

万丽丽,王转茸,范志雄,等.单倍体诱导创建二倍体技术在油菜遗传育种中的研究进展[J].江苏农业科学,2020,48(10):38-45.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.10.007

单倍体诱导创建二倍体技术在油菜遗传育种中的研究进展

万丽丽¹,王转茸¹,范志雄²,辛强³,洪登峰³,杨光圣³,孙玉宏¹,谭庆¹

(1. 武汉市农业科学院作物研究所作物遗传改良中心,湖北武汉 430065; 2. 安徽省农业科学院作物研究所,安徽合肥 230001;
3. 华中农业大学植物科学技术学院,湖北武汉 430070)

摘要:单倍体诱导创建二倍体的技术体系主要包括 2 种类型。(1)对植物中雄性或者雌性生殖器官进行培养获得具有单套染色体组的组织,经过天然或者加倍剂处理获得二倍体;(2)对 *CENH3* 基因进行修饰获得单倍体诱导系,利用单倍体诱导系与不同材料杂交获得后者的单倍体,进而加倍成二倍体。在油菜中应用最广泛的单倍体诱导创建二倍体植株的技术是小孢子培养方法,其过程受到 3 个因素的影响,分别为小孢子胚发生能力、小孢子天然加倍和加倍剂处理后的加倍效率、从胚再生成完整植株的能力。经过多年研究,在油菜中建立的小孢子诱导创建二倍体的技术为油菜遗传育种研究提供了重要的技术支持。小孢子和小孢子培养得到的胚均能用于创造突变体及遗传转化试验。通过遗传学方法定位了决定油菜小孢子胚发生、天然加倍以及胚状体直接成苗的数量性状基因座(QTLs),可在不同群体中验证候选基因。深入挖掘调控小孢子胚发生和再生成苗的分子机制,分析胚性细胞发育的转变、起始细胞的分化以及胚形态发生的基因调控网络,进而为理解油菜单倍体诱导以及二倍体发生的作用机制提供依据。随着植物单倍体诱导发生的分子机制被逐步揭示,在油菜中对与拟南芥染色体减数分裂相关的同源基因进行修饰能够获得单倍体诱导系,将其与待改良的父母本进行杂交可快速获得具有不同亲本背景的单倍体,经过加倍剂处理可快速获得纯系,单倍体诱导技术能够用于反向育种研究以及品种的遗传改良。

关键词:双单倍体;油菜;遗传育种;小孢子培养;遗传转化;单倍体诱导;数量性状基因座(QTLs);分子机制

中图分类号: S634.303.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)10-0038-08

单倍体是含有单套染色体组的细胞或植株,由单倍体经过染色体加倍后得到的二倍体被称为双单倍体(double haploid, DH)。单倍体或双单倍体的获得是单倍体育种的基础,通常可以通过不同的方法来诱导单倍体形成,如将植株离体的花药或者分离的小孢子进行培养,形成胚状体或者经过愈伤组织脱分化成植株,或将植物未受精的胚珠或者子房进行离体培养,使胚囊细胞发育成胚,继而分化成单倍体植株。在油菜中应用最为广泛的单倍体诱导创建二倍体的技术体系是通过分离油菜花蕾中的单倍体小孢子,并对其进行加倍处理、成胚培养和胚性转换成苗,最终获得双单倍体植株的过程。单倍体诱导小孢子胚发生途径主要受供体植物的基因型、生长环境、选择的小孢子发育阶段(如单核

小孢子的胚发生能力最强)、样品预处理方法、胚发生培养基组分以及小孢子培养的温度和光照度的影响^[1]。通过单倍体诱导所得到的双单倍体的优势是基因型纯合,通过其创建的群体能够直接用于育种以及基因定位研究^[2]。单倍体小孢子由于具有细胞类型一致性、体积小等优点,适合基因突变和遗传转化研究。小孢子染色体加倍以及植株再生的试验体系等重要因素决定了双单倍体的创建能否成功。大量研究表明,单倍体以及双单倍体技术已成为植物尤其是芸薹属植物遗传学和基因组学研究的重要工具^[3-8]。DH 育种技术目前已经被用于超过 250 种作物的育种过程,为植物的遗传研究和品种选育提供了有利条件。近年来,研究者们对玉米单倍体诱导系的分子机制进行了大量研究,并在模式作物拟南芥中开发了着丝粒介导染色体消失的技术,通过修饰着丝粒相关蛋白质的重要基因,使得转基因亲本的染色体被选择性丢失,进而诱导出父本或者母本单倍体^[9]。这些基因广泛存在于真核生物中,理论上在作物中应用着丝粒介导

