

玉米单倍体自然加倍若干问题探讨

吴鹏昊^{1,2}, 任姣姣¹, 田小龙¹, 刘晨旭¹, 刘文欣¹, 陈绍江¹

(1. 中国农业大学/国家玉米改良中心/北京作物遗传改良重点实验室, 北京 100193; 2. 新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052)

摘要: 玉米单倍体加倍是 DH 育种中的关键技术环节之一, 玉米单倍体雄穗自然加倍能力较低, 限制了 DH 育种技术在商业育种中的大规模推广, 对玉米雄穗自然加倍遗传特性的研究将有助于 DH 技术在育种中的进一步应用。本研究通过对多个不同遗传背景的单倍体雄穗自然加倍能力进行严格统计和差异比较, 结果表明, 单倍体雄穗育性恢复主要受核基因的控制, 不受细胞质基因的调控。诱导率对单倍体雄穗自然加倍能力没有显著影响, 自交系来源的 DH₁ 经过诱导后的单倍体由于基因型没有变化, 其自然加倍能力与自交系相比没有显著提高。

关键词: 玉米; 单倍体; 自然加倍; 遗传特性

中图分类号: S513.035.2

文献标识码: A

Genetic Studies on Haploid Spontaneous Doubling in Maize

WU Peng-hao^{1,2}, REN Jiao-jiao¹, TIAN Xiao-long¹, LIU Chen-xu¹, LIU Wen-xin¹, CHEN Shao-jiang¹

(1. College of Agriculture and biotechnology / National Maize Improvement Center of China/

Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, China Agricultural University, Beijing 100193;

2. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: Haploid spontaneous doubling in maize is one of the key technological steps in DH breeding, however, average rate of male fertility is very low, which limits the broadly commercial application of DH technology. Therefore, so genetic study of maize haploid spontaneous doubling could facilitate further application of DH technology in crop breeding procedure. In this study, haploids with different genetic background were investigated with their male fertility and compared with each other, the result showed that haploid spontaneous doubling of male fertility is mainly controlled by genes in nucleus, but not genes in the cytoplasm; the haploid induction rate has little effect on haploid male fertility. There is also no significant difference of haploid spontaneous doubling between haploids from DH₁ and their corresponded inbred because of unchangeable genotypes.

Key words: Maize; Haploid; Spontaneous doubling; Genetic characteristic

玉米单倍体加倍是双单倍体(Doubled haploid, DH)育种的重要环节^[1]。目前主要以化学加倍为主, 该方法效率较高, 但成本较高, 容易造成环境污染, 而且在具体操作上也存在一定难度, 因此, 开展自然加倍研究有利于玉米单倍体育种的普及与应用^[2]。单倍体雄穗的自然加倍率一般在 10% 以下, 是影响单倍体自交结实数量的主要因素, 且因母本材料种

质背景不同而变异幅度较大^[3,4]。除此之外, 单倍体雄穗的散粉性状虽然受到环境因素的影响, 但具有较高的遗传力。因此, 对于单倍体雄穗育性恢复能力比较高的材料, 可以不必采取化学加倍的方法, 而是直接在田间进行自然加倍以获得 DH 系材料; 对育性恢复能力较低的材料可以通过一定的回交育种程序进行遗传改良以提高其散粉特性。为了对单倍体自然加倍有较为系统地认识, 还需要对单倍体自然加倍的遗传特性进行深入研究, 为建立高效的自然加倍技术体系提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供体母本材料包括 3 部分: ①利用自交系郑 58、豫 8701 以及郑 58 和 4F1 分别组配正反交杂交组合;

收稿日期: 2016-04-18

基金项目: 国家自然科学基金(31560392)、现代农业产业技术体系(CARS-02-09)、“十三五”国家重点研发计划“玉米杂种优势利用技术与强优势杂种创制”

作者简介: 吴鹏昊(1984-), 男, 河南许昌人, 博士, 主要从事玉米单倍体育种研究。E-mail: craie788@126.com
陈绍江为本文通讯作者。E-mail: chen368@126.com

