

玉米单倍体诱导的分子机制 解析及其应用研究进展

郭 华, 鹿红卫, 王帮太, 王志红, 苏玉杰, 张晓春, 秦贵文

(鹤壁市农业科学院, 河南 鹤壁 458031)

摘 要: 单倍体诱导(HI)及双单倍体(DH)技术为加快玉米自交系的选育起到了重要作用。DH育种是改良作物和整合新基因以选育出满足不同育种需求的有效方法, 已逐步实现规模化生产。自1959年Coe发现玉米单倍体诱导自然突变体以来, 单倍体诱导率(HIR)已从最初的2%~3%逐渐上升至10%以上。针对单倍体诱导基因克隆及诱导机制开展大量研究, 先后发现多个QTL诱导位点, 克隆4个重要的单倍体诱导基因, 并在诱导机制方面取得较大突破, 但许多关于HI的谜团仍然存在, 依然制约着HI技术在作物育种中的应用。

关键词: 玉米; 单倍体诱导; 双单倍体; 基因克隆; 诱导机制

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Molecular Mechanism Analysis and Application Research Progress of Maize Haploid Induction

GUO Hua, LU Hong-wei, WANG Bang-tai, WANG Zhi-hong, SU Yu-jie, ZHANG Xiao-chun, QIN Gui-wen

(Hebi Academy of Agricultural Sciences, Hebi 458031, China)

Abstract: The haploid induction technique(HI) and double haploid technique(DH) have played a crucial role in accelerating the breeding of maize inbred lines. DH breeding is an effective method for crop improvement and the integration of new genes to meet various breeding requirements. It has gradually achieved large-scale and industrialized production. Since Coe identified a spontaneous mutant(named Stock6) able to induce about 2%–3% haploid embryos in maize in 1959, the induction rate has gradually increased from the initial 2%–3% to over 10%. Although extensive research has been conducted on the cloning and induction mechanism of *HI* genes, multiple QTL induction sites have been identified, four important *HI* genes have been cloned, and significant breakthroughs have been made in the induction mechanism. However, many mysteries about HI still exist, which restrict its application in maize and other important crop breeding.

Key words: Maize; Haploid induction; Doubled haploid; Gene clone; Induction mechanism

现代玉米杂交种的成功取决于优良亲本自交系的选育^[1]。传统的玉米育种需要8~10代才能将目标基因引入理想的遗传背景, 非常费力、耗时且成本较高^[2]。此外, 新出现的气候变化威胁需要快速选育对非生物和生物因素具有更高耐受性的改良品

种^[3]。因此, 迫切需要开发一种快速有效的方法, 培育兼有多种优良性状的自交系。

开花植物的有性生殖包括双受精, 即花粉中的两个精子与胚囊中的两个生殖细胞结合^[4], 玉米属于典型的双受精植物。现代育种学家希望将亲本重组单倍体基因组固定在自交系中, 通过恢复正常的倍性状态直接产生DH个体^[5-6]。以单倍体诱导(HI)为基础的DH育种体系只需要两代即可实现纯合, 大大缩短了育种时间, 可以有效替代传统自交系选育^[7]。同时, DH个体基因组的快速纯和, 使得作物表型性状的早期鉴定、基因鉴定、遗传图谱开发等遗传学研究更为精准有效^[8-9]。此外, HI技术可以与不同的分子技术结合, 从而更好地克服作物改良中存

录用日期: 2024-03-03

基金项目: 河南省科技攻关计划项目“基于QTL-seq的玉米穗行数QTL定位与分析”(222102110475)

作者简介: 郭 华(1982-), 女, 河南新乡人, 助理研究员, 硕士, 主要从事玉米遗传育种研究。Tel: 18739233903

E-mail: guohua2012@qq.com

鹿红卫为并列第一作者。

张晓春和秦贵文为本文通信作者。

在各种限制^[10]。目前,HI技术已经逐渐成为作物工程的基础,并逐步发展成为玉米育种的重要技术。国内外许多公司已实现DH育种的规模化应用,该技术已成为与生物育种、分子标记辅助育种相媲美的玉米育种三大关键核心技术之一^[11]。

目前,已发现3种不同来源体内单倍体诱导系,一是能诱导父系和母系单倍体的*ig*突变体^[12-13];二是组蛋白3(CENH3)的着丝粒突变体诱导父系单倍体,利用*cenh3*无效突变的杂合子作为母本进行杂交,玉米单倍体诱导率可达5%^[14];三是诱导母系单倍体的Stock6诱导系或未知功能域679膜蛋白(*dmp*)突变体^[15]。

