

耿帅锋,李洋,李晓华,等.植物单倍体诱导技术研究进展[J].山西农业科学,2025,53(2):3-10.

GENG S F, LI Y, LI X H, et al. Research progress on haploid induction technology in plant[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2025, 53(2):3-10.

doi:10.3969/j.issn.1002-2481.2025.02.02

植物单倍体诱导技术研究进展

耿帅锋¹,李洋¹,李晓华²,刘少帅¹,李爱丽¹,毛龙¹

(1.中国农业科学院作物科学研究所,北京100081;2.山西农业大学小麦研究所,山西临汾041000)

摘要:随着育种技术的进步和作物品种的遗传改良,作物产量得到了很大提高,初步解决了巨大的粮食需求问题,但常规育种周期太长,一般需要6~8 a才能得到纯合自交系,严重制约了新品种的培育速率。双单倍体技术(Double haploid, DH)作为近年来重要的一项育种技术,能大幅缩减育种年限,并提高作物育种效率。目前,虽然在单倍体诱导基因挖掘、单倍体诱导体系建立、单倍体筛选方法优化、染色体加倍技术改进方面已经取得很大的进展,但单倍体诱导(Haploid induction, HI)的效率还未达到生产的预期,且遗传基础知识体系仍不完善,单倍体鉴定体系也因物种不同而存在差异。因此,挖掘单倍体诱导新基因,创制高效单倍体诱导系和鉴定体系,是解决双单倍体技术应用瓶颈的主要方法。文章从双单倍体诱导技术研究的重要意义、单倍体诱导基因的研究现状、单倍体诱导产生的原因、单倍体鉴定方法研究进展等方面进行了综述,为植物中挖掘新的单倍体诱导基因、聚合创制高效单倍体诱导系和鉴定系以及解析单倍体诱导的遗传基础提供参考,并为作物单倍体诱导体系构建及其在作物育种中的应用提供理论和技术支撑。

关键词:单倍体;磷脂酶;单倍体诱导系;小麦

中图分类号:S335.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2481(2025)02-0003-08

Research Progress on Haploid Induction Technology in Plant

GENG Shuaifeng¹, LI Yang¹, LI Xiaohua², LIU Shaoshuai¹, LI Aili¹, MAO Long¹

(1. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2. Institute of Wheat, Shanxi Agricultural University, Linfen 041000, China)

Abstract: With the advancement of breeding technologies and the genetic improvement of crop varieties, crop yields have greatly increased, helping to address the growing food demand. However, conventional breeding cycles are too long, typically requiring 6 to 8 years to obtain homozygous inbred lines, which severely limits the rate of new variety development. Double haploid(DH) technology, an important breeding technique in recent years, can significantly shorten the breeding cycle and improve breeding efficiency. Although significant progress has been made in areas such as haploid induction gene discovery, haploid induction system establishment, haploid screening method optimization, and chromosome doubling technology improvement, the efficiency of haploid induction(HI) has not yet met production expectations. Furthermore, the genetic knowledge system remains incomplete, and haploid identification systems differ across species. Therefore, the exploration of new genes for haploid induction and the creation of highly efficient haploid induction lines and haploid identification system are key methods for addressing the application bottleneck of double haploid technology. In this article, the significance of research on double haploid induction technology, the current status of haploid induction gene research, the causes of haploid induction, and research progress on haploid identification methods were reviewed. It provided reference for exploration of new genes for haploid induction in plants, aggregated creation of highly efficient haploid induction lines and haploid identification lines, and analysis of the genetic basis of haploid induction. Additionally, It offered theoretical and technical support for the establishment of crop haploid induction systems and their application in crop breeding.

收稿日期:2025-01-10

基金项目:国家自然科学基金(32072066)

作者简介:耿帅锋,副研究员,主要从事小麦单倍体诱导基因挖掘研究,Email:gengshuaifeng@caas.cn.耿帅锋、李洋为同等贡献作者

通信作者:李晓华,助理研究员,博士,主要从事小麦遗传育种研究,Email:lixiaohualff@163.com

Keywords: haploid; phospholipase; haploid induction line; wheat

1 双单倍体技术研究的重要意义

双单倍体(Doubled haploid, DH)技术是指将人为处理产生或自然发生的具有配子染色体数目(N)的单倍体种子或植株,通过染色体加倍处理后,获得完全纯合的二倍体自交系(2N)的技术。相较于需要6~8个育种周期才能获得纯合自交系的常规育种方法,双单倍体技术只需要1~2个周期就可以快速获得纯合自交系(图1),极大地缩减了育种周期,获得了育种学家们的青睐,正逐步成为现代育种的重要组成部分^[1]。鉴于单倍体育种技术周期短、纯度高等优点,在国内外各大农业公司及育种单位获得了广泛的应用。以DH育种技术商业育种应用最为成功的作物玉米为例,经过长达60多年的研究与实践,玉米DH育种技术日趋成熟,成为玉米主流育种技术之一。国内外许多公司均已实现DH育种的规模化应用,该技术已成为可与转基因技术,分子标记辅助育种技术相媲美的现代玉米育种三大核心技术之一^[2]。

