

单倍体的产生途径及其在作物遗传育种中的应用

相志国, 海燕, 康明辉, 赵永英
(河南省农业科学院 小麦研究中心, 河南 郑州 450002)

摘要: 综述了诱导单倍体产生的花药培养、远缘杂交、诱导系、着丝粒介导等途径, 及其在加速育种进程、构建 DH 群体、非同源染色体配对研究、转基因供体、突变体研究及基因组测序中的作用。
关键词: 单倍体; 花药培养; 远缘杂交; 诱导系; 着丝粒介导
中图分类号: S335.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)11-0017-05

Generation Ways of Haploid and Its Application in Crop Genetics and Breeding

XIANG Zhi-guo, HAI Yan, KANG Ming-hui, ZHAO Yong-ying
(Wheat Research Center, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In this paper, the haploid generation ways and its potential application in plant genetics and breeding are reviewed. Haploid can be gained by different ways, such as anther culture, distant hybridization, inducer line, centromere mediation and so on. Haploid has important actions in accelerating breeding process, building DH population, studies on non-homologous chromosome pairing, transgenic donors and mutants, and genome sequencing.
Key words: Haploid; Anther culture; Distant hybridization; Inducer line; Centromere mediation

作物正常的生长发育均是以体细胞双倍体的形式存在, 单倍体只是在特定的发育阶段特定组织中(如配子体)才存在。单倍体染色体数目为正常体细胞染色体数目的 1/2。在自然界中, 作物自发形成单倍体植株的几率很低, 一般不超过 0.1%, 但通过一些人为手段, 可以从不同途径来获得单倍体。单倍体中没有显隐性基因的干扰, 在加速育种材料纯合, 提高育种选择效率中具有重要作用。单倍体的人工诱导成功, 使其在规模化商业育种中发挥了重要作用。鉴于单倍体在作物遗传育种研究中的独特作用, 综述了单倍体的产生途径及其在作物遗传育种中的应用。

1 单倍体产生的途径

自 1921 年 Bergner 在被子植物曼陀罗 (*Datura innoxia*) 中发现并确定第 1 株单倍体植株以来, 人

们已在玉米、烟草、棉花、水稻、油菜、西红柿和小麦等一系列高等植物中鉴定出了单倍体, 但单倍体自然发生机率极低, 远不能适应规模化商业育种的应用。根据来源和操作方式不同, 人工诱导单倍体可以分为花药(小孢子)培养、远缘杂交、诱导系、着丝粒诱导等途径。

1.1 花药(小孢子)培养途径

20 世纪 60 年代, 印度学者 Guha 和 Maheshwari 用毛叶曼陀罗的花药进行人工离体培养, 成功诱导获得了单倍体植株, 其后其他科学家在多种植物中得到证实, 从而揭示了通过试验途径可以获得大量不同植物的单倍体, 这极大地促进了人工诱导单倍体及其利用的研究。多个国际研究机构都高度重视该项技术的育种应用价值, 先后在水稻、小麦、玉米、油菜、苜蓿以及许多药用植物中获得单倍体植株用于品种改良, 并获得了一些优良品种应用于生产。

收稿日期: 2011-06-13
基金项目: 河南省科技重点攻关项目(0821021440012)
作者简介: 相志国(1977-), 男, 山西运城人, 助理研究员, 博士, 主要从事作物单倍体与染色体工程的遗传育种研究。
E-mail: xiangzhuying@gmail.com

目前,全世界已对 34 科 300 多种植物物种诱导获得了单倍体^[1]。

花药培养获得单倍体的主要步骤为:选择适宜的小孢子发育时期,禾本科一般为单核靠边期。适当的预处理,主要包括低温处理、高温处理和饥饿处理等。通过适宜的诱导和分化培养基和光暗处理,在我国小麦上已开发出 C17 培养基、癸培养基、W14 培养基,水稻上有 N6 及其改良培养基等^[2-3]。

