

# 玉米花药培养及再生植株倍性鉴定

李春红 孟祥启 蒋有绎

(北京市植物细胞工程实验室,北京 100081)

**摘 要** 对影响玉米花药培养的几个因素及再生植株的倍性鉴定的结果表明,基因型是影响玉米花培效果的重要因素,杂交种的花培效果好于不稳定系,不稳定系又好于自交系。 $N_6$ 与正 $1_4$ 两种培养基都适于花药培养,但正 $1_4$ 培养基优于 $N_6$ 培养基,特别是液体培养基效果更好。花药接种的适宜时期为单核中期和后期,单核后期又稍好于单核中期,单核早期的花药不能诱导愈伤组织。单倍体与二倍体花粉植株之间叶片气孔保卫细胞长度差异极显著,长度小于 $29\mu m$ 的为单倍体,大于 $29\mu m$ 的为二倍体或多倍体,鉴定的准确性可达到95%,因此可利用测量气孔保卫细胞长度的方法鉴定花粉植株的倍性。

**关键词** 玉米 花药培养 再生植株 倍性 气孔保卫细胞

花药培养单倍体育种已在小麦、水稻中获得成功,目前不少育成的新品种在农业生产上得到了广泛应用<sup>[1,2]</sup>。玉米是异花授粉作物,通过常规育种选育一个自交系至少要5、6年的时间,有时还不能保证其纯合性;单倍体育种不仅能缩短育种年限,而且能提高纯度,扩大选择范围,因此也适用于玉米,具有极大的应用价值。70年代末至80年代初,不少学者对玉米花药培养中培养基成分及激素配比,试管苗移栽及加倍方法等进行了研究<sup>[3,4]</sup>,取得较好效果。但是由于玉米花药培养对基因型的依赖性很大,大多数基因型不能诱导愈伤组织和分化绿苗,花培效果较好的几个基因型诱导和分化频率也较低,从而限制了玉米花药单倍体育种这一技术在实践中的应用。目前通过单倍体育种途径育成的玉米品种很少。本文总结了几年来我们对玉米花药培养研究的情况,旨在为玉米花药培养单倍体育种的广泛应用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

本试验选用95份不同基因型的玉米材料,其中包括尖端齐、四自四等自交系5份;B丹/8112-1、双SC-1/B混-1等不稳定系24份;京早9号、(B丹×许C)等杂交种66份。试验材料由北京市农林科学院作物所玉米育种室及河北省唐山市农科所玉米育种组提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 花药培养 玉米分期播种在大田上,当植株长至大喇叭口期,从田间连同叶片拔出雄穗,带至室内镜检花粉粒发育状况,符合要求的材料用0.1%升汞消毒10min,无菌水冲洗3~4次后接种。诱导愈伤组织培养基为 $N_6$ 或正 $1_4$ <sup>[3]</sup>,附加2,4-D $2mg/L$ ,KT $1mg/L$ ,蔗糖

15%、活性炭 0.5%。分化绿苗培养基为  $N_6$  或正<sub>14</sub>, 附加 KT 2mg/L、IBA 0.5mg/L、蔗糖 5%、活性炭 0.5%。

1.2.2 倍性鉴定 剪取花粉植株的根尖, 0°C 冰浴 24h, 卡诺固定液固定 24h, 常规压片, 卡宝品红染色, 镜检记录染色体数目; 同时在同一植株上剪取一片叶, 撕下一小块下表皮, 直接装片, 镜检随机测量 30 个气孔保卫细胞长度, 取其平均值作为样本值, 用生物统计方法对试验数据进行处理。

