

超甜玉米细胞和组织培养及其后代育种

母秋华 张新生 杜娟 田立国 于树清 母文玉 王金余

(中国人民解放军农牧大学植物细胞工程室, 长春 130062)

摘要 利用高培养力基因型与甜玉米杂交,其 F_1 代进行花药培养具有较高的培养力,花粉胚的诱导频率可达26%。甜玉米基因型通过幼胚培养,建立起2个可长期继代培养,大量再生绿苗的体细胞克隆,并获得了自交结实后代,同工酶分析表明,同一克隆再生植株可产生基因突变。常规高培养力材料与甜玉米杂交后代进行二环系培养,可以筛选出高配合力的超甜玉米自交系。

关键词 超甜玉米;细胞培养;组织培养;后代育种

甜玉米(*zea. mays* L. *Saccharata* Sturt)是玉米种里的一个亚种。其子粒含有丰富的乳果糖,维生素A、E和植物纤维素,甜玉米在医疗保健,改善人们的食品结构,增加食品工业原料方面都有重要地位。近十几年来,国际上甜玉米的研究越来越深入,中、美、法、英、巴西等国家利用生物技术对甜玉米的选育及品质改良极为重视。

Mu Qiuhua etc. (1988)^[1], Sun Jinsan, L. M. Prioli, etc. (1989)^[2]分别发表了甜玉米的组织培养及原生质体培养的结果,但迄今尚未见用生物技术育成甜玉米纯系和进行田间育种的报道。

于1985~1993年在对国内外甜玉米引种鉴定的基础上,我们又对甜玉米的组织培养,体细胞Clone的建立,后代筛选方面做了许多工作,本文报道如下:

1 材料和方法

从美国引进的超甜玉米32个品系中筛选出3个优良品系和中国7个高培养力供体材料杂交,组合成10个基因型重组的供体材料,86交3、交10、交58等进行了花药和幼胚培养。采用的培养基为zhang14、cj7、8114、N6,附加成份为2.4D2mg/L(单位下同)6BA1、NAA0.5、IAA0.5、CH500、诱导花粉胚状体时,添加蔗糖15%。诱导合子幼胚形成胚性愈伤组织加蔗糖2%。绿苗分化和Clone继代培养采用8114加蔗糖3%~5%去掉2.4-D其他成份同上。

培养温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,每日补充光照10小时,花药培养接种40天后统计诱导频率、胚性愈伤组织和Clone。每4周继代培养一次,并统计细胞团增殖率与绿苗分化率。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对Clone后代进行同工酶分析。测交种产量测定,按每公顷保苗5.55万株种于田间,当花丝抽出20~22天时,测定含糖量和鲜果穗产量(2次重复)。

2 结果与分析

2.1 甜玉米重组基因型的花药培养

利用花药培养快速获得甜玉米纯系,并进行自交系(包括二环系)间杂种优势的利用,被各国育种学家所重视。目前在美国、英国、法国等国家至少有30个单位开展甜玉米生物技术

育种的研究。但甜玉米花粉胚的诱导频率一般在0.2%以下(见表1)。为了提高甜玉米的培养力,从1986年起我们首次利用培养力较高的花培后代为桥梁亲本与甜玉米杂交或回交,然后利用 F_1 进行花药培养,取得了较好的效果。

表1 甜玉米桥接组合的含糖量及花药培养结果

材料成号	组合代号	含糖量	接种花药数(枚)	形成胚状体数	诱导频率胚/花药(%)
89-1	86交3	15.6	800	4	0.50
2	4	15.2	1250	5	0.40
3	6	15.0	1500	60	4.00
4	7	13.4	1550	21	1.40
5	10	18.2	3300	738	22.36
7	15	13.0	1900	24	1.26
8	27	9.8	2100	127	6.04
9	58	10.8	1400	285	20.35
甜美44		14.5	400	1	0.25
甜美38		18.0	450	0	0
桥梁亲本	单复953	6.0	2850	476	16.70

从表1的结果可见,(1)用普通高诱导率的玉米单复953等为桥梁和甜玉米杂交,不仅含糖量较高,而且用这些组合进行花药培养后,形成胚状体的能力大大提高。其中86交10,86交58,其诱导率分别达到22.36%与20.35%。(2)不同的桥接组合不仅含糖量不同,而且诱导频率的高低也存在着一般配合力和特殊配合力的差异。如86交10,不仅含糖量较高,而且特殊配合力较好。(3)甜玉米与普通高培养力玉米间的杂交 F_1 ,通过花药培养后其花粉胚的诱导率存在着明显的杂交优势,一般可以比原亲本提高2~80倍以上。

