

# 玉米单倍体育种技术的研究进展

张 强

(黑龙江省农业科学院 草业研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**为探索高效玉米育种技术,加速育种进程,介绍了单倍体的产生途径,阐述了玉米单倍体的加倍方法,初步分析了玉米单倍体育种技术在育种实践中存在的问题及应用前景。

**关键词:**玉米;单倍体;育种技术

**中图分类号:**S513

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2014)09-0150-04

玉米是集粮、经、饲于一体的三元作物,也是世界上最重要的粮食作物之一,对国民经济和人们的生活具有重要的意义。玉米是我国种植面积第一大的作物,2012年,玉米播种面积超过3 400万 $\text{hm}^2$ 。玉米是典型的利用杂种优势的作物,因此,自交系的选育是利用杂种优势的核心。目前,国内外95%以上的育种力量都集中于利用轮回选择法、回交法和二环系法等常规育种方法。轮回选择法是把短期、中期、长期的育种目标结合起来使用的育种方法,对提高群体中数量性状有利基因频率是有效的。回交转育法是改良玉米自交系的快速有效的方法,以能提供某种优良性状的有利基因的自交系作为供体,通过连续回交将有利基因导入受体自交系中。二环系法是目前育种中的常用方法,具有操作简易、见效快等优点。但是,这些常规途径选育的自交系往往要经过6~10代才能达到相对的纯合,需要花费大量的人力、物力和财力<sup>[1]</sup>。

单倍体育种技术通过利用配子体进行选择,而且只需两代即可获得理论上完全纯合的纯系。在杂种优势育种中,加倍单倍体可用于选择固定杂种优势,也可用于杂优组合的配制,还可以利用单倍体技术选育雄性不育系、保持系和恢复系等。这对缩短育种时间、提高选择效率、提高诱变育种效能等都具有重要意义<sup>[2]</sup>。当前利用优异种质快速选育玉米自交系和杂交种是育种技术创新的主要方向之一。而单倍体育种技术由于方法简单,操作简便,已成为国内玉米育种有效方法之一。但是因为玉米单倍体雄穗育性恢复率比较低,是限制玉米单倍体实际利用的因素之一。因此,探

索高效的单倍体加倍技术成为了研究单倍体育种技术的重点。目前最常用的加倍剂仍然是秋水仙素,因此,寻找最合适的秋水仙素浓度和合理施用的方法<sup>[3-5]</sup>是单倍体育种技术的必要基础。

## 1 玉米单倍体育种的研究情况

单倍体是指只具有配子染色体的个体或细胞。单倍体可由雌配子或雄配子产生。高等植物中自然出现的单倍体几乎都是由生殖过程不正常产生的,如孤雌生殖和孤雄生殖等。孤雌生殖是自然产生单倍体的主要方式,它是指卵细胞未经受精而发育成单倍体的孢子体。

单倍体可自然发生,也可以通过诱导的方式产生。玉米中的单倍体最早于1929年由Stadler和Randolph报道,研究发现单倍体的频率因杂交组合的不同而差异很大<sup>[6-7]</sup>。

单倍体诱导方法包括花药培养和小孢子培养等。目前,在玉米育种实践中主要利用单倍体诱导系杂交人工诱导产生单倍体。其基本过程是以选系用的基础材料为母本,以孤雌生殖诱导系为父本进行杂交,在当代杂交果穗上就可以产生一定比例的单倍体籽粒。为了从表型上区分二倍体籽粒与单倍体籽粒,需要借助一定的遗传标记。后来人们将显性遗传标记基因 $R-nj$ 和 $P1$ 导入了孤雌生殖诱导系。Kato利用带有 $R1-scm2$ 基因的Stock6诱导系进行单倍体诱导,杂交后代的单倍体鉴定效率达到94%,远远高于 $R-nj$ 的鉴定效率<sup>[8]</sup>。因此通过胚、胚乳以及茎秆颜色可以较容易地把单倍体鉴定出来。

单倍体的一个典型特征就是不育,因而无法自交结实。如何将不育的单倍体转化为可育的二倍体,是单倍体育种中的重要前提。自秋水仙素被发现具有细胞染色体加倍功能之后,人们广泛利用秋水仙素进行探索,在不同的作物中形成了各自较为有效的加倍技术,使单倍体育种成为了

