

玉米单倍体雌穗育性自然恢复研究

任姣姣^{1,2} 吴鹏昊^{1,2} 田小龙¹ 陈琛¹ 陈绍江^{1*}

(1. 中国农业大学 农学院/国家玉米改良中心/北京市作物遗传改良重点实验室,北京 100193;
2. 新疆农业大学 农学院,乌鲁木齐 830052)

摘要 为了对玉米单倍体雌穗育性恢复能力进行系统遗传分析,本研究以22个玉米自交系诱导产生的单倍体为材料对雌穗自然恢复能力进行观察,通过分类比较的方法分析单倍体雌穗平均结实株率、平均结实籽粒数和2个雌穗育性恢复指标自然恢复的遗传特点。结果表明,不同自交系的单倍体雌穗平均结实株率为89.54%,变异范围为73.56%~99.18%;单倍体雌穗平均结实籽粒数为15.4粒,变异范围为2.67~59.82粒。单倍体雌穗结实株率的广义遗传力为0.67,平均结实籽粒数的广义遗传力为0.86。22个自交系材料中,B73的单倍体雌穗育性恢复能力较其他试验材料强,单倍体雌穗平均结实株率为99.18%,平均结实籽粒数为59.82粒,基因型在单倍体雌穗育性自然恢复过程中起主要作用。通过对单倍体雌穗育性恢复与雄穗育性恢复性状进行相关性分析发现单倍体雌穗育性恢复与雄穗育性恢复是2个相对独立的过程。

关键词 玉米单倍体; 自交系; 自然加倍; 雌穗育性恢复; 雄穗育性恢复

中图分类号 S513 **文章编号** 1007-4333(2018)08-0001-07 **文献标志码** A

Study on the haploid female fertility (HFF) of maize inbred lines

REN Jiaojiao^{1,2}, WU Penghao^{1,2}, TIAN Xiaolong¹, CHEN Chen¹, CHEN Shaojiang^{1*}

(1. College of Agronomy and Biotechnology/National Maize Improvement Center of China/
Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, China Agricultural University, Beijing 100193;
2. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract Haploids induced from 22 inbred lines were pollinated with normal diploid pollen to investigate the genetic inheritance of haploid female fertility (HFF). The average haploid female fertility rate (HFFR) was about 89.54%, and the range was from 73.56% to 99.18%. The average kernel number (AKN) was 15.40 ranging from 2.67 to 59.82. The heritability for HFFR and AKN were 0.67 and 0.86, respectively. It is found that B73 had the best HFF 99.18% and the AKN was 59.82. It is also found that genetic background was the main factor effecting haploid male fertility. No significant correlation was found between haploid male fertility (HMF) and HFF, which reveals that the process of HMF and HFF may have separate processes.

Keywords maize haploid; inbred line; spontaneous doubling; haploid female fertility; haploid male fertility

应用玉米单倍体(doubled haploid, DH)能够显著缩短育种选系时间,加快育种进程,是现代玉米育种的关键技术之一。单倍体育种包括单倍体诱导、鉴别和加倍3个环节。目前,高频诱导系的利用及自动化鉴别技术的建立以及高效化学加倍技术的日臻完善,有力地促进了单倍体育种的广泛应用。尽管如此,为进一步提高单倍体育种的效率,降低

DH系生产成本,自然加倍方法仍然是规模化单倍体育种中重点研究的内容之一。然而,单倍体的育性自然恢复效率较低,一般在5%以下,因此,利用遗传改良方法提高单倍体自然加倍的效率对单倍体育种方法的进一步改进具有重要意义^[1]。

单倍体育性恢复通常包括雄穗的育性恢复和雌穗的育性恢复。前人研究结果表明,单倍体雌穗的

收稿日期:2017-08-25

基金项目:国家自然科学基金项目(31560392)

