

# 玉米杂交诱导单倍生殖育种工具材料 ——单倍体诱导系

任 军, 郭 琦, 刘小丹, 代玉仙, 于明彦,  
李淑华, 张铭堂, 徐国良, 才 卓

(吉林省农业科学院单倍体育种研究创新团队, 长春 130033)

**摘 要:** 玉米育种的关键在于自交系的选拔。优良自交系选育的质量和速度决定了组配杂交种的水平和表现。传统的自交系选育方法所需周期长、规模大、费时费力, 已不能适应现代市场对于新品种的需求。目前, 最好的方法是双单倍体育种方法, 此方法通过单倍体诱导系可以诱导产生 10% 左右的母本单倍体种子, 经过加倍处理, 即可获得 100% 纯合的自交系。杂交诱导单倍体育种方法的根基是诱导系的创制与诱导率提升。

**关键词:** 玉米; 单倍体; 单倍体诱导系

**中图分类号:** S513.035.2

**文献标识码:** A

## Tool Material for Maize in Vivo Haploid Induction: Inducers

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

(Maize Haploid Innovative Research Team, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

**Abstract:** The key for hybrid maize breeding is to select for superior maize inbred lines. The speed and quality in developing maize inbred lines are helpful to elevate the level of combining ability or hybrid performance. Conventional maize breeding needs longer breeding cycle, bigger scale, higher cost, and labor intensive, which is not adapted to the market demand for better hybrids in a shorter time frame. The best and quickest solution is the double haploid breeding method. In maize, there is a tool named haploid inducer line that can genetically produce around 10% maternal haploid seeds. These haploids can be doubled to form 100% genetic pure inbred lines through chromosome doubling procedure with doubling agents. It points that the creation of haploid inducer line and the increase of the induction rate is the root of DH technology development.

**Key words:** Maize; Haploid; Haploid inducer line

玉米杂交种选育的关键在于优异自交系的选育, 优良自交系选育的速度和质量决定了其组配杂交种的水平。然而, 应用百年来的传统自交系选育方法所需周期长、规模大、费时费力, 一般需要通过 8 代以上连续自交才能获得遗传稳定的自交材料; 加之, 测交种组配与筛选, 新杂交种的培育历时长达

10 ~ 15 年, 经常导致品种育成之时市场需求已经时过境迁, 辛苦付诸东流。因此, 对于育种家来讲, 缩短育种时间、加快育种速度一直是努力追求的目标; 对种业公司来讲, 早日具有优异新品种推出就是效益。由于单倍体育种具有周期短、纯度高等优点, 所以获得了国内外各大农业公司及育种单位的密切关注。

20 世纪 40 年代, 配子体选拔作为快速育种最理想的概念被提出, 技术思路是将只有单套染色体的配子体(Gamete)加倍, 快速成为基因完全纯合的二倍体, 比传统系谱法节省了 6 ~ 8 个育种世代<sup>[1,2]</sup>。随之兴起了花药(花粉)培养单倍体育种与杂交诱导单倍生殖育种两个技术方向的研究。至 20 世纪 70 年代, 花药培养单倍体育种曾被作为前景最为广阔的

录用日期: 2019-01-01

基金项目: “863”项目“东北中晚熟区北部玉米种质改良与强优势杂交种创制”(2016YFD0101203-3)、玉米单倍体人工加倍研究及再生植株的倍性鉴定(y81991501)

作者简介: 任 军, 副研究员, 研究方向玉米单倍体育种。

E-mail: 583215489@qq.com

才 卓和徐国良为本文通讯作者。

育种方法在全球广泛探索,我国也育成了桂花1号等品种应用于生产,但由于技术复杂、效率不高、基因型依赖单一等瓶颈问题而搁置。至20世纪90年代,冷清了半个多世纪的杂交诱导单倍生殖育种方法取得跨越式发展,周期短、效率高、易操作等优势凸显,只需两代即可获得高纯度的双单倍体系(Doubled Haploid, DH),极大程度缩短了育种进程,因此,在全球范围内迅速推广,正在替代沿用了长达百年的传统系谱育种法。单倍体诱导系是进行杂交诱导单倍生殖育种必备的遗传工具材料,本文围绕单倍体诱导系相关问题做系统综述。

## 1 杂交诱导单倍生殖诱导系的创造过程

单倍体诱导系作为单倍体育种的最基本工具遗传材料,首先是必须具备通过杂交诱导单倍生殖能力产生单倍体,其次是具有稳定遗传的显性标识标记性状,用以区别杂交诱导产生的子粒是不是单倍体。也可以说,高的诱导率和明显的标记性状是其先决条件,前者是主功能基因,后者是辅助功能基因,两者缺一不可。

自然条件下,玉米单倍体植株发生频率低于十万分之一。因为,很少有人会对于偶尔发现的极其弱小植株产生兴趣。直到1929年Stadler L. J. 及Randolph L. F. 对玉米单倍体进行了描述报导。1946年,Northrup King公司(简称NK公司,现已被先正达收购)发现1个早熟、硬粒、白色子粒及粉质胚乳材料,农艺性状不佳,经常出现弱小不育株,这个无直接育种价值的材料被送给了明尼苏达大学细胞遗传学家Charles Burnham后,经证实,这些弱小株