2.2 甜玉米幼胚培养及体细胞 clone 的建立

2.2.1 不同诱导培养基对幼胚培养的影响

于1991~1993年间,采用甜玉米与高培养力材料基因型重组材料 F_1 :je68,甜玉米单交种8906a纯系;4039 4047等田间授粉12天的幼胚在无菌条件下接种在Zheng14,cj7,8114,ms,N6培养基上。接种后于1周、2周、3周后分别观察接种后的反应及胚性愈伤组织形成情况,观察结果见表2。

表2 不同诱导培养基对胚性愈伤组织形成的影响

培养基	接种幼胚数(个)	形成胚性愈伤组织		形成 clone	
		数量(团)	诱导频率(%)	数量	诱导频率(%)
8114	27	16	59.2	1	6.25
Zheng14	48	21	43.7	1	4.76
cj7	21	13	61.9		
ms	40	14	35.0		
N6	32	7	21.8		

2.2.1.1 不同的培养基,在其它成份相同的情况下,对甜玉米幼胚的培养效果不同。以cj7,8114,Zheng14胚性愈伤组织的形成频率较高,分别为61.9%、59.2%、43.7%。

2.2.1.2 幼胚形成愈伤组织的质量不同,8114,Zheng14,不仅诱导的胚性愈伤组织频率高,且质量好,愈伤组织是结构致密,成颗粒状的胚性细胞团;Ms诱导的愈伤组织易产生褐变与畸形器官分化;N6易形成根系较高的白色松散愈伤组织。

2.2.1.3 Zheng14与8114,分别诱导形成2个可长期继代培养的甜玉米 clone₁(je68), clone₂8906a(cj68)分别继代18,11次,再生大量绿苗。

2.2.2 不同品种对幼胚形成 clone 的影响

近年来,从国外引入80份甜玉米材料和15份重组基因型材料中,筛选出20份进行幼胚培养。试验结果表明:(1)不同甜玉米的基因型差异很大,虽然80%的材料都可形成愈伤组织,但大多数胚芽直接发育成绿苗,形成胚性组织后不能继代培养,只有je68、4047、甜单8906a等较易形成可以继代培养的胚性细胞团。(2)不同材料的细胞团 clone,在长期继代培养中绿苗再生能力不同。clone₁绿苗分化能力很强,继代培养18次仍有90%可再生绿苗。目前已再生绿苗1万株。但移栽后不易成活。甜单8906a形成的 clone₂不仅绿苗再生能力强,移栽后成活率较高。1993年春在温室栽培,获得了移栽成活植株并得到了自交结实果穗⁽³⁾。

2.3 甜玉米 clone₂ 再生植株的后代观察与同工酶分析

2.3.1 clone₂ 再生植株后代观察

根据玉米体细胞全能性和变异性的原理,筛选优良甜玉米纯系或突变体,我们将 clone₁ 与 clone₂ 的再生绿苗,于 1992 年 11 月中旬进行了绿苗移栽。clone₂ 再生绿苗移栽后 40% 可成活。但是同一 clone₂ 的再生植株之间在一些农艺性状上存在着差异(见表 3)。

表 3 clone₂D1 再生植株性状差异

株号	株高 (cm)	穗位 (cm)	节数	中部最大叶片长	中部最大叶片宽	雄穗长 (cm)	行数	行粒数	结实粒数	轴色	蔗液垂度
clone ₂₋₁	97	10	7	80	7.0	22	12	14	60	红	22
clone ₂₋₂	99	10	10	50	4.2	10	0	0	0		
clone ₂₋₄	27	8	5	18	2.0	5	6	10	5	粉	18

注:调查时间 1993-06-13

从表 3 所见,(1)同一 clone 再生植株 D1 在生长势、株高、穗位、节数、叶片大小等性状上差异较大;(2)雄穗长短结实能力有所不同。轴色和子粒含糖量也出现了变异;(3)通过不同植株叶片,进行酯酶和过氧化物酶同工酶分析结果证明,clone₂ 后代 D1 产生了基因突变。如 clone₂₋₁ clone₂₋₂ 再生植株的酯酶都出现 6 条酶带,但它们酶带的位置宽度着色深浅有明显差异,过氧化物酶、同工酶的结果也出现了酶带的位置着色深浅的差异,同时 clone₂₋₂ 比 clone₂₋₁ 多一条酶带。