第一作者:任姣姣,博士研究生,E-mail:renjiaojiao789@sina.com

通讯作者:陈绍江,教授,博士生导师,主要从事玉米遗传育种研究,E-mail:chen368@126.com

育性恢复能力远远高于雄穗的育性恢复能力,雄穗育性恢复是提高单倍体育种效率的关键限制因素,因此,之前的研究更多地集中于雄穗育性恢复^[2-6]。随着近几年对单倍体自然加倍认识的逐步深入,育种家发现DH系的产生效率虽然受到雄穗育性恢复能力的显著影响,但是可育单倍体自交结实效率也与雌穗的育性恢复能力紧密相关。单倍体雌穗育性恢复能力不仅影响单倍体自交结实株率,还影响每穗自交结实籽粒数。通常情况下,利用正常的二倍体与单倍体雌穗授粉,单倍体雌穗的结实率能够达到90%甚至更高^[7-10]。Chalyk等^[7]对来自马齿类型的玉米种质后代单倍体进行研究,利用正常二倍体植株花粉对单倍体雌穗授粉,约有96%的单倍体雌穗可以正常杂交结实。在所有结实的果穗中,平均每穗的结实籽粒个数为27粒,结实最多的穗子能够达到107粒。Geiger等^[4]采取开放授粉方式对单交种后代单倍体雌穗的结实特征进行调查,分析结果显示平均每穗的结实籽粒数大约为80粒,范围在25~192粒。魏俊杰等^[8]、刘志增等^[9]和吴鹏昊等^[10]的研究结果也表明单倍体的雌穗育性自然恢复率高达90%以上。但是,由于这些研究都主要集中于对特定的几个材料进行分析,每个材料单倍体数目非常有限,遗传基础较为狭窄,所采取的授粉方式也较为粗放,缺乏对雌穗育性恢复能力及其与雄穗育性恢复相关性的系统研究。由于雌穗育性自然恢复具体遗传特征目前尚未见报道,因此,本研究拟通过对不同类型自交系的单倍体后代雌穗育性恢复能力进行分析,探讨单倍体雌穗育性恢复变异特点及雌雄穗育性恢复之间的关系,旨在为单倍体育种技术的改进提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料与田间试验设计

本试验采用的诱导系是由中国农业大学选育的农大高诱5号(CAU5),诱导率约为8%~15%^[11]。诱导单倍体的母本22个自交系见表1,这些自交系分属于不同杂种优势类群。杂交诱导试验分别于2011和2012年冬季在海南进行,诱导后的籽粒通过R1-n_j颜色标记挑选单倍体,胚乳紫色胚无色的籽粒为单倍体^[12]。将获得的单倍体按照自交系来源分别于2012和2013年夏季在北京进行种植,完全区组设计,2个重复,15行区,行长2.5m,行宽0.6m,每行20株,6~7叶期对苗期的单倍体进行田间除草。

1.2 单倍体雌穗育性恢复评价方法及性状测定方法

单倍体雌穗以杂交种郑单958的花粉进行多次重复授粉,授粉后不能结实的单株记为雌穗不育株,能够正常结实的单株记为雌穗可育株,在植株生理成熟后,每个材料随机收取10个果穗,每穗选取较整齐的一行测定行粒数和穗行数,并统计每穗结实籽粒数。雌穗育性恢复由结实株率(Haploid female fertility rate, HFFR)和平均结实籽粒数(Average kernel number, AKN)进行评价,计算公式如下:

$$\text{结实株率} = (\text{雌穗可育株} / \text{授粉株数}) \times 100\%$$

$$\text{平均结实籽粒数} = \sum \text{每穗结实籽粒数} / \text{授粉株数}$$

1.3 表型数据分析方法

对单倍体雌穗育性恢复的2个评价指标进行遗传力分析和差异性比较。由于数据本身不服从正态分布,对数据进行正态转换,对结实株率和平均结实籽粒正态转换的公式分别为: $Y_{\text{trans(HFFR)}} = \ln(\text{HFFR})$ 和 $Y_{\text{trans(AKN)}} = (1.005 - \text{AKN}) / (\text{AKN} + 0.005)$ 。方差分析的模型为:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + T_j + R(T)_{jk} + GT_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

