

玉米体细胞培养与抗病变异体筛选

周洪生

(中国农科院作物所, 北京 100081)

摘要 本文回顾了玉米体细胞培养的历史, 综述了抗病筛选的进展, 讨论了组织培养技术应用
于基础研究和育种实践中存在的问题并展望了应用前景。

关键词 玉米 体细胞培养 抗病性 变异体

玉米组织培养技术近十几年来发展十分迅速。目前, 已能从不同外植体诱导产生单倍体、二倍体、三倍体和非整倍体愈伤组织; 也可从单倍体、二倍体、非整倍体愈伤组织中再生植株。玉米愈伤组织的诱导、继代、植株再生是由外植体基因型、发育阶段、培养基以及每一培养阶段的环境因素控制的。组织培养过程可诱导产生变异, 因此已成功地从中选择到了许多变异。

1 玉米愈伤组织的诱导及植株再生

1949年, LaRue首次成功地诱导出甜玉米胚乳愈伤组织。1965年, Mascarenhas等首次诱导出二倍体组织培养物, 但不能再生植株。1975年, Green和Phillips以幼胚为外植体诱导出愈伤组织并从中分化出植株。目前, 已能从幼苗中胚轴(Harms, 1976)、成熟胚(Torne, 1980)、雄幼穗(Rhodes, 1986a)、中间芽组织(Lowe, 1985)、未成熟颖片(Suprasanna, 1986)、幼苗分生组织(Ahooowalia, 1986)、幼苗叶基基部(Chang, 1983)、未成熟花序(Reddy, 1986)诱导再生性愈伤组织。但幼胚是最易诱导且使用最多的外植体。玉米愈伤组织分为两类, 通常将生长速度慢、结构致密的愈伤组织称为“类型I”愈伤组织。这类愈伤将来主要通过器官发生途径再生植株。在“类型I”愈伤组织中可形成芽点, 也可产生盾片结构, 有时还有体细胞胚。Tomes认为芽点是由体细胞“前胚”提前萌发形成的, 故“类型I”愈伤以器官发生

型为主, 也有少量胚胎发生。这类致密的胚性愈伤很难继代保存, 因为愈伤组织内器官分化导致愈伤组织生长速度下降(Lu, 1982; Vasil, 1986)。生长较快的、易碎的、胚胎发生型愈伤组织称为“类型II”愈伤组织。玉米“类型II”愈伤最早是从A188“类型I”愈伤中分离得来的。它是由不同发育时期的胚状体组成的。这种胚状体据认为起源于单细胞(Green, 1982)。“类型II”愈伤是细胞培养、原生质体培养最理想的材料, 因为它的细胞分裂迅速, 非常容易继代。目前只在极少数基因型中诱导并选择到这种愈伤。这两类愈伤是人为的划分。实际上“类型I”愈伤是分生组织、胚状体和“类型II”愈伤组织的混合组织, 通过控制培养基成分和一定时间的培养选择, 从“类型I”中可选择到“类型II”愈伤。

愈伤组织的诱导力主要是由核基因控制的, 以加性效应为主。在某些材料中表现出显性和上位性效应(Strong, 1985)。一般至少有2对以上基因控制愈伤组织的诱导力(Willman, 1989)。细胞质对诱导力也有影响。Kamo等(1986)用A188×B73和B73×A188诱导愈伤组织, 发现B73×A188诱导愈伤组织和再生植株都比反交结果好。本文作者研究结果表明, 细胞质因子在不同组合或不同培养基上对诱导率均有影响。

培养基是影响诱导率的关键因素之一。Green和Phieeips(1975)首次诱导玉米体细胞再生植株所使用的是MS培养基。以后, Armstrong和Green(1985)证明N6培养基

