

文章编号:1003-8701(2011)05-0009-04

玉米单倍体加倍效果的研究

岳尧海,王 敏,张志军,张洪伟,刘文国*

(吉林省农业科学院玉米研究所,吉林 公主岭 136100)

摘 要:本试验用高诱 1 号诱导的单倍体植株为材料,在 5~6 叶期用两种浓度的秋水仙素配以二甲基亚砷(DMSO)注射处理茎尖生长点,进行人工加倍,并对不同处理效果进行方差分析和多重比较。结果表明:从不同基因型的材料中诱导出的单倍体的加倍都是有效的,且不同基因型材料间有显著差异;0.5%浓度的秋水仙素的处理效果最好。

关键词:玉米;单倍体加倍;单倍体诱导;秋水仙素

中图分类号:S513.035.2

文献标识码:A

Studies on the Doubling of Maize Haploid

YUE Yao-hai, WANG Min, ZHANG Zhi-jun, ZHANG Hong-wei, LIU Wen-guo

(Maize Research Institute, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Using induced haploids ‘Gaoyou 1’ as materials, their stem tips were treated separately with two colchicines concentration and DMSO in five-leaf and six-leaf stage to double them. The results were analyzed by variance and multiple comparisons. The results showed that injection treatment was effective for haploids induced from different sources and the difference was obvious. The best result was the treatment with 0.5% colchicines.

Keywords: Maize; Doubling of maize haploid; Maize haploid inducing; Colchicines

在育种技术革新的时代,单倍体育种技术以其优越的特点被国内外许多育种家所应用。单倍体技术在玉米育种中的应用前景十分诱人,首先对目标诱导材料进行重组与改良,使其积累足够的有利基因位点,然后利用单倍体技术使优良的基因快速纯合,获得性状优良的纯系,只需 1 个世代,大大缩短自交系选育年限,这将极大地发挥单倍体育种技术的优势,极大提高玉米育种的效率^[1]。但是玉米育种中有效应用单倍体技术,需要解决几个关键问题:如何简便且大规模地获得单倍体植株,如何简便且有效地进行单倍体加倍等,这些技术难题是目前制约单倍体技术发展的瓶颈。因此本文根

据不同的浓度和不同基因型材料对单倍体加倍效果进行了试验和讨论,为广大育种者提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本试验所采用的单倍体是利用孤雌生殖诱导系农大高诱 1 号为父本,340/A123(旅大红骨)、478/S11 (Reid)、Mo17/A15 (LANCAST)、81162/2455(其它)、444/A22(黄早 4)为母本材料在 F₁ 代进行杂交,从杂交种中挑选单倍体子粒,按 60 000 株/hm² 种植于田间,得到单倍体植株。

1.2 方法

在 5~6 叶期,当天上午 9:00,分别用浓度为 0.1%、0.5% 的秋水仙素和 2.0% 的二甲基亚砷(DMSO)混合液 2.0 μL 注射处理单倍体幼苗茎尖生长点,以同期播种的单倍体为对照,花期凡能散粉的植株记为加倍成功的植株,统计散粉株率,并加强田间管理,进行精细授粉。

收稿日期:2011-03-10

基金项目:吉林省财政厅育种专项(2009)

作者简介:岳尧海(1974-),男,硕士,助理研究员,主要从事玉米育种工作。

通讯作者:刘文国(1971-),男,研究员,

E-mail: Liuwenguo168@163.com

散粉株率(%)=(雄性可育株 / 总株数)× 100%^[2]

1.3 数据统计与分析

采用 DPS6.55 和 Excel 统计软件对试验数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 5~6 叶期单倍体的处理效果

由表 1 可看出 ,5~6 叶期的单倍体幼苗经不

同浓度秋水仙素注射处理后 ,不仅加倍频率有了大幅度的提高 ,并且受药害株数较少 ,受药害株率也很低。这个时期用注射处理法对玉米单倍体的加倍比较有效。在 0.1%的秋水仙素浓度下的散粉株率 26.60% ,在 0.5%的秋水仙素浓度下的散粉株率 31.31% ,虽然随着浓度的增加受药害株率也增加 ,但散粉株率增加幅度较大 ,因此 0.5%的秋水仙素浓度处理效果较好 ,0.1%浓度次之。

