

玉米孤雌生殖单倍体加倍技术研究进展

黎 亮, 李浩川, 徐小炜, 陈绍江

(中国农业大学, 国家玉米改良中心, 北京 100193)

摘要: 玉米单倍体育种技术能显著加快育种进程。单倍体高效率加倍是单倍体技术能否广泛应用于育种实践的关键因素。综述了单倍体加倍的主要方法, 介绍常用的秋水仙素化学加倍技术, 对其他细胞分裂抑制剂也做了简要介绍, 并对今后的单倍体加倍研究进行了展望。

关键词: 玉米; 单倍体; 染色体加倍; 秋水仙素

中图分类号: S513.035.2

文献标识码: A

Research Progress of Haploid Doubling Technology on Maize

LI Liang, LI Hao-chuan, XU Xiao-wei, CHEN Shao-jiang

(China Agricultural University, China National Maize Improvement Center, Beijing 100193, China)

Abstract: Application of haploid technology can significantly accelerate the breeding process in maize breeding. Currently, widely application of this technology depends on the haploid doubling efficiency. It was reviewed that the main methods of chromosome doubling in maize, including the commonly used colchicine, as well as other microtubule inhibitors. Perspectives on chromosome doubling were also mentioned.

Key words: Maize; Haploid; Chromosome doubling; Colchicine

单倍体育种能显著地缩短育种进程、提高育种效率, 是玉米育种的重要技术之一。目前获得单倍体的途径主要有花药培养、雌穗离体培养以及生物诱导等。相比于花药培养以及雌穗离体培养, 孤雌生殖诱导单倍体技术具有操作简单、无配子选择等优点。在孤雌生殖诱导系 Stock6 的基础上已选育了多个优良诱导系, 如 MHI、RWS、UH400、高诱一号、吉高诱 3 号等。目前, 现有诱导系已能用于单倍体的大规模诱导, 但是由于单倍体植株的不育性, 必须经过染色体加倍才能成为可育的双二倍体纯系(DH系)。因此, 单倍体加倍技术成为孤雌生殖单倍体育种的关键技术。国内外对加倍技术进行了大量研究, 并取得了较大进展。目前, 国外已有一些单位和育种公司开发出了效率比较高的技术并进行大规模应用, 但是这些技术都处于保密状态。加倍技术的进

步将是我国玉米单倍体育种实现突破的关键。本文综述了目前单倍体加倍的一些主要方法, 为探索孤雌生殖单倍体的加倍技术提供参考。

1 自然加倍

单倍体的体细胞发生自然加倍是普遍存在的现象。在一些重要农作物如水稻的组培再生苗中有超过 50% 的植株是双单倍体, 而玉米中的自然加倍频率非常低。Khokhlov 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, 出现二倍体细胞的最大比例为 1.23%, 从而可能引起单倍体的自然加倍。魏俊杰也观察了 10 株单倍体花药组织的体细胞, 其二倍体体细胞的频率分布是 0~0.97%。

玉米孤雌生殖诱导单倍体自然加倍的频率普遍比较低, 许多材料的单倍体自然加倍率低于 5%, 有些材料则不发生自然加倍。Chase 报道, 单倍体的自然加倍频率达 10% 左右。可见, 单倍体的自然加倍受材料的限制较大。另外, 单倍体的雄穗和雌穗的育性恢复程度也不一样。Chalyk 发现单倍体雌穗自动恢复二倍化的程度大大高于雄穗, 单倍体能否自交结实主要取决于雄穗是否产生花粉。但是不同单倍体基因型间雄穗育性恢复的程度存在很大差别。

收稿日期: 2009-04-01

基金项目: 国家自然科学基金(30671306)、国家科技支撑计划(206B AD01A03)

作者简介: 黎 亮, 博士, 从事玉米单倍体育种研究。

E-mail: liliang88@126.com

陈绍江为本文通讯作者。 E-mail: shaohj@cau.edu.cn

Shatskaya 等考察了 4 组不同来源的单倍体材料,其雄穗育性恢复率最高的为 22%,最低的为 3.4%。Shatskaya 等研究发现,自然加倍的特性通过选择可以提高,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%。Shatskaya 等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。由此可推断单倍体的自然加倍特性也是一种遗传性状。

