

黑龙江八一农垦大学大学生创新训练 项目计划申请书

项目编号			
项目名称	玉米雄性核不育遗传鉴定及生理生化分析		
项目负责人	孔子豪	联系电话	15562360919
所在学院	农学院		
学号	20204011009	专业班级	20 级农学创新人才班
指导教师	孙丽芳		
E-mail	912916701@qq.com		
申请日期	2022. 06. 13		
项目期限			

黑龙江八一农垦大学

填写说明

1. 本申请书所列各项内容均须实事求是，认真填写，表达明确严谨，简明扼要。
2. 申请人可以是个人，也可为创新团队，首页只填负责人。“项目编号”一栏不填。
3. 本申请书为大 16 开本（A4），左侧装订成册。可网上下载、自行复印或加页，但格式、内容、大小均须与原件一致。
4. 负责人所在学院认真审核，经初评和答辩，签署意见后，将申请书（一式两份）报送项目管理办公室。

一、基本情况

项目名称	玉米雄性核不育遗传鉴定及生理生化分析						
所属学科	学科一级门： 农学 学科二级类：植物生产类						
项目来源	<input type="checkbox"/> A、学生自主选题，来源于自己对课题的长期积累与兴趣 <input checked="" type="checkbox"/> B、学生来源于教师科研项目选题 <input type="checkbox"/> C、学生承担社会、企业委托项目选题 <input type="checkbox"/> D、拔尖专项 <input type="checkbox"/> E、竞赛专项 <input type="checkbox"/> F、研修专项						
申请金额	10000 元	项目期限	2 年	拟申报项目级别		省级	
负责人	孔子豪	性别	男	民族	汉族	出生年月	2002 年 9 月
学号	20204011009	联系电话	宅： 手机： 15562360919				
指导教师	孙丽芳	联系电话	宅： 手机： 15765959395				
项目简介		本项目以 7024 雄性核不育突变体为试验材料，对其进行不育表型分析，构建不同遗传背景 F ₁ 、F ₂ 及 BC ₁ F ₁ 群体，鉴定后代可育与不育的分离比例，从而确定该突变体的遗传特点；利用临时装片及石蜡切片鉴定该突变体细胞败育时期；测定核不育突变体与可育株各发育时期叶片及雄穗生理生化指标，为后续该不育系的研究与利用奠定基础。					
负责人曾经参与科研的情况		无。					

指导教师承担科研课题情况		<p>A. 黑龙江省科技部青年基金项目，QC2015029，玉米苗期盐胁迫下 DNA 甲基化修饰变化的研究，2015/08-2018/07，5 万元，结题，主持。</p> <p>B. 黑龙江省博士后启动基金项目，LBH-Q18101，CRISPR/ Cas9 系统介导玉米 <i>ROS1</i> 基因编辑及表观遗传调控分析，2019/01-2020/12，10 万元，结题，主持。</p> <p>C. 黑龙江八一农垦大学青年创新人才项目，2041010053，DNA 甲基化及组蛋白修饰调控玉米耐盐应答基因的研究，2018/01-2019/12，6 万元，在研，主持。</p> <p>D. 一个玉米细胞质雄性不育系鉴定及遗传分析，校博士启动项目，2013-2015，5 万元，结题，主持。</p>				
指导教师对本项目的支持情况		同意。				
项目组主要成员	姓名	学号	学院	专业班级	联系电话	项目分工
	宣航	20204011228	农学院	20 级农学	13846592686	田间育性调查
	李琳辉	20204011236	农学院	20 级农学	19845976065	石蜡切片
	燕洪利	20204011523	农学院	20 级种工	13846974306	测定生理生化指标
	孙心玉	20204011245	农学院	20 级农学	18335609580	田间取样及指标测定
指导教师	姓名	工号	学院/单位	职称	联系电话	电子邮件
	孙丽芳	002857	农学院	副教授	15765959395	Sunlifang2013@126.com

