

宫捷, 孙磊磊, 张丽萍, 等. 甜糯双隐性基因型玉米种质的创制与评价[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(2): 6-13.
GONG Jie, SUN Leilei, ZHANG Liping, et al. Creation and evaluation for corn germplasm of double recessive sweet-waxy genotype[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(2): 6-13.

甜糯双隐性基因型玉米种质的创制与评价

宫捷[†], 孙磊磊[†], 张丽萍, 王青峰, 杨瑞春, 李小琴, 冯发强
(华南农业大学农学院/广东省植物分子育种重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】创制甜糯基因双隐性玉米自交系, 了解甜糯基因双隐性对品质性状的影响, 为甜糯玉米育种提供参考和依据。【方法】以 1 份甜玉米 *Zea mays* ssp. *saccharata* 骨干自交系 (M01) 和 3 份糯玉米 *Z. mays* var. *ceratina* 自交系 (L33、L35 和 L38) 为材料, 用与糯玉米隐性基因 *wx* 紧密连锁的分子标记辅助筛选, F₂ 代得到甜糯双隐性玉米材料, 连续自交, F₄ 代得到 11 个纯合甜糯双隐性玉米自交系, 检测其可溶性糖含量、淀粉含量及乳熟期籽粒果皮厚度, 并与对应的甜、糯玉米亲本进行比较分析。【结果】与 *wx* 基因紧密连锁的引物 phi061 在甜、糯玉米亲本间扩增出清晰且呈共显性的条带, 可在 F₂ 代作为糯质基因的前景选择标记。11 份甜糯双隐性自交系材料的可溶性糖质量分数平均为 12.27%, 比甜玉米亲本高 2.55%, 远高于糯玉米亲本; 淀粉质量分数平均为 19.73%, 比甜玉米亲本低 3.77%, 远低于糯玉米亲本; 乳熟期籽粒冠部和背胚部果皮厚度均介于对应的杂交亲本之间。【结论】通过分子标记辅助选择可快速创制甜糯纯合双隐性玉米材料, 其可溶性糖含量高于甜质亲本, 淀粉含量低于甜质亲本, 果皮厚度介于双亲之间。

关键词: 甜糯玉米; 分子标记辅助选择; 可溶性糖; 淀粉; 果皮厚度
中图分类号: S513 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2019)02-0006-08

Creation and evaluation for corn germplasm of double recessive sweet-waxy genotype

GONG Jie[†], SUN Leilei[†], ZHANG Liping, WANG Qingfeng, YANG Ruichun, LI Xiaoqin, FENG Faqiang
(College of Agriculture, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To create double recessive sweet-waxy corn inbred lines, identify the effects of double recessive sweet-waxy genes on quality traits, and provide a reference and basis for sweet-waxy corn breeding. 【Method】The double recessive sweet-waxy corn materials with *wxwxsh₂sh₂* genotype were screened by molecular marker that linked with waxy corn recessive gene *wx* in F₂ populations obtained from one elite sweet corn line (M01) and three waxy corn lines (L33, L35 and L38). Then these materials were self-pollinated continuously, and 11 pure double recessive sweet-waxy corn inbred lines with *wxwxsh₂sh₂* genotype were obtained in F₄ populations. Their soluble sugar content, total starch content and pericarp thickness were measured and compared with the corresponding sweet corn parent and waxy corn parent. 【Result】The primer phi061, which was tightly linked to *wx* gene, amplified clear and codominant bands between sweet corn parent and waxy corn parent and was selected as the foreground selection marker of waxy gene. The average content of soluble sugar was 12.27% for double recessive sweet-waxy corn inbred lines, which was 2.55% higher than that

收稿日期: 2018-06-12 网络首发时间: 2019-01-30 09:10:00
网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20190129.1006.008.html>
作者简介: 宫捷 (1995—), 女, 硕士研究生, E-mail: 550587421@qq.com; 孙磊磊 (1989—), 男, 硕士研究生, E-mail: 361385400@qq.com; [†]对本文贡献相同; 通信作者: 冯发强 (1976—), 男, 助理研究员, 博士, E-mail: fengfq@scau.edu.cn
基金项目: 广东省科技计划项目 (2015A020209113, 2017B090907023); 广州市科技计划项目 (201607010248)

sweet corn parent and far higher than that waxy corn parent. The average total starch content was 19.73%, which was 3.77% lower than that sweet corn parent, and far lower than that waxy corn parent. The pericarp thicknesses of crown and abgerminal regions of double recessive maize lines were in the interval of their corresponding parents. 【Conclusion】 It is a feasible way to create rapidly the double recessive sweet-waxy corn lines by molecular marker assisted selection. Their average content of soluble sugar is higher than that of sweet corn parent, the average content of starch is lower than that of sweet parent, and the average pericarp thickness is between their parents.

