

# 玉米单倍体诱导育种的研究进展

王永斌,赵远玲,刘昭军,李 铁,王广金

(黑龙江省农业科学院 生物技术研究所/黑龙江省农业科学院生物技术重点开放实验室,黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**为提高决选玉米自交系的效率,加快玉米单倍体诱导育种的研究进程,对玉米单倍体诱导育种的发展历程、研究进展及应用现状进行综述,展望了单倍体诱导系在玉米育种中的应用前景。

**关键词:**玉米;单倍体诱导系;自交系

**中图分类号:**S513.035.2

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2013)11-0131-04

玉米(*Zea mays* L.)是我国的重要粮食作物,在全世界范围内也广泛种植,种植面积和产量均列农作物的第一位<sup>[1]</sup>。2012年,中国社会科学院农村绿皮书发布会暨中国农民经济形势分析与预测研讨会报告预测,2012年玉米产量将超过稻谷,成为我国第一大粮食作物。

玉米育种的核心环节是选育高产、高抗、高配合力的“三高”优良自交系。近年来,以孤雌生殖诱导单倍体为基础的单倍体育种技术研究与应用发展迅速,已经成为国内外玉米育种的核心技术之一。单倍体育种通过配子体优先选择有利基因型,只需一季就可获得新自交系,进而加快选系的进程。另外,单倍体加倍形成的双单倍体(DH, Doubled haploid)系,可利用充分显现的显性性状直接淘汰含有不利隐性性状的个体,完全消除可致死基因;DH作为永久群体,可在不同环境和季节进行重复试验减少环境误差,应用于构建遗传图谱和基因定位;DH还可以提高突变体选择效率、快速固定特殊性状,因其基因高度纯合而成为遗传和育种的理想材料,如转基因受体及遗传标记分析等。基于各国作物育种家对单倍体育种在玉米中的应用,并努力使其成为欧美商业化育种的主要选系方法,该文对玉米单倍体诱导育种的研究进展进行综述,以期加快玉米育种研究的发展进程,为玉米单倍体诱导育种的研究提供参考。

## 1 玉米单倍体诱导系育种研究历程

### 1.1 单倍体植株形态特征

具有配子染色体的细胞或个体,仅由原生物

体染色体组一半的染色体组数所构成的个体、组织或细胞称为单倍体,由其分化并生长出的植株为单倍体植株。单倍体植株的基本性状虽然和原生物体相同,但明显较小、较纤弱,植物的单倍体几乎都不能形成种子。单倍体籽粒胚面小,盾片小,在田间生产中主要表现为生长缓慢,植株细矮,在2~3叶期幼茎和根的长度显著细短;叶片上扬、细小,表面积仅为正常植株的50%,单位面积叶片上气孔数目较多,气孔保卫细胞较小,叶绿体数目较少;单倍体的体细胞、细胞核和花粉母细胞都小,雄花败育或发育不正常,雌穗花丝短,自交不易结实。

### 1.2 单倍体诱导育种

单倍体染色体组一经加倍,即得到同等纯合的纯系,是快速决选优良资源的优异材料。20世纪初,第1株单倍体植株由Bergner在蔓陀罗中发现并确定,此后,烟草、油菜、西红柿、棉花、水稻和小麦等一系列高等植物中均被鉴定出自发产生的单倍体。玉米单倍体则是20世纪20年代末由Randolph和Stadler第1次报道发现。单倍体自然发生机率一般不超过0.1%<sup>[2]</sup>,因此大量单倍体的获得必须通过人工方法进行诱导。单倍体人工诱导的途径很多,如远缘杂交、花药培养以及化学药剂诱导等。然而在玉米育种实践中,这些方法明显不足,直到1949年,Chase提出选择父本提高诱导产生单倍体的频率的理念,即通过单倍体诱导选系的方法,用单倍体诱导系作父本杂交,使母本产生单倍体的频率显著提高。

### 1.3 玉米单倍体诱导系育种

20世纪50年代,美国遗传学家Ed. Coe博士

收稿日期:2013-06-03

第一作者简介:王永斌(1976-),女,黑龙江省哈尔滨市人,博士,助理研究员,从事生物技术育种研究。E-mail:wyby119@126.com。

获得一个具白色胚乳和紫色糊粉层的玉米高频率诱发单倍体的材料 Stock6,其自交和杂交后代可分别产生 2.52%和 1%~2%的单倍体植株。随后,Coe 等又将 2 种显性标记基因导入 Stock6,即控制籽粒糊粉层和形成胚芽色素的 *ACR-nj* 基因

