

大棚玉米诱导小麦单倍体育种关键技术研究

刘莹, 张小娟, 凌冬, 左珍喜, 谭靖, 王立峰* (襄阳市农业科学院, 湖北襄阳 441057)

摘要 为提高大棚玉米诱导小麦单倍体技术在襄阳地区小麦育种中的应用, 研究了小麦去雄授粉技术、小麦杂交穗离体培养技术、大棚玉米栽培技术等关键技术。结果表明, “整穗+嫩龄剪药”得胚率可达 31.3%, 比常规去雄法增加 8.2%, 前者可作为一种高效去雄技术在小麦单倍体育种中进行推广应用; 利用人工气候箱进行离体穗培养, 2 个批次的得胚率分别为 24.3% 和 23.9%, 比在大棚自然条件下的得胚率分别增加 4.9% 和 8.2%, 因此前者更适于进行杂交穗的离体培养; 2020 年暖冬气候条件下大棚玉米异常健壮, 得胚率较以往年份显著提高, 说明充足的光照和较高的积温可有效提高现有大棚玉米的生长健壮程度, 进而影响玉米花粉对小麦单倍体胚的诱导频率。

关键词 大棚玉米; 小麦单倍体; 剪药; 人工气候箱; 健壮玉米

中图分类号 S512.1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)05-0053-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.05.014



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Key Techniques of Wheat Haploid Breeding by Greenhouse Maize Induction

LIU Ying, ZHANG Xiao-juan, LING Dong et al (Xiangyang Academy of Agricultural Sciences, Xiangyang, Hubei 441057)

Abstract In order to improve the application of wheat haploid technology induced by greenhouse maize in wheat breeding in Xiangyang region, we researched on the wheat emasculation method, wheat hybrid panicle *in vitro* culture technology and greenhouse maize cultivation technology. The results showed that the rate of embryos obtained by ‘cutting anther at young age’ could reach 31.3%, an increase of 8.2% compared with the conventional emasculation method. The former method could be promoted as a high-efficiency emasculation technique in wheat haploid breeding application. By using artificial climate box for *in vitro* spike culture, the embryo yields of the two batches were 24.3% and 23.9%, respectively, increased by 4.9% and 8.2% respectively compared with those in the greenhouse. The results revealed that artificial climate box was more suitable for *in vitro* culture of hybrid ears. Maize in greenhouses was exceptionally strong under warm winter in 2020, and embryo yield was significantly higher than that in previous years, indicating that sufficient light and higher accumulated temperature could effectively improve the growth of maize in existing greenhouses. The degree of maize robustness, in turn, affected the frequency of maize pollen induction of wheat haploid embryos.

Key words Greenhouse maize; Wheat haploid; Cutting anther; Artificial climate box; Robust maize

1986 年 Laurie 等^[1]首次报道利用玉米花粉诱导小麦产生了单倍体植株; 陈新民等^[2]自 1992 年进行小麦×玉米产生小麦单倍体和双单倍体的技术研究, 在国内率先建立了利用小麦与玉米杂交产生小麦双单倍体技术体系, 并利用该技术首先培育了小麦新品种^[3-4]; 顾坚等^[5]自 2000 年开始对小麦玉米远缘杂交产生小麦单倍体进行了深入研究, 利用云南昆明全年有近 180 d 可开展小麦玉米杂交的有利条件, 通过 8 年的研究与实践, 主要技术指标达到国内外同类研究的较好水平, 建立了一套产生小麦单倍体的技术体系, 并且已在小麦品种的选育中应用, 使云南省农业科学院成为国内外极少数能大量产生小麦单倍体的单位之一, 为开展小麦单倍体育种奠定了基础。襄阳市农业科学院于 2008 年开始进行小麦玉米远缘杂交诱导小麦单倍体技术研究, 分别尝试了夏播小麦、秋播小麦与同季玉米的远缘杂交, 形成了一套秋播小麦与温室反季节玉米杂交诱导小麦单倍体的技术体系, 并于 2011 年首次提出建立矮败小麦结合单倍体育种的矮败小麦高效育种生物技术新体系^[6]。鉴于此, 笔者结合襄阳市农业科学院近 10 年来的研究结果与实践经验, 针对一些瓶颈技术环节进行了探索与总结, 主要包括简易去雄方法、杂交穗离体授粉与培养技术以及冬季大棚玉米栽培要点等关键性