母系单倍体诱导系及其衍生物目前已广泛应用于玉米育种^[16-17]。母系单倍体诱导由父系触发,使用来自该单倍体诱导系的花粉杂交导致卵细胞发育成仅包含母系染色体组或基因组的单倍体胚胎,而胚乳通常是受精的^[18-19]。自1959年第1个玉米单倍体诱导自然突变体的发现到一系列高效诱导系的选育,利用诱导系诱导单倍体已成为玉米DH育种的有效方法。单倍体技术已经成为北美和欧洲玉米育种的主要技术^[20]。国内玉米单倍体育种也在快速发展中,成功育成系列诱导率达15%以上的高频诱导系、子粒油分和诱导率均超10%的超高油型诱导系及组培专用诱导系等^[21]。目前我国每年创制DH系达到30万个以上,育成DH杂交种超过200个,其中,展现出DH杂交种的高产潜力。

这些成功的育种工作进一步表明了单倍体诱导的多基因性质,并逐渐被数量性状位点(QTL)分析及关键基因克隆所证实^[22]。植物单倍体诱导的机制仍然是一个长期的探索。本文主要围绕玉米母系单倍体诱导QTL定位和关键基因克隆、单倍体诱导机制假说及关键基因分子作用机理进行综述。

1 玉米母系单倍体诱导系

玉米单倍体诱导系的诞生要追溯到1959年,Ed Coe发现了1个能够诱导产生约2%~3%单倍体胚胎的自然突变体(*Stock6*)。当由*Stock6*授粉时,无论受体亲本遗传背景如何,单倍体都能稳定发生^[23]。随着玉米育种的不断发展,许多诱导系衍生物被选育出来,形成了一个复杂的单倍体诱导系谱系。根据其遗传多样性划分为6个类群^[24],其中,HIR较高的衍生物,如广泛使用的RWS^[25],被称为“现代单倍体诱导系”,使DH技术在玉米育种中的大规模应用成为可能。随后,具有更高HIR的玉米单倍体诱导系的选育,使得体内单倍体诱导成为生

产玉米单倍体的首选方法^[26],育种家在生产实践中能够更加有效地选育单倍体^[27]。

2 玉米母系单倍体诱导遗传研究

2.1 单倍体诱导QTL定位

玉米的母体单倍体诱导是一种受多基因控制的数量性状。Lashermes和Beckert认为,单倍体诱导是一种可遗传性状,由少数具有主要决定性的基因控制^[28]。Deimling等在Bin1.03-1.06及Bin2.04-2.06分别鉴定出了1个主效和1个微效QTL,他们共同解释了17.9%的表型变异^[29]。Barret等在Bin 1.04上确定1个参与孤雌生殖诱导的主要位点*ggi1*,并精确定位至约11.6 cM的区间(*umc1917-bnlgl1811*),与Deimling等^[29]鉴定出的主效QTL位置一致。Prigge在4个不同群体中定位到7个HIR相关QTLs,其中*qhir1*与*ggi1*位置一致,并决定66%的HIR,位于Bin9.01的*qhir8*决定22.75%的HIR。位于*qhir1*位点上的*sed1*区域物理距离被缩小至455 kb,随后,*qhir1*被精确定位至243 kb的区间,为后续基因克隆提供了一个很好的起点,*qhir8*的位置也被进一步被缩小到789 kb的区域^[30]。通过GWAS分析,*qhir1*被分解为两个紧密相连的基因组片段*qhir11*(0.54 Mb)与*qhir12*(3.97 Mb)^[31]。HIR评估显示,只有*qhir11*对单倍体诱导有显著影响^[32]。

2.2 单倍体诱导基因克隆

2.2.1 基于正向遗传策略的关键基因克隆

玉米母系单倍体诱导系使传统的正向遗传策略探索单倍体基因得以实现,科学家们通过多轮定位及基因编辑对单倍体诱导基因进行探索和验证^[33]。*ggi1/qhir1*是迄今为止发现的HIR最高的QTL位点,其精确定位始于Barret等创建了96个高重组自交系和诱导杂交的18个单粒传后代。此后,*ggi1/qhir1*被缩小到243 kb的区域。Kelliher等将*ggi1/qhir1*位点缩小到大约0.57 Mb的区域,与*ggi1/qhir1*的一个子区域*qhir11*一致,并首次克隆了*qhir1*位点上控制玉米单倍体诱导基因,确定了玉米单倍体诱导是由一种花粉特异性磷脂酶基因的移码突变造成的,命名为*MATRILINEAL(MTL)*。随后,Liu等^[34]和Gilles等^[35]也克隆了该基因,分别命名为*ZmPHOSPHOLIPASE-A1(ZmPLA1)*和*NOT LIKE DAD(NLD)*,并分别利用基因敲除及野生型互补证实了突变带来的功能缺失是导致单倍体诱导的原因。该基因统一称为*ZmPLA1*。

