

# 玉米单倍体育种技术的实践探索与成效

王长魁, 李志荣

(张掖市农业科学研究院, 甘肃 张掖 734000)

**摘要:** 单倍体育种(Double haploid breeding, DH)技术是利用孤雌生殖诱导系诱导产生孤雌生殖单倍体, 经过自然加倍或者人工加倍获得纯合二倍体的育种技术, 利用该技术只需要2个世代就可获得一个理论上所有性状均达到100%纯合的纯系。结合国内相关研究进展对玉米单倍体育种技术中的单倍体诱导和加倍流程进行了综述, 从基础材料的构建、诱导系筛选与改良、单倍体诱导、单倍体籽粒挑选与性状鉴别、单倍体加倍、DH系扩繁与表型鉴定评价筛选、DH系配合力测定及试配新组合以及应用单倍体育种取得的成效等方面阐述了玉米单倍体育种技术的探索与实践, 并对今后玉米单倍体育种技术的应用前景进行了展望。

**关键词:** 玉米; 单倍体育种; DH系; 表型鉴定评价; 配合力测定; 实践探索; 成效

**中图分类号:** S513; S335.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-2172(2025)03-0210-05

**doi:** 10.3969/j.issn.2097-2172.2025.03.002

## Practical Exploration and Achievements of Maize Haploid Breeding Technology

WANG Changkui, LI Zhirong

(Zhangye Academy of Agricultural Sciences, Zhangye Gansu 734000, China)

**Abstract:** Double haploid breeding (DH) technology is a breeding technique that uses a parthenogenesis induction line to induce the production of parthenogenesis haploids, and then obtains homozygous diploids through natural or artificial doubling. Using this technology, it only takes 2 generations to obtain a pure line with 100% homozygosity for all traits in theory. This paper reviews the research progress on maize haploid breeding in China, focusing on haploid induction and chromosome doubling processes. It elaborates on various aspects, including the construction of basic materials, screening and improvement of induction lines, haploid induction, selection and trait identification of haploid kernels, haploid doubling, DH line propagation, phenotypic evaluation and selection, DH line combining ability testing, new hybrid combination trials, and the achievements of DH breeding applications. Furthermore, the future application prospects of maize haploid breeding technology are discussed.

**Key words:** Maize; Haploid breeding; DH line; Phenotypic evaluation; Combining ability testing; Practical exploration; Achievement

近年来, 以生物诱导为原理的玉米单倍体育种技术已成为现代玉米育种的生物前沿技术之一。单倍体育种(Double haploid breeding, DH)技术是利用被子植物的双受精现象和孤雌生殖原理, 利用孤雌生殖诱导系诱导基础材料产生孤雌生殖单倍体, 再经过自然加倍或者人工加倍获得纯合二倍体的育种技术。利用该技术只需要2个世代就可以获得一个理论上所有性状均达到100%纯合的纯系。单倍体育种技术再结合分子标记辅助育种技术及南繁加代, 可大大缩短育种年限, 加快育种进程, 提高选育效率, 降低人力、财力和物力

等投入。单倍体育种技术是与转基因育种、分子标记辅助育种、基因编辑、全基因组选择技术相媲美的现代玉米育种的五大前沿生物技术之一。我们结合国内相关研究进展对2013—2024年张掖市农业科学研究院和甘肃金源种业股份有限公司玉米单倍体育种技术中的单倍体诱导和加倍流程进行了综述, 从基础材料的构建、诱导系筛选与改良、单倍体诱导、单倍体籽粒挑选与性状鉴别、单倍体加倍、DH系扩繁与表型鉴定评价筛选、DH系配合力测定及试配新组合以及应用单倍体育种取得的成效等方面作了详尽地阐述, 以期如玉

