

高培养力玉米种质资源及生物技术 后代保存利用的研究

母秋华 杜 娟 于树清 田立国 张新生 林振江
付作申 王金余 原正萍 贾玉峰 赵 明

(中国人民解放军农牧大学, 长春 130062)

Study on The Expanding of Maize Germplasm Resource with High Culture Ability, The Preserving and The Utility of Their Progenies

Mu Qiuhua et al.

(The University of Agricultural and Animal Sciences of PLA, Changchun 130062)

Abstract: 1. Some new genotypes with high culture ability which came from the crossing between bridge parents with high culture ability and other germplasms have been created (not less than 10 percent in culture ability), 50 kinds of them have been collected, edited and preserved in national warehouse.

2. For the first time it has been demonstrated that pollen embryo with anther wall is tolerant to low temperature through the experiment and some pure lines have been applied for breeding.

3. Four clonal strains have been set up through pollen and embryo culture, including strain Je6, Sweet Corn(Zea Mays) pure line 201 etc. Je6 has been used as the receiver of the Gus gene.

4. 70 kinds of biotechnologically pure lines were collared with bags in the field or preserved in dry condition. The combining ability of lines with excellent spikes have been tested, the cross Shuang Biao × J818 has been used in the province area experiment, Jundang 91049 has been carried out for preparatory experiment. The production of 12473.7 kg/h and 16.9% higher than in Sidan 19.

Key words: High culture ability; Zea Mays; Germplasm; Biotechnology; Preserving and using

摘要 1. 通过高培养力材料为桥梁亲本与高蛋白、高糖、高配合力等种质杂交创造了一批培养高于10%的基因型重组材料。从中筛选出50份进行整理、编目并在国家库长期保存。

2. 对玉米的细胞、组织及种质资源进行低温、超低温及不同保存条件的试验,首次证明带有药壁花粉胚耐低温保存,并获得了低温保存的纯系用于育种实践。

3. 通过花粉及幼胚培养建立了四个无性繁殖系,获得了Je6 clone,甜玉米 clone 201 纯系。Je6 等三个系已用作Gus基因转移的受体。

4. 对获得的70份生物工程纯系分期进行了田间套袋和干燥保存,同时对优良纯系进行了配合力测定,双B早×吉818参加了吉林省区域试验,军单91049参加了省预备试验,产量高达12473.7 kg/hm²,比四单19增产16.9%,列11份参试材料的第一名。

关键词 高培养力 玉米 种质资源 生物技术后代 保存与利用

玉米是世界上主要粮食作物,采用生物技术改良作物品质与抗性的研究是近年来发展迅速的一门新兴科学。用细胞组织培养等离体遗传操作改良玉米的研究已有三十多年的历史,但由于玉米受基因型影响较大,一些品质优良高配合力基因型难以保存。为避免丢失,我们从1989年以来,开展了高培养力种质资源的拓宽和后代保存利用的研究,取得了突破性进展。

1 材料和方法

- 1.1 用于基因型重组的材料是高培养力的单三 91CL10 等桥梁亲本和高配合力的自 330、M14、M17、高蛋白、高糖玉米材料杂交共重组 146 份基因型。
- 1.2 将上述供体材料在单核中期进行花药培养,部分材料在授粉 12 天进行幼胚培养,以便测定其花粉胚、胚性细胞团 clone 的发生力及绿苗再生能力的大小。
- 1.3 用正 7、正 14^[1]附加 2、4-D2mg/L(单位下同)、6BA1 NAA1、CH500、作诱导培养基;用 8114^[2]附 6BA 或 KT1-2、NAA0.5、1AA0.5 作分化或继代培养基。
- 1.4 用低温和干燥保存的材料是花粉胚、带药壁的花粉胚、幼龄的体细胞胚、clone、原生质体 clone、花粉、种子等。将上述材料分别放到 1~4℃的低温冰箱、6~12℃的光照培养

