

基于DH系的种质基础和秋水仙素浓度对玉米单倍体加倍效果的研究

姜 龙¹, 南 楠², 慈佳宾¹, 崔学宇¹, 张 野¹, 孙贵星¹, 杨伟光¹

(1. 吉林农业大学农学院, 长春 130118; 2. 东北师范大学生命科学学院, 长春 130024)

摘 要: 以先玉 335 为母本、高频孤雌生殖诱导系 G5 为父本杂交诱导产生的单倍体为实验材料, 研究秋水仙素浸芽加倍处理玉米单倍体的最佳浓度和时间。结果表明, 秋水仙素浓度为 0.7 mg/mL、浸芽 8 h 处理下的玉米单倍体加倍率最高, 高达 14.4%; 秋水仙素浓度为 0.8 mg/mL、浸芽 8 h 处理下的单倍体加倍率次之, 为 12.1%。以自交系 PHB1M、PH4CV、PH6WC、PHGJ4 和 DH 系 Z2、Z8 为亲本组配的 PHB1M×PH4CV、PHB1M×Z2、PH4CV×DZ2、PH6WC×PHGJ4、PH6WC×Z8、PHGJ4×Z8 组合为母本, 以 G5 为父本, 研究玉米 DH 系对杂交后代加倍率的影响, 结果表明, PH4CV×Z2(26.2%)、PHB1M×Z2(25.8%)、PHGJ4×Z8(23.3%) 和 PH6WC×Z8(21.3%) 的单倍体加倍率显著高于 PHB1M×PH4CV(13.5%) 和 PH6WC×PHGJ4(8.4%), 以 DH 系为亲本组配选系基础材料可显著提高玉米杂交组合的单倍体加倍率。

关键词: 玉米; 单倍体; 种质基础; 秋水仙素; 加倍率

中图分类号: S513.035.2

文献标识码: A

Maize Haploid Doubling Effect of the Germplasm of DH Lines and Different Colchicine Concentrations

JIANG Long¹, NAN Nan², CI Jia-bin¹, CUI Xue-yu¹, ZHANG Ye¹, SUN Gui-xing¹, YANG Wei-guang¹

(1. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118;

2. School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract: Used Xianyu335 as the female parent and the haploid frequency parthenogenesis inducer G5 as the male parent, the optimum concentration and time of maize haploid colchicine soaked bud treatment were studied. The results showed that the doubling rate of maize haploid treated by colchicine soaked bud with concentration of 0.7 mg/mL and under 8h was the highest, up to 14.4%. What was more, the higher was 12.1% with that the concentration of 0.8 mg/mL and under 8h treatment. Six combinations of PHB1M×PH4CV, PHB1M×Z2, PH4CV×DZ2, PH6WC×PHGJ4, PH6WC×Z8, PHGJ4×Z8 that were composited by inbred lines of PHB1M, PH4CV, PH6WC, PHGJ4 and DH lines of Z2 and Z8 as the female parent, also with G5 as male parent to study the doubling effects of DH lines on maize hybrids. The results showed that the haploid doubling rate of PH4CV×Z2(26.2%), PHB1M×Z2(25.8%), PHGJ4×Z8(23.3%) and PH6WC×Z8(21.3%) were significantly higher than that of PHB1M×PH4CV(13.5%) and PH6WC×PHGJ4(8.4%). With basic materials of DH lines could significantly improve the doubling rate of maize hybrid combinations.

Key words: Maize; Haploid; Germplasm base; Colchicine; Doubling rate

收稿日期: 2014-09-18

基金项目: 国家“863”项目(2011AA10A103)、农业部“948”项目(2011-G1-21)

作者简介: 姜 龙, 男, 博士, 主要从事玉米种质资源创新与 DH 育种研究。E-mail: jianglong335@sina.com
杨伟光为本文通讯作者。

玉米 DH(Doubled Haploid)育种技术是培育玉米新材料和新品种的最快速、最经济的手段, 该技术是近年给玉米育种进程带来飞跃发展的新技术, 是玉米育种技术的重大突破, 已成为玉米育种界最为关注的热点之一^[1~3]。然而, 单倍体的二倍化困难即加倍率低, 已成为限制我国玉米 DH 系“工厂化育种”的关键因素之一^[4, 5]。Wan^[6]、Zabirova^[7]研究报道, 许

多玉米材料单倍体自然加倍率低于5%,有些材料甚至根本不发生自然加倍。因此,要获得大量玉米DH系,并从中选育出优良自交系供生产上利用,必须借助单倍体人工染色体加倍体系。