作为触发玉米单倍体诱导的第二大QTL,*qhir8*可以解释大约20%的基因型变异。2015年,*qhir8*被

精细定位至 789 kb 的区域内。2019 年,在 *qhir8* 中发现了 1 个非 Stock6 起源基因的突变,通过图位克隆将候选基因区间缩小至 318 kb,最终锁定为编码 DUF679 结构域膜蛋白的基因,命名为 *ZmDMP*,并利用基因编辑等方法验证了 *ZmDMP* 就是 *qhir8* 位点触发单倍体诱导的关键基因(表 1)。

2.2.2 基于逆向遗传策略的关键基因克隆

基于 *ZmPLA1* 诱导机制,采用逆向遗传策略确

定同属于磷脂酶亚家族的 *ZmPLD3* 发生功能缺失后,同样可引发单倍体诱导,并利用基因编辑进行了验证。*ZmPLD3* 中存在两个水解活性位点区域(HKD)结构域,并筛选出两个因碱基插入或缺失导致的突变体,突变的 *ZmPLD3* 产生了与 *ZmPLA1* 相似的 HIR。*ZmPLD3* 与先前报道的 QTL 均未发生重叠,这表明该位点可能没有被育种者选择^[36]。

表 1 单倍体诱导相关基因及 QTLs
Table 1 Haploid induction related genes and QTLs

来 源	名 称	所在位点/基因	突 变	编码蛋白	蛋白定位	诱导率(%)	作 物	文 献
Resource	Name	Locus	Mutation	Coding protein	Protein localization	Haploid induction rate	Crop	Literature
Stock6	<i>MTL/ZmPLA1/NLD</i>	bin 1.04, <i>ggi1/qhir1</i> <i>GRMZM2G471240</i>	插入	花粉特异性磷脂酶	营养细胞内质膜	3	谷物	[34] [35]
非 Stock6	<i>ZmDMP</i>	bin 9.01, <i>qhir8</i> <i>GRMZM2G465053</i>	SNP	DUF679 结 构 域 膜 蛋白	精子细胞质膜	0.1 ~ 0.3	谷物及双 子叶植物	[15]
基因编辑	<i>ZmPLD3</i>	<i>Zm00001d017246</i>	插入/缺失	花粉特异性磷脂酶	内质网、质体、高 尔基体和细胞质	0.85、0.96	谷物	[36]
基因编辑	<i>ZmPOD65</i>	<i>Zm00001d017996/</i> <i>GRMZM2G442008</i>	SNP/移码 突变	精子特异性过氧化 物酶	无	7.7、1.0	谷物	[37]

2017 年,玉米单核测序技术取得了重要突破。测序结果显示,*zmpla1* 突变体中精子细胞 DNA 断裂频率较高^[37]。Jiang 等^[38]发现与“ROS&应激”相关的过氧化物酶基因 *ZmPOD65*(*Zm00001d017996*)在小孢子细胞三核期高度表达。利用 CRISPR-Cas9 系统编辑该基因产生了错义突变、移码突变两个突变体,HIR 分别为 7.7%和 1.0%,这表明 *ZmPOD65* 突变导致单倍体诱导,进而支持 ROS 爆发在单倍体诱导中的作用^[38]。

3 关键诱导基因分子作用机制

3.1 活性氧(ROS)爆发

对 *zmpla1* 进行多个组学水平综合功能分析,发现大量显著富集或差异丰富的分子实体的功能类别与氧化应激反应相关,这表明活性氧(ROS)爆发在单倍体诱导中起着关键作用。*ZmPLA1* 编码一种在花粉营养细胞中特异性表达的类 patatin 样磷脂酶 a,该基因启动子活性始于双细胞晚期,即第二次有丝分裂之前或期间^[39]。*zmpla1* 中 1 个 4 bp 的插入导致编码的磷脂酶被截断失去稳定性,引起精子中磷脂酰胆碱(PC)的增多。PC 是 ROS 的有效诱导剂,PC 含