箱、12~14℃的冷室(自然光照)、-196℃的液氮罐、装有干燥剂的大型干燥器中,分别保存 4 个月至 6 年。

1.5 细胞、组织和 clone 培养用再生绿苗植于温室或田间,种子及花粉纯系的测交种种于大田,行长 5m,2-3 行区,1-3 次重复,田间管理同一般大田。

2 结果与分析

2.1 高培养力玉米种质资源的拓宽及培养力的测定与保存

经中外玉米生物工程工作者的大量研究证明,种质资源的基础研究是试验成败的关键。近十几年来,我们在筛选高培养力玉米品种资源的基础上,根据育种目标,选用高配合力、高蛋白、高糖的优良品系与高培养力的基因型杂交共组配了 146 个重组基因型。

每年将这些基因型重组材料按穗行进行田间观察与品质测定。将性状优良的材料用作花药和幼胚培养,通过绿苗分化率来确定培养力的大小,从中筛选出培养力 10%以上的材料或有价值的基因型 50 份进行整理、编目与长期保存。

2.1.1 不同基因型重组材料在正 7 培养基上花药培养结果比较。

近几年来共培养 120 个供体材料,80%可形成花粉胚,但不同重组基因型反应不同。

表 1 不同重组基因型花粉胚形成能力的比较

材料代号	重组类型	接种花药数	花粉胚形成数	诱导率	花粉胚/花药
P1B79	高培养力基因型重组	1700	414		24.35
P1 白 2	高培养力基因型重组	850	531		62.6
LP1091	高培养力基因型重组	450	198		44.0
yanyll 甜 9049	甜玉米重组基因型	250	124		49.0
yan5 甜 2	甜玉米重组基因型	400	104		26.0
yan6 甜 2	甜玉米重组基因型	200	27		13.5
P102	高赖氨酸重组基因型	450	21		4.67
P1330	高赖氨酸重组基因型	400	16		4.0

注:培养基正 7+2.4--D2+6BA1+NAA0.5+CH500

从表 1 的结果可见,用高培养力的基因型为桥梁亲本分别与生产上高配合力自交系

或甜玉米材料杂交,使有利基因型重组都可以使花粉胚的形成能力大幅度提高,与高赖

氨酸含量的玉米基因型重组材料杂交也可获得花粉胚,三者花粉的最高诱导率分别为62.6%、49.0%与4.67%,由此可见,在本试验中培养力的大小是:高培养力重组基因型>甜玉米重组基因型>高赖氨酸重组基因型。

2.1.2 对干燥保存和重组基因型资源进行培养力与种子发芽力的测定

1992年将干燥保存6年的种子105份种于田间,种子出苗后7天调查种子的出苗情况,在适宜时期进行花药和幼胚培养,测定其培养力大小。

表 2 干燥保存 6 年的供体材料出苗与培养力情况

材料代号	播种数	出苗率%	接种 花药数	形成花 粉胚数	花粉胚 诱导率%	接幼 胚数	胚性愈伤		体细胞 克隆
							(个)	%	
1028	100	47	300	19	6.33	80	72	90	+
1026	100	63	450	198	44.0	80	68	85	+
1053	100	43	150	19	8.67				
1054	100	75	400	14	8.50				
1063	100	49	100	4	4.0	70	60	86	
1105	100	68	400	18	4.50				

结果证明用大型干燥器保存的种子6年后发芽率仍可达到43%~75%,花粉胚的形成力最高可达44%,幼胚培养胚性愈伤组织数可达90%,同时可形成继代培养10次以上并不断再生绿苗的体细胞 clone、如1026、1028形成的体细胞 clone 和再生绿苗的能力很强,是突变体筛选和基因转移良好供体材料(详见表1);从本次和以往的试验中发现,长期保存的重组基因型发芽力有所降低,花粉胚形成也减弱,如1028保存两年时花粉胚的诱导率达131%,6年后花粉胚的发生频率仅为44%,其他材料也有类似情况,这可能与保存过程中酶活性降低有关。

