

网络出版时间: 2025-12-03

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20251202.1311.002>

小麦育种中双单倍体技术的研究进展

刘洋¹, 张婷婷¹, 薛帆¹, 曹彦^{1,2}

(1. 内蒙古自治区乌兰察布市农林科学研究所, 内蒙古乌兰察布 012000; 2. 中国农业大学, 北京 100091)

摘要: 双单倍体(DH)技术是一种通过单倍体诱导与染色体加倍快速获得纯合植株的生物技术, 可在一个世代内实现遗传稳定, 显著缩短育种周期, 被广泛应用于小麦、玉米、油菜等多种作物的遗传育种, 尤其在构建遗传群体、QTL定位和品种改良中发挥关键作用。本文简要介绍了小麦单倍体产生的方法, 回顾了DH育种技术在小麦研究领域的最新进展, 并介绍DH技术在加速育种、遗传图谱构建、核不育及小孢子遗传转化等方面的应用实例, 以期促进DH技术在小麦育种中的发展和提高小麦育种效率。

关键词: 小麦; 单倍体技术; 育种; 远缘杂交

中图分类号: S512.1; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2026)04-0454-10

Research Progress of Double Haploid Technology in Wheat Breeding

LIU Yang¹, ZHANG Tingting¹, XUE Fan¹, CAO Yan^{1,2}

(1. Ulanqab Institute of Agricultural and Forestry Sciences, Ulanqab, Inner Mongolia 012000, China;

2. China Agricultural University, Haidian District, Beijing 100091)

Abstract: Doubled haploid(DH) technology is a biotechnology that rapidly obtains homozygous plants through haploid induction and chromosome doubling, genetic stability in one generation and significantly shortening the breeding cycle. It is widely used in the genetic breeding of various crops such as wheat, corn, and rapeseed, especially a key role in the construction of genetic populations, QTL mapping, and variety improvement. This paper will briefly introduce the method of producing wheat haploid, review the latest progress of DH breeding technology in the field of wheat research, and introduce the application examples of DH technology in accelerating breeding, genetic map construction, nuclear sterility, and microspore genetic transformation, in order to promote the development of DH technology in wheat breeding and further improve the efficiency of wheat breeding.

Keywords: Wheat; Haploid technology; Breeding; Distant hybridization

小麦(*Triticum aestivum* L.)是中国主要粮食作物之一, 加强小麦遗传育种的探究对国家粮食安全和人民群众生活水平的提高至关重要^[1]。合理的育种技术是小麦实现高效育种的关键^[2]。1920年, 人们在棉花上发现单倍体植株, 其染色体数是正常植株的一半^[3]。此后, 育种家们持续关注植物上自然产生的单倍体, 希望通过加倍形成双单倍体(doubled haploid, DH), 以此开展植

物育种。由于植物自然产生单倍体植株几率较低, 科学家不断探索, 逐渐将单倍体诱导^[3-4]与染色体加倍结合, 掌握了快速获得纯合植株的DH育种技术, 并在小麦、玉米、油菜等作物的遗传育种上广泛应用。该技术从亲本杂交后的配子体进一步发展完整的纯合子系, 可在一个世代内实现遗传稳定, 显著缩短育种周期^[5], 其在构建遗传群体、QTL定位、品种改良等方面发挥着重要作

收稿日期: 2025-07-20

修回日期: 2025-08-23

基金项目: 内蒙古小麦育种联合攻关项目(YZ2023008); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2025QN03085)

第一作者 E-mail: lyang15502416083@163.com(刘洋)

通讯作者 E-mail: caoyan060119@163.com(曹彦)

用^[6]。本文简要介绍小麦单倍体产生的方法,回顾 DH 技术在小麦研究领域的最新进展,总结 DH 植株在育种工作中的开发与利用状况,以期推动 DH 技术在小麦遗传育种研究中更广泛的应用,促进小麦高效育种和相关研究的开展。

1 小麦单倍体的诱导方法

小麦单倍体最初来源于小麦和圆柱山羊草(*Aegilops cylindrica* Host)之间的杂交^[7]。此后,人工诱导小麦单倍体的研究工作大量开展,获

得的诱导方法多种多样,主要有小麦远缘杂交、离体培养及单倍体基因诱导^[8-14],这些方法原理不同,应用的优缺点各有差异(表 1)。

1.1 小麦的远缘杂交

通过小麦和球茎大麦(*Hordeum bulbosum* L.)杂交可产生小麦单倍体,但球茎大麦对位于小麦 5A 和 5B 染色体上的优势交叉性抑制剂基因*Kr1*和*Kr2*敏感,因此通过小麦×球茎大麦杂交产生的小麦单倍体仅限于可交叉的小麦基因型^[15-16]。

表 1 小麦单倍体诱导的主要方法
Table 1 Main methods of wheat haploid induction

诱导方法 Inducing method	技术应用 Technology utilization	原理 Principle	优势 Dominance	不足 Deficiency	基因型偏离 Genotype deviation
远缘杂交 Distant hybridization	小麦×玉米杂交 Wheat×maize hybrid	染色体消除 Chromosome elimination	不存在基因型限制,效率高 No genotype restriction, high efficiency	操作流程繁琐,受环境影响较大 Operation process is cumbersome, greatly affected by the environment	存在 Presence
离体培养 Isolated culture	花粉培养 Pollen culture	植物细胞全能性 Plant cell totipotency	无愈伤组织阶段,减少孢子体变异和幼苗白化 No callus stage, reduce sporophyte variation and seedling albino	受基因型影响大,对技术要求严格 Greatly affected by the genotype, Requires strict technology and environment	存在 Presence
	花药培养 Anther culture	植物细胞全能性 Plant cell totipotency	技术成熟,应用广泛 Mature technology, widely used	需诱导愈伤组织,存在白化现象,受亲本基因型影响明显 Inducing callus, high proportion of albino, significantly affected by parental genotype	存在 Presence
	子房培养 Ovary cultivation	植物细胞全能性 Plant cell totipotency	再生植株的比例高,避免白化 High proportion of regenerated plants, low albinism	技术应用较少 Less application of technology	存在 Presence
单倍体基因诱导 Haploid gene induction	<i>TaMTL</i>	精细胞片段化 Sperm cell fragmentation	诱导率高,技术成熟,可实现大规模育种 High induction rate, mature technology, to achieve large-scale breeding	结实率低,具有染色体渗入风险,存在品种差异 Low seed setting rate, risk of chromosome infiltration, variety differences	存在 Presence
	<i>TaPLA</i>	精细胞片段化 Sperm cell fragmentation	诱导率高,技术成熟,更适合大规模育种 High induction rate, mature technology, to achieve large-scale breeding	结实率低,具有染色体渗入风险,存在品种差异 Low seed setting rate, risk of chromosome infiltration, variety differences	存在 Presence
	<i>TaCENH3a-</i>	单亲染色体消除 Single parent chromosome elimination	可快速固定父本的优良基因 Excellent genes of the male parent were quickly fixed	诱导率低 Low induction rate	存在 Presence

