

· 评述 · 饲草生物学专辑

单倍体育种技术研究进展及其在苜蓿等豆科牧草中的应用

王娜^{1†}, 姜腾^{1†}, 王彬锡^{1,2}, 牛丽芳¹, 林浩^{1*}

¹中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; ²河北师范大学, 石家庄 050024

摘要 双单倍体育种通过单倍体诱导与加倍技术相结合实现遗传材料的快速纯合, 显著加快纯系的选育进程和效率, 是农业生物育种中的共性关键技术。该文简要回顾了诱导植物单倍体产生和染色体加倍的相关方法及研究进展, 重点介绍了新近发展的基因编辑介导的体内单倍体诱导技术, 并对单倍体育种技术在紫花苜蓿(*Medicago sativa*)等豆科牧草中的应用进行了探讨和展望。

关键词 单倍体育种技术, 基因编辑技术, 豆科牧草, 苜蓿

王娜, 姜腾, 王彬锡, 牛丽芳, 林浩 (2022). 单倍体育种技术研究进展及其在苜蓿等豆科牧草中的应用. 植物学报 57, 756–763.

单倍体(haploid)是指具有配子体染色体数目的植株; 双单倍体(doubled haploids, DHs)是指单倍体经过染色体复制和粘贴形成的纯合植株(Ren et al., 2017), 这种获得纯合植株的方式称为双单倍体育种。传统杂交育种需要连续多代自交或者回交才能获得纯合性状的植株, 但双单倍体植株后代在遗传上是同质材料, 这使得育种家可以迅速筛选出目标性状(Gilles et al., 2017a)。因此, 与传统杂交育种方法相比, 单倍体育种技术能够缩短纯系选育时间, 提高育种效率(Prigge et al., 2012), 对农业生产具有重要应用价值。

发展草食畜牧业不仅是推进农业结构调整的必然需求, 也是适应消费者膳食结构升级的战略选择。近年来, 随着居民生活水平的提高, 对牛羊肉及奶制品的需求量逐渐增长。因此, 为了满足居民需求, 必须鼓励发展国内草食业。紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是一种多年生草本豆科植物, 其营养价值丰富、适应能力强且产量高, 是我国栽培面积最大的一种牧草, 享有“牧草之王”的美誉(Yang et al., 2019)。与其它主要农作物相比, 苜蓿具有自交不亲和、自交衰退及

多倍体遗传等生物学特性, 这使得解析其重要农艺性状困难, 进而导致苜蓿育种技术还停留在以杂交选育为主的“2.0时代”(金京波等, 2021)。现代分子育种技术是利用一系列现代生物学技术培育新品种的方法, 打破了常规育种周期长和选择准确性低等限制因素, 是目前最有效的育种手段, 因此亟待建立饲草现代育种新技术。本文简要总结了诱导植物产生单倍体和染色体加倍的相关方法, 详细阐述了由基因编辑介导的体内单倍体诱导技术, 同时探讨了单倍体育种技术在苜蓿等饲草中的应用。

1 诱导植物单倍体产生的相关方法及进展

1.1 自发产生单倍体

已有研究发现, 包括烟草(*Nicotiana tabacum*)、水稻(*Oryza sativa*)和玉米(*Zea mays*)在内的400多物种中都存在自发产生单倍体的现象(Kasha and Maluszynski, 2003)。在芸薹属(*Brassica*)植物中, Thompson (1974)报道了自然条件下产生的单倍体可以形成

收稿日期: 2022-08-09; 接受日期: 2022-10-09

基金项目: 国家重点研发计划(No.2022YFF1003204)、海南省崖州湾种子实验室(No.B21HJ0215)和呼和浩特市“政产学研推用银”创新联合体项目(No.RC2022-联合体-1)

† 共同第一作者

* 通讯作者。E-mail: linhao@caas.cn

纯合二倍体; 在玉米中, 不确定配子体基因(*indeterminate gametophyte1, ig1*)导致精子或卵细胞产生单倍体胚胎(Kermicle, 1969); 在栽培苜蓿群体中偶然发现了1个自发产生的苜蓿单倍体(Stanford and Clement, 1958)。虽然这些自发单倍体可以恢复形成双单倍体, 但单倍体形成频率很低, 不足以应用于农作物育种。

1.2 雌核离体组织培养

雌核发育(gynogenesis)是诱导产生单倍体的一种常见方法, 在此过程中精细胞刺激雌配子体(通常指未受精的卵细胞)在体外直接发育形成胚胎, 但由于双受精过程异常, 这些胚胎只继承了母本的染色体信息。在体外培养过程中, 材料的基因型(Alan et al., 2003; Bohanec et al., 2003)、培养基的组成和胚囊的发育阶段等均会对其造成一定程度的影响(Keller and Korzun, 1996)。因此, 可以根据物种的不同选择未受精的胚珠、子房或花芽等部位进行离体培养。此外, Saunders和Bingham (1972)发现, 将苜蓿未成熟子房作为外植体进行植物组织离体培养, 可成功获得苜蓿的再生植株。