和控制不定根、叶鞘和茎秆色素形成的 *ABPI* 基因,经过 2 次回交和 2 次自交,将其改良成具有 Navajo 斑纹的籽粒和紫色植株双显性遗传标记的单倍体诱导系<sup>[3]</sup>。单倍体诱导产生双单倍体的途径见图 1。

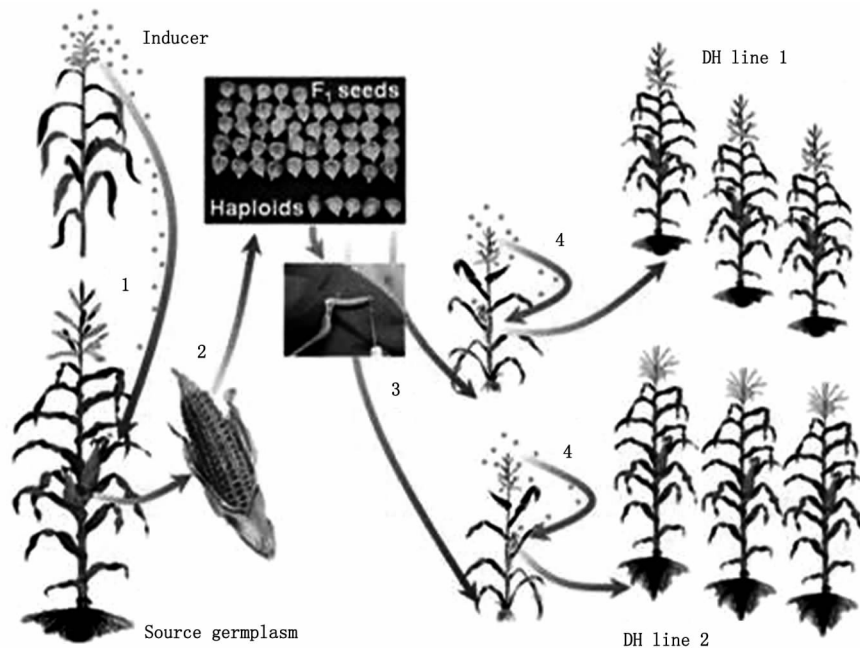


图 1 单倍体诱导产生双单倍体的途径<sup>[4]</sup>

1:单倍体诱导(诱导系与育种材料杂交);2:杂交籽粒中拟单倍体鉴定(利用籽粒颜色);3:单倍体加倍(化学药剂或自然条件);4:加倍籽粒自交形成双单倍体系 DH 系

Fig. 1 Schematic description of doubled haploid(DH)line development with the in vivo haploid induction approach<sup>[4]</sup>

1: Haploidy is induced by pollinating the source germplasm with pollen from a haploid inducer genotype. 2: Identification of putative haploid seeds (with a haploid embryo) using a seed coloration marker system; 3: Doubling of chromosomes of putative haploids by treating seedlings with a mitotic inhibitor; 4: DH plants are self-pollinated to produce seeds for maintenance and multiplication of the DH line.

活体诱导产生单倍体的方式有 2 种:母本单倍体和父本单倍体。1959 年,Coe 发现可作为父本与其它系杂交授粉,并能产生 1%~2%的母本单倍体的玉米单倍体诱导系 Stock6<sup>[3]</sup>;Kermicle 发现 W23 的不定配子突变系 W23ig(indeterminate gametophyte)作为母本与其它系杂交时,可以产生 0~2%的父本单倍体<sup>[3]</sup>。父本的作用在孤雌生殖诱导系中体现的非常充分。任何玉米材料在理论上都可能出现一定频率的单倍体,但由于频率太低难以应用,因此选育诱导系一般以 Stock6 为基础材料。研究表明孤雌生殖诱导系 Stock6 的诱导性状是由核基因控制的,其诱导能力主要是由具有加性效应的多基因所决定的,环

境互作的影响较小。通过与其它材料杂交进行选育并选择便可以提高。

单倍体的产生除了取决于诱导系外,与母本遗传背景也有一定关系,即受与之杂交的另一亲本基因型的限制。由于 Stock6 和 W23(ig)的单倍体诱导率很低,国内外许多育种家先后进行诱导系的杂交改良,意图创造更多的诱导系。Stock6 和 W23 衍生的高频新诱导系有法国的 WSl4、前苏联的 ZMS(Zarodyshevsky marker Saratovsky)、俄罗斯的 KMS(Korichnew marker Saratovsk)、摩尔多瓦的 MHI(Moldovian haploid inducer)<sup>[5]</sup>以及后来德国的 RWS 和 UH400 等,其单倍体诱导率均可达到 3%以上;我国的刘志

