

玉米生物技术育种的改革与研究

母秋华 李卫国 李淑霞

(吉林市农科所玉米室玉米花培组)

近十几年来,利用花药培养、幼胚培养、化学药剂诱发玉米孤雌生殖等生物技术,进行玉米品种改良的研究,受到国内外科技工作者的普遍重视。有些研究成果已应用到育种实践。但是,目前尚有些技术环节不够完善。为此我们重点进行了下述三项试验,将夏季接种变为利用冬季温室培养供体材料,春季进行花药培养;利用花培后代进行幼胚培养;利用化学药剂对一些品系做复合处理,诱导孤雌生殖。试验证明:这三项改革是成功的,它将对玉米生物技术迅速的应用于生产实践起着一定的促进作用。

一、材料和方法

(一)用以玉米花药培养的材料,是按计划组配的园7×自330或群体材料(Hybrid—population)84—园5等,共51份。春季将其中的6份材料取单核早期的花药进行培养。诱导培养基采用8114⁽²⁰⁾、正7、正14⁽¹⁾,附加2,4-D 2 mg/L(单位下同),6BA1, NAA 1。分化培养基为8112,附加KT或6BA1—2, NAA 0.5, IAA 0.5。

(二)用做幼胚培养的材料是:多代系m₃和花培群体84—园5。一般采用授精14天左右的幼胚进行离体培养。诱导与分化培养基同上。

(三)用花培纯系胚10—3、京花13、⁶⁰CO- γ 射线处理后代原502mo,以Mo17op为对照,利用正g培养液⁽¹⁾,附加2,4-D 2, NAA 2, 6BA 2, GA 5或秋水仙碱等,组成五种配方,在上述材料抽丝24小时后,在套袋隔离的条件下,将药液滴注到雌蕊的花丝上,诱发孤雌生殖(Lnduad parthenesis)。

二 结 果 与 分 析

(一) 春季花药培养

玉米花药培养是快速获得玉米纯系和杂交种的有效途径之一。但目前,国内外的寒冷地区普遍存在着冬季温室材料不能形成再生绿苗,夏季培养的花粉植株越冬难的问题。由此,我们除利用夏季田间材料进行培养外,又于1985年12月中旬利用温室条件培养供体材料。1986年3月进行花药离体培养,结果春季用以花药培养的6份材料均成功的诱导出胚状体。接种8350枚花药,诱导出861个胚状体。平均诱导率达9.7%(表1)。表1表明:

1. 春季花药培养同样可以获得较高的诱导频率,其培养效果的好坏和材料的基因型、培养基密切相关。8114、正7两种培养基结果较为理想。84—园5在这两种培养基上获得许多胚状体,最高诱导率达71.3%。

2. 春季花药培养获得的再生绿苗叶片浓绿,根系发达,获得的40株绿苗,移栽成活

*张殿荣参加了该项试验,玉米室参加部分工作。

表1

1986年春季花药培养试验结果

培养基与结果 材料	8114			正7			正14		
	花药数 (枚)	出胚数 (个)	胚/药 (%)	花药数 (枚)	出胚数 (个)	胚/药 (%)	花药数 (枚)	出胚数 (个)	胚/药 (%)
胚1×甜99	550	21	3.8	500	26	5.2	1050	1	0.09
胚10×甜40	600	15	2.5				350	0	0
胚10-02×甜40	700	0	0	150	8	5.3	850	0	0
84-园6(群体)	550	392	71.3	900	177	19.7	250	0	0
园7×自330				1150	199	16.5	650	5	0.77
84-园6(群体)				550	26	4.7			

率60%。而同年夏季接种获得的702株绿苗，冬季在温室移栽成活率不到10%。

3. 在幼苗生长发育适宜的5月，将花粉植株移到田间，不但成活率高，而且植株发育健壮，移植到田间的植株50%结实，6个果穗自交和姊妹交后共获255粒种子。比历年温室栽培的花粉植株结实率提高3倍多。

4. 春季花药培养的效率高低，很大程度上取决于供体材料的生理状态。因此，水、肥、温、光要给予保证，使植株及雄穗发育正常，否则就不会成功。

(二) 玉米幼胚培养

利用玉米幼胚培养获得胚性愈伤组织，再通过分化培养再得绿苗，从60年代起就有人获得成功。我们从1980年起通过幼胚培养曾获得吉梁等纯系。近年来一些学者利用玉米幼胚这一外植体进行组织培养，来诱发变异(体细胞无性系变异)的兴趣越来越大，特别是Mccoy等与Bghare的工作，非常清楚的说明：组织培养可以引起染色体缺失、易位和其它次要重排^[3]。我们的目的是通过幼胚获得有育种价值的突变体。

