

玉米单倍体育种技术发展现状及高效应用展望

徐丽媛 王利明 任正鹏 余宁安 王丽梅 刘芳 马小川 李海良 崔明亮

(合肥丰乐种业股份有限公司,安徽合肥 230088)

摘要:玉米是我国重要的粮食作物之一,也是常用的饲料作物,选育优良玉米品种对保障粮食安全和促进农业发展有非常重要的作用。通过使用单倍体育种技术,可以将纯系的育种时间从6~7代缩短为1~2代,从而加快育种进程,提升优良品种的选育效率。对玉米单倍体育种技术研究进展和高效评价方法进行综述,包括诱导系的选择和加倍方法的筛选。目前,DH系生产的工程化水平显著提高。在单倍体评价过程中,通过田间观察筛选、分子检测筛选、全基因组选择技术开展了DH系的高效评价研究。玉米单倍体育种技术与全基因组选育技术的有机结合,有助于高效筛选出符合育种要求的DH系,进一步提升单倍体工程化应用效率,在育种过程中具有良好的应用前景。

关键词:单倍体;DH系;玉米;筛选;全基因组选择

Development Status and Efficient Application Prospect of Maize Haploid Breeding Technology

XU Liyuan, WANG Liming, REN Zhengpeng, SHE Ning'an, WANG Limei,
LIU Fang, MA Xiaochuan, LI Hailiang, CUI Mingliang
(Hefei Fengle Seed Industry Co., Ltd., Hefei 230088)

玉米育种过程中一个关键的步骤是稳定纯系的获得,单倍体育种技术通过诱导产生单倍体植株并进行染色体加倍,迅速获得纯合的自交系,这一过程相较于传统方法大大缩短了育种周期,仅需一代即可达到纯合状态,从而快速锁定目标性状。经过世界各地的学者和专家在高效诱导系创制、单倍体的稳定加倍技术以及分子生物学工具整合等方面的不断突破,玉米单倍体遗传改良取得了显著进展,诱导系的效率得到了大幅提升,使得在实验室条件下更可靠地产生单倍体植株成为可能。同时,通过细胞学方法和分子标记技术准确鉴定单倍体,并利用化学或物理方法促进染色体自然加倍,已形成了一个高效的单倍体育种体系。该技术具有明显的工程化特征,目前已开始大规模应用^[1]。我国在这一领域不断完善技术、提升效率,每年产出双单倍体

(DH)系数量可达千万以上,该技术已被列为现代玉米核心育种技术^[2]。

1 单倍体诱导系研究进展

玉米首个诱导系 Stock6,该诱导系为孤雌生殖,但农艺性状差,其诱导率平均只有2.52%,自交结实困难^[3],严重限制了单倍体技术的发展。经过几十年的研究和探索,中国农业大学通过将高油玉米育种材料与 Stock6 进行杂交筛选,得到诱导率达5.80%的诱导系——农大高诱1号^[4],取得较大突破。2007年才卓等^[5]育成的吉高诱系3号,其平均诱导率可达10.40%,有明显的显色标记,植株整体花粉量大,抗病抗逆性强。中国农业大学2017年通过全基因组测序技术克隆了玉米单倍体诱导基因(*ZmPLA1*)^[6],发现该基因是最有可能的*qhir1*区域的候选基因。随后利用CRISPR/Cas9介导的基因编辑技术敲除*ZmPLA1*进行基因功能验证,结果显示*ZmPLA1*敲除系对测试植株HIR的影响与

基金项目:安徽省重点研究与开发计划(2023n06020023)