收稿日期:2019-04-29

基金项目:中国博士后科学基金第 65 批面上资助项目(编号:2019M652726);武汉市农业科学院博士后项目。

作者简介:万丽丽(1982—),女,湖北武汉人,博士,农艺师,主要从事油菜分子设计育种研究。E-mail:wanlili13226@163.com。

法能够产生单倍体后代。

1 小孢子诱导单倍体创建 DH 系的应用现状

1.1 小孢子诱导获得的双单倍体在油菜育种中的应用

通过双单倍体技术创建油菜 DH 系受到小孢子胚发生能力、小孢子对有丝分裂抑制剂(加倍剂)的敏感性和胚再生能力等 3 个因素的影响。由于不同基因型材料受以上 3 个因素的影响且遗传模式存在显著差异,研究人员对不同基因型材料探索出不同的试验条件,以获得较高的加倍成苗率^[10-12]。为进一步优化双单倍体技术,研究者们挖掘了在小孢子培养过程中表现再生能力强的株系作为育种研究的供体。Ferrie 等在甘蓝型油菜中通过小孢子培养获得了胚再生能力强的品种 Topas DH 系用于育种^[13]。在自花授粉或者常异花授粉作物中培育新品种需要 10 年时间,自交授粉 6 代也只能获得 98% 的纯合率;而通过创建 DH 系能将育种时间缩短至 3~4 年,且基因型纯合率为 100%。在开放授粉作物中,DH 植株可以作为亲本自交系用于杂交种制种。此外,构建 DH 系能够固定重要性状以及定位显性和隐性基因或在一个较小群体中进行选择研究。Dirks 等利用 DH 系群体进行反向育种(reverse breeding, RB)^[14],这种育种方法可以从杂交种中分离得到不同来源的亲本材料,但是这种方法并不能完全有效地应用到育种程序中,因为有利的基因重组伴随着不利的连锁累赘,且 DH 技术受到基因型和物种的限制^[15]。Thomas 等总结了 12 种作物中的 200 个 DH 商业种信息,其中甘蓝型油菜有 49 个栽培种,芥菜型油菜中有 2 个栽培种^[16]。目前加拿大育种单位利用 DH 技术选育出了双低优质油菜品种。总之,DH 技术在植物遗传研究和品种选育中的优势表现在以下几个方面:(1)显著缩短育种周期。传统育种须要连续自交多个世代才能选育出纯合度高达 99% 的自交系。(2)简化育种流程。通过 DH 技术的应用,减少了纯系选育所需要的时间、人力资源,降低了成本。(3)提高选育效率。通过结合分子标记辅助选择技术和加代繁育技术提高了选育的效率。(4)符合植物新品种保护中植物新品种测试(DUS 测试)的品种要求。对通过优势组合构建的 DH 群体进行直接评价,能够获得符合品种独特性、一致性和稳定性测试要求的优势组合。

1.2 双单倍体在突变体研究中的应用

化学和物理诱变剂主要有甲基磺酸乙酯(ethylmethane sulfonate, EMS)、乙基亚硝基脲(ethyl nitrosourea, ENU)、叠氮化钠(sodium azide, NaN₃)、N-甲基亚硝基脲(N-methyl nitrosourea, MNU)、γ射线(gamma rays)、X 射线(X-rays)和紫外线(UV)。常规的诱变育种是将种子用诱变剂处理后种植在田间,通过连续多代选择获得新品种^[17],这种方法须要检测和评估大量的突变体,导致育种过程费时费力。种子胚是多细胞,利用诱变剂处理会产生嵌合体或者因重要性状的缺失而失去育种价值的突变材料。单倍体小孢子数量大、所占培养空间小,在诱变剂作用下发生 DNA 损伤修复,经过后期加倍的 DH 植株基因型纯合,能够快速获得隐性或显性突变体,且能够快速剔除具有致死缺陷的隐性突变,减少常规诱变育种从后代中筛选隐性致死突变的程序。前人利用 EMS 诱变油菜小孢子得到 80 000 个油菜单倍体/双单倍体植株,获得了脂肪酸以及农艺性状发生改变的新种质资源。在白菜和芥菜中,应用小孢子诱变技术获得油酸、亚油酸和饱和脂肪酸含量存在显著差异的新材料^[18]。

