#### DOI: 10.13597/j.cnki.maize.science.20150605

# 基于基因组重测序信息构建玉米 第5染色体的片段代换系

林 峰,葛 敏,宝华宾,赵 涵

(江苏省农业科学院农业生物技术研究所/江苏省农业生物学重点实验室,江苏 南京 210014)

摘 要:利用玉米自交系齐319与郑58杂交衍生的重组自交系群体,通过筛选剩余杂合体(RHL)以达到快速构 建CSSLs的目的。在接近纯合的重组自交系群体中,结合基因组重测序信息扫描玉米第5染色体上的InDel位点, 定点开发分子标记,筛选剩余杂合体进行自交快速获得了多个位点的染色体片段代换系。在玉米5号染色体的 19 130 718 bp~214 379 898 bp区间内,共获得41个染色体片段代换系。两个染色体片段代换系位点间的间距为 0.2~26.4 Mb,平均为2.5 Mb。其中8个染色体片段代换系群体中只含有1个多态位点,为单片段代换系。本研究所 建立的CSSLs可为玉米第5染色体上QTL的精细定位及功能分析提供支撑,并为玉米育种提供中间材料。

关键词: 玉米;第5染色体;染色体片段代换系;基因组重测序
 中图分类号: S513.035
 文献标识码: A

# Chromosome Segment Substitution Lines Construction on Maize Chromosome 5 Based on Next–generation Sequencing

LIN Feng, GE Min, BAO Hua-bin, ZHAO Han

(Institute of Agro-biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences,

Provincial Key Laboratory of Agrobiology, Nanjing 210014, China)

Abstract: By a method of discovering residual heterozygous line(RHL) in the recombinant, inbred lines and CSSLs were produced after self-pollination. Based on re-sequenced data of maize genome through next generation sequencing, InDel markers were developed throughout chromosome 5 and 41 CSSLs were selected at average space of 2.5 Mb from the 19 130 718 bp to 214 379 898 bp. The minimal space between adjacent CSSLs was 0.2 Mb while the max was 26.4 Mb. Eight single segment substitution lines were produced containing only one polymorphic site. These CSSLs will be benefit for fine-mapping of QTLs located on chromosome 5 and also can achieve the development of plant molecular breeding from utilizing single gene to synthetically exploiting genome.

Key words: Maize; Chromosome 5; Chromosome segment substitution line; Next-generation sequencing

玉米作为我国第一大作物,是不可或缺的重要 粮食及饲料来源。玉米中大多数重要的农艺性状如 产量、品质、生育期及抗逆性等均为数量性状,受数 量性状位点(Quantitative trait loci, QTL)控制。由于 QTL的检测受环境和实验误差影响较大,初级定位 一般只能将其置信区间限定在10~30 cM的范围 内<sup>III</sup>,在这较长的染色体区域存在着大量与目标性 状无关的基因,利用与之连锁的标记进行辅助育种 尚存在许多缺陷。为了鉴定并克隆真正控制目标性 状的候选基因,一般通过培育次级定位群体来精细 定位QTL。

染色体片段代换系(Chromosome segment substitution lines, CSSLs)是产生次级群体的首选材料,它 与受体亲本只有1个或几个代换片段不同,其他遗 传背景一致。只含1个染色体片段与受体亲本不同 时,称单片段代换系(Single segment substitution line, SSSL),理论上与其受体亲本在遗传背景间只有单个 代换片段的差异,消除了其他背景的干扰,提高了

收稿日期: 2015-09-08

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20141385)、江苏省农业科技自 主创新资金[CX(13)3060]、上海市能源作物育种及应用 重点实验室开放课题