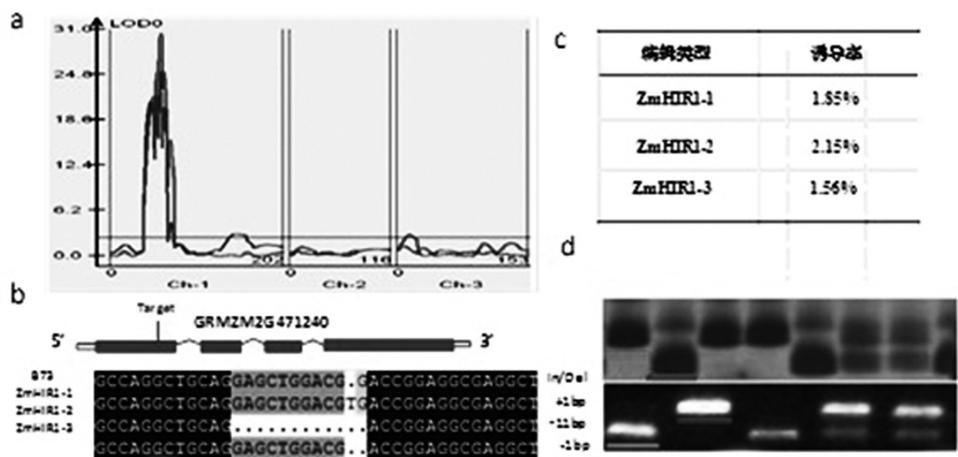
就是单倍体。至于其产生机理及其遗传之谜70年后才被解析。

20世纪40年代末,Coe E H Jr.(Charles Burnham的研究生)收藏了这份材料,编号Stock 6。由此开始,几代遗传育种家进行了长达60年之久的杂交诱导单倍生殖育种方法的探索研究,在杂交诱导、批量鉴定、高效加倍等关键环节取得了重大突破。直至2010年前后,规模化技术陆续应用于商业化育种,逐步替代了应用长达百年的常规系谱法,迅速成为玉米主产国家育种的主体技术。

## 2 杂交诱导单倍生殖能力的证实与诱导系的改良

20世纪50年代,Coe E H Jr. 研究证实,Stock 6的花粉能够诱导母本材料产生3%左右的单倍体植株,这个重要发现为杂交诱导单倍生殖育种方法奠定了理论基础<sup>[1]</sup>。之后几十年来,Stock 6经美国、德国、苏联、法国、中国等国家及国际组织几代遗传育种家的连续改良,新选诱导系诱导能力及综合性状几经提升,诱导率已从当初的1%~3%持续提高到15%左右,也有报道诱导材料达到20%左右,但多伴有结实率低、标记性状模糊等这样或那样的缺陷。报道与应用较多的诱导系为德国的RWS、UH400、PK6、HZI1;苏联的KMS、ZMS、KEMS;法国的WS14;摩尔多瓦的ZMS、MHI;罗马尼亚的PHI;印度的5329C;CIMMYT的TAILs;中国农业大学的农大高诱1号、农大高诱5号;吉林省农业科学院的吉高诱3号、吉高诱31号等<sup>[4-11]</sup>。

### 2.1 杂交诱导单倍生殖的机理及其遗传



注:a为诱导基因定位;b为诱导基因克隆;c为诱导基因验证;d为诱导基因分子标记x18(上)和285(下)。

Note: a, mapping for induction gene; b, clone for candidate gene; c, verification for induction gene; d, molecular for induction gene.

图1 诱导基因的突变导致玉米单倍体的形成

Fig.1 The mutation of induction gene causes haploid induction in maize

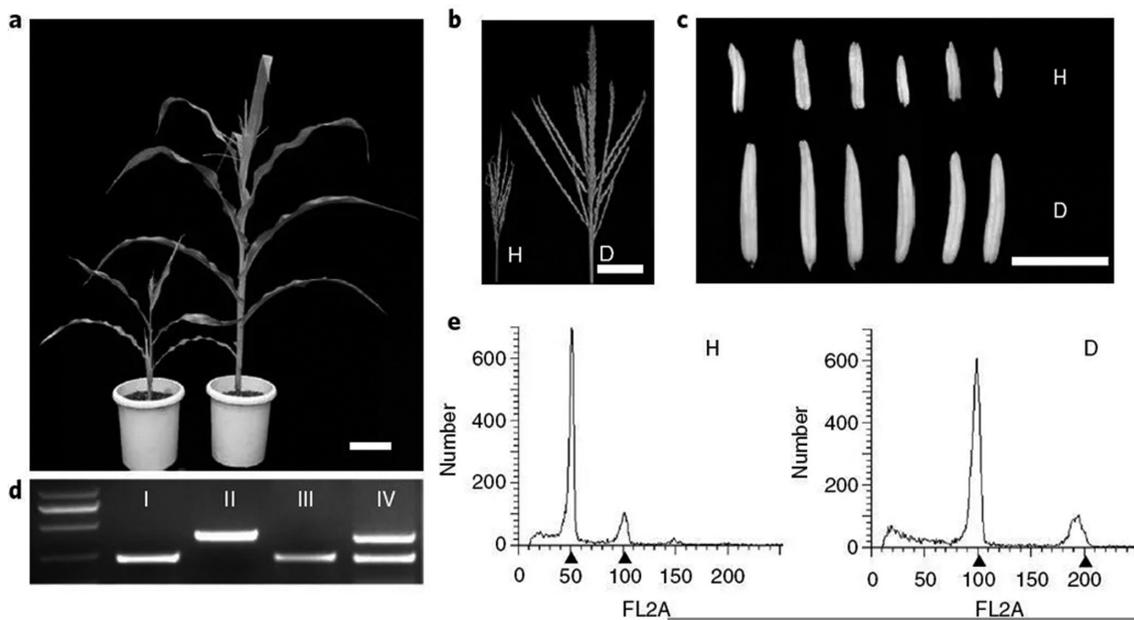
陈绍江研究团队发现,诱导过程中染色体排除是单倍体形成的重要机理。2017年锁定磷脂酶基因 *ZmPLA1*, 关键功能位点为 qhir1 和 qhir8。qhir1 位于1号染色体短臂上 Bin 1.04, 该区域全长为 243 kb、编码 428 个氨基酸(图 1), 候选基因为 *ZmPLA1*, 该基因第 4 外显子 4 个碱基 CGAG 的插入导致原有功能缺失, 突变基因功能异常作用于细胞膜, 导致细胞膜结构不完整或脆弱, 强度不足, 或影响渗透压大小。花粉管萌发过程中, 由于细胞膜异常而导致花粉管进入胚囊后, 提前或异常破裂, 配子体异常, 导致 1 个精细胞与极核细胞结合, 另外 1 个精细胞还在细胞壁之内或流失, 染色体成套或不同程度丢失, 从而产生一定比例的母本单倍成胚<sup>[12]</sup>。