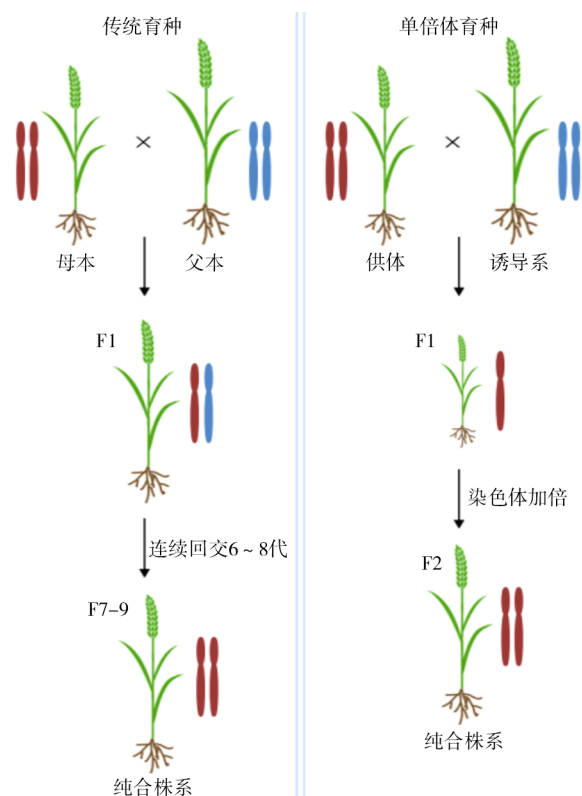


图1 单倍体育种技术流程

Fig.1 The process of haploid technology in breeding

双单倍体育种技术主要由3个部分所组成:单倍体获得、单倍体筛选、染色体加倍^[3]。其关键步骤之一是诱导获得单倍体,经过多年的探索与研究,已经建立了多种较为成熟的诱导方法。根据诱导方式分为体外诱导和体内诱导。体外诱导包括雄配子诱导和雌配子诱导;体内诱导包括远缘杂交诱导、物理和化学诱导、诱导系诱导^[4]。各种诱导技术由于操作复杂,限制条件多,适用范围窄等问题,无法大规模的应用。近年来,基于诱导系基因的克隆和诱导机制的发现^[3],使得诱导系诱导的单倍体育种技术在诱导效率和适用范围上都有不错的表现,并已经进入快速发展时期,被世界各地的种子公司和科研人员大量使用和改良。

因此,挖掘单倍体诱导新基因,创制高效单倍体诱导系,对单倍体诱导技术和植物遗传育种研究具有十分重要的理论及实际意义。

2 单倍体诱导基因的研究现状

玉米中存在天然的较高频率的孤雌单倍体诱导系,当诱导系与普通玉米材料杂交之后,后代有一定几率产生受体植株孤雌生殖单倍体。1959年,美国遗传学家COE^[5]报道的Stock 6作为父本诱导系,经过近60 a的发展,由Stock 6衍生的一系列诱导系已成为DH育种重要材料基础。2017年1月,全球农业科技巨头企业先正达(Syngenta)公司在Nature杂志上报道了1个玉米花粉特异性磷脂酶基因*MATRILINEAL (MTL)*^[6],并利用TALENs(Transcription activator-like effector nucleases或转录激活因子样效应物核酸酶)基因编辑技术对其进行了新的编辑,结果可以把单倍体诱导率提高到6.7%~13.1%。2017年2月,中国科学家LIU等^[7]也报道了同一诱导基因(命名为*ZmPLA1*),并用CRISPER/Cas9基因编辑技术获得了转基因诱导系,开展了相应的诱导实验。更为重要的是,已有研究表明,*MTL*基因在禾谷类作物中序列与功能非常保守^[6],所以该基因的克隆有望为基于该基因的单倍体诱导与DH育种打开应用之门,从而在更多的重要禾本科作物中开发DH育种技术。

随着分子生物学技术的发展,植物中诱导单倍体的基因不断被发现(表1)。拟南芥中,存在1种编码着丝粒特异性组蛋白的基因*CENH3*,当其发

生突变后,自交后代中发现了一定比例的单倍体^[8]。对其进行点突变后,突变体与野生型杂交能够诱导产生单倍体^[9]。小麦中,通过筛选基因组编辑的 *CENH3* 异等位基因组合进行鉴定,发现编辑后的等位基因在雌配子体中的传递减少,并且杂合子基因型比纯合基因型组合更能触发较高的单倍体诱导率^[10]。大麦、甜菜的 *CENH3* 保守结构域中一个氨基酸的改变,也会诱导产生单倍体^[11]。同时, *CENH3-tailswap* 转基因可用于在玉米植株体内构建单倍体诱导系统^[12]。但 *CENH3* 突变引起的诱导率只有 2%~3%,远远低于玉米 Stock 6 来源诱导系的诱导率 12%^[13],影响了其在单倍体诱导中的应用。