②4个自交系来源的DH_i代材料和EH_i代材料;③郑单958F₁(表1)。父本诱导材料为农大高诱5号CAU5^[5],平均诱导率在10%左右;农大高油高诱1号CAUHOI^[6],诱导率在2%~5%;其诱导系间正反交杂交种,诱导率约在6%左右。

1.2 田间试验设计

杂交诱导试验分别于2011年夏季在北京上庄和冬季在海南进行,诱导后的果穗通过R1-nj标记进行单倍体的子粒鉴别,所得单倍体分别于2012年夏季和2013年夏季同时在北京和甘肃进行种植并评价单倍体的雄穗自然加倍能力。在6~7叶期对苗期的单倍体进行除杂,密度在90 000株/hm²左右。除杂定苗之后每个材料来源的单倍体群体大约在100株左右。于7~8月分别对不同单倍体群体的散粉情况进行调查,利用露药率、露粉率、露药得分和露粉得分4个性状整体描述单倍体群体的散粉特征。

1.3 数据分析

根据对单倍体雄穗育性恢复4个表型特征露药率、露粉率、露药得分和露粉得分的调查结果,分别比较:①不同正反交后代单倍体雄穗自然加倍差异

性;②不同DH_i后代单倍体雄穗自然加倍差异性;③不同早期加倍单倍体EH_i^[7]后代单倍体雄穗自然加倍差异性;④不同诱导率后代单倍体雄穗育性恢复差异性(表1)。

比较方法:①当待比较组数大于等于3时,首先采用Shapiro-Wilk Test对每个性状作正态性检验,服从正态分布者,采用Levene's Test作方差同质性检验;服从正态分布且方差同质的,作方差分析,方差分析显示各组均数具有显著差异,采用SNK法作两两比较;不服从正态分布或方差不同质的,采用Kruskal-Wallis Test作非参数检验,非参数检验显示各组具有显著差异的,采用Nemenyi Test作非参数检验的两两比较;②当待比较组数等于2时,首先采用Shapiro-Wilk Test对每个性状作正态性检验,服从正态分布者,作方差同质性检验;服从正态分布且方差同质的,采用t Test作t检验;服从正态分布但方差不同质者,采用Satterthwaite t Test作近似t检验;不服从正态分布者,采用Wilcoxon Rank-Sum Test作非参数检验。所有分析的显著性水平 $\alpha=0.05$ 。所有数据分析利用SAS 9.3完成^[8]。

表1 试验材料及遗传分析内容
Table 1 Materials and genetics experimental design

父本材料 Inducer	母本材料 Donor material	试验设计 Experimental design
CAU5	郑58/豫8701;豫8701/郑58;	(1)正反交后代单倍体雄穗自然加倍比较
	郑58/4F1;4F1/郑58	
	4F1DH;K22DH;B73DH;昌7-2DH	(2)DH _i 后代单倍体雄穗自然加倍比较
CAU5;CAUHOI;CAUHOI×CAU5; CAU5×CAUHOI	EH759EH;豫8701EH;B73EH;K22EH	(3)EH _i 后代单倍体雄穗自然加倍比较
	郑单958	(4)不同诱导率后代单倍体雄穗自然加倍比较

2 结果与分析

2.1 单倍体自然恢复基本情况

通过选取共5个杂交组合、7个自交系、4个DH_i和4个EH_i来源的单倍体在田间进行雄穗自然加倍率4个相关性状的统计分析,自交系、DH_i和EH_i来源的单倍体在露药率、露粉率、露药得分和露粉得分都要高于杂交组合来源的单倍体(表2)。纯系来源的单倍体露药率和露粉率均值都能在70%以上,露药得分和露粉得分均值也能够达到0.5左右;杂交种后代的单倍体平均露药率和露粉率不到50%,露药得分和露粉得分也不到0.2。本研究所选的纯系其雄穗自然加倍能力本身较高,杂交组合是由高低亲

