

玉米单倍体自然加倍与化学加倍研究

王志永,郑淑云,吴金鑫,王嘉瑞,张国宾
(北京金色农华种业科技股份有限公司,北京 100083)

摘要: 对不同地点玉米单倍体加倍率(结实率)进行研究。结果表明,单倍体的加倍率与环境、加倍方式及不同材料关系很大,通过对海南、北京、甘肃加倍环境的比较,海南单倍体加倍率较高。NH101在海南和北京两地化学加倍率均高于其自然加倍率,海南化学加倍率和自然加倍率分别为10.64%和2.93%;北京分别为7.27%和2.95%。同一环境、同样处理方式,不同类型的材料加倍率差异很大。

关键词: 玉米;单倍体;自然加倍;化学加倍;加倍率

中图分类号: S513.035.2 **文献标识码:** A

Study on Natural and Chemical Doubling Rate in Maize Haploid
WANG Zhi-yong, ZHENG Shu-yun, WU Jin-xin, WANG Jia-rui, ZHANG Guo-bin
(Beijing Kings Nower Seed S&T Co., Ltd., Beijing 100080, China)

Abstract: The doubling rate of maize haploid in different planting places was analyzed. The results indicated that the doubling rate of maize haploid was affected by the environmental conditions, doubling methods and maize genotypes. The doubling rate in Hainan province was higher than in Beijing. Chemical doubling rates of NH101 were both higher than natural doubling rates, they were 10.64% and 2.93% in Hainan province, 7.27% and 2.95% in Beijing. The doubling rates of different maize genotypes were significant differences in the same environmental condition and by the same doubling method.

Key words: Maize; Haploid; Natural doubling; Chemical doubling; Doubling rate

玉米双单倍体育种技术即DH(Doubled haploid)技术已广泛应用于育种中,特别适合高通量的育种作业,在玉米商业化育种过程中有广阔的应用前景。在此技术中,玉米单倍体的加倍技术是其关键步骤。各公司采用的加倍技术主要有两种,自然加倍和化学药剂加倍(秋水仙素浸泡幼芽技术)^[1,2]。本研究分析不同地点玉米单倍体自然加倍率与化学加倍率,为DH技术应用提供参考。

试验于2011~2012在海南三亚进行,试验材料为NH101、DM1002、DM1007和DM1009;2012年试验地点分别在甘肃张掖和北京进行,试验材料为NH101、Y04、Y02、Y05和Y06,NH101在两年两地共同使用。供试材料来源见表1。本试验中各材料单倍体子粒由中国农业大学陈绍江教授提供的诱导系农大高诱5号诱导产生。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收稿日期: 2015-10-09
基金项目: “亲本种子制备及遗传纯度保持关键技术研究”项目(201303005)
作者简介: 王志永(1980-),男,河北遵化人,硕士,主要从事玉米育种工作。Tel:13488728133
E-mail:wangzhiyong@jsnh.com.cn

表1 供试材料来源表
Table 1 Materials and source

材 料 Material	来 源 Source
NH101	农华101(NH60×S121)
DM1002	美国杂交种
DM1007	美国杂交种
DM1009	美国杂交种
Y02	PH6WC×美国SS种质
Y04	PH6WC×美国SS种质
Y05	PH4CV×美国Lancaster种质
Y06	PH4CV×美国Lancaster种质

1.2 试验方法

1.2.1 自然加倍

在海南(播期11月10日)、张掖(播期4月20日)、北京(播期4月20日)三地,单倍体高密度播种,行距60 cm、株距13.8 cm。苗期和散粉期去除杂株,散粉单倍体植株自交授粉。