关于玉米单倍体化学加倍方法的报道很多^[8~11],其中,秋水仙素对玉米种子、幼芽、花蕾、花粉和嫩枝都可产生诱变作用,应用起来更为广泛。前人对于秋水仙素加倍玉米单倍体的效率进行了相关报道^[12~17],但单倍体诱导基础材料基因型和秋水仙素处理浓度和时间对玉米单倍体加倍的效果尚存在一定影响,有必要进行深入研究。因此,本实验借鉴前人研究成果,以不同秋水仙素的处理浓度及时间和以玉米DH系为亲本的诱导基础组合对玉米单倍体加倍的效果进行研究,为玉米DH育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

第一组材料:选用以先玉335为母本、本课题组选育的高频诱导系G5为父本杂交诱导产生的单倍体为实验材料(供试材料G5是从诱导系RWS×UH400中选育,并经系谱法命名而来),研究秋水仙素浸芽处理玉米单倍体的最佳浓度和时间。

第二组材料:选用以自交系PHB1M、PH4CV、PH6WC、PHGJ4和DH系Z2、Z8为亲本组配的PHB1M×PH4CV、PHB1M×Z2、PH4CV×DZ2、PH6WC×PHGJ4、PH6WC×Z8、PHGJ4×Z8组合为母本(Z2、Z8是以亲本PH4CV×PHB1M的F₁代为诱导基础,经诱导系UH400诱导,并经浓度为0.7 mg/mL的秋水仙素加倍而成),G5为父本,研究DH系对杂交后代加倍率的影响。

1.2 实验方法

第一组实验:于2012年在长春对供试单倍体进行加倍处理,秋水仙素浓度设置为0.3、0.5、0.7、0.9、1.1 mg/mL,处理单倍体时间设置为4、6、8、10、12 h。根据2012年实验结果,在2013年哈尔滨实验中秋水

仙素浓度设置为0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mg/mL,处理单倍体时间设置为6、7、8、9、10 h。

第二组实验:2013年10月在吉林农业大学海南玉米育种基地进行,秋水仙素浓度为0.7 mg/mL,浸芽时间为8 h,对6个组合的单倍体子粒进行浸芽加倍处理。

单倍体浸芽加倍处理的基本步骤:浸泡种子8 h,采用沙盘法催芽,当幼芽长约2 cm时用刀片将幼芽顶端胚芽鞘切掉1~2 mm,使之露出一个小口(不要伤害到嫩芽),将其在室温下密闭浸泡在不同浓度的秋水仙素溶液中,浸泡6 h,流水清洗2 h后将其种在育苗盘中,待幼苗长至4~5片叶时移栽至大田,统计植株成活率,开花期套袋自交,收获后计算加倍率。单倍体植株成活率和加倍率的计算公式如下:

植株成活率=成活株数/种子(出芽、生根)数×100%;

加倍率=自交单倍体植株数/总单倍体植株数×100%。

1.3 统计分析

实验原始数据先在Excel 2003软件中进行处理,再用DPS7.1^[18]软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度秋水仙素的加倍效果分析

由表1可知,在2012年秋水仙素加倍玉米单倍体实验中,秋水仙素浓度为0.3 mg/mL、浸芽4 h处理的植株成活率最高,为89.5%;浓度为0.5 mg/mL、浸芽4 h的植株成活率居第2位,为88.6%;浓度为1.1 mg/mL、浸芽12 h植株成活率最低,为33.8%。浓度为0.3 mg/mL处理的成活率均值为81.8%;1.1 mg/mL处理的成活率均值为49.8%;浸芽时间为4 h处理的成活率均值为77.0%;浸芽时间为12 h处理的成活率均值为56.8%,单倍体植株的成活率随秋水仙素浓度和处理时间增加呈现降低的趋势。

表1 2012年秋水仙素处理下的植株成活率
Table 1 Survival rate of haploid plants treated by Colchicine in 2012 %

浓度(mg/mL) Concentration	时 间(h) Time					均 值 Mean value
	4	6	8	10	12	
0.3	89.5	88.4	88.5	71.7	70.8	81.8
0.5	88.6	83.7	85.8	69.8	68.7	79.3
0.7	78.6	78.1	72.5	63.7	60.3	70.6
0.9	64.9	61.1	62.0	55.4	50.6	58.8
1.1	63.6	56.9	51.1	43.8	33.8	49.8
均值 Mean value	77.0	73.6	72.0	60.9	56.8	