此外, 辐照的花粉作为父本也能诱导雌核发育(Kalinowska et al., 2019)。例如, 在一些树木中可以通过辐射近缘种的花粉, 然后授予母本即可诱导孤雌生殖。然而, 在紫花苜蓿中使用辐照花粉杂交并未产生单倍体后代(Armstrong, 1959)。

1.3 雄核离体组织培养

雄核发育指雄配子体细胞通过体外培养再生为单倍体植株。在此过程中, 配子体细胞将从配子体途径转化为孢子体途径, 并在孢子体途径基础上再生为新植株。20世纪60年代首次发现离体培养曼陀罗属(*Datura*)花药可以产生单倍体胚和植株(Guha and Maheshwari, 1964)。目前, 该方法已经在玉米、烟草、辣椒(*Capsicum annuum*)、小麦(*Triticum aestivum*)和油菜(*B. napus*)等多个物种中应用并成功获得单倍体植株。但相对而言, 饲草作物相关研究进程缓慢。1972年, 研究者发现将苜蓿未成熟的小孢子进行组织培养也可获得苜蓿再生植株(Saunders and Bingham, 1972)。1984年首次报道了离体培养苜蓿花药可产生单倍体, 但花药培养获得再生植株的过程受到多

种因素影响(Zagorska and Dimitrov, 1995)。例如, 材料的基因型、小孢子发育阶段、低温预处理花药的时间、培养基成分以及不同激素种类的组合和配比。随后在冰草(*Agropyron glaucum*) (Chekurov and Razmakhnin, 1999)、黑麦(*Secale cereale*) (Ma et al., 2004)和燕麦(*Avena sativa*) (Kiviharju et al., 2005)等多种牧草中通过离体培养花药或者小孢子成功获得了再生植株, 证明此方法在牧草中具有一定的应用价值, 可为牧草育种提供技术支持。

1.4 远缘杂交诱导单倍体

远缘杂交是作物通过染色体消除获得单倍体的方法(Kasha and Kao, 1970), 但对其作用机制并不清楚。远缘杂交使植物完成双受精形成合子, 但合子细胞分裂可能会导致父本染色体选择性消失, 促使形成单倍体胚胎; 同时, 胚乳快速分裂也会导致染色体消除, 造成种子败育。因此, 远缘杂交形成的单倍体胚胎必须通过体外培养进行拯救。

自1970年发现栽培大麦(*Hordeum vulgare*)与相关品种球型大麦杂交后代能获得单倍体, 该方法很快就被育种家使用并进行了改进(Kasha and Kao, 1970)。有研究表明, 将四倍体紫花苜蓿($2n=4x=32$)作为母本与二倍体苜蓿杂交可以产生“单倍体”($2n=2x=16$)后代, 进而成为首个获得单倍体苜蓿的成功案例, 但由于单倍体产生效率低, 在苜蓿生产中并不适用(Bingham, 1971)。因此, 亟须建立苜蓿单倍体诱导系, 以解决苜蓿育种周期长及选育纯合品种难等问题。

2 基因编辑技术介导的体内单倍体诱导

体外诱导单倍体的方法限制因素多、难度大, 远远无法满足实际生产应用的需求。基因编辑技术的发展和植物体内诱导单倍体基因的挖掘和机制解析, 为解决上述问题提供了全新的方法和思路, 同时可为饲草作物单倍体育种提供很好的借鉴。目前, 植物中能够诱导产生单倍体植株的内源基因包括MTL、PLD3、POD65、DMP和CENH3。在不同物种中, 这些内源基因缺失后产生单倍体的诱导率有所不同。基因编辑技术介导的体内单倍体诱导技术在植物中的应用情况见表1。

表1 基因编辑技术介导的体内单倍体诱导相关基因

Table1 Related genes of *in vivo* haploid induction mediated by gene editing technology