**作者简介:**林 峰(1978-),男,博士,主要从事作物遗传育种研究。 E-mail:flinlc@hotmail.com

赵 涵为本文通讯作者。E-mail:zhaohan@jaas.ac.cn

QTL定位的精确度;同时能降低效应较大QTL对效 应较小QTL的遮盖作用,减少QTL之间的互作,从 而使微效QTL被检测出来<sup>[2~4]</sup>。Alpert<sup>[5]</sup>利用由近等 基因系构建的包含3472个单株的次级F<sub>2</sub>群体精细 定位了控制番茄果实重量的*fw2.2*,进而克隆到了该 QTL,证实该基因是控制细胞伸长的负调控因子<sup>[6]</sup>。 目前,该类群体已被广泛用于QTL的精细定位及图 位克隆<sup>[7~10]</sup>。迄今为止,构建SSSL及类似群体的作 物包括番茄、水稻、小麦、大麦和玉米等,并以之检测 到许多控制重要农艺性状的QTL<sup>[11,12]</sup>。Salvi等<sup>[13]</sup>以 B73和Gaspe Flint为亲本构建了75个SSSLs,利用此 群体定位了与玉米花期、节数、节间长、穗数、茎干长 度、穗上节数以及穗下节数等性状相关的QTL。

构建CSSLs的常规方法至少需要3~4代回交, 到 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>后自交得到 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>,并且从 BC<sub>1</sub>代开始须结 合分子标记进行导入片段的正向选择和轮回亲本的 背景选择,需要投入较大的人力物力。Yamanaka等[14] 提出,在重组自交系群体中筛选剩余杂合体的方法, 能大大节省时间,由剩余杂合体衍生的群体已被广 泛用于作物主要性状的精细定位及图位克隆[15~17]。但 由于鉴定剩余杂合体需要更多的分子标记分析基因 型,传统开发分子标记的方法通量较低,大大限制了 其应用。随着基因组测序技术和计算生物学的发 展,基于生物信息学的方法大规模挖掘基因组特异 分子标记已成为可能。本研究利用玉米基因组重测 序信息,定点开发第5染色体上的InDel分子标记, 在接近纯合的重组自交系群体中筛选剩余杂合体, 快速得到覆盖整条染色体的片段代换系,大大加快 了构建染色体片段代换系的进程,为玉米第5染色 体上基因的定位及克隆奠定基础。

# 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

试验所用材料为玉米自交系齐319与郑58杂交 衍生的F<sub>7</sub>代重组自交系群体及其亲本,共50个株 系,2014年种植于江苏省农科院实验田,每株系种 植1行,行长2m,行宽40 cm,每行播种10粒。

#### 1.2 玉米重测序序列清理及全基因组组装

玉米自交系齐 319 与郑 58 基因组测序数据由 NCBI 网站下载(http://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/ sra/sra.cgi?study=SRP001425),利用 SolexaQA 软件包 对原始测序数据进行质量(Q20, Phred-Score≥20 即 1%的错误率)和测序长度(L20,长度≥20 bp)过滤。 随后利用 SOAPdenovo2<sup>[18]</sup>组装软件对清理后的序列 进行全基因组组装。

#### 1.3 玉米第5染色体 InDel 的发掘与标记开发

与玉米B73基因组序列(v3)比对,筛选出两亲本 第5染色体的序列。利用Primer3<sup>[19]</sup>设计引物,使得 PCR产物都够覆盖整条染色体。通过电子PCR的 策略在两个亲本间进行模拟PCR扩增,进一步通过 cPCR软件(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-pcr/) 分析标记位点的多态性,模拟中碱基错配值Mismatch≤3 bp。电子多态性筛选的候选多态性位点即 可能存在1个InDel。利用该引物即可作为InDel标 记用于该位点的基因型检测。

#### 1.4 基因型检测

将群体所有单株及亲本取样,植物叶片用低温 真空干燥仪干燥后,采用Karroten植物基因组DNA 提取试剂盒抽提DNA,具体步骤详见试剂盒说明 书。DNA加适量TE溶解后,4℃或-20℃贮藏待用。 PCR反应体系为25 μL,包含5 pmol两侧引物,2.5 μL 10 x buffer,1.25 nmol dNTP,1 U Taq聚合酶和40 ng 模板DNA。扩增程序为94℃ 3 min 预变性,然后进 入扩增循环,94℃ 30 s,55℃或60℃ 30 s,72℃ 40 s, 35 个循环后,72℃反应 5 min。扩增产物在2%琼脂 糖凝胶上电泳分离,溴化乙啶显色,凝胶成像仪上观 察、照相并记录。