花药培养目前仍是我国单倍体育种的主要技术,采用此技术育成的水稻品种超过 60 个、小麦品种超过 20 个。但由于诱导率、分化率受到基因型限制,使整体上获得绿苗率较低,且产生大量白化苗,限制了其在作物育种上的广泛应用。

游离小孢子培养技术是在花药培养基础上发展起来的一种单倍体诱导技术。与花药培养相比,它可以大幅度提高接种效率,有利于大规模商业化单倍体育种的应用。同时,由于小孢子群体解除了花药壁的干扰作用,是研究配子体发育、胚胎发生机制的理想材料^[4]。

小孢子培养的育种应用,目前国内主要集中在油菜等十字花科作物中,在禾本科作物小麦和大麦中也有成功的报道,但都只是集中在个别易诱导的特殊基因型中,远达不到规模化的育种应用。但从目前研究进展来看,近几年明显加快,所得的绿苗诱导率远高于花药培养中的诱导率。相信随着生物技术的不断发展,小孢子培养技术会在主要作物商业化单倍体育种中发挥更大作用^[5]。

1.2 远缘杂交途径

此途径可分为人工合成型和染色体消除型 2 种。人工合成型主要应用于一些异源多倍体如小麦、油菜等中。普通小麦是异源六倍体,由四倍体小麦(AABB)与二倍体节节麦(DD)杂交而后加倍获得的,其单倍体的染色体组成应为三倍体(ABD)。将此 2 个祖先种杂交获得杂种 F_1 ,即可得到小麦的单倍体(ABD)^[6]。

染色体消除型远缘杂交法是在小麦、大麦等作物中发现并得到应用。如在小麦中,以球茎大麦、玉米、薹苳、珍珠粟等作物的花粉与小麦杂交,由于亲缘关系远,杂种胚发育过程中外源染色体有消失现象,经过胚拯救就可获得单倍体植株。Kasha 等用球茎大麦作父本与栽培大麦授粉后,得到只有栽培大麦基因组的双单倍体(15.5%)和单倍体(11.0%)植株^[7]。但由于小麦染色体 5B 和 5A 上的显性 *Kr1* 和 *Kr2* 基因控制着小麦基因型远缘杂交的不亲和性,限制了球茎大麦技术在小麦单倍体育种上

的应用。为寻找更有效的授粉者,Laurie 等研究表明,玉米对小麦的 *Kr* 基因位点不敏感,玉米与小麦的远缘杂交杂合子中玉米染色体能够自发消除,从而诱导小麦获得单倍体,且得胚率较高^[8]。但小麦与玉米等远缘种存在的播期不同、花期难遇等因素也限制了该方法的广泛应用。为了克服花期不遇,采用贮存 5 个月的珍珠粟与小麦杂交获得了小麦单倍体,且得胚率高达 27.6%^[9]。应用花期长、花粉多的薹苳、鸭茅状摩擦禾、小黑麦作为花粉供体,也成功诱导出小麦单倍体植株,并且也具有杂交后成胚率高的特点^[10-12]。印度学者发现,白茅也可以实现与小麦的杂交获得单倍体,且白茅具有在自然生长条件下与小麦花期相遇的优点^[13],这在规模化单倍体育种应用中将具有重要作用。

1.3 诱导系途径

诱导系具有杂交后诱导母本雌配子体形成高频单倍体的能力,是目前玉米单倍体诱导的主要方法。1950 年,Edward H. Coe 发现了一个高频率诱发单倍体的材料,并对其导入了控制籽粒性状和植株性状的 2 种显性标记基因(*R-nj*、*PI*),又经过 2 次回交和 2 次自交,定名为 Stock6。以 Stock6 作父本,与被诱导材料进行杂交,平均单倍体诱导率为 2.52%。由于导入了 *R-nj* 基因和 *PI* 基因,母本植株会产生不同类型的籽粒,其中籽粒类型为白色硬粒、具有紫色顶和无色胚芽尖的是单倍体种子。由于 Stock6 本身存在花粉量少,自交结实性差等缺点,国内外多个单位都以 Stock6 为基础进行改良以获得新的诱导系,如国外的 SW14、ZMs 等,国内的高诱 1 号、吉高诱 3 号等^[14-15]。玉米诱导系诱导产生单倍体的细胞学机制目前仍不能确定,需要进一步研究。

