

玉米杂交诱导孤雌生殖单倍体研究进展

刘志增 宋同明

(中国农业大学植物科技学院,北京 100094)

摘要:本文对玉米杂交诱导孤雌生殖单倍体的方法、诱导性的遗传、诱导机理和单倍体的加倍方法等进行综述,对该领域研究中存在的主要问题进行了分析和探讨。

关键词:玉米;单倍体;孤雌生殖;染色体加倍

中图分类号:S 513.0352

玉米单倍体是配子体无融合生殖的产物,包括孤雄生殖和孤雌生殖两大类。孤雄生殖主要是指花药组织培养,其特点是所获得的单倍体苗加倍频率较高,但花药愈伤组织的诱导受基因型影响颇大,多数材料难以成功。孤雌生殖是通过杂交或其它理化手段获得由未受精的雌配子发育成胚的单倍体种子。在自然状态下,孤雌生殖单倍体的发生频率一般不超过 0.1% (Chase, 1949)。50 年代育种家曾尝试借助子粒遗传标记来杂交诱导孤雌生殖单倍体种子,但是诱导率很低(Chase 1969)。另外采取射线处理的花粉授粉,以及变温或化学试剂等处理未授粉的雌穗(Mathur 等, 1980; 赵佐宁等, 1984; 郭乐群等, 1997), 也可以获得低频率的单倍体子粒。(Coe 1959)用一个来自南美洲的自交系给其它玉米授粉,发现在后代中产生大约 3% 的孤雌生殖单倍体植株。这些单倍体既不含父本的染色质,也不含父本的细胞质,其遗传特性完全取决于母本。这一他称之为 Stock6 的材料证明具有诱导高频孤雌生殖单倍体的能力。通过对 Stock6 的进一步改造,已经能获得单倍体诱导率达 15% 甚至更高的孤雌生殖诱导系(Aman 等 1978, Sarker 等 1994)。

显然,利用孤雌生殖诱导系杂交诱导单倍体不但诱导率很高,而且方法非常简单,所获得的单倍体完全取决于母本基因型的随机组合,它们经过染色体加倍,即可成为可育的纯合二倍体。因此具备应用于育种的基本要求。利用单倍体方法进行育种,不但可以大大缩短自交系的选育周期,加快育种进程,而且还可以实现配子选择,提高有利基因型的人选频率。此外,由纯合二倍体所构成的遗传群体还是进行基因分子定位、基因互作和分子标记研究的宝贵材料。

1 孤雌生殖诱导系杂交诱导单倍体的方法

所谓孤雌生殖诱导系是指用该系作父本杂交时,能够诱导其相应的母本产生显著高于自然频率的单倍体。其基本过程是:以选系用的基础材料为母本,用诱导系与之杂交,从当代杂交果穗上就可以产生一定比例的单倍体子粒。为了使单倍体子粒与杂交产生的二倍体子粒从形态上能够区分,Coe 等(1964)将显性遗传标记基因 $R-nj$ 和 P_1 导入孤雌生殖诱导系。 $R-nj$ 基因的效应是在胚中形成有色盾状体(紫色或红色),同时也能在胚乳糊粉层中产生有色顶冠,是双重遗传标记性状。这样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几种类型;(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(由父本的显性基因 P_1 控制)予以淘汰,植株为绿色的即为单倍体或双单倍体。