附加L-脯氨酸可诱导A188“类型I”愈伤组织的胚胎发生,D-脯氨酸则无这种作用。Duncan(1985)报道过一种培养基,可大大提高诱导能力。本文作者认为,不同基因型要求不同培养基,没有一种培养基能适合所有基因型。因此在诱导不同基因型时,应使用不同培养基且附加不同浓度的激素,并根据生长状况随时调整。使用一种培养基培养多种基因型材料时,许多材料在诱导和继代过程中褐化死亡。原因是这种培养基不能诱导该种基因型材料的细胞分裂,而使细胞老化死亡。这是玉米组培的难点之一。另一个难点是,相当多的材料不能分化植株或经过较长时间的体外培养后失去分化能力。这种状态的愈伤组织无论加入何种细胞分裂素都很难分化成苗。对那些有分化能力但分化能力较低的愈伤组织,Duncan等(1988)用3.5mg/l 6-BA处理3~6天愈伤,然后把愈伤转入无任何激素的培养基中,结果大大提高植株分化力。加入AgNO₃也可轻微地提高分化力。Songstad(1988)试验表明,乙烯利抑制剂能有效地提高植株再生能力。有再生能力的愈伤组织,只要转入不含激素的培养基就可分化植株。经器官发生途径再生的植株还必须转入生根培养基,令其长出大量根,才能转入培养土中,而胚性愈伤组织再生植株的方法(Armstrong, 1985; Kamo, 1985)是先将含有未成熟体细胞胚的愈伤转入不含2,4-D而含6%蔗糖(或2%蔗糖+21.3g/l肌醇以提高渗透压)的N6培养基。经过约14天的培养,胚状体可成熟,然后转入MS培养基(2%蔗糖,不含激素),让其萌发成小植株,即可转入土中。

2 体细胞变异

组培可诱导细胞和再生植株发生染色体变异,Meadows(1982、1983)报道B73悬浮培养物只有50%二倍体细胞,其余则为16~32条染色体的细胞。A188×W22R-nj R-nj及其反交愈伤只有5%的正常分裂细胞,其

余全为非二倍体细胞(Mccoy, 1982),染色体变化范围为10~21条。Balzan(1978)观察到79%四倍体细胞并发现双着丝点、片段和后期桥。但Gresshoff报道(1973)一个二倍体玉米培养了一年仍保持染色体的稳定。

组培中体细胞所发生的变异可在植株水平上检查出来。目前已在组培后代中发现50多个单基因突变基因型,其中包括不透明、蚀刻、白冠、无胚种子,致死株、异常生长株、黄色苗、黄绿苗、浅绿苗、白化苗、细条纹叶、黄条纹叶、微绿苗,小株、矮株、胎萌、斑点叶和白轴变异(Edallo, 1981);还发现数量性状变异,如生活力、籽粒产量、含水量、散粉和抽丝期、倒伏、植株高度、穗长、粒行、粒重(Eechert, 1983)等变异。

再生植株染色体结构变异研究较多,McCoy和Phillips(1982)报道119个再生植株中有5株为细胞学异常株,其中3株为花粉育性嵌合体。Rhodes等(1986)报道W22Rr-xl×A188再生植株有12%易位、14%异配对(缺失或重复)、14%基因组加倍、5%附加或丢失染色体。Armstrong(1986)证明培养时间增加,后代发生变异的频率也相应增加,但Lee(1984)和Armstrong(1986)都观察到长时间培养比短时间培养减少了近50%嵌合体。或许早期发生的变异随时间加长逐渐形成了同质的愈伤组织。Benzion(1984)认为大多数突变发生在培养的早期,突变率可能整个培养过程都一样,突变或许随时间而积累下来。

Vasil(1983)认为体细胞胚胎发生是一个精确的形态发生过程,正常细胞比异常细胞形成体细胞胚的可能性大。那么“类型I”愈伤的再生植株会比“类型I”的再生植株含有较少的变异。但Armstrong(1986)从A188诱导两种愈伤“类型I”和“类型II”果出人意料,“类型I”再生植株比“类型II”再生植株还不稳定。这也许是与“类型I”愈伤的生长速度快有关,而与胚胎发生关系较小。