通信作者:崔明亮

Stock6 相似。2019 年 Zhong 等^[7]采用图位克隆技术,定位了 *qhir8* 的候选基因,命名为 *ZmDMP*,同时突变 *ZmPLA1* 和 *ZmDMP*,诱导率可达到 7.00%。2022 年 Jiang 等^[8]解析玉米单倍体诱导关键基因发生的分子机制,研究发现,精细胞中活性氧(ROS)增多是诱导玉米单倍体产生的关键因素,通过对关键因素的剖析,鉴定了一个全新的诱导单倍体发生的新基因 *ZmPOD65*,研发出用化学试剂处理花粉从而诱导单倍体发生的新方法。Chen 等^[9]通过共表达转录因子 *ZmC1* 和 *ZmR2* 形成紫胚玉米新种质与高效单倍体诱导系 CAU6 融合,创制出不受材料背景的影响、单倍体鉴别准确率达 99.10% 的玉米诱导系 MAGIC1 (Maize Anthocyanin Gene InduCer 1)和升级版 MAGIC2,使得鉴别单倍体胚时间从传统的授粉后 21d 缩短到了 9d,同时保持了高准确率。玉米单倍体诱导系的不断创新,使得单倍体诱导过程越来越便捷、单倍体籽粒产出效率越来越高。籽粒高油诱导系、紫根苗诱导系、超前显色诱导系等一系列改良提升了诱导系在不同环境条件下的适应性,确保诱导效率和鉴定准确率不受地域、季节变化的影响,使该技术能够在全球范围内推广使用。

2 玉米单倍体加倍技术研究进展

2.1 自然加倍法 利用玉米诱导系材料诱导单倍体,通过自然加倍成 DH 系,是构建玉米 DH 系的一种操作简便且快速有效的方法。较早时期 Eder 等^[10]通过试验证实不同基因型母本诱导率之间有显著差异,张如养等^[11]将不同类群的骨干自交系作为母本材料,利用 6 个玉米单倍体诱导系对自交系进行诱导,得出 6 个不同诱导系的诱导率依次为京科诱 043 (6.06%) > 京科诱 044 (5.45%) > 京科诱 045 (5.24%) > 京科诱 006 (4.11%) > 京科诱 041 (2.45%) = 京科诱 005 (2.45%)。徐国良等^[12]以杂交种不同种质的混粉群体及单交种为母本材料,得出不同种质材料的单倍体自交结实率差异较大的结论,Reid 群最高为 13.01%,Lancaster 群较低为 2.30%。黎亮等^[13]以 20 个杂交种为母本材料进行单倍体诱导,结果表明高频材料的单倍体频率约为低频材料的 5 倍。李国良等^[14]通过试验证明农大高诱 1 号对塘四平头、旅大红骨、Lancaster、Reid 四大种质类群和热导地方种质群的平均诱

导率为 3.90%,不同类群间存在显著差异,其中对 Reid 群诱导率最高,对热导地方种质类群最低。蔡泉等^[15]研究结果表明,5 个诱导系(高诱 1 号、高诱 2 号、Y01、Y02、Y04)中单倍体诱导率最高的是 Y04,达到 8.90%,最低的是高诱 2 号,为 6.16%,不同群体间 Reid 血缘的诱导率较高,5 个诱导系平均达到了 8.54%,Lancaster 血缘的诱导率最低,平均为 6.38%。在诱导系实际应用过程中,要根据母本材料类型制定试验计划,才能收获理想 DH 系株数。

不同地域加倍效果也不同,要根据品种的加倍时间,选择合适的加倍地点。段民孝等^[16]在甘肃、北京、海南 3 个地方开展玉米自然加倍试验,结果表明:同一材料自然加倍效率随着种植地点不同差异明显,比较有利的时间、地点是甘肃春季播种和海南冬季播种。慈佳宾等^[17]在长春、榆树和白城分别种植同一种玉米基础材料,研究得出在长春种植加倍率显著高于榆树和白城。蔡泉等^[18]在海南和黑龙江设 4 个玉米材料组合加倍,经过验证,黑龙江平均加倍率(4.42%),海南平均加倍率(7.61%)。

2.2 人工加倍法 人工加倍单倍体过程要使用加倍试剂,考虑药剂的毒性、对环境的影响和成本因素,一般使用秋水仙素配合助渗剂(二甲基亚砜)以及细胞分裂素等^[19],将秋水仙素浓度控制在 0.06% 加倍效果最佳。也有研究人员通过使用除草剂达到加倍效果,惠国强等^[20]比较了 3 种除草剂对玉米单倍体成熟胚的加倍效果,发现 10 μ mol/L 的甲基胺草磷的效果最好,对先玉 335、中地 88 和郑单 958 的加倍率分别为 85.16%、80.20% 和 66.30%。

