

Liu X., Yu Y., Huang S., Xu C., Wang X., Gao J., Meng Q., Wang P., 2022. The impact of drought and heat stress at flowering on maize kernel filling: Insights from the field and laboratory. *Agricultural and Forest Meteorology*, 312: 108733. doi: 10.1016/j.agrformet.2021.108733.

Shi L.J., Wen Z.R., Zhang S.B., Wang J., Lu W.P., Lu D.L., 2018. Effects of water deficit at flowering stage on yield and quality of fresh waxy maize. *Acta Agronomica Sinica*, 44 (8): 1205-1211. doi: 10.3724/SPJ.1006.2018.01205.

Wang L., Yan Y., Lu W., Lu D., 2021a. Application of exogenous phytohormones at silking stage improve grain quality under post-silking drought stress in waxy maize. *Plants*, 10 (1): 48. doi: 10.3390/plants10010048.

Wang J., Mao Y., Huang T., Lu W., Lu D., 2021b. Water and heat stresses during grain formation affect the physicochemical properties of waxy maize starch. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101 (4): 1331-1339. doi: 10.1002/jsfa.10743.

Drought Tolerance Assessment of 100 Vietnamese maize landraces at the tasseling stage under controlled greenhouse conditions

Doan Thi Bich Thao, Pham Thi Ngoc Yen, Bui Van Hieu, Bui Van Manh, Bui Manh Minh, Ta Thi Thuy Dung, Hoang Thi Kim Thoa, Vuong Huy Minh

Abstract

Drought is a major abiotic stress that severely limits maize growth and productivity. In this study, the drought tolerance of 100 promising local maize landraces selected from a previously characterized collection of 400 accessions was evaluated. Pot experiments were conducted under greenhouse conditions at the Maize Research Institute (Hanoi) during the Spring 2025 season, with two treatments: well-watered and drought stress applied from the 9-leaf stage to the end of the tasseling-silking stage. Agronomic traits assessed included growth duration, plant height, ear height, leaf stay-green rating, grain yield, and the drought resistance index (DRI). The results showed that prolonged drought delayed tasseling, anthesis, silking, and physiological maturity by 1.2, 1.3, 3.2, and 1.6 days, respectively, compared with the well-watered control. Drought stress also reduced average plant height by 13.7 cm, ear height by 8.4 cm, and grain yield by 23.5%. Nevertheless, several accessions demonstrated superior adaptability with DRI > 1, notably T83 (H'Mong red flint), T135 (Na Leng red-brown flint), T243 (Dan Hoa red flint), T267 (Krông Pắc yellow flint), and T295 (Krông Ana yellow flint). These findings suggest that drought-tolerant landraces can be valuable genetic resources for breeding maize varieties with enhanced resilience to climate change.

Keywords: Local maize landraces, drought, drought resistance index (DRI), growth, yield

Ngày nhận bài: 17/9/2025

Người phản biện: TS. Lương Văn Vàng

Ngày phản biện: 24/11/2025

Ngày duyệt đăng: 22/12/2025

THÀNH TỰU CÔNG NGHỆ DÒNG KÍCH TẠO ĐƠN BỘI TRÊN NGÔ TẠI VIỆT NAM VÀ TRÊN THẾ GIỚI

Hà Văn Giới^{1*}, Nguyễn Xuân Thắng¹, Lương Thái Hà¹, Nguyễn Đức Thành¹, Nguyễn Thị Như Quỳnh¹

TÓM TẮT

Công nghệ đơn bội kép (Doubled haploid, DH) được sử dụng rộng rãi và phổ biến trong chọn giống ngô. Bằng cách tận dụng khả năng tạo ra dòng thuần chủng 100% chỉ trong hai chu kỳ chọn tạo ngắn và khả năng cố định kiểu gen mong muốn trên một bộ nhiễm sắc thể mà không phụ thuộc vào sự biểu hiện trội hay lặn của gen, kỹ thuật DH hỗ trợ hiệu quả cho nhiều phương pháp chọn giống mới như chỉnh sửa gen (genome editing), chuyển gen bất dục đực tế bào chất. Với những hiểu biết mới nhất về cấu trúc di truyền của các gen kích thích tạo đơn bội và các QTL liên quan, sự kết hợp của nhiều chỉ thị kiểu hình với chỉ thị R1-nj để xác định chính xác các cá thể giả định là đơn bội, các phương pháp mới, cải tiến hơn để nhân đôi nhiễm sắc thể an toàn hơn, tiết kiệm chi phí và cải thiện tỉ lệ kích thích tạo đơn bội (HIR), công nghệ DH ngày càng tiềm năng trong chọn tạo giống ngô. Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu sâu rộng và sự hợp tác của các nhà khoa học toàn cầu, công nghệ DH vẫn đối mặt với nhiều thách thức. Bài viết này tổng quan các nghiên cứu mới nhất về công nghệ kích thích tạo đơn bội trên ngô trên các tạp chí, sách và báo cáo hội nghị trong và ngoài nước về công nghệ DH, bao gồm tầm quan trọng của việc cải tiến các bước nghiên cứu, tiềm năng ứng dụng trong tương lai và những thách thức hiện nay trên thế giới và Việt Nam.

Từ khóa: DH, đơn bội kép, dòng kích thích tạo đơn bội

I. GIỚI THIỆU

Các dòng cảm ứng đơn bội (Haploid Inducer - HI) được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu không chỉ ở

môi trường học thuật mà còn được ứng dụng trong lai tạo giống thương mại tại các công ty giống lớn (Bernardo, 2014). Công nghệ kích thích tạo đơn bội được coi là một trong

¹ Viện Nghiên cứu Ngô

*Tác giả liên hệ, email: havangioi@gmail.com

những phương pháp nhanh nhất để tạo ra các dòng thuần từ giống lai hoặc quần thể; chỉ cần hai thế hệ là có thể tạo ra dòng thuần so với sáu thế hệ trong phương pháp tạo dòng truyền thống, các dòng thuần này được nhân đôi bộ nhiễm sắc thể từ hạt đơn bội - phần lớn là 100% đồng hợp tử (Butruille *et al.*, 2015). Với sự hợp tác của các nhà khoa học trên toàn thế giới, các thế hệ mới của dòng cảm ứng đơn bội hiện đã có thể được sử dụng rộng rãi tại các quốc gia nhiệt đới hoặc trên nền vật liệu di truyền nhiệt đới.

Gần đây, việc phân tích di truyền và áp dụng công nghệ để tạo ra các dòng cảm ứng đơn bội tốt hơn về tỷ lệ cảm ứng, cũng như các chỉ thị hình thái học cho việc nhận diện hạt đơn bội nhanh chóng và chính xác, đã khiến công nghệ đơn bội kép (Doubled Haploid - DH) trở thành một công cụ hiệu quả cao trong lai tạo giống. Bài tổng quan này sẽ cung cấp một cái nhìn cập nhật về cấu trúc di truyền và ứng dụng của HI trong lai tạo ngô.

II. CẢM ỨNG ĐƠN BỘI

2.1. Cảm ứng đơn bội *in vivo* theo dòng bố

Alen *Ig* - “giao tử bất định” (indeterminate gametophyte) - được xác định là yếu tố chính gây ra đơn bội theo dòng bố ở ngô (Management, 1992). Tỷ lệ cảm ứng đơn bội (HIR) trung bình theo dòng bố là 1,6% (Kermicle, 1994). Mặc dù đơn bội theo dòng bố không được sử dụng rộng rãi nhưng dòng WS14 - có nguồn gốc từ tổ hợp W23 × Stock 6 và mang alen *ig* - cùng các thế hệ dòng cảm ứng đơn bội sau này như RWS, RWK và BHI (cũng bắt nguồn từ WS14) lại được dùng phổ biến cho cảm ứng đơn bội theo dòng mẹ (Lashermes *et al.*, 1988).

Gần đây, các nhà khoa học đã phát triển dòng cảm ứng đơn bội mang đột biến ở vị trí Histone H3 (CENH3). Dòng cảm ứng đơn bội dị hợp tử (+/cenh3) có thể được sử dụng như dòng cảm ứng theo cả hướng cha và mẹ, tuy nhiên, +/cenh3 thích hợp hơn khi dùng cho cảm ứng đơn bội theo dòng bố, với tỷ lệ cảm ứng trung bình đạt 5%, so với chỉ 0,5% ở chiều ngược lại (Wang *et al.*, 2021). Một tỷ lệ cảm ứng tương tự cũng được ghi nhận khi sử dụng đột biến CENH3/CENPA cho cả hai hướng ở *Arabidopsis*, khẳng định rằng +/cenh3 nên được ưu tiên cho cảm ứng đơn bội theo dòng bố (Wang *et al.*, 2023).

2.2. Cảm ứng đơn bội *in vivo* theo dòng mẹ

Hiện tượng đơn bội trong ngô lần đầu tiên được đề cập năm 1932 bởi Randolph, khi ông phát hiện hạt ngô đơn bội xuất hiện với tỷ lệ rất thấp (Randolph, 1932). Báo cáo đầu tiên về tỷ lệ hạt đơn bội do Chase công bố, xác định rằng hạt đơn bội có thể xuất hiện tự phát ở ngô với tỷ lệ trung bình 0,11% (Chase, 1949). Cột mốc quan trọng nhất của dòng cảm ứng đơn bội được ghi nhận năm 1959 với công bố “A line with high haploid frequency” - đó chính là dòng Stock 6, được sử dụng làm nguồn gen cảm

ứng đơn bội ban đầu cho hầu hết các thế hệ dòng cảm ứng sau này (Coe, 1959). Dòng cảm ứng đơn bội thực sự trở thành công cụ hữu ích trong chọn giống khi Stock 6 mang gen *R1-nj* từ nguồn gen, còn gọi là “chỉ thị phôi tím” (Purple embryo marker) (Chase & Nanda, 1965).

Trong thập niên 1970 - 1980, các nghiên cứu về dòng cảm ứng đơn bội chủ yếu được tiến hành tại Nga với một số dòng như KMS và ZMS; tuy nhiên, hầu hết vẫn có tỷ lệ cảm ứng thấp hơn Stock 6 (Tyrnov & Zavalishina, 1984). Các nhà khoa học Pháp đã thành công trong việc phát triển dòng WS14, có HIR đạt 2 - 5%, cao hơn mức 2,3% của Stock 6; WS14 được tạo ra từ tổ hợp W23 × Stock 6, trong đó W23 mang alen *ig* cho cảm ứng đơn bội theo dòng cha (Lashermes *et al.*, 1988).

Từ năm 1988, các dòng cảm ứng đơn bội kép đã phát triển theo ba hướng chính: (1) tăng tỷ lệ cảm ứng đơn bội, (2) tìm kiếm các chỉ thị mới để nhận diện dễ dàng hơn, (3) mở rộng ứng dụng dòng đơn bội kép trên tất cả nền vật liệu di truyền đa dạng của cây mẹ. Trong giai đoạn 1988 - 2020, các nhà chọn giống chủ yếu tập trung nâng HIR từ mức 5% lên đến 15%. Một số dòng cảm ứng hiện tại có thể đạt HIR đến 15% gồm BHI201, BHI306, và CSs. Quy trình lai tạo để chọn lọc HIR được hỗ trợ bởi chọn giống có trợ giúp chỉ thị (MAS) cho các vị trí *qhir1* và *qhir8* (Chen *et al.*, 2020; Chaikam *et al.*, 2018).

Một cải tiến quan trọng khác trong các dòng cảm ứng đơn bội là việc bổ sung các chỉ thị hình thái giúp nhận diện hạt đơn bội dễ dàng và chính xác hơn. Tất cả các dòng HI đều mang *R1-nj* từ năm 1984, trong khi những dòng đầu tiên sử dụng chỉ thị “Korichnevsky marker saratovsky” được báo cáo bởi Tyrnov và Zavalishina (1984). Chỉ thị rễ đỏ *Pl1* hỗ trợ nhận diện cây con đơn bội ở giai đoạn nảy mầm lần đầu tiên được sử dụng cùng với chỉ thị *R1-nj* (Chalyk, 1999). Rotarenco (2010) đã bổ sung thêm các chỉ thị *B1* (Booster1) và *Pl1* (Purple1), thể hiện màu tím ở bẹ lá, rễ đỏ kết hợp với *R1-nj*. Chỉ thị *B1* cũng có mặt trong dòng UH600, còn *Pl1* được dùng trong dòng BHI306 (Melchinger *et al.*, 2013).

