

文章编号: 1005-0908(2008)06-0048-04

我国玉米单倍体育种技术研究进展

姜 昱, 王玉民, 王中伟, 林秀峰, 康岭生, 刘志铭

(吉林省农业科学院生物技术中心, 长春 130033)

摘 要: 介绍了我国玉米单倍体产生途径、鉴定方法以及加倍方法的研究进展, 并对单倍体技术在玉米育种中的应用价值进行了概述。

关键词: 玉米; 单倍体; 孤雌生殖; 育种技术

中图分类号: S513.03

文献标识码: A

The Advances at Haploid Breeding of Maize in China

JIANG Yu, WANG Yu-min, WANG Zhong-wei, et al.

(Biotechnology Research Center, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130124, China)

Abstract: This paper introduced the research progress of China's maize haploid in producing approaches, the identification method and the doubling method, and made a summary for the application value of haploid techniques in maize breeding.

Key words: Maize; Haploid; Parthenogenesis; Breeding technology

自 Randolph 首先发现单倍体以来, 单倍体已在植物遗传与育种研究中得到广泛应用, 特别是在玉米自交系选育研究方面应用较多。与传统育种方法相比较, 双单倍体(DH)技术是选育玉米自交系的一种最快、最简便、经济和直接的方法。单倍体经染色体加倍获得纯合二倍体, 从中选育自交系, 缩短了育种年限, 加速了育种进程, 因此受到育种家们的极大重视。

1 玉米单倍体产生途径

单倍体可以自然发生, 也可以诱导产生, 但单倍体自然发生的几率很低, 约为几十万分之一。目前, 在育种上通常采用人工诱导的方法获得单倍体。玉米诱导产生单倍体的方法主要有花药培养、化学药剂诱导孤雌生殖以及孤雌生殖诱导系杂交诱导等。

1.1 花药(花粉)培养产生单倍体

花药培养的原理是依据植物每一特化的营养细胞都具有发育成完整植株的“潜在全能性”原理

(1902)。目前, 我国玉米在花药培养及单倍体育种方面取得了重大进展。谷明光等(1975)在我国首次获得玉米花粉植株, 杭玲等育成了花培杂交种“桂三 1 号”。此后, 我国又有一些科研单位育成了玉米花培杂交种参加省级区试。

花药培养效率受供体植物的基因型、花粉发育时期、培养基及其添加物、预处理方式、供体植物的生长状况等的影响, 基因型是影响单倍体培养的主要因素。付迎军等研究表明, 不同基因型的玉米花药培养的诱导频率差异非常明显, 杂交种的诱导频率要比纯系高。

虽然花药培养和花粉培养的目的相同, 但严格说来, 花药培养的是器官, 而花粉培养的是单细胞。与花药培养相比, 花粉培养不受花药的药隔、药壁和花丝等体细胞的干扰, 因而能更好地调控雄核发育的各种影响因子。由于花粉数量多, 具单细胞、单倍性、同步性好等优点, 培养较少的花药可获得大量的花粉植株。

由于花药培养效率低、基因型障碍大、染色体加倍困难, 加上需要一定的设备条件和较高费用等缺点, 限制了这项技术的发展和推广。提高玉米花药培养效率, 获得大量的加倍纯系, 是目前玉米花培育种急需解决的问题。

1.2 化学药剂诱导产生单倍体

收稿日期: 2008-06-10

作者简介: 姜 昱(1961-), 女, 研究员, 从事分子标记辅助育种研究工作。E-mail: jiangyu@cjaas.com

王玉民为本文通讯作者。E-mail: wangym@cjaas.com

利用植物调节剂直接刺激卵细胞,使之分裂诱发孤雌生殖,此法简便易行。研究表明:硫酸二乙酯、2,4-D、马来酰肼(MH)、萘乙酸(NAA)、肌醇、烟酸、6-苄氨基嘌呤(6-BA)、赤霉素(GA3)、矮壮素、乙烯雌酚、炔诺酮、甲地孕酮、聚乙二醇(PEG)、秋水仙素(COL)和二甲基亚砷(DMSO)等化学药剂都有诱导孤雌生殖的作用。其中以 2%二甲基亚砷诱导效果最好;组合药剂的诱导效果优于单一药剂的诱导效果。

