

玉米孤雌生殖单倍体诱导效率优化方法研究

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/北京作物遗传改良重点实验室,北京 100193)

摘要 玉米孤雌生殖单倍体的诱导是进行单倍体育种的重要环节。本研究选择 20 个杂交种作母本进行单倍体诱导,结果表明:不同母本基因型间单倍体频率差异显著,其中高频材料的单倍体频率约为低频材料的 5 倍。以郑单 958 为母本和 CAUHOI-1 杂交经多年试验初步表明在海南冬季进行单倍体诱导的效率(3.39%)显著高于北京夏季(1.86%)。杂交诱导果穗不同部位的单倍体频率存在差异,顶部的单倍体频率较高。吐丝后不同时期的单倍体诱导表明,在吐丝早期授粉的诱导效率最高。初步研究结果表明母本基因型、诱导地点以及授粉时期均对单倍体诱导有重要影响。选择高频的母本材料,在合适的地点于吐丝早期进行单倍体诱导是单倍体诱导的最佳方案。

关键词 玉米; 单倍体; 诱导系; 双单倍体系; 优化

中图分类号 S 513

文章编号 1007-4333(2012)01-0009-05

文献标志码 A

Preliminary optimization of *in-vivo* haploid induction in maize

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

(National Maize Improvement Center of China/Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement,
China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Efficient haploid induction is the prerequisites in maize doubled haploid breeding. In this study, the results showed that the haploid induction rates differed significantly among the 20 single hybrids, and the highest rate was about five times higher than the lowest. From the multi-year haploid induction experiment using single hybrid ZD958 as female and haploid inducer CAUHOI-1 as male, the average induction rate in winter season in Hainan (3.39%) was higher than that of Beijing in summer season (1.86%). Haploid rates differed between different seed positions on the ear, and the higher haploid frequency was found on the top of the ear. Haploid induction rate was also affected by the silk age, and the younger silk could yield more haploids. The results above supported that maternal genotype, maternal silk age and inducing location could be important in haploid induction. To increase haploid induction rate and optimize the haploid induction, induction should be conducted in locations with stable environment and pollination in early time after ear silking.

Key words maize; haploid; inducer; doubled haploid; optimization

近年来,以孤雌生殖诱导单倍体为基础的单倍体育种技术研究与应用发展迅速,已经成为国内外玉米育种的核心技术之一。该技术主要包括以下几个主要步骤:1)将育种材料和诱导系杂交;2)利用籽粒颜色或者其他标记(如油份)鉴定出杂交籽粒中的单倍体;3)利用化学药剂或自然条件下对获得的单倍体进行加倍;4)将获得的加倍籽粒自交形成双

单倍体系(DH系)用于进一步的评价^[1-5]。因此,单倍体的诱导是进行单倍体育种的前提。Stock 6 是最早的诱导系^[6],诱导频率一般在 1%左右。其后,以 Stock 6 为基础,逐步选育出了多个诱导率达到 10%左右或更高的新型单倍体诱导系,有力促进了单倍体育种技术的大规模应用。但由于此类诱导系受到被诱导母本材料和诱导环境等方面的影响,因

收稿日期:2011-09-27

基金项目:现代农业产业体系-玉米(nycyt-x-02)

第一作者:黎亮,博士,E-mail:liliang88@126.com

通讯作者:陈绍江,教授,博士生导师,主要从事玉米遗传育种研究,E-mail:chen368@126.com

此如何优化诱导技术、提高其诱导效率、充分发挥诱导效能,仍有不少问题需要探讨。本研究旨在分析影响诱导率的一些因素,进而提出进行高效诱导的技术方法。

1 材料与方法

1.1 单倍体诱导的母本效应

2005年夏选择20个杂交种为被诱导材料种植于北京昌平试验站,每个杂交种植1行,无区组重复。这些杂交种中包括商业杂交种及其他产量潜力较好的杂交组合,其亲本涵盖了华北区域中主要的杂种优势群。父本农大高诱一号(CAUHOI-1)为本实验室选育的高油型单倍体诱导系。

