

不同生态条件下玉米单倍体自然加倍率及除草剂加倍效果

程 江, 郑常祥, 潘敏娜, 陈柔屹*

(贵州省旱粮研究所, 贵阳 550006)

摘 要: 单倍体加倍率低成为玉米单倍体育种的限制性因素。为了提高玉米单倍体的加倍率, 研究两种生态条件下单倍体的自然加倍率, 比较甲基胺草磷 (APM) 和氟乐灵两种除草剂在不同浓度和处理方法下玉米单倍体的加倍效率。结果表明, 海南试验点的单倍体自然加倍率要高于贵州贵阳试点。应用除草剂可以明显提高雅玉 889 和京糯 208 单倍体的加倍率, 基础材料基因型对自然加倍率和除草剂加倍率都具有显著影响。APM 和氟乐灵均是在浓度为 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理单倍体加倍率最高, APM 处理的单倍体加倍率要高于氟乐灵, 采用滴心法和浸种法处理的单倍体加倍率无明显差异。综上, 如采用自然加倍, 应在海南试验点种植单倍体; 如采用除草剂加倍, 应使用浓度为 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 APM, 采用滴心法或浸种法对雅玉 889 和京糯 208 单倍体加倍。

关键词: 玉米; 单倍体; 自然加倍; 除草剂

中图分类号: S513

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)01-0114-05

Effects of the ecological condition and herbicide on chromosome doubling of haploid maize

CHENG Jiang, ZHENG Changxiang, PAN Minna, CHEN Rouyi

(Guizhou Institute of Upland Food Crops, Guiyang 550006)

Abstract: A low chromosome doubling rate of haploids becomes the limiting factor in maize haploid breeding at present. The purpose of this experiment was to improve the doubling rate of maize haploid in two ecological systems and through the herbicide application. Two herbicides, amiprofos-methyl (APM) and trifluralin at different concentrations with different methods were tested. The 2-year experimental result showed that the natural doubling rate of maize haploids grown in Jiusuo, Hainan Province was much higher than that in Guiyang, Guizhou Province. The doubling rates of haploid Yayu889 and Jingnuo208 were significantly improved with the application of herbicides. The doubling rate was also significantly affected by the haploid genotype. The doubling rate was the highest when APM and trifluralin at $80 \mu\text{mol/L}$ were applied with the rate of APM treatment being higher than that of trifluralin treatment at the same concentration. There is no obvious difference in the doubling rate between the soaking seed method and the dripping interior leaf whorls from the 3-leaf stage method with the same herbicide. If the natural doubling method was adopted, the haploid of maize should be planted in Jiusuo, Hainan; if herbicide application was adopted, APM at $80 \mu\text{mol/L}$ should be chosen using the method of dripping interior leaf whorls or seed-soaking for doubling Yayu889 and Jingnuo208 haploids.

Key words: maize; haploid; natural doubling; herbicide

玉米单倍体育种技术能显著加快育种进程, 在许多科学家的努力下, 单倍体诱导系的诱导率有了大幅提升, 现阶段玉米单倍体育种要实现突破的关键就是要解决单倍体高效加倍问题^[1]。目前, 单倍体的加倍方法主要是自然加倍法和化学加倍法, 而

化学加倍法又以秋水仙素为主。玉米单倍体的育性自然恢复能力主要受母本基因型影响和环境影响, 单倍体自然加倍率受基因型影响较大, 有的介于 $0.4\% \sim 1.2\%$ 之间^[2], 有的介于 $1.07\% \sim 9.37\%$ 之间^[3], 有的甚至高达 10% 以上, 接近化学加倍的育性恢复

收稿日期: 2016-07-08

基金项目: 贵州省农业科学院研究生创新基金项目 [黔农科合 (创新基金) 09010 号] 资助。

作者简介: 程 江, 硕士研究生。E-mail: 121358173@qq.com

* 通信作者: 陈柔屹, 博士, 副研究员。E-mail: fmcry@qq.com

水平^[3]。

研究表明, 生态环境对单倍体的自然加倍率也有显著影响, 在三亚的自然加倍率和秋水仙素加倍率显著高于长春和长岭^[4]。甘肃春季播种玉米单倍体加倍率最高, 其次为海南冬季种植, 北京春播种加倍率最低^[5]。王志永等研究表明海南的自然加倍率和化学加倍率要显著高于北京^[6]。众多研究表明海南的单倍体加倍率最高。

