

提高N₆培养基钙浓度对玉米幼胚培养的影响*

付凤玲, 李晚忱, 荣廷昭*, 潘光堂

(四川农业大学 玉米研究所, 四川 雅安 625014)

[摘要] 筛选试验结果表明, 将N₆培养基Ca²⁺浓度从1.13 mmol/L提高到5 mmol/L, 对玉米幼胚胚性愈伤组织的诱导、继代和分化具有促进作用。在一次继代过程中, Ca²⁺浓度为5 mmol/L的培养基上培养的胚性愈伤组织相对生长量比1.13 mmol/L的原培养基增加0.8倍。Ca²⁺浓度提高以后, 在培养基中再添加钙调蛋白(CaM)抑制剂盐酸氯丙嗪(CPZ), 可抑制Ca²⁺的促进作用, 说明钙增加后对玉米胚性愈伤组织诱导和继代的促进作用受Ca²⁺/CaM信息系统控制。用改进后的N₆培养基, 可提高生产上大面积推广的玉米自交系胚性愈伤组织的诱导率和继代生长量。

[关键词] 玉米幼胚; 组织培养; 转基因; 胚性愈伤组织

[中图分类号] S513.035.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)01-0081-04

与水稻等作物相比, 玉米胚性愈伤组织的诱导、继代和分化再生更为困难。受基因型的限制, 一些生产上大面积推广的优良自交系不易诱导产生可再生的胚性愈伤组织, 难以建立转基因操作的受体系统。目前, 用A188、B73、墨西哥甜玉米等模式自交系及其衍生系的幼胚作外植体, 诱导愈伤组织的技术已较成熟^[1~6]。但是这些自交系的农艺性状不能满足生产要求, 其转基因植株要经过复杂、长期的杂交转育才能育成实用品种。Ca²⁺与钙调蛋白(CaM)结合, 可引起植物细胞的一系列生理变化, 提高其对不良环境的适应性^[7,8]。本研究拟通过筛选试验, 调整N₆培养基中的Ca²⁺浓度, 提高大面积推广的优良自交系胚性愈伤组织的诱导率和继代生长量, 为玉米转基因操作提供良好的受体系统。

1 材料与方法

1.1 试验材料

研究材料为生产上大面积推广的玉米优良杂交种的亲本自交系S37、48-2、18-599、掖478、P22、R08、R09和5022。取授粉13 d左右, 长1.5~2 mm的幼胚作外植体。

1.2 培养基

基本培养基 N₆+ 蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L, pH 5.8。

愈伤组织诱导培养基 基本培养基+脯氨酸

1.38 g/L+水解酪蛋白500 mg/L+2, 4-D 2 mg/L。

继代培养基 基本培养基+脯氨酸690 mg/L+水解酪蛋白100 mg/L+甘露醇20 g/L+2, 4-D 1 mg/L。

分化培养基 基本培养基+水解酪蛋白100 mg/L+KT 1 mg/L。

1.3 培养条件和胚性鉴别

将外植体接种于愈伤组织诱导培养基, 27℃暗培养, 及时切去幼芽及根状体。形成愈伤组织后, 按Ammstrong等^[1]和李世润等^[5]介绍的鉴别标准, 挑选胚性愈伤组织, 转入继代培养基, 14℃下暗培养。分化培养温度为27℃, 每天光照12 h。

1.4 浓度筛选

将继代培养基中的Ca²⁺浓度提高到2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mmol/L, 并调节pH值至5.8, 以Ca²⁺浓度1.13 mmol/L的继代培养基为对照, 每处理转接21支试管, 每试管10块愈伤组织, 转接的愈伤组织为继代时间相同和质地相当的胚性愈伤组织块, 愈伤组织净重为接种后的重量减去接种前试管和培养基的重量。转接后27℃暗培养, 20 d后调查愈伤组织生长状况, 以愈伤组织相对生长量((培养后重-培养前重)/培养前重)为指标, 确定继代培养基最佳Ca²⁺浓度。

根据继代培养基最佳Ca²⁺浓度, 将诱导培养基

* [收稿日期] 2002-01-24

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30070476); 四川省应用基础基金资助项目

[作者简介] 付凤玲(1962-), 女, 陕西蒲城人, 副研究员, 硕士, 主要从事玉米生物技术和遗传育种研究。

* 责任作者。

Ca^{2+} 浓度分别提高到 4, 5, 6 mmol/L, 调节 pH 值至 5.8, 以 Ca^{2+} 浓度为 1.13 mmol/L 的诱导培养基为对照, 每处理接种 7 支试管, 每试管 10 个外植体, 27 暗培养, 40 d 后调查愈伤组织诱导率(发生胚性愈伤组织的外植体数/接种外植体总数), 确定诱导培养基最佳 Ca^{2+} 浓度。