表 1 5~6 叶期秋水仙素注射处理的效果

秋水仙素浓度(%)	处理单倍体苗数(株)	受药害株数(株)	受药害株率(%)	散粉株数(株)	散粉株率(%)
0.1	30	1	3.3	8	26.60
0.5	32	2	6.3	10	31.31
CK	31	0	0	2	6.52

注 :试验中的单倍体来源于 478/S11(Reid)。

2.2 5~6 叶期从不同基因型材料中诱导出的单倍体的处理效果

由表 2 可看出 ,在 5~6 叶期注射 0.5%浓度的秋水仙素对从不同基因型材料中诱导出的单倍体的加倍均起到了较好的效果。从杂交种 478/S11(Reid)中诱导出的单倍体的加倍率升高了 2.75 倍 ;从杂交种 Mo17/A15(LANCAST)中诱导

出的单倍体经注射处理后加倍率升高了 2.5 倍 ;从杂交种 81162/2455(其它)中诱导出的单倍体的加倍率升高了 2 倍多 ;从 340/A123 (旅大红骨)、444/A22(黄早 4)中诱导出的单倍体加倍率均升高近 1 倍。而 0.1%浓度的秋水仙素的处理效果不如 0.5%的明显 ,但也均高于各自的对照。另外从对照中可以看出 ,来源于 340/A123 (旅大红骨)、

表 2 5~6 叶期秋水仙素对从不同基因型材料中诱导出的单倍体注射处理的效果

单倍体的来源	秋水仙素浓度(%)	处理单倍体苗数(株)	散粉株数(株)	散粉株率(%)
478/S11(Reid)	CK	20	1	5.00
	0.1	29	2	6.90
	0.5	32	6	18.75
Mo17/A15(LANCAST)	CK	25	2	8.00
	0.1	27	5	18.52
	0.5	25	7	28.00
340/A123(旅大红骨)	CK	16	2	12.50
	0.1	37	6	16.22
	0.5	37	10	27.03
81162/2455(其它)	CK	16	1	6.25
	0.1	32	3	9.38
	0.5	31	6	19.35
444/A22(黄早 4)	CK	20	3	13.00
	0.1	19	3	15.79
	0.5	33	9	27.27

444/A22(黄早 4)单倍体的自然加倍率比较高。

对以上 5 个品种和 478/S11(Reid)中诱导出的单倍体在 5~6 叶期秋水仙素的不同处理效果进行方差分析结果见表 3。经计算分析 ,基因型间的 F 测验值 4.30 大于 F_{0.05} ,说明基因型间的加倍

率在 5%水平上存在显著差异 ,即从不同基因型材料中诱导出的单倍体的加倍率存在显著差异 ,不同秋水仙素处理间的 F 测验值 28.59 大于 4.46 (F_{0.05}) ,说明不同的秋水仙素浓度对单倍体的加倍效果有显著差异。

表 3 单倍体加倍率的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	F _{0.05}
基因型间	307.6	5.0	61.5	4.30	3.84
处理间	817.4	2.0	408.7	28.59	4.46
误差	142.9	10.0	14.3		
总变异	1 267.9	17.0			

因有指定对照 ,故用 LSD 法分析。LSD 法测验结果见表 4 ,0.5%的秋水仙素处理的效应最强 ,与对照有极显著差异 ;0.1%的秋水仙素次之 ,有

显著差异。

以上结果表明 ,在 5~6 叶期对单倍体进行茎尖注射处理 ,从不同基因型的材料中诱导出的单

倍体的加倍都是有效的，且不同基因型材料间有显著差异。0.5%浓度的秋水仙素的处理效果最好，加倍率与对照相比有明显的提高，0.1%浓度的处理对单倍体的加倍也有一定的效果，但不如0.5%浓度的处理效果明显。

表 4 秋水仙素处理与对照的差异显著性分析

秋水仙素浓度(%)	平均数	与对照的差数
ck	8.88	
0.1	15.58	6.70*
0.5	25.29	16.41**

注:LSD_{0.05}=4.86 ,LSD_{0.01}=6.91。

3 讨 论

3.1 单倍体加倍的适宜浓度

本研究在 5~6 叶期采用两种处理方式对单倍体幼苗茎尖生长点 ,用秋水仙素和 DMSO 的混合液进行注射处理。结果表明 ,在此时期用 0.5%浓度的秋水仙素进行注射处理对玉米单倍体的加倍是一种比较有效的方法。这与魏俊杰的研究结果相似^[3]。另外本试验中 ,来源于 340/A123(旅大红骨)、444/A22(黄早 4)单倍体的自然加倍率比较高 ,说明有可能含有 340、444 血缘的种质自然加倍率比较高 ,但还需进一步试验和研究。

