

# 提高玉米花培绿苗诱导频率 及染色体加倍效率的研究

姜丽君 宋建成 王守义 王启柏

(山东农业大学农学系, 泰安 271018)

## Studies on the improvement of microspore derived from plant production and chromosome doubling efficiency in maize anther culture

Jiang Lijun Song Jiancheng Wang Shouyi Wang Qibai

(Dept. of Agron., Shandong Agri. Univ., Taian 271018)

**Abstract:** The early transfer and early chromosome doubling techniques of microspore derived from pro-embryos were investigated in order to raise the anther culture efficiency of maize. In transferring the anthers containing pro-embryos to the differentiation medium two weeks after plating, the number of microspore derived from plantlets was 10 to 12 times as many as that of the traditional procedure. The percentage of fertile plants was significantly increased after the treatments of embryoids in the size of 1~2mm with colchicine solution (50mg/l) for 6 to 72 hours. The duration of 24 hours gave the optimum results, getting 71.7% of fertile plants in contrast to 32.3% of the control without significant effects on differentiation capacity. In Combining the early transfer and early chromosome doubling techniques, 1ml of colchicine in concentration of 50mg/l was added to each plate one day before the anther transfer, 58.3% of fertile plants and 37.4% of plants with seed set were obtained while those of control were 39.4% and 17.9% respectively. Furthermore, this treating procedure had decreased neither the embryoid production nor their differentiation rate.

**Key words:** Maize; Anther culture; Early transfer of pro-embryos; Early chromosome doubling

**摘要** 采用微胚早期转移技术, 将接种后2周的花药连同微胚一起转移到分化培养基, 可提高分化成苗率10~12倍, 且减轻了胚状体转移的麻烦。利用50mg/L的秋水仙碱溶液处理1~2mm的胚状体6~72小时, 可在一定范围内提高可育株率, 其中处理24小时效果最好, 在不降低分化成苗率的前提下, 可育株率由对照的32.3%提高到71.4%。将微胚早期转移与染色体早期加倍相结合, 在微胚转移前一天向原培养基中滴加1ml 50mg/L的秋水仙碱溶液, 在保持同样出胚率和分化率的基础上, 可育株率由39.4%提高到58.3%, 自交结实株率由17.9%提高到37.4%。

**关键词:** 玉米 花药培养 胚状体早期转移 分化率 染色体早期加倍

花药培养是玉米单倍体育种的重要途径, 但长期面临着培养效率低和染色体加倍困难等问题。近年来, 对提高胚状体诱导率方

收稿日期 1995-04-18  
本研究为农业部“八五”重点项目, 项目编号85(农)-  
11-01-02-13

面研究较多,进展较快。但幼苗分化率的提高则较困难,尤其是随着胚状体诱导率的大幅度提高,幼苗分化率迅速下降,Beckert 等(个人座谈)Pescitelli<sup>[1]</sup>等都曾将某些基因型的出愈率提高到 300%~500%,但幼苗诱导率却仍低于 5%。另外,由于玉米的雌雄异位、无分蘖,在幼苗期进行染色体加倍,很难使雌雄同时加倍,而常常以嵌合体的形式出现,难以获得自交后代,严重影响了花药培养技术在玉米育种实践中的应用。本文旨在探讨微胚早期转移及染色体早期加倍技术对玉米花药培养中幼苗诱导率及染色体加倍率的影响,以便较大幅度地提高培养效率,使该技术早日成为玉米育种的常规技术之一。

1 材料与方法

本研究所用基因型 HD5 和 HD7 系 Beckert 博士等通过花药培养所获得的加倍单倍体纯系,具有较高的花药培养能力,H99 和 Pa91 为具有一定花药培养能力的美国商用自交系,由 Petolino 博士提供,供试材料种植于温室或人工气候室(盆栽、营养液滴灌)。温室白天温度 $\leq 26^{\circ}\text{C}$ ,夜间温度 $\geq 18^{\circ}\text{C}$ ,光照 16 小时(100w/m<sup>2</sup> 高压钠气灯);人工气候室为 22 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$  恒温,空气相对湿度为 80 $\pm$ 5%,光照 16 小时(400w/m<sup>2</sup> 高压钠气灯)。花药培养正常程序根据 Dieu 和 Beckert<sup>[2]</sup>所述,将花药于诱导培养基(Go)上,培养至胚状体肉眼可见,然后转到分化培养基(Eo)至成苗。实验结果采用非参数分析方法中的 Friedman 测验,检验其差异显著性,并求得最小显著差异值或置信区间。

