

文章编号: 1005-0906(2010)06-0001-07

玉米单倍体育种研究进展

杜何为^{1,2}, 戴景瑞², 李建生²

(1. 长江大学生命科学学院, 湖北 荆州 434025; 2. 中国农业大学 / 国家玉米改良中心, 北京 100193)

摘要: 基于孤雌生殖诱导系的单倍体育种技术在玉米育种中被广泛应用, 极大加快了育种进程。综述了玉米单倍体获得的途径和加倍的方法, 讨论了孤雌生殖诱导系产生单倍体的机理以及单倍体的应用价值, 最后分析了单倍体育种技术存在的问题, 并对应用前景进行了展望。

关键词: 玉米; 单倍体; 育种

中图分类号: S513.035.2

文献标识码: A

Study Proceeding in Haploid Breeding of Maize

DU He-wei^{1,2}, DAI Jing-ru², LI Jian-sheng²(1. *The College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025;**2. China Agricultural University, National Maize Improvement Center of China, Beijing 100193, China)*

Abstract: The gynogenesis-inducer lines were used to induce maternal haploid, and this technology had been widely used in maize breeding, which accelerated the breeding process. The technology of haploid production and the methods of chromosome doubled in maize were introduced. Possible cause of the haploid-induce and the application of haploid in maize were discussed. Finally, we focused on some problems of haploid breeding, and haploid technology would become to a main method to select inbred lines in maize.

Key words: Maize; Haploid; Breeding

玉米是我国种植面积最大的农作物^[1], 直接关系到我国的粮食安全问题, 具有十分重要的战略地位。长期以来, 常规的系谱法、回交法、复合杂交和轮回选择等技术是改良玉米自交系的主要手段, 已培育了许多能够适应各种生态环境的优良杂交种, 但常规遗传改良一直存在育种周期长等缺点。单倍体育种技术只需 2 个世代便可得到纯合的 DH 系, 极大缩短了育种周期, 提高了育种效率。基于孤雌生殖诱导系的单倍体育种技术已在玉米育种中广泛应用, 并且越来越受到育种工作者的青睐。本文综述了玉米单倍体获得途径和加倍方法, 讨论了孤雌生殖诱导系产生单倍体的机理以及单倍体的应用价值。

1 单倍体的发现

单倍体是指只携有配子染色体数目的个体, 自然界中的单倍体是经过不正常受精形成的, 一般发生频率很低。1922 年, Dorothy Bergner 首次发现了野生的曼陀罗单倍体^[2], 此后, 烟草、小麦等其他物种的单倍体被相继发现^[3]。玉米单倍体的发现相对较晚, Randolph 首先观察到品种间或自交系间杂交的后代中有 0.011%~0.103% 的孤雌生殖单倍体, 并且不同杂交组合中单倍体产生的频率存在较大的差异^[4]。尽管单倍体的发现较早, 但人工单倍体的产生经历了漫长的过程。直到 1964 年, Guha 和 Maheshwari 使用花药培养, 第一次在实验室得到了人工的曼陀罗单倍体^[5]。

2 玉米人工诱变单倍体的获得方式

2.1 花药培养

花药培养是获得单倍体的有效途径之一。玉米的花药培养比较困难, 主要原因是花药愈伤组织的诱导率和分化率较低, 且受基因型的限制。1977 年, Opatrný 等以玉米杂交种 CE250 为试验材料, 以单核期的花药为外植体, 比较了 2,4-D 和 IAA 不同浓

收稿日期: 2010-04-20

基金项目: 国家“863”计划(2009AA101103)

作者简介: 杜何为(1976-), 男, 湖北大冶人, 博士, 研究方向为玉米单倍体育种。E-mail: duhewei666@163.com
李建生为本文通讯作者。

度及组合对花药愈伤组织诱导的影响,但没有获得单倍体植株^[6]。此后,玉米花药培养获得成功,得到了单倍体植株^[7]。1987年,Pace等先用低温对花药处理14d,然后再进行培养,发现20%的花药能产生胚状体,26%的胚状体能分化出植株,经染色体镜检分析,都是单倍体植株^[8]。Petolino和Thompson以自交系H99、LH38、Pa91和FR16为试验材料,进行双列杂交,并对6个杂交F₁组合的花药进行了培养,发现H99×FR16和Pa91×FR16的花药易于培养,FR16的一般配合力和特殊配合力较高,LH38较低,花药培养受父本基因型的影响较大^[9]。

为了完善玉米花药组织培养体系,科研工作者进行了长期不懈的努力。Büter等将花药于14℃处理4d,并在诱导培养基加入125mg/L脯氨酸,100个花药最高可诱导出143.5个胚状体^[10]。Barloy和Beckert使用低糖和激动素,提高了胚状体的质量和植株的再生频率^[11]。Wassom等研究发现,环境与激素存在互作关系,在不同的环境条件下使用不同浓度的ABA和GA处理植株,然后取其花药进行培养,胚状体的诱导率存在较大差异^[12]。

