

文章编号: 1005-0906(2009)05-0001-04

玉米杂交诱导单倍生殖(单倍体)选育自交系技术规范(暂行版)

才 卓, 徐国良, 代玉仙, 张铭堂, 任 军, 董亚林, 李淑华, 于明艳

(吉林省农业科学院玉米研究所, 吉林 公主岭 136100)

摘 要: 汇总国内外单倍体育种研究理论与经验, 经美国著名单倍体育种家张铭堂指导, 组装集成出本规范, 供试用参考。本规范制定了杂交诱导单倍生殖方法选育自交系的基本操作程序, 将单倍体杂交诱导、子粒鉴定、植株确认、自然与人工加倍及双单倍体获得 5 个环节作出技术规定。在每个环节都还有技术关键(特别是人工加倍等多属商业机密范畴)在试用与待熟化。经多年实践验证, 按此规范程序, 只需 2~3 个生育世代即可批量选育出遗传高度纯合自交系。

关键词: 玉米; 单倍体育种; 自交系选育

中图分类号: S513.03

文献标识码: A

The Specification of Using Haploid Breeding of Hybrid Maize Breeding the Inbred Lines (Provisional Edition)

CAI Zuo, XU Guo-liang, DAI Yu-xian, et al.

(Maize Institutes of Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: By summarized the theoretical and empirical of haploid breeding at home and abroad, and following the guidance of the well-known haploid breeder in the USA, this specification were assembled for the trial information. The specification laid down the basic operating procedures of breeding inbred lines with hybridization-induced haploid, made the technical requirements in haploid hybridization-induced, seed screening, plant recognition, natural and artificial double and doubled haploid. The key technology in every aspect were trialing and not yet perfect (artificial doubling and many other areas was commercial confidentiality). Following this program, batch selection the high-volume homozygous inbred lines only needs 2-3 reproductive generations.

Key words: Maize; Haploid breeding; Inbred lines breeding

本规范规定了利用杂交诱导单倍生殖方法选育自交系的诱导系选用、杂交诱导方法、单倍体子粒筛选、单倍体植株确认、单倍体加倍方法以及双单倍体的获得等技术环节。

本规范适用于利用玉米杂交单倍生殖诱导系选育玉米自交系。按此实施规程选育出稳定的玉米自交系只需要二个生育周期, 且选育的自交系是遗传高度纯合。

1 术语及定义

收稿日期: 2009-05-10

作者简介: 才 卓(1956-), 男, 研究员, 从事玉米育种研究。

E-mail: zhuocai@sohu.com

1.1 杂交单倍生殖诱导系(单倍体诱导系)

某些遗传材料作杂交父本或母本时, 可以诱导产生较高频率的单倍体种子(Rober, et al. 2005), 如 A385, 38-11(Chase. 1949), Stock6(Coe. 1959), Krasnodar, MHI, *igl* (不确定的配子体)基因(Kermicle. 1969), 农大高诱 1 号, 吉高诱系 3 号等。平均单倍体诱导率 Stock6 为 2.52%, Krasnodar 为 6%~8%, MHI 为 5%~6%, 农大高诱系 1 号为 5.34%, 吉高诱系 3 号为 10.4%。

1.2 标记性状

子粒 Navajo 斑纹, 诱导系一般都带有, 由显性基因 *A1*、*A2*、*Bz1*、*Bz2C1*、*C2* 和 *R1-nj* 控制, *R1-nj* 作为父本与含 *rl* 的母本杂交会产生产隐性性状和显性的斑纹。杂交当代种子具有紫色的胚乳顶端和紫

色的胚芽,单倍体种子具有紫色的胚乳顶端,但胚芽不为紫色,易于辨认。根据子粒顶部和胚芽尖颜色、胚形等逐粒挑选胚芽尖无色、紫色粒顶的准单倍体子粒。

紫色叶片、叶鞘和植株,颜色标记基因(显性基因 *A1*、*A2*、*B1* 和 *Pl1*)控制,导入到父本诱导系中后,在杂交后代中显性表达。

好的诱导系子粒标记性状明显、诱导率高、花粉量大、抗病性好、结实性好。

1.3 单倍体形态学特征

植株瘦弱并且生长缓慢,叶片较少、狭窄、直立,叶色较淡,偶尔出现白斑。雌雄花期不协调。

1.4 双单倍体(DH 系)