Key words: sweet-waxy corn; molecular marker-assisted selection; soluble sugar; starch; pericarp thickness

甜、糯玉米是世界上非常重要的鲜食玉米类型,其产量和产值均位居蔬菜作物前列。甜、糯玉米是广东省具有优势和特色的农作物,经济效益高,已形成重要的产业^[1],至 2014 年,甜玉米种植面积已增至 22.0 万 hm²,产量为 310.2 万 t,分别占全国甜玉米种植面积的 66.1% 和产量的 62.1%^[2]。经过多年的发展,我国已成为全球最大的鲜食玉米种植国、生产国、加工国和消费国,据 2016 年统计,全国鲜食玉米总种植面积达 133.33 万 hm²,其中糯玉米 80 万 hm²,甜糯玉米 13.33 万 hm²,甜玉米 40 万 hm²^[3]。

甜玉米由控制胚乳碳水化合物转化的一个或多个相关基因发生隐性突变形成,是隐性胚乳突变体。迄今为止,世界范围内已发现多个玉米胚乳隐性突变体基因,如 *su*₁、*su*₂、*sh*₁、*sh*₂、*bt*₁、*bt*₂、*se* 等^[4]。在灌浆期和乳熟期,这些突变体基因可以使胚乳中淀粉合成受阻,从而使籽粒中可溶性糖大量积累,淀粉则显著减少。糯玉米起源于我国西南地区的西双版纳和广西亚热带地区,由普通玉米中的 *wx* 基因发生隐性突变形成^[5],其淀粉由 95%~100% 的支链淀粉组成,具有较强的黏性和糯性,果穗成熟后呈非透明、无光泽的蜡质状,所以糯玉米也被称作蜡质玉米。

随着经济的持续发展和生活水平的提高,人们对鲜食玉米需求量增加的同时,对其品质也提出了更高要求,出现了一种新的鲜食玉米类型,即甜加糯型鲜食玉米。甜加糯玉米最早由著名玉米育种家谢孝颐先生提出,利用糯玉米与甜玉米杂交分离出糯超甜双隐性株系,再与糯玉米杂交可收获包含糯与甜糯 2 种籽粒类型的新型玉米^[6-7]。甜加糯型玉米表现为同一果穗上既有甜玉米籽粒也有糯玉米籽粒,兼有甜、糯 2 种口味,市场份额逐年上升^[8-9]。

wx 基因和其他多个胚乳隐性基因间存在互作, *ae*、*du* 和 *wx* 3 个基因隐性纯合时蔗糖含量高达 23.7%,但它们单独存在时蔗糖累积很少, *su* 和 *wx* 双基因隐性纯合时可溶性糖高达 47.5%^[10]。李新海等^[11]报

道,3 对 SSR 引物 *phi022*、*phi027*、*phi061* 与糯玉米隐性基因 *wx* 紧密连锁,杨耀迥等^[12]利用这 3 对 SSR 引物进行分子标记辅助选择,成功选育出 9 个甜糯双隐性纯合自交系。本研究探索应用分子标记辅助育种技术快速选育甜糯双隐性玉米自交系的技术和方法,并对选育的甜糯双隐性基因玉米材料进行品质鉴定与评价,旨在提高甜糯玉米育种效率,为促进甜糯玉米育种提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

选用由华南农业大学农学院甜玉米课题组选育的 1 份甜玉米骨干系 M01(*sh*₂*sh*₂) 和 3 份糯玉米自交系 L33、L35 和 L38(*wxwx*) 为亲本材料,于 2013 年春季杂交得到 F₁ 代,2013 年秋季 F₁ 代种子自交获得 F₂ 代,果穗籽粒性状分离,表现为甜(*sh*₂*sh*₂)、糯(*wxwx*) 和普通(*wxsh*₂) 3 种玉米籽粒类型,表型为皱缩和非皱缩籽粒分离,选择皱缩籽粒留种。2014 年春季,选择 F₂ 种子中留种的皱缩籽粒播种,在苗期取幼嫩叶片提取全基因组 DNA,用 SSR 标记鉴定基因型为 *wxwxsh*₂*sh*₂ 的甜糯双隐性单株,挂牌并自交,获得甜糯双隐性基因型 F₃ 代种子。2014 年秋季种植 F₃ 代种子,选择表型相对一致的株系自交,得 11 个 F₄ 代甜糯双隐性基因型自交系。2015 年春,将这 11 个 F₄ 代甜糯双隐性自交系与甜、糯玉米亲本采用随机区组试验设计种植于华南农业大学增城试验基地,每个小区行长 2 m,宽 0.67 m,株距 0.3 m,行距 0.5 m,每个自交系种植 2 行,3 次重复,采用常规大田管理技术,于乳熟期检测籽粒可溶性糖含量、总淀粉含量及果皮厚度,并与亲本进行比较分析。

1.2 试剂

主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、Buffer、MgCl₂ 等均购自广州东盛生物科技有限公司,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.3 DNA 提取

于大喇叭口期采集 F₂ 代单株幼嫩叶片, 采用改良 CTAB 法^[13]提取叶片全基因组 DNA, 用 1×TE 稀释至 25 mg·L⁻¹, 于-20 ℃ 冰箱中保存备用。