二、 立项依据（可加页）

（1）研究目的

玉米是世界三大粮食作物之一，具有高产稳产、抗逆性强、适应性广等特点，是杂种优势利用中具有代表性的作物。随着我国经济发展，劳动力大量向城市转移，导致玉米制种基地劳动力紧张，去雄延误等问题出现。然而，玉米雄性不育在玉米杂交制种过程中具有重要的意义，它不仅可节省大量人工去雄、降低种子成本，而且可减少因去雄不净所造成种子混杂，而提高种子纯度。因此，本项目以田间发现的 7024 雄性核不育突变体为研究对象，通过不育表型观察、遗传学、细胞学、生理生化指标等方面的鉴定，初探 7024 雄性核不育突变体的败育机理，为后续该不育系的研究与利用奠定基础。

（2）研究内容

① 7024 雄性不育突变体遗传分析

a. 雄性败育表型鉴定

从植株散粉初期至结束每天进行单株育性调查，记录植株散粉情况；在植株散粉期从雄穗中部随机剥取花药，观察花药颜色，用游标卡尺测量 10 个花药的长度和宽度，比较可育株和不育系株间差异；将花药放置在载玻片上，用解剖针将花药沿横轴切断，挤出花粉粒，1%的 I_2 -KI 染色，显微镜下观察花粉粒的可染性，分析花粉活力情况。

b. 构建不同遗传背景育性分离群体

2022 年组配 7024(不育)×Mo17Ht、7024(不育)×B73、7024(不育)×17-703 不同遗传背景杂交组合；2022 年冬季海南育种基地播种各杂交组合 F_1 世代，自交获得 F_2 代分离群体，并以 7024 不育系为母本回交获得 BC_1F_1 世代分离群体；2023 年安达育种基地观察 F_2 及 BC_1F_1 分离群体可育与不育植株数，利用卡方检验计算分离比例，从而确定 7024 雄性败育突变体的败育类型及基因调控对数。

② 细胞学败育时期鉴定

a. 临时装片观察方法

在抽穗季节，用手摸花序部分，如感到松软，即用刀在喇叭口纵切一刀，取出数条花序分支，如果主穗先端小穗颖长达到 3-4mm 时取样，单株挂牌，每隔 1d 取主穗中部小

穗。所取小穗置 FAA 固定液中固定 24h 后，于 FAA 中(4°C)长期保存备用。选取固定后 2-3mm 长的花药压片，用解剖刀横断花药，挤出花药药室内细胞，经过醋酸洋红染色，数码显微镜(BA 2100 igital)下观察游离细胞的形态，并照相。

b. 石蜡切片观察

从大喇叭口期至雄穗发育完成，对供试材料每日取样，选出各个时期的可育株雄花和不育株雄花，从茎中部横切幼嫩的雄穗，剥取新鲜花药，经 FAA 固定液固定，经固定后的花药分别用 30%、50%、70%、85%、95%乙醇逐级脱水，1/5、2/5、3/5、4/5 二甲苯和纯二甲苯透明，逐级浸蜡透蜡之后用纯蜡包埋，用切片机切片，横切片厚度为 8 μ m，用明胶粘片，干燥后进行脱蜡、透明，晾干后加一滴树胶进行封藏，用 Olympus.BH 显微镜观察照相。

③ 生理生化指标测定

以 7024 群体中可育与不育植株为分析对象，于不同时期取样测定生理生化指标，具体内容如下：

营养生长期：苗期叶片（三叶一心期幼苗）、拔节期叶片、抽雄期雄穗功能叶片和散粉期雄穗功能叶片。各时期取样至少混合 5 株叶片，低温保存备用。

雄穗发育期：花药刚开始发育、穗长不超过 10cm 为时期 1，花药发育完全、雄穗刚要抽出为时期 2、雄穗完全抽出但没散粉为时期 3，散粉期为时期 4。剥取 4 个时期雄穗花药，至少混合 10 株取样，低温保存备用。

以上每个取样点均设置 3 次生物学重复。

采用 NBT 光还原法测定超氧化物歧化酶（SOD）活性；愈创木酚法测定过氧化物酶（POD）活性；高锰酸钾滴定法测定过氧化氢酶（CAT）活性；AsA 法测定抗坏血酸过氧化物酶（APX）活性；硫代巴比妥酸法测定二醛（MDA）含量；蒽酮法测可溶性糖含量；考马斯亮蓝法测可溶性蛋白含量；酸性茚三酮法定脯氨酸含量。