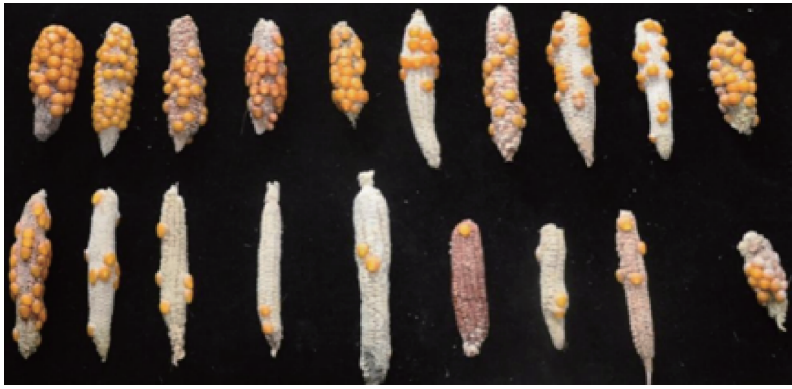
式中: μ 为均值; G_i 为基因型*i*的效应值; T_j 为年份*j*的效应值; $R(T)_{jk}$ 为第*j*年*k*重复的效应值; GT_{ij} 为基因型*i*与年份(环境)*j*的交互; ϵ_{ijk} 为随机误差。本试验的遗传力是以小区为单位计算的广义遗传力^[13]。

根据结实株率和平均结实籽粒数对22个自交系材料进行聚类分析,以比较不同基因型单倍体雌穗育性恢复能力。采用的聚类方法为K-means(k中心算法),并根据总体离差平方和的峰值确定样品所属类别。分类的结果值为0表示无关;值越大相关性越高。最后,利用吴鹏昊等^[14-15]试验中20个自交系(除了本试验中的京24和K12的所有自交系)雄穗育性恢复相关性状的结果,对单倍体雌穗育性恢复与雄穗育性恢复相关性状进行两两之间的相关性分析,采用的方法是皮尔逊相关性检验(Pearson Correlation)^[15]。方差分析、聚类分析和相关性检验都是用SAS(9.3版)软件。

2 结果与分析

2.1 单倍体雌穗育性恢复能力表现

对来源于22个自交系单倍体的雌穗育性恢复能力进行2年2重复调查发现,几乎所有的单倍体都有雌穗且能正常吐丝,单倍体雌穗平均结实株率为89.54%,变异范围为73.56%~99.18%;单倍体雌穗平均结实籽粒数为15.4粒,变异范围为2.67~59.82粒(图1;表1)。



自交系依次为第一排：豫 87-1, B73, 垦自 167, K22, EH766, C8605, 丹 598, EH759, 昌 7-2; 第二排：铁 7922, Mo17, 郑 58, 许 178, 黄 C, By815, 4F1, Gy923, K12。

The lines in the figure are: Yu87-1, B73, Kenzi167, K22, EH766, C8605, Dan598, EH759, Chang7-2; Second row: Tie7922, Mo17, Zheng58, Xu178, Huang C, By815, 4F1, Gy923, K12.

图 1 不同自交系单倍体雌穗结实性表现

Fig. 1 Haploid female fertility (HFF) performance of different lines

表 1 不同自交系单倍体雄穗及雌穗育性恢复能力(结实株率和平均结实籽粒数)

Table 1 Haploid male fertility and female fertility (including haploid fertility rate, HFFR, and average kernel number, AKN) of different lines