药剂诱导玉米孤雌生殖已有许多成功报道。刘晓广等利用调整 PEG 细胞融合剂与其它诱导剂的配比诱导 14 份玉米基础材料,诱导频率由 0.1%~0.15%提高到 0.22%,选育出 18 份孤雌生殖自交系。唐明远等利用复合诱导剂 TAM (诱导孤雌生殖频率为 0.47%)处理玉米湘玉 7 号 F_1 雌穗,经过 3 年选育获得了自交系 203,用其配制的杂交种 CT296,1997 年参加湖南省玉米区试。郭乐群等利用药物诱导玉米远缘杂种孤雌生殖,在 2~3 年内选育出异源种质纯系 540,组配出优良杂交种遗单 6 号(5003/540),推广面积已达 1 万多 hm^2 。柯永培等以杂交种川单 15 为基础材料,通过复合化学药剂诱导孤雌生殖,经自然加倍获得分离变异材料,采用南北穿梭加代系谱育种法,育成自交系 K363,组配出杂交种正红 211。

1.3 孤雌生殖诱导系

孤雌生殖诱导系是指用该系作亲本杂交时,能够诱导产生显著高于自然频率的单倍体。Stock6 是玉米中发现的第一个孤雌生殖诱导系,以其作父本与任何玉米材料杂交,后代中均可出现 1%~2%的孤雌生殖单倍体。由于 Stock6 存在许多严重缺陷,如诱导率较低、农艺性状差、受遗传背景影响较大,给鉴别工作带来很大困难。我国育种家对 Stock6 进行了遗传改良,刘志增等从单倍体诱导系 Stock6 与高油玉米群体 BHO 的杂交后代中经过不断的测交和选择,育成了我国第一个玉米孤雌生殖单倍体诱导系农大高诱 1 号,平均单倍体诱导率为 5.34%,较 Stock6 高出 5 倍,同时子粒 Navajo 标记较之 Stock6 更加明显,还结合了 ABP1 紫色植株标记和独特的大胚面标记。花粉量大、繁殖容易和油分具有花粉直感等,是用于诱导孤雌生殖单倍体的优良授粉者。才卓等(2004)诱导选育出早熟、抗病性强、品质优良和自身丰产性好的新自交系 YD001、YD002;2007 年又育成了诱导频率高、遗传标记明显而稳定、花粉量大、结实性好、抗病性强的优良单倍体诱导系吉高诱系 3 号,单倍体诱导率在 5.50%~15.94%,平均单

倍体诱导率为 10.40%,是 Stock6 的 10 倍。刘治先等 2003~2006 年从美国引进单倍体诱导材料 H01~H05,单倍体诱导率为 2.4%~18.5%。利用玉米诱导材料诱导单倍体,自然加倍成 DH 系,是操作简便、经济、有效、规模化、快速选育自交系的方法之一。

1.4 延迟授粉诱导法

延迟授粉,花粉管即使到达胚囊内,卵细胞由于丧失受精能力而不能受精,但其受花粉管刺激后容易引起分裂,从而进行孤雌生殖形成单倍体植株。去雄后延迟授粉可以大大提高孤雌生殖的诱导率。其原因可能是授粉促进胚乳的形成,从而保证孤雌生殖幼胚的顺利发育。

1.5 远缘杂交诱导产生单倍体

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。亲缘关系较远的花粉一般很难使母本的卵细胞受精,但却能刺激卵细胞单性发育,由此可产生单倍体或经核内复制形成双倍体。朱庆麟等(1979)用失活花粉、衰老而丧失授精能力的花粉、无授粉能力的幼嫩花粉及异种花粉诱发玉米孤雌生殖诱导率较低,而用向日葵、南瓜和棉花花粉混合给玉米授粉,诱导率比分别授粉都要高。远缘花粉诱导孤雌生殖效果不稳定,不同材料的变异很大。

1.6 辐射花粉诱导法

在开花前至受精过程中,用射线照射花粉,以影响受精过程的正常进行,或用射线照射过花粉给去雄的母本授粉,通过减弱花粉的活力来影响其参与受精的能力,使花粉仅能刺激卵细胞发育,达到诱发孤雌生殖的目的。能诱导孤雌生殖的有 X 射线、 γ 射线、紫外线、 P^{32} 和 Co^{60} 等。目前,也有少量应用辐照雌配子体来诱导产生孤雌生殖单倍体的报道。