技术, 为小麦×玉米单倍体诱导技术转变为单倍体育种技术提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验材料为半春性小麦杂交世代材料, 包括小麦 F₁、F₂ 代和矮败小麦可育株。玉米材料为甜糯玉米品种“广甜糯 1 号”。

1.2 小麦材料去雄 笔者于 2020 年春对 F₂-6 号材料的 25 个麦穗采用了常规整穗+去雄法; 对 48 个麦穗采用整穗+嫩龄剪药法替代了常规去雄法, 选择开花前 7 d 的麦穗先整穗, 去掉中间小花, 仅保留基部 2 朵小花, 剪药时从小花最膨大处入手, 斜向上 45°角剪去颖壳, 3 个花粉囊同时被剪破, 此时可见柱头羽状体不明显, 毛刷尚未大幅展开。

1.3 杂交穗的离体授粉及穗培养 去雄麦穗授粉前即从基部剪断, 从大田转移至玉米大棚等待授粉。授粉前将所有麦穗的叶片轻轻捋下, 防止沾染花粉。用 30 cm×50 cm 的羊皮纸袋盛装新鲜玉米花粉, 将 100~150 个麦穗捆成 1 捆, 一起放入装有花粉的羊皮纸袋, 扎紧袋口使劲摇晃, 使玉米花粉在封闭空间内剧烈振荡给小麦均匀授粉。

完成杂交授粉的麦穗置入含有营养液的桶中, 其中 21 个麦穗放在大棚通风处进行穗培养(中午棚内温度太高采用半遮阴降温), 其余 25 个麦穗放在人工气候箱中培养(温度 23℃, 湿度 RH 75%)。14 d 后将麦穗取出, 剥取籽粒, 消毒后在超净工作台无菌条件下剥出幼胚, 统计得胚数。

1.4 冬季大棚玉米的栽培 玻璃温室内设塑料大棚, 长 17.0 m, 宽 3.8 m, 拱形棚顶高 2.3~2.7 m。

基金项目 湖北省中央引导地方科技发展专项(2019ZYDD037); 湖北省重点研发计划项目(2020BBA003); 湖北省技术创新专项(重大项目)(2018ABA085)。

作者简介 刘莹(1982—), 女, 湖北襄阳人, 助理研究员, 硕士, 从事小麦单倍体遗传育种研究。* 通信作者, 高级农艺师, 从事小麦遗传育种研究。

收稿日期 2020-08-18; **修回日期** 2020-09-01

采用2个大功率暖风机满足棚内温度条件的需要,在棚顶每隔1 m安装1盏36 W的植物生长灯用于补给棚内的光照,共计12盏。

玉米采用覆膜点播,施足底肥,大喇叭口期追施尿素,扬花期为防倒伏,用竹竿固定玉米植株。

2 结果与分析

2.1 不同去雄方法的比较 试验采用了2种不同的去雄方法,常规法为先整穗后人工去雄,剪药法为先整穗后剪破花药,比较不同去雄处理条件下得胚率的差异,试验结果见表1。由表1可知,不同时期处理麦穗对得胚率影响较大。3月23日整穗的2个方法中,剪药法的得胚率高达31.3%,比常规去雄法的得胚率高出8.2个百分点。但随着整穗日期的推迟,3月31日剪药法的得胚率显著下降,仅为16.7%,而常规法的得胚率为33.6%,说明剪药法应比常规法的去雄时机适当提前,否则容易损伤柱头而影响得胚率。因此,推荐在嫩龄剪药去雄,并在剪药之前进行整穗,每小穗仅留基部2朵小花,以确保去雄后2朵小花的柱头更好地自我修复。

表1 不同去雄方法的比较

Table 1 Comparison of different emasculatoin methods

| 去雄方法 Emasculatoin method | 整穗日期 Date of spike emasculatoin | 授粉日期 Pollination date | 授粉穗数 Pollinated spikelets | 得胚数 Embryo number | 得胚率 Embryo rate//% |
|---------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 常规法 Convent- ional method | 03-23 | 03-30 | 14 | 81 | 23.1 |
| | 03-31 | 04-04 | 11 | 116 | 33.6 |
| 剪药法 Cutting anther method | 03-23 | 03-30 | 15 | 97 | 31.3 |
| | 03-25 | 03-30 | 20 | 63 | 24.6 |
| | 03-31 | 04-04 | 13 | 55 | 16.7 |