#### 1.5 染色体片段代换系群体的构建

通过对群体所有单株第5染色体的基因型分 析,筛选出所有位点为杂合的单株,套袋自交,后代 在该位点发生分离,利用相同标记筛选出该位点为 纯合的两类单株(与亲本齐319相同或与郑58相 同),该两类单株全基因组基本相同,只在检测位点 不同,即构成该位点的染色体片段代换系群体。

## 2 结果与分析

#### 2.1 InDel的发掘及多态性分子标记的开发

玉米第5染色体约含217959525个碱基,扫描 整条染色体序列,共开发413对引物,从4200779bp 起始,到214538822bp止,覆盖了该染色体的 96.5%。所有引物在齐319和郑58间进行了多态性 筛选,其中揭示亲本间多态的标记有244个,多态率 为59%,平均805kb有1个多态位点。有多态标记 间的最小间距为1.6kb,最大间距为11.6Mb(图1)。

#### 2.2 第5染色体中剩余杂合体的筛选

齐319与郑58杂交衍生的重组自交系群体共存 活354个单株,利用亲本间有多态的引物检测所有 单株的基因型。共有89对引物检测到杂合位点,如 图2箭头所示。平均每隔2.2 Mb检测到1个多态位 点,两位点最小间距为20 kb,最大间距为26.4 Mb。





Fig.1 Distribution of the polymorphic markers on chromosome 5 developed based on next-generation sequencing



图 2 在重组自交系群体中筛选到的部分剩余杂合体 Fig.2 Residual heterozygous lines screened from the RILs population

#### 2.3 染色体片段代换系群体的获得与鉴定



Fig.3 Determination of the chromosome segment substitution lines(CSSLs) by using molecular markers

选取剩余杂合体单株进行套袋自交,共收获62

个单株。自交后代中随机选取6粒种子进行基因型鉴定,利用上述检测到杂合位点的引物分析,结果表明,41个株系基因型发生分离,12个株系未检测到分离,剩余株系未扩增出清晰条带。发生分离株系包括3种基因型,两种与亲本相同的纯合带型及杂合带型。含有不同纯合带型的单株整个遗传背景基本一致,只在检测位点处有差异,一起构成染色体片段代换系群体(图3)。

### 2.4 染色体片段代换系差异位点的分析

共有78对引物检测到上述41个基因型发生分离的株系,这些引物从5号染色体的第19130718bp 起始,到214379898bp为止,平均2.5Mb获得1个 染色体片段代换系。两个染色体片段代换系位点间 的最小间距为0.2 Mb,最大间距为26.4 Mb(图4)。平 均每组染色体片段代换系含有4.9个多态位点,8组 染色体片段代换系只含有1个多态位点,为单片段 代换系。多态位点最多的一组染色体片段代换系含 有 34 个多态位点。





Fig.4 The physical map of the chromosome segment substitution lines(CSSLs) on chromosome 5

# 3 结论与讨论

染色体片段代换系群体多是通过Fi代与轮回亲 本进行多代回交,然后对供体亲本的染色体片段进 行选择得到的高代回交群体。通常需要至少3~4 次回交后所得的染色体片段代换系的遗传背景才能 与轮回亲本接近一致。虽然分子标记能够加快背景 选择的速度,但仍然需要多代回交,而且利用分子标 记进行背景选择很难覆盖整个基因组。另外,如果 想构建多个位点的染色体片段代换系,需要分别进 行回交,然后进行选择,工作量大。剩余杂合体 (RHL)是从高代重组自交系群体中获得的在目标区 间呈杂合而背景基本纯合一致的单株,只需利用目 标区间的分子标记在高代重组自交系群体中进行筛 选即可获得RHL,其自交后得到的遗传分离群体整 体遗传背景基本一致,只在目标区间发生分离,即得 到该区间的染色体片段代换系群体。本研究利用已 接近纯合的F<sub>2</sub>代重组自交系群体,筛选目标区段的 剩余杂合体,其自交后即得到该位点纯合的染色体 片段代换系群体,并且同时检测了多个位点,大大加 快了获得染色体片段代换系群体的进程。