目的基因	植物物种	基因编辑类型	单倍体比例(%)	参考文献
<i>AtCENH3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gene replacement and insertion	25–45	Ravi and Chan, 2010
<i>ZmCENH3</i>	<i>Zea mays</i>	Gene replacement and insertion/RNAi	0.16–3.6	Kelliher et al., 2016
<i>TaCENH3</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Gene replacement and insertion	7	Lv et al., 2020
<i>ZmCENH3</i>	<i>Z. mays</i>	Site-specified knockout	0.5–5	Wang et al., 2021
<i>ZmMTL</i>	<i>Z. mays</i>	TALENs	6.7	Kelliher et al., 2017
<i>ZmPLA1</i>	<i>Z. mays</i>	Site-specified knockout	1.55–6.67	Liu et al., 2017
<i>ZmNLD</i>	<i>Z. mays</i>	Gene replacement and insertion	0.5–3.59	Gilles et al., 2017a
<i>OsMATL</i>	<i>Oryza sativa</i>	Site-specified knockout	2–6	Yao et al., 2018
<i>TaPLA</i>	<i>T. aestivum</i>	Site-specified knockout	5.88–15.66	Liu et al., 2020a
<i>TaMTL</i>	<i>T. aestivum</i>	Site-specified knockout	11.8–31.6	Liu et al., 2020b
<i>SiMTL</i>	<i>Setaria italica</i>	Site-specified knockout	1.75–3.49	Cheng et al., 2021
<i>ZmDMP</i>	<i>Z. mays</i>	Site-specified knockout	0.1–0.3	Zhong et al., 2019
<i>AtDMP8/9</i>	<i>A. thaliana</i>	Site-specified knockout	0.92–3.23	Zhong et al., 2020
<i>MtDMP8/9</i>	<i>Medicago truncatula</i>	Site-specified knockout	0.29–0.82	Wang et al., 2022
<i>SIDMP</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Site-specified knockout	0.49–3.68	Zhong et al., 2022a
<i>BnaDMP</i>	<i>Brassica napus</i>	Site-specified knockout	2.4	Zhong et al., 2022b
<i>ZmPLD3</i>	<i>Z. mays</i>	Site-specified knockout	0.85–0.96	Li et al., 2021
<i>ZmPOD65</i>	<i>Z. mays</i>	Site-specified knockout	0.9–7.7	Jiang et al., 2022

2.1 基因编辑磷脂酶家族基因诱导植物单倍体

玉米MATL (MATRILINEAL)基因第4个外显子处插入4个碱基会使其自交后代产生单倍体, 该基因亦称NLD (NOT LIKE DAD) (Gilles et al., 2017b)或PLA1 (Phospholipase A1) (Liu et al., 2017), 其编码花粉特异性表达的磷脂酶(Kelliher et al., 2017), 在诱导产生单倍体过程中发挥关键作用(Prigge et al., 2012)。研究人员通过基因编辑手段在水稻、小麦和谷子(*Setaria italica*)中分别创制了*mtl*突变体, 并发现该突变体后代可以产生母本单倍体, 只是在不同植物中的诱导率不同(Yao et al., 2018; Wang et al., 2019; Xie et al., 2019; Liu et al., 2020a, 2020b; Cheng et al., 2021; Sun et al., 2022)。目前, MTL基因在单子叶植物中的单倍体诱导率不同, 而在双子叶植物中尚未被证实是否具有诱导单倍体的能力。此外, 中国农业大学Li等(2021)发现, 玉米磷脂酶D亚家族成员之一的玉米磷脂酶D3 (ZmPLD3)功能缺失突变也可以诱导玉米母体单倍体, 并且*zmpld3/zmmmtl*双突变体的单倍体诱导率相较于*zmpld3*单突变体提高了4倍。华中农业大学与中国科学院遗传与发育生物学研究所合作解析了磷脂酶家族基因产生单倍体的作

用机制, 发现活性氧(reactive oxygen species, ROS)在诱导单倍体过程中发挥重要作用, 并鉴定出1个可以诱导产生单倍体的新基因——精子特异性过氧化物酶编码基因(*ZmPOD65*), 进而为加速作物育种提供了一条潜在的途径(Jiang et al., 2022)。

2.2 CRISPR/Cas9编辑DMP诱导单倍体

ZmDMP在玉米中功能缺失可诱导形成单倍体, 但诱导率仅为0.1%–0.3%, 若同时突变ZmDMP和ZmPLA1可将效率提高5–6倍(图1) (Zhong et al., 2019)。研究显示, 在双子叶植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中同时敲除AtDMP8和AtDMP9也能诱导产生单倍体(Zhong et al., 2020)。中国农业科学院研究团队发现, 在蒺藜苜蓿(*M. truncatula*)中通过基因编辑技术将MtDMP8和MtDMP9同时敲除并与不同生态型亲本杂交可以获得母本来源的单倍体, 这表明DMP基因在豆科植物中具有母本单倍体诱导能力。该研究为创建紫花苜蓿和大豆(*Glycine max*)等豆科牧草单倍体育种技术体系奠定了重要基础(Wang et al., 2022)。随后发现在番茄(*Solanum lycopersicon*)、烟草和油菜等重要经济作物中, DMP基因突变后也能诱导产生单