2.2 小孢子培养

小孢子培养也是获得DH系的一条有效途径,同时,由于小孢子没有细胞壁,也是研究配子体发育、胚胎发生机制及配子体基因调控与表达的理想材料。1982年,Lichter首次使用小孢子培养技术获得了油菜单倍体植株^[13]。此后,小孢子培养技术在茄科和十字花科作物上得到广泛的应用。禾本科作物小孢子培养研究起步相对较晚,首先在大麦上取得了突破。Hunter报道了大麦小孢子培养,且得到单倍体植株^[14]。陈英等对水稻离体小孢子的培养进行了研究,但没有分化出单倍体植株^[15]。Pescitelli和Petolino以Pa91×FR16为试验材料,发现异常小孢子的分裂在培养后的第7天达到高峰,随后下降,多细胞团和胚状体结构分别在14d和25d出现。Pescitelli等首次报道了从玉米小孢子培养中分化出单倍体植株^[16]。

玉米小孢子的培养过程复杂,受许多因素的影响。使用混合法分离小孢子,前4d培养的温度降低到15℃,并将蔗糖的浓度提高到8.0%~9.5%,胚状体诱导率高达92%。不同的糖及浓度对小孢子的培养影响也很大,单独使用蔗糖,小孢子多核结构的诱导率较高,相反,混合使用蔗糖、果糖和葡萄糖,诱导率较低;单独添加蜜二糖或蜜二糖与蔗糖混合使用,没有多核结构产生,但小孢子发育能力有所提高。

培养基类型及pH值对小孢子培养也有较大的影响,玉米小孢子在mN6M培养基上的存活率比ppN6M/89和YPM-G培养基要高;使用mN6M培养基,pH值为5.8时小孢子发育能力比pH值为3.0时显著增加。

2.3 利用Stock6诱发单倍体

美国Northrup King种子公司于1950发现一个玉米高频单倍体诱导系。1956年,Coe发现了这份材料的利用价值,并将其命名为Stock6,并在随后的研究中将R-navajo、Pl等控制紫色胚乳、茎秆、叶片、雄穗和花药的色素基因导入其中^[17]。以Stock6作为父本,与绿色植株、无胚乳颜色的母本进行杂交,得到的子粒中紫色胚乳紫色胚的为杂交种子;紫色胚乳无色胚的为单倍体子粒;无色胚乳无色胚的是异源花粉污染所致。

Stock6已经被应用于玉米单倍体育种。刘治先与张铭堂用Oh43/Mo17的F₁组合与Stock6杂交600果穗,得到305778个子粒,经鉴定2852个是单倍体子粒。将这些单倍体种子播种,发现275株发生自然加倍,经自交,最后得到98个DH系^[18]。韩学莉等以Stock6作为父本,分别与48-2、ES40、478、698-5和IYS20-10杂交,共得到75个果穗,9974个子粒,其中紫顶白胚子粒1088个,单倍体诱导率为4.54%^[19]。刘纪麟和马克军以WBM、辽旅群等6份不同类型的广基群体为母本,分别与Stock6杂交,得到1239个杂交果穗,筛选出紫顶白胚子粒11842个。将这些紫顶白胚的种子全部育苗移栽,成活8077株,最后自交118个果穗,获得36个结实穗,结实738粒^[20]。有研究表明,单倍体诱导的频率不但与母本基因型有关,而且同一果穗不同的部位,单倍体产生的频率也不相同,单倍体产生的频率一般是果穗顶部>中部>基部。

尽管Stock6已经直接应用于玉米育种,但其自身存在一些缺陷,如雄花对温度敏感、高温时花粉量少或不散粉、结实率低、穗粒腐病严重、R-navajo遗传标记表达较弱等。因此,玉米育种工作者对Stock6进行了改良,选育了诱导率高、农艺性状较优良的单倍体诱导系。刘志增、宋同明使用高油玉米群体BHO与Stock6杂交,经连续自交和测交选育得到农大高诱1号,该单倍体诱导系已经应用于育种,诱导率达5.8%^[21]。才卓等从Stock6与M278的杂交后代中连续6代测交,育成了吉高诱系3号,该诱导系与20个不同基因型材料杂交,平均诱导率达10.4%,并且花粉量大,抗性强,R-navajo标记表达明显^[22]。国