量增加破坏线粒体稳态并刺激 ROS 的产生,继而引起氧化还原失衡,这可能导致 DNA 断裂从着丝点区域延伸到整个精子基因组。而持续的 DNA 断裂导致雄性基因组丢失/或着丝粒缺陷,触发单倍体诱导。使用 ROS 试剂对花粉进行简单的化学处理会导致单倍体诱导,进一步证实了 PC 引发的 ROS 是 *ZmPLA1* 突变产生单倍体诱导的主要因素。

在 *zmpla1* 突变体中发现 3 个精子特异性过氧化物酶基因在转录图谱的三核花粉期高度表达,其中,*Zmpod65* 在移码突变及 M73L 点突变杂合状态下均可产生 HI,支持 ROS 爆发在这一过程中的作用。

3.2 雌雄配子细胞通讯受阻或中断

研究表明,*zmdmp* 及 *zmpld3* 均可与 *zmpla1* 产生协同效应,推测在现代 HIR 背后包含不同的单倍体诱导途径。在 *zmpld3* 突变体中发现多个参与雌雄配子间细胞通信的基因发生了显著变化,可能改变了花粉管的极性生长或中断了与雌配子体的通信,进一步导致双受精过程中雄性特异性发育缺陷和基因组消除。此外,*ZmPLD3* 作为磷脂酶家族的一员,突变后的功能缺失可能同样会引发 ROS。

基于拟南芥中同源基因 *AtDMP8* 和 *AtDMP9* 突

变体研究结果,推测玉米 *ZmDMP* 参与了双受精所必需的雌雄配子相互作用,并且对精卵细胞融合的贡献大于中心细胞与精子的融合^[40]。*ZmDMP* 可能不会直接产生单倍体诱导,但可以损害双受精并诱发中央细胞单受精,同时异雄核受精率提高(中心细胞和卵细胞分别与来自两个不同花粉管的精子细胞的融合)^[41],有利于增加 DNA 片段化精子使卵细胞受精的机会,从而间接提高 HIR,被认为可以解释 *zm-pla1* 和 *zmdmp* 之间的协同作用^[42]。

4 体内母系单倍体诱导机制假说

母体单倍体诱导物中的花粉负责诱导产生单倍体。由 Stock6 衍生而来的玉米母系单倍体诱导系统依赖于雄配子体缺陷,单倍体子粒中胚乳正常受精表明,两个精子细胞中至少 1 个正常受精是形成单倍体子粒的必要前提^[43]。单倍体诱导主要可以分为

以下 3 种假说。

4.1 小孢子发育或受精过程中的异常可能导致中央细胞单受精

Sarkar 研究认为,极核的正常受精产生三倍体胚乳,同时刺激未受精卵分裂,是产生大多数玉米母体单倍体的原因。以往关于小孢子发育异常的研究多基于细胞形态观察,主要针对精子传输速度^[44]、形态大小不同^[45]、染色体倍性异常等以及一些异常的受精现象,如异雄核受精^[46-48]等,利用显微镜甚至可以观察到未与卵细胞融合的残余精核^[49],以及中心细胞分裂而卵细胞没有发生分裂等直接证据。2017 年,单核测序技术取得重大突破,发现约 30% 单倍体诱导系的精子细胞发生染色体断裂,不仅会产生单倍体胚胎,还会产生非整倍体胚胎和/或胚乳,从而导致子粒败育(表 2)。

表 2 单倍体诱导机制-单受精假说
Table 2 Haploid induction mechanism-hypothesis of single fertilization

类 别 Category	依 据 Evidence	文 献 Literature
细胞学	精子传输速度不同	[44]
同工酶分析、形态学	异雄核受精	[46][50]
形态学	精子大小不同	[45]
细胞学	非整倍体精子	[43]
形态学、细胞学	胚囊残余精核	[49]
细胞学、形态学	卵细胞未分裂	[47]
单核测序	染色体断裂	[37]

4.2 受精后父系染色体消除

这一假说主要基于在受精产物(胚胎或胚乳)中检测到不完整的父系染色体片段^[51-55]。非整倍性、混合倍性、滞后染色体和微核,所有这些都表明单倍体诱导过程中父系染色体丢失^[56]。利用 SSR、SNP 等分子标记可以检测出部分单倍体胚胎携带诱导系基