1.5 盐酸氯丙嗪对 Ca^{2+} 作用的抑制

逆境下钙对植物组织生长具有促进作用, 其作用机理涉及 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 信息系统。盐酸氯丙嗪是 CaM 与钙结合的抑制剂, 当其与 CaM 首先结合后, $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 信息系统的信号传导功能受阻, 钙的促进作用即会减弱。本试验在最佳 Ca^{2+} 浓度(5 mmol/L)的继代培养基和对照继代培养基(Ca^{2+} 浓度 1.13 mmol/L)中添加钙调蛋白抑制剂——盐酸氯丙嗪(CPZ) 0.3 $\mu\text{mol/L}$ ^[8], 20 d 后调查其与未

添加 CPZ 的愈伤组织相对生长量的差异, 以证明钙对胚性愈伤组织的促进作用是否涉及 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 信息系统。

2 结果与分析

2.1 继代培养基 Ca^{2+} 浓度的筛选

将诱导产生的胚性愈伤组织转接到不同 Ca^{2+} 浓度的继代培养基上, 20 d 后愈伤组织相对生长量见表 1。由表 1 可见, 各自交系胚性愈伤组织继代生长最快的 Ca^{2+} 浓度不尽相同, 但都集中在 5 mmol/L 左右, 平均比对照增加 0.8 倍。由此认为, 继代培养基的最佳 Ca^{2+} 浓度为 5 mmol/L。而且, 愈伤组织颗粒疏散, 色泽鲜黄, 更符合 Amstrong 等^[1] 和李世润等^[5] 介绍的胚性愈伤组织鉴别标准。

表 1 愈伤组织在不同 Ca^{2+} 浓度继代培养基上的相对生长量

Table 1 Growth rate of callus at subculture media with different Ca^{2+} consistency

自交系 Inbred lines	Ca^{2+} 浓度/(mmol·L ⁻¹)									
	1.13	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S37	2.21	2.64	3.13	4.75	5.43	5.55	4.82	4.17	3.88	3.80
48-2	2.01	2.34	3.32	3.45	4.81	4.23	4.20	3.49	2.57	2.41
18-599	3.62	4.14	4.58	6.64	7.34	5.98	5.51	5.08	4.33	4.76
掖 478 Ye 478	3.71	3.60	3.79	4.89	4.56	4.70	3.68	3.01	2.97	2.84
P22	3.51	4.38	5.02	5.38	6.84	5.63	5.01	4.46	4.01	3.72
R08	2.63	3.09	3.71	4.56	4.70	4.71	3.62	3.49	3.41	2.81
R09	2.58	3.16	3.35	4.24	5.02	4.69	3.20	3.30	3.27	3.34
5022	3.31	2.83	3.15	3.76	4.31	4.27	3.36	2.51	2.35	2.05

2.2 对提高诱导率培养基中 Ca^{2+} 浓度的作用

根据继代培养基 Ca^{2+} 浓度的筛选结果, 将易于诱导胚性愈伤组织的玉米自交系 18-599, P22, R09 的幼胚分别接种于 Ca^{2+} 浓度为 4, 5, 6 mmol/L 的诱导培养基上, 40 d 后的愈伤组织诱导率见表 2。由表 2 可见, 在 Ca^{2+} 浓度为 5 mmol/L 的诱导培养基上, 3 个自交系的愈伤组织诱导率和每个外植体幼胚诱导出的愈伤组织块数, 均比 Ca^{2+} 浓度约为 1.13 mmol/L 的对照高, 尤以愈伤组织诱导率的提

高更为明显。试验中发现, 当钙浓度提高到 6 mmol/L 以上时, 培养基质地脆弱, 弹性降低, pH 值变异较大, 可能是影响胚性愈伤组织诱导和继代的原因。同时, 用对照诱导培养基(Ca^{2+} 浓度为 1.13 mmol/L)不能诱导出愈伤组织的基因型, 即使提高钙浓度, 也不能诱导胚性愈伤组织的产生。可见, 适当提高钙浓度, 只是改善了培养条件, 使之更适应胚性愈伤组织的产生和继代生长, 从而提高了诱导率和继代生长量。

表 2 不同 Ca^{2+} 浓度诱导培养基对自交系愈伤组织的诱导率

Table 2 Callus induction rate of 18-599, P22, R09 at induction media with different Ca^{2+} consistency