根据我们的实验观察,R-nj 基因的表达受遗传背景影响较大,给鉴别工作带来很大困难。因此如何加强其表达或者导入其它标记性状是成功利用这一方法必须解决的技术问题。

2 孤雌生殖诱导系的诱导特性遗传

孤雌生殖诱导系的诱导性状是在花粉中表达的遗传性状。早期的研究已经证明,Stock6 的诱导能力是遗传控制的(Sarkar 和 Coe,1966)。据 Aman 等(1978)报道,包含 Stock6 的杂交后代经三轮诱导性状的全姊妹选择后,其诱导单倍体的能力平均从 0.16% 提高到 3.6%,其中个别品系的诱导能力达 14.2%。但不同杂交背景之间存在较大差异。因此,Aman 认为诱导能力似乎是由具有加性效应的多基因所决定的,受环境影响较小。Sarkar 等(1994)选育含有 75% Stock6 遗传背景的早代材料作为诱导品系,获得了平均 3% 的单倍体诱导能力。经过进一步选择后,诱导能力稳步提高,许多品系超过 5%,最高者达 18.57%。由此可见,Stock6 的诱导性状由核基因控制,通过杂交选择可以改良和提高。Lashermes 等(1988)通过对 Stock6 杂交 F_1 、 F_2 和 F_3 代的分析指出,单倍体诱导力性状在 F_1 代呈显性, F_2 和 F_3 代出现分离,并显示出受三对显性基因控制的特征,其中一对基因对另两对基因具有上位性作用。但是这一遗传模式仍不能对 Stock6 杂交分离后代诱导能力出现的巨大差异做出令人满意的解释。

3 孤雌生殖诱导系的作用机制

Chang(1992)对孤雌生殖诱导系 Stock6 诱导产生的单倍体及纯合二倍体植株进行同工酶分析发现,单倍体及纯合二倍体的基因型是其母本基因型随机组合后的产物。因此,孤雌生殖种子的胚必然是由减数胚囊中的卵细胞发育而成。孤雌生殖种子的胚乳发育是正常的,为 $3n$ 胚乳。据 Sarkar 和 Coe(1966)报道,Stock6 成熟花粉均为三核花粉粒,排除了单精子花粉导致单倍体的可能性。因此可以推测,在双受精过程中,一个精核与两个卵核结合形成胚乳,而另一个精核未与卵核结合或结合失败, $3n$ 胚乳的发育可能会激活未受精的卵细胞发生分裂,从而产生单倍体胚。由于所产生的单倍体种子几乎都是单胚,很少有多胚现象,所以,可以推测胚囊中助细胞或反足细胞发育为单倍体胚的可能性不大。纯合二倍体是由于卵细胞的一次核内有丝分裂而来,还是胚囊内两个 n 细胞融合而来尚不清楚。

由于诱导特性是花粉性状,它可能与花粉粒中两个精核之间的发育差异有关。在正常的玉米成熟花粉粒中,一对精细胞虽然体积有明显的不同,但一般它们核的体积差异不大(胡适宜,1990)。Bylick 和 Chalysk(1996)在对 Stock6 衍生系 ZMS 的成熟花粉细胞观察后发现,与对照材料花粉相比,ZMS 花粉除大部分表现正常外,还有 6.32% 的花粉精核形态异常。在这部分花粉的两个精核中,其中一个形态正常,另一个形态要么偏大(可能尚未发育成熟)要么偏小(可能已经衰老)。这一异常花粉的比例恰好相当于 ZMS 诱导能力的两倍。如果两个精核与卵核和极核的结合是完全随机的过程,那么异常花粉中正常精核与卵核结合形成合子的概率为 3.16%,该合子由于胚乳未受精而不能发育成正常种子。同样这类精子与极核结合形成 $3n$ 胚乳的概率也为 3.16%,这类单受精一般可以诱导卵核发育为单倍体胚。这种巧合是属偶然还是规律,还有待进一步研究。但是可以推测,花粉粒中一个正常精核与一个不正常、可能无

受精能力的精核同时存在,是诱导产生单倍体的主要原因。

4 影响孤雌生殖诱导系诱导效果的因素

单倍体的产生除了取决于诱导系外,与母本遗传背景也有一定关系。Chase(1969)发现,经过多代农艺性状改良的材料作母本比未经改良材料产生单倍体频率高,单倍体的发生频率与雌配子体中致死和半致死基因的频率呈负相关。据刘志增和宋同明(1998)报道,从国内各类常用自交系中诱导出单倍体的频率有一定差异。

Prasanna 和 Sarkar(1995)在一个高单倍体发生系“ACR”中检测出活化的遗传移动因子 Uq 的存在。用该系作母本与 Stock6 杂交,诱导单倍体的频率平均为 4.23%,个别果穗的单倍体发生频率达 20.43%,表明移动因子的活动可能有助于单倍体的产生。

