

文章编号: 1005-0906(2014)06-0036-04

外引诱导系 EMK-1 诱导率和早熟玉米单倍体加倍技术研究

杨耿斌¹, 程睿钰¹, 刘兴焱¹, 王 巍², 张 恒¹,
王 辉¹, 何长安¹, 纪春学¹

(1. 黑龙江省农业科学院克山分院, 黑龙江 克山 161606; 2. 黑龙江省农业科学院玉米研究所, 哈尔滨 150086)

摘 要: 以 3 份加拿大早熟玉米种质为基础材料, 利用外引俄罗斯诱导系 EMK-1 为父本进行人工诱导, 通过子粒外观形态鉴定, 确定准单倍体子粒。以加拿大早熟群体 4 诱导的单倍体植株为材料, 设置秋水仙素浸种加倍、在 6 叶期秋水仙素注射加倍与自然加倍 3 个实验, 对单倍体植株进行人工加倍。结果表明, 3 份加拿大早熟玉米种质单倍体诱导率存在很大差异, 诱导率最高达 14.37%, 最低为 5.82%。0.1% 浓度的秋水仙素在植株 6 叶期注射植株加倍的处理效果最好, 加倍率为 26%; 0.3% 浓度的秋水仙素浸种 12 h 处理加倍效果次之, 加倍率为 14.63%; 自然加倍加倍率为 3.06%。

关键词: 玉米; 单倍体; 浸种加倍; 注射加倍; 自然加倍

中图分类号: S513.035.2

文献标识码: A

Research on the Induction Rate of EMK-1 and Doubling Method of Early Maturity Maize

YANG Geng-bin¹, CHENG Rui-yu¹, LIU Xing-yan¹, WANG Wei², ZHANG Heng¹,
WANG Hui¹, HE Chang-an¹, JI Chun-xue¹

(1. Keshan Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan 161606;

2. Maize Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: Haploid materials of maize were gotten with EMK-1 from Russian as male parent and three early maturity maize materials from Canada as the base material. Doubling experiment with three methods were done, soaking seed in colchicine, injection colchicine at six leaf stage, natural doubling, which the haploid materials were gotten from the early maturity maize population of Canada No.4. The results indicated that haploid induction rates among different germplasm materials were different. The highest haploid induction rate was 14.37% while the lowest was 5.82%. The doubling result showed that the best method was the treatment with 0.1% colchicines at six leaf stage, the rates of 26%. The second was soaking seed in 0.3% colchicine for 12 h, the doubling rate was 14.63%, the natural doubling rate was only 3.06%.

Key words: Maize; Haploid; Doubling by soaking; Doubling by injecting; Natural doubling

玉米是世界上总产量最高的粮食作物^[1], 与粮食安全密切相关。近几年我国玉米种植面积连年攀升, 2010 年玉米种植面积为 3 000 万 hm²^[2], 2011 年玉

米种植面积为 3 340 万 hm²^[3], 2012 年玉米种植面积为 3 493 万 hm²^[4]。玉米经济效益的提高, 使我国北部以种植大豆为主的粮食产区也开始大面积种植玉米, 急需极早熟、高产、抗病的玉米品种, 加快我国北部极早熟玉米的育种进程显得尤为重要。

玉米单倍体育种是一种有效缩短育种年限的技术^[5]。常规的育种方法选育自交系, 获得一个纯系的时间平均大约需要 6 年左右^[6], 单倍体育种技术只需 2 年, 与常规方法相比, 显著地提高了育种效率, 国际上一般称其为 DH(Doubled Haploid) 育种技术。

收稿日期: 2014-01-22

基金项目: 国际科技合作项目(2011DFR30840)

作者简介: 杨耿斌(1980-), 男, 硕士, 研究方向为玉米育种研究。

Tel: 13763551997

E-mail: kshmaize@163.com

单倍体诱导系杂交诱导单倍体方法简单,所获得的单倍体完全取决于母本基因型的随机组合,经过染色体加倍,可成为可育的纯合二倍体,因此,具备应用于育种的基本要求^[7]。诱导率低和单倍体加倍率低一直阻碍该项技术的应用,玉米单倍体自然加倍比较困难,许多材料的自然加倍率低于5%,有些材料甚至不发生自然加倍^[8-10],需经过人工加倍才能得到更多的 DH 系,以满足育种需要。1952年 Chase 提出用秋水仙素溶液注射幼苗的盾片节进行加倍^[11]。本实验采用来源于一个基础材料的玉米单倍体为试验材料,研究不同加倍方式对玉米单倍体加倍率的影响,为早熟区玉米单倍体育种应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

