

Stock 6 杂交诱导的玉米单倍体加倍效果研究

蔡 泉,张建国,赵 伟,李树军,殷 跃

(黑龙江省农业科学院 玉米研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为提高育种效率,研究了 Stock 6 对 21 个引自美国的玉米群体的单倍体诱导及加倍效果。结果表明: Stock 6 对 21 个美国群体的单倍体诱导率在 2.76%~9.41%,平均诱导率 5.26%;自然加倍率在 0~23.1%,平均 10.6%;通过对人工加倍效果的研究表明,用浸芽法处理单倍体的时候,秋水仙素浓度为 0.60%时,产生严重的药害,浓度在 0.10%时平均加倍率为 18.4%,浓度在 0.06%时平均加倍率为 21.9%。

关键词:玉米;单倍体;Stock 6;加倍率

中图分类号:S513.035.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)11-0001-03

利用单倍体技术进行玉米自交系的选育,可以实现配子体选择,大大缩短育种年限,提高育种效率。Stock 6 具有两个标记性状:(1)籽粒 Navajo 斑纹,是由 A1A2C1C2R-nj 互补基因控制;(2)成株叶片和叶鞘呈紫色,是由 A1A2C2BP1 互补基因控制。在育种实践中用 Stock 6 作父本,被诱导的育种试材作母本,大约有 3%的单倍体胚。Stock 6 及其改良的诱导系,在我国已经被广泛利用于玉米单倍体诱导研究^[1]。

玉米单倍体的加倍方法主要有自然加倍和人工化学加倍。自然加倍主要由材料自身特性而定,一般自然加倍率均<5%,有些材料不发生自然加倍,还有一些材料自然加倍率可以>10%,甚至达到 20%以上;人工化学加倍主要用秋水仙素处理,加倍效果受浓度、处理部位、处理时间等因素影响而不同^[2]。

该研究对 Stock 6 对来自美国的 21 个玉米群体的单倍体诱导效果,以及其单倍体人工化学加倍的效果进行初步研究,探索较优的单倍体诱导及人工化学加倍方法。

1 材料与方法

1.1 材料

父本是单倍体诱导系 Stock 6,母本是引自美国的 21 个综合群体(见表 1)。

表 1 供试的 21 个母本综合群体来源

| 09 南区号 | 来源 | 09 南区号 | 来源 |
|--------|---------------|--------|--------------------|
| 9001 | LH820H/PHW65 | 9012 | PHZ51/LH820H |
| 9002 | LH1/PHW65 | 9013 | PHZ51/PHW65 |
| 9003 | LH1/LH820H | 9014 | 兰卡长穗/Iodent |
| 9004 | LH1/Iodent | 9015 | 高油 M222-S12003(迪卡) |
| 9005 | PHZ51/Iodent | 9016 | XH251-S12003(迪卡) |
| 9006 | LH820H/Iodent | 9017 | M132-S12003 春(迪卡) |
| 9007 | 兰卡长穗/LH82 | 9018 | BSSS |
| 9008 | PHZ51/LH82 | 9019 | 衣阿华马齿 |
| 9009 | PHW65/LH82 | 9020 | Iodent 综合种 |
| 9010 | LH1/LH82 | 9021 | 620697-S1(先锋) |
| 9011 | Iodent/LH82 | | |

1.2 方法

试验分两部分:(1)获得单倍体:利用诱导系作为父本,来自美国的 21 个群体作母本,杂交得到单倍体籽粒,鉴定其对不同群体诱导产生单倍体的几率;(2)单倍体加倍:对单倍体籽粒进行加倍处理,得到 DH 系,并对加倍效果进行研究。

1.2.1 获得单倍体部分 2009 年 10 月 27 日在海南三亚黑龙江省南繁指挥部试验基地播种。小区行长 5 m,株距 20 cm,诱导系 3 行区,被诱材料 1 行区。以诱导系为父本,被诱材料为母本,每区选择农艺性状良好的单株 5 株授粉。同时父本自交采种,收获后自然风干脱粒,查 5 株收获粒数,单倍体籽粒数,单倍体籽粒留待加倍处理加代取得 DH 系。

