

玉米花药培养单倍体育种的研究

母秋华 杨振棠 陈泽光

(吉林市农科所新技术育种组)

近年来,我国玉米花药培养的研究工作,进展很快。几个单位的工作重点已经逐渐转向花粉植株后代利用于育种实践的研究。1978、1979两年,我们在这方面研究中也做了一些工作。1978年,胚状体和愈伤组织的平均诱导率为3.28%,平均绿苗诱导率(每100个花药产生的绿苗数,下同)为0.67%,诱导出绿苗345株,移栽80株,成活20株,异交结实5株,自交结实1粒。1979年又有新的进展,胚状体和愈伤组织的平均诱导率提高到8.81%,最高可达209.4%,平均绿苗诱导率为1.61%,诱导出绿苗975株,移栽成活80株,31株结实,得自交果穗18个^{*},花粉植株派生二环系20个穗系。现将两年来的部分试验结果简要报道如下。

一、材料与 方法

1978、1979两年共接种材料56份,其中41份材料可以诱导出胚状体和愈伤组织,而诱导率超过1%的有30份材料,本文涉及的有单三91〔海淀八趟白H1×(小八趟×水白)〕、九单1×京黄13、京黄13、单三91×C103、C103×单三91、单三91×黄粮91、海淀八趟白(以下简称“海白”)、海白×(小八趟×水白)、蛟骨98×来宾白、老来秕×京黄13、群单105、胥各庄多穗、单复92〔海白H1×(C103×单三91)〕等。

培养基主要采用正交法组配出的16种培养基,还有N6、玉培、762和玉—4四种基本培养基。分化培养主要用N6培养基附加激动素(KT)1ppm、石油助长剂0.4ml/l和活性炭(C)0.5%,蔗糖5%,及“正9”培养基附加KT2ppm、吲哚乙酸(IAA)0.5ppm、萘乙酸(NAA)0.5ppm、石油助长剂0.5ml/l、C0.5%、蔗糖4%。

接种花药的花粉发育时期为单核早期。诱导愈伤组织的温度为25~29℃。分化绿苗的温度为20~25℃,培养室每天用日光灯补充照明10小时左右。

花粉植株移栽缓苗后,在4~6叶期用0.1%秋水仙素和0.5%二甲基亚砷混合液(1:1)滴心(早、晚各一次,连滴3日)加倍,然后移栽于室温为18~28℃的半地下式温室内,光照14小时左右。

^{*}其中包括中国科学院遗传所协助移栽并自交结实的5个果穗。

花粉植株后代的观察和利用的研究，均在田间进行。行株距为60厘米×50厘米，管理方法同一般大田。

二、结果与分析

(一) 提高花粉植株的诱导频率

1、培养基的筛选

培养基是影响玉米花药培养效率的重要因素之一。为了筛选更适于玉米花药培养的高效培养基，1978年，我们在研究国内外优良培养基各成分组成⁽⁶⁾的基础上，进行了大量无机盐五种成分四个用量的正交试验（见表1）。

表1 L16⁴⁵大量元素正交试验培养基成分* (ppm)

培养基代号	KNO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	MgSO ₄ · 7H ₂ O	CaCl ₂ · 2H ₂ O	KH ₂ PO ₄
正1	1500	100	180	150	170
正2	1500	150	350	200	340
正3	1500	300	450	300	450
正4	1500	400	600	440	600
正5	2000	100	350	300	600
正6	2000	150	180	440	450
正7	2000	300	600	150	340
正8	2000	400	450	200	170
正9	2500	100	450	440	340
正10	2500	150	600	300	170
正11	2500	300	180	200	600
正12	2500	400	350	150	450
正13	3000	100	600	200	450
正14	3000	150	450	150	600
正15	3000	300	350	440	170
正16	3000	400	180	300	340

