

网络出版时间:2015-12-02 14:25

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2016.01.011

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20151202.1425.022.html

高效生物诱导玉米单倍体及加倍方法的研究

孙贵星,张 野,李 洋,董 莹,张艳辉,
王立萍,徐 新,杨伟光

(吉林农业大学 农学院,吉林 长春 130118)

[摘 要] 【目的】探讨高效的玉米单倍体诱导和加倍方法。【方法】以北方春玉米区高抗茎腐病的自交系 Z99 和高感茎腐病的自交系 R120 的杂交 F_1 代为母本,以 5 个诱导系(Y601~Y605)为父本,进行单倍体杂交诱导试验;以秋水仙素作为玉米单倍体人工染色体加倍药剂,采取 4 种处理方法(浸种法、浸芽法、滴心叶法、注射法),每种方法设置 3 个质量浓度梯度(0.1,0.3 和 0.5 mg/mL)进行单倍体加倍试验。【结果】单倍体诱导试验表明,延迟授粉(长花丝 ≥ 8 cm)的平均单倍体诱导率为 17.4%,约为正常授粉(短花丝 ≤ 4 cm)条件下的 3.3 倍;伏后授粉的诱导率平均为 18.9%,约为伏期授粉的 3.3 倍。秋水仙素加倍试验中浸种法对植株伤害较严重,存活率低于 50%;注射法(0.5 mg/mL)和滴心叶法(0.3 mg/mL)的散粉率较高(46.9%,28.3%),相应的结实率也较高(14.6%,10.9%)。【结论】花丝长短和授粉时间对玉米单倍体诱导率有重要影响,延迟授粉时间和较低的温度有利于提高单倍体诱导率;秋水仙素加倍玉米单倍体时注射法处理效果最好,滴心叶法次之。

[关键词] 玉米;单倍体;诱导率;加倍率

[中图分类号] S513.032

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2016)01-0068-05

Bio-haploid inducing and doubling methods for maize (*Zea mays* L.)

SUN Gui-xing,ZHANG Ye,LI Yang,DONG Ying,ZHANG Yan-hui,
WANG Li-ping,XU Xin,YANG Wei-guang

(College of Agronomy,Jilin Agricultural University,Changchun,Jilin 130118,China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to obtain suitable methods for maize haploid inducing and doubling. 【Method】 Using the F_1 generation hybrids of high resistance head smut inbred line Z99 and high sense of stem rot inbred line R120 in north corn region as female parent and 5 haploid inducer (Y601—Y605) released by Northeast Agricultural University as male parent,maize haploid inducing test was conducted. Using colchicine as maize haploid artificial chromosome doubling agents,four approaches (dipping seed method,dipping bud method,dipping heart leaf method,and injection method) were tested with three concentration gradients each (0.1,0.3,and 0.5 mg/mL). 【Result】 The maize haploid inducing rate of longer silk (≥ 8 cm) pollination was 17.4% on average,about 3.3 times of that of shorter silk (≤ 4 cm) pollination. Haploid inducing rate of late summer pollination was 18.9% on average,about 3.3 times of that of middle summer pollination. In the four haploid colchicine doubling treatments,the plant survival rate of dipping seed method was lower than 50%. Injection (0.5 mg/mL) and dipping heart leaf (0.3 mg/mL) methods had high fertile rates of 46.9% and 28.3% and seed rates of 14.6% and 10.9%,respectively. 【Conclusion】 The haploid inducing rate was significantly influenced by the silk length and pollination date.

[收稿日期] 2014-05-23

[基金项目] 国家“863 计划”项目(2011AA10A103);国家科技计划项目(2011BAD35B01);农业部“948”项目(2011-G1-21)

[作者简介] 孙贵星(1990—),女,重庆人,在读硕士,主要从事玉米遗传育种研究。E-mail:445020514@qq.com

[通信作者] 杨伟光(1960—),男,吉林梨树人,教授,主要从事玉米遗传育种研究。E-mail:yangwg789@126.com

Late pollination and low temperature would increase haploid inducing frequency. Injection method and dipping heart leaf method were good for chromosome doubling.