表 1 已克隆单倍体诱导基因

Tab.1 Haploid induction genes cloned

基因 Genes	植物 Plants
<i>CENH3</i>	拟南芥、玉米、小麦
<i>PLA1</i>	玉米、水稻、小麦
<i>PLD3</i>	玉米
<i>DMP8</i>	拟南芥
<i>DMP9</i>	拟南芥、芸苔属甘蓝
<i>DMP</i>	玉米、番茄、甘蓝型油菜、烟草、马铃薯、苜蓿
<i>DMP4</i>	西瓜
<i>KNL2</i>	玉米
<i>POD65</i>	玉米

Stock 6 诱导系中存在 2 个单倍体诱导的主效应位点, *qhir1* (quantitative haploid induction rate 1) 和 *qhir8* (quantitative haploid induction rate 8)。对关键位点 *qhir1* 进行克隆,获得单倍体诱导的关键基因 *MATRILINEAL* (*MTL/ZmPLA1/NLD*), 编码花粉特异性磷脂酶 A, 编码序列上的 4 个碱基插入所导致的基因功能缺失是单倍体诱导能力产生的关键^[7]。然而, *ZmPLA1* 基因并不能完全解释高频诱导现象。对 *qhir8* 位点进行定位克隆, 鉴定到了 *ZmDMP* 基因, 并进一步通过 CRISPR-Cas9 介导的基因编辑技术验证了该基因具有诱导单倍体的功能, 其单倍体产率为 0.1%~0.3%^[14]。利用组学技术手段, 通过筛选 *mtl* 突变体中显著上调表达的基因, 获得单倍体诱导候选基因 *ZmPLD3* (花粉特异性磷脂酶基因), 然后通过 CRISPR-Cas9 系统, 获得该基因功能缺失突变体, 经单倍体诱导检测, 该基因突变具有诱导单倍体的能力, 且诱导

率与主效单倍体诱导基因 *MTL/ZmPLA1/NLD* 的诱导率(1.2%)相当。同时进一步与已报道单倍体诱导调控基因聚合, 发现 *ZmPLD3* 与 *MTL/ZmPLA1/NLD* 双突变体的单倍体诱导效率能够提高 4 倍, 三突 *zmpld3(+/-)-mtl-zmdmp* (*ZmPLD3* 杂合突变, *MTL/ZmPLA1/NLD* 与 *ZmDMP* 纯合突变) 的单倍体诱导效率能够提高 6~7 倍^[15]。在水稻中将 *ZmMTL* 基因的同源基因 *O_sMTL* 敲除后, 自交后代中有 6% 的植株为单倍体^[16]。利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除小麦中玉米 *ZmMTL/ZmPLA1/ZmNLD* 基因的同源等位基因 *TaPLA-A* 和 *TaPLA-D*, 成功诱导产生了小麦单倍体籽粒, 诱导率为 2.0%~3.0%^[17]。而对小麦 *TaMTL-A*, *TaMTL-B*, *TaMTL-D* 基因进行编辑后, 植株结实率显著降低, 单株单倍体诱导率最高达 18.8%, 同时还发现了无胚型和胚及胚乳双无型籽粒^[17-19]。敲除谷子中玉米 *MTL* 基因的同源基因 *SiMTL*, 成功诱导了谷子单倍体的产生, 平均诱导率为 2.7%^[20]。

由此可见, 单倍体诱导基因高度保守, 挖掘单倍体诱导新基因, 对在其他作物中构建单倍体诱导技术体系具有重要借鉴意义, 可为培育新型诱导系提供基础。

3 磷脂酶基因诱导产生单倍体

磷脂酶主要功能是水解膜的主要成分磷脂, 在植物生长发育、逆境胁迫响应、花粉成熟、花药开裂等方面发挥着重要作用。根据其水解磷脂部位分为磷脂酶 A (PLA)、磷脂酶 C (PLC) 和磷脂酶 D (PLD)^[21]。PLA 基因家族包括 *PLA1*、*PLA2* 和 *pPLA* 三大类。其中, *PLA1* 催化水解磷脂的 sn-1 位酯键, 生成 2-溶血磷脂 (2-LPL) 和游离脂肪酸 (FFA)。PLA2 催化水解磷脂的 sn-2 位酯键, 生成 1-溶血磷脂 (1-LPL) 和游离脂肪酸 (FFA)^[21]。PLC 水解甘油磷酸键, 形成二酰基甘油和含磷酸极性基团, 具有独特的催化特性和下游信号传导功能, 代谢产生磷脂酸 (Phosphatidic acid, PA) 和六磷酸 (Hexakisphosphate, IP6) 等次生信使, 并进一步细分为磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 (Phosphoinositide-specific PLC, PI-PLC) 和磷脂酰胆碱类磷脂酶 C (Phosphatidylcholine-PLC, PC-PLC)^[22-23]。PC-PLC 优先水解 PC, 但也可作用于其他脂类, 如磷脂酰乙醇胺 (Phosphatidylethanolamine, PE) 和磷

脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS), 因此, 也被称为非特异性磷脂酶 C (Non-specific PLCs, NPCs)^[22]。PLD 主要底物为磷脂类化合物, 其作用位点为磷脂物质的末位磷原子。在水分子的作用下, PLD 可以催化磷脂底物水解生成磷脂酸(Phosphatidic acid, PA)。在有合适的第二亲和试剂底物时(如丝氨酸、羟基丁酸、肌醇等), PLD 可以催化底物磷脂的极性头部发生酯交换反应, 释放原有极性头部, 生产新的磷脂^[24-26]。

磷脂酶基因的分类和功能表明其介导膜脂代谢的多个过程, 并参与调节花粉发育, 这可能是其诱导产生单倍体的原因^[27-33]。在拟南芥中, *DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE 1 (DAD1)* 基因编码一个叶绿体 *PLA* 基因, 是花粉成熟、花药开裂和开花所必需的, 并与花蕾中茉莉酸的积累相关^[27]。此外, 非特异性磷脂酶 C2 (*NPC2*) 和非特异性磷酸酶 C2 (*NPC6*) 的突变体通过抑制磷脂水解和三酰甘油生物合成, 导致花粉管生长缺陷^[33]。在玉米中, 花粉特异性磷脂酶 A1 (*MTL*) 基因是单倍体诱导的关键基因。在水稻^[16]、小麦^[17-19]、谷子^[20]中也证明该基因具有诱导产生单倍体的功能。同时, 玉米中花粉特异性磷脂酶基因 (*PLD3*) 也具有诱导产生单倍体的功能, 且与主效单倍体诱导基因 *MTL/ZmPLA1/NLD* 的诱导率相当, 聚合已报道单倍体诱导调控基因可使单倍体诱导效率提高 6~7 倍^[15]。

由此可见, 磷脂酶基因具有诱导产生单倍体的潜力, 深入挖掘磷脂酶基因家族中具有单倍体诱导功能的新基因, 解析新基因与 *MTL* 诱导单倍体的遗传基础, 聚合创制高效的单倍体诱导系将为小麦等作物育种提供重要的理论和技术支撑。

4 单倍体诱导产生的原因

19 世纪末, 被子植物双受精机制被发现, 雄配子体形成 2 个精子, 其中一个与卵融合形成二倍体的合子, 另一个与中央细胞的极核(通常 2 个)融合形成初生胚乳核。双受精后由合子发育成胚, 中央细胞发育成胚乳。但也存在卵细胞不能正常融合成二倍体的合子, 中央极核正常融合的现象, 即形成单倍体胚, 三倍体胚乳的现象, 就是孤雌生殖。受体孤雌生殖 (Parthenogenesis) 能够产生单倍体, 即卵细胞不经过受精也能发育成正常的新个体, 完美地契合了 DH 育种技术的目标^[3]。孤雌

生殖现象是一种普遍存在于一些较原始动物种类身上的生殖现象, 在禾本科作物和高等动物也低频率发生, 为基于单倍体诱导与加倍的 DH 育种技术提供了生物学机制上的可能。

随着单倍体诱导基因的不断发现, 对单倍体诱导产生机制的探索也不断加强^[34]。目前, 关于单倍体诱导产生的机制有 2 种: 单核受精假说和染色体消除假说。已有的研究大多倾向于支持染色体消除假说, 如玉米诱导系 Stock 6 作为父本与常规材料进行杂交后父本染色体在一周内逐步消失^[35]。在对诱导系不同阶段发育花药进行单细胞测序后, 发现花粉有丝分裂时期的精子染色体片段化是造成受精后染色体消除及单倍体诱导的直接原因^[36]。通过对 *zmpla1* 和野生型花粉的转录组、蛋白组、蛋白修饰组、单核基因组、代谢组、脂质组等的全面分析, 揭示单倍体诱导发生过程是精细胞的 *ZmPLA1* 失活, 造成周边卵磷脂积累, 使线粒体发生紊乱, 引起活性氧爆发, 破坏精细胞染色体的稳定性, 导致染色体片段化, 从而诱导产生单倍体。同时, 发现过氧化物酶 POD 是细胞防御活性氧的主要工具, 将三核花粉期特异表达的过氧化物酶基因 *ZmPOD65* 进行基因编辑后, 后代出现高至 7.7% 的单倍体诱导率^[37]。进一步深入研究, 发现导致活性氧水平变化的化学物质也可以诱导产生单倍体。通过多轮测试, 最后找到了能直接诱导单倍体产生的特定化学诱导剂 (MMI, M106466, PC₁₈:1, 850375P), 并发明了一套利用特定化学物质处理花粉以诱导单倍体发生的技术^[37]。在小麦中, 对小麦磷脂酶基因 *MTL* 诱导单倍体产生的机制进行了研究, 发现 *MTL* 突变后会导致其翻译提前终止, 蛋白失去功能, 并引起三核花粉粒时期花粉细胞内的脂质代谢紊乱, 导致花粉中脂肪酸合成中间产物棕榈酸和油酸积累, 继而引发线粒体电子传递链紊乱, 产生过量活性氧, 导致花粉精细胞染色体在进行第二次有丝分裂过程中受损, 并在受精后逐渐消除, 产生单倍体^[19]。