本试验以外引加拿大3个玉米早熟群体为母本,利用外引俄罗斯 EMK-1 诱导系为父本杂交,对 F₁ 果穗子粒进行鉴定单倍体,并对其中1份群体的单倍体子粒进行单倍体加倍试验。

1.2 试验方法

1.2.1 杂交诱导试验

2011年5月,用加拿大3个玉米早熟群体为母本,利用外引俄罗斯 EMK-1 诱导系为父本杂交,收获脱粒时,挑选子粒顶端糊粉层为紫色、而胚部或胚芽尖无紫色、且胚面较小、凹陷较深的子粒为准单倍体子粒^[12],根据杂交当代子粒和准单倍体子粒数,计算单倍体诱导率。单倍体诱导率=准单倍体粒数/杂交总粒数×100%。

1.2.2 单倍体加倍实验

对加拿大早熟群体4诱导获得的准单倍体子粒数进行秋水仙素浸种加倍实验、秋水仙素注射植株加倍实验和自然加倍实验共3个处理,每个处理准单倍体50粒,双行区,行长4m,人工除草,不定期检查幼苗长势及叶鞘颜色,淘汰幼苗紫色叶鞘的壮苗,

防治虫害,通过人工自交授粉获得 DH 系。

秋水仙素浸种加倍实验:采用化学加倍的浸种方法,药剂使用秋水仙素(Colchicine, COL)和二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO),秋水仙素配制成3种不同浓度(0.06%、0.3%和0.6%),以2.0%的DMSO作为助渗剂,分别配制不同浓度的溶液各500 mL。设3种秋水仙素浓度(0.06%、0.3%和0.6%),3个处理时间(6、12、24 h),共9个浸种处理,处理种子是先把种子清水浸泡12 h^[13],然后利用不同浓度(0.06%、0.3%和0.6%)的秋水仙素处理6、12、24 h,处理后清水冲洗浸泡6 h后播种。

秋水仙素注射植株加倍实验:药剂使用秋水仙素(Colchicine, COL)和二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO),秋水仙素配制成不同浓度(0.01%、0.05%、0.10%和0.5%),以2.0%的DMSO作为助渗剂,分别配制4种不同浓度的溶液各50 mL。在玉米6叶期,采取0.1 mL剂量注射单倍体植株茎尖生长点偏下的组织中。

自然加倍实验:对准单倍体子粒不采取药剂处理,只进行人工辅助授粉。

1.3 测定项目

杂株率=杂株数/准单倍体子粒数×100%;

单倍体成株率=单倍体成活数/(准单倍体子粒数-杂株数)×100%;

药害株率=药害株数/(准单倍体子粒数-杂株数)×100%;

加倍率=收获 DH 数/(准单倍体子粒数-杂株数)×100%。

2 结果与分析

2.1 单倍体诱导率

以加拿大3个早熟群体为亲本的基础材料,单倍体诱导粒数和单倍体诱导率的结果见表1。从表1可以看出,单倍体诱导率最高的为14.37%,最低的为5.81%,3个群体的平均单倍体诱导率为9.24%。

表1 不同基础材料单倍体诱导率

Table 1 The rates of induced haploid in different basic materials

基础材料 Basic material	杂交总粒数 (粒) Total grain number	准单倍体粒数 (粒) Grain number per haploid	单倍体诱导率 (%) Rate of induced haploid
加拿大早熟群体3	4 925	286	5.81
加拿大早熟群体4	10 216	769	7.53
加拿大早熟群体10	3 048	438	14.37

2.2 单倍体加倍率

2.2.1 秋水仙素浸种加倍

由表2可以看出,经秋水仙素处理的准单倍体种子,其子粒的成活率的变幅较大,成活株率极低,最高为68.29%,且成活株率总体上有随浓度和时间

增加而降低的趋势。浓度为0.6%处理24 h时,成活株率为0,说明秋水仙素对子粒毒害作用明显。从处理加倍率看,在用浓度为0.3%处理12 h时,加倍率最高,为14.63%;浓度为0.3%处理6 h次之,加倍率最低为9.30%。