| 材料 Line | 雄穗育性恢复能力 HMF | 结实株率/% HFFR | 平均结实籽粒数 AKN |
|------------|-----------------|----------------|----------------|
| 4F1 | 强 | 74.36 | 2.76 |
| By815 | 弱 | 84.10 | 4.70 |
| Mo17 | 弱 | 91.60 | 7.47 |
| 龙抗 11 | 弱 | 74.57 | 2.85 |
| Gy923 | 弱 | 73.56 | 2.67 |
| 丹 598 | 弱 | 94.78 | 16.21 |
| EH759 | 强 | 95.85 | 15.77 |
| 黄 C | 弱 | 82.31 | 12.16 |
| K22 | 中 | 95.30 | 38.54 |
| 垦自 167 | 弱 | 95.75 | 29.83 |
| C8605 | 弱 | 92.83 | 17.73 |
| B73 | 弱 | 99.18 | 59.82 |
| 铁 7922 | 弱 | 99.01 | 10.16 |
| 郑 58 | 弱 | 89.82 | 4.59 |
| 昌 7-2 | 弱 | 95.01 | 13.75 |
| EH766 | 弱 | 99.57 | 24.72 |
| 京 24 | 弱 | 98.60 | 12.74 |
| K12 | 弱 | 73.86 | 14.74 |
| 豫 87-1 | 强 | 98.28 | 26.88 |
| 许 178 | 中 | 93.18 | 5.78 |
| 齐 319 | 中 | 82.03 | 2.77 |
| 1145 | 弱 | 86.30 | 12.07 |

注：雄穗育性恢复能力以任姣姣等^[16]的最终结果为准。

Note: The haploid fertility is based on final results quoted in reference^[16].

2.2 单倍体雌雄穗育性恢复的遗传参数估计

对单倍体雌穗育性恢复的2个评价指标的原始值进行正态转换之后,通过混合线性模型对其方差组分和遗传力进行统计分析。结果表明单倍体雌穗结实株率和平均结实籽粒数在材料间都具

有极显著的差异,材料与环境互作也具有极显著差异(表2),而环境间差异不显著(表3)。以小区为单位对广义遗传力进行估计,单倍体雌穗结实株率的遗传力为0.67,平均结实籽粒数的遗传力为0.86。

表2 单倍体雌穗结实株率和平均结实籽粒数遗传参数

Table 2 Genetic parameters for haploid female fertility rate (HFFR) and average kernel number (AKN) analyses were based on transformed data

| 参数 Parameter | 性状 Trait | |
|-------------------------|-------------|-------------|
| | 结实株率/% HFFR | 平均结实籽粒数 AKN |
| 均值 Mean | 89.54 | 15.40 |
| 变异范围 Range | 73.56~99.18 | 2.67~59.82 |
| σ_g^2 | 0.015 2** | 0.69** |
| $\sigma_{g \times e}^2$ | 0.005 6** | 0.16** |
| σ_e^2 | 0.001 9 | 0.12 |
| 广义遗传力 H^2 | 0.67 | 0.86 |

注: σ_g^2 为遗传型方差, $\sigma_{g \times e}^2$ 为遗传与环境互作方差, σ_e^2 为试验误差。**表示差异显著($P < 0.01$)。

Note: σ_g^2 genotype variance, $\sigma_{g \times e}^2$ genotype and environment variance, σ_e^2 experiment error. ** significant difference at 0.01 level.

表3 单倍体雌穗结实株率和平均结实籽粒数

Table 3 Mean of haploid female fertility rate (HFFR) and average kernel number (AKN)

| 年份 Year | 结实株率/% HFFR | 平均结实籽粒数 AKN |
|------------|----------------|----------------|
| 2012 | 91.96 a | 11.06 a |
| 2013 | 90.60 a | 9.94 a |

注:同一性状数值后面相同字母代表不同年份间差异不显著,不同字母代表差异显著 $P < 0.05$ 。

Note: Values within each trait followed by a common letter are not significantly different between different years at 0.05 level; followed by a different letter are significantly different at 0.05 level.