紫外线是用于植物的一种重要的诱变剂^[19-21],用紫外线处理甘蓝型油菜小孢子所得到的双单倍体经品质分析后发现,不同植物种子的饱和脂肪酸含量不同。Barro 等采用紫外线或者 EMS 诱变剂对埃塞俄比亚芥小孢子进行处理,并对所得加倍体植株收获的种子进行品质分析,结果发现,有些家系的芥酸、硫苷含量存在显著差异^[19,22]。利用紫外线处理油菜小孢子后获得的双单倍体可以快速筛选获得农艺性状改良的植株^[23]。利用冷胁迫处理 UV 诱变的小孢子,评价所得到的纯合家系的耐冷性以及田间综合农艺性状,从而获得耐冷性改良和农艺性状优良的新材料^[23]。草酸是病原菌侵染植物组织所产生的毒性物质,在甘蓝型油菜小孢子培养试验中,单倍体胚在发生过程中会形成愈伤组织,用 EMS 处理这些愈伤组织并将处理后的愈伤组织置于不同浓度的草酸培养基上进行培养,可以快速筛选出抗病性优良的 DH 系^[24]。小孢子诱变也可用于抗除草剂种质资源的筛选,Beversdorf 等将除草剂活性成分加入到培养基中用于突变体的筛选,最终得到抗氯磺隆的油菜^[25-26]。在培养基中加入 4-羟基脯氨酸(tran-4-hydroxy-L-proline),能够获得脯氨酸含量较高的 3 个家系,它们的耐寒性均

得到了改良。

在小孢子诱变试验中,诱变剂处理的时间很关键,在第 1 次有丝分裂和染色体天然加倍期间采用诱变剂处理会获得纯合突变体。此外,小孢子是单倍体细胞,比植物组织和种子对诱变剂更敏感,适宜剂量的诱变剂处理后不仅可保证细胞发生诱变,且能再生成植株。Yun 等采用紫外线、 NaN_3 、EMS 分别处理小孢子和从小孢子再生得到的胚,结果发现,随着 UV 照射剂量的增大,小孢子胚发生或者胚成苗的频率下降,低浓度 NaN_3 和 EMS 同时处理小孢子后能够提高产胚率,但是在高浓度 NaN_3 和 EMS 或者更长的处理时间下产胚率大幅下降^[27]。

1.3 双单倍体在遗传转化研究中的应用

小孢子、小孢子发育后产生的胚以及双单倍体植株都可以成为遗传转化试验的供体材料。目前已经有研究报道了利用农杆菌介导的遗传转化、基因枪、微注射以及电转化方法来转化上述供体材料^[28-34]。Abdollahi 等利用基因枪和农杆菌介导的方法将含有 β -葡萄糖苷酸酶(β -glucuronidase, *GUS*)基因的载体转化油菜小孢子细胞,转化后检测发现,*GUS* 基因被成功整合到细胞中,但是转化后的小孢子细胞却不能完成胚的发生过程,他们认为,培养中小孢子的细胞密度、基因枪转化试验中金粉包裹的大小以及渗透调节物质的含量和种类对提高转化后再生效率至关重要^[35]。Chugh 等在黑小麦中建立了一套能够跨越细胞膜的肽链,它可以作为载体通过在细胞膜中的孔隙吸收后进入细胞^[36]。小孢子细胞和其他营养组织的细胞不同,它有着更厚的小孢子外壁,因而难以吸收 DNA 分子,为了增强小孢子细胞的转化能力,研究者们不断尝试采用不同酶类物质降解外壁,从而协助 DNA 分子进入细胞。

此外有研究报道,可以单独利用微注射、基因枪介导 DNA 转化以及 DNA 分子自吸收相结合的方法,直接转化由小孢子发育而来的胚(microspore-derived embryos, MDE)^[37-40]。基因枪轰击后的 MDE 组织或 MDE 生长得到的下胚轴可在分化培养基上生长,进入次生胚发生途径后成苗^[41]。与转化冬油菜下胚轴后得到的杂合型植株相比,农杆菌介导的遗传转化油菜小孢子再生胚后只需要 1 代就能获得纯合的转基因植株^[42]。通过遗传转化和 DH 技术相结合的方法能够快速获得抗根肿病和花露尾甲的油菜新种质资源^[43-44]。随着植物生物技术