鉴定出重组位点的基础是具有足够数量的分子标记。在很多研究中,虽然通过加大遗传群体或通过交互杂交等方法增加了重组率,但由于缺乏能够

检测出重组的分子标记而限制了研究的进一步开 展。目前,在玉米中广泛应用的分子标记主要包括 RFLP、SSR、InDel、SNP标记等<sup>[21~26]</sup>。利用玉米 B73 及Mo17杂交构建的重组自交系IBM 群体,已将上千 个SSR分子标记定位在玉米的10条染色体上。但 由于SSR分子标记在不同亲本间的多态率相对来较 低[27,28],在遗传图谱上留下较大的间隙。当针对某 一区段进行分行时,很难找到更多合适的多态性标 记,上述开发分子标记的方法通量偏低,限制了 RHL筛选的效率。近年来,随着基因组测序技术的 快速发展,第二代测序已被广泛应用于动植物全基 因组测序、重测序、转录组以及表观基因组等方面的 研究[29~31]。通过重测序比较发现,玉米不同基因型 间存在着大量InDel变异。Lai等<sup>[32]</sup>估算中国6个玉 米优良自交系的非重复区大约存在30178个InDel, 其中约有571个InDel位于功能基因内,这些变异直 接导致了玉米表现型的多样性,提供了更多的标记 位点。利用玉米基因组重测序信息,建立了大规模 开发分子标记,并对其进行电子多态性筛选的流 程<sup>[3]</sup>,利用该流程在玉米第5染色体上开发出了413 对InDel标记引物,覆盖了该染色体的96.5%,其中, 揭示亲本间多态的标记有244个,多态率达59%;平 均805kb有1个多态位点,提高了玉米第5染色体上 RHL的鉴定效率。

使用上述标记对重组自交系群体中剩余杂合体 的筛洗,获得了41个位点的染色体片段代换系群 体,几乎覆盖了玉米第5染色体,两个位点间的最小 距离为0.2 Mb,但其中尚存在几个比较大的间隙,最 大的位于染色体中部,两个位点的间隔为26.4 Mb, 位于着丝粒位置。两位点间距离超过10 Mb的区段 共有4个,可以针对该区段开发新的分子标记,还可 增加重组自交系群体株系的数目进行筛洗。未检测 到分离的株系可能是因为样本量太少,在洗择的种 子中没有分离。通过筛洗剩余杂合体构建的染色体 片段代换系群体中可能含有影响相同性状的其他 OTL位点,会对该群体的应用产生影响。可以在剩 余杂合体中同时鉴定其他OTL位点,从而获得只含 有特定OTL的染色体片段代换系群体。玉米第5染 色体上已经定位了多个重要性状的OTL,如抗粗缩 病OTL、株高OTL、穗位高OTL以及铝耐受性OTL 等[34~36]。利用构建的染色体片段代换系可以对上述 OTL进行精细定位并将已知有益位点应用到玉米育 种中。

#### 参考文献:

- Kearsey M, Farquhar A. Qtl analysis in plants; where are we now?[J]. Heredity, 1998, 80: 137–142.
- [2] Ando T, Yamamoto T, Shimizu T, et al. Genetic dissection and pyramiding of quantitative traits for panicle architecture by using chromosomal segment substitution lines in rice[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 116: 881–890.
- [3] Xi Z Y, He F H, Zeng R Z, et al. Development of a wide population of chromosome single–segment substitution lines in the genetic background of an elite cultivar of rice(*oryza sativa* L.)[J]. Genome, 2006, 49: 476–484.
- [4] Ye G, Liang S, Wan J. Qtl mapping of protein content in rice using single chromosome segment substitution lines[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121: 741–750.
- [5] Alpert K B, Tanksley S D. High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing fw2. 2: A major fruit weight quantitative trait locus in tomato[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996, 93: 15503-15507.
- [6] Frary A, Nesbitt T C, Frary A, et al. Fw2. 2: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size[J]. Science, 2000, 289: 85–88.
- [7] Schmalenbach I, Körber N, Pillen K. Selecting a set of wild barley introgression lines and verification of qtl effects for resistance to powdery mildew and leaf rust[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 117: 1093–1106.
- [8] Chung C L, Poland J, Kump K, et al. Targeted discovery of quantitative trait loci for resistance to northern leaf blight and other diseases of maize[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 123: 307–326.
- [9] Chen G, Li H, Zheng Z, et al. Characterization of a qtl affecting spike morphology on the long arm of chromosome 3h in barley(horde-

um vulgare l.) based on near isogenic lines and a nil-derived population[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 125: 1385–1392.

