

小麦孤雌生殖的诱导及其在遗传育种上的应用

刘洪梅¹, 王和乐²

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 新乡市农业科学院, 河南 新乡 453000)

摘要: 介绍了小麦孤雌生殖技术, 包括孤雌生殖的诱导方法、鉴定方法及其在小麦遗传和育种研究中的应用。

关键词: 小麦; 孤雌生殖; 诱导; 应用

中图分类号: S512.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)03-0008-04

孤雌生殖是指卵细胞未经受精而单独发育成胚或长成植株, 可分为单倍体孤雌生殖和二倍体孤雌生殖。孤雌生殖技术在作物育种中能够简化育种过程, 已成为快速育种的一个重要途径, 在植物育种方面具有非常重要的应用价值, 越来越受到育种工作者的重视。在天然状态下, 大多数植物孤雌生殖发

生频率仅为 0~0.364%, 远不能满足理论研究和生产应用的需要, 而人工诱导能大幅度提高孤雌生殖的发生频率。小麦孤雌生殖的研究起步于 18 世纪 70 年代, 至今已发现多种小麦孤雌生殖的诱导方法, 其中效果较好的方法已应用于育种实践, 笔者对这方面的内容进行了简要综述, 旨在推广孤雌生殖

收稿日期: 2007-09-09

基金项目: 河南师范大学科研启动基金(052065)

作者简介: 刘洪梅(1975-), 女, 黑龙江铁力人, 讲师, 硕士, 主要从事植物细胞遗传研究。

的资金, 并依法依规专项使用。要以提高农业综合生产能力为出发点, 加大基本农田整理力度, 建设高标准基本农田。结合土地开发整理项目区推进小型农田水利建设, 将小型农田水利设施建设作为土地开发整理项目建设的重要内容。继续推进以田、水、路、林、村综合整治为主要内容的土地整理复垦。加大灾毁耕地复垦力度, 帮助灾区农民恢复生产、重建家园。

4.5 加强村民宅基地管理

村庄整治要立足于现有基础进行房屋和设施改造, 防止因大拆、大迁而大量占用土地。要引导农民住宅建设按规划、有计划地向小城镇和中心村集中, 严格按照土地利用规划和年度计划批准宅基地, 控制农村建设用地增量, 禁止城镇居民在农村购置宅基地。开展城镇建设用地增加与农村建设用地减少挂钩试点。

4.6 推行集约用地

目前, 用地指标紧缺, 耕地又少, 要保障发展的话, 出路就在于节约集约用地。因此, 要把每一块地都用好, 要把好每一个项目的预审关, 要千方百计地挖掘用地潜力, 提高用地效率, 要严格定额指标管理, 严格限制投资强度、建筑密度^[9]。要充分利用荒

山荒地。要多把丘岗地、荒滩、劣地利用起来。同时, 还要组织存量建设用地的普查, 要摸清底数, 盘活存量, 用好存量, 要依法收回闲置用地。对农村基础设施建设用地, 如农村道路、农村集贸市场和农村公益设施建设用地, 要按照控制总量、合理布局、节约用地、保护耕地的原则进行规划建设。

参考文献:

- [1] 倪绍祥, 谭少华. 江苏省耕地安全问题探讨[J]. 自然资源学报, 2002, 17(3): 307-312.
- [2] 吴荣涛, 蔡慧敏. 河南省土地资源可持续利用路径分析[J]. 河南农业科学, 2007(3): 77-81.
- [3] 尹惠斌, 覃事娅. “新农村”建设过程中的城乡土地利用问题及对策研究[J]. 国土资源导刊, 2006(1): 44-46.
- [4] 于金芳, 周鹏, 任建兰. 土地可持续利用的动态度量[J]. 资源开发与市场, 2005, 21(4): 289-291.
- [5] 许恒周, 郭忠兴. 科学发展观指导下的土地可持续利用问题[J]. 国土资源科技管理, 2005, 22(4): 55-59.
- [6] 曲福田. 可持续发展的理论与政策选择[M]. 北京: 中国经济出版社, 2000.
- [7] 刘宗连. 新农村建设背景下的农村土地整理[J]. 中国土地, 2006(9): 18-19.
- [8] 陈昌春, 黄贤金. 建立耕地储备制度的初步研究[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(3): 439-444.
- [9] 李何超. 新农村建设与科学土地利用[J]. 资源与环境, 2006(15): 18-19.