因,利用 *R1-nj* 和高油标记物等细胞遗传标记,检测到单倍体胚胎中含有源于父系诱导系的弱花青素和高油标记,支持父系染色体渐渗的假设。在少数单倍体中检测到源于诱导系的细胞遗传学标记 B 染色体,为选择性消除染色体提供直接证据,与甜玉米杂交诱导产生的镶嵌胚乳从形态上直观地展现了诱导

表 3 单倍体诱导机制-亲本染色体消除假说
Table 3 Mechanism of haploid induction-hypothesis of paternal chromosome elimination

类 别 Category	依 据 Evidence	文 献 Literature
SSR 标记	父系染色体片段、父系染色体渐渗	[16][26][51][52][53]
形态学、细胞学	微核、混合倍性、镶嵌胚乳	[53][56]
荧光原位杂交、SNP 标记	混合多倍体、父系染色体渐渗	[54]
形态学、细胞学、SSR 标记	混合倍性、滞后染色体、微核、父系染色体片段	[55]
单细胞测序、SNP 芯片测序	非整倍性、混合倍性	[37][47]
基因测序	基因编辑产物	[2][57]

系染色体片段不同程度的消除。2019年,利用单倍体诱导系介导的基因组编辑(IMGE、HI-Edit)方法成功生成了由父系诱导系基因组编辑的单倍体^[57],这意味着精子和卵细胞发生了融合,但传递了一个不稳定的父系基因组并触发了雌性生殖(表3)。

4.3 精细胞缺陷、受精缺陷和受精后染色体消除共同作用

单核测序发现,单倍体诱导系中约30%的精子细胞基因组不稳定,与卵细胞结合后父系染色体逐渐消除。动物研究表明,DNA损伤是杂交细胞基因组消除的促进因素^[58],为单倍体诱导系花粉中观察到的精子细胞缺陷和胚胎中父系基因组特异性消除/缺失之间的联系提供了桥梁^[59]。另外,基于*zmd-mp*突变可以显著增加单倍体诱导后代中异雄核受精率,以及*zmpla1*与*zmdmp*突变的协同作用等分子机制的研究,一种新的假设被提出:“缺陷”精子细胞与卵细胞融合,随后在早期胚胎发生过程中父系诱导系基因组丢失;中心细胞的单受精导致支持种子发育和未受精的卵细胞自主发育为单倍体胚胎的功能性胚乳的形成,且胚乳中母系和父系基因组的2:1平衡对于种子发育至关重要^[60]。总之,在玉米单倍体诱导系中,高单倍体胚胎发生率是精子细胞缺陷、受精缺陷和受精后染色体消除共同作用的结果。

5 讨 论

研究表明,单倍体诱导基因在自然界中存在广泛的来源,如Stock和非Stock衍生系,单子叶植物或双子叶植物^[61-62]等。有些诱导基因如*ZmPLA1*、*ZmDMP*在育种中已被固定,有些如*ZmPLD3*并未固定。这些基因之间协同作用及功能冗余体现了不同的作用机制,如ROS引发精子细胞缺陷导致染色体消除,而损伤雌雄配子间正常通讯可以导致单受精等。回顾单倍体诱导关键基因的克隆,存在两种截然不同的科研途径:一种是常规的从发现自然突变到最终基因克隆的正向育种策略;另一种是基于诱导机制的作用路径,通过基因编辑技术人为的创造新的诱导突变体,也就是逆向育种策略。如*ZmPLD3*这样的逆向遗传策略代表了一种扩展遗传资源的新方法,为选育超级单倍体诱导系的潜力提供了一种新的途径。

单倍体诱导并不是完全显性的,只有一部分单倍体诱导后代具有单倍体胚胎,而很大一部分具有正常的二倍体胚胎。有研究推测认为,表观遗传调控可能是不完全外显的原因之一^[63]。如何提高单倍体诱导外显率、降低子粒败育率,以及通过基因之间

的协同效应叠加并放大单倍体诱导效率是今后一项重要的研究方向。

HI技术可以与许多生物技术相结合奠定了其作物工程基础的地位。如DH与标记辅助选择(MAS)相结合减少了性状渗入优良品种的时间和资源^[64];单倍体诱导与基因编辑(GE)结合可以对难以进行基因转化的品种实现“无痕”基因编辑;单倍体诱导与雄性不育的结合可以打破作物有性繁殖模式的限制,实现对自花授粉作物的诱导;与有丝分裂取代减数分裂(*MiMe*)技术的结合可以实现种子克隆,降低商业制种成本;与高通量基因分型平台(如微阵列、外显子组捕获或测序基因分型)相结合,显著加速了基因图谱的开发等。