单倍体植株雌穗、雄穗通过自然或人工染色体加倍可产生可育卵子、花粉。授粉后所结子粒称之为双倍体自交系。

1.5 选系基础材料

拟利用杂交诱导单性生殖方法从中选育自交系的遗传群体材料可以是优良的杂交种(包括单交种、三交种、双交种)或各类群体(包括优良农家品种、综合杂交种等)。

基础材料要求子粒黄色或白色。综合农艺性状好、高产性状突出、抗病抗逆性强、品质性状兼优的基础材料容易获得好的自交系;后代分离小的基础群体获得优良自交系的几率高;以遗传变异分离大的群体为基础材料时获得优良自交系的几率很小。

1.6 杂交诱导单倍生殖方法选育自交系的基本程序

包括主要杂交诱导、单倍体子粒鉴定、单倍体植株确认、单倍体加倍、双单倍体确认 5 个基本环节。

2 单倍体子粒的获得与鉴定

2.1 杂交诱导

2.1.1 播种

根据育种计划的规模确定种植的基础材料和诱导系株数和比例。一般育种计划可种植基础材料 200~300 株,以 4:1 配播诱导系;特殊育种计划可根据育种规模同比扩大。尽量不用不育系杂交种做选系基础群体,必须应用时,基础材料种植株数要相应扩大 4 倍。

当育种规模大、基础材料多时,可采用在隔离区内以诱导系做父本,一父多母(1:4~5 的比例)制种的方式进行配制,以减少人工杂交用工量,规模可视选系计划相应同比扩大。

2.1.2 花期调节

根据选系基础材料的生育期,对选系基础材料及单倍体诱导系进行花期调节,尽量选用花期与基础材料相近的诱导系,或采取分期播种、地膜覆盖促早熟、延期管理促晚熟等系列措施,以确保花期相遇,使杂交顺利完成。

2.1.3 单倍体诱导系与母本材料的杂交授粉

与正常杂交相同,在基础材料雌穗抽丝前套袋,并在抽出花丝后取孤雌诱导系的新鲜花粉进行授粉。授粉时间、方法与正常杂交授粉相同,极端高温天气时授粉时间在早上 11:00 以前为好。花丝长短和授粉时间对单倍体诱导率有重要影响,凉爽季节、延迟授粉(长花丝 ≥ 8 cm 时)有利于提高单倍体诱导率(提高 1.5~2 倍)。

2.1.4 杂交果穗的收获和脱粒

杂交果穗成熟后收获,并妥善保管,避免鸟、虫、鼠等危害。干燥后仔细脱粒,尽量避免子粒的机械损伤。

2.2 单倍体子粒的鉴定

2.2.1 单倍体子粒常规鉴定

所得杂交果穗穗数比较充足时,可将杂交果穗的上、下端圆形子粒去掉,保留中部扁形子粒混合脱粒后,进行单倍体子粒的鉴定。

子粒顶端糊粉层和胚部均显示为紫色是正常的杂交二倍体子粒;胚和糊粉层均未着紫色的子粒则是由其他花粉污染所至;子粒顶端糊粉层为紫色、而胚部或胚芽尖无紫色、且胚面较小、凹陷较深是单倍体子粒。挑选出后精细保管,待下季播种用。

2.2.2 单倍体子粒辅助鉴定

利用农大高诱 1 号作诱导系时,除根据常规的子粒标记性状鉴定单倍体子粒外,还可根据子粒的含油量来做进一步判断。利用核磁共振仪(NMR)进行油分含量单粒测定,以基础材料自交子粒的含油量为标准,高于自交子粒即为双受精子粒,显著低于自交子粒即为断定为单倍体子粒。

2.3 单倍体植株确认

2.3.1 选地与播期

选择适合玉米生长的生态环境和地点,利于获得较多的单倍体植株自然加倍率;选择凉爽、昼夜温差较大的生态环境利于单倍体植株的自然加倍;选择玉米生长的逆境环境条件(干旱、低温、瘠薄等)利于对单倍体植株进行自然选择,可获得较多的抗逆广适 DH 系。可根据不同的育种计划、规模选择不同的生态环境,但极端高温、干旱、花期连雨天、生长前期温度过高等条件应避免。

