

## 高效生物诱导玉米单倍体及其加倍方法研究初报

文科<sup>1,2</sup> 黎亮<sup>3</sup> 刘玉强<sup>3</sup> 陈绍江<sup>1,2</sup>

(1. 中国农业大学 国家玉米改良中心, 北京 100094; 2. 北京市作物遗传改良重点实验室, 北京 100094;  
3. 作物杂种优势研究与利用教育部重点实验室, 北京 100094)

**摘要** 利用中国农业大学选育的高油型孤雌生殖单倍体诱导系(CAUHOI)对提高玉米单倍体诱导率和加倍率的方法进行了研究。单倍体诱导试验表明,花丝长短和授粉时间对单倍体诱导率有重要影响:延迟授粉(长花丝8 cm)的平均单倍体诱导率为3.86%,约为正常授粉(短花丝5 cm)条件下的1.5倍;伏后授粉的诱导率平均为4.70%,约为伏期授粉的2倍。证明延迟授粉时间和较低的温度有利于提高单倍体诱导率。秋水仙素加倍试验表明,浸根法和注射法对植株伤害较严重,存活率低于50%;浸种法(0.6 mg/mL)和注射法(0.4 mg/mL)的散粉率较高(48.35%,28.09%),相应的结实率也较高(14.29%,10.11%),说明浸种法处理效果最好,注射法次之。

**关键词** 玉米;单倍体诱导系;孤雌生殖;诱导率;加倍率

中图分类号 S311;S513

文章编号 1007-4333(2006)05-0017-04

文献标识码 A

### Study on bio-haploid inducing and doubling efficiency in maize

Wen Ke<sup>1,2</sup>, Li Liang<sup>3</sup>, Liu Yuqiang<sup>3</sup>, Chen Shaojiang<sup>1,2</sup>

(1. National Maize Improvement Center of China, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Beijing 100094, China;

3. Key Laboratory of Crop Heterosis and Utilization, Ministry of Education, Beijing 100094, China)

**Abstract** A high oil haploid inducer named CAUHOI released by China Agricultural University was used in the study of haploid inducing and doubling. Results indicated that the haploid inducing rate was significantly influenced by the silk length and pollination date. The haploid inducing rate of longer silk (8 cm) pollination was 3.86% on average, almost 1.5 times higher than that of shorter silk (5 cm) pollination; haploid inducing rate of late summer pollination was 4.70% on average, almost two times higher than that of mid summer pollination. These results showed that late pollination and low temperature would increase haploid inducing frequency. Of the four haploid colchicine doubling treatments (immersing shoots, seedling roots, seeds and microinjecting growing point), the plant survival rates of immersing seedling roots and microinjecting growing point were lower than 50%. Doubling frequencies of immersing seed at 0.6 mg/mL concentration and microinjecting growing point at 0.4 mg/mL concentration performed better, with the rate of fertile plants at 48% and 28% and the seed rate of plants at 14% and 10% respectively. These results showed that immersing seed and microinjecting growing point would be better options for chromosome doubling.

**Key words** maize; haploid inducing line; parthenogenesis; inducing rate; doubling rate

利用玉米孤雌生殖诱导系诱导单倍体是一种新的快速育种方法,各国育种家正在进行深入研究。国外种子公司也在尝试利用单倍体诱导系进行大规模玉米自交系选育,以加快育种速度,缩短新杂交种选育周期。Stock6<sup>[1]</sup>是玉米中发现的第1个孤雌生

殖诱导系,利用其所选育的诱导系有WS14<sup>[2]</sup>、MHI<sup>[3]</sup>等。由于Stock6诱导系本身存在缺陷,而且其改良成功的高频诱导系也多被保护,因此大大限制了该技术在我国的玉米育种中的应用。中国农业大学利用高油材料改造Stock6选育出了世界上第1

收稿日期:2006-03-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170564;30370884);十五国家科技攻关项目(2004BA525B04-2)

作者简介:文科,硕士研究生;陈绍江,博士,教授,通讯作者,主要从事特用玉米遗传与分子育种研究,

E-mail:shaoj@cau.edu.cn

个高油型单倍体诱导系 CAUHOI<sup>[4]</sup>。该系具有遗传标记明显、花粉量大和油分具有花粉直感等特点<sup>[5]</sup>。通过改良玉米孤雌生殖诱导系而提高单倍体诱导率已有相关的研究报道<sup>[2-3]</sup>,但在优化诱导的环境条件方面,国内外报道较少。为更好地发挥 CAUHOI 在育种上的应用价值和潜力,本试验对提高其诱导单倍体频率以及单倍体加倍的方法进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 单倍体诱导