1.4 引物及 PCR 反应体系

用于扩增 wx 基因的 SSR 引物引自前期研究^[11-12], 序列来源于 Maizegdb 网站 <http://www.maizegdb.org>, 引物序列详见表 1。PCR 反应通过 PTC-100TM 型 PCR 仪完成, 反应总体系为 20 μL^[14]: 50~60 ng·μL⁻¹ 的玉米材料基因组 DNA 2.00 μL, 10× PCR Buffer(含 Mg²⁺)2.00 μL, 25 mmol·L⁻¹ 的 dNTPs 1.20 μL, 2 U·μL⁻¹ 的 Taq 酶 0.50 μL, 30 ng·μL⁻¹ 的 Primer(Primer F 和 Primer R) 各 0.60 μL, ddH₂O 13.10 μL。PCR 扩增程序: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min, 引物 phi022、phi027 和 phi061 的退火温度分别为 57、60 和 61 ℃。

表 1 鉴定 wxwx 基因型的 3 个 SSR 引物序列
Table 1 The sequences of three SSR primers for wxwx genotype identification

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Primer sequence
phi022	F-TGCGCACCAGCGACTGACC
	R-GCGGGCGACGCTTCCAAAC
phi027	F-GCGTACGTACGACGAAGACAC
	R-CACAGCACGTTGCGGATTCTCT
phi061	F-AAACAAGAACGCGGTGCTGATTC
	R-GACGTAAGCCTAGCTCTGCCAT

1.5 乳熟期籽粒可溶性糖及淀粉含量检测

雌穗套袋控制授粉时间, 于授粉后 22 d, 11 个自交系株系和每份亲本材料取 3 个果穗, 用镊子或刀片剥取完好的玉米籽粒, 并选取大小相对一致的籽粒为试验材料。准确称取 20 g 玉米籽粒, 匀浆, 加入 20 mL 蒸馏水, 搅拌均匀后 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液。向离心管剩余的固体中添加 20 mL 蒸馏水, 搅拌均匀后再次 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 合并 2 次上清液, 移至 250 mL 容量瓶中定容, 制成玉米可溶性糖提取液。按照蒽酮法^[15]测定甜玉米籽粒中可溶性糖含量, 淀粉含量测定按照 NY/T 11—1985 标准^[16]进行。

1.6 鲜玉米籽粒果皮厚度的测量

套袋授粉 22 d 后, 每份材料取 3 个果穗, 每个果穗取中部 5 颗籽粒, 每颗籽粒分别取顶部和背胚

部 2 mm×2 mm 大小的果皮, 采用常规石蜡组织切片技术制片, 果皮取材后立即放入 FAA 固定液, 固定后经体积分数为 50%、70%、85%、95% 和 100% 的乙醇逐级脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 包埋, 切片, 展片, 染色和封片, 在 Primo Star 光学显微镜 (Zeiss, 德国) 400×下观察并拍照。

1.7 数据统计与分析

PCR 扩增结果有带记为 1, 无带记为 0, 采用 Excel 2007 进行 χ² 分析。可溶性糖及淀粉含量: 在波长 620 nm 下比色, 分别记录光密度值 (D_{620 nm}), 查标准曲线得知对应的葡萄糖质量 (m/μg), 用以下公式计算甜玉米籽粒中可溶性糖及淀粉含量:

$$w(\text{可溶性糖}) = km/10^6 M \times 100\%, \tag{1}$$

$$w(\text{淀粉}) = KD_{620\text{ nm}}/203LM \times 100\%, \tag{2}$$

式中: *k* 和 *K* 为稀释倍数; *M* 为样品质量, g; *L* 为比色管长度, dm。

果皮厚度在显微镜下测量 3 次, 取平均值, 精确到 1 μm。采用 Excel 2007 进行统计分析, 用 SAS V8.0 进行 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 wx 基因的功能标记筛选

对与糯玉米隐性基因 wx 紧密连锁的 3 对 SSR 引物 phi022、phi027、phi061 在 1 份甜玉米骨干系 M01 和 3 份糯玉米自交系 L33、L35 和 L38 之间进行多态性筛选 (图 1), 发现引物 phi022 和 phi027 在甜玉米和糯玉米亲本间表现无差异, 引物 phi061 的扩增条带清楚完整且差异明显, 表现为共显性, 因此选择引物 phi061 鉴定 3 个 F₂ 分离群体中的甜糯双隐性植株 (图 2)。由于引物 phi061 为共显性标记, 可以鉴定出 WxWx 显性纯合基因个体、Wxwx 杂合基因个体和 wxwx 隐性纯合基因个体, 由图 2 看出, 在来自杂交 L35×M01 的 F₂ 群体中与糯玉米亲本 L35 条带处于同一位置且仅为单带的共有 4 个单株 (泳道 1、8、11 和 12), 这 4 个单株的基因型为 wxwxsh₂sh₂, 仅对含有甜糯双隐基因的单株自交以减少工作量。