1.4 着丝粒介导途径

此方法目前只在拟南芥中得到证实,通过改变着丝粒中特异性蛋白 CENH3 的组成,用转基因的方法获得 CENH3 表达发生改变的基因型,以此为母本与野生型杂交,可使其基因组在合子中消失,而只保留野生型基因组的单倍体植株,最高可获得高达 45% 的野生型单倍体植株。采用此方法与四倍体拟南芥杂交,也成功获得了倍性减半的二倍体类型。这种方法具有诸多优点,但最大的优点是不需要组培,只需要与诱导系杂交即可得到单倍体。由于 CENH3 蛋白在真核生物中普遍存在,所以这种方法可以推广到所有植物单倍体诱导中^[16]。

1.5 其他诱导途径

其他途径包括化学药剂处理法、延迟授粉法、特

殊细胞质诱导法、子房培养法、棉花中的半配合法等单倍体诱导途径,但由于在实际育种中研究和应用的不多,这里不再赘述。

2 单倍体在遗传育种研究中的作用

2.1 快速纯化育种材料,加快育种进程

单倍体染色体数目为正常植株染色体数目的一半,理论上如果两亲本有 n 对可自由组合的不同等位基因,从常规 F_2 代选出所需基因型的频率为 $1/2^{2n}$,而由单倍体选育频率为 $1/2^n$,即比常规选育效率高 2^n 倍,随着 n 值的增大,选择效率提高越多,且不存在显隐性互作。另外花药培养育种是以 H_2 代纯合株系的群体性状表现进行选择,而不是以单株进行选择,提高了选择的准确性及可靠性。我国自 20 世纪 70 年代开始进行花药培养育种研究,已取得重大成就,以水稻和小麦为代表的作物花药培养育种研究与应用处于世界领先地位,并成功与常规杂交育种、远缘杂交育种及转基因技术相结合,发展形成了一套较完整的育种技术体系。例如,河南省农业科学院小麦细胞工程育种室选育的花培系列小麦新品种正是这种理论与育种实践结合的成功实例^[17]。

2.2 构建 DH 群体,进行农艺性状的 QTL 定位分析

DH 群体由于属于永久性分离群体,群体中各系的遗传组成固定,可通过种子繁殖代代相传,可以进行多年多点重复鉴定试验,特别适用于受多基因控制或易受环境影响的性状的研究。由于 DH 群体可以交流共享,有利于学科协作攻关,使其成为最受青睐的构建作图群体之一。Cuthbert 等利用构建的 DH 群体通过 6 点连续 2 a 的鉴定试验,对春小麦的产量及其相关性状进行 QTL 定位研究,共发现 5 个 QTL 分子标记可以解释 34.4% 的产量贡献^[18]。Chu 等利用人工合成小麦与小麦品种构建 DH 群体,对成株叶锈病抗性基因进行 QTL 定位研究^[19]。田纪春等利用河南省农科院小麦细胞工程育种室构建的由花培 3 号与豫麦 57 号衍生的 DH 群体,对其产量和品质等多个农艺性状进行了 QTL 定位研究^[20-23]。

2.3 用于单倍体中非(部分)同源染色体间配对、重组的研究

由于单倍体中不存在同源染色体,但在其减数分裂过程中非(部分)同源染色体间可能发生配对、联会与重组。在二倍体物种如水稻的单倍体中,由于各染色体以单倍形式存在,彼此间没有同源性,但

