

玉米花药培养诱导胚状体 和胚状体无性系的研究*

母 秋 华

(吉 林 市 农 业 科 学 研 究 所)

证明高等植物细胞存在全能性的最惊人的事实,就是培养植物体细胞可以分化成胚状体,并进而再生成整株植株。自1958年Steward等人用胡萝卜细胞悬浮培养获得胚状体后,胚状体的研究在国际上引起广泛重视⁽¹⁾。目前在花药培养和组织培养中具有胚状体分化能力的种子植物已达117种、34科、75属⁽¹⁾。我国广西农学院和甘肃农业大学1978年分别从玉米花粉愈伤组织得到了可继代繁殖的无性系,但尚未得到结实成熟植株⁽¹⁾⁽²⁾。

我所在1979~1980年共获得玉米花粉胚状体5,000多块、分化出绿苗1,400多株,移栽360多株,成活170多株,1979年18穗自交结实⁽⁴⁾,有的已配制成增产幅度较大的测交种。在此基础上,我们又经1978~1980二年多的38种培养基,经过几十次反复试验,先后共获得10个能继代繁殖的胚状体无性系。胚系79—635已繁殖胚状体182,900块,胚系80—1、80—10共得到了近20万块胚状体与1837株绿苗,移栽成活57株,5株自交结实,经小苗根尖染色体检查,2n=10的居多。同时,得到6个异交与测交果穗。上述研究,为建立一个稳定的能继代繁殖的无性系提供了资料,为继续大幅度提高玉米花药培养中绿色植株的诱导率和实现玉米快速无性繁殖,提供了新的线索。

材 料 和 方 法

两年共接种单三91、单复92、单复92×胚943、九单1×京13、46黄91×胚944等材料72份。选取单核早期的花药,按常规方法接种。

诱导培养主要采用正交试验法组配的16种培养基⁽⁴⁾,还有N₀、玉培、762、五一4等培养基。分化培养基主要采用正₀+K₂+IAA0.5+石油助长剂0.5+C0.5%+CH500+蔗糖4%。胚状体无性系的继代繁殖及绿苗培养主要采用正₁₄和正₂两种培养基。诱导胚状体的温度为25~29℃,诱导无性系的温度7~27℃,胚状体无性系继代培养的温度20~27℃。培养基每天用日光灯补充照明10小时。

根尖染色体检查:先用0.2%秋水仙素处理,然后用铁矾苏木精法染色制片,胚性细胞团的形态直接进行活体观察。

当无性繁殖的绿色植株2~3叶时,在18~28℃的半地下温室里栽培。

*参加此项研究的有:杨振堂、陈泽光;参加部分研究的有张挂兰、王玉霞、刘志本、张增明、田惠香等。此项研究曾得到北京大学朱徵教授的指导,谨致谢意。

结 果 与 分 析

目前,许多研究者指出,在花药培养中直接诱导胚状体比诱导愈伤组织成苗有三个优点:即数量多、速度快、结构完整。两年来,我们共获得5,000多块胚状体,绘制出4,000多块胚状体外部形态图,观察近1,000个花药,试图摸索出花粉胚状体的来源、形态发生、胚状体的外部形态和成苗率的关系,从而,提高玉米花药培养效率。

1、玉米花粉胚状体的发生

1978年郭仲琛等首次报道了有关玉米雄核发育的研究结果,并指出:玉米小孢子发育主要有四条途径:即营养细胞发育途径;生殖细胞发育途径;营养细胞和生殖细胞同时发育途径;花粉均等分裂⁽⁶⁾。为了进一步探索小孢子发育成胚的主要途径,1979年我们把培养1、2、3、4、单三91的花药分期同卡诺固定液固定,然后用席夫试剂染色,用正体制片法镜检。除观察了小孢子的不同发育途径外,还详细统计了各类小孢子发育类型的百分率。

表 1 玉米花药培养小孢子不同发育类型

培养天数	开始发育小孢子总数(个)	营养核发育		生殖核发育		营养核和生殖核同时发育		均等分裂			退化了的细胞团	
		(个)	(%)	(个)	(%)	(个)	(%)	单核(个)	营养核(个)	%	(个)	(%)
7	30	26	88.6	2	6.6	1	3.3	1		3.3		
7	12	9	75.0			1	8.3	1	1	16.6		
15	16	11	68.7	1	6.2			3	1	25.0		
21	64	56	87.5	2	3.1	2	3.1	3	1	6.2		
21	96	80	83.3	4	4.1	6	6.2	3	3	6.3		
21	83	66	79.5	3	3.6	9	10.0	4	2	7.2		
90	52	30	57.6					3		5.7	19	36.0
小计	353	278	78.8	12	3.4	19	5.4	25		7.1		

