

利用秋水仙素喷淋加倍不同遗传基础的单倍体子粒探讨

孙成韬, 孙楠, 马云祥, 姜敏, 刘晓丽, 王延波

(辽宁省农业科学院玉米研究所, 沈阳 110161)

摘要: 以不同血缘及不同世代的遗传育种材料为母本、高频孤雌生殖诱导系辽诱1和CAU5等为父本杂交诱导产生的单倍体子粒为实验材料, 研究秋水仙素浓度为0.625 mg/mL的条件下, 用喷淋加倍设备对试验材料进行8 h喷淋的加倍效果。结果表明, 喷淋秋水仙素后, 郑单958的S2代材料加倍率最高, 为33.75%; 第2位的是L3258×H71, 是NSS种质S0代材料, 其加倍率为13.02%; 第3位的是D299/PH4CV, 为NSS种质S1代材料, 加倍率为10.34%。研究表明, 喷淋秋水仙素的加倍效果与遗传背景关系紧密, 喷淋秋水仙素加倍率总体由高到低的顺序为郑单958>NSS种质>(SS+NSS)种质>SS种质>欧洲杂交种, 喷淋秋水仙素对全部试验材料的加倍率都有提高作用, 比自然加倍提高0.83~5.08倍。利用该喷淋设备加倍单倍体子粒, 具有节约用药量、操作简便、便于大规模生产应用、减少人员对秋水仙素的接触、废液回收方便、有利于保护环境等优点。

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

Exploration of Haploid Seeds with Different Genetic Maize Breeding Materials by Spraying Colchicine

SUN Cheng-tao, SUN Nan, MA Yun-xiang, JIANG Min, LIU Xiao-li, WANG Yan-bo

(Institute of Maize Research, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, China)

Abstract: Using different generations of genetic breeding materials with different genetic background as female parent and high-frequency parthenogenetic induction line G5 as haploid induced by male parent hybridization as experimental materials, the spraying doubling equipment was used to spray the experimental materials for 8 hours under the condition of colchicine concentration of 0.625 mg/mL. After spraying colchicine, the results showed that the material doubling rate of Zhengdan958 in S2 generation was the highest, at 33.75%. Second place was L3258×H71 which was added to NSS germplasm such as Ludahonggu and then to yellow-modified S0 generation. The doubling rate was 13.02%. The third place was that NSS germplasm added to tropical germplasm S1 generation. The doubling rate was 10.34%. The results showed that the doubling effect of spraying colchicine was closely related to the genetic background. In this study, the overall order of the doubling rate of spraying colchicine was Zhengdan958 > NSS germplasm > (SS+NSS) germplasm > SS germplasm > European hybrid. Spraying colchicine could improve the doubling rate of all the experimental materials, which was higher than natural doubling 0.83–5.08 times. Using the spray equipment to double the haploid seeds has the advantages of saving the dosage, simple operation, convenient for large-scale production and application, reducing the contact of personnel with colchicine, convenient waste liquid recovery, and environmental protection.

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

录用日期: 2019-06-21

基金项目: 国家重点研发计划项目“七大农作物育种”(2017YFD0101103, 2017YFD0101103-1)

作者简介: 孙成韬(1977-), 硕士, 主要从事玉米遗传育种与DH系选育种研究。E-mail: sunchengtao2006@163.com

刘晓丽和王延波为本文通讯作者。

玉米DH(Doubled Haploid)育种技术为玉米育种中自交系的选育过程提供了全新的选育思路,缩短了传统自交晋代选系的时间,其各个技术环节不断完善,实现工程化、工厂化育种,提高育种效率。玉米单倍体育种技术发展迅速已经成为国际研究热点之一,并取得了重大突破,已成为培育玉米新材料和新品种最高效的技术手段^[1-3]。单倍体在玉米育种中广泛应用,具有诸如获得纯系方便快捷、简化基因互作并去除超显性效应、保留有利加性效应并淘汰有害、致死和半致死的隐性基因等优点^[4,5]。单倍体自然加倍成二倍体比较困难即加倍率低,已成为限制我国玉米DH系“工厂化育种”的关键因素之一^[6,7]。Wan,Zabirova研究表明,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^[8,9]。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。秋水仙素是目前应用较广泛的加倍药剂,秋水仙素可有效抑制细胞分裂过程中纺锤丝的形成,促使玉米单倍体染色体数目加倍,在玉米单倍体育种中得到广泛应用。关于玉米单倍体化学加倍方法的报道很多^[10-13],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^[14-19]。