2.3 单倍体雌穗育性恢复能力聚类分析

利用单倍体雌穗结实株率和平均结实籽粒数综合对22个自交系的单倍体进行聚类分析,可将其分为三类(表4;图2)。第一类为雌穗育性恢复能力好的材料,只包括自交系B73,其单倍体雌穗结实株率为99.18%,平均结实籽粒数为59.8粒。第二类为

雌穗育性恢复能力中等的材料,包括K22、垦自167、豫87-1、EH766、C8605、丹598、EH759、昌7-2、京24、铁7922、Mo17、许178和郑58。该类群自交系单倍体的平均雌穗结实株率为95.35%,变异范围为89.82%~99.57%,平均结实籽粒数为17.24粒,变异范围为4.59~38.54粒。第三类为雌穗育性恢复能力差的材料,包括黄C、1145、K12、By815、龙抗11、齐319、4F1和Gy923。该类群自交系单倍体的平均雌穗结实株率为78.89%,变异范围为73.56%~86.30%,平均结实籽粒数为6.84粒,变异范围为2.67~12.16粒。从以上结果可以看出,单倍体的雌穗自然恢复能力与各自交系所属的杂种优势类群没有表现出显著的关联,表明自交系的雌穗自然恢复能力可能受其自身的基因控制。

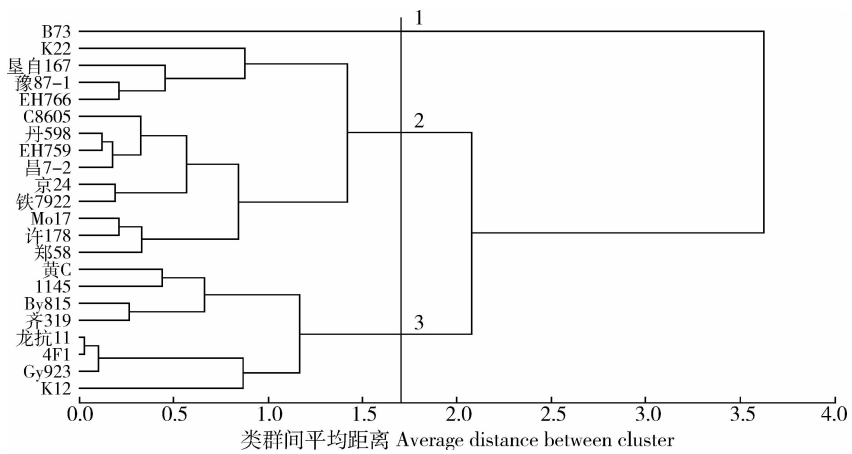
2.4 单倍体雌雄穗育性恢复的相关性分析

相关性检验结果表明单倍体雌穗相关性状雌穗结实株率与平均结实籽粒数显著正相关($P < 0.05$),相关系数为0.71,而且雌穗育性恢复的两个性状均与行粒数显著负相关。单倍体雌雄穗育性恢复性状两两之间相关性均没有达到显著水平(表5)。

表 4 各类群内自交系单倍体雌穗结实株率和平均结实籽粒数的均值和变异范围

Table 4 Mean and range for the cluster group of haploid female fertility rate (HFFR) and average kernel number (AKN) within the groups of inbred lines

| 聚类 Cluster | 自交系个数 Number of lines | 结实株率/% HFFR | | 平均结实籽粒数 AKN | |
|---------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | | 均值 Mean | 变异范围 Range | 均值 Mean | 变异范围 Range |
| 1 | 1 | 99.18 | | 59.82 | |
| 2 | 13 | 95.35 | 89.82~99.57 | 17.24 | 4.59~38.54 |
| 3 | 8 | 78.89 | 73.56~86.30 | 6.84 | 2.67~12.16 |



自交系从上往下依次为 B73, K22, 垦自 167, 豫 87-1, EH766, C8605, 丹 598, EH759, 昌 7-2, 京 24, 铁 7922, Mo17, 许 178, 郑 58, 黄 C, 1145, By815, 齐 319, 龙抗 11, 4F1, Gy923, K12

1 为第一类雌穗育性恢复能力好的材料; 2 为第二类为雌穗育性恢复能力中等的材料; 3 为第三类为雌穗育性恢复能力差的材料, 随着距离值的增加, 相关性也增加, 可以聚成一类。

The lines in the figures are: B73, K22, Kenzi167, Yu87-1, EH766, C8605, Dan598, EH759, Chang7-2, Jing24, Tie7922, Mo17, Xu178, Zheng58, Huang C, 1145, By815, Qi319, Longkang11, 4F1, Gy923 and K12.