在小麦与玉米杂交中,玉米对普通小麦的*Kr1*、*Kr2*不敏感,因而其花粉可在小麦柱头上萌发、伸长并使小麦卵细胞和极核受精。在受精卵的前 3 次细胞分裂中,玉米染色体组消失,最终形成的胚只含小麦雌配子染色体组,即为单倍体胚。但这一过程的具体机制尚未完全明确,可能与核蛋白合成异步性、细胞周期异步性或着丝粒特异性失活等因素有关^[17]。通过这一方法几乎可诱导所有小麦基因型产生单倍体,是生产小麦单倍体最常用的方法^[9],具有基因型特异性低、操作简

便、成本相对较低、体细胞无性系变异少、高效省时、再生率高等优点^[17,18]。1986 年,小麦和玉米之间新的远缘杂交系统成功建立,但一些研究认为玉米基因型对小麦×玉米系统有显著影响^[19-21],使用多种甜玉米基因型的花粉混合物会增强单倍体植株的再生^[22]。小麦基因型对单倍体培养的影响小于玉米基因型^[19]。目前普遍认为,冬小麦(冬小麦、冬小麦×冬小麦 F₁)的单倍体培养表现优于非冬小麦(春小麦、春小麦×小麦 F₁和冬小麦×春小麦 F₁)。然而,冬小麦×春

小麦 F_1 在获取再生植株方面表现最好^[23], 小麦×玉米基因型中的 DNA 杂合性提高了单倍体诱导率(HIR)^[24]。利用杂交诱导单倍体的过程中, 由于杂交种子中没有胚乳, 因此需要胚挽救。有研究人员提出, 通过调整培养中的重要条件如温度(18~21℃)可以提高胚胎形成的频率^[25]。

此外, 利用其他植物如高粱(*Sorghum bicolor* L.)^[26]、小米(*Pennisetum glaucum*)^[27]和白茅草(*Imperata cylindrica*)^[28]也可此通过杂交诱导小麦单倍体。

1.2 离体培养

离体培养是将小麦分离的花药通过无菌操作分离出来, 在特定的培养基上进行离体培养, 雄配子通过胚胎发生和器官发生在体外发育成单倍体植株^[29]。

小麦花粉离体培养没有愈伤组织阶段, 可减少因孢子体变异而引起的农艺性状退化以及白化苗的产生量, 提高单倍体产生频率, 是小麦单倍体育种中比较成熟的方法之一, 在生产中已有广泛应用。但其培养体系仍有一些障碍, 如出现低反应基因型、高白化病频率及对培养技术和条件具有严格要求等问题^[30]。研究表明, 玉米花粉诱导产生小麦单倍体的总体效率比花药培养高6~10倍^[31]。因此, 与小麦×玉米杂交体系相比, 花药培养的应用受限。小麦等谷类作物离体培养中植株再生效率高度依赖于培养基成分及其剂量、合适的植物生长调节剂和生长条件等^[32,33]。目前, 提高花粉培养诱导效率的研究大多集中在诱导和再生阶段的花粉预处理和优化离体培养条件^[34]。据报道, 植株的成功再生受 CuSO_4 、 AgNO_3 以及诱导步骤的影响^[35], 6-苄氨基嘌呤可以提高胚胎中单倍体植株的比例, 而 AgNO_3 的优势在于胚胎培养过程中微生物污染减少^[11]。

Slama 等^[10]比较了小孢子培养、用玉米花粉授粉小麦以及子房培养三种方法在突尼斯硬粒小麦中获得单倍体的效率, 结果表明, 小孢子培养的效果最差(再生植株的比例 0.01%), 与玉米杂交排名第二(再生植株的比例 0.4%), 而子房培养的效果最佳(再生植株的比例 0.8%)。此外, 使用后两种方法可以再生出 100% 的绿苗, 而小孢子培养仅产生白化苗。该研究团队还发表了硬粒小麦子房培养的详细方案^[36], 诱导培养基中加入低浓度的大量盐、 $750 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的谷氨酰胺、 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-D 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的咪唑氨基

嘌呤(Kinetin)是子房培养的最佳选择。分化培养基则包含 $146 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的谷氨酰胺、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-D 和 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAA。相比其他方法, 使用未授粉的子房通过直接离体培养产生单倍体胚胎的雌核发育方法应用比较少。

总之, 离体培养的物理处理(冷预处理、热休克)中, 使用 AgNO_3 、BAP、植物生长调节剂和优化培养条件可能会对植株的离体培养反应产生积极影响^[37-40], 可增加胚胎诱导中胁迫的耐受性, 有助于增强小麦离体培养的胚胎发生能力^[41,42], 从而提高 HIR。

1.3 诱导基因突变

利用单倍体诱导基因型作为种质杂交, 可以诱导单倍体产生, 获得的单倍体穗会携带一定比例的种子, 其含有母系来源的单倍体胚胎^[43]。

在玉米中使用的所有现代单倍体诱导剂均来源于单倍体诱导剂系 Stock6。MTL/ZmPLA1/NLD 基因突变会导致单倍体诱导现象^[43], HIR 可达到 2%^[44-46]。ZmDMP 是非 Stock6 起源基因, 其突变将会导致玉米配子质膜通讯和融合中断, HIR 为 0.1%~0.3%, 在 MTL/ZmPLA1/NLD 存在下 HIR 可增加 5~6 倍^[47]。但在水稻中敲除 ZmDMP 的两个直系同源基因 OsDMP3 和 OsDMP6 后, 在与 OsMTL 突变体结合时, 并没有诱导单倍体或增加 HIR^[48]。