观察统计结果表明,玉米小孢子发育除个别类型(多个游离核、带有微核的游离核、不规则的核裂、块裂、带状分裂)外,主要有上述四种类型(表1)。其中营养核发育占78%;生殖核发育占3.4%;营养核与生殖核同时发育占5.4%;均等分裂占7.1%。在这四种途径中,第一与第四种是小孢子发育成胚的主要途径,在均等分裂中以单核均等分裂发育成胚的可能性大。

另外,我们在观察中发现,部分小孢子在发育成胚状体的过程中,培养5~7天的单核花粉,经第一次有丝分裂,形成两个不均等核,营养核大而染色均匀。两周后观察,它在花粉细胞中的位置多数位于中央,少数位于一端,呈球型或心型发育。有的在一个花粉细胞内可见到两个原始胚。这种由营养核形成的原始胚的细胞团发育很快,达到一定体积时,将花粉壁撑破,进入药室里,花粉在发育的各个时期、它们之间或与药壁组织之间是有联系的。3~4周发育成熟,突破药壁的胚状体、它的类似胚柄的器官仍与药壁紧密相连。

2、胚状体的外部形态与成苗的关系

玉米花药培养中，由于基因型与外界培养条件的影响，胚状体的形态、特征是多种多样的。(1)与典型的合子胚相似，可区分出盾片、胚芽、胚根和胚轴等，这种类型的胚状体，因品种不同数量多少而不同。在单三91、单复92这两个材料中出现的萌发胚较多，转移后86%可以分化成苗，移栽率可达50%以上；(2)球形、香蕉形等变态胚状体。这类胚状体的比例数很多，转移到适宜培养基上只有10%可以分化成苗，移栽率不到20%；(3)透明、油包状胚。这种胚转移后，大多成苗少或不成苗；(4)钟形或筒形胚状体。这种胚1/2可以分化出胚根和胚芽，但不能继续生长；(5)多子叶或连体胚。这种胚都可长成多子叶或连体苗，一主根或多根，但很少正常发育(详见表2)。虽然有的孪生连体胚植株可以长到开花期，但由于姐妹株之间互相影响，很少自交结实。

表2 胚状体的形态与成苗率的关系

胚状体形态	转移块数 个	分化成苗数 (株)	移栽苗数 (株)	分化率 (%)	移栽率 (%)
1、与合子胚相似的萌发胚	142	122	62	86.6	50.8
2、球型、香蕉型等变态胚	296	32	6	10.8	18.7
3、透明、油包状胚	4	0	0	0	0
4、钟型或筒形胚	2	1	0	50.0	0
5、多子叶或连体胚	2	2	0	100	0

在玉米花药培养中，由小孢子发育成胚状体是常见的，但胚状体一般都不能继代培养，其繁殖能力随着分化成苗而消失。因此，如何建立一个稳定的并能继代繁殖的胚状体无性系，尽快地获得大量纯系，是所有组织培养工作者的共同愿望。

我所于1979年9月从单三91和单复92中获得了5个能继代繁殖5次以上的胚性细胞团，其中79—635经12次继代繁殖，仍然繁殖旺盛，并保持分化紫色芽鞘的稳定性。经观察，属胚状体无性系。

1980年9月，又从单复92×HS943花粉胚状体中得到了5个不同类型的胚性细胞团。其中胚系1、2胚系10已继代繁殖10代以上，获得绿苗1837株，移栽成活57株，有的已经结实。这些胚性细胞团就外部形态而言，大致可以分为三种类型：(1)集落或团块较为松散，胚状体之间虽有联系，但容易剥离。单个胚状体有分化根与紫色芽鞘的能力，进一步培养只能形成白化苗，如胚系79—635；(2)胚性细胞团外部形态同上，继代培养时繁殖能力很强，并可分化出根、茎、叶完整的绿苗，如胚系80—10；(3)团块紧密，连体的胚状体不易分离，有的发育成多子叶的菜花样小苗，有的在苗丛里也可以形成正常植株，如胚系80 2。