* (1) 微量元素及有机成分同B₅，另加甘氨酸2 ppm；

(2) 铁盐同MS，蔗糖15%；

(3) 附加成分(ppm)：2,4-D 2, 6-氨基嘌呤(BA) 1, NAA 1, 酪朊水解物(CH) 500, Co. 5%。

1978年的接种材料是海白，1979年又增加了蛟骨98×来宾白、单三91S1、九单1×京黄13等九份材料。试验结果如表2、表3所示。

由表2可见，在正交试验的16种培养基中，对“海白”胚状体和愈伤组织的诱导率超过20%的有七种培养基，绿苗诱导率在5%以上的有五种培养基，其中“正14”对海白的诱导率高达90.4%，绿苗诱导率为10.8%。表3的结果说明，1979年对正交试验培养基增加接种材料数和花药数进行再试验，仍然取得了较好的结果。所试验的11种培养基，诱导率都超过对照，有的甚至提高了六倍多，而且绿苗诱导率绝大多数都比对照高。其中“正2”和“正7”对单三91、九单1×京黄13等8个材料的平均诱导率分别为17.0%和

表 2

正交试验培养基试验结果

(1978年)

培 养 基	接 种 花 药 数 (个)	胚 状 体 和 愈 伤 组 织 (块)	诱 导 率 (%)	绿 苗 数 (株)	苗/花药 (%)
正 1	250	2	0.8	0	0
正 2	150	0	0	0	0
正 3	250	5	2.0	0	0
正 4	250	5	2.0	0	0
正 5	250	53	21.2	1	0.4
正 6	250	30	12.0	1	0.4
正 7	200	16	8.0	2	1.0
正 8	200	32	16.0	5	2.5
正 9	200	99	49.5	11	5.5
正 10	250	120	48.0	8	3.2
正 11	150	53	35.3	11	7.3
正 12	150	24	16.0	1	0.7
正 13	200	65	32.5	14	7.0
正 14	250	226	90.4	27	10.8
正 15	200	33	16.5	3	1.5
正 16	250	100	40.0	15	6.0
CK N 6	400	1	0.25	0	0

表 3

正交试验培养基试验结果

(1979年)

培 养 基	接 种 材 料 数 (个)	接 种 花 药 数 (个)	胚 状 体 和 愈 伤 组 织 (块)	平 均 诱 导 率 (%)	绿 苗 (株)	苗/花药 (%)
正 2	8	1560	265	17.0	80	5.1
正 4	8	1920	197	10.3	29	1.5
正 5	8	1800	203	11.3	12	0.7
正 7	8	1680	547	32.6	138	8.2
正 9	11	3420	325	9.5	95	2.8
正 10	11	2700	407	15.1	61	2.3
正 11	11	2340	217	9.3	16	0.7
正 12	11	3720	268	7.2	40	1.1
正 13	10	3420	408	11.9	71	2.1
正 14	11	3540	546	15.4	75	2.1
正 16	11	3660	262	7.2	46	1.3
CK N 6	11	3900	209	5.4	49	1.3

32.6%，是N6培养基的三倍多和六倍多，而绿苗诱导率分别是N6的四倍和六倍多；而且正2和正7对胚状体的发育更有十分突出的效果。正9和正14对11个材料的平均诱导率约为N6的2~3倍，绿苗诱导率也大大提高。

通过对表2中试验结果分析，可以看出，大量无机盐影响诱导率的主次关系可依次排列如下： KNO_3 ， $MgSO_4$ ， KH_2PO_4 ， $(NH_4)_2SO_4$ 和 $CaCl_2$ 。大量无机盐的最佳水平

与合理配比为： KNO_3 3000, $(NH_4)_2SO_4$ 150, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 450, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 150, KH_2PO_4 600；这个结果与“正14”的大量无机盐的组成完全一致。

两年的试验结果说明，改变培养基中大量元素无机盐的含量，确定出一个合理的元素配比，能够使诱导率大大提高。

2、不同接种材料对诱导率的影响

玉米花药培养的诱导率，与接种材料本身的遗传类型有关^(1,2)。为了提高诱导率，我们除了接种一些现有的品种外，还接种了一些以花粉植株为母本的“桥接”材料，以及不同品种间的单交、三交、双交和复合杂交组合，都取得了较好的结果。

(1) 花粉植株后代的花药再培养。两年来，我们对以花粉植株为母本直接配成的6个组合的杂交后代进行了花药再培养试验，结果表明，花粉植株杂交后代，不仅胚状体的诱导率很高，而且培养后可产生较多的花粉植株。如1978年，我们将单三91〔海白H1 × (小八趟 × 水白)〕的花药分别接种在“玉—2”、“玉—4”和N6等四种培养基上。试验结果表明，单三91花药的出愈和成苗效率都很高(表4)，在四种培养基上的平均诱