3 抗病变异体筛选

变异是选择的基础,组培中可自发发生多种变异,因此可供选择。加入某种毒素后,毒素则作为筛选抗该种毒素的细胞系的选择剂,小斑病菌 T 小种可专化性侵染 T 型胞质雄不育材料。Gengenbach 和 Green(1975)首先将致病真菌 T 小种植物毒加入 cms-T 型(感病)材料的愈伤组织中,经过几个月的筛选,获得了比原始材料抗毒能力强 40 倍的抗性愈伤,但并未获得再生植株。后来使用 A188 和 T 型胞质材料的杂交种诱导愈伤组织,并经过同样筛选,结果得到了抗病再生植株,但大多数植株及其子代恢复了育性。

郭丽娟等(1987)用 γ 射线和 EMS 处理玉米八趟白单倍体胚性细胞无性系,以玉米小斑病菌毒素过滤液为选择剂,获得了抗玉米小斑病菌的胚性细胞团。但没有关于再生植株的抗性和育性遗传方面的报道。

Jiankun Wei(魏建昆,1988)首先报道了小斑病 C 小种(*Bipolaris maydis race C*)在中国的存在。C 小种专化侵染 C 型胞质材料。因此筛选抗 C 小种变异体非常重要。梁根庆(北农大硕士论文,1989)将 C 小种毒素加到培养 C 型胞质杂交种愈伤组织培养基中,筛选出抗病变异体,其部分再生植株仍保持不育。他由此认为,C 型胞质材料的抗病基因性基因不连锁。本文作者使用 C 型不育胞质杂交种的胚性愈伤组织,以 C 小种的两个菌株 C7 和 C87-200 的混合毒素为选择剂,经过几个月从亚致死浓度到致死浓度的选择,获得了抗毒愈伤组织并再生出大量健壮植株,雌雄穗也生长正常。在 R_0 及 R_1 代中均存在较高频率的抗病不育株。表明抗小斑病 C 小种的基因和不育基因可能不完全连锁。

在筛选抗穗粒腐病突变体的研究方面,本文作者首次获得了抗串珠镰刀菌毒素能力比原来增强 10 倍以上的愈伤组织,所使用的材料是感穗粒腐病的自交系中系 Mo17 愈伤

组织。

Kuehnle 和 Early(1989)曾研究 cms-T 对杀虫剂 methomyl 的敏感性。Methomyl 可杀死 T 型胞质材料。在 T 型胞质的几个自交系和杂交种愈伤组织培养基中加入 0.6~0.7mM methomyl,选择出抗该杀虫剂的再生植株。但同时育性恢复并呈母性遗传。

线粒体 DNA 重复区异常易变。该区与 T 型雄性不育的恢复有关。cms-S 的愈伤组织 mtDNA 中 S_1 、 S_2 序列很不稳定,失去这些序列与愈伤组织形态变异相关(Gengenbach, 1981; Kemble, 1982; McNay, 1984)。Wise(1987)对组培筛选后代 mtDNA 的分析表明,mtDNA 限制性图谱有显著改变,T 细胞质 mtDNA 中 6.7kb 的 Xba 片段已经丢失。

4 问题与展望

玉米组织培养技术还没有在育种实践上起重要作用,其原因有以下几点:并非所有基因型材料都能诱导出愈伤组织,很多农艺性状优良的自交系和杂交种尚不能诱导出愈伤组织和再生植株;抗性的选择,有的在细胞水平上能表达,而在植株水平上不一定能稳定地表达;对某一性状的选择,会影响其它重要农艺性状,如产量、抗病、雄不育等。尽管存在很多问题与困难,但组织培养手段仍不失为基础研究和育种实践的强有力工具,可为育种工作提供并创新基础材料。在抗病、抗寒、抗除草剂、杀虫剂、耐盐、耐热、过量合成氨基酸及其它性状的选择上具有广阔的前景。

参 考 文 献

- [1]郭丽娟等,遗传学报,1987,14(5),355-362
- [2]Ahoowalia, B. S., 1986. In Abstr, 6 Int. Congr. plant Tissue Cell Cult Minneapol is MN4-8 Augnt Univ of Minnesota, Minneapolis p445.
- [3]Armstrong, C. L., et al., 1985, Maize Genet. Coop News lett(MNL), 59: 92-93.
- [4]Armstrong, C. L., 1986, ph D diss. Univ. of Minnerota, Minneapolis.
- [5]Armstrong C. L., et al., 1985, planta 164: 207-214.

