

玉米孤雌生殖单倍体诱导及加倍机理 研究新进展

陈琦, 马海霞, 尹高龙, 林海建, 潘光堂, 张志明, 沈亚欧

(四川农业大学玉米研究所, 成都 611130)

摘要: 玉米单倍体技术的应用可以大大缩短自交系选育年限, 加快育种进程, 提高选育效率, 尤其是孤雌生殖单倍体技术的广泛应用, 能够在高效加倍的基础上快速选育稳定的纯系。本文较全面地综述了近年来关于玉米孤雌生殖诱导产生单倍体的机理及单倍体染色体加倍分子机制的研究新进展, 旨在为单倍体技术更广泛的应用提供一定的理论依据。

关键词: 玉米单倍体; 孤雌生殖诱导; 染色体加倍

Research Progress in the Mechanism of Parthenogenesis Haploid Induction and Doubling on Maize

CHEN Qi, MA Hai-xia, YIN Gao-long, LIN Hai-jian, PAN Guang-tang, ZHANG Zhi-ming, SHEN Ya-ou

(Maize Research Institute of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130)

Abstract: Application of haploid technology can significantly shorten breeding time, accelerate the breeding process and improve the breeding efficiency, especially the parthenogenesis haploid induction technology, which is widely applied to quickly provide stable pure line based on the haploid doubling efficiency. In this paper, the new research progress in the mechanism of parthenogenesis haploid induction and chromosome doubling on maize was reviewed. It would help our further understanding of the theoretical basis and broaden the utilization of maize haploid.

Key words: maize haploid; parthenogenesis haploid induction; chromosome doubling

自 1952 年 Chase 首次将单倍体技术应用于玉米育种以来^[1], 以孤雌生殖诱导系为基础的单倍体育种技术在玉米育种中的应用越来越广泛, 引起了越来越多育种工作者及育种公司的重视和青睐。近年来美国、德国及俄罗斯等国都已先后通过孤雌生殖诱导系进行玉米自交系的选育, 并成功选育了一批优良的单倍体诱导系。在我国, 玉米单倍体育种也取得了长足进步。一些大型企业单倍体育种已初具规模, 选育了一批优良杂交组合, 与国外差距进一步缩小。中国农业大学、吉林省农业科学院等利用“农大高诱系列”和“吉高诱系列”选育出一批综合性状较好的玉米自交系^[2], 审定推广了遗单 6 号、科玉 10 号和秦单 5 号等一系列优良品种。单倍体加

倍可获得双单倍体(DH, doubled haploid), DH 系在遗传快速纯合、高效配子选择、寻找基因突变、精细定位基因和拓宽种质资源中具有极高的应用价值。然而, 目前诱导效率不高、加倍效率偏低是限制玉米单倍体育种发展的两大障碍。据报道, 我国玉米孤雌生殖诱导系诱导率并不高, 平均诱导率不足 10%。徐国良等^[3]使用高频单倍体诱导系吉高诱 3 号对基因型不同的 12 份材料进行单倍体杂交诱导试验, 发现诱导率受母本基因型的影响, 不同基因型的单倍体材料诱导率介于 6.77% ~ 12.14%, 差异较大。国外的改良高频诱导系(WS14、ZMS 和 KMS 等), 由于专利、保密等问题也很难引进使用, 使优良诱导系选育变得更加困难。我国单倍体自

收稿日期: 2014-07-25 修回日期: 2014-09-25 网络出版日期: 2015-06-11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150611.0815.001.html>

基金项目: 四川省教育厅青年基金(11ZB066)