技术,进一步探讨其在小麦遗传育种中的应用前景。

1 孤雌生殖诱导方法

1.1 花粉诱导

1.1.1 异种属花粉延迟授粉 远缘的花粉不易使卵细胞受精,但能刺激卵细胞单性发育,从而产生单倍体或纯合的二倍体胚。最初由细胞、胚胎学证明的孤雌生殖现象就是在远缘杂交时发现的^[1]。成熟的卵细胞容易引起分裂,去雄后延迟授粉能够提高孤雌生殖率,已有的研究表明,去雄后延迟 7 d 授粉,诱导效果最好^[1]。用异种属花粉延迟授粉是一种简单而有效的诱导小麦孤雌生殖的方法,已应用于育种实践。胡启德等^[2]从 1972 年开始从事小麦孤雌生殖方面的研究,用黑麦、圆锥小麦和硬粒小麦花粉延迟授粉,诱导普通小麦品种间杂种 F₁ 孤雌生殖,诱导率最高达 6.7%。

杜连恩等^[3]在应用此法进行小麦孤雌生殖诱导时发现,不同诱导者在处理同一组合时有不同的诱导频率,表明诱导者和被诱导者之间有互作。因此,诱导小麦孤雌生殖时,应该针对被诱导者找到诱导率比较高的授粉者。

1.1.2 染色体消除型远缘花粉授粉 染色体消除型远缘花粉授粉法是用与小麦亲缘关系较远的玉米、高粱、球茎大麦等作物的花粉与小麦杂交,由于亲缘关系远,杂种胚发育过程中外源染色体有消失现象,然后用组织培养的方法得到愈伤组织,愈伤组织分化就可获得单倍体植株。该法是由“球茎大麦技术”发展而来。Kao 和 Kasha 用球茎大麦作父本与栽培大麦授粉后,观察到在胚发育的早期,球茎大麦的染色体逐渐被全部排出,最后得到只有栽培大麦基因组的 15.5% 的双单倍体和 11.0% 的单倍体植株。1975 年 Barclay 用球茎大麦花粉给普通小麦授粉,借球茎大麦的染色体消失,获得了 13.6% 的小麦单倍体植株^[4]。但由于小麦染色体 5B 和 5A 上的显性 *Kr1* 和 *Kr2* 基因控制着小麦基因型远缘杂交的不亲和性,限制了“球茎大麦技术”在育种上的应用。在寻找更有效的授粉者时,Laurie 等^[5]研究表明,玉米与小麦的远缘杂交能够诱导小麦孤雌生殖,且具有高成胚率的特点。原因是玉米对小麦的 *Kr* 基因位点不敏感和杂合子中玉米染色体能够自发消除,但小麦与玉米等远缘种存在的播期不同、花期不遇等因素也限制了该方法的广泛应用。随着研究的深入,李大玮等^[6]用鸭茅状摩擦禾作授粉者,也成功诱导出小麦孤雌生殖植株,鸭茅状摩擦禾是玉米族中摩擦禾属的一个种,具有多分枝、花期长、花粉多等特点,能够克服玉米与小麦杂交时的困难,

并且也具有杂交后高成胚率的特点。

1.1.3 辐照花粉授粉 此法是将花粉用射线(X 射线、γ 射线等)照射后再给小麦授粉,诱导小麦发生孤雌生殖。在一粒小麦中用被 X 射线照射过的花粉授粉,孤雌生殖诱导频率最高可达 17.6%^[1]。胡启德等^[2]用⁶⁰Co-γ 线照射带有标记性状品种的花粉给普通小麦品种间杂种 F₁ 授粉,获得最高为 7.5% 的孤雌生殖诱导率。此外用放射性同位素 P32 处理普通小麦也能够引起孤雌生殖,获得小麦单倍体植株^[1]。

1.2 化学药剂诱导

用化学药剂诱导小麦孤雌生殖方法简便,不需要花粉刺激或参与假配合,只需化学药剂处理花柱、柱头或子房。已发现能够诱导小麦孤雌生殖的药剂有 DMSO (二甲基亚砷)、PCPA (对氯苯氧乙酸)、KT (激动素)、2,4-D (2,4 二氯苯氧乙酸)、NAA (奈乙酸)、GA₃ (赤霉素)、肌醇等。不同药剂的诱导效果差异很大,同一药剂不同浓度诱导效果也有较大差异,孙耀中等^[7]的研究表明,对氯苯氧乙酸以 500 mg/L 的诱导结实率最高(4.6%);肌醇以 100 mg/L 的诱导结实率最高(4.2%);2,4-D 则以 10 mg/L 的诱导结实率最高(3.4%)。另外,不同药剂组合存在一定的互作效应,王金玲等^[8]研究表明,混合药剂中 DMSO 2%+KT 100 mg/L+对氯苯氧乙酸 500 mg/L 和 DMSO 40 mL+KT 100 mg/L+对氯苯氧乙酸 500 mg/L+秋水仙素 0.1%+肌醇 10 mg/L+吲哚乙酸 20 mg/L+2,4-D 10 mg/L 为较优组合。