收稿日期: 2024-10-30

基金项目: 甘肃省科技重点研发计划(22YF7NG189)。

作者简介: 王长魁(1968—), 男, 甘肃张掖人, 研究员, 主要从事农作物遗传育种工作。Email: 740132903@qq.com。

米育种工作提供参考。

## 1 单倍体育种技术中的单倍体诱导和加倍流程

### 1.1 组建高起点基础群体

玉米育种的成败在很大程度上取决于育种方法和技术路线选择的正确性, 能否选育出符合育种目标, 综合性状优良的玉米新品种, 选育杂种优势强、高产、高抗、高配合力的“三高”优良自交系是关键。选育“三高”优良自交系, 诱导基础材料的选择、设计和组配是基础, 不论是单倍体育种技术, 还是常规的选系方法, 都需要根据育种目标, 利用优异的种质资源, 选择组配高起点的基础材料。玉米单倍体育种技术同常规育种方法一样, 要求育种家具有较高的专业学术水平、敏锐的洞察力、较强的分析判断能力和对发展前景超前的预见性。

组建高起点的基础群体材料涉及材料类型、系谱来源、杂优类群等。我们根据甘肃省不同生态类型区域组建了早、中、晚熟(双亲各 1 个)6 个基础群体(QKM1、QKF1、QKAM、QKAF、QXM1、QXF1), 在早熟群体中主要导入具有欧洲血缘的早熟硬粒型种质, 在中熟群体中主要导入具有美国血缘中熟的 SS 和 NSS 种质, 在晚熟群体中主要导入具有泰国苏湾血缘和默瑞血缘的晚熟抗病种质。

由于单倍体育种技术不能有效打破不良基因间的连锁, 基因间的重组概率较低, 所以在基础材料构建上, 我们通常采取第 1 年组建基础材料和群体; 第 2 年将基础群体  $F_1$  代进行混粉; 第 3 年在  $F_2$  代群体中选取综合性状优良的穗行再进行混粉, 剩余群体  $F_2$  代种子混合均匀后, 种植 200 株以上继续进行混粉; 第 4 年将穗行  $F_3$  代作为基础材料诱导单倍体, 在群体  $F_3$  代中选取综合性状优良的穗行再进行混粉, 以后逐年依次类推, 诱导单倍体的做法。连续多年混粉选择有利于打破不良基因的连锁, 增加优良基因的重组概率, 提高选择效率和选择准确度。因此先对基础群体材料进行有效的重组改良, 逐年累计足够的有利基因位点, 然后再用单倍体诱导技术获得二倍体纯系(DH 系), 可利用 DH 系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, 是克服这一缺点的有效手段。

### 1.2 诱导系筛选与改良

根据基础材料的类群和遗传因素将引进的诱导系进行鉴定与分析评价, 筛选出适宜于基础群体, 诱导率高、结实率好、花粉量大等综合性状优良的诱导系, 作为亲本组配杂交组合, 利用杂交种  $F_1$  代杂种优势强, 花粉量大, 植株高大, 抗倒伏倒折能力强等有利性状, 将基础材料和诱导系  $F_1$  代按 4 : 1 行比法种植, 有利于自然授粉结实, 增加结实率, 提高诱导率。

### 1.3 单倍体诱导技术

单倍体诱导率的高低受诱导系、基础材料遗传因素、环境条件和授粉时间等因素共同作用。不同诱导系诱导同一基础材料、同一诱导系诱导不同遗传的基础材料以及不同的授粉时间, 诱导率均不同; 同一基础材料和同一诱导系在不同的环境条件下的诱导率也不同。李向永等<sup>[1]</sup>研究表明, 玉米花丝长度  $\geq 8$  cm 单倍体诱导率是花丝长度  $\leq 4$  cm 的 2.9 倍, 但结实率很低。刘志增等<sup>[2]</sup>对玉米高频率孤雌生殖单倍体诱导系的鉴定研究结果也表明, 孤雌生殖单倍体诱导系农大高诱 1 号对不同基因型材料均能诱导产生单倍体, 但其诱导效率与被诱导材料的基因型有很大关系, 不同母本基因型对单倍体诱导率的影响相差数倍。但随着新型诱导系的选育成功, 单倍体诱导效率及鉴定效率会不断得以提高。