第一作者研究方向为玉米单倍体育种。E-mail: cqej124896@163.com

通信作者: 林海建, 研究方向为玉米单倍体育种。E-mail: linhj521@gmail.com

然加倍频率也很低,仅有10%左右,化学加倍的各种因素又难以控制,且处理后植株二倍化效率并不高,再生群体也多是单倍体、双单倍体及其他倍性嵌合体的混合群体。相关研究表明^[4],植物所有的地上器官包括生殖器官均产生自茎顶端分生组织。茎顶端分生组织由三层细胞组成,仅最内层细胞才能发育为生殖器官,因此化学药剂对外层细胞的加倍是无效的,只有使更多的最内层细胞加倍,才可获得加倍的配子,从而得到双单倍体的种子,并且加倍时间必须早于分生组织分化前。因此,单倍体二倍体化过程中复杂的影响因素导致加倍效果并不理想,张铭堂^[5]认为,若扣除自然加倍的频率和药害损失的单倍体植株,人工化学加倍的效果是不显著的。

单倍体技术的两大障碍,严重制约了我国玉米单倍体育种进程和规模化生产,因此,单倍体诱导机理及加倍机制的研究尤为重要,直接决定了单倍体育种的发展进程。本文就近年来在孤雌生殖诱导产生单倍体的机理及单倍体加倍机制的研究进展进行阐述,并对孤雌生殖诱导系在玉米单倍体育种中的应用前景进行展望。

1 孤雌生殖单倍体产生的遗传和生物学机制

1.1 遗传机制

1.1.1 加性效应的多基因决定与核基因控制 孤雌生殖诱导系的诱导性状在玉米花粉中表达。K. R. Sarkar等^[6]早在1966年就已证明Stock6的诱导能力是受遗传控制的。M. A. Aman等^[7]在对包含Stock6的杂交后代进行3轮诱导性状的全姊妹选择后发现,其诱导单倍体的能力显著提高,平均从0.16%上升到3.6%,其中个别品系的诱导率达14.2%。但与此同时,也发现不同杂交背景之间的差异较大。因此,M. A. Aman等^[7]认为孤雌生殖诱导系的诱导能力可能是由具有加性效应的多基因决定的,受环境影响较小。K. R. Sarkar等^[8]通过对含有75%Stock6遗传成分早代材料的选育并将其作为诱导品系,得到了平均3%的单倍体诱导率,在进一步选择后,诱导能力不断稳步提高,许多品系的诱导率超过了5%,最高者达18.57%。由此可得出Stock6的诱导性状是由核基因控制的,通过杂交选择可以改良和提高。P. Lashermes等^[9]通过对Stock6杂交获得的F₁、F₂和F₃分析表明,单倍体的诱导性状在F₁呈显性遗传,在F₂和F₃出现分离,并

显示出受3对显性基因控制的特征,其中1对基因对其他2对基因具有上位性作用,然而此模式仍无法明确解释Stock6杂交分离后代诱导能力差异巨大的原因。

1.1.2 QTL定位分析 P. Lashermes等^[9]、S. Demling等^[10]和F. K. Röber等^[11]对玉米孤雌生殖诱导产生单倍体进行遗传分析指出该性状受多基因控制。P. Barret等^[12]发现非诱导系与诱导系PK6杂交产生的后代群体中出现了显著的偏分离现象,该研究揭示了控制单倍体诱导能力的主效QTL(*qHI-1*)位于第1染色体1.04区域。基于水稻染色体同线性精细定位分析发现2个STS标记与诱导能力位点(尤其是4.5cM和4.9cM)紧密连锁,分析指出在此区域内包含28个候选基因^[4]。

V. Prigge等^[13]对玉米孤雌生殖诱导系单倍体诱导能力进行QTL定位分析,结果表明该性状受1个或多个主效QTL以及部分微效QTL的控制。利用单倍体诱导系UH400分别和2个温带自交系CAUHOI、1680和2个热带自交系CML395、CML495杂交产生的4个分离群体进行QTL作图定位分析,在其中3个群体中发现了贡献率达66%的控制单倍体诱导率的主效QTL,位于第1染色体bin1.04区域内,此结果与前人研究一致。同时在该研究中发现其中3个群体在*qHI-1*区域及与其连锁的分子标记附近区域出现显著的偏分离现象,使诱导系UH400的等位位点*qHI-1*配子传递率明显降低。在另外一个双诱导系CAUHOI和UH400作为亲本的分离群体内共检测到分别位于5条染色体上的7个微效QTL,其中在该群体的F₃检测到一个表型贡献率为20%的主效QTL*qHI-9*,位于第9染色体上。以上结果表明位于第1染色体和第9染色体的2个主效QTLs和微效QTLs的共同作用可能进一步提高孤雌生殖诱导系诱导单倍体的能力。利用以上QTLs区域上的分子标记对单倍体诱导性状进行分子标记辅助选择,可能对提高单倍体诱导系的选育效率和单倍体诱导率具有一定的作用。