自交系 Inbred lines	Ca^{2+} 浓度/(mmol·L ⁻¹)	Ca^{2+} consistency	接种外植体数 Explant number inoculated	产生愈伤外植体数 Callus number induced	愈伤组织诱导率/%		愈伤组织块数/外植体 Callus number per explant
					Callus induction rate	愈伤组织诱导率/%	
18-599	1.13(CK)	70	54	77.1			3.6
		4	70	54	77.1		3.9
		5	70	59	84.3		4.1
		6	70	57	81.4		3.6
P22	1.13(CK)	70	36	51.4			2.1
		4	60	31	51.7		2.3
		5	70	38	54.3		2.3
		6	70	35	50.0		2.1
R09	1.13(CK)	60	27	45.0			1.7
		4	70	29	41.4		2.3
		5	70	33	47.1		2.3
		6	70	31	44.3		1.7

2.3 盐酸氯丙嗪对Ca²⁺促进作用的抑制

在最佳Ca²⁺浓度(5 mmol/L)和对照(1.13 mmol/L)的继代培养基中添加钙调蛋白抑制剂盐酸氯丙嗪(CPZ)0.3 μmol/L, 转接培养玉米自交系18-599, P22, R09的胚性愈伤组织, 20 d后愈伤组织相对生长量与未添加CPZ对照的差异见表3。表3结果表明, 在Ca²⁺浓度为5 mmol/L的继代培养基中添加CPZ后, 3个自交系愈伤组织相对生长量均

显著降低; 而Ca²⁺浓度为1.13 mmol/L的继代培养基中添加CPZ后, 愈伤组织相对生长量降低较少, 3个自交系的表现趋势相当。观察发现, CPZ不但明显抑制Ca²⁺的促进作用, 还使胚性愈伤组织色泽暗淡, 质地干燥, 胚性发育不良。这说明增加钙浓度, 对胚性愈伤组织诱导和继代的促进作用受Ca²⁺/CaM信息系统控制。

表3 不同Ca²⁺浓度继代培养基添加盐酸氯丙嗪对愈伤组织相对生长量的影响

Table 3 Effect of CPZ on callus growth rate at subculture media with different Ca²⁺ consistency

盐酸氯丙嗪含量/ (μmol·L ⁻¹) CPZ content	Ca ²⁺ 浓度/(mmol·L ⁻¹) Ca ²⁺ consistency					
	1.13(CK)			5.00		
	P22	18-599	R09	P22	18-599	R09
0	3.46	3.37	2.51	6.65	7.51	5.24
0.3	3.24	3.21	2.27	2.93	3.65	2.41

2.4 增加Ca²⁺浓度对愈伤组织分化再生的影响

在Ca²⁺浓度5 mmol/L的继代培养基上继代的18-599, P22, R09的胚性愈伤组织, 用分化培养基分化再生, 分化成苗率分别达67.3%, 51.3%和52.5%, 比Ca²⁺浓度为1.13 mmol/L的对照培养基(61.4%, 47.1%, 45.9%)分别提高6%, 4%和6.5%。

因此, 作者认为, 将N₆培养基Ca²⁺浓度从1.13提高到5 mmol/L, 可以改进玉米自交系胚性愈伤组织的诱导、继代和再生, 从而为玉米转基因研究提供良好的受体系统。

3 讨 论

Ca²⁺在ABA诱导基因表达中起重要作用, 在ABA含量相同的条件下, 增加Ca²⁺的浓度, 可使ABA诱导的特异RAB mRNA表达水平提高。ABA对植物体细胞胚的发生与发育具有重要作用^[9]。在合子胚发育过程中, ABA可促进同化产物的分配, 并在胚性基因表达中发挥重要作用^[10]。伴随着胚性愈伤组织的发生, 内源ABA相应出现一个峰值^[11]。本试验结果也表明, 适当增加N₆培养基Ca²⁺浓度, 可以明显提高玉米胚性愈伤组织产量, 但当浓度超过10 mmol/L后, 增加的效果显著降低。

当细胞内Ca²⁺浓度增加时, Ca²⁺与钙调蛋白

(CaM)结合, 形成Ca²⁺-CaM复合体, 活化许多关键酶, 引起一系列生理生化反应。钙调蛋白抑制剂CPZ通过与CaM的结合, 使CaM结合钙的功能丧失, 失去信号传导功能, 不能启动ABA的基因表达, 因而使胚性愈伤组织生长量显著受抑。说明N₆培养基Ca²⁺浓度增加引起的玉米胚性愈伤组织诱导率和继代生长量的提高, 受Ca²⁺/CaM信使系统活化和ABA基因表达的控制。由此推测, Ca²⁺-CaM作为第二信使对ABA诱导基因表达起着极其重要的作用。

综上所述, 将N₆培养基Ca²⁺浓度由原来的约1.13 mmol/L提高到5 mmol/L, 可以促进愈伤组织的诱导和继代生长, 并通过对愈伤组织生长状态的改良和胚性愈伤组织继代生长量的增加提高绿苗再生率。一些生产上大面积推广的优良自交系, 可通过对愈伤组织继代生长建立转基因操作受体系统。但是, 不同基因型之间胚性愈伤组织诱导率的差异仍然存在。