关于处理时期,欧行奇等^[9]研究表明,抽穗期处理诱导结实率最高,孕穗期次之。孙耀中等^[10]诱导矮败小麦不育株孤雌生殖时的试验结果表明,用药剂处理的时间以每天 19:00 以后处理的效果最好。山军建^[11]等的试验表明,施药方法以喷施 3 次的效果最好。

另外,唐明远^[12]新研制出一种复合诱导剂 TAM,它是由光合作用增强剂、细胞分裂促进剂、内源激素乙烯抑制剂、渗透剂、展着剂及乳化剂等组成。TAM 诱导剂在诱导水稻、玉米孤雌生殖及新品种选育上已卓有成效。目前还没有人将 TAM 诱导剂应用在小麦孤雌生殖育种上。

1.3 异源细胞质-核互作诱导

Mozoti 等^[13]最早在玉米中发现,具有大刍草细胞质的玉米能高频率地产生单倍体。20 世纪 50 年代,Kihara 等^[14]在研究中证实,某些山羊草细胞质和普通小麦核组成的核质杂种,不但有雄性不育的特性,亦可产生高频率的单倍体。杨天章等^[15]的研

究也表明,具有粘果山羊草细胞质的 1BL/1RS 易位系可产生单倍体,平均频率为 16.71%,最高达 70%。这是目前应用其他技术难以比拟的,而且这样诱导的单倍体种子一般均能正常发芽,生长发育良好,加倍方便,该法的缺点是需要筛选出加倍后的纯合可育株。

1.4 子房、胚珠离体培养诱导

该法是将未授粉的小麦子房或胚珠进行组织培养,从中获得孤雌生殖植株。丹麦胚胎学家 Jonson 认为,来自大孢子的单倍体比来自小孢子的单倍体更有活力^[16]。用未授粉的子房、胚珠培养,为那些难以用花药培养获得单倍体的植物或雄性不育植物提供了获得单倍体的有效途径。张素芳等^[17]从 1987 年开始小麦“三系”子房离体培养,分别从太谷核不育系和 T 型细胞质雄性不育系的未授粉子房培养中成功获得了单倍体植株。

上述几种孤雌生殖诱导方法,单独使用都能获得一定的诱导率,但若将两种或多种诱导方法组合使用,诱导效果更佳。在一粒小麦中,用 X 射线照射过的花粉授粉,单倍体发生的频率为 17.6%,单独采用延迟授粉方法,单倍体出现的频率为 29%;当两种方法并用时,单倍体发生频率达 77.8%^[18]。另外采用田间药剂处理和室内幼胚培养相结合的方法,也能够明显提高孤雌生殖植株频率^[19]。孙敬三等^[20]则用玉米花粉授粉后,再用 2,4-D 处理然后再将获得的幼胚进行组织培养,最终可获得 78.3% 的单倍体植株。

2 孤雌生殖植株鉴定方法

2.1 外部形态特异性观察

由于单倍体染色体数减少一半,因此孤雌生殖单倍体植株一般体型较小,育性很低,叶片表皮的气孔较小,保卫细胞里的叶绿体数目较少。如一粒小麦单倍体的株高为二倍体株高的 63%,为穗长的 70%,叶长的 66%,叶宽的 73%。而且生长势弱,分蘖少,甚至不分蘖^[1]。孤雌生殖二倍体植株性状分离程度极小,且外部形态类似被诱导的母本植株。

2.2 遗传学分析

鉴别单性生殖的小麦植株最方便的方法是利用遗传标记基因,即利用显性性状作为标记。在孤雌生殖诱导中,利用的授粉者最好在某些性状上是显性,而被诱导者在相应性状上是隐性。这种父本所带有的显性基因,称为标记基因。这样诱导后代中凡表现出隐性性状而无作为标记的显性性状植株就可能是孤雌生殖植株。胚和胚乳的双重标记是最理想的能在孤雌生殖中利用的标记基因。胚和胚乳均