1.2 生物学机制

1.2.1 单受精理论 X. Xu等^[14]报道的单受精原理为:Stock6花粉粒中的2个精核,在受精过程中运行的速度不同,往往形成2种不同的单受精形式,一种是2个精核中的一个,优先进入卵细胞与卵核结合,另一个精核由于某种原因死亡,形成紫胚芽尖、非紫粒顶的二倍体子粒;另一种是2个精核中的一个,与2个极核选择受精,另一个精核死亡,形成

紫粒顶、无色胚芽尖的单倍体子粒。在育种中用 Stock 6 作父本,被诱导的育种材料作母本,大约可产生 3.0% 的单倍体胚^[15]。

单受精产生的原因可能是花粉精核形态异常导致的,也可能是精核生殖单位破坏而造成的。但最新的研究发现^[14],单精子突变体 *cdka-1*、*fbl17* 等依然能够使卵细胞或中心细胞受精而产生单受精事件。不同于单受精和半配合生殖假说,据报道,诱导系产生的花粉粒细胞均为 3 核,且在早先的研究中也发现在诱导产生的部分单倍体中存在诱导系的染色体片段。此外,除了像 B 染色体这样极端的例子,众所周知 2 个精细胞与卵细胞或极核的结合是完全随机的,因此可以猜想如果一个携带突变体 *sed1* 单体型的精子与卵细胞或极核融合将产生单倍体子粒或者缺陷型子粒,而缺陷型子粒的胚乳不会携带 *sed1* 单体型。然而与单受精假说相矛盾的是,在该研究中绝大多数缺陷型子粒携带有 *sed1* 单体型。此研究结果中发现孤雌生殖单倍体诱导中双受精过程仍然正常存在,而诱导产生单倍体的真正原因是在胚中发生的染色体消失。而所有缺陷型子粒成熟期的胚乳中均含有父本单体型 *sed1*,因此染色体消失并未在胚乳中发生。此研究认为,单受精理论已不能清楚解释单倍体产生的原因,并且越来越多的研究认为染色体消失是孤雌生殖单倍体产生的主要原因。

1.2.2 染色体消失理论 关于种间杂交产生单性生殖的染色体消失理论也存在很多假说。例如,在 M. Ravi 等^[16]的研究中,以拟南芥着丝粒功能性蛋白 CENH3 缺失突变体为母本与野生型父本杂交得到的后代由于双亲着丝粒互作,使突变体的染色体组在合子有丝分裂时丢失,从而得到只含有野生型亲本一套染色体的单倍体后代。该方法诱导效率高且不需组培,只需要与着丝粒突变体杂交即可得到单倍体。研究表明,CENH3 蛋白在真核生物中普遍存在,并且有学者认为^[17],玉米孤雌生殖诱导系诱导单倍体产生的机理也是染色体消失。然而在玉米中,母本单倍体的诱导不太可能由 *CENH3* 基因的突变导致,因为玉米 *CENH3* 基因定位于第 6 染色体上并且在玉米第 1 染色体 bin1.04 区域上也不存在 *CENH3* 的同源基因。关于染色体消失的最新研究中,创造了一种新的更有效的“单倍体诱导系”:将着丝粒蛋白 CENH3 的 N-端组蛋白的 HI 尾巴用 GFP 标签替代,并命名为 GFP-tailwap。以此 *cenh3* GFP-tailwap 改造的植株与野生型杂交可在 F₁ 后代