1.2.2 化学加倍

采用秋水仙素浸泡幼芽方法^[1],按《玉米单倍体育种技术》所提供的方法操作,常规方法将单倍体种子发芽;幼芽长至2 cm左右,切除胚芽鞘顶端(露出1个小口)备用;将处理好的幼芽放入秋水仙素溶液(0.06%秋水仙溶液+2%二甲基亚砷溶液)中浸泡8 h;将浸泡后的幼芽清水中冲洗30 min,在育苗钵中温室发苗;待幼苗长至3~4片叶时移栽到大田,精细管理。抽雄时注意观察,散粉单倍体及时自交授粉。

1.3 调查项目

玉米抽雄后,每天记录花药露出植株(单个小穗露出花药、个别分枝或整个雄穗露出花药)数,标记并自交授粉。成熟后,统计田间单倍体株数、散粉株数和结实株数(即DH系)。计算散粉率和结实率(加倍率):

散粉率=散粉株数/单倍体株数×100%;

结实率=结实株数/单倍体株数×100%。

2 结果与分析

2.1 海南自然加倍与化学加倍结果

从表2可以看出,除NH101药剂加倍处理略高于自然加倍外,其他材料的散粉率药剂加倍均明显高于自然加倍。单倍体药剂加倍结实率效果更加明显,平均是自然加倍结实率的5.9倍。其中,药剂加倍结实率最高的材料DM1002,其药剂加倍结实率为28.41%,是自然加倍结实率的5.6倍。

表2 海南自然加倍和化学加倍散粉率与结实率

Table 2 The pollen shedding rate and seed setting rate of natural-doubled and chemical-doubled haploid in Hainan province

加倍方式 Doubling mode	材 料 Material	单倍体株数 (株) Haploid plants	散粉株数 (株) Pollen shedding plants	结实株数 (株) Seed setting plants	散粉率 (%) Pollen shedding rate	结实率 (%) Seed setting rate
自然加倍	NH101	1 262	265	37	21.00	2.93
	DM1002	848	285	43	33.61	5.07
	DM1007	816	242	25	29.66	3.06
	DM1009	825	213	39	25.82	4.73
	共 计	3 751	1 005	144		
	平 均				26.79	3.84
化学加倍	NH101	808	188	86	23.27	10.64
	DM1002	609	315	173	51.72	28.41
	DM1007	2501	1190	680	47.58	27.19
	DM1009	837	315	132	37.63	15.77
	共 计	4 755	2 008	1 071		
	平 均				42.23	22.52

2.2 北京自然加倍与化学加倍结果

不同气候条件对玉米单倍体自然加倍散粉率影响较大。从表3可以看出,5个材料北京春播玉米自然加倍散粉率高于甘肃张掖,最终结实率两地各有高低,相差不明显,平均值北京为2.69%,甘肃张掖为2.08%。

北京和张掖两组数据中,NH101、Y04和Y05在北京的散粉率和结实率都高于甘肃张掖;Y02和Y06在北京的散粉率高,但甘肃张掖的结实率高。

散粉率与结实率之间没有明显的相关关系,即使在成功散粉的条件下,也无法实现散粉植株全部授粉^[3]。

5个材料化学药剂加倍(北京)散粉率和结实率均高于自然加倍,北京药剂加倍平均散粉率是自然加倍的1.8倍;北京药剂加倍平均结实率是自然加倍的5.2倍,其中,Y06药剂加倍散粉率和结实率最高,分别为24.98%和18.17%(表4)。

表3 北京、甘肃张掖自然加倍散粉率与结实率
Table 3 The pollen shedding rate and seed setting rate of natural-doubled haploid in Beijing and Zhangye

试验地点 Test site	材 料 Material	单倍体株数(株) Haploid plants	散粉株数(株) Pollen shedding plants	结实株数(株) Seed setting plants	散粉率(%) Pollen shedding rate	结实率(%) Seed setting rate
北 京	NH101	2 437	386	72	15.84	2.95
	Y04	790	130	42	16.46	5.32
	Y02	1 215	64	15	5.27	1.23
	Y05	900	102	20	11.33	2.22
	Y06	840	81	17	9.64	2.02
	共 计	6 182	763	166		
	平 均				12.34	2.69
甘肃张掖	NH101	19 588	1 762	220	9.00	1.12
	Y04	2 612	229	110	8.77	4.21
	Y02	13 475	428	202	3.18	1.50
	Y05	4 918	177	57	3.60	1.16
	Y06	23 410	2 065	740	8.82	3.16
	共 计	64 003	4 661	1 329		
	平 均				7.28	2.08

