

网络出版时间:2015-04-13 12:59

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.05.004

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150413.1259.004.html

玉米单倍体育性的自然恢复和染色体 化学加倍效果研究

慈佳宾,杨 巍,崔学宇,任雪娇,姜 龙,孙贵星,董 莹,杨伟光

(吉林农业大学 农学院,吉林 长春 130118)

[摘 要] 【目的】对单倍体不同类群组成下雌雄育性的自然恢复现象以及秋水仙素处理的浸种法、浸根法、浸芽法和注射法的加倍效果进行研究,为提高玉米单倍体加倍频率提供参考。【方法】利用自选诱导系 JS6-1 诱导杂种 F_1 代 J-211(Reid $\times$ Reid)、J-212(Lancaster $\times$ Lancaster)、J-213(Reid $\times$ Lancaster)产生的单倍体为材料,对单倍体育性的自然恢复和不同质量浓度(0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6 mg/mL)秋水仙素处理及其 4 种不同处理方法(浸种法、浸根法、浸芽法和注射法)的化学恢复效果进行研究。【结果】不同基因型材料诱导产生的单倍体雌穗的自然育性差异较大,平均结实率为 46.49%,其中 J-212(Lancaster $\times$ Lancaster)的结实率最高,为 59.09%;J-211(Reid $\times$ Reid)的结实率最低,为 33.33%。雄穗的自然育性远远低于雌穗,最高的为 6.25%。秋水仙素加倍处理时,以幼苗期采用浸根法和注射法的化学恢复效果最佳,秋水仙素处理的最佳条件为 0.4~0.6 mg/mL 秋水仙素+体积分数 5%甘油+体积分数 3%DMSO 溶液。【结论】Lancaster $\times$ Lancaster 类群基础材料的自然育性恢复力最强。秋水仙素加倍处理的最优方法为:①注射法,药剂为 0.6 mg/mL 秋水仙素+体积分数 5%甘油+体积分数 3%DMSO 溶液;②浸根法,药剂为 0.4 mg/mL 秋水仙素+体积分数 5%甘油+体积分数 3%DMSO 溶液。

[关键词] 玉米;单倍体;育性;秋水仙素

[中图分类号] S513.035.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2015)05-0107-06

Natural fertility restoration and chemical chromosome doubling of maize haploid

CI Jia-bin, YANG Wei, CUI Xue-yu, REN Xue-jiao, JIANG Long,
SUN Gui-xing, DONG Ying, YANG Wei-guang

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

Abstract: 【Objective】In this study, natural fertility restoration (NFR) and chromosome doubling of maternal maize haploid by 4 methods (seed soaking, root immersing, bud immersing and injection) were studied to improve the doubling frequency. 【Method】The research selected haploid materials J-211(Reid $\times$ Reid), J-212(Lancaster $\times$ Lancaster) and J-213 (Reid $\times$ Lancaster) induced by optional parthenogenesis haploid inducer JS6-1 and the effects of NFR and chemical treatment with colchicine at mass fraction of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, and 0.6 mg/mL by different methods (seed soaking, root immersing, bud immersing and injection) were compared. 【Result】There were large differences in natural fertility of ears from the haploid induction of different genotypes with average haploid ears of 46.49%. J-212 (Lancaster $\times$ Lancas-

[收稿日期] 2013-12-09

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2011AA10A103);国家科技计划项目(2011BAD35B01);科技部农业科技成果转化项目(2011GB2B100006);吉林省科技发展计划项目(20116030);吉林省财政厅育种项目(201103)

[作者简介] 慈佳宾(1985—),男,吉林长春人,在读博士,主要从事玉米育种研究。

[通信作者] 杨伟光(1960—),男,吉林长春人,教授,博士生导师,主要从事玉米育种研究。

ter) had the highest value of 59.09% while J-211 (Reid×Reid) had the lowest value of 33.33%. The NFR of haploid tassel was much lower with the highest value of 6.25%. Root immersing and injection of colchicine were the best methods and the best condition was 0.4—0.6 mg/mL colchicine mixed with 5% glycerine and 3% DMSO. 【Conclusion】 The NFR of haploids with the genotype of Lancaster×Lancaster was the strongest. The optimal conditions for doubling with colchicine were: ①injection with 0.6 mg/mL colchicine, 5% glycerine and 3% DMSO, and ②root immersing with 0.4 mg/mL colchicine, 5% glycerine and 3% DMSO.