（3）国、内外研究现状和发展动态

玉米(*Zea mays*)为雌雄同株，是杂种优势利用典型的代表性作物^[1]。然而杂种优势利用制种过程，母本的花粉会严重影响种子的纯度，那么去雄就显得尤为重要。但去雄不仅耗时、耗力且降低杂交种子的质量和产量。因此，利用雄性不育系是扩大玉米杂交育种规

模的理想选择。植物雄性不育是指雄性器官不能正常发育，但雌性器官发育正常，可以与其他有功能的雄配子受精结实，且雄性不育能够稳定遗传的现象^[2]。导致雄性不育现象产生的因素有很多，如基因漂移、基因突变、光照周期及温度的改变等^[3]。雄性不育按照遗传方式的不同，可以分为2类：细胞核雄性不育(*genic male sterility*, GMS)和核质互作雄性不育(*cytoplasmic male sterility*, CMS)，其中细胞核雄性不育还分为显性核不育、隐性核不育以及光温敏核不育。玉米的CMS应用非常广泛，据 Darrah 等报道，1979年美国利用各类CMS系配制的杂交种占种子生产量的17.5%，其中T型1.3%、C型14.1%、S型2.1%；1984年种子生产量为11.6%，其中C型8.3%、S型3.3%^[4]。中国农业大学采用掺和法对豫玉22号的不育胞质杂交种进行推广利用，并且形成了一定的推广面积^[5]，其中2003年，制种面积达866.67 hm²，可供16.67万hm²生产使用，累计推广面积约573万hm²^[6,7]。尽管迄今已发现约100多种玉米CMS材料，但是受小斑病菌专化侵染和雄花育性不稳定的影响，且“三系”配套增加制种成本，导致能在生产上应用的并不多。然而，细胞核雄性不育系的选育不受恢复基因的限制，且没有细胞质不育基因的不利性状，应用潜力较大。目前，已经发现并命名的玉米核不育基因有200多个^[8]，但仅有少数的几个基因得到克隆，如：*ms8*^[9]、*ms9*^[10]、*ms22/msc1*^[11,12]、*ms23*^[13]、*ms26*^[14]、*ms32*^[15]、*Ms44*^[16]、*ms45*^[17]、*apv1*^[18]、*ipe1*^[19]、*mac1*^[20]、*ocl4*^[21]。

前人对玉米雄性不育系遗传分析做了大量研究。如，张欢欢^[22]等将晋玉1A×昌7-2、晋玉1A×G155和晋玉1A×昌7-2无叶舌获得F₁代植株再分别自交，并通过调查F₂代群体散粉期单株雄穗的开花、散粉情况的方式来进行遗传群体的育性分析；朱永卉^[23]通过构建不同的(*ms39*×Mo17)回交群体、(*ms39*×B73) F₂分离及回交群体对*ms39*定位结果进行验证；康丹^[24]通过构建*ms2*×B73 F₂分离群体、*ms2*×PH4CV F₂分离群体以及*ms2*×B73 F₃分离群体来对*ms2*突变体进行遗传分析；柳双双^[25]通过调查*ms30*×昌7-2和*ms30*×郑58的F₂分离群体育性比例来进行玉米核不育突变体*ms30*的遗传分析。通过以上研究发现，选用不同的遗传背景来鉴定玉米雄性不育系的遗传基础是非常必要的。

此外，不同雄性不育突变体的败育类型和特征不尽相同，掌握花药败育发生的确切时期、部位和特征是深入研究雄性不育机制的基础，将有助于更好地用于农业生产。研究发现，Wang等^[26]利用苏木精醋酸洋红对玉米雄性不育突变体*ms8*花粉母细胞减数分裂过程