2019年, 又将功能位点 qhir8 区间由 789 kb 缩小至 318 bp, 锁定了编码 DUF679 结构域膜蛋白 (DUF679 domain membrane protein) 基因 *ZmDMP* 及其功能位点, qhir8 位于 9 号染色体短臂上, Bin 9.01, 编码 205 个氨基酸, 该功能通过 CRISPR-CAS9 介导的基因敲除技术验证。*ZmDMP* 与 *ZmPLA1* 具有一定的相似性, 均在成熟的花粉中表达和定位在细胞膜上, 在单倍体诱导的过程中参与相同的通路。在 *ZmPLA1* 突变的基础上, *ZmDMP* 起始密码子下游的第 131 bp 上 T 到 C 的单碱基替换导致氨基酸的错

译, 能够提升 2~3 倍单倍体诱导率。将其完全敲除, 并且通过同时突变 *mtll/zmpla1/nld* 基因能够将单倍体诱导率增加 5~6 倍<sup>[13]</sup>。

## 2.2 单倍体诱导系的主标识性状及其遗传

图 2 展示了二倍体与单倍体植株在表型和细胞学的鉴定方法。尽管当时 Stock6 显现出非常诱人的实用前景, 但由于没有明确的标记性状, 无法大批量鉴别单倍体种子, 因此实用价值难以体现。1949 年, Chase 最早尝试 PEM 紫胚标记 (Purple Embryo Marker) 诱导单倍体的方法, 虽诱导率低至 1%~3%, 但仍获得了优良的 DH 系, 组配出商业化双交种。直至 1959 年, Coe E H Jr. 比较尝试了多个标示性状后 (包括无叶舌基因, 花青素基因, 紫色 *R* 基因, *R-scm* 及 *R-nj* 基因等), 确认 *R-nj* 基因标记明显、实用, 不仅可在胚乳冠顶, 而且也在胚芽鞘 (胚面) 产生紫色的双重标记, 将其导入 Stock6 培育出第 1 个杂交诱导单倍生殖诱导工具材料-单倍体诱导系, 以其为父本, 用其花粉诱导育种基础材料 (母本) 获得的杂交种子带有显性 *A1A2C1C2R-nj* 基因, 可以产生紫色冠顶及紫色胚芽鞘, 单倍体种子则只有紫色冠顶, 胚芽鞘没有颜色, 两者区别非常明显。新的 Stock6 以该标识为基础在全球持续获得改良, 延续使用至今<sup>[14-18]</sup>。



注: a 为植株差异; b 为雄穗差异; c 为花药差异; d 为转基因受体与测验种的多态性标记; I、II、III、IV 分别是测验种郑单 958, 受体, 单倍体和二倍体标记; e 为单倍体和二倍体倍性的流式细胞仪鉴定。

Note: a-c, Phenotypes of plants (a), tassels (b) and anthers (c) of haploids and diploids. d, Identification of haploids and diploids with polymorphic markers between the transgenic receptor line and tester. I, II, III, and IV represent the bands of the tester hybrid ZD958, receptor, haploid and diploid, respectively. e, verification of the ploidy of haploids and diploids with flow cytometry.

图 2 单倍体表型的鉴别

Fig.2 Verification of the haploid phenotypes

显性紫色  $R$  及隐性无色  $r$  是一对复合基因,由 2~3 个突变型复合基因组成。标准型显性  $R$  基因性状表现是紫色糊粉层,无(白)色胚及胚芽鞘。 $R-r$  复合基因是紫色糊粉层( $R$  单元),无(白)色胚及胚芽鞘,紫红色花药( $r$  单元)。 $R-g$  复合基因是紫色糊粉层( $R$  单元),无(白)色胚及胚芽鞘,绿色花药( $g$  单元)。唯有  $R-nj$  是单独 1 个的显性复合基因,性状表现能清楚

表达紫色糊粉层冠顶,无(白)色胚及紫色胚芽鞘( $R-nj$  单元),绿色花药(图 3)。

$R$  基因位除了显性紫色的  $R$  基因及隐性无色  $r$  基因之外,还有跳跃基因引起的显性变异,包括紫色的  $R-sc$ 、紫色胚芽鞘的  $R-scm$ 、细条状紫色的  $R-st$ 、块状紫色的  $R-mb$  以及不规则紫色的  $R-m$  等<sup>[19]</sup>。

等位基因	糊粉层颜色	2, 3 显性剂量	$R-x r r$ 表现	胚/胚芽鞘	幼苗/植株
$R-r$	紫色		小型斑点 	无色	紫色 
$R-g$	紫色		小型斑点 	无色	绿色 
$r-r$	无色			无色	紫色 
$r-g$	无色			无色	绿色 
$R-ch b Pl$	淡紫		小型斑点 	无色	深紫色 
$R-mb$	块状紫色			无色	绿色 
$R-nj$	紫顶			紫点	紫色 
$R-sc$	紫色			紫色	绿色 
$R-scm$	紫色			紫色	绿色 
$R-st$	紫色斑点			紫色斑点	绿色 
$r-ch$	无色			无色	深紫色 