本研究在借鉴和学习前人研究的基础上,利用自制喷淋式加倍机,采用浓度为0.625 mg/mL秋水仙素对切除芽尖的幼苗进行喷淋,研究喷淋秋水仙素的平均加倍率及不同种质和世代的加倍率差异,为玉米DH育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

表1 2017年冬海南秋水仙素处理下的育种材料

Table 1 Maize breeding materials treated with colchicine in Hainan in winter 2017

编号 Number	材料来源 Material source	血缘 Consanguinity	世代 Generation
1	郑单958	郑58×C7-2	S2
2	L3258/H71	NSS	S0
3	D299/PH4CV	NSS	S1
4	S3336/PH4CV	NSS	S1
5	CT3354/L72V	NSS	S1
6	PH4CV/D299	NSS	S1
7	M35/P335选系	外引杂交种	S0
8	P1613	外引杂交种	S2
9	PHBW8/L586	SS	S1
10	KW673	外引杂交种	S1
11	PHBW8/L586	SS	S1

1.2 实验方法

实验于2017年11月,在辽宁省农业科学院海南玉米育种基地进行。采用秋水仙素浓度为0.625 mg/mL,喷淋时间为8 h,对11个基础材料(S0~S2世代)的单倍体子粒进行喷淋处理。采用沙培法催芽,当幼芽长约2 cm时,用剪刀将幼芽顶端胚芽鞘切掉(距离中胚轴5~10 mm),将幼苗装入漏水的塑料筐内,放入喷淋秋水仙素的加倍设备中(图1),喷淋8 h,然后换成清水进行喷淋洗苗,将其种移栽至大田,植株成活率均比较高。CK为直播出苗后剪除芽尖然后喷清水。开花期套袋自交,收获后计算加倍率。

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

原始数据先在Excel 2007软件中进行处理,方差分析用DPS v8.01进行处理。

2 结果与分析

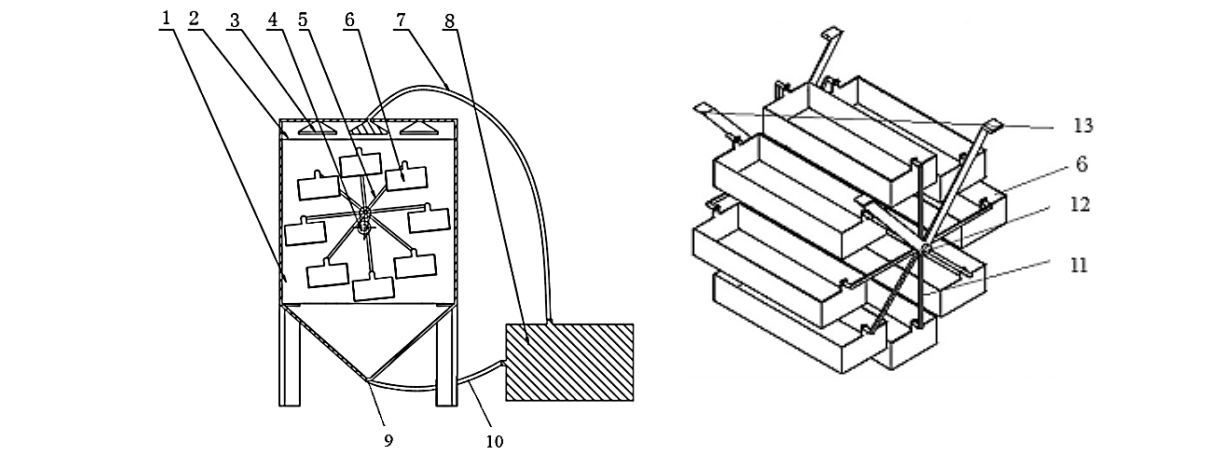
2.1 不同遗传基础的单倍体子粒加倍率分析

由表2可以看出,喷淋秋水仙素后,郑单958(郑58×C7-2)的S2代的材料加倍率最高,为33.75%;第2位的是L3258×H71(L3258=PH4CV×D598,H71=C7-2×K12),是NSS种质S0代材料,其加倍率为13.02%;第3位D299/PH4CV是NSS种质的S1代材料,加倍率为10.34%。平均加倍率最低的是外引杂交种KW673,加倍率仅为2.82%;其次是PHBW8/L586,为SS种质S1代材料,其平均加倍率为3.85%;