杂交于吐丝后3~4 d进行,每个杂交种杂交至少5穗。收获后每个杂交种选择结实较好的果穗混合脱粒进行单倍体的初步鉴定,其中胚乳有紫色标记而胚无紫色标记的籽粒为拟单倍体。所有拟单倍体于第2年夏天(2006年夏)种植于北京昌平试验站进行进一步的种植鉴定,其中单倍体表现为植株矮小、叶片和茎秆绿色、多为不育;而杂交二倍体表现为植株高大、茎秆紫色、花粉可育。根据田间鉴定结果统计不同杂交种的单倍体频率。

1.2 单倍体诱导的环境效应

选择生产上种植面积较大的商业杂交种郑单958(ZD958)、农大108(ND108)以及部分试验品种1145×Y331、CD2621和CD2351共5个杂交种作母本分别和诱导系CAUHOI-1杂交进行单倍体诱导,每个杂交组合选择10个以上果穗用于单倍体诱导率的测定。试验于2004年在北京和海南进行。为了进一步研究不同年份北京和海南两地点间的单倍体诱导率差异,选择胚部标记表达较好的杂交种ZD958作母本和CAUHOI-1在北京和海南分别杂交,并进行单倍体鉴定。单倍体的鉴定方法同1.1。

1.3 果穗不同部位的诱导率比较

选择5个杂交种(NDG5, ND5598、GY115、ND108和ZD958)于2006年冬天种植于中国农业大学海南基地,以诱导系UH400(从德国霍恩海姆大学引进的诱导系)作父本和各杂交种杂交,各杂交20~40穗。收获后选择结实较好的果穗按底部和顶部分开脱粒,每部分约为果穗长度的二分之一。脱粒后根据籽粒颜色标记进行单倍体初步鉴定。单倍体的进一步鉴定于2007年夏在北京试验站进行,鉴定方法同1.1。

1.4 吐丝后不同授粉时期诱导率比较

选择不同杂交种为母本,诱导系CAUHOI-1为父本在不同的授粉时期进行授粉,其中杂交种的名称见表5。授粉时期分为3个处理,分别为:早期授粉(0~1 d),中期授粉(3~4 d)和晚期授粉(6~9 d),分别根据杂交种花丝吐丝后的天数进行判断。即将吐丝时剪开苞叶授粉定义为0 d,刚吐丝时定义为1 d,依次往后记录吐丝后的天数。收获后按不同的处理选择结实性较好的果穗分别混穗脱粒以进行单倍体的鉴定。单倍体的鉴定方法同1.1。此试验分别于2006年夏和2007年夏在北京昌平试验站进行。

2 结果与分析

2.1 不同母本基因型对单倍体诱导率的影响

利用20个杂交种作母本和CAUHOI-1杂交,由表1可见不同杂交种诱导产生单倍体的频率存在

表1 20个杂交种的单倍体诱导率比较

Table 1 Comparison of the haploid induction rates among 20 hybrids

杂交种代号	总粒数	单倍数	诱导率/%	位次
G1	1 016	25	2.46	17
G2	492	16	3.25	11
G3	728	8	1.10	20
G4	464	25	5.39	3
G5	364	25	6.87	1
G6	677	17	2.51	16
G7	367	11	2.99	13
G8	495	28	5.66	2
G9	1 106	23	2.08	18
G10	951	33	3.47	10
G11	600	21	3.50	9
G12	549	17	3.10	12
G13	883	23	2.60	15
G14	780	36	4.62	4
G15	507	23	4.54	6
G16	578	21	3.63	8
G17	1 228	33	2.69	14
G18	209	4	1.91	19
G19	1 108	44	3.97	7
G20	525	24	4.57	5
平均	659	682	3.55	

着显著差异。单倍体频率最高的是 G5(农大 622, 6.87%), 单倍体频率最低的是 G3(农大 169C, 1.10%)。各杂交种单倍体诱导的平均频率为 3.55%。此结果表明单倍体诱导效率的高低受母本基因型的影响很大, 但诱导效率的高低与杂种优势模式没有必然的联系, 比如诱导率最高和最低的 2 个杂交种均来自于瑞德×四平头的模式。

