

玉米单倍体雄穗自然加倍性轮选遗传修复与高加倍率材料的创制

才卓, 徐国良, 任军, 代玉仙, 于明艳, 李淑华,
刘小丹, 郭琦, 王丽娜, 张铭堂

(吉林省农业科学院玉米研究所单倍体育种技术创新团队, 吉林公主岭 136100)

摘要: 利用DH技术对先玉335进行连续轮回选择,发现单倍体雄穗自然加倍能力具有极显著的累加遗传效应,这种遗传效应可以获得成倍提高。证明玉米自身遗传系统具有单倍体雄穗自然加倍遗传恢复(修复)能力。用两轮选择所获的DH²系再次杂交组群,再经杂交诱导获得单倍体植株平均雄花散粉率高达85.15%,自交结实率高达66.18%,是基础群体先玉335直接诱导单倍体株的6.99倍和9.86倍。获得的DH³系因经两轮全基因组配子体选择,最大限度地淘汰了有害、劣性基因,聚合了较多优良基因,农艺性状好,植株长势强,可直接应用于资源扩增和品种选育。单倍体雄穗自然加倍性的轮选遗传修复能力的发现与高自然加倍率材料的创制具有极其重要的应用价值,可与玉米双轮回选择育种模式相结合,构建基于自然加倍为主体的单倍体双轮回育种技术体系。

关键词: 玉米;单倍体加倍;轮回选择;自然修复加倍

中图分类号: S513.035.2

文献标识码: A

Selection Experiment of High Spontaneous Male-Fertility-Restorer Frequency Maize Population

CAI Zhuo, XU Guo-liang, REN Jun, DAI Yu-xian, YU Ming-yan, LI Shu-hua,
LIU Xiao-dan, GUO Qi, WANG Li-na, ZHANG Ming-tang

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

Abstract: Use DH lines from Xianyu335 as source materials for haploid induction in the recurrent selection scheme, the spontaneous doubling rate of the haploid tassels had significantly increased in the next cycle and showed a cumulative genetic effect, and through using DH recurrent selection technique, the doubling rate of the haploid tassels can be doubled. It proved that performing continuous recurrent selection, the genetic makeup of the haploids had been enriched for spontaneous doubling restoration. Using hybrids between DH lines from two cycles haploid selection as source materials for haploid induction, the haploid tassel doubling rate had reached 85.15% and haploid ears showed seed set had reached 66.18%, representing a rate increase of 6.99 folds and 9.86 folds of its original source population Xianyu335. Also, because the DH lines had been selected from two cycles haploids or whole genome gamete selection, it was effectively eliminated many deleterious and bad genes, and also cumulatively combined many superior genes for agronomy and plant growth vigor. These new DHs can be directly used as parents for germplasm enhancement and new hybrid selection and breeding. The discovery of enrichment or spontaneous doubling restoration of the haploid tassels that were derived from DH recurrent selection technique and create high spontaneous doubling rate source materials showed a significant application value in maize breeding. It showed significant advantages for construct maize two cycle recurrent selection with high haploid spontaneous doubling rate to speed up breeding output.

Key words: Maize; Haploid; Recurrent selection; Spontaneous doubling

收稿日期: 2016-06-01

基金项目: 七大农作物育种专项“主要农作物染色体细胞工程育种”、“玉米杂种优势利用技术与强优势杂种创制”、吉林省农业科技创新工程“玉米单倍体规模化育种技术研究与示范”项目

作者简介: 才卓(1956-),男,研究员,从事玉米育种研究。

杂交诱导单倍体育种技术能够大幅度缩短育种年限,提高育种效率,已被国内外种业同行广泛认可。国外各大种业公司将其作为现代育种核心技术加以完善和发展,以期抢占国际竞争领域的制高点。中国育种家也都在育种实践中对其进行了尝试与应用,形成了逐步取代或部分取代常规系谱育种方法的趋势。随着近年该技术的逐步完善和快速发展,目前,高通量的诱导和大量单倍体的获取已经突破,单倍体的加倍效率成为限制单倍体技术工程化的“瓶颈”。

本课题组不同遗传基础材料的单倍体自然加倍率仅在0~10%^[1-3],为此,大量研究集中在如何通过化学药剂提高单倍体加倍率方面,但多种方法效果都不理想,提升幅度仅在20%以内,而且操作环节复杂,不确定因素多,加倍药剂多为剧毒(秋水仙素),对人体、环境危害大^[4-6]。所以,现阶段DH技术发展的关键在于研发安全、简捷、高效地提高单倍体加倍效率的工程化育种方法。