2.2 杂交穗离体培养条件的比较 试验中分别将离体麦穗放在大棚自然条件和人工气候箱可控条件下进行培养,14 d

后剥取籽粒并剥出幼胚,比较不通过培养条件下的得胚率,结果见表2。由表2可知,利用人工气候箱进行离体穗培养,2个批次的得胚率分别为24.3%和23.9%,比在大棚自然条件下的得胚率分别增加4.9%、8.2%。因此,稳定适宜的环境条件对小麦×玉米杂交诱导单倍体胚频率影响显著,人工气候箱控制温度、湿度、光照是提高得胚率的有效途径。

表3 杂交穗离体培养条件的比较

Table 3 Comparison of the *in vitro* culture conditions of hybrid panicle

| 培养条件 Cultivation condition | 整穗日期 Date of spike emasculatoin | 授粉日期 Pollination date | 授粉穗数 Pollinated spikelets | 得胚数 Embryo number | 得胚率 Embryo rate//% |
|----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 大棚 Greenhouse | 03-28 | 04-02 | 10 | 46 | 19.4 |
| | 03-29 | 04-03 | 11 | 43 | 15.7 |
| 气候箱 Artificial climate box | 03-28 | 04-02 | 13 | 67 | 24.3 |
| | 03-29 | 04-03 | 12 | 60 | 23.9 |

2.3 大棚玉米生长情况对得胚率的影响 为使大棚玉米与大田小麦花期同步,每年冬季应提前在简易温室大棚内点播玉米。

由于简易温室大棚设施较简陋,不能实现对温度和光照的精确控制,外界天气条件对棚内温度和光照的影响较大。外界温度较低时,棚内平均温度也较低;晴好天气下,棚内光照条件比阴雨天要好得多。2017、2018、2019、2020年襄阳地区的冬季气候条件差异较大,大棚玉米的生长状态呈现不同特点,小麦与玉米杂交后的单倍体胚诱导率也有较大差异(表3)。从表3可以看出,2018和2019年1—2月玉米苗期温度偏低、光照偏弱,导致玉米生长较弱,平均得胚率较低;而2017和2020年同期生长积温较高、光照条件较好,玉米生长基本健壮,较前者得胚率显著增高。由此可知,冬季自然温光条件对大棚玉米的生长发育影响较大,进而造成得胚率差异显著。

表3 不同年份大棚玉米生长条件和状态的比较

Table 3 Comparison of the growth condition and status of corn in greenhouse at different years

| 年份 Year | 月份 Month | 平均高温 Average high temper- ature//°C | 平均低温 Average low temper- ature//°C | 平均气温 Average temper- ature//°C | 天气概况 Climate situation | 玉米健壮程度 Healthy degree of corn | 平均得胚率 Average embryo rate//% |
|------------|-------------|--|---|---|------------------------------|--|---------------------------------------|
| 2017 | 1月 | 9 | 2 | 5.5 | 晴好天气与雨雪天气分布正常 | 良好,茎秆一般,株高适中 | 19.5 |
| | 2月 | 12 | 3 | 7.5 | | | |
| 2018 | 1月 | 5 | -2 | 1.5 | 暴雪天气多,温室被大雪覆盖时间长,光照不足 | 较弱,秆细茎长,株高偏高 | 11.3 |
| | 2月 | 11 | 2 | 6.5 | | | |
| 2019 | 1月 | 6 | 0 | 3.0 | 1月份持续阴雨天气,光照严重不足 | 较弱,秆细茎长,株高偏高 | 12.2 |
| | 2月 | 7 | 2 | 4.5 | | | |
| 2020 | 1月 | 6 | 1 | 3.5 | 高温晴好天气多,雨雪后即遇晴天,光照充足 | 良好,茎秆粗壮,株高较矮 | 25.8 |
| | 2月 | 12 | 5 | 8.5 | | | |

3 结论与讨论

3.1 不同去雄方法的选择与比较 该试验结果显示,掌握适当的去雄时机,采用剪药法不仅不会降低得胚率,还可使去雄效率提高至少5倍,有效解决了杂交季节大量用工的难题,并在现有人力物力的基础上满足大规模杂交需要,从而