在小麦中, TaPLA-A、TaPLA-B 和 TaPLA-D 为 MTL/ZmPLA1/NLD 的同源基因, 其功能丧失会导致精细胞片段化, 进而触发单倍体诱导现象^[12]。也有研究表明, 通过优化 CRISPR/Sp-Cas9 系统并编辑了小麦 TaMTL 后, TaMTL-A 和 TaMTL-D 的双敲除突变导致 HIR 达到 10%, TaMTL-A、TaMTL-B 和 TaMTL-D 的三重敲除会将 HIR 提高至 11.8%~31.6%^[49], 远高于以往的 HIR^[12]。敲除 ZmDMP 的同源基因可能会进一步提高小麦 HIR, 小麦中的 TaDMP3 和 TaDMP13 在序列和表达模式方面均与 ZmDMP 相似, 预测通过基于 CRISPR/Cas9 的基因组编辑修饰这些直系同源基因在小麦中高效产生单倍体诱导系(HIS)^[50], 但这些同源基因在小麦中是否能够诱导单倍体还未见报道。

磷脂酶 D₃ 是磷脂酶 D(phospholipase D, PLD)亚家族的成员之一, 其功能丧失突变会导致精细胞片段化, 可以触发玉米的母体单倍体诱导。ZmPLD3 被鉴定为母本单倍体诱导基因, 其

突变导致的 HIR 与 *MTL/ZmPLA1/NLD* 相似, 在提高 HIR 方面表现出协同作用, 其 HIR 约为 4%。此外, *ZmPLD3* 在谷物中高度保守, 突出了这些体内单倍体诱导剂系在其他重要作物物种中的潜在应用^[51]。然而, *ZmPLD3* 在小麦中的同源基因是否能够诱导单倍体还未见报道。

活性氧 (ROS) 爆发在单倍体诱导过程中起关键作用, ROS 会导致 DNA 损伤, 可能导致染色体片段化, 在单倍体诱导过程中消除染色体。用过氧化物抑制剂: 甲硫咪唑 (MMI)、ROS 试剂: 磷脂酰胆碱 (PC) 对花粉进行简单化学处理, 可能会导致单倍体诱导, 并发现编码精子特异性过氧化物酶的 *ZmPOD65* 突变会诱导单倍体后代, 其 HIR 为 1.0%~7.7%, 研究者推断其他增加花粉 ROS 水平的试剂, 如钙离子、环磷酸腺苷 (cAMP)、4,5-二磷酸磷脂酰肌醇 (PI (4,5) P2) 以及细胞骨架聚合或解聚抑制剂, 也可能产生单倍体诱导现象^[52]。在小麦中也存在类似情况, 当 *TaPLA* 基因突变失去功能后, 花粉在第二次有丝分裂时产生一定量的 ROS, 导致精细胞中的 DNA 受到一定程度的损伤, 受损伤的 DNA 在受精后逐渐消除, 最终产生单倍体籽粒^[13], 但过氧化物抑制剂、ROS 试剂以及小麦 *ZmPOD65* 的同源基因突变在小麦中是否会产生单倍体诱导现象仍需研究。

Ravi 等^[53] 研究发现, 可以通过纵着丝粒特异性组蛋白 (CENH3) 在拟南芥中获得单倍体, *CENH3* 与着丝粒 DNA 结合并将其连接到纺锤体纤维上, 在减数分裂和有丝分裂期间促进染色体和染色单体分离到子细胞中, *CENH3* 的突变会导致合子发育过程中亲本染色体消除而产生单倍体。这种方法产生的单倍体还可通过减数分裂非还原自发转化为可生育的二倍体, 使它们的基因型得以延续。因此, 利用改良的 *CENH3* 进行单倍体创制的方法在小麦中具有较好的应用前景。*CENH3* 的基因组编辑在小麦中可以产生父本单倍体, HIR 约为 7%, 通过筛选基因组编辑的 *Ta-CENH3α*-异等位基因组合来鉴定, 且杂合基因型触发的 HIR 高于纯合子组合^[14]。

小麦单倍体诱导基因的开发实现了小麦种内单倍体诱导, 为小麦单倍体诱导技术开辟了一条新的路径, 也为小麦 DH 育种方法升级奠定了基础。

2 单倍体鉴定方法

单倍体鉴定是 DH 技术的重要组成部分。目前单倍体鉴定的方法有很多, 常用的方法主要包括植株形态、细胞遗传学和遗传标记。

2.1 植株形态

形态鉴定法是单倍体鉴定的最基础方法。单倍体仅含有一组染色体, 植株的叶片面积、花茎以及种子等器官相较于二倍体小, 植株也较矮。前人研究发现, 小麦×玉米产生的单倍体颖果小, 小穗数少, 植株瘦小, 颜色淡, 质地软, 且大多数子房内无胚乳, 仅在少数子房内观察到 1 个游离的球形幼胚, 单倍体植株常在开花期出现花药退化或花粉败育^[54]。因此, 一般情况下, 通过观察植株的表型可以很直观快速地分辨出单倍体。但是该方法鉴定单倍体所需的时间较长, 需要在田间种植, 而植物的生长也容易受到环境的影响^[55], 因此在植株倍性鉴定中, 几乎不采用形态进行鉴定, 避免造成鉴定失误。

单倍体和二倍体的种子质量不同, 单倍体种子的平均质量较小。然而, 单倍体和二倍体种子的种子质量分布重叠, 具体取决于供体基因型^[56]。因此, 利用种子质量大小有效区分单倍体和二倍体仍具有挑战性。

2.2 细胞遗传学

许多植物中, 细胞或器官大小与倍性水平有关^[57]。随着倍性水平的增加, 气孔会变大, 而气孔密度会降低。气孔保卫细胞中的叶绿体数量与倍性水平通常呈正相关^[58]。因此, 根据这种关系可以快速鉴别二倍体和单倍体。通过染色体压片观察植物的根尖细胞是鉴定单倍体的最直观方法。研究人员利用胚培苗根尖鉴定栽培大麦和球茎大麦的倍性^[59]。但该方法所包含的实验步骤繁琐, 且效率较低, 不适用于大量样品的筛选鉴定。利用流式细胞仪 (Flowcytometry, FCM) 对处于分裂期的植物细胞 DNA 含量进行检测, 进而确定样本的倍性^[60], 既快速精准, 又能实现样品批量检测。