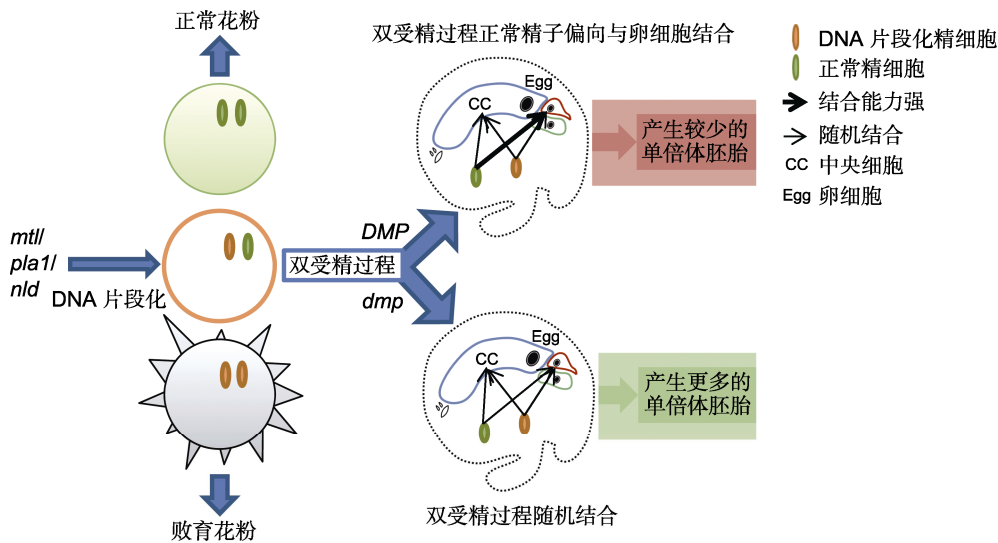


图1 MTL/PLA1/NLD和DMP基因诱导植物单倍体的分子机制

Figure 1 Molecular mechanism of MTL/PLA1/NLD and DMP genes inducing plant haploid

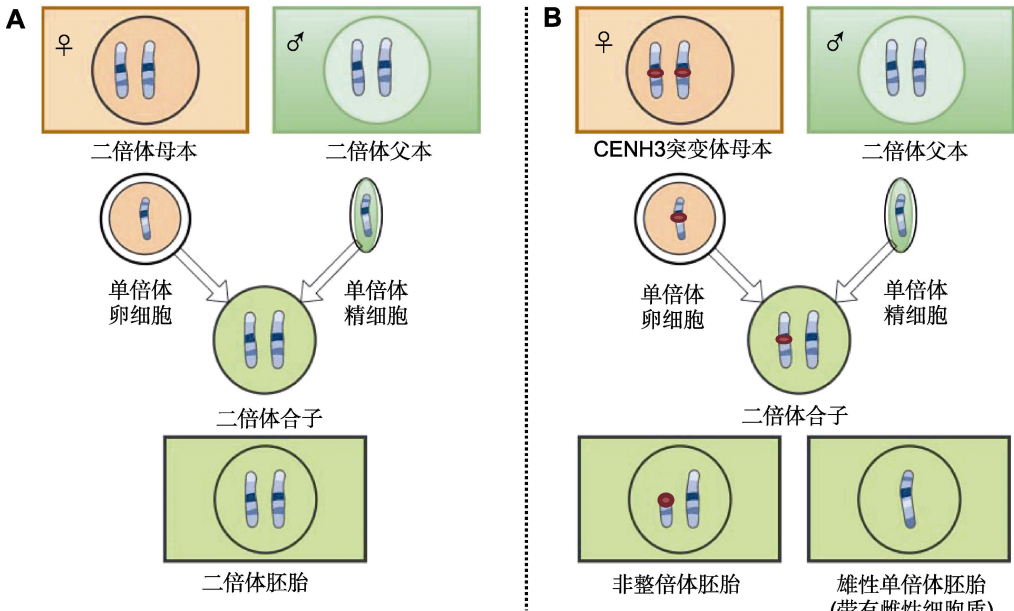


图2 基于CENH3的单倍体诱导系统中单亲染色体消除模型
(A) 正常亲本杂交; (B) CENH3突变体母本与正常父本杂交

Figure 2 Model of the uniparental chromosome elimination in the CENH3-based haploid inducer
(A) Normal parent crossing; (B) Cross between CENH3 mutant female parent and normal male parent

倍体, 只是诱导率有所差异(Zhong et al., 2022a, 2022b)。这表明以DMP-HI系统为基础的单倍体诱导体系在单、双子叶植物中具有较好的通用性。

2.3 CRISPR/Cas9编辑CENH3着丝点组蛋白

目前, 研究发现着丝点组蛋白CENH3可在多个物种

中成功实现单倍体诱导。Ravi和Chan (2010)首次证实, 对CENH3进行相关修饰可在拟南芥中诱导产生单倍体(图2)。随后研究发现, 拟南芥CENH3的N端尾部与亲缘关系较远的玉米N-tailswap交换后, 导致严重的不育表型, 即中心体缺陷(Ravi et al., 2011)。这表明改变拟南芥N端尾部的组成也可能产生单倍体诱

导系。在玉米(Kelliher et al., 2016)、番茄和水稻(Kalinowska et al., 2019)中对高度可变的N端尾部尝试进行编辑,结果在这些物种中均成功诱导出单倍体植株。尽管诱导率比较低,但也足以证明对CENH3的N端可变尾部进行编辑能创制出新的单倍体诱导系。最近研究表明,在玉米中CENH3/cenh3杂合子可诱导产生单倍体,并且突变体作为母本比作为父本时的单倍体诱导率高(Wang et al., 2021)。此外,先正达公司研究发现,在小麦中设计2个靶点,使其获得一种新的N端也可诱导小麦产生单倍体(Lv et al., 2020)。