图 3  $R$  基因等位基因的颜色效果

Fig.3 The pigment effect of  $R$  allele

### 2.3 单倍体诱导系的辅助标记性状及其遗传

在选系基础群体类型为早熟硬粒(欧洲硬粒种质等)、热带种质(suwan 种质等)或带有抑制基因( $CI-I$ )时, $R-nj$  标记基因功能就会被弱化或抑制,杂交诱导所得子粒的斑纹标记表现变得非常模糊,甚至没有,这时单倍体子粒挑选变得非常困难,甚至是无法进行。为此,遗传学家又在主标识性状基础之上,添加了不同的器官表达的辅助标记性状(表 1)。至今,不但诱导系的胚尖、胚乳、胚根、茎秆、叶鞘到叶片等全部器官都已开发出相应直接鉴别的辅助性状标记,而且还开发出依靠各类功能仪器设备间接鉴别的高油胚选择标记、荧光幼胚选择标记、荧光胚乳选择标记等。其中,因紫色植株标记一目了然,应用较多。

紫色素标记:植物组织紫色素由位于第 3 号染色体长臂的  $A_1$ 、第 5 号染色体短臂的  $A_2$ 、第 2 号染色

体短臂的  $B_1$  及第 6 号染色体长臂的  $Pl_1$  这 4 个显性基因控制,玉米器官受光照后变成紫色,光照愈充足紫色表现越深。现在的 Stock 6 是导入花青素显性基因  $A_1A_2BP_1$  之后的材料,遗传结构是纯合的  $A_1A_2BBz_1Bz_2C_1C_2PR-nj$  基因组合(表 1),性状表现是子粒紫色的冠顶、胚芽鞘及胚根,紫色的茎秆、叶鞘及叶片,紫色的花序及花药等。诱导系与普通玉米选系基础群体(大多不带有  $B_1$  及  $Pl_1$  基因)杂交,获得的杂合二倍体子粒与植株除紫色冠顶、紫色胚芽鞘外,抽穗期前后茎秆、叶鞘、叶片、花序等多数器官都表现是紫色,而单倍体子粒与植株除紫色冠顶外,胚芽鞘及植株则呈现绿色,很容易鉴别。除此外,还有两个没有定位的紫色胚芽鞘控制基因  $Pu1$  及  $Pu2$ ,他们跟  $R-nj$  基因功能独立,当 3 个基因同时显性时,则胚芽鞘及部分胚变成深紫色,影响紫色胚芽鞘的判别。

表1 标记性状控制基因及基因组合  
Table 1 The list of marked trait and allele combine

标识性状基因组合 Trait gene combination	所在染色体区域 Chromosomal region	果皮、胚乳显色 Color of pericarp, endosperm	茎、叶显色 Color of stem and leaf
糊粉层紫色必要基因5对			
$A_1A_2C_1C_2R$		紫色	绿色
$a_1A_2C_1C_2R$	$a_1$ 位于3L-111	无色	绿色
$A_1a_2C_1C_2R$	$a_2$ 位于5S-15	无色	绿色
$A_1A_2c_1C_2R$	$c_1$ 位于9S-26	无色	绿色
$A_1A_2C_1c_2R$	$c_2$ 位于4L-123	无色	绿色
$A_1A_2C_1C_2r$	$r$ 位于10L-57	无色	绿色
糊粉层颜色修改基因4对			
$A_1A_2Bz_1Bz_2C_1C_2InPrR$		紫色	绿色
$A_1A_2Bz_1Bz_2C_1C_2InprR$	$pr$ 位于5L-46	红色	绿色
$A_1A_2Bz_1Bz_2C_1C_2inPrR$	$in$ 位于7S-20	深紫色	绿色
$A_1A_2Bz_1Bz_2C_1C_2inprR$		深红色	绿色
$A_1A_2bz_1Bz_2C_1C_2InPrR$	$bz_1$ 位于9S-31	深褐色	绿色
$A_1A_2Bz_1bz_2C_1C_2InPrR$	$bz_2$ 位于1L-106	深褐色	绿色
胚芽鞘基因2对			
$A_1A_2Bz_1Bz_2C_1C_2Pu_1Pu_2R-nj$		紫色胚芽鞘	绿色
$A_1A_2Bz_1Bz_2C_1C_2pu_1Pu_2R-nj$		紫色胚芽鞘	绿色
$A_1A_2Bz_1Bz_2C_1C_2Pu_1pu_2R-nj$	$pu_1$ 位于??	紫色胚芽鞘	绿色
$A_1A_2Bz_1Bz_2C_1C_2pu_1pu_2R-nj$	$pu_2$ 位于??	无色胚芽鞘	绿色
果皮及轴色控制基因			
$A_1A_2Bz_1Bz_2C_1C_2InPR$		果皮紫色 红轴	绿色
$A_1A_2Bz_1Bz_2C_1C_2InpR$	$p$ 位于1S-26	果皮无色 白轴	绿色
叶片及叶鞘紫色必要基因4对			
$A_1A_2BP_1$		无色	紫色
$a_1A_2BP_1$	$a_1$ 位于3L-111	无色	绿色
$A_1a_2BP_1$	$a_2$ 位于5S-15	无色	绿色
$A_1A_2bP_1$	$b$ 位于2S-49	无色	绿色
$A_1A_2Bp_1$	$p_1$ 位于6L-48	无色	绿色
植株紫色修改基因2对			
$A_1A_2BBz_1Bz_2iInP_1$		无色	深紫色
$A_1A_2BBz_1Bz_2iinP_1$		无色	紫色
$A_1A_2BBz_1Bz_2IInP_1$		无色	绿色
$A_1A_2Bbz_1Bz_2IInP_1$	$bz_1$ 位于9S-31	深褐色	红褐色
$A_1A_2BBz_1bz_2IInP_1$	$bz_2$ 位于1L-106	深褐色	红褐色
叶片黄色控制必要基因			
$Yg_3$		无色	叶片 黄绿色
$yg_3$	$yg_3$ 位于5L	无色	叶片 绿色
荧光胚(乳)控制必要基因			
$YFP$	不同事件位置不同	绿色荧光胚(乳)	无荧光
$yfp$		无荧光胚(乳)	无荧光
$GFP$	不同事件位置不同	红色荧光胚(乳)	无荧光
$gfp$		无荧光胚(乳)	无荧光
子粒油分控制基因群			
高油子粒	QTL位于6、1、8、7等染色体	脂肪8%以上	绿色
普通子粒		脂肪4%左右	绿色
胚乳淀粉颜色控制基因			
$Y_l$		胚乳黄色	绿色
$y_l$	$y_l$ 位于6L-17	胚乳白色	绿色