2.1.3 玉米细胞、组织低温、超低温保存

近年来,随着植物离体遗传操作的进展,低温保存植物的细胞,组织种质资源的研究受到遗传育种者的普遍重视。但玉米生物技术育种遇到了花粉植株越冬难和花期不遇的问题,严重影响了玉米细胞育种的应用。为了克服这一困难,我们将玉米花粉、花粉胚性细胞系(clone)分别放在3℃、12℃光照培养箱,12~15℃冷室(自然光照)和-196℃(液氮)条件下进行低温冷藏试验,取得了如下进展:

2.1.3.1 1989年7月将单核早期的玉米花药接种在8114+2.4-D0.2mg/L(单位下同)+6BA1.5+NAA0.5+Su15%的半固体培养基上,待花粉胚萌发后,直接放在12~15℃的光照培养箱和冷室内的上述培养基上进行长期保存。保存时间可达7~8个月。在冷室保存的效果较好。保存397个带有药壁的花粉胚。在自然低温保存6个月后,转移到8114蔗糖含量3%的分化培养基上,诱导绿苗分化(温度25℃±2℃)。3周后,分化绿苗31株。1990年4月在春季适宜的季节移栽到温室,成活率为35.48%。8株结实,三株自交结实,同年而未经冷藏的花粉胚再生植株,冬季移栽成活率仅20%。且只获得了异交结实果穗。目前有二个经过冷藏花粉胚再生的花粉纯系配制成15个测交种。1993年田间测产结果:双B晚×冷系4,每公顷产量为11616kg,表现出明显的杂交优势。

2.1.3.2 1991年~1992年在3℃光照培养箱内,采用8114液体培养基(成份同上)。将浅层培养的花粉 clone 及原生质体 clone 悬浮培养细胞(100ml三角瓶+0.3g细胞)进行低温冷藏,冷藏4个月后,培养基细胞干燥,当把这些细胞转移到半固体培养

基上($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)迅速恢复了生长,到目前 Z4 原生质体 clone 已继代 24 次。

2.1.3.3 用 8114 培养基(成份同上)加二甲基亚风 4%、甘油 5%、蔗糖 9% 的液体培养基,将玉米 clone je68、24 及花粉胚(带或不带药壁二种)和经 35°C 干燥的新鲜玉米花粉放到封闭的指形管里,在 -196°C 液氮条件下冷藏。在放入液氮前缓慢降温($2^{\circ}\text{C}/\text{min}$)。保存后在 $31-10^{\circ}\text{C}$ 温水浴中快速化冻,试验结果发现(1)花粉 clone 保存 4 个月后,经继代培养二次后死亡。(2)带药壁的花粉胚少部分恢复生长,在分化培养基上分化出绿芽。(3)超低温保存的花粉,在 2-3 周内完好生活力,两种花粉经测交后,均获得结实后代。

2.2 玉米生物技术后代的应用及纯系测交种比较

2.2.1 玉米高培养力重组基因型的利用

2.2.1.1 优良突变体的筛选

通过玉米的组织 and 细胞培养不仅可以缩短玉米纯系的培养时间,同时可通过 clone 的建立进行优良突变体的筛选。近几年来我们在首次获得玉米花粉 clone 纯系的基础上,于 1992 年又建立了 je68 含有甜玉米基因的 clone,经继代培养 16 次后获得了一万株再生绿苗。C8906a 获得自交结实植株,通过田间观察同工酶的测定结果表明同一 clone 再生植株在数量和质量性状上存在一定差异,同时也可产生基因、分子、染色体水平上的变异。⁽³⁾⁽⁵⁾

通过试管苗的筛选及田间选择,已筛选出含糖 20% 的 clone201 甜玉米纯系及 clone-10-02 具有抗倒伏,双穗率高的优良突变性状的无性繁殖纯系,经试管固体、悬浮培养筛选出 93clone2 花粉 clone。