表4 花粉植株后代的花药再培养诱导效果

培 养 基	单三91 (1978年)			单复92 (1979年)			单 三91S1 (1979年)				
	接 种 花 药 数 (个)	诱 导 率 (%)	苗 花 药 (%)	培 养 基	接 种 花 药 数 (个)	诱 导 率 (%)	苗 花 药 (%)	培 养 基	接 种 花 药 数 (个)	诱 导 率 (%)	苗 花 药 (%)
N6	300	12.3	1.0	762	300	38.3	12.7	N6	300	39.3	10.0
玉—2	500	52.4	23.6	玉—2	240	18.8	5.8	正7	240	209.2	56.7
玉—4	500	27.2	10.0	玉—4	240	25.8	8.3	正14等11种正交培养基	3060	77.6	17.1
N6 + 石油助长剂	50	6.0	10.0								
小计及平均	1350	32.4	13.0		700	28.5	9.2				
玉—2 (海白)	300	2.3	0.7								
玉—2 (小八趟/水白)	350	1.1	0.6								
玉—4 (海白)	150	1.3	0								
玉—4 (小八趟/水白)	250	2.0	0.4								

导率为32.4%，最高为52.4%；绿苗诱导率平均为13.0%，最高为23.6%；其诱导率是原亲本的几十倍。1979年，我们将单复92〔海白H1 × (C103 × 单三91)〕的花药进行了再培养，也获得了很高的诱导率(表4)，在三种培养基上平均诱导率为28.4%，最高为38.3%；绿苗平均诱导率为9.2%，最高为12.7%。同时，对单三91F1的自交、混交、姊妹交等留种方法所得的穗系，进行花药再培养，诱导率仍然很高。如单三91自交一代(S1)在11种培养基上的平均诱导率为77.9%，最高为209.2%(表4)。通过对胚状体的继代培养后分别从单三91、单复92中获得一批胚性细胞团*。

(2) 不同遗传类型材料组合方式的影响。玉米花药接种材料的选择不仅应注意本身具有易诱导的基因型，还应注意符合当地育种目标的性状。通过两年来对34份一般接种材料和22个桥接组合材料的试验，结果表明，目前当地现有优良材料，有的不能诱导出

*单三91、单复92的胚性细胞团，经遗传所培养又获得再生绿苗。

愈，有的虽能出愈，但数量少，频率低。如果把当地优良材料与花粉植株后代或外引易诱导材料进行有性杂交，便可有效地提高诱导率。材料之间的组合方式有单交、三交、双交和复合交等（表5）。可以看出：①不能诱导出愈伤组织的材料如蛟骨98、黄粮91、九单1号等，与易诱导材料杂交后，都可以产生愈伤组织；②各种组合方式都可形成愈伤组织，其中杂合程度大的、亲缘关系或地理位置远的组合，诱导频率高，如九单1×京黄13，平均诱导率12%，最高诱导率44.2%；③用易诱导的花粉植株做母本比其反交诱导率高，如单三91×C103比C103×单三91高40%以上；④不同材料的桥接组合对大量无机盐含量不同的培养基，具有选择性，如单三91×C103和九单1×京黄13，分别在正14和正4培养基上诱导率最高。

表5 当地优良材料与易诱导材料杂交后的诱导效果

组合方式	材 料	接种花药数(个)	平均诱导率(%)	最高诱导率(%)	最高诱导率的培养基	备 注
单 交	蛟骨98×来宾白	2700	1.9	5.8	正14	供试培养基为
三 交	老米批×京黄13(大白头霜×黄204)	3480	1.4	9.4	正14	正交试验培养基
双 交	九单1×京黄13(大黄46×蛟骨98)	3480	12.0	44.2	正4	和N6培养基，
复合交	单三91×黄粮91	3300	2.0	7.5	正7	共14种。每个处
正 交	单三91×C103	2340	7.0	18.0	正14	理接种花药300
反 交	C103×单三91	5580	4.9	13.3	正4	~600枚。

