

文章编号: 1005-0906(2007)05-0060-05

玉米单倍体育种技术研究与应用进展

赵延明¹, 董树亭², 张锁良¹, 丁建国³

(1. 莱阳农学院植物科技学院, 山东 青岛 266109; 2. 山东农业大学玉米研究中心, 山东 泰安 271018;

3. 威海市农业科学院, 山东 威海 264200)

摘要: 综述了玉米单倍体育种技术研究进展及在玉米育种中的应用。包括玉米单倍体的获得方法、鉴定方法、二倍体加倍方法、在玉米育种中的应用等, 并就玉米单倍体育种研究存在的问题、现状、发展趋势等作了初步的阐述和分析。

关键词: 玉米; 单倍体; 育种

中图分类号: S513

文献标识码: A

Development in the Research and Application of Technology of Haploid Breeding in Maize

ZHAO Yan-ming¹, DONG Shu-ting², ZHANG Suo-liang¹, DING Jian-guo³

(1. College of Plant Science and Technology, Laiyang Agricultural University, Qingdao 266109;

2. Maize Research Center, Shandong Agricultural University, Taian 271018;

3. Weihai Academy of Agricultural Sciences, Weihai 264200, China)

Abstract: The brief introduction were summarized on the progress and application of haploidy breeding in maize. Including the method how to obtain and evaluate the haploid and dihaploidze and apply in maize breeding. The preliminary exposition and analysis were also made about existing question and circumstance and developing tendency on haploid breeding in maize.

Key words: Maize; Haploid; Breeding

优良玉米自交系的选育是玉米利用杂种优势、选育优良杂交种的基础和关键。传统选育优良自交系是根据育种目标选用优异种质资源组配基础材料后连续自交 5~6 代以上, 性状稳定后进行配合力测定, 再根据杂种优势模式组配杂交组合。玉米单倍体是指具有配子体染色体数目的植物体, 采用玉米单倍体育种技术可在一定程度上克服传统育种方法存在的不足。利用单倍体研究进行育种可以缩短产生纯合品系的时间。本文就玉米单倍体育种研究进展做一综述, 促进单倍体育种技术在玉米育种中的应用。

1 获得玉米单倍体技术

1.1 自然发生的单倍体

生殖过程异常所引起的孤雌或孤雄生殖而来的玉米单倍体, 自然发生的单倍体的频率极低, 仅为 $10^{-5} \sim 10^{-8}$ 。由于单倍体高度不育, 其植株和它的组织器官等都比它们的二倍体弱小, 所以自然界中存在的单倍体很少。

1.2 孤雌生殖

诱导玉米孤雌生殖的方法很多。利用异种花粉授粉, 刺激未受精卵发育引起孤雌生殖产生单倍体; 利用紫外线处理的玉米成熟花粉粒给正常植株授粉, 让已无授精能力的花粉去刺激未受精的卵细胞单性发育成单倍体的胚; 利用甲苯胺蓝等化学药剂处理花粉产生单倍体。化学药物诱导孤雌生殖常易产生一些影响生理生化和形态上的畸变, 其可靠性常受到怀疑。

1.3 花粉、花药培养

收稿日期: 2007-02-20

基金项目: 山东省玉米产业化(三 O 工程)项目

作者简介: 赵延明(1966-), 男, 副教授, 从事作物遗传育种科研与教学工作。Tel: 0532-86080447

E-mail: zhaoym796@sina.com

用花药、花粉组织培养技术获得单倍体。在获得单倍体的同时,还常常出现已自然加倍了的二倍体和双倍体。此方法的缺点是要经过组织培养的过程,先诱导愈伤组织,再分化形成再生植株,但并非每个小孢子都能无性增殖。二倍体化以后,因适应性问题而出现生长或结实的困难。从理论上说,玉米花药培养是快速获得玉米纯系的有效途径。但至今通过玉米花药培养获得花培纯系和杂交种很少有大量应用于生产。一是玉米花粉愈伤组织的诱导率较低,只能从少数基因型上诱导单倍体植株,材料间的差异较大,试验证明遗传背景是决定玉米雄核发育水平的重要因素;二是玉米单倍体植株染色体加倍的成功率极低,难度较大,花粉植株再生率低。目前国内外研究表明,一般愈伤组织诱导率可达 20% 的水平,绿苗率达到 2% 的水平。