表4 北京药剂加倍散粉率与结实率
Table 4 The pollen shedding rate and seed setting rate of chemical-doubled haploid in Beijing

材 料 Material	单倍体株数(株) Haploid plants	散粉株数(株) Pollen shedding plants	结实株数(株) Seed setting plants	散粉率(%) Pollen shedding rate	结实率(%) Seed setting rate
NH101	2 159	448	157	20.75	7.27
Y04	920	150	130	16.30	14.13
Y02	3 069	735	500	23.95	16.29
Y05	610	90	60	14.75	9.84
Y06	2 334	583	424	24.98	18.17
共 计	9 092	2 006	1 271		
平 均				22.06	13.98

3 结论与讨论

大量研究表明,玉米单倍体自然加倍率受环境条件影响较大。同一地点、不同播期^[4-6]以及相同材料不同种植地点单倍体加倍率均不同^[7-9]。

本研究 NH101 在海南冬播、北京、张掖春播三地自然加倍结实率分别为 2.93%、2.95%和 1.12%,表明海南冬播和北京春播玉米单倍体自然加倍率较高。分析原因,北京春播玉米生长前期气温较低,玉米苗期至大喇叭口期生长缓慢,雄穗分化时间相对较长,单倍体加倍概率增加;海南属于海洋性气候,夜晚凉爽,温差较大,可能有利于单倍体加倍。

甘肃春季低温时间长、昼夜温差大,自然加倍率较高,国内一些公司把玉米单倍体自然加倍基地放在甘肃地区。本研究中,NH101 在甘肃的自然加倍

率只有 1.12%,远低于海南冬播和北京春播,这与段民孝的研究结果不同,原因可能是因为 2012 年材料种植地授粉期间气温较高、湿度较小,导致雄穗颖壳不张开,花药无法露出,从而使加倍成功的单倍体无法被观察到而没有授粉。玉米单倍体自然加倍率受各种条件影响较大。与自然加倍率的不稳定性相比,化学药剂加倍更能保证 DH 系的稳定产出。本试验采用秋水仙素浸泡幼芽技术,NH101 在海南和北京两地的加倍率分别为 10.64%和 7.27%,均达到了较高的水平。

在玉米育种过程中,应根据其实际情况采用不同的单倍体加倍技术。采用化学药剂处理,可能更加适应大规模、稳定性强的工厂化育种的要求。

参考文献:
(下转第 26 页)