收稿日期:2014-06-04

作者简介:张强(1986-),男,黑龙江省哈尔滨市人,硕士,研究实习生,从事玉米遗传育种研究。E-mail:zhangqiang\_aa@163.com。

可能。1969 年 Chase 通过玉米自发产生获得 DH 系,并成功地组配了商业品种<sup>[9]</sup>。之后人们一直不断摸索玉米单倍体的人工加倍方法。近年来,由于单倍体诱导效率和加倍效率的不断提高,以杂交诱导为基础的玉米单倍体育种技术成为了玉米育种的重要手段。许多国外的科研机构 and 种业都能够熟练运用此种技术指导玉米生产<sup>[10]</sup>。我国单倍体育种开展的较晚,但进展较快。1973 年,我国在玉米和小麦上进行了孤雌生殖的研究,并取得了一定进展<sup>[11-12]</sup>。玉米花药培养单倍体于 1975 年在我国首先获得成功<sup>[13]</sup>。赵佐宇和谷明光以二甲基亚砷和秋水仙素的混合液作为加倍剂进行了玉米孤雌生殖方面的研究,并且获得了一定数量的纯合二倍体<sup>[14]</sup>。张铭堂用诱导系 Stock6 作父本,以单交种作母本进行杂交诱导,获得种子 305 100 粒。从中选出了紫顶并且胚芽是无色的种子 1 730 粒,作为拟单倍体籽粒进行播种,待幼苗长出 2~3 片叶时,用浓度为 0.05% 的秋水仙素进行处理,最终获得 249 个双倍体纯系<sup>[15]</sup>。刘志增等对诱导系 Stock6 进行了改良,成功培育了诱导率 5%~6% 的孤雌生殖诱导系高诱一号<sup>[12]</sup>。才卓等选育出了单倍体诱导率高达 10.4%(显著高于 Stock6)的新诱导系-高诱三号,该诱导系遗传标记明显而且抗病性强<sup>[16]</sup>。

## 2 单倍体的育性恢复

### 2.1 单倍体育性的自然恢复

由于玉米单倍体的雌穗均可育,单倍体自交结实的限制因素是雄穗的育性,所以必须采用人工加倍。

单倍体多数表现出高度不育,但是往往也存在一定程度的育性恢复。单倍体植株的雌穗大部分都可以正常生长发育<sup>[17]</sup>。超过 95% 雌穗都能够恢复育性,而雄穗的自然加倍率不超过 2%<sup>[18]</sup>。许多材料的自然加倍率低,甚至不发生自然加倍。不同单倍体基因型间雄穗恢复可育的能力存在很大差异。由此可知,绝大部分的雄穗不能正常生长发育是限制单倍体育种技术应用的主要因素。也有研究认为雄穗育性的恢复不但与基因型有关,也与周围的环境影响有关<sup>[19]</sup>。

Gayen 等研究发现细胞间有时会发生细胞质融合,染色质会在细胞间转移,因此认为细胞融合是影响单倍体雌穗结实性及花粉育性的因素之一<sup>[20]</sup>。而 Testillano 等认为细胞核融合导致了染色体加倍<sup>[21]</sup>。Chalyk 认为玉米雄穗存在不同时期体细胞加倍的现象<sup>[18]</sup>。段民孝等试验结果

表明,玉米单倍体的自然加倍率因种植地点不同而存在很大的差异,在甘肃张掖春播种植玉米单倍体的自然加倍效果最好;北京春播处理玉米单倍体的自然加倍率最低<sup>[22]</sup>。蔡泉等以德国引进的诱导系 Y02 为父本,杂交诱导 4 组来源不同的母本材料,结果表明玉米单倍体的自然恢复情况因母本材料的基因型和播种地点的不同差异极显著,其中海南玉米单倍体的自然加倍效果好于黑龙江<sup>[23]</sup>。