此外,基于*ZmPLA1*及*ZmDMP*等基因的功能保守性,使得单倍体诱导体系可以不断跨越物种的限制,已成功转化至水稻、小麦等单子叶植物以及番茄、苜蓿等双子叶植物中^[65]。以往单倍体诱导的跨作物功能扩展主要基于氨基酸序列比对的蛋白质家族聚类分析以及同源基因挖掘,但一维的序列信息无法完全阐明蛋白质的功能特性,而人工智能可以直接基于蛋白质三维构象进行功能分析,将为具有可变序列和低序列保守性的蛋白质分类提供新的视角^[66]。相信这项技术必将为单倍体诱导在更多作物中的应用提供有力的技术保障。

近年来,随着更为高效的单倍体遗传标记鉴定系统^[67]以及自发加倍^[68-69]的发展,实现了从诱导、鉴别到加倍的一整套DH技术的整体升级,并可能导致“超级单倍体诱导系”^[70]的产生,HI技术已成为现代育种技术的一个重要基础,并进入了飞速发展的“高铁时代”。

参考文献:

- [1] DUVICK D N. The contribution of breeding to yield advances in maize(*Zea mays* L.)[J]. *Advances in Agronomy*, 2005, 86: 83-145.
- [2] WANG B, ZHU L, ZHAO B, et al. Development of a haploid-inducer mediated genome editing system for accelerating maize breeding[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(4): 597-602.
- [3] BHOWMIK P, BILICHAK A. Advances in gene editing of haploid tissues in crops[J]. *Genes(Basel)*, 2021, 12(9): 1410.
- [4] KELLIHER T, STARR D, RICHBOURG L, et al. Matrilineal, a sperm specific phospholipase, triggers maize haploid induction[J]. *Nature*, 2017, 542: 105-109.
- [5] JACQUIER N M A, GILLES L M, MARTINANT J P, et al. Maize in planta haploid inducer lines: a cornerstone for doubled haploid technology[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2288: 25-48.
- [6] VIJVERBERG K, OZIAS-AKINS P, SCHRANZ M E. Identifying and engineering genes for parthenogenesis in plants[J]. *Front Plant*