2.3 遗传标记

遗传标记具有可遗传性和可识别性, 可用于对染色体、染色体片段和基因进行鉴别和分析。玉米单倍体缺乏 *R1-nj*, 因而利用显性花青素标记 *R1-nj* 对单倍体进行筛选^[61], 但该标记在某些种质中的鉴定效率低下^[62]。利用高仁油含量

(KOC)的单倍体诱导系也可实现单倍体鉴定^[63],其准确率甚至超过90%,随着研究的不断深入和技术成本的不断降低,这种方法可大幅度提高单倍体鉴定的效率^[64]。但这两种技术目前仅在玉米上有所应用^[65],是否用于其他作物尚有待探索。随着玉米花青素基因诱导剂的开发和升级,玉米单倍体的鉴定识别更加有效、准确和简便^[66]。另外,基于增强的绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白信号在胚胎和胚乳中的特异性表达,也能简化单倍体鉴定^[67]。

在小麦中,研究人员建立了基于花青素积累的筛选系统:利用玉米花青素调控基因*ZmC1*和*ZmR*,将组成型表达*ZmC1*的材料AL-30与诱导系进行杂交,通过分子标记与表型辅助选择,育成了紫胚芽鞘诱导系PCI。利用该诱导系杂交的后代,根据胚芽鞘颜色可实现单倍体精准鉴定,准确率达到96.3%^[68]。随后,胚特异表达的色素标记系统^[69]被建立,并直接被转化到小麦单倍体诱导系中,形成紫胚单倍体诱导系PEI。PEI叶片中无花青素积累,生长不受影响。利用该诱导系产生的六倍体表现为紫色胚,而单倍体胚表现为正常颜色。利用3个母本材料进行单倍体鉴定评估,结果表明,无论是幼胚阶段还是成熟种子阶段,单倍体鉴定准确率平均达到97.7%。

研究人员通过编辑小麦*TaMTL*基因,创制了小麦单倍体诱导系,以该诱导系作为父本能够诱导母本产生20%左右的单倍体籽粒^[49]。利用小麦单倍体诱导系与表达花青素基因*ZmC1*(胚芽鞘呈现紫色)的转基因小麦杂交,获得了携带*ZmC1*的小麦单倍体诱导系HIPC。以HIPC作为父本与其他小麦材料杂交,籽粒萌发后胚芽鞘呈现白色的为单倍体,呈现紫色的为二倍体^[59],经过染色体计数、保卫细胞长度鉴定、DNA含量测定和花粉育性观察等验证,根据胚色直观鉴定单倍体籽粒的准确率几乎为100%。

3 加倍处理

3.1 人工诱导染色体加倍

单倍体植株具有不育性^[70]。染色体加倍可获得纯合、稳定的DH植株。秋水仙素是应用最多的加倍植物染色体的试剂^[71],其在有丝分裂期间抑制纺锤体功能,并阻止姐妹染色单体的极性分离,诱导时加入2%二甲基亚砜(DMSO)可以

有效提高增倍诱导率^[72]。此外,有研究者在诱导单倍体小麦时,开发出一种高效的秋水仙碱诱导方法,可使染色体加倍效率大大提高^[17]。

3.2 自发性单倍体基因组复制

自发性单倍体基因组复制(SHGD)发生在许多伞形科、十字花科、葫芦科、茄科等作物中,SHGD机制尚不完全清楚,但SHGD在不同物种中以不同的频率发生。例如,在谷类作物中,大麦^[73]、水稻^[74]及玉米^[75]中均存在SHGD现象。不同小麦材料中自发染色体加倍的比例差异较大。研究人员对6个小麦品系观察发现,4个品系的自发染色体加倍比例约80%,2个品系则低于15%^[76],这种现象在小麦栽培品种间也存在^[77]。

4 DH技术在实践中的应用

4.1 加速育种

利用DH技术可加速小麦新品种的选育。在具体实践中,小麦×玉米杂交被广泛应用,虽然其单倍体基因诱导效果较弱、技术难度大及成本高,但利用这种方式已成功育成新品种(系)。例如,Amin等^[27]利用DH技术筛选出盐胁迫条件下产量性状优于亲本的春小麦DH种质材料;Zhang等^[78]利用该技术培育出11个矮败雄性不育系材料;王子宁等^[79]利用该技术培育了6个糯性小麦新品种;Bustos等^[80]以提高粒数和粒重为目标,筛选出的DH品系比亲本增产31%。利用DH技术可改良品种抗病性。研究人员利用该技术育成高产、节水、条锈病中高抗及白粉病免疫的小麦新品种中麦533^[81]。通过小麦×玉米杂交,Moradi等^[82]评价面包小麦材料的黄锈病抗性,并在短时间内获得纯合抗病基因型。通过小麦与白茅草的杂交,利用DH技术筛选出在苗期和成株期对黄锈病和褐锈病均表现抗性的株系^[83]。

此外,单倍体诱导技术与分子标记技术结合^[84],能够快速获得稳定、纯合的目标单株,加速育种进程^[85-86]。Rohit等^[87]在单倍体诱导的基础上,增加多性状分子标记筛选,快速培育出聚合了来源于小黑麦的抗秆锈病基因*SrR*、*Sr31*和来源于长穗偃麦草的抗秆锈病基因*Sr24*、*Sr26*的普通小麦品系。

4.2 遗传图谱构建

数量性状由多个基因控制,因而对杂交后代中数量性状稳定遗传所需要的时间较长,其规律

也比较复杂。DH 群体具有完全纯合的特性,是进行小麦数量性状遗传分析的理想材料。在小麦 DH 群体构建过程中,离体培养的 HIR 受基因型影响较大,白化问题也会导致群体偏小,可能遗漏部分基因和性状,基因诱导也存在结实率低的问题,影响遗传图谱的完整性和准确性。通过小麦×玉米杂交可产生遗传稳定的单倍体,且不受基因型限制,有助于减少遗传背景的干扰,提高遗传图谱的准确性和可靠性,因而此方法经常被用于 DH 群体构建。