黄色素标记:显性黄绿苗性状来源于  $Y_g-N1582$ ,由位于第5号染色体长臂的  $Y_g$  基因控制,性状表现是幼苗期开始叶片呈现黄绿色,抽穗后恢复绿色。黄绿苗标记性状的应用填补了诱导系幼苗期无标识的空白,目前,唯一的代表诱导系为吉黄诱系7号系列。其特异性在于当母本基础群体为早熟硬粒、热带种质、彩色子粒等类型或抑制基因( $CI-1$ )存在的情况下,子粒斑纹标记变得非常模糊,子粒挑选非常困难,甚至是不可能;此时,单倍体确认就只能依据叶片、茎秆及经验判别,但紫色标记最早也要在拔节后期显现。因此,在幼苗期根据黄绿苗标记确认可以减少大量人力、物力、财力与时间的浪费,特别是对早期加倍单倍体 EDH(Early doubled Haploid)系的判别非常有用,由于 EDH 系苗期长势与诱导产生的二倍杂株(基因型分离广泛,杂交诱导产生的二

倍体杂株也呈不规则连续分布)形态上区别非常困难,故很容易被当作伪单倍体株剔除,或模糊留苗自交授粉,待次年再鉴定。

高脂肪标记:是多基因控制的数量性状,遗传位点涉及6、1、8、7、9号等多条染色体的区段。陈绍江等提出用高油玉米花粉直感效应鉴别单倍体的技术原理(图4),并培育出脂肪含量9%以上的高油型诱导系,杂交诱导普通玉米时,杂合二倍体和单倍体子粒油分差异达到了40%左右,利用核磁共振仪器或近红外仪器检测准确率达95%左右,解决了紫色素表达受环境和母本遗传背景的影响较大,鉴别准确率低的问题。由于高脂肪胚是间接鉴别标记,须借助专用核磁共振仪器挑选。因此也被视为实现了单倍体人工挑选到机械鉴别的技术升级<sup>[20,21]</sup>。