外学者对 Stock6 的改良比较早, Lashermes 从 Stock6 和 W23ig 中选育了 WS14, 单倍体诱导率达 3.5%; Trynov 和 Zavalishina 使用的 ZMS(Zarodyshev Mark-er Saratovsky), 诱导率为 0.6% ~ 3.43%; Shatskaya 使用的 KMS(Korichnev Mark-er Saratovsky), 诱导率为 6.3%; Chalyk 利用 ZMS 和 KMS, 选育出了 MHI(Mod-ovian Haploid Inducer), 诱导率较高, 为 6.94% ~ 8.72%^[23-26]。

2.4 不定配子体诱导孤雄生殖产生单倍体

1969 年, Kermicle 从玉米自交系 W23 中发现了不定配子体(Indeterminate gametophyte)突变基因(*ig*)。不定配子体基因位于玉米第 3 条染色体上, 可以诱导孤雄生殖产生单倍体, 诱导率为 1% ~ 2%^[27]。在正常的胚囊中, 有 1 个卵细胞、2 个助细胞、3 个反足细胞和两个中心细胞, 而 *ig* 突变体的胚囊异常。研究发现, 大约 40% 的胚囊中含有 3 个及 3 个以上的助细胞, 2 个及 2 个以上的卵细胞; 33% 的胚囊中有 2 个及 2 个以上的中心细胞, 额外的中心细胞通常位于合点端, 与反足细胞毗连。珠孔附近的中心细胞体积较大, 含有 2 个极核, 有时也出现 3 个或 3 个以上的极核, 而额外的中心细胞只有 1 个极核。正常授粉过程中, 花粉管进入胚囊后, 导致 1 个助细胞破裂降解。而在 *ig* 突变体胚囊中, 在含有 2 个助细胞的胚囊中, 2 个助细胞同时降解的概率是 29%; 含有 3 个及 3 个以上助细胞的胚囊, 其助细胞降解的概率是 33%, 这是因为多个花粉管同时进入 1 个胚囊所致。

ig 基因位于玉米第 3 条染色体上, 使用比较基因组学和分子标记等方法, *ig-1* 基因已经被克隆。*ig-1* 基因编码一个 LATERAL ORGAN BOUNDARIES 蛋白, 该蛋白与拟南芥 ASYMMETRIC LEAVES2 蛋白高度同源, 控制胚囊与叶片的生长发育。在 *ig* 突变体中, 当 1 个精核与 3 个中心细胞受精, 收获的子粒胚乳很小; 1 个精细胞与 4 个及 4 个以上的中心细胞结合, 子粒一般不能发育。在 *ig/ig* 纯合的突变体中, 也经常导致雄性不育。*ig-1* 基因也参与叶片的生长发育调控, 在 *ig-1* 突变中, 叶片经常出现异常, 无叶脉和扭曲的叶舌比较普遍。在 *ig1-mum/ig1-mum* 突变体中, 叶片的外表皮上常见一根像头发丝的线条。*ig/ig* 纯合体为母本, 与育种材料杂交, 用于 DH 系的选育, 但纯合体雄性不育, 不能自交留种, 而杂合体的后代只有 1/4 是纯合体, 群体难以扩大, 限制了其在育种中的应用。

2.5 化学药剂诱导单倍体

国内使用化学试剂诱导孤雌生殖纯合系的研究

比较多, 常用的化学试剂有二甲基亚砜(DMSO)、马来酰肼(MH)、赤霉素(GA3)、萘乙酸(NAA)、聚乙二醇(PEG)、激动素、甲苯胺蓝、6-BA、秋水仙素、2,4-D 等^[28-30]。常用的方法有在花丝尚未抽出时将雌穗套袋, 待花丝完全抽出后剪短花丝(约留 1 ~ 2 cm), 再用注射器将化学试剂注射到花丝上, 每个雌穗注射 2 mL 化学试剂溶液, 最后再套上一层纸袋, 防止花粉从针眼和下口处进入^[31]。化学诱导在实际应用中具有许多缺点, 如孤雌生殖诱导率低、孤雌生殖后代二倍体比例少、非整倍体居多、大多数孤雌生殖后代性状分离等, 这可能是孤雌生殖后代是由体细胞(如珠心、珠被等细胞)发育所致。

3 单倍体加倍方法

3.1 单倍体的自然加倍

在自然生长环境中, 单倍体植株各组织的体细胞发生自然加倍的现象比较普遍。玉米单倍体植株自然加倍的概率为 0.4% ~ 1.2%, 但自然加倍率受环境与基因型的影响, 不同的基因型自然加倍的频率差异较大, 有的材料不发生自然加倍, 有的材料自然加倍率达 10%。通常情况下, 玉米单倍体植株表现为不育和雌雄不协调, 而雄穗的育性是自然加倍的关键。对于自然加倍率高的材料, 依靠自身的育性恢复便可以自交结实; 而对于自然加倍率低的材料, 对其进行人工加倍就显得十分必要。

