

单倍体技术在玉米育种上的应用研究进展

蔡 泉, 曹靖生, 史桂荣, 郭晓明, 张建国, 赵 伟, 李树军, 金 玲
(黑龙江省农业科学院玉米研究所, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要: 综述了玉米单倍体育种技术研究进展以及在玉米育种中的应用。包括玉米单倍体获得的方法、鉴定方法、单倍体加倍方法、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: S511 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)04-0015-03

Development in the Research of Technology of Haploid Breeding in Maize

CAI Quan, CAO Jing-sheng, SHI Gui-rong, GUO Xiao-ming, ZHANG Jian-guo, ZHAO Wei, LI Shu-jun, JIN Ling
(Maize Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: The brief introduction was summarized on the progress and application of haploid breeding in maize. Including the method how to get and evaluate the haploid, haploid doubling and applying in maize breeding. The discussion and analysis were showed about existing question, circumstance and developing tendency on haploid breeding in maize.

Key words: maize (*Zea mays* L.); haploid; breeding

玉米育种的成功在很大程度上取决于选育方法和选择的正确性。选育高产、高抗、高配合力的“三高”优良自交系, 是玉米育种的核心环节。常规的育种方法选育自交系, 获得一个纯系的时间平均大约需要 6 a 左右^[1], 时间期限长, 耗费大量的人力和物力。单倍体育种技术直接利用配子体进行选择, 提高有利基因型的入选频率, 大大缩短自交系的选育年限。在国外已经投入了大量的人力、物力、财力进行了卓有成效的研究工作^[2]。单倍体技术在自交系的选育过程中已经是主要的、常规的方法之一, 综述单倍体技术的应用与研究进展, 促进单倍体技术在玉米育种中的应用十分必要。

1 单倍体的产生途径及鉴定

1.1 单倍体的概念

单倍性 (haploid) 变异是指同一物种中出现体细胞只具有配子染色体数目的变异。携有配子染色体数的个体称为单倍体。单倍体植株体细胞染色体数目只为亲本的一半, 其体细胞、细胞核和花粉母细胞都变小, 花粉粒小而空瘪, 不能正常授粉结实。

1.2 玉米单倍体产生的途径

1.2.1 自然发生的单倍体 在自然界中, 玉米在生殖

过程异常的情况下, 有时会引起孤雌或者孤雄生殖而产生单倍体, 但几率极低, 一般不超过 0.1%^[3], 仅为 $10^5 \sim 10^8$ 。

1.2.2 远缘杂交 在远缘杂交中, 可能缘于双亲体细胞分裂周期的不同步导致某一亲本染色体丢失, 常出现大量的不稳定的“非整倍体”杂种类型, 引起单倍体的发生。

1.2.3 孤雌生殖 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; 利用射线照射玉米成熟的花粉粒给正常植株授粉, 刺激卵细胞单性发育成单倍体; 利用化学药剂处理未授粉果穗, 均可诱导产生单倍体^[4]。

1.2.4 孤雄生殖 孤雄生殖就是玉米花药培养, 以单核期的花药为材料, 利用组织培养技术诱导其分裂形成愈伤组织或胚状体, 再转入分化培养基形成再生苗, 然后转至生根培养基诱导生根, 形成单倍体植株^[5]。

1.2.5 利用单倍体诱导系杂交获得玉米单倍体 利用远缘杂交、孤雌生殖、孤雄生殖等诱导产生单倍体的方法均有各种不足, 无法使单倍体技术广泛的应用于玉米育种^[6]。

利用单倍体诱导系作亲本杂交时, 能显著提高另一亲本产生单倍体的频率。1959年 Coe 发现玉米单倍体诱导系 Stock6, 玉米单倍体育种技术由设想过渡到实施^[7]。但是 Stock6 在诱导率 (平均 1%)、繁殖性能、抗逆性等各方面存在诸多缺陷, 因此各国的育种家根

收稿日期: 2008-11-19

基金项目: 国家“863”计划项目 (2006AA 100103)

第一作者简介: 蔡泉 (1979-), 男, 黑龙江省牡丹江市人, 硕士, 助理研究员, 主要从事玉米新品种选育与推广工作。E-mail: caiquan6539@163.com.

