

文章编号: 1005-0906(2004)03-0013-03

单倍体技术在玉米育种中的应用和新进展

梁文科^{1,2}, 戚廷香², 徐尚忠¹

(1. 华中农业大学作物改良国家重点实验室, 湖北 武汉 455112; 2. 中国农业科学院棉花研究所)

摘要: 介绍了单倍体技术在作物育种中应用的概况, 特别是在玉米育种中, 对如何获得单倍体, 如何进行单倍体的鉴别和加倍等问题进行了综述。并介绍了 Stock 6 及其衍生的几个玉米单倍体诱导系, 评述了单倍体技术在玉米育种中的应用前景。

关键词: 玉米; 孤雌生殖; 单倍体诱导系; 育种

中图分类号: S513.035.2

文献标识码: A

Progress and Utilization of Haploidy Methods in Maize Breeding

LIANG Wen-ke^{1,2}, QI Ting-xiang², XU Shang-zhong¹

(1. National Key Lab of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Cotton Research Institute of CAAS.)

Abstract: Brief introduction was presented on the progresses and application of haploidy method in crop breeding. Especially in maize, and summarized how to obtain a haploid, and how to make it diploidization. And also presented some inducer lines derived from stock 6. The comment about the future utilization of haploidy technology in maize breeding was proposed.

Key words: Maize; Parthenogenesis; Haploid inducing lines; Breeding

人们很早就产生了在作物育种中利用单倍体技术的思想, 但是, 实践的过程是漫长的, 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。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, 形成了一种新的育种思路——分解育种。分解育种包括三个阶段: ①获得单倍体; ②在单倍体水平上进行选育; ③多倍体的重新合成。而单倍体的获得是分解育种的基础, 利用单倍体技术获得纯系是分解育种的重要研究方向之一。对玉米而言, 分解育种方案简化为两个阶段: 即获得单倍体和单倍体的二倍体化。

Chase(1949)提出利用单倍体技术获取玉米自交系: 利用自然发生或人工培育的单倍体植株, 经过自然或人工加倍获得双单倍体(纯系)。因为从单倍体到纯系只需一个世代, 并且单倍体技术的应用是对配子进行选择, 获得优良的遗传重组的机会高于合

子的选择, 并可缩短自交系的选育年限, 提高育种效率。

1 关于单倍体的几个基本问题

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(n)的变异(刘大均, 1998)。携有配子染色体数的个体称为单倍体。被子植物中单倍现象是很广泛的(Xoxjiob, 1970)。Katayama(1935)以细胞遗传学特点为依据, 提出了为单倍体分类的方法, 即根据原始个体的倍数性水平, 把所有单倍体分为两个基本类型: 一倍体是从具有二倍染色体数的个体所产生的单倍体; 多倍单倍体是从具有多倍染色体数的个体所产生的单倍体。霍赫洛夫等(1970)根据细胞核和细胞质所决定的单倍体的遗传结构为基础, 给出如下的单倍体分类: ①母性单倍体。从减数卵细胞或由有机体的母本有性组织(胚囊)的细胞发育而成的单倍体, 具有来自同一个体的细胞质和细胞核。②雄核发育单倍体。从卵细胞或胚囊的任何其它细胞发育而来, 其染色体被外来精子的染色体所代换, 这类单倍体具有质核杂种的性质。③花药单倍体。从雄性的(花粉粒)细胞发育而

收稿日期: 2003-09-30

作者简介: 梁文科(1960-), 男, 辽宁大连人, 副研究员, 华中农业大学在读博士, 主要从事玉米遗传育种研究。

Tel: 0372-2633253

来,具有同一个体的细胞质和细胞核。不同类型的单倍体其基因型的特性是不同的,母性单倍体和花药单倍体都具有来自同一个体的染色体和细胞质;而雄核发育单倍体则不同,它是从父本获得染色体,从母本获得细胞质。弄清这种差异对于在育种和遗传中有效地利用单倍体技术将会大有帮助。