3.2 单倍体加倍的化学试剂

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而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^[4]。二甲基亚砷(DMSO)是一种水溶性化合物 ,能溶解绝大多数有机化合物。它能提高秋水仙素的加倍能力是由于提高了溶液通过分生组织的穿透能力 ,并能使分生组织更加活跃。秋水仙碱对哺乳动物微管的亲和性相对较高 ,因而这种药剂也会对人产生毒害作用 ,在严重的情况下 ,还会使人致癌。因此除了秋水仙碱外 ,还有很多抗微管物质需要进一步研究 ,如甲基胺草磷 ,戊炔草胺 ,安磺磷和氟乐灵等^[5] ,它们诱导染色体加倍时都具有很大的潜力。

3.3 影响加倍效果的因素

玉米单倍体加倍的方法很多 ,如浸种、浸芽、浸根、喷雾等方法 ,大多都是采用化学试剂进行加倍。加倍效果的好坏可能有以下几方面的原因 :①秋水仙素与二甲基亚砷(DMSO)的浓度与量的搭配有关。②秋水仙素处理玉米单倍体后 ,破坏了玉米茎尖幼嫩组织 ,破坏植物组织的正常生理环境 ,其功能和发育可能受到一定限制 ,可能会造成植

物的生长发育产生异常表现 ,有的还不易成活。③加倍率的高低和细胞的生理状态有关 ,处于活跃分裂期的细胞越多 ,加倍效果则越显著 ,所以要特别注意处理的时期^[6]。④另外加倍的效果还与注射秋水仙素时的温度有关。处理温度对药剂的水解速度影响很大 ,由于在低温下药剂的水解速度缓慢 ,所以诱导剂能保持一定的稳定性 ,但对细胞的有效作用却减弱 ,相反 ,在高温条件下虽然有效作用增强 ,但是同时也加速了它在溶液中的变性过程。现在普遍采用“变温处理”解决这个问题。张素芝等 (2006) 在对大蒜多倍体诱导的研究中发现 ,温度对四倍体的诱导率影响很大 ,较高的温度、短时间的处理效果较好 ,较低的温度 ,时间则应延长一些^[7]。值得注意 ,由于单倍体数量上的限制 ,试验设计的处理较少 ,试验所得出的数据结论可能有一些偏差 ,未能对更多的秋水仙素浓度以及助渗剂 DMSO 和秋水仙素配合使用的最佳方式进行研究。相信随着加倍单倍体技术的进一步完善 ,将会获得更高加倍频率。

3.4 展望

玉米单倍体育种技术是一项革新育种技术。利用单倍体育种方法 ,可以大大缩短育种年限、加快育种进程、降低育种成本 ,在玉米商业育种中的应用前景十分广阔。近 10 年来美国孟山都公司、德国 KWS 公司及俄罗斯等国的一些玉米种子公司都在利用单倍体诱导系进行自交系选育。据不完全统计 ,德国 KWS 公司利用单倍体诱导系每年大约可产生 1500~2000 个纯系^[8]。美国已育成了一批优良的玉米单倍体诱导系 ,而且对玉米单倍体的鉴别、筛选、育种方法已经日趋完善成熟。目前 ,这一技术正在被美国玉米商业育种家广泛利用。我国在单倍体研究方面起步晚。目前 ,中国农业大学、中国农业科学院、华中农业大学、河北农业大学、山东省农业科学院、辽宁省农业科学院、吉林省农业科学院等也都先后从事了这方面的研究。2000 年中国农业大学选育的诱导系农大高诱 1 号诱导率达 5.82%左右 ,最近又选育出诱导率比较高的新诱导系^[9]。2006 年吉林省农科院选育的吉高诱系 3 号诱导率达到 10.40% ,是理想的单倍体诱导系 ,为我国开展玉米单倍体诱导选系奠定了基础^[10]。