Key words: maize; haploid; fertilization; colchicine

玉米单倍体育种技术越来越受到国内外各个玉米育种公司、科研院所和高等院校重视,但是该技术受到玉米雄穗自然可育性恢复率低的限制,尚未实现工厂化。Chalyk^[1]研究表明,单倍体能否自交结实主要取决于雄穗是否产生可育花粉。然而绝大部分单倍体的雄花高度不育,自然情况下单倍体雄穗发生全部或局部育性恢复的概率极低,仅产生大约 10%的可育花粉而自交结实^[2],但是不同基因型间单倍体雄花自然育性恢复的程度存在很大差异^[3]。另外,经过多次诱导产生的单倍体,其育性恢复率大大高于一般单倍体^[4]。

通过药剂处理可以改变细胞染色体的倍性,以此来增加雄花育性的恢复率。目前,关于玉米单倍体化学加倍方法的报道很多^[5-7],其中秋水仙素的应用更为广泛和有效,其可以对玉米种子、幼芽、花蕾、花粉和嫩枝产生诱变作用,但制约秋水仙素加倍率的因素很多^[8-9]。本试验利用玉米自选孤雌生殖诱导系 JS6-1 所产生的单倍体为材料,对单倍体雌雄自然育性的恢复进行了测定,并通过对秋水仙素化学加倍的 4 种处理方法(浸种法、浸根法、浸芽法和注射法)以及不同处理部位(种子、根、芽、茎尖)的研究,以获得较好的玉米单倍体化学加倍的方法,探索提高玉米单倍体加倍频率的有效途径,为玉米单倍体育种技术的实际应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

单倍体加倍材料 J-211 (Reid×Reid)、J-212 (Lancaster×Lancaster)、J-213 (Reid×Lancaster), 为 2011 年夏在吉林农业大学试验基地利用自选诱导系 JS6-1 诱导的杂种 F₁ 代。浸种法和浸芽法处理的单倍体均通过诱导 J-211 产生,浸根法处理的单倍体通过诱导 J-212 产生,注射法中 0.1~0.4 mg/mL 秋水仙素溶液处理的单倍体通过诱导 J-213 产生,0.5~0.6 mg/mL 秋水仙素处理的单倍体通

过诱导 J-212 产生。

加倍药剂为鼎国生物科技有限公司生产的秋水仙素、体积分数 3% DMSO 和体积分数 5% 甘油。

1.2 试验方法

1.2.1 单倍体的鉴定及材料选用 (1)拟单倍体籽粒鉴定。根据籽粒 Navajo 标记对单倍体籽粒进行逐粒鉴定,糊粉层紫色而胚无色为拟单倍体籽粒,单倍体籽粒胚面有较深的凹陷,且胚面较小,呈三角形^[10]。

(2)单倍体幼苗表型及鉴定。依据单倍体幼苗的生长情况淘汰杂株。单倍体幼苗植株矮小,生长缓慢,叶片颜色为浅绿色,叶片短而窄并且上冲,叶片夹角小^[11-12];雄穗在花期育性很差,绝大部分不能正常散粉,雌穗的花丝较短;而杂株生长发育快,植株高大,叶片长且宽,颜色深绿,雄穗在花期散粉性好,花粉量大,雌穗花丝长。

1.2.2 育性恢复观察 (1)雌穗育性调查。观察和记录自然条件下处理的单倍体有无雌穗,用 JS6-1 给雄性不育株授粉,授粉后能够正常结实的记为雌性可育株,否则记为雌性不育株。

(2)雄穗育性调查。观察和记录自然处理和经药剂处理加倍的单倍体雄穗的抽出及散粉情况,凡能正常散粉的均记为雄性可育株;不散粉的植株分别取其主轴上、中、下颖花,进行室内镜检(用质量分数 0.5% I₂-KI 溶液),全染色或半染色亦记为雄性可育株,不染色的记为雄性不育株。浸根法和注射法由于是在单倍体出苗后进行的药剂处理,所以总株数以处理时实际存活的株数计。

按以下公式计算单倍体植株的调查项目:

成活率 = 成活株数/单倍体总株数(出芽、生根)×100%;

散粉率 = 雄性散粉株数/单倍体总株数×100%;

加倍率 = 成活的雄性散粉株数/成活的单倍体株数×100%;