种子形态是在驯化过程中改变的重要性状。研究人员在两个小麦 DH 群体中,发现 3D 上存在影响种子长度的 QTL,在 1D 和 3B 上存在种子均匀加宽的 QTL^[88]。Zhang 等^[89]使用一组来源于华培 3×玉麦 57 的小麦杂交 DH 群体,研究其株高的数量性状位点(QTL),认为株高遗传加性效应占 46.07%,上位效应占 19.89%,QTL×环境相互作用(QEs)占 19.09%,三者共解释了 85.04% 的表型变异。Ajay 等^[90]利用弱筋小麦品种 Rugby 和强筋小麦品种 Maier 创建的小麦 DH 群体构建了一张包含 228 个标记的遗传连锁图谱,可解释 90% 以上的表型变异。小麦的穗状形态性状^[91]、穗粒数^[92]、产量^[93]、谷蛋白质含量^[94]等性状的 QTL 也成功通过 DH 群体被发现。Jia^[95]通过对杂种花药培养获得的小麦 DH 群体,构建遗传连锁图谱,并检测到稳定的低赤霉病严重度 QTL。这些 QTL 的发现有助于小麦高产优质品种的选育以及优异种质资源的挖掘。

4.3 与雄性不育结合

太谷核不育小麦是显性不育基因控制的雄性不育材料。太谷核不育基因(*Ms2*)的发现对小麦育种方式的创新具有重要意义^[96],利用该基因可实现轮回选择育种^[97]。将携带 *Ms2* 的轮回选择群体与单倍体诱导系杂交,可以产生大量单倍体。这种方法的效果已在小麦和拟南芥中得到验证,可显著减少大规模单倍体诱导所需的工作量^[98]。

研究人员利用 F₁、F₂ 和 F₃ 代的不育材料,基于 DH 技术选育小麦热光敏基因雄性不育系(TPSGMS),并对不同子代不育材料利用效率进行评估,结果表明,4 年内共培育了 24 个具有完全纯合且其他性状优良的品系,其中 F₂ 代更有利于选育 DH 系;相较于传统系谱法育种,这种方法用时短,品系选育效率高^[99]。因此,在小麦杂交优势利用研究过程中,急用 DH 技术在不育系

的选育及其性状改良方面可充分挖掘了小麦种质材料的潜力。

4.4 小孢子遗传转化

将单倍体技术与基因编辑技术结合,可以在一个生育期内获得含有目标性状的 DH 系,继而进行基因功能分析和作物品种的遗传修饰^[100]。利用基因枪法、电激转化法和农杆菌介导法对小麦小孢子进行遗传转化,可获得纯合的转基因植株。研究人员将大麦耐旱性基因 *HVA1* 用农杆菌介导的方法进行遗传转化,转入小麦花药来源的单倍体胚胎,获得耐旱单倍体植株,对其进行加倍获得纯合 DH 转基因植株^[101]。通过转化水稻花药愈伤组织,经过加倍获得含 *Xa21* 基因的 DH 转基因植株^[102]。将目标基因转入植株,进行单倍体诱导,加倍后得到纯合转基因 DH 植株,这无疑缩短了通过自交获得纯合转基因植株的时间^[103]。

5 结语

利用 DH 技术可大幅缩短小麦新品种的育成时间,该技术的不断优化将会使 DH 的培育过程更加高效和稳定。DH 也被广泛应用于遗传图谱构建、不育系筛选、小孢子遗传转化等方面,成为小麦遗传育种研究的重要手段,将进一步提高性状遗传分析和改良的效率和准确性,为小麦遗传育种提供更多可能。

虽然小麦×玉米杂交的应用十分广泛,但环境因素对单倍体产生的成功率和胚培养效果均存在显著影响,激素的处理浓度、时间和方法对胚胎成活和成苗的影响仍存在基因型差异。通过优化技术路线,打破种质壁垒,进一步提高小麦×玉米杂交诱导的 HIR,可提高这种方法的应用适配性。

离体培养的诱导效率受到基因型、环境、激素等多种因素影响,且多数时候存在基因型依赖性,限制该技术在加速育种、遗传分析及其他研究领域的应用,因而有必要围绕限制因素进一步改进离体培养诱导技术,提高成熟度。此外,可在小孢子遗传转化等研究领域运用该诱导技术,充分挖掘其在小麦遗传育种研究中的利用价值。

单倍体诱导基因的发现对实现小麦种内单倍体诱导有重要意义。利用此类基因产生单倍体对基因型依赖性较小,且不需要组织培养,成本和效率均得到提高。未来需要深入解析单倍体诱导基因的分子机制,这将有助于挖掘更多具有单倍体

诱导功能的基因,可进一步拓展单倍体诱导技术的应用范围。此外,更要将其与其他现代生物技术的结合运用,拓宽其在水麦研究中的应用范围。例如,将显性雄性不育基因与单倍体诱导系相结合,可省去传统DH育种中的去雄步骤,进一步结合可视化单倍体识别系统,从单倍体诱导和鉴定两方面提高单倍体的产生效率,最大程度提高育种规模。

此外,进一步开发小麦单倍体标记,能够在胚胎时期以及种子时期有效筛选单倍体,拓宽单倍体识别效率的品种范围;染色体加倍常用的化学处理通常会对植物细胞造成损害,SHGD可以避免这种化学损伤,挖掘SHGD在水麦中的发生机制,提高DH植株的产生效率,挖掘DH技术在水麦研究中的更多可能性。

参考文献:

- [1] WHITFORD R, FLEURY D, REIF J C, *et al.* Hybrid breeding in wheat: Technologies to improve hybrid wheat seed production [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(18): 5411.
- [2] SELVA C, RIBONI M, BAUMANN U, *et al.* Hybrid breeding in wheat: How shaping floral biology can offer new perspectives [J]. *Functional Plant Biology*, 2020, 47(8): 675.
- [3] DUNWELL J M. Haploids in flowering plants: Origins and exploitation [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2010, 8(4): 377.
- [4] XU L, NAJEEB U, TANG G X, *et al.* Haploid and doubled haploid technology [J]. *Advances in Botanical Research*, 2007, 45: 181.
- [5] GERMANÀ M A. Anther culture for haploid and doubled haploid production [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2011, 104(3): 283.
- [6] GUAN X Z, PENG J H, FU D L. Technology for production of wheat doubled haploid *via* maize pollen induction: Updated review [J]. *Agronomy*, 2024, 14(2): 375.
- [7] GAINES E F, AASE H C. A haploid wheat plant [J]. *American Journal of Botany*, 1926, 13(6): 373.
- [8] SEGUÍ-SIMARRO J M, JACQUIER N M A, WIDIEZ T. Overview of *in vitro* and *in vivo* doubled haploid technologies [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2287: 3.
- [9] HUSSAIN B, KHAN M A, ALI Q, *et al.* Double haploid production in wheat through microspore culture and wheat × maize crossing system: An overview [J]. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2013, 6: 332.
- [10] SLAMA-AYED O, BOUHAOUEL I, AYED S, *et al.* Efficiency of three haplomehtods in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum Desf.): Isolated microspore culture, gynogenesis and wheat × maize crosses [J]. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2019, 55(3): 101.
- [11] BOKORE F E, KNOX R, CUTHBERT R D, *et al.* Effects of media supplements on doubled haploid production in durum wheat [J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2016: CJPS.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] KASHA K J, KAO K N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Nature*, 1970, 225(5235): 874.
- [16] PICKERING R A, MORGAN P W. The influence of temperature on chromosome elimination during embryo development in crosses involving *Hordeum* spp., wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1985, 70(2): 199.
- [17] NIU Z X, JIANG A X, ABU HAMMAD W, *et al.* Review of doubled haploid production in durum and common wheat through wheat × maize hybridization [J]. *Plant Breeding*, 2014, 133(3): 313.
- [18] SUENAGA K, NAKAJIMA K. Efficient production of haploid wheat (*Triticum aestivum*) through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays*) [J]. *Plant Cell Reports*, 1989, 8(5): 263.
- [19] VERMA V, BAINS N S, MANGAT G S, *et al.* Maize genotypes show striking differences for induction and regeneration of haploid wheat embryos in the wheat × maize system [J]. *Crop Science*, 1999, 39(6): 1722.
- [20] KAPOOR C, CHAUDHARY H K, SHARMA P, *et al.* *In vivo* haploid induction potential of Himalayan maize (*Zea mays*) and cogon grass (*Imperata cylindrica*) gene pools in different segregational cycles of intra and inter-generic crosses of wheat [J]. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 2021, 19(6): 522.
- [21] DHIMAN R, RANA V, CHAUDHARY H K. Himalayan maize: Potential pollen source for maize mediated system of chromosome elimination approach in DH breeding of bread wheat [J]. *Cereal Research Communications*, 2012, 40(2): 246.
- [22] AVCİ S, KUTLU İ. Comparison of orchard-grass and sweet maize for doubled haploid plant production *via* wide hybridization in bread wheat [J]. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 2020, 8(7): 1548.
- [23] SHARMA S, SETHI G S, CHAUDHARY H K. Influence of winter and spring wheat genetic backgrounds on haploid induction parameters and trait correlations in the wheat ×

- maize system [J]. *Euphytica*, 2005, 144(1):199.
- [24] SINGH S, SETHI G S, CHAUDHARY H K. Differential responsiveness of winter and spring wheat genotypes to maize-mediated production of haploids [J]. *Cereal Research Communications*, 2004, 32(2):201.
- [25] BHATTACHARYA A, PALAN B, CHAR B R. An insight into wheat haploid production using wheat $\times$ maize wide hybridization [J]. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 2003, 3:44.
- [26] INAGAKI M, MUJEEB-KAZI A. Comparison of polyhaploid production frequencies in crosses of hexaploid wheat with maize, pearl millet and sorghum [J]. *Japanese Journal of Breeding*, 1995, 45(2):157.
- [27] AMIN A Y, SAFWAT G. Development of doubled haploid wheat genotypes using chromosome eliminating technique and assessment under salt stress [J]. *American Journal of Science*, 2010, 6:139.
- [28] CHAUDHARY H K, SETHI G S, SINGH S, *et al.* Efficient haploid induction in wheat by using pollen of *Imperata cylindrica* [J]. *Plant Breeding*, 2005, 124(1):96.
- [29] YANG H Y, ZHOU C. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1982, 63(2):97.
- [30] REDHA A, ISLAM S M S, BÜTER B, *et al.* The improvement in regenerated doubled haploids from anther culture of wheat by anther transfer [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2000, 63(3):167.
- [31] PRATAP A, SETHI G S, CHAUDHARY H K. Relative efficiency of anther culture and chromosome elimination techniques for haploid induction in *Triticale* $\times$ wheat and *Triticale* $\times$ *Triticale* hybrids [J]. *Euphytica*, 2006, 150(3):339.
- [32] ISLAM S, BARI M, AMIN M, *et al.* *In vitro* plant regeneration through anther culture of eight wheat varieties [J]. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, 2001, 11(1):31.
- [33] SHAHINUL ISLAM S M. The role of drought stress on anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 2010, 20(1):55.
- [34] NIAZIAN M, SHARIATPANAH M E. *In vitro* -based doubled haploid production: Recent improvements [J]. *Euphytica*, 2020, 216(5):69.
- [35] ORŁOWSKA R, PACHOTA K A, MACHCZYŃSKA J, *et al.* Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2020, 43:8.
- [36] AYED SLAMA O, SLIM AMARA H. Unpollinated ovaries used to produce doubled haploid lines in durum wheat [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2287:245.
- [37] OLESZCZUK S, SOWA S, ZIMNY J. Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid *Triticale* ($\times$ *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo [J]. *Plant Cell Reports*, 2004, 22(12):885.
- [38] DATTA S K, DATTA K, POTRYKUS I. Embryogenesis and plant regeneration from microspores of both 'Indica' and 'Japonica' rice (*Oryza sativa*) [J]. *Plant Science*, 1990, 67(1):83.
- [39] ASIF M, EUDES F, RANDHAWA H, *et al.* Induction medium osmolality improves microspore embryogenesis in wheat and *Triticale* [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2014, 50(1):121.
- [40] SHARIATPANAH M E, BELOGRADOVA K, HESSAM-VAZIRI L, *et al.* Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment [J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25(12):1294.
- [41] ELIBY S, BEKKUZHINA S, KISHCHENKO O, *et al.* Developments and prospects for doubled haploid wheat [J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 60:108007.
- [42] KANBAR O, LANTOS C, KISS E, *et al.* Androgenic responses of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) combinations in *in vitro* anther culture [J]. *ABI Genetika*, 2020, 52(1):335.
- [43] PRIGGE V, XU X W, 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.
- [44] KELLIHER T, STARR D, RICHBOURG L, *et al.* MATRI- LINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction [J]. *Nature*, 2017, 542(7639):105.
- [45] LIU C X, LI X, MENG D X, *et al.* A 4-bp insertion at Zm-PLA1 encoding a putative phospholipase generates haploid induction in maize [J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(3):520.
- [46] GILLES L M, KHALED A, LAFFAIRE J B, *et al.* Loss of pollen-specific phospholipase not like dad triggers gynogenesis in maize [J]. *EMBO Journal*, 2017, 36(6):707.
- [47] 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.
- [48] LIU Z K, ZHONG Y, QI X L, *et al.* Haploids can be induced in knockout mutants of OsPLA1, but not OsDMP3 or OsDMP6, in rice [J]. *The Crop Journal*, 2024, 12(1):213.
- [49] 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.
- [50] GOYAL L, KAUR M, MANDAL M, *et al.* Potential gene editing targets for developing haploid inducer stocks in rice and wheat with high haploid induction frequency [J]. *3 Biotech*, 2024, 14(1):14.
- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] RAVI M, CHAN S W L. Haploid plants produced by centro-