再次是SS+NSS种质,平均加倍率为4.69%。

对数据进行方差分析,表明秋水仙素加倍与材料的遗传基础的相关性达极显著水平,喷淋秋水仙素和对照相比达显著水平(表3)。

研究喷淋秋水仙素加倍率和材料世代($S_0 \sim S_2$)关系,方差分析表明,加倍率与世代差异不显著,说明在此试验中加倍率的高低与世代无关(表4)。



注:1.喷淋箱;2.箱盖;3.喷头;4.电动机;5.旋转支架;6.芽苗盘;7.导液管;8.药液循环泵;9.出口;10.出液管;11.旋转支杆;12.轴承;13.固定支架。
Note: 1, Spray box; 2, Box cover; 3, Spray nozzle; 4, Motor; 5, Rotating bracket; 6, Sprout tray; 7, Liquid guide pipe; 8, Liquid medicine circulating pump; 9, Liquid outlet; 10, Liquid outlet pipe; 11, Rotating strut; 12, Bearing; 13, Fixed bracket.

图1 喷淋式秋水仙素加倍机
Fig.1 Spray-type colchicine double machine

表2 2017年冬海南秋水仙素处理下的加倍率平均值
Table 2 Average doubling rate of Hainan colchicine in winter 2017

编 号 Number	材料来源 Material source	血 缘 Consanguinity	世 代 Generation	处理方式 Handling method	成苗株数(株) No. of seedling plant	DH 系数数量 No. of DH	加倍率(%) Double rate
1	郑单 958	郑58×C7-2	S2	喷淋秋水仙素	80	27	33.75
				CK	90	5	5.56
2	L3258/H71	NSS	S0	喷淋秋水仙素	169	22	13.02
				CK	182	5	2.75
3	D299/PH4CV	NSS	S1	喷淋秋水仙素	87	9	10.34
				CK	95	3	3.16
4	S3336/PH4CV	NSS	S1	喷淋秋水仙素	113	11	9.73
				CK	128	3	2.34
5	CT3354/L72V	NSS	S1	喷淋秋水仙素	23	2	8.70
				CK	90	3	3.33
6	PH4CV/D299	NSS	S1	喷淋秋水仙素	43	3	6.98
				CK	91	2	2.20
7	M35/P335 选系	SS+NSS	S0	喷淋秋水仙素	59	3	5.08
				CK	92	2	2.17
8	P1613	SS+NSS	S2	喷淋秋水仙素	70	3	4.29
				CK	97	2	2.06
9	PHBW8/L586	SS	S1	喷淋秋水仙素	52	2	3.85
				CK	95	2	2.11
10	KW673	外引杂交种	S1	喷淋秋水仙素	142	4	2.82
				CK	153	1	0.65
11	PHBW8/L586	SS	S1	喷淋秋水仙素	258	6	2.33
				CK	269	2	0.74

表3 不同材料喷淋秋水仙素加倍效果分析
Table 3 Analysis on the double effect of spray colchicine with different materials

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
Source of variation	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square	F value	P value
喷淋秋水仙素	247.5982	1	247.5982	8.44*	0.016
基础材料间	1379.52	4	344.88	114.95**	0.000
基础材料内	24.00	8	3.00		
总 计	1403.52	12			

表4 不同世代材料加倍率分析结果
Table 4 Analysis results of material doubling rate of different generations

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
Source of variation	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square	F value	P value
不同世代间(S ₀ ~S ₂)	248.03	2	124.02	1.86	0.217
不同世代内	533.78	8	66.72		
总变异	781.81	10			

才卓^[20]通过试验得出,通过单倍体雄穗自然加倍能力轮回选择与遗传修复,发现该性状具有极其显著的累加效应,好的组合1次轮选加倍率可以成倍提高。坚持自然加倍,选择加倍率比较高的材料,进行重组再进行自然加倍,不断提高群体的自然加倍率,建立自然加倍比较高的母本群和父本群,即形成高加倍的遗传材料,可以摆脱秋水仙素的限制,减少环境污染,建立环境友好的单倍体育种技术体系是十分有意义的。

