

玉米胚性愈伤组织的诱导及其植株再生的研究

谢友菊 戴景瑞 郝 琨

(北京农业大学)

近年来,利用体细胞无性系变异进行作物改良,已引起各国生物学家的极大关注。所谓体细胞无性系变异就是指在组织培养过程中获得的再生植株具有与其亲本植株不同特征特性的现象。这种未经过特殊选择压力的筛选而形成的遗传变异可能是一种随机突变,其机理仍不十分清楚。尽管如此,目前已利用这种方法得到了优良的水稻品系、抗晚疫病的马铃薯品系和抗眼斑病的甘蔗品系等^[1],在玉米上也得到了抗除草剂的变异体,而且证明这些特性是稳定遗传的^[2]。

鉴于上述原因,用玉米不同器官作外植体进行组织培养的研究显得格外重要,建立有效的组织培养系统,从中获得大量再生植株是上述工作的首要前提。

1975年 Green 和 Phillips 首次报道从玉米未成熟胚培养出愈伤组织,并成功地获得了再生植株^[6]。此后,用玉米其他部位作外植体也取得了同样的成功^[10,2,12,3];在另外的一些报道中,已获得可以长期保存的胚性愈伤组织^[3,4,11]。1983年 Lu 等用高糖的 MS 培养基对若干杂种开放授粉的幼胚进行了培养,在所用的材料中都无例外地获得了高频率的胚性愈伤组织,并再生了植株^[8]。本文的目的在于探讨 Lu 的“高糖法”,在控制授粉情况下,对自交系胚性愈伤组织诱导及植株再生的效果。

材 料 和 方 法

按一定要求选择 29 个国内外玉米自交系,1985 年春播种在北京郊区。所用的授粉方式为控制授粉,即自交与姐妹交。在无菌条件下,

将授粉后十多天的 1—2mm 幼胚取出,接种在含有 1mg/l 2, 4-D 的 12% 高糖 MS 培养基上,每系测定 60—80 个幼胚,暗培养在 27℃ 恒温条件下。约两周后,按特定的标准(见结果部分)观察和统计胚性愈伤组织发生情况,用产生胚性愈伤组织的胚数和接种胚数计算诱导频率(%)。1—2 周后复查,以最高百分比为准,衡量各系产生胚性愈伤组织的能力大小。

胚性愈伤组织需每两周转移一次,当胚性愈伤组织上产生了胚状体并发芽,继而胚芽鞘伸长到 1—2cm 时,将单个胚状体转移到含有 2% 蔗糖的 1/2MS 培养基上,置 27—30℃ 16 小时光照(约为 2000 勒克司)8 小时黑暗的条件下培养,最终形成绿色而又根系发达的小植株。以小植株数和具有胚性愈伤组织的幼胚数计算各系的植株再生频率(%)。我们的方法与 Lu 法的区别是,采用 2% 蔗糖的 1/2MS 培养基直接再生植株,省去他的最后一种培养基,从而简化了再生植株的步骤。当植株长到 14—24cm 高时,移到土和虾石为 1:1 的花盆中,注意掌握合适的湿度,成活后移到田里,生长直至成熟。

电镜扫描图象用日本 Hitachi S-450 扫描电子显微镜拍摄,电镜样品的制备按常规方法进行。

结 果 和 讨 论

一些系的幼胚在接种后 10 天左右即长出白色、不透明、结构致密的胚性愈伤组织。最初

Xie Youju et al.: Studies on Induction of Embryonic in Maize and Regeneration of its Plantlet

