

## 21份玉米单倍体诱导系遗传背景及诱导率分析

王薪淇, 岳尧海, 董亚琳, 孟令聪, 路明, 周德龙, 孙传波\*

(吉林省农业科学院/玉米国家工程实验室(长春)/国家玉米工程技术研究中心(吉林)/农业部东北中部玉米生物学与遗传育种重点实验室/吉林省农作物育种南繁基地开放实验室, 长春 130033)

**摘要:**为明确改良和应用不同血缘背景诱导系,本研究选用21个外引及自选诱导系,采用基于Geno Plexs多重PCR的1K SNP标记进行基因分型并应用层次聚类法进行类群划分,同时以先玉335和3份糯玉米杂交种为母本进行杂交诱导,用以评判诱导系的诱导能力。结果表明,21份诱导系被划分为3类血缘,分别是Stock6为代表的类群I、吉诱101代表的类群II和农大高诱系列代表的类群III;类群II平均诱导率显著高于类群III和类群I,自选系WY7在选育过程中相比于背景诱导系产生了诱导率增益,WY7和W7-4可用于诱导糯玉米。

**关键词:**诱导系;诱导率;聚类分析;吉诱101

中图分类号:S513

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2019)06-0010-04

### Analysis of Genetic Background and Inducing Rate of 21 Haploid Inducers

WANG Xinqi, YUE Yaohai, DONG Yalin, MENG Lingcong, LU Ming, ZHOU Delong, SUN Chuanbo\*

(Jilin Academy of Agricultural Sciences/National Engineering Laboratory For Maize(Changchun)/National Engineering Research Center for Maize(Jilin)/Key Laboratory Biology and Genetic Improvement of Maize in Northeast Region, Ministry of Agriculture/Jilin Provincial Open Laboratory of Crop Breeding in Hainan Base, Changchun 130033, China)

**Abstract:** In order to improve and apply the haploid inducers of different blood backgrounds clearly, in this study, 21 introduced and self-selective haploid inducers were selected, and Geno Plexs multiplex PCR-based 1K SNP markers were used for genotyping and hierarchical clustering was used for group classification. 'Xianyu 335' and 3 waxy hybrids were used as a female parent to induce hybridization to judge the inducing ability of the haploid inducers. The results showed that 21 induction lines were classified into three types of blood, among which group I represented by Stock6, group II represented by 'Jiyou 101', and group III represented by the CAUHO. The average inducing rate of group II was significantly higher than group III and group I. The self-selected lines 'Jiyou 101' and WY7 produced an induction rate gain compared to the background haploid inducers during the selection process. WY7 and W7-4 can be used to induce waxy corn.

**Key words:** Haploid inducers; Inducing rate; Clustering analysis; Jiyou 101

单倍体技术(Doubled Haploid)作为现代玉米育种核心技术之一,可快速纯合杂合个体并获得纯系,缩短育种年限<sup>[1]</sup>。该技术是基于Stock6<sup>[2]</sup>等孤雌生殖诱导系的发现及应用,即以诱导系为父

本,采用杂交的方式在F<sub>1</sub>后代获得一定比例的单倍染色体个体,并采用化学、自然等方式加倍单倍体<sup>[3]</sup>,进而获得纯合DH系。研究表明,单倍体育种效率(即诱导率和加倍率)的影响因素非常复杂,包括外界环境、植株条件及遗传差异等,提高诱导系诱导率是提升单倍体育种效率最为直接有效的方法。

近年来,我国从德、法、俄、美等国家引入多份不同血缘背景的诱导系材料<sup>[4-5]</sup>,以这些外引材料为基础,国内多家科研单位开发选育出新型高频诱导系以提升单倍体育种效率,如中国农业大学的高诱系列<sup>[6]</sup>,吉林省农业科学院的吉高诱3和吉

收稿日期:2019-04-01

基金项目:吉林省农业科学院创新工程项目(CXGC82018ZY017、C92071513);吉林省农业科技创新工程项目-博士后基金(c92071510)