1986年，我们首次利用花培后代群体85-园5和多代系m₃为供体材料，共接种230个幼胚，和22个幼嫩的种子(授精后14天的胚)。详细观察与记载了通过幼胚诱导胚性愈伤组织的过程，和胚状体——再生绿苗的形态发生。从试验结果发现：

表2 玉米不同供体材料幼胚培养的试验结果

供体材料	外植体种类	接种数量(个)	获得胚性愈伤组织(个)	诱导频率(%)	分化绿苗数(株)	分化频率(%)
m ₃	幼胚	150	10	6.6	5	50.0
84-园5	幼胚	80	47	58.0	43	91.4
84-园6	幼种	22	1	4.5	0	0

活，有的细胞团可以分化出3~9个丛状绿芽。

3. 授精14天的幼种，经离体培养后，只是体积增大，其中仅有1个幼种形成愈伤组织，其它没有变化。

4. 不同供体材料的幼胚培养效果差异很大。“花药培养后代群体”较易产生胚性细胞团或愈伤组织，其诱导率达58.0%，是其它材料的10倍。绿苗分化率可达91.4%。从而说明，花药培养后代幼胚细胞全能性表达的潜能比正常材料大得多。

1. 在无菌条件下解剖出授精14天的幼胚，经培养2周后形成愈伤组织，再继续培养这些愈伤组织可形成胚性细胞团。

2. 将这些胚性愈伤组织或细胞团转移到分化培养基上，2周后发现，有的细胞团中的胚状体的体积增大，只长出根系；有的则长出绿芽，并发育出有根、茎、叶的完整小植株，移到土壤中可以成

(三) 化学药剂诱导孤雌生殖

诱发突变用于植物改良在许多植物上都有报道^[4]。但利用玉米花粉纯系, 和⁶⁰Co- γ 射线处理的后代做供体, 以正9花药培养基母液附加2, 4-D等生长素, 6BA等细胞分裂素, 来诱发玉米孤雌生殖, 尚未见正式报道。

1984年以来, 我们做了4次重复30多个处理, 从4个材料里获得249粒孤雌生殖的种子, 然后在肥沃的土壤里单粒点播, 详细记载了不同处理间差异和不同材料对诱变剂的反应, 并对它们的田间表现和下一代的遗传现象也做了系统地调查与分析。

1. 不同配方的诱变剂对结实率及后代的影响 (见表3)

表3 不同配方的诱变剂对诱导玉米孤雌生殖的影响 (1975年)

诱变剂成份	处理穗数 (个)	结实穗数 (个)	结实粒数 (个)	出苗株数 (株)	出苗率 (%)	m ₁ 的田间主要表现
清水	8	1	4	0	0	
正萘+2, 4-D ₂	12	4	48	10	20.8	1/3叶片有黄色条纹, 20%不育, 3株正常结实, 一株巨型株。
正9+2, 4-D ₂ +NAA ₂	12	3	78	23	29.4	2/3叶片黄色条纹, 3株似自交系, 5株巨型株。
正9+TNAA ₂ +GA ₅	12	3	45	26	44.0	3/4叶片出现条纹, 10%不育, 5株似自交系。
正9NAA ₂ +秋水仙碱0.1%	12	3	26	12	60.0	40%不育, 40%叶片肥厚似多倍体与混倍体, 仅25%结实。
正9+NAA ₂ +6BA ₂	12	3	47	20	42	叶片有条纹卷曲, 不育株畸型株50%, 20%似自交系并结实。

(1) 用上述五种配方均可以诱导玉米孤雌生殖。结穗率达20%多, 明显超过对照。

(2) NAA与2, 4-D合配使结实率提高, 但m₁代叶片带黄绿相间条纹的巨型株比率较高。说明这两种生长素不仅可促进大孢子单性生殖, 对后代的生长也有刺激作用。

(3) 用NAA与赤霉素(GA)或细胞分裂素分别配合, 对再生植株的诱变影响较大。GA对诱导孤雌生殖是有利的, 频率达21%以上。BA可使m₁—m₂产生许多新的类型, 从而扩大了变异幅度。同时n₁出现的叶色黄条纹, 可以遗传到m₂, 并出现孟德尔式遗传现象。