为实现育种生产提供了保障。

常规去雄法是最安全、最易推广的方法,但是效率太低,平均完成1个麦穗的整穗去雄至少需要3~5 min。李月华等^[7]将简单去雄法的垂直穗轴剪切改为45°角剪颖,提高了杂交工效,保证了杂交种子的质量。陈新民等^[8]比较了常规

去雄技术、改良垂直剪颖剪药技术、不去雄授粉技术共 3 种杂交授粉方法对单倍体胚产生频率的影响,推荐采用改良垂直剪颖剪药技术;刘琨等^[9]比较了不同去雄方法的得胚率,推荐首选剪颖不去雄法。在实际操作中,采用剪颖不去雄法对授粉时机要求很高,必须在小麦自身开花前 1~2 d 授以玉米花粉,因此每天授粉前都要先取下杂交袋确认小花发育进程,因而增加了一道工序。

笔者通过多年的实践发现,常规去雄后 5~7 d 授粉仍能诱导产生单倍体,这与顾坚等^[5]的结论一致。他们认为授粉时,小花柱头发育越成熟,单倍体胚的诱导频率越高,因此在确保去雄成功的前提下,尽量推迟授粉有益于得胚率的提高。

该研究采用了“整穗+嫩龄剪药”法,不仅提高了去雄的效率,保留了去雄的彻底性,也得到了较高的得胚率,是一种理想的、可操作性强的、易推广的、简单高效的去雄方法,为实现小麦单倍体育种提供了有效的途径。

3.2 人工气候箱离体穗培养可有效提高单倍体胚频率和稳定性 小麦×玉米单倍体诱导技术中,在田间用玉米花粉逐个给麦穗授粉是一道耗时耗力的复杂工序。笔者从 2016 年起即采用杂交穗离体授粉与培养技术^[2,10],极大提高了授粉效率,节约了人力物力。2016—2018 年离体麦穗主要在温室大棚里进行离体培养,无法精确控制温度和湿度,得胚率不稳定,平均得胚率偏低;2019—2020 年利用新购置的人工气候箱进行离体培养,得到了较好的试验效果。

陈新民等^[2]认为,小麦生长环境条件和生长状态是小麦与玉米杂交稳定获得高频率单倍体胚的重要因素。该研究采用离体授粉技术,极大提高了授粉效率,同时配套离体培养技术,使小麦生长环境达到人工可控条件,为提高小麦单倍体胚频率和稳定性提供了基础。

3.3 疫情下特殊气候带来的启示 该研究种植玉米品种为广甜糯 1 号,由于该品种生育期短、适应力强、耐低温、生长快、粉量大、诱导成功率高,因此可作为小麦授粉的主要玉米品种。

为了与大田正季播种的小麦植株实现花期同步,一般同年 12 月就要在大棚内播种玉米,次年 4 月初开花^[11]。近 10 年来的试验实践中,冬季大棚的玉米一直生长较弱,茎秆很细,而且经不起风雨,很容易倒伏。笔者采用改良土壤、提高

大棚温度、喷施矮壮素,均未能实现大棚玉米的健壮生长,每年大棚玉米的生长仅能维持小麦×玉米杂交所需要的花粉用量。

襄阳市农业科学院地处鄂北岗地(32°N,112°E),冬季日照时间短,阴天和雨雪天较多,日照强度远远低于玉米种植正季的夏秋季节。而在 2020 年疫情下,特殊的暖冬气候却带来意外的收获,冬行春令,晴好天气伴随较高温度,大棚中的玉米植株生长异常健壮,甚至出现了以前在冬季大棚中未曾见过的粗壮的支持根,株高显著降低,茎秆直径是往年的 2 倍,平均胚诱导率较往年大幅提高,达到 25.8%。在其他试验条件不变的前提下,可以断定作为花粉供体的玉米植株生长状态和健壮程度是影响小麦单倍体胚诱导率的重要因素,而除了要达到一定的积温要求,充足的光照条件也是培育健壮玉米植株的必要条件。

为了减少冬季自然温光条件对大棚玉米花粉诱导效率的不利影响,在冬季大棚内种植玉米时,要保证棚内足够充足的光照强度,专用的 LED 植物生长灯下 50 cm 处至少要达到 50 000 lx。在玉米生长正季时在大田种植玉米,获得的玉米植株最健壮,花粉活力也较高,对小麦植株单倍体胚的诱导效果更好,这种方法值得进一步研究探索。