2013 年, 我们采取基础材料和诱导系分片种植, 无需隔离区, 田间进行人工套袋授粉。由于诱导系种子用量少, 而人工套袋、采粉、授粉、取袋、关针等一系列操作环节, 需要花费大量的劳动力和材料, 而且结实率低, 不适合大规模诱导和商业化、工程化育种。但随着诱导材料的增多和规模的扩大, 从 2014 年开始选择隔离区, 把诱导基础材料和诱导系采取 4 : 1 行比法自然授粉加人工辅助授粉的方法, 诱导系采用杂种  $F_1$  代, 因  $F_1$  植株高大, 花粉量大, 有利于自然授粉。诱导系分两期播种, 每间隔 100 cm, 错期 5 ~ 7 d, 诱导系和基础材料按平均每 3 d 生长 1 片叶计算, 通过叶片数调节花期。根据父本雄穗和母本雌穗的发育情况, 在父本抽雄和母本吐丝前, 对母本进行 2 ~ 3 次抽雄处理, 以便更好地调节花期, 增加自然授粉的概率。在确定播种期时, 将父本诱

导系叶片减掉 1 片, 则推迟播种 3 d, 同时再通过母本诱导基础材料去雄, 将母本吐丝期提前, 通过父母本 2 次调节花期, 达到推迟授粉 4~6 d 的目的; 增加母本花丝长度以延迟授粉, 提高单倍体诱导率。同时对父母本花期不育、相差较大的母本, 在备用诱导系采粉田采粉, 用花粉管人工辅助授粉。自然授粉加人工辅助授粉能节省大量的劳动力和纸袋等套袋材料, 虽然外来花粉污染较多, 但结实率高, 母本雌穗全部授粉结实, 种子量大, 单倍体籽粒总数多, 适合于大规模诱导单倍体。

#### 1.4 单倍体籽粒的挑选与性状鉴定

选育诱导率高的诱导系, 并且在诱导的籽粒中高效地筛选出单倍体是单倍体育种技术的关键环节。在诱导系诱导组合的玉米果穗上, 90%以上的籽粒为杂合二倍体, 从形态上很难对单倍体和二倍体加以区分, 因此就需要有行之有效的区分单倍体和二倍体的办法。

1.4.1 遗传标记籽粒挑选法 Coe<sup>[3]</sup>开发了诸多的标记系统, Sarkar 等<sup>[4]</sup>将 R1-Navajo (R1-nj) 标记系统应用于单倍体籽粒的挑选。根据诱导系的遗传标记系统, 一般将单倍体诱导果穗上的籽粒分为两种类型, 只有胚乳糊粉层紫色而胚无色的为拟单倍体籽粒, 其余均为杂合二倍体籽粒, 根据这两种类型人工挑选单倍体籽粒。

1.4.2 农艺性状鉴定单倍体 玉米田间通过农艺性状鉴别单倍体, 玉米单倍体植株相较于二倍体长势较弱, 单倍体植株高度仅为正常二倍体的 70% 左右, 且叶片直立、上冲、窄小、无光泽<sup>[5]</sup>, 带有 ABPI 标记诱导的单倍体植株整株均为绿色, 而杂合的二倍体植株茎基部叶鞘均为紫色, 鉴定过程中可利用这些标记性状可以将杂合二倍体去杂剔除。

1.4.3 室内发芽和田间性状鉴定单倍体 通过室内发芽在形态标记方面来鉴定单倍体。将挑选的拟单倍体籽粒发芽, 把幼芽和幼根均为紫色标记的杂合二倍体剔除, 幼芽和幼根均无紫色标记的为单倍体, 胚根部产生部分浅紫色标记而幼芽无紫色标记的为拟单倍体。在单倍体幼苗移栽前或移栽到田间后至授粉前的整个生长阶段, 通过生长势的强弱和根茎部紫色标记来鉴定单倍体, 单