对于单倍体自然加倍的机理一直不很清楚,但几乎所有作物的单倍体细胞都有自然加倍的倾向。Gayen 等对单倍体花粉母细胞观察发现,细胞间有时会发生融合,并且染色质会从一个细胞转移到另一个细胞,认为单倍体的育性恢复与细胞融合有关。Testillano 等研究了玉米离体培养早期小孢子胚胎形成中的染色体加倍,认为很可能是细胞核融合导致了染色体加倍。也有学者认为,核内复制、核内有丝分裂、花粉管中精子和营养核的融合等因素都可能导致自然加倍的发生。

2 化学加倍

2.1 秋水仙素加倍法

由于自然加倍的频率往往很低,因此通过化学手段来干扰减数分裂从而实现加倍显得尤为重要。秋水仙素是目前最常用的化学加倍试剂,并在其溶液中添加一些辅助剂来提高加倍效率,其中 DMSO、吐温、细胞分裂素等是常用的辅助剂。常用的处理方法有浸种法、注射法、浸根法、浸芽法。

2.1.1 浸种法

浸种法是一种非常简便的方法,将单倍体种子放置于秋水仙素溶液中进行浸泡,具体浸泡的程序、时间、浓度以及辅助处理是影响浸种法效果的关键因素。浸种法一般采取浸泡前用清水处理,种子吸胀,以减少种子对秋水仙素的吸收,达到减少毒害的目的;在浸泡后也要进行清水处理,以减少对种子的毒害,同时避免播种时对人的毒害。

2.1.2 注射法

注射法是用注射器将适当浓度的秋水仙素溶液注射到植株的生长点处。Chase 用 0.05% 的秋水仙素和 10% 的甘油水溶液 0.5 mL 注射试验,发现处理比对照的结实率提高了 3 倍多。Eder 用 0.125% 的秋水仙素配以 0.5% 的 DMSO 水溶液注射 3~4 叶期的盾片上方 3~5 mm 处,8.1% 的植株能结实。文科等的研究表明,0.04% 的秋水仙素注射到 6 叶期的生长点处,结实率能达到 10.11%。这种方法不需要育苗

和移栽且所需的秋水仙素比较少,难点在于处理时期以及注射部位的把握,尤其对注射部位的选择,往往具有人为因素而影响加倍的效果。

2.1.3 浸根法

浸根法是指用秋水仙素溶液浸泡单倍体根的方法。浸根法可以在幼芽期进行,也可以在幼苗期进行。Seaney 将单倍体幼苗的根系在 0.05% 的秋水仙素溶液中浸泡 24 h,在 18 株单倍体中有 11 株部分雄花能够散粉,而 11 株对照中仅有 3 株散粉。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,使 3 组不同来源单倍体材料的雄花可育率达到 30%~60%,而 3 组未处理的雄花全部不育。文科等采取幼芽期浸根法,当种子发芽到 5~7 cm 时采用自编的带有小孔的铁丝网将幼芽固定而将幼根浸泡于秋水仙素溶液中。结果表明,在秋水仙素溶液浓度为 0.02% 时的加倍效果最好。浸根法的加倍效果比较好,但是需要育苗、处理、移栽等繁琐的工作环节,而且移栽后幼苗的成活率会受到影响,处理所需药剂剂量比较大,成本较高。

2.1.4 浸芽法

浸芽法指用秋水仙素浸泡幼芽的方法。Gayen 等采取 3 种秋水仙素浓度(0.03%、0.06%、0.1%)、3 个处理时间(6、12、24 h)和在种子胚芽处切口与不切口共 18 个处理组合来浸泡单倍体种子,结果以胚芽切口、0.06% 的秋水仙素溶液浓度下浸泡 12 h 效果最好,有 18% 的种子加倍成功。Eder 利用秋水仙素浸芽法的结实率能达到 27.3%,显著高于对照自然加倍的结实率。本实验室也成功建立起以此法为基础的高效加倍方法,一般情况下,加倍成功率可达 30% 以上乃至更高。浸芽法是一种较为有效的加倍方法,加倍效率比较高,但处理程序比较复杂,而且需要的秋水仙素溶液比较多,人体接触秋水仙素的机会也较多,因此在处理时一定要做好中毒的防范工作。