玉米雌花序不同部位所产生花丝的长度不同,花粉管穿越的距离也就不同。处在雌穗基部的小花,由于花粉管穿行的距离比较长,精核容易受损或发生变化,因而理论上基部果穗产生单倍体的频率似乎应高一些。然而 Sarkar 等(1995)对各种材料果穗上不同区段诱导产生的单倍体子粒进行统计表明,单倍体发生频率依次是,果穗顶部 > 中部 ≥ 基部。这种现象的原因还不清楚。

花粉和花丝的生活力与受粉和受精都有密切关系。但是降低 Stock6 花粉的生活力或推延母本花丝的受粉时间均不增加单倍体的发生频率(Aman 等,1981)。

5 单倍体染色体的加倍

由于单倍体植株的性母细胞不能进行减数分裂,因此不能产生可育配子。单倍体植株获得有性后代的唯一办法就是染色体加倍。染色体一经加倍即可成为可育的双单倍体(double haploid)纯系(或称 DH 系)。

5.1 自然加倍

在自然状态下,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。Khoklov 等检查了 17 800 个单倍体组织细胞,发现平均有 0.42% 的二倍体细胞(据 Chalyk, 1994)。这些加倍了的细胞是由于核内有丝分裂造成的。如果这些细胞处在分生组织,就会产生二倍体的生殖器官,实现单倍体的自然加倍。据 Chase(1952)报道,单倍体的自然加倍频率达 10% 左右。Zabirova 等(1993)和 Shatskaya(1994a)的资料显示,许多材料的单倍体自然加倍率低于 5%,有些材料不发生自然加倍。Chalyk(1994)发现,绝大部分单倍体的雄穗没有花药,因而表现完全的雄性不育性,但是当用其它花粉给单倍体果穗授粉,其结实株率可达 96% 左右。这表明雌花序比雄花序的自然加倍率要高。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,似乎可以认为,单倍体回复二倍性是细胞的一种本能反应。据我们试验观察,几乎所有诱导出的单倍体都可以正常抽丝,但绝大部分雄花不育。

Shatskaya 等(1992)研究发现,由 DH 系再诱导出来的单倍体,其自然加倍频率比一般单倍体高出 40%。用高频系与低频系杂交, F_1 代产生单倍体的自然加倍率倾向双亲平均值(Shatskaya 等, 1994b)。因此,单倍体的自然加倍特性也是一种遗传性状。

5.2 化学加倍

秋水仙素是目前最常用的染色体化学加倍剂,其加倍处理方法有种子浸渍法和幼苗浸渍法等。试剂浓度一般为 0.05% ~ 0.1% 左右。处理时间应少于一个细胞分裂周期。

秋水仙素的加倍效果与多种因素有关。药剂浓度在一定范围内与加倍效果成正相关,但

浓度过高会引起组织中毒,影响幼苗存活率。

处理时间与加倍有很大关系,处理时间太长会加重药害,还会产生多倍体。反之,处理时间过短,则起不到加倍作用。

提高温度可以促进染色体加倍,但同时也会加深药害,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)。

利用细胞助渗剂二甲基亚砷与秋水仙素配合,能有效地提高加倍频率(白守信等,1979)。

有趣的是,由自然加倍产生的 DH 系再诱导出的单倍体,经秋水仙素处理后,其染色体更容易加倍,在有的基因型中出现了 50% 的加倍率(Shatskaya, 1992)。

尽管如此,玉米单倍体的化学加倍频率仍不能令人满意。在有些情况下,如果扣除可能发生的自然加倍,化学加倍的效果并不十分显著(张铭堂,1992)。因此,探索更为有效的加倍方法,提高加倍频率,对于单倍体的利用具有非常重要的作用。

6 结语与展望

利用孤雌生殖诱导系诱导单倍体具有诱导频率高、方法简便、成本低等特点,是花药培养、化学诱导等其它方法无法比拟的。目前该方法在有些国家已在育种中应用,一些高频诱导系已被专利保护(私人通讯),限制了国际间材料的交流。我国要在玉米育种中利用这一技术,就必须创造自己的孤雌生殖诱导系。