用高抗青枯病自交系 1145 和高感青枯病自交系 Y331 的杂交一代作为母本,本实验室选育的 5 个高油单倍体诱导株系作为父本,于 2001 年在中国农业大学科学园杂交诱导单倍体。试验设置花丝长短和授粉时期 2 个因素。花丝长短设 2 个处理:在长花丝(8 cm)和短花丝(5 cm)条件下用诱导系花粉授粉;授粉时期设 2 个处理:伏期(07-15—08-01)和伏后(08-15—09-01)授粉。用于研究的母本材料分别于 5 月中旬和 6 月上旬播种。

### 1.2 单倍体鉴别和数据统计

利用胚和胚乳的颜色标记进行单倍体鉴别。胚乳无色或者胚呈紫色的籽粒都不是单倍体,胚乳为紫色而胚为无色时则可能是单倍体;再通过植株性状进行进一步鉴定,单倍体植株表现比较弱小,而二倍体植株表现正常。考察性状有每株杂交后代籽粒数、每株单倍体数、单倍体诱导率等。数据统计采用

DNPS 软件,用 *t* 测验进行显著性分析。

### 1.3 单倍体加倍

单倍体加倍所用试剂为秋水仙素,采取 4 种处理方法,每种方法分 3 个质量浓度梯度(0.2、0.4 和 0.6 mg/mL)。种子浸泡法是先把种子清水浸泡 12 h,然后用秋水仙素溶液浸泡 24 h,再用清水浸泡 6 h 后播种;浸根法和浸芽法是当萌发的芽长到 5~7 cm 时,用秋水仙素溶液浸泡根或芽 18 h,再用清水浸泡 6 h 后移栽;苗期注射法是在 6~7 叶期时用秋水仙素溶液在田间注射于茎秆盾片节处的顶端生长点。处理之后田间观察成活率、散粉率、结实率和药害情况。以单倍体植株是否散粉和结实来判断玉米单倍体植株是否加倍成功。为防外来花粉授粉结实,试验选取单倍体自交后代结实较好的果穗于 2002 年冬和 2003 年春分别在海南和北京种植观察,以进一步鉴别其加倍情况。

## 2 结果分析

### 2.1 不同花丝长度的玉米孤雌生殖诱导频率

比较不同单倍体诱导株系可以看出,长花丝处理每株单倍体数均高于短花丝处理,其中株系 2 差值最大达 4.80 个;长花丝处理每株单倍体数平均值为 7.92 个,比短花丝处理平均值多 3.48 个。各株系中长花丝处理单倍体诱导率均高于短花丝处理(表 1)。除株系 1 外,其余各株系长花丝和短花丝处理间单倍体诱导率差异达到显著水平,表明长花丝条件下授粉可以提高诱导率。

表 1 不同花丝长度授粉单倍体诱导频率

Table 1 Haploid inducing rate at different silk length pollination

株系	短花丝(5 cm)					长花丝(8 cm)					诱导率 差异/ %
	株数	总粒数	单倍体数	株单倍体数	诱导率/ %	株数	总粒数	单倍体数	株单倍体数	诱导率/ %	
1	11	2 234	44	4.00	1.97	9	1 929	48	5.33	2.49	0.52
2	10	2 102	42	4.20	2.00	10	2 124	90	9.00	4.24	2.24**
3	10	1 978	51	5.10	2.58	11	2 199	84	7.64	3.82	1.24*
4	10	2 017	41	4.10	2.03	11	2 221	97	8.82	4.37	2.33**
5	10	1 827	48	4.80	2.63	10	1 999	85	8.50	4.25	1.62**
平均				4.44	2.24				7.92	3.86	1.62**