作者简介:王薪淇(1989-),男,助理研究员,博士,研究方向:特用玉米育种。

通讯作者:孙传波,男,硕士,副研究员,E-mail: chuanbosun@163.com

诱 101<sup>[7-8]</sup>、辽宁省农业科学院的辽诱系列<sup>[9]</sup>等,诱导率也由原始材料 Stock6 的 2% 左右提升至 10% 以上<sup>[7]</sup>。优良诱导系除了诱导率较高外,还需具有较强的 Navajo 显色反应即糊粉层和胚紫色标记明显<sup>[10]</sup>,以及抗倒伏、花粉量大、结实性好、生育期适中特性<sup>[11]</sup>。系谱法选育诱导系的过程较为繁琐,诱导率测定需耗费大量人力,单倍体诱导系测验种黄绿苗自交系<sup>[12]</sup>的发现为诱导率评估提高了效率。然而,由于对诱导系遗传背景的剖析不足,导致诱导系选育工作盲目、低效,近缘材料杂交无法聚合更多有利基因,进而导致改良效果不

佳,故本研究对 2010~2018 年外引及自选的诱导系进行遗传基础剖析,以期明确现有诱导系间亲缘关系,为筛选及创制诱导系提供指导方向。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

以 2010~2018 年引入的农大高诱 5 号(引自中国农业大学)、Stock6 等及自主选育的共计 21 个诱导系作父本,以先玉 335(PH6WC/PH4CV)为母本,进行杂交诱导。诱导系名称及血缘信息见表 1。

表 1 父母本名称及血缘

编号	名称	血缘	编号	名称	血缘
1	JWY1	农大高诱 1	12	JWY-A2	美国外引
2	JWY2	农大高诱 2	13	JWY-A3	美国外引
3	JWY3	农大高诱 3	14	吉诱 101	俄罗斯外引/农大高诱 1
4	JWY4	农大高诱 4	15	JWY-A7	美国外引
5	JWY-R1	俄罗斯外引	16	JWY7	Ho13-H3
6	JWY-L1	国内外引	17	JWY-A4	美国外引
7	JWY5	农大高诱 5	18	JWY-A5	美国外引
8	JWY-R2	俄罗斯外引	19	JWY-A6	美国外引
9	JWY6	Stock6	20	W7-4	Stock6/吉诱 101//农大高诱 5(自选)
10	JWY-R3	俄罗斯外引	21	WY7	俄罗斯外引/农大高诱 1//Stock6(自选)
11	JWY-A1	美国外引			

### 1.2 遗传背景分析

于 2018 年 5 月采集 21 份诱导系植株叶片,使用 CTAB 法<sup>[13]</sup>提取基因组 DNA,采用基于 Geno Plexs 多重 PCR 的 1K SNP 标记进行基因分型,通过层次聚类法(HC)<sup>[14]</sup>构建树状聚类图。

### 1.3 杂交诱导试验

21 份诱导系及 4 份杂交种(先玉 335、京科糯 2000、垦粘 1 号、佳糯 26)于 2018 年 5 月种植于吉林省农业科学院公主岭试验基地,每个父本材料种植 6 行,分 3 期种植(母本同期、晚母本 6 天、晚母本 12 天);先玉 335 种植 100 行,每个糯玉米杂交种种植 2 行,诱导系种植采用随机区组设计,3 次重复,所有试验材料种植株距 25 cm,行距 63 cm,5 m 行长。杂交诱导于母本吐丝 3~4 d 后或花丝长度达 8 cm 以上时进行<sup>[15]</sup>,每个试验材料杂交 8~10 穗,收获后基于 Navajo 标记进行观察鉴定单倍体<sup>[16]</sup>,单倍体诱导率为准单倍体子粒数占成功诱导总子粒数的百分比。