1 stands for lines with best HFF; 2 stands for lines with middle HFF; 3 stands for lines with worst HFF. Correlation is much more significant and could be in a cluster in according with distance value.

图 2 单倍体雌穗育性恢复聚类图

Fig. 2 Cluster analysis of haploid female fertility (HFF)

表 5 单倍体雌穗育性恢复与雄穗育性恢复相关性

Table 5 Correlation analysis of haploid female fertility (HFF) and haploid male fertility (HMF)

| 性状 Trait | 结实 株率/% HFFR | 穗行数 Kernel row number | 行粒数 Kernel number per row | 露药率 Anther emergence rate | 露粉率 Pollen production rate | 露药得分 Anther emergence score | 露粉得分 Pollen production score |
|-------------|--------------------|-----------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 结实株率% HFFR | 1.00 | 0.14 | -0.65** | -0.01 | 0.09 | 0.10 | 0.15 |
| 平均结实粒数 AKN | 0.71** | 0.41 | -0.66** | -0.06 | -0.01 | -0.04 | -0.01 |

注: ** 表示差异显著 $P < 0.01$ 。

Note: ** significant difference at 0.01 level.

3 讨论

3.1 单倍体雌穗育性恢复不同授粉方式及评价指标比较

评价单倍体雌穗结实的方式通常分为3种,第一种是以正常二倍体花粉杂交获得结实果穗和籽粒^[7-9],第二种是直接以同株可育花粉授粉获得DH₀代籽粒^[17],第三种是结合了以上2种方式,以开放授粉的方式让雌穗获得尽可能多的花粉,以期望结实效率更高。为了使单倍体雌穗获得结实,这3种方法各有利弊。在单倍体育种实践中,育种家普遍采用的是第二种方法,即通过可育单倍体直接自交获得DH₀代籽粒,该籽粒可繁种后直接用于杂交。在开放授粉条件下,每穗平均结实籽粒数最多,其次为二倍体花粉杂交授粉,结实效率最差的为自交结实,平均每穗的结实籽粒数不到1个^[17]。开放授粉需要特别注意材料生育期,因为花期不育往往影响雌穗的最终结实。单倍体自交结实受雄穗育性恢复的影响,考虑到大多数单倍体雄穗育性自然恢复效果低,通过自交的方式也不能客观地反映雌穗的真实结实性。因此,本研究认为在评价单倍体雌穗结实性的试验中,应当采用二倍体花粉杂交授粉的方式。利用此评价方式时,需要提前对选用的花粉进行活力鉴定,本研究选取杂交种郑单958的花粉对不同遗传背景单倍体材料进行授粉,利用碘-碘化钾对花粉活力进行检测,其次在杂交过程中进行多次授粉确保每个材料的雌穗都能够获得充分授粉,试验结果能够客观地反映各材料的雌穗育性恢复能力。

在以往的报道中,研究人员主要从两个指标对单倍体的雌穗育性恢复能力进行评价,即每个材料雌穗结实的百分比和每穗的平均结实籽粒数^[7,18]。这两个指标可以分别从单倍体群体层面和单株层面反应雌穗的育性恢复特征。本研究以此两个指标作为标准所得到的结果表明,单倍体后代的雌穗结实率普遍较高,平均能够达到89.54%,且变异范围较小,多在73.56%~99.18%,同时,本研究所用的自交系来源较为广泛,涵盖了主要杂种优势类群,因此,可以认为单倍体较高的雌穗结实率是较为普遍的现象与以往的研究结果一致^[7]。而自交系单倍体结实率则表现出较大差异,每穗的平均结实籽粒数为15.4粒,变化范围较大,大约在2.67~59.82粒,说明单穗的结实籽粒数可以作为衡量不同自交系单