组配所得,因此散粉效率相对较小。

2.2 正反交组合后代单倍体雄穗自然加倍能力比较

试验(1)中大部分情况下所测量性状均服从或近似正态分布,可以进行一般t测验(表3)。对4F1和郑58正反交后代单倍体两年两点的雄穗自然加倍结果表明,两个正反交后代来源的单倍体在露药率、露粉率、露药得分和露粉得分4个性状上差异都不显著。对豫8701和郑58正反交杂交后代单倍体两年两点的自然育性恢复的分析结果表明,两个正反交后代来源的单倍体在露药率、露粉率、露药得分和露粉得分4个性状上差异都不显著。结果表明,正反交F₁后代来源的单倍体雄穗自然加倍能力主要受核基因控制,胞质影响较小。

表2 单倍体自然加倍基本情况
Table 2 Basic information of haploid spontaneous doubling

材 料 Material	材料个数 Number	总单倍体数 Plants	性 状 Trait	均 值 Mean	最大值 Max.	最小值 Min.	变 幅 Range
杂交组合	5	727	露药率(%)	43.70	65.20	30.10	35.10
			露粉率(%)	36.20	59.20	23.70	35.50
			露药得分	0.19	0.40	0.07	0.33
			露粉得分	0.12	0.32	0.03	0.29
自交系	7	797	露药率(%)	73.70	98.20	30.10	68.10
			露粉率(%)	76.20	98.20	23.70	74.50
			露药得分	0.49	0.90	0.07	0.83
			露粉得分	0.52	0.32	0.03	0.29
DH ₁	4	417	露药率(%)	75.60	98.80	32.90	66.00
			露粉率(%)	72.70	98.30	25.50	72.80
			露药得分	0.51	0.96	0.09	0.87
			露粉得分	0.59	0.76	0.10	0.66
EH ₁	4	455	露药率(%)	77.70	98.50	61.70	36.70
			露粉率(%)	76.00	97.10	61.70	35.40
			露药得分	0.48	0.95	0.21	0.74
			露粉得分	0.47	0.58	0.22	0.35

表3 试验(1)、(2)、(3)比较结果
Table 3 Results of comparing for experiment (1), (2), (3)

材 料 Material	性 状 Trait	数据分布特征 Distribution	统计方法 Method	自由度 DF	<i>t</i> 值 <i>t</i> -value
4F1×郑58 vs 郑58×4F1	露药率	正态、不同质	方差不同质的 <i>t</i> 测验	5.12	0.43
	露粉率	正态、不同质	方差不同质的 <i>t</i> 测验	5.15	1.62
	露药得分	正态、同质	方差同质的 <i>t</i> 测验	7.00	-0.37
	露粉得分	正态、同质	方差同质的 <i>t</i> 测验	7.00	-0.18
豫8701×郑58 vs 郑58×豫8701	露药率	正态、同质	方差同质的 <i>t</i> 测验	7.00	-0.37
	露粉率	正态、同质	方差同质的 <i>t</i> 测验	7.00	-0.18
	露药得分	非正态	基于秩和的 <i>t</i> 测验	15.00	1.00
	露粉得分	非正态	基于秩和的 <i>t</i> 测验	13.00	0.71
DH ₁ vs 自交系	露药率	正态、同质	方差同质的 <i>t</i> 测验	6.00	0.63
	露粉率	正态、同质	方差同质的 <i>t</i> 测验	6.00	0.83
	露药得分	正态、同质	方差同质的 <i>t</i> 测验	6.00	0.49
	露粉得分	非正态	基于秩和的 <i>t</i> 测验	22.00	0.35
EH ₁ vs 自交系	露药率	正态、同质	方差同质的 <i>t</i> 测验	6.00	0.88
	露粉率	非正态	基于秩和的 <i>t</i> 测验	22.00	0.35
	露药得分	正态、同质	方差同质的 <i>t</i> 测验	6.00	0.38
	露粉得分	正态、同质	方差同质的 <i>t</i> 测验	6.00	1.10

2.3 再诱导DH₁代、EH₁代与原自交系材料雄穗自然加倍差异比较

试验(2)和(3)中大部分情况下所测量性状均服从或近似正态分布,可以进行一般*t*测验(表3)。通过对4个自交系4F1、B73、K22和昌7-2相应来源的DH₁代材料进行单倍体自然加倍性状的差异比较发