### 2.2 秋水仙素化学加倍

单倍体的染色体加倍,不同物种、不同起源的单倍体方法有所不同。在有些情况下,单倍体有可能产生极少量的可育种子,这对通过种子和幼苗处理加倍染色体是有利的。目前最常用的仍然是秋水仙素诱导处理,单倍体染色体加倍。关于使用浓度和具体方法,在许多作物中都已经积累了不少经验,一般并不困难。但是要做到高频率、低损伤、低成本、简单快捷,还需要进一步研究摸索。玉米与其它作物相比,单倍体的化学加倍率是比较低的。这与玉米本身的特点有关,如幼苗根系不发达使得处理后不易成活,而不具有分蘖也减少了茎尖加倍的机率等。

**2.2.1 浸种法** 一种简便易行的方法,将单倍体种子浸泡于秋水仙素溶液中,具体操作程序、浸泡时间以及不同浓度秋水仙素等都会影响单倍体的加倍率。Gayen 等采取不同秋水仙素浓度,不同处理时间以及在种子胚芽处进行切口处理。结果表明以种子胚芽切口、0.06% 秋水仙素溶液浸泡 12 h 加倍效果最好<sup>[24]</sup>。季洪强等研究表明,采用浓度为 0.6 g·L<sup>-1</sup> 的秋水仙素溶液浸泡萌动的玉米单倍体种子,加倍效果较好<sup>[25]</sup>。浸种法一般在放入秋水仙素溶液中浸泡之前都会先采用清水浸泡处理,待种子吸胀后,再进行秋水仙素溶液浸泡处理,最后用清水处理种子以减轻秋水仙素对种子的毒害作用。

**2.2.2 注射法** 指将适当浓度的秋水仙素用注射器注射到单倍体幼苗第一盾片节生长点的方法。注射器选取常规的微量注射器,注射量取决于注射的浓度,一般为 0.1 mL。秋水仙素的浓度、用量和注射时期都会影响处理结果。文科等研究表明,当单倍体幼苗长出 6~7 片叶时,用注射器将秋水仙素溶液注射到玉米单倍体植株茎秆的第一盾片节顶端的生长点,发现单倍体加倍率较高,散粉和结实情况相对较好<sup>[26]</sup>。Chase 将 0.5 mL 浓度为 0.05% 的秋水仙素和 10% 甘油的混合液注射到单倍体植株第一盾片的生长点,发

现处理组的结实率显著高于对照组<sup>[27]</sup>。魏俊杰等以利用高诱 1 号杂交诱导不同基因型的母本材料,以诱导出的单倍体籽粒为材料,当单倍体幼苗生长出 6 片叶子的时候,用不同浓度的秋水仙素(0.1%、0.5%、1.0%)和二甲基亚砜(DMSO)的混合液采用注射法处理玉米单倍体幼苗,结果表明浓度为 0.5%的秋水仙素溶液处理玉米单倍体幼苗的加倍效果最好,加倍率显著高于对照<sup>[28]</sup>。岳尧海等用 2 种浓度的秋水仙素(0.1%、0.5%)与 2.0%的二甲基亚砜混合液采用注射法进行玉米单倍体加倍,结果表明其混合液注射处理 5~6 叶期玉米单倍体幼苗的加倍率最高<sup>[29]</sup>。注射法的优点是可以直接在田间生长的单倍体植株上进行注射处理,省去了育苗移栽等步骤,用药量相对较少,当有大量的材料需要处理时可以采用此种方法。但由于注射部位不容易把握,不同的植株间存在很大的差异,因此对注射的操作手法要求较高。处理时期和注射部位是影响该方法加倍效果的关键因素。

**2.2.3 浸根法** 当单倍体幼苗的根生长到一定长度时,先将根系放到一定浓度的秋水仙素溶液中浸泡一段时间,再用清水浸泡根系来减轻秋水仙素对幼苗的毒害作用,最后移栽到大田中。Seaney 将单倍体幼苗的根系在浓度为 0.05%的秋水仙素溶液中浸泡了 24 h,雄穗的散粉情况明显好于对照<sup>[30]</sup>。Bordes 等用 0.15%的秋水仙素溶液浸泡 3 叶期的单倍体幼苗 3 h,3 组不同来源单倍体材料的散粉率达到了 30%~60%,而未经过处理的对照组材料雄花全部不育<sup>[31]</sup>。慈佳宾等研究表明,采用秋水仙素溶液浸根法进行玉米单倍体加倍时,秋水仙素的浓度为 0.2 mg·mL<sup>-1</sup>时处理 16 h 玉米单倍体的加倍效果最好,加倍率达到了 9.4%<sup>[32]</sup>。