倍体雌穗自然恢复能力的主要指标。通过遗传力计算发现这2个性状都具有较高的遗传力。由于单穗的平均结实籽粒数变异较大,遗传力较高,可以较好地地区分不同遗传背景材料单倍雌穗育性恢复特性,因此建议在单倍体的雌穗育性恢复的遗传研究中,以每穗的平均结实籽粒数作为表型评价指标。并且,平均结实籽粒数与雌穗的结实株率间也具有显著的正相关关系,对平均结实籽粒进行统计,也可以从一定程度上反映材料的雌穗整体自然恢复情况。与此同时,通过相关性分析发现单倍体雌穗的这2个性状都与评价雄穗育性恢复能力的4个性状之间不存在显著相关性,说明在单倍体的育性恢复研究当中,雌雄穗的育性恢复之间是2个相互独立的过程,在遗传研究中需要区分对待。本研究还发现结实株率和平均结实粒数均与行粒数呈现出显著的负相关,此现象的普遍性尚需进一步研究。

3.2 单倍体雌穗育性恢复影响因素分析

前人研究表明,不同母本基因型单倍体雌穗育性恢复存在较大差异^[19],而且通过优化土壤条件、增加光照时间和提高温度等栽培措施可以提高单倍体自交结实^[20-21]。本研究通过对不同遗传材料两年的单倍体雌穗育性恢复能力进行方差分析,也发现不论是单倍体群体的整体结实株率,还是单株的平均结实籽粒个数都受到基因型以及环境和基因交互作用的极显著影响(表2)。一方面,对于整体结实株率来讲,虽然材料间变异幅度较小,但是结实株率也同样受到遗传背景差异的显著影响,例如自交系B73具有较高的整体结实率,表现为多次正常授粉之后几乎全部结实,而自交系4F₁的结实株率相对较低,多次正常授粉之后仍然有大约1/4的单倍体植株无法正常结实。这一结果在单株的平均结实籽粒数中表现更显著。这说明与雄穗育性恢复一样,遗传是影响单倍体雌穗育性恢复能力关键因素,不同遗传背景材料在诱导之后单倍体的雌穗结实能力的差异在整体结实和单株结实上都有所体现。另一方面,雌穗的结实能力也与其他因素紧密相关。Kleiber等^[16]曾发现温室环境下的单倍体自交结实情况要显著好于大田环境中单倍体自交结实的情况。本研究根据不同年份统计的结果,也发现相同材料在不同年份中的表现显著不同。这说明雌穗结实也一定程度上受到种植环境的影响。最后,从聚类分析的结果来看,雄穗育性恢复能力较强的材料其雌穗育性恢复能力并非一定很强,这也从另一个