Chỉ thị hàm lượng dầu cao (OC) để nhận diện hạt đơn bội lần đầu tiên được áp dụng năm 2009 cùng với *R1-nj* trong dòng CAUHOI của Đại học Nông nghiệp Trung Quốc (Li *et al.*, 2009). Với sự hỗ trợ của cộng hưởng từ minispec (NMR), các dòng UH601 (hàm lượng dầu 11,7%, HIR = 6,6%) và UH600 (hàm lượng dầu 10,8%, HIR = 10,2%) của Đại học Hohenheim đã có thể được sử dụng cho chọn lọc đơn bội tự động bằng máy Brucker mq20 (Melchinger *et al.*, 2013; Mirdita *et al.*, 2014).

Các nhà khoa học toàn cầu cũng nỗ lực mở rộng ứng dụng của dòng cảm ứng đơn bội trên nhiều dạng vật liệu di truyền của cây mẹ. Năm 2012, CIMMYT đã giới thiệu

dòng cảm ứng đơn bội thích nghi nhiệt đới (TAILs) phối hợp với Đại học Hohenheim, có khả năng cảm ứng hạt đơn bội ở nguồn gen nhiệt đới tới 10% và thích nghi tốt với khí hậu nhiệt đới (Prasanna *et al.*, 2012). Thế hệ thứ hai của TAILs, gọi là CIM2GTAILs, có tỷ lệ cảm ứng đạt tới 13,1% (Chaikam *et al.*, 2018).

Để khắc phục bất tương hợp một phần trong ngô nổ (popcorn), dòng cảm ứng đơn bội BHI306 mang alen *Gal* được phát triển bởi Đại học Bang Iowa từ năm 2015. Ngoài ra, dòng cảm ứng đơn bội C1-I cho phép sản xuất hàng loạt các dòng HI từ quần thể mang gen *HI* và chỉ thị R1-nj thông qua lai với cảm ứng đơn bội theo dòng bố C1-I và chọn hạt đơn bội cảm ứng (Chen *et al.*, 2024).

Trong thập niên 2020, chỉnh sửa gen trở thành xu

hướng nghiên cứu nóng trong sinh học; ở ngô, dòng cảm ứng đơn bội được kết hợp với chỉnh sửa gen tạo thành công nghệ HI-Edit. Công nghệ này sử dụng phần hoa từ các dòng HI được tái lập trình để chuyển tính trạng chỉnh sửa gen vào cây mục tiêu. HI-Edit yêu cầu các dòng HI phải có khả năng biến nạp và HIR cao để đáp ứng tất cả điều kiện. Các nhà khoa học của Syngenta đã tạo ra thế hệ mới của các dòng HI-Edit (Delzer *et al.*, 2024).

Với hiểu biết về cơ chế của gen cảm ứng đơn bội - có thể gây ra sự bùng phát các gốc oxy tự do (ROS) và làm tăng quá trình oxy hóa màng phần - các nhà khoa học Trung Quốc đã sử dụng hóa chất oxy hóa mạnh như Methimazole và Phosphatidylcholine để xử lý phần hoa không đột biến, từ đó tạo ra phần đơn bội cảm ứng nhân tạo với HIR dao động từ 2,2 đến 17,2% (Jiang *et al.*, 2022).

Bảng 1. Tên của các dòng kích tạo đơn bội và các đặc tính cơ bản

| Dòng kích tạo đơn bội | Nguồn gốc và đặc tính cơ bản | HIR (%) | Chỉ thị và kiểu hình | Tài liệu tham khảo |
|-----------------------|--|--------------|-----------------------------|--|
| Stock number 6 | Bộ Nông nghiệp Hoa kỳ | 2,29 | | Coe, 1959 |
| PEM | Chỉ thị phôi tím, hiệp hội nông nghiệp Deklb | 0,11 | R1-nj | Chase & Nanda., 1965; Nanda & Chase, 1966 |
| KMS | Korichnevsky marker saratovsky, Nga phát triển từ dòng Stock 6 | 0,5 - 3,4 | Pl1 | Tyrnov & Zavalishina, 1984 |
| ZMS | Zarodyshevsky marker Saratovsky, Nga phát triển từ dòng Stock 6 | 2 | R1-nj | Tyrnov & Zavalishina, 1984 |
| WS14 | (Viện Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc gia Pháp) phát triển từ 2 dòng W23 × Stock 6 | 2-5 | R1-nj | Lashermes <i>et al.</i> , 1988 |
| KEMS | Chỉ thị phôi tổng hợp Krasnador | 6,3 | R1-nj | Shatskaya <i>et al.</i> , 1994 |
| MHI | Dòng kích tạo đơn bội, dòng phân ly từ KMS × ZMS | 5,5 - 6,7 | R1-nj, Pl1 | Chalyk, 1999 |
| RWS | Đại học Hohenheim, dòng phân ly từ KEMS × WS14 | 8,1 | R1-nj | Röber <i>et al.</i> , 2005 |
| RWK-76 | Đại học Hohenheim phân ly từ WS14 × KEMS | 9 - 10 | R1-nj | Geiger, 2009 |
| CAUHOI | Stock 6 × quần thể hàm lượng dầu cao từ Đại học Nông nghiệp Trung Quốc | 2,21 | R1-nj, high oil content | Li <i>et al.</i> , 2009 |
| UH400 | Đại học Hohenheim phân ly từ KEMS | 7 - 9 | R1-nj | Chang & Coe., 2009; Prigge <i>et al.</i> , 2011 |
| PHIs | Dòng đơn bội Procera từ Moldova, phân ly từ MHI × Stock6, mang gen B1 và Pl1. Cây đơn bội có thể được xác định dựa là cây con không có mẫu tím. | 12,1 - 14,5 | R1-nj, B1, Pl1 | Rotarenco <i>et al.</i> , 2010 |
| TAILs | (Dòng kích tạo đơn bội thích ứng với điều kiện nhiệt đới) CIMMYT phối hợp với đại học Hohenheim | 8 - 10 | R1-nj | Prasanna <i>et al.</i> , 2012 |
| CAU5 | Đại học Nông nghiệp Trung Quốc | 10 | R1-nj, high oil content | Xu <i>et al.</i> , 2013; Trentin <i>et al.</i> , 2020 |
| CAU079 | Đại học Nông nghiệp Trung Quốc | 9 | R1-nj, high oil | Xu <i>et al.</i> , 2013; Trentin <i>et al.</i> , 2020 |
| UH600 | Đại học Hohenheim, dòng kích tạo đơn bội có hàm lượng dầu cao 10,8%, có chỉ thị B1 mẫu tím ở bẹ lá và lá bi. | 10,2 | R1-nj, B1, High oil content | Melchinger <i>et al.</i> , 2013; Mirdita <i>et al.</i> , 2014 |
| UH601 | Đại học Hohenheim, dòng kích tạo đơn bội có hàm lượng dầu cao 11,7% | 6,6 | R1-nj, High oil content | Melchinger <i>et al.</i> , 2013; Mirdita <i>et al.</i> , 2014 |
| BHI201 (ISURF#04065) | Đại học bang Iowa, B73 × RWS và RWK | 8 - 15 | R1-nj | https://www.plantbreeding.iastate.edu/breeding-programs/maize-doubled-haploid From 2015 |
| BHI306 (ISURF#04099) | Đại học bang Iowa, B73 × RWS và RWK bổ xung gen <i>Gal</i> , gen bất hợp 1 phần cho phép dòng cảm ứng hoạt động hiệu quả trên nền vật liệu ngô nổ. | 8 - 15 | R1-nj, Pl1, <i>Gal</i> | (https://www.plantbreeding.iastate.edu/breeding-programs/maize-doubled-haploid), From 2015 |
| CIM2GTAILs | CIMMYT thế hệ hai dòng kích tạo đơn bội thích ứng với điều kiện nhiệt đới. | 8,2 - 13,1 | R1-nj | Chaikam <i>et al.</i> , 2018 |
| CSs | Đại học Nông nghiệp Trung Quốc, dòng kích tạo đơn bội đặc biệt tăng cường sắc tố tím ở phôi non. | 8,15 - 15,54 | R1-nj | Chen <i>et al.</i> , 2020 |

| Dòng kích tạo đơn bội | Nguồn gốc và đặc tính cơ bản | HIR (%) | Chi thị và kiểu hình | Tài liệu tham khảo |
|-----------------------|--|----------|----------------------|--|
| ISURF #5202 | C1-I dòng kích tạo đơn bội từ đại học bang Iowa, dòng C1-I cho phép ứng dụng công nghệ đơn bội kép, và những tiến bộ để phát triển dòng kích tạo đơn bội. Mo47 × ISURF#04099 | 5,8 - 12 | C1-I | (https://isurftech.technologypublisher.com/technology/48403); Chen et al., 2024 |
| 19SN952196 | Dòng kích tạo đơn bội cho chỉnh sửa gen. Công ty giống Syngenta. Dòng phân ly từ SYN-INBB-C34X(RWKS/Z21S//RWKS). | 13 | R1-SCM2 | Delzer et al., 2024 |
| 19SN952452 | Dòng kích tạo đơn bội cho chỉnh sửa gen, công ty giống Syngenta. Phân ly từ SYN-INBB34x(RWKS/Z21S//RWKS) | > 15 | R1-SCM2 | Delzer et al., 2024 |

2.3. Cơ sở di truyền của dòng cảm ứng đơn bội theo dòng mẹ

Gen chính kiểm soát tỉ lệ cảm ứng đơn bội (HIR) ở ngô là *qhir1*, chiếm khoảng 66% biến dị di truyền giữa các quần thể phân ly liên quan đến HIR. Ba nhóm nhà khoa học đã độc lập phát hiện gen này và đặt tên là

MATRILINEAL (MTL), *ZEA MAYS PHOSPHOLIPASE A1 (ZmPLA1)*, và *NOT LIKE DAD (NLD)*. Các alen lặn gây đột biến kiểm soát HIR được tìm thấy ở exon của gen *GRMZM2G471240*, do có chèn 4 cặp nucleotit (Gilles et al., 2017; Kelliher et al., 2017; Liu et al., 2017).

Bảng 2. Tên của các locus hoặc gen điều khiển tỉ lệ kích tạo đơn bội trên ngô

| Gen | Tên | Alen | Tác động của gen | Vị trí gen | Chức năng/ đặc tính | Tài liệu tham khảo |
|-----|--|-------------------------------|------------------|--|--|--|
| Gen | <i>MATRILINEAL (MTL)/ NOT LIKE DAD (NLD)/ Pata-tin-Like Phospholipase A (ZmPLA1)</i> | <i>Mtl/nld/zmpla1</i> | Lặn | <i>qhir1</i> 67.86 Mb - 68.42 Mb Gen <i>GRMZM2G471240</i> | Phospholipase đặc hiệu cho tinh trùng; kích hoạt cảm ứng đơn bội; đột biến tăng cường tỉ lệ hạt đơn bội lên 2%. | Kelliher et al., 2017; Gilles et al., 2017; Liu et al., 2017 |
| Gen | <i>ZmDMP</i> | <i>zmdmp</i> | Lặn | <i>Qhir8</i> bin 9.01 Gen <i>GRMZM2G465053</i> | Protein màng chứa miền DUF679, đột biến tăng tỉ lệ hạt đơn bội lên 7% khi kết hợp với gen <i>zmpla1-zmdmp</i> | Liu et al., 2015; Zhong et al., 2019 |
| Gen | <i>Centromere histone H3 (CENH3)</i> | <i>+/cenh3</i> | Dị hợp tử | Chr 6 | lai <i>+/cenh3</i> với dòng không mang đột biến ta có thể có dòng đơn bội theo cả dòng bố và dòng mẹ. | Wang et al., 2021 |
| Gen | <i>Zea mays PHOSPHOLIPASE D3 (Zm PLD3)</i> | <i>Zmpld3</i> | Lặn | Chr 6 | Phospholipase biểu hiện đặc hiệu trong hạt phấn. | Li et al., 2021 |
| Gen | <i>ZmPOD65</i> | <i>+/ZmPOD65 (met to leu)</i> | Dị hợp tử | Chr 5 | Peroxidase 65 điều khiển bùng nổ ROS dẫn đến phá vỡ DNA tinh trùng. | Jiang et al., 2022 |
| Gen | <i>Zm00001d029559 KOKOPELLI</i> | | | <i>Qhir1</i> Chr10 141.7 Mb | Cyclin dependent kinase 1 ở ngô KOKOPELLI điều khiển siRNA cis-đối nghĩa gây ra cảm ứng đơn bội (HIR) ở Arabidopsis. | Trentin et al., 2023 |

Gần đây, một gen liên quan đến protein màng chứa domain DUF679, mang tên *GRMZM2G565053*, đã được xác định. Gen này nằm trong vùng *qhir8* (bin 9.01) và giải thích thêm khoảng 20% HIR khi alen đột biến tồn tại cùng với đột biến *zmpla1/nld/mtl*. Sau đó, gen này được đặt tên là *ZmDMP*. Alen đột biến lặn *zmdmp* gây cảm ứng đơn bội là một đột biến thay thế một nucleotit đơn (single-nucleotide substitution mutation) (Zhong et al., 2019).