本文于 1986 年 1 月 24 日收到。

出现在盾片胚根鞘一端的边缘,形如褶皱,以后逐渐扩大(图 1,图 2)。这种胚性愈伤组织生长缓慢。在接种后的 30—45 天内,一些系的胚性愈伤组织逐渐分化成胚状体并发芽,继而胚状体的胚芽鞘伸长,达到肉眼明显可见的程度。图 3 是从胚性愈伤组织上取下的单个体细胞胚状体,从图 4 可以清楚看到从胚性愈伤组织里的胚状体长出的胚芽鞘,通常是 1 个盾片具有 1 个胚芽鞘,但也有 1 个盾片上含有几个胚芽鞘的情况(图 5)。大多数自交系的胚状体产生幼苗的时间是在接种后的 30—45 天。74-258-9 自交系特殊,在接种后的 3 个月还有胚状体出现,仍可进行植株再生。大部分系的愈伤组织在接种两个多月后,由于分化出大量的根而无法长期保存。图 6 是移栽成活的再生植株。

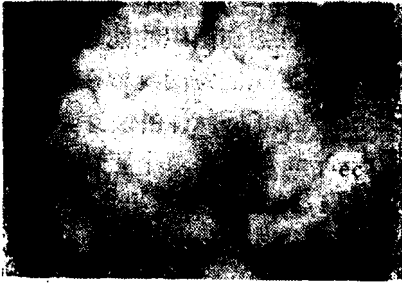


图 1 74-258-9 的胚性愈伤组织(×14)



图 2 胚性愈伤组织的电镜扫描图象

供试的 29 个自交系,除其中 13 个系未产生任何胚性愈伤组织外,16 个产生胚性愈伤组织的自交系,依胚性愈伤组织诱导频率的高低为序列于表 1。从表 1 看出, B84 和 Pa 762 具有最高的胚性愈伤组织诱导频率,其他 14 个系的诱导频率逐渐递减,直到自 330,仅有 1.4% 的诱导频率,ω23 等 13 个系未产生任何胚性愈

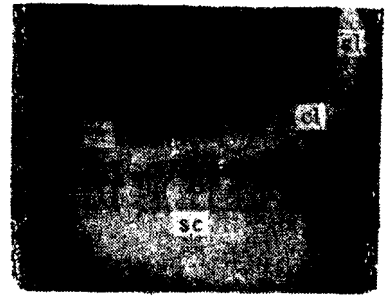


图 3 74-258-9 的体细胞胚状体(×14)
(cr: 胚根鞘 cl: 胚芽鞘 sc: 盾片)

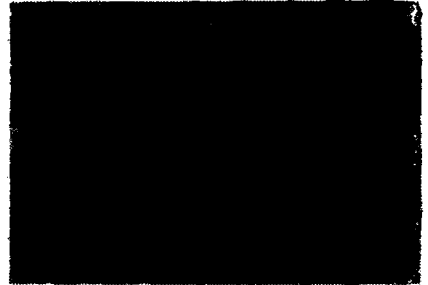


图 4 从胚性愈伤组织里的胚状体长出的胚芽鞘(74-258-9)

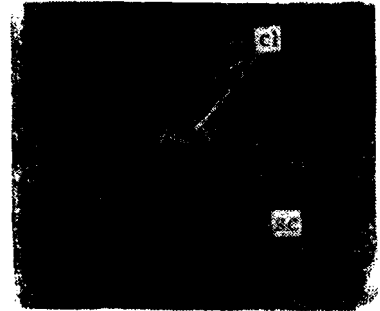


图 5 一个盾片上含有几个胚芽鞘的电镜扫描图象
(cl: 胚芽鞘 sc: 盾片)