无雌穗率 = 无雌穗株数/单倍体总株数 × 100%;

结实率 = 结实株/授粉总株数 × 100%。

1.2.3 药剂加倍处理 (1)浸种法。先用清水将单倍体种子浸泡 6 h,然后分别在 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 和 0.6 mg/mL 秋水仙素 + 体积分数 5%甘油 + 体积分数 3%DMSO 的溶液中室温密闭浸泡处理 6 h,接着用流水清洗 2 h 后播种。

(2)浸根法。将单倍体种子浸泡在清水中 6 h,之后置于 28 ℃培养箱中催根,待幼苗长到 2~3 叶时,将其置入 4 ℃冰箱中低温生长 2~3 h,然后用自编的带有小孔的铁丝网固定幼芽,将幼根浸泡于秋水仙素(0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 和 0.6 mg/mL)+体积分数 5%甘油+体积分数 3%DMSO 的溶液中,在幼芽上包附一层滤纸保湿,浸泡 6 h 后,再用流水清洗 2 h,移栽至大田。

(3)浸芽法。利用湿毛巾包裹种子催芽,当幼芽长约 2 cm 时用刀片将幼芽顶端胚芽鞘切掉 1~2 mm,露出一个小口(但不要伤害到幼芽),将其在室温下密闭浸泡在不同质量浓度秋水仙素(0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 和 0.6 mg/mL)+体积分数 5%甘油+体积分数 3%DMSO 的溶液中,浸泡 6 h,流水清洗 2 h 后将其种在育苗盘中,待幼苗长到 4~5 片叶时移栽至大田。

(4)注射法。在单倍体幼苗于田间长到 6~7 叶时,用微量移液器抽取 5 μL 不同质量分数(0.1~0.6 mg/mL)的秋水仙素+体积分数 5%甘油+体积分数 3%DMSO 溶液,注射于幼苗茎秆盾片节处的顶端生

长点。

(5)试验对照(CK)。未经药剂处理的单倍体。加倍处理后的单倍体雌穗育性调查及记录同自然处理。

2012 年夏,在吉林农业大学试验基地进行单倍体自然加倍和药剂处理加倍试验。试验基地行距 65 cm,种植密度为 9 万株/hm²,株距 17 cm。

2 结果与分析

2.1 单倍体育性的自然恢复

2.1.1 单倍体雌穗育性的自然恢复 由表 1 可知,在自然状态下,J-211(Reid×Reid)经 JS6-1 诱导获得的单倍体有 19.05%无雌穗,J-212(Lancaster×Lancaster)和 J-213(Reid×Lancaster)分别有 2.50%和 29.4%无雌穗。来源于不同母本材料的单倍体雌穗结实率也各有不同,平均为 46.49%,其中 J-212 结实率最高,为 59.09%,杂交的单倍体果穗虽小,但每穗结实粒数差异很大,最多达到 86 粒,几乎长满整个果穗,最少的仅 1 粒,平均每穗结实 10.88 粒;J-213 次之,结实率为 47.06%,平均结实数为 7.43 粒,变异幅度为 1~27 粒;J-211 结实率最低,为 33.33%,在调查的 21 株单倍体中,除 4 株无雌穗外,有 6 株单倍体被授粉,其余花期不协调,结实株为 2 株,各结实 1 粒。由此可见,JS6-1 诱导产生的单倍体个体间雌穗育性差异较大。上述研究结果说明,单倍体雌穗育性的自然恢复与产生单倍体的母本材料有一定关系,不同母本基因型单倍体雌穗育性的自然恢复存在较大差异。

表 1 不同基础材料单倍体雌穗育性的自然恢复表现

Table 1 Natural fertility restoration of female inflorescence of haploid induced from different materials

诱导单倍体的 杂种 F ₁ 材料 Resource of haploids	单倍体株数 Number of haploids	无雌穗株数 Number of non-ears	无雌穗率/% Rate of non-ears	授粉株数 Number of pollination	结实株数 Seeds setting number	结实率/% Rate of seeds setting	平均结实数/粒 Average of seeds setting
J-211	21	4	19.05	6	2	33.33	1
J-212	80	2	2.50	22	13	59.09	10.88
J-213	167	5	29.94	85	40	47.06	7.43