2.2 材料世代对喷淋加倍率的影响分析

2017年冬的实验结果,秋水仙素浓度为0.625 mg/mL,喷淋8 h处理玉米单倍体时的加倍效果差异很大,加倍率为2.33%~33.75%,这种差异主要是材料遗传背景造成的,差异达极显著水平。喷淋秋水仙素加倍对全部试验材料均有提高作用,差异达显著水平。分析材料世代对加倍率的影响,未达显著水平。本研究中加倍率的影响由高到低为遗传背景>药剂处理>材料世代。

3 结论与讨论

2016年对85个材料在沈阳地区进行了自然加倍,成苗8886株,共获得加倍的单倍体46穗,平均加倍率为0.52%,表明在沈阳地区的单倍体自然加倍率偏低。2017年冬在海南自然加倍率平均值是2.46%,2017年冬在海南喷淋秋水仙素加倍率的总体平均值是9.17%,是对照的3.73倍,加倍效率显著提高。因此,自然加倍不能满足加速育种进程的实

际需要,人们在不断地研究和探讨各种人工加倍方法。

本研究表明,不同遗传基础材料的玉米单倍体子粒喷淋秋水仙素和自然加倍的加倍率差异极显著,喷淋秋水仙素加倍效果明显高于自然加倍率。喷淋秋水仙素加倍率总体由高到低的顺序为郑单958>NSS种质>(SS+NSS)种质>SS种质>外引杂交种(KW673),经过对基础材料种质基础和世代的方差分析,加倍率和材料的遗传基础密切相关,与材料世代的关系不紧密。

使用喷淋式秋水仙素加倍机喷淋秋水仙素对全部试验材料都有提高作用,加倍性的提高具有普遍性。试验中喷淋秋水仙素加倍不同种质的加倍率为2.33%~31.75%,比自然加倍提高0.83~5.08倍。用该设备喷淋秋水仙素具有节约用药量、操作简便、便于大规模生产应用、减少人员对秋水仙素的接触、废液回收方便、有利于保护环境等优点。

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] G Andres Gordillo, Hartwig H Geiger. Alternative recurrent selection strategies using doubled haploid lines in hybrid maize breeding

- [J]. *Crop Science*, 2008, 48: 911–922.
- [5] 胡适宜. 雄性生殖单位和精子异型性研究的现状[J]. *植物学报*, 1990, 32(3): 230–240.
- Hu S Y. Current status of studies on male reproductive units and sperm atypia[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 1990, 32 (3): 230–240. (in Chinese)
- [6] 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)
- [7] 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)
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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)
- [11] 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)
- [12] 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)
- [13] 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)
- [14] Chase S S. Production of homozygous diploids of maize from monohaploids[J]. *Agron J*, 1952, 44: 263–267.
- [15] 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.
- [16] 姜 龙, 慈佳宾, 崔学宇, 等. 不同生态条件下玉米单倍体诱导率和加倍率研究[J]. *玉米科学*, 2015, 23(1): 63–68.
- Jiang L, Ci J B, Cui X Y, et al. Induction and doubling rate of maize haploid under the different ecological conditions[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2015, 23(1): 63–68. (in Chinese)
- [17] 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)
- [18] 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, 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)
- [19] 刘晓鑫, 杨 巍, 慈佳宾, 等. 不同基础材料和秋水仙素浓度对玉米单倍体加倍率的影响[J]. *吉林农业大学学报*, 2015, 37(2): 136–140.
- Liu X X, Yang W, Ci J B, et al. Effects of different base materials and colchicines concentrations on maize haploid doubling rate[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2015, 37(2): 136–140. (in Chinese)
- [20] 才 卓, 徐国良, 任 军, 等. 玉米单倍体雄穗自然加倍性轮选遗传修复与高加倍率材料的创制[J]. *玉米科学*, 2016, 24(4): 1–6.
- Cai Z, Xu G L, Ren J, et al. Selection experiment of high spontaneous Male-Fertility-Restorer frequency maize population[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2016, 24(4): 1–6. (in Chinese)

(责任编辑: 朴红梅)