

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^X

张东向¹ 张崇浩² 李杰芬²

(¹齐齐哈尔大学生命科学与工程学院, 黑龙江齐齐哈尔, 161006; ²北京师范大学生命科学院, 北京, 100875)

提 要 玉米幼叶愈伤组织的形成能力因其形态学部位的不同而呈显著差异, 从基部向上依次递减, 幼叶外植体的内源 IAA 和 ABA 水平亦相应地呈递减趋势。2, 4D 及与 BA 组合对基部切段的愈伤组织形成无显著影响, 愈伤组织生长符合 Logistic 曲线, 单独使用 BA 不利于愈伤组织形成; 采用 2 mg/L 2, 4D 与 0.5 mg/L BA 的组合最有利于胚性愈伤组织的诱导。培养物内源 IAA 水平随培养时间显著下降; 2, 4D 可进一步降低 IAA 水平, 但显著提高内源 ABA 水平, 2 mg/L 2, 4D 作用最为显著。伴随着胚性愈伤组织的发生, 内源 ABA 相应地出现一个峰值。玉米胚性发生能力的大小与培养物内源 ABA 水平的高低密切相关, 2, 4D 可能是决定 ABA 水平的因素之一。

关键词 玉米幼叶; 胚性愈伤组织; 2, 4D; IAA; ABA

Embryogenic Callus Induction of Maize Leaves and Related to Endogenous IAA and ABA

ZHANG Dongxiang¹ ZHANG Conghao² LI Jiefen²

(¹College of Life Science and Technology, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang, 161006; ²College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing, 100875)

Abstract The callus formation ability of maize leaf segments decreased gradually as their positions from basal to middle and upper segments. It corresponded to the change of endogenous IAA and ABA. The callus formations of basal segments had no associated with either 2, 4D or combinations of 2, 4D and BA in media, and coincided with the Logistic curve. The BA alone had no effect on callus formation. The combination of 2 mg L⁻¹ 2, 4D and 0.5 mg L⁻¹ BA was recommendable for inducing the embryogenic callus. Endogenous levels of IAA in callus cultures reduced as the culture passed and the 2, 4D concentration increased. Endogenous levels of ABA were enhanced by 2, 4D, especially in 2 mg L⁻¹. As the endogenous level of ABA in the cultures reached to maximum value, the embryogenic calli formed. Therefore the occurrence of embryogenic callus might be related to endogenous levels of ABA, which was affected by 2, 4D.

Key words Maize leaf; Embryogenic callus; 2, 4D; IAA; ABA

2, 4D 的应用促进了禾本科植物组织培养工作, 尤其是体细胞胚胎发生研究的发展。目前禾谷类作物胚性愈伤组织的诱导, 多采用幼穗^[1]、幼胚^[2]和花序^[3]等繁殖器官为外植体, 采用叶片的报道尚较少见。外植体的胚胎发生能力与其内源激素水平有关^[4], 低浓度的 ABA 可刺激 DNA 合成和细胞分裂^[5]、参与细胞淀粉积累^[3], 并有利于胚性愈伤组织的长期保

X 本课题得到国家自然科学基金的资助。
收稿日期: 1998204213, 接收日期: 1998212218

持^[6]。探索内源激素水平与外植体胚胎发生能力的关系及2, 4D 在其中的作用, 在理论和实践上都具有重要意义。我们在对玉米叶片愈伤组织体细胞胚胎发生进行细胞形态学研究^[7]的基础上, 本文比较玉米幼叶不同形态学部位的愈伤组织和胚性愈伤组织形成能力, 并测定外植体和培养物的内源 IAA 和 ABA 水平, 为进一步探索2, 4D 对内源激素的作用及其与胚性愈伤组织发生的关系提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为玉米(*Zea mays* L.) 品种“中单14”由中国农业科学院作物育种栽培研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 材料的培养和取材 玉米无菌苗的获得同前文^[7]。取12~15天苗龄的无菌苗, 去胚芽鞘和第一片外彼叶, 以内层剩余幼叶为外植体, 从靠近根部的顶端分生组织以上0.5 mm 处连续切取, 分别作为基部(0~5 mm)、中部(5~10 mm)和上部(10~15 mm)切段接种到培养基上, 于 24 ± 1 °C、每天光照16 h (2000 Lx) 的条件下培养。记录愈伤组织形成和胚性愈伤组织发生情况, 定期取样, 精确称重, 贮于-70 °C 低温冰箱中备用。

1.2.2 培养基的配制 以MS 为基本培养基, 添加3% 蔗糖和500 mg/L 水解酪蛋白, 附加不同浓度的2, 4D 和BA 后, 调节pH 为5.8, 经15磅(121 °C) 下高压灭菌20 min 后备用。