参考文献

- [1] LAURIE D A, BENNETT M D. Wheat × maize hybridization[J]. *Can J Genet Cytol*, 1986, 28(2): 313-316.
- [2] 陈新民, 王凤菊, 李思敏, 等. 小麦与玉米杂交产生小麦单倍体与双单倍体的稳定性[J]. *作物学报*, 2013, 39(12): 2247-2252.
- [3] 陈新民, 何中虎, 刘春来, 等. 利用小麦×玉米诱导单倍体技术育成小麦新品种中麦 533[J]. *麦类作物学报*, 2011, 31(3): 427-429.
- [4] 王霖, 郭新平, 孙雷明, 等. 太谷核不育基因对小麦与玉米杂交产生单倍体诱导频率的影响[J]. *安徽农业科学*, 2006, 34(14): 3285-3286.
- [5] 顾坚, 田玉仙, 李绍祥, 等. 小麦小花穗位及发育进度对小麦×玉米单倍体胚诱导率的影响[J]. *麦类作物学报*, 2005, 25(1): 30-32.
- [6] 刘莹, 赵翠琴, 王立峰, 等. 矮败小麦高效育种技术平台的研究[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(23): 13986-13987, 13990.
- [7] 李月华, 丁寿康, 贾继增, 等. 小麦剪药去雄套袋杂交技术[J]. *作物学报*, 1992, 18(5): 387-390.
- [8] 陈新民, 李学渊, 陈孝, 等. 不同杂交技术对小麦×玉米产生单倍体的影响[J]. *作物学报*, 1998, 24(6): 743-746.
- [9] 刘琨, 李绍祥, 李宏生, 等. 简化去雄方法对小麦×玉米杂交单倍体胚诱导率的影响[J]. *西南农业学报*, 2016, 29(1): 206-208.
- [10] 顾坚, 李绍祥, 刘琨, 等. 一种小麦玉米杂交诱导单倍体胚的麦穗离体培养方法: CN201410314779. 4[P]. 2014-10-08.
- [11] 刘莹, 凌冬, 陈科海, 等. 鄂北地区诱导小麦单倍体的温室大棚玉米品种选择与播期研究[J]. *湖北农业科学*, 2019, 58(S2): 122-125.
- [12] 王章存, 姚惠源. 凯氏定氮法测定大米蛋白质时蛋白系数的确定[J]. *食品科学*, 2004, 25(1): 158-160.
- [13] 刘期成. 试析食品中蛋白质含量的测定方法——凯氏定氮法[J]. *城市技术监督*, 2000(7): 47.
- [14] 戴飞, 吴贝贝, 关敬媛, 等. 凯氏定氮法测定固体饮料中蛋白质含量的不确定度评定[J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(7): 76-78.
- [15] 马俊奎, 刘小荣, 周伟, 等. 集水槽法在大豆抗旱性鉴定中的应用研究[J]. *大豆科学*, 2016, 35(5): 766-771.
- [16] HAJDUCH M, GANAPATHY A, STEIN J W, et al. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database[J]. *Plant physiology*, 2005, 137(4): 1397-1419.
- [17] 邱丽娟, 常汝镇. 大豆种质资源描述规范和数据库标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 58-75.
- [4] 郭数进, 杨凯敏, 霍瑾, 等. 干旱胁迫对大豆鼓粒期叶片光合能力和根系生长的影响[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(5): 1419-1425.
- [5] 赵立琴. 干旱胁迫对大豆抗旱生理指标及产量和品质影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- [6] 乔亚科, 杨晓倩, 乔潇, 等. 大豆基于形态及生理指标的抗旱性评价及相关性分析[J]. *大豆科学*, 2014, 33(5): 667-673.
- [7] 杨婷婷, 张海生, 古晓红, 等. 大豆抗旱种质资源筛选及利用[J]. *湖北农机化*, 2019(12): 36-37.
- [8] 吕新云. GmLECI1 与 GmFUS3 在大豆种子发育过程中的表达及其与贮藏蛋白合成的关系[D]. 太谷: 山西农业大学, 2016.
- [9] 张代军, 周顺启, 梁怀海, 等. 高油大豆品种蛋白质和油份积累规律的研究[J]. *大豆科学*, 2005, 24(4): 301-304.
- [10] 张志民, 周青, 郑丽敏, 等. 大豆蛋白质遗传和生育期间积累规律的研究进展[J]. *大豆科技*, 2017(1): 36-39.

(上接第 52 页)