Khi hai alen đột biến *zmdmp* và *zmpla1/nld/mtl* cùng tồn tại trong kiểu gen, HIR có thể tăng từ 2 - 6 lần so với chỉ một đột biến *mtl*, cho thấy có tương tác át chế giữa các gen kiểm soát màng tế bào tinh trùng (Trentin et al., 2020). Bằng cách sử dụng các chiến lược di truyền đảo ngược (reverse genetics), người ta cũng xác định một gen khác tên *ZmPLD3*. Gen này được cho là có tác dụng hiệp

lực (synergistic) với alen *zmpla1/nld/mtl*, khi kết hợp cùng *zmpla1/nld/mtl* có thể tăng HIR gấp ba lần từ 1,19% lên 4,13% (Li et al., 2021). Cơ chế mà đột biến *zmpla1/nld/mtl* gây ra hiện tượng cảm ứng đơn bội (HI) đã được đề xuất và chứng minh liên quan đến bùng nổ các gốc oxy phản ứng (ROS), gây tổn thương ADN dẫn đến mất bộ gen của bố. Nghiên cứu này cũng xác định gen *ZmPOD65* là một gen mới kiểm soát HI (Jiang et al., 2022). Ngoài hai gen chính trên, HIR còn được điều khiển bởi một số QTL có tác dụng vừa và nhiều QTL nhỏ hơn. Một nghiên cứu GWAS đã xác định 52 SNP liên quan đến HIR (Nair et al., 2020). Cũng theo phương pháp này, để tìm các gen kiểm soát HIR ngoài *ZmPLA1/NLD/MTL* và *ZmDMP*, các nhà khoa học đã phát hiện một gen chính gần *MTL* và một gen trên chromosome 10, là tương đồng chức

năng gen Kokopelli kiểm soát HIR ở *Arabidopsis*. Ngoài ra còn có nhiều QTL khác có tác dụng nhỏ hơn (Trentin *et al.*, 2023). Hầu hết các alen *mtl*, *zmdmp*, *zmpld3* đều tạo ra hạt đơn bội khi ở trạng thái đồng hợp lặn. Tuy nhiên, đột biến của *cenH3* trên chromosome 6 đã được xác định có thể cảm ứng hạt đơn bội theo cả hai hướng khi ta lai giữa dòng cảm ứng *+cenH3* với dòng không mang đột biến (Wang *et al.*, 2021). Các dòng HI trong tương lai có thể kết hợp biến thể *CENH3* và các gen cảm ứng chính có trong các dòng phân ly từ Stock 6; những dòng có cả biến thể *CENH3* và đặc tính từ Stock 6 có thể tăng HIR từ 10,2% lên 16,3%, cho thấy tiềm năng phát triển các dòng HI trong tương lai (Meng *et al.*, 2022).

Cảm ứng đơn bội do gen điều hòa methyl hóa ADN (DMGs): một số bằng chứng từ cá nóc cho thấy có những gen có sự khác biệt về methyl hóa ADN và biểu hiện giữa đơn bội và lưỡng bội, cũng như sự khác biệt hiệu suất ở các mức độ đa bội những gen này có thể tham gia vào hiện tượng hình thành đơn bội (Zhou *et al.*, 2022). Ngoài ra, có bằng chứng cho thấy methyl hóa ADN có thể gây biến dị ở thực vật (Kaepler & Phillips, 1993). Mặc dù các nghiên cứu trên được thực hiện ở cá, nhưng methyl hóa ADN cũng nên được xem xét trong tương lai cho cảm ứng đơn bội ở ngô.

Kết luận: hiện tượng cảm ứng đơn bội ở ngô được điều khiển bởi đa gen ở nhiều vùng trên bộ gen với các alen đột biến kiểm soát các cơ chế riêng biệt như phospholipase màng tế bào, chức năng của protein *CENH3*. Đồng thời, methyl hóa ADN cũng là một yếu tố cần được cân nhắc như một cách khả thi để tăng tốc độ cảm ứng đơn bội.

2.4. Các cơ chế gây cảm ứng đơn bội theo mẹ

Hạt đơn bội có thể được cảm ứng bởi nhiều yếu tố và cơ chế, bao gồm kích thích từ và hiện tượng thụ tinh đơn. Trong các nghiên cứu tập trung giải mã di truyền các dòng cảm ứng đơn bội, các nhà khoa học đã xác định một số gen chủ chốt có vai trò gây và kiểm soát loại bỏ nhiễm sắc thể sau thụ tinh.

Thuyết thụ tinh đơn:

Trong ngô, phấn hoa trải qua quá trình thụ tinh kép: một tinh trùng kết hợp với 2 tế bào trung tâm tạo thành nội nhũ, tinh trùng còn lại hợp với trứng tạo thành phôi (Dresselhaus *et al.*, 2016). Thuyết này cho rằng hạt đơn bội có thể là hậu quả của quá trình thụ tinh đơn (Hình 1A). Bằng chứng về thụ tinh đơn đã được phát hiện ở các nền gen khác nhau của ngô (Kato, 1999). Kato còn xác định hiện tượng thụ tinh dị hợp (hetero fertilization) khi nội nhũ và phôi trong cùng một hạt bị thụ tinh bởi phấn hoa khác nhau, với tần suất trung bình khoảng 1,46% (Gao *et al.*, 2011). Nghiên cứu sau đó cung cấp thêm bằng chứng

rằng thụ tinh đơn kết hợp với loại bỏ nhiễm sắc thể chính là cơ chế gây cảm ứng đơn bội ở ngô (Tian *et al.*, 2018).

Thuyết loại bỏ nhiễm sắc thể:

Sau khi tinh trùng hợp nhất với trứng, bộ nhiễm sắc thể từ bố bị loại khỏi phôi, dẫn đến hiện tượng phôi đơn bội (Hình 1A). Năm 2013, các nhà khoa học Trung Quốc sử dụng các dòng cảm ứng mang ký hiệu B Chromosome ở tế bào chất di truyền. Sau khi lai dòng cảm ứng với giống lai ZhengDan95B, các hạt đơn bội được xác định vẫn mang nhiễm sắc thể B từ dòng cảm ứng - chứng tỏ thụ tinh đã xảy ra nhưng nhiễm sắc thể bố đã bị loại sau đó (Zhao *et al.*, 2013).

Điều này được củng cố khi giải trình tự phôi đơn bội cho thấy có các đoạn ADN nguồn gốc từ dòng kích tạo đơn bội CAU5 tồn tại trong hạt đơn bội (Li *et al.*, 2017). Sau khi xác định gen chính *MTL/ZmPLA1/NLD* điều khiển cảm ứng đơn bội có ở dòng Stock 6, thuyết loại bỏ nhiễm sắc thể được khẳng định (Liu *et al.*, 2017). Nghiên cứu sâu hơn cho thấy rằng sự bùng nổ các gốc oxy phản ứng (ROS) trong quá trình cảm ứng đơn bội gây đứt gãy ADN của tinh trùng và dẫn đến mất ADN từ bố, chỉ để lại một số đoạn ADN trong phôi đơn bội (Jiang *et al.*, 2022).

Sự sai sót trong phân li tâm động của nhiễm sắc thể (đột biến *CENH3*):

Vùng tâm động (centromere) là nơi gắn vi ống trước khi phân li nhiễm sắc thể. Đột biến ở vùng *CENH3* làm thay đổi cấu trúc và chức năng của protein, gây sai sót trong phân li nhiễm sắc thể, hậu quả là loại bỏ bộ gen và hình thành thể đơn bội (Hình 1B) (Comai & Tan, 2019; Sanei *et al.*, 2011).

Ảnh hưởng của môi trường lên cảm ứng đơn bội:

Có nhiều bài báo ghi nhận môi trường ảnh hưởng đến tỉ lệ cảm ứng đơn bội ở ngô (Trampe *et al.*, 2022; Kebede *et al.*, 2011). Nghiên cứu tại Brazil cho thấy tỉ lệ cảm ứng cao hơn vào mùa hè so với mùa đông (Da Silva *et al.*, 2020). Ở cây *Arabidopsis*, kích thích nhiệt độ ngắn hạn trên đột biến *cenH3* có thể tăng hiệu quả cảm ứng lên gấp 10 lần (Ahmadli *et al.*, 2023) gợi ý rằng stress nhiệt cũng có thể tăng hình thành hạt đơn bội khi kết hợp với đột biến tâm động ở ngô.

III. PHƯƠNG PHÁP PHÁT TRIỂN CÁC DÒNG CẢM ỨNG ĐƠN BỘI NGÔ

3.1. Phương pháp truyền thống

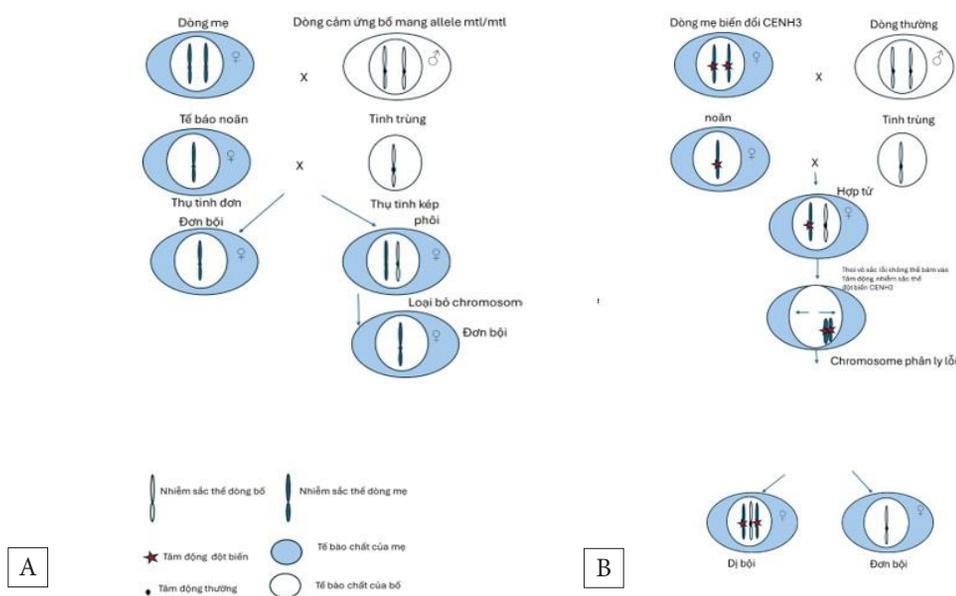
Với sự hỗ trợ của chọn lọc dựa vào chỉ thị phân tử MAS (Marker-Assisted Selection) cho các gen chính như *mtl* và *zmdmp* và các dấu hiệu kiểu hình như R1-nj, P11 (rễ đỏ), B1 (bẹ lá đỏ), các dòng kích tạo đơn bội truyền thống có thể phát triển sau khoảng 6 thế hệ (Trentin *et al.*, 2020). Để rút ngắn thời gian và hướng đến sản xuất hàng loạt, các nhà khoa học tại Iowa State University (ISU) đã phát triển phương pháp kết hợp các dòng HI mang gen *C1-I*.

Khi lai với quần thể nguồn đã được cố định gen *R1-nj*, *mtl*, *zmdmp*, có thể chọn hạt đơn bội mang dấu hiệu màu tím ở phôi. Sau đó tiến hành nhân đôi nhiễm sắc thể để phát triển dòng DH mang *R1-nj*, *mtl*, *zmdmp* chỉ trong 2 thế hệ, một số dòng DH inducer đạt HIR vượt 23% (Chen *et al.*, 2024).