为了进一步探讨胚状体无性系的形成与影响繁殖速度的因素，我们还进行了以下几方面的研究。

1、胚状体无性系的形成与基因型的关系

我们1978年在玉米花粉植株的遗传性及杂交优势的研究中发现，玉米花粉胚的形成与材料的基因型有关，这种基因型是可以遗传的，花粉胚状体植株杂交后代有较高的形成胚

表 3 1979~1980年几种胚性细胞团的来源与繁殖状况

细胞团代号	材料来源	成胚率 / 成苗 (%)	诱导培养基	继代培养代数	继代培养日期	繁殖胚状体块数	成苗情况
胚系79-632	单 三91	77.9	正7	5	79.9-80.4	9,000	少量
" 79-633	"		"	4	"	4,500	"
" 79-634	"		"	4	"	4,500	"
" 79-635	"		"	14	79.9-81.5	182,900	少量白苗
" 79-90	单 复92	28.5	玉培	6	79.9-81.4	4,000	少量
胚系80-1	单复92×HS943	24.6	正13	10	80.9-81.5	25,228	237
" 80-2	"		正10	6	80.9-81.2	7,460	120
" 80-9	"		N6	4	"	1,150	"
" 80-10	"		正14	11	80.9-81.5	132,700	1.37
" 80-13	"		正7	4	80.9-81.2	15,000	28

从表3可以看出：(1)在我们获得的10个胚性细胞团中，有4个来自单三91，1个来自单复92。这两个材料都是以“海白”花粉胚状体植株做母本的杂交后代。其中1980年获得的5个胚系都是由单复92×HS943同一基因型形成的。(2)这些材料花药形成胚状体的频率都很高，其平均诱导率分别为77.9%、28.5%、24.6%。这些材料在本所试验条件下，从花药诱导出的全部是不同形态的胚状体，有的突破药壁时就可继续发育成胚性细胞团。(3)在花药培养中易形成胚性细胞团的基因型，通过有性杂交可以将其特性遗传给杂交后代。

2、胚状体无性系的形成与培养条件的关系

(1)培养基与胚状体无性系形成

①诱导与分化培养基的影响

培养基是影响胚性细胞团产生的又一重要因素。从图1可见：在我们获得的10个能继代

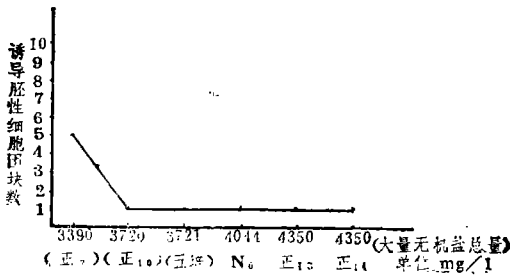


图 1 诱导培养基大量无机盐的含量对胚性细胞团形成的影响

繁殖的胚性细胞团中，分别是在6个培养基中形成的。培养基中大量无机盐的含量差别很大，从3390mg/l到4350mg/l都可诱发胚原细胞形成无性系；3720~4350mg/l之间差异不够明显。而“正7”培养基大量无机盐含3390mg/l时，诱导数量最多。这一培养基，K、N(NO₃)、N(NH₄)、Mg、P、Ca克分子当量浓度分别为22.5、20、2.3、2.4、2.5、1.0。另外，培养基中细胞分裂素和生长素的含量及相互间的搭配，也对诱发胚性细胞团的形成有着重要影响。在上述的6种培养基中，5种培养基(正7、正10、正13、正14、玉培)均

附加了BA 1 mg/l和NAA 1 mg/l。另外，酪朊水解物和水解乳蛋白，对无性系的形成也有良好作用。

②继代培养基的影响

胚性细胞团形成以后，如何实现继代繁殖、提高繁殖倍数，增加绿苗频率，培养基起着重要作用。在我们试验的38种继代培养基中，除怀特培养基(大量无机盐含量1365mg/l)外，其他各种培养基都可进行增殖，但由于培养基的种类和附加物质不同，表现出差异。由表4可以看出：