秋水仙素是目前玉米上常用的高效化学加倍试剂, 许多研究者用秋水仙素都成功提高了单倍体加倍效率^[7-10]。尽管秋水仙素加倍效率较高, 但其为剧毒物质, 对环境造成较大污染, 对试验者也有较大损害, 且易产生畸形苗等缺点^[1], 因此, 寻找安全有效的单倍体化学加倍药剂是单倍体育种的技术关键之一。秋水仙素加倍的主要原理是抑制细胞分裂, 而甲基胺草磷(Amiprophos-methyl)、拿草特(Pronamide)、安磺灵(Oryzalin)、氟乐灵(Trifluralin)是常用的几种细胞分裂抑制剂。王贺等研究表明戊炔草胺和甲基胺草磷可以替代秋水仙素用于单倍体加倍^[11]。慈佳宾等用 2 种抗微管除草剂氟乐灵、拿草特和秋水仙素通过浸种法处理玉米单倍体, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟乐灵处理种子 20 h 加倍效果最好(35.7%), 显著优于秋水仙素的加倍率^[12]。惠国强等研究了甲基胺草磷、炔苯酰草胺和氟乐灵作为加倍药剂时单倍体的加倍率, 其中 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基胺草磷加倍效果最佳^[13]。陈宝健等研究表明甲基胺草磷处理幼胚可以显著提高单倍体加倍效率^[14]。可见, 甲基胺草磷和氟乐灵处理单倍体时加倍效果最好。有多种方法可用来加倍, 浸种法、浸芽法、浸根法、注射法和滴心法等, 从生产实际出发, 本研究采用易于实施的 2 种处理方法, 浸种法和滴心法来加倍玉米单倍体。

因此, 本研究在贵阳和海南两地试验点测定不同基因型单倍体的自然加倍率, 在贵阳试验点测定不同除草剂和处理方法的单倍体加倍率, 为单倍体育种提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

单倍体种子有 4 个材料, 分别为京糯 208, 黔糯 768、雅玉 889 和五谷 1790 单倍体, 前一季用农大高诱 1 号诱导获得。每种单倍体种子分成 3 组, 每组约 1000 粒, 分别用于自然加倍、浸种法加倍, 和滴心法加倍。用于自然加倍的 2 个试验点分别位于贵州省贵阳市小河区贵州省农业科学院内试验地

(贵阳试验点) 和海南试验点的乐东县九所镇九所新区的贵州省南繁基地试验地(海南试验点)。除草剂加倍试验在贵阳试验点进行。除草剂有 2 种, 分别为甲基胺草磷和氟乐灵, 均来源于西格玛奥德里奇公司。

1.2 单倍体鉴定

包括籽粒 Navajo 标记鉴定、田间苗期鉴定、6 叶期鉴定。单倍体种子为紫顶白胚, 二倍体为紫顶紫胚; 单倍体苗期叶鞘为绿色, 二倍体为紫色; 单倍体叶片较少、狭窄、直立、植株瘦弱且生长缓慢、株高、穗位都明显低于二倍体。

1.3 单倍体加倍

自然加倍: 在田间自然生长条件下, 当雄穗散粉时授粉自交, 有花粉但花药不开裂时人工破坏花药, 让花粉散出授粉自交。

除草剂加倍: 将甲基胺草磷、氟乐灵原液制成浓度为 20、40、80 和 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液待用。以雅玉 889 和京糯 208 单倍体为处理对象。浸种法: 处理前用清水浸泡种子 6 h, 再浸入药剂中室温密闭浸泡处理 20 h, 之后用流水冲洗 2 h, 以清水浸泡 6 h 的单倍体种子为对照。滴心法: 选择长势一致的单倍体幼苗, 待其生长到三叶期时, 分别将不同类型和浓度除草剂滴至单倍体植株的心叶处, 每株约 1 mL, 以同期播种的未处理的单倍体为对照。当雄穗散粉时授粉自交, 有花粉但花药不开裂时人工辅助散粉后授粉自交。

1.4 统计分析

计算单倍体的自然加倍率和除草剂加倍率。加倍率计算公式如下: 加倍率= (结实单倍体植株数/存活单倍体总株数) $\times 100\%$ 。采用 DPS_{v7.05} 统计软件处理试验数据。