1.4 传粉玉米子房诱导单倍体

利用花粉的生物刺激作用来诱导传粉的玉米子房产生单倍体植株,可建立起高效、稳定的玉米单倍体诱导体系。汤飞宇(2004)等研究了授粉时间长短和季节对单倍体诱导效果的影响研究。结果表明:当授粉时间控制在 12~22 h,授粉子房均有可能诱导出单倍体植株,春秋两季诱导单倍体植株的效果比夏季好。从 26 400 个子房中获得 281 株再生植株,经根尖压片检查其中 24 株为单倍体植株,证明了利用传粉植株诱导单倍体植株是可行的。利用传粉的玉米子房来诱导单倍体植株,有助于启动卵细胞单性胚胎发育。玉米子房传粉 15 h 即有可能被诱导出单倍体植株,如授粉时间延长,会增加子房授精的危险,因此利用传粉玉米子房来诱导产生单倍体植株,关键在于控制好授粉时间。

1.5 远缘杂交单亲染色体消失

在远缘杂交中,可能由于双亲体细胞分裂周期的不同步,导致某一亲本染色体的丢失,从而引起单倍体的发生。

1.6 辐射诱导

用射线照射花或父本花粉经 X 射线处理后,给去雄的母本授粉,以影响授精,诱导单性生殖产生单倍体。

1.7 利用高频诱导单倍体材料

美国发现了一个高频诱导单倍体的材料并定名为 Stock6,为早熟、白色、粉质、硬粒型的玉米,后又经过两次回交和两次自交导入了控制子粒性状和植株性状的两种显性标记基因(*R-nj*、*PI*)。它具有两个标记性状:子粒有斑纹、成株叶片和叶鞘呈紫

色,均是由互补基因控制。Stock6 诱导产生单倍体的原理已经清楚,双授精过程中一个精子与极核结合,而另一个精子不能与卵结合形成授精卵。在育种实践中用作父本,被诱导的育种试材作母本,大约有 3% 的单倍体胚。此外还有 A358、ZMS、MKS、MHI 等一些单倍体诱导材料,均能够产生大约 3% 的单倍体胚。在以上这些材料中,目前利用较多的是 Stock6,育种家已利用作父本诱导了大量的母本单倍体,从中获得的部分玉米自交系已在生产上加以利用。张铭堂(1992)用 Stock6 作父本,诱导单交种 OH43 × Mo17,共获得 600 个杂交所穗计 305 100 粒种子,经子粒标记选择和植株标记选择,最后获得 249 个双单倍体纯系,现已育成 2 个玉米自交系,并配出优良的商业杂交种。刘纪麟(2001)从美国引进了玉米诱导系 Stock6,并用它作父本对 WBM、辽旅等 6 个玉米群体进行了单倍体诱导,经对诱导后代的子粒、成株标记和植株育性的鉴定,已获得一些双单倍体材料。

我国学者对 Stock6 进行了有效的改造。刘志增(1998)等用一个高油玉米改良群体 BHO 和 Stock6 杂交,经多代自交和测交选育出农大高诱 1 号单倍体诱导系,其诱导率可高达 5.8%,比 Stock6 高出 5 倍,已经应用于育种实践。国外通过对 Stock6 的改造,已衍生出数个单倍体诱导系。

2 单倍体的鉴定方法

2.1 形态学和解剖学方法

利用形态学和解剖学特征来鉴定单倍体是一种直观和便捷的方法。玉米单倍体细胞染色体的量仅为二倍体细胞质的一半,因而它的细胞及细胞核变小,在解剖学上观察叶片表皮气孔、保卫细胞的大小和数目,也可以区分单倍体和二倍体。由于细胞变小导致营养器官和繁殖器官变化及植株矮化,在幼苗期可以用目测选出大部分的单倍体。单倍体在正常生长状态下常常比它的标准类型小的多;在幼苗生长的早期阶段主根和牙鞘的长短区别明显;在苗期玉米单倍体的第一片叶较短;比较胚和盾片的大小也能对单倍体做出初步的鉴定。玉米单倍体的成株约为基因型相同的纯合二倍体姊妹株高度的 70%,叶面积约为后者的 35%。此外,单倍体植物的特点是:开花较早,延续时间长;花不正常、败育,结的果实少而小;单倍体植株矮小,叶片、花、花药、气孔均较小,花序较紧密、花较多,花丝短,其相应的二倍体则相反。需要指出的是,除了单倍体植株