- mere-mediated genome elimination [J]. *Nature*, 2010, 464 (7288):615.
- [54]蔡华,马传喜,乔玉强. 小麦×玉米诱导小麦单倍体的形态学及细胞学鉴定 [J]. 核农学报, 2008, 22(2):127
- CAI H, MA C X, QIAO Y Q, *et al.* Identification of morphology and cytology in wheat haploid through wheat × maize [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2008, 22 (2):127.
- [55]DERMAIL A, MITCHELL M, FOSTER T, *et al.* Haploid identification in maize [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15:1378421.
- [56]SMELSER A, BLANCO M, LÜBBERSTEDT T, *et al.* Weighing in on a method to discriminate maize haploid from hybrid seed [J]. *Plant Breeding*, 2015, 134(3):283.
- [57]WEI K H, XU J P, LI L X, *et al.* *In vitro* induction and generation of tetraploid plants of *Sophora tonkinensis* gapnep [J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2018, 14(54):149.
- [58]TOKUMOTO Y, KAJIURA H, TAKENO S, *et al.* Induction of tetraploid hardy rubber tree, *Eucommia ulmoides*, and phenotypic differences from diploid [J]. *Plant Biotechnology*, 2016, 33(1):51.
- [59]李淑洁, 李静雯, 张正英. 染色体消除法诱导啤酒大麦单倍体技术研究 [J]. 麦类作物学报, 2012, 32(5):853.
- LI S J, LI J W, ZHANG Z Y. Study on inducing barley (*Hordeum vulgare*) haploids using hordeum bulbosum chromosome elimination in *H. vulgare* × *H. bulbosum* crosses [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2012, 32(5):853.
- [60]YAN J J, ZHANG J B, SUN K Y, *et al.* Ploidy level and DNA content of *Erianthus arundinaceus* as determined by flow cytometry and the association with biological characteristics [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3):e0151948.
- [61]NANDA D K, CHASE S S. An embryo marker for detecting monoloids of maize (*Zea mays* L.) [J]. *Crop Science*, 1966, 6(2):213.
- [62]CHAIKAM V, NAIR S K, BABU R, *et al.* Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for *in vivo* haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2015, 128(1):159.
- [63]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.
- [64]LIU C X, LI J L, CHEN M, *et al.* Development of high-oil maize haploid inducer with a novel phenotyping strategy [J]. *The Crop Journal*, 2022, 10(2):524.
- [65]MELCHINGER A E, SCHIPPRACK W, FRIEDRICH UTZ H, *et al.* *In vivo* haploid induction in maize; Identification of haploid seeds by their oil content [J]. *Crop Science*, 2014, 54 (4):1497.
- [66]CHEN C, LIU X Q, LI S Z, *et al.* Co-expression of transcription factors ZmC1 and ZmR2 establishes an efficient and accurate haploid embryo identification system in maize [J]. *Plant Journal*, 2022, 111(5):1296.
- [67]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.
- [68]RIAZ B, CHEN H Q, WANG J, *et al.* Overexpression of maize ZmC1 and ZmR transcription factors in wheat regulates anthocyanin biosynthesis in a tissue-specific manner [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (22):5806.
- [69]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.
- [70]陈新民, 徐惠君, 周俊芳, 等. 提高小麦×玉米胚培养植株产生频率的研究 [J]. 中国农业科学, 1996, 29(4):29.
- CHEN X M, XU H J, ZHOU J F, *et al.* A study on the increasing frequencies of plant production during embryo culture in crosses between wheat and maize [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1996, 29(4):29.
- [71]HOOGHVORST I, NOGUÉS S. Chromosome doubling methods in doubled haploid and haploid inducer-mediated genome-editing systems in major crops [J]. *Plant Cell Reports*, 2021, 40(2):255.
- [72]TADESSE W, SANCHEZ-GARCIA M, *et al.* Doubled haploid production in wheat [M]//Advances in breeding techniques for cereal crops. Sawston; Burleigh Dodds Science Publishing, 2019:93.
- [73]HOEKSTRA S, VAN ZIJDERVELD M H, HEIDEKAMP F, *et al.* Microspore culture of *Hordeum vulgare* L. The influence of density and osmolality [J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 12(12):661.
- [74]CHO M S, ZAPATA F J. Plant regeneration from isolated microspore of indica rice [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1990, 31(6):881.
- [75]SEGUÍ-SIMARRO J M, NUEZ F. Pathways to doubled haploidy: Chromosome doubling during androgenesis [J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2008, 120(3-4):358.
- [76]CASTILLO A, ALLUE S, COSTAR A, *et al.* Doubled haploid production from Spanish and Central European spelt by anther culture [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2019, 21(5):1313.
- [77]FOMICHEVA M, KULAKOV Y, ALYOKHINA K, *et al.* Spontaneous and chemically induced genome doubling and polyploidization in vegetable crops [J]. *Horticulturae*, 2024, 10(6):551.
- [78]ZHANG W, WANG K, LIN Z S, *et al.* Production and identification of haploid dwarf male sterile wheat plants induced by corn inducer [J]. *Botanical Studies*, 2014, 55(1):26.
- [79]王子宁, 张艳敏, 郭北海, 等. 利用单倍体育种技术快速培育糯性小麦新品系 [J]. 华北农学报, 2001, 16(1):6.