在观察的 70 个减数分裂细胞中发现 45 个细胞中出现二价体,49 个细胞中出现多价体,特别是在染色体 9 与 10、11 与 12 中形成了高频率的非同源二价体,甚至在终变期和中期 I 仍可看到染色体 11 与 12 二价体之间交叉的发生^[24]。在异源四倍体甘蓝油菜 *Brassica napus* (AACC; $2n=38$) 的单倍体中,不但可以观察到 A—C 部分同源染色体间发生配对,还可以观察到非同源染色体如 A—A 间、C—C 间发生配对。这些非(部分)同源染色体间发生的配对和重组,已被证明是染色体间发生重排的重要原因^[25]。单倍体中非(部分)同源染色体间配对与重组的发生,有助于通过染色体重排产生新的基因型,增加作物遗传变异,丰富种质资源。注重对此问题的深入研究,将有助于染色体组间同源关系及染色体组内各染色体间进化关系的研究。

2.4 用于转基因供体及其纯合研究

单倍体在转基因的应用研究中主要有 2 种方式,一种是以单倍体胚性细胞为转基因的供体材料直接进行遗传转化,再经过加倍即可迅速得到纯合的转基因株系。陈彩艳等通过优化水稻花培诱导培养基的成分,延长花药愈伤组织的培养时间和降低共培养过程中农杆菌浓度等,成功地建立了以水稻花药愈伤组织为受体的农杆菌转化体系。并将白叶枯病抗性基因 *Xa21* 作为该体系的模式基因导入到多个粳稻品种的花药愈伤组织中,共得到了 145 个独立的转基因株系,其中 43 个经鉴定为纯合的加倍单倍体转基因株系^[26]。这种方法能否得到纯合转基因植株主要取决于供体花药的倍性,如果供体花药愈伤组织已加倍,则可能得到转基因的杂合体,如果供体是单倍体则通过转基因后再加倍则可得到纯合的转基因株系。由于有些作物花药愈伤组织的诱导率较低,不能提供大量单倍体愈伤供体,限制了单倍体作为遗传转化直接供体的应用。为了克服不足,另一种方法就是将杂合的转基因植株进行单倍体诱导,以快速获得纯合的转基因植株。朱丽等采用农杆菌介导的水稻转化体系,筛选阳性转基因植株,按单株进行花药培养,快速得到无选择标记而目的基因阳性的转基因纯合植株,得率为 9.87%^[27]。通过含抗除草剂 *pat* 基因的杂合转基因玉米与易花培的玉米杂交,经过花培,也迅速获得了纯合的转基因玉米^[28]。

2.5 用于突变体的研究

单倍体在突变体研究中有诸多优势,一方面单倍体不存在显隐性,使获得的显隐性突变系均在当代表现出来,另一方面,通过对发生突变的单倍体植

株进行加倍可迅速获得纯合的突变二倍体。第三,以单倍体进行突变研究可以减少嵌合体的出现。在目前突变研究中主要有 2 种形式,一是对种子进行突变处理,在 M_1 代进行单倍体诱导,而后加倍获得纯合的突变体。应用单倍体诱导法获得的突变体(1:1 分离)比 M_1 自交选择 M_2 的方法(3:1 分离)频率要高,这在小麦、大麦和水稻突变研究中都得到证实和应用^[29]。二是对单倍体直接进行突变处理,这在油菜小孢子诱导突变提高脂肪酸含量研究中得到应用,共获得油酸含量提高的突变体 197 份,低亚油酸突变体 69 份和低饱和脂肪酸突变体 157 份^[30]。

2.6 用于测序工作

单倍体中等位基因以单倍型的形式存在,所以在序列分析的时候不存在不同等位基因间的干扰问题,使序列分析问题大大简化。如马铃薯单倍体用于基因组草图的构建,以单倍体马铃薯为材料来降低基因组分析的复杂度,应用这一策略极大地提高了测序的进程,提前 2 a 完成了马铃薯全基因组的测序^[31]。相信应用单倍体测序策略,对未来其他基因组复杂作物的全基因组测序将发挥更大作用。

3 展望

随着科学研究的进展,对于主要农作物相信都能依据各自的生物学特点,筛选出适宜的单倍体诱导途径和条件,并加大对单倍体诱导原理的研究,将不同的高效单倍体诱导技术应用于规模化商业育种中。同时,可以利用单倍体在遗传研究中相对于二倍体的独特优越性,探讨非同源染色体间配对、重组的机制,加速其在转基因供体和突变体供体中的应用研究,以及复杂生物基因组测序中的应用研究。