一般较小外,生活力不一定弱。如果同源二倍体玉米生活力强,则单倍体的生活力也强,反之也一样。除非是和杂合体相比较来说,否则把“较弱的植株”作为单倍体的特征是一种误解。

2.2 细胞遗传学方法

根据玉米单倍体的结构特点、形态特征,可以初步地将其与其原始二倍体亲本区分出来,但最终的鉴别仍须用细胞学的方法镜检其染色体数目才能确定。尤其是伴随着单倍体同时出现的不同倍数性个体、嵌合体及非整倍体时更是如此。细胞遗传学方法最准确的方法是用根尖分生组织压片观察体细胞中或减数分裂细胞中的染色体数目,可区分整倍单倍体和非整倍单倍体(韩学莉,2006)。在检查单倍体根尖细胞染色体数时,应注意到由于单倍体植株根尖细胞具有二倍化的倾向,细胞中染色体组可能自然加倍,根据染色体的计数来鉴别单倍体时有可能引起差错。玉米根尖细胞二倍体化的频率因其单倍体的基因型而异,必要时可对需鉴别的植株的幼叶或花芽细胞进行染色体的计数,或检查孢原组织细胞或花粉母细胞,以确定其倍数性。

2.3 生理生化特性的区别

除上述形态上的区别外,生理生化方面单倍体与二倍体间也存在差别。Tyecba(1973)研究一倍体和二倍体玉米在吐丝期叶片纤维部分无机水和有机水的相互关系和抗坏血酸的含量时,发现当玉米由二倍体转变为一倍体水平时,不仅有形态特征和解剖结构的改变,而且有组织的化学成分的改变:无机水的含量减少,有机水和抗坏血酸的含量增加。利用光度计法分析细胞核中DNA含量不同区分单倍体和二倍体,但不能区分整倍单倍体和非整倍单倍体,又由于该法检测速度慢和需要仪器设备,不适合在田间进行大批量地鉴定。

2.4 射线照射法

植物对辐射的敏感性随着倍数性的变化而变化是生物学的一般规律。基本方法是用电离射线照射叶片的一部分,先看到褪绿,而后出现辐射坏死。关键是要探索出不同染色体倍数玉米的最适剂量和照射时间,如果掌握的好,该法可成为最简便和实用的鉴定方法之一。

2.5 遗传标记法

在大量材料中按外部形态学和解剖学的性状鉴别出单倍体植株是件相当繁重复杂的工作,对玉米这种既不能无性繁殖又不能保存植株的一年生种子植物来说,在生育的后期如开花期才能初步鉴

定出单倍体,则已无法使其二倍体,势必无法得到种子。所以在育种实践上要求一定要在早期鉴别出单倍体。利用遗传标记筛选单倍体,可减少根据形态上差异筛选时常有的误差。因此利用遗传标记成为最可靠有效的单倍体鉴定方法。在玉米中,著名的Navajo标记基因*R-nj*是利用较成功的。Coe的Stock6和宋同明等的高诱1号单倍体诱导系,导入了子粒和植株显色的遗传标记基因,农大高诱1号诱导率高,繁殖容易,克服了Stock6的重要缺陷,杂交当代可使母本子粒的胚面增大,标记较为清晰。由单倍体诱导系诱导出的子粒分三种类型:胚乳糊粉层呈现紫色或紫红色,胚芽部位也呈现紫色或紫红色;胚乳糊粉层呈现紫色或紫红色标记,胚芽部位无色;胚乳糊粉层和胚芽部位均不显色无标记(梁文科,2004)。