3.2. Phát triển các dòng cảm ứng đơn bội bằng kỹ thuật chỉnh sửa gen

Gen *CENH3* mã hóa protein kiểm soát phức hợp kinetochore tại các tâm động của nhiễm sắc thể. Đột biến trong gen *CENH3*, được gọi là *cenh3 L130F*, khi cây dị hợp tử *+/-cenh3* lai với cây hoang dại ở *Arabidopsis* đã tạo ra hạt

đơn bội (Karimi-Ashtiyani *et al.*, 2015). Một trong những dòng cảm ứng đơn bội sớm nhất được tạo từ chuyển gen *CENH3* để sử dụng làm dòng kính tạo trong ngô đã được công bố vào năm 2016 với tỉ lệ cảm ứng đơn bội tối đa là 3,6% (Kelliher *et al.*, 2016). Đối với ngô, sau khi có dòng cảm ứng mang đột biến *+/-cenh3*, việc sử dụng và duy trì rất đơn giản. Bằng cách lai dòng *+/-cenh3* với cây bình thường theo cả hai chiều làm bố và làm mẹ, ta có thể thu được hạt đơn bội. Khi lai dòng *+/-cenh3* với các dòng mong muốn, ta có thể nhanh chóng chuyển các dòng đó thành cảm ứng mang *+/-cenh3* chỉ sau một lần lai, giúp việc duy trì và sử dụng dòng *+/-cenh3* trở nên rất đơn giản (Wang *et al.*, 2021).



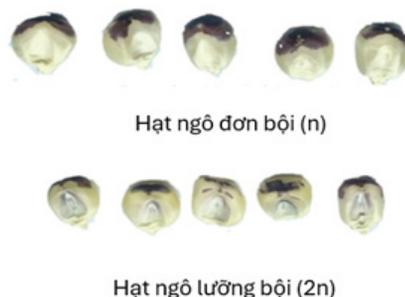
Hình 1. Sơ đồ minh họa hiện tượng cảm ứng đơn bội trên ngô. (A) hai khả năng tạo hạt đơn bội trên ngô với dòng cảm ứng mang gen *mtl/mtl*. (B) đơn bội gây ra sự đột biến gen *CENH3*

Còn khi kết hợp chỉnh sửa gen *CENH3* để tạo biểu hiện quá mức cùng với các dòng kích tạo đơn bội mang gen đơn bội từ Stock 6, các nhà khoa học đã tạo được các dòng có HIR lên đến 16,3%, cao hơn khoảng 6,1% so với các dòng kích tạo đơn bội gốc gốc từ Stock 6. Để giảm nhược điểm của phương pháp chỉnh sửa gen bằng TILLING sử dụng Ethyl Methane Sulfonate (EMS) gây đột biến điểm, một phương pháp mới gọi là “base editing” đã thay thế Adenine (A) bằng Guanine (G) trong gen *CENH3* của *Arabidopsis* và tạo được các dòng đơn bội (Wang & Ouyang., 2023).

Chỉnh sửa gen trong các vùng QTL chính được xác định là liên quan đến cảm ứng đơn bội:

Hiện có hai vùng QTL chính đã xác định kiểm soát HIR ở ngô là *qhir1* và *qhir8*. Gen *ZmPLA1* thuộc locus *qhir1* và *ZmDMP* thuộc locus *qhir8*. Đột biến ở *ZmPLA1* ở Stock6 dẫn đến hiện tượng cảm ứng đơn bội ở ngô. Bằng cách chỉnh sửa gen, các nhà khoa học đã thử chỉnh sửa vị trí mục tiêu trong gen *ZmPLA1* ở

dòng nhiệt đới LM13 và đạt được kết quả khả thi đầu tiên (Rangari *et al.*, 2023). Đồng thời, sử dụng CRISPR-Cas9 để knockout gen *ZmDMP* có thể kích hoạt tỉ lệ cảm ứng đơn bội khoảng 0,1 - 0,3%, và đột biến này còn có thể làm tăng HIR khi nền tảng có alen *mutant zmpla1* (Zhong *et al.*, 2019). Gen *ZmPLD3* trên nhiễm sắc thể 6 khi được chỉnh sửa cũng gây ra hạt đơn bội, cho thấy hiệu ứng hiệp lực với *mutant zmpla1* (Li *et al.*, 2021).



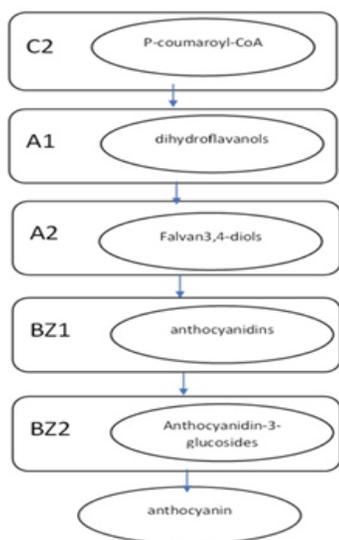
Hình 2. Hạt đơn bội và hạt lưỡng bội dự kiến được nhận diện bằng chỉ thị R1-nj

IV. XÁC ĐỊNH PHÔI ĐƠN BỘI

4.1. Phương pháp chính để nhận diện đơn bội

Các nhà khoa học tại CIMMYT thường sử dụng đánh giá hình thái về sức sống cây, độ rộng lá, màu sắc lá, góc lá, khả năng trở cờ để nhận diện cây đơn bội, đây được gọi là phương pháp “tiêu chuẩn vàng” trong phân loại phôi đơn bội. Mặc dù phương pháp này dùng được cho quy mô lớn, nó có thể gây kết quả sai khi nguồn gen dòng thuần có độ biến động về sức sống (Chaikam *et al.*, 2016; Nair *et al.*, 2020). Để nhiệm vụ sắc thể là công cụ chính xác nhưng đòi hỏi kỹ năng cao trong di truyền tế bào (Sekiya *et al.*, 2020). Phân tích tế bào theo dòng chảy (flow cytometry) được xem là một trong những phương pháp chính xác nhất để nhận diện đơn bội nhưng lại tốn kém (Ribeiro *et al.*, 2018).

4.2. Chỉ thị hình thái và một số chỉ thị hiện hành để nhận diện hạt đơn bội



Hình 3. Con đường tổng hợp anthocian ở ngô

Chỉ thị R1-nj (Navajo):

Ưu điểm: chỉ thị R1-nj dùng để chọn hạt đơn bội lần đầu do Nanda và Chase phát triển dưới tên R-nj:cuđu, sau nhiều năm ứng dụng và cải tiến, đây là chỉ thị được sử dụng rộng rãi nhất để quét hạt đơn bội trên thế giới; hầu hết các dòng cảm ứng đều sử dụng chỉ thị R1-nj. Hạt đơn bội dự kiến được nhận diện với phôi không màu và lớp tế bào quanh nội nhũ màu tím; hạt lưỡng bội sẽ được xác định và loại bỏ khi biểu hiện màu tím ở cả phôi và lớp tế bào quanh nội nhũ hình 1 (Chase & Nanda, 1965). Một số dòng mới được công bố gần đây kết hợp R1-nj với các dấu hiệu khác như hàm lượng dầu cao, rễ đỏ và thân đỏ (Chaikam *et al.*, 2019; Porotnikov *et al.*, 2022). Chỉ thị này không chỉ dùng để nhận diện đơn bội ở hạt đã chín đầy đủ mà còn có thể dùng ở giai đoạn rất sớm của phôi thông qua kỹ thuật cứu phôi trong buồng tăng trưởng (Lopez *et al.*, 2023). Hầu hết ngô ôn đới có thể dễ dàng nhận diện là hạt đơn bội khi

dùng chỉ thị Navajo. Chỉ thị này là bền vững trên hạt và có thể được chọn lọc với sắp xếp thời gian và lao động hợp lý.

Nhược điểm: màu anthocyanin ở hạt, cụ thể ở aleurone và phôi, được kiểm soát bởi một hệ alen phức tạp gồm *A1 A2 Bz1 Bz2 C1 C2 R1 Pr1*. Sự kết hợp khác nhau giữa các alen có thể tạo ra màu hạt từ đồng đỏ, đỏ sậm, đỏ, đến tím đen (Coe, 1994). Điều này khiến việc quan sát gặp khó khăn trong các nguồn gen có tổ hợp alen với R1-nj.

Một trong những khó khăn khi sử dụng chỉ thị R1-nj là trong nguồn gen có alen *C1-I*, nằm trên nhiễm sắc thể 9, có khả năng ức chế biểu hiện anthocyanin của hạt. Alen *C1-I* này có thể bao gồm cả dấu hiệu 8 bp indel và SNP đặc hiệu cho *C1-I* (Chaikam *et al.*, 2015). Một chỉ thị R1 mới gọi là R1-SCM2 đã được phát triển bởi các nhà khoa học từ Syngenta nhằm hỗ trợ nhận diện đơn bội; chỉ thị này ít bị ảnh hưởng hơn so với các alen *R1* trước đây, được cho là sẽ giảm tỷ lệ sai lầm dương trong lựa chọn đơn bội (Delzer *et al.*, 2024).

Các chỉ thị khác:

Chỉ thị hàm lượng dầu cao: chỉ thị này lần đầu được báo cáo có thể sử dụng cho xác định dòng DH vào năm 2003, và dòng HI đầu tiên được công bố là CAUHOI bởi các nhà khoa học Trung Quốc (Shao, 2003; Li *et al.*, 2009). Nghiên cứu sau đó xác định rằng chỉ thị dầu cao có thể kết hợp với máy NMR tự động để tăng tốc độ chọn lọc và giảm chi phí lao động. Hệ thống NMR tự động có thể quét hạt với tốc độ 4 giây mỗi hạt và độ chính xác 94% (Wang *et al.*, 2016).

Theo thời gian và để nâng độ chính xác lên đến 97,8% cũng như loại bỏ các hạt bị ngưng phát triển do dầu thấp, phương pháp ngưỡng kép (double threshold) đã được sử dụng để phân loại hạt đơn bội, hạt lưỡng bội và hạt ngưng phát triển (Qu *et al.*, 2021).

Sau khi kỹ thuật sàng lọc tự động bằng máy NMR cho hạt đơn bội được phát triển thành công, nhiều trường đại học và viện nghiên cứu đã nỗ lực kết hợp chỉ thị dầu cao với các chỉ thị hình thái khác, các dòng DH mới với hàm lượng dầu cao và tỉ lệ cảm ứng tốt hơn cũng đã được các nhà khoa học Trung Quốc công bố (Liu *et al.*, 2022).

Chỉ thị rễ đỏ và chỉ thị mầm đỏ: chỉ thị P11 (rễ đỏ) là một chỉ thị anthocyanin phụ thuộc ánh sáng, biểu hiện màu đỏ ở rễ cây con khi nảy mầm, có thể dùng để hỗ trợ nhận diện hạt đơn bội (Trentin *et al.*, 2020). Chỉ thị rễ đỏ có thể dùng như dấu hiệu chọn trong nguồn gen, khi nó hoàn toàn ức chế biểu hiện anthocyanin ở lớp vỏ hạt hoặc dùng kết hợp với R1-nj để tăng hiệu quả nhận diện trong nguồn gen đa dạng (Chaikam *et al.*, 2016). Đối với việc nhận diện cụ thể hơn trên một số nguồn gen mang chỉ thị P11, chỉ thị này có thể kết hợp với chỉ thị B1. Khi cả *B1* và *P11* xuất hiện, cây con sẽ có mầm, bẹ, bao lá, vỏ và thân màu tím sẫm gần như đen (Coe, 1994). Một số

dòng cảm ứng đơn bội có mang chỉ thị P11 trong bộ gen như KMS, MHIs, BHI306 (Tyrnov & Zavalishina., 1984; Chalyk, 1999). Các dòng PHIs (DH) kết hợp chỉ thị P11 và B1 cũng đã được phát triển (Rotarenco *et al.*, 2010).