注: \*为 2 处理间差异显著( $P < 0.05$ ), \*\*为 2 处理间差异极显著( $P < 0.01$ );下同。

### 2.2 不同授粉时期的玉米孤雌生殖诱导频率

由表 2 分析可知,伏期处理和伏后处理间每株

单倍体数和单倍体诱导率差异都极显著。各个株系伏后处理比伏期处理每株单倍体数高,其中伏后处

表 2 不同授粉时期单倍体诱导频率

Table 2 Haploid inducing rate at different pollinating dates

株系	伏期处理 (07-15 —08-01)					伏后处理 (08-15 —09-01)					诱导率 差异/ %
	株数	总粒数	单倍体数	株单倍体数	诱导率/ %	株数	总粒数	单倍体数	株单倍体数	诱导率/ %	
1	11	2 028	55	5.00	2.71	8	1 750	85	10.63	4.86	2.15**
2	10	1 983	55	5.50	2.77	9	1 737	85	9.44	4.89	2.12**
3	10	2 083	37	3.70	1.78	10	1 854	73	7.30	3.94	2.16**
4	10	1 960	44	4.40	2.24	10	1 930	98	9.80	5.08	2.83**
5	10	2 081	48	4.80	2.31	9	1 808	86	9.56	4.76	2.45**
平均				4.69	2.36				9.28	4.70	2.34**

理每株单倍体数最高达 10.63 个,平均为 9.28 个,约为伏期授粉平均值的 2 倍。由此可见,相对于花丝长短,授粉时期对诱导率的影响更大。

2.3 不同加倍方法对单倍体植株成活率的影响

表 3 结果显示,每种处理方法随着秋水仙素含

量的增加,单倍体植株的成活率都逐步降低。浸芽法的适宜质量浓度为 0.2 mg/ mL,注射法的适宜质量浓度为 0.4 mg/ mL。在每种质量浓度下浸根法和注射法的受害程度都比浸芽法严重。浸根法在 3 种质量浓度下存活率分别仅为 38.6 %、38.6 %和 24.7 %。

表 3 不同处理方法的单倍体植株的成活情况

Table 3 Survival rate of haploid plants at different colchicine concentrations

(秋水仙素)/ (mg/ mL)	浸芽法			浸根法			注射法		
	成活株数	总株数	成活率/ %	成活株数	总株数	成活率/ %	成活株数	总株数	成活率/ %
0.2	76	102	74.51	32	83	38.55	34	83	40.96
0.4	54	92	58.70	34	88	38.64	38	89	42.70
0.6	43	90	47.78	21	85	24.71	20	78	25.64

注:由于浸种后直接播种,故没有统计浸种法的成活率。

2.4 不同加倍方法对单倍体植株散粉和结实的影响

在 4 种加倍方法中,浸种法的效果最好,散粉率均超过 10 %,在秋水仙素含量为 0.6 mg/ mL 时散粉率达到 48.35 %;结实率也最高,为 14.29 %。注

射法在 0.4 mg/ mL 下散粉率为 28.09 %,结实率为 10.11 %;而浸苗法和浸根法的散粉率都低于 10 %,在秋水仙素含量为 0.4 和 0.6 mg/ mL 下结实率都为 0(表 4、5)。由此可以看出,在散粉性和结实率方面,浸种法和注射法相对较好。

表 4 不同加倍方法单倍体植株的散粉情况

Table 4 Fertility rate of haploid plants at different colchicine concentrations

(秋水仙素)/ (mg/ mL)	浸种法			浸芽法			浸根法			注射法		
	散粉 株数	总株 数	散粉 率/ %									
0.2	9	81	11.11	2	102	1.96	6	83	7.23	15	83	18.07
0.4	11	79	13.92	9	92	9.78	2	88	2.27	25	89	28.09
0.6	44	91	48.35	3	90	3.33	2	85	2.35	6	78	7.69

表5 不同加倍单倍体植株的结实情况

Table 5 Setting rate of haploids at different colchicine concentrations

(秋水仙素)/ (mg/mL)	浸种法			浸芽法			浸根法			注射法		
	结实 株数	处理 株数	结实 率/ %									
0.2	3	81	3.70	2	102	1.96	1	83	1.20	2	83	2.41
0.4	5	79	6.33	0	92	0.00	0	88	0.00	9	89	10.11
0.6	13	91	14.29	0	90	0.00	0	85	0.00	3	78	3.85