目前我国育成了多个性状较优良的 DH 系 ,并且选育出多个优良组合参加国家级和省级区域试验 ,有的组合已经通过审定并在生产上推广^[11]。可见我国在单倍体育种方面已经取得了很大的进

步。但我国玉米单倍体育种总体上还处于引进熟化创新阶段,与发达国家比较还有一定的差距。实现单倍体技术在我国玉米育种中的应用,必须建立和完善包括从亲本选择、诱导系选择及育种中各环节鉴定技术和手段的育种体系。而在众多技术难点中,目前玉米单倍体加倍效率不高仍是单倍体技术在育种中应用的一个瓶颈,应加快玉米单倍体加倍技术的研究步伐。

参考文献:

- [1] 陈绍江,黎 亮,李浩川.玉米单倍体育种技术[M].北京:中国农业大学出版社,2009.
- [2] 韩学莉,唐祈林,荣廷昭.Stock6 杂交诱导的玉米单倍体化学加倍效果研究[J].玉米科学,2009,17(1):22-27.
- [3] 魏俊杰,张晓丽,陈梅香.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.
- [4] 田增荣(译).秋水仙素对小麦小孢子胚胎发生产生双单倍体植株的直接影响[J].国外农学-麦类作物,1992(3):1-3.
- [5] 黄权军.化学药剂诱导植物多倍体研究进展[J].安徽农学通报,2009,15(5):58-59,74.
- [6] 徐玉冰,牛维和,刘继红,等.甜菜单倍体植株染色体人工加倍技术的探讨[J].中国甜菜,1991(3):7-11.
- [7] 张素芝,李纪蓉.秋水仙素诱导大蒜四倍体的研究[J].核农学报,2006,20(4):303-308.
- [8] 谭 静,徐春霞,陈洪梅.利用单倍体诱导系选育玉米自交系研究[J].玉米科学,2007,15(4):56-58,62.
- [9] 刘志增,宋同明,滕文涛.玉米孤雌生殖诱导系的选育方法研究[J].中国农业大学学报,2000,5(3):51-57.
- [10] 才 卓,徐国良,刘向辉,等.玉米高频率单倍生殖诱导系吉高诱3号的选育[J].玉米科学,2007,15(1):1-4.
- [11] 蔡 泉,曹靖生,史桂荣,等.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):15-17,20.

《植物遗传资源学报》征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊,为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国农业核心期刊、全国优秀农业期刊。该刊为中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊(核心期刊)、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,又被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中文科技期刊数据库收录。据中国期刊引证研究报告统计,2010年度《植物遗传资源学报》影响因子1.081。

双月刊,大16开本,128页。定价20元,全年120元。各地邮局发行。邮发代号:82-643。国内刊号CN11-4996/S,国际统一刊号ISSN1672-1810。

本刊编辑部常年办理订阅手续,如需邮挂每期另加3元。

地 址:北京市中关村南大街12号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部

邮 编:100081 电 话:010-82105794 010-82105796(兼传真)

网 址:www.zwyczy.cn E-mail:zwyczyxb2003@163.com zwyczyxb2003@sina.com

2012年《黑龙江农业科学》征订启事

《黑龙江农业科学》是黑龙江省农业科学院主办的综合性科技期刊。是全国优秀期刊、黑龙江省优秀期刊。现已被中国科学引文数据库、中国核心期刊(遴选)数据库等多家权威数据库收录。□

本刊内容丰富,栏目新颖,信息全面,可读性强。月刊,每月10日出版,国内外公开发行。国内邮发代号14-61,每期定价5.00元,全年60.00元;国外发行代号M8321,每期定价8.00美元,全年96.00美元。

热忱欢迎广大农业科研工作者、农业院校师生、国营农场及农业技术推广人员、管理干部和广大农民群众踊跃订阅。全国各地邮局均可订阅,漏订者可汇款至本刊编辑部补订。汇款写明订购份数、收件人姓名、详细地址及邮编。

另外,2010年合订本已出版,还有少量2007~2009年合订本珍藏版。2007年合订本每册定价80.00元,2008~2009年合订本每册定价90.00元,2010年合订本150.00元,邮费各10.00元,售完为止。

地址:哈尔滨市南岗区学府路368号《黑龙江农业科学》编辑部□ 邮编:150086

电话:0451-86668373 信箱:nykx13579@sina.com 网址:www.haasep.cn