2.2 功能标记在 F₂ 代群体中的 χ² 分析

对 3 个 F₂ 群体后代中糯质基因的分离比例进行 χ² 分析 (表 2), 糯质隐性纯合植株与非隐性纯合植株的理论比例为 1:3。L33×M01 的 F₂ 代群体的 χ² 为 0.03, L35×M01 的 F₂ 代群体的 χ² 为 0.40, L38×M01 的 F₂ 代群体的 χ² 为 0.01, 其对应的概率

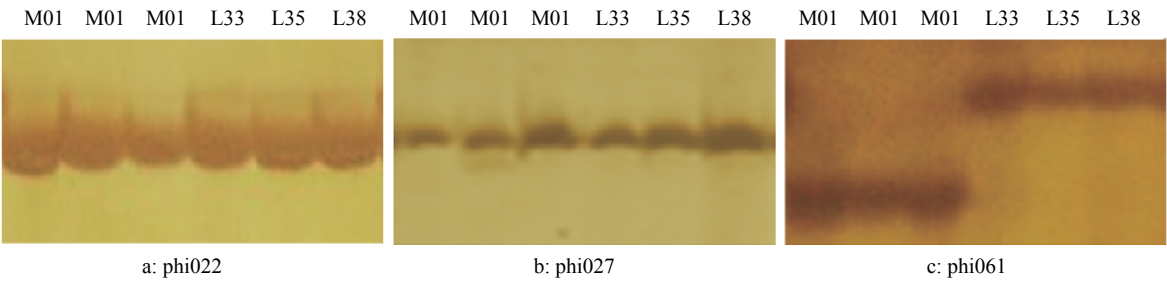
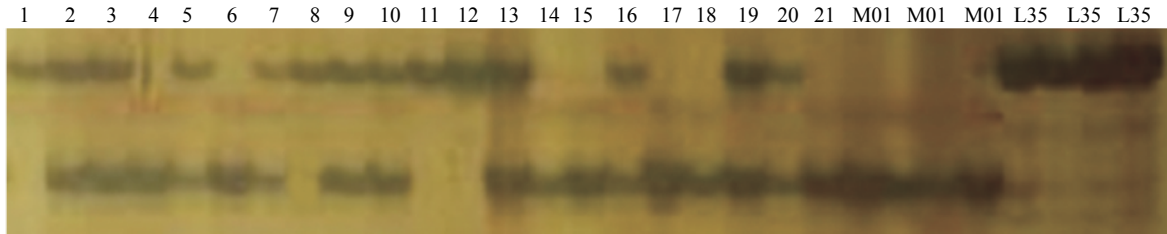


图 1 引物 phi022、phi027、phi061 在甜玉米自交系和糯玉米自交系之间的多态性筛选

Fig. 1 The polymorphism screenings between sweet corn line (M01) and wax corn lines (L33, L35 and L38) by phi022, phi027 and phi061 primers



1~21 为以 L35×M01 得到的 F₂ 群体全基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增产物, 其中 1、8、11 和 12 为双隐性纯合单株; M01: 甜玉米亲本, L35: 糯玉米亲本

From one to 21 indicate the PCR amplification products from F₂ population genomic DNA obtained from L35 × M01. 1, 8, 11 and 12 indicate their corresponded plants with double recessive sweet-waxy genotype; M01: Sweet corn parental line, L35: Waxy corn parental line

图 2 利用引物 phi061 鉴定 L35×M01 得到的 F₂ 群体中的双隐性植株

Fig. 2 The identifications of double recessive sweet-waxy plants by primer phi061 in F₂ populations obtained from L35×M01

表 2 引物 phi061 在 F₂ 代群体中的 χ^2 分析

Table 2 The chi-square analysis of primer phi061 in F₂ populations

杂交组合	植株总数量	甜糯双隐性植株数量	非甜糯双隐性植株数量	χ^2	<i>P</i>
Hybrid combination	Total plant number	No. of plants with <i>wxwxsh₂sh₂</i>	No. of plants with <i>Wx_sh₂sh₂</i>		
L33×M01	11	3	8	0.03	0.86
L35×M01	21	4	17	0.40	0.53
L38×M01	33	8	25	0.01	0.92

P 均大于 0.05, 差异不显著, 表明糯质基因的分离比例符合理论比例。以上结果显示 3 个分离世代基因型的分离比例均符合孟德尔遗传定律, 表明运用该功能标记对 3 个 F₂ 代群体隐性纯合单株的选择有效, 甜质基因与糯质基因间不存在连锁关系。在 3 个 F₂ 群体中成功鉴定出基因型为 *wxwxsh₂sh₂* 的甜糯双隐性纯合植株分别为 3、4 和 8 株, 共计 15 株, 经两代自交, 实际得到 11 个甜糯双隐性基因型自交系。

2.3 甜糯双隐性自交系材料的可溶性糖含量分析

F₄ 代甜糯双隐性自交系 L1~L11 及甜、糯质亲本可溶性糖含量测定结果如表 3 显示。11 份自交系材料的可溶性糖质量分数平均为 12.27%, 标准差平均为 1.61%, 变异系数平均为 0.13, 可溶性糖质量分数平均变幅为 8.65%~16.77%; 甜质亲本的