历经10年研究,依托轮回选择与自身遗传修复方法创制出单倍体雄穗高频自然加倍群体、育种材料及DH系,将这种方法(专利申请号:201610280480.0)应用到育种实践,跨越式地提高单倍体育种工程化水平与能力。

1 材料与方 法

1.1 材 料

诱导基础群体:玉米单交种先玉335(组合代号:X1132X),其母本为PH6WC,属于Reid种群,大多试验认为该遗传类群单倍体自然加倍率较高;父本PH4CV,属于Lancaster种群,大多试验认为该遗传类群单倍体自然加倍率低。

单倍体诱导系:吉林省农业科学院选育的吉高诱3号,具有子粒Navajo标记明显稳定、花粉量大、结实性好、抗病性强等优点,平均诱导率10.4%^[7]。

1.2 单倍体获得方法

将先玉335作为母本,诱导系吉高诱3号作为父本,杂交诱导单倍体。获得杂种F₁代子粒,根据navajo遗传标记逐粒挑选,具有无色胚芽、紫色粒顶、胚近三角形的为准单倍体子粒。

1.3 田间鉴定方法

将准单倍体子粒种植于单倍体规模化育种圃场(公主岭市)或海南育种基地(三亚市),种植密度为105 000株/hm²,精细管理,确保健壮生长,发育良好。根据形态学特征,及时去除具有植株高壮和紫色标记特征性状的伪单倍植株^[8]。

1.4 DH系获得方法

对于确定的单倍体植株,在散粉期仔细观察散粉情况,对散粉单倍体植株及时精细自交授粉并更换另色纸袋。散粉期结束后,统计散粉株数及比例。

自交果穗成熟后,及时按单穗收获,避免子粒开裂及丢失,干燥后仔细脱粒。收获时统计收获到种子的植株数,以收获到种子的植株记为单倍体自然加倍植株,用来计算加倍率(经下个生长季确认)。

将获得的双单倍体子粒按单穗分行种植,田间精细管理,确保植株长势整齐,根据形态学特征判断及时剔除杂株。对选留的植株、穗行自交授粉,按单行收获脱粒,即为DH系种子。

1.5 DH系的鉴定与杂交重组

将上季扩繁收获的DH系种子种植于田间,每份材料种1行,观察其长势及相关农艺性状,及时自交留种。同时,根据育种目标性状表现有针对性地选择2个以上缺点尽量能够相弥补的优良DH系再杂交组群,再杂交诱导及自然加倍即可获得新的DH²系。

循环往复以上过程,分别获得DH系、DH²系(DH×DH)、DH³系(DH×DH/DH×DH)、DHⁿ系(DH×DH..DH×DH),参加下轮选择;也可选出优异DH穗行,直接进入育种程序应用。

1.6 统计项目指标计算方法

散粉率 = 散粉株数 / 单倍体总株数 × 100%;

结实株率 = 收获DH种子株数 / 单倍体总株数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 单倍体雄穗自然加倍遗传恢复研究与育种材料创制

2006~2008年开始进行第一轮杂交诱导到获得第一轮DH系;2009~2012年开始进行二轮重组群体到获得第二轮DH²系;2013~2015年开始,进行三轮重组群体到获得第三轮DH³系。10余年的持续循环轮回选择过程发现(图1),轮选初代单倍体雄穗可散粉株率、花药多少、花药大小及花粉量分布等性状显示受微效多基因控制的特征明显,第二轮、第三轮选择过程中花药多少、花药大小、花粉多少呈典型连续分布表现。