3.2 单倍体的人工加倍

单倍体人工加倍的方法较多, 玉米单倍体常用的方法有浸种法、浸芽法、注射法、组织培养加倍法、气体加倍法等。刘志增、宋同明使用注射法在 6 叶期和拔节期分别注射不同浓度的秋水仙素溶液, 结果发现, 注射 0.05% 和 0.1% 的秋水仙素溶液, 在拔节期的散粉率分别是 2.86% 和 5.71%; 而 6 叶期的散粉率分别是 18.52% 和 23.08%, 显著高于拔节期的加倍效果^[32]。魏俊杰等也进行了相关的研究, 结果表明在 6 叶期的注射效果显著高于拔节期^[33]。文科等使用秋水仙素溶液, 以不同的加倍方法进行了对比研究, 结果发现, 浸根法和注射法对植株的伤害比较严重, 浸种法和注射法的散粉率和结实率较高, 浸种法的加倍效果较好, 注射法次之^[34]。

3.3 组织培养加倍技术

组织培养加倍的方法是将秋水仙素、除草剂或其他试剂添加到培养基中, 对花药、小孢子或单倍体愈伤组织等进行加倍处理, 然后经分化得到 DH 植株的方法。Wan 等用 0.05% 和 0.025% 秋水仙素分别

处理单倍体愈伤组织 24、48、72 h, 结果发现, 处理 72 h 加倍效果较好, 136 株再生植株中有 107 株自交结实^[35]。Saisingtong 等在诱导培养基中添加 5 ~ 1 000 mg/L 的秋水仙素, 研究发现, 低浓度的秋水仙素 (5 mg/L) 长时间处理 (7 d) 或高浓度秋水仙素 (250 mg/L) 短时间处理 (1 ~ 3 d) 有利于花药胚状体结构的形成。秋水仙素浓度越高加倍效果越好, 但高浓度的秋水仙素抑制植株的分化再生^[36]。Barnabás 等用 0.02% 和 0.03% 的秋水仙素处理玉米小孢子, 得到了高度可育的再生植株^[37]。由于秋水仙素是致癌物质, 对身体健康影响较大, 因此科研工作者试图寻找一种既对人体安全、同时加倍率又高的替代品。在随后的研究表明, 除草剂是代替秋水仙素的理想选择。Wan 等使用 amiprophosmethyl (APM)、pronamide、oryzalin 和 trifluralin 4 种除草剂处理玉米花药单倍体愈伤组织, 结果表明, 10 μ mol/L APM 和 10 μ mol/L pronamide 对单倍体愈伤组织的生长和分化抑制作用小, 加倍率高; oryzalin 加倍效果好, 但严重抑制愈伤组织的生长和再生植株的分化; 低浓度的 trifluralin 加倍效果较差, 高浓度又对愈伤组织的生长和再生植株的分化有较强的抑制作用。David 等对月季、马铃薯、冬青、芒草、甜菜、小麦等也报道了除草剂加倍成功的研究^[38-40]。

3.4 气体加倍法

在玉米 6 叶期, 用一氧化二氮气体 (600 kPa) 处理 2 d, 可以显著提高单倍体植株的可育性, 44% 的单倍体植株能自交结实; 没有用一氧化二氮气体处理的单倍体, 只有 11% 的单倍体植株能自发加倍。

4 孤雌生殖诱导系诱导单倍体生成的分子机理

4.1 单受精产生单倍体

孤雌生殖诱导系诱导单倍体生成的作用机制比较复杂, 至今仍未得出明确的结论。Chang 以 Stock6 作父本, 从 600 个果穗中得到 305 778 个子粒, 其中无色胚乳无色胚的子粒 678 个, 无色胚乳紫色胚子粒 4 471 个, 紫色胚乳无色胚的子粒 1 730 个, 缺陷子粒 3 575 个。将紫色胚乳无色胚的子粒播种, 并在苗期用秋水仙素处理, 同时进行 RFLP 和同工酶标记分析结果得出, 精核进入胚囊首先与卵细胞结合的概率是 83.71%, 与极核结合的概率是 16.29%, 精核与极核的单受精是产生单倍体的主要原因^[41]。