2.1.2 单倍体雄穗育性的自然恢复 在田间自然状态下,成活的单倍体植株多能正常抽雄,但经室内 I₂-KI 染色镜检后发现大部分不育,在少数可育的雄穗中,仅有 1 个或几个分枝的育性可以恢复,有几个花药或 1 个花药能散粉。本研究条件下,不同来源单倍体雄穗育性的自然恢复情况见表 2。表 2 结果表明:不同来源单倍体的雄穗散粉率平均为 5.47%,其中来源于 Lancaster×Lancaster 杂交模式的 J-212 产生的单倍体散粉率最高,为 6.25%;来源于

Reid×Lancaster 杂交模式的 J-213 产生的单倍体散粉率次之,为 5.39%;来源于 Reid×Reid 杂交模式的 J-211 产生的单倍体散粉率最低,为 4.76%。可见不同基因型单倍体雄穗的可育程度存在较大差异,但仍远低于雌穗育性。

上述结果说明,单倍体自交结实率低的关键限制因素是雄穗的育性是否恢复,Bordes 等^[13]提出的“以单倍体雄穗育性高低来衡量单倍体育性”的论点是可靠、合理的。

2.2 单倍体的化学加倍效果

2.2.1 秋水仙素质量浓度对单倍体植株成活率的影响 不同质量浓度秋水仙素处理对单倍体成活的影响见表 3。表 3 表明,在 4 种人工染色体加倍方法中,用 0.1~0.6 mg/mL 的秋水仙素溶液浸种、0.1~0.2 mg/mL 的秋水仙素溶液浸芽,处理后单倍体成活率与对照接近,说明这样的秋水仙素质量浓度和处理方法对单倍体生长发育无显著影响。与

浸种和浸芽法相比,浸根法和注射法的药害程度则显得异常严重,用 0.1~0.6 mg/mL 秋水仙素溶液浸根时,单倍体成活率均值为 15.04%,CK 成活率约是秋水仙素溶液处理的 5.5 倍,药害极重;以 J-213 为母本获得的单倍体用 0.1~0.4 mg/mL 的秋水仙素注射处理后,单倍体的成活率均值为 27.78%,远低于以 J-212 为母本获得的单倍体用 0.5~0.6 mg/mL 秋水仙素处理的成活率均值(63.34%)。

表 2 不同基础材料单倍体雄穗育性的自然恢复(自然加倍)表现

Table 2 Natural fertility restoration in male inflorescence of haploid induced from different materials

诱导单倍体的杂种 F ₁ 材料 Resource of haploids	杂种优势模式 Heterosis pattern	单倍体粒数 Haploids grains	雄性可育株数 Number of male fertile	散粉率/% Rates of loose powder
J-211	Reid×Reid	21	1	4.76
J-212	Lancaster×Lancaster	80	5	6.25
J-213	Reid×Lancaster	167	9	5.39

表 3 不同质量浓度秋水仙素处理单倍体的成活表现

Table 3 The survival rate of haploid plants in different colchicines concentrations

秋水仙素/(mg·mL ⁻¹) Colchicine concentration	浸种法 Seed soaking			浸芽法 Bud immersed		
	成活株数 Survival number	总株数 Total number	成活率/% Survival rate	成活株数 Survival number	总株数 Total number	成活率/% Survival rate
0.1	22	57	38.60	25	51	49.02
0.2	31	64	48.44	26	49	53.06
0.3	27	57	47.37	13	49	26.53
0.4	32	60	53.33	12	60	20.00
0.5	33	71	46.48	9	58	15.52
0.6	37	70	52.86	11	60	18.33
平均值 Mean	30.33	63.17	47.85	16	54.50	30.41
对照 CK	9	18	50.00	8	18	44.44

秋水仙素/(mg·mL ⁻¹) Colchicine concentration	浸根法 Root immersed			注射法 Injection		
	成活株数 Survival number	总株数 Total number	成活率/% Survival rate	成活株数 Survival number	总株数 Total number	成活率/% Survival rate
0.1	5	28	17.86	17	45	37.78
0.2	2	32	6.25	13	45	28.89
0.3	4	30	13.33	15	45	33.33
0.4	4	37	10.81	5	45	11.11
0.5	5	28	17.86	27	45	60.00
0.6	7	29	24.14	30	45	66.67
平均值 Mean	4.50	30.67	15.04	12.50/28.50	45/45	27.78/63.34
对照 CK	14	17	82.35	100/80	100/80	100/100

注:注射法平均值中“/”前数字表示 0.1~0.4 mg/mL 秋水仙素处理单倍体的成活株数、总株数和成活率均值,来源于 J-213,“/”后数字表示 0.5~0.6 mg/mL 秋水仙素处理单倍体的成活株数、总株数和成活率均值,来源于 J-212。CK 中“/”前后数字意义相同。下同。
Note:In infection method,numbers before “/” indicate from J-213 with 0.1—0.4 mg/mL colchicine. Numbers after “/” indicate from J-212 with 0.5—0.6 mg/mL colchicine. Values before and after “/” in CK are same. The same below.