2 如何获得单倍体

2.1 自然发生的单倍体

在自然界,大多数生物是二倍体,而动物几乎都是二倍体。在植物中,大多数低等植物的生命周期的主要阶段是单倍体,是由配子(孢子)直接产生的,不会出现不育性问题。高等植物自然发生的单倍体,一般是由于生殖过程异常所引起的孤雌或孤雄生殖而来的。由于高等植物中的单倍体高度不育,其植株和它的组织器官等都比它们的二倍体和双倍体弱小,所以,在自然界存在的单倍体很少。

2.2 人工诱变单倍体

2.2.1 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 X 或紫外线处理玉米成熟花粉粒,并用辐射过花粉给正常植株授粉,让已无授精能力的花粉去刺激未受精的卵细胞单性发育成单倍体的胚;利用甲苯胺蓝(TB)处理花粉也能产生单倍体。

2.2.2 花粉培养

用花粉(小孢子)培养技术获得单倍体在许多植物上都已取得成功。在获得单倍体的同时,还常常出现已自然加倍了的二倍体和双倍体。这个方法的缺点是:要经过组织培养的过程,先诱导愈伤组织,再分化形成再生植株,并非每个小孢子都能无性增殖。此外,二倍体化以后,因适应性问题而出现生长或结实的困难。花培育种效率不高,除了受基因型影响外,绿苗诱导率低和染色体加倍的困难也是原因之一。

2.2.3 单亲染色体消失

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。

2.2.4 核质互作

据报道,在小麦中连续回交进行核置换时,发现单倍体出现的频率极高(53%~93.8%)。Mukai(1983)认为,这是由于 1BS 上抑制单倍体发生的基因随着 1BS 被 1RS 代换而丢失,而 1RS 不能补偿 1BS 在这方面的功能。该途径产生单倍体的频率虽然很高,但

是在单倍体二倍体化后依然是雄性不育,在育种中难以利用。

2.2.5 利用单倍体启动基因

1950 年美国的 Northrup King 种子发现了 一个高频诱导单倍体的材料,为早熟、白色、粉质、硬粒型的玉米,送给威斯康辛大学作遗传研究。Ed Coe(1956)发现这份材料有利用的价值,并导入了控制子粒性状和植株性状的两种显性标记基因(R-nj、Pl),又经过两次回交和两次自交,然后定名为 Stock 6。它具有两个标记性状:①子粒 Navajo 斑纹,是由 A1A2C1C2R-nj 互补基因控制;②成株叶片和叶鞘呈紫色,是由 A1A2C2BPl 互补基因控制。在育种实践中用 Stock 6 作父本,被诱导的育种试材作母本,大约有 3%的单倍体胚。Hagberg(1980)在大麦中鉴定出一个部分显性的单倍体启动基因(hap)突变体,它控制异常胚和胚乳的败育或存活,其纯合的后代能产生 10%~15%的单倍体。

此外,Chase 的 A358;Trynov 和 Zavalishina 使用的 ZMS(Zarodyshevsky Marker Saratovsky);Chalyk 使用的 MKS(korichnevsky Marker Saratovsky)及 MHI(Moldovian Haploid Inducer)等等,它们都可以产生约 3%左右的单倍体胚。在以上这些材料中,目前利用较多的是 Stock 6,育种家已利用 Stock 6 作父本诱导了大量的母本单倍体,从中获得的部分玉米自交系已在生产上加以利用。张铭堂(1996)用 Stock 6 作父本,诱导单交种 Oh43×Mo17,共获得 660 个杂交果穗计 305 100 粒种子,经子粒标记选择和植株标记选择,最后获得 249 个双单倍体纯系,现已育成 2 个玉米自交系,并配出优良的商业杂交种。我国的学者对 Stock 6 进行了有效的改造,刘志增等(1998)用一个高油玉米改良群体 BHO 和 Stock 6 杂交,经多代自交和测交选育出农大高诱 1 号单倍体诱导系,其诱导率可高达 5.8%,比 Stock 6 高出 5 倍,已经应用于育种实践。通过对 Stock 6 的改造,已衍生出数个单倍体诱导系,如 Shatskaya (1994) 俄罗斯的 KRAS-NODAR MARKER,Chalyk(1994)报道的摩尔瓦多的 ZMS,Lashermes(1998)报道的 SW14。刘纪麟(2001)从美国引进了玉米诱导系 Stock 6,并用它作父本对 WBM、辽旅等 6 个玉米群体进行了单倍体诱导,经对诱导后代的子粒、成株标记和植株育性的鉴定,已获得一些双单倍体材料。