表2 秋水仙素浸种处理的效果

Table 2 Results of soaking seeds treatment with colchicines

秋水仙素浓度(%) Colchicine concentration	秋水仙素浸泡处理时间(h) Time of treatment	准单倍体粒数(粒) Grain number per haploid	杂株数(株) Plants of hybrid	杂株率(%) Rate of hybrid	单倍体株数(株) Haploid plants	单倍体成株率(%) Rate of haploid plant	单倍体自交结实株数(株) Ears of haploid single cross	单倍体加倍率(%) Rate of double haploid
0.06	6	50	5	10	29	64.44	2	4.44
0.06	12	50	9	18	28	68.29	2	4.88
0.06	24	50	12	24	23	60.53	3	7.89
0.3	6	50	7	14	27	62.79	4	9.30
0.3	12	50	9	18	24	58.54	6	14.63
0.3	24	50	4	8	19	41.30	4	8.70
0.6	6	50	12	24	8	21.05	1	2.63
0.6	12	50	9	18	5	12.20	0	0.00
0.6	24	50	14	28	0	0.00	0	0.00

2.2.2 秋水仙素注射植株加倍

从表3可以看出,在6叶期的单倍体幼苗经秋水仙素注射处理后,单倍体加倍率较浸种实验大幅度的提高,并且受药害株数也较少。0.1%浓度的秋水

仙素处理效果最好,加倍率最高,为26%;0.05%浓度次之,0.01%浓度的处理效果虽然最低,但处理的单倍体幼苗生长正常,只有个别单倍体注射后出现畸形苗。

表3 6叶期秋水仙素注射处理的效果

Table 3 Results of injection treatment with colchicines in six leaf stage

秋水仙素浓度(%) Colchicine concentration	注射时期 Stage and usage for injection	处理单倍体苗数(株) Treated haploid seedlings	受药害株数(株) Drug injured plants	受药害株率(%) Rate of drug injured plant	单倍体自交结实株数(株) Ears of haploid single cross	单倍体加倍率(%) Rates of double haploid
0.01	6叶期	51	0	0.00	5	9.80
0.05	6叶期	47	1	2.13	9	19.15
0.1	6叶期	50	3	6.00	13	26.00
0.5	6叶期	48	6	12.50	6	12.50

2.3 自然加倍

表4 单倍体自然加倍的效果

Table 4 The natural doubling rate of haploid

准单倍体粒数(粒) Grain number per haploid	杂株数(株) Plants of hybrid	杂株率(%) Rate of hybrid	单倍体株数(株) Haploid plants	单倍体成株率(%) Rate of haploid plant	单倍体自交结实株数(株) Ears of haploid single cross	单倍体加倍率(%) Rate of double haploid
119	21	17.6	76	77.55	3	3.06

由表4可以看出,自然加倍的成活株率较高,为77.55%,浸种处理的最高成活株率为68.29%,自然加倍的成活株率明显好于浸种处理。自然加倍单倍体加倍率很低,加倍率只有3.06%,明显低于注射处理与浸种处理。

3 结论与讨论

玉米单倍体育种是快速选育纯系的有效方法,但单倍体诱导率和加倍结实率较低,一直限制单倍体育种的发展。秋水仙素是一种应用最广泛的化学加倍试剂,当它与正在进行分裂的细胞接触时,通过阻止细胞有丝分裂中期纺锤丝微管的收缩,使复制了的染色体不能移向细胞的两极而实现染色体的加倍。玉米单倍体植株的加倍方法有浸根法、浸种法、浸芽法、注射法等。Gayen使用浸种法,使加倍率达到了18%^[4]。魏俊杰等在6叶期和拔节期用不同浓度的秋水仙素配以二甲基亚砜(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%^[15]。