2.2.2 秋水仙素质量浓度对单倍体散粉和加倍的影响 不同质量浓度秋水仙素处理对单倍体散粉情况的影响见表 4。表 4 结果表明,不同质量浓度秋水仙素处理下单倍体的散粉率差异显著。在 4 种人工染色体加倍方法中,用 0.2,0.5 mg/mL 秋水仙素浸种法处理单倍体的散粉率为 0,用 0.3,0.5 mg/mL 的秋水仙素浸芽法处理单倍体的散粉率为 0,2 种方法处理后单倍体的散粉率均值分别为 1.62%和 1.89%,均低于 CK(5.00%);浸根法中用

0.4~0.6 mg/mL 秋水仙素处理单倍体的散粉率均高于 CK(5.00%),其中用 0.4,0.5 mg/mL 秋水仙素处理单倍体的散粉率均超过 10%,均为 CK 的 2 倍多;注射法中除用 0.4 mg/mL 秋水仙素处理的单倍体散粉率(2.50%)较低外,其余处理的单倍体散粉率均超过 10%。
由表 5 可以看出,在 4 种人工染色体加倍方法中,浸种法程序非常简单,但加倍效果较差,加倍率最高为 7.41%,低于 CK。浸芽法处理的单倍体成

活率随秋水仙素质量浓度的增大总体呈降低趋势,加倍率亦低于 CK。0.2~0.6 mg/mL 秋水仙素用浸根法处理的单倍体加倍率均高于 CK 值,但由表 3 可知浸根法所得植株的成活率较低,被加倍的植株并不多;用 0.4 mg/mL 秋水仙素浸根处理单倍体的加倍率达到了 100%,但由表 4 知其散粉率只有 10.26%,即在 39 株单倍体中仅有 4 株加倍成纯合的 DH 系。注射法处理单倍体的药害程度相对较

轻,表 4 显示,0.1~0.4 mg/mL 秋水仙素注射处理单倍体的散粉率均值(11.25%)是 CK(5.00%)的 2.25 倍,而其加倍率均值(33.69%)是 CK(5.00%)的 6.74 倍,获得的 DH 系最多;用 0.5~0.6 mg/mL秋水仙素注射处理的单倍体散粉率均值(15.00%)是 CK(6.25%)的 2.4 倍,加倍率均值(20.93%)是 CK(6.25%)的 3.35 倍。

表 4 不同质量浓度秋水仙素处理单倍体的散粉表现

Table 4 Fertility rates of haploid plants with different colchicine concentrations						
秋水仙素/(mg·mL ⁻¹) Colchicine concentration	浸种法 Seed soaking			浸芽法 Bud immersed		
	雄性可育株数 Male fertile number	总株数 Total number	散粉率/% Rate of loose powder	雄性可育株数 Male fertile number	总株数 Total number	散粉率/% Rate of loose powder
0.1	1	60	1.67	1	50	2.00
0.2	0	58	0	3	50	6.00
0.3	2	57	3.51	0	50	0
0.4	1	60	1.67	1	60	1.67
0.5	0	60	0	0	60	0
0.6	2	70	2.86	1	60	1.67
平均值 Mean	1	60.83	1.62	1	55	1.89
对照 CK	1	20	5.00	1	20	5.00

秋水仙素/(mg·mL ⁻¹) Colchicine concentration	浸根法 Root immersing			注射法 Injection		
	雄性可育株数 Male fertile number	总株数 Total number	散粉率/% Rate of loose powder	雄性可育株数 Male fertile number	总株数 Total number	散粉率/% Rate of loose powder
0.1	0	27	0	6	40	15.00
0.2	1	28	3.57	6	40	15.00
0.3	2	26	7.69	5	40	12.50
0.4	4	39	10.26	1	40	2.50
0.5	3	27	11.11	5	40	12.50
0.6	3	30	10.00	7	40	17.50
平均值 Mean	2.17	29.50	7.11	4.50/6.00	40/40	11.25/15.00
对照 CK	1	20	5.00	5/5	100/80	5.00/6.25