Key words: maize; haploid; inducing rate; doubling rate

玉米单倍体(DH, Doubled Haploid)育种技术是传统育种技术的革命,与分子育种技术、转基因技术形成了现代玉米育种技术的新体系^[1-3]。国内外各大公司、科研院所和高等院校相继开展了玉米DH育种,以加速培育优良自交系,并应用于玉米育种实践^[2]。杜邦先锋、孟山都、先正达、利马格兰、KWS等国际公司已大规模运用玉米DH育种技术,实现了“工厂化育种”^[3]。然而玉米单倍体育种受2个因素所限制:一是难以获得足够数量的单倍体,即单倍体诱导率低,仅为3%^[4-6];二是单倍体二倍化时困难,即加倍率低,目前加倍率达到10%及以上是很难实现的^[7-9]。基于此,本研究以本课题组选育的新型诱导系Y600的姊妹系Y601~Y605为父本,以高抗茎腐病自交系Z99和高感茎腐病自交系R120的杂交F₁代为母本材料,杂交诱导产生单倍体,探讨了不同诱导因素对单倍体诱导率的影响,以及4种秋水仙素化学加倍玉米单倍体方式,以期探索一套高效、经济、便捷、实用的玉米单倍体诱导及加倍方法,为生产上实际应用玉米单倍体的秋水仙素化学加倍技术提供参考。

1 材料与方法

1.1 杂交诱导试验

以高抗茎腐病自交系Z99和高感茎腐病自交系R120的杂交F₁代为母本,以本课题组选育的5个诱导系Y601~Y605为父本,于2011年在吉林农业大学玉米育种基地杂交诱导单倍体。试验设置花丝长短和授粉时期2个因素。花丝长短设2个处理:在长花丝(≥8 cm)和短花丝(≤4 cm)条件下用诱导系花粉授粉;授粉时期设2个处理:伏期(07-15-08-01)和伏后(08-15-09-01)授粉。用于研究的母本材料分别于2011年5月中旬和6月上旬播种。

于母本吐丝后进行授粉,收获后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2012年春种植于吉林农业大学玉米育种基地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。根据杂交当代籽粒数和准单倍体籽粒数,计算单倍体诱导率:

单倍体诱导率=(准单倍体籽粒数/诱导的总籽粒数)×100%。

1.2 单倍体加倍试验

单倍体加倍药剂为上海如吉生物科技发展有限公司生产的秋水仙素原药。采取浸种法、浸芽法、滴心叶法和注射法4种处理方法,每种方法分3个质量浓度梯度(0.1, 0.3和0.5 mg/mL)。

加倍材料源于试验1.1节中杂交诱导产生的单倍体,将部分准单倍体均分4等份(100粒)后,根据不同的秋水仙素加倍处理需求种植田间,去除非单倍体植株。田间观察成活率、散粉率、结实率和药害情况。以单倍体植株是否散粉和结实来判断玉米单倍体植株是否加倍成功。为防止外来花粉授粉结实,试验选取单倍体自交后代结实较好的果穗,于2012年冬和2013年春分别在海南三亚和吉林农业大学玉米育种基地种植观察,以进一步鉴别其加倍情况。

成活率=(成活株数/单倍体总株数)×100%;

散粉率=(散粉株数/单倍体总株数)×100%;

结实率=(结实株数/单倍体总株数)×100%。

1.3 数据统计

试验原始数据先在Excel 2003软件中进行处理,再用DPS7.1^[10]软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 玉米单倍体诱导率试验

2.1.1 不同花丝长度的玉米单倍体诱导率 从表1可以看出,花丝长度对单倍体诱导率有很大影响,花丝长度≥8 cm时的平均诱导率明显大于花丝长度≤4 cm时的平均诱导率。其中在花丝长度≤4 cm时诱导率最高的是Y604,诱导率为8.4%。花丝长度≥8 cm时诱导率最高的诱导系为Y603,诱导率为21.6%。各诱导系长花丝处理单倍体诱导率均高于短花丝处理。

对花丝长度与不同诱导系间进行方差分析,结果见表2。表2结果表明:诱导系间诱导率达到显著水平,花丝长度间诱导率达到了极显著水平,说明花丝长度对诱导率有很大影响,且长花丝条件下授粉可以提高诱导率。