### 1.4 统计方法

利用软件 Excel 2007 和 DPS 7.1 进行数据分析

和计算<sup>[17]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 诱导系遗传背景分析

对 21 个诱导系进行基于层次聚类法的聚类分析,结果如图 1 所示。29 个供试材料可划分为三大类群,类群 I 中包含以 Stock6(JWY6)为代表

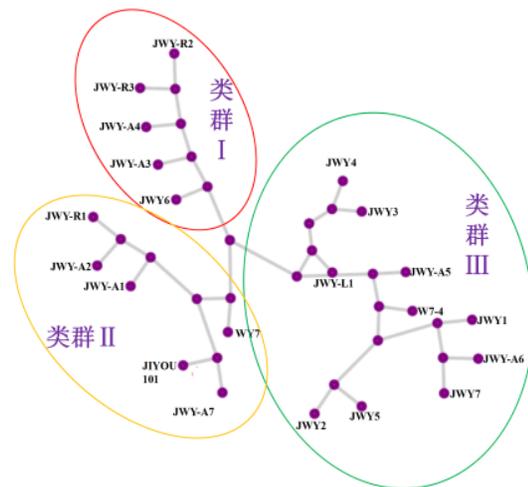


图 1 21 份诱导系 HC 聚类分析

的5个诱导系;类群Ⅱ包含以吉诱101为代表的6个诱导系;类群Ⅲ包含农大高诱系列及高油诱导系Ho13-H3(JWY7)在内的10个诱导系,验证了自选系W7-4具有农大高诱5遗传背景的事实以及类群划分的准确性;结果显示,俄罗斯外引系(JWY-R2、JWY-R2)及美国外引系(JWY-A3、JWY-A4)可能是来源于Stock6的改良系;吉诱101的遗传背景可能偏近于俄罗斯外引系JWY-R1。

以Stock6为对照,对其余20份诱导系与Stock6的基因型差异程度进行分析,结果如表2所示。农大高诱3号、农大高诱4号与Stock6基因型差异最小,分别为0.175和0.176,国内外引系JWY-L1与Stock6基因型差异最大(0.358),基因型差异分布如图2所示。不同类群诱导系与

Stock6的基因型差异均值比较结果如表2所示,类群Ⅰ<类群Ⅲ<类群Ⅱ,差异不显著。

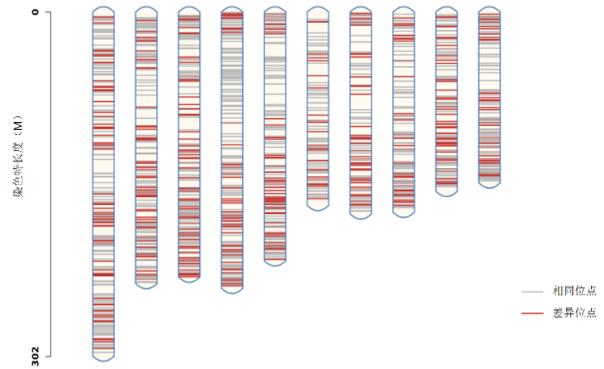


图2 JWY-L1与Stcok6的差异基因型分布图

表2 诱导系与Stock6基因型差异分析

样本	差异	样本	差异	样本	差异
类群Ⅰ		类群Ⅱ		类群Ⅲ	
JWY-A3	0.236	JWY7	0.294	JWY3	0.175
JWY-A4	0.278	吉诱101	0.298	JWY4	0.176
JWY-R2	0.285	JWY-A1	0.299	JWY1	0.276
JWY-R3	0.301	JWY-A2	0.300	JWY-A6	0.283
		JWY-R1	0.303	JWY5	0.284
		JWY-A7	0.281	W7-4	0.288
				JWY2	0.289
				WY7	0.327
				JWY-A5	0.347
				JWY-L1	0.358
均值	0.275 aA		0.296 aA		0.280 aA

2.2 诱导率测定及分析

对21个诱导杂交组合进行诱导率评价,诱导率基本统计分析、方差分析及诱导系间平均诱导率差异显著性测验结果列于表3~表5,结果表

表3 诱导率基本统计分析

变异范围(%)	均值(%)	标准差(%)	变异系数
0.8~9.6	5.68	2.02	0.36

明,所有杂交组合诱导率均值为5.68%,变异系数0.36,诱导率变异范围为0.8%~9.6%;诱导率方差分析结果表明,诱导系间诱导率达到极显著差异水平,表明不同遗传背景诱导系的诱导率具有显著差异;不同诱导系间平均诱导率差异显著性测验结果表明,农大高诱5号的诱导率最高

(9.94%),国内外引系JWY-L1诱导率最低(1.27%),生育期过晚导致错过诱导最佳时期可能是造成该结果的主要原因,自选诱导系WY7和W7-4诱导率相对较高,平均达7.01%,WY7的改良过程中相比于原有诱导系(俄罗斯外引/农大高诱1/Stock6)产生了明显的诱导率增益;不同类群诱导系间平均诱导率差异显著性分析结果如表6所示,类群Ⅱ平均诱导率最高(6.70%)显著高于类群Ⅲ(5.41%)和类群Ⅰ(5.01%)。

