

玉米获白 × 莱 1029 的悬浮细胞系的建立及其再生植株的研究*

孙世孟 赛吉庆 谢友菊

(北京农业大学生物学院, 北京, 100094)

提 要

利用玉米获白 × 莱 1029 的未成熟胚诱导的愈伤组织, 系统地研究了愈伤组织的改良、悬浮细胞系的建立及其分化。结果表明, 获白 × 莱 1029 的愈伤组织在高硝态氮的培养基上, 经过调节 2, 4-D 的浓度、渗透压和 NaCl 的浓度, 选择得到了黄色、小颗粒状结构、不分泌粘液、快速生长和易于悬浮的松散愈伤组织: 在悬浮培养初期, 经过高浓度 2, 4-D 的启动, 短时间内先后建立了 4 个悬浮细胞系, 并对其中一个系的生长特性进行了鉴定: 采用过渡分化的方法, 悬浮细胞系再生了 7 株完整、健壮的试管苗。文章还对愈伤组织改造中所采用的措施进行了单因子分析, 对有关问题进行了讨论。

关键词 玉米悬浮细胞, 组织培养, 植株再生

对大多数不能利用 T_i 质粒进行转化的禾谷类作物而言, 悬浮细胞和原生质体是迄今进行外源基因导入的良好受体^[7,8,12,13,14,15,16,17]。目前认为禾谷类植物原生质体最好的来源是胚性悬浮细胞系^[4,5,6,11,12,13,14,15,17], 即要获得能再生植株的原生质体往往离不开特定的悬浮细胞。但众所周知, 由原生质体再生植株比较困难^[6,12,14,15], 特别是转化后的原生质体给再生植株更增加了难度^[13,17]。八十年代以来随着基因枪的诞生, 用悬浮细胞直接进行基因转化已经成为现实^[7,8], 并且取得了显著的成绩, 这点在玉米转化中更为突出。因此建立良好的玉米胚性悬浮细胞系, 为玉米的基因转化工作提供良好的受体系统, 具有十分重要的现实意义。本文报道以获白 × 莱 1029 为材料, 通过对愈伤组织的筛选和改良, 建立了良好的玉米悬浮细胞系, 并得到了再生植株。本文还对愈伤组织改良中所采用的若干措施进行了单因子分析, 对所建立的悬浮细胞系进行了评价, 对有关问题进行了讨论。

1 材 料 与 方 法

1.1 实验材料 玉米单交种获白 × 莱 1029 的幼穗。

1.2 愈伤组织的诱导 取授粉后 12 天的幼穗, 在超净台上剥去苞叶, 挑取穗子中部的幼胚, 使盾片向上接种于 MS₁ 培养基 (MS 培养基的无机盐, 0.5mg/l VB₁, 132mg/l 天门冬酰胺, 690mg/l 脯氨酸, 20g/l 蔗糖, 1-4mg/l 2, 4-D) 上, 在黑暗条件下培养, 温度为 25-28°C。

* 本文在实验过程中, 曾得到中国科学院植物研究所郭仲琛研究员的指导和帮助, 特此致谢。
本文于 1992 年 9 月 10 日收到, 1993 年 3 月 26 日终审完毕。

1.3 愈伤组织的改良 将 MS₁ 培养基上产生的愈伤组织按图 1 的程序进行改良。MS₂ 培养基的成分是: MS 无机盐、MS 有机成分、1g/l 脯氨酸、1.1g/l KNO₃、0.35g/l NH₄NO₃、2g/l KCl、1-6mg/l 2, 4-D。调节 2, 4-D 浓度的原则是当愈伤组织颜色变暗、生长缓慢时, 增加 2, 4-D 的浓度; 当愈伤组织生长过快、颜色变淡时, 减少 2, 4-D 的浓度。用山梨醇制造高渗透压条件, MS₃ 培养基的成分是: 2 倍的 MS 无机盐、MS 有机成分、200mg/l 谷氨酰胺、150mg/l 天门冬酰胺、1g/l 脯氨酸、20g/l 山梨醇、2mg/l 2, 4-D, 0.1mg/l KT。MS₄ 培养基的成分是: MS₂ 培养基的基本成分加上 10g/l 山梨醇。用 NaCl 制造高盐离子条件, N₆I 培养基的成分是: N₆ 培养基基本成分加上 1g/l NaCl、3mg/l 2, 4-D。每次继代时, 注意挑选生活力强、生长旺盛的愈伤组织。N₆II 培养液的成分是 N₆ 培养基的基本成分加上 0.69g/l 脯氨酸、0.2g/l 谷氨酰胺和 2mg/l 2, 4, -D。