参考文献:

- [1] 欧阳俊闻,胡含,庄家骏,等.小麦花粉植株的诱导及其后代的观察[J].中国科学,1973,3(1):72-82.
- [2] 隋新霞,樊庆琦,李根英,等.小麦花药培养研究进展[J].麦类作物学报,2005,25(4):127-131.
- [3] 海燕,康明辉,赵永英,等.河南省农科院小麦花药培养技术及其应用研究概况[J].河南农业科学,2009(9):31-33.
- [4] 王宏芝.小麦游离小孢子培养研究进展[J].麦类作物学报,2002,22(1):91-94.
- [5] Hu T C, Kasha K J A. Cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat(*Triticum aestivum* L.) cv. Chris [J]. Genome, 1999,42:432-441.
- [6] Zhang L Q, Yan Z H, Dai S F, et al. The crossability of *Triticum turgidum* with *Aegilops tauschii* [J]. Cereal Res Comm, 2008, 37: 417-427.
- [7] Kasha K I, Kao I N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Nature, 1970, 225: 874-876.
- [8] Laurie D A, Bennett M D. The effect of the cross ability loci *Kr1* and *Kr2* on fertilization frequency in hexaploid wheat × maize crosses [J]. Theor Appl Genet, 1987(73): 403-409.
- [9] Inagaki M N, Mujeeb-Kazi A. Production of polyhaploids of hexaploid wheat using stored pearl millet pollen [J]. Euphytica, 1998, 100: 253-259.
- [10] Mochida K, Tsujimoto H. Production of wheat doubled haploids by pollination with Job's tears (*Coix lacrymal-jobi* L.) [J]. The Journal of Heredity, 2001, 92(1): 81-83.
- [11] 欧阳平,李大玮,邱纪文.由普通小麦与鸭茅状摩擦禾杂交获得小麦单倍体和杂种植株[J].科学通报,1996,41(17):1615-1618.
- [12] Pratap A, Sethi G S, Chaudhary H K. Relative efficiency of different Gramineae genera for haploid induction in triticale and triticale × wheat hybrids through the chromosome elimination technique [J]. Plant Breeding, 2005, 124(2): 147-153.
- [13] Chaudhary H K, Sethi G S, Singh S, et al. Efficient haploid induction in wheat by using pollen of *Imperata cylindrica* [J]. Plant Breeding, 2005, 124(1): 96-98.
- [14] 赵延明,董树亨.玉米单倍体育种技术研究与应用进展[J].玉米科学,2007,15(5):60-64.
- [15] 才卓,徐国良,Chang M T.玉米单倍体育种研究进展[J].玉米科学,2008,16(1):1-5.
- [16] Ravi M, Chan S W L. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination [J]. Nature, 2010, 464: 615-618.
- [17] 康明辉,海燕,黄冰艳,等.从花培品种的选育谈小麦花培育种策略[J].麦类作物学报,2009,29(3):548-551.
- [18] Cuthbert J L, Somers D J. Molecular mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2008, 117: 595-608.
- [19] Chu C G, Friesen T L, Xu S S, et al. Identification of novel QTLs for seedling and adult plant leaf rust resistance in a wheat doubled haploid population [J]. Theor Appl Genet, 2009, 119: 263-269.
- [20] Zhang K P, Tian J C. Mapping QTLs with epistatic effects and QTL × environment interactions for plant height using a doubled haploid population in cultivated wheat [J]. J Genet Genomics, 2008, 2(35): 119-