2.1.5 影响加倍效果的因素

单倍体的加倍效果与多种因素有关。在一定范围内,秋水仙素的浓度与加倍效果成正相关,但浓度过高会造成药害。另外,处理时间与加倍效果有很大关系,处理时间太长会加重药害,还会产生多倍体,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℃)。曹孜义等报道采用变温处理即在低温条件下(11℃~17℃)进行秋水仙素处理,然后恢复到常温生长,能有效减

轻药害,提高加倍效率。在花药组织培养中,使用秋水仙素并辅以 7 d 的冷激处理能显著提高加倍效率。单倍体的加倍效果受不同因素的影响,要把不同的因素进行系统分析,以满足最优的加倍条件。

2.2 细胞分裂抑制剂加倍法

秋水仙素不仅毒性很大,而且往往造成死苗、畸形等情况,因此筛选出一些具有类似功能的细胞分裂抑制剂。APM(Amiprophosmethyl)、拿草特(Pronamide)、安磺灵(Oryzalin)、氟乐灵(Trifluralin)是常用的几种细胞分裂抑制剂。

Stadler 等报道,APM 是一种能有效用于干扰细胞有丝分裂并可能引起加倍的试剂,Trifluralin 则效果不佳。Wan 等的研究表明,APM、Pronamide 和秋水仙素一样能用于诱导花粉愈伤组织的加倍,并且不提高体细胞突变。Beaumont 等的研究也表明,Pronamide 能提高玉米花粉诱导愈伤组织的加倍效率。但是也有其他研究结果并不完全一致。Martin 等的研究结果认为,用秋水仙素和 GA_3 处理花药诱导愈伤组织能提高胚状体的加倍效率,Oryzalin 和 Pronamide 则不能。Wan 等采用上述 4 种细胞分裂抑制剂对玉米花药诱导愈伤组织进行处理,均表现出不同的加倍效果,尽管 Oryzalin 能显著引起染色体加倍,但严重影响了愈伤组织再生,由此认为 APM 和 Pronamide 应用效果较好。

一氧化二氮(N_2O)也具有染色体加倍功能。Kato 最早报道其对玉米苗期染色体有加倍功能。Kato (2002) 采用 600 kPa 的 N_2O 气体处理了 8 种不同基因型的 6 叶期玉米苗 2 d,其中 44% 的植株能自交结实,对照只有 11% 的植株由于自然加倍能自交结实。

3 其他加倍技术

利用物理因素可使染色体组加倍,但频率很低,目前还没有找到有效的方法。利用 X 射线、 γ 射线、中子等辐照处理,在促使染色体数目加倍的同时,也引起了染色体的损伤、断裂、丢失等,成功率不高,结果不理想。温度处理也有助于提高染色体加倍的效率。细胞融合技术也可用于获得纯合二倍体,目前在玉米中还没有这方面的报道。

单倍体育性的恢复涉及到一个比较漫长的生长过程,从种子发芽到最后散粉的过程中各种因素都有可能影响到加倍效果,只有最后形成可育的花粉才能表明雄穗加倍成功。在加倍过程中发现,由于环境等因素大量存在着花粉被花药包裹而不能正常

散粉,因此除了依靠单倍体自身散粉之外,能否人工辅助散粉也是一个值得研究的问题。

4 结论与讨论

单倍体的加倍是单倍体技术能否应用于育种实践的关键技术。在各种加倍方法中,自然加倍法是一种最经济、操作最简便的方法,但是加倍效率低且与基因型有关是该方法应用的最大限制因素。在育种中可以有针对性地选择一些自然加倍频率比较高的材料进行自然加倍,可满足育种的需要;同时也应加强人工辅助散粉的研究,有针对性地采取一些辅助措施,如提高雄花散粉频率、提高花粉的利用频率、减少雌雄不协调的频率等来提高加倍效率。