1.7 玉米雌穗、子房和胚珠的离体诱导法

离体孤雌生殖是指通过离体培养未受粉的子房或胚珠,使未受精的卵细胞(广义的孤雌生殖还包括雌配子体的其它单倍体细胞)生成再生植株的过程。黄国中等在离体条件下,利用 16 种不同的玉米材料,将未授粉的雌穗进行整个直插或切段直插培养,成功获得结实。通过组织培养在离体条件下诱导雌核发育是单倍体育种的重要途径之一,也为研究孤雌生殖或无配子生殖的细胞胚胎学提供了稳定的实验体系。

2 玉米孤雌生殖单倍体的鉴定方法

孤雌生殖单倍体的鉴定方法有形态学鉴定法、

解剖学鉴定法、细胞学鉴定法、分子标记法、遗传标记法等,在玉米诱导产生单倍体的鉴定上主要利用形态学鉴定法和遗传标记法。

2.1 形态学鉴定法

孤雌生殖单倍体由于染色体数的减少,一般引起细胞体积变小,从而导致营养器官和生殖器官变小。表现为植株生活力较弱,出苗顶土力较差,植株较矮,叶片短和颜色浅等特点;在正常生长状态下常常比它的标准类型小的多,雄穗育性很低或不育。因此,可以比较容易鉴定单倍体植株。韩学莉发现株高鉴定是鉴定单倍体植株最准确的方法。在玉米等子粒大而扁平的作物上,比较胚和盾片的大小也能对单倍体做出初步的鉴定。该方法具有简便、快速、无需专用仪器设备且可在苗期进行鉴定等优点,不足之处是经验因素大,所得结果准确性较差,只能与其它鉴定方法结合使用。

2.2 遗传标记法

目前最可靠有效的单倍体鉴定方法是利用遗传标记。利用具有在不同遗传背景下能稳定表达的显性性状标记的基因型作供粉种,根据植株显性性状表达与否可将孤雌生殖来源的单倍体或双单倍体与杂交产生的杂合体快速区分开来,从而简化整个孤雌生殖诱导程序。

在玉米中,著名的 Navajo 标记基因 *R-nj* 是利用较成功的。Coe 等(1964) 将控制子粒糊粉层和形成胚芽色素的 *ACR-nj* 基因和控制不定根、叶鞘和茎秆色素形成的 *ABP1* 基因导入孤雌生殖诱导系 Stock6,使之具有子粒和植株双显性遗传标记。当使用黄色或白色子粒玉米作母本,用带有显性标记的孤雌生殖诱导系 Stock6 作父本,杂交所产生子粒就可以分为以下 3 种类型:①胚和胚乳均带有 *R-nj* 标记,为杂合二倍体;②胚乳具有 *R-nj* 标记,但无有色盾状体,胚乳为三倍体,胚为单倍体;③胚和胚乳均不带有 *R-nj* 标记,属异源花粉污染所致。种植第二类子粒,植株为紫色的予以淘汰,植株为绿色的即为单倍体或双单倍体。

子粒 Navajo 标记是选择单倍体的关键性状,但子粒 Navajo 标记的遗传非常复杂,存在显性互补基因、修饰基因和基因剂量效应。子粒着色程度还受气候条件及发育情况影响,所以经过筛选后的单倍体子粒还需要借助其它鉴定方法如紫色植株标记、细胞学鉴定等进一步鉴定。而由 *ABP1* 显性控制的紫色植株标记在各种遗传背景下均能正常表达。因此,利用紫株标记即可对单倍体进行准确鉴定。但是紫

株标记的应用远不如 Navajo 标记方便。此外,母本带有无叶舌或光叶等幼苗期容易观察的隐性性状也可以用来鉴别孤雌生殖单倍体,由于具有这些突变基因的材料很少,它的应用范围比较有限。陈绍江等利用高油分的花粉直感效应鉴别玉米单倍体,准确率超过 90%,明显高于子粒 Navajo 标记法的准确率,突破了单纯依赖颜色标记进行单倍体筛选的局限性。在育种实践中,结合育种家的经验,灵活运用各种鉴定方法,无疑是成功的关键。

3 玉米单倍体的加倍

3.1 单倍体的自然加倍

自然状态下,单倍体各部分组织的体细胞发生自然加倍的现象是普遍存在的。单倍体的自然加倍频率在 5%~10%,有些材料不发生自然加倍。细胞的加倍可能是核内加倍、核内有丝分裂、细胞融合等。有关单倍体自然加倍的机制尚不清楚,但从自然加倍的广泛程度来看,可以认为,单倍体回复二倍性是细胞的一种本能反应。