- 127.
- [21] Zhang K P, Tian J C. A Genetic map constructed using a doubled haploid population derived from two elite Chinese common wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(8):1-10.
- [22] Zhang K P, Zhao L, Chen G F, *et al.* Detection of quantitative trait loci for heading date based on the doubled haploid progeny of two elite Chinese cultivated wheats[J]. Genetica, 2009, 135:257-265.
- [23] Zhang K P, Tian J C. Molecular genetic analysis of flour color using a double haploid population in bread wheat[J]. Euphytica, 2009, 165:471-484.
- [24] Gong Z, Liu X, Tang D, *et al.* Non-homologous chromosome pairing and crossover formation in haploid rice meiosis[J]. Chromosoma, 2011, 120:47-60.
- [25] Nicolas S D, Mignon G L, Eber F, *et al.* Homeologous recombination plays a major role in chromosome rearrangements that occur during meiosis of brassica napus haploids[J]. Genetics, 2007, 175:487-503.
- [26] 陈彩艳, 肖晗, 张文利, 等. 以花药愈伤组织为受体的水稻转化和 RNA 干扰研究[J]. 中国科学:生命科学, 2006, 36(4):289-301.
- [27] 朱丽, 傅亚萍, 刘文真, 等. 利用共转化和花药培养技术快速获得无选择标记的三价转基因水稻[J]. 中国水稻科学, 2007, 21(5):475-481.
- [28] Aulinger I E, Peter S O, Schmid J E, *et al.* Rapid attainment of a double haploid line from transgenic maize plants by means of anther culture[J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2003, 39:165-170.
- [29] Szarejko I, Forster B P. Doubled haploidy and induced mutation[J]. Euphytica, 2007, 158:359-370.
- [30] Ferrie A M R, Taylor D C, Mackenzie S L, *et al.* Microspore mutagenesis of *Brassica* species for fatty acid modifications; a preliminary evaluation[J]. Plant Breeding, 2008, 127:501-506.
- [31] 潘锋. 马铃薯基因组序列框架图全球发布[N/OL]. http://news.sciencenet.cn/html_news/2009-09-22.shtml

(上接第 3 页) 目标必须包括以下新的内容。一是母本种子角质化程度高、籽粒类型偏圆形。二是株高、穗位适中, 茎秆坚韧、根系发达, 抗倒能力强。三是抗病抗虫, 尤其要抗青枯病和抗玉米螟。四是穗位整齐, 苞叶长短适中、厚度偏薄、后期松开。五是中早熟, 春播区玉米生育期应短于 125 d, 夏播区玉米生育期短于 100 d, 籽粒灌浆快、后期脱水快, 成熟时籽粒含水量降至 20% 左右。六是母本自交系上部节间长, 顶部叶片短而小, 雄穗小、分枝少。

参考文献:

- [1] 王统武. 农业机械化和玉米商业化育种[J]. 玉米科学, 2006, 14(增刊):33-34.
- [2] 冯家中, 付立波. 农业机械收获对玉米育种的要求[J]. 作物杂志, 2009(11):27.
- [3] 杨耿斌. 玉米育种目标与机械化收获[J]. 农业科技通讯, 2009(9):162-163.
- [4] 赵延明, 董树亭, 宋希云, 等. 玉米育种目标与生产机械化[J]. 山东农业科学, 2007(4):24-26.
- [5] 谢琼, 章惠全, 刘琳. 我国玉米收获机械化发展现状及展望[J]. 农业科技与装备, 2009(6):104-106.
- [6] 李文阁, 邵连存. 对我国目前玉米育种目标的思考[J]. 玉米科学, 2005, 13(增刊):7-8, 11-13.
- [7] 卢勇涛, 李亚雄, 李斌, 等. 制种玉米人工去雄与机械去雄特点对比分析[J]. 新疆农机化, 2010(1):25-26.
- [8] 佰庆英, 周美华. 玉米生产全程机械化技术[J]. 现代农业科技, 2009(20):90-90, 92.
- [9] 石文廷, 孙敏. 晋北旱地玉米穴灌地膜种植技术探讨[J]. 山西农业科学, 2009, 37(7):20-21, 33.
- [10] 刘宁莉, 石文廷, 张锐. 旱地玉米少耕穴灌聚肥节水技术应用效果简析[J]. 山西农业科学, 2011, 39(6):546-548.
- [11] 张伟, 张冬梅, 樊修武, 等. 不同耕作方式对旱地土壤环境和玉米产量的影响[J]. 山西农业科学, 2011, 38(7):44-47.