人工加倍方法使用较为广泛的有浸种、切芽、注射、组织培养加倍等^[21]。通过研究不同的加倍方法可提高单倍体技术的应用范围,文科等^[22]对单倍体不同加倍方法进行对比,证明对植株伤害比较严重的是浸根法和注射法,加倍效果最好的是浸种法。张坤明等^[23]将种子浸泡在秋水仙素溶液中 12h 表现最佳,其成活率、散粉率、结实率分别达到了 78.57%、57.14%、19.64%。王贺等^[24]将单倍体种子在秋水仙素溶液(0.07%)中浸芽处理 8h,加倍率达 16.5%。刘俊等^[25]利用秋水仙素溶液(0.06%),使用浸根、滴注心叶、注射生长点的方法分别对单倍

体籽粒进行加倍,结果证实注射生长点的方法可以使单倍体成株散粉率和结实率得到提升,平均加倍率达到23%。人工加倍过程中处理方式、药剂浓度、单倍体籽粒处理时间等因素不同,加倍效果存在较大差异,在加倍过程中要多次尝试,选择适合的加倍方案。

3 玉米 DH 系高效评价方法

由于玉米 DH 系生产具有阶段性,育种家需要短期聚集大量的人员完成阶段性工作,因此一些 DH 系生产服务公司应运而生。DH 系生产服务公司的成熟技术,使国内单倍体育种规模越来越大。巨大的生产量,带来的问题是众多新生产的 DH 系如果全部测配,必定浪费较多的人力物力与时间,技术应用的主要瓶颈是 DH 系大规模生产和材料评价能力之间效率不同,单倍体工程化育种的重点逐步向高效评价 DH 系转变,总结部分评价方法如下。

3.1 田间观察筛选

3.1.1 “两步法”测配 DH 系鉴定评价需要考虑到不同环境和不同品种,评价过程中规划测试小区的计算方法是 DH 系数量 $\times$ 测验种数量 $\times$ 测试环境数量。如每份基础材料产生 1000 个 DH 系,在 5 个不同生态区,使用 3 种不同测验种进行测交,要 1.5 万个小区,对很多育种单位来说,土地租赁面积有限,增加测试区域难度较大。为了降低经济成本,减少土地使用量,可以采取“两步法”进行选择,第 1 年使用一个测验种在较少地点进行测试,经过筛选后,第 2 年再利用多个测验种在多地进行测试^[26]。

3.1.2 田间 DH 系种植筛选 在田间像测试杂交组合一样高标准种植 DH 系,对所有 DH 系实施相同的灌溉、施肥、病虫害防治措施。组配前后多次观察、记录,大量淘汰综合性状不符合育种要求的 DH 系。制定详细的管理日志,记录每次操作的时间、方法和用量,确保各处理组之间的一致性。从播种到收获的全过程中,系统地记录生长发育指标(株高、分蘖数、开花期等)、产量、品质参数等。利用现代信息技术,如无人机监测、图像识别等手段,可以提高数据收集的效率和准确性。

3.2 分子检测筛选 使用杂交 F_2 世代开展单倍体诱导生产 DH 系比使用 F_1 能够获得更多需要的材料。只选择目标基因 F_2 个体用于 DH 系的生产,

DH 系的生产成本和评价成本将大大减少。分子检测可以作为自交系 DH 系评价的第一个漏斗^[27],在 F_2 世代诱导可以与分子检测相结合,通过分子标记技术(如 SSR、SNP 等)定期对种植的 DH 系进行遗传纯度验证,确保植株的基因型保持一致,排除可能的突变或污染。

3.3 玉米 DH 系高效育种 设计育种正引领着作物育种领域的一场革命^[28],随着智能设计育种阶段的到来,单倍体育种技术结合基因编辑工具(如 CRISPR-Cas9)、高通量分子标记、全基因组选择等^[29],极大地加速了优良性状的筛选和固定过程,标志着玉米育种进入了前所未有的高效时代。高效育种体系能够应用的基础条件需要要有以下几个方面:一定的 DH 系、高质量的表型鉴定、经济的基因型分析、可靠的统计建模。开展全基因组选择育种需要建立统计模型^[30],通过田间数据记载获得每个个体的性状表型值,对材料进行基因分型测序,获得 SNP 基因型,并估计 SNP 效应值用于后续分析。高通量分子标记技术让研究人员能够大规模地对整个基因组进行扫描,识别与特定性状相关的遗传标记,以实现表型的预测。通过设计育种^[31],使得在早期世代就能预测植株的表现成为可能,提高 DH 系选择的准确性,加快了优良基因型的鉴定速度。目前国内科研团队提出了一种可以降低成本的体系构建思路,育种家根据这些 DH 系本身的表型,先做筛选,淘汰掉大量有严重缺陷的 DH 系,仅把有希望的 DH 系做训练群体检测基因型,建立统计模型进行筛选。