- [25] Ching A, Caldwell K S, Jung M, et al. Snp frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines[J]. BMC Genetics, 2002, 3: 19.
- [26] Liu S, Chen H D, Makarevitch I, et al. High-throughput genetic mapping of mutants via quantitative single nucleotide polymorphism typing[J]. Genetics, 2010, 184: 19–26.
- [27] Cone K C, McMullen M D, Bi IV, et al. Genetic, physical, and informatics resources for maize. On the road to an integrated map[J]. Plant Physiology, 2002, 130: 1598–1605.
- [28] Barcaccia G, Pallottini L, Parrini P, et al. A genetic linkage map of a flint maize (*zea mays* var. *Indurata* L.) italian landrace using a one-way pseudo-testcross strategy and multilocus pcr-based markers[J]. Maydica, 2006, 51: 469.
- [29] Mardis E R. Next-generation DNA sequencing methods[J]. Annu Rev. Genomics Hum Genet, 2008, 9: 387–402.
- [30] Varshney R K, Nayak S N, May G D, et al. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding[J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27: 522–530.
- [31] Su Z, Ning B, Fang H, et al. Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics[J]. Expert Rev. Mol.Diagn, 2011, 11(3): 333–343.
- [32] Lai J, Li R, Xu X, et al. Genome-wide patterns of genetic variation among elite maize inbred lines[J]. Nature Genetics, 2010, 42: 1027–1030.
- [33] 吕远大, 李 坦, 石 丽, 等. 基于全基因组重测序信息开发玉米 h99 自交系特异分子标记[J]. 作物学报, 2014, 40(2): 191–197.
- Lü Y D, Li T, Shi L, et al. Next-generation sequencing for molecular marker development in maize inbred H99[J]. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(2): 191–197. (in Chinese)
- [34] Liu C, Weng J, Zhang D, et al. Genome-wide association study of resistance to rough dwarf disease in maize[J]. European Journal of Plant Pathology, 2014, 139: 205–216.
- [35] 杨晓军, 路 明, 张世煌, 等. 玉米株高和穗位高的 qtl 定位[J]. 遗传, 2008, 30(11): 1477–1486.
- Yang X J, Lu M, Zhang S H, et al. QTL mapping of plant height and ear position in maize(*Zea mays* L.) [J]. Hereditas, 2008, 30(11): 1477–1486. (in Chinese)
- [36] Guimaraes C T, Simoes C C, Pastina M M, et al. Genetic dissection of al tolerance qtls in the maize genome by high density snp scan [J]. BMC Genomics, 2014, 15: 153.

(责任编辑:高 阳)

(上接第 20 页)

- [1] 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, 2011.
- [2] 李浩川, 陈绍江, 黎 亮. 一种玉米单倍体加倍管理方法[P]. 中国专利: CN102177846 A, 2011-09-14.
- [3] 刘 海, 郭建文. 玉米单倍体的自然及化学加倍研究[J]. 天津农业科学, 2014, 20(12): 129–130.
- Liu H, Guo J W. Research on technique of haploid doubling of maize[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2014, 20(12): 129–130. (in Chinese)
- [4] 许 洛, 王绍新, 冯健英. 不同生态环境的玉米单倍体加倍效果研究[J]. 河北农业科学, 2013, 17(3): 63–65.
- Xu L, Wang S X, Feng J Y. Study on natural doubling effect of maize haploid in different ecological environments[J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2013, 17(3): 63–65. (in Chinese)
- [5] 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)
- [6] 段民孝, 赵久然, 刘新香, 等. 春夏不同播期对玉米单倍体自然加

倍率的影响[J]. 玉米科学, 2011, 19(5): 39–42.

- Duan M X, Zhao J R, Liu X X, et al. Study on maize haploid doubling rate in spring and summer planting[J]. Journal of Maize Sciences, 2011, 19(5): 39–42. (in Chinese)
- [7] 芦连勇, 王海莉, 等. 玉米单倍体在春夏不同播期条件下的自然加倍效果研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(18): 9613–9614, 9625.
- Lu L Y, Wang H L, et al. Study of the natural doubling effect of maize(*Zea mays* L.) haploid under different sowing times in spring and summer[J]. Journal of Anhui Agri. Sci., 2012, 40(18): 9613–9614, 9625. (in Chinese)
- [8] 段民孝, 赵久然, 等. 不同种植地点对玉米单倍体自然加倍率的影响[J]. 作物杂志, 2012(12): 68–70.
- Duan M X, Zhao J R, et al. Study on the effect of planting place in maize haploid doubling rate[J]. Crops, 2012(12): 68–70. (in Chinese)
- [9] 蔡 泉, 曹靖生, 等. 玉米单倍体在黑龙江与海南自然加倍效果的对比研究[J]. 玉米科学, 2012, 20(5): 7–9.
- Cai Q, Cao J S, et al. Comparison on natural doubling of maize haploid in heilongjiang and hainan province[J]. Journal of Maize Sciences, 2012, 20(5): 7–9. (in Chinese)

(责任编辑:朴红梅)