综上所述, 解析单倍体诱导产生的机制, 有利于挖掘单倍体诱导的新基因, 创建高效的单倍体诱导系, 加快作物的遗传改良。

5 单倍体鉴定方法研究进展

单倍体鉴定是双单倍体技术中的关键步骤, 能否在籽粒早期鉴定出单倍体, 进行染色体加倍,

是快速获得纯合株系的关键因素。单倍体诱导系能够诱导自身产生 4 种籽粒(正常二倍体籽粒、单倍体籽粒、胚败育籽粒、胚乳败育籽粒)。因此,快速准确的单倍体鉴定方法是 DH 技术应用的前提和关键。在早期的研究中,根据单倍体和二倍体之间的差异,存在多种鉴定方法,包括表型、遗传标记、染色体数目、气孔保卫细胞长度、分子标记等^[38]。目前已开发出的单倍体鉴定技术,主要是在植株和籽粒水平上进行鉴定和筛选,包括形态学鉴定方法、细胞遗传学鉴定方法、遗传标记鉴定方法、双荧光鉴定方法等。

5.1 形态学鉴定

单倍体与二倍体相比,由于细胞染色体数目减半,出现细胞较小、生物量减小、植株矮小、叶片狭窄、节间数减少等表型。另外,染色体数目异常,会导致减数分裂无法正常进行,出现不育表型。已有研究发现,水稻中能够把叶尖弧度作为筛选标准进行单倍体鉴定,准确率为 100%,但该表型的分子机制还未见报道,仅作为一种简便的单倍体筛选方式应用^[39]。虽然依靠形态学特点,可以在田间对单倍体进行鉴定,但该方法鉴定周期较长,消耗大量的土地资源,容易受到环境因素影响。因此,该方法并不能够满足双单倍体技术广泛应用的需求。

5.2 细胞遗传学鉴定

单倍体相较于二倍体,染色体数目减半,细胞遗传学鉴定是利用根尖或减数分裂期的花药进行压片处理,在显微镜下观察染色体数目,从而进行倍性鉴定,因此,该方法是最准确直观的鉴定方式^[40]。然而,因其实验步骤较为繁琐,且成功率较低,并不能够适用于大批量种子鉴定。此外,还可利用流式细胞仪,通过荧光强度精确定量 DNA 含量,生成 DNA 含量峰图,从而鉴定植株染色体倍性^[41]。然而流式细胞仪需要选取叶片细胞,鉴定时期过晚,无法及时进行染色体数目加倍,且流式细胞仪价格昂贵,需要较高的技术水平,因此,并不适用于大批量的单倍体鉴定。

5.3 遗传标记鉴定

上述鉴定方法往往周期长,且消耗大量资源。因此,如何在种子阶段鉴定出单倍体尤为重要。育种家通过被子植物双受精机制,将不同的遗传标记导入到诱导系中,通过胚、胚乳不同的受精过

程,使单倍体和二倍体能够在种子阶段被区分出来,即利用单倍体诱导系自身携带的遗传标记基因,辅助单倍体筛选,能有效减少依赖单倍体植株形态筛选产生的误差,是一种高效实用的筛选方法。

5.3.1 花青素遗传标记 为实现利用花青素遗传标记鉴定单倍体,将花青素 *R1-nj* 基因导入诱导系中,使单倍体和二倍体种子显示出不同的颜色,实现对单倍体种子快捷高效的筛选^[42]。如将标记基因 *R1-nj*, 导入到玉米诱导系 Stock6 中,该基因能够在玉米的胚乳糊粉层和胚的盾片中特异性表达,产生紫色的花青素。拥有 *R1-nj* 标记后的诱导系与正常植株杂交后,子代可产生胚和胚乳均为紫色的杂种籽粒;胚乳为紫色,胚为白色的单倍体籽粒;胚和胚乳均为白色的自交花粉污染的籽粒;胚为紫色,胚乳为白色的异雄核受精籽粒^[43]。经过颜色标记后,利用肉眼就可以区分玉米籽粒,这种鉴定方式操作简单、效率高、成本投入小,最大程度地保护了籽粒的完整性,并能在早期实现单倍体籽粒的鉴定^[44]。*R1-nj* 标记的使用,极大地提升了玉米单倍体的鉴定与筛选,但 *R1-nj* 标记的应用依然有一定的局限性,比如,*R1-nj* 基因的表达容易受到诱导系和母本材料的遗传背景,收获时籽粒的成熟度和鉴定倍性时籽粒水分含量的影响,并在部分特殊材料(有色籽粒)中表达较弱,肉眼不易识别。以上因素均限制了 *R1-nj* 标记的应用。为了弥补 *R1-nj* 标记的不足,育种家在 *R1-nj* 标记诱导系的基础上导入色素控制基因 *ABP1*,该基因在叶鞘、不定根和茎秆中均表达,最终形成的诱导系具有籽粒、植株双显性遗传标记。子代产生单倍体籽粒的胚乳(糊粉层)为紫色,盾状体(胚)为白色,籽粒幼苗叶鞘为绿色。