## 2 试验结果

### 2.1 不同基因型玉米对花培效果的反应

本试验共接种 95 个基因型, 能诱导出愈伤组织的基因型有 50 个, 占 52.6%; 能分化出绿苗的基因型有 19 个, 占 20.0%; 仅有 14.7% 的基因型愈伤组织诱导率大于 1%; 9.5% 的基因型绿苗诱导率大于 0.1%。愈伤组织诱导率最高者(B 丹×许 C)为 10.16%, 最低者(三团四×(87001-1×混粉))为 0.02%; 绿苗诱导率最高者(B 丹×许 C)为 0.4%, 最低者(八张×8112、DB 丹×8112)为 0.02%。可见不同基因型之间诱导愈伤组织和分化绿苗的能力有很大差别(表 1), 说明基因型是影响玉米花培效果的一个重要因素。

从表 1 还可以看出自交系、不稳定系和杂交种这三种类型的材料花培效果的反应很不一样。杂交种的效果明显好于不稳定系和自交系, 很可能杂种优势也直接对花药培养产生明显的影响。

表 1 杂交种、不稳定系和自交系玉米花培效果比较

基 因 型	杂交种 66 个	不稳定系 24 个	自交系 5 个	总 计 95 个
出愈伤组织基因型的个数	42	7	1	50
出愈伤组织基因型的 %	63.64	29.16	20.00	52.63
出绿苗基因型的个数	16	3	0	19
出绿苗基因型的 %	24.24	12.50	0	20.00
出愈率大于 1% 基因型的个数	12	2	0	14
出愈率大于 1% 基因型的 %	18.18	8.33	0	14.74
绿苗诱导率大于 0.1% 基因型的个数	7	2	0	9
绿苗诱导率大于 0.1% 基因型的 %	10.61	8.33	0	9.47
最高出愈率 %	10.16	3.03	0.63	10.16
最高绿苗诱导率 %	0.40	0.27	0	0.40

特别令人感兴趣的是自交系尖端齐这一材料对幼胚培养反应很好(关于幼胚培养结果将另文报道), 但花药培养反应很差, 不产生愈伤组织和绿苗, 可见同一基因型在其花药培养和幼胚培养的反应之间并不存在相关性。

### 2.2 $N_6$ 与正<sub>14</sub>两种培养基的比较

本实验比较了  $N_6$  与正<sub>14</sub>两种基本培养基的固体型、液体型的效果。接种 7 个基因型, 每个基因型在这 4 种类型培养基上愈伤组织诱导频率表现很不一致(表 2), (5MCC×8112)对这 4 种培养基均无反应, 未能产生愈伤组织; (D 总×许 C)在  $N_6$  固体培养基上反应较好; (中黄 64×综 SC)、(中黄 05×许 C)两个基因型在  $N_6$  液体培养基上反应较好; 总的趋势是液体

型优于固体型,正<sub>14</sub>培养基优于N<sub>6</sub>培养基。

表2 不同基因型在不同培养基上出愈率比较

基 因 型	培 养 基 出 愈 率 (%)			
	N <sub>6</sub> 液体型	N <sub>6</sub> 固体型	正 <sub>14</sub> 液体型	正 <sub>14</sub> 固体型
5MCC×8112	0	0	0	0
D总×许C	0.83	7.40	2.79	6.25
中黄64×绿SC	7.00	0	1.71	0
B辽×B丹	0.50	0.33	0.48	0.45
中黄05×许C	6.25	1.20	9.67	1.00
CEE×478	1.49	0.23	5.23	1.49
许C/C717×7922	0.56	0	2.08	1.58

## 2.3 花粉粒不同发育时期对花培效果的影响

以正<sub>14</sub>液体培养基为基本培养基,A<sub>2</sub>和京早9号两个基因型为试材,将花粉粒发育时期分为早期(四分体分离以后到单核早期)、中期(单核中期,核基本位于中央,有小液泡)和晚期(单核靠边期,核已在一边,中央为大液泡)。分别对花粉粒处于这三个不同发育时期的花药进行接种,比较其愈伤组织诱导频率和绿苗诱导频率,结果见表3。A<sub>2</sub>和京早9号这两个基因型的实验结果相同,早期花药未能诱导出愈伤组织和绿苗,中期和晚期花药均有愈伤组织和绿苗产生,而晚期花药的接种效果更好。