本试验中, 当钙浓度提高到6 mmol/L以上时, 胚性愈伤组织的诱导率和继代量虽然比对照(钙含量1.13 mmol/L)有所提高, 但不及5 mmol/L钙浓度时的增长量。究其原因, 可能是N₆培养基钙浓度过高影响了培养基的质子配比平衡所致, 关于此问题还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 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
- [2] Duncan D R, Williams M E. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous Zea mays genotypes[J]. Planta, 1985, 165: 322- 332
- [3] Kamo K K, Hodges T K. Establishment and characterization of long-term embryogenic maize callus and cell suspension cultures[j]. Plant

- Sci, 1986, 45: 111- 117.
- [4] Hodges T K, Kamo K K, Inbrie C W. Genotypes specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize[J]. Bio Tech, 1986, 4: 219 - 223.
- [5] 李世润, 张举仁, 张惠民. 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(自然科学版), 1990, 25(1): 116- 124.
- [6] 付凤玲, 张莉萍, 朱 祯. 玉米优良自交系转基因受体系统建立及转化后的筛选与再生[J]. 四川农业大学学报, 2000, 18(2): 97- 99, 108.
- [7] 章文华, 刘友良. 盐胁迫下钙对大麦和小麦离子吸收分配及H⁺-ATP酶活性的影响[J]. 植物学报, 1993, 35(6): 435- 440.
- [8] 汪良驹, 刘友良, 马 凯. 钙在无花果细胞盐诱导脯氨酸积累中的作用[J]. 植物生理学报, 1999, 25(1): 38- 42.
- [9] 崔凯荣, 邢更生, 周功克, 等. 植物激素对体细胞胚胎发育的诱导与调节[J]. 遗传, 2000, 22(5): 349- 354.
- [10] 覃章铮, 唐锡华, 潘国祯. 水稻胚和胚乳内源ABA含量的变化及其与发育和萌发的关系[J]. 植物学报, 1990, 32(6): 448- 455.
- [11] 张东向, 张崇浩, 李杰芬. 玉米叶片胚性愈伤组织诱导及其与内源IAA和ABA关系的初步研究[J]. 作物学报, 2000, 26(2): 195- 199.

The effect of raising calcium consistency of N₆ medium on maize immature embryos' culture

FU Feng-ling, LI Wan-chen, RONG Ting-zhao, PAN Guang-tang

(Institute of Maize Research, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: The selection experiment showed that improved N₆ medium by increasing Ca²⁺ content from 1.13 to 5 mmol/L promoted embryogenic callus induction and subculture growth from maize immature embryos. During one time of subculture, growth rate of embryogenic callus increased by 0.8 times as subcultured on the medium with Ca²⁺ content of 5 mmol/L as subcultured on the medium with Ca²⁺ content of 1.13 mmol/L. Addition of CPZ, CaM inhibitor, to the medium with 5 mmol/L Ca²⁺ performed an inhibition effect on the promotion role of Ca²⁺. The improved N₆ medium could be used to increase embryogenic callus induction rate and subculture growth rate from popularized maize inbreds and provide acceptor system with excellent genetic foundation for transgenic operation.

Key words: maize immature embryos; tissue culture; transgenic; embryogenic callus

(上接第80页)

Study into film-covering rape cultivation technique and its application in North Weihei Dry-land of Shaanxi

DONG Zhen-sheng¹, JING Jun-sheng¹, ZHANG Yu-wen²,
ZHANG He-ping³, CHANG Guang-ping⁴, XILEI⁵

(1 College of Agronomy, Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Baodi Institute of Agricultural Science, Qishan, Baodi 722400, China; 3 Xianyang Agricultural Bureau, Jianjun Town, Qian County 723400, China;

4 Yanan Luochuan Institute of Agricultural Science, Luochuan, Yanan 727400, China; 5 Weinan Institute of Agricultural Science, Sunzhen, Weinan 715501, China)

Abstract: Experiments showed that the rape yield was increased significantly by various ways of film-covering, especially, the bunch planting was the highest, the yield could increase 71.8% compared with non-film-covering cultivation. Furrow planting beside film was the follow-up, 33.6% higher than CK. By means of three-year extensive practice from 1999 to 2001, it has been found that bunch planting is inconvenient for mechanized operation and it is a waste of time and labour. Furrow planting beside film is convenient for mechanized planting, and the mass would like to accept. During the three years, planting area of the film-covering rape was 28 500 hm², rape yield increased 18 500 t, increasing value 33 262 000 RMB in the north Weihei dry-land.

Key words: North Weihei Dry-land; film-covering; rape cultivation