的不断发展,采用基因编辑技术和 DH 技术相结合的方法能够快速获得对目标基因进行精确突变的纯合新材料,经过室内或田间鉴定加速育种进程。

1.4 小孢子诱导出胚途径中关键基因的遗传研究

甘蓝型油菜不同基因型材料的胚发生能力存在显著差异,目前决定这种差别的遗传基础还未被揭示^[5-6]。研究人员采用诱导胚发生频率高和不能诱导胚发生的基因型材料构建遗传群体,通过对杂合 F_1 自交后得到的 F_2 代群体或者 F_1 代的 DH 群体进行遗传分析,定位了控制小孢子胚发生途径的关键基因。Zhang 等对胚再生能力有显著差异的 4 个甘蓝型油菜和白菜型油菜进行双列杂交,结果发现,甘蓝型油菜的胚发生主要受加性效应影响;采用胚发生能力强的 Lisandra 和胚不能发生的 Kamikita 材料构建 F_2 代群体,通过分析确定了决定胚发生的 2 个主效数量性状基因座(QTLs);随后,筛选了与小孢子胚再生连锁的随机扩增多态性 DNA(RAPD)标记,在 52 个多态性标记中有 11 个标记与胚发生能力强的表型共分离,有 3 个标记与未能出胚表型共分离;在 F_2 代群体中有 6 个标记表现为孟德尔分离,表明这些标记与小孢子胚发生能力关键基因连锁,通过分析小孢子胚产量和标记分离数据相关性确定了与胚再生能力相关的 3 个标记;来自 Lisandra 材料等位基因的植株比来自 Kamikita 材料等位基因的植株具有更高的产胚能力^[45-46]。

此外,研究人员采用小孢子成胚率高的油菜品种 Topas 和成胚率低的品种 Westar 构建了 F_2 代群体和 2 个 DH 群体,分子标记分析结果显示,在 DH 群体中与 Topas 成胚率高的等位基因连锁的标记表现为偏分离,而在 F_2 代群体中没有这种现象,这可能是由于在 DH 群体中,等位基因高度纯合化,导致隐性致死基因大量表达,进而出现较高的偏分离比例^[47]。Cloutier 等发现,定位在第 1 条连锁群(LG1)和第 18 条连锁群(LG18)上的标记在 2 个 DH 群体中与 Topas 等位基因偏分离,而在 F_2 代群体中符合孟德尔分离比例,由此推测在 LG1 和 LG18 上的部分染色体区段与小孢子胚发生能力相关^[48]。同样的现象也发生在采用大白菜 Homei09(产胚力高)和萝卜 Siloga S2(产胚能力低)构建的 DH 群体和 F_2 代群体的 RAPD 标记分析试验中,在 6 个连锁群中,与 Homei09 等位基因连锁标记发生偏分离,而在 2 个连锁群中,与 Siloga S2 等位基因

连锁的标记发生偏分离;对 F_2 代群体进行分析发现,来自 Homei 09 的优良等位基因并没有总是表现出与较高胚发生频率相关^[49]。有研究者采用花椰菜 DH 系 (early big) 和 DH rapid cycling (TO1000DH3) 构建 DH 群体并对其进行分析,发现了 139 个与产胚能力相关的标记,其中分布在 C1、C2、C4、C5 和 C7 染色体上的 77 个位点与产胚率低的性状相关;与产胚率高的性状相关的 62 个位点分布在 C3、C6、C8 染色体上^[15,50]。研究人员认为,与小孢子胚发生相关的标记能够用于胚再生能力性状的遗传选择。实际上胚再生能力只是产胚能力的单一表现,而胚发生后秋水仙碱加倍以及直接再生成苗的过程也是双单倍体育种的关键,所以要排除胚再生但不能成苗的表型,因此在偏分离标记与 MDE 表型相关性分析试验中还需要考虑胚活力、加倍率和植株再生频率 3 个因素的作用^[51]。