可溶性糖质量分数平均为 9.72%, 标准差平均为 0.67%, 变异系数平均为 0.07, 可溶性糖质量分数平均变幅为 9.25%~10.49%; 3 个糯质亲本的可溶性糖质量分数平均为 3.51%, 标准差平均为 0.86%, 变异系数平均为 0.25, 可溶性糖质量分数平均变幅为 1.15%~6.78%。11 份甜糯双隐性自交系材料的可溶性糖质量分数均高于对应的甜、糯质亲本, 其中质量分数最高的是株系 L6, 为 14.15%, 最低的是 L38, 为 1.64%。

对 11 份甜糯双隐性自交系与对应亲本的可溶性糖含量差异进行 *t* 检验, 结果如表 4 所示。除了株系 L2、L5 和 L8 外, 其余 8 份自交系的可溶性糖含量均显著高于甜质亲本 (*P*<0.05); 11 份自交系的可溶性糖含量均极显著高于糯质亲本 L33、L35 和 L38 (*P*<0.01)。

表 3 11 份甜糯双隐性自交系材料与甜、糯质亲本可溶性糖含量

Table 3 Soluble sugar contents in 11 double recessive sweet-waxy inbred lines and their parents

株系 Strain	材料来源 Material source	w(可溶性糖) ¹⁾ /%	标准差/% Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation	变幅/% Range
L1	L33×M01	13.44±1.63	2.82	0.21	11.03~16.54
L2	L33×M01	9.74±0.55	0.94	0.10	8.65~10.30
L3	L33×M01	12.04±1.02	1.76	0.15	10.00~13.08
L4	L35×M01	13.76±1.91	3.31	0.24	9.96~15.97
L5	L35×M01	10.73±1.01	1.74	0.16	8.95~12.43
L6	L35×M01	14.15±0.48	0.84	0.06	13.43~15.07
L7	L38×M01	13.88±1.45	2.51	0.18	12.27~16.77
L8	L38×M01	10.07±0.30	1.05	0.10	9.25~11.25
L9	L38×M01	12.42±0.29	0.50	0.04	11.89~12.87
L10	L38×M01	11.11±0.61	1.06	0.10	9.89~11.81
L11	L38×M01	13.59±0.69	1.19	0.09	11.25~14.49
M01	甜质亲本	9.72±0.39	0.67	0.07	9.25~10.49
L33	糯质亲本	3.76±0.35	0.60	0.16	3.08~4.19
L35	糯质亲本	5.13±0.85	1.48	0.29	3.97~6.78
L38	糯质亲本	1.64±0.51	0.51	0.31	1.15~2.18

1) 该列数据为平均值±标准误

1) Data in this column are average value ± standard error

表 4 11 份甜糯双隐性自交系材料与甜、糯质亲本可溶性糖含量差异 *t* 检验¹⁾

Table 4 The *t* test of differences in soluble sugar contents between 11 double recessive sweet-waxy inbred lines and their parents

株系 Strain	甜质亲本 Sweet parent		糯质亲本 Waxy parent	
	<i>t</i>	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
L1	3.14*	0.02	8.23**	<0.01
L2	0.04	0.97	13.07**	<0.01
L3	3.02*	0.02	7.37**	<0.01
L4	2.93*	0.03	5.84**	<0.01
L5	1.33	0.23	6.01**	<0.01
L6	10.12**	<0.01	31.23**	<0.01
L7	3.91**	<0.01	11.69**	<0.01
L8	0.68	0.52	17.69**	<0.01
L9	7.91**	<0.01	36.88**	<0.01
L10	2.72*	0.03	19.74**	<0.01
L11	6.94**	<0.01	22.57**	<0.01

1) “*” 和 “**” 分别表示在 0.05 和 0.01 水平差异显著

1) “*” and “**” indicate significant differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively

2.4 甜糯双隐性自交系材料的淀粉含量分析

甜糯双隐性自交系 L1~L11 及甜、糯质亲本的淀粉含量如表 5 所示。11 份自交系材料的淀粉含量 (*w*) 平均为 19.73%，标准差平均为 1.50%，变异系数平均为 0.08，淀粉含量平均变幅为 15.67%~23.78%；甜质亲本的淀粉含量 (*w*) 平均为 23.50%，标准差平均为 1.71%，变异系数平均为 0.07，淀粉含量平均变幅为 21.92%~25.31%；3 个糯质亲本的淀粉含量 (*w*) 平均为 47.34%，标准差平均为 5.25%，变异系数平均为 0.11，淀粉含量平均变幅为 41.59%~57.08%。11 份自交系淀粉含量均低于对应的甜、糯质亲本，其中含量 (*w*) 最高的是株系 L6，为 22.50%，含量最低的是株系 L8，为 16.60%。

对 11 份甜糯双隐性自交系与对应亲本的淀粉含量差异进行 *t* 检验，结果如表 6 所示。除了株系 L1、L3、L4、L6 和 L9 外，其余 6 份自交系的淀粉含量显著低于甜质亲本 M01(*P*<0.05)；11 份自交系的淀粉含量均极显著低于 3 个糯质亲本 (*P*<0.01)。