表4 培养基对胚状体无性系增殖的影响

项 目 培 养 基	培 养 材 料	培 养 天 数	培 养 时 鲜 重 (g)	培 养 后 鲜 重 (g)	增 殖 倍 数
正 ₁₄ + 2.4-D1 + K0.5 + BA0.5 + C0.5 + CH500 + Su 2 %	胚系79-635	35	200	680	3.4
正 ₁₄ + 2.4-D1 + BA 0.5 + NAA0.5 + C0.5 + CH500 + Su 7 %	"	35	200	480	2.4
正 ₉ + BA1 + K1 + IAA0.2 + C0.5 + CH500 + Su 6 %	"	35	200	1350	6.7
正 ₇ + K0.5 + BA1 + NAA0.2 + C0.5 + CH500 + Su 3 %	"	35	200	1430	7.1
正 ₉ + K 2 + IAA0.5 + NAA0.5 + CH500 + C0.5 + Su 4 %	胚系80-10	35			8.5
正 ₉ + K 2 + IAA0.5 + NAA0.5 + CH500 + Su 4 %	"	35	200		10.0

正₁₄培养基可使胚性细胞团个数增多，但发育速度慢些，一般是散落形的粒状集落。而正₇、正₉培养基可使胚状体边繁殖边完成个体发育，培养5周的团块鲜重明显高于正₁₄。在蔗糖浓度2~7%的试验中，较低的蔗糖浓度可以提高繁殖倍数，而蔗糖浓度5%可促进胚状体与绿苗的形成。活性炭对胚性细胞团的形态发生及绿苗形成有显著效果，加0.5%的炭可使萌发胚的数量提高一倍，绿苗形成速度明显加快。此外，温度可影响胚性细胞团的繁殖倍数，在20~26℃的培养条件下，5周可繁殖10倍以上。夜间7℃、白天27℃的变温培养，可促进胚性细胞团的形成。

(2) 胚状体无性系单细胞或部分组织培养

为了进一步证明胚状体无性系单细胞或胚状体部分组织发育成再生植株的全能性，我们将600mg(鲜重)的胚系80-10细胞团，放在6%的蔗糖溶液中，用注射器内管研磨，直至全部磨碎为止。然后，用四层纱布过滤将滤液分装于正。固体培养基上(每瓶3ml)；再将纱布上的碎片，接种在相同的培养基上，同时对照一起在温度20~27℃条件下培养，其全部操作均在无菌条件下进行。试验结果(表5)表明，单细胞在正。固体培养基上没能再生成细胞团。组织碎片培养7天后明显增殖，3周可形成形态分明的完整胚；有的开始萌发，35天可再生成2厘米的绿色小植株。与对照相比，破碎组织由于在培养中需要一恢复期，所以增殖与分化速度慢，增殖高峰出现迟。

3、胚状体无性系的成苗过程

我们用活体或压碎法，观察了无性系胚状体的发生过程。在各个发育时期胚状体的表

表 5

胚状体无性系组织碎片及单细胞培养植株再生情况

瓶 号	处 理	培 养 21 天 增殖倍数 (倍)	再 生 完 正 胚 数 (个)	绿 芽 数 (个)	再 生 植 株 数 (个)	增 殖 高 峰 出 现 时 间 (天)
1	单 细 胞	0	0	0	0	—
2	"	0	0	0	0	—
3	"	0	0	0	0	—
4	"	0	0	0	0	—
5	"	0	0	0	0	—
6	组 织 碎 片	3	10	1		35
7	"	3	8	1		"
8	"	2.8	30	2	1	"
9	"	2.5	12	2		"
CK	细 胞 团	6.0	60	2	3	21~28

层都可以看到与表皮垂直发育的细胞。在胚状体内或连体胚之间都可以形成类似分生组织区和活化细胞群。这些细胞的原生质浓、核很大，分裂速度很快，而且具有分生和分化同时进行的特点，只是因条件不同表现的主次关系不同。据观察，胚状体无性系中每一个细胞，都相当于一个胚原细胞，只要条件适宜，它们都有再生植株的能力，在其发育过程中细胞之间是有联系的，是互补的。还有嵌合在一起的各种形状的变态胚。

由胚性细胞团发育成的胚状体，与花粉胚一样，具有多样性和不同步性。在同一培养基上可以同时看到球形、心形、香蕉形胚和萌发胚以及小苗。在胚状体、芽、苗的基部，又可重新长出胚状体。萌发了的胚状体如果条件适宜即可长出完整的绿色植株。其繁殖力成苗过程大致如图 2 所示⁽³⁾。