2 结果及分析

2.1 微胚早期转移技术

对接种后 2 周的花药(胚状体尚包在花药中),以三种方式进行转移:A 转到低糖诱导培养基(60g/L),胚状体脱出花药后再转移到正常分化培养基;B 转到高糖分化培养基(60g/L),胚状体脱出花药后再转入分化培养基;C 转到正常分化培养基至成

苗,以正常培养程序(接种四周以后,胚状体脱出花药时转到正常分化培养基)为对照。实验结果(表 1)表明:就胚状体诱导率而言,处理 A 与对照无显著差异,处理 B 和 C 则显著降低。然而,三个处理的幼苗诱导率则有大幅度的提高,其中处理 B 效果最好,处理 C 次之,分别为对照的 12 倍和 10 倍。

表 1 微胚早期转移对提高 HD5 $\times$ HD7 成苗数的效果

| 处 理             | CK   | A     | B     | C      |
|-----------------|------|-------|-------|--------|
| 接种花药数           | 450  | 425   | 450   | 450    |
| 胚状体诱导率(块/100花药) | 355a | 385a  | 260b  | 238b   |
| 绿苗诱导率(株/100花药)  | 3.8a | 19.7b | 48.5d | 38.75c |

\* 标有同一字母者差异不显著( $p=0.05$ ),以下表同。

根据以上结果,结合实验操作中的观察,我们认为,玉米小孢子的胚胎发生可分为诱导和成熟两个阶段,诱导阶段要求较高的蔗糖浓度,而较低的蔗糖浓度则有利于胚状体的发育成熟。因此在诱导阶段过后,转入低糖培养基上,便可促进胚状体的正常发育,为以后分化成苗奠定基础,这便是处理 A 比对照成苗率高的原因。在接种后不经成熟阶段直接转入分化培养基,可促进胚状体两极分化,使尚未完成成熟阶段的胚状体很快停止发育。因此,处理 B、C 的胚状体诱导率显著降低,但这种两极分化却减小了胚状体间的相互竞争,保证了存活胚状体的质量,从而大幅度提高了幼苗分化率和成苗数目。处理 C 的效果虽比处理 B 稍差,但因省去了胚状体转移的工序,可以大幅度提高工作效率,是进行大规模花药培养工作之理想的转移方式。

2.2 染色体早期加倍技术

将 1~2mm 的胚状体转移到含有 50mg/L 秋水仙碱的分化培养基上,经 0~72 小时处理后,再转到正常分化培养基上。结果表明(表 2):经过 6 小时和 24 小时处理后,对幼苗分化无不良影响,但处理时间继续加长则抑制了幼苗的分化,降低了成苗率。从成活植株的育性看,除 6 小时处理者无显著变

化外,其余处理都显著提高了可育株率,其中24小时处理后,可育株率由对照的32.3%提高到71.4%。尽管48小时和72小时处理后

仍保持较高的可育株率,但由于其幼苗分化率受到抑制,而没有显著增加可育株总数。所以处理24小时为本实验的最佳选择。

表2 秋水仙碱处理胚状体对提高植株可育性的效果

| 处理时间(小时) | 项目<br>胚状体数 | 产生幼苗 |          | 成活<br>植株数 | 雌雄均可育株 |           |
|----------|------------|------|----------|-----------|--------|-----------|
|          |            | 数目   | (%)      |           | 数目     | (%)       |
| 0        | 340        | 49   | 14.4±3.7 | 31        | 10     | 32.3±14.5 |
| 6        | 369        | 42   | 11.4±3.2 | 28        | 10     | 35.7±17.7 |
| 24       | 365        | 46   | 12.6±3.4 | 35        | 25     | 71.4±15.0 |
| 48       | 341        | 30   | 8.8±3.0  | 19        | 11     | 57.9±22.2 |
| 72       | 353        | 23   | 6.5±2.6  | 14        | 9      | 64.3±25.1 |

由此可见,在胚状体阶段进行染色体加倍具有很好的效果,这与 Wan<sup>[3]</sup>等对玉米愈伤组织的试验结果是一致的。分析其原因,我们认为:一是由于胚状体阶段器官分化尚未开始,后期的雌雄穗原基很可能来自该时期的同一个细胞,该细胞加倍后就可以使雌雄穗同时恢复可育性,而不是以嵌合体的形式存在;二是由于此时分生区无叶鞘包被,秋水仙碱可直接作用于分裂细胞,加倍效率较高。