4.3. Các cơ hội tiềm năng khác cho việc chọn hạt đơn bội

Các nhà khoa học đang tìm kiếm các phương pháp mới có khả năng nhận diện hạt đơn bội nhanh và chính xác; lựa chọn hạt đơn bội tự động là yếu tố then chốt cho việc ứng dụng công nghệ DH ở quy mô lai tạo. Một số phương pháp tiềm năng như phổ cận hồng ngoại (NIR spectroscopy): hạt đơn bội có thể được tự động chọn với độ chính xác 96,16% (Lin *et al.*, 2018); Phổ biến đổi Fourier Raman (FT-Raman): là phương pháp phân tích không xâm lấn, cung cấp thông tin chi tiết hơn về cấu trúc hóa học của nhân hạt đơn bội (Rosa *et al.*, 2023). Các nhà khoa học tại CIMMYT đã phát triển cơ chế giúp rút ngắn thời gian kích tạo đơn bội kép từ hai vụ gieo trồng xuống còn một vụ rưỡi bằng kỹ thuật cứu phôi (embryo rescue) giải quyết cả khó khăn với nguồn gen có lớp aleurone đen hoặc tím. Phôi được đặt lên giấy lọc chứa sucrose 200 mM và chọn dựa vào biểu hiện chỉ thị R1-nj (Lopez *et al.*, 2023). Với sự phát triển của trí tuệ nhân tạo và học sâu (AI & Deep Learning), các mô hình như CNNs đang được ứng dụng để nhận diện hạt đơn bội qua ảnh: mô hình VGG-19 đạt độ chính xác 94,58% (Altuntaş *et al.*, 2019). Các nghiên cứu tiếp theo với CNNs tiếp tục cải thiện độ chính xác lên 97,07% và 98,5% (Sabadin *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2023).

V. KỸ THUẬT LƯƠNG BỘI HÓA BỘ NHIỄM SẮC THỂ Ở NGŌ

Hạt đơn bội chỉ mang một bộ nhiễm sắc thể từ mẹ. Hạt có thể nảy mầm nhưng thường là vô sinh và không thể tạo ra hạt mới, để phục hồi số lượng nhiễm sắc thể, cần tăng gấp đôi số nhiễm sắc thể từ cây mầm đơn bội (Chaikam *et al.*, 2019).

5.1. Kỹ thuật lưỡng bội hóa bộ nhiễm sắc thể nhân tạo

Colchicine và tác nhân hóa học trong việc tăng số nhiễm sắc thể: Colchicine ngăn chặn sự phân li của nhiễm sắc thể trong phân chia tế bào. Kết quả là tế bào có số lượng nhiễm sắc thể gấp đôi bình thường (Manzoor *et al.*, 2019). Theo quy trình tiêu chuẩn lưỡng bội hóa bộ nhiễm sắc thể ở ngô, hạt đơn bội được gieo trên giấy ẩm; khi mầm đạt chiều dài khoảng 2 cm, đầu mầm (coleoptile) sẽ được cắt và xử lý bằng dung dịch colchicine 0,06 % pha với DMSO; sau đó cây con được rửa sạch và trồng trong đất đã được tiệt khuẩn (Prigge & Melchinger., 2012). Một báo cáo gần đây nhằm cải tiến kỹ thuật này cho biết rằng kết hợp 0,07% colchicine và 0,1% DMSO ở giai đoạn có hai lá thật (V_2) mang lại tỉ lệ sống sót của cây đơn bội kép cao nhất tăng từ 30% lên đến 52,7% ở ngô thích nghi vùng cận nhiệt đới (Kaur *et al.*, 2023). Mặc dù colchicine được sử dụng rộng

rãi nhưng nó rất độc hại cho môi trường và cần xử lý đặc biệt. Vì vậy, các nhà khoa học đang nỗ lực tìm các hóa chất thay thế an toàn hơn, chẳng hạn như khí nitrous oxit (N_2O), N_2O đã được dùng để tăng nhiễm sắc thể ở ngô nhằm tạo cây tứ bội (Kato & Birchler., 2006). Nghiên cứu gần đây đã so sánh hiệu quả tăng nhiễm sắc thể giữa N_2O và colchicine: tỉ lệ thành công (OSR) của N_2O dao động từ 6,4% đến 33,3%, trong khi của colchicine là 5,0% đến 28,1%, tùy thuộc năm và môi trường. N_2O được đánh giá là thay thế cạnh tranh cho colchicine và các phương pháp dùng thuốc diệt cỏ, đồng thời có lợi về mặt an toàn và xử lý (Molenaar *et al.*, 2018). Một phương pháp thay thế khác là sử dụng thuốc diệt cỏ ngăn thoi vô sắc như amiprophos-methyl (APM) và oryzalin. Theo một nghiên cứu, tác động lưỡng bội thực tế đạt được với APM là khoảng 38,23%, so với 20,64% của colchicine và 19,4% của oryzalin cho thấy APM có hiệu quả hơn colchicine. Phương pháp ngâm hạt được xác định là cách thức xử lý cho tỉ lệ lưỡng bội hóa nhiễm sắc thể đơn bội cao nhất (Ren *et al.*, 2017).

5.2. Lưỡng bội hóa nhiễm sắc thể tự diễn (Spontaneous Haploid Genome Doubling - SHGD)

SHGD đã được quan sát hơn 70 năm qua. Với sự hiểu biết và hỗ trợ từ công nghệ hiện đại, SHGD hiện có thể được tận dụng để tăng tác động của công nghệ DH trong lai tạo ngô (Boerman *et al.*, 2020). Thông qua chọn lọc chu kỳ, các nhà khoa học tại Đại học Hohenheim đã tăng tỉ lệ nhân đôi tự phát của cây đơn bội từ 5% lên tới 50%, tùy vào nguồn gen, cách này tiềm năng hơn phương pháp truyền thống dùng colchicine (Molenaar *et al.*, 2019). Cơ chế của SHGD vẫn chưa được hiểu đầy đủ, năm 2022 nghiên cứu tế bào học ở ngô đơn bội cho thấy SHGD có thể là kết quả của ba cơ chế: nhân đôi bộ gen trước giảm phân (pre-meiotic), lệch phân ly nhiễm sắc thể ở kì giữa giảm phân I và trong giảm phân thứ hai. Nghiên cứu cũng cho thấy hiện tượng SHGD ở tế bào soma như mô lá là độc lập với phôi (Yang *et al.*, 2022). Về phân tích di truyền SHGD, một QTL chính nằm trên nhiễm sắc thể 6 gọi là qhmf4 đã được xác định (Ren *et al.*, 2017). Một QTL khác trên nhiễm sắc thể 5 giải thích hơn 45% biến động giữa các môi trường cũng được xác định, là ứng cử viên tiềm năng cho nhân đôi nhiễm sắc thể tự diễn vì dễ lai ngược và thể hiện ổn định qua môi trường khác nhau (Trampe *et al.*, 2020).

VI. ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ ĐƠN BỘI KÉP TRONG CHỌN GIỐNG NGŌ

6.1. Ứng dụng công nghệ DH để phát triển dòng thuần

Công nghệ DH được sử dụng trong các viện nghiên cứu và các công ty sản xuất hạt giống lớn như Syngenta (Karen, 2017). Pioneer cũng đang sử dụng công nghệ DH để phát triển các dòng (farmprogress.com). Các nhà khoa học xác nhận rằng việc áp dụng công nghệ DH trong các chương trình lai tạo thực tế là hiệu quả ngang với phương

pháp truyền thống. Tuy nhiên, để cải thiện khả năng kết hợp của các dòng, cần thực hiện một thể hệ chọn lọc đại trà cho nguồn gen nhằm loại bỏ các kiểu gen không mong muốn (Jumbo *et al.*, 2011). Nền di truyền của dòng cảm ứng cũng cho thấy ảnh hưởng đáng kể đến tỉ lệ cảm ứng đơn bội (HIR). Với các nền gốc khác nhau của dòng lai thương mại dạng hạt răng ngựa, tỉ lệ HIR cao nhất là 9,66%, ở dòng non-stiff stalk đạt 7,06%, ở dòng Stiff stalk là 5,68%, trong khi các dòng ngô ngọt (sweet corn) và ngô hạt đá có tỉ lệ HIR thấp nhất, lần lượt là 4,62% và 4,03% (Trentin *et al.*, 2022). Ở các loại ngô biệt dạng, việc sử dụng các dòng cảm ứng cho thấy có khả năng sử dụng dòng kích tạo đơn bội theo mẹ trong quần thể ngô ngọt nhiệt đới. Do ngô ngọt có thể mang các alen ức chế tổng hợp anthocyanin, sử dụng chỉ thị màu ở bẹ lá hiệu quả hơn so với chỉ thị R1-nj trên hạt ngô ngọt; việc đo chỉ số khí khổng (stomata) cũng có thể được ứng dụng nếu chúng ta không thể quan sát màu sắc trên lá mầm đầu tiên (Sekiya *et al.*, 2020). Trentin cũng đề cập trong nghiên cứu năm 2022 rằng các nhóm ngô nhiệt đới và ngô ngọt có thể có tỷ lệ nhận dạng sai (misclassification) cao hơn do sự xuất hiện của alen ức chế anthocyanin. Để khắc phục tình trạng nhận dạng nhầm phân đơn bội, dòng cảm ứng có thể được bổ sung các chỉ thị P11 và B1, và phương pháp kiểm tra tiêu chuẩn vàng (gold-standard test) cũng có thể được sử dụng để xác định tỉ lệ đơn bội. Trong ngô nếp kỹ thuật sử dụng dòng cảm ứng theo mẹ để phát triển các dòng thuần ngô dẻo và dùng để lai tạo ngô dẻo lai (hybrid waxy corn) để dàng áp dụng trong quần thể ngô nếp với tỉ lệ kích tạo đơn bội dao động từ 5% đến 14%, tùy thuộc kiểu gen cảm ứng và quần thể nếp (Cengiz, 2022). Một số nghiên cứu gần đây về ngô nếp trong các quần thể ngô nếp vùng ôn đới và nhiệt đới gặp nhiều khó khăn trong việc vượt qua sự bất hợp ở ngô nếp; tỉ lệ HIR dao động từ 0,0% đến 1,2%, trung bình 0,34%. Tuy nhiên, quần thể nhiệt đới cho thấy số lượng hạt trên bắp cao hơn khi lai với các dòng cảm ứng so với quần thể ôn đới tương ứng (JPad *et al.*, 2023).

Việc sử dụng thể hệ nào làm mẹ để lai với dòng cảm ứng đơn bội để tạo các dòng thuần hiệu quả hơn là một câu hỏi được các nhà khoa học quan tâm. Tần số tái tổ hợp ở quần thể F₁ thường thấp hơn so với F₂, điều này có thể là hạn chế khi sản xuất trực tiếp dòng đơn bội kép từ F₁. Các nghiên cứu gần đây cho thấy các dòng đơn bội kép được trích xuất từ quần thể F₂ có sự đa dạng cao hơn về khả năng kháng bệnh *Fusarium* Stalk Rot so với các dòng từ F₁, trong khi cả F₁ và F₂ đều là kết quả của lai giữa dòng kháng và dòng dễ nhiễm bệnh (Mamtazbi *et al.*, 2023). Nghiên cứu về sử dụng giống lai F1 của các dòng cảm ứng để ứng dụng trong kích tạo đơn bội đã được tiến hành khá sớm, trong đó tổ hợp lai lai RWS × RWK-76 có tỉ lệ cảm ứng tương đương với các dòng cảm ứng ban đầu nhưng thể hiện sinh trưởng mạnh mẽ và tung phấn tốt hơn (Geiger, 2009). Các dòng cảm ứng

đơn bội thuần thông thường thường yếu hơn và cho phần ít hơn so với các giống cảm ứng lai là kết quả của việc lai giữa hai dòng cảm ứng đơn bội; giống lai của hai dòng kích tạo đơn bội BH201/LH82-Ped126 và BH201/LH82-Ped128 thể hiện tiềm năng tốt cho kích tạo đơn bội, cải thiện sức sống cây cảm ứng với cờ ngô lớn hơn mà không làm giảm tỉ lệ cảm ứng (Trentin *et al.*, 2023). Tiềm năng sử dụng giống lai kích tạo đơn bội trong lai tạo cây trồng là rất rõ ràng bởi cảm ứng lai dễ trồng và chăm sóc trong vườn ươm; sử dụng các dòng kích tạo đơn bội lại có lợi vì không cần thêm một thể hệ để tạo ra giống lai kích tạo đơn bội, đồng thời các dòng kích tạo đơn bội dễ dàng duy trì qua các thế hệ.