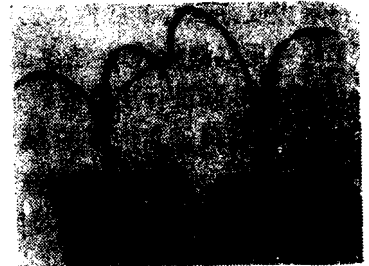


图 6 移栽成活的再生植株

伤组织,表明自交系的基因型对胚性愈伤组织的诱导有着极为重要的影响。Lu 的高糖 MS 培养基,并不能克服自交系基因型差别所带来的影响。

表1 29个玉米自交系的胚性愈伤组织诱导频率和植株再生频率

系名	胚性愈伤组织诱导频率(%)	植株再生频率(%)
B84	95	8.7
Pa762	82.1	0
74-258-9	45.2	41.6
齐31	28	42.8
Syn5	26.6	0
Va35	22.8	15.3
Syn63	22.8	46.1
莱1029	20	52.9
获白	16.9	10
Va94	11.2	50
K64	9.8	0
黄204	6.7	0
A188	4.9	0
白金03	3.0	33.3
中白05	2.7	0
自330	1.4	0
ω23等13个系	0	0

从表1还可看出,74-258-9、齐31、Syn63、莱1029、Va94和白金03等6个系有较高的植株再生频率,但是其中只有74-258-9、齐31两系同时还具有较高的胚性愈伤组织诱导频率;Va94、白金03等虽然植株再生频率高,但胚性愈伤组织诱导频率很低;Pa762却相反,胚性愈伤组织的诱导频率高,然而未能再生出植株。这些结果表明,胚性愈伤组织进一步分化成体细胞胚状体并再生植株,也是由基因型决定的;而胚性愈伤组织的诱导、体细胞胚状体的产生和植株再生是分别具有特殊要求的不同过程。特定的组培系统可能满足某种基因型的某一过程的需要而不能满足另一过程的需要,因而出现上述结果。

如果从利用无性系变异改良玉米自交系的角度出发,显然这一组培系统仅适用于74-258-9、齐31、综63、莱1029等系。因为他们具有较高或一定程度的胚性愈伤组织诱导频率和植株

再生频率,容易获得大量再生植株,以供筛选和鉴定。

从本文的结果看出, Lu的“高糖法”仅能使少数自交系产生一定频率的胚性愈伤组织和再生植株,看来,他们的方法更实用于杂交种和开放授粉的条件。因此这种方法对于改良自交系有一定的局限性。考虑到利用自交系在控制授粉情况下获得的幼胚作为组培的外植体,对快速改良自交系具有十分重要的意义,因此进一步探讨适于这种目的的培养系统,如一种培养基适合多种自交系或一种培养基适合某一特定自交系仍然是值得注意的研究课题。最近, Duncan等报道,用他们的特殊培养系统,可使90%以上的玉米自交系产生有再生能力的愈伤组织^[5],或许这将是这方面的一个突破。

参 考 文 献

- [1] 许智宏: 1985. 遗传, 7(6): 37-40.
- [2] 吴家道: 1982. 安徽农业科学, 4: 21-23.
- [3] 谢友菊等: 1986. 遗传学报, 13(2): 113-119.
- [4] Armstrong, C. L. and C. E. Green: 1984. *Planta*, 164: 207-214.
- [5] Duncan, D. R., M. E. Williams, B. E. Zehr and J. M. Widholm: 1985. *Planta*, 165: 322-332.
- [6] Green, C. E. and R. L. Phillips: 1975. *Crop Science*, 15: 417-421.
- [7] Lu, C., I. K. Vasil and P. Ozias-Akins: 1982. *Theor. Appl. Genet.*, 62: 109-112.
- [8] Lu, C., V. Vasil and I. K. Vasil: 1983. *Theor. Appl. Genet.*, 66: 285-289.
- [9] McCammon, Kenneth R.: 1985. *A Report at the Symposium of International Agricultural Exhibition*, (Beijing, China).
- [10] Rhodes, C. A., C. E. Green and R. L. Phillips: 1982. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, 56: 148-149.
- [11] Tomes, D. T., and O. S. Smith: 1985. *Theor. Appl. Genet.*, (1985) 70: 505-509.
- [12] Torne, Jose, M., M. A. Santos and J. L. Blanco: 1984. *Plant Science Letters*, 33: 317-325.
- [13] Vasil, V., I. K. Vasil and C. Lu: 1984. *Amer. J. Bot.*, 71(1): 158-161.