3、玉米花药的漂浮培养

森德兰(N:Sund land)指出，将花药漂浮在液体表面，在25~28℃下静置培养，可以从同一批花药中得到一系列的花粉产物，从而可以提高花粉植株的产量。为了提高玉米花粉植株的诱导率，1979年我们开展了玉米花药漂浮培养试验，接种材料为单三91、单三91×C103、京黄13S1、海白。接种花药的花粉发育时期为单核中及单核靠边期。培养基以本所1978年筛选的“正9”和“正14”为基本培养基。共接种花药2340枚，获得愈伤组织和胚状体98块，平均诱导率为4.2%；分化出17株绿苗，绿苗诱导率为0.7%。我们比较了不同的蔗糖浓度、接种材料和花粉发育时期的诱导效果，结果如表6—表8所示。可以看出：①只有蔗糖浓度7%和9%能够产生愈伤组织，有的可以直接分化出绿苗；②只是单三91和京黄13诱导出了愈伤组织，其中前者的诱导效果较好，得到的花粉植株经移

表6 不同培养基和蔗糖浓度的诱导效果

培 养 基	蔗 糖 %	接种花药数(个)	胚状体和愈伤组织(块)	诱 导 率 (%)	苗 (株)	苗/花药 (%)
正9-3	5	360	0	0	0	0
—4	6	120	0	0	0	0
—5	7	420	14	3.3	3	0.7
正14-2	4.5	180	0	0	0	0
—3	6	480	0	0	0	0
—4	7.5	240	0	0	0	0
—5	9	540	84	15.6	14	2.6

表 7

不同接种材料的诱导效果

材 料	接种花药数 (个)	胚状体和愈伤 组织(块)	诱 导 率 (%)	苗 (株)	苗/花药 (%)	培 养 基
单三91	660	73	11.1	12	1.8	正14-5
单三91×C103	720	0	0	0	0	"
京黄13S1	120	12	10.0	2	1.7	"
海 白	240	0	0	0	0	"

表 8

花粉不同发育时期的诱导效果

花粉发育时期	接种花药数 (个)	胚状体和愈伤组织 (块)	诱 导 率 (%)	苗 (株)	苗/花药 (%)
单核中期	360	71	19.7	12	3.3
单核靠边期	60	1	1.7	0	0

栽、加倍后已经成活一株，得自交果穗；③单核中期比单核靠边期诱导效果好；④散落在培养液中的花粉胚状体可以直接形成绿苗。

(二) 花粉植株的移栽与管理

在玉米花药培养中，绿苗诱导突破以后，首先遇到的问题就是如何提高成活率和结实率。1978年，我们得到345株绿苗，移栽80株，由于管理措施不当，越冬时没有温室，虽然勉强成活20株，但多数植株瘦小、早衰、返祖，经人工授粉，只一株自交结实，5株异交结实。

1979年共获得绿苗975株，除了中国科学院遗传所带去的82株可移栽植株外，其余全在本所分两期移栽，共249株，最后成活80株，结实28株，得自交果穗13个。

第一期，9月初~10月中，在一般室内移栽，温度12~18℃。由于植株发育期间的温度和光照不足，虽有三分之一植株成活，但发育不良，雌性增强，严重早衰，结实率很低，在成活的56株中仅有3株自交结实，3株杂交结实（见表9）。

表 9

玉米花粉植株生长发育情况

移栽期	存活株数	结实株数	生长期限 (年月)	平均株高 (cm)	有雌无雄 (株)	雌雄正常 (株)	雌雄同位 (株)	自交结实 (株)	异交结实 (株)	结实率 (%)
1	56	6	79.9-80.2	33.0	17	3	5	3	3	10.9
2	24	22	79.11-80.3	115.7	0	17	3	10	12	91.6

第二期，10月中、下旬~11月，缓苗后及时置于可用地炕加温的半地下温室里。加倍处理后移入温床栽培。在17m²的温室中加300W灯泡10个，500W碘钨灯4个。每天光照14小时左右，温度控制在18~25℃之间。三月中旬可达34,000勒克斯。根据植株发育情况，及时进行合理的灌溉、施肥、培土、治虫等。拔节后，施正14全量培养液。抽雄期，温度控制在20~28℃之间，加强灌溉和培土管理。经常在温室地面上洒水，以保持合适的湿度。由于采取了以上一些措施，初步摸索出了花粉植株在北方冬季温室栽培技术，达到了正常