表 5 11 份甜糯双隐性自交系材料与甜、糯质亲本淀粉含量

Table 5 Starch contents in 11 double recessive sweet-waxy inbred lines and their parents

株系	材料来源	w(淀粉) ¹⁾ /%	标准差/%	变异系数	变幅/%
Strain	Material source	Starch content	Standard deviation	Coefficient of variation	Range
L1	L33×M01	21.97±1.07	1.86	0.08	19.92~23.51
L2	L33×M01	19.03±0.84	1.46	0.08	17.42~20.20
L3	L33×M01	21.13±1.18	2.04	0.10	18.89~22.88
L4	L35×M01	21.80±1.63	2.83	0.13	19.82~23.78
L5	L35×M01	17.90±0.78	1.35	0.08	16.77~23.04
L6	L35×M01	22.50±0.42	0.72	0.03	21.92~23.30
L7	L38×M01	19.23±1.05	1.81	0.09	17.33~20.88
L8	L38×M01	16.60±0.47	0.82	0.05	15.70~18.32
L9	L38×M01	20.63±0.75	1.31	0.06	18.60~22.11
L10	L38×M01	18.47±0.52	0.91	0.05	15.67~19.24
L11	L38×M01	17.80±0.79	1.37	0.08	16.30~19.01
M01	甜质亲本	23.50±0.99	1.71	0.07	21.92~25.31
L33	糯质亲本	50.20±4.10	7.11	0.14	42.92~57.08
L35	糯质亲本	46.33±1.86	3.22	0.07	42.88~49.03
L38	糯质亲本	45.50±3.13	5.43	0.12	41.59~51.72

1) 该列数据为平均值±标准误

1) Data in this column are average value ± standard error

表 6 11 份甜糯双隐性自交系材料与甜、糯质亲本淀粉含量差异 *t* 检验¹⁾

Table 6 The *t* test of differences in starch contents between 11 double recessive sweet-waxy inbred lines and their parents

株系	甜质亲本 Sweet parent		糯质亲本 Waxy parent	
	<i>t</i>	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
L1	-1.05	0.35	-6.65**	<0.01
L2	-3.44*	0.03	-7.44**	<0.01
L3	-1.54	0.20	-11.45**	<0.01
L4	-0.83	0.45	-10.84**	<0.01
L5	-4.46*	0.01	-14.11**	<0.01
L6	-0.93	0.40	-7.27**	<0.01
L7	-2.96*	0.04	-7.95**	<0.01
L8	-3.96*	0.02	-9.42**	<0.01
L9	-2.31	0.08	-7.71**	<0.01
L10	-4.51*	0.01	-8.51**	<0.01
L11	-4.50*	0.01	-8.56**	<0.01

1) “*” 和 “**” 分别表示在 0.05 和 0.01 水平差异显著

1) “*” and “**” indicate significant differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively

2.5 甜糯双隐性玉米材料的果皮厚度分析

11 份甜糯双隐性自交系与甜、糯质亲本的果皮厚度如表 7 所示。11 份自交系材料籽粒冠部果皮厚度平均为 40.83 μm, 标准差平均为 5.37 μm, 变异系数平均为 0.07, 冠部果皮厚度平均变幅 29.95~52.01 μm; 甜质亲本冠部果皮厚度平均为 28.07 μm, 标准差为 0.11 μm, 变异系数平均为 0.12, 冠部果皮厚度平均变幅为 24.19~32.89 μm; 3 个糯质亲本冠部果皮厚度平均为 60.34 μm, 标准差为 5.13 μm, 变异系数平均为 0.04, 冠部果皮厚度平均变幅为 50.71~65.93 μm。3 个杂交组合 (L33×M01、L35×M01 和 L38×M01) 双亲籽粒冠部果皮厚度平均分别为 45.38、45.97 和 41.26 μm, 11 份自交系籽粒冠部果皮厚度与对应亲本的果皮厚度均值相近。11 份自交系籽粒背胚侧果皮厚度平均为 59.68 μm, 标准差平均为 10.43 μm; 甜质亲本背胚侧果皮厚度平均为 38.02 μm, 标准差为 0.10 μm; 糯质亲本背胚侧果皮厚度平均为 81.17 μm, 标准差为 15.39 μm。甜糯双隐性自交系材料背胚侧果皮厚度多介于双亲背胚侧果皮厚度之间。

表 7 11 份甜糯双隐性自交系与甜、糯质亲本籽粒冠部和背胚侧果皮厚度¹⁾

Table 7 The pericarp thickness on the crown and dorsal embryo side of the grain in 11 double recessive sweet-waxy inbred lines and their parents