表 1 不同花丝长度授粉的单倍体诱导率

Table 1 Haploid inducing rates for pollination with different silk lengths

父本材料 Male material	花丝长度≤4 cm Silk length≤4 cm			花丝长度≥8 cm Silk length≥8 cm		
	总籽粒数 Total grains	准单倍体籽粒数 Grains of pre haploid	单倍体诱导率/% Inducing rate	总籽粒数 Total grains	准单倍体籽粒数 Grains of pre haploid	单倍体诱导率/% Inducing rate
Y601	3 980	170	4.3	4 380	700	15.9
Y602	3 660	235	6.4	3 900	521	13.4
Y603	4 000	275	6.9	4 340	936	21.6
Y604	4 020	336	8.4	3 580	728	20.3
Y605	4 220	112	2.7	3 760	596	15.9
平均值 Mean value			5.7			17.4

表 2 花丝长度与不同诱导系间的方差分析

Table 2 Variance analysis between silk length and inducer

变异来源 Source of variation	自由度 DF	平方和 SS	均方 MS	F 值 F value
诱导系间 Inducer	4	58.1	10.5	5.4*
花丝长度 Silk length	1	337.5	337.5	76.2**
误差 Error	4	20.5	4.1	

注：* 表示差异显著($P<0.05$), ** 表现差异极显著($P<0.01$)。表 4 同。

Note: * indicates significant difference ($P<0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$). The same for table 4.

2.1.2 不同授粉时期的玉米单倍体诱导率 由表 3 可知,授粉时期对单倍体诱导率亦有很大影响,伏后授粉时的平均诱导率明显大于伏期授粉时的平均诱导率。其中在伏期授粉时,诱导率最高的是诱导系 Y604(8.5%),伏后授粉时诱导率最高的诱导系为 Y603(23.2%)。各诱导系伏后授粉时单倍体诱导率均高于伏期授粉。

表 3 不同授粉时期的玉米单倍体诱导率

Table 3 Maize haploid inducing rates with different pollinating dates

父本材料 Male material	伏期处理(07-15—08-01) Summer days treatment			伏后处理(08-15—09-01) After Summer days treatment		
	总籽粒数 Total grains	准单倍体籽粒数 Grains of pre haploid	单倍体诱导率/% Inducing rate	总籽粒数 Total grains	准单倍体籽粒数 Grains of pre haploid	单倍体诱导率/% Inducing rate
Y601	3 774	181	4.8	4 201	737	17.5
Y602	3 541	248	7.0	3 513	516	14.7
Y603	4 105	261	6.4	3 995	927	23.2
Y604	3 963	339	8.5	3 289	732	22.3
Y605	4 474	112	2.5	3 569	597	16.7
平均值 Mean value			5.8			18.9

对授粉时期与不同诱导系间进行方差分析,结果见表 4。表 4 结果表明:诱导系间、伏期处理间诱导率均达到了极显著水平,说明不同授粉时期对诱导率有很大影响,且伏后授粉时可以提高单倍体诱导率。此外,相对于花丝长短,授粉时期对诱导系彼此间的差异影响更大。

表 4 授粉时期与不同诱导系间的方差分析

Table 4 Variance analysis between pollinating date and inducer

变异来源 Source of variation	自由度 DF	平方和 SS	均方 MS	F 值 F value
诱导系间 Inducer	4	62.1	16.1	7.6**
授粉时间 Pollinating date	1	399.9	340.3	81.1**
误差 Error	4	23.5	5.7	

2.2 玉米单倍体加倍试验

2.2.1 不同加倍方法对单倍体植株成活率的影响 表 5 结果显示,单倍体植株成活率在秋水仙素各处理质量浓度下均表现不同。滴心叶法的适宜质量

浓度为 0.1 mg/mL,浸芽法的适宜质量浓度为 0.1 mg/mL,注射法的适宜质量浓度为 0.5 mg/mL。在秋水仙素各质量浓度梯度下浸种法处理时单倍体植株受害程度都比其他 3 种方法严重,在 3 种质量浓

度下存活率分别仅为 40.7%,43.5%和 27.3%。

表 5 不同质量浓度秋水仙素处理玉米单倍体的成活率

Table 5 Survival rates of maize haploid plants with different colchicines concentrations						
秋水仙素/ (mg · mL ⁻¹) Colchicine concentration	浸种法 Dipping seed method			浸芽法 Dipping bud method		
	成活株数	总株数	成活率/%	成活株数	总株数	成活率/%
	Survival of strains	Sum of strains	Survival rate	Survival of strains	Sum of strains	Survival rate
0.1	35	86	40.7	79	99	79.8
0.3	37	85	43.5	57	94	60.6
0.5	24	88	27.3	46	92	50.0
秋水仙素/ (mg · mL ⁻¹) Colchicine concentration	滴心叶法 Dipping heart leaf method			注射法 Injection method		
	成活株数	总株数	成活率/%	成活株数	总株数	成活率/%
	Survival of strains	Sum of strains	Survival rate	Survival of strains	Sum of strains	Survival rate
0.1	48	86	55.8	36	91	39.6
0.3	49	92	53.3	48	94	51.1
0.5	23	81	28.4	58	96	60.4