带有标记性状,可以确定是经双受精产生的杂种种子;如果胚无标记性状,胚乳带有标记性状,即是最理想的由假配合(假受精)产生的孤雌生殖后代。在小麦幼苗期可利用的显性标记性状有红或紫芽鞘及红或紫叶耳^[1]。例如,在用黑麦诱导时,黑麦的红紫色芽鞘便是一个可利用的遗传标记性状。

2.3 细胞学和胚胎学分析

采用诱导后代小麦根尖细胞染色体计数的方法,可以检测孤雌生殖植株。胡启德等^[2]在小麦孤雌生殖后代中鉴定二倍体就曾用此法。另外配合用石蜡切片法、子房整体透明法等观察小麦胚胎发育过程,可进一步证实孤雌生殖及确定发生原因。

2.4 生化分析

对诱导后代进行酯酶同工酶分析,是一种较快速的孤雌生殖植株鉴定方法。方法是在诱导后代植株和其父、母本的种子中分别取样,每次样品用 3~4 粒种子,将种子发芽 3~4 d 后,取其胚乳做凝胶电泳分析。根据显示酯酶谱带的异同,来判断诱导植株是母本型、杂种型,还是附加型。

2.5 分子遗传学分析

取孤雌生殖一代、二代和亲本的叶片,烤干、研碎,提取 DNA。用 RAPD 方法,在不同 Primer 背景下电泳制板、照相,分析孤雌生殖一代、二代整齐一致株群 DNA 带和亲本 DNA 带之间的相互关系。

3 孤雌生殖在小麦遗传育种上的应用

3.1 加快育种进程,提高育种效率

应用常规方法杂交育种时,需经多年的基因分离、重组和纯化,一般要 7~8 年才能获得纯合的小麦新品种。而孤雌生殖产生的单倍体植株经自然加倍或人工加倍后,容易获得纯合基因型,隐性性状能够直接表现出来,这时只要发现理想的基因型便可繁殖推广,从杂交到纯合品种只需 3~4 年,大大缩短了育种年限,节省人力物力。胡启德等^[2]通过诱导普通小麦品种间杂种 F₁ 孤雌生殖,已育成春、冬小麦“单生”系列品种。王子宁等^[21]用玉米诱导小麦孤雌生殖法培育糯性小麦,试验结果表明,该法操作技术简便、成本低,诱导频率比常规育种高 8 倍。

3.2 快速固定杂种优势

利用杂种优势可大幅度提高小麦产量和品质。按照 Bruce^[19]的理论,如果杂种后代是纯合的,而且包含了双亲的全部优良显性基因,那么杂种优势就被固定下来。但由于不良基因常与优良基因连锁,应用常规育种方法不易得到含有双亲全部优良显性基因的纯合基因型个体。而单倍体通常来源于胚囊中的各种单倍体细胞,这些单倍体细胞含有双亲更

多的优良显性基因是有可能的, 这些单倍体细胞发育成植株, 经过人工加倍或染色体自然加倍形成的纯合二倍体, 就可部分地固定杂种优势。而如果能够成功诱导杂种母本的二倍体孤雌生殖, 就能够快速传递杂种优势, 完全地固定杂种优势。

3.3 培育遗传育种材料

孤雌生殖能够产生大量的单倍体植株。单倍体是进行遗传和育种研究的极好材料。如利用单倍体创制单体, 单体植株自交后还可产生缺体。单体、缺体是研究基因定位和基因互作的重要材料。此外通过单倍体还可培育三体、四体等一系列的非整倍体, 从而创造小麦附加系、易位系等遗传育种材料。

3.4 创造新种质、丰富遗传资源

利用孤雌生殖还可以克服远缘杂交不亲和性, 培育新种质。如董安书等^[22]将普通小麦×硬粒小麦杂种作母本诱导孤雌生殖, 从孤雌生殖后代植株中获得了 $2n=38$ 的小硬麦, 不仅创造了小麦新类型, 还提供了一种新的种间杂交育种方法。另外 Riera-Lizarazu^[23]等曾报道, 由燕麦和玉米杂交得到的燕麦成熟植株中永久保留了玉米的一到多条染色体, 已鉴定了分别带 8 条不同玉米染色体的 8 个燕麦—玉米附加系。刘辉等^[24]对小麦×玉米杂交后代的蛋白质及酯酶同工酶进行分析时, 也发现了附加型谱带, 如果这种小麦—玉米附加型能够稳定遗传, 那么不仅丰富了小麦遗传资源, 也可能对小麦品质及性状的改良有重要意义。