1.2.3 内源 IAA 和 ABA 水平的测定

采用 A2 溴-2, 3, 4, 5, 6-五氟甲
苯(PFB Br) 衍生物气相色谱法^[8]。取经称重的植物样品, 加入适量丙酮在冰浴中匀浆, 置-20 °C 下避光浸提一昼夜, 砂芯漏斗抽滤, 丙酮洗残渣3次(1÷1, v/v), 弃残渣。滤液经无水MgSO₄脱水处理, 过滤, 丙酮定容滤液至10 mL。取滤液1 mL 于K1 D 瓶中, 加400 μ L PFB Br 丙酮溶液(340 mg/L) 和数粒无水K₂CO₃, 摇匀密封后置于55 °C 恒温水浴准确回流90 min, 取出冷却后N₂吹干丙酮, 用正己烷定容至0.5 mL。该样品在VISTA 26000气相色谱仪上测定, 测定条件为WCO T 毛细管柱(12 m × 0.23 mm)、63 NiECD 检测器, SE230 做固定液, 高纯氮气为载气, 流速10 mL/min, 尾吹40 mL/min, 分流比10÷1; 柱

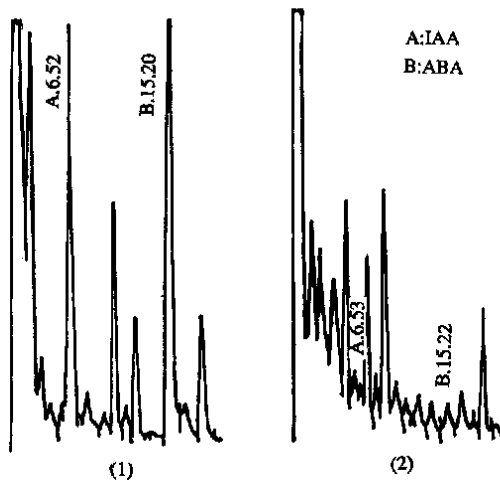


图1 玉米幼叶培养物中 IAA 和 ABA 的气相色谱分离

Fig. 1 Chromatograms of IAA and ABA from pure standard

(1) 标准的 IAA 和 ABA, (2) 样品中的 IAA 和 ABA

(1) and from a cultures of basal segment of young leaves of maize (2)

温216 °C, 气化室270 °C, 检测室285 °C, HP3390A 积分仪记录分析结果。以标准 IAA、ABA 作对照, 外标法计算回收率, 最后换算成含量($\mu\text{g/g}$ fw) (图1)。每个样品设3个重复。

2 结果与分析

2.1 玉米叶片形态学部位及内源激素水平对愈伤组织形成的影响

玉米幼叶基部、中部和上部切段愈伤组织形成的差异见图2。结果表明,愈伤组织形成能力自基部向上显著降低,其中基部切段愈伤组织形成率高达80%,愈伤组织发达;而中部和上部愈伤组织形成能力低,愈伤组织仅限于切口边缘,在继代培养中不能增殖、褐变。气相色谱分析表明,玉米叶片愈伤组织形成能力表现出的这种形态部位差异,可能与其内源激素水平的高低有关(图2)。叶片外植体自基部向上其内源 IAA 和ABA 水平显著下降,基部切段的内源激素水平均最高。但ABA 在叶片部位间的差异又高于 IAA,例如基部 IAA 和ABA 水平分别是中部的2倍和2.5倍。外植体内源激素水平的这种差异可能是导致愈伤组织形成能力不同的内部因素。

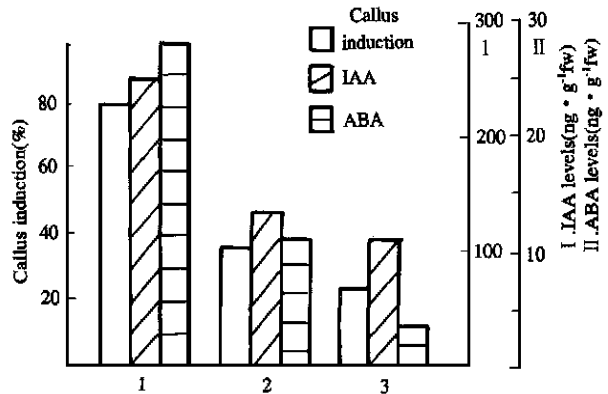


图2 玉米不同形态学部位的叶片切段愈伤组织诱导率、内源 IAA 和ABA 水平的比较

Fig. 2 Comparison of the induced frequencies of callus and the levels of endogenous IAA and ABA in different segments of maize