4 小结与展望

随着单倍体技术应用过程中各环节技术的不断完善,该技术已在玉米育种工作中广泛应用。通过创制材料的 DH 系,可以增加玉米基础材料的遗传多样性,得到新的突变体。在育种过程中对 DH 系的需求量增大,需要逐步扩大国内低成本规模化 DH 系生产系统,整合数据分析技术,建立高通量 DH 系评价,形成智慧育种新模式,缩短育种周期,构建玉米高效育种材料选择体系,促进玉米商业化育种进入精准化的新阶段,推动现代种业与人工智能、大数据等前沿科技深度融合,更快地响应市场需求和环境变化,为全球粮食安全和可持续发展贡献力量。

参考文献

- [1] Rber F K, Gordillo G A, Geiger H H. In vivo haploid induction in maize—performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica*, 2005, 50: 275–283
- [2] Kriz A L, Larkins B A. Molecular genetic approaches to maize improvement. Springer Berlin Heidelberg, 2009: 127–142
- [3] 刘治先, 张铭堂. 玉米 Stock6 的遗传特性及其在玉米育种上的应用. *山东农业科学*, 1996 (3): 4–7
- [4] 刘志增, 宋同明. 玉米高频率孤雌生殖单倍体诱导系的选育与鉴定. *作物学报*, 2000, 26 (5): 570–574
- [5] 才卓, 徐国良, 刘向辉, 董亚琳, 代玉仙, 李淑华. 玉米高频率单倍体诱导系吉高诱系 3 号的选育. *玉米科学*, 2007, 15 (1): 1–4
- [6] Liu C X, Liu C X, Li X, Meng D X, Zhong Y, Chen C, Dong X, Xu X W, Chen B J, Li W, Li L, Tian X L, Zhao H M, Song W B, Luo H S, Zhang Q H, Lai J S, Jin W W, Yan J B, Chen S J. A 4-bp insertion at *ZmPLA1* encoding a putative phospholipase a generates haploid induction in maize. *Molecular Plant*, 2017, 10: 520–522
- [7] Zhong Y, Liu C X, Qi X L, Jiao Y Y, Wang D, Wang Y W, Liu Z K, Chen C, Chen B J, Tian X L, Li J L, Chen M, Dong X, Xu X W, Li L, Li W, Liu W X, Jin W W, Lai J S, Chen S J. Mutation of *ZmDMP* enhances haploid induction in maize. *Nature Plants*, 2019, 5: 575–580
- [8] Jiang C L, Sun J, Li R, Yan S J, Chen W, Guo L, Qin G C, Wang P C, Luo C, Huang W J, Zhang Q H, Alisdair F, David J, Li X, Yan J B. A reactive oxygen species burst causes haploid induction in maize. *Molecular Plant*, 2022, 15 (6): 943–955
- [9] Chen C, Liu X Q, Li S Z, Liu C X, Zhang Y L, Luo L L, Miao L Q, Yang W Z, Xiao Z J, Zhong Y, Li J S, Chen R M, Chen S J. Co-expression of transcription factors *ZmC1* and *ZmR2* establishes an efficient and accurate haploid embryo identification system in maize. *The Plant Journal*, 2022, 111: 1296–1307
- [10] Eder J, Chalyk S T. In vivo haploid induction in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104: 703–708
- [11] 张如养, 段民孝, 赵久然, 刘新香, 邢锦丰, 王元东, 张华生, Chang M T. 6 个玉米单倍体诱导系诱导率的差异性研究. *玉米科学*, 2013, 21 (2): 6–10