2.2 不同环境的单倍体诱导率差异

2004 年的结果初步表明(表 2), 海南冬季的单倍体诱导频率高于北京夏季。其中 GY115, 1145×Y331, CD2621 在海南的诱导率显著高于北京($P<0.05$), ND108 和 CD2351 在两个地点间的诱导率差异不显著。连续 4 年选择杂交种 ZD958 和 CAUHOI-1 杂交诱导的观察结果见表 3。从中可以看出, 海南的单倍体诱导率极显著($P<0.01$)高于北京, 其中海南冬季的平均诱导率为 3.39%, 而北京夏季的诱导率仅为 1.86%。

表 2 5 个不同杂交种在北京海南两地点间的诱导率比较

Table 2 Comparison of haploid induction rates between Beijing and Hainan using 5 hybrids %

地点	GY115	ND108	1145×Y331	CD2621	CD2351	平均
北京	3.93	2.68	2.12	3.50	3.50	1.86
海南	4.83	2.76	3.83	4.37	3.81	3.39

表 3 不同年份北京和海南两地点间的诱导率比较

Table 3 Comparison of haploid induction rates between Beijing and Hainan in multi-years

年份	地点	总粒数	单倍体数	诱导率/%
2005	北京	1 083	19	1.75
2006	北京	2 579	62	2.40
2007	北京	4 262	63	1.48
2008	北京	1 392	30	2.16
2009	北京	2 432	45	1.85
总计		11 748	219	1.86
2005	海南	17 397	609	3.50
2006	海南	6 369	246	3.86
2007	海南	2 400	50	2.08
2008	海南	3 411	102	2.99
2009	海南	1 932	62	3.21
总计		31 509	1 069	3.39

2.3 诱导杂交果穗不同部位的单倍体频率比较

从 2006 年海南冬季所测验的 5 个杂交种来看, 除了 ND108 之外, 其余 4 个杂交种和 UH400 杂交果穗中顶部出现的单倍体频率均高于底部(表 4), 顶部籽粒平均单倍体频率为 4.35%, 而底部出现的单倍体频率为 3.50%。 t 测验表明, 只有 GY115 和 ND5598 两个杂交种的顶部和底部单倍体频率达到极显著差异($P<0.01$), ZD958 和 NDG5 顶部和底部的单倍体频率差异不显著。

表 4 诱导果穗顶部和底部的诱导率比较

Table 4 Comparison of haploid induction rates between top and bottom parts of ear

基因型	部位	总粒数	单倍体数	诱导率/%	诱导率 平均值/%
GY115	顶	3 189	187	5.86	4.95
	底	2 535	97	3.81	
ND108	顶	2 711	56	2.07	2.74
	底	2 620	90	3.44	
ZD958	顶	3 340	141	4.21	3.85
	底	3 029	105	3.45	
ND5598	顶	2 647	143	5.40	4.32
	底	2 940	98	3.34	
NDG5	顶	3 938	162	4.11	3.81
	底	3 945	138	3.51	
合计	顶	15 825	689	4.35	3.94
	底	15 069	528	3.50	

2.4 授粉时期对单倍体诱导效率的影响

母本雌穗吐丝后, 总体上延迟授粉会降低单倍体的诱导率(表 5)。但是也有例外, 其中 2007 年当以 ND5598 和 ZD958 为母本于晚期授粉时的单倍体频率高于中期授粉的频率。早期授粉的单倍体平均频率最高(1.86%), 其次是中期授粉(1.59%), 晚期授粉的频率最低(1.12%)。方差分析结果表明, 不同杂交种间单倍体的诱导率达到显著差异, 而不同处理时间的单倍体诱导率没有达到显著差异。尽管如此, 由于授粉时间越晚, 杂交结实数显著降低, 因此早期授粉获得单倍体的数量显著高于晚期授粉。