- Science, 2019, 10: 128.
- [7] CHAIKAM V, MOLENAAR W, MELCHINGER A E, et al. Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2019, 132 (12): 3227–3243.
 - [8] GERMANÀ M. Doubled haploid production in fruit crops[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2010, 104(3): 283–300.
 - [9] HORSTMAN A, BEMER M, BOUTILIER K. A transcriptional view on somatic embryogenesis[J]. Regeneration, 2017, 4(4): 201–216.
 - [10] JACQUIER N M A, GILLES L M, PYOTT D E, et al. Puzzling out plant reproduction by haploid induction for innovations in plant breeding[J]. Nature Plants, 2020, 6(6): 610–619.
 - [11] 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.
 - GUO S L, WEI X, WEI M L, et al. Analysis of technique and mechanism relate to induction and doubling of haploid in maize[J]. Journal of Maize Sciences, 2020, 28(3): 52–59, 65. (in Chinese)
 - [12] KERMICLE J L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize [J]. Science, 1969, 166: 1422–1424.
 - [13] KINDIGER B, HAMANN S. Generation of haploids in maize: a modification of the indeterminate gametophyte(ig) system[J]. Crop Science, 1993, 33(2): 342–344.
 - [14] WANG N, GENT J I, DAWE R K. Haploid induction by a maize *cenh3* null mutant[J]. Science Advances, 2021, 7(4): eabe2299.
 - [15] ZHONG Y, LIU C, QI X, et al. Mutation of *ZmDMP* enhances haploid induction in maize[J]. Nature Plants, 2019, 5(6): 575–580.
 - [16] RÖBER 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[J]. Maydica, 2005, 50(3): 275–283.
 - [17] GEIGER H, GORDILLO G A. Doubled haploids in hybrid maize breeding[J]. Maydica, 2009, 54(4): 485–499.
 - [18] SARKAR K, COE E. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize[J]. Genetics, 1966, 54: 453.
 - [19] BARRET P, BRINKMANN M, BECKERT M. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for insitu gynogenesis in maize[J]. Theor Appl Genet, 2008, 117: 581–594.
 - [20] SEITZ G. The use of doubled haploids in corn breeding[C]. Urbana: University of Illinois at Urbana Champaign, 2005.
 - [21] 中国农业大学. 我校玉米单倍体育种技术体系引领作物育种创新与发展[EB/OL]. (2021–11–10)[2021–11–11]. <http://news.cau.edu.cn/tgznew/795740.htm>.
 - [22] PRIGGE V, XU X, LI L, et al. New insights into the genetics of in vivo induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize[J]. Genetics, 2012, 190: 781–793.
 - [23] COE E H. A line of maize with high haploid frequency[J]. The American Naturalist, 1959, 93(873): 381–382.
 - [24] HU H, SCHRAG T A, PEIS R, et al. The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method[J]. Genetics, 2016, 202: 1267–1276.
 - [25] RÖBER 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[J]. Maydica, 2005, 50: 275–283.
 - [26] XU X, 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.
 - [27] DONG X, XU X, MIAO J, et al. Fine mapping of *qhir1* influencing in vivo haploid induction in maize[J]. Theor Appl Genet, 2013, 126: 1713–1720.
 - [28] LASHERMES P, BECKERT M. Genetic control of maternal haploidy in maize(*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines[J]. Theor Appl Genet, 1988, 76: 405–410.
 - [29] DEIMLING S, RÖBER F K, GEIGER H H. Methodology and genetics of in vivo haploid induction in maize[J]. Vortr. Pflanzenzüchtg, 1997, 38: 203–224.
 - [30] LIU C X, LI W, ZHONG Y, et al. Fine mapping of *qhir8* affecting in vivo haploid induction in maize[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2015, 128(12): 2507–2515.
 - [31] HU H, SCHRAG T A, PEIS R, et al. The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method[J]. Genetics, 2016, 202(4): 1267–1276.
 - [32] NAIR S K, MOLENAAR W, MELCHINGER A E, et al. Dissection of a major QTL *qhir1* conferring maternal haploid induction ability in maize[J]. Theor Appl Genet, 2017, 130: 1113–1122.
 - [33] LÜ J, KELLIHER T. Recent advances in engineering of in vivo haploid induction systems[J]. Methods Mol Biol, 2023, 2653: 365–383.
 - [34] LIU C, LI X, MENG D, et al. A 4-bp insertion at *ZmPLA1* encoding a putative phospholipase a generates haploid induction in maize [J]. Molecular Plant, 2017, 10: 520–522.
 - [35] GILLES L M, KHALED A, LAFFAIRE J B, et al. Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize[J]. The EMBO Journal, 2017, 36(6): 707.
 - [36] LI Y, LIN Z, YUE Y, et al. Loss-of-function alleles of *ZmPLD3* cause haploid induction in maize[J]. Nature Plants, 2021, 7(12): 1579–1588.
 - [37] LI X, MENG D, CHEN S, et al. Single nucleus sequencing reveals spermatid chromosome fragmentation as a possible cause of maize haploid induction[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 991.
 - [38] JIANG C, SUN J, LI R, et al. A reactive oxygen species burst causes haploid induction in maize[J]. Mol Plant, 2022, 15(6): 943–955.
 - [39] GILLES L M, CALHAU ARM, LA PADULA V, et al. Lipid anchoring and electrostatic interactions target NOT-LIKE-DAD to pollen endo- plasma membrane[J]. J. Cell Biol, 2021, 220(10): e202010077.
 - [40] CYPRYS P, LINDEMEIER M, SPRUNCK S. Gamete fusion is facilitated by two sperm cell-expressed DUF679 membrane proteins[J]. Nature Plants, 2019, 5(3): 253–257.
 - [41] TAKAHASHI T, MORI T, UEDA K, et al. The male gamete membrane protein DMP9/DAU2 is required for double fertilization in flowering plants[J]. Development, 2018, 145(23): dev170076.
 - [42] ZHONG Y, CHEN B, LI M, et al. A DMP-triggered in vivo maternal haploid induction system in the dicotyledonous Arabidopsis[J].