许多遗传标记系统可用来早期识别玉米单倍体,能将母本单性生殖的单倍体和杂种后代区分开,也能分辨出起源于父本的雄核发育的单倍体。例如,用具有遗传标记基因紫色性状的玉米原种为父本,给不具紫色的玉米授粉,然后在后代中查找无紫色的幼苗,它不同于显现出紫色的杂种,可能是母本单性生殖产生的单倍体,可进一步用细胞学的方法鉴定出真正的单倍体。无紫色的幼苗中可能包括有下述原因形成的二倍体类型:在标记基因上发生突变的突变体或染色体缺失的二倍体杂种;带有一些强有力的、颜色抑制因子的基因的杂种;因染病而抑制了颜色表现型发育的杂种;母本二倍体;起初为单倍体而随后发生了染色体加倍的一些二倍体(Chase,1952)。

根据子粒的颜色标记特征,对单倍体做出初步判断之后,还可在田间根据植株紫色标记对单倍体做出进一步的判别:凡幼苗叶鞘全部为紫色者不是单倍体。在拔节期,单倍体植株大多表现出生长缓慢、植株矮小、叶片短和颜色浅等特点;此外,玉米植株的育性也是鉴别玉米单倍体的一个重要指标。玉米的单倍体植株由于只含有一套染色体组,通常都是雄性不育或育性很低。

陈绍江、宋同明(2003)利用高油分的花粉直感效应鉴别玉米单倍体。通过对农大高诱1号衍生材料的诱导率和含油量的分析,筛选出了一个诱导率与含油量均较高的高诱株系。该系油分具有显著的花粉直感效应,以其为父本与普通玉米杂交,杂交当代子粒含油量显著高于自交子粒和单倍体子粒,花粉直感的增油率在30%以上。利用这一区别所发

展的单倍体油分筛选法准确率超过 90%,明显高于标记法挑选的准确率。测油法突破了单纯依赖颜色标记进行单倍体筛选的局限性。

2.5 分子标记方法

汤飞宇等(2004)利用 SSR 标记检测来源于玉米孤雌生殖的双单倍体,取得了明显的效果。

3 单倍体的二倍体化方法

3.1 单倍体的自然加倍

在一般情况下单倍体植株表现为雌雄不调,正常花粉粒很少,所以单倍体自然加倍的频率仅占全部单倍体植株的 10%。许多材料的自然加倍率低于 5%,也有的材料不发生自然加倍。仅仅依靠单倍体的自然加倍难以满足育种实践的要求,必需对其进行人工加倍。

3.2 单倍体的人工加倍

目前主要是利用秋水仙素处理单倍体的根尖或茎尖生长点。基本有 3 种方式:处理萌发的种子;处理根尖;处理茎尖生长点。其中效果较好的是第 2 和第 3 种方式。处理根尖,在实际操作中会受到一些限制;而处理顶端分生组织较为方便,可采用微量注射和涂抹。早在 1952 年 Chase 提出用秋水仙素溶液注射幼苗的盾片进行加倍。Seaney(1994)采用浸根法,但此法需要育苗、移栽等环节,Gayen P 在 1994 年使用浸种法,使加倍率达到了 14%。刘志增(2000)等在拔节期将不同浓度的秋水仙素注射到茎尖生长点偏下的组织中,结果在较低浓度下效果好,随着浓度的提高,受药害植株的比例也在增加。Gayen P(1994)等用不同浓度的秋水仙素,在两个温度下分别对单倍体的种子和幼苗进行不同时间的处理。结果表明,在不同温度下,用相同浓度秋水仙素处理,单倍体加倍的百分率不同。张铭堂(1992)认为:如果能扣除自然加倍的频率,人工化学加倍的效果尚不十分显著,此外,环境条件对单倍体的加倍效果的影响也不能忽略。有效的单倍体加倍方法是单倍体技术能否在玉米育种中广泛应用的关键问题之一。

4 单倍体在玉米育种中的应用

利用单倍体技术可缩短培育优势杂种时间,克服远缘杂交产生的不亲和性、提高诱变育种的效率、合成玉米育种新材料。单倍体技术培育玉米自交系在美国正被玉米商业育种家广泛地利用。在我国,最早开展此项研究的中国科学院遗传研究所,

通过采用孤雌生殖技术,在不到 20 年的时间里已育成 3000 多个孤雌生殖纯系,其中综合性状优良或个别性状突出,可直接或间接用于育种的近 350 个,选出多个优良组合参加省级和国家级区试。遗单 6 号、科玉 10 号、秦单 5 号已通过审定,并在生产上进行推广。