表 5 不同杂交种作母本吐丝后不同天数和 CAUHOI-1 杂交后的单倍体频率比较

Table 5 Comparison of the haploid induction rates under different pollination stages after silking

年份	母本	授粉时期/d	总粒数	单倍体数	诱导率/%
2006 年	ND108	0~1	2 761	61	2.21
		3~4	974	25	2.57
		6~9	836	14	1.67
	ZD958	0~1	1 737	42	2.42
		3~4	842	20	2.38
	GY115	0~1	1 780	19	1.07
		6~9	771	3	0.39
	NDG5	0~1	2 444	47	1.92
		3~4	750	8	1.07
		6~9	1 300	10	0.77
2007 年	ND5598	0~1	1 182	18	1.52
		3~4	1 113	12	1.08
		6~9	728	9	1.24
	ND108	0~1	1 113	23	2.07
		3~4	339	5	1.47
		6~9	498	7	1.41
	ZD958	0~1	1 939	31	1.60
		3~4	1 906	24	1.26
		6~9	417	8	1.92
合计		0~1	12 956	241	1.86
		3~4	5 924	94	1.59
		6~9	4 550	51	1.12

3 讨 论

3.1 诱导系与母本的互动

目前关于单倍体诱导效率的优化鲜有报道。本研究表明,不同母本基因型间单倍体的诱导效率差异很大,这与前人的研究结果相一致^[7-8]。至于母本种质背景对诱导率的影响,李国良等的研究结果表明诱导兰卡斯特类群材料产生单倍体的频率要显著高于瑞德、四平头和旅大红骨类群,地方种质群^[9]。本研究使用的 20 个杂交种基本上涵盖了黄淮海区种质的主要杂种优势类群,没有发现不同杂种优势模式与诱导频率之间明显的相关性。所以,不同种

质背景或杂种优势类群与单倍体诱导率之间的关系仍需要进一步研究。

3.2 诱导环境的优化

据 Röber 等报道,不同环境间诱导率差异很大,在比较差的环境下平均诱导率仅 2.0%,而在理想的环境下诱导率可以高达 16.4%^[7]。而 Eder 和 Chalyk 利用 12 份材料在两种不同的环境下诱导,并没有发现不同环境下的诱导率具有显著差别^[8]。Prigge 等在热带地区进行单倍体诱导利用无叶舌材料作测验种 2 个环境下的诱导率具有显著差异^[10]。本研究选取了北京和海南 2 个地点进行研究,发现海南冬季的诱导率显著高于北京夏季。这种差异很可能与当地的气候条件有关。北京夏天的气温很高,而海南冬天的气温相对较低,昼夜温差也较大。有可能气温较低的情况下更适合于籽粒发育。因此,考虑到单倍体诱导过程中籽粒的发育和色素标记基因的表达,选择适合的单倍体诱导地点或环境如海南、西北等地建立诱导基地将有利于提高单倍体诱导效率。

3.3 诱导时间的选择

授粉时期对单倍体的诱导率也有重要影响。不同的研究结果都表明延迟授粉可以提高玉米单倍体的发生频率^[11-13]。文科等的研究结果表明长花丝授粉的单倍体频率要高于短花丝,延迟授粉也可能是原因之一^[14]。Rotarenco 和 Mihailov 则观察到随着授粉时期的延长,单倍体频率有降低的趋势^[15]。本研究发现果穗顶部籽粒的单倍体频率有高于底部的趋势,此与前人的研究结果相一致^[11,16-17]。Chalyk 认为这是由于顶部的卵细胞发育程度最晚,更易于单受精发育成单倍体胚^[17]。花丝的发生最先从果穗基部 5~15 轮开始,然后上部和下部的花丝相继出现,顶部的花丝出现最晚^[18]。据 Randolph 在 1936 年的观察,当花丝长度为 3~5 cm 时授粉到受精的时间大约为 16 h,而当花丝长度为 15~18 cm 时需要大约 23 h^[19]。假设 2 个精核中其中某 1 个精核受精的功能较弱,那么花丝越长单倍体频率就可能越高,因而底部出现的单倍体的频率应该更高。本研究表明底部的单倍体频率低于顶部,早期授粉的单倍体频率高于晚期授粉,此现象尚无法用花丝长短进行解释。Rotarenco 和 Mihailov 认为这与异雄核受精有关,由于吐丝时间长的花丝直径更大,可以容纳更多的花粉管生长,单受精的概率可能降低进而影响单倍体出现频率^[15]。