利用WY7和W7-4对3份糯玉米杂交种进行杂交诱导,结果(表7)表明WY7和W7-4诱导糯玉米杂交种同样保持较高诱导率水平,W7-4平均诱导率(8.90%)略高于WY7(7.92%),说明两份自选诱导系WY7和W7-4可用于诱导糯玉米种质。

表4 诱导率方差分析

变异来源	DF	SS	MS	F Value	P Value
重复间	0.29	2	0.15	0.26	0.78
诱导系间	420.62	20	21.03	36.51	0.00
误差	23.04	40	0.58		
总变异	443.95	62			

表5 不同诱导系间平均诱导率差异显著性测验

诱导系	诱导率均值(%)	差异显著性	
		0.05	0.01
JWY5	9.94	a	A
吉诱101	9.06	ab	A
JWY7	8.36	b	AB
WY7	7.02	c	BC
W7-4	7.00	c	BC
JWY-A3	6.13	cd	CD
JWY-A7	6.00	cde	CD
JWY-R2	5.77	def	CD
JWY-A2	5.73	def	CD
JWY-R3	5.69	def	CD
JWY4	5.63	def	CD
JWY-A1	5.57	def	D
JWY-R1	5.43	def	D
JWY-A6	5.43	def	D
JWY-A5	5.23	def	D
JWY3	5.06	ef	D
JWY-A4	4.86	f	DE
JWY2	3.83	g	EF
JWY1	3.53	g	FG
JWY6	2.55	h	G
JWY-L1	1.27	i	H

表6 不同类群诱导系间平均诱导率差异显著性测验

诱导系类群	诱导率均值(%)	差异显著性	
		0.05	0.01
类群II	6.70	a	A
类群III	5.41	ab	A
类群I	5.01	b	A

表7 WY7和W7-4对糯玉米品种的诱导率 %

诱导系名称	京科糯2000	垦粘1号	佳糯26	平均
WY7	7.95 aAB	7.30 bB	8.50 aA	7.92
W7-4	9.80 aA	7.70 cC	9.21 bB	8.90

### 3 讨论

本研究基于1K SNP标记对18份外引诱导系和3份自选诱导系进行基因分型,相比于李高科

等<sup>[18]</sup>基于24对SSR引物的类群划分,结果更为精确。近年来,随着单倍体技术应用的日趋成熟,高频诱导系成为提升单倍体育种效率的关键角色,前人针对不同血缘的诱导系做了大量的实践工作<sup>[19-22]</sup>,且大部分研究均表明农大高诱5号诱导率表现突出<sup>[12,23]</sup>,本研究结果中,同样说明了农大高诱5号及其改良系表现了较高的诱导率水平,Zhong等<sup>[24]</sup>以农大高诱5号为实验材料,发现ZmDMP基因中T/C的基因型差异导致诱导率的显著差异,本研究仅利用分子标记技术来简要剖析诱导系间亲缘关系及其诱导能力,参试诱导系中高频诱导率与低频诱导率个体间是否存在ZmDMP基因中的目标碱基差异还有待后续试验验证。

诱导率的形成因素不单单受控于诱导系自身,还极易受到母本遗传基础的影响<sup>[25-27]</sup>,本研究仅对参试诱导系的诱导率进行初步评价(对先玉335的杂交诱导),无法全面、客观地评价其真实诱导能力,而且鉴于当前特用玉米亟需构建完整且高效的单倍体育种技术体系,WY7和W7-4虽可满足糯玉米种质诱导需求,但仍因个别母本遗传背景影响导致糊粉层显色弱而不易识别,且诱导率有待提高,故笔者拟在后续的试验中对来自不同血缘的常规玉米以及糯玉米、甜玉米等进行系统的诱导能力评估,旨在筛选或改良出适合不同类型或不同血缘的专用型诱导系。