2.4 甜玉米桥接基因型二环系的培育及配合力测定

1989 年将超甜玉米与高培养力材料花培后代之间基因型重组材料 18 份种植于田间。在花药培养的同时,将雌穗套袋自交,进行二环系的选育。当年收 18 个自交果穗,由于甜玉米的含糖量是由 su 一对隐性基因所控制的,当它与粉质胚乳材料杂交后,其 F₁ 为正常子粒。人工套袋自交一代,大约产生 1/4 甜质子粒。将这些种子挑选出来于 1990 年种成穗行,除进行花药培养外,雌穗仍然进行套袋自交进行二环系的选育。在自交三代时进行含糖量及配合力测定。

2.4.1 超甜玉米桥接基因型二环系糖分的测定

于 1992 年对 16 个甜玉米二环系,当抽丝 22 天时,到田间采鲜果穗用测糖仪(WYT 型 0%~80%)进行蔗液垂度的测定。

表 4 超甜玉米桥接基因型二环系含糖量测定

穗系号	蔗液垂度 (%)	穗系号	蔗液垂度 (%)	穗系号	蔗液垂度 (%)
0049	25.5	0079	23.6	0085	21.5
0050	14.7	0080		0086	20.0
0051	14.6	0081	25.0	0087	15.0
0076	28.7	0082	25.0	0088	15.0
0077	30.0	0083	26.0		
0078	27.8	0084	14.0		

从表 4 甜玉米二环系(⊗S3)测糖结果所见:(1)通过对桥接甜玉米材料的连续自交选育筛选出超甜自交系,如 0049,0076,0077,0078,0081,0082,0083,7 份材料的蔗液垂度均达 25% 以上。(2)这些甜玉米二环系的株高、穗位、穗型从三代起接近整齐一致。自交三代(⊗S3)的子粒类型没有发现分离现象。

2.4.2 超甜玉米二环系测交结果

1992 年从超甜玉米二环系中选择 0077 与 0088 二个系做父本,以甜玉米 007 与 0052 做母本进行测交。配制成 007×0077,0052×0088 等测交种。1993 年春将测交种与其他 91 个组合同时种于田间(2 次重复)进行产量测定。试验结果见表 5。

表5 甜玉米二环系测交种的含糖量及产量结果

组 合	生育 日数	含 糖 量		鲜果穗产量(kg/ha)	
		蔗液垂度	比CK增加	kg/ha	比对照增加
007×0077	98	20.9	173.5	19174.5	156.0
0052×0088	104	15.8	103.9	20710.5	168.5
美甜4号	100	15.2	100	12291.0	100

种如 007×0077, 0052×0088, 它们的鲜果穗产量为 17 174.5 公斤/公顷与 20 710.

公斤, 分别比美甜4号(吉美公司提供)增产 56% 与 68.5%, 居所有参试组合的前3名。

物工程后代做桥梁亲本筛选出甜玉米纯系及高产杂交组合, 国内外尚未见报道。该项研究为甜玉米组织培养与常规育种方法相结合, 快速筛选甜玉米自交系及杂交种开辟了一条新的途径。

参 考 文 献

- 1 母秋华等. 玉米生物技术育种的改革与研究. 吉林农业科学. 1988, (3), 15-18
- 2 孙敬之等. 超甜玉米原生体培养和植株再生. 植物学报. 1989, 31(12), 909-915
- 3 母秋华等. 甜玉米体细胞无性系(Clone)后代自交结实与同工酶分析. 北方7省2市第五届遗传学术讨论会文集. 1993, 50

STUDIES ON CELL AND TISSUE CULTURE AND ITS PROGENY BREEDING IN SUPER SWEET CORN

Mu Qiuhua et al.

(University of Agriculture and Animal Husbandry of PLA)

ABSTRACT

1. The anther Culture of F_1 generation crosses from the corn with high culture ability gene-type and sweet corn exists higher culture ability. The induction frequency of pollen embryos from those crosses can reach 20%.

2. By embryo culturing of sweet corn gene-types, we have built 2 somatic clones that can be cultured regeneratively for long time and can form regeneration plants, from which some progenies have been achieved by self-crossing. Isozyme analysis indicated that in regeneration plants from one clone, gene mutation could occur.

3. The super sweet corn inbreds with high combining ability can be selected when crosses of corn with general high culture ability and sweet corn are cultured.

Key Words: Super Sweet corn, Cell and tissue culture, Progeny breeding

表 6

培养力供体

花药及幼胚组织培

1)。同时用这一方法也

选育的基础材料。用这些二