表3 花粉粒不同发育时期的接种效果

基因型	发育时期	接种量(个)	愈伤组织(块)	出愈率(%)	绿苗(株)	绿苗诱导率(%)
A <sub>2</sub>	早	1080	0	0	0	0
	中	3060	131	4.28	10	0.33
	晚	2280	171	7.53	9	0.39
京早9号	早	600	0	0	0	0
	中	960	12	1.25	4	0.42
	晚	720	15	2.08	5	0.69

## 2.4 花粉植株染色体倍性的鉴定

对通过花药培养再生出的87株绿苗进行根尖染色体数目观察,结果是单倍体( $n=10$ )61株,占70.1%;二倍体( $2n=20$ )23株,占26.4%;三倍体( $3n=30$ )3株,占3.5%。同时对61株单倍体植株叶片气孔保卫细胞长度进行测量,余下的26株也逐株进行了测量(表4)结果表明,61株单倍体气孔保卫细胞长度分布范围为19.68~29.52 $\mu\text{m}$ ,平均长度为24.82 $\pm$ 1.96 $\mu\text{m}$ ,变异系数为7.91%,其次数的分布属于正态分布;23株二倍体气孔保卫细胞长度分布范围为30.92~41.27 $\mu\text{m}$ ,平均长度为35.66 $\pm$ 3.06 $\mu\text{m}$ ,变异系数为8.59%,其次数的分布基本属于正态分布。 $t$ 检验分析, $t=19.18>t_{0.01}=2.938$ ,说明单倍体与二倍体植株之间气孔保卫细胞长度差异极显著。统计结果置信度为95%时,单倍体的置信区间为20.90~28.74 $\mu\text{m}$ ,二倍体的置信区间为29.54~41.78 $\mu\text{m}$ 。因此可利用叶片气孔保卫细胞长度这一指标来鉴定再生植株的倍性,当长度小于29 $\mu\text{m}$ 时,可鉴定为单倍体,大于29 $\mu\text{m}$ 则为二倍体。

表 4 单倍体与二倍体植株气孔保卫细胞长度的分布

倍 性	组 距( $\mu\text{m}$ )	分布次数	频 率(%)
单倍体 ( $n=10$ )	18.98~20.38	2	3.28
	20.39~21.78	2	3.28
	21.79~23.18	10	16.39
	23.19~24.58	10	16.39
	24.59~25.98	18	29.51
	25.99~27.38	15	24.59
	27.39~28.79	3	4.92
	28.79~30.18	1	1.64
	$\Sigma$	51	100
二倍体 ( $2n=20$ )	29.88~31.95	2	8.70
	31.96~34.02	5	21.74
	34.03~36.09	7	30.43
	36.10~38.16	3	13.04
	38.17~40.23	4	17.39
	40.24~42.30	2	8.70
	$\Sigma$	23	100

另外,3株三倍体植株气孔保卫细胞长度分别为32.54、37.63和57.78 $\mu\text{m}$ 。其中2株的长度与二倍体相当,1株的长度较长,与二倍体的差别较大,因此用这一方法不能把二倍体和三倍体植株区分开。

### 3 讨论

#### 3.1 玉米花药培养

玉米花药培养的研究曾一度出现过高潮,但受到基因型限制的影响,未能使这一新技术得到广泛的应用。通过对有关文献的分析<sup>[5,6]</sup>,以及我们近年来的研

究实践发现在试验材料中具有农家品种八趟白、白马牙亲缘的基因型易产生愈伤组织和再生成苗,其原因尚不清楚。联系到上述杂交种的花培反应优于自交系,如果能把这些问题一一加以研究,有可能对基因型的限制起到突破的影响。