本实验选取加倍率较高的浸种法与6叶期注射法,设置不同的浓度梯度及处理时间,结果表明,秋水仙素浸种加倍试验中,秋水仙素浸种处理后,子粒的成活率的变幅为0~68.29%,秋水仙素浓度为0.6%处理的单倍体成活率直线降低,秋水仙素浸种浓度应小于0.6%。浓度为0.3%处理12h时,加倍率最高,为14.63%。6叶期秋水仙素注射实验中,单倍体幼苗经秋水仙素注射处理后,加倍率有了大幅度的提高,而且受药害株数较少,这个时期用注射法加倍效果好。本实验中0.1%浓度的秋水仙素处理效果最好,在0.5%浓度的秋水仙素处理中单倍体药害率是0.1%浓度的2.1倍,而且加倍率降低显著,秋水仙素浓度的上限应低于0.5%。

本实验中,6叶期秋水仙素注射法加倍效果最好,加倍率最高,为26%,而且还具备用药量少、成本低的优点;浸种法加倍效果次之,加倍率最高,为14.63%;自然加倍法加倍率最低,加倍率仅为3.06%。

参考文献:

- [1] 陈彦成,黄红梅,刘清波. 玉米组织培养研究进展[J]. 农业科技, 2011(20): 45-46.
Chen Y C, Huang H M, Liu Q B. Research progress of maize tissue culture[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2011(20): 45-46. (in Chinese)
- [2] 高 钦. 浅谈玉米种植行距对机收机播的影响[J]. 农机科技推广, 2011(8): 27.

- Gao Q. Maize plant row pitch effect on mechanical row an harvest [J]. Agriculture Machinery Technology Extension, 2011(8): 27. (in Chinese)
- [3] 郭 浩,柳晓峰. 2011年中国玉米市场回顾及2012年展望[J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(4): 8-11.
Guo H, Liu X F. Review the Chinese maize market in 2011 outlook for it in 2012[J]. Chinese Journal of Animal Sciences 2012, 48(4): 8-11. (in Chinese)
- [4] 赵久然,王荣焕. 中国玉米生产发展历程,存在问题及对策[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(3): 1-6.
Zhao J R, Wang R H. Course of Chinese maize, question and the way to deal with a situation[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2013, 15(3): 1-6. (in Chinese)
- [5] 姚文华,韩学莉,汪燕芬. 我国甜玉米育种研究现状与发展对策[J]. 中国农业科技导报, 2011, 13(2): 1-8.
Yao W H, Han X L, Wang Y F. Present situation Chinese sweet maize and the way to deal with a situation[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2011, 13(2): 1-8. (in Chinese)
- [6] 蔡 泉,曹靖生,史桂荣. 单倍体技术在玉米育种上的应用研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2009(4): 15-17.
Cai Q, Cao J S, Shi G R. Research progress of haploid technology used in maize[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2009(4): 15-17. (in Chinese)
- [7] 魏俊杰. 玉米单倍体在育种中的应用进展[J]. 中国种业, 2009(1): 22-24.
Wei J J. Research progress of haploid technology used in maize breeding[J]. Chinese Seeds, 2009(1): 22-24. (in Chinese)
- [8] 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 Genetics Cooperation Newsletter, 1993, 67: 67.
- [9] Chalyk S T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding[J]. Euphytica, 1994, 79: 13-18.
- [10] Shatskaya O, Zabirowa E, Shcherbak V, et al. Mass induction of maternal haploid in corn[J]. 1994, 68: 51-52.
- [11] Chase S S. Production of homozygous diploids of maize from monohaploids[J]. Agronomy Journal, 1952, 44(5): 263-267.
- [12] 才 卓,徐国良,代玉仙. 玉米杂交诱导单倍生殖(单倍体)选育自交系技术规范(暂行版)[J]. 玉米科学, 2009, 17(5): 1-4.
Cai Z, Xu G L, Dai Y X. The specification of using haploid breed of hybrid maize breeding the inbred lines[J]. Journal of Maize Sciences, 2009, 17(5): 1-4. (in Chinese)
- [13] 文 科. 玉米单倍体诱导和加倍方法及其SSR和ISSR标记分离研究[D]. 北京: 中国农业大学硕士学位论文论文, 2003.
- [14] 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.
- [15] 魏俊杰,池书敏,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, Chi S M, Liu Z Z. Preliminary study on artificial doubling method of maize haploid and pollen viability determination[J]. Journal of Maize Sciences, 2001, 9(3): 12-13. (in Chinese)

(责任编辑: 朴红梅)