5 玉米单倍体育种存在困难及发展趋势

虽然早在 1929 年,Randolph 和 Stadler 就首次报道了玉米单倍体,产生了在玉米育种中利用单倍体技术的思想,但由于有两个限制因素:一是难以获得足够数量的单倍体育种材料;二是单倍体二倍体化时的困难,导致实践的过程是漫长的,单倍体技术至今尚未得到广泛应用。在玉米育种中有效的应用单倍体技术,要具备几个先决条件:如何简便且大规模地获得单倍体植株;如何简便且有效地重组二倍体;如何简便且快速地鉴别纯系。

单倍体技术在玉米育种上应用具有如下优点:快速获得纯系;在单倍体中能简化基因互作,去掉超显性效应,保留有利的加性和加性上位效应;还可淘汰有害的、致死和半致死的隐性基因。但是,单倍体育种技术也存在缺点:不能有效打破不良基因的连锁;基因间的重组几率较低;单倍体的诱导频率不高。此外,重组二倍体时染色体加倍具有一定的困难。目前,二倍体化的频率能达到 15%~25%。随着对单倍体现象的深入研究和科技进步,这些限制因素被最大限度地克服了,形成了一种新的育种思路——分解育种(梁文科,2004)。分解育种包括 3 个阶段:获得单倍体;在单倍体水平上进行选育;多倍体的重新合成。而单倍体的获得是分解育种的基础,利用单倍体技术获得纯系是分解育种的重要研究方向之一。对玉米而言,分解育种方案简化为两个阶段:即获得单倍体和单倍体的二倍体化。提出利用单倍体技术获取玉米自交系:利用自然发生或人工培育的单倍体植株,经过自然或人工加倍获得双单倍体和纯系。因为从单倍体到纯系只需一个世代,并且单倍体技术的应用是对配子进行选择,获得优良的遗传重组的机会高于合子的选择,并可缩短自交系的选育年限,提高育种效率。

单倍体技术在玉米育种中的应用前景是十分诱人。与种质扩增和育种材料的改良有机结合起来,先对目标诱导材料进行有效的重组改良,累积足够的有利基因位点,然后再用单倍体技术获得纯

系,将会极大地发挥单倍体育种的优势,大大提高育种效率,并且双单倍体群体在遗传学研究上具有重要的研究价值,可应用于遗传图谱的构建、基因定位及克隆(梁文科,2004)。未来的工作除了要进一步完善单倍体诱导体系、提高单倍体诱导率外,还应该着重研究单倍体加倍技术。杜娟等(1999)利用有性杂交使有利基因型重组后进行花药培养从而快速获得玉米纯系,建立了玉米单倍体育种的新体系,不仅具有理论意义,还存在着巨大的生产潜力。

参考文献:

- [1] 才 卓,徐国良,刘向辉,等. 玉米单倍体诱导选系研究[J]. 玉米科学,2004,12(1):10-11.
- [2] 陈绍江,宋同明. 利用高油分的花粉直感效应鉴别玉米单倍体[J]. 作物学报,2003,29(4):587-590.
- [3] 杜 娟,母秋华,贾玉锋,等. 利用桥接组合转育的方法提高玉米花药培养诱导率的研究[J]. 玉米科学,1999,7(3):16-18.
- [4] 韩学莉,唐祈林,曹墨菊,等. 用 Stock6 杂交诱导的单倍体鉴定方法初探[J]. 玉米科学,2006,14(1):64-66.
- [5] 谷光明. 药物诱导玉米孤雌生殖植株的倍性变异[J]. 遗传学报,1995,22(5):406-412.
- [6] 郭奕明,杨映根,郭仲琛. 玉米花药培养和单倍体育种的研究新进展[J]. 植物学通报,2001,18(1):23-30.
- [7] 李春秋,祁永红,王 巍,等. 玉米无融合生殖的诱发及其在玉米育种上的应用[J]. 农业与技术,2005,25(1):9-14.
- [8] 刘治先,张铭堂. 玉米 Stock6 的遗传特性及其在玉米育种上的应用[J]. 山东农业科学,1996,3:4-7.
- [9] 刘治先. 玉米育种新技术[J]. 玉米科学,1996,3(4):12-15.
- [10] 刘志增,宋同明. 玉米孤雌生殖诱导系 Stock6 的表现及其遗传改良初报[J]. 中国农业大学学报,1998,3(增刊):6-10.
- [11] 刘志增,宋同明. 玉米杂交诱导孤雌生殖单倍体研究进展[J]. 玉米科学,1999,7(2):16-19.
- [12] 刘志增,宋同明,滕文涛,等. 玉米孤雌生殖诱导系的选育方法研究[J]. 中国农业大学学报,2000,5(3):51-57.
- [13] 刘志增,宋同明. 玉米高频率孤雌生殖单倍体诱导系的选育与鉴定[J]. 作物学报,2000,26(5):570-574.
- [14] 石太渊. 药物诱导玉米孤雌生殖的研究[J]. 杂粮作物,2000,20(1):17-20.
- [15] 宋建成,姜丽君,王启柏,等. 玉米孤雌生殖诱导系及标记基因的观察[J]. 玉米科学,1998,6(1):17-20.
- [16] 孙美红,刘 霞. 植物单倍体诱导育种研究进展[J]. 陕西农业科学,2006(3):69-71.
- [17] 汤飞宇,王 菲,王国英. 利用 SSR 标记检测来源于玉米孤雌生殖的双单倍体[J]. 江西农业大学学报,2004,26(6):859-862.
- [18] 汤飞宇,王 菲,王国英. 从玉米传粉子房培养出单倍体植株[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2004,33(4):489-493.
- [19] 王建革. 单倍体技术在玉米育种中的应用[J]. 国外农学—杂粮作物,1996,4(4):7-8.
- [20] 魏俊杰,池书敏,刘志增. 关于玉米单倍体人工加倍方法及花粉活力测定初步研究[J]. 玉米科学,2001,9(3):12-13.
- [21] 魏俊杰,李红梅,刘志增. 玉米单倍体的细胞学研究[J]. 保定师范专科学校学报,2003,16(4):21-23,33.
- [22] 魏俊杰,陈梅香. 玉米单倍体育性自然恢复的初步研究[J]. 玉米科学,2006,14(2):24-26.
- [23] 辛淑容,高建伟,颜廷进. 活体诱导植物孤雌生殖研究进展[J]. 莱阳农学院学报,1995,12(2):112-117.
- [24] 扬宪民. 玉米自交系快速高效育成法——孤雌生殖法[J]. 广西农业科学,2003,6:27-29.
- [25] 叶胜海,李春寿,阮关海,等. 作物单倍体二倍化及其染色体倍性鉴定研究进展[J]. 浙江农业学报,2003,15(5):323-326.
- [26] 张铭堂. 40 年来玉米遗传研究进展[J]. 科学农业(台湾),1992,40(1):53-80.
- [27] 张天真. 作物育种学总论[M]. 中国农业出版社,2004.
- [28] Chalyk S, Chebotar O. Utilizing maternal haploids to identify major genes controlling plant height in maize[J]. Journal of Genetics and Plant Breeding, 1999(935): 73-77.
- [29] Chalyk S T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding[J]. Euphytica, 1994(79): 13-18.
- [30] Chalyk S T, Cealic S T. Creating new haploid-inducing lines of maize [J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1999(73): 53-54.
- [31] Chase S S. Production of homozygous diploids of maize from mono-ploids[J]. Agron. J, 1952(44): 16-19.
- [32] Coe E H. A line of maize with high haploid frequency[J]. Amer. Nat., 1959, 93: 381-382.
- [33] Lashermes P, Beckert M. Genetic control of maternal haploid in maize and selection of haploid lines[J]. Theor. Appl. Genet., 1988, 76: 405-410.
- [34] Sarkar K R, Pandey A, Cayen P. Stabilization of high haploid inducer lines[J]. Maize Genet News Lett, 1994, 68: 64-65.
- [35] Sarkar K R, Coe E H. A genetic analysis of the origin of maternal haploid in Maize[J]. Genetics, 1966, 54(3): 453-464.

(责任编辑:朱玉芹)