倍体生长势比较弱, 而杂交籽粒的生长势比较强。在田间可将植株生长势强、幼苗叶鞘和根紫色、植株茎基部紫色、叶片宽大弯曲, 光泽亮丽等的植株为杂合二倍体, 予以去杂剔除和淘汰。

#### 1.5 单倍体加倍技术

单倍体加倍技术是目前单倍体育种技术中的重要技术障碍和难点<sup>[6-9]</sup>, 国外已经有很多科研院所和种业公司将单倍体育种作为常规育种手段进行自交系的选育, 但是这些加倍技术处于保密或者专利保护的状态而得不到广泛应用, 因此, 只有发展具有自主知识产权的加倍技术, 才能促进我国单倍体育种技术领域的进步。

1.5.1 单倍体自然加倍 单倍体可以自然加倍或者人工加倍, 但是一般自然加倍率很低。据报道玉米单倍体植株自然加倍率为 0.4%~1.2%, 不同的基因型自然加倍率差异也较大, 有的材料甚至不发生自然加倍。

1.5.2 芽苗法秋水仙素单倍体加倍 用秋水仙素溶液处理萌发的种子, 等胚芽鞘长至 2 cm 时, 用小刀将胚芽鞘顶尖 0.2 mm 切除, 然后用 0.04%~0.06% 的秋水仙素溶液添加 0.5% 二甲基亚砜(DMSO)作为助剂浸种 8~12 h, 再用清水冲洗 0.5 h 后移栽至育苗盘, 在温室大棚中培养至 3~5 叶期, 等最后一次晚霜过后(张掖市 5 月中旬)开始将单倍体苗移栽至田间, 此方法加倍率可达到 10%~30%, 但不同的群体间所得的加倍率不同<sup>[10]</sup>。

1.5.3 组培法单倍体加倍 将基础材料用诱导系授粉后 18~20 d, 把雌穗上的籽粒取下, 灭菌消毒, 在无茵条件下转接到培养基上进行培养, 等发芽长出幼苗后, 根据幼芽和胚根的颜色, 选择单倍体和杂株。幼芽和胚根均无紫色标记的为单倍体, 幼芽和胚根为紫色标记的为杂合二倍体杂株, 予以剔除和淘汰, 胚根部产生部分浅紫色标记而幼芽无紫色标记的为拟单倍体。

#### 1.6 DH 系扩繁和表型鉴定筛选

DH 系是由单倍体加倍获得的双单倍体, 也称 DH 群体、纯系群体, 可直接用于玉米育种, 可极大地缩短玉米育种周期<sup>[11-14]</sup>。将加倍后的玉米 DH 系在海南三亚进行扩繁, 根据综合性状表现, 筛选淘汰不符合育种目标的玉米 DH 系, 自交收获符合育种目标的玉米 DH 系。



1.6.1 DH系耐密性鉴定评价 在甘肃张掖和海南三亚分别进行玉米耐密性鉴定试验。试验田间按行距 50 cm、株距 14 cm 进行高密度种植, 淘汰倒伏倒折率较高、空秆率高、结实差等耐密性不好的玉米 DH 系, 筛选适宜耐密的玉米 DH 系。

1.6.2 DH系抗旱性鉴定评价 玉米抗旱性是受多个基因控制的数量性状遗传, 其表现受到多个基因和环境因素共同作用的结果。在张掖灌溉区采用行距 60 cm、株距 20 cm 规格种植, 玉米全生育期控制灌水 1 次(玉米吐丝散粉后大概在 7 月中旬)。在陇东旱作农业区采用不覆膜种植, 行距 60 cm、株距 20 cm, 玉米全生育期不灌水。在张掖灌溉区和陇东旱作农业区进行抗旱性鉴定时均通过调查空秆率从而筛选出抗耐旱的玉米 DH 系。