浸种法和浸根法虽然操作较简便,但是所需要的秋水仙素剂量较大,相应的提高了试验成本,并且 2 种方法中涉及育苗和移栽等试验环节,单倍体幼苗移栽后生长势较弱而不易成活。注射处理的方法不需要进行育苗和移栽等工作,大大提高了单倍体幼苗的成活率。当单倍体幼苗长出 3~5 片叶时就可以在田间进行注射处理,该方法简单易行,加倍效果好,成本较浸种法和浸根法低。文科等研究了在浸种处理、浸根处理及注射处理下单倍体植株的田间存活率、雄穗的散粉率和以及雌穗的结实率等,结果表明在散粉性和结实率方面,浸种法和注射法的处理效果较好<sup>[26]</sup>。

## 2.3 化学加倍中辅助剂的选择

在单倍体的化学加倍中,选择合适的助溶剂可以提高单倍体的加倍效率。目前常用的助溶剂有二甲基亚砜、赤霉素和吐温等,但以二甲基亚砜最为常用。

二甲基亚砜(DMSO)是一种有机化合物并且含有硫,具有较强的吸湿性、高极性、高沸点并且具有可燃性等特点。多数有机化合物都可以溶解其中,被称为“万能溶剂”。之所以说二甲基亚砜可以提高秋水仙素的加倍效率,是因为 DMSO 可以使秋水仙素较容易地穿透到分生组织当中去,提高分生组织的活跃性,让秋水仙素的作用得到了充分发挥。

## 2.4 其它加倍试剂和方法

在玉米单倍体加倍研究过程中所用到的秋水仙素具有一定的毒性,植株经过秋水仙素处理后经常出现白化苗、畸形苗甚至造成植株的死亡等情况。因此,人们开始寻找其它具有类似加倍功能的药剂来替代秋水仙素。其中 APM(Amiprophosmethyl)、氟乐灵(Trifluralin)、拿草特(Pronamide)和安磺灵(Oryzalin)是常用的几种细胞分裂抑制剂,均具有一定的加倍功能。Wan 等研究表明,在不提高细胞突变率的前提下,APM 和 Pronamide 同样可以使花粉的愈伤组织加倍。目前,在国外除草剂中已成功应用到单倍体加倍实践中并且形成了一套完整的加倍体系,除草剂将会替代秋水仙素成为新的加倍剂。此外,一氧化二氮(N<sub>2</sub>O)也可以使染色体发生加倍,Kato 研究表明一氧化二氮可以使处于苗期的玉米植株的染色体发生加倍。此外,一氧化二氮也应用到了小麦、高粱和大麦等作物的研究中。

## 3 目前存在的问题及展望

当前,在我国玉米单倍体育种技术还不完善,在运用过程中主要存在 3 个问题:一是秋水仙素的毒性很大,对人体健康构成了威胁,亟待寻找一种加倍剂来替代秋水仙素;二是单倍体的总体加倍效率相对较低,需要寻找一种合适的方法来提高加倍效率;三是如何选择诱导材料(群体、杂交种或二环系)用于诱导。

由于单倍体育种技术具有操作相对简便、育种周期短、效率高等优点,使得此种技术手段在玉米育种中的应用前景十分广阔,特别是在玉米育种材料的纯化和改良等方面都有很大优势。在未来的玉米育种实践中,如果把单倍体育种技术与分子生物学、分子标记辅助选择以及分子遗传学