1.2.2 单倍体加倍部分 2010 年 5 月 5 日在黑龙江省农业科学院玉米研究所试验基地播种。小区行长 3 m,株距 30 cm。人工加倍采用浸芽法。用光照培养箱培养单倍体籽粒,当胚芽伸长到 3 cm 左右时,剪去尖部约 0.5 cm,然后用秋水仙素溶液浸泡 8 h,再用清水冲洗 2 h,移栽在培养钵内,待长至 3 叶 1 心时,坐水移栽大地。移栽后,幼苗长至 5 叶 1 心时,再对其进行一次鉴定,去除伪单倍体^[3]。

收稿日期:2011-06-27

基金项目:农业部转基因新品种培育重大专项资助项目(2009zx08003-015B)

第一作者简介:蔡泉(1979-),男,黑龙江省牡丹江市人,硕士,助理研究员,从事玉米新品种选育与推广工作。E-mail: cq6539@163.com。

按照秋水仙素浓度设 4 个处理:0.60%、0.10%、0.06% 和 CK,其中 CK 为自然加倍(无秋水仙素处理)。

2 结果与分析

2.1 获得单倍体

由表 2 可知,该 Stock 6 诱导系对美国群体的诱导率在 2.76%~9.41%,平均诱导率 5.26%。共得到 1 031 粒单倍体种子。

表 2 海南收获总粒数及单倍体粒数

| 09 南区号 | 总粒数 | 单倍体 | 诱导率 /% | 09 南区号 | 总粒数 | 单倍体 | 诱导率 /% |
|--------|------|-----|--------|--------|------|-----|--------|
| 9001 | 665 | 20 | 3.01 | 9012 | 761 | 44 | 5.78 |
| 9002 | 227 | 13 | 5.73 | 9013 | 617 | 25 | 4.05 |
| 9003 | 947 | 54 | 5.70 | 9014 | 489 | 46 | 9.41 |
| 9004 | 721 | 28 | 3.88 | 9015 | 378 | 18 | 4.76 |
| 9005 | 1249 | 47 | 3.76 | 9016 | 1307 | 111 | 8.49 |
| 9006 | 1845 | 51 | 2.76 | 9017 | 977 | 78 | 7.98 |
| 9007 | 856 | 27 | 3.15 | 9018 | 1326 | 90 | 6.79 |
| 9008 | 1854 | 68 | 3.67 | 9019 | 577 | 42 | 7.28 |
| 9009 | 470 | 24 | 5.11 | 9020 | 1337 | 79 | 5.91 |
| 9010 | 1347 | 53 | 3.93 | 9021 | 907 | 53 | 5.84 |
| 9011 | 1759 | 60 | 3.41 | | | | |

2.2 单倍体加倍

由于群体 9001、9002、9004、9005、9007、9009、9012、9013、9014、9015、9019 得到的单倍体籽粒数太少,因此不对这 11 个群体的单倍体籽粒进行人工加倍,只进行自然加倍。其它的 10 个群体按方案进行 4 个处理。

由表 3 可知,群 9008、9011、9016 的自然加倍率达到了 20% 以上;群 9001、9004、9010、9013、9018、9019、9020、9021 的自然加倍率在 10%~20%;群 9002、9003、9005、9007、9009、9014、9015、9017 的自然加倍率在 5%~10%;群 9012 的自然加倍率小于 5%;群 9006 自然加倍率为 0。21 个群体的平均自然加倍率是 10.6%。

由表 4 可知,秋水仙素 0.60% 处理的田间存活率非常低,只有群 9003、9006、9010、9016、9020、9021 有 1~2 株单倍体植株存活,并且只有群 9010、9016、9021 各有 1 株加倍成功。分析认为处理的秋水仙素浓度过大,导致植株产生药害,死亡。

由表 5 可知,秋水仙素 0.10% 处理的田间存活植株明显好于 0.60% 处理,田间平均存活率为 45.9%,其中群 9003、9006、9018、9021 的加倍率超过了 20%;其余均大于 10%,10 个群体平均加倍率为 18.4%。