2.2 单倍体雄穗自然加倍遗传修复能力及其累加效应的发现

2006年开始对先玉335进行杂交诱导与自然加倍,单倍体雄穗自然加倍率为6.71%;2009年用所获DH系重组第二轮选系群体,2011年种植杂交诱导

获得单倍体株群体发现,第二轮群体再诱导出单倍体植株雄花自然加倍率显著提升,平均达到

17.63%。其中,组合07先335-58×07先335-128自然加倍率高达31.26%。

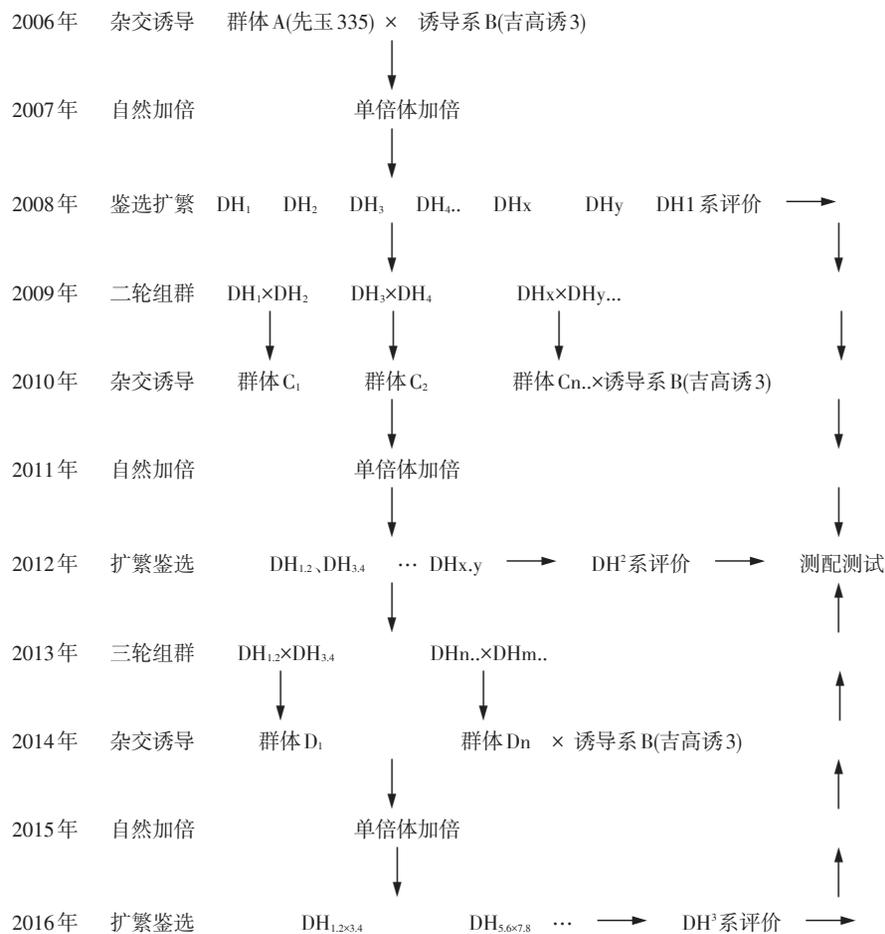


图1 玉米雄穗高自然加倍材料(系)的创制

Fig.1 Diagram of high spontaneous doubled frequency maize population creation procedures

2.3 单倍体雄穗自然加倍遗传修复能力及其累加效应的验证

2014和2015年,再次诱导07先335-18×09先玉335-18和06先335-18×06先玉335-9两个DH系杂交组合,单倍体株自然加倍散粉率高达49.96%和39.94%,授粉结实率高达35.56%和27.04%,证明了玉米单倍体雄穗自然加倍能力具有极其显著的遗传修复与累加效应。

2.4 单倍体雄穗高自然加倍遗传育种材料的创制

2013年开始,在上季所获DH²系中,优选综合性状优异、优缺点互补的DH²系,重新组配第三轮诱导选系群体。2015年通过自然加倍获得新一轮DH系(即DH³)。由表1可见,第三轮选择的单倍体植株散粉率和收获率再次极显著提升,平均散粉率高达85.15%,平均结实率高达66.18%,且花药大小、花药多少、散粉量显著提高,完全不需要像第一轮那样精细采粉。可见,轮回选择遗传修复的方式,可有效地

提高单倍体雄穗的自然加倍能力(散粉株率),同时散粉量、自交结实率也随之显著提升。

本试验大部分DH系重组群体自然加倍率达到原基础群体加倍率的2倍,诱导DH²系间再杂交组合获得的单倍体株,有的组合散粉率达到90%以上,自交授粉结实率超过65%以上。同时,这些高自然加倍率群体也因经2轮全基因组配子体选择,最大限度淘汰了有害、劣性基因,聚合了较多优良基因,无论是单倍体株及DH系均具有了较多的优良农艺性状及生长势,其中,已有多个第二轮选择获得DH系配制的组合进入了吉林省预备试验。