表 2 2012 年秋水仙素处理下的加倍率

Table 2 Doubling rate of haploid plants treated by Colchicine in 2012

%

浓度(mg/mL) Concentration	时 间(h) Time					均 值 Mean value
	4	6	8	10	12	
0.3	4.9	5.1	6.8	5.5	4.4	5.3
0.5	8.1	8.2	9.5	7.7	5.6	7.8
0.7	8.6	11.7	13.9	9.5	6.7	10.1
0.9	9.5	11.4	13.0	9.9	6.3	10.0
1.1	10.5	8.6	7.7	7.4	5.3	7.5
均值 Mean value	7.9	9.0	10.2	8.0	5.7	

由表 2 可知,在 2012 年实验中,秋水仙素处理单倍体平均加倍率高低顺序为 0.7 mg/mL>0.9 mg/mL>0.5 mg/mL>1.1 mg/mL>0.3 mg/mL;浸芽时间处理单倍体平均加倍率高低顺序为 8 h>6 h>10 h>4 h>12 h。秋水仙素浓度为 0.7 mg/mL、处理 8 h 的单倍体加倍率最高(13.9%);浓度为 0.9 mg/mL、浸芽 8 h 处理的单倍体加倍率次之(13.0%)。因此认为,浓度 0.7 mg/mL 和 0.9 mg/mL、浸芽时间为 8 h 的加倍效果较好,因此,可进一步调整秋水仙素浓度和浸芽时间,确定最佳组合。

由表 3 可知,在 2013 年秋水仙素加倍玉米单倍体实验中,秋水仙素浓度为 0.6 mg/mL、浸芽 6 h 处理的植株成活率最高,为 79.7%;浓度为 0.6 mg/mL、浸芽 7 h 植株成活率居第 2 位,为 79.1%;浓度为 1.0 mg/mL、浸芽 10 h 植株成活率最低,为 38.4%。浓度为 0.6 mg/mL 处理的成活率均值为 73.7%;1.0 mg/mL 处理的成活率均值为 50.1%;浸芽时间为 6 h 处理的成活率均值为 70.4%;浸芽时间为 10 h 处理的成活率均值为 50.6%。

表 3 2013 年秋水仙素处理下的植株成活率

Table 3 Survival rate of haploid plants treated by Colchicine in 2013

%

浓度(mg/mL) Concentration	时 间(h) Time					均 值 Mean value
	6	7	8	9	10	
0.6	79.7	79.1	74.5	74.7	60.3	73.7
0.7	78.6	78.5	76.4	60.3	55.4	69.8
0.8	71.0	66.5	62.0	53.3	50.6	60.7
0.9	64.1	60.3	55.5	48.1	48.3	55.3
1.0	58.4	55.9	50.3	47.5	38.4	50.1
均值 Mean value	70.4	68.1	63.7	56.8	50.6	

表 4 2013 年秋水仙素处理下的加倍率

Table 4 Doubling rate of haploid plants treated by Colchicine in 2013

%

浓度(mg/mL) Concentration	时 间(h) Time					均 值 Mean value
	6	7	8	9	10	
0.6	7.5	9.7	11.0	10.3	9.5	9.6
0.7	9.6	11.8	14.4	12.7	9.5	11.6
0.8	11.5	10.3	12.1	11.3	10.6	11.2
0.9	9.1	8.7	8.0	7.3	7.5	8.1
1.0	8.5	6.8	6.5	5.7	4.8	6.5
均值 Mean value	9.2	9.5	10.4	9.5	8.4	

由表 4 可知,在 2013 年实验中,秋水仙素浓度处理单倍体平均加倍率高低顺序为 0.7 mg/mL>0.8 mg/mL>0.6 mg/mL>0.9 mg/mL>1.0 mg/mL;浸芽

时间处理单倍体平均加倍率高低顺序为 8 h>7 h=9 h>6 h>10 h。秋水仙素浓度为 0.7 mg/mL、处理 8 h 的单倍体加倍率最高(14.4%);浓度为 0.8 mg/mL、浸芽 8 h

处理的单倍体加倍率次之(12.1%)。综合 2012 和 2013 两年的实验结果,秋水仙素浓度为 0.7 mg/mL、浸芽 8 h 处理玉米单倍体时的加倍效果最好,加倍率高达 14.4%。

2.2 亲本DH系对所配组合单倍体加倍率的影响

对不同亲本 DH 系所配组合的单倍体加倍率进行单因素方差分析,处理间 $F=158.1^{**}$,达极显著差异水平,6 个基础材料的单倍体加倍率间存在极显著差异;对处理平均数进行差异显著性检验,多重比较结果见表 5。