- [10] Albert N W, Lewis D H, Zhang H, et al. Members of an r2r3-myb transcription factor family in petunia are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning[J]. The Plant Journal, 2011, 65: 771-784.
- [11] Röder M S, Huang X Q, Börner A. Fine mapping of the region on wheat chromosome 7d controlling grain weight[J]. Functional & Integrative Genomics, 2008, 8: 79–86.
- [12] Schmalenbach I, March T J, Bringezu T, et al. High-resolution genotyping of wild barley introgression lines and fine-mapping of the threshability locus thresh-1 using the illumina goldengate assay[J]. G3: Genes, Genomes, Genetics, 2011, 1: 187–196.
- [13] Salvi S, Corneti S, Bellotti M, et al. Genetic dissection of maize phenology using an intraspecific introgression library[J]. BMC plant biology, 2011, 11: 4.
- [14] Yamanaka N, Watanabe S, Toda K, et al. Fine mapping of the ft1 locus for soybean flowering time using a residual heterozygous line derived from a recombinant inbred line[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 110: 634–639.
- [15] Watanabe S, Xia Z, Hideshima R, et al. A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the gigantea gene is involved in soybean maturity and flowering[J]. Genetics, 2011, 188: 395–407.
- [16] Du J H, Fan Y Y, Lei W, et al. Dissection of qtls for yield traits using near isogenic lines derived from residual heterozygous lines in rice[J]. Rice Science, 2008, 15: 259–266.
- [17] Tuyen D, Zhang H, Xu D. Validation and high-resolution mapping of a major quantitative trait locus for alkaline salt tolerance in soybean using residual heterozygous line[J]. Molecular Breeding, 2013, 31: 79-86.
- [18] Luo R, Liu B, Xie Y, et al. Soapdenovo2: An empirically improved memory- efficient short- read de novo assembler[J]. Gigascience, 2012, 1: 18.
- [19] Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Bioinformatics methods and protocols [J]. Springer. 1999. 365–386.
- [20] Peleman J, Wye C, Zethof J, et al. Qtl isogenic recombinant (qir) analysis: A method for high-resolution mapping of quantitative trait loci within a single population[J]. Genetics, 2005.
- [21] Helentjaris T, Weber D, Wright S. Identification of the genomic locations of duplicate nucleotide sequences in maize by analysis of restriction fragment length polymorphisms[J]. Genetics, 1988, 118: 353-363.
- [22] Taramino G, Tingey S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize[J]. Genome, 1996, 39: 277–287.
- [23] Bhattramakki D, Dolan M, Hanafey M, et al. Insertion-deletion polymorphisms in 3' regions of maize genes occur frequently and can be used as highly informative genetic markers[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48: 539–547.
- [24] Fu Y, Wen T J, Ronin Y I, et al. Genetic dissection of intermated recombinant inbred lines using a new genetic map of maize[J]. Genetics, 2006, 174: 1671–1683.

- [25] Ching A, Caldwell K S, Jung M, et al. Snp frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines[J]. BMC Genetics, 2002, 3: 19.
- [26] Liu S, Chen H D, Makarevitch I, et al. High-throughput genetic mapping of mutants via quantitative single nucleotide polymorphism typing[J]. Genetics, 2010, 184: 19-26.
- [27] Cone K C, McMullen M D, Bi IV, et al. Genetic, physical, and informatics resources for maize. On the road to an integrated map[J]. Plant Physiology, 2002, 130: 1598–1605.
- [28] Barcaccia G, Pallottini L, Parrini P, et al. A genetic linkage map of a flint maize (zea mays var. Indurata l.) italian landrace using a one-way pseudo-testcross strategy and multilocus pcr-based markers[J]. Maydica, 2006, 51: 469.
- [29] Mardis E R. Next-generation DNA sequencing methods[J]. Annu Rev. Genomics Hum Genet, 2008, 9: 387–402.
- [30] Varshney R K, Nayak S N, May G D, et al. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding[J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27: 522–530.
- [31] Su Z, Ning B, Fang H, et al. Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics[J]. Expert Rev. Mol.Diagn, 2011, 11(3): 333-343.