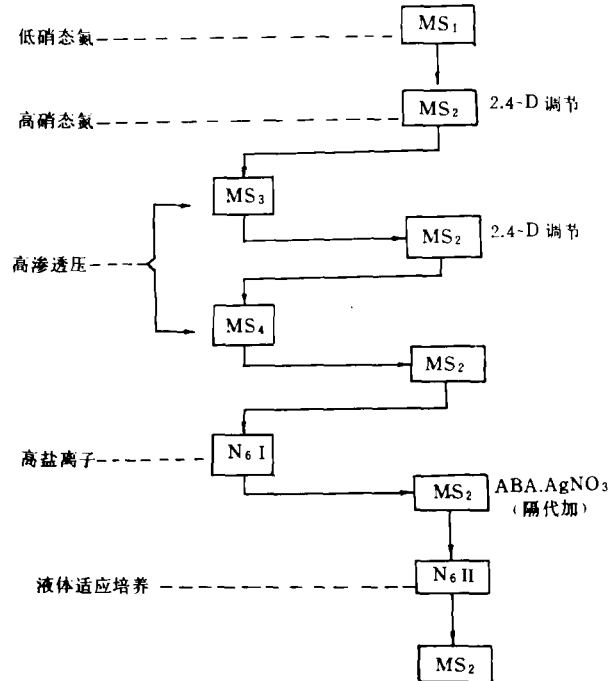


图1 愈伤组织改良流程图

Fig.1 Diagram of the process of callus modification

1.4 悬浮细胞系的建立及其生长特性的测定

1.4.1 悬浮细胞系的建立 取改造后的愈伤组织 2g, 在含有 4mg/l 2, 4-D 的 N₆ 液体培养基中进行启动悬浮培养, 10 天后转入 R₄ 培养基 (含有 2.5mg/l 2, 4-D、50ml/l 椰子孔、5g/l 葡萄糖、5g/l 山梨醇、1.8g/l 丙氨酸、1g/l 脯氨酸、200mg/l 精氨酸、100mg/l 天门冬酰胺、200mg/l 谷氨酰胺的 N₆ 液体培养基) 中进行悬浮培养。旋转摇床的转速为 120rpm, 每 5 天继代一次, 每次继代用吸管将液体上部细胞及分泌物弃掉, 补充 1/3-2/3 的新鲜培养液, 1 个月后用孔径为 40μm 的不锈钢丝网过滤, 弃掉大细胞团和

愈伤组织块,保留分散良好、细胞质浓的悬浮细胞培养物继续培养,即得到悬浮细胞系。

1.4.2 悬浮细胞系生长特性的测定 取一定数量的悬浮细胞,置于45mlR₄培养基中,在悬浮培养的10天内,每隔2天,取其充分摇匀的悬浮细胞5ml,放入到刻度离心管中,400g下离心5分钟,测定紧实细胞体积(PCV),同时测定培养液的pH值,重复3次,取其平均值。

鲜重和干重的测定:每个重复取5个装有近似等量的R₄培养基的三角瓶,接种于近似等量的悬浮细胞(单独称重),在悬浮培养的10天内,每隔2天取出一瓶,用滤纸吸干培养基,测其鲜重。再在80°C烘箱内烘5小时至恒重,测其干重,然后计算每克起始材料在培养一定天数后的鲜重和干重,重复3次,取其平均值。