染色观察发现, 该突变体花粉母细胞形态呈不规则状, 在二分体时期就已败育解体; 樊建青等^[27]以小麦光温敏核雄性不育系 BS366 为材料, 采用卡宝品红染色观察花粉母细胞减数分裂过程发现, 不育环境下的 BS366 花粉母细胞减数分裂过程中表现出染色体散乱排列、分离不同步以及细胞质不完全分裂、细胞板不平整、子细胞大小不一等特征, 认为这些异常可能是造成花粉败育的主要原因。何金华等^[28]用间接免疫荧光标记(Indirect-immunofluorescence)细胞微管, PI 染色观察发现同源四倍体水稻微管组织的异常可能与染色体的行为异常存在一定的关联, 两者共同影响花粉发育, 导致其育性偏低。对于成熟花粉育性和活力的检测方法主要包括花粉萌发测定法、TTC 法、I₂-KI 染色法和 Alexander 染色法^[29]等, 这些方法对多数植物花粉育性都能有效鉴别, 但基于操作简单方便, 通常会选用后面两种方法。Alexander 试剂染色后, 可育花粉呈红色, 而败育的花粉染色反应呈现绿色。玉米花粉富含淀粉, 不育花粉不积累或积累较少淀粉, 用 I₂-KI 染色不着色或是染色浅, 可育花粉染色成棕黑色。

为了探究玉米雄性不育系的生理生化特征, 前人也做了大量的工作基础。汪燕等^[30]研究发现, 与可育株 K305F 相比, 不育株 K305ms 雄花发育过程中花药与颖壳的可溶性蛋白含量和游离脯氨酸含量均不同程度降低, 而 POD 活性显著或极显著升高。张勤^[31]等发现不育株叶片中的抗氧化酶活性总是低于同期可育株, 并且不育株叶片中的 MDA 和 H₂O₂ 含量、O²产生速率高于同期可育株, 说明叶片中抗氧化酶活性低、活性氧积累多可能是引起雄性不育的原因之一。不育株叶片中的叶绿素、脯氨酸和可溶性糖的含量均低于同时期的可育株, 特别是在雄穗发育初期可溶性糖含量显著低于可育株, 说明光合效率低及营养物质缺乏可能会导致雄穗发育异常。周国昌等^[32]研究发现, 造成 K932MS 败育的原因可能是由于不育花药中营养物质的严重不足, 同时不育花药的 CAT 和 SOD 活性降低、POD 活性升高, 不利于花药的正常生长发育。以上研究说明, 玉米细胞雄性不育可能与花药发育过程中物质代谢营养缺乏、抗氧化系统异常、光合效率低等有关。那么, 弄清玉米雄性不育生理生化特征对于研究玉米雄性不育系的败育机理来说是必不可少的。

因此, 本项目拟利用玉米自交系 7024 雄性核不育系为研究对象, 利用不同遗传背景材料组配杂交组合, 分析后代可育与不育的分离比例, 从而确定该材料的不育性及基因调控对数; 利用临时装片及石蜡切片鉴定不育系的败育时期; 测定 7024 不育株和可育株各