表5 不同组合单倍体加倍率的多重比较
Table 5 Multiple comparisons of haploids doubling rate between different combinations

基础材料 Basic material	均值(%) Mean value	显著水平 Significance level	
		5%	1%
PH4CV×Z2	26.2	a	A
PHB1M×Z2	25.8	a	A
PHGJ4×Z8	23.3	b	AB
PH6WC×Z8	21.3	c	B
PHB1M×PH4CV	13.5	d	C
PH6WC×PHGJ4	8.4	e	D

由表 5 知,PH4CV×Z2 和 PHB1M×Z2 的单倍体加倍率分别为 26.2%和 25.9%,而 PHB1M×PH4CV 仅为 13.5%,PH4CV×Z2 和 PHB1M×Z2 的单倍体产生频率极显著高于 PHB1M×PH4CV。PHGJ4×Z8 和 PH6WC×Z8 的单倍体产生频率分别为 23.3%和 21.3%,而 PH6WC×PHGJ4 仅为 8.4%,PHGJ4×Z8 和 PH6WC×Z8 的单倍体产生频率极显著高于 PH6WC×PHGJ4。

以 DH 系为亲本组配选系基础材料可显著提高玉米杂交组合的单倍体加倍率,因此在玉米育种实践中要注重对 DH 系的利用。

3 结论与讨论

Chase 用 0.05%的秋水仙素和 10%的甘油水溶液 0.5 mL 注射盾片节;Gayen 等将单倍体玉米幼苗的根系浸入 300 mL 的 0.05%秋水仙素溶液中 24 h 或将根系在此药液中浸 24 h 后换到营养液中浸 24 h,然后再次浸入药液中 24 h,这两种处理均取得了一定的加倍效果。文科等研究表明,用 0.6 mg/mL 秋水仙素浸种处理玉米单倍体,其加倍率可高达 48.35%;0.4 mg/mL 秋水仙素浸芽处理玉米单倍体的加倍率最高仅为 9.78%。魏俊杰在 6 叶期和拔节期

用不同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%。段民孝等用 0.06%秋水仙素溶液浸泡幼芽上部 and 幼芽全部,结果表明,浸泡幼芽上部植株的加倍效果、成活率、授粉率和结实株率均是浸泡幼芽全部处理的 1.5 倍左右,而且浸泡幼芽上部处理的授粉率和结实率分别是对照的 2 倍和 4 倍以上。王贺等用秋水仙素浸芽处理玉米单倍体的结果表明,秋水仙素浓度为 0.4 ~ 1.0 mg/L 时的加倍率为 8% ~ 16%。

综合本实验中 2012、2013 两年结果表明,秋水仙素浓度为 0.7 mg/mL、浸芽 8 h 浸芽处理玉米单倍体的加倍效果最好,加倍率高达 14.4%。

本实验对亲本 DH 系所配组合的单倍体加倍率进行研究,结果证实,以 PH4CV×Z2(26.2%)和 PHB1M×Z2(25.8%)为基础的单倍体加倍率要显著高于 PHB1M×PH4CV(13.5%);以 PHGJ4×Z8(23.3%)和 PH6WC×Z8(21.3%)为基础的单倍体加倍率要显著高于 PH6WC×PHGJ4(8.4%),以 DH 系为亲本组配选系基础材料可显著提高玉米杂交组合单倍体加倍率。目前,限制单倍体技术应用的主要关键因素是加倍率,因此在育种中组配选系基础材料时要注意对 DH 系的利用。

参考文献:

[1] 刘纪麟. 玉米育种学(第二版)[M]. 北京:中国农业出版社,2002 .
[2] 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)
[3] 陈绍江,黎 亮,李浩川,等. 玉米单倍体育种技术(第二版)[M]. 北京:中国农业大学出版社,2012 .
[4] 姜 龙,慈佳宾,张 野,等. 不同生态条件下玉米单倍体诱导率和加倍率研究[J]. 吉林农业大学学报,2014,36(2): 23-29 .
Jiang L, Ci J B, Zhang Y, et al. Study on inducing rate and doubling rate of maize haploid under different ecological conditions[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2014, 36(2): 23-29. (in Chinese)
[5] 姜 昱,王玉民,王中伟,等. 我国玉米单倍体育种技术研究进展[J]. 玉米科学,2008,16(6):48-51,57 .
Jiang Y, Wang Y M, Wang Z W, et al. The advances at haploid breeding of maize in China[J]. Journal of Maize Sciences, 2008, 16 (6): 48-51, 57. (in Chinese)
[6] Wan Y, Widholm J M. Effect of chromosome-doubling agents on somaclonal variation in the progeny of doubled haploids of maize[J]. Plant Breed, 1995, 114(3): 253-255.
[7] Zabirowa E R, Shatskaya O A, Shcherbak V S. Line 613/2 as a source of a high frequency of spontaneous diploidization in corn[J]. Maize Genet. Coop. News Lett., 1993, 67: 67.
[8] 慈佳宾,李继竹,刘振库,等. 抗微管除草剂对玉米单倍体加倍效