1.5 悬浮细胞的分化 将悬浮细胞转至R₄固体培养基上,待愈伤组织块长至直径约0.5cm左右时,分别转到含有不同激素水平和糖水平的数种培养基上,20天继代一次,每次继代均选择质地较硬,颜色鲜艳的愈伤组织。此种愈伤组织极易生根,为抑制根的产生,采用过渡分化的方法,即先用含0.25mg/l 2,4-D、10mg/l 6-BA的R₄固体培养基,然后再用含0.5mg/l 6-BA、0.5mg/l KT的R₄固体培养基有效地抑制根的分化,待愈伤组织变得致密时,再转到含有60g/l蔗糖,无2,4-D的MS培养基上,促进芽分化,待有芽产生后,再以3.2mg/l的IAA增加根的分化数量。当幼苗长到10-15cm高时,移栽于土壤中。分化时期的培养条件是25-28°C,每天14小时光照(2500Lux)。

2 结果与讨论

2.1 愈伤组织的改良

由图1和图2看出,愈伤组织经过顺境(MS₂培养基)下的培养和逆境(高渗透压和高盐离子等)下的筛选,获得了较好的改良效果。在顺境条件下,愈伤组织得到扩增;在逆境条件下,生活力差、抗逆性弱的愈伤组织得以淘汰;短期的液体适应培养便于筛选出易于悬浮的小颗粒状愈伤组织。最终,从MS₂培养基上选到了具有小颗粒状结构、黄色、不分泌粘液、快速生长和易于悬浮的松脆愈伤组织。

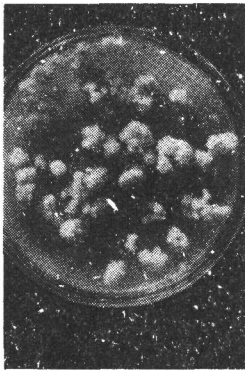


图2 改良后的获白×莱1029的松脆愈伤组织

Fig.2 Friable calli of H×L genotype after modification

实验表明,我们所用的方法对获白×莱1029愈伤组织的改良是有效的。

2.2 愈伤组织改良中所采用的若干措施的单因子分析

在愈伤组织改良中,我们应用了不同浓度的2,4-D、山梨醇和NaCl,起到了较好的效果。为了摸清使用这些成分的适宜浓度范围,特进行了以下单因子分析研究。

2.2.1 不同的2,4-D浓度对愈伤组织的影响 2,4-D浓度的高低,直接影响到愈伤组织的形态和分化。由表1看出:高浓度的2,4-D处理,愈伤组织虽不分化,但水渍化、死亡率较高;低浓度的2,4-D处理,虽无水渍化,但其分化频率却很高,不利于继代培养,以2-6mg/l的2,4-D继代培养比较适宜,在这范围内可随愈伤组织的生长情况和形态变化,不断改变2,4-D的浓度,以利于愈伤组织的改良。

表 1 2, 4-D 浓度对愈伤组织的影响 *
Table 1 The effects of 2, 4-D concentration on the calli*

2, 4-D 浓度 Concentration of 2, 4-D (mg/l)	接种愈伤组织 块 数 No. of pieces of inoculated calli	分化的愈伤组织 Differential calli		水渍化和死亡的愈伤组织 Glassy and dead calli		愈伤组织生长情 况的评定 ** Evaluation of callus growing**
		块 数 Pieces	频 率 Frequency (%)	块 数 Pieces	频 率 Frequency (%)	
0	32	26	81.25	0	0.00	-
2	33	8	24.24	0	0.00	++
4	30	2	6.67	0	0.00	++
6	32	0	0.00	14	43.75	+
8	31	0	0.00	26	83.87	-
10	30	0	0.00	29	96.67	-

* 处理 15 天后的结果, 本实验利用 MS₁ 培养基和获白 × 莱 1029 的愈伤组织。

** ++ 表示愈伤组织生长很好; + 表示愈伤组织生长好; - 表示愈伤组织生长不好。

* The results were collected 15 days after subculture. The MS₁ medium and calli of H×L genotype were used in this experiment.