开花、结实的目的。在成活的24株中，75%发育健壮、生育正常，50%的植株雌雄发育协调。经多次人工授粉，目前已自交结实10株，异交结实12株（表9）。

（三）花粉植株后代的利用

1、快速选育纯合系和测定配合力

在玉米常规育种中，从自交系的选育到配合力的测定，一般要经历6~8年的时间。而通过花药培养产生的花粉植株，一经加倍，就是一个高度的纯合系，它的后代性状具有一致性⁽³⁾。如果花粉植株雌雄发育协调，即可在当代自交采种的同时，再与其它亲本进行测交，测定配合力。我们在目前得到的京黄13、单三91纯系的同时，分别与门14等自交系进行了测交。这样，在同一培养时期内既可得到自交系，又可得到测交种。因此，单倍体育种法是快速选育新品种的新途径，其选育程序可以概括如图1。

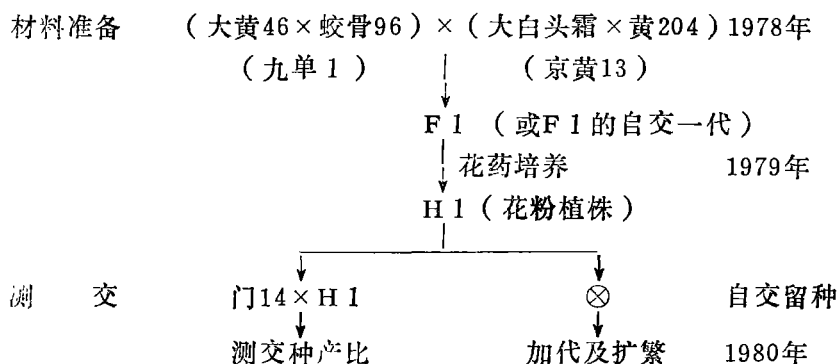


图1 玉米快速育种的新程序

此外，花粉植株由于在整个培养周期内受到2,4-D、KT、秋水仙素等化学药品的强烈刺激，以及光照、温度等外界条件的影响；细胞染色体的数目、倍性和结构会发生变异⁽²⁾；而且这种变异大大地超过了用其他人工引变方法所引起的染色体变异。因此，在由于染色体变异所产生的多种多样的花粉植株一代中，有可能出现新的突变类型。这样，用花药培养法不仅可以直接得到纯系，同时还可以从其杂交后代中进行二环系的分离。1978年春，我们以单三91为亲本，与维尔44、黄粒91等自交系进行复合杂交，同年进行二环系分离。目前已分离出花粉植株杂交后代的早代穗系20个，从而丰富了育种材料。

2、花粉植株的杂交优势及杂种优势的维持

用花药培养法产生的单倍体植株，二倍化后即可纯合，同时还具有基因型和表现型一致的特点。因此，用花粉植株直接配成的杂交种，可尽快明确被接种的原始材料的配合力和遗传表现。在1978年对花粉植株遗传性和杂交优势初步研究⁽⁴⁾的基础上，1979年我们又进行了进一步研究。研究结果表明，花粉植株具有较强的杂交优势，花粉植株能将原亲本的主要性状遗传给后代；同时，再选用合适的亲本与花粉植株杂交一代进行进级杂交，可以维持其杂交优势。其结果如表10、表11所示。

由表10可见，用花粉植株直接配成的杂交种“单三91”〔海白H1 × (小八趟 × 水白)〕，单株粒重、穗长、百粒重等重要经济性状都明显地超过双亲，尤其单株粒重321.8克，是原亲本的2~4倍。从表11中可以看出，进级杂交可以维持一定的杂交优

势。如单三91×C103，比原亲本“小八趟×水白”增产39.3%，甚至比参考对照“吉单101”也增产24.3%。

表10 花粉植株杂交一代及其亲本主要经济性状比较

性状	品系	花粉植株杂交一代 (海白H1×(小八趟×水白))	海 白	小八趟×水白	备 注
株高 (cm) $\bar{X} \pm S$		250.6±23.4	203.0±82.3	202.4±85.9	单株粒重为4—7 株平均值。
	C·V%	9.3	40.6	42.4	
穗长 (cm) $\bar{X} \pm S$		26.8±3.4	12.8±2.4	20.6±1.5	
	C·V%	12.7	18.7	7.3	
单株粒数 $\bar{X} \pm S$		751±143	178±48	489±353	
	C·V%	19.0	20.9	72.2	
单株粒重(克) $\bar{X} \pm S$		321.8±57.2	82.7±513	130.6±111.1	
	C·V%	18.4	62.0	85.1	
百粒重(克) $\bar{X} \pm S$		42.7±3.5	35.2±19.6	27.4±12.6	
	C·V%	8.2	55.7	46.0	