现,自交系与相应的DH₁代来源单倍体在4个性状上均没有显著差异。通过对来源于4个纯系EH759、豫8701、K22和B73相应来源的EH₁代材料进行单倍体自然加倍性状的差异比较发现,自交系与相应的EH₁代来源单倍体在4个性状上均没有显著差异。结果说明,纯系来源的DH后代经过诱导,

其自然加倍效率与相应的纯系相比没有显著差异。

2.4 不同诱导率后代单倍体雄穗自然加倍能力比较

试验(4)中部分情况下所测量性状均服从或近似正态分布,可以进行一般方差分析(表4)。利用4个具有不同诱导率的诱导系材料诱导郑单958得到

的单倍体进行雄穗自然加倍的结果统计比较,发现来源于不同父本诱导系诱导的单倍体其自然加倍效率在4个相关性状上都没有显著差异。说明不同诱导率的诱导系对单倍体育性恢复能力的大小没有显著影响。

表4 试验(4)比较结果
Table 4 Results of comparison for experiment (4)

性状 Trait	数据分布特征 Distribution	统计方法 Method	p 值 p-value
露药率	非正态	卡方测验	0.04*
露粉率	非正态	卡方测验	0.25
露药得分	正态	方差分析 F 测验	0.50
露粉得分	正态	方差分析 F 测验	0.67

注: *为 $p<0.05$ 。
Note: *, significance at $p<0.05$.

3 讨 论

玉米单倍体育种包括单倍体诱导、鉴别和加倍。随着新型诱导系的选育和单倍体鉴别效率的不断提高,玉米单倍体加倍技术成为DH育种中的关键环节。一般单倍体雌穗自然加倍率可以达到90%以上,单倍体雄穗自然加倍率仅仅不到10%,成为单倍体自然加倍的限制因素。对单倍体雄穗自然加倍遗传特性的深入研究有助于DH育种技术的改良与推广应用。研究表明,种质间的遗传差异是影响单倍体自然加倍的主要因素^[9],在此基础上还需要对单倍体自然加倍的其他几个关键的遗传特性进行研究分析,以便于育种家更好地结合自身的育种材料特点对DH技术加以充分利用。

单倍体的自然加倍主要受限于其雄穗的自然加倍能力,单倍体雄穗的自然加倍的表型特征与常规育种材料中雄性不育特征相似,雄性不育主要又分为核不育和核质互作的不育,因此有必要通过正反交实验设计对单倍体育性恢复的遗传特性进行研究。本实验通过对两对育性恢复能力不同的材料豫87-1和郑58以及4F1和郑58正反交F₁后代单倍体的育性恢复相关性状进行比较,发现正交与反交F₁后代单倍体的育性恢复并没有表现出显著差异,即高频材料和低频材料正交的F₁后代及反交的F₁后代单倍体育性恢复能力相当,说明单倍体育性恢复并不是受到细胞质基因的影响,而是由核基因所控制。

玉米单倍体主要是通过生物诱导途径获得的,即单倍体是由父本诱导系对母本材料进行诱导获得

的。以往的研究发现,在少量的后代单倍体中能检测到一些诱导系的渗入片段^[10, 11],因此亟待阐明诱导性状是否会对单倍体加倍产生影响。本研究利用不同诱导率诱导系对郑单958进行诱导,并对获得的单倍体自然加倍能力进行比较,发现不同诱导率诱导系产生的单倍体雄穗自然加倍相关性状并没有显著差异,说明诱导系对单倍体的自然加倍没有影响。

育种经验认为,经过多代加倍的种质材料其自然加倍能力会有所提升。本研究通过对自交系及其对应DH_n代来源的单倍体雄穗露药率、露粉率、露药得分和露粉得分进行比较分析,发现DH_n后代单倍体雄穗自然加倍能力没有发生显著的提高。研究和育种实践都发现,多次诱导的后代其雄穗自然加倍能力会有显著提高,其原因主要是种质材料存在一定差异。自然加倍研究以及田间育种实践主要是以杂交种材料作为基础进行研究,如果自然加倍是受到多个基因的调控,并且基础种质背景中控制自然加倍的位点往往也往往处于杂合状态,当这些杂合种质材料经过多代诱导之后,控制自然加倍的位点可能会随着诱导代数的增加发生聚合,导致了DH_n代的材料在自然加倍能力上往往会高于DH_{n-1}代。本研究所基于的种质材料与以往的实践经验有所不同,是基于自交系材料进行的比较,由于自交系材料所有位点基本纯合,因此即使经过多代诱导,所得到DH_n代材料其单倍体的自然加倍能力与其亲本自交系本身相比,不会存在遗传上的显著差异。通过这种比较进一步可以证明,单倍体自然加倍是一个数量性状,受到多个位点的调控^[12],而不是通过诱导后