中产生高达 50% 的单倍体^[18]。

M. Wedzony 等^[19]研究发现,授粉 20 d 大约 10% 单倍体诱导系 RWS 的胚细胞中有微小染色体出现,微小染色体是染色体消失发生的重要特征。E. Fischer^[20]利用 SSR 标记发现,一小部分单倍体 (1% ~ 2%) 包含有诱导系父本的染色体片段,Z. L. Zhang^[21]等的研究也支持染色体消失假设。L. Li 等^[22]证明诱导系的染色体片段整合入了单倍体及双单倍体的基因组中,以此说明诱导系染色体的消失发生在双受精之后。Z. L. Zhang 等^[21]、L. Li 等^[22]研究发现单倍体后代中渗入了孤雌生殖诱导系的 DNA 片段,这种渗入可能会对 DH 群体的 QTL 定位、优良 DH 系的选育及利用等造成较大的影响。染色体消失假说虽然可以对单倍体植株中包含父本诱导系基因组的现象给出合理的解释,但其生物学证据不足,仍不能完全说明其为单倍体产生的主要机制。

1.2.3 非整倍体配子打破双受精 S. Chalyk 等^[23]研究发现在单倍体诱导系 MHI 和 M471H 中存在 10% ~ 15% 的非整倍体小孢子,因此认为非整倍体也是诱导产生单倍体的可能原因。此研究提出单倍体诱导系染色体的异常分裂发生在小孢子形成期,这可能会导致非整倍体精子的形成。非整倍体配子的存在可打破植物双受精的发生且能够刺激卵细胞在未受精的情况下发育成单倍体胚。

综上所述,单倍体诱导机制依然未被清楚证明和阐释,然而可以确定的是诱导过程伴随着生殖异常,并且不同诱导系引起不同的生殖异常而产生单倍体也不无可能。目前单倍体诱导率的 QTL 定位仍处在初步定位的水平,通过精细定位,在更小的区域内筛选出与诱导率相关的候选基因,将是未来单倍体诱导机制研究的重点和方向。

2 植物单倍体加倍机制

2.1 自然加倍的生物学机制

虽然单倍体自然加倍的机理还不十分清楚,但几乎所有作物的单倍体细胞在自然状态下都具有一定的二倍化趋势,且玉米单倍体雌穗自然二倍化率大大高于雄穗。刘志增等^[24]发现在玉米单倍体中,平均有 93.2% 的雌穗自然可育,而雄穗育性因基因型不同而差异很大。O. A. Shatkaya 等^[25]研究指出,具有 Mo17、Ts8、Ts16 和 613/2c4 遗传背景的单倍体材料,散粉率分别为 1.2%、5.5%、3.4% 和 22%。因此,单倍体自交结实主要取决于雄穗是否产生可

育花粉。P. Testillano 等^[26]通过电镜观察发生自然加倍的玉米小孢子母细胞胚胎,发现早期细胞内出现核融合现象是自发二倍化发生的重要原因。研究者认为,精核融合、核内复制、核内有丝分裂、花粉管中精子和营养核的融合等因素都是导致染色体加倍的可能原因^[27]。然而尚不清楚单倍体加倍自然发生的真实原因及相应的分子机制,仅仅依靠单倍体自然加倍难以满足育种实践的需要,必须通过人工加倍的手段产生可育植株。