** ++: Callus growing was very good. +: Callus growing was good. -: Callus growing was poor.

2.2.2 不同的山梨醇浓度对愈伤组织的影响

使用山梨醇的目的是提高渗透压, 较高的渗透压有利于筛选生活力强、细胞质浓、易于在液体中生长的悬浮细胞^[5]。但渗透压过高, 愈伤组织就会变褐死亡(表 2)。

表 2 渗透压对愈伤组织改良的影响 *
Table 2 The Effects of osmotic pressure on the callus modification*

山梨醇浓度 Concentration of sorbitol (g/l)	接种愈伤组织 块 数 No. of pieces of inoculated calli	分化愈伤组织 Differential calli		变褐和死亡愈伤组织 Brown and dead calli		愈伤组织 改良效果 ** Effects of callus modification**
		块 数 Pieces	频 率 Frequency (%)	块 数 Pieces	频 率 Frequency (%)	
0	10	5	50.00	1	10.00	-
20	12	9	75.00	1	8.33	+
40	13	8	61.54	4	30.77	-
60	13	10	76.92	2	15.38	-
80	12	9	75.00	2	16.67	-
100	12	4	33.33	8	66.67	-
120	13	4	30.77	9	69.23	-
140	10	0	0.00	10	100.00	-

* 处理 20 天的结果, 本实验用 MS₁ 培养基和获白 × 莱 1029 的愈伤组织。

** + 表示愈伤组织改良效果好; - 表示愈伤组织改良效果不好。

* The results were collected 20 days after subculture. The MS₁ medium and calli of H×L genotype were used in this experiment.

** +: The effects of callus modification were good. -: The effects of callus modification were not good.

由表 2 看出, 在 MS₁ 培养基中, 山梨醇浓度在 40g/l 的情况下, 愈伤组织分化和死亡频率之和, 已超过 90%。随着浓度进一步上升, 这种现象更为严重, 显然不利于愈伤组织改良, 而以 20g/l 甚至低一点较为合适。

2.2.3 不同的 NaCl 浓度对愈伤组织的影响

在培养基中加入一定浓度的 NaCl, 是筛选生活力强、分裂旺盛愈伤组织的简易方法, 但 NaCl 浓度过低, 起不到任何效果; 浓度过高, 又会使大量愈伤组织受害, 从表 3 看出, 1000—2500mg/l 这一范围较为合适。

表 3 NaCl 对愈伤组织改良的影响*
Table 3 The effects of NaCl on the callus modification*

NaCl 浓度 NaCl Concentration (mg/l)	接种愈伤组织块数 No. of pieces of inoculated calli	受盐害愈伤组织 Calli injured by NaCl		愈伤组织改良的效果** Effect of callus modification**
		块数 No. of Pieces	比例 Rate (%)	
0	11	0	0.00	—
250	10	0	0.00	—
500	19	2	10.53	—
1000	17	10	58.82	+
1500	16	13	81.25	+
2000	18	16	88.89	+
2500	13	10	76.92	+
3000	12	11	91.67	—
3500	10	10	100.00	—
4000	10	10	100.00	—

* 处理 20 天后的结果, 本实验用 MS₁ 培养基和获白 × 莱 1029 的愈伤组织。

** + 表示愈伤组织改良效果好; — 表示愈伤组织改良效果不好。

* The results were collected 20 days after subculture. The MS₁ medium and calli of H×L genotype were used in this experiment.

** +: The effects of callus modification were good. —: The effects of callus modification were not good.

2.3 悬浮细胞系的建立

改造后的愈伤组织经悬浮启动培养后, 转移至 R₄ 液体培养基中。在悬浮培养早期, 就有大量圆形细胞组成的小细胞团。1 个月后, 即建立了分散良好的悬浮细胞系, 在显微镜下观察到这种悬浮细胞系主要是由细胞质浓厚、细胞壁较薄、形态较为均一的细胞团所组成 (图 3), 我们利用获白 × 莱 1029 这种基因型的愈伤组织, 经改造后共建立了 4 个悬浮细胞系, 即 K₁、K₂、K₃ 和 K₄。