### 参考文献:

- [1] 陈绍江,黎亮,李浩川,等.玉米单倍体育种技术(第1版)[M].北京:中国农业大学出版社,2009:60.
- [2] Coe, E H. A line of maize with high haploid frequency. Am. Nat. 1959, 93: 381-382.
- [3] 岳尧海,王敏,张志军,等.玉米单倍体加倍效果的研究[J].吉林农业科学,2011,36(5):9-12.
- [4] Chalyk S T. Obtaining fertile pollen in maize maternal haploids [J]. Maize Genet Coop Newslett, 2000, 74: 17-18.
- [5] Chalyk S T. Creating new haploid-inducing lines of maize[J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1999, 73: 53.
- [6] 李浩川,曲彦志,杨继伟,等.玉米生物诱导孤雌生殖单倍体影响因素研究进展[J].中国农学通报,2015,31(3):239-243.

(下转第32页)

本研究通过水稻穗顶部颖花退化 T-DNA 插入突变体的分子鉴定及表型特征分析,证明了 *paa1* 和 *paa2* 为穗顶部颖花退化突变体, *LOC\_Os04g56160* 为水稻穗顶部颖花退化调控基因,该结果为进一步研究水稻穗顶部颖花退化机理奠定了基础。*paa1* 和 *paa2* 的穗顶部颖花退化表型与气孔开关和密度相关调控基因的作用机制及 *LOC\_Os04g56160* 基因的生物学功能有待于进一步深入研究。