单倍体子粒播种后能够正常发芽出苗,完成整个生长发育周期,但是大部分单倍体植株因育性问题而不能自交结实,不同基因型间差异很大。几乎所有杂交诱导出的玉米单倍体的雌穗均能正常吐丝,90%以上的雌穗是自然可育的,而雄穗的自然育性要低得多,不同基因型材料间存在很大差异,通常雄穗育性的自然恢复率都未超过 20%。因此,雄穗的育性是双单倍体育种体系应用的限制性因素。只有雄穗的自然加倍率很低或者低于 20%的时候才需要染色体加倍;高于 20%则可在实际育种上得到应用。单倍体自然加倍受环境影响较大,刘治先等研究表明:在同一环境条件下基础材料间单倍体加倍率变异不显著,而种植环境间单倍体加倍率变异极显著。

3.2 单倍体的化学加倍

人工加倍最有效的方法是利用化学药剂破坏细胞有丝分裂的纺锤丝,使两个子细胞染色体在有丝分裂后期不移向两极,人为改变分裂细胞染色体倍性,实现染色体化学加倍。秋水仙素(Col)是目前最常用的化学加倍剂,加倍方法主要有浸种法、浸根法、注射法和培养基掺入法等。

秋水仙素的加倍效果与多种因素有关。在一定范围内,试剂浓度、处理时间与加倍效果成正相关,但浓度过高、处理时间太长都会加重药害。提高温度可以促进细胞分裂,有利于染色体加倍,但同时也

会加深组织药害。一般适宜的处理温度为略高于细胞分裂的临界温度(18℃)。采用变温处理,即在低温条件下(11~17℃)进行秋水仙素处理,然后恢复到常温下(25℃)生长,可有效减轻药害,刺激细胞分裂,增加细胞同步化程度,减少混倍体,提高加倍效率(曹孜义等,1983)。利用二甲基亚砷以及细胞分裂素与秋水仙素配合,能有效地提高加倍频率(白守信等,1979)。魏俊杰等在6叶期和拔节期用不同浓度的Col+2%DMSO注射处理玉米单倍体幼苗茎尖生长点,发现6叶期用0.5%Col+2%DMSO处理效果最好,拔节期处理时药害随秋水仙素浓度增大而增加。刘志增等在6叶期则以0.1%Col+2%DMSO注射茎尖生长点加倍效果最佳,散粉株率达23.08%,较对照提高3.6倍,随着秋水仙素浓度的提高,受药害的单倍体株数增加。

关于秋水仙素的加倍机理有待进一步研究。秋水仙素对人体毒性很大,而且易对植物造成死苗、畸形等伤害,寻找其他替代品是今后染色体加倍研究的重点。据报道,APM、拿草特、安磺灵、氟乐灵和 N_2O 具有加倍功能,有望成为新的细胞分裂抑制剂替代品。

4 单倍体技术在育种中的应用

4.1 缩短育种周期,提高选择效率

利用单倍体经染色体加倍获得纯合二倍体植株,再从中选育自交系,一般只需2年时间就能获得纯合自交系,再经过2年的杂交组合试验,从选育自交系到育成杂交种只需4年时间,与常规育种相比,省工、省时,可以显著地缩短育种周期,提高效率。在单倍体中能简化基因互作,去掉超显性效应,保留有利的加性和上位效应;还可淘汰有害的、致死和半致死的隐性基因。因此,单倍体在提高目标性状选择的准确性、加快育种进程上有不可替代的作用。

双单倍体是由配子体发育而来,对DH系的选择实际上属于配子体选择。对于由n个独立基因控制的性状来说,在DH群体中入选的几率为 $(1/2)^n$,而在普通二倍体群体中入选的几率为 $(1/4)^n$ 。这对于由多基因控制的数量性状的选择无疑会更加有效,将有利于产量、品质、抗逆性等重要农艺性状的改良。

4.2 遗传分析

单倍体只有一个单一功能的基因模式,排除了杂合性等因素的干扰,是研究基因性质和功能的良好材料。利用二倍体与单倍体杂交可产生各种非整倍体,如单体、缺体和三体等,为细胞遗传学中研究

突变的作用、染色体及染色体组的进化、染色体及基因的剂量效应、数量性状遗传和遗传连锁等多种基本问题提供适宜的材料,为植物种属基本染色体的起源提供重要遗传学证据。DH系可以在多个环境或季节进行重复试验,是研究基因与环境互作的理想材料,DH群体的加性遗传方差总大于相应的二倍体系统,可以获得较好的选择响应。