2.4 悬浮细胞系 K₃ 生长特性的鉴定

由图 4 看出, 悬浮细胞的鲜重和 PCV 在接种后 6 天内增殖很快, 6 天以后处于缓慢生长期, 而

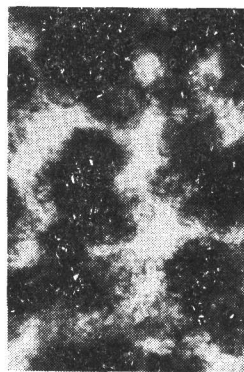


图 3 获白 × 莱 1029 的悬浮细胞系
Fig.3 Suspension cell line of H×L genotype

干重则在两天内处于快速生长期, 2-6 天内处于缓慢生长期, 6 天以后再次进入另一生长期。

这些结果表明, 悬浮细胞在更换培养基后的 6 天之内, 营养及环境条件一般比较适宜, 6 天以后, 细胞增殖较慢, 应该及时更换培养基。由图 4 还可以看出, 悬浮细胞在更换培养基的第 2 天, 培养液的 pH 值由 5.8 迅速下降到 4.5 左右, 在以后的培养过程中, pH 开始缓慢上升, 至第 10 天基本又达到 5.8。

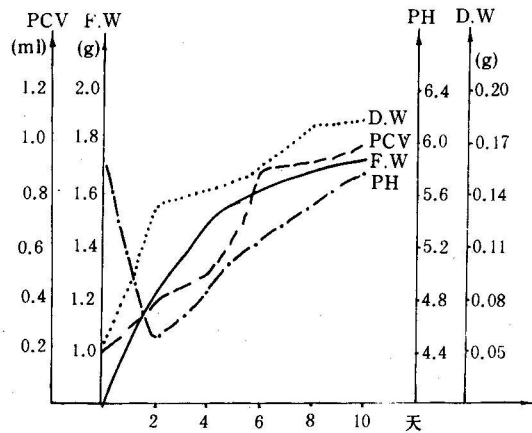


图 4 获白 × 莱 1029 的悬浮细胞系 K₃ 的生长曲线和培养过程中的 pH 值变化 *

Fig.4 Growth curve of suspension cell line K₃ of H×L genotype and its pH value change during culture period.*

* PCV: 悬浮细胞紧实细胞体积; F.W.: 悬浮细胞鲜重; D.W.: 悬浮细胞干重; pH: 悬浮培养过程中的 pH 值
* PCV: packed cell volume; F.W.: Fresh weight; D.W.: Dry weight; pH: pH value during suspension culture



图 5 获白 × 莱 1029 悬浮细胞的再生植株
Fig.5 Plantlets regenerated from suspension cell lines of H×L genotype



图 6 移栽于花盆中的再生植株
Fig.6 Regenerated plant transplanted into the pot

2.5 悬浮细胞的分化

悬浮细胞的分化与愈伤组织的分化存在着很大的差异, 将悬浮细胞直接转入到含有 60g/l 蔗糖、无 2, 4-D 的 MS 分化培养基上, 则其中的大细胞团或小块愈伤组织会在其表面长出大量松软的畸形根, 很难有芽的产生, 仅有少数愈伤组织可分化出少量正常根, 为

此不得不采用过渡分化的方法,即先不将 2,4-D 浓度一次降到零,而是先降到 0.25mg/l,同时升高 KT 和 6-BA 的用量。实验结果表明,过渡分化的措施是有效的,最终得到了 7 株正常的再生小植株(图 5.6)。

2.6 对愈伤组织改良中几个问题的看法

愈伤组织改良是在多种因素作用下完成的,其主要的因素有: 1 培养基中氨态氮和硝态氮的比例, 2 2,4-D 的浓度, 3 渗透压, 4 无机盐离子的浓度, 5 重金属离子浓度等等。

在实验中我们对 2,4-D 的浓度、渗透压和无机盐离子的浓度等做了不同等级的分析,找到了在愈伤组织改良中所能应用的浓度范围,为以后的愈伤组织改良,提供了必要的参考数据。

由于在选择、继代过程中,主要靠的是经验,即根据不同的处理、仔细挑选所需要的愈伤组织,并且要根据愈伤组织的生理状态和形态变化,不断调节培养基的成分,使愈伤组织朝着易于悬浮的形态发展。对整个改良过程,目前尚无一个固定的程序。