- WANG Z N, ZHANG Y M, GUO B H, *et al.* Waxy wheat production by haploid plant production [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2001, 16(1): 6.
- [80] BUSTOS D V, HASAN A K, REYNOLDS M P, *et al.* Combining high grain number and weight through a DH-population to improve grain yield potential of wheat in high-yielding environments [J]. *Field Crops Research*, 2013, 145: 106.
- [81] 陈新民, 何中虎, 刘春来, 等. 利用小麦×玉米诱导单倍体技术育成小麦新品种中麦 533 [J]. 麦类作物学报, 2011, 31(3): 3.
- CHEN X M, HE Z H, LIU C L, *et al.* New wheat variety Zhongmai 533 developed by wheat×maize cross [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2011, 31(3): 3.
- [82] MORADI P, HAGH N A, BOZORGIPOUR R, *et al.* Development of yellow rust resistant doubled haploid lines of wheat through wheat×maize crosses [J]. *International Journal of Plant Production*, 2009, 3(3): 1735.
- [83] PATIAL M, CHAUDHARY H K, SHARMA N, *et al.* Developing genetic stock for yellow and brown rust resistance in *Triticum aestivum* L. via *Imperata cylindrica*-mediated doubled haploidy technique [J]. *Cereal Research Communications*, 2022, 50(3): 439.
- [84] WESSELS E, BOTES W C. Accelerating resistance breeding in wheat by integrating marker-assisted selection and doubled haploid technology [J]. *South African Journal of Plant and Soil*, 2014, 31(1): 35.
- [85] DONG X, XU X W, LI L, *et al.* Marker-assisted selection and evaluation of high oil *in vivo* haploid inducers in maize [J]. *Molecular Breeding*, 2014, 34(3): 1147.
- [86] KHAMMONA K, DERMAIL A, SURIHARN K, *et al.* Accelerating haploid induction rate and haploid validation through marker-assisted selection for *qhir1* and *qhir8* in maize [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1337463.
- [87] MAGO R, LAWRENCE G J, ELLIS J G. The application of DNA marker and doubled-haploid technology for stacking multiple stem rust resistance genes in wheat [J]. *Molecular Breeding*, 2011, 27(3): 329.
- [88] WILLIAMS K, SORRELLS M E. Three-dimensional seed size and shape QTL in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) populations [J]. *Crop Science*, 2014, 54(1): 98.
- [89] ZHANG K P, TIAN J C, ZHAO L, *et al.* Mapping QTLs with epistatic effects and QTL×environment interactions for plant height using a doubled haploid population in cultivated wheat [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2008, 35(2): 119.
- [90] KUMAR A, ELIAS E M, GHAVAMI F, *et al.* A major QTL for gluten strength in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) [J]. *Journal of Cereal Science*, 2013, 57(1): 21.
- [91] XU H W, ZHANG R Q, WANG M M, *et al.* Identification and characterization of QTL for spike morphological traits, plant height and heading date derived from the D genome of natural and resynthetic allohexaploid wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2022, 135(2): 389.
- [92] YUAN Q Q, DENG Z Y, PENG T, *et al.* QTL-based analysis of heterosis for number of grains per spike in wheat using DH and immortalized F₂ populations [J]. *Euphytica*, 2012, 188(3): 387.
- [93] ZHANG H, CHEN J S, LI R Y, *et al.* Conditional QTL mapping of three yield components in common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *The Crop Journal*, 2016, 4(3): 220.
- [94] ZHANG J J, SHE M Y, YANG R C, *et al.* Yield-related QTL clusters and the potential candidate genes in two wheat DH populations [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(21): 11934.
- [95] JIA G F, CHEN P D, QIN G J, *et al.* QTLs for Fusarium head blight response in a wheat DH population of Wangshuibai/Alondra's [J]. *Euphytica*, 2005, 146(3): 183.
- [96] NI F, QI J, HAO Q Q, *et al.* Wheat Ms2 encodes for an orphan protein that confers male sterility in grass species [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15121.
- [97] 刘秉华, 杨丽, 王山荭, 等. 矮败小麦群体改良的方法与技术 [J]. 作物学报, 2002, 28(1): 69.
- LIU B H, YANG L, WANG S H, *et al.* The method and technique of population improvement using dwarf male-sterile wheat [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2002, 28(1): 69.
- [98] QI X L, LIU J C, LIU Z K, *et al.* High-throughput haploid induction in species with bisexual flowers [J]. *Plant Communications*, 2023, 4(1): 100454.
- [99] LI H S, LI S X, ABDELKHALIK S, *et al.* Development of thermo-photo sensitive genic male sterile lines in wheat using doubled haploid breeding [J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 246.
- [100] GURUSHIDZE M, HENSEL G, HIEKEL S, *et al.* True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92046.
- [101] CHAUHAN H, KHURANA P. Use of doubled haploid technology for development of stable drought tolerant bread wheat (*Triticum aestivum* L.) transgenics [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(3): 408.
- [102] CHEN C Y, XIAO H, ZHANG W L, *et al.* Adapting rice anther culture to gene transformation and RNA interference [J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2006, 49(5): 414.
- [103] WIJERATHNA-YAPA A, RAMTEKEY V, RANAWAKA B, *et al.* Applications of *in vitro* tissue culture technologies in breeding and genetic improvement of wheat [J]. *Plants*, 2022, 11(17): 2273.