1.6.3 DH系抗病性鉴定评价与筛选 将海南三亚扩繁的玉米 DH 系在甘肃张掖试验基地人工接菌, 进行抗病性鉴定评价与筛选。抗茎腐病鉴定试验采用行距 60 cm、株距 20 cm 规格种植, 不设重复。采用根埋法人工开沟接菌的方式, 在 DH 系根部 10~20 cm 处开 5~10 cm 的沟, 每株玉米处放玉米粒菌种、小麦粒菌种各 15~20 g, 然后覆土埋严踩实。接种完及时灌水, 以增加湿度, 提高发病率。通过调查病株率从而筛选出抗茎腐病的玉米 DH 系。抗穗腐病鉴定试验采用行距 60 cm、株距 20 cm 规格种植, 不设重复。接菌时间为玉米吐丝后 10~15 d, 使用的接种方法为果穗注射法, 将准备好的镰孢菌分生孢子悬浮液用注射器接种到果穗中上部, 每穗接种量 2 mL, 每份材料接种 10 株。通过调查发病面积占果穗总面积的发病率, 参照病情级别及抗病性鉴定评价标准, 筛选出抗穗腐病玉米的 DH 系。抗丝黑穗病鉴定试验采用行距 60 cm、株距 20 cm 规格种植, 不设重复。玉米进入乳熟后期, 于 9 月 25 日开始对鉴定材料逐株调查, 分别调查总株数和发病株数, 计算发病率。根据发病率鉴定评价玉米 DH 系的抗性级别。在黑龙江省自然发病条件下进行玉米 DH 系的抗大斑病、抗弯孢霉叶斑病鉴定; 在河南省自然发病条件下进行玉米 DH 系的抗小斑病鉴定; 在河南省和海南省自然发病条件下进行玉米 DH 系的抗锈病鉴定。

1.6.4 耐寒性测定 在张掖市于 3 月 25 日开始播

种, 出苗后于 5 月 1 日开始调查玉米 DH 系的耐寒性, 或在室内模拟春播玉米区春季昼夜温度进行耐寒性测定。

### 1.7 DH系配合力测定及试配新组合

根据基础材料组配目标, 选择合适的测验种开展杂种优势和配合力测验<sup>[15]</sup>。选取高产、高抗、高配合力的“三高”自交系进行新组合的试配, 通过鉴定试验和品种比较试验, 筛选出杂种优势强, 配合力强的强优势组合, 推荐参加国家和各省区域试验及生产示范, 从而选育出新品种。

近几年来, 张掖市农业科学研究所和甘肃金源种业股份有限公司利用育成的 DH 系每年配制新杂交组合 10 000~15 000 个。通过在甘肃张掖、河南新乡、黑龙江哈尔滨和讷河开展鉴定试验, 每年筛选出新组合 1 200~1 500 个参加多点区域试验, 进而筛选出优良组合 10~20 个推荐参加国家区域试验和各省区域试验, 以及多年多点区域试验和生产示范。

## 2 应用单倍体育种技术取得的成效

张掖市农业科学研究所和甘肃金源种业股份有限公司应用孤雌生殖诱导单倍体育种技术已初步取得了一些成果, 近几年张掖市农业科学研究所和甘肃金源种业股份有限公司共创新了 DH 系种质资源 2 万份以上, 从中优选了 2 000 多个 DH 系开展新组合的试配和选育。利用选育的 DH 系育成了一批玉米新品种, 如通过国家农作物品种审定委员会审定定名的陇研 598(DH516A2×JX20)、陇研 668(JN621×DH413A3)、金凯 797(JN461×DH511A3)、金凯 798(JN991×DH030A3)、金凯 799(JN061×DH030A3), 通过甘肃省农作物品种审定委员会审定定名的金凯 10 号(J4992×DH273)、金凯 7172(JY2×DH273)、金凯 7192(JX52×DH1660)、金凯 869(DH235A1×DH509A9)、金凯 991(JN991×DH498A18)、金凯 808(JB43A×DH121A2)、金凯 988(BJ230×DH034A23)。