据本国的实践,相继对 Stock6 进行了改良,选育出一批诱导率高、农艺性状良好的诱导系。Lashermes 从 Stock6×w 23(ig)后代中选育出诱导系 SW14^[8]; Sarker 从 Stock6 的回交后代中获得了诱导率超过 5%的新材料^[9];在我国,中国农业大学宋同明等从 Stock6×BHO(高油群体)后代中获得诱导率 5.34%的诱导系农大高诱 1 号^[10];吉林农科院才卓等从 Stock6×M278 后代中选育出诱导系吉高诱系 3 号^[11]。

利用单倍体诱导系杂交诱导产生玉米单倍体,鉴定方法简单,易操作,是目前获得单倍体的最经济最有效的途径之一。

1.3 玉米单倍体的鉴定

1.3.1 形态学鉴定 玉米单倍体植株的主要植物学特征是植株细弱,单倍体成株高度约为同基因型纯合二倍体植株高度的 70%,有学者认为,株高鉴定是鉴定单倍体植株最快速的方法^[12]。

1.3.2 细胞学和解剖学鉴定 染色体倍性鉴定通常采用根尖压片法计数染色体数和观察开花结实情况两种方法。染色体计数法是确定染色体倍性最基本、最直接、最可靠的方法^[13]。

1.3.3 遗传标记鉴定 利用遗传标记是目前鉴定玉米单倍体最为有效的方法^[13]。Coe 发现的 Stock6 导入了籽粒 Navajo 标记的 *R-nj* 基因和紫色叶鞘标记的 *ABPI* 基因,根据籽粒表型性状(籽粒顶部和胚芽颜色)对单倍体作初步判断,其中胚乳糊粉层为紫色,胚芽无色的为单倍体籽粒,胚乳糊粉层与胚芽均为紫色或无色的为杂交二倍体籽粒,并且可在田间根据植株 *ABPI* 紫色标记对单倍体作进一步判断,凡幼苗叶鞘绿色者为单倍体,紫色者为杂交二倍体。

宋建成等引入幼苗光叶基因 *gl*,在一定程度上有助于单倍体植株的识别^[14];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%,明显高于籽粒 Navajo 标记法挑选的准确率,突破了单纯依靠颜色标记进行单倍体筛选的局限性^[10]。刘志增等发现并引入了黄绿苗材料 Syn695yg 测定各类不具有特殊标记材料的单倍体诱导率^[15]。

1.3.4 生理生化特性的区别 Tyecha 研究发现,当玉米由二倍体转变为单倍体水平时,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,可以区分单倍体和二倍体,但不能区分整单倍体和非整单倍体。

1.3.5 分子标记鉴定法 汤飞宇等利用 SSR 标记并结合大田农业性状,对玉米 178×黄 C 杂交种子房培养的再生植株后代进行遗传分析,结果证明两个株系在随机检测的 20 个位点上均表现纯合,为自发加倍的双单倍体^[16]。

2 玉米单倍体的加倍

单倍体的加倍主要有自然加倍和人工诱变加倍两种主要途径。

2.1 自然加倍

自然状态下单倍体各器官组织的体细胞自然加倍现象普遍存在。玉米单倍体自然加倍率一般为 5%~10%,许多材料的自然加倍率低于 5%,但也有不发生自然加倍的材料^[17-19]。

2.2 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。利用秋水仙素处理加倍玉米单倍体染色体的可行方法主要有浸种法、浸根法、注射法和培养基掺入法等。

2.2.1 浸种法 用秋水仙素浸泡单倍体种子是最简单的加倍处理方法。处理后的单倍体种子的根被加倍而膨大,膨大后的根生长缓慢或停止伸长,造成幼苗夭亡,加倍成功率较低。Gayen 用 3 种秋水仙素浓度(0.03%、0.06%和 0.10%),3 个处理时间(6、12、24 h),2 种种子处理方法(在种子胚芽处切口与不切口),共 18 个处理浸种,结果发现胚芽切口的玉米种子在 0.06%的秋水仙素溶液中浸泡 12 h 效果最好,加倍率达到了 18%^[20]。

2.2.2 浸根法 Seaney 将 18 株单倍体幼苗根系在浓度为 0.05%的秋水仙素溶液中浸泡 24 h 后种植,有 11 株雄花能散粉,而 11 株对照中仅有 3 株散粉。Bords 等将 3 叶期的单倍体幼苗根浸入 0.15%秋水仙素溶液 3 h,发现处理后单倍体植株的雄花可育率达 30%~60%,而对照全部雄花不育^[21]。