表 5 不同质量浓度秋水仙素处理单倍体的加倍情况

Table 5 Doubling rates of haploid plants with different colchicine concentrations				
秋水仙素/(mg·mL ⁻¹) Colchicine concentration	加倍率/% Doubling rate			
	浸种法 Seed soaking	浸芽法 Bud immersed	浸根法 Root immersed	注射法 Injection
0.1	4.55	4.00	0	35.29
0.2	0	11.54	50.00	46.15
0.3	7.41	0	50.00	33.33
0.4	3.13	8.33	100.00	20.00
0.5	0	0	60.00	18.52
0.6	5.41	9.09	42.86	23.33
平均值 Mean	3.42	5.49	43.40	33.69/20.93
对照 CK	11.11	12.50	7.14	5.00/6.25

综上所述,4 种人工染色体加倍方法中,浸根法和注射法优于浸种法、浸芽法,在本试验范围内,适宜的秋水仙素质量浓度为 0.4~0.6 mg/mL。

3 讨 论

3.1 玉米单倍体育性的自然恢复

本研究对 268 株单倍体雌雄育性自然恢复的观

察表明:玉米单倍体的母本基因型是影响其生长发育、育性恢复及结实率的最主要因素。除单倍体雌穗发育不良或无雌穗外,其余大部分都能正常吐丝。以自选诱导系 JS6-1 的花粉进行授粉,J-212(Lancaster×Lancaster)的结实率最高,为 59.09%,这与刘志增等^[9]、Chalyk 等^[14]的玉米单倍体雌穗大都能正常吐丝、育性接近 100%的研究结果相似。造成

本试验结实率偏低的原因可能与单倍体母本基因型材料差异或杂交授粉时恰逢长春夏季连阴雨的气候状况有关。

前人研究证实,不同母本基因型单倍体雌雄育性差异很大,雄穗育性是单倍体自交结实的关键性限制因素^[11]。温度、湿度可能导致单倍体雄穗颖壳不张开、花药不开裂,因此本试验将雄穗可自然散粉或不散粉但经室内镜检花药可染色的单倍体均记为雄性可育株。刘志增等^[9]认为,花粉有活性但不能从花药中散出来是由于雄穗减数分裂过程异常,几乎不能形成正常的生殖细胞所致,但其真正原因尚不清楚,有待继续深入研究。

本试验来源于 J-212(Lancaster×Lancaster)单倍体的自然散粉率为 6.25%,但散粉的单倍体雌雄花期不协调,进而使自交结实率未达到 100%。因此如何使不正常花药中的花粉散发出来,并使单倍体的花期协调是玉米单倍体在田间自然条件下雌雄育性恢复良好的关键。一旦解决这 2 个技术难题,JS6-1 杂交诱导的单倍体加倍率将会有大幅提高,从而获得更多单倍体株系,使单倍体育种方法快速应用于玉米育种实践。

3.2 玉米单倍体的人工染色体加倍

受单倍体育性制约,自然条件下单倍体自交结实率整体较低。对于散粉率和加倍率较低的单倍体基因型,必须借助人工染色体加倍处理,才有可能提高其结实率,产生单倍体株系,并用于玉米育种实践^[15-16]。在本研究的秋水仙素质量浓度范围内,不同加倍处理结果差异较大。田间调查统计发现,在玉米单倍体的整个生长期,随着秋水仙素质量浓度的增加,发生药害的植株呈增加趋势,单倍体成活率降低。在散粉期调查单倍体雄穗育性发现,浸种法处理的单倍体加倍率和散粉率均低于 CK;浸芽法处理的散粉率与浸种法相似,只有 0.2 mg/mL 秋水仙素处理时的单倍体散粉率高于 CK,加倍率接近 CK,这可能是该质量浓度的秋水仙素对单倍体有特殊的加倍作用,具体原因尚有待进一步研究。浸根法和注射法处理的整体效果均较另外 2 种处理方法好,散粉率和加倍率远高于各自的 CK,如果能确保成活率保持在一定水平,散粉率和加倍率都会有极大提高,从而获得更多的单倍体株系。综上可知,玉米单倍体秋水仙素化学加倍最好采用浸根法和注射法,适宜的秋水仙素质量浓度为 0.4~0.6 mg/mL。建议不要使用浸芽法,而对浸种法则可以继续探索在适当秋水仙素质量浓度下是否可用。