### 参考文献:

- [ 1 ] Bai J, Zhu X, Wang Q, et al. Rice *TUTOU1* Encodes a Suppressor of cAMP Receptor-Like Protein That Is Important for Actin Organization and Panicle Development[J]. *Plant Physiol*, 2015, 169(2): 1179-1191.
- [ 2 ] Rao Y, Yang Y, Xu J, et al. *EARLY SENESCENCE1* Encodes a SCAR-LIKE PROTEIN2 That Affects Water Loss in Rice[J]. *Plant Physiol*, 2015, 169(2): 1225-1239.
- [ 3 ] Heng Y, Wu C, Long Y, et al. *OsALMT7* Maintains Panicle Size and Grain Yield in Rice by Mediating Malate Transport[J]. *Plant Cell*, 2018, 30(4): 889-906.
- [ 4 ] Wang Q L, Sun A Z, Chen S T, et al. *SPL6* represses signalling outputs of ER stress in control of panicle cell death in rice[J]. *Nat Plants*, 2018, 4(5): 280-288.
- [ 5 ] 邱 杨. 水稻显性矮秆和穗退化基因的精细定位[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [ 6 ] 李红平. 水稻顶端穗退化 *tsr* 突变体的基因定位及候选基因的克隆[D]. 福州: 福建农林大学, 2015.
- [ 7 ] 侯飞雪, 彭永彬, 韩小行, 等. 水稻穗顶退化突变体 *paa1331* 的鉴定及基因定位[J]. *科学通报*, 2018, 63(31): 3192-3203.
- [ 8 ] Akter M B, Piao R, Kim B, et al. Fine mapping and candidate gene analysis of a new mutant gene for panicle apical abortion in rice[J]. *Euphytica*, 2014, 197(3): 387-398.
- [ 9 ] Toda Y, Wang Y, Takahashi A, et al. *Oryza sativa* H<sup>+</sup>-ATPase (*OSA*) is involved in the regulation of dumbbell-shaped guard cells of rice[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2016, 57(6): 1220-1230.
- [ 10 ] 王晓雪, 邢 飞, 杨 峰, 等. 耐盐碱基因 *OsMYB56* 转化水稻的研究[J]. *东北农业科学*, 2016, 41(3): 31-36.
- [ 11 ] 刘宪虎, 许明子, 李美善, 等. 水稻光温敏核不育基因的分子标记定位研究[J]. *吉林农业科学*, 2013, 38(3): 25-30.
- [ 12 ] 包婉莹, 仲晓芳, 杜 茜, 等. 抗病转基因大豆事件 B4J8049 外源 T-DNA 整合位点分析及特异性检测[J]. *东北农业科学*, 2018, 43(5): 21-26.
- [ 13 ] Jin Y M, Won S Y, Jeon H, et al. Identification and molecular characterization of a *low acid phosphatase 3 (lap3)* mutant based on the screening of an Arabidopsis activation-tagged population [J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2011, 5(1): 45-51.
- [ 14 ] An S, Park S, Jeong D H, et al. Generation and analysis of end sequence database for T-DNA tagging lines in rice[J]. *Plant physiology*, 2003, 133(4): 2040-2047.
- [ 15 ] 才 卓, 徐国良, 刘向辉, 等. 玉米高频率单倍生殖诱导系吉高诱 3 号的选育[J]. *玉米科学*, 2007, 15(1): 1-4.
- [ 16 ] 岳尧海, 路 明, 张建新, 等. 玉米单倍体高频诱导系吉诱 101 号的选育[J]. *作物杂志*, 2017(3): 35-38.
- [ 17 ] 刘欣芳, 马 骏, 齐 欣, 等. 辽诱系列玉米单倍体诱导系的选育 [J/OL]. *玉米科学*: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1201.S.20181218.1618.002.html>.
- [ 18 ] 张俊雄, 武占元, 宋 鹏, 等. 玉米单倍体种子胚部特征提取及动态识别方法[J]. *农业工程学报*, 2013, 29(04): 199-203.
- [ 19 ] 钟 成. 新选玉米单倍体诱导系生态适应性评价与遗传多样性分析[D]. 成都: 四川农业大学, 2015.
- [ 20 ] 刘文国, 路 明, 赵万庆, 等. 玉米新型诱导系测验种 JL-H1 的选育[J]. *现代化农业*, 2015(12): 6-8.
- [ 21 ] 王 伟, 杨文鹏, 关 琦, 等. SSR 分子标记技术操作规程的优化[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(11): 4459-4464, 4493.
- [ 22 ] 李 飞. 基于层次聚类的生物数据特征选择算法的研究与实现[D]. 吉林大学, 2019.
- [ 23 ] 李向永, 姜 龙, 王薪淇, 等. 糯玉米单倍体诱导和加倍的研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2016, 44(8): 90-96.
- [ 24 ] Chase S S. Monoploids and Monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.) [J]. *Bot Review*, 1969, 35: 117-167.
- [ 25 ] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学技术出版社, 2002: 304-311.
- [ 26 ] 李高科, 毛笈华, 李春艳, 等. 28 份玉米单倍体诱导系的诱导率表现及聚类分析[J]. *玉米科学*, 2016, 24(4): 24-29.
- [ 27 ] 刘培勋, 刘和平, 罗仁革, 等. 单倍体诱导技术在玉米育种中的应用[J]. *种子*, 2014, 35(5): 49-52.
- [ 28 ] 杨美丽, 王瑞英, 陈志梅, 等. 玉米不同基因型诱导系诱导效果研究及应用[J]. *中国农学通报*, 2017, 33(4): 21-24.
- [ 29 ] 王 蕊, 周联东, 王铁固, 等. 玉米单倍体诱导系 XKY-1 和 XKY-2 的选育研究[J]. *现代农业科技*, 2018(13): 34-35.
- [ 30 ] 刘 坚, 方 芳, 徐 洁, 等. 用单倍体诱导系诱导糯玉米单倍体[J]. *四川农业大学学报*, 2009, 27(1): 47-50.
- [ 31 ] 徐 辉, 姜 龙, 陈殿元, 等. 不同玉米单倍体诱导系之间杂交组合诱导性状的杂种优势研究[J]. *种子*, 2018, 37(11): 21-25.
- [ 32 ] Zhong Y, Liu C, Qi X, et al. Mutation of *ZmDMP* enhances haploid induction in maize[J]. *Nature plants*, 2019, 5(6): 575.
- [ 33 ] 刘传兵, 王黎明, 朱祥芬, 等. 玉米单倍体诱导系及其杂交种对不同类型 F1 的诱导率评价与应用[J]. *湖北农业科学*, 2015, 54(18): 4398-4400, 4411.
- [ 34 ] Rotareno V, Dicu G, armaniu M, 等. 玉米杂交诱导单倍体机理探析[J]. *玉米科学*, 2010, 18(6): 27-30.
- [ 35 ] 焦仁海, 徐艳荣, 代秀云, 等. 玉米单倍体诱导系诱导率研究[J]. *吉林农业科学*, 2015, 40(2): 1-3.

(上接第 13 页)