为利于单倍体自然加倍,应选择土壤肥力中上等、排灌方便的地块。根据各地情况确定最适播期,确保全生育期有良好的生长发育环境和肥水保障。

2.3.2 单倍体子粒的播种方法

单倍体发芽势、生长势极弱,应根据不同环境要求,选择直播、刨埯浇水、育苗移栽处理等单粒精细播种方法,确保尽可能获得多的单倍体植株。

2.3.3 单倍体子粒的播种密度

根据土壤肥力与施肥水平、种植方式等确定种植密度,一般保苗 7.0 万~10.0 万株/hm²为宜。过密不利于单倍体植株发育。

2.3.4 单倍体植株田间确认

依据植株的形态学特征判别。主要依据是叶片较少、狭窄、直立,偶尔出现白斑,植株瘦弱,生长缓慢,镜检细胞较小。

幼苗长势慢、株高低,叶片短且较上冲、叶色浅,植株瘦弱,叶片叶鞘绿色则可确认是来自基础材料的单倍体植株,要进行加倍处理。

植株生长势介于单倍体植株和杂交植株之间、叶片叶鞘绿色是单倍体自然加倍形成的二倍体植株(DH 系),自交后即可成自交系。

叶片叶鞘紫色、植株瘦弱则是来自诱导系的单倍体植株;植株粗大高壮、紫色叶片叶鞘是杂交植株,予以田间淘汰。

2.4 单倍体植株的加倍

自然状态下单倍体回复二倍性是细胞的一种本能反应,各部分组织的体细胞自然加倍现象普遍存在,90%以上的单倍体雌穗自然可育,而雄穗的自然加倍频率在 5%~10%,是限制因素,且不同基因型材料间存在很大差异,有些材料不发生自然加倍。一般情况下单倍体植株表现为雌雄不调,花粉很少,仅仅依靠单倍体的自然加倍难以满足育种实践的要求,对有些自然加倍率低的材料,需对其进行人工加倍。

2.4.1 单倍体的自然加倍

对于散粉株率高的单倍体基因型,依靠育性的自然恢复就可实现自交结实。不同生态环境、种植时间倍性自然恢复株率不同。当单倍体植株有花药外露并有明显花粉产生时,小心取其花粉进行精细自交授粉,次日后,有花粉时再进行一次自交授粉。授粉后严格封闭好套雌穗的袋,避免外来花粉污染与虫媒花粉传染。

自然加倍特性可以通过再选择来提高,使用 2 个双单倍体(DH 系)材料组配成的杂交种为基础材

料进行下一轮选系时,可提高新选单倍体雄穗的自然加倍频率,更容易选育出新的自交系(育性恢复率从 9.4%提高到 33%)。

2.4.2 单倍体的人工(化学)加倍

对自然加倍率很低的单倍体基因型必须进行人工加倍处理。目前,加倍方法多是利用化学药剂破坏细胞有丝分裂的纺锤丝形成,使两个子细胞染色体在有丝分裂后期不移向两极,改变分裂细胞染色体倍性,实现染色体加倍。

加倍剂可使用抑制纺锤丝形成的化学药剂。目前,比较明确的加倍剂是秋水仙素、APM、氟乐灵、拿草特、安磺灵和一氧化二氮等。利用二甲基亚砷以及细胞分裂素与秋水仙素配合是最有效的加倍配方。加倍方法因不同单位、不同育种家的熟练程度加倍效果差异很大。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,必须由专人严格掌握实施。

加倍方法主要有浸种法、浸根法、浸芽法、注射法、田间喷洒除草剂(氟乐灵)等。目前加倍技术还不十分成熟,公认的高效方法正在研究验证中,随不同加倍方法、熟练程度以及不同时间、地点等获得的处理效果差异很大,重演性较差,但公认处理效果比较明显。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(浸根法、注射法较严重)。因此,要求严格按药品操作规程精细处理。

浸种法即用秋水仙素溶液浸泡萌动的单倍体种子。先将单倍体种子用清水浸泡 12 h,种子吸胀后,用浓度为 0.6 mg/mL 的秋水仙素溶液浸泡 24 h,再用清水浸泡 6 h 后播种,以减少对种子的毒害,同时也避免播种时对人的毒害,相应的结实率可达 14.29%。