我们在实验中曾对多种基因型的不同类型的愈伤组织进行改良,但其结果却仅在获白×莱 1029 这一种基因型的一种愈伤组织类型上获得了成功,其它类型的材料,均被淘汰。由此看出,并非任何材料均可通过这套方法加以改良而使其适于悬浮培养,特定的基因型和所挑选的不同的愈伤组织,往往在其改良方法上有特异性。

虽然我们所建立的悬浮细胞系具有细胞形态均一、分散性能好、细胞质浓、分裂旺盛、能再生植株等特点,但由于愈伤组织改良的时间过长,而使建立悬浮细胞系的起始愈伤组织再生能力就比较低,因而悬浮细胞系的再生能力不理想。由此看出,缩短愈伤组织改良的时间,加速改良的进程,也是提高悬浮细胞再生能力的有效措施之一。

我们希望所建立的悬浮细胞系能够最终通过胚状体途径再生植株,但实际上是通过器官发生途径再生植株的。尽管早期胚性愈伤组织的筛选严格要求执行,但经历了长时间的改造和悬浮后,再次形成的愈伤组织似乎已失去了胚状体形成能力,这一问题值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 蔡起贵、郭仲琛、钱迎倩等, 1987, 植物学报, 29, 453—458。
- [2] 孙敬三、路铁刚, 1989, 植物学报, 31(10), 742—749。
- [3] 陈章良、潘乃芭, 1989, 生物工程进展, 9(3), 20—29。
- [4] 夏镇澳, 1989, 植物生理学通讯, 2, 1—6。
- [5] 王海波、方仁、王培等, 1989, 作物杂志, 3, 26—28。
- [6] 施介村、刘纪华、郭仲琛, 1991, 植物学报, 33(6), 409—416。
- [7] Fromm, M.E. et al., 1990, Bio./Technology, 8, 833—839。
- [8] Gordon-Kamm, W.J., T.M. Spencer et al., 1990, The Plant Cell, 2, 603—618。
- [9] Kamo, K.K. and T.K.Hodges, 1986, Plant Science, 45, 111—117。
- [10] Manocchi, L.A., G.Giorinazzo and S.Castelli, 1990, Maize Genetics Cooperation News letter, 84, 85—86。
- [11] Morocz, S., G. Donn et al., 1990, Theor. Appl. Genet., 80, 721—726。
- [12] Prioli, L.M., M.R.Sondahl, 1989, Bio./Technology, 7, 589—593。
- [13] Rhodes, C.A., D.A.Pierce and I.J.Mettler et al., 1988, Science, 240, 203—207。
- [14] Rhodes, C.A., K.S. Lowe and K.L.Ruby, 1988, Bio./Technology, 6, 56—60。

- [15] Shillito, R.D. et al., 1989, *Bio/Technology*, 7, 581—587.
[16] Vasil, V. and I.K.Vasil, 1986, *J.Plant Physiol.*, 124, 399—408.
[17] Vasil, V. and I.K.Vasil, 1987, *Theor. Appl. Genet.*, 73, 793—798.

Study of Establishment of H×L Genotype Suspension Cell Lines Capable of Plant Regeneration in Maize

Sun Shi-meng Sai Ji-qing Xie You-ju

(*College of Biology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094*)

Abstract

The whole establishment process of suspension cell lines, including callus induction, callus texture modification, establishment and differentiation of suspension cell lines, was systematically studied with immature embryos from H×L genotype in maize. A kind of golden, non-mucilaginous, grainy texture, friable and fast growing callus systematically studied with immature embryos from H×L genotype which is suitable for suspension culture was obtained through modification of selected type II callus from H×L genotype on the modified MS medium with high level of nitrate nitrogen cooperated with adjusting 2, 4-D concentration, osmotic pressure, NaCl concentration. So far the four suspension cell lines have been established through several steps, particularly including short-period suspension culture of the modified callus in the liquid medium containing high concentration of 2, 4-D to switch on these cells adapting growth in liquid medium.

Seven plantlets have been regenerated by using the method of transition differentiation of plated suspension cells on the solid media.

This paper has also systematically studied appropriate concentration ranges of several factors used in the callus modification. Discussion has been made in several aspects.

Key words Maize suspension cells, Maize cell culture, Plant regeneration.