等技术手段有机结合起来,将进一步提高育种效率。

#### 参考文献:

- [1] 刘治先,杨菲.玉米单倍体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.
- [2] Rotarenco Valeriy, Dicu Georgeta, Sarmaniuc Mariana. Induction of maternal haploids in maize[J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 2009, 83: 1-9.
- [3] 白守信,李翠云,张振刚,等.单倍体小麦染色体加倍研究[J].遗传学报,1979(2):230-232.
- [4] 陈玉蓉,王培.冬小麦花粉植株的适宜越冬苗龄和染色体加倍的研究[J].河北农业大学学报,1992,15(1):4-7.
- [5] 徐玉冰,牛维和,刘继红,等.甜菜单倍体植株染色体人工加倍技术的探讨[J].中国甜菜,1991(3):7-11.
- [6] Randolph L F. The chromosomes of haploid maize with special reference to the double nature of the univalent chromosomes in the early meiotic prophase[J]. Science, 1932, 5: 566-567.
- [7] Randolph L F. Note on haploid frequencies. Maize Genet[J]. Coop. Newslett. ,1940,14:23-24.
- [8] Kato A. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage[J]. Plant Breeding, 2002, 121(5): 370-377.
- [9] Chase S S. Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.) [J]. Bot. Review, 1969, 35: 117-167.
- [10] 陈绍江,黎亮,李浩川.玉米单倍体育种技术[M].北京:中国农业大学出版社,2009:10.
- [11] 胡启德,何宗宇,曹化林.诱导小麦孤雌生殖及其应用[J].遗传学报,1979(3):20-22.
- [12] 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,1998,3(S):6-10.
- [13] 中国科学院遗传研究所组织培养实验室、四室一组.诱导玉米花粉植株的初步研究[J].遗传学报,1975,2(2):138-142.
- [14] 赵佐宇,谷明光.药物诱导玉米孤雌生殖获得二倍体纯系[J].遗传学报,1984,11(1):39-46.
- [15] 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.
- [16] 才卓,刘向辉.玉米高频率单倍生殖诱导系吉高诱3号的选育[J].玉米科学,2007,15(1):1-4.
- [17] 赵延明,董树亭,张锁良,等.玉米单倍体育种技术研究与应用进展[J].玉米科学,2007,15(5):60-64.
- [18] Chalyk S T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding[J]. Euphytica, 1994, 79: 13-18.
- [19] Shatskaya O A, Zabirova E R, Shcherbak V S. Autodiploid lines as sources of haploid spontaneous diploidization in corn[J]. Maize Genet. Coop. News Lett. ,1994, 68: 51-52.
- [20] Gayen P, Sarkar K R. Cytomixis in maize haploids[J]. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 1996, 56: 79-85.
- [21] Testillano P, Georgiev S, Mogensen H L, et al. Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during in vitro maize induced microspore embryogenesis[J]. Chromosoma, 2004, 112: 342-349.
- [22] 段民孝,赵久然,刘新香,等.不同种植地点对玉米单倍体自然加倍率的影响[J].作物杂志,2012(2):68-70.
- [23] 蔡泉,曹靖生,史桂荣,等.玉米单倍体在黑龙江与海南自然加倍效果的对比研究[J].玉米科学,2012,20(5):7-9.
- [24] Gayen P, Madan J K, Kumar R, et al. Chromosome doubling in haploids through colchicine[J]. Maize Genet. Coop. Newslett. ,1994, 68: 65.
- [25] 季洪强,刘慧,宋桂良,等.玉米单倍体诱导与加倍方法研究[J].河南农业大学学报,2012(1):11-15.
- [26] 文科,黎亮,刘玉强,等.高效生物诱导玉米单倍体及其加倍方法研究初报[J].中国农业大学学报,2006,11(5):17-20.
- [27] Chase S S. Selection for parthenogenesis and monoploid fertility in maize[J]. Genetics, 1952, 37: 573-574.
- [28] 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.
- [29] 岳尧海,王敏,张志军,等.玉米单倍体加倍效果的研究[J].吉林农业科学,2011,36(5):9-12.
- [30] Seaney R R. Studies on monoploidy in maize[D]. New York: Cornell Univ. ,1955.
- [31] Bordes J, Dumas de Vaulx R, Lapierre A, et al. Haplodiploidization of maize (*Zea mays* L.) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding[J]. Agronomie, 1997, 17: 291-297.
- [32] 慈佳宾,李继竹,刘振库,等.抗微管除草剂对玉米单倍体加倍效果研究[J].玉米科学,2012,20(5):10-14.

## Research Progress on Haploid Breeding of Maize

ZHANG Qiang

(Pratacultural Sciences Institute of Heilongjiang Academy of Aricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

**Abstract:** In order to explore efficient breeding technology of maize and accelerate the breeding process, the generation of haploid was introduced, maize haploid doubling method and existent problems were analyzed, and prospects of maize haploid breeding technique in breeding production were expounded.

**Key words:** maize; haploid; breeding technology