2.2.1.2 作二环系的优良基础材料。

为了拓宽玉米供体材料,丰富其遗传基础,近几年来我们在重组基因型时,除注意其培养力外还特别重视亲本的配合力、抗逆性

和适应性及遗传背景。一些基因型重组材料获得的 70 个纯系 80% 应用于育种实践,同时有 20 个基因型重组的甜玉米供体材料进行了二环系的选育,其中甜系 4012 含糖量 18%,特殊配合力很高,居甜玉米果穗产量鉴定的第一位。产量 $16065\text{kg}/\text{hm}^2$,比对照种美甜 4 号增产 31.5%⁽⁴⁾。

2.2.1.3 玉米是原生质体培养、基因转移的理想受体。

玉米是重要的禾本科植物,从 80 年代起各国科学家对玉米原生质体培养及转基因植物方面的研究都非常重视,但由于缺少优良基因型受体材料而使研究进展缓慢。经过几年研究我们筛选出 yan5, yan5yll 等优良基因型经花药及幼胚培养可形成易分散的胚性愈伤组织或由芽原基组成的胚性细胞团,玉米花粉胚 clone2 经振荡培养建立起悬浮培养细胞系,玉米原生质体培养已成功。目前又用作基因转移的受体,进行 GUS 基因转移的协作攻关(与中科院遗传所),以建立理想的玉米基因转化系统。

2.2.2 玉米生物技术纯系配合力测定及产量比较。

2.2.2.1 配合力的测定:通过生物技术共获得 135 个纯系除干燥保存外隔年按穗行种于田间,在观察主要农艺性状的基础上进行配合力的测定,中早熟材料如双 B 早、e502GS 等用吉 818、M017 等测定,晚熟材料双 B 晚、美 QB7m 等分别用中引 7、340 等作测交种进行一般和特殊配合力测定。几年来从上述材料中筛选出 70 份优良生物技术纯系作亲本,分别同 M017、340 等做杂交,5 年中共配制出 671 份测交种,按年度进行产量观察→产量鉴定→产量比较→区域试验,除测定产量性状外,对 14 种主要农艺性状也进行了考察和鉴定,同时将 70 份有利用价值的纯系进行了进一步整理与编目。

2.2.2.2 测交种产量比较与优良单交种区域试验。

用生物技术获得纯系的最终目的是配制

出高产、质佳、抗逆性强的优良组合以便生产上应用。

2.2.2.2.1 1994 年单交种产量比较。

1990~1994 年通过田间产量观察和鉴定的组合共 671 个,增产 10%以上的进行产量比较试验同时对 16 种农艺性状进行考察和鉴定:1994 年玉米杂交组合田间产量比较见表 3。

由此可见,生物技术纯系配制的组合具有很大潜力。330re、90 纯 59 孤、双 B 晚、3rmb 等都是生物技术纯系,它们所配制的杂交组合,产量高,抗逆性强,如美 QB7×330re 经过三年的异地试种平均比当地对照种增产 10%。5003×90 纯 59 孤经过三年的产量观察比较试验,年年增产,1994 年比对照种四

单 19 增产 26.5%,比吉单 159 增产 11.1%,是一个理想的晚熟杂交组合。

2.2.2.2.2 省地区域试验。

中早熟组合双 B 早×吉 818,是 1989 年配制的杂交种,经三年田间测定和省区域试验证明,该组合具有抗倒、适应性强、产量高的特点。1992~1993 年继续参加试验示范。平均 7801kg/hm² 比对照种增产 10.4%,军单 91049 是平展型大穗高产中型种,1993 年在前两年产量比较试验的基础上参加了吉林省预备区域试验,7 个点平均产量 12473.7kg/hm²,比对照种四单 19 增产 16.9%,最高增产 39.2%,居 11 个参试材料的第一位,详见表 4。