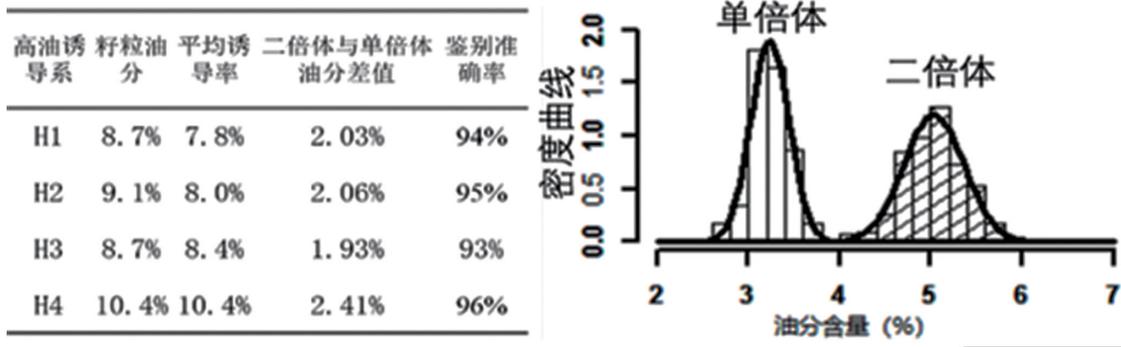


图4 高油型诱导系及油分鉴别原理

Fig.4 The principle of identifying haploid with oil content

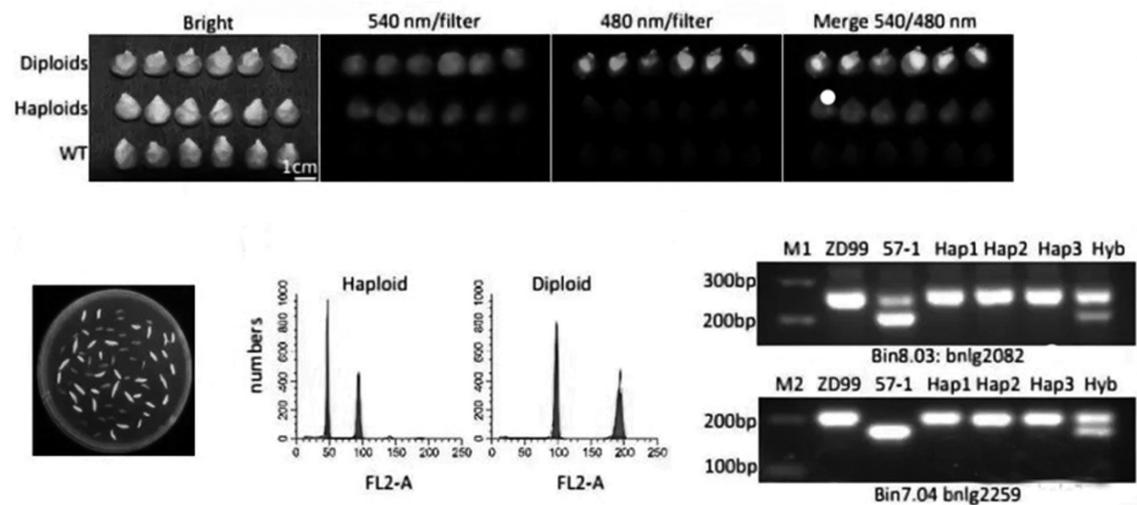


图5 GFP系统在单倍体鉴定中的应用

Fig.5 The application of GFP system in haploid identification

荧光(YFP、GFP)蛋白标记:通过转基因方法可将荧光(YFP、GFP)蛋白基因转移到单倍体诱导系中。由于不同方法、不同启动子所获得的不同事件,

$YFP$ 、 $GFP$ 基因整合到染色体的位置不同,表现差异也不相同,借助荧光观察器具(荧光激发光源、荧光体式显微镜与激光共聚焦显微镜等)很容易鉴别筛

选。谢传晓等采用胚特异型启动子 ZmESP 和胚乳特异性启动子 HvASP, 构建了胚特异表达绿色荧光蛋白(eGFP)和胚乳特异表达红色荧光蛋白(DsRED)的双荧光标记单倍体诱导系, 并开发出基于组织特异表达的双荧光蛋白标记的单倍体鉴定技术。用荧光蛋白标记诱导系花粉给母本授粉后, 具有绿色或红色荧光的胚或子粒为杂合二倍体, 不具有荧光的为单倍体胚(图 5)。荧光蛋白标记既可以作为替代诱导系 *R-nj* 基因的主标识也可以作为副标识应用。由于荧光蛋白标记诱导系是转基因材料, 严格限定在转基因实验室内应用<sup>[22,23]</sup>。

除这些外, 在黄色玉米单倍体育种过程中, 诱导系的白色子粒及杂种优势表现也可以作为辅参考标记。

## 2.4 单倍体诱导系的评价与分类

### 2.4.1 单倍体诱导系的评价

诱导系的功能是通过杂交诱导产生单倍体, 因此, 其价值是杂交诱导产生单倍体的获得率, 对其优劣的评价主要应以诱导率高低为主要指标。就目前诱导率水平表现看, 超过 10% 即可满足规模化育种需求, 要求主标识明显并表现要强, 辅助标识尽量多样, 同时, 植株生长势要强、花期要长、粉量要大与温光钝感等。玉米育种的产量、品质等商业化性状的优劣就显得没有太大的意义, 或多或少带有活力低、易感病、花粉少、易倒伏及结实低等很多这样或那样的缺点, 只要没有致死作用, 一般也都被育种家所接受。甚至有育种家感到多系混合的诱导系综合种散粉花期长, 植株生长势强, 使用更为得心应手。

### 2.4.2 诱导系的分类

#### 2.4.2.1 按被诱导基础材料分类

诱导系不但可以自身产生单倍体, 不同诱导材料可以诱导母本或父本产生单倍体。

**母本诱导系:**用该类诱导系作父本、以选系的基础材料为母本, 用诱导系花粉诱导母本基础材料产生单倍体。现在所用的诱导系大多为该系, 如国外的 RWS、KMS、UH400 等, 国内的农大高诱 1 号、高诱 5 号, 吉高诱 3 号、吉高诱 31 等。

**父本诱导系:**用该类诱导系作母本、以选系的基础材料为父本, 以其花粉为诱导系授粉, 诱导选系基础材料产生单倍体。因诱导系本身结实数量少, 诱导父本结实效率远远少于母本诱导系, 故对该类诱导系研究很少, 数量也很少, 诱导率也很低, 但其可快速转育细胞质雄性不育系的特殊功能体现出其重要利用价值, 如 Kermicle 发现的带有不确定配子体 *igl* 基因的 W23ig 等<sup>[24]</sup>。

#### 2.4.2.2 按标记性状分类

诱导系没有标识性状就无法应用于育种实践, 因此按诱导系的标识性状可分为两类。

**直接标记性状诱导系:**杂交诱导后可以通过肉眼直观鉴别方法区分杂合二倍体和单倍体子粒的诱导系。主要主标记为胚尖紫色、紫色冠顶, 对大宗商品玉米来说副标识主要为红粒、白(紫)粒, 红叶、黄叶, 紫秆、紫叶鞘等, 其中, 以 Stock 6 衍生系大多是紫秆红粒。通常以绿秆黄粒型诱导系、绿秆白粒型诱导系、紫秆白粒型诱导系、紫秆黄粒型诱导系居多。

**间接标记性状诱导系:**杂交诱导后需要借助核磁共振仪、近红外仪等鉴别方法区分杂合二倍体和单倍体的诱导系。目前, 这类诱导系还比较少, 如农大高油分标记系列诱导系、绿色荧光标记的 CAUY-FP 等诱导系, 中国农业科学院的双色荧光标记诱导系。

## 3 展 望

20 世纪 90 年代, 伴随单倍体诱导系诱导频率的快速提升, 杂交诱导与加倍方法的不断完善, 在主要玉米生产国杂交诱导单倍生殖规模化育种技术体系逐步形成, 并以前所未有的速度迅速普及推广, 未来杂交诱导单倍生殖诱导系的开发也将更加系统全面。

### 3.1 单倍体诱导系的功能添加, 拓展杂交诱导单倍体育种新时代

田间的优中选优与室内生物技术相结合是未来品种选育的大趋势。目前, 杂交诱导单倍体育种方法已经成为替代传统系谱育种方法的主流技术, 实现了在短时间内(两代)批量快速创制不受遗传背景限制的 DH 自交系; 同时, 以 CRISPR/Cas9 为代表的基因组编辑技术也在迅猛发展, 成为革命性的高效精准改变 DNA 序列的定向编辑育种工具, 两者革命性技紧密结合将迸发出更加高效, 更加快捷的新技术体系。2019 年, 将以 ZmLG1 为目标的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统导入到诱导系 CAU<sub>5</sub> 中, 成为介导诱导系 CAU5LG1-Cas9, 两个世代创造出了经基因编辑改良的 DH 系<sup>[25]</sup>。该方法打破了基因编辑育种对材料遗传转化能力的依赖, 开辟了创造不含转基因(CRISPR 载体)的 DH 自交纯系。因此, 未来的热点研究将是基因组编辑能力与诱导单倍体效率相结合的提升与完善, 在此基础上, 形成操作简单便捷、成本低, 高频突变的“单倍体诱导系+CRISPR/Cas9”育种技术流程, 既“杂交诱导单倍生殖+CRISPR/Cas9 基因编辑”的育种体系。