6.2. Ứng dụng công nghệ đơn bội kép trong các kỹ thuật lai tạo tiên tiến

Dòng cảm ứng đơn bội có thể phối hợp với công nghệ chỉnh sửa bộ gen gọi là HI-Edit; phần ngô từ dòng kích tạo đơn bội mang protein Cas9 và gRNA sẽ chỉnh sửa đến ADN mục tiêu trong tế bào noãn. Sau khi lai với phần HI-Edit, hạt đơn bội được hình thành chỉ mang ADN mẹ đã được chỉnh sửa. Hạt đơn bội này sẽ nảy mầm và sau đó được lưỡng bội hóa nhiễm sắc thể để tạo ra dòng thuần chủng mang gen đã chỉnh sửa. Công nghệ HI-Edit trong ngô giúp các nhà khoa học khắc phục nhiều hạn chế của chỉnh sửa gen truyền thống (Kelliher *et al.*, 2019). Các nhà khoa học tại Syngenta cũng phát triển thể hệ HI-Edit mới để tăng tần suất biến nạp của dòng cảm ứng dùng cho HI-Edit, đồng thời cải thiện tỉ lệ kích tạo đơn bội (Delzer *et al.*, 2024). Công nghệ DH cũng được dùng để nhanh chóng chuyển dòng thuần thành dòng bất dục tế bào chất. Dòng kích tạo đơn bội được mang CMS-C và đột biến dị hợp tử *cenH3* sẽ được dùng làm mẹ và lai với các dòng thương mại mong muốn. Hạt đơn bội sau khi lưỡng bội nhiễm sắc thể sẽ mang nhiễm sắc thể từ dòng thương mại và tế bào chất từ dòng cảm ứng, tạo nên dòng CMS (Bortiri *et al.*, 2024).

Tại Việt Nam, Viện Nghiên cứu Ngô là đơn vị chủ động tiếp cận sớm với công nghệ đơn bội kép với sự chuyển giao công nghệ và dòng kích tạo đơn bội nhiệt đới từ CIMMYT từ năm 2011 khi được trồng tại các vùng nhiệt đới núi cao tại Đức Trọng - Lâm Đồng có tỉ lệ hạt đơn bội là 6 - 8% (Nguyễn Đức Thành và cs., 2013). Từ những bước đầu thành công trong công tác duy trì và tạo hạt đơn bội Viện Nghiên cứu Ngô tiếp tục ứng dụng công nghệ đơn bội kép và đã thu được nhiều thành công trong công tác chọn tạo giống với 16 dòng có nhiều đặc tính nông sinh học tốt, năng suất > 30 tạ/ha. Khảo sát đánh giá các tổ hợp lai được tạo ra từ các dòng ngô đơn bội kép được chọn được 04 tổ hợp lai đơn (LVN399, VS89, LVN228 và LVN268) năng suất đạt từ 12 đến 13 tấn/ha trong điều kiện thâm canh (Đặng Ngọc Hạ và cs., 2020). Giống ngô lai đơn LVN226 có 2 dòng bố mẹ được tạo ra từ dòng đơn bội kép, kháng

định khả năng kết hợp của dòng được tạo ra từ phương pháp kích tạo đơn bội có triển vọng lớn trong chọn tạo giống (Nguyễn Đức Thành & Đặng Ngọc Hạ, 2019). Các tổ hợp lai tiềm năng này sau đó đã phát triển thành các giống lai thương mại minh chứng cho khả năng ứng dụng thực tế cao của dòng kích tạo đơn bội trong chọn tạo giống ngô tại Việt Nam. Đặc biệt tổ hợp lai THA1 × THB12 được tạo ra giữa 2 dòng đơn bội kép đã được khảo nghiệm trên phạm vi cả nước và có năng suất vượt ở mức có ý nghĩa với hầu hết các đối chứng là các giống thương mại phổ biến khác. Giống ngô này sau đó đã được đặt tên thương mại là Thịnh Vượng 9999 và chính thức đi vào thương mại hóa (Nguyễn Đức Thành và cs., 2020). Với việc thương mại hóa chính thức giống ngô được tạo hoàn toàn từ 2 dòng đơn bội kép chứng minh giá trị thực tiễn cao của việc áp dụng công nghệ dòng kích tạo đơn bội trên ngô.

VII. THÁCH THỨC VÀ TRIỂN VỌNG CỦA CÔNG NGHỆ DÒNG ĐƠN BỘI KÉP

7.1. Những thách thức khi ứng dụng công nghệ đơn bội kép trong tạo giống ngô

Một số dòng DH được tạo ra bằng công nghệ DH không có hiệu năng ổn định; mặc dù các dòng DH đồng nhất hơn so với các dòng truyền thống nhưng một số dòng có hiện tượng mọc nhiều bắp bên trong bắp chính, một số khác có độ đậu hạt kém hoặc không đậu được hạt (Jumbo *et al.*, 2011). Hiệu năng kém này có thể do tác động của colchicine hoặc có thể do một yếu tố chưa rõ liên quan đến sự methyl hóa ADN. Nghiên cứu gần đây ở *Arabidopsis* cho thấy, cây DH được tạo bởi colchicine hoặc tự lưỡng bội có số vùng ADN bị methyl hóa tăng lên rõ rệt (Piskorz *et al.*, 2023). Sự methyl hóa ADN cao có thể ảnh hưởng đến năng suất hạt và hiện tượng mọc nhiều bắp trong các dòng DH. Trong tương lai, phương pháp lưỡng bội hóa nhiễm sắc thể tự diễn (SHGD) có thể là một thay thế hiệu quả về chi phí và có thể giảm tác động bất lợi của colchicine. Cho đến nay, tỉ lệ cảm ứng đơn bội cao nhất ở các dòng cảm ứng chỉ đạt khoảng 15%, tỉ lệ này thấp dần ở các dòng nhiệt đới rồi đến ngô nổ hoặc ngô ngọt. Tỉ lệ sống sót của cây DH truyền thống sử dụng colchicine chỉ khoảng 30%, hoặc tối đa 50% nếu áp dụng phương pháp cải tiến, do đó từ hạt đơn bội ban đầu đến cây DH hoàn chỉnh chỉ hiệu quả tối đa là 7% (Delzer *et al.*, 2024; Kaur *et al.*, 2023). Tuy nhiên, số lượng hạt thu hoạch từ cây DH₀ sau khi nhân đôi nhiễm sắc thể thường rất thấp, khiến chi phí sản xuất các dòng này tăng cao. Để tăng số lượng hạt, các nhà khoa học từ Bayer đã phát triển phương pháp xử lý DH₀ bằng Paclobutrazol ở giai đoạn chuyển sang sinh sản, nhờ đó tăng số bắp trên mỗi cây và số hạt thu hoạch (Wu *et al.*, 2020).

Để khắc phục hạn chế về môi trường và nguồn gen nhiệt đới, các dòng kích tạo đơn bội nhiệt đới mới cũng được chọn lọc theo phương pháp bắp trên hàng cải tiến, kết quả là tăng

tỉ lệ kích tạo đơn bội thêm 0,4% mỗi chu kỳ và tăng 30,1% số hạt trên bắp (Trentin *et al.*, 2023). Tuy nhiên, cần nhiều nghiên cứu và công nghệ hơn nữa để cải thiện tỉ lệ kích tạo đơn bội, tỉ lệ sống sót của cây lưỡng bội hóa bộ nhiễm sắc thể và số lượng dòng DH có thể tạo ra từ mỗi cây ngô. Nghiên cứu với dòng kích tạo đơn bội UH400 chỉ ra rằng, dòng kích tạo đơn bội có nguồn gốc ôn đới này có thể thích hợp với điều kiện nhiệt đới ở phía Bắc cụ thể là vụ Xuân tại Hà Nội với tỉ lệ kích tạo đơn bội 7,05%, nhóm tác giả cũng đưa ra phương pháp sử dụng chỉ thị SSR để hỗ trợ cho công tác xác định hạt đơn bội và lưỡng bội với độ chính xác cao, khẳng định chỉ thị SSR có thể ứng dụng cho việc sàng lọc hạt đơn bội và lưỡng bội (Phạm Quang Tuấn và cs., 2026).

Quy trình chọn hạt đơn bội vẫn tốn thời gian và chi phí cao. Mặc dù đã có nhiều nỗ lực tự động hóa quy trình chọn lọc hạt đơn bội, hầu hết các bước vẫn phụ thuộc vào lao động có tay nghề để nhận dạng. Điều này khiến việc chọn lọc trở nên tốn thời gian, gây mệt mỏi và tăng chi phí nhân công (Lin *et al.*, 2018; Melchinger *et al.*, 2013). Học sâu (Deep Learning) có thể được ứng dụng để chọn lựa những hạt đơn bội tiềm năng nhưng vẫn cần thêm bước xác nhận để đảm bảo chính xác (Sabadin *et al.*, 2021). Chi phí cho một bắp doubled haploid bằng phương pháp colchicine truyền thống cũng khá cao, khoảng 20 USD/bắp và ngay cả khi có các phương pháp hóa học thay thế, chi phí này vẫn không hề thấp (Molenaar *et al.*, 2018). Ở các quốc gia nhiệt đới, có thể trồng 2 - 3 vụ ngô mỗi năm nhưng lợi thế giảm thời gian tạo dòng thuần bằng DH lại không rõ rệt do yêu cầu cao về huấn luyện, công lao động và hóa chất cho lưỡng bội hóa nhiễm sắc thể; một số bước còn tạo ra rào cản tài chính lớn với các đơn vị lai tạo nhỏ (Transon & Defourmy, 2017).

7.2. Triển vọng tương lai của công nghệ đơn bội kép trên ngô

Cùng với việc nâng cao tỷ lệ cảm ứng đơn bội (HIR), việc ứng dụng các chỉ thị hình thái để phân biệt, khả năng kết hợp với chỉnh sửa bộ gen (Genome editing), các dòng cảm ứng đơn bội mẹ có thể được dùng để chuyển đổi các dòng ưu tú thành dòng bất dục đực tế bào chất. Lưỡng bội hóa nhiễm sắc thể tự diễn cũng có thể giúp giảm chi phí của công nghệ DH. Trong tương lai, khi kết hợp nhiều alen kích tạo đơn bội khác nhau, khả năng kích tạo đơn bội có thể tăng lên, đồng thời chỉ thị nhận diện có thể trở nên mạnh hơn và dễ ứng dụng trên nhiều nền di truyền khác nhau. Các công nghệ đơn bội kép tương lai sẽ tập trung vào nâng cao khả năng nhân đôi nhiễm sắc thể tự nhiên, đồng thời hợp tác hiệu quả hơn với kỹ thuật chỉnh sửa bộ gen như tăng tần suất chuyển gen. Với sự cộng tác của giới khoa học toàn cầu, công nghệ DH sẽ trở nên dễ tiếp cận hơn, kinh tế hơn và triển vọng ứng dụng rộng rãi hơn cho các nhà lai tạo ngô trong tương lai gần.