2.2.3 注射法 Chase 用 0.05%秋水仙素+10%甘油的水溶液 0.5 mL 注射玉米幼苗的盾片叶,结实率较对照提高 3 倍多^[22];魏俊杰等在 6 叶期和拔节期用不同浓度 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^[23]。刘志增等得到不完全一致结果,但仍以 6 叶期注射茎尖生长点的加倍效果最佳,散粉株率达到 23.08%,较对照提高 3.6 倍^[24]。与浸种、浸根处理相比,注射法无需育苗、移栽、用药量少,适于田间对大量单倍体植株进行加倍处理。

2.2.4 培养基掺入法 花药培养诱导单倍体时,可将愈伤组织临时转入掺有低浓度秋水仙素的培养基中,使愈伤组织单倍体体细胞加倍成二倍体,再经分化形成二倍体花粉植株,该法的加倍率远高于直接处理单倍体植株的加倍率。Wan 等在含秋水仙素 0.025%~0.050%的培养基上培养愈伤组织 24 h,50%的花粉植株加倍;培养时间延至 72 h,花粉植株全部加倍,而对照全为单倍体^[25]。Barnabas 用同样的方法处理,发现高浓度秋水仙素诱导效果比低浓度好,并获得 60%~

70%的花粉植株^[26]。

张铭堂认为:如果能够扣除自然加倍的频率,人工化学诱变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使用的关键问题之一^[27]。

3 加倍单倍体品系(DH系)和自交系特性比较

Chalyk 研究表明,所测农艺性状均值 DH 系皆低于自交系^[28]。Lashemes 等^[29]、刘志增等^[30] 研究结果类似:由单倍体加倍所得的 DH 系在所有可观测性状上均表现为高度的一致性,一些 DH 系的生长势和果穗性状表现在育种上是可以接受的。Murigneux 等对来源相同的 120 个 DH 系与 81 个单粒传系的比较研究发现, DH 系在综合农艺性状方面与单粒传相当,仅有少数性状逊色于自交系^[31]。因此,若创造的 DH 群体足够大,完全有可能从中获得目标性状达到甚至超过常规自交系的优良类型。

4 单倍体在玉米育种中的应用

单倍体技术选育玉米自交系在国外已经广泛应用,目前国外大约 60%的马齿型自交系,30%的硬粒型自交系由单倍体技术选育出来。在我国最早开展此项研究的是中科院遗传所,通过孤雌生殖技术,在不到 20 a 里育成 3 000 多个孤雌生殖纯系,其中综合性状优良或个别性状突出,可直接或者间接用于育种的近 350 个,此外近几年中国农业大学、华中农业大学、河北农业大学、吉林省农业科学院、山东省农业科学院和辽宁省农业科学院等也都先后从事了这方面的研究,目前也都育成了多个性状较优良的 DH 系,并且选育出多个优良组合参加国家级和省级区域试验,有的组合已经通过审定并在生产上推广。

5 玉米单倍体育种存在的困难及发展趋势

人们很早就产生了在作物育种中利用单倍体技术的思想,一直无法实现,这是因为有两个限制因素: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。玉米育种中有效的应用单倍体技术,需要解决几个关键技术:如何简便且大规模地获得单倍体植株,这个问题随着越来越多的优良的诱导系的出现,已经不再困难;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。后两个问题还需要做更深入的研究。

玉米单倍体育种的优点: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;淘汰有害的、致死和半致死的隐性基因。其缺点是,不能有效打破不良基因连锁,基因间的重组率较低,单倍体的诱导频率不高。此外,重组二倍体时,染色

体加倍有一定的困难。随着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。

单倍体技术在玉米育种中的应用前景十分诱人,首先对目标诱导材料进行重组与改良,使其积累足够的有利基因位点,然后利用单倍体技术使优良的基因快速纯合,获得性状优良的纯系,这将会极大地发挥单倍体育种技术的优势,极大提高玉米育种的效率。未来的工作将以进一步完善单倍体诱导体系、提高单倍体诱导率和提高单倍体加倍技术为重点研究方向。

参考文献:

- [1] Kuo C S, Guo Z C, Li Z et al. Another culture and haploid breeding of maize in China [J]. *Biotechnology in Agriculture and forestry*, 1994, 25: 149-161.
- [2] 王建革. 单倍体技术在育种中的应用[J]. *国外农学-杂粮作物*, 1996(4): 7-8.
- [3] Chase S. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize and its component single cross hybrids and inbred lines [J]. *Genetics* 1949, 34: 328-332.
- [4] 王文和. 未授粉子房和胚珠离体培养诱导植物雌核发育研究进展 [J]. *植物学通报*, 2005, 22(增刊): 108-117.
- [5] 胡道芬. 植物花培育种进展 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996.
- [6] 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, 11(专刊): 70-72.
- [7] Coe E. A line of maize with high haploid frequency [J]. *Amer Nat*, 1959, 93: 381-382.
- [8] Lashemes P, Beckert M. Genetic control of maternal haploid in maize and selection of haploid lines [J]. *Theor. Appl. Genet*, 1988, 76: 405-410.
- [9] Sarkar K R, Pandey A, Cayen P. Stabilization of high haploid inducer lines [J]. *Maize Genet News Lett*, 1994, 68: 65-65.
- [10] 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]. *玉米科学*, 2003, 29(4): 587-590.
- [11] 才卓, 徐国良, 刘向辉, 等. 玉米高频率单倍体诱导系吉高诱 3 号的选育 [J]. *玉米科学*, 2007, 15(1): 1-4.
- [12] 韩学莉, 唐祈林, 曹墨菊, 等. 用 Stock 6 杂交诱导的单倍体鉴定方法初探 [J]. *玉米科学*, 2006, 14(1): 64-66.
- [13] 梁文科, 戚廷香, 徐尚忠, 等. 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.
- [14] 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.
- [15] 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]. *玉米科学*, 2000, 26(5): 570-574.
- [16] 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.
- [17] Chalyk S T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding [J]. *Euphytica*, 1994, 79: 13-18.
- [18] Zabirowa E, Shatskaya O, Shcherbak V. Line 613/2 as source of a high frequency of spontaneous diploidization in com [J]. *Maize Genet Coop News Lett*, 1993, 67: 67.
- [19] Shatskaya O, Zabirowa E, Shcherbak V, et al. Mass induction of maternal haploid in com [J]. 1994, 68: 51-52.
- [20] Gayen P, Sarkar K. Cytomixis in maize haploids [J]. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 1996, 56(1): 79-85.
- [21] Seaney P R. Studies on monoploidy in maize [M]. New York: Cornell University, 1955.

(下转第 20 页)

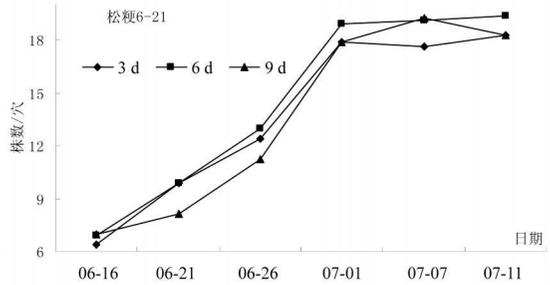
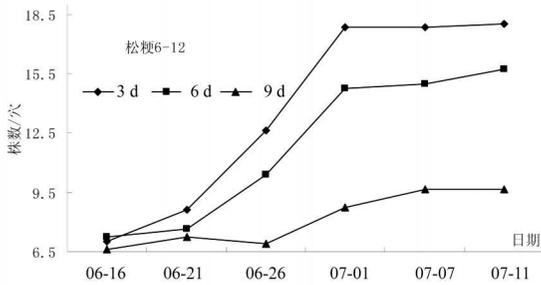


图1 处理温度与水稻分蘖

出(见表1), 低温处理对水稻最大分蘖数和最高分蘖日期有很大影响。水稻的最高分蘖数随低温处理的延长而显著下降, 大部分品种低温处理3 d和6 d的最大分蘖数差异较大, 6 d和9 d的最大分蘖数差异相对较小。低温处理3 d的水稻最大分蘖数与

适温条件相比差异不大, 有些品种(空育131、龙稻3号和垦稻10号)的最大分蘖数比适温条件下的还高。由此可见, 3~6 d的低温处理严重影响水稻分蘖的发生, 而低温处理时间低于3 d对水稻的最大分蘖数影响不大。