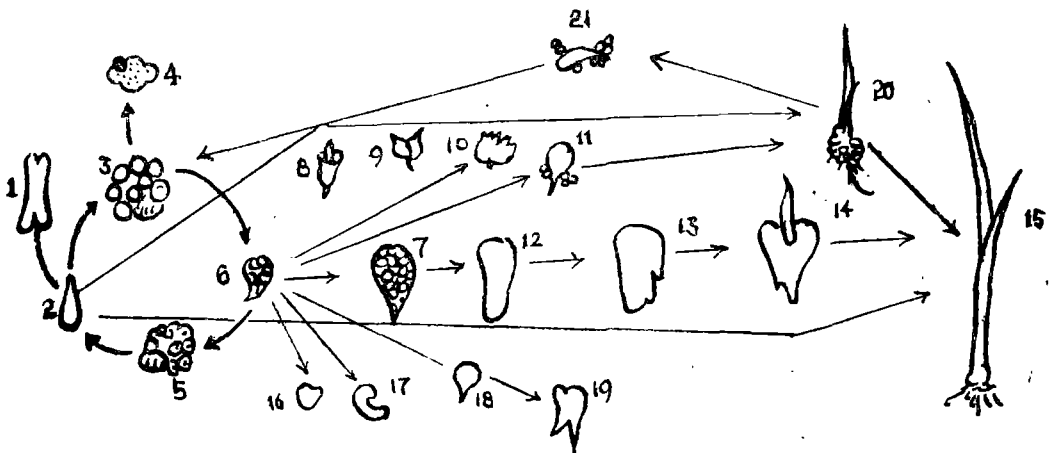


图 2 胚状体无性系和胚状体发育成苗的过程

说明: 1、花药 2、胚状体 3、5、胚性细胞团 4、老化的胚性团块 6、多细胞原胚
8、9、10、16、17、18、19分别为钟形、连体胚、多子叶胚、球形、肾形等变态胚
7—15、胚状体成苗过程 20、21花粉胚或无性系胚发育成的植株

从图2大致可以看出,玉米花药培养诱导出的花粉胚状体,有的可以直接发育成苗;有的在发育成苗的同时,接触培养基的部分,由于胚原细胞活化而形成胚性团块,其中有些同合子胚和花粉胚相似而成苗;也有的发育成筒形、连体、多子叶胚,虽然能萌发出根与叶,但大多数为变态苗,还有一大部分为球形、肾形变态胚,有的不能萌发或只能生根。胚状体或胚状团块由于得不到足够营养也能衰老死亡。如果把老化的细胞团及时转到新鲜培养基上,又可形成新的胚性团块及胚状体。从胚性细胞中产生的各种胚状体及细胞团都可继代繁殖,互相转换,以致反复进行。

4、胚状体无性系繁殖倍数与成苗率的差异及幼苗移栽

通过对1980年获得的5个能继代繁殖的无性系的观察发现,各系虽然都是来自同一亲本,但因培养基不同,它们的外部形态和繁殖倍数及成苗率的差异很大。从表6可以看出,胚系80—1成苗数及移栽成活率较高,幼苗质量好,但繁殖倍数低。

表6 不同胚状体无性系繁殖倍数及成苗率的差异

系名	转移块数	分化绿苗数 (株)	苗/胚 (%)	成活绿苗数 (株)	成活苗/总苗数 (%)
胚系80—1	15,228	237	1.55	26	1.90
胚系80—10	132,700	1,437	1.08	26	0.18

而胚系80—10继代繁殖能力很强,幼苗成活率也较高。上述两个系的胚状体大多都有发育成绿苗的能力,但由于在继代繁殖中,个体之间的密度较大,存在着分生与分化之间的竞争。只有那些以分化为主,而又得到足够营养、水分及空气的胚状体,才能发育成完整的绿苗。1980年12月~1981年12月,我们在获得的1,837株绿苗中,选取84株健壮绿苗进行移栽,目前成活57株,成活率达70%。我们采取的具体办法是:

(1) 壮苗。其方法有二:一是将拥挤在绿苗周围的团块挤走(不要伤根),再倒入一定量成份相同的新鲜培养液;二是对已长出心叶的绿苗,将根部团块轻轻剥落于原瓶,再放入半固体的正分化培养中(洋菜0.4~0.5%),待绿苗长到2片叶,根系发达时移栽。