Trong điều kiện Việt Nam đã bước đầu sử dụng công

nghe dòng kích tạo đơn bội kép vào thực tế sản xuất và có những thành tựu đáng được ghi nhận thông qua các dòng và giống lai thương mại. Nhưng do hạn chế và khó khăn trong quá trình chọn lọc hạt đơn bội cần một lượng lớn nhân công được đào tạo, việc sử dụng dòng kích tạo đơn bội có hàm lượng dầu cao phối hợp với công nghệ chọn lọc hạt tự động bằng máy NMR có thể sẽ giúp ích lớn cho việc áp dụng công nghệ dòng kích tạo đơn bội vào sản xuất. Song song với đó cần có nghiên cứu thay thế colchicine là hóa chất rất độc và đắt tiền bằng các hóa chất rẻ tiền khác như N_2O để công nghệ này có thể áp dụng đơn giản tại các phòng thí nghiệm vừa và nhỏ. Công nghệ máy học và AI khi áp dụng vào nhận diện hạt đơn bội cùng với robot cũng là một hướng đi hữu ích cho tương lai nhằm hỗ trợ cho việc sàng lọc hạt đơn bội bước đầu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đặng Ngọc Hạ, Nguyễn Đức Thành, Lương Văn Vàng, Vũ Hoài Sơn, Vũ Xuân Long**, 2020. Ứng dụng công nghệ kích tạo đơn bội trong chọn tạo giống ngô lai. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 12 (121): 3-7.
- Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Hữu Hùng, Lương Thái Hà, George Mahuku, Vijay Chaikam**, 2013. Công nghệ tạo dòng thuần bằng cây kích tạo đơn bội. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 1 (31): 29-33.
- Nguyễn Đức Thành, Đặng Ngọc Hạ**, 2019. Nghiên cứu chọn tạo và phát triển giống ngô lai đơn LVN226. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 9(106): 17-22.
- Nguyễn Đức Thành, Đặng Ngọc Hạ, Kiều Quang Luận**, 2020. Kết quả nghiên cứu chọn tạo giống ngô lai đơn thịnh vượng 9999. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 4 (113): 16-22.
- Phạm Quang Tuấn, Đông Huy Giới, Nguyễn Việt Long, Vũ Văn Liết, Nguyễn Thị Nguyệt Anh, Nguyễn Văn Hà, Đoàn Thị Yến, Nguyễn Trung Đức**, 2016. Khai thác vật liệu kích tạo đơn bội tự nhiên UH400 phục vụ chọn tạo giống ngô ưu thế lai. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 14 (11): 1696-1706.
- Ahmadli U., Kalidass M., Khaitova L. C., Fuchs J., Cuacos, M., Demido D., Zuo S., Pecinkova J., Mascher M., Ingouff M., Heckmann S., Houben A., Riha K., Lermontova I.**, 2023. High temperature increases centromere-mediated genome elimination frequency and enhances haploid induction in *Arabidopsis*. *Plant Communications*, 4 (3): 100507.
- Altuntaş Y., Cömert Z., Kocamaz A.F.**, 2019. Identification of haploid and diploid maize seeds using convolutional neural networks and a transfer learning approach. *Computers and Electronics in Agriculture*, 163 (40): 1-11.
- Bernardo R.**, 2014. *Essentials of Plant Breeding*. Stemma Press, Woodbury, MN, USA, 400 p.
- Boerman N.A., Frei U.K., Lübberstedt T.**, 2020. Impact of spontaneous haploid genome doubling in maize breeding. *Plants*, 9 (3): 369.
- Bortiri E., Selby R., Egger R., Tolhurst L., Dong S., Beam K., Meier K., Fabish J., Delaney D., Dunn M., Mcnamara D., Setliff K., Castro R., Lunny, M. Gergen S., Dawe R.K., Kelliher T.**, 2024. Cyto-swapping in maize by haploid induction with a *cenh3* mutant. *Nature Plants*, 10 (4): 567-571.
- Butruille D.V., Birru F.H., Boerboom M.L., Cargill E.J., Davis D.A., Dhungana P., Dill G.M., Dong F., Fonseca A.E., Gardunia B. W., Holland G.J., Hong N., Linnen P., Nickson T.E., Polavarapu N., Pataky J.K., Popi J., Stark S.B.**, 2015. Maize breeding in the United States: views from within Monsanto. In Janick J. (Ed.), *Plant Breeding Reviews* (Vol. 39, Issue 1). Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, USA: 199-282.
- Cengiz R.**, 2022. Maternal haploid waxy maize, environmental effects on grain yield, and quality parameters. *Plos One*, 17 (11).
- Chaikam V., Martinez L., Melchinger A.E., Schipprack W., Boddupalli P.M.**, 2016. Development and validation of red root marker-based haploid inducers in maize. *Crop Science*, 56: 1678-1688.
- Chaikam V., Molenaar W., Melchinger A.E. & Boddupalli P.M.**, 2019. Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. *Theoretical and Applied Genetics*, 132 (12): 3227-3243.
- Chaikam V., Nair S.K., Babu R., Martinez L., Tejomurtula J., Boddupalli P.M.**, 2015. 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 128 (1): 159-171.
- Chaikam V., Nair S.K., Martinez L., Lopez L.A., Utz H.F., Melchinger A.E., Boddupalli P.M.**, 2018. Marker-assisted breeding of improved maternal haploid inducers in maize for the tropical/subtropical regions. *Frontiers in Plant Science*, 9 (1527): 14 pp.
- Chalyk S.T.**, 1999. Creating new haploid-inducing lines of maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 73: 53-54.
- Chang M.T. & Coe E.H.**, 2009. Doubled haploids. In Kriz A.L. & Larkins B.A. (Eds.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer, Berlin, Heidelberg, 63: 127-142
- Chase S. & Nanda D.K.**, 1965. Screening for monoloids of maize by use of a purple embryo marker. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 39: 59-60.
- Chase S.S.**, 1949. Monoploid Frequencies I N a Commercial Double. *Genetics*, 34 (182): 328-332.
- Chen C., Xiao Z., Zhang J., Li W., Li J., Liu C., Chen S.**, 2020. Development of *in vivo* haploid inducer lines for screening haploid immature embryos in maize. *Plants*, 9 (379).
- Chen Y., Lübberstedt T., Frei U.K.**, 2024. Development of doubled haploid inducer lines facilitates selection of superior haploid inducers in maize. *Frontiers in Plant Science*, 14 (1320660).
- Coe E.H.**, 1994. Anthocyanin Genetics. In Micheal Freeling & Walbot V. (Eds.), *The Maize Handbook*. Springer-Verlag, New York, p. 759.
- Coe E.H.**, 1959. A line of maize with high haloid frequency. *The American Naturalist*, XCIII (873): 381-382.
- Comai L. & Tan E.H.**, 2019. Haploid induction and genome instability. *Trends in Genetics*, 35 (11): 791-803.
- Meng D., Luo H., Dong Z., Huang W., Liu F., Li F., Chen S., Yu H., Jin W.**, 2022. Overexpression of modified CENH3 in maize stock6-derived inducer lines can effectively improve maternal haploid induction rates. *Frontiers in Plant Science*, 13: 892055.
- Da Silva H.A., Scapim C.A., Vivas M., Amaral A.T., Pinto**

- R.J.B., Vivas J.M.S., Rossi R.M. & Baleroni A.G., 2020. Corn genotypes and crop seasons on the rate of putative haploids with the expression of gene *R1-navajo*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 55 (e01521).
- Delzer B., Liang D., Szwerdszarf D., Rodriguez I., Mardones G., Elumalai S., Johnson F., Nalapalli S., Egger R., Burch E., Meier K., Wei J., Zhang X., Gui H., Jin H., Guo H., Yu K., Liu Y., Breitingner B., Poets A., Nichols J., Shi, Wan., Skibbe D., Que Q., Kelliher T., 2024. Elite, transformable haploid inducers in maize. *Crop Journal*, 12: 314-319.
- Dresselhaus T., Sprunck S., Wessel G.M., 2016. Fertilization mechanisms in flowering plants. *Current Biology*, 26:R125-R139.
- Gao S., Babu R., Lu Y., Martinez C., Hao Z., Krivanek A. F., Wang J., Rong, T., Crouch J., Xu Y., 2011. Revisiting the hetero-fertilization phenomenon in maize. *PLoS ONE*, 6 (1), e16101.
- Geiger H.H., 2009. Doubled Haploids. In Bennetzen J. L. & Hake S. (Eds.), *Handbook of Maize: Genetics and Genomics*. Springer verlag, heidelberg, New York: 641-657.
- Gilles L.M., Khaled A., Laffaire J., Chaignon S., Gendrot G., Laplaige J., Bergès H., Beydon G., Bayle V., Barret P., Comadran J., Martinant J., Rogowsky P.M., Widiez T., 2017. Loss of pollen specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize. *The EMBO Journal*, 36 (6): 707-717.
- Jiang C., Sun J., Li, R., Yan S., Chen W., Guo L., Qin G., Wang P., Luo, C., Huang W., Zhang Q., Fernie A.R., Jackson D., Li X. & Yan J., 2022. A reactive oxygen species burst causes haploid induction in maize. *Molecular Plant*, 15 (6): 943-955.
- JPad S., JMS V., KOdGD., JCS., VTB T., WR C., 2023. Popcorn (*Zea mays* L. var. Everta) haploids identified by Navajo phenotype and ploidy level. *Frontiers in Plant Science*, 14.
- Jumbo M., Weldekidan T., Holland J.B., Hawk J.A., 2011. Comparison of conventional, modified single seed descent, and doubled-haploid breeding methods for maize inbred line development using germplasm enhancement of maize breeding crosses. *Crop Science*, 51 (4): 1534-1543.
- Kaeppeler S. & Phillips R., 1993. DNA methylation and tissue culture-induced variation in plants. *In vitro cellular and Developmental Biology-Plant*, 29: 125-130.
- Karen M., 2017. *Double-Haploid Induction Speeds Up Plant-Breeding Process*. <https://syngentathrive.com/articles/double-haploid-induction-speeds-up-plant-breeding-process/>
- Karimi-Ashtiyani R., Ishii T., Niessen M., Stein N., Heckmann S., Gurushidze M., Banaei-Moghaddam A. M., Fuchs J., Schubert V., Koch K., Weiss O., Demidov D., Schmidt K., Kumlehn J., Houben A., 2015. Point mutation impairs centromeric *CENH3* loading and induces haploid plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112 (36): 11211-11216.
- Kato A., 1999. Single fertilization in maize. *Journal of Heredity*, 90 (2): 276-280.
- Kato A. & Birchler J.A., 2006. Induction of tetraploid derivatives of maize inbred lines by nitrous oxide gas treatment. *Journal of Heredity*, 97 (1): 39-44.
- Kaur H., Kyum M., Sandhu S., Singh G., Sharma P., 2023. Protocol optimization and assessment of genotypic response for inbred line development through doubled haploid production in maize. *BMC Plant Biology*, 23 (1): 1-9.
- Kebede A.Z., Dhillon B.S., Schipprack W., Araus J.L., Bänziger M., Semagn K., Alvarado G., Melchinger A.E., 2011. Effect of source germplasm and season on the *in vivo* haploid induction rate in tropical maize. *Euphytica*, 180: 219-226.
- Kelliher T., Starr D., Richbourg L., Chintamanani S., Delzer B., Nuccio M.L., Green J., Chen Z., McCuiston J., Wang W., Liebler T., Bullock P., Martin B., 2017. MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction. *Nature*, 542 (7639): 105-109.
- Kelliher T., Starr D., Su X., Tang G., Chen Z., Carter J., Wittich P.E., Dong S., Green J., Burch E., McCuiston J., Gu W., Sun Y., Strebe T., Roberts J., Bate N.J., Que Q., 2019. One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction. *Nature Biotechnology*, 37 (3): 287-292.
- Kelliher T., Starr D., Wang W., McCuiston J., Zhong H., Nuccio M.L., Martin B., 2016. Maternal haploids are preferentially induced by *cenH3*-tailswap transgenic complementation in maize. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1-11.
- Kermicle Jerry L., 1994. Indeterminate Gametophyte (ig): Biology and use. In Freeling M. & Walbot V. (Eds.), *The Maize Handbook*, Springer-Verlag, New York: 388-393.
- Lashermes P., Beckert M., Crouelle D. De., 1988. Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 76 (3): 405-410.
- Li L., Xu X., Jin W., Chen S., 2009. Morphological and molecular evidence for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. *Planta*, 230: 367-376.
- Li X., Meng D., Chen S., Luo H., Zhang Q., Jin W., Yan J., 2017. Single nucleus sequencing reveals spermatid chromosome fragmentation as a possible cause of maize haploid induction. *Nature Communications*, 8 (1): 1-8.
- Li Y., Lin, Z., Yue Y., Zhao H., Fei X., Lizhu E., Liu C., Chen S., Lai J., Song W., 2021. Loss-of-function alleles of *ZmPLD3* cause haploid induction in maize. *Nature Plants*, 7 (12): 1579-1588.
- Lin J., Yu, L., Li W. & Qin H. 2018. Method for identifying maize haploid seeds by applying diffuse transmission near-infrared spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 72 (4): 611-617.
- Liu C., Li, J., Chen M., Li W., Zhong Y., Dong X., Xu X., Chen C., Tian X., Chen S., 2022. Development of high-oil maize haploid inducer with a novel phenotyping strategy. *The Crop Journal*, 10 (2): 524-531.
- Liu C., Li W., Zhong, Y., Dong X., Hu H., Tian X., Wang L., Chen B., Chen C., Melchinger A.E., Chen S., 2015. Fine mapping of *qh18* affecting *in vivo* haploid induction in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 128 (12): 2507-2515.
- Liu C., Li X., Meng D., Zhong, Y., Chen C., Dong X., Xu X., Chen B., Li W., Li L., Tian X., Zhao H., Song W., Luo H., Zhang Q., Lai J., Jin W., Yan J., Chen S., 2017. A 4-bp insertion at *ZmPLA1* encoding a putative phospholipase a generates haploid induction in maize. *Molecular Plant*, 10 (3): 520-522.
- Lopez L. A., Ochieng J., Pacheco M., Martinez L., Omar H. A., Gowda M., Prasanna B. M., Dhugga K.S., Chaikam V., 2023.