2.5 基于自然加倍为主体的单倍体双轮回育种技术体系构建

鉴于玉米双轮回选择育种是现代商业育种的基石,单倍体雄花自然加倍能力可通过轮选遗传修复方法提高,可将两者相结合构建“基于自然加倍为主体的单倍体双轮回育种技术体系”(图2),同时对母

本群(SS群等)、父本(NSS群等)群分别进行轮回改良,连续用遗传类群内不同选系基础材料间产出的DH系再组建基础群(遗传背景较为宽泛),轮回选择n轮产生DHⁿ系,形成血缘关系对应的2套核心种质群,不同阶段按遗传类群导入优异新材料,再轮回批

量产出新的自交系(DHⁿ⁺¹)。也可采用杂交、回交等方法将单倍体雄花高自然加倍能力(基因)直接导入到核心种质或骨干自交系中,创制不同血缘类型的高自然加倍能力DH自交系用于育种实践。

表1 单倍体雄花自然加倍率轮选修复加倍结果

Table 1 Spontaneous male fertility restorer situation in recombinant population

轮选代数 Recurrent selection line	诱导基础群体 Induced base population	单倍体株数 Plants of haploid	散粉株率(%) Rate of shedding strain	收获穗数 No. of harvest spike	收获穗率(%) Harvesting spike rate
DH ¹ 系	先玉335	6801	11.04	457	6.71
DH ² 系	07先玉335-18×09先玉335-18	1229	49.96	437	35.56
	06先玉335-18×06先玉335-9	1302	39.94	352	27.04
	07先玉335-58×07先玉335-57	1566		373	23.82
	07先玉335-58×07先玉335-34	980		159	16.22
	07先玉335-58×07先玉335-128	998		312	31.26
	07先玉335-151×07先玉335-128	398		96	24.12
	07先玉335-98×07冬先玉335-1	420		46	10.95
	07先玉335-98×07冬先玉335-58	432		31	7.18
	07先玉335-98×07先玉335-171	376		22	5.85
	07先玉335-171×07冬先玉335-10	121		10	8.26
	07冬先玉335-10×07冬先玉335-1	566		53	9.36
	07冬先玉335-10×07先玉335-58	982		117	11.91
		平均		44.95	
DH ³ 系	(X1132X-1/06先玉335-18)-4×(X1132X-1/06先玉335-18)-3	982	91.24	713	72.61
	(X1132X-1/06先玉335-18)-4×(X1132X-1/06先玉335-18)-2	699	83.98	485	69.38
	(X1132X-1/06先玉335-18)-5×(X1132X-1/06先玉335-18)-2	883	74.97	505	57.19
	(X1132X-1/06先玉335-18)-2×(X1132X-1/06先玉335-18)-3	913	85.10	679	74.37
	(X1132X-1/06先玉335-18)-4×(X1132X-1/06先玉335-18)-6	889	88.75	487	54.78
	(X1132X-1/06先玉335-18)-2×(X1132X-1/06先玉335-18)-1	975	86.87	670	68.72
	平均		85.15		66.18

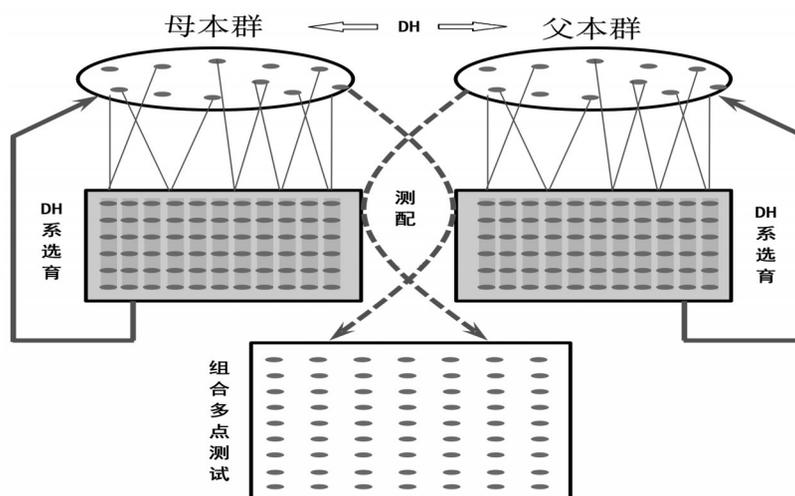


图2 基于自然加倍为主体的单倍体双轮回育种技术体系示意图

Fig.2 System schematic diagram of recurrent breeding technology based on based on natural doubling as the main haploid