### 3 讨论

1) 由于花粉中2个精细胞形成雄性生殖单位是保证2精核同步转运的重要条件<sup>[6]</sup>,所以花丝长度对诱导单倍体频率的影响可能是由于较长的花丝增加了2精核在花粉管中运输的不同步性所致。刘志增<sup>[7]</sup>报道精核间距在诱导单倍体过程中起重要作用。花丝长时,从花粉粒萌发后花粉管到达胚囊距离延长,可能造成2个精核的间距加大,从而更容易诱导形成单倍体。授粉时期对单倍体诱导率的影响可能同气温有密切关系,花丝在温度较低时接受花粉的时间延长,这样也增加了单受精的机会。另外,试验还发现,海南冬繁单倍体诱导频率明显高于北京,这也进一步证明较低温度可能有利于单倍体诱导。花丝长短和授粉时期也可能影响了精卵结合的过程,随着花丝的增长,极核和卵核接受精核的能力可能减弱,极核与精核结合的能力相对较强,由此导致胚乳正常发育,而雌配子由于没有受精而发育为单倍体。温度较低时对受精过程也可能有类似影响。从花丝不同时期接受花粉的能力来看,雌穗在吐丝后3~4d内抽出的花丝活力较强<sup>[8]</sup>,6~9d后活力开始下降<sup>[9]</sup>。本试验结果表明,长花丝比短花丝条件下授粉诱导率高,但是在长花丝的条件下,诱导率还存在一定差异。考虑到本研究母本基因型较少,有关温度、花丝活力和母本基因型等因素对诱导性能的影响仍需进一步研究。

2) 本试验的秋水仙素处理结果表明:浸种法(0.6 mg/mL)和注射法(0.4 mg/mL)的效果较好,散粉率和结实率相对较高。本研究所得适宜秋水仙素含量与国外幼芽加倍法采用的含量类似<sup>[10]</sup>,关于秋水仙素的加倍机理有待于进一步研究;但是,由于秋水仙素对人体毒性很大,而且易对植物造成死苗、畸形等伤害,因此寻找其他替代品是今后染色体加倍研究的重点。据报道,APM(amiprophos-methyl)<sup>[11~13]</sup>、拿草特(pronamide)<sup>[12~13]</sup>、安磺灵

(oryzalin)<sup>[13]</sup>、氟乐灵(trifluralin)<sup>[11,13]</sup>和N<sub>2</sub>O<sup>[14]</sup>具有加倍功能,有望成为新的细胞分裂抑制剂替代品。

### 参 考 文 献

- [1] Coe E H. A line of maize with high haploid frequency [J]. *Am Nat*, 1959, 93: 381-382
- [2] Lashermes P, Beckert M. Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines [J]. *Theor Appl Genet*, 1988, 76(3): 405-410
- [3] Chalyk S T. Creating new haploid-inducing lines of maize [J]. *Maize Genet Coop Newslett*, 1999, 73: 53-54
- [4] 刘志增, 宋同明. 玉米高频率孤雌生殖单倍体诱导系的选育与鉴定 [J]. *作物学报*, 2000, 26(5): 570-574
- [5] 陈绍江, 宋同明. 利用高油分的花粉直感效应鉴别玉米单倍体 [J]. *作物学报*, 2003, 29(4): 587-590
- [6] 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
- [7] 刘志增, 宋同明. 玉米孤雌生殖单倍体的诱导与父本花粉在离体萌发花粉管中精核间距的相关性分析 [J]. *西北植物学报*, 2000, 20(4): 495-502
- [8] 胡寅华, 郑卓琳. 玉米子粒类型及与成粒的关系 [J]. *河北农业大学学报*, 1991, 14(3): 11-15
- [9] 汪茂华. 玉米花粉、柱头生活力及其开花生物学的观察 [J]. *农业学报*, 1959, 10(2): 121-128
- [10] Eder J, Chalyk S. In vivo haploid induction in maize [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 703-708
- [11] Stadler J, Phillips R, Leonard M. Mitotic blocking agents for suspension cultures of maize 'Black Mexican Sweet' cell lines [J]. *Genome*, 1989, 32(3): 475-478
- [12] 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
- [13] Wan Y, Duncan D R, Rayburn A L, et al. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus [J]. *Theor Appl Genet*, 1991, 81(2): 205-211
- [14] Kato A. Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) is effective in chromosome doubling of maize seedlings. [J] *Maize Genet Coop Newslett*, 1997, 71: 36-37