3 植物染色体加倍方法

多倍体在植物界普遍存在,与单倍体产生原理相反,植物染色体组数量增加造成植株产生多倍体。产生多倍体植株也是变异发生的重要途径,对物种进化和育种工作具有重要意义。在实际生产应用中,单倍体植物通常无法作为纯系直接使用,因此诱导单倍体并鉴定成功以后往往需要对获得的单倍体植株进行加倍,获得纯系个体以满足制种业的生产需求(Chaikam et al., 2019)。

3.1 自然恢复

部分植物的单倍体植株可以自动恢复到正常倍性状态。例如,水稻中的自发基因组加倍效率为50%–60%(Seguí-Simarro and Nuez, 2008)。但是染色体倍性自然恢复具有随机性和不确定性,因此无法应用于实际生产中。

3.2 人工诱导

人工诱导包括物理和化学方法。物理方法可以通过断顶和摘心(除去顶芽)等机械刺激使植株的断口部位产生幼嫩的愈伤组织(潘家驹, 1994),然后幼嫩的愈伤组织通过再生产生不定芽,进而获得染色体加倍的新的植物组织,最后对获得的植物组织进行培养使其恢复正常倍性。物理方法诱导单倍体恢复倍性具有一定的随机性,实际生产中只在特定植物中起作用。化学诱导是使用最多且应用最广的多倍体获取方式,其中最为著名的化学诱导试剂是秋水仙碱,其能够抑制有丝分裂、破坏纺锤体,使染色体停滞在分裂中期,最终造成染色体数目加倍(Kleiber et al.,

2012),因此在单倍体倍性恢复和多倍体植株诱导中大放异彩。然而,用秋水仙碱诱导多倍体存在诱导效率低、对植物有毒害作用以及容易出现嵌合体等缺点。

4 单倍体育种技术在紫花苜蓿等饲草作物中的应用

紫花苜蓿是世界著名的优良牧草,也是我国种植面积最大的豆科饲草作物,但由于其具有异花授粉、遗传背景复杂以及自交衰退等生物学特性,严重限制了紫花苜蓿的遗传改良和育种应用(Chen et al., 2020)。随着基因组测序技术的快速发展,已有研究团队对苜蓿品种的基因组信息进行组装,如新疆大叶(Chen et al., 2020)、中苜1号(Shen et al., 2020)和中苜4号(Long et al., 2022)。因此,高质量紫花苜蓿基因组信息的破译对于苜蓿基因功能研究具有一定的指导作用。单倍体育种只需通过单倍体生产和加倍2个世代即可实现纯系创制,这显著加快了纯系的选育进程并提高了育种效率,是农业生物育种中培育优良品种的加速器。目前,在紫花苜蓿中,主要通过体外培养花药、小孢子和胚囊等组织获得单倍体,或者通过远缘杂交方式产生单倍体,但单倍体诱导效率较低,应用于农作物生产还远远不够(Croser et al., 2006)。此外,豆科植物体内单倍体诱导的研究进展也相对缓慢,限制了单倍体育种技术在苜蓿等豆科牧草育种中的应用。最近,中国农业科学院研究团队借助基因编辑技术在豆科植物蒺藜苜蓿中创制了体内单倍体诱导体系(Wang et al., 2022),为解析豆科植物单倍体诱导机制以及创建紫花苜蓿等豆科牧草和作物单倍体育种技术体系提供了新思路。

5 展望

我国饲草育种相对于其它粮食和经济作物起步较晚。截至目前,全国审定的草品种约636个,但实际生产应用的优质牧草资源为数不多。紫花苜蓿作为主要的豆科牧草,具有营养价值丰富、品质优良、适应性强和生物固氮作用等特点,被誉为“牧草之王”,可作为牲畜的主要饲料蛋白来源(Radović et al., 2009; Wang et al., 2016)。挖掘优异苜蓿种质资源、培育优

良的苜蓿品种是提高优质饲草作物产量, 促进奶业等草食畜健康发展的关键。传统育种包括选择育种和杂交育种等方式。选择育种是通过人工或天然的方式从个体表现型中挑选出优良品质的植株, 是选育优质新品种的首要手段和基本方法; 杂交育种是利用染色体重组原理培育新品种的重要方式, 并且杂交品种的性状明显优于双亲(Gao, 2021)。传统育种存在育种周期长等缺点, 并且紫花苜蓿具有自交不亲和及多倍体遗传等特点, 导致苜蓿育种技术仍停留在以杂交选育为主的“2.0 时代”(金京波等, 2021)。因此, 传统育种方式已无法满足牧草良种选育需要。现代分子育种技术发展迅速, 将传统育种与现代分子育种相结合, 可加快培育高产优质苜蓿新品种, 对于提高苜蓿育种水平和改善育成品种质量具有关键作用。因此亟待建立高效、精准且智能化的现代生物育种技术体系。