4.2 异行精核花粉诱发单倍体

Bylich 和 Chalyk 认为, 单倍体诱导系中含有两

种不同形态精核的花粉, 授粉后可能诱发单倍体的生成。他们观察了 ZMS 诱导系的花粉粒, 将 ZMS 诱导系的花粉粒分为 5 种类型: ① NN 型, 花粉中的两个精核发育良好, 大小和形状正常, 这类花粉占 93.5%; ② GG 型, 花粉中两个精核发育都不充分, 大小和形状不规则, 异于第一类型, 不具备受精的能力, 这类花粉占 0.09%; ③ gg 型, 这类花粉中的两个精核非常小, 染色质高度浓缩, 明显不同于第一类型, 这类花粉占 0.09%; ④ NG 型, 这类花粉中的 1 个精核与 NN 型相同, 另 1 个精核与 GG 型相同, 这类花粉占 5.56%; ⑤ Ng 型, 花粉粒中 1 个精核与 NN 型相同, 另 1 个与 gg 型相同, 这类花粉占 0.76%。NG 和 Ng 型花粉粒占 6.32%, 能引起单受精, 花粉进入胚囊后, 可能与卵细胞结合, 也可能与极核结合, 与 ZMS 诱导系 3% 的诱导率相吻合^[42]。Enaleeva 等研究发现, 花粉中只有 1 个正常的精核, 是打破双受精产生单倍体的可能原因。然而, Mahendru 和 Sarkar 在随后的研究中并没有在诱导系的花粉中发现上述形态异常的精核^[43, 44]。

4.3 诱导系非整倍体配子打破双受精

Chalyk 等认为, 非整倍体是诱导单倍体产生的可能原因。他们观察了两个单倍体诱导系 MHI 和 M471H 以及两个正常自交系 A619 和 MC3 的小孢子染色体数目。MHI 诱导系种植在温室, 14.7% 的小孢子是非整倍体, 而种植在大田产生非整倍体的概率为 11.0%。M741H 种植在大田, 非整倍体小孢子产生的频率也很高, 5.7% 的小孢子细胞是 9 个二价体, 3.6% 的小孢子细胞是 11 个二价体, 7/192 的细胞是 7 个二价体。而在正常的自交系 A619 和 MC3 中, 非整倍体产生的频率很低, A619 中 108 个细胞发现了 1 个非整倍体, 观察了 253 个 MC3 小孢子, 有 4 个非整倍体。非整倍体配子打破了植物的双受精, 导致卵细胞未受精而直接发育成单倍体胚^[45]。

4.4 异雄核受精

Rotarenco 和 Eder 认为, 单倍体的形成与异雄核受精有关。自然授粉产生的单倍体频率较低, 这主要是由于自然条件下落在花丝上的花粉不断更新, 导致更多的花粉管进入胚囊, 异雄核授粉的概率高, 单受精的概率低, 故单倍体的产生频率低。相反, 人工授粉条件下, 花丝上的花粉不能更新, 异雄核受精的概率低, 但单受精的概率较高, 故单倍体产生的频率较自然授粉的高^[46]。

4.5 染色体消失

种间杂交也能产生单倍体, 这种单倍体的产生

主要是由于染色体消失造成的。有学者认为,玉米孤雌生殖诱导系诱导单倍体产生的机理也是染色体消失。Wedzony 等研究发现,授粉 20 d 大约 10% 单倍体诱导系 RWS 的胚细胞中有微小染色体出现,微小染色体是染色体消失发生的重要特征^[47]。Fischer 利用 SSR 标记发现,一小部分单倍体(1%~2%)包含有诱导系父本的染色体片段。Zhang 等的研究也支持染色体消失假设^[48,49]。

对于玉米孤雌生殖单倍体形成的原因,目前主要认为是由单受精引起的,即 1 个精核与 2 个极核结合,而另外 1 个精核没有与卵细胞结合,导致得到的单倍体种子其胚乳是正常的三倍体,而胚却是单倍体。按此假设,单倍体的基因组应来自于母本,但目前的研究发现,单受精并不能完全解释玉米孤雌生殖单倍体形成的原因,因为在单倍体中,已经发现了诱导系父本的基因组片段。染色体消失假设尽管能解释单倍体植株中包含父本诱导系基因组的现象,但目前缺少细胞生物学方面的证据,还需进一步证实。

5 单倍体的应用价值

5.1 提高育种效率,拓宽育种资源

传统的方法选育二环系,需要连续自交 7 代,得到纯度为 99.2% 的自交系,耗时、费力,而且周期较长。使用单倍体育种技术,只需 2 个世代便可得到纯度为 100% 的 DH 系。除了加快选系进程外,单倍体还具有其他的一些优势。由于单倍体只有一套染色体,没有等位基因,因此,有利于淘汰有害的隐性基因,在加倍的群体中也没有显隐杂合子;使用玉米单倍体育种技术,可以避免早代人为选择的干扰,使 DH 系内的加性效应遗传变异最大化,从而发掘配合力高的系。Chase 率先提出了单倍体育种,并首次获得了玉米 DH 系,随后用 DH 系配制了强优势的杂交种 D640^[50]。单倍体育种技术已经被广泛应用,大约 250 余种作物使用了单倍体育种技术,其中玉米、大麦等 12 种作物使用 DH 系培育了 300 多个强优势的商业杂交种。