除自然加倍率外,玉米单倍体人工染色体加倍的效果尚不十分显著,可能有以下几方面原因:(1)不同母本基因型的单倍体耐药性高低与秋水仙素使用质量浓度的高低有关,有的显示出较强的耐药性,有的则在较低质量浓度下就表现药害,那些具有分蘖能力的单倍体长势极弱,若用秋水仙素处理则几乎全部死亡;(2)在一定质量浓度范围内,秋水仙素处理时的质量浓度与单倍体化学加倍效果成正相关,但秋水仙素质量浓度过低时单倍体加倍效果不明显,秋水仙素质量浓度过高会使单倍体植株产生药害,抑制植株生长甚至导致死亡,获得的 DH 系较少;(3)秋水仙素浸根法处理玉米单倍体后,可能破坏了植株根系系统(尤其是根毛和根尖幼嫩组织),导致根系功能和发育受到一定限制,难以及时从土壤中吸收水分和营养物质,使其不易成活;(4)4 种方法处理玉米单倍体,势必导致秋水仙素在单倍体后期生长中长期作用于其内部组织,进而破坏植物组织的生理生境,必定会使植物的生长发育产生异常表现;(5)玉米单倍体加倍的主要目的是使雄穗可育并正常散粉。雄穗由花原基发育而成,本试验中浸根法和注射法均是针对性的处理茎尖生长点,因此这 2 种方法的加倍效果优于浸种法(直接处理种子)和浸芽法(处理芽);(6)由于试验材料受母本基因型群体的一定限制,试验设计中秋水仙素的质量浓度梯度较小,秋水仙素质量浓度与单倍体母本材料的关系还有待更细致入微的研究。

本试验研究结果说明,Lancaster×Lancaster 类群自然育性恢复能力最强、散粉率最优的处理条件是采用注射法,药液为 0.6 mg/mL 秋水仙素+体积分数 5%甘油+体积分数 3%DMSO,提高加倍率的最优条件是采用浸根法,药液为 0.4 mg/mL 秋水仙素+体积分数 5%甘油+体积分数 3%DMSO。

[参考文献]

- [1] Chalyk S T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding [J]. Euphytica, 1994, 79: 13-18.
- [2] Chase S S. Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.) [J]. Bot Review, 1969, 35: 117-167.
- [3] Shatskaya O A, Zabirowa E R, Shcherbak V S. Autodiploid lines as sources of haploid spontaneous diploidization in corn [J]. Maize Genet Coop News Lett, 1994, 68: 51-52.
- [4] Zabirowa E R, Shatskaya O A, Shcherbak V S. Lines 613/2 as a source of a high frequency of spontaneous diploidization in corn [J]. Maize Genet Coop News Lett, 1993, 67: 67.
- [5] 魏俊杰, 李红梅, 刘志增. 关于玉米单倍体人工加倍方法及花粉

活力测定的初步研究 [J]. 玉米科学,2001,9(3):12-13.

Wei J J,Li H M,Liu Z Z. Primary study on artificial doubling method of maize haploid and tests of pollen vigor [J]. Journal of Maize Sciences,2001,9(3):12-13. (in Chinese)

[6] 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.

Wen K,Li L,Liu Y Q,et al. Study on haploid inducing and doubling efficiency in maize [J]. Journal of China Agricultural University,2006,11(5):17-20. (in Chinese)

[7] 魏俊杰,张小丽,陈梅香,等. 6 叶期秋水仙素注射处理玉米单倍体的加倍效果研究 [J]. 玉米科学,2007,15(4):49-51.

Wei J J,Zhang X L,Chen M X,et al. Analysis of the results of injection treatment with colchicines in six leaf stage to maize haploid [J]. Journal of Maize Sciences,2007,15(4):49-51. (in Chinese)

[8] 曹孜义. 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.

Cao Z Y. Study on maize haploid embryogenic cells for diploiaization cell clones [J]. Acta Genetica Sinica,1983,10(4):274-279. (in Chinese)

[9] 刘志增,宋同明. 玉米单倍体雌雄育性的自然恢复以及染色体的化学加倍 [J]. 作物学报,2000,26(6):947-952.