1. 基部; 2. 中部; 3. 上部

1. basal segment; 2. middle segment; 3. upper segment

2.2 2, 4-D 和 BA 对胚性愈伤组织发生的影响

以基部切段为外植体,比较2, 4D 和BA 的不同浓度组合对愈伤组织和胚性愈伤组织形成的影响。愈伤组织在培养的4~6天出现,胚性愈伤组织则在第12~16天发生。2, 4D 及与BA 组合对愈伤组织形成无显著影响,而对胚性愈伤组织的诱导则表现出显著差异,0.5 mg/L BA 与2, 4D 组合都能诱导出胚性愈伤组织,其中2 mg/L 2, 4D 诱导率最高,单独使用2,

4D 或提高BA 浓度均显著降低胚性发生能力,前者更有利于不定根形成。单独使用BA 对愈伤组织形成不利(表2)。进一步分析表明,愈伤组织生长曲线符合Logistic 方程,愈伤组织鲜重增长的临界值为176 mg,日平均增

表1 6种培养基中玉米幼叶基部愈伤组织的形成和分化

Table 1 Formation and differentiation of callus derived from basal segments of young leaves of maize in six induction media

植物生长物质含量 Content of plant growth regulators (mg L ⁻¹)		愈伤组织 形成率 Callus (%)	胚性愈伤组织 诱导率 Embryogenic callus (%)	愈伤组织不定 根形成率 Callus with adventitious roots (%)
2, 4D	BA			
2.0	0	71.7 ± 8.3	4.0 ± 0.5	20.0 ± 3.6
1.0	0.5	85.3 ± 10.6	10.8 ± 2.4	0
2.0	0.5	73.2 ± 7.4	27.3 ± 5.3	2.3 ± 0.3
4.0	0.5	74.5 ± 8.1	14.6 ± 2.8	0
2.0	1.0	90.2 ± 11.2	2.4 ± 0.6	0
0	0.5	5.0 ± 1.5	0	0

长率为0.23(图3)。

2.3 2, 4-D 对培养物内源 IAA 和ABA 水平的影响

用不同浓度的2, 4D 附加0.5 mg/L BA, 测定了培养物内源 IAA 和ABA 的水平,以分

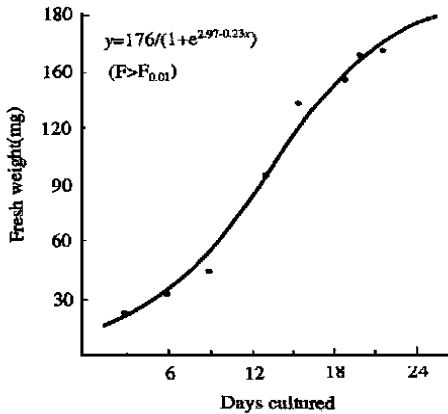


图3 玉米幼叶基部切段愈伤组织生长曲线

Fig. 3 Growth curve of callus derived from basal segments of maize leaves

伤组织诱导率与培养物内源ABA 水平呈显著的正相关($r = 0.9841^{3.3}$)。因而玉米叶片胚性发生能力与培养物内源ABA 水平密切相关, 2, 4D 浓度可能是决定ABA 水平的重要因素之一。

析内源激素与胚性愈伤组织发生的联系。表2显示培养物中 IAA 水平随培养时间显著下降, 增加2, 4D 浓度, IAA 水平下降更明显, 这表明2, 4D 可能是降低培养物中 IAA 水平的一个因素。从内源ABA 变化来看, 对照组培养物不仅愈伤组织形成率低(5%), 而且内源ABA 水平较低, 并随培养时间不断下降(表2); 同对照相比, 2, 4D 可提高相应的ABA 水平, 其中2 mg/L 2, 4D 作用尤为显著。伴随着胚性愈伤组织的发生, 内源ABA 水平均出现一个峰值, 其中1 mg/L 2, 4D 出现在第16天; 而2和4 mg/L 2, 4D 则出现在第12天, 虽在第16天回落, 但第21天又有所提高, 这可能与胚性细胞的进一步发育有关。相关分析表明, 在2, 4D 的调节下, 玉米叶片胚性愈

表2 2, 4D 对玉米幼叶基部切段愈伤组织中内源 IAA 和ABA 水平的影响

Table 2 Effects of 2, 4D on endogenous levels of IAA and ABA in callus cultures during cultured period of basal segments of maize leaves

2, 4D 浓度 Conc. of 2, 4D (mg L ⁻¹)	内源 IAA 水平 Endogenous levels of IAA (ng g ⁻¹ fw)			内源ABA 水平 Endogenous levels of ABA (ng g ⁻¹ fw)			
	3rd day	21th day	Drop ratios (%)	3rd day	12th day	16th day	21th day
CK	52.87	16.38	69.0	8.94	4.17	2.82	2.20
1	41.06	9.00	78.1	8.72	7.30	10.30	9.61
2	30.38	2.20	92.7	20.25	24.56	19.46	21.37
4	16.93	1.21	92.9	14.48	15.82	12.63	13.46