## 3 小结

选育诱导率高的诱导系, 提高选择的效率、准确率及加倍率既是单倍体育种的关键点也是难点所在。单倍体育种技术更需要注重基础材料的组配, 能否育出好品种, 选育杂种优势强、高产、高抗、高配合力的“三高”自交系是基础。而基础

材料的选择和设计是选育优良自交系的关键, 将  $F_1$  或  $F_2$  进行混粉, 增加有利基因的聚合, 用  $F_2$  或  $F_3$  进行诱导, 提高优良单倍体产生的概率。由于种子是农业的“芯片”<sup>[16-17]</sup>, 因此要选育出优异的玉米杂交种, 自交系选育是关键。单倍体技术带引育种进入“高铁时代”, 应用单倍体技术创新玉米种质资源及新品种选育应用技术研究是每一个育种者需要深入思考的课题。

#### 参考文献:

- [1] 李向永, 姜 龙, 王薪淇, 等. 糯玉米单倍体诱导和加倍的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(8): 90-96.
- [2] 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[J]. 作物学报, 2000, 26(5): 570-574.
- [3] COE E H. A line of maize with high haploid frequency [J]. The American Naturalist, 1959, 93: 381-382.
- [4] SARKAR K R, PANKE S, SACHAN J K. Development of maternal haploidy-inducer lines in maize (*Zea mays* L.) [J]. Indian Journal Agricultural Sciences, 1972, 42: 781-786.
- [5] CHOE E, CARBONERO C H, MULVANEY K, et al. Improving in vivo maize doubled haploid production efficiency through early detection of false positives[J]. Plant Breeding, 2012, 131: 399-401.
- [6] 才 卓, 徐国良, 郭 琦, 等. 玉米单倍体自然加倍双轮回育种体系的探索[J]. 玉米科学, 2023, 31(3): 1-8.
- [7] 刘小丹, 吕 超, 于明彦, 等. 玉米单倍体精准加倍效果及超快捷育种方法探讨[J]. 玉米科学, 2022, 30(2): 1-4; 11.
- [8] 陶 蕊, 侯佳贤, 刘洪霞, 等. 糯玉米单倍体诱导及其加倍研究[J]. 玉米科学, 2020, 28(5): 27-31.
- [9] 郭书磊, 魏 昕, 魏良明, 等. 玉米单倍体诱导、加倍技术及相关机理探讨[J]. 玉米科学, 2020, 28(3): 52-59; 65.
- [10] PR IGGE V, MELCHINGER A E. Production of haploids and doubled haploids in maize[M]. Berlin: Springer, 2012.
- [11] 李忠南, 王越人, 鄢生辉, 等. 玉米 DH 系遗传参数分析和育种效果[J]. 玉米科学, 2021, 29(3): 17-22.
- [12] 周旭梅, 高旭东, 高洪敏, 等. 同一基础材料的玉米 DH 系主要农艺性状配合力分析及应用潜力评价[J]. 玉米科学, 2020, 28(3): 31-36.
- [13] 张坤明, 逯晓萍, 薛春雷, 等. 61 份玉米 DH 系的 SSR 标记分析及性状遗传研究[J]. 玉米科学, 2018, 26(5): 14-20; 29.
- [14] 李艳华, 王彦飞, 周 婷, 等. 不同环境下玉米 DH 系遗传分析及其杂交组合丰产性及稳产性分析[J]. 玉米科学, 2019, 27(3): 23-29.
- [15] 郭还威, 王黄英. 玉米不完全双列杂交测定自交系配合力的研究[J]. 玉米科学, 1993(4): 17-18.
- [16] 郑 琪, 郭怀亮, 李 娜, 等. 平凉市推进粮食安全的保障措施[J]. 寒旱农业科学, 2024, 3(5): 400-404.
- [17] 肖 静, 田全红, 王 娜, 等. 甘肃省农业种质资源库建设现状及发展建议[J]. 寒旱农业科学, 2023, 2(6): 506-509.