表11 单三91进级杂交后的杂种优势

组 合	平均株高 (cm)	穗 长 (cm)	一株穗数	十株产量 (斤)	增 产 比 率 (%)	
					对 照	参 考 对 照
小八趟×水白 (CK)	221	19.1	1.6	3.3	100	
吉单101 (参考对照)	222	22.3	1.0	3.7		100
单三91×C103	278	22.5	1.8	4.6	39.3	24.3
C103×单三91	250	19.7	1.2	3.7	12.1	0
单三91×黄粮91	225	21.2	1.2	4.1	24.2	10.8

三、结 论 与 讨 论

1、提高花粉植株的诱导频率

玉米花药培养是快速获得玉米纯系的一条有效途径。但当前玉米花粉植株的诱导率还很低，如1978年全国25个单位平均愈伤组织的诱导率为0.192%，花粉植株的诱导率仅为0.033%⁽⁵⁾，这就严重地影响了玉米花药培养在育种实践中的广泛应用。我们两年来使玉米花药培养效果提高近30倍，其主要措施是：①用正交设计法，在研究国内外优良培养基各成分配比的基础上，进行了大量元素无机盐的筛选试验，结果筛选出了“正14”“正9”等几种较好的新培养基；②用“海淀八趟白”、“京黄13”等易诱导材料与当地优良材料杂交，组配既适合当地特点又有较高诱导率的新材料，如“九单1×京黄13”、“蛟骨98×来宾白”等；③用花粉胚状体植株后代进行花药再培养，或用桥接方式将胚率较高的基因型重新组合，从中筛选花粉胚的给体材料如“单三91”“单复92”。同时，结合选择适合胚状体发育的培养基，添加不同的附加物质和进行继代培养等，控制花粉发育途径，走胚状体或胚性细胞团成苗的道路。

2、花粉植株的栽培与环境条件的关系

玉米花粉植株的特点是株型较小，生长势较弱，但加倍以后，其发育时期对环境条件

的要求与正常植株有共同之处。在温室栽培的花粉植株，如能满足光、温、水、肥等条件，同样能生长良好，开花结实。光照：必须注意光强和光质的影响，除自然光照外，必须补充光照。光照时间以14~15小时为宜，少于12小时雌性增强，超过15小时，提前抽雄，易雌雄不遇。温度：以苗期18~20℃，拔节期20~25℃，抽穗开花期20~28℃为宜。水肥：在拔节和抽穗期必须结合施肥进行多次灌溉，并中耕培土。每隔1~2天追施100毫升N、P、K三要素含量较高的正14全量培养液，可使植株健壮，根系发达。

3、花粉植株的利用

玉米花粉植株可以遗传原亲本的特征特性。花粉植株当代具有多样性。花粉植株自交后代具有整齐一致的特点。因此，玉米花粉植株可做花药再培养和二环系分离的亲本材料。利用玉米单倍体育种法可快速获得纯系和测交种，通过花药培养法得到的纯系可以发挥较大的杂交优势并可以通过进级杂交方法维持其杂交优势。这些试验结果都为玉米单倍体育种尽快应用于生产实践提供了依据。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院遗传所组织培养实验室四室一组, 1975, 诱导玉米花粉植株的初步研究. 遗传学报 2: (2): 138—142
- [2] 丁玉澄、谷明光等, 1979, 玉米花粉植株后代H₂减数分裂的染色体行为, 遗传学报 6 (2): 159—164
- [3] 陈力等, 1979, 用花药培养法获得玉米纯系的初步研究, 遗传学报 6 (12): 421—426
- [4] 母秋华、杨振棠, 1978, 玉米花粉植株遗传性和杂交优势的初步研究, 植物生理学报 5 (3): 291—294
- [5] 山东省农科院, 1979, 我国玉米花药培养研究进展(未发表资料)
- [6] 中国科学院北京植物所, 黑龙江省农业科学院编著 1977 《植物单倍体育种》56—62页, 科学出版社,
- [7] 吉林市农科所新技术育种组, 1979, 提高玉米花粉植株培养效率的研究, 吉林市农业科技 1980, 1, 2, 1—6
- [8] 母秋华、陈泽光、杨振棠, 1980, 玉米花药漂浮培养, 遗传 2 (5): 37~38.