然而,这种处理方式仍是以正常培养程序为基础的,胚状体转移的工作量很大,给大规模花药培养工作带来困难。为此,我们结合微胚早期转移技术,在花药接种后2周,向原培养基滴加1ml秋水仙碱溶液(50mg/L)以

滴加清水为对照。24小时后将花药转移到分化培养基上进行正常培养。调查结果表明(表3),该处理技术对两个基因型的花培能力均无不良影响,无论是花药反应率、胚状体诱导率还是幼苗诱导率,处理者与对照差异都未达显著水平,而却能显著提高诱导植株的可育性(表4),其中雌雄均可育株率和自交结实株率分别由对照的39.4%和17.9%提高到58.3%和37.4%。田间观察的结果还表明,处理后的可育植株雄穗发育比对照好,雄穗结粒现象较少,同时雌雄穗发育也更协调,在一定程度上减轻了离体培养所引起的发育不正常现象。所以自交结实率提高的幅度(2.09倍)比可育株率(1.5倍)更高。

表3 秋水仙碱处理微胚对花药培养效率的影响

| 基因型      | 处理项目 | 接种<br>花药数 | 出胚花药 |        | 胚状体   |       | 幼苗   |        |
|----------|------|-----------|------|--------|-------|-------|------|--------|
|          |      |           | 数目   | %      | 数目    | (%)   | 数目   | (%)    |
| HD5×HD7  | CK   | 875       | 545  | 62.3 a | 8302  | 949 a | 498  | 56.9 a |
|          | T    | 2375      | 1438 | 60.5 a | 22757 | 958 a | 1193 | 50.2 a |
| H99×Pa91 | CK   | 975       | 20   | 2.0 b  | 27    | 3 b   | 1    | 0.10 b |
|          | T    | 2875      | 81   | 2.8 b  | 127   | 4 b   | 10   | 0.35 b |

表4 秋水仙碱处理微胚的效果

| 处理项目 | 观察  |           | ♀、♂均可育植株  |        | 自交结实植株 |        |
|------|-----|-----------|-----------|--------|--------|--------|
|      | 植株数 | 数目 (%)    | 数目 (%)    | 数目 (%) | 数目 (%) | 数目 (%) |
| CK   | 71  | 28 39.4 a | 10 17.9 a |        |        |        |
| T    | 72  | 42 58.3 b | 25 37.4 b |        |        |        |

在本实验中,我们并没有按照传统的做法观察根尖染色体的数目。我们认为:玉米的人工加倍往往是区域性的,产生的嵌合体比例较大,较难使根尖、雌穗和雄穗同时加倍。因此,以雌雄均可育株为标准比染色体数目观察实用和可靠得多。 (下转第11页)

### 3 讨论

从本研究结果可以看出,我们在大幅度提高幼苗分化率和可育株率两个方面都取得一定进展,在维持原胚状体诱导率水平的前提下,可使玉米花药培养效率(自交结实株总数)提高20倍以上,接种100个花药,一般可获得20~30个加倍单倍体可育株,同时使花药培养的工作效率提高几十倍。

在微胚早期转移中,尽管使幼苗数提高10倍以上,但分化率仍保持在20%以下,这主要是由于转移后胚状体密度太高(每个 $\phi 55\text{mm}$ 的培养皿中高达100个以上),相互竞争强烈所致,降低胚状体密度后便可在更大范围内提高分化成苗率(结果已报道<sup>[4]</sup>)。该技术特别适于出愈率较高的基因型。

结合微胚早期转移技术进行染色体的早期加倍,无疑是一种较有意义的尝试,不仅加倍效率高,且减少了幼苗期加倍所需工时和成本。然而,本实验的加倍率仅达60~70%,

若适当增加秋水仙碱浓度,可能会进一步提高加倍效果。

应该指出的是,本研究是基于1~2个高反应率基因型,对其它基因型,尤其是低反应率材料的处理效果还有待进一步验证。

### 参 考 文 献

- [1] Pescitelli S. M. et al., 1989. High frequency androgenesis from isolated micropores of maize. *Plant Cell Report* 7: 673—676.
- [2] Dieu P. and Beckert M., 1986. Further studies of androgenetic embryo production and plant regeneration from in vitro cultured anthers in maize. *Maydica* 31: 245—259.
- [3] Wan Y. Widholm J. M., 1993. Anther culture of maize In: *plant Breeding Rev. John Wiley & sons* V. 11: 199—224.
- [4] Song J. C. et al., 1993. Efficient production of pollen embryoids and doubled—haploid plants via anther culture of maize *Curr. plant Sci. Biotechnol. Agric. kluwer Academic publishers*. V. 15: 357—360