Rotarenco 报道人工授粉和自然授粉的单倍体频率存在显著差异,也认为异雄核受精是导致这种现象的原因^[20]。由此推测,不同环境下单倍体诱导率的差异也可能与花丝自身结构以及花粉的活力有关。

高效地进行单倍体诱导对于单倍体育种至关重要。特别是大规模的单倍体育种工作的开展,更需要从系统化和工程化角度进行技术优化。由于诱导效率受到母本材料、地点环境等因素影响,本研究结果支持在诱导技术优化过程中,系统地利用高频诱导材料、高频诱导地点、高频诱导时间将有利于单倍体育种技术系统效率的提高,也有利于单倍体育种工程化特别是专业化和基地化的发展。当然,随着单倍体育种技术的普及和规模化应用,仍然需要探索更加完善的单倍体诱导优化方案,从而为实现单倍体育种的工程化提供理论依据。

参 考 文 献

[1] Chase S S. The monoploid method of developing inbred lines [C]. Proc 6th Annual Hybrid Corn Industry Research Conf, Chicago, Illinois, USA, 1951:29-34

[2] Bordes J, Dumas De 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

[3] Melchinger A E, Longin C F, Utz H F, et al. Hybrid maize breeding with doubled haploid lines: quantitative genetic and selection theory for optimum allocation of resource [C]. Illinois Corn Breeders School, Urbana, 2005:8-21

[4] Seitz G. The use of doubled haploids in corn breeding [C]. In Proc of the 41st Annual Illinois Corn Breeders' School, Univer of Illinois, Urbana-Champaign, IL. 2005:1-7

[5] 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]. 作物学报, 2003, 29:587-590

[6] Coe E H. A line of maize with high haploid frequency [J]. Am Nat, 1959, 93:381-382

[7] Röber F K, Gordillo G A, Geiger H H. *In vivo* haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding [J]. Maydica, 2005, 50:275-283

[8] Eder J, Chalyk S T. *In vivo* haploid induction in maize. Theor Appl Genet, 2002, 104:703-708

[9] 李国良, 苏俊, 李春霞, 等. 农大高诱 1 号对玉米不同种质类群诱导单倍体的效果初探 [J]. 杂粮作物, 2008 (3):125-129

[10] Prigge V, Sánchez C, Dhillon B S, et al. Doubled haploids in tropical maize; I. Effects of inducers and source germplasm on *in vivo* haploid induction rates [J]. Crop Sci, 2011, 51(4):1498-1506

[11] Chase S S. Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.) [J]. Bot Review, 1969, 35:117-167

[12] Seaney R R. Monoploids in maize [J]. Maize Genet Coop News Lett, 1954, 28:22

[13] Chase S 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

[14] 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

[15] Rotarenco V A, Mihailov M E. The influence of ear age on the frequency of maternal haploids produced by a haploid-inducing line [J]. Maize Genet Coop News Lett, 2007, 81:9-10

[16] Sarkar K R, Prasanna B M, Gayen P. Distribution of haploids on the ear [J]. Maize Genet Coop News Lett, 1995, 69:107

[17] Chalyk S T. Creating new haploid-inducing lines of maize [J]. Maize Genet Coop News Lett, 1999, 73:53-54

[18] Bassetti P, Westgate M E. Emergence, elongation, and senescence of maize silks [J]. Crop Sci, 1993, 33:271-275

[19] Randolph L F. Heat treatments [J]. Maize Genet Coop News Lett, 1936, 10:4

[20] Rotarenco V A. Production of matroclinous maize haploids following natural and artificial pollination with a haploid inducer [J]. Maize Genet Coop News Lett, 2002, 76:16

责任编辑：袁文业