表 3 1994 年 玉 米 杂 交 组 合 产 量 比 较

杂交组合	亩 产 量 (kg/hm ²)			均数 (kg)	与对照 1 %	与对照 2 %
	I	Ⅰ	Ⅱ			
美 QB7×330re	8788.5	10606.5	9697.5	9697.5	103.8	
5003×3rmb	10101.0	8788.5	9192.0	9360.0	100.2	
5003×90 纯 59 孤	13636.5	11212.5	10606.5	11818.5	126.5	111.1
美 BC87-2×双 B 晚	8182.5	11110.5	8788.5	9360.0	100.2	
CK1 四单 19	8080.5	10606.5	9343.5	9343.5		
CK2 吉单 159	8889.0	12121.5	10909.5	10639.5		

表 4 1993 年 玉 米 杂 交 组 合 吉 林 省 预 备 试 验

试验地点	平均每公顷产量(kg)	比对照种四单 19 增产%
长春市农科院	12067.3	+39.2
农牧大学	14141.4	+16.7
吉林省农科院	12488.8	+15.0
四平市农科院	11711.1	+15.8
吉林市农科院	14070.0	+29.8
通化市农科院	11777.0	+12.7
白城市农科院	11060.6	-5.1
平 均	12473.7	+16.9

3 结 语

玉米组织培养 30 年代西方就有人开始研究。60—70 年代,美国的 Green 在玉米幼胚培养中经过大量品种、品系的筛选,唯有

A118 自交系易成功。1975 年中国科学家从玉米八趟白中首次获得了玉米花粉植株,十几年来玉米组织和幼胚培养一直受到基因型狭窄的限制。1979 年作者首次发现有花培后代为亲本的桥接组合可以大幅度提高诱导频

率并开始了重组基因型的研究,组配的单三91最高花粉胚的产量可达30%。尔后该基因型先后传入美国、法国、罗马尼亚、意大利等国,使他们玉米组织培养有了突破性进展。一位美国生物学家说“自从东方的玉米基因型(白91系单三91)传到西方,玉米单倍体育种才有了起色”。由此可见深入研究玉米生物工程的供体材料在促进中外玉米生物技术育种的绿色革命中具有相当重要的地位。十几年来我们有5000份次的花粉clone重组基因型、花粉纯系、组合提供给美国、中科院植物所、遗传所、北京大学及河北师大、东北师大等单位,在形态发生抗病突变体的筛选,原生质体培养,基因转移等项研究中取得了突破性进展。

在玉米生物技术研究方面做出应有的贡献。

献。

但由于我们的条件水平所限,尚有许多问题有待深入研究。

参 考 文 献

- 1 母秋华等.提高玉米花粉植株诱导频率的研究.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 母秋华等.玉米复合生物技术育种的研究 1994 年全国植物遗传及应用学术讨论会文集.玉米科学 1994(4)
 - 4 母秋华、张新生、田立国、杜娟等.甜玉米组织细胞培养及后代育种.吉林农业科学,1994年,(4)
 - 5 母秋华等.超甜玉米体细胞无性系后代杂交结实及同工酶分析.1993年全国七省二市遗传学术讨论会文集.
- * 参加该项研究工作的还有:王平、陶丹、杨海军、杨红、刘万巨、武凯、温玉梅、于香云、常太和、孙勇如(中科院遗传所)。

《天津农业科学》1997 年征订启事

《天津农业科学》是由天津市农科院信息研究所主办的综合性学术期刊。主要报道农林、植保、土肥、园艺、畜牧兽医、农产品贮藏保鲜加工、水产、花卉等方面的基础理论科研论文,试验报告、实用技术,并设立专栏刊登农业区划、科研管理等软科学论文和专题综述类文章。适合各级农业科技人员、农技推广人员、农业行政管理干部、农业大中专院校师生和广大农村种植养殖专业户等参阅。

本刊为季刊,逢季末月出版,每期定价 3.00 元,全年 12.00 元,国内统一刊号,CN12-1256/S。本刊自办征订发行,交换单位除外。欲订购者请将订购款从银行转帐(请勿在信内夹寄现金)汇至:天津市南开区航天道 26 号,天津市农科院信息研究所《天津农业科学》编辑部(开户银行:天津农行白堤路分理处,帐号:394-5-801000420,单位:天津市农科院信息研究所),邮政编码:300192。