- Nature Plants, 2020, 6(5): 466–472.
- [43] CHALYK S, BAUMANN A, DANIEL G, et al. Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize[J]. Maize Genet Coop Newsletter, 2003, 77: 29.
- [44] HU S. Male germunit and sperm heteromorphism: the current status [J]. Acta Bot Sin, 1990, 32: 230–240.
- [45] BYLICH V G, CHALYK S T. Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei as a possible cause of the haploid inducing capacity in ZMS line[J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1996, 70: 33.
- [46] ROTARENCO V A, EDER J. Possible effect of hetero fertilization on the induction of maternal haploids in maize[J]. Maize Genet Coop Newsletter, 2003, 77: 30.
- [47] LIU C, CHEN B, MA Y, et al. New insight into the mechanism of hetero-fertilization during maize haploid induction[J]. Euphytica, 2017, 213: 174.
- [48] TIAN X, QIN Y, CHEN B, et al. Hetero-fertilization together with failed egg-sperm cell fusion supports single fertilization involved in in vivo haploid induction in maize[J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(20): 4689–4701.
- [49] SWAPNA M, SARKAR K R. Anomalous fertilization in haploidy inducer lines in maize(*Zea mays* L.)[C]. Elsevier Ireland Ltd, 2012.
- [50] CHANG M T. Preferential fertilization induced from Stock 6[J]. Maize Genet Coop Newsletter, 1992, 66: 99–100.
- [51] LI L, XU X, 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.
- [52] FISCHER E. Molecular genetic studies on the occurrence of paternal DNA transmission during in vivo haploid induction in maize (*Zea mays*)[D]. University of Hohenheim, 2004.
- [53] ZHANG Z, QIU F, LIU Y, et al. Chromosome elimination and in vivo haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize(*Zea mays* L.)[J]. Plant Cell Rep, 2008, 27: 1851–1860.
- [54] ZHAO X, XU X, XIE H, et al. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers[J]. Plant physiology, 2013, 163: 721–731.
- [55] QIU F, LIANG Y, LI Y, et al. Morphological, cellular and molecular evidences of chromosome random elimination in vivo upon haploid induction in maize[J]. Current Plant Biology, 2014, 1: 83–90.
- [56] WEDZONY M, RÖBER F K, GEIGER H H. Chromosome elimination observed in selfed progenies of maize inducer line RWS[R]. Lubin: Maria Curie-Skłodowska University Press, 2002.
- [57] KELLIHER T, STARR D, SU X, et al. One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction[J]. Nat Biotechnol, 2019, 37: 287–292.
- [58] WANG Z, YIN H, LÜ L, et al. Unrepaired DNA damage facilitates elimination of uniparental chromosomes in interspecific hybrid cells [J]. Cell Cycle, 2014, 13(8): 1345–1356.
- [59] COMAI L, Tan E H. Haploid Induction and Genome Instability[J]. Trends Genet, 2019, 35(11): 791–803.
- [60] CARPUTO D, MONTI L, WERNER J E, et al. Uses and usefulness of endosperm balance number[J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 478–484.
- [61] RAVI M, CHAN S W. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination[J]. Nature, 2010, 464(7288): 615–618.
- [62] KELLIHER T, STARR D, WANG W, et al. Maternal haploids are preferentially induced by CENH3-tailswap transgenic complementation in maize[J]. Front Plant Sci., 2016, 7: 414.
- [63] PETRONIS A. Human morbid genetics revisited: relevance of epigenetics[J]. Trends in Genetics, 2001, 17: 142–146.
- [64] FORSTER B P, HEBERLE-BORS E, KASHA K J, et al. The resurgence of haploids in higher plants[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(8): 368–375.
- [65] WANG D, ZHONG Y, FENG B, et al. The RUBY reporter enables efficient haploid identification in maize and tomato[J]. Plant Biotechnol J., 2023, 21(8): 1707–1715.
- [66] HUANG J, LIN Q, FEI H, et al. Discovery of deaminase functions by structure-based protein clustering[J]. Cell., 2023, 186(15): 3182–3195.
- [67] CHEN C, LIU X, LI S, et al. Co-expression of transcription factors ZmC1 and ZmR2 establishes an efficient and accurate haploid embryo identification system in maize[J]. Plant J., 2022, 111(5): 1296–1307.
- [68] ABOOBUCKER S I, JUBERY T Z, FREI U K, et al. Protocols for in vivo doubled haploid(DH) technology in maize breeding: from haploid inducer development to haploid genome doubling[J]. Methods Mol Biol, 2022, 2484: 213–235.
- [69] REN J, WU P, TIAN X, et al. QTL mapping for haploid male fertility by a segregation distortion method and fine mapping of a key QTL *qhm4* in maize[J]. Theor Appl Genet, 2017, 130(7): 1349–1359.
- [70] REN J, WU P, TRAMPE B, et al. Novel technologies in doubled haploid line development[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15 (11): 1361–1370.

(责任编辑:朴红梅)