2.2 化学药剂介导单倍体人工加倍的生物学机制

关于化学药剂诱导染色体加倍的动力学机制主要包括以下两种:干扰纺锤体形成机制和干扰细胞器 Ca^{2+} 运输系统。

2.2.1 干扰纺锤体形成机制

目前染色体加倍使用的化学药剂主要有秋水仙素和部分除草剂。秋水仙素诱导加倍的机制与微管、着丝粒的结构和特性有关^[28],其作用于细胞的根本效应是改变细胞微管的状态,导致微管蛋白与微管蛋白二聚体结构变形,阻断微管蛋白组装成微管,引起原有微管解聚^[29]。R. Bai 等^[30]证明秋水仙素的 A 环与 β 微管蛋白 354 半胱氨酸结合、C 环结合在 239 半胱氨酸和 N 末端氨基酸。H. J. Torin 等^[31]利用计算机软件对该结合位点进行了三维结构模型的动画模拟,直观地反映了秋水仙素与微管蛋白的结合方式。S. Kaborty 等^[32]通过对不同 pH、温度、微管蛋白的不同结构下秋水仙素及 B-Ring 类似物与微管蛋白的结合模型研究中发现,无论是秋水仙素抑或微管蛋白,都必须处于较高活化能状态下,即秋水仙素形成聚合复合物,微管蛋白 C-端活化状态下,二者方可顺利结合从而导致微管功能异常而解聚。类似的研究表明硝基苯胺类除草剂安磺灵 (Oryzalin) 和氟乐灵 (Trifluralin) 也能与微管蛋白结合形成除草剂-微管蛋白复合物,抑制微管蛋白聚合,阻止细胞壁的形成^[33]。苯基酰胺类除草剂拿草特 (Pronamide) 能缩短微管长度,破坏纺锤体的组装,抑制细胞有丝分裂。磷酸酰胺类除草剂甲基胺草磷 (APM) 能直接影响微管功能。程罗根等^[34]对 APM 处理的洋葱根尖细胞有丝分裂和微管功能进行毒理学和免疫化学检测,结果表明使用 $10 \mu\text{mol/L}$ APM 处理 16 h 后,细胞出现了多极分裂和不均等分裂现象,纺锤丝凝聚成一团,失去正常向两极辐射状排列的功能,引起细胞的不正常分裂。

2.2.2 干扰细胞器 Ca^{2+} 运输系统

非生物逆境胁迫和病原物侵染都会引起植物细胞内 Ca^{2+} 浓度的

变化^[35]。细胞学研究表明,胞内 Ca^{2+} 浓度是影响微管聚合和解聚的因素之一,当 Ca^{2+} 浓度低时会促进微管的组装,高时则会引起微管的分解,胞内高浓度的 Ca^{2+} 不利于微丝组装。佟树坤等^[36]等使用不同浓度的 Ca^{2+} 处理洋葱鳞茎表皮细胞,结果发现洋葱鳞茎表皮的细胞骨架受到破坏,解聚程度与处理浓度和时间呈正相关。研究发现,化学加倍药剂作用于植物细胞,引起胞内 Ca^{2+} 浓度失衡,从而导致微管和微丝的解聚,最终阻止细胞有丝分裂。刘文革等^[37]在组培材料同源加倍试验中发现,安磺灵能通过影响 Ca^{2+} 在微管组装中的作用来干扰细胞器的 Ca^{2+} 运输系统,加速更多微管解聚。相关研究表明,甲基胺草磷是一种胞内 Ca^{2+} 转运的抑制剂,通过阻止 Ca^{2+} 在线粒体中累积,提高 Ca^{2+} 在细胞质中的浓度,进而阻止微管聚合,导致染色体分裂出现多极化和落后现象。

然而目前对单倍体加倍过程中基因的表达调控模式及加倍过程的分子机制仍不十分清楚,尚无准确定论,推测这一过程可能是通过干扰细胞器 Ca^{2+} 运输系统、亲和微管蛋白,破坏微管组装,妨碍纺锤体的正常形成,使细胞分裂失去动力来源,不能一分为二,最终生成了双倍染色体数目的细胞。目前对于多倍化的基因表达调控模式已有很多研究报道,因此可以从多倍化的过程中推测单倍体二倍化可能的调控机制。