(4) NAA与秋水仙碱合配用滴注刺激雌蕊, 可以使再生绿萼叶片浓绿, 肥厚, 多绒毛, 花器变大, 气孔增大, 不仅使孤雌生殖的种子发芽率提高, 同时可获得多倍体, 和非正倍体, 也可获得染色体加倍并自交结实的纯合系。可见, 这种方法是玉米单倍体育种和倍性育种的良好手段。

2. 不同材料对诱变剂的反应

组织培养和人工诱变相结合可以加速玉米品种改良。为了寻找适合诱导孤雌生殖的基因型, 我们对花药培养后代胚10—3、京花13、⁶⁰CO- γ 射线处理后代原502mD的诱变反应做了深入研究(表4)。

(1) 玉米花粉胚性细胞系(Clone)后代胚10—3及花粉纯系后代京花13, 诱变处理后结实率较高, 但京花13的种子出苗率较低, 仅21%出苗。但获得孤雌生殖纯系的比率高。

(2) 经二次⁶⁰Co-r射线处理后代原502moP又进行复合处理以后, 虽然结实率稍

表4 不同基因型对化学诱变剂的反应 (1984年)

处理代号	结 果 材 料	获得种子数(个)	出苗数(个)	出苗率(%)	备注
1	Mo17杂(c)	47	13	22.6	每个处理12穗
2	原502 1.0万rmop	42	31	88.0	
3	京花13	101	22	21.0	
4	胚10-3	63	30	47.0	

注: 诱变剂正9附加2.4-D或NAA、6BA、GA各2-5 mg/L。

低, 但孤雌生殖的种子萌发能力很强, 达88%, 在以往的试验中自330自交系对理化因素的反应也不够敏感, 这可能是一些抗逆性较强的材料, 对物理化学诱变剂也有一定耐性。另外从原502moP中选择的E502GS有很高的配合力, 抗性强, 整齐一致性好。

(3) Mo17系的自然开放穗, 理化因素处理后, 出苗率降低。同时, Mo17

经理化因素处理后, 其后代分离现象严重, 畸型株多, 1个穗系m₂50%致死。还出现了茎秆坚硬, 有黄绿相间条纹, 雌穗位置移位和不能抽雌的植株。尤其在NAA+6BA的处理中这种现象较多。但也选择出一些整齐一致, 株高适中, 果穗性状好的纯系。

三、小结与讨论

(一) 玉米花药培养的十年实践证明, 供体材料的基因型、培养基和培养环境是保证试验获得成功的关键。我们近两年利用温室材料进行春季接种的试验结果说明: 如果培养基和材料的基因型选择适宜, 于12月中旬在温室播种(温室12~28℃), 3月上旬接种花药, 5月中下旬将加倍后的盆栽花粉植株移栽到大田, 就可以大大地提高培养效率, 结实率达50%以上。

(二) 用于玉米花药培养的培养基和材料的基因型, 对幼胚培养也是适用的, 尤其是经过花药培养的后代, 使外植体对试管环境的耐性及适应性有所增强, 所以84-园5群体幼胚培养的诱导率与分化频率都较高, 分别达58%与91.4%。我们观察到, 授精日数和幼胚培养后的再生植株的发育途径关系很大, 在相同培养基上, 幼龄的胚(14天左右)易形成胚性愈伤组织, 近成熟的胚易直接发育成幼苗。幼胚培养形成的细胞团, 经分化培养再生绿苗也同花药培养一样走胚状体的发育途径。

(三) 现代科学技术的发展, 使玉米育种工作有了新的飞跃。如果对有价值的基因型先用物理、化学诱变方法扩大变异幅度, 创造新类型, 再用有性过程使优良基因型重组, 进而再用玉米花药培养或诱导孤雌生殖等生物技术进行单倍体育种, 就可大大加快选育周期和玉米育种的进度。我们已用上述方法获得了V花91B、502GS、46花997等一批优良纯系, 并配制出了V花91B×Mo17等抗不良条件、高产、早熟的杂交组合, 为“复合生物技术”在玉米育种中的应用展示了美好的前景。但是由于我们的水平和条件所限, 尚有些理论机制问题没有揭示清楚, 一些技术环节仍不够完善, 以后应该协作攻关, 深入探讨。

参 考 文 献

- (1) 母秋华等: 提高玉米花药培养诱导频率的研究, 《遗传》, 1981, 4, 25-28.
- (2) 母秋华等: 高粱蔗体细胞无性系的建立, 《吉林农业科学》, 1984, 4.
- (3) F·R·Blattncr. Genetic Enginerring fo osmoregulation. 1982 289-313.
- (4) F·G·Brieger, induced mutations and plant lmpovement. 1972, 43-47.