2 结果与分析

2.1 单倍体自然加倍率分析

通过调查真单倍体株数和最后收获 DH 植株数来统计加倍情况, 两年的自然加倍率试验结果(表 1)表明: 海南试验点的自然加倍率要明显高于贵阳试验点。雅玉 889 单倍体海南试验点加倍率为 2.9%, 贵阳试验点加倍率仅为 0.4%; 京糯 208 单倍体海南试验点加倍率为 1.3%, 贵阳试验点仅为 0.2%; 黔糯 768 单倍体在贵阳试验点未成功加倍, 在海南试验点加倍率为 0.4%, 五谷 1790 在海南和贵阳试验点均未能加倍。不同地点加倍率差异明显的原因可能是因为贵阳试验点春播时节昼夜温差较小, 不利于雄穗加倍^[15], 同时也发现, 有少量单倍体植株雄

穗散粉,但是花期不遇也影响了单倍体加倍率。

2.2 不同基础材料的自然加倍率

由表1可知,4个单倍体材料2年的自然加倍率以雅玉889(1.65%)最高,京糯208(0.75%)较高,黔糯708次之(0.20%),五谷1790在贵阳

试验点和海南试验点均未能加倍,说明基础材料对单倍体自然加倍率有重要影响。几个基础材料的加倍率在海南试验点和贵阳试验点排名相同,说明了玉米单倍体的母本基因型是影响其育性恢复及结实率的最主要因素,这与前人研究结果一致^[16]。

表1 不同地点的自然加倍率

Table 1 Natural doubling rate for combinations in different location

组合 Combination	2014		2015		贵阳平均 Average in Guiyang	海南平均 Average in Hainan	平均 Average
	贵阳 Guiyang	海南 Hainan	贵阳 Guiyang	海南 Hainan			
雅玉889	0.4 ^B	2.6 ^A	0.4 ^B	3.2 ^A	0.4	2.9	1.65 ^a
京糯208	0.2 ^B	1.6 ^A	0.2 ^B	1.0 ^A	0.2	1.3	0.75 ^{ab}
黔糯768	0	0.4	0	0.4	0	0.4	0.20 ^b
五谷1790	0	0	0	0	0	0	0.00 ^b

注:大写字母表示差异极显著($P<0.01$, LSD法);小写字母表示差异显著($P<0.05$, LSD法)。下同。

Note: The capital letter and small letter mean the different significance at 0.01 and 0.05 levels, respectively. The same below.

表2 除草剂处理单倍体种子的加倍率

Table 2 The doubling rate of haploids treated by herbicide

单倍体 Haploid	除草剂 Herbicide	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration	浸种法加倍率/% Doubling rate by soaking seeds	滴心法加倍率/% Doubling rate by dropping interior	平均值/% Mean
雅玉889 Yayu889	甲基胺草磷 APM	0	0.4 ^D	0.4 ^D	0.4
		40	14.5 ^B	12.8 ^B	13.65
		80	22.4 ^A	24.0 ^A	23.2
		160	8.8 ^C	5.4 ^C	7.1
	氟乐灵 Trifluralin	0	0.4 ^D	0.4 ^D	0.4
		40	8.6 ^B	6.8 ^B	7.7
		80	16.6 ^A	18.4 ^A	17.5
		160	4.2 ^C	3.2 ^C	3.7
京糯208 Jingnuo208	甲基胺草磷 APM	0	0.2 ^D	0.2 ^D	0.2
		40	15.2 ^B	17.4 ^B	16.3
		80	28.6 ^A	30.2 ^A	29.4
		160	5.4 ^C	4.2 ^C	4.8
	氟乐灵 Trifluralin	0	0.2 ^C	0.2 ^D	0.2
		40	6.4 ^B	8.2 ^B	7.3
		80	16.6 ^A	15.2 ^A	15.9
		160	4.2 ^B	3.0 ^C	3.6

表3 $80\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下的不同除草剂处理单倍体种子的加倍率

Table 3 The doubling rate of haploids treated by different herbicides at the concentration of $80\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