- Effectiveness of R1-nj anthocyanin marker in the identification of *in vivo* induced maize haploid embryos. *Plants*, 12 (2314).
- Mamtazbi B., Babu S., Lohithaswa H.C., Triveni G., Mallikarjuna M.G., Mallikarjuna N., Balasundara D.C., Anand P.**, 2023. Comparative assessment of genetic variability realised in doubled haploids induced from F1 and F2 plants for response to *Fusarium* stalk rot and yield traits in maize (*Zea mays* L.). *Agronomy*, 13 (1): 100.
- Management M.P.**, 1992. Management of the *ig* gene for haploid induction in maize. *Agronomie*, 12 (3): 247-251.
- Manzoor A., Ahmad T., Bashir M.A., Hafiz I.A., Silvestri C.**, 2019. Studies on colchicine induced chromosome doubling for enhancement of quality traits in ornamental plants. *Plants*, 7 (8): 194.
- Melchinger A.E., Molenaar W.S., Mirdita V., Schipprack W.**, 2016. Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled-haploid production. *Crop Science*, 56 (2): 559-569.
- Melchinger A.E., Schipprack W., Würschum T., Chen S., Technow F.**, 2013. Rapid and accurate identification of *in vivo*-induced haploid seeds based on oil content in maize. *Scientific Reports*, 3 (1): 2129.
- Meng D., Luo, H., Dong Z., Huang W., Liu F., Li F., Chen S., Yu H., Jin W.**, 2022. Overexpression of modified *CENH3* in maize stock6-derived inducer lines can effectively improve maternal haploid induction rates. *Frontiers in Plant Science*, 13: 892055.
- Mirdita V., Schipprack W., Melchinger A.E.**, 2014. Identification of *in vivo*-induced haploid seeds in maize based on oil content. In *50th Annual Illinois Corn Breeders School*, March 3, 2014, Illinois, The Illinois Maize Breeding and Genetics Laboratory: 87-105.
- Molenaar W.S., Schipprack W., Brauner P.C., Melchinger A.E.**, 2019. Haploid male fertility and spontaneous chromosome doubling evaluated in a diallel and recurrent selection experiment in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 132: 2273-2284.
- Molenaar W.S., Schipprack W., Melchinger A.E.**, 2018. Nitrous oxide-induced chromosome doubling of maize haploids. *Crop Science*, 58 (2): 650-659.
- Nair S.K., Chaikam V., Gowda M., Hindu V., Melchinger A.E., Boddupalli P.M.**, 2020. Genetic dissection of maternal influence on *in vivo* haploid induction in maize. *Crop Journal*, 8 (2): 287-298.
- Nanda D.K. & Chase S.S.**, 1966. An Embryo Marker for detecting monoloids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Science*, 6: 213-215.
- Piskorz E.W., Xu L., Ma Y., Jiang H.**, 2023. Doubled-haploid induction generates extensive differential DNA methylation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 74 (3): 835-847.
- Porotnikov I.V., Puykkenen V.P., Antonova O.Y., Mitrofanova O.P.**, 2022. The efficiency of molecular markers of the SKr suppressor gene that determines the crossability of common wheat with rye. *Ecological Genetics*, 20 (3): 203-214.
- Prasanna B.M., Vijay C., George M.**, 2012. *Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice*. CIMMYT, Mexico, D.F., Mexico, 51 p.
- Prigge V. & Melchinger A.E.**, 2012. Production of haploids and doubled haploids in maize. In Loyola-Varga V. & Ochoa-Ajejo N. (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (Third edit, Vol. 877). Humana Press, Totowa, NJ, pp. 161-172.
- Prigge V., Sánchez C., Dhillon B. S., Schipprack W., Araus J. L., Bänziger M., Melchinger A.E.**, 2011. Doubled haploids in tropical maize: I. Effects of inducers and source germplasm on *in vivo* haploid induction rates. *Crop Science*, 51 (4): 1498-1506.
- Qu Y., Liu Z., Zhang Y., Yang J., Li H.**, 2021. Improving the sorting efficiency of maize haploid kernels using an NMR-based method with oil content double thresholds. *Plant Methods*, 17 (2): 1-15.
- Randolph L.F.**, 1932. Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 18: 222-229.
- Rangari S.K., Kaur Sudha M., Kaur H., Uppal N., Singh G., Vikal Y., Sharma P.**, 2023. DNA-free genome editing for *ZmPLA1* gene via targeting immature embryos in tropical maize. *GM Crops and Food*, 14 (1): 1-7.
- Ren J., Wu P., Tian X., Lübberstedt T., Chen S.**, 2017. QTL mapping for haploid male fertility by a segregation distortion method and fine mapping of a key QTL *qhmf4* in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 130: 1349-1359.
- Ribeiro C.B., Pereira F.deC., Filho L.daN., Rezende B.A., Dias K.O.dasG., Braz G.T., Ruy M.C., Silva M.B., Cenzi G., Techio V.H., de Souza J.C.**, 2018. Haploid identification using tropicalized haploid inducer progenies in maize. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 18 (1): 16-23.
- Röber F.K., Gordillo G.A., Geiger H.H.**, 2005. *In vivo* haploid induction in maize - performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica*, 50: 275-283.
- Rosa J.C., Uhdre R.S., Faria M.V., Barth Pinto R.J., Rossi R.M., Medina Neto A., Scapim C.A.**, 2023. A new approach to Fourier transforms Raman: Identification of haploids in maize (*Zea mays*). *Plant Breeding*, 142 (5): 632-638.
- Rotarencu V., Dicu G., State D., Fuia S.**, 2010. New inducers of maternal haploids in maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 84: 7 pp.
- Sabadin F., Galli G., Borsato R., Gevartosky R., Campos G.R., Fritsche-Neto R.**, 2021. Improving the identification of haploid maize seeds using convolutional neural networks. *Crop Science*, 61 (4): 2387-2397.
- Sanei M., Pickering R., Kumke K., Nasuda S., Houben A.**, 2011. Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (33).
- Sekiya A., Pestana J., Silva M., Krause M., Silva C., Ferreira J.**, 2020. Haploid induction in tropical supersweet corn and ploidy determination at the seedling stage. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 55.
- Shao C.**, 2003. Identification haploid with high oil xenia effect in maize. *Acta Agronomica Sinica*, 29 (4): 587-590.
- Shatskaya O.A., Zabirowa E.R., Shcherbak V.S., Chumak M.V.**, 1994. Mass induction of maternal haploids in corn. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 68 (51).
- Tian X., Qin Y., Chen B., Liu C., Wang L., Li X., Dong X., Liu L., Chen S.**, 2018. Hetero-fertilization together with failed egg-sperm cell fusion supports single fertilization involved in *in vivo* haploid induction in maize. *Journal of Experimental Botany*, 69 (20): 4689-4701.

- Trampe B., Batiru G., Pereira da Silva A., Frei U.K., Lübberstedt T., 2022. QTL mapping for haploid inducibility using genotyping by sequencing in maize. *Plants*, 11, 878.
- Trampe B., dos Santos I.G., Frei U.K., Ren J., Chen S., Lübberstedt T., 2020. QTL mapping of spontaneous haploid genome doubling using genotyping-by-sequencing in maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 133: 2131-2140.
- Transon J. & Defourny P., 2017. *Corn crops in Bukidnon, Philippines: Synthesis from field survey and literature* (Issue February).
- Trentin H.U., Batiru G., Frei U.K., Dutta S., Lübberstedt T., 2022. Investigating the effect of the interaction of maize inducer and donor backgrounds on haploid induction rates. *Plants*, 11 (12): 10 pp.
- Trentin H.U., Frei U.K., Lübberstedt T., 2020. Breeding maize maternal haploid inducers. *Plants*, 9 (5): 614.
- Trentin H.U., Krause M.D., Zunjare R.U., Almeida V.C., Peterlini E., Rotareno V., Frei U.K., Beavis W.D., Lübberstedt T., 2023. Genetic basis of maize maternal haploid induction beyond *MATRILINEAL* and *ZmDMP*. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1218042.
- Trentin H.U., Yavuz R., Demail A., Frei U.K., Dutta S., Lübberstedt T., 2023. A comparison between inbred and hybrid maize haploid inducers. *Plants*, 12 (5): 11 pp.
- Tyrnov V.S. & Zavalishina A.N., 1984. Inducing high frequency of matroclinal haploids in maize [in Russian]. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 276: 735-738.
- Wang H., Liu J., Xu X., Huang Q., Chen S., Yang P., Chen S., Song Y., 2016. Fully automated high-throughput NMR system for screening of haploid kernels of maize (corn) by measurement of oil content. *PLoS ONE*, 11 (7): 1-14.
- Wang N., Gent J.I., Dawe R.K., 2021. Haploid induction by a maize *cenH3* null mutant is induction by a maize *cenH3* null mutant. *Science Advances*, 7 (4): 7 pp.
- Wang S. & Ouyang K., 2023. Rapid creation of *CENH3* mediated haploid induction lines using a cytosine base editor (CBE). *Plant Biology*, 25: 226-230.
- Wang Z., Chen M., Yang H., Hu Z., Yu Y., Xu H., Yan S., Yi K., Li J., 2023. A simple and highly efficient strategy to induce both paternal and maternal haploids through temperature manipulation. *Nature Plants*, 9: 699-705.
- Wu M.F., Goldshmidt A., Ovadya D., Larue H., 2020. I am all ears: Maximize maize doubled haploid success by promoting axillary branch elongation. *Plant Direct*, 4 (5): 1-8.
- Xu X., Li L., Dong X., Jin W., Melchinger A.E., Chen S., 2013. Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through *in vivo* induction of a maternal haploid in maize. *Journal of Experimental Botany*, 64 (4): 1083-1096.
- Yang J., Liu Z., Qu Y., Zhang Y., Li H., 2022. Cytological study on haploid male fertility in maize. *Journal of Integrative Agriculture*, 21 (11): 3158-3168.
- Zhao X., Xu X., Xie H., Chen S. & Jin W., 2013. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers. *Plant Physiology*, 163 (2): 721-731.
- Zhong Y., Liu C., Qi X., Jiao Y., Wang D., Wang Y., Liu Z., Chen C., Chen B., Tian X., Li J., Chen M., Dong X., Xu X., Li L., Li W., Liu W., Jin W., Lai J., Chen S., 2019. Mutation of *ZmDMP* enhances haploid induction in maize. *Nature Plants*, 5 (6): 575-580.
- Zhou H., Wang Q., Zhou Z., Li X., Sun Y., Shan G., Zheng X., Chen Q., Liu H., Wang W., Shao C., 2022. Genome-wide DNA methylation and gene expression patterns of androgenetic haploid tiger pufferfish (*Takifugu rubripes*) provide insights into haploid syndrome. *Scientific Reports*, 12 (8252).
- Zhu Y., Zhou X., Yao L., An X., 2023. *Maize haploid seed selection method based on CNN-SVM*. Proc. SPIE 12716, Third International Conference on Digital Signal and Computer Communications (28 July 2023), Xi'an, China.

Technological achievements in doubled haploid maize breeding: Vietnam and the world

Ha Van Gioi, Nguyen Xuan Thang, Luong Thai Ha, Nguyen Duc Thanh, Nguyen Thi Nhu Quynh

Abstract

Doubled haploid (DH) technology is used broadly and extensively in maize breeding. By taking advantage of the ability to form a 100% inbred line in a very short breeding cycle and to fix the desired genotype in one chromosome regardless of dominance or recessive gene expression, the DH technique is integrated into many new breeding methodologies like genome editing, cytoplasmic male sterility conversion. With the latest understanding of the genetic constitution of haploid inducer genes and QTLs, the cooperation of many phenotypic markers with the *R1-nj* marker for accurate identification of putative haploid, new and improved methods for chromosome doubling, which is safer and more cost-effective, improve Haploid Induction rate (HIR) and DH technology has gained increasing potential in maize breeding. Despite extensive research and cooperation by scientists worldwide, DH still faces many challenges. This paper reviews DH technology, including the importance of improved research steps, potential for future application, and challenges in Viet Nam and globally.

Keywords: DH, doubled haploid, inducer line

Ngày nhận bài: 14/10/2025

Ngày phản biện: 24/12/2025

Người phản biện: TS. Lê Duy Đức

Ngày duyệt đăng: 25/12/2025