- [6] Balzan, R. , 1978, *Caryologia*, 31 : 75—87.
- [7] Beckert, M. , et al. , 1983, *Agronomie*, 7 : 9—18.
- [8] Benzion, G. , 1984, ph D diss Univ. of Minnerota.
- [9] Chang, Y. F. , 1983, *plant Cell Rep.* 2: 183—185.
- [10] Duncan, D. R. , et al. , 1988, *Plant Cell Rep*, 7: 452—455.
- [11] Duncan, et al. , 1985, *planta*, 165: 322—332.
- [12] Gengenbach, B. G. , et al. , 1981, *Theor Appl Genet.* (TAG), 59: 157—167.
- [13] Gengenbach, B. G. , et al. , 1975, *Crop Sci.* 15: 645—649.
- [14] Green, C. E. , 1982, In *plant tissue Cult Maruzen Co.* Tokyo, Japan, 107—108.
- [15] Green, C. E. , et al. , 1975, *Crop Sci.* 15: 417—421.
- [16] Harms, C. T. , et al. , 1976, *Z. Pflanzenzuecht*, 77: 347—351.
- [17] Jiankun Wei, et al. , 1988, *Phytopathol*, 77: 550—554.
- [18] Kamo, K. K. , et al. , 1985, *Bot Gaz.* 146: 327—334.
- [19] Kamo, K. K. , et al. , 1986, *Plant Sci.* 45: 111—117.
- [20] Kemble, R. J. , et al. , 1982, *TAG.* , 62: 213—217.
- [21] Koehnle, A. R. , et al. , 1989, *TAG*, 78: 672—682.
- [22] Rue, C. D. , 1949, *Am. J. Bot.* , 36: 798.
- [23] Lee, M. , 1984. M. S. , thesis, Univ. of Minnesota.
- [24] Lowe, K. , et al. , 1985, *plant Sci*, 41: 125—132.
- [25] Lu, C. , et al. , 1982, *TAG*, 62: 109—112.
- [26] Mascarenhas, A. F. , et al. , 1965, In *Tissue Cult Junk publ.* The Hague, 283—291.
- [27] Mc Coy T. J. , et al. , 1982, *Can. J. Genet. Cytol*, 24: 559—565.
- [28] McNay, J. W. , et al. , 1984, *TAG.* , 67: 433—437.
- [29] Meadows, M. G. , 1982/1983, *Plant Sci. lett*, 28: 337—348.
- [30] Reddy, G. M. , 1986, In *Abstr. 6 Int Congy. plant Tissue Cell Cult.* Minneapolis, 444.
- [31] Rhodes, C. A. , et al. , 1986a, *Plant Sci.* 46: 225—232.
- [32] Rhodes, C. A. , et al. , 1986, *Can. J. Geret. Cytol*, 28: 374—384.
- [33] Suprasanna, P. K. , et al. , 1986, *TAG.* , 72: 120—122.
- [34] Torne, J. M. , et al. , 1980, *Plant Sci. lett*, 17: 339—344.
- [35] Vasil, J. K. , 1983, In *Genetic engineering eukaryotes*, plenum press New York, 233—252.
- [36] Vasil, V. , et al. , 1986, *Pleat physiol*, 124: 399—408.
- [37] Willman, M. R. , et al. , 1989, In *vitro cellular & Devel-
opmental Biology*, 25(1), 95—100.
- [38] Wise, P. R. , et al. , 1987, *Proc Nate, Acad. Sci. USA.* , 84: 2858—2862.