注射法即用注射器将秋水仙素溶液注射到植株的生长点。在 6 叶期,以使用 0.4%~0.6%的秋水仙素配以 2.0%的二甲基亚砷(DMSO)混合溶液 2.0 μL 在茎尖生长点注射处理,加倍率可达 32.3%,是未处理的 5 倍。该方法的优点是不需要育苗和移栽,难点在于处理时期以及注射部位难以把握,尤其对注射部位的选择往往具有人为的因素而影响加倍的效果。随着秋水仙素浓度的提高,受药害的比例增加。

浸芽法即用秋水仙素溶液浸泡幼芽的方法。当单倍体子粒萌发的芽长到 2~3 cm 时,用浓度为 0.06~0.2 mg/mL 秋水仙素溶液浸泡根或芽 18、12 h,

再用清水浸泡 6 h,加倍成功率可以达到 18%以上。如果在种子胚芽处切口,加倍效率可以达到 18%~30%以上。

浸根法即用秋水仙素溶液浸泡单倍体根。可以在幼芽期或幼苗期进行,将 3 叶期单倍体幼苗的根系在 0.05%或 0.15%的秋水仙素溶液中浸泡 24 h 或 3 h,处理后需要进行育苗、移栽等,应确保处理后幼苗成活。该方法加倍效果比较好,雄花可育率达到 30%~60%,但所需药剂量较大,成本较高。

2.4.3 双单倍体子粒的收获、保存

自交果穗成熟后,小心收获其果穗,避免自交子粒的丢失。干燥后仔细脱粒,妥善保管,避免自交子粒的损害。

2.5 双单倍体植株的获得、鉴定及繁殖

2.5.1 双单倍体子粒的播种

将获得的双单倍体子粒按单穗分行,仔细精密播种,确保正常出苗。

2.5.2 双单倍体植株的鉴定

多株双单倍体植株的鉴定。同一果穗获得多个双单倍体子粒播种后,如果植株长势整齐一致,子粒无分离,且不是杂交种株型,则可基本确认为纯合的自交系。

单株双单倍体植株的鉴定。单株的双单倍体植株,收获前应根据植株形状、生长势、子粒色泽统筹考虑予以确认;如果长势良好可先自交后,于下一个生长季播种成穗行,获得的植株长势整齐一致,则即可确认为纯合的玉米自交系。

2.5.3 双单倍体自交系的繁殖

将确认为纯合自交系的双单倍体植株仔细自交授粉,获得自交子粒,下一代即可作为新自交系进行

配合力测定,用于杂交组合配制等。

3 单倍生殖诱导系的繁殖

Stock6 等单倍体诱导系子粒粉质,种皮崩裂,低温环境下极易粉种,同时发芽势、生长势很弱,高感叶斑病,高度倒伏,雌雄花期不调,自交结实困难,稍有不慎就难以获得种子。所以,单倍生殖诱导系的繁殖要特殊操作。

3.1 精细播种

应根据不同环境,选择干爽地点,忌干旱、低洼地块。采用直播、刨掩浇水、育苗移栽、晚播处理等播种方法,确保精细播种。

3.2 种植密度

根据土壤肥力、种植方式等确定种植密度,宜稀植不宜密植,一般保苗 4.5 万~5.5 万株/hm²为宜。

3.3 重复授粉

雄穗开始散粉后,在雌穗包叶上端用剪刀剪除包叶 1/3 左右,次日授粉,隔日再重复授粉;散粉后期再进行一次混合授粉,可有效地克服其结实性差的缺点,保存种源。

参考文献:

- [1] 才卓,徐国良,CHANG Ming-tang. 玉米单倍体育种研究进展[J]. 玉米科学,2008,(16)1:1-5.
- [2] 韩学莉,唐祈林,曹墨,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.
- [3] 刘纪麟,马克军. 诱发单倍体快速选系育种—单倍体—纯合二倍体选系方法[J]. 玉米科学,2003,13(3):70-72.
- [4] 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.
- [5] 邱法展. 玉米单倍体育种及苗期耐渍性研究[D]. 华中农业大学博士论文,2007.

(责任编辑:李万良)