织再生植株的促进方法研究[J]. 河南农业大学学报, 2005, 39(1): 5—9.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 姚洪军. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(3): 78—84.
- [23] 施介村. 青饲玉米原生质体培养再生植株并开花结实[J]. 植物学报, 1991, 33(6): 409—416.
- [24] 吴家道. 从玉米幼穗再生完整植株[J]. 植物生理学通讯, 1982, (2): 41—42.
- [25] 陈莉, 杨晋彬, 罗玉明, 等. 甜玉米成熟胚愈伤组织的诱导及植株再生特性的评价[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(3): 184—188.
- [26] 杨会, 王国英. 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, 9(4): 334—337.
- [27] 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—61.
- [28] 傅作中, 隋云凌, 徐振彪, 等. 玉米93供113-1花药愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 吉林农业科学, 1998, 12(2): 46—47.
- [29] Spencer TM, Gordon-Kamm WJ, Daincs RJ, et al. Biolaphos selection of stable transformants from maize cell culture[J]. Theor Appl Genet, 1990, 79: 625—631.
- [30] 付凤玲, 李晚忱, 荣廷昭. N6培养基添加钙和烯效唑对玉米幼胚培养的作用[J]. 作物学报, 2005, 31(5): 634—639.
- [31] 付凤玲, 李晚忱, 荣廷昭, 等. 提高N6培养基钙浓度对玉米幼胚培养的影响[J]. 西北农林科技大学学报, 2003, 31(1): 81—84.
- [32] 张红梅, 刘小红, 张红伟, 等. 不同杂种优势类群玉米幼胚愈伤组织的诱导及植株再生特性的研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(1): 50—55.
- [33] 谷祝平, 郑国铝. 玉米幼胚愈伤组织培养中体细胞胚发生的研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 1990, 26(4): 121—126.
- [34] 季良越, 孙晓丽, 韦小敏, 等. 玉米幼胚愈伤组织诱导和植株再生研究[J]. 河南农业大学学报, 2002, 36(2): 101—105.
- [35] 杜何为, 张祖新, 郑用琰. 玉米组织培养体系的研究[J]. 湖北农业科学, 2003, (4): 22—24.
- [36] 王宏伟, 史振声, 邢志远. 玉米幼胚组织培养褐化发生因素的研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(18): 4665—4666.
- [37] 王毅, 谢友菊, 戴景瑞. 玉米体细胞胚状体的发生和植株再生[J]. 北京农业大学学报, 1989, 15(2): 127—133.
- [38] 姚丹, 郝文媛, 沈刚, 等. 玉米自交系愈伤组织诱导及植株再生研究[J]. 玉米科学, 2007, 15(2): 67—72.
- [39] 贾利敏, 张红梅, 贾利欣. 玉米组织培养和植株再生的研究现状[J]. 内蒙古农业科技, 2002, (3): 10—13.
- [40] 曹俊梅, 窦秉德, 陈莉, 等. 玉米幼胚和成熟胚愈伤组织分化反应性比较[J]. 新疆农业大学学报, 2005, 28(2): 10—13.
- [41] 王昌涛, 杨爱国, 高树仁, 等. 玉米不同外植体愈伤组织的诱导及植株再生的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(5): 515—518.
- [42] 马丽, 孙庆泉, 周玉亮, 等. 玉米自交系幼胚培养能力与遗传关系研究(简报)[J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(2): 164—172.
- [43] 王宏伟, 史振声, 王志斌, 等. 玉米自交系快速选育新技术[J]. 中国种业, 2007, (5): 55—56.
- [44] 石太渊. 玉米体细胞培养中不同基因型和外植体的反应[J]. 国外农学—杂粮作物, 1999, 19(5): 11—14.
- [45] 张莉萍. 转基因玉米减少无性变异、提高成活率的研究[J]. 四川农业大学学报, 2000, 18(3): 232—235.
- [46] 李群. 植物组织培养中控制污染技术研究[J]. 四川林业科技, 1999, 20(4): 22—26.
- [47] 朱广廉. 植物组织培养中外植体灭菌[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(6): 444—449.
- [48] 徐振彪. 植物组织培养过程中的褐化现象[J]. 国外农学—杂粮作物, 1997, 17(1): 55—56.
- [49] 母秋华. 超甜玉米细胞和组织培养及其后代育种[J]. 吉林农业科学, 1994, (2): 6—9.
- [50] 张宏. 超声波介导法转化玉米愈伤组织及可育转基因植株的获得[J]. 作物学报, 1998, 24(4): 497—502.
- [51] 傅作申. 玉米幼胚愈伤组织诱导及植株再生[J]. 玉米科学, 1998, (3): 32—34.
- [52] 王雷. 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.