- [12] 徐国良, 代玉仙, 刘晓丹, 任军, 李淑华, 于明彦, 才卓. 玉米单倍体诱导率和加倍率研究. *玉米科学*, 2012, 20 (2): 1–5
- [13] 黎亮, 李浩川, 徐小炜, 陈绍江. 玉米孤雌生殖单倍体诱导效率优化方法研究. *中国农业大学学报*, 2012, 17 (1): 9–13
- [14] 李国良, 苏俊, 李春霞, 龚士琛, 宋锡章, 阎淑琴, 扈光辉, 王明泉. 农大高诱 1 号对玉米不同种质和世代单倍体诱导率的研究. *玉米科学*, 2008, 16 (5): 3–6
- [15] 蔡泉, 曹靖生, 史桂荣, 郭晓明, 张建国, 赵伟, 李树军, 殷跃. 几个不同来源玉米单倍体诱导系诱导效果的研究. *玉米科学*, 2012, 20 (4): 19–21
- [16] 段民孝, 赵久然, 刘新香, 王元东, 邢锦丰, 王志永, 李绍明, 张如养, 王乃顺, 何瑞娟. 不同种植地点对玉米单倍体自然加倍率的影响. *作物杂志*, 2012 (2): 68–70
- [17] 慈佳宾, 杨巍, 崔学宇, 任雪娇, 姜龙, 张野, 杨伟光. 不同生态条件下玉米单倍体诱导率和加倍率的研究. *玉米科学*, 2015, 23 (1): 63–68
- [18] 蔡泉, 曹靖生, 史桂荣, 郭晓明, 张建国, 赵伟, 李树军, 殷跃. 玉米单倍体在黑龙江与海南自然加倍效果的对比研究. *玉米科学*, 2012, 20 (5): 7–9
- [19] 杨巍, 任雪娇, 崔学宇, 慈佳宾, 张野, 赵超, 杨伟光. 玉米不同自交后代的单倍体诱导率和加倍率表现及 DH 系配合力分析. *玉米科学*, 2014, 22 (6): 40–44
- [20] 惠国强, 侯磊, 杜彦超, 王秀明, 南芝润, 贾聪慧. 不同除草剂对玉米单倍体成熟胚的加倍效果. *山西农业科学*, 2020, 48 (8): 1189–1191, 1201
- [21] 杜何为, 戴景瑞, 李建生. 玉米单倍体育种研究进展. *玉米科学*, 2010, 18 (6): 1–7
- [22] 文科, 黎亮, 刘玉强, 陈绍江. 高效生物诱导玉米单倍体及其加倍方法研究初报. *中国农业大学学报*, 2006, 11 (5): 17–20
- [23] 张坤明, 逯晓萍, 薛春雷, 董婧, 李俊伟, 韩平安, 张瑞霞, 李美娜. 不同加倍方法对玉米单倍体加倍效率影响. *北方农业学报*, 2018, 46 (3): 18–21
- [24] 王贺, 李继竹, 张继伟, 慈佳宾, 姜龙, 张野, 杨伟光. 秋水仙素和除草剂浸芽加倍玉米单倍体效率的研究. *吉林农业大学学报*, 2013, 35 (4): 384–388
- [25] 刘俊, 尹晓红, 刘君, 刘旭, 李卉, 景希强. 不同加倍方法处理玉米单倍体的加倍效果研究. *玉米科学*, 2014, 22 (4): 8–12
- [26] Longin C F H, Utz H F, Melchinger A E, Reif J C. Hybrid maize breeding with doubled haploids: II. Optimum type and number of testers in two-stage selection for general combining ability. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114 (3): 393–402
- [27] 衡燕芳, 范开建, 陈绍江, 黎亮. 玉米单倍体工程化育种研究进展和展望. *中国基础科学*, 2022, 24 (5): 15–23, 44
- [28] 李伟. 玉米单倍体诱导效应分析与机器学习在 DH 技术中的应用. 北京: 中国农业大学, 2017
- [29] 张敖, 关媛, 张学才, 杨双, 计舒文, 刘翼宁, 阮燕晔, 郑洪建. 玉米全基因组选择育种研究进展. *上海农业学报*, 2023, 39 (5): 13–18
- [30] 焦宇馨, 张宇翔, 杨文艳, 经思宇, 尹玉琳, 刘畅, 王欣, 徐辰武, 徐扬. 结合辅助性状的玉米全基因组选择预测力评估. *江苏农业学报*, 2023, 39 (2): 313–320
- [31] Cheng Q, Jiang S Q, Xu F, Wang Q, Xiao Y J, Zhang R Y, Zhao J R, Yan J B, Ma C, Wang X F. Genome optimization via virtual simulation to accelerate maize hybrid breeding. *Briefings in Bioinformatics*, 2022, 23 (1): bbab447

(收稿日期: 2024-06-11)