增等育成了农大高诱 1 号,并进一步筛选出含油量在 7.5%左右的高油型高诱 1 号,同时还创建了新型单倍体鉴别体系<sup>[6]</sup>;平均诱导率为 10.4%的吉高诱系 3 号则由才卓等育出<sup>[7]</sup>。目前,法国、美国和德国的一些跨国公司商业化应用选的诱导

系诱导率均可达 6%以上。

2 单倍体的筛选与鉴定

鉴定单倍体方法有很多(见表 1),育种家在育种实践中,综合并灵活熟练地运用各种方法,事半功倍。

表 1 玉米单倍体的鉴定方法  
Table 1 Selection methods of maize haploids

器官 Organs	应用技术 Application technology	观察指标 Observation targets	理论基础 Theoretical basis
籽粒、植株 Grain and plant	人工分拣	籽粒大小颜色,植株生活力及生长状态,株高,胚与盾片大小	形态学鉴定 ACR-nj, ABPI 遗传标记
籽粒 Grain	自动化分选	胚部特征	RGB 组合快速识别算法与玉米分选试验台结合的动态分选系统 <sup>[8]</sup>
根尖 Root tip	染色体压片	染色体数	细胞遗传学方法
叶片 Leaf blade	显微镜观察	气孔数目,保卫细胞大小,叶绿体含量	形态解剖学方法
Leap blade	电离照射	叶片颜色	射线照射法
	流式细胞仪	细胞核中 DNA 倍性	细胞遗传学方法
	DNA 提取	SSR 标记	分子标记方法 <sup>[9]</sup>
花粉 Pollen	I <sub>2</sub> -KI	花粉活力	生理生化法

3 单倍体加倍技术

在自然条件下,单倍体各部分组织的体细胞可以正常加倍。1952 年,Chase 研究表明单倍体的自然加倍率约为 10%<sup>[3]</sup>。Zabirova 和 Shatskaya 在后来的研究中则发现除少数材料不发生自然加倍外,大多材料的单倍体均能自然加倍,但加倍率低于 5%。为提高新选单倍体雄穗的自然加倍频率,利用 2 个 DH 系作为亲本材料,进行下一轮选系,其育性恢复率可从 9.4%提高到 33%,甚至高达 43%。因此,在生产实践中,自然加倍特性可以通过再选择来提高。

目前,最常用的染色体化学加倍剂是秋水仙素,其加倍效果与多种因素有关,需要在一个细胞分裂周期内,用 0.05%~0.10%浓度的秋水仙素对不同器官(种子、幼根、幼苗)进行注射或浸渍,达到加倍效果<sup>[10]</sup>。植物单倍体的加倍还可以用一些具有植物细胞微管组装抑制作用的除草剂;此外,甲基胺草磷(amiprophos-methyl, APM)可以有效干扰细胞有丝分裂,阻碍纺锤丝的形成,产生微核,Stadler 与 Blanco 等研究认为其可引起染色体加倍<sup>[3]</sup>。Ramulu 等发现在马铃薯细胞悬

浮培养中,15~32 μmol·L<sup>-1</sup>甲基胺草磷比 0.5~5.0 mmol·L<sup>-1</sup>的秋水仙素在细胞分裂中期诱导细胞的微核更有效,频率更高<sup>[3]</sup>;氟乐灵(Trifluralin)也有一定的加倍效果,快苯酰草胺(Pronamide)经由 Beaumont 等的研究发现其也可以提高玉米花粉诱导愈伤组织的加倍率<sup>[3]</sup>。惠国强等<sup>[11]</sup>通过使用这 3 种除草剂显著提高了玉米单倍体的加倍频率,其中 80 mol·L<sup>-1</sup>甲基胺草磷的效果最好,但不同基因型单倍体对除草剂的敏感性存在差异。