单倍体育种技术在两代内就可以获得遗传背景纯合的材料, 缩短了优质品种的培育时间, 是实现作物育种优化的宝贵“捷径”, 具有重要应用价值。建议今后继续挖掘紫花苜蓿单倍体诱导新基因, 研发基因编辑介导的高效紫花苜蓿单倍体诱导技术, 开发适用于其染色体加倍方法, 建立高效的紫花苜蓿单倍体育种技术体系, 为加快紫花苜蓿等豆科牧草的遗传改良进程提供有力支撑。

参考文献

- 金京波, 王台, 程佑发, 王雷, 张景昱, 景海春, 种康 (2021). 我国牧草育种现状与展望. 中国科学院院刊 **36**, 660–665.
- 潘家驹 (1994). 作物育种学总论. 北京: 农业出版社. pp. 141–142.
- Alan AR, Mutschler MA, Brants A, Cobb E, Earle ED (2003). Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn. *Plant Sci* **165**, 1201–1211.
- Armstrong JM (1959). Pollen irradiation as a method of inducing variation in alfalfa. *Can J Genet Cytol* **1**, 110–117.
- Bingham T (1971). Isolation of haploids of tetraploid alfalfa. *Crop Sci* **11**, 433–435.
- Bohanec B, Jakse M, Havey MJ (2003). Genetic analyses of gynogenetic haploid production in onion. *J Am Soc Hortic Sci* **128**, 571–574.
- Chaikam V, Molenaar W, Melchinger AE, Boddupalli PM (2019). Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. *Theor Appl Genet* **132**, 3227–3243.
- Chekurov VM, Razmakhnin EP (1999). Effect of inbreeding and growth regulators on the *in vitro* androgenesis of wheatgrass, *Agropyron glaucum*. *Plant Breed* **118**, 571–573.
- Chen HT, Zeng Y, Yang YZ, Huang LL, Tang BL, Zhang H, Hao F, Liu W, Li YH, Liu YB, Zhang XS, Zhang R, Zhang YS, Li YX, Wang K, He H, Wang ZK, Fan GY, Yang H, Bao AK, Shang ZH, Chen JH, Wang W, Qiu Q (2020). Allele-aware chromosome-level genome assembly and efficient transgene-free genome editing for the autotetraploid cultivated alfalfa. *Nat Commun* **11**, 2494.
- Cheng ZX, Sun Y, Yang SH, Zhi H, Yin T, Ma XJ, Zhang HS, Diao XM, Guo Y, Li XH, Wu CY, Sui Y (2021). Establishing *in planta* haploid inducer line by edited *SiMTL* in foxtail millet (*Setaria italica*). *Plant Biotechnol J* **19**, 1089–1091.
- Croser JS, Lültsdorf MM, Davies PA, Clarke HJ, Bayliss KL, Mallikarjuna N, Siddique KHM (2006). Toward doubled haploid production in the Fabaceae: progress, constraints, and opportunities. *Crit Rev Plant Sci* **25**, 139–157.
- Gao CX (2021). Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell* **184**, 1621–1635.
- Gilles LM, Khaled A, Laffaire JB, Chaignon S, Gendrot G, Laplaige J, Bergès H, Beydon G, Bayle V, Barret P, Comadran J, Martinant JP, Rogowsky PM, Widiez T (2017a). Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize. *EMBO J* **36**, 707–717.
- Gilles LM, Martinant JP, Rogowsky PM, Widiez T (2017b). Haploid induction in plants. *Curr Biol* **27**, 1095–1097.
- Guha S, Maheshwari SC (1964). *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* **204**, 497.
- Jiang CL, Sun J, Li R, Yan SJ, Chen W, Guo L, Qin GC, Wang PC, Luo C, Huang WJ, Zhang QH, Fernie AR, Jackson D, Li X, Yan JB (2022). A reactive oxygen species burst causes haploid induction in maize. *Mol Plant* **15**, 943–955.
- Kalinowska K, Chamas S, Unkel K, Demidov D, Lermontova I, Dresselhaus T, Kumlehn J, Dunemann F, Houben A (2019). State-of-the-art and novel developments of *in vivo* haploid technologies. *Theor Appl Genet* **132**, 593–605.
- Kasha KJ, Kao KN (1970). High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature* **225**, 874–876.
- Kasha KJ, Maluszynski M (2003). Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I, eds. Doubled Hap-