- 果研究[J]. 玉米科学, 2012, 20(5): 10-14.
- Ci J B, Li J Z, Liu Z K, et al. Doubling effect of anti-microtubule herbicides on the maize haploid[J]. Journal of Maize Sciences, 2012, 20(5): 10-14. (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] 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)
- [11] 惠国强, 杜何为, 杨小红, 等. 不同除草剂加倍玉米单倍体的效率[J]. 作物学报, 2012, 38(3): 416-422.
- Hui G Q, Du H W, Yang X H, et al. Doubling efficiency of maize haploids treated by different herbicides acta agronomica[J]. Acta Agronomica Sinica, 2012, 38(3): 416-422. (in Chinese)
- [12] Chase S S. Production of homozygous diploids of maize from monohaploids[J]. Agron J, 1952, 44: 263-267.
- [13] Gayen P, Maden J K, Kumar R, et al. Chromosome doubling in haploids through colchicines[J]. Maize Genet. Coop News Lett., 1994, 68: 64-65.
- [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.
- Wen K, Li L, Liu Y Q, et al. Study on bio2haploid inducing and doubling efficiency in maize[J]. Journal of China Agricultural University, 2006, 11(5): 17-20. (in Chinese)
- [15] 魏俊杰, 张晓丽, 陈梅香, 等. 6叶期秋水仙素注射处理玉米单倍体的加倍研究[J]. 玉米科学, 2007, 9(4): 55-57.
- 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)
- [16] 段民孝, 刘新香, 赵久然, 等. 秋水仙素浸芽法处理玉米单倍体的加倍效果研究[J]. 种子, 2013, 32(2): 19-23.
- Duan M X, Liu X X, Zhao J R, et al. Study on the doubling effect using colchicine in maize haploid[J]. Seed, 2013, 32(2): 19-23. (in Chinese)
- [17] 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)
- [18] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其DPS数据处理系统[M]. 北京: 科学技术出版社, 2002.

(责任编辑: 朴红梅)

(上接第27页)

- [2] Eder J, Chalyk S. In vivo haploid induction in maize[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002(104): 703-708.
- [3] 祁志云, 杨华. 不同基因型玉米单倍体诱导效果研究[J]. 西南农业学报, 2012, 25(4): 1152-1158.
- Qi Z Y, Yang H. Study on inducing effect of haploid in different maize genotypes[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2012, 25(4): 1152-1158. (in Chinese)
- [4] 黎亮, 李浩川, 徐小伟, 等. 玉米孤雌生殖单倍体诱导效率优化方法研究[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(1): 9-13.
- Li L, Li H C, Xu X W, et al. Preliminary optimization of in-vivo haploid induction in maize[J]. Journal of China Agricultural University, 2012, 17(1): 9-13. (in Chinese)
- [5] 蔡泉, 曹靖生, 史桂荣, 等. 几个不同来源玉米单倍体诱导系诱导效果的研究[J]. 玉米科学, 2012, 20(4): 19-21.
- Cai Q, Cao J S, Shi G R, et al. Induction effect of the haploid inducers from different sources[J]. Journal of Maize Sciences, 2012, 20(4): 19-21. (in Chinese)
- [6] 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.
- Li G L, Su J, Li C X, et al. Preliminary result of Gaoyou Inducer No.1 effect haploid induced rate in different maize germplasm[J]. Rain Fed Crops, 2008(3): 125-129. (in Chinese)
- [7] 马骏, 刘欣芳, 王贺, 等. 两个单倍体诱导系对玉米不同材料诱导效果的研究[J]. 玉米科学, 2011, 19(4): 14-16, 21.
- Ma J, Liu X F, Wang H, et al. Research on inducing effect of two different maize materials[J]. Journal of Maize Sciences, 2011, 19(4): 14-16, 21. (in Chinese)

(责任编辑: 朴红梅)