2.2.2 不同加倍方法对单倍体植株散粉和结实的影响 由表 6 和 7 可知,在 4 种加倍方法中,注射法的效果最好,散粉率均超过 10%,在秋水仙素质量浓度为 0.5 mg/mL 时散粉率达到 46.9%,结实率也最高,为 14.6%;滴心叶法在 0.3 mg/mL 下散粉率为 28.3%,结实率为 10.9%;浸种法的散粉率都

低于 10%,在秋水仙素质量浓度为 0.3 和 0.5 mg/mL 下结实率都极低(1.2%,1.1%);浸芽法虽在 0.3 mg/mL 下散粉率超过 10%,但其结实率却很低(1.1%)。综上可以看出,在散粉性和结实率方面,注射法和滴心叶法相对较好。

表 6 不同质量浓度秋水仙素处理玉米单倍体的散粉率

Table 6 Fertility rates of maize haploid plants with different colchicines concentrations						
秋水仙素/ (mg · mL ⁻¹) Colchicine concentration	浸种法 Dipping seed method			浸芽法 Dipping bud method		
	散粉株数	总株数	散粉率/%	散粉株数	总株数	散粉率/%
	Fertile strains	Sum of strains	Fertility rate	Fertile strains	Sum of strains	Fertility rate
0.1	7	86	8.1	3	99	3.0
0.3	3	85	3.5	10	94	10.6
0.5	3	88	3.4	4	92	4.3
秋水仙素/ (mg · mL ⁻¹) Colchicine concentration	滴心叶法 Dipping heart leaf method			注射法 Injection method		
	散粉株数	总株数	散粉率/%	散粉株数	总株数	散粉率/%
	Fertile strains	Sum of strains	Fertility rate	Fertile strains	Sum of strains	Fertility rate
0.1	16	86	18.6	10	91	11.0
0.3	26	92	28.3	12	94	12.8
0.5	7	81	8.6	45	96	46.9

表 7 不同质量浓度秋水仙素处理玉米单倍体的结实率

Table 7 Seed rates of maize haploids with different colchicine concentrations						
秋水仙素/ (mg · mL ⁻¹) Colchicine concentration	浸种法 Dipping seed method			浸芽法 Dipping bud method		
	结实株数	总株数	结实率/%	结实株数	总株数	结实率/%
	Seed strains	Sum of strains	Seed rate	Seed strains	Sum of strains	Seed rate
0.1	2	86	2.3	3	99	3.0
0.3	1	85	1.2	1	94	1.1
0.5	1	88	1.1	1	92	1.1
秋水仙素/ (mg · mL ⁻¹) Colchicine concentration	滴心叶法 Dipping heart leaf method			注射法 Injection method		
	结实株数	总株数	结实率/%	结实株数	总株数	结实率/%
	Seed strains	Sum of strains	Seed rate	Seed strains	Sum of strains	Seed rate
0.1	3	86	3.5	4	91	4.4
0.3	10	92	10.9	6	94	6.4
0.5	4	81	4.9	14	96	14.6

3 讨 论

3.1 不同诱导条件下玉米单倍体的诱导效率

本试验研究发现,在花丝长度 ≥ 8 cm 和花丝长度 ≤ 4 cm 时授粉进行杂交诱导,前者单倍体诱导率较高,在伏期授粉(07-15—08-01)时的单倍体诱导率远低于伏后授粉(08-15—09-01)。其中花丝长度对玉米单倍体诱导率造成影响的原因可能是,花粉中 2 个精细胞形成雄性生殖单位是保证两精核同步转运的重要条件,而较长的花丝增加了两精核在花粉管中运输的不同步性所致^[11]。刘志增等^[12]研究表明,精核间距在诱导单倍体过程中起重要作用,花丝长时,从花粉粒萌发后花粉管到达胚囊距离延长,可能造成 2 个精核的间距加大,从而更容易诱导形成单倍体。