生育时期叶片及雄穗生理生化指标, 为后续该不育系的研究与利用奠定基础。

参考文献

- [1] 任源, 林彦萍. 玉米细胞核雄性不育基因的研究进展及其在玉米育种中的应用[J/OL]. 分子植物育种: 1-17
- [2] 田士可, 秦心儿, 张文亮, 等. 玉米雄性不育突变体 *mi-ms-3* 的遗传分析及分子鉴定[J]. 作物学报, 2020, 46(12): 1991-1996.
- [3] 马冲, 张春庆, 陈举林, 等. 玉米胞质雄性不育系研究进展[J]. 中国农学通报, 2005(01): 163-164+232.
- [4] Darrah LL, Zuber MS. 1985 United States farm maize germplasm base and commercial breeding strategies [J]. 1986, 26(6): 1109-1113.
- [5] 侯玮, 陈举林, 王国胜, 等. 细胞质雄性不育在玉米育种及生产中的应用概述[J]. 安徽农学通报, 2011, 17(1): 64-66.
- [6] 石明亮, 陈国清, 彭长俊, 等. 玉米雄性不育类型、遗传机理及育种利用方法研究动态[J]. 天津农学院学报, 2013, 20(1): 21-27.
- [7] 马春红, 李九云, 翟彩霞, 等. 玉米细胞质雄性不育(CMS)的研究进展及分析[J]. 玉米科学, 2006(01): 46-49.
- [8] Timofejeva L, Skibbe DS, Lee S, *et al.* Cytological characterization and allelism testing of anther development mutants identified in a screen of maize male sterile lines. G3: Genes, Genomes[J]. Genetics. 2013, 3(2): 231-249.
- [9] Wang DX, Skibbe DS and Walbot V. Maize Male sterile 8 (*Ms8*), a putative β -1,3-galactosyltransferase, modulates cell division, expansion, and differentiation during early maize anther development[J]. Plant Reproduction. 2013, 26(4): 329-338.
- [10] Albertsen M, Fox T, Leonard A, *et al.* Cloning and use of the *ms9* gene from maize[J]. US patent US20160024520A1. 2016.
- [11] Albertsen MC, Fox T, Trimnell M, *et al.* *Msc1* nucleotide sequences impacting plant male fertility and method of using same [J]. US patent US20090038027A1. 2009.
- [12] Chaubal R, Anderson JR, Trimnell MR, *et al.* The transformation of anthers in the *msc1* mutant of maize [J]. Planta. 2003, 216(5): 778-788.
- [13] Nan GL, Zhai J, Arikiti S, *et al.* MS23, a master basic helix-loop-helix factor, regulates the specification and development of the tapetum in maize [J]. Development, 2017, 144(1): 163-172.
- [14] Djukanovic V, Smith J, Lowe K, *et al.* Male-sterile maize plants produced by targeted mutagenesis of the cytochrome P450-like gene (*MS26*) using a re-designed I-CreI homing endonuclease[J]. Plant Journal, 2013, 76(5): 888-899.
- [15] Moon J, Skibbe D, Timofejeva L, *et al.* Regulation of cell divisions and differentiation by MALE STERILITY32 is required for anther development in maize [J]. Plant Journal. 2013, 76(4): 592-602.
- [16] Fox T, DeBruin J, Haug Collet K, *et al.* A single point mutation in *Ms44* results in dominant male sterility and improves nitrogen use efficiency in maize. Plant Biotechnology Journal [J]. 2017, 15(8): 942-952.
- [17] Cigan AM, Unger E, Xu RJ, *et al.* Phenotypic complementation of *ms45* maize requires tapetal expression of MS45[J]. Sexual Plant Reproduction. 2001, 14(3): 135-142.
- [18] Somaratne Y, Tian Y, Zhang H, *et al.* *ABNORMAL POLLEN VACUOLATION1 (APV1)* is required for male fertility by contributing to anther cuticle and pollen exine formation in maize[J]. Plant Journal.

2017, 90(1): 96-110.

- [19] Chen X, Zhang H, Sun H, *et al.* *IRREGULAR POLLEN EXINE1* Is a Novel Factor in Anther Cuticle and Pollen Exine Formation [J]. *Plant Physiology*. 2017, 173(1): 307-325.
- [20] Wang CJ, Nan GL, Kelliber T, *et al.* Maize *multiple archesporial cells1 (mac1)*, an ortholog of rice TDL1A, modulates cell proliferation and identity in early anther development [J]. *Development*. 2012, 139(14): 2594-2603.
- [21] Vernoud V, Laigle G, Rozier F, *et al.* The HD-ZIP IV transcription factor OCL4 is necessary for trichome patterning and anther development in maize [J]. *Plant Journal*. 2009, 59(6): 883-894.
- [22] 张欢欢,崔贵梅,王长彪,等.玉米雄性不育系晋玉 1A 的选育及其特性[J].*中国农业科学*, 2020, 53(21): 4322-4332.
- [23] 朱永卉. 玉米雄性不育基因 *ms39* 精细定位及生长发育相关基因的遗传转化[D]. 四川农业大学,2018.
- [24] 康丹. 玉米 *ms2* 雄性不育突变体的表型分析与基因定位[D].中国农业科学院, 2016.
- [25] 柳双双. 玉米雄性核不育基因 *ms30* 的遗传分析及精细定位[D].湖南农业大学, 2017.
- [26] Wang D X, Oses-Prieto J A, Li K H, *et al.* The male sterile 8 mutation of maize disrupts the temporal progression of the transcriptome and results in the mis-regulation of metabolic functions [J]. *Plant J*, 2010: 63(6): 939-951.
- [27] 樊建青,张立平,赵昌平,等. 光温敏核雄性不育小麦 BS366 花粉母细胞减数分裂的细胞学研究[J].*中国细胞生物学学报*, 2011, 33(6) 622-628.
- [28] 何金华,程杏安,陈志雄,等. 同源四倍体水稻花粉母细胞减数分裂期间微管骨架组织和结构变化 [J]. *作物学报*, 2010, 36(10): 1777-1785.
- [29] Alexander M P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen [J]. *Stain Technology*, 1969, 44: 117-122.
- [30] 汪燕,石海春,余学杰,等. 玉米细胞核雄性不育突变体 K305ms 的生理生化分析[J]. *浙江农业学报*,2018,30(08): 1281-1287.
- [31] 张勤,金圣浩,方芳,等. 玉米光温敏雄性不育系 CB1208-82 的生理生化代谢研究[J]. *玉米科学*, 2019, 27(03): 48-53.
- [32] 周国昌,石海春,余学杰,等. 玉米雄性不育 K932MS 不育株和可育株生理生化特性的比较研究[J]. *玉米科学*, 2018, 26(03): 6-11.