由表 6 可知,秋水仙素 0.06% 处理的田间存活植株明显增多,平均存活率达到了 71.7%,其

表 3 自然加倍(CK)田间存活及加倍效果调查

| 09 南区号 | 单倍体粒数 | 田间存活 | 自然加倍 | 加倍成功率/% |
|--------|-------|------|------|---------|
| 9001 | 20 | 17 | 2 | 11.8 |
| 9002 | 13 | 11 | 1 | 9.1 |
| 9003 | 14 | 12 | 1 | 8.3 |
| 9004 | 28 | 25 | 3 | 12.0 |
| 9005 | 47 | 40 | 3 | 7.5 |
| 9006 | 12 | 10 | 0 | 0 |
| 9007 | 27 | 26 | 2 | 7.7 |
| 9008 | 17 | 14 | 3 | 21.4 |
| 9009 | 24 | 18 | 1 | 5.6 |
| 9010 | 13 | 11 | 2 | 18.2 |
| 9011 | 15 | 13 | 3 | 23.1 |
| 9012 | 44 | 36 | 1 | 2.8 |
| 9013 | 25 | 20 | 2 | 10.0 |
| 9014 | 46 | 37 | 2 | 5.4 |
| 9015 | 18 | 15 | 1 | 6.7 |
| 9016 | 27 | 24 | 5 | 20.8 |
| 9017 | 19 | 15 | 1 | 6.7 |
| 9018 | 22 | 18 | 2 | 11.1 |
| 9019 | 42 | 38 | 4 | 10.5 |
| 9020 | 20 | 16 | 2 | 12.5 |
| 9021 | 13 | 9 | 1 | 11.1 |

表 4 秋水仙素 0.60% 处理的田间存活及加倍效果调查

| 09 南区号 | 单倍体粒数 | 田间存活 | 自然加倍 | 加倍成功率/% |
|--------|-------|------|------|---------|
| 9003 | 14 | 1 | 0 | 0 |
| 9006 | 12 | 1 | 0 | 0 |
| 9008 | 17 | 0 | 0 | 0 |
| 9010 | 13 | 1 | 1 | 100 |
| 9011 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| 9016 | 27 | 2 | 1 | 50 |
| 9017 | 19 | 0 | 0 | 0 |
| 9018 | 22 | 0 | 0 | 0 |
| 9020 | 20 | 1 | 0 | 0 |
| 9021 | 13 | 1 | 1 | 100 |

表 5 秋水仙素 0.10% 处理的田间存活及加倍效果调查

| 09 南区号 | 单倍体粒数 | 田间存活 | 自然加倍 | 加倍成功率/% |
|--------|-------|------|------|---------|
| 9003 | 14 | 6 | 2 | 33.3 |
| 9006 | 12 | 7 | 2 | 28.6 |
| 9008 | 17 | 9 | 1 | 11.1 |
| 9010 | 13 | 6 | 1 | 16.7 |
| 9011 | 15 | 9 | 1 | 11.1 |
| 9016 | 27 | 10 | 1 | 10.0 |
| 9017 | 19 | 9 | 1 | 11.1 |
| 9018 | 22 | 10 | 3 | 30.0 |
| 9020 | 20 | 8 | 1 | 12.5 |
| 9021 | 13 | 5 | 1 | 20.0 |

中群 9003 和 9018 的加倍率分别达到了 55.6% 和 43.8%;群 9006、9008、9021 的加倍率均大于 20%;而群 9017、9020 的加倍率在 10%~20%;群 9010、9011、9016 加倍率则不到 10%,10 个群体的平均加倍率为 21.9%。

表 6 秋水仙素 0.06%处理的田间存活及加倍效果调查

| 09 南区号 | 单倍体粒数 | 田间存活 | 自然加倍 | 加倍成功率/% |
|--------|-------|------|------|---------|
| 9003 | 12 | 9 | 5 | 55.6 |
| 9006 | 15 | 10 | 2 | 20.0 |
| 9008 | 17 | 13 | 3 | 23.1 |
| 9010 | 14 | 11 | 1 | 9.1 |
| 9011 | 15 | 12 | 1 | 8.3 |
| 9016 | 30 | 22 | 1 | 4.5 |
| 9017 | 21 | 16 | 2 | 12.5 |
| 9018 | 24 | 16 | 7 | 43.8 |
| 9020 | 19 | 12 | 2 | 16.7 |
| 9021 | 14 | 8 | 2 | 25.0 |