方面说明了单倍体的雄穗育性恢复与雌穗育性恢复之间具有不同的恢复机制。

参考文献 References

- [1] Geiger H H, Schönleben M. Incidence of male fertility in haploid elite dent maize germplasm [J]. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 2011, 85: 22-32
- [2] Chase S S. Selection for parthenogenesis and monoploid fertility in maize[J]. *Genetics*, 1952, 37: 573-574
- [3] Chase S S. Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L)[J]. *The Botanical Review*, 1969, 35(2): 117-167
- [4] Geiger H H, Braun M D, Gordillo G A, Koch S, Jesse J, Krutzfeldt B A E. Variation for female fertility among haploid maize lines[J]. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 2006, 80: 28-29
- [5] Sugihara N, Higashigawa T, Aramoto D, Kato A. Haploid plants carrying a sodium azide-induced mutation (*fdrl*) produce fertile pollen grains due to first division restitution (FDR) in maize (*Zea mays* L)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, 126(12)6: 2931-2941
- [6] Wu P H, Ren J, Li L, Chen S. Early spontaneous diploidization of maternal maize haploids generated by in vivo haploid induction [J]. *Euphytica*, 2014, 200(1): 127-138
- [7] Chalyk S T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding[J]. *Euphytica*, 1994, 79(1): 13-18
- [8] 魏俊杰, 陈梅香. 玉米单倍体育性自然恢复的初步研究[J]. 玉米科学, 2006, 14(2): 24-26
Wei J J, Chen M X. Primary study on the natural fertility of maize haploid[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2006, 14(2): 24-26 (in Chinese)
- [9] 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
Liu Z Z, Song T M. Fertility spontaneously restoring of inflorescence and chromosome doubling by chemical treatment in maize haploid[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2000, 26(6): 947-952 (in Chinese)
- [10] 吴鹏昊, 任姣姣, 田小龙, 王乐乐, 李国梁, 刘文欣, 陈绍江. 玉米单倍体自然二倍化研究[J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(1): 1-7
Wu P H, Ren J J, Tian X L, Wang L L, Li G L, Liu W X, Chen S J. Studies on haploid spontaneous diploidization in maize[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2016, 21(1): 1-7 (in Chinese)
- [11] Xu X, Li L, Dong X, Jin W, Melchinger A E, Chen S. Gametophyte and zygotic selection leads to segregation distortion through in vivo induction of maternal haploid in maize[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64: 1083-1096
- [12] Nanda D K, Chase S S. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L)[J]. *Crop Science*, 1966, 6: 213-215
- [13] Hallauer A R, Carena M J, Miranda-Filho J B. *Quantitative Genetics in Maize Breeding*[M]. New York: Springer, 2010
- [14] 吴鹏昊. 玉米生物诱导单倍体雄穗育性恢复研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014
Wu P H. The study for haploid male fertility of in vivo induction in maize (*Zea may* L)[D]. Beijing: China Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- [15] Wu P, Ren J, Tian X, Lübberstedt T, Li W, Li G, Li X, Chen S. New insights into the genetics of haploid male fertility in maize [J]. *Crop Science*, 2017, 57(2): 637-647
- [16] 任姣姣. 玉米单倍体自然加倍遗传及育性恢复主效 QTL 定位研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2017
Ren J J. The genetic studies for spontaneous doubling and major QTL mapping for haploid fertility of in vivo induction in maize (*Zea may* L) [D]. Beijing: China Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [17] Kleiber D, Prigge V, Melchinger AE, Burkard F, San Vicente F, Palomino G, Gordillo G A. Haploid fertility in temperate and tropical maize germplasm[J]. *Crop Science*, 2012, 52(2): 623-630
- [18] Geiger H H, Braun M D, Gordillo G A, Koch S, Jesse J, Krutzfeldt B A E. Variation for female fertility among haploid maize lines[J]. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 2006, 80: 28-30
- [19] 慈佳宾, 杨巍, 崔学宇, 任雪娇, 姜龙, 孙贵星, 董莹, 杨伟光. 玉米单倍体育性的自然恢复和染色体化学加倍效果研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(5): 107-113
Ci J B, Yang W, Cui X Y, Ren X J, Jiang L, Sun G X, Dong Y, Yang W G. Natural fertility restoration and chemical chromosome doubling of maize haploid[J]. *Journal of Northwest A & F University*, 2015, 43(5): 107-113 (in Chinese)
- [20] 黎亮, 李浩川, 徐小炜, 陈绍江. 玉米孤雌生殖单倍体加倍技术研究进展[J]. 玉米科学, 2010, 18(1): 12-14, 19
Li L, Li H C, Xu X W, Chen S J. Research progress of haploid doubling technology on maize[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2010, 18(1): 12-14, 19 (in Chinese)
- [21] 段民孝, 赵久然, 刘新香, 王元东, 邢锦丰, 王志永, 李绍明, 张如养, 王乃顺, 何瑞娟. 不同种植地点对玉米单倍体自然加倍率的影响[J]. 作物杂志, 2012(2): 68-70
Duan M X, Zhao J R, Liu X X, Wang Y D, Xing J F, Wang Z Y, Li S M, Zhang R Y, Wang N S, He R J. Study on the effect of planting place in maize haploid doubling rate[J]. *Crops*, 2012(2): 68-70 (in Chinese)