- loid Production in Crop Plants. A Manual. Dordrecht: Springer. pp. 1–4.
- Keller ERJ, Korzun L (1996). Ovary and ovule culture for haploid production. In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE, eds. *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Dordrecht: Springer. pp. 217–236.
- Kelliher T, Starr D, Richbourg L, Chintamanani S, Delzer B, Nuccio ML, Green J, Chen ZY, McCuiston J, Wang WL, Liebler T, Bullock P, Martin B (2017). MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction. *Nature* **542**, 105–109.
- Kelliher T, Starr D, Wang WL, McCuiston J, Zhong H, Nuccio ML, Martin B (2016). Maternal haploids are preferentially induced by *CENH3-tailswap* transgenic complementation in maize. *Front Plant Sci* **7**, 414.
- Kermicle JL (1969). Androgenesis conditioned by a mutation in maize. *Science* **166**, 1422–1424.
- Kiviharju E, Moisander S, Laurila J (2005). Improved green plant regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some DH lines. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **81**, 1–9.
- Kleiber D, Prigge V, Melchinger AE, Burkard F, San Vicente F, Palomino G, Gordillo GA (2012). Haploid fertility in temperate and tropical maize germplasm. *Crop Sci* **52**, 623–630.
- Li Y, Lin Z, Yue Y, Zhao HM, Fei XH, E LZ, Liu CX, Chen SJ, Lai JS, Song WB (2021). Loss-of-function alleles of *ZmPLD3* cause haploid induction in maize. *Nat Plants* **7**, 1579–1588.
- Liu CX, Li X, Meng DX, Zhong Y, Chen C, Dong X, Xu XW, Chen BJ, Li W, Li L, Tian XL, Zhao HM, Song WB, Luo HS, Zhang QH, Lai JS, Jin WW, Yan JB, Chen SJ (2017). A 4 bp insertion at *ZmPLA1* encoding a putative phospholipase A generates haploid induction in maize. *Mol Plant* **10**, 520–522.
- Liu CX, Zhong Y, Qi XL, Chen M, Liu ZK, Chen C, Tian XL, Li JL, Jiao YY, Wang D, Wang YW, Li MR, Xin MM, Liu WX, Jin WW, Chen SJ (2020a). Extension of the *in vivo* haploid induction system from diploid maize to hexaploid wheat. *Plant Biotechnol J* **18**, 316–318.
- Liu HY, Wang K, Jia ZM, Gong Q, Lin ZS, Du LP, Pei XW, Ye XG (2020b). Efficient induction of haploid plants in wheat by editing of *TaMTL* using an optimized *Agrobacterium*-mediated CRISPR system. *J Exp Bot* **71**, 1337–1349.
- Long RC, Zhang F, Zhang ZW, Li MN, Chen L, Wang X, Liu WW, Zhang TJ, Yu LX, He F, Jiang XQ, Yang XJ, Yang CF, Wang Z, Kang JM, Yang QC (2022). Genome assembly of alfalfa cultivar Zhongmu-4 and identification of SNPs associated with agronomic traits. *Genom Proteom Bioinf* **20**, 14–28.
- Lv J, Yu K, Wei J, Gui HP, Liu CX, Liang DW, Wang YL, Zhou HJ, Carlin R, Rich R, Lu TC, Que QD, Wang WC, Zhang XP, Kelliher T (2020). Generation of paternal haploids in wheat by genome editing of the centromeric histone *CENH3*. *Nat Biotechnol* **38**, 1397–1401.
- Ma R, Guo YD, Pulli S (2004). Comparison of anther and microspore culture in the embryogenesis and regeneration of rye (*Secale cereale*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* **76**, 147–157.
- Prigge V, Xu XW, Li L, Babu R, Chen SJ, Atlin GN, Melchinger AE (2012). New insights into the genetics of *in vivo* induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. *Genetics* **190**, 781–793.
- Radović J, Sokolović D, Marković J (2009). Alfalfa—most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnol Anim Husb* **25**, 465–475.
- Ravi M, Chan SWL (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* **464**, 615–618.
- Ravi M, Shibata F, Ramahi JS, Nagaki K, Chen CB, Murata M, Chan SWL (2011). Meiosis-specific loading of the centromere-specific histone CENH3 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **7**, e1002121.
- Ren JJ, Wu PH, Trampe B, Tian XL, Lübberstedt T, Chen SJ (2017). Novel technologies in doubled haploid line development. *Plant Biotechnol J* **15**, 1361–1370.
- Saunders JW, Bingham ET (1972). Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Sci* **12**, 804–808.
- Seguí-Simarro JM, Nuez F (2008). Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. *Cytogenet Genome Res* **120**, 358–369.
- Shen C, Du HL, Chen Z, Lu HW, Zhu FG, Chen H, Meng XZ, Liu QW, Liu P, Zheng LH, Li XX, Dong JL, Liang CZ, Wang T (2020). The chromosome-level genome sequence of the autotetraploid alfalfa and resequencing of core germplasms provide genomic resources for alfalfa research. *Mol Plant* **13**, 1250–1261.
- Stanford EH, Clement WM (1958). Cytology and crossing behavior of a haploid alfalfa plant. *Agron J* **50**, 589–592.
- Sun GL, Geng SF, Zhang HJ, Jia ML, Wang ZY, Deng ZY, Tao S, Liao RY, Wang F, Kong XC, Fu MX, Liu SS, Li AL, Mao L (2022). *Matrilineal* empowers wheat pollen with haploid induction potency by triggering post mitosis reactive oxygen species activity. *New Phytol* **233**, 2405–2414.
- Thompson KF (1974). Homozygous diploid lines from naturally occurring haploids. In: Proc 4th Int Rapskongr. 4th International Rapeseed Congress. Giessen: pp. 119–

124.