(2) 移栽。首先将苗放入自然光照的温室中,打开瓶盖,练苗1~2天,然后将苗轻轻取出,直接放入1/4炭+3/4的床土中移栽(根不用水洗),再把试管中的培养基放入离根1.5寸的地方,浇正,培养液150毫升左右,边浇边覆土,加罩3~7天,不遮光。温度保持在18~28℃左右。待小苗长出1~2片心叶时,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),进行加倍处理。早晚补充光照共14小时左右。目前成活绿苗已有十一穗结实,其中5株自交结实,来源于同一胚系的材料整齐一致。

问 题 与 讨 论

一、关于胚状体和胚状体无性系的发生问题

目前大多数玉米花培工作者认为,从玉米花粉细胞分裂分化形成花粉植株,基本上有两种类型:一是从花粉分裂分化形成胚状体;另一种是花粉分裂后形成愈伤组织^[5]。

目前国内获得的2个能继代繁殖的胚性细胞团是由花粉愈伤组织形成的⁽³⁾⁽⁴⁾。通过我们几年来的观察,在本所试验条件下,花粉细胞分裂,分化形成胚状体,随后发育成绿色植株是唯一途径。胚状体无性系,是在内外因共同作用下,由胚状体胚原细胞的分裂繁殖与分化形成的。它是由胚原细胞,多细胞原胚直到成熟胚组成的集落。由于这一集落,胚状体各个发育时期及每一部位,特别是表皮细胞,都可繁殖出新的个体,所以外部形态常常表现出团状结构。胚状体无性系形态发生的细胞学观察表明,胚性细胞团是由集落在一起的发育不同步的大多是变异的胚性体组成的,它们都有再生力和繁殖力,能够继代繁殖,有的并表现出再生绿色植株的细胞的能力。因此,我们认为:在玉米花药培养中建立胚状体无性系是可能的。但关于胚状体无性系的发生,还涉及到多学科的理论问题,有待继续研究和探讨。

二、关于胚状体无性系的利用问题

谷明光等报道⁽⁸⁾愈伤组织无性系在长期继代繁殖中,染色体倍性变化很小, $2n=10$ 的占90%。我们通过对胚性系79—635、胚系80—10的根尖染色体检查也表明,培养6~10代的根尖,染色体 $2n=10$ 的居多,也有一部分多于10或少于10的,表现出相对遗传稳定性。此外,来自同一亲本的无性系之间,由于培养条件不同又表现出不同的特点。如胚系80—1、80—10绿苗健壮,叶鞘较长;而胚系80—2,叶鞘很宽,苗多为丛生,多子叶状。成活绿苗的株型、叶形、叶色在物候期上也表现显著差异。因而花粉胚性细胞无性系的建立,不仅为玉米这一主要的粮食作物实现快速无性繁殖,快速繁育纯系,提供了新的方法;而且,也为植物细胞学、实验胚胎学、发育遗传学、生理生化等学科的理论研究,提供了良好材料;为单倍体育种、诱变育种、抗病育种、杂交优势利用等,开辟了新的途径;为高等植物选种提供崭新的途径。

参 考 文 献

- (1) 朱徵 1978 植物组织培养中的胚状体《遗传学报》(1)
- (2) 广西农学院农学系花培组 1980 玉米花药培养胚性细胞团的发生《全国玉米花粉会资料》
- (3) 郭彩 曹孜义等 1980 玉米愈伤组织胚状体发生的研究《全国玉米花培会议资料》
- (4) 母秋华 杨振堂 陈泽光 1980 玉米花药培养单倍体育种的研究《吉林农业科学》1980 (4) 6—14
- (5) 郭仲琛等 1980 玉米花粉植株的诱导和雄蕊发育的研究《植物学报》1980 (4) 6—14
- (6) 吴小航 1979 植物嫁接愈合的细胞学研究《全国植物细胞学术讨论会论文摘要》
- (7) 母秋华 杨振堂 1979 玉米花粉植株的遗传性及杂交优势的初步研究《植物生理学报》5 (3) 291~294
- (8) 谷明光等 1980 玉米花粉愈伤组织无性系的分化能力及其稳定性《全国玉米花培会议资料》