Liu Z Z,Song T M. Fertility spontaneously restoring of inflorescence and chromosome doubling by chemical treatment in maize haploid [J]. Acta Agronomica Sinica,2000,26(6):947-952. (in Chinese)

[10] 韩学莉,唐祈林,荣廷昭,等. 用 Stock6 杂交诱导的单倍体鉴定方法初探 [J]. 玉米科学,2006,14(1):64-66,69.

Han X L,Tang Q L,Rong T Z,et al. Study on identifying methods of maize haploid induced by Stock6 [J]. Journal of Maize Sciences,2006,14(1):64-66,69. (in Chinese)

[11] 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 Publisher,2012. (in Chinese)

[12] 刘志增,宋同明. 玉米高频率孤雌生殖单倍体诱导系的选育与鉴定 [J]. 作物学报,2000,26(5):570-574.

Liu Z Z,Song T M. The breeding and identification of haploid inducer with high frequency parthenogenesis in maize [J]. Acta Agronomica Sinica,2000,26(5):570-574. (in Chinese)

[13] Bordes J,De Vaulx R D,Lapiervie A,et al. Haploidiploidization of maize (*Zea mays* L.) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding [J]. Agronomie,1997,17:291-297.

[14] Chalyk S T,Ostrovsky V V. Comparison of haploid and diploid maize (*Zea mays* L.) plants with identical genotypes [J]. Journal of Genetics and Breeding,1993,47:77-80.

[15] 岳尧海,王 敏,张志军,等. 玉米单倍体加倍效果的研究 [J]. 吉林农业科学,2011,36(5):9-12.

Yue Y H,Wang M,Zhang Z J,et al. Studies on the doubling of maize haploid [J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences,2011,36(5):9-12. (in Chinese)

[16] 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]. Theor Appl Genet,1991,81(2):205-211.

(上接第 99 页)

[11] 刘 霞,尹燕萍,姜春明,等. 花后不同时期弱光 and 高温胁迫对小麦旗叶荧光特性及籽粒灌浆进程的影响 [J]. 应用生态学报,2005,16(11):2117-2121.

Liu X,Yin Y P,Jiang C M,et al. Effects of weak light and high temperature stress after anthesis on flag leaf chlorophyll fluorescence and grain fill of wheat [J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2005,16(11):2117-2121. (in Chinese)

[12] 牟会荣,姜 东,戴廷波,等. 遮荫对小麦旗叶光合及叶绿素荧光特性的影响 [J]. 中国农业科学,2008,41(2):599-606.

Mou H R,Jiang D,Dai T B,et al. Effect of shading on photosynthesis and chlorophyll fluorescence characters in wheat flag leaves [J]. Scientia Agricultura Sinica,2008,41(2):599-606. (in Chinese)

[13] 杨俊峰,龚月桦,王俊儒,等. 旱地覆膜对小麦干物质积累及转运特性的影响 [J]. 麦类作物学报,2005,25(6):96-99.

Yang J F,Gong Y H,Wang J R,et al. Effects of film mulching on dry matter accumulation and transportation characteristics of wheat in dry land area [J]. Journal of Triticeae Crops,2005,25(6):96-99. (in Chinese)

[14] Cox M C,Qualset C O,Rains D W. Genetic variation for nitrogen assimilation and translocation in wheat: I. Dry matter and nitrogen accumulation to grain [J]. Crop Science,1985,25(3):430-435.

[15] Arun K B,Monojit A C. Mechanism of monocarpic senescence in rice [J]. Plant Physiology,1980,65:340-345.

[16] 张嵩午. 小麦的冷温状态和逆向衰老 [J]. 中国科学基金,2011(3):148-163.

Zhang S W. Low temperature state and inverse leaf aging of wheat [J]. Bulletin of National Natural Science Foundation of China,2011(3):148-163. (in Chinese)

[17] 邓 飞,王 丽,姚 雄,等. 不同生育阶段遮阴对水稻籽粒充实和产量的影响 [J]. 四川农业大学学报,2009,27(3):265-269.

Deng F,Wang L,Yao X,et al. Effects of different-growing-stage shading on rice grain-filling and yield [J]. Journal of Sichuan Agricultural University,2009,27(3):265-269. (in Chinese)