2.3 倍性效应基因表达调控机制

单倍体加倍后,染色体数量发生了变化,为了适应自然和进化需要,细胞内基因表达调控模式会发生巨大的改变。张红宇等^[38]采用全基因组甲基化位点检测和基因芯片测序的方法,对遗传背景一致的水稻双胚苗单倍体和二倍体植株进行了基因表达差异分析,结果表明单倍体的甲基化水平高于对应的二倍体,单倍体发生表达变化的序列占水稻总探针序列的 2.47%,其中激活变化的占 0.34%,沉默变化的占 0.27%,激活的序列数量多于沉默的。R. M. Stupar 等^[39]采用基因芯片技术分析了单倍体和二倍体中 9000 个基因的表达情况,结果发现在叶鞘和根尖组织中约有 10% 的基因表达差异显著,单倍体材料部分基因加倍表达。姚军^[40]利用甲基化敏感性限制性内切酶-PCR 法,结合 SRAP 分子标记技术检测基因组甲基化位点多态性结果表明,小白菜游离小孢子培养获得的单双倍体甲基化调控存在差异,说明单倍体与二倍体基因组甲基化程度差异明显。L. Wang 等^[41]采用 cDNA 单链构型多态性检

测方法对小麦单倍体及其二倍体植株的 30 个转录本进行了检测,结果发现基因 *TC251989* 在单倍体材料中出现了沉默现象;后续基因芯片检测在单倍体根和幼苗中找到了 55052 个基因,而这些基因在二倍化材料中仅有极少量能被检测到。由此可见,单倍体加倍后 DNA 的甲基化水平和基因表达丰度发生了重大改变,然而这一重大改变正是在二倍化过程中实现的,这预示着单倍体加倍过程中细胞的基因表达模式出现了重大调整。

当前国内外有关单倍体二倍化前后基因表达调控模式的报道还很少,S. O. Mittelsten 等^[42]的研究表明,多倍化也伴随着基因表达模式的改变,具体表现为基因的沉默或激活,植物多倍化过程中的基因表达模式可以作为单倍体加倍过程基因表达模式的重要参考。基因沉默在异源多倍化过程中普遍发生,人工异源四倍体拟南芥、四倍体小麦及棉花中基因沉默发生的频率分别为 0.4%、1% 和 5%^[43-44]。染色体加倍后出现的过度甲基化会引起基因沉默,H. S. Lee 等^[45]在人工四倍体拟南芥基因组中发现了一些沉默表达基因,当使用 aza-dC 处理阻断基因组的胞嘧啶甲基化后,这些沉默基因又表现出了活性。转座子激活也会引起基因沉默,N. P. Harberd 等^[46]在六倍体小麦基因组中发现一个长约 8 kb 的反转录因子能插入 *Glu21* 基因编码区域,导致谷蛋白无法正常合成。此外,大量报道证明,在人工合成的异源多倍体和天然异源多倍体中均有部分基因激活表达,P. He 等^[47]在新合成的小麦异源六倍体中检测到一个编码蛋白质基因在亲本中低水平表达,而在多倍体中高水平表达。同样的 K. Kashkush 等^[48]发现人工四倍体小麦表达发生变化的基因中,20% 表现为激活表达。而 L. Comai 等^[49]发现人工合成的拟南芥异源四倍体中部分激活表达的转录本正是亲本中沉默或低水平表达的反转座子。

由此可以推测,在单倍体加倍过程中,染色体数量发生了改变,基因表达调控模式也出现了变化,具体表现为大量基因出现差异表达及甲基化修饰,甚至表现为部分基因的激活或沉默。研究秋水仙素作用下单倍体加倍过程中基因的调控模式和应答机制,无疑会丰富对染色体加倍前后基因表达调控机制的认识。目前,单倍体加倍方法中效率最高的是茎尖生长点注射法,但该方法仍然不能使单倍体加倍率达到 100%,今后可通过实验研究将加倍试剂、试剂浓度、处理时间、处理温度等条件建立到最佳状态,使加倍率达到 100% 后,再对单倍体加倍过程的

转录组序列和 DNA 甲基化水平进行研究,来阐明玉米单倍体化学加倍过程的基因表达情况和应答机制,从分子层面探索提高玉米单倍体化学加倍效率的途径,发掘与单倍体加倍过程密切相关的基因,通过分子遗传学手段提高现有单倍体材料的加倍效率,填补该领域国内外研究的空白。