产生和利用有利突变,是培育植物新品种的有效方法。单倍体只有一套染色体,没有显隐性关系,因此,突变在早代可进行鉴定,经加倍处理,突变位点纯合,缩短了育种周期。使用物理或化学的方法,对小孢子、花药等进行处理,加倍处理后得到纯合突变体的 DH 系,极大拓宽了育种资源,该技术在小麦、大麦、油菜、烟草等作物上被大规模使用^[51]。

Ferrie 和 Keller 创建了最大的 DH 突变群体,从小孢子中分化得到 34 000 个 DH 突变体,对其中的 7 000 株进行了筛选,结果发现 57 个 DH 系的油酸含量升高,69 个 DH 系亚油酸含量降低,157 个 DH 系的饱和脂肪酸含量较低^[52]。

5.2 构建基因定位群体

DH 群体尽管所含的信息量相对较少,但群体中的每个 DH 系都是一个遗传上纯合的株系,能够无限繁殖,适于表型鉴定分析,是 QTL 定位的理想群体。DH 群体在小麦、大麦、油菜和水稻的 QTL 定位中应用非常广泛,其中小麦和大麦 90% 以上的分子标记是用 DH 群体开发的。玉米 DH 群体用于 QTL 定位报道还比较少,Beaumont 通过小孢子培养构建了玉米 DH 群体,但群体的偏分离现象比较严重^[53]。使用孤雌生殖单倍体诱导系可以得到大量的单倍体,经加倍便构建了 DH 群体,该群体是随机分离群体,偏分离现象不明显。刘玉强等使用玉米孤雌生殖单倍体诱导系构建了 DH 系,结果发现 DH 群体中的 SSR 标记呈随机分布,未见明显的偏分离现象;DH 群体与 RIL 群体的比较研究发现,2 个群体主要农艺性状表现基本一致,DH 群体表现出系内整齐性更高^[54]。

6 存在问题及展望

基于孤雌生殖单倍体诱导技术在玉米育种中广泛应用,并且已经培育出许多商业化杂交种,但育种技术仍面临问题。

(1)*R-navajo* 基因表达受基因型影响较大,单倍体子粒筛选比较困难。在 Stock6 及其衍生系中,含有控制胚及胚乳颜色的 *R-navajo* 基因,但该基因的表达受到基因型的影响,不同材料的紫顶差别较大。本研究发现,在 Reid 杂种优势群中,紫顶紫胚颜色非常明显,易于鉴别出紫顶白胚的单倍体子粒,但在黄早四杂种优势群,紫顶颜色非常弱,有的仅仅是一个点,难以辨别,给单倍体鉴定带来了很大的困难。在温热 I 杂种优势群,尽管紫顶颜色非常明显,但材料的种皮较厚,难以鉴别紫胚。

(2)加倍的成功率低。加倍的成功率是指单倍体植株经加倍后,收获种子的植株数占总植株数的比例。单倍体加倍的方法较多,有的方法加倍率也较高,但加倍的成功率较低。大多数研究是以雄穗的育性来衡量加倍成功与否,而忽视了雌配子的加倍,因此经常会出现雄穗育性好、散粉量多,但授粉后并不能结实。雌雄配子同时被加倍以及花期相遇,是加倍

成功的关键。

(3)父本单倍体诱导系 DNA 片段的污染,可能会影响该技术在玉米育种中的应用。孤雌生殖单倍体诱导系诱导单倍体形成的分子机理目前仍然存在较大的争议,但越来越多的研究表明,在单倍体后代渗入了单倍体诱导系的 DNA 片段。单倍体诱导系 DNA 片段的导入,可能会对 DH 群体的 QTL 定位、优良 DH 系的选育及利用等造成较大的影响。

Duick 对美国不同阶段的玉米品种及其亲本的产量进行了分析,发现玉米产量的提高与双亲产量的均值成显著的正相关,而杂种优势对玉米产量贡献的绝对值并没有增加,玉米杂交种产量的提高主要是通过自交系的提高而实现^[55]。Hua 等研究发现,在两位点水平上,双亲基因型互补的纯合体在大多数情况下表现最好^[56]。Tang 等对豫玉 22 的永久 F₂ 代群体的产量及其构成因子进行了分析,同样发现双亲基因型互补纯合体(11/22, 22/11)表现为最好的基因型。在自交系的选育过程中,双亲纯合互补基因型的不断累加和固定是玉米自交系产量不断提高的遗传机理^[57]。使用玉米孤雌生殖诱导系得到的单倍体植株,同时含有双亲基因型的遗传位点(1 或 2 个)。这些单倍体植株经过加倍可以直接获得不同位点间纯合互补的基因型(11/22, 22/11),从而选育出农艺性状和产量性状优异的 DH 系。基于孤雌生殖诱导系的玉米单倍体育种技术,可以快速有效地累积有利的双亲互补基因,选择优良的双亲互补基因型将会成为改良自交系的主要方法。