表1 不同温度处理对水稻最高分蘖期的影响

品种	最高分蘖数						最高分蘖日期					
	12-3	12-6	12-9	21-3	21-6	21-9	12-3	12-6	12-9	21-3	21-6	21-9
空育131	16.38	12.84	10.50	16.00	15.25	13.50	07-11	07-11	07-07	07-07	07-11	07-11
龙稻7号	15.38	11.88	11.00	16.13	14.13	15.63	07-01	07-07	07-11	07-07	07-07	07-11
龙稻3号	20.75	12.38	12.25	19.25	17.88	17.50	07-11	07-11	07-01	07-01	07-07	07-07
垦稻10号	17.25	13.63	12.88	16.88	16.63	17.25	07-01	07-01	07-01	07-07	07-07	07-07
龙粳16	12.75	8.25	8.00	13.50	13.25	14.63	07-07	07-01	07-07	07001	07-07	07-07
松粳6号	17.88	15.75	9.63	18.25	19.38	19.25	07-01	07-11	07-07	07-11	07-11	07-07

注: 12-3表示处理温度为12℃, 处理天数为3 d。

3 结论与讨论

李家洋^[1] 课题组研究发现了控制水稻分蘖的 *MOC1* 基因, 奠定了水稻分蘖的分子生物学研究基础, 为深入研究水稻分蘖发生的分子生物学机理提供了思路。而环境温度对基因的表达有着重要影响, 环境温度的高低严重影响水稻分蘖, 尤其是低温使水稻分蘖发生减缓^[2,4]。本项研究结果表明低温处理对分蘖的发生具有明显的抑制作用, 不同品种对低温的敏感度不同, 以上的研究结果在一定程度上支持这个结论。

高桥保一^[5] 认为分蘖芽分化发育的前两个阶段(即分化、定性阶段)对环境条件的反应都十分敏感, 而以后的发育过程则不受外界因素的控制。蒋彭炎^[6] 对水稻分蘖芽的环境敏感期做了研究, 认为搞清水稻分蘖芽的各个发育时期对环境条件的反应有助于准确有

效地控制或促进分蘖。本项研究表明3~6 d的低温处理严重影响水稻分蘖的发生, 而低温处理时间低于3 d对水稻的最大分蘖数影响不大。

参考文献:

[1] 李家洋. 水稻分蘖数目与分蘖角度的分子机理[J]. 中国基础科学, 2008(3): 14-15.
 [2] 王定平, 唐晋, 李润发, 等. 提高冷浸田土壤温度对水稻生长发育影响的分析[J]. 陕西气象, 1999(4): 20-22.
 [3] 程彩霞. 水稻分蘖消长动态与产量的研究[J]. 中国稻米, 2007(1): 37-9.
 [4] 詹可, 邹应斌. 水稻分蘖特性及成穗规律研究进展[J]. 作物研究, 2007, 21(5): 588-591.
 [5] 高桥保一. 利用深水管理控制水稻无效分蘖[J]. 国外农学, 1986, 12(1): 41-42.
 [6] 蒋彭炎. 水稻三高一稳栽培法纵论[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1993: 84-87.

(上接第17页)

[22] Chase S. Production of homozygous diploids of maize from monohaploids[J]. Agron. J., 1952, 44: 263-267.
 [23] 魏俊杰, 李红梅, 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, 2004, 9(3): 12-13.
 [24] 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.
 [25] Wan Y J, Petolino, Widholm J. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus[J]. Theor Appl Genet, 1989, 77(6): 889-892.
 [26] Barnabas B, Oberst B, Kovacs G. Colchicine an efficient genome-doubling agent for maize(Zea mays L.) microspores cultured in anthero[J]. Plant Cell Reports, 1999, 18(10): 858-862.

[27] 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.
 [28] Chalys S. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding[J]. Euphytica, 1994, 79(1-2): 13-18.
 [29] Lashermes P, Beckert M. Genetic control of maternal haploidy in maize(Zea mays L.) and selection of haploid inducing lines[J]. Theor Appl Genet, 1988, 76(3): 405-410.
 [30] 刘志增. 玉米孤雌生殖诱导机理与遗传探讨及高效单倍体诱导系的培育和利用[D]. 北京: 中国农业大学, 1999.
 [31] Muirgneux A, Barloy D, Lero Y P, et al. Molecular and morphological evaluation of doubled haploid lines in maize. 1. Homogeneity within DH lines[J]. Theor Appl Genet, 1993, 86: 837-842.