3 展望

玉米单倍体育种技术是生物技术与常规育种方法结合产生的一条新的育种途径,能显著加快育种进程,单倍体技术在玉米育种中的应用前景非常广阔。首先对目标诱导材料进行重组与改良,使其积累足够的有利基因位点,然后利用单倍体技术使优良的基因快速纯合,获得性状优良的纯系,这将会极大地发挥单倍体育种技术的优势,极大提高玉米育种的效率^[2]。孤雌生殖育种目前仍处于探索阶段,今后研究的重点应是寻找更科学高效的诱导方法,探明诱导孤雌生殖发生机理,提高其诱导频率,找到单倍体加倍过程中的基因表达调控模式及分子机制,探索更有效的加倍方法,提高加倍效率,使单倍体育种技术更加成熟、完善。可以预见,孤雌生殖技术在作物育种领域将得到更为广泛的应用。

参考文献

- [1] Chase S S, Gowen J W. Monoploids in maize [J]. *Heterosis*, 1952;389-399
- [2] 赵延明,董树亭,张锁良,等. 玉米单倍体育种技术研究与应用进展 [J]. *玉米科学*, 2007, 15(5):60-64
- [3] 徐国良,代玉仙,刘晓丹,等. 玉米单倍体诱导率和加倍率的研究 [J]. *玉米科学*, 2012, 20(2):1-5
- [4] Prasanna B M, Vijay C, George M. Doubled haploid (DH) technology in maize breeding: theory and practice [M]. Mexico: CIMMYT, 2012
- [5] 张铭堂. 玉米之遗传(续): 细胞遗传 [J]. *科学农业*, 1996, 44(3/4):101-109
- [6] Sarkar K R, Coe Jr E H. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize [J]. *Genetics*, 1966, 54(2):453
- [7] Aman M A, Mathur D S, Sarkar K R. Effect of pollen and silk age on maternal haploid frequencies in maize [J]. *Indian J Genet Plant Breeding*, 1981, 41(3):362-365
- [8] Sarkar K R, Pandey A, Gayen P. Stabilization of high haploid inducer lines [J]. *Maize Genet Coop Newsl*, 1994, 68:64
- [9] Lashermes P, Gaillard A, Beckert M. Gynogenetic haploid plants analysis for agronomic and enzymatic markers in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1988, 76(4):570-572
- [10] Deimling S, Röber F K, Geiger H H. Methodic and Genetic of in-vivo-haploid induction in maize [J]. *Vortr. Pflanzenzüchtung*, 1997, 38:203-224
- [11] 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(3/4):275
- [12] Barret P, Brinkmann M, Beckert M. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible

- for in situ gynogenesis in maize [J]. *Theor Appl Genet*, 2008, 117(4):581-594
- [13] 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(2):781-793
- [14] 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]. *J Exp Bot*, 2013, 64(4):1083-1096
- [15] 韩学莉,唐祈林,曹墨菊,等. 用 Stock6 杂交诱导的单倍体鉴定方法初探[J]. *玉米科学*, 2006, 14(1):64-66
- [16] Ravi M, Chan S W L. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination [J]. *Nature*, 2010, 464(7288):615-618
- [17] Zhao X, Xu X W, Xie H X, et al. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers[J]. *Plant Physiol*, 2013, 163:721-731
- [18] Chan S W L. Chromosome engineering: power tools for plant genetics [J]. *Trends Biotechnol*, 2010, 28(12):605-610
- [19] Wedzony M, Röber F K, Geiger H H. Chromosome elimination observed in selfed progenies of maize inducer line RWS[C]//XVI-Ith International Congress on Sex Plant Reproduction. Lublin; Maria Curie-Skłodowska University Press, 2002:173
- [20] Fischer E. Molecular genetic studies on the occurrence of paternal DNA transmission during in vivo haploid induction in maize (*Zea mays*) [D]. Stuttgart: University of Hohenheim, 2004
- [21] Zhang Z L, Qiu F Z, Liu Y Z, et al. Chromosome elimination and in vivo haploid production induced by Stock6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27:1851-1860
- [22] Li L, Xu X, Jin 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
- [23] Chalyk S, Baumann A, Daniel G, et al. Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize [J]. *Maize Genet Coop Newsl*, 2003, 77:29
- [24] 刘志增,宋同明. 玉米单倍体雌雄育性的自然恢复以及染色体的化学加倍[J]. *作物学报*, 2000, 26(6):947-952
- [25] Shatskaya O A, Zabirova E R, Shcherbak V S. Autodiploid lines as sources of haploid spontaneous diploidization in corn [J]. *Maize Genet CoopNewsl*, 1994, 68:51
- [26] Testillano P, Georgiev S, Mogensen H L, et al. Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during in vitro maize induced microspore embryogenesis [J]. *Chromosoma*, 2004, 112(7):342-349
- [27] 陈绍江,黎亮,李浩川,等. 玉米单倍体育种技术[M]. 2版. 北京:中国农业大学出版社, 2011
- [28] 吴举宏. 秋水仙素的诱导机理[J]. *中学生物教学*, 2002(2):93
- [29] 翟中和. 细胞生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 1995:319-359
- [30] Bai R, Pei X F, Boyé O, et al. Identification of cysteine 354 of β -tubulin as part of the binding site for the A ring of colchicine [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(21):12639-12645
- [31] Torin H J, Winter P, Johnson L, et al. Computational design and biological testing of highly cytotoxic colchicine ring A modifications [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2010, 75(6):541-550
- [32] Kaborty S, Gupta S, Sarkar T, et al. The B-ring substituent at C-7 of colchicine and the α -C-terminus of tubulin communicate through the "tail-body" interaction [J]. *Proteins*, 2004, 57(3):602-609
- [33] 慕小倩,赵毓. 除草剂对植物细胞有丝分裂的影响[J]. *杂草科学*, 1999(1):11-13
- [34] 程罗根,施新,彭永康. 除草剂 APM 对洋葱细胞分裂和微管功能的影响[J]. *华北农学报*, 2002, 17(2):112-115
- [35] 章文华,陈亚华. 钙在植物细胞盐胁迫信号转导中的作用[J]. *植物生理学通讯*, 2000, 36(2):146-153
- [36] 佟树坤. 不同处理条件对洋葱鳞茎表皮细胞骨架形态的影响[J]. *种子世界*, 2010(8):25-27
- [37] 刘文革,阎志红. 植物离体组织染色体加倍诱导同源四倍体[J]. *植物学通报*, 2005, 22(8):29-36
- [38] 张红宇. 双胚苗水稻中单倍体与二倍体表型和基因表达的差异分析[D]. 四川:四川农业大学, 2006
- [39] Stupar R M, Bhaskar P B, Yandell B S, et al. Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization [J]. *Genetics*, 2007, 176(4):2055-2067
- [40] 姚军. 白菜小孢子培养再生植株染色体倍性分子检测技术研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2009
- [41] Wang L, Liu D, Guo X, et al. Variability of gene expression after polyploidization in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Gene Genomic Genet*, 2011, 1(1):27-33
- [42] Mittelsten S O, Jakovleva L, Afsar K, et al. A change of ploidy can modify epigenetic silencing [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(14):7114-7119
- [43] Adams K L, Percifield R, Wendel J F. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid [J]. *Genetics*, 2004, 168(4):2217-2226
- [44] Comai L, Tyagi A P, Winter K. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(9):1551-1568
- [45] Lee H S, Chen Z J. Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(12):6753-6758
- [46] Harberd N P, Flavell R B, Thompson R D. Identification of a transposon-like insertion in a Glu-1 allele of wheat [J]. *Mol Gene Genet*, 1987, 209(2):326-332
- [47] He P, Friebe B R, Gill B S, et al. Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 52(2):401-414
- [48] Kashkush K, Feldman M, Levy A A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid [J]. *Genetics*, 2002, 160(4):1651-1659
- [49] Comai L, Madlung A, Josefsson C, et al. Do the different parental heteromes' cause genomic shock in newly formed allopolyploids? [J]. *Philos T R Soc B*, 2003, 358(1434):1149-1155