关于接种花药的花粉粒发育时期,有人认为最佳时期为单核中期<sup>[6]</sup>,有的认为单核中、晚期都适宜<sup>[7]</sup>。本试验结果表明单核中、晚期都适于花药培养,但最佳时期是单核晚期。我们认为花粉粒发育是一个连续过程,在一个雄穗的不同部位花药中花粉粒发育进程也不一致。在接种花药时,其花粉粒不可能完全处于同一发育时期,所以在接种中期花药时,不可避免地要接入早期花药。早期花药难以诱导出愈伤组织,从而降低了诱导频率;在接种晚期花药时,混入部分中期花药,不会影响诱导频率,因此最好是接花粉粒处于单核晚期的花药。

#### 3.2 用气孔保卫细胞长度鉴定花粉植株的倍性

在许多植物中都发现叶片气孔保卫细胞长度与植株染色体倍性有关,二倍体的细胞较长,单倍体的较短。现已将测量气孔保卫细胞长度这一方法成功地应用于鉴定小麦花粉植株的倍性<sup>[8,9]</sup>。

本试验采用根尖染色体压片法和气孔保卫细胞长度测量法平行鉴定。找出了玉米单倍体植株的鉴定标准是气孔保卫细胞长度不超过29 $\mu\text{m}$ ,其鉴定的精度可达到95%。采用这一方法不伤害植株根系,简单、快速、可靠,可以为秋水仙素进行染色体加倍提供依据。

至于为什么在再生植株中出现部分二倍体和三倍体的植株,是在分化过程中自然加倍的结果抑或是其他的原因,有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 胡道芬等. 冬小麦花粉孢子体的诱发及“京花1号”的育成. 中国农业科学, 1983, (1): 29~35
- 2 尹光初等. 用单倍体育种法育成水稻等新品种的研究. 中国科学, 1976, (2): 191~199
- 3 母秋华等. 介绍一种玉米花药培养基. 遗传, 1980, 2(4): 28
- 4 徐庆玉等. 提高玉米花粉植株移栽成活率的研究. 植物生理学通讯, 1981, (3): 18~21
- 5 母秋华等. 提高玉米花粉植株诱导频率的研究. 遗传, 1981, 3(4): 25~28
- 6 郭仲琛. 玉米花粉植株的诱导和雄核发育的研究. 植物学报, 1978, 20(3): 30~34
- 7 母秋华等. 玉米花药漂浮培养. 遗传, 1980, 2(5): 37~38
- 8 李春红等. 用气孔保卫细胞鉴定小麦花粉植株倍性方法的研究. 植物细胞工程与育种, 北京: 北京理工大学出版社, 1990, 394~400
- 9 中国农业科学院烟草研究所等. 单倍体育种资料集. 北京: 科学出版社, 1973, 26~28

## Anther Culture and Ploidy Identification of Regenerated Plants of Corn

Li Chunhong    Meng Xiangqi    Jiang Youyi

(Beijing Plant Cell Bioengineering Laboratory, Beijing 100081)

**Abstract** Some factors influencing on corn anther culture and the ploidy identification of regenerated plants of corn were studied. The results indicated that genotype was the main influencing factor. The response of anther culture in the unstable line was not as good as in the hybrid, but was better than in the self-line. Both  $N_6$  and Zheng<sub>14</sub> media were suitable for corn anther culture. The liquid medium was better than the solid medium. The inoculating period of anther was either the mid or the late stages of the uninucleate microspore. The late stage was better than the mid stage. Calli could not be induced at the early stage of the uninucleate microspore. The difference in length of the stoma guard cell reached the highly significant level between diploid and haploid regenerated plants. These plants with stoma guard cells shorter than 29  $\mu\text{m}$  were haploid ones, and those with stoma guard cells longer than 29  $\mu\text{m}$  were diploid or polyploid ones. The accuracy reached 95%. The method for measurement of the length of stoma guard cell could be used to identify ploidy.

**Key words:** Corn; Anther culture; Ploidy; Regenerated plants; Stoma guard cell