4 展望

目前各国育种家对从单倍体获得纯系的兴趣越来越浓厚,在玉米商业育种竞争日趋激烈的当今世界,很多国家知名的种子公司已经将该方法作为成型技术,广泛应用于玉米的商业化育种之中。初步统计数据表明,利用单倍体诱导系德国 KWS 公司每年可产生 1 500~2 000 个纯系,美国已完善并熟练掌握玉米单倍体的鉴别、筛选及育种方法,也育成了许多优良的玉米单倍体诱导系。

我国的玉米单倍体诱导系的选育已有长足的

发展,诱导系的选育以及单倍体加倍的前期工作已经取得一些成绩,并获得了具有优良农艺性状的 DH 系,也有多个优良组合参加国家级和省级区域试验。刘志增等育出的诱导系农大高油型高诱 1 号彻底结束了国外对玉米高频率诱导系的垄断。2012 年,重庆市农业科学院采用单倍体生物诱导选育的玉米新自交系渝 051 通过了重庆市农作物品种审定委员会的鉴定,成为我国南方地区第一个通过鉴定的玉米双单倍体诱导品系。

由于诱导效率受到母本材料、地点以及环境等因素的影响,为提高单倍体育种技术系统效率,育种中要系统地利用高频诱导材料,选择高频诱导地点及最适诱导时间<sup>[12]</sup>。另外,由于单倍体诱导系品种不足、加倍的方法单一、加倍的效率低等制约了我国单倍体育种工作的发展进程,玉米单倍体的鉴别、筛选和育种方法远远没有形成完善的工程化,特别是专业化和基地化的发展模式仍不能进行商业化应用。

随着研究的深入开展,未来的单倍体诱导技术在玉米育种中拥有广阔的市场发展前景。育种家们仍要广泛地收集、引进和筛选国内外优秀的品种资源,根据农业生产实际需要,充分应用现储的玉米优质遗传基因种质库,优化有效的诱导模式和加倍方法,更多地选育诱导率高的诱导系,逐步建立相对完善的育种平台,进而充分有效地发挥单倍体诱导育种的绝对优势,积极开发我国玉

米种业无限潜力,提升产业竞争力,占据国内外市场更多的份额,创造更大的经济价值。

#### 参考文献:

- [1] FAO. FAO Statistical Yearbook[M]. Rome:FAO,2009:59-62.
- [2] 刘纪麟,马克军. 诱发单倍体快速选系育种——单倍体纯合二倍体选系方法[J]. 玉米科学,2003,11(7):70-72.
- [3] 才卓,徐国良,张铭堂,等. 玉米单倍体育种研究进展[J]. 玉米科学,2008,16(1):1-5.
- [4] Prigge V, Melchinger A E. Production of haploids and doubled haploids in maize[J]. Methods Mol Biol., 2012, 877: 161-72.
- [5] Eder J, Chalys S. *In vivo* haploid induction in maize[J]. Theor Appl Genet, 2002, 104(4): 703-708.
- [6] 刘志增,宋同明. 玉米孤雌生殖诱导系 Stock6 的表现及其遗传改良初报[J]. 中国农业大学学报, 1998, 3(增刊): 6-10.
- [7] 才卓,徐国良,刘向辉,等. 玉米高频率单倍生殖诱导系吉高诱系 3 号的选育[J]. 玉米科学, 2007, 15(1): 1-4.
- [8] 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(4): 199-103.
- [9] 汤飞宇,王菲,王国英. 利用 SSR 标记检测来源于玉米孤雌生殖的双倍体[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(6): 859-862.
- [10] 黎亮,李浩川,徐小炜,等. 玉米孤雌生殖单倍体加倍技术研究进展[J]. 玉米科学, 2010, 18(1): 12-14, 19.
- [11] 惠国强,杜何为,杨小红,等. 不同除草剂加倍玉米单倍体的效率[J]. 作物学报, 2012, 38(3): 416-422.
- [12] 黎亮,李浩川,徐小炜,等. 玉米孤雌生殖单倍体诱导效率优化方法研究[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(1): 9-13.

## The Advances in Haploid Induction Breeding of Maize

WANG Yong-bin, ZHAO Yuan-ling, LIU Zhao-jun, LI Tie, WANG Guang-jin

(Biotechnology Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Opening Key Laboratory of Biotechnology of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

**Abstract:** In order to improve the efficiency of final selection for inbred lines greatly, and to accelerate the research progress, the development of maize haploid induction breeding as well as the screening, identification and double technology were summarized, the prospects and development direction in maize breeding were analyzed.

**Key words:** *Zea mays* L.; haploid inducing lines; inbred line

欢迎加盟理事会、协办单位