3 讨论与结论

根据高等植物减数分裂及双重受精理论,玉米单倍体不能进行正常减数分裂,因此,也不能产生花粉而自交授粉结实。实践发现,绝大多数单倍体植株雌穗可育,雄穗偶有可育花粉散出,当生长条件良好时,好的遗传群体诱导出的单倍体产生正常花粉的株数就多,花粉量也大,说明玉米自身单倍染色体组遗传系统具有“遗传修复与调整机能”。受这种重要的因素调整,生长条件有利就会较多地发生全部或局部恢复二倍化,故不同年份间、不同环境下,尤其是雄穗表现差别较大。因此,单倍体植株能否成为DH系,取决于其雄花序是否能够恢复育性,这是制约单倍体技术发展的“瓶颈”^[9~11]。

Shatskaya等研究认为,不同基因型单倍体雄穗的可育程度是遗传性状^[12]。吴鹏昊等基因定位研究得到8个相关基因位点,认为作用方式包括加性效应、显性效应、部分显性和超显性^[13]。本研究把DH姊妹系重新杂交组群(第二、三轮),再诱导所获得的单倍体株群雄穗自然加倍性状(群体间散粉株率、群体内株间花药特征、花粉量多少的分布)也表现受微效多基因控制,显示出典型的连续分布特征。

本研究基于PH6WC×PH4CV较为狭窄遗传背景,把单交组合内位点有限、效应微弱的高雄穗加倍率相关基因位点进行累加聚合,但轮选获得的单倍体株群雄穗自然加倍能力极显著提高,散粉率最高达91.24%,自交结实率最高达74.37%,表现出极其显著的加性效应,进而选育出自然加倍率超高育种新材料(DH系)。

综合分析这种极其显著的加性遗传效应产生的机理,尽管控制自然加倍的相关基因微效,但其等位基因相当于致死基因,导致轮选过程中携带者(不散粉株)因全部不育而被淘汰。因此,该过程是一个超高强度的轮选与强制性遗传修复过程,玉米自身遗传系统由于受到了强化恢复而获得遗传适应能力,故凸显加性、“超显性”遗传效应值极高。所以,轮选过程中良好的生长环境是遗传修复的基本保证。

基于上述,提出单倍体加倍方法除自然加倍、化学加倍、物理加倍等普通方法外,还应加上遗传修复方法。本试验证明,轮选遗传修复方法具有极其显著的效率与应用前景。遗传改良提高单倍体自然加倍率研究鲜见报道,国际上仅有Zabirova及Geiger进行相关研究,但未见新的进展^[14,15],而国内未见报道^[16,17]。

玉米DH轮选修复育种方法及高加倍率育种材

料可在商业化育种实践中广泛应用,前景极其广阔。基本原理:用DH育种技术进行循环轮回选择品种改良,随周期递增,目标性状相关有益基因频率逐步累加,雄穗自然加倍特性也同时得以快速提高。随育种进程逐步深入,按遗传类群形成两个或多个单倍体高自然加倍商业化核心种质群,就可摆脱复杂苛刻的实验室或工厂化加倍技术环节,形成简捷高效的“单倍体田间自然加倍技术体系”。Valeriu在单倍体水平上进行轮回选择试验证明,群体产量水平及相关农艺性状均获得显著改良^[17]。也可采取将高自然加倍率特性回交导入到两套血缘对立的骨干自交系或核心种质群中,批量产出同型的高自然加倍率自交系,以此为基础形成商业化核心种质。

结论:通过单倍体雄穗自然加倍能力轮回选择与遗传修复,发现该性状具有极其显著的累加效应,好的组合一次轮选加倍率可以成倍提高。在狭窄的单交组合遗传背景下,轮回选择创制出单倍体雄穗高自然加倍能力遗传材料,说明玉米自身还具有加倍能力自然修复(恢复)遗传机制,这种机制具有极其重要的应用价值。轮选修复机理为控制不能加倍的等位基因相当于致死基因,导致轮选过程中携带者单倍体株全部淘汰,因此,超高强度的轮回选择与强制性遗传修复过程,使玉米自身遗传系统受到强化恢复而获得适应,微效的相关加倍基因凸显出极高的加性(超显性)遗传效应。将玉米双轮回选择育种与单倍体轮选遗传修复方法相结合,构建“基于自然加倍为主体的单倍体双轮回育种技术体系”,再辅之现代计算机技术及生物技术,必将再次推动玉米育种再次跨上新台阶。本发现并验证的自然加倍率轮选增益现象及创制的高加倍率育种新材料将为该技术体系奠定坚实基础。