在国内,有关诱导孤雌生殖单倍体的研究刚刚起步。据我们观察,诱导系 Stock6 对我国玉米种质同样具有较高的单倍体诱导能力,通过适当的遗传改良,我们已经创造出了诱导率和其他综合性状得到全面提高的新的孤雌生殖诱导系(资料未发表)。因此,进行单倍体育种尝试的基本条件可以说已经具备。诱导系诱导性状的遗传规律和诱导机制的揭示对充分发掘单倍体诱导潜能无疑会具有重要指导作用。但这方面的报道很少,还有待进一步探索。

单倍体的加倍频率直接关系到单倍体育种的效率。化学加倍虽然已取得一些成功经验,但效果并不十分理想,如何提高化学加倍率仍是一个值得研究的问题。

参 考 文 献

- [1] 白守信,等.单倍体小麦染色体加倍的研究.遗传学报,1979,6(2):230-232.
- [2] 曹孜义,等.玉米单倍体胚性细胞无性系二倍化研究.遗传学报,1983,10(4):274-279.
- [3] 郭乐群,谷明光,等.药物诱导玉米远缘杂种孤雌生殖获得异源种质纯系及其育种研究.遗传学报,1997,24(6):537-543.
- [4] 胡适宜.雄性生殖单位和精子异型性研究的现状.植物学报,1990,32(3):230-240.
- [5] 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.中国农业大学学报,1998,3(增刊):6-10.
- [6] 赵佐宁,谷明光.药物诱导玉米孤雌生殖获得二倍体纯系.遗传学报,1984,11(1):39-46.
- [7] 张铭堂.四十年来玉蜀黍遗传研究的进展.科学农业,1992,40(1-2):53-80.
- [8] Aman M A, Sarkar K R. Indian J. Genet and Plant Breed, 1978, 38(3):452-457.
- [9] Aman M A, Mathur D S and Darkar K R. Indian J. Genet, 1981, 41(3):362-365.
- [10] Bylich V G and Chalyk S T. MNL, 1996, 70:33.
- [11] Chalyk S T. Euphytica, 1994, 79:13-18.
- [12] Chang M T. MNL, 1992, 67:98-99.

(下转第 38 页)

- [13] Chang M T. MNL, 1992, 67: 99 – 100.
- [14] Chase S S. Genetics, 1949, 34: 328.
- [15] Chase S S. Agron. J., 1952, 44: 263 – 267.
- [16] Chase S S. Bot. Rev. 1969, 35: 117 – 167.
- [17] Coe E H. Amer. Nat. 1959, 93: 381 – 382.
- [18] Coe E H and Sarkar K R. J. Hered. 1964, 55: 231 – 233.
- [19] Lashermes P and Beckert M. Theor. Appl. Genet. 1988, 76: 405 – 410.
- [20] Mathur D S, M A Aman, K R Sarkar. Current Science, 1980, 49: 744 – 746.
- [21] Prasanna B M and SarKar K R. MNL, 1995, 69: 108.
- [22] Sarkar K R and Coe E H. Genetics, 1996, 54: 453 – 464.
- [23] SarKar K R, Pandey A, Gayen P, et al. MNL, 1994, 68: 64 – 65.
- [24] SarKar K R, Prasanna B M and Gayen P. MNL, 1995, 69: 107.
- [25] ShatsKaya O A, Shcherbak V S, Churnak M S and Zabirowa E R. MNL, 1992, 66: 58.
- [26] ShatsKaya O A, Zabirowa E R, Shcherbak V S and Chamak M V. MNL, 1994, 68: 51(a).
- [27] ShatsKaya O A, Zabirowa E R and Shcherbak V S. MNL, 1994, 68: 51 – 52(b).
- [28] Zabirowa E R, ShatsKaya O A and shcherbak V S. MNL, 1993, 67: 67.

The Advances In The Studies Of gynogenetic Haploid Induction Through Hybridization In Maize

LIU Zhi-zeng SONG Tong-ming

(College of Plant Sci. & Tech, China Agri. Univ., Beijing 100094)

Abstract: Researches in the method of gynogenetic haploid induction through hybridization, inheritance and mechanism of the haploid – inducing charatcer, as well as haploid doubling method in maize were reviewed. The discussion focused on the existing problems in the researches.

Key words: Maize; haploid; Gynogenesis; Chromosome doubling