ZmC1 和 *ZmR* 可以调控植物花青素合成。对组成型表达 *ZmC1* 的小麦材料(AL-30)和组成型表达 *ZmR* 材料(AL-40)的幼胚、种子以及胚芽鞘进行了系统观察,发现 *ZmC1* 可导致紫色胚芽鞘,*ZmR* 可导致紫色种皮。将组成型表达 *ZmC1* 的材料(AL-30)与诱导系杂交,通过分子标记与表型辅助选择,育成了紫胚芽鞘诱导系。该诱导系杂交的后代,可根据胚芽鞘颜色实现单倍体的精准鉴别(准确率为 96.3%)^[45]。另外,利用 *ZmC1* 基因标记构建出小麦 HIPC(Haploid inducer with

a purple coleoptile)诱导系,并作为父本诱导其他材料,发现后代中紫色胚芽鞘的为二倍体,无色的为单倍体。根据胚的颜色标记直观鉴定单倍体籽粒的准确率为100%^[46]。这大大减轻了鉴定单倍体的工作量,提高了鉴定的准确性和效率,可以批量进行单倍体鉴定,显著促进了小麦单倍体育种技术的应用。

5.3.2 高油标记系统 玉米胚的含油量占总籽粒的85%以上,通过油含量选育的高油标记诱导系能通过杂合二倍体胚的含油量与孤雌生殖的单倍体含油量的差异快速鉴定单倍体^[47]。含油量能够利用核磁共振技术进行检测,并设计出高通量的鉴定仪器,极大地提升了检测的准确率,减少了资源消耗^[48]。但由于含油量表型由多基因控制,遗传机制尚不清晰,在育种过程中并不稳定,容易受作物本身含油量的影响,如小麦籽粒含油量并不突出,不能精确识别,因此,该方法未能在其他作物中普及。

5.3.3 荧光蛋白标记系统 除了上述方法外,还开发了利用荧光蛋白标记区分单倍体和二倍体的方法。将编码着丝粒组蛋白H3的变体CENH3尾部连接YFP荧光蛋白引入诱导系,产生的YFP信号可用于区分二倍体和单倍体^[35]。将荧光蛋白基因与组织特异性启动子结合,在玉米*zmmtl*诱导系籽粒中,利用胚和胚乳中特异性启动子表达eGFP和DsRED,得到的单倍体种子在胚中无荧光,在胚乳中显示红色荧光,二倍体种子的胚显示绿色荧光,胚乳显示红色荧光^[3]。棉花中,在*ghdmp*诱导系中开发出携带有DsRED特异表达的荧光标记植株,作为父本进行杂交。双受精后,产生2种籽粒,一种为胚孤雌生殖形成单倍体,胚无荧光。另一种为杂合二倍体,含有父本的DsRED荧光标记,表现为胚含有红色荧光^[49]。在黄瓜中,利用GFP绿色荧光蛋白基因与*ghdmp*诱导株系结合,能够直接在杂交后代中区分无色的单倍体籽粒和携带GFP荧光的二倍体籽粒^[50]。荧光鉴定系统由于其颜色明显、鉴定准确等特点,已在玉米中得到广泛应用,大大提高了单倍体鉴定效率,且筛选准确率达到99.7%,极大地推动了双单倍体技术的应用^[51]。

6 展望

近年来,国内外在单倍体技术基础理论研究

方面取得了突破,克隆了许多单倍体诱导基因,且这些基因在物种中存在一定的保守性,为单倍体技术在不同物种中的广泛应用提供了基础,但有些基因在一些物种中没有同源基因,因此,将聚合后提高单倍体诱导率的基因,在同一物种中聚合表达提高单倍体诱导率将成为下一步的研究热点。目前,单倍体诱导系大多通过基因编辑技术编辑单倍体诱导基因构建而成,影响了其在生产上的应用,因此,创制单倍体诱导基因的突变材料,也是单倍体诱导系在生产上应用的重点。目前,单倍体的诱导率大多为2%~11%,与理想的单倍体诱导率(20%)还有一定的差距^[52],因此,挖掘新的单倍体诱导基因,提高单倍体诱导率仍任重而道远。

总之,挖掘单倍体诱导新基因,解析单倍体诱导的遗传基础,选育和培育新型高效的诱导系,将进一步提升单倍体育种效率,扩大其在育种中的应用。通过综述单倍体基因的研究进展,有助于挖掘单倍体诱导的新基因,创建高效的单倍体诱导系,解析单倍体诱导的遗传基础,可为植物单倍体技术在育种中的应用提供重要的理论支撑。

参考文献:

- [1] REN J J, WU P H, TRAMPE B, et al. Novel technologies in doubled haploid line development[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(11): 1361-1370.
- [2] 王雨,王桂香,韩硕,等. 利用基因编辑技术创制单倍体诱导系的研究进展[J/OL]. *分子植物育种*, 2024: 1-11. (2024-04-18). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=FZZW20240412005&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- [3] WANG Y, WANG G X, HAN S, et al. Research progress in creating haploid induction lines by gene editing technology[J/OL]. *China Industrial Economics*, 2024: 1-11. (2024-04-18). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=FZZW20240412005&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- [3] 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.
- [4] ELIBY S, BEKKUZHINA S, KISHCHENKO O, et al. Developments and prospects for doubled haploid wheat[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 60: 108007.
- [5] COE E H. A line of maize with high haploid frequency[J]. *American Naturalist*, 1959, 93: 381-382.
- [6] KELLIHER T, STARR D, RICHOUBOURG L, et al. MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction[J]. *Nature*, 2017, 542: 105-109.
- [7] LIU C X, LI X, MENG D X, et al. A 4-bp insertion at *Zm-*

- PLA1* encoding a putative phospholipase A generates haploid induction in maize[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(3):520-522.
- [8] RAVI M, CHAN S W L. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination[J]. *Nature*, 2010, 464:615-618.
- [9] KUPPU S, TAN E H, NGUYEN H, et al. Point mutations in centromeric histone induce post-zygotic incompatibility and uniparental inheritance[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(9):e1005494.
- [10] LV J, YU K, WEI J, et al. Generation of paternal haploids in wheat by genome editing of the centromeric histone CENH₃ [J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(12):1397-1401.
- [11] KARIMI-ASHTIYANI R, ISHII T, NIESSEN M, et al. Point mutation impairs centromeric CENH₃ loading and induces haploid plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(36):11211-11216.
- [12] KELLIHER T, STARR D, WANG W L, et al. Maternal haploids are preferentially induced by CENH₃-tailswap transgenic complementation in maize[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7:414.
- [13] XU X W, LI L, DONG X, et al. Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through *in vivo* induction of a maternal haploid in maize[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(4):1083-1096.
- [14] ZHONG Y, LIU C X, QI X L, et al. Mutation of *ZmDMP* enhances haploid induction in maize[J]. *Nature Plants*, 2019, 5(6):575-580.
- [15] LI Y, LIN Z, YUE Y, et al. Loss-of-function alleles of *Zm-PLD3* cause haploid induction in maize[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(12):1579-1588.
- [16] YAO L, ZHANG Y, LIU C X, et al. *OsMATL* mutation induces haploid seed formation in indica rice[J]. *Nature Plants*, 2018, 4(8):530-533.
- [17] LIU C X, ZHONG Y, QI X L, et al. Extension of the *in vivo* haploid induction system from diploid maize to hexaploid wheat[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(2):316-318.
- [18] LIU H Y, WANG K, JIA Z M, et al. Efficient induction of haploid plants in wheat by editing of *TaMTL* using an optimized *Agrobacterium*-mediated CRISPR system[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(4):1337-1349.
- [19] SUN G L, GENG S F, ZHANG H J, et al. Matrilineal empowers wheat pollen with haploid induction potency by triggering postmitosis reactive oxygen species activity[J]. *New Phytologist*, 2022, 233(6):2405-2414.
- [20] CHENG Z X, SUN Y, YANG S H, et al. Establishing in planta haploid inducer line by edited *SiMTL* in foxtail millet (*Setaria italica*) [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(6):1089-1091.
- [21] WANG X. Plant phospholipases[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2001, 52:211-231.
- [22] POTOCKÝ M, ELIÁS M, PROFOTOVÁ B, et al. Phosphatidic acid produced by phospholipase D is required for tobacco pollen tube growth[J]. *Planta*, 2003, 217(1):122-130.
- [23] POKOTYLO I, PEJCHAR P, POTOCKÝ M, et al. The plant non-specific phospholipase C gene family. Novel competitors in lipid signalling[J]. *Progress in Lipid Research*, 2013, 52(1):62-79.
- [24] MCDERMOTT M, WAKELAM M J O, MORRIS A J. Phospholipase D[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2004, 82(1):225-253.
- [25] YANG S F, FREER S, BENSON A A. Transphosphatidylation by phospholipase D[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1967, 242(3):477-484.
- [26] DAMNJANOVIĆ J, IWASAKI Y. Phospholipase D as a catalyst: application in phospholipid synthesis, molecular structure and protein engineering[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 116(3):271-280.
- [27] ISHIGURO S, KAWAI-ODA A, UEDA J, et al. The *DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(10):2191-2209.
- [28] POKOTYLO I, KOLESNIKOV Y, KRAVETS V, et al. Plant phosphoinositide-dependent phospholipases C: variations around a canonical theme[J]. *Biochimie*, 2014, 96:144-157.
- [29] DOWD P E, COURSOLO S, SKIRPAN A L, et al. *Petunia* phospholipase c1 is involved in pollen tube growth[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(6):1438-1453.
- [30] KIM H J, OK S H, BAHN S C, et al. Endoplasmic reticulum- and Golgi-localized phospholipase A2 plays critical roles in *Arabidopsis* pollen development and germination[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(1):94-110.
- [31] SCANDOLA S, SAMUEL M A. A flower-specific phospholipase D is a stigmatic compatibility factor targeted by the self-incompatibility response in *Brassica napus*[J]. *Current Biology*, 2019, 29(3):506-512.
- [32] PEJCHAR P, SEKEREŠ J, NOVOTNÝ O, et al. Functional analysis of phospholipase Dδ family in tobacco pollen tubes[J]. *The Plant Journal*, 2020, 103(1):212-226.
- [33] BOSE D, NGO A H, NGUYEN V C, et al. Non-specific phospholipases C2 and C6 redundantly function in pollen tube growth *via* triacylglycerol production in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2021, 106(2):409-418.
- [34] WANG B B, ZHU L, ZHAO B B, et al. Development of a haploid-inducer mediated genome editing system for accelerating maize breeding[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(4):597-602.
- [35] ZHAO X, XU X W, XIE H X, et al. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers[J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2):721-731.
- [36] LI X, MENG D X, CHEN S J, et al. Single nucleus sequencing reveals spermatid chromosome fragmentation as a possible cause of maize haploid induction[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1):991.
- [37] JIANG C L, SUN J, LI R, et al. A reactive oxygen species burst causes haploid induction in maize[J]. *Molecular Plant*, 2022, 15(6):943-955.