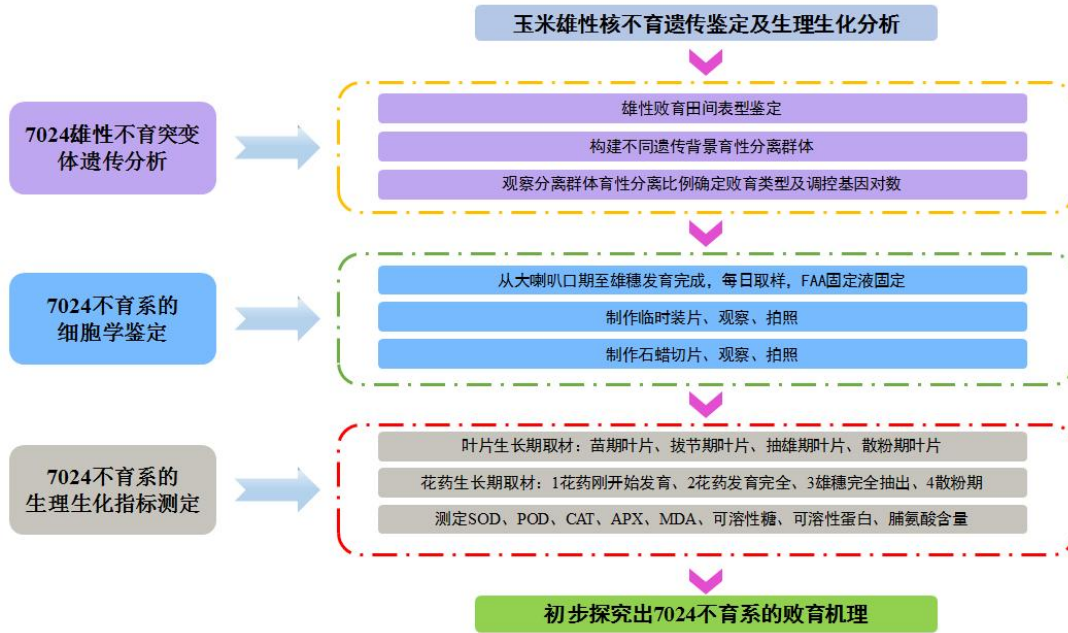
(4) 创新点与项目特色

①利用遗传学、细胞学方法确定 7024 雄性核不育败育类型及基因调控对数;

②分析雄性不育突变体及可育植株间生理生化差异, 为后续理解该突变体的败育机理提供理论依据。

(5) 技术路线、拟解决的问题及预期成果

1.技术路线



2.拟解决的问题

- (1) 鉴定 7024 雄性核不育系败育生物学和细胞学特征；
- (2) 为 7024 雄性核不育系的机理研究奠定理论基础。

3.预期成果

- (1) 研究报告一份
- (2) 发表核心期刊论文 1-2 篇。

(6) 项目研究进度安排

- 2022 年 5-6 月：完成田间种植及出苗情况调查；
- 2022 年 7-8 月：完成各生育期叶片和花药的取样及杂交授粉工作；
- 2022 年 9-10 月：完成生理指标测定；
- 2022 年 11-12 月：完成花粉败育时期的鉴定；
- 2023 年 1-4 月：完成论文的撰写；