3 单倍体的鉴定方法

3.1 细胞遗传学方法

最准确的方法是用根尖分生组织压片观察体细

胞中或减数分裂细胞中的染色体数目,可区分整倍单倍体和非整倍单倍体。利用光度计法分析细胞核中 DNA 含量,但不能区分整倍单倍体和非整倍单倍体,又由于该法检测速度慢和需要仪器设备,不适合在田间进行大批量地鉴定。

3.2 形态学和解剖学方法

利用形态学和解剖学特征来鉴定单倍体是一种直观和便捷的方法。在幼苗期可以用目测选出大部分的单倍体。单倍体在正常生长状态下常常比它的标准类型小的多;在幼苗生长的早期阶段(4~6 d)主根和牙鞘的长短区别明显;在 2~3 叶期玉米单倍体的第一片叶大约短 $1/4 \sim 1/2$ (Chase, 1955);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。在解剖学上观察叶片表皮气孔、保卫细胞的大小和数目,也可以区分单倍体和二倍体。

3.3 射线照射法

植物对辐射的敏感性随着倍数性的变化而变化,是生物学的一般规律。基本方法是用电离射线照射(如 X 射线)叶片的一部分,先看到褪绿,而后出现辐射坏死。关键是要探索出不同作物的最适剂量和照射时间,如果掌握的好,该法可成为最简便和实用的鉴定方法之一。

3.4 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。在玉米中,著名的 Navajo 标记基因 R-nj 是利用较成功的。Coe 的 Stock 6 和宋同明等的高诱 1 号单倍体诱导系,导入了子粒和植株显色的遗传标记基因。由单倍体诱导系诱导出的子粒分三种类型:①胚乳糊粉层呈现紫色或紫红色,胚芽部位也呈现紫色或紫红色;②胚乳糊粉层呈现紫色或紫红色标记,胚芽部位无色;③胚乳糊粉层和胚芽部位均不显色(无标记)。张铭堂(1998)报道:第一、三种类型的子粒占绝大多数,为二倍体子粒;第二类子粒所占的比例很小,为单倍体子粒。根据子粒的颜色标记特征,对单倍体做出初步判断之后,还可在田间根据植株 ABPI 紫色标记对单倍体做出进一步的判别:凡幼苗叶鞘全部为紫色者不是单倍体。在拔节期,单倍体植株大多表现出生长缓慢、植株矮小、叶片短和颜色浅等特点;此外,玉米植株的育性也是鉴别玉米单倍体的一个重要指标。玉米的单倍体植株由于只含有一套染色体组,通常都是雄性不育或育性很低。

综上所述,单倍体的鉴定方法很多,但是运用之妙存乎一心。在育种实践中,结合育种家的经验,灵活运用诸方法,无疑是成功的关键。

4 单倍体的二倍体化方法

4.1 单倍体的自然加倍

单倍体植株在生长发育的过程中,大约有 0.4%~1.2% 的植株可以自然加倍成二倍体(Chalyk, 1994)。在一般情况下单倍体植株表现为雌雄不调,正常花粉粒很少,所以单倍体自然加倍的频率仅占全部单倍体植株的 10%(Chase, 1952)。许多材料的自然加倍率低于 5%,也有的材料不发生自然加倍(Zabirova 等, 1993; Shatskaya, 1994)。鉴于此,仅依靠单倍体的自然加倍难以满足育种实践的要求,必需对其进行人工加倍,以提高其育性,通过自交以获得更多的纯合二倍体种子,以便从中选育出优良的自交系。