参考文献:

- [1] 戴景瑞,鄂立柱.我国玉米育种科技创新问题的几点思考[J].玉米科学,2010,18(1):1-5.
- [2] Blakeslee A F, et al. A haploid mutation in the jimson weed, datura stramonium[J]. Science, 1922, 55: 646-647.
- [3] Clausen R E, Mann M C. Inheritance in *Nicotiana tabacum*. V. The occurrence of haploid plants in interspecific progenies[J]. Proc. Natl. Acad. Sci., 1924, 10: 121-124.
- [4] Randolph L F. Note on haploid frequencies[J]. Maize Genet. Coop. News Lett., 1938, 12: 12.
- [5] Guha S, Maheshwari S C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*[J]. Nature, 1964, 204: 497.
- [6] Opatrný Z, Dostál J, Martinek V. Anther Cultures of Maize[J]. Biologia Plantarum(praha), 1977, 19(6): 477-480.
- [7] Genovesi A D, Collins G B. In vitro production of haploid plants of corn via anther culture[J]. Crop Sci., 1982, 22: 1137-1144.
- [8] Pace G M, Reed J N, Ho L C, et al. Anther culture of maize and the visualization of embryogenic microspores by fluorescent microscopy[J]. Theor. Appl. Genet., 1987, 73: 863-869.
- [9] Petolino J F, Thompson S A. Genetic analysis of anther culture response in maize[J]. Theor. Appl. Genet., 1987, 74: 284-286.
- [10] Büter B, Schmid J E, Stamp P. Effects of L-proline and post-plating temperature treatment on Maize(*Zea mays* L.) anther culture[J]. Plant Cell Reports, 1991, 10: 325-328.
- [11] Barloy D, Beckert M. Improvement of regeneration ability of androgenetic embryos by early anther transfer in maize[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, 33: 45-50.
- [12] Wassom J J, Mei C, Rocheford T R, et al. Interaction of environment and ABA and GA treatments on the maize anther culture response[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 64: 69-72.
- [13] Lichter R. Induction of haploid plants from isolate pollen of brassica napus Z[J]. Pflanzenphysiol BD, 1982, 105: 42-43.
- [14] Hunter C P. The effect of anther orientation on the production of microspore-derived embryoids and plants of *Hordeum vulgare* cv. Sabarlis[J]. Plant Cell Reports, 1985, 4: 267-268.
- [15] 陈英,王瑞丰,田文忠,等.水稻游离花粉粒培养诱导形成植株的研究[J].遗传学报,1980,1(7):46-54.
- [16] Pescitelli S M, petolino J F. Microspore development in cultured maize anthers[J]. Plant Cell Reports, 1988, 7: 441-444.
- [17] Coe E H. A line of maize with haploid frequency[J]. Aner.Nat., 1959, 93: 381-382.
- [18] 刘治先,张铭堂.玉米 Stock6 的遗传特性及其在玉米育种上的应用[J].山东农业科学,1996(3):4-7.
- [19] 韩学莉,唐祈林,曹墨菊,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):64-66,69.
- [20] 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.
- [21] 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].中国农业大学学报,1998,3(增刊):6-10.
- [22] 才卓,徐国良,刘向辉,等.玉米高频率单倍生殖诱导系吉高诱系 3 号的选育[J].玉米科学,2007,15(1):1-4.
- [23] 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: 405-410.
- [24] Tymov V S, Zavalishina A N. Inducing high frequency of matroclinal haploids in maize[J]. Dok l. Akad. Nauk SSSR, 1984, 276(3): 735-738.
- [25] Shatskaya O A, Zabirowa E R, Shcherbak V S, et al. Mass induction of maternal haploids in corn[J]. Maize Genet. Coop. Newslett, 1994, 68: 51.
- [26] Chalyk S T. Creating new haploid-inducing lines of maize[J]. Maize Genet. Coop. Newslett, 1999, 73: 53-54.
- [27] Kermicle J L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize[J]. Science, 1969, 166: 1422-1424.
- [28] 王宏伟,邢志远,史振声,等.药剂诱导玉米孤雌生殖[J].玉米科学,2006,14(6):35-37.
- [29] 文仁来,阎飞燕,吴翠荣,等.化学药物诱导玉米孤雌生殖研究初报[J].玉米科学,2001,9(4):31-32.
- [30] 安颖蔚,高西宁,杨立国.利用药剂诱导玉米孤雌生殖 Pa1 代植株的倍性变异[J].杂粮作物,2002,22(2):66-68.
- [31] 丰嵘,蔡群峰.药剂诱导玉米孤雌生殖研究[J].西南农业大学学报,1994,16(6):566-568.
- [32] 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): 12-13.
- [33] 魏俊杰, 池书敏, 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, 2001, 9(3): 12-13.
- [34] 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.
- [35] Wan Y, Petolino J F, Widholm J M. Efficient production of doubled haploid plants through colchicines treatment of anther-derived maize callus[J]. Theor. Appl. Genet., 1989, 77: 889-892.