3 讨论

禾本科植物组织培养和体细胞胚胎诱导中2, 4D 的应用十分普遍^[9]。Ray 等利用2 mg/L 2, 4D 从玉米幼叶获得的松散、白色的愈伤组织, 继代在8 mg/L 2, 4D 的培养基中才能诱导出黄色的胚性愈伤组织^[10]; 添加细胞分裂素对小麦胚性愈伤组织的形成和分化有利^[11]。本文结果表明, 2, 4D 在玉米幼叶愈伤组织形成和胚性愈伤组织诱导中必不可少, 它与低浓度的BA 结合可不经继代培养直接获得一定比例的胚性愈伤组织(表1); 单独使用BA 不利于愈伤组织形成。本实验还发现, 玉米叶片的脱分化能力存在着品种差异, “中单14”愈伤组织形成率高达80%, 而“中单120”仅为25%, 这可能是基因型差异的表现。

据报道, 狼尾草叶片的胚性发生能力和内源 IAA、ABA 水平因其形态学部位而异, 内源激素水平高的幼叶基部, 其愈伤组织和胚性发生能力也较强^[4], 这与我们的结果相一致(图2、表1)。然而, 玉米叶片培养物 IAA 水平随时间而下降, 2, 4D 能导致 IAA 水平的进一步降低(表2), Zam skaya 也观察到2, 4D 能降低玉米胚芽鞘切段内源 IAA 水平^[12]。IAA 参与细

胞伸长和胞壁沉积^[13], 但小麦胚芽鞘细胞伸长却明显被高水平的内源 ABA 抑制^[14], 这表明 IAA 对植物细胞的作用行为与 ABA 不同。IAA 水平随培养时间下降的原因及其与 2, 4D 对愈伤组织形成和胚性发生能力的影响的关系值得探讨。

ABA 单独或与 ZT、GA₃ 结合能有效抑制畸形胚的发生^[15], 内源 ABA 参与体细胞胚胎发生^[4], 低浓度的 2, 4D 可提高玉米胚芽鞘 ABA 水平^[12]。本文结果表明, 伴随着胚性愈伤组织发生, 培养物内源 ABA 水平相应地出现一个峰值, 2, 4D 能提高内源 ABA 水平, 并促进胚性能力表达, 而且胚性愈伤组织诱导率与内源 ABA 水平呈正相关, 2, 4D 可能通过调节内源 ABA 水平, 进而影响培养物胚性能力的表达。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^[16]。ABA 在玉米叶片体细胞胚胎发生中是否存在类似机制, 将做进一步研究。

参 考 文 献

- 1 张树录 见: 中国科学院植物研究所、兰州大学生物系, 植物细胞工程应用基础研究新进展 北京: 学术期刊出版社, 1989. 72~ 76
- 2 Lowe K, D B Aylor, P K Ryan et al *Plant Sci*, 1985, 41: 125~ 132
- 3 Vasil V, I K Vasil *Amer J Bot*, 1982, 69: 1441~ 1449
- 4 Rajasekaran K, M B Hein, I K Vasil *Plant Physiol*, 1987, 84: 47~ 51
- 5 Minocha S C. *Z Pflanzenphysiol*, 1979, 92: 431~ 441
- 6 Brown C, F J Brooks, D Pearson et al *J Plant Physiol*, 1989, 133: 727~ 733
- 7 张东向, 张崇浩, 李杰芬. 北京师范大学学报(自然科学版), 1997, 33(1): 110~ 116
- 8 李慧琳, 云自厚, 杨亦平等. 植物学报, 1990, 32(3): 205~ 209
- 9 Bhaskaran S, R H Smith. *Crop Sci*, 1990, 30: 1328~ 1336
- 10 Ray D S, P D Ghosh. *Ann Bot*, 1990, 66: 497~ 500
- 11 Nabors M W, J W Heyser, T A Dykes et al *Planta*, 1989, 157: 385~ 391
- 12 Zemskaya V A, Z V Kalibernaya, S P Verenchikov. *Soviet Plant Physiol*, 1989, 36: 905~ 911
- 13 Ortuno A, J Sanchez-Bravo. J R Moral et al *Physiologia Plantarum* 1990, 78: 211~ 217
- 14 朱汝幸, 曹日强, 杨仲南等. 南京大学学报(自然科学版), 1990, 26(6): 684~ 689
- 15 Kamada H, H Harada. *Plant & Cell Physiol*, 1981, 22: 1423~ 1429
- 16 覃章铮, 唐锡华, 潘国祯等. 植物学报, 1990, 32(4): 448~ 455