4.3 基因定位和分子标记辅助选择

通过单倍体加倍而形成的DH群体,株系内基因完全纯合,株系间的差异构成了分离群体的遗传特性,这类群体有利于连续性资料积累。在植株表现型和分子标记上,单倍体基因均表现为1:1的分离,因此DH群体是比较理想的遗传作图群体,尤其适用于数量性状基因(QTL)定位。通过检测目标性状QTL连锁的分子标记,实现对数量性状的分子标记辅助选择,在玉米育种中,人工筛选已有很长的历史,但对于数量性状的育种筛选很困难,因这些性状受多基因、环境以及基因与环境间互作的影响,对DH群体分子标记辅助筛选就解决了这一问题。

21世纪是生物技术迅猛发展的世纪,如果单倍体与常规育种、基因工程、分子生物学相结合,单倍体技术在玉米育种中的应用前景将更加广阔。

参考文献:

- [1] 才卓,徐国良,CHANG Ming-tang,等.玉米单倍体育种研究进展[J].玉米科学,2008,16(1):1-5.
- [2] 王建革.单倍体技术在玉米育种中的应用[J].杂粮作物,1994(4):7-8.
- [3] 胡建斌,李建吾,孙守如,等.植物单倍体材料创制方法及其应用[J].贵州农业科学,2007,35(4):135-137.
- [4] 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.
- [5] 付迎军,任海祥,白艳凤,等.糖液预处理对提高玉米花培诱导率的研究[J].玉米科学,2004,12(1):111-113.
- [6] 王宏伟,史振声,王志斌.我国化学诱导玉米孤雌生殖育种研究与进展[J].玉米科学,2001,9(2):22-25.
- [7] 文仁来,阎飞燕,吴翠荣,等.化学药物诱导玉米孤雌生殖研究初报[J].玉米科学,2001,9(4):31-32.
- [8] 王宏伟,邢志远,史振声,等.药剂诱导玉米孤雌生殖[J].玉米科学,2006,14(6):35-3.
- [9] 刘晓广,金玄吉.孤雌生殖诱导技术在玉米育种上的利用效果[J].吉林农业科学,1999,24(1):23-25.
- [10] 唐明远,张玉华,徐庆国,等.TAM诱导剂诱导作物孤雌生殖及其在育种上的应用[J].中国农业科学,1999,32(2):112.
- [11] 郭乐群,谷明光,杨太兴,等.药物诱导玉米远缘杂种孤雌生殖获得导源种质纯系及育种研究[J].遗传学报,1997,24(6):537-543.

(上接第 51 页)

- [12] 柯永培,袁继超,潘光堂,等.化学诱导选育高淀粉玉米正红 211 [J].核农学报,2007,21(1):5-8.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 才卓,徐国良,刘向辉.玉米单倍体诱导选系研究(简报)[J].玉米科学,2004,12(1):10-11.
- [16] 才卓,徐国良,刘向辉,等.玉米高频率单倍生殖诱导系吉高诱系 3 号的选育[J].玉米科学,2007,15(1):1-4.
- [17] 刘治先,杨菲,丁照华,等.玉米单倍体诱导材料的鉴定和快速选系技术研究[J].玉米科学,2008,16(3):12-14,18.
- [18] 牟春红,王彬,谢兆辉,等.植物孤雌生殖的诱导及其在育种中的应用[J].中国农业科学,2002,35(11):1319-1324.
- [19] 梁文科,戚廷香,徐尚忠.单倍体技术在玉米育种中的应用和新进展[J].玉米科学,2004,12(3):13-15,18.

- [20] 刘飞虎,梁雪妮.植物孤雌生殖研究进展[J].世界农业,1996(8):20-23.
- [21] 董清山.玉米离体孤雌生殖研究[J].延边大学农学学报,2006,28(1):61-66.
- [22] 黄国中,谷明光.玉米雌穗离体培养诱导孤雌生殖结实[J].遗传学报,1995,22(3):230-238.
- [23] 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):64-66,69.
- [24] 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.
- [25] 魏俊杰,张晓丽,陈梅香,等.6 叶期秋水仙素注射处理玉米单倍体的加倍效果研究[J].玉米科学,2007,15(4):49-51.
- [26] 刘志增,宋同明.玉米单倍体雌雄育性的自然恢复以及染色体的化学加倍[J].作物学报,2000,26(6):947-952.
- [27] 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的初步研究[J].玉米科学,2001,9(3):12-13.

(责任编辑:朴红梅)