授粉时期对单倍体诱导率的影响可能同气温有密切关系。授粉时期早时温度相对较高,高温时玉米花粉管生长速度加快,新陈代谢非常旺盛,呼吸作用也因而加强。在这种条件下能量和物质的消耗都加快,而供给的能量和物质不会相应地增加,相对于本身内含物就很少的玉米孤雌生殖诱导系花粉粒来说,这种状况会加速花粉管的衰老,不正常花粉的竞争力减弱,从而导致单倍体的产生减少。当授粉时期晚时,温度相对较低,新陈代谢相对较慢,玉米孤雌生殖诱导系的不正常花粉粒的 2 个精核在花粉管中有充足的时间分开运输,从而达到单受精产生玉米单倍体。因此花丝在温度较低时接受花粉的时间延长,这样也增加了单受精的几率。

本课题组还发现,海南三亚冬繁单倍体诱导频率明显高于吉林农安,这也进一步证明较低温度可能有利于单倍体诱导。花丝长短和授粉时期也可能影响了精卵结合的过程,随着花丝的增长,极核和卵核接受精核的能力可能减弱,极核与精核结合的能力相对较强,由此导致胚乳正常发育,而雌配子由于未受精而发育为单倍体。温度低时对受精过程也可能有类似影响。考虑到本研究母本基因型较少,有关温度、花丝活力和母本基因型等因素对诱导性能的影响仍需进一步研究。

3.2 人工染色体加倍处理下玉米单倍体的加倍效率

Chase^[13]曾提出用秋水仙素溶液注射玉米幼苗的盾片节进行加倍,Gayen 等^[14]曾采用浸种法,使单倍体加倍率达到了 18%。魏俊杰等^[15]在 6 叶期和拔节期用不同质量浓度的秋水仙素配以 DMSO

注射处理茎尖生长点,发现在 6 叶期以 0.5% 秋水仙素配以 2.0% 的 DMSO 处理效果最好,加倍率高达 32.3%。

本试验秋水仙素处理结果表明,注射法和滴心叶法的效果较好,散粉率和结实率相对较高;而浸种法单倍体的散粉率和结实率较低,这可能是由于玉米播种后,幼嫩根芽萌发后遇到一定质量浓度的秋水仙素药液,生长发育因药害受到一定阻碍,也可能是秋水仙素药液破坏了玉米胚芽等幼嫩组织,造成幼苗的过早死亡。有关秋水仙素化学加倍处理单倍体的具体方法,本课题组将在前人研究的基础上进一步筛选最优玉米单倍体加倍方案,并探讨相关的玉米单倍体加倍机制。

[参考文献]

- [1] 刘纪麟. 玉米育种学 [M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2002: 172-177.
Liu J L. Maize breeding [M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2002: 172-177. (in Chinese)
- [2] 王 贺, 李继竹, 张继伟, 等. 秋水仙素和除草剂浸芽加倍玉米单倍体效率的研究 [J]. 吉林农业大学学报, 2013, 35(4): 384-388.
Wang H, Li J Z, Zhang J W, et al. Study on doubling efficiency of maize haploids bud soaked by herbicide and colchicine [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2013, 35(4): 384-388. (in Chinese)
- [3] 杨 巍, 李 玲, 姜 龙, 等. 不同密度下玉米 DH 系单株产量的杂种优势及配合力分析 [J]. 吉林农业大学学报, 2014, 36(1): 23-29.
Yang W, Li L, Jiang L, et al. Analysis of heterosis and combining ability of per plant yield of maize DH lines in different densities [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2014, 36(1): 23-29. (in Chinese)
- [4] 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.
- [5] 邢锦丰, 张如养, 段民孝, 等. 单倍体技术在玉米育种中的应用及其问题探讨 [J]. 作物杂志, 2012(2): 15-17.
Xing J F, Zhang R Y, Duan M X, et al. Discussion on problems for utilization of haploid breeding of maize [J]. Crops, 2012(2): 15-17. (in Chinese)
- [6] 陈绍江, 黎 亮, 李浩川, 等. 玉米单倍体育种技术 [M]. 2 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2012.
Chen S J, Li L, Li H C, et al. Maize haploid breeding [M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture University Press, 2012. (in Chinese)