### 3.2 单倍体诱导系的持续改良,提高杂交诱导单倍体诱导率

自 Stock6 育成以来,诱导率从当初的 1%~3% 成功地提高到 10% 以上,印证了“诱导能力的遗传主要以加性效应为主,并狭义遗传力较高,这对诱导率的改良和提高育种效率具有重要意义”<sup>[26]</sup>。因此,通过有利基因的不断累加聚合,再加上早代选择的改良方法,可有效地提高或稳定诱导效率。可以选择具有较高利用潜力的诱导材料构建基础群体,再利用多个遗传背景差异较大的材料早代进行诱导率测验,选育诱导率更高的诱导系材料。由于诱导系涉及的性状并不复杂,诱导基因也已被定位与克隆,关键分子标记也同时被开发,进一步伴随着主要标识性状分子标记的发掘,高效诱导系的分子标记辅助选育方法将会大幅度提高单倍体诱导系的诱导率。

### 3.3 拓宽单倍体诱导系遗传基础,高效利用诱导系杂交组合

目前,对诱导系在诱导率、散粉性、标识性、抗病性、适应性的改良取得了很大进展,诱导系综合性状都得到了全面改良,但仍难以满足规模化、隔离区条件下自然杂交诱导的要求,被诱导材料多为杂交 F<sub>1</sub> 代,较为高大,长势强,而诱导系矮小细弱,带来田间管理难度。特别是很多诱导系连续自交生长势逐步衰退,导致诱导率、散粉量降低。因此,未来有效的解决的办法是拓宽现有诱导系血缘遗传基础,选育更多新血缘类型的诱导系,用现有高频诱导系与新的类型诱导系配制诱导系杂交组合,通过诱导率杂种优势测试,选育高效利用正向超亲优势杂交组合。Kebede 等利用诱导系间杂交组合 UH400×RWS 诱导能力杂种优势具有超亲现象,进行单倍体诱导,效率大幅度提高。才卓等利用吉绿诱组合 1 号、吉紫诱组合 1 号多年,诱导率、生长势明显优于纯合系。

### 3.4 发掘自动化高效鉴别新标记,奠定高通量智能化筛选基础

控制胚及胚乳颜色的 *R-navajo* 斑纹基因表达受基因型与环境影响较大,在不同遗传背景下与不同环境条件下单倍体子粒标记表现差异较大,有时紫色冠顶显色微弱,仅是个很小的紫点,甚至难以发现,导致筛选非常困难。特别是对早熟硬粒、厚种皮子粒、热带血缘、彩色子粒玉米等类型材料诱导时难以鉴定。因此,亟待开发新像高油、荧光等那样便于机械化、自动化高效鉴别的标记,以适于未来高通量、智能化育种发展的大趋势。如通过药剂专杀、遗传致死、机械识别等方法实现智能判别机械化鉴

选。成功的实例包括对配子体、细胞集团进行耐逆性及耐除草剂的选拔等。

#### 参考文献:

- [1] Stadler L J. Gamete selection in corn breeding[J]. J. Am Soc. Agron., 1944(36): 988-989.
- [2] Chang M T, Coe E H. Doubled haploids. In: Kriz A.L., Larkins B.A. (eds) Molecular genetic approaches to maize improvement[B]. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 2009(63): 127-142.
- [3] Coe E H Jr. A line of maize with high haploid frequency[J]. The American Naturalist, 1959, XCIII, 873: 381-382.
- [4] Rober F K. In vivo haploid induction in maize performance of nwe inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding[J]. Maydica, 2005(50): 275-283.
- [5] Shatskaya O A, et al. Mass induction of maternal haploids in corn[J]. Maize Genet Coop Newslett, 1994, 68: 51.
- [6] Lashermes P, Beckert V L. Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines[J]. Theor. Appl. Genet., 1988, 76: 405-410.
- [7] Chalych S T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding[J]. Euphytica, 1994(79): 13-18.
- [8] Prigge V C, Sanchez B S, Dhillon W, et al. Doubled haploids in tropical maize: Effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates[J]. Crop Sci., 2011, 51: 1498-1506.
- [9] 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, 690.  
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. Boreal. Occident. Sin., 2000, 20(4): 495-502, 690. (in Chinese)
- [10] 陈绍江, 宋同明. 利用高油分的花粉直感效应鉴别玉米单倍体[J]. 作物学报, 2003, 29(4): 587-590.  
Chen S J, Song T M. Identification haploid wity high oil xenia effect in maize[J]. Acta Agronomica Sinica, 2003, 29(4): 587-590. (in Chinese)
- [11] 才卓, 徐国良, 刘向辉, 等. 玉米高频率单倍体诱导系吉高诱系 3 号的选育[J]. 玉米科学, 2007, 15(1): 1-4.  
Cai Z, Xu G L, Liu X H, et al. The breeding of JAAS3-Haploid Inducer wity high frequency parthenogenesis in maize[J]. Journal of Maize Sciences, 2007, 15(1): 1-4. (in Chinese)
- [12] Liu C, Li X, Meng D, et al. A 4bp insertion at *ZmPLA1* encoding a putative phospholipase A generates haploid induction in maize[J]. Mol. Plant, 2017, 10(3): 520-522.
- [13] Yu Z, et al. Mutation of *ZmDMP* enhances haploid induction in maize[J]. Nature Plants, 2019, 5: 575-580.
- [14] Chase S S. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize, and in its component single cross hybrids and inbred lines[J]. Genetics, 1949, 34: 328-332.
- [15] Chase S S. Efficient methods of developing & improving inbred lines. The monoploid method of developing inbred lines[R]. Report of 6<sup>th</sup> Hybrid Corn Industry-Research Conference, 1951: 29-34.