秋水仙素是目前玉米上最常用的高效化学加倍试剂。但是由于秋水仙素的毒性大、畸形苗等副作用,筛选其他药物以替代秋水仙素并寻找最佳处理方法仍是今后研究的重点之一。要在探索更为高效加倍方法的同时,强化加倍机理研究,包括自然育性的恢复机理以及药物加倍的机理等,以建立起更加安全可靠单倍体育种技术体系。

参考文献:

- [1] Chase S S. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize, and in its component single cross hybrids and inbred lines[J]. Genetics, 1949, 34: 328.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Chen Y, Li L. Investigation and utilization of pollen-derived haploid plants in rice and wheat[C]. In: Proceedings of symposium on plant tissue culture. Science Press, Peking, 1978.
- [5] 魏俊杰. 玉米单倍体加倍技术及育性恢复机理初探[D]. 保定:河北农业大学, 2001.
- [6] Zabirowa E R, Shatskaya O A, Shcherbak V S. Line 613/2 as a source of a high frequency of spontaneous diploidization in corn[J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1993, 67: 67.
- [7] Shatskaya O A, Zabirowa E R, Shcherbak V S. Autodiploid lines as sources of haploid spontaneous diploidization in corn[J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1994, 68: 51-52.
- [8] Chase S S. Monoploids and monoploid-derivatives of maize[J]. Bot. Rev., 1969, 35: 117-167.
- [9] Chalyk S T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding[J]. Euphytica, 1994, 79: 13-18.
- [10] Shatskaya O A, Shcherbak V S, Chumak M S, et al. Relationship between frequency of autodiploid corn inbred occurrence and origin of initial stock[J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1992, 66: 58.
- [11] Gayen P, Sarkar K R. Cytomixis in maize haploids[J]. Indian Journal of Genetics & Plant Breeding, 1996, 56: 79-85. (下转第 19 页)

(上接第 14 页)

- [12] 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.
- [13] Chase S S. Production of homozygous diploids of maize from monoloids[J]. Agron. J., 1952, 44: 263–267.
- [14] Eder J, Chalys S T. In vivo haploid induction in maize[J]. Theor. Appl. Genet., 2002, 104: 703–708.
- [15] 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.
- [16] Seaney R R. Studies on monoploidy in maize[M]. Ph. D. Thesis, Cornell Univ., Ithaca, New York, 1955.
- [17] Bordes J, Dumas V 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.
- [18] Gayen P, Jasbir K M, Rajesh K, et al. Chromosome doubling in haploids through colchicine[J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1994, 68: 65.
- [19] 曹孜义, 等. 玉米单倍体胚性细胞无性系二倍化研究[J]. 遗传学报, 1983, 10(4): 274–279.
- [20] Saisingtong S, Schmid J E, Stamp P, et al. Colchicine-mediated chromosome doubling during anther culture of maize (*Zea mays* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 92(8): 1017–1023.
- [21] Antoine M S, Beckert M. Spontaneous versus colchicine-induced chromosome doubling in maize anther culture[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 1997, 48(3): 203–207.
- [22] Stadler J, Phillips R, Leonard M. Mitotic blocking agents for suspension cultures of maize black mexican sweet cell lines[J]. Genome, 1989, 32: 475–478.
- [23] Wan Y, Widholm J M. Effect of chromosome-doubling agents on somaclonal variation in the progeny of doubled haploids of maize [J]. Plant Breeding, 1995, 114: 253–255.
- [24] Beaumont V H, Widholm J M. Ploidy variation of pronamide-treated maize calli during long term culture[J]. Plant Cell Reports, 1993, 12: 648–651.
- [25] Martin B, Widholm J M. Ploidy of small individual embryo-like structures from maize anther cultures treated with chromosome doubling agents and calli derived from them[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15(10): 781–785.
- [26] Wan Y, Duncan D R, Rayburn A L, et al. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1991, 81(2): 205–211.
- [27] Kato A. Nitrous oxide(N_2O) is effective in chromosome doubling of maize seedlings[J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1997, 71: 36–37.
- [28] 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.

(责任编辑:尹 航)