参考文献:

- [1] Chase S S. Monoploids and monoploid derivatives of maize(*Zea mays* L.)[J]. Bot. Review, 1969, 35: 117-167.
- [2] Beckert M. Advantages and disadvantages of the use of doubled-haploids in recurrent selection for combining ability[J]. Crop Sci., 1994, 40: 23-29.
- [3] Kato A. Chromosome doubling of haploid maize seedling using nitrous oxide gas at flower primordial stage[J]. Plant Breed, 2002, 121: 370-377.
- [4] 惠国强,李建生,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.
Hui G Q, Li J S, et al. Doubling efficiency of maize haploids treated by different herbicides[J]. Acta Agronomica Sinica, 2012, 38(3): 416-422. (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]. *Acta Agronomica Sinica*, 2000, 26(6): 947-952. (in Chinese)
- [6] 文科, 陈绍江, 等. 高效生物诱导玉米单倍体及其加倍方法研究初报[J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(5): 17-20.
- Wen K, Chen S J, et al. Study on bio-haploid inducing and doubling efficiency in maize[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2006, 11(5): 17-20. (in Chinese)
- [7] 才卓, 徐国良, 等. 玉米高频率单倍生殖诱导系吉高诱系3号的选育[J]. 玉米科学, 2007, 15(1): 1-4.
- Cai Z, Xu G L, et al. The breeding of jaas3-haploid inducer with high frequency partheno genes is in maize[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2007, 15(1): 1-4. (in Chinese)
- [8] 才卓, 徐国良. 玉米杂交诱导单倍生殖(单倍体)选育自交系技术规范(修订版)[J]. 玉米科学, 2013, 21(2): 1-5.
- Cai Z, Xu G L. Technique specifications for the breeding of maize inbred line using haploid induction from cross hybridization[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2013, 21(2): 1-5. (in Chinese)
- [9] Chalyk S T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding[J]. *Euphytica*, 1994, 79(1/2): 13-18.
- [10] Kleiber D, Prigge V, et al. Haploid fertility in temperate and tropical maize germplasm[J]. *Crop Science*, 2012, 52(2): 623-630.
- [11] 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.
- Duan M X, Zhao J R, Liu X X, et al. Study on the effect of planting place in maize haploid doubling rate[J]. *Crops*, 2012(2): 68-70. (in Chinese)
- [12] Shatskaya O A, Zabirowa E R, Shcherbak V S. Autodiploid lines as sources of haploid spontaneous diploidization in corn[J]. *Maize Genet Coop Newslett*, 1994, 68: 51-52.
- [13] 吴鹏昊. 玉米生物诱导单倍体雄穗育性恢复研究[D]. 博士学位论文, 北京: 中国农业大学, 2014.
- [14] Zabirowa E R, O A Shatskaya, V S Shcherbak. Line 613/2 as a source of a high frequency of spontaneous diploidization in corn[J]. *Maize Genet. Coop. News Lett.*, 1993, 67: 6-7.
- [15] Geiger H H, Schonleben M. Incidence of male fertility in haploid elite dent maize geimplasm[J]. *Maize Genet Coop Newsl*, 2011, 85: 22-32.
- [16] 董占山, 卢洪, 柴宇超, 等. 中国特色的玉米商业育种体系构建[J]. 玉米科学, 2015, 23(1): 1-9.
- Dong Z S, Lu H, Chai Y C, et al. Concept and practices of maize commercial breeding in China[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2015, 23(1): 1-9. (in Chinese)
- [17] 董占山, 高玉峰, 柴宇超, 等. 玉米育种理论技术新拓展与商业育种实践[J]. 玉米科学, 2016, 24(1): 1-7.
- Dong Z S, Gao Y F, Chai Y C, et al. Advances in maize breeding technologies and commercial breeding practices[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2016, 24(1): 1-7. (in Chinese)

(责任编辑: 李万良)