4.2 单倍体的人工加倍

单倍体的人工加倍,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。基本有三种方式:①处理萌发的种子;②处理根尖;③处理茎尖生长点。其中效果较好的是第二和第三种方式。处理根尖,在实际操作中会受到一些限制;而处理顶端分生组织较为方便,可采用微量注射和涂抹。刘志增等(1998)在拔节期将 0.1 mL 的不同浓度(0.01%, 0.05%, 0.1%)的秋水仙素注射到茎尖生长点偏下的组织中,结果在 0.01% 的低浓度下效果好,随着浓度的提高,受药害植株的比例也在增加。

P. Gayen 等(1994)用不同浓度(0.03%, 0.06%, 0.1%)的秋水仙素,在两个温度(18℃和 25℃)下分别对单倍体的种子和幼苗进行不同时间(6、12 和 24 h)的处理。结果表明,在(18±1)℃的温度下,用 0.06% 的秋水仙素处理 12 h,单倍体加倍的百分率为 18.05%。张铭堂(1992)认为,如果能扣除自然加倍的频率,人工化学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。所以,有效的单倍体加倍方法是单倍体技术能否在作物育种中广泛应用的关键问题之一。

5 单倍体技术在玉米育种中的应用

育种家对从单倍体获得纯系的兴趣越来越浓厚,因为利用单倍体技术培育优势杂种,选种过程可缩短 $3/4 \sim 4/5$ 的时间。目前,在美国产生玉米纯系的单倍体技术,正被玉米商业育种家广泛地利用(张铭堂, 2002)。

在玉米育种中有效的应用单倍体技术,要有几个先决条件:①如何简便且大规模地获得单倍体植株;②如何简便且有效地重组二倍体;(下转第 18 页)

(上接第 15 页)③如何简便且快速地鉴别纯系。Stock 6 及其改良的衍生系,如 ZMB 和农大高诱 1 号等单倍体诱导系的成功培育,能对任何基因型的材料诱导出 3%的单倍体。它们携带的显性标记基因 A,C,R-nj:cu du 可保证对成熟种子进行有效的鉴别。单倍体技术在玉米育种上应用具有如下优点: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加上位效应;还可淘汰有害的、致死和半致死的隐性基因。但是,单倍体育种技术也存在缺点:不能有效打破不良基因的连锁;基因间的重组几率较低;单倍体的诱导频率不高;此外,重组二倍体时染色体加倍具有一定的困难。目前,二倍体化的频率能达到 15%~25%。尽管如此,单倍体技术在玉米育种中的应用前景是十分诱人,若与种质扩增和育种材料的改良有机的结合起来,先对目标诱导材料进行有效的重组改良,累积足够的有利基因位点,然后再用单倍体技术获得纯系,将会极大地发

挥单倍体育种的优势。

参考文献:

- [1] 刘志增,等.玉米孤雌生殖诱导系的选育方法研究[J].中国农业大学学报,2000,5(3):51-57.
- [2] 刘志增,等.玉米孤雌生殖诱导系 Stock6 的表现及其遗传改良初报[J].中国农业大学学报,1998,3(增刊):6-10.
- [3] 刘志增,等.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.
- [4] 张铭堂.玉米之遗传(续):细胞遗传[J].科学农业,1996,44(3,4):87-109.
- [5] 文仁来,等.玉米花培早期添加秋水仙碱共培养的研究初报[J].玉米科学,2000,8(4):23-24.
- [6] Chalyk S, Chebotar O. Utilizing maternal haploids to identify major genes controlling plant height in maize. Journal of Genetics and Plant Breeding, 1999, (35): 73-77.
- [7] Chalyk S T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding. Euphytica, 1994, (79): 13-18.
- [8] Chalyk S T, Cealic S T. Creating new haploid-inducing lines of maize. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1999, (73): 53-54.