株系 Strain	材料来源 Material Source	冠部 Crown		背胚侧 Dorsal embryo side	
		果皮厚度/ μm	变幅/ μm	果皮厚度/ μm	变幅/ μm
		Pericarp thickness	Range	Pericarp thickness	Range
L1	L33×M01	46.93±1.98	40.59~52.01	58.08±2.61	52.20~66.22
L2	L33×M01	35.29±0.81	33.09~37.53	43.07±1.51	39.32~46.86
L3	L33×M01	32.48±0.83	29.95~34.22	43.30±0.85	41.34~46.23
L4	L35×M01	43.02±1.19	39.49~46.77	52.56±0.63	50.26~53.94
L5	L35×M01	39.17±0.85	37.08~42.18	78.33±0.62	76.80~80.22
L6	L35×M01	39.04±0.31	38.06~40.03	61.04±0.92	58.29~63.37
L7	L38×M01	34.08±1.44	31.48~39.33	66.87±0.83	64.62~68.73
L8	L38×M01	46.75±1.60	41.97~51.20	64.23±0.66	62.53~66.17
L9	L38×M01	40.98±0.91	38.94~44.31	61.01±1.10	58.68~64.38
L10	L38×M01	43.17±2.46	38.66~49.35	60.23±2.49	52.98~65.81
L11	L38×M01	48.17±1.99	40.60~51.52	67.76±1.84	61.53~73.06
M01	甜质亲本	28.07±1.56	24.19~32.89	38.02±0.45	37.02~39.24
L33	糯质亲本	62.69±0.68	61.24~64.76	82.91±3.70	75.56~95.81
L35	糯质亲本	63.87±0.76	62.12~65.93	95.63±1.86	89.29~100.35
L38	糯质亲本	54.45±1.43	50.71~57.60	64.98±1.68	59.95~69.55

1) 表中数据为平均值±标准误
1) Data in the table are average value ± standard error

3 讨论与结论

随着人们生活水平的提高,对鲜食玉米的营养和口味提出了更高的要求。近年来,一种兼有甜、糯 2 种风味的新型鲜食玉米品种,即甜糯玉米应运而生,成为鲜食玉米市场的新宠^[17]。甜糯玉米一般以糯玉米自交系为母本,甜糯双隐性玉米自交系为父本, F₂ 代果穗中有 1/4 的甜糯玉米籽粒, 3/4 的糯玉米籽粒^[6-7]。选育甜糯双隐性玉米自交系是培育甜糯玉米品种的关键,由于甜质基因 *sh*₂ 和糯质基因 *wx* 要均为隐性纯合时方能表达,因此存在选育过程长、效率低的问题。*sh*₂ 基因隐性纯合时,种子皱缩凹陷,表型明显,但 2 个基因均隐性纯合时,种子淀粉含量少,通过碘-碘化钾染色法判断甜糯双隐性材料存在一定的困难,利用分子标记辅助选择可以较好地解决这一问题。

分子标记辅助选择是利用分子标记对作物进行改良的一种手段^[18],其基本原理是通过与目标基因紧密连锁或共分离的功能标记锁定目标基因,利用其他分子标记进行全基因组的筛选,以便快速恢复轮回亲本的背景基因,减少连锁累赘,迅速获得期望个体^[19-20]。目前该技术已广泛应用于各种作物

的品种改良^[21-22]和聚合育种^[23-24]。应用分子标记辅助选育甜糯双隐性材料由李新海等^[11]在 2003 年提出,发现 3 对 SSR 引物与糯玉米隐性基因紧密连锁。杨耀迥等^[12]应用分子标记辅助选择从 3 个甜糯玉米品种的杂交组合中选育了 9 份甜糯纯合双隐性玉米材料,引物 *phi022* 在亲本间检测出多态性,连续自交 4 代得到了甜糯双隐性材料。本研究中引物 *phi061* 在甜、糯玉米亲本间检测出多态性,以甜糯玉米自交系为材料,后代的分离相对于品种间杂交较小,在 F₄ 代得到了纯合的甜糯双隐性自交系。

目前已有一些关于甜糯双隐性玉米材料品质评价的报道^[25]。郝小琴等^[25]分析了甜糯双隐性基因玉米材料的农艺性状和可溶性糖含量,发现大部分双隐性材料在授粉后 15~30 d 可溶性总糖含量高于对应的甜玉米和糯玉米亲本。郝小琴等^[26]研究发现双隐性纯合体的可溶性糖含量最高,其次为甜糯玉米杂交种,单隐性纯合体最低。本研究发现甜糯双隐性玉米材料的可溶性糖平均含量高于甜玉米亲本,远高于糯玉米亲本,与前人研究结果一致;淀粉的平均含量低于甜玉米亲本,远低于糯玉米亲本;乳熟期籽粒冠部和背胚部的果皮厚度介于两亲本之间。

甜糯玉米作为一种鲜食玉米类型, 营养品质和柔嫩度品质均非常重要, 可溶性糖和淀粉是其主要的营养成分, 柔嫩度与果皮厚度呈显著负相关^[27]。本研究利用 *sh₂* 基因的表型和 *wx* 基因的紧密连锁标记, 对甜玉米和糯玉米自交系杂交 F₂ 代进行选择并自交选育 11 个甜糯玉米双隐性材料, 并对其品质进行了较为全面的评价。应用分子标记辅助选育甜糯双隐性玉米种质明显缩短了育种周期, 减少了田间工作量, 对双隐性材料的品质评价以及开展甜糯玉米自交系选育时的亲本选择提供了参考, 这对优质甜糯玉米育种有重要的指导意义。

参考文献:

[1] 李小琴, 王青峰. 广东省甜玉米发展现状与对策探讨[J]. *作物杂志*, 2007(3): 32-34.