单倍体 Haploid	除草剂 Herbicide	浸种法加倍率/% Doubling rate by soaking seeds	滴心法加倍率/% Doubling rate by dropping interior	平均值/% Mean
雅玉889	甲基胺草磷 APM	22.4 ^A	24.0 ^A	23.2
Yayu889	氟乐灵 Trifluralin	16.6 ^B	18.4 ^B	17.5
京糯208	甲基胺草磷 APM	28.6 ^A	30.2 ^A	29.4
Jingnuo208	氟乐灵 Trifluralin	16.6 ^B	15.2 ^B	15.9

2.3 单倍体除草剂加倍率分析

从表2可知,经除草剂处理的单倍体加倍率要极显著高于未处理的。对于不同的除草剂浓度,甲

基胺草磷(APM)和氟乐灵均是以 $80\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的加倍率最高,浓度 $40\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 次之,浓度 $160\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 最低。同一种除草剂,在40和 $80\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,

浸种法和滴心法的加倍率无明显差异,但在 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,浸种法比滴心法的加倍率更高。可能原因是高浓度的除草剂毒性更高,对幼苗造成的损伤较种子更大。在 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,APM

处理的单倍体加倍率要极显著高于氟乐灵处理的(表 3),说明了 APM 更适宜于雅玉 889 和京糯 208 单倍体加倍。

表 4 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ APM 处理不同基础材料单倍体种子的加倍率增加倍数
Table 4 The increasing fold of doubling rate of different haploids treated 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ APM

单倍体 Haploids	浸种法加倍率增加倍数 Increasing fold of doubling rate with soaking seeds method	滴心法加倍率增加倍数 Increasing fold of doubling rate with dropping interior method	平均值 Mean
雅玉 889 Yayu889	56 ^B	60 ^B	58 ^B
京糯 208 Jingnuo208	143 ^A	151 ^A	147 ^A

2.4 不同基础材料的除草剂加倍率

不同的基础材料对单倍体的除草剂加倍率有显著影响,用 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 APM 处理单倍体种子,京糯 208 单倍体加倍率平均增加了 147 倍,而雅玉 889 的加倍率增加了 58 倍(表 4)。说明基础材料对除草剂的加倍率有重要影响,用除草剂处理时,京糯 208 比雅玉 889 更为敏感。

3 讨论

3.1 基因型对单倍体加倍率的影响

在相同自然条件下,单倍体自然加倍率在 0.66%~4.6%之间^[4]。单倍体雌穗育性恢复较好,自然恢复率可达 90.52%^[17],影响单倍体加倍率的限制性因素是雄穗育性^[17],其差异是受核基因控制的,并且呈加性遗传^[18],基因型不同育性也不同。用相同浓度的秋水仙素处理不同母本基因型的单倍体,加倍率同样差异显著^[19-21],用甲基胺草磷处理不同基因型单倍体,加倍率在 14.99%~25.01%之间^[13]。本研究不同基因型的自然加倍率在 0~3.2%之间,除草剂处理单倍体的加倍率在 3.0%~30.2%之间,其中,未成功加倍的单株中有少部分属于是雌雄不协调,雌雄不调的比例在不同单倍体基因型间是有差异的,这需要进一步深入研究。也有研究认为母本基因型所产生的雌配子中有害基因的频率不同引起加倍率不同^[22],因此,在以后的工作中,要注重研究母本基因型对加倍率的影响。

3.2 生态区对单倍体自然加倍率的影响

研究表明,生态类型对玉米单倍体加倍率具有显著影响,大多数研究者认为海南试验点的自然加倍率要高于其他地区^[4-6],本研究结果与前人研究一致。贵阳玉米生长季节春季气温低,生长慢,昼夜温差相对较小;而海南九所属于海洋性气候,白天炎热,夜晚凉爽,昼夜温差较大,这种气候可能更