(下转第 24 页)

- [8] 杨俊品, 荣廷昭, 向道权, 等. 玉米数量性状基因定位[J]. 作物学报, 2005, 31(2): 188-196.  
Yang J P, Rong T Z, Xiang D Q, et al. QTL mapping of quantitative Traits in maize[J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(2): 188-196. (in Chinese)
- [9] 赵璞, 刘瑞响, 李成璞, 等. 基于掖478导入系的玉米产量性状QTL鉴定[J]. 中国农业科学, 2011, 44(17): 3508-3519.  
Zhao P, Liu R X, Li C P, et al. QTL mapping for grain yield associated traits using Ye 478 introgression lines in maize[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(17): 3508-3519. (in Chinese)
- [10] 张玉娜, 张强, 潘芳芳, 等. 玉米产量相关性状的QTL定位与剖析[J]. 复旦学报(自然科学英文版), 2017, 56(4): 421-430.  
Zhang Y N, Zhang Q, Pan F F, et al. Detection of quantitative trait loci for maize grain yield and kernel-related traits[J]. Journal of Fudan University: Natural Science Edition in English, 2017, 56(4): 421-430. (in Chinese)
- [11] 靳晓春, 李庭峰, 吴方勇, 等. 玉米产量及相关性状的QTL分析[J]. 玉米科学, 2011, 19(5): 10-18.  
Jin X C, Li T F, Wu F Y, et al. QTL mapping for yield and related character[J]. Journal of Maize Sciences, 2011, 19(5): 10-18. (in Chinese)
- [12] 詹晶晶, 邢文慧, 田玉焕, 等. 基于掖478导入系的玉米百粒重QTL鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(5): 955-960.  
Zhan J J, Xing W H, Tian Y H, et al. Identification of QTL for 100-kernel weight based on introgression line in maize[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2015, 16(5): 955-960. (in Chinese)
- [13] 李成璞, 白苇, 翟立红, 等. 玉米穗行数QTL及其互作分析[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(5): 955-960.  
Li C P, Bai W, Zhai L H, et al. Identifying and interaction assay of QTL for row number per ear of maize[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2015, 16(5): 955-960. (in Chinese)
- [14] 高之仁. 数量遗传学(第1版)[M]. 成都: 四川大学出版社, 1986.
- [15] 霍仕平, 晏庆九, 向振凡, 等. 我国西南地区的玉米育种实践与思考[J]. 作物杂志, 2017, 17(1): 20-24.  
Huo S P, Yan Q J, Xiang Z F, et al. Practice and thinking of maize breeding in southwest of China[J]. Crops, 2017(1): 20-24. (in Chinese)
- [16] Stuber C W, Lincoln S E, Wolff D W, et al. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers[J]. Genetics, 1992, 132(3): 823-839.
- [17] Lawrence C J, Dong Q, Polacco M L, et al. Maize GDB the community database for maize genetics and genomics[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32: 393-397.
- [18] Cao Y G, Wang G Y, Wang S C, et al. Construction of a genetic map and location of quantitative trait loci for dwarf trait in maize by RFLP markers[J]. Chinese Science Bulletin, 2000, 45(3): 247-250.  
(责任编辑: 朴红梅)

(上接第16页)

- [16] Chase S S. Monoploids in maize. Heterosis[M]. Edited by J. W. Gowen, Iowa State College Press, Ames, 1952: 389-399.
- [17] Coe E H Jr. A line of maize with high haploid frequency[R]. The American Naturalist, 1959, 873: 381-382.
- [18] Coe E H Jr, Sarkar K R. The detection of haploids in maize[J]. The J. of Heredity, 1964, 5: 231-233.
- [19] 张铭堂. 玉米之遗传(续)第六章: 花青素合成[M]. 科学农业, 1995.
- [20] 吕秀清. 玉米子粒油分QTL定位及其效应分析[D]. 中国农业大学, 2005.
- [21] 赵韦. 高油玉米突变体子粒油分QTL定位[D]. 东北农业大学, 2008.
- [22] Dong L, Li L N, Liu C L, et al. Genome editing and double fluorescence proteins enable robust maternal haploid induction and identification in maize[J]. Molecular Plant, 2018, 11(9): 1214-1217.
- [23] 陈宝建, 刘丽威, 徐丽, 等. 玉米单倍体幼胚加倍效果观察[J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(5): 10-16.  
Chen B J, Liu L W, Xu L, et al. Observation on doubling effects of immature haploid embryo in maize[J]. Journal of China Agricultural University, 2016, 21(5): 10-16. (in Chinese)
- [24] 张姿丽, 徐尚忠. 玉米Stock6衍生系诱导单倍体的机理[D]. 华中农业大学, 2008.
- [25] Wang B B, et al. Development of a Haploid-Inducer mediated genome editing system for accelerating maize breeding[J]. Molecular Plant, 2019, 12: 597-602.
- [26] 张如养, 段民孝, 赵久然, 等. 8个玉米单倍体诱导系诱导率的配合力研究[J]. 玉米科学, 2015, 23(5): 12-15.  
Zhang R Y, Duan M X, Zhao J R, et al. Combining ability of haploid induction rate of eight inducers in maize[J]. Journal of Maize Sciences, 2015, 23(5): 12-15. (in Chinese)  
(责任编辑: 朴红梅)