2023 年 5-6 月：完成分离群体的播种；

2023 年 7-8 月：完成田间分离群体的可育与不育的鉴定工作。

2023 年 9-10 月：完成研究报告的撰写。

(7) 已有基础

1. 与本项目有关的研究积累和已取得的成绩

本课题组 2015 年田间鉴定发现自交系 7024 种植群体中有不育植株，可育与不育比例基本符合 1: 1 的比例，然后每年均用可育株给不育株授粉，目前已稳定保持该不育材料 5-6 个世代，基本判定该不育系为隐性核不育。可育植株花药饱满、呈黄绿色，不育植株花药颜色暗黄、干瘪、不开裂（图 1），游标卡尺检测后发现不育花药长度仅为可育花药的 76%（图 2）。通过 I_2 -KI 染色后，可观察到可育株花粉粒 94% 以上可染，而不育株的花药经 I_2 -KI 染色后找不到花粉粒，说明不育系花药内没有花粉粒，败育彻底（图 3）。

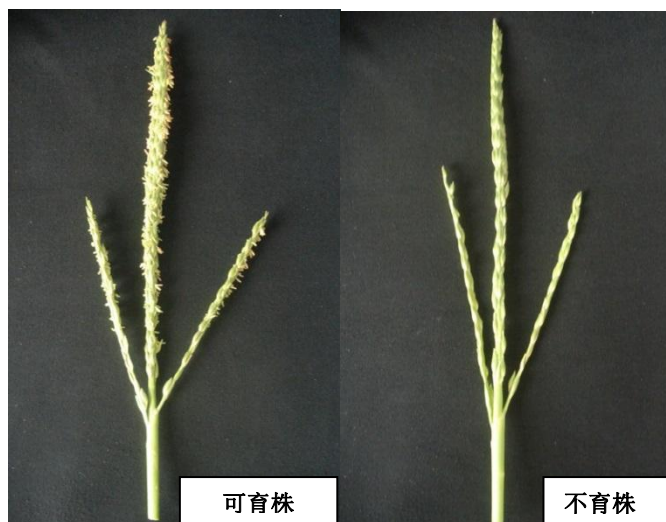


图 1 可育株和不育株的雄穗比较





图 2 可育株和不育株的花药形态的比较
注：A：可育株；B：不育株

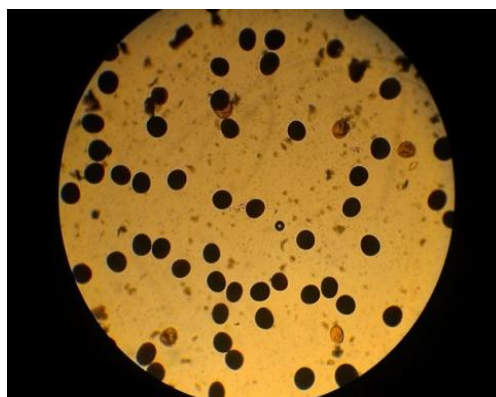


图 3 可育株花粉粒的 I₂-KI 染色鉴定

2. 已具备的条件，尚缺少的条件及解决方法

本项目提出的所有研究内容都是建立在以往的研究工作基础之上，实验需要的所有条件都已具备。项目组成员已掌握扎实的专业理论知识，积累了丰富的研究经验，熟练掌握与本项目相关的研究技术和方法，如石蜡切片、生理生化指标测定等。这是本项目得以顺利开展的基本保障。但由于工作量较大，还需通过合理的时间安排来完善试验。

三、 经费预算

开支科目	预算经费（元）	主要用途	阶段下达经费计划（元）	
			前半阶段	后半阶段
预算经费总额	10000		5000	5000
1. 业务费	3000			3000
（1）计算、分析、测试费				
（2）能源动力费				

开支科目	预算经费（元）	主要用途	阶段下达经费计划（元）	
			前半阶段	后半阶段
（3）会议、差旅费				
（4）文献检索费				
（5）论文出版费	3000			3000
2. 仪器设备购置费				
3. 实验装置试制费				
4. 材料费	7000		5000	2000
学校拨款	5000.00			
财政拨款	5000.00			

四、项目组成员签名

孔子豪 燕洪利 李琳辉 宣航 孙心玉

五、指导教师意见

同意

导师（签章）：孙丽芳

2022 年 6 月 19 日

六、 院系推荐意见

<div>盖章： 年 月 日</div>

七、 学校推荐意见

<div>盖章： 年 月 日</div>