有利于单倍体加倍,这可能是九所加倍率高的原因,这与姜龙等^[4]的研究结果类似。

3.3 除草剂在单倍体育种中的应用

单倍体的自然加倍率太低,要想大规模应用必须要进行加倍,而常用的加倍试剂秋水仙素毒性强,伤害单倍体苗、人和环境^[1],一些除草剂可以有效干扰细胞有丝分裂,具有与秋水仙素相同的加倍功能,除草剂氟乐灵的加倍效果甚至比秋水仙素还好^[12],甲基胺草磷的加倍效果与秋水仙素基本相同,可以替代秋水仙素加倍玉米单倍体^[11]。本研究在前人研究的基础上,比较了甲基胺草磷和氟乐灵 2 种除草剂分别用滴心法和浸种法处理玉米单倍体的加倍效果,结果表明 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甲基胺草磷的加倍效果更好,在贵阳试验点最高可达到 30%的加倍率,这与慈佳宾等^[23]、惠国强等^[13]和王贺等^[11]的研究一致,而张良君等研究表明 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 APM 滴心法处理单倍体加倍率最好^[24],这可能是因试剂的品牌、纯度和材料的遗传背景等因素有关。陈宝建等用 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 APM 处理单倍体幼胚 72 h,成株散粉率最高,达到 37%^[14],其 APM 处理浓度远低于本研究的 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,原因可能是幼胚对 APM 的耐受性要远低于种子和幼苗。

4 结论

采用自然加倍法,可在海南试验点种植单倍体以利于加倍;如采用除草剂加倍,应使用浓度为 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甲基胺草磷,采用滴心法或浸种法对雅玉 889 和京糯 208 单倍体加倍。

参考文献:

- [1] 黎亮,李浩川,徐小炜,等. 玉米孤雌生殖单倍体加倍技术研究进展[J]. 玉米科学, 2010, 18(1): 12-14.
- [2] CHALYK S T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding[J].

- Euphytica, 1994, 79(1): 13-18.
- [3] 周联东, 孙佩, 王文洁, 等. 玉米单倍体诱导系 EMK-1 诱导率的测定和单倍体自然加倍技术研究[J]. 河南农业科学, 2015, 44(9): 19-21.
- [4] 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]. 吉林农业大学学报, 2014, 36(2): 139-143.
- [5] 段民孝, 赵久然, 刘新香, 等. 不同种植地点对玉米单倍体自然加倍率的影响[J]. 作物杂志, 2012(2): 68-70.
- [6] 王志永, 郑淑云, 吴金鑫, 等. 玉米单倍体自然加倍与化学加倍研究[J]. 玉米科学, 2015, 23(6): 18-20; 26.
- [7] 姜龙, 慈佳宾, 南楠, 等. 秋水仙素针刺生长点法加倍处理 3 叶期玉米单倍体的初报[J]. 种子, 2014, 33(12): 27-29.
- [8] 段民孝, 刘新香, 赵久然, 等. 秋水仙素浸芽法处理玉米单倍体的加倍效果研究[J]. 种子, 2013, 32(2): 19-23.
- [9] 蔡泉, 张建国, 赵伟, 等. Stock6 杂交诱导的玉米单倍体加倍效果研究[J]. 黑龙江农业科学, 2011(11): 1-3.
- [10] 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效果研究[J]. 玉米科学, 2007, 15(4): 49-51.
- [11] 王贺, 李继竹, 张继伟, 等. 秋水仙素和除草剂浸芽加倍玉米单倍体效率的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2013, 35(4): 384-388.
- [12] 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.
- [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.
- [14] 陈宝建, 刘丽威, 徐丽, 等. 玉米单倍体幼胚加倍效果观察[J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(5): 10-16.
- [15] 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.
- [16] 慈佳宾, 杨巍, 崔学宇, 等. 玉米单倍体育性的自然恢复和染色体化学加倍效果研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(5): 107-113.
- [17] 魏俊杰, 陈梅香. 玉米单倍体育性自然恢复的初步研究[J]. 玉米科学, 2006, 14(2): 24-26.
- [18] SHATSKAYA O A, ZABIROVA E R, SHCHERBAK V S. Autodiploid lines as sources of haploid spontaneous diploidization in corn[J]. Maize Genet Coop Newslett, 1994, 68: 51-52.
- [19] 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效果研究[J]. 玉米科学, 2007, 15(4): 49-51.
- [20] 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.
- [21] 李光发, 李忠南, 王越人, 等. 玉米单倍体成株诱导率和加倍率研究[J]. 玉米科学, 2014, 22(4): 26-32.
- [22] CHASE S S. Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.) [J]. Bot Rev, 1969, 35(2): 117-168.
- [23] 慈佳宾, 杨巍, 任雪娇, 等. 玉米单倍体诱导及化学加倍方法的研究[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(3): 49-53.
- [24] 张良君, 赵延明, 张海艳, 等. 甲基胺草磷加倍玉米单倍体效果的初步研究[J]. 山东农业科学, 2013, 45(10): 29-31.