- [32] Lai J, Li R, Xu X, et al. Genome-wide patterns of genetic variation among elite maize inbred lines[J]. Nature Genetics, 2010, 42: 1027-1030.
- [33] 吕远大,李 坦,石 丽,等.基于全基因组重测序信息开发玉米 h99 自交系特异分子标记[J].作物学报,2014,40(2):191-197.

Lü Y D, Li T, Shi L, et al. Next-generation sequencing for molecular marker development in maize inbred H99[J]. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(2): 191-197. (in Chinese)

- [34] Liu C, Weng J, Zhang D, et al. Genome-wide association study of resistance to rough dwarf disease in maize[J]. European Journal of Plant Pathology, 2014, 139: 205–216.
- [35] 杨晓军,路 明,张世煌,等.玉米株高和穗位高的qtl定位[J]. 遗传,2008,30(11):1477-1486.
   Yang X J, Lu M, Zhang S H, et al. QTL mapping of plant height
  - and ear position in maize(*Zea mays* L.) [J]. Hereditas, 2008, 30(11): 1477–1486. (in Chinese)
- [36] Guimaraes C T, Simoes C C, Pastina M M, et al. Genetic dissection of al tolerance qtls in the maize genome by high density snp scan [J]. BMC Genomics, 2014, 15: 153.

(责任编辑:高阳)

(上接第20页)

- [1] 陈绍江,黎 亮,李浩川,等.玉米单倍体育种技术(第二版)[M]. 北京:中国农业大学出版社,2011.
- [2] 李浩川,陈绍江,黎 亮.一种玉米单倍体加倍管理方法[P].中国专利:CN102177846 A,2011-09-14.
- [3] 刘 海,郭建文.玉米单倍体的自然及化学加倍研究[J].天津农业科学,2014,20(12):129-130.
  Liu H, Guo J W. Research on technique of haploid doubling of maize[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2014, 20(12): 129-130. (in Chinese)
- [4] 许 洛,王绍新,冯健英.不同生态环境的玉米单倍体加倍效果 研究[J].河北农业科学,2013,17(3):63-65.

Xu L, Wang S X, Feng J Y. Study on natural doubling effect of maize haploid in different ecological environments[J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2013, 17(3): 63–65. (in Chinese)

[5] 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.
Liu Z Z, Song T M. Fertility spontaneously restoring of inflorescence and chromosome doubling by chemical treatment in maize haploid [J]. ActaAgronomica Sinica, 2000, 26(6): 947-952. (in Chinese)

[6] 段民孝,赵久然,刘新香,等.春夏不同播期对玉米单倍体自然加

倍率的影响[J]. 玉米科学, 2011, 19(5): 39-42.

Duan M X, Zhao J R, Liu X X, et al. Study on maize haploid doubling rate in spring and summer planting[J]. Journal of Maize Sciences, 2011, 19(5): 39–42. (in Chinese)

[7] 芦连勇,王海莉,等.玉米单倍体在春夏不同播期条件下的自然加倍效果研究[J].安徽农业科学,2012,40(18):9613-9614,9625.

Lu L Y, Wang H L, et al. Study of the natural doubling effect of maize(*Zea mays* L.) haploid under different sowing times in spring and summer[J]. Journal of Anhui Agri. Sci., 2012, 40(18): 9613–9614, 9625. (in Chinese)

[8] 段民孝,赵久然,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(12):68-70.

Duan M X, Zhao J R, et al. Study on the effect of planting place in maize haploid doubling rate[J]. Crops, 2012(12): 68–70.(in Chinese)

[9] 蔡 泉,曹靖生,等.玉米单倍体在黑龙江与海南自然加倍效果的对比研究[J].玉米科学,2012,20(5):7-9.
Cai Q, Cao J S, et al. Comparison on natural doubling of maize haploid in heilongjiang and hainanprovince[J]. Journal of Maize Sciences, 2012, 20(5): 7-9. (in Chinese)

(责任编辑:朴红梅)