的一些表观修饰导致多次加倍后加倍率增加。

参考文献:

- [1] 陈绍江. 作物育种工程化与工程化育种思考[J]. 作物杂志, 2013 (6): 1-4.
Chen S J. Crop breeding engineering and engineered breeding[J]. Crops, 2013(6): 1-4. (in Chinese)
- [2] Kleiber D, Prigge V, Melchinger A E, et al. Haploid fertility in temperate and tropical maize germplasm[J]. Crop Science, 2012, 52(2): 623-630.
- [3] Chase S S. Monoploids and monoploid derivatives of maize(*Zea mays* L)[J]. The Botanical Review, 1969, 35(2): 117-167.
- [4] Geiger H H, Gordillo G A. Doubled haploids in hybrid maize breeding[J]. Maydica, 2009, 54(4): 485-499.
- [5] Xu X, Li L, Dong X, et al. Gametophyte and zygotic selection leads to segregation distortion through in vivo induction of maternal haploid in maize[J]. J. Exp. Bot., 2013, 64(4): 1083-1096.
- [6] 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.
Liu Z Z, Song T M. Correlation analysis between induction of maize parthenogenesis haploid in vivo and intersperm nucleus distances in pollen tubes germinating in vitro of male parent[J]. Acta Bot Bore-al-Occident Sin, 2000, 20(4): 495-502. (in Chinese)
- [7] Wu P H, Ren J J, Li L, et al. Early spontaneous diploidization of maternal maize haploids generated by in vivo haploid induction[J]. Euphytica, 2014, 200(1): 127-138.
- [8] SAS Institute. SAS version 9.3. SAS Institute, Cary, NC. 2011.
- [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] Li L, Xu X, Jin W, et al. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize[J]. Planta, 2009, 230(2): 367-376.
- [11] Zhao X, Xu X, Xie H X. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers[J]. Plant Physiology, 2013, 163(2): 721-731.
- [12] Hallauer A R, Carena M J, Miranda J B. Quantitative genetics in maize breeding[J]. Springer Science and Business Media, LLC, New York, NY. 2010.

(责任编辑:李万良)

《东北农业科学》征订启事

《东北农业科学》(原《吉林农业科学》)是吉林省农业科学院主办的农业综合类学术期刊。本刊融学术性、技术性、信息性和知识性于一体,是理论与实践相结合、普及与提高并重的刊物。旨在报道最新农业科研成果、研究进展和科技动态,传播农业科学知识,推广农业新品种和新技术,介绍农业生产新经验等。辟有作物育种栽培、生物技术、土壤肥料、植物保护、畜牧兽医、园艺果树、农业经济和农产食品加工等栏目。

本刊是中国科技论文统计源期刊、中国期刊全文数据库全文收录期刊、中国核心期刊(遴选)数据库期刊、中文科技文献检索权威期刊、中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊,2004年获全国优秀农业期刊奖,2006年获第五届全国农业期刊金犁奖学术类二等奖。《东北农业科学》面向全国公开发刊,主要为各图书情报部门的中文期刊采购和读者需求服务,为广大农民朋友、农业科研人员、农业技术推广人员、农业生产管理者和农业院校师生服务。

《东北农业科学》为双月刊,逢双月25日出版,刊号:CN22-1376/S,大16开112页,每期定价8.00元,全年48.00元。邮发代号:12-71,全国各地邮局(所)均可订阅,漏订者亦可随时向本刊编辑部订阅,不另收邮费。

电 话: 0431-87063151

E-mail: jlnyx@163.com jlnyx@cjaas.com

通讯地址: 吉林省长春市生态大街1363号《东北农业科学》编辑部

邮政编码: 130033