[2] 刘蔚楠, 万忠, 甘阳英, 等. 2015 年广东甜玉米产业发展形势与对策建议[J]. *广东农业科学*, 2016, 43(3): 12-16.

[3] 李一男. 国家玉米政策调整后鲜食玉米的发展机遇和方向[J]. *农业开发与装备*, 2017(9): 60.

[4] 祁显涛, 李燕敏, 谢传晓. 玉米甜、糯性状育种的遗传学基础[J]. *玉米科学*, 2017, 25(2): 1-5.

[5] 龙德祥, 任晓菊, 李勤, 等. 鲜食玉米育种概况及新品种选育方法[J]. *中国种业*, 2018(1): 21-23.

[6] 吴子恺. 异隐纯合体杂交法与甜糯玉米育种[J]. *玉米科学*, 2003, 11(3): 13-17.

[7] 张沛敏, 邵林生, 闫建宾, 等. 黑甜糯玉米新品种黑甜糯 631 的选育[J]. *中国蔬菜*, 2018(5): 74-76.

[8] 王萍, 田凤芝, 李晨. 北方甜糯玉米优质高效栽培及发展前景[J]. *吉林蔬菜*, 2016(6): 18-19.

[9] 郝德荣, 冒宇翔, 陈国清, 等. 我国鲜食甜糯玉米育种现状与展望[J]. *浙江农业科学*, 2016, 57(4): 478-481.

[10] CREECH R G, MCARDLE F J. Gene interaction for quantitative changes in carbohydrates in maize kernels 1 [J]. *Crop Sci*, 1966, 6(2): 192-194.

[11] 李新海, 白丽, 彭泽斌, 等. 糯玉米育种技术研究进展[J]. *玉米科学*, 2003(专刊): 14-16.

[12] 杨耀迥, 张述宽, 滕辉升, 等. 应用分子标记辅助选择甜糯双隐基因型玉米种质[J]. *广西农业科学*, 2010, 41(1): 1-3.

[13] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19(1): 11-15.

[14] 冯发强, 张晶, 王青峰, 等. 甜玉米 *LCYE* 等位基因多态性及功能分析[J]. *华南农业大学学报*, 2014, 35(5): 25-30.

[15] 李晓旭, 李家政. 优化蒽酮比色法测定甜玉米中可溶性糖的含量[J]. *保鲜与加工*, 2013, 4: 24-27.

[16] 中华人民共和国国家标准. 谷物籽粒粗淀粉测定法: NY/T 11—1985[S]. 北京: 中国标准出版社, 1985.

[17] 刘春泉, 宋江峰, 李大婧. 鲜食甜糯玉米的营养及其加工[J]. *农产品加工*, 2010(6): 8-9.

[18] RIBAUT J M, HOISINGTON D. Marker-assisted selection: New tools and strategies[J]. *Trends Plant Sci*, 1998, 3(6): 236-239.

[19] RIBAUT J M, JIANG C, HOISINGTON D. Simulation experiments on efficiencies of gene introgression by backcrossing[J]. *Crop Sci*, 2002, 42(2): 557-565.

[20] BABU R, NAIR S K, PRASANNA B M, et al. Integrating marker-assisted selection in crop breeding-Prospects and challenges[J]. *Curr Sci*, 2004, 87(5): 607-619.

[21] PRASANNA B M, PIXLEY K, WARBURTON M, et al. Molecular marker-assisted breeding options for maize improvement in Asia[J]. *Mol Breed*, 2010, 26(2): 339-356.

[22] FENG F, WANG Q, LIANG C, et al. Enhancement of tocopherols in sweet corn by marker-assisted backcrossing of ZmVTE₄[J]. *Euphytica*, 2015, 206(2): 513-521.

[23] 徐小万, 雷建军, 罗少波, 等. 作物基因聚合分子育种[J]. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(3): 364-368.

[24] 马军韬, 张国民, 辛爱华, 等. 水稻品种抗稻瘟病分析及基因聚合抗性改良[J]. *植物保护学报*, 2016, 43(2): 177-183.

[25] 郝小琴, 吴子恺. 双隐性甜糯玉米的主要农艺及品质性状[J]. *作物学报*, 2003, 29(3): 321-329.

[26] 郝小琴, 吴子恺, 张慧英. 鲜食甜糯玉米子粒可溶性总糖含量的研究[J]. *玉米科学*, 2005, 13(2): 72-75.

[27] ZHANG S, HUANG Y, HE Z, et al. Variation law of pericarp tenderness of super sweet corn kernel[J]. *Agr Sci Technol*, 2016, 17(7): 1671-1674.

【责任编辑 李庆玲, 李晓卉】