- [38] 刘传兵,王黎明,杜世凯,等. 玉米单倍体诱导育种关键技术[J]. 现代农业科技,2011(2):89-90.
LIU C B, WANG L M, DU S K, et al. Key technology of maize haploid breeding by inducing[J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2011(2):89-90.
- [39] GHALAGI C, NAMRATHA M R, KOTYAL K, et al. A novel visual marker to distinguish haploids from doubled haploids in rice (*Oryza sativa*, L) at early growth stages[J]. Plant Methods, 2023, 19(1):137.
- [40] MALUSZYNSKI M, KASHA K, SZAREJKO I, et al. Doubled haploid production in crop plants[M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003:309-335.
- [41] BOHANEK B, JAKSE M, HAVEY M J. Genetic analyses of gynogenetic haploid production in onion[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2003, 128(4):571-574.
- [42] LI L, XU X W, JIN W W, et al. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction *via* a high oil inducer CAUHOI in maize[J]. Planta, 2009, 230(2):367-376.
- [43] SARKAR K R, COE E H. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize[J]. Genetics, 1966, 54(2):453-464.
- [44] 王化冰,刘励蔚,朴莲玉,等. 国内玉米单倍体诱导及籽粒鉴别技术的研究进展[J]. 东北农业科学,2020,45(6):28-31,85.
WANG H B, LIU L W, PIAO L Y, et al. Research progress on maize haploid induction and grain identification in China[J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2020, 45(6):28-31,85.
- [45] QI X L, GUO S W, ZHONG Y, et al. Establishment of an efficient haploid identification system by engineering anthocyanin accumulation in the wheat embryo[J]. Plant Communications, 2023, 4(3):100568.
- [46] TANG H L, WANG K, ZHANG S X, et al. A fast technique for visual screening of wheat haploids generated from *TaMTL*-edited mutants carrying anthocyanin markers[J]. Plant Communications, 2023, 4(3):100569.
- [47] 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.
LIU Z Z, SONG T M. The breeding and identification of haploid inducer with high frequency parthenogenesis in maize[J]. Acta Agronomica Sinica, 2000, 26(5):570-574.
- [48] WANG H Z, LIU J, XU X P, et al. Fully-automated high-throughput NMR system for screening of haploid kernels of maize (corn) by measurement of oil content[J]. PLoS One, 2016, 11(7):e0159444.
- [49] LONG L, FENG Y M, SHANG S Z, et al. *In vivo* maternal haploid induction system in cotton[J]. Plant Physiology, 2024, 194(3):1286-1289.
- [50] YIN S, LI S, SUN L, et al. Mutating the maternal haploid inducer gene *CsDMP* in cucumber produces haploids in planta[J]. Plant Physiology, 2024, 194(3):1282-1285.
- [51] XIA H C, QU Y Z, YIN Y J, et al. Powerful combination: a genome editing system to improve efficiency of breeding inducer and haploid sorting in maize[J]. Plant Biotechnology Journal, 2025, 23(2):512-514.
- [52] QU Y Z, FERNIE A R, LIU J, et al. Doubled haploid technology and synthetic apomixis: Recent advances and applications in future crop breeding[J]. Molecular Plant, 2024, 17(7):1005-1018.

著作权使用声明

本刊已许可中国知网以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。本刊支付的稿酬已包含中国知网著作权使用费,所有署名作者向本刊提交文章发表之行为视为同意上述声明。如有异议,请在投稿时说明,本刊将按作者说明处理。

《山西农业科学》编辑部