Wang C, Liu Q, Shen Y, Hua YF, Wang JJ, Lin JR, Wu MG, Sun TT, Cheng ZK, Mercier R, Wang KJ (2019).

Clonal seeds from hybrid rice by simultaneous genome engineering of meiosis and fertilization genes. *Nat Biotechnol* **37**, 283–286.

Wang D, Khurshid M, Sun ZM, Tang YX, Zhou ML, Wu YM (2016). Genetic engineering of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Protein Pept Lett* **23**, 495–502.

Wang N, Gent JI, Dawe RK (2021). Haploid induction by a maize *cenH3* null mutant. *Sci Adv* **7**, eabe2299.

Wang N, Xia XZ, Jiang T, Li LL, Zhang PC, Niu LF, Cheng HM, Wang KJ, Lin H (2022). *In planta* haploid induction by genome editing of *DMP* in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnol J* **20**, 22–24.

Xie E, Li YF, Tang D, Lv YL, Shen Y, Cheng ZK (2019). A strategy for generating rice apomixis by gene editing. *J Integr Plant Biol* **61**, 911–916.

Yang S, Zu YQ, Li B, Bi YF, Jia L, He YM, Li Y (2019). Response and intraspecific differences in nitrogen metabolism of alfalfa (*Medicago sativa* L.) under cadmium stress. *Chemosphere* **220**, 69–76.

Yao L, Zhang Y, Liu CX, Liu YB, Wang YL, Liang DW, Liu JT, Sahoo G, Kelliher T (2018). *OsMATL* mutation induces haploid seed formation in *indica* rice. *Nat Plants*

4, 530–533.

Zagorska N, Dimitrov B (1995). Induced androgenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Cell Rep* **14**, 249–252.

Zhong Y, Chen BJ, Li MR, Wang D, Jiao YY, Qi XL, Wang M, Liu ZK, Chen C, Wang YW, Chen M, Li JL, Xiao ZJ, Cheng DH, Liu WX, Boutilier K, Liu CX, Chen SJ (2020). A *DMP*-triggered *in vivo* maternal haploid induction system in the dicotyledonous *Arabidopsis*. *Nat Plants* **6**, 466–472.

Zhong Y, Chen BJ, Wang D, Zhu XJ, Li MR, Zhang JZ, Chen M, Wang M, Riksen T, Liu JC, Qi XL, Wang YW, Cheng DH, Liu ZK, Li JL, Chen C, Jiao YY, Liu WX, Huang SW, Liu CX, Boutilier K, Chen SJ (2022a). *In vivo* maternal haploid induction in tomato. *Plant Biotechnol J* **20**, 250–252.

Zhong Y, Liu CX, Qi XL, Jiao YY, Wang D, Wang YW, Liu ZK, Chen C, Chen BJ, Tian XL, Li JL, Chen M, Dong X, Xu XW, Li L, Li W, Liu WX, Jin WW, Lai JS, Chen SJ (2019). Mutation of *ZmDMP* enhances haploid induction in maize. *Nat Plants* **5**, 575–580.

Zhong Y, Wang YW, Chen BJ, Liu JC, Wang D, Li MR, Qi XL, Liu CX, Boutilier K, Chen SJ (2022b). Establishment of a *dmp* based maternal haploid induction system for polyploid *Brassica napus* and *Nicotiana tabacum*. *J Integr Plant Biol* **64**, 1281–1294.

Advances in Haploid Breeding Technology and Its Application in Alfalfa and Other Legume Forages

Na Wang^{1†}, Teng Jiang^{1†}, Binxi Wang^{1,2}, Lifang Niu¹, Hao Lin^{1*}

¹Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ²Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China

Abstract Doubled haploid breeding can achieve rapid homogenization of genetic material through the combination of haploid induction and doubling technology, which significantly accelerates the speed of pure line production and the selection process in hybrid breeding, is a common key technology in agricultural breeding. In this paper, we briefly review the methods and progress of plant haploid induction and chromosome doubling, introduce the latest gene editing-mediated *in vivo* haploid induction technology, and discuss and prospect the application of haploid breeding technology in *Medicago sativa* and other legumes forage.

Key words haploid breeding technology, genome editing technology, legume forage, alfalfa

Wang N, Jiang T, Wang BX, Niu LF, Lin H (2022). Advances in haploid breeding technology and its application in alfalfa and other legume forages. *Chin Bull Bot* **57**, 756–763.

† These authors contributed equally to this paper

* Author for correspondence. E-mail: linhao@caas.cn