3 结论与讨论

3.1 玉米单倍体的自然加倍

玉米单倍体的育性自然恢复主要受母本基因型决定,其中单倍体雄穗能否释放出正常花粉粒变化范围在 2.8%~46.0%,这是限制单倍体技术在玉米育种中应用的主要因素^[4],该研究中的母本全部是来自美国的群体,其单倍体自然加倍率在 0~23.1%,平均 10.6%,基本上与前人研究结果类似。但因为自然加倍受母本基因型决定,因此要想使单倍体技术真正应用于玉米育种的过程中,通过人工化学处理来提高加倍率是十分必要的。

3.2 秋水仙素的浓度对于加倍效果的影响

人工加倍的方法主要以秋水仙素处理研究较多,加倍的效果视处理部位、处理时间和秋水仙素浓度而不同^[5],结果表明,就浸芽法来说,秋水仙素的浓度不应超过 0.1%,在浓度为 0.60%的情况下,采用浸芽法会产生严重的药害;在浓度为 0.10%的情况下,来自 10 个群体的单倍体植株加倍率均达到了 10%以上,田间存活率也达到了 45.9%;在浓度为 0.06%的情况下,田间存活率最高,达到了 71.7%,加倍率在 4.5%~55.6%,平均加倍率 21.9%。该结果与前人研究并不完全一致^[5-7],分析认为主要还是与所用材料不同有关,该试验采用的母本基因型均为引自美国的综合群体,在美国,单倍体技术已经应用了近 20 年的时间,每年通过单倍体的方法选育出大量的

DH 系^[8],该试验所引入的群体中存在通过单倍体技术选育出来的材料的几率很大,这样的材料对人工加倍处理的反应与国内材料可能不同。

另外,进一步研究处理部位、处理时间、秋水仙素浓度等不同处理方法及其最适合的组合搭配方式是十分必要的,目前的研究结果也不尽相同,主要是所采用的母本基因型各不相同,其对人工加倍处理的反应不同,因此,找到适合本单位试验材料的人工加倍方法是提高单倍体育种技术在玉米育种上应用的重要难点之一。

3.3 人工加倍处理与自然加倍的选择

一般的观点认为,如果用作母本基因型材料的自然加倍率可以达到 10%左右,则可以在应用单倍体技术的时候采用自然加倍的方法来获得 DH 系,但是如果自然加倍率很低,或者几乎不自然加倍则一定要对单倍体进行人工化学加倍处理,来提高其加倍率,确保获得 DH 系。因此,在选择母本基因型的时候,可以先通过一次预备试验了解其自然加倍的能力,对于那些自然加倍率很低或者根本不能自然加倍的材料,再进一步选择适合的人工化学加倍处理方法。

参考文献:

- [1] 梁文科,戚廷香,徐尚忠,等.单倍体技术在玉米育种中的应用和新进展[J].玉米科学,2004,12(3):13-15,18.
- [2] Zabirowa E, Shatskaya O, Shcherbak V. Line 613/2 as source of a high frequency of spontaneous diploidization in corn[J]. Maize Genet Coop News Lett, 1993, 67: 67.
- [3] 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.
- [4] 才卓,徐国良,CHANG Mingtang,等.玉米单倍体育种研究进展[J].玉米科学,2008,16(1):1-5.
- [5] 韩学莉,唐祈林,曹墨菊,等.用 Stock 6 杂交诱导的单倍体鉴定方法初探[J].玉米科学,2006,14(1):64-66.
- [6] 魏俊杰,李红梅,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.
- [7] 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.
- [8] 韩赞平,王彬,张泽民,等.玉米的单倍体育种[J].种子,2010,29(1):120-122.

Study on the Doubling Efficiency of Maize Haploid Induced by Stock 6

CAI Quan, ZHANG Jian-guo, ZHAO Wei, LI Shu-jun, YIN Yue

(Maize Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: The study on the inducing and doubling efficiency of 21 maize haploid from American population induced by Stock 6 were conducted. The result showed that the ratio of inducing by stock 6 of 21 American population was between 2.76% and 9.41%, the average was 5.26%; natural doubling-ratio of haploid was between 0 and 23.1%, the average was 10.6%; by immersing buds, when the colchicines was 0.60%, the drug injured was hard, and the col was 0.10%, the average of doubling-ratio was 18.4%, when the col was 0.06%, it was 21.9%.

Key words: maize (*Zea mays* L.); haploid; Stock 6; ratio of doubling