- [36] Saisingting S, Schmid J E, Stamp P, et al. Colchicine-mediated chromosome doubling during anther culture of maize (*Zea mays* L.)[J]. Theor. Appl. Genet., 1996, 92: 1017-1023.
- [37] Barnabás B, Obert B, Kovács G. Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero[J]. Plant Cell Reports, 1999, 18: 858-862.
- [38] David C Z, Christian A, Thill, Neil O A. Trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa chinensis minima* (Sims) Voss seedlings[J]. Euphytica, 2005, 141: 281-290.
- [39] Barandalla L, Ritter E, Galarreta J I R D. Oryzalin treatment of potato diploids yields tetraploid and chimeric plants from which Euploids could be derived by callus induction[J]. Potato, 2006, 49: 143-145.
- [40] Rey H Y, Sansberro P A, Collavino M M, et al. Colchicine, trifluralin, and oryzalin promoted development of somatic embryos in *Iles paraguariensis* (Aquifoliaceae)[J]. Euphytica, 2002, 123: 49-56.
- [41] Chang M T. Preferential fertilization induced from stock6[J]. Maize Genet. Coop. Newslett, 1992, 66: 99-100.
- [42] Bylich V G, Chalyk S T. Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei as a possible cause of the haploid-inducing capacity in ZMS line[J]. Maize Genet. Coop. Newslett, 1996, 70: 33.
- [43] Enaleeva N K H, Tymov V S, Selivanova L P, et al. Single fertilization and the problem of haploidy induction in maize[J]. Doklady Biol. Sci., 1996, 353: 225-226.
- [44] Mahendru A, Sarkar K R. Cytological analysis of the pollen of haploidy inducer lines in maize[J]. India J. Genet. Plant Breed, 2000, 60: 37-43.
- [45] Chalyk S, Baumann A, Daniel D, et al. Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize[J]. Maize Genet. Coop. Newslett, 2003, 77: 29.
- [46] Rotarencu V, Eder J. Possible effects of heterofertilization on the induction of maternal haploids in maize[J]. Maize Genet. Coop. Newslett, 2003, 77: 30.
- [47] Wedzony M, Röber F, Geiger H H. Chromosome elimination observed in selfed progenies of maize inducer line RWS[C]. in: VII. intern. congress on sexual Plant Reproduction. Maria Curie-Skłodowska University Press, Lublin, Poland, 2004.
- [48] Fischer E. Molekulargenetis vhe untersuchungen zum vorkommen paternaler DNA-übertragung bei der in-vivo-haploideninduktion beimais (*Zea mays* L.)[C]. PHD Dissertation. University of Hohenheim, Grauer Verlag, Stuttgart.
- [49] Zhang Z L, Qiu F Z, Liu Y Z, et al. Chromosome elimination and in vivo haploid production induced by Stock6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.)[J]. Plant Cell Rep., 2008, 27: 1851-1860.
- [50] Chase S S. The reproductive success of monoplloid maize[J]. Am. J. Bot., 1949, 36, 795-796.
- [51] Maluszynski M, Kasha K J, Forster B P, et al. Doubled haploid production in crop plants, a manual[C]. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- [52] Ferrie A M R, Keller W A. Application of double haploidy and mutagenesis in Brassica[C]. Thirteenth Crucifere Genetics Workshop, University of California, Davis.
- [53] Beaumont V H. Mapping the anther culture response genes in maize (*Zea mays* L.)[J]. Genome, 1995, 38: 968-975.
- [54] 刘玉强, 黎亮, 陈绍江. 玉米生物诱导孤雌生殖后代 DH 群体变异性分析[J]. 中国农业大学学报, 2009, 14(1): 56-60.
- [55] Duvick D N. Heterosis: feeding people and protecting natural resources[C]. In "The Genetice and Exploitation of Heterosis in Crops" (J G Coors and S Pander, eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI.
- [56] Hua J P, Xing Y Z, Wu W R, et al. Single-locus heterotic effects and dominance by dominance interactions can adequately explain the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid. Proc[J]. Natl. Acad. Sci., 2003, 100(5): 2574-2579.
- [57] Tand J H, Yan J B, Ma X Q, et al. Dissection of the genetic basis of beterosis in an elite maize hybrid by QTL mapping in an immortalized F₂ population[J]. Theor. Appl. Genet., 2010, 120: 333-340.

(责任编辑: 朴红梅)