综上所述, 小麦孤雌生殖技术在小麦种质资源研究、提高遗传育种效率、固定杂种优势甚至改良小麦品质上都展现出诱人的应用前景。目前该项技术还存在诱导率低、诱导机理不明确等问题, 今后进一步研究的重点应是寻找更高效的诱导方法, 提高孤雌生殖诱导频率, 探明诱导孤雌生殖机理, 使该项技术更加完善, 以便在小麦遗传和育种上得到广泛的推广和应用。

参考文献:

- [1] 李德炎. 小麦育种学[M]. 北京: 科学出版社, 1976.
- [2] 胡启德, 何宗宇, 曹化林, 等. 诱导小麦孤雌生殖及其应用[J]. 遗传学报, 1979, 6(1): 20.
- [3] 杜连恩, 郭素琴. 延迟授以黑麦花粉和化学药剂诱导冬小麦孤雌生殖的研究初报[J]. 河北农学报, 1978, 1(1): 7—10.
- [4] Barclay I R. High frequencies of haploid production in wheat(*Triticum aestivum*) by chromosome elimination[J]. Nature, 1975, 256: 410—411.
- [5] Laurie D A, Bonnett M D. Wheat×maize hybridization[J]. Can J Genet Cytol, 1986, 28: 313—316.

- [6] 李大玮, 邱纪文, 殴阳平, 等. 普通小麦与鸭茅状摩擦禾的远缘杂交 I. 胚形成频率[J]. 遗传学报, 1994, 21(5): 398—402.
- [7] 孙耀中, 董洪平, 秦素平, 等. 化学诱导矮败小麦孤雌生殖育种的研究与应用[J]. 河南农业科学, 2004(3): 3—6.
- [8] 王金玲, 魏凌基, 周洪华, 等. 化学药剂诱导孤雌生殖在春小麦育种中的应用研究[J]. 新疆农业科学, 2005, 42(1): 38—40.
- [9] 殴行奇, 茹振钢, 薛香. 小麦化诱单性结实若干规律的研究[J]. 河南职技师院学报, 1999, 27(2): 1—3.
- [10] 孙耀中, 董洪平, 秦素平. 显性核不育小麦孤雌生殖诱导方法的研究[J]. 河北农业技术师范学院学报, 1994, 8(2): 1—5.
- [11] 山军建, 曾宝安, 王彩芬. 诱导太谷核不育矮败小麦孤雌生殖的研究[J]. 宁夏农林科技, 2001(2): 1—3.
- [12] 唐明远, 张玉华, 徐庆国, 等. TAM 诱导剂诱导作物孤雌生殖及其在育种上的应用[J]. 中国农业科学, 1999, 32(2): 106—107.
- [13] Mozoti L B Muchieberg. Haploids naturals in maize[J]. Rev Argent Argon, 1985, 25: 171—178.
- [14] Kihara H, Tsunewaki K. Use of an alien cytoplasm as a new method of production hapoids[J]. Japan J Genet 1962, 87: 310—313.
- [15] 杨天章, 刘庆法, 张改生. 利用粘果山羊草细胞质诱导小麦单倍体频率的研究[J]. 西北植物学报, 1989, 9(2): 63—69.
- [16] 潘家驹. 作物育种学总论[M]. 北京: 农业出版社, 1994.
- [17] 张素芳, 张召铎, 刘植义, 等. 从小麦雄性不育系的未授粉子房诱导单倍体植株[J]. 遗传, 1993, 15(1): 20—23.
- [18] 蔡旭. 植物遗传育种学[M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [19] 孙耀中, 董洪平. 用幼胚拯救法提高矮败小麦孤雌生殖诱导频率[J]. 华北农学报, 2002, 17(2): 141—142.
- [20] 孙敬三, 刘辉, 路铁刚, 等. 利用小麦×玉米获得小麦单倍体的研究[J]. 植物学报, 1992, 34(11): 817—823.
- [21] 王子宁, 张艳敏, 郭北海, 等. 利用单倍体育种技术快速培育糯性小麦新品系[J]. 华北农学报, 2001, 16(1): 1—6.
- [22] 董安书, 苗芳, 陶少武. 诱导小麦种间杂种孤雌生殖的研究[J]. 陕西农业科学, 1997(3): 3—6.
- [23] Riera-Lizarazu O, Rines H W, Philips R L. Maize chromosome retention, sexual transimission, and introgression in plants generated by oat×maize crosses. [M] //Abstract of the Second International Conference on the Plant Genome. San Diego: California, 1994: 178.
- [24] 刘辉, 陈纯贤, 孙敬三, 等. 小麦×玉米杂交后代的蛋白质及酯酶同工酶分析[J]. 植物学报, 1996, 38(5): 357—361.