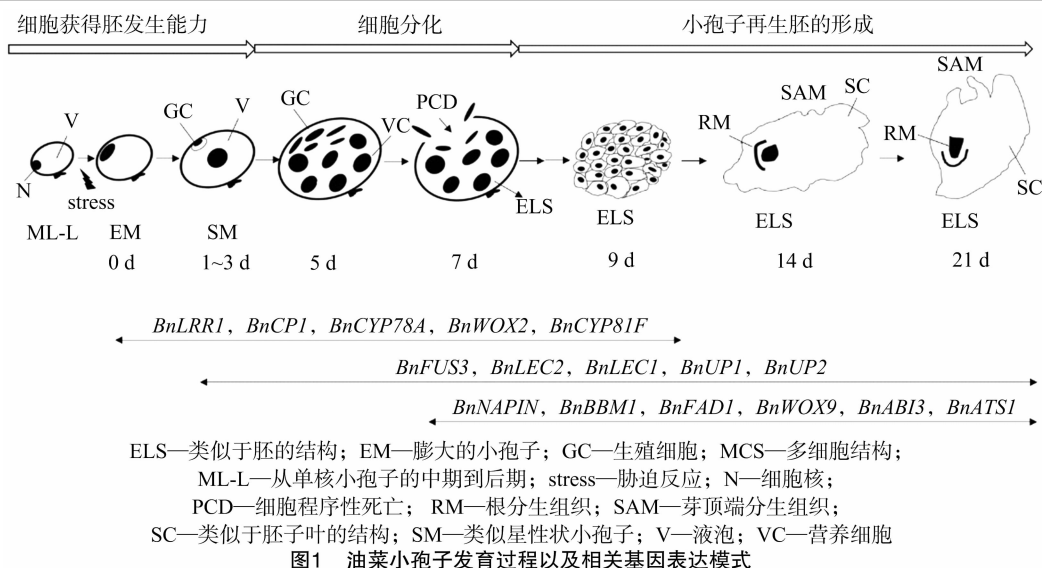
研究者认为,在 DH 群体中偏分离标记可能与减数分裂早期遗传因素控制的单核小孢子胚再生能力有关,如果在减数分裂过程中配子体发育受到抑制,那么在 F_2 代群体和 DH 群体中会发生同样的偏分离现象;此外在 100 多个 DH 系的出胚能力评估试验中,由于小孢子发生与供体植株的生长状态以及花蕾发育时期密切相关,导致统计上出错的概率增加^[52]。假设在 DH 群体中偏分离的标记位点与小孢子胚发生相关的基因是连锁的,那么从双亲而来的 DH 群体中优良等位基因组合的 DH 系与没有聚合优良等位基因的 DH 系比较,会表现出超高的单核小孢子胚发生频率。研究人员结合之前发现的在 DH 群体中偏分离标记所在的基因组区段,在不同品种间构建替换系,并验证了这些区段与小孢子胚发生率的相关性。通过繁殖纯合的品种间替换系使小孢子培养试验获得稳定、准确、可重复的数据。分离 F_2 代群体虽然能够避免发生偏分离现象,但是 F_2 代群体的高度杂合性使得表型考察结果不具有代表性,采用重组自交系能够保证后代基因型纯合,使小孢子胚发生能力的表型数据准确,此外通过关联分析群体能够在丰富的种质资源群体中评估小孢子出胚能力^[53-54]。

1.5 小孢子诱导单倍体发生途径中关键基因的研究现状

在单核小孢子向胚发育的过程中涉及很多基因的差异表达,这些基因参与的生物学功能主要分为 3 类,分别为胁迫诱导反应途径介导的胚性细胞

发育转变、起始细胞的分化、胚形态发生途径。在甘蓝型油菜小孢子培养试验中,将单核小孢子置于 42 °C 条件下胁迫处理 2 d,促使与热激反应相关的基因表达;小孢子再生成胚的过程是单核小孢子终止了向正常花粉发育的程序,转向成胚发育途径,该过程涉及花粉发育中淀粉以及蔗糖等生物合成相关基因的下调表达^[55]。对出胚率高和低的材料进行基因差异表达谱分析,挖掘出与胚发生频率相关的基因(图 1),通过分析获得的 16 个决定小孢子胚发生的关键基因发现,*BnFUS3*、*BnLEC2*、*BnLEC1*、*BnUP1*、*BnUP2* 基因在小孢子诱导、发育以及合子胚发育时期表达,*BnNAPIN*、*BnBBM1*、*BnFAD1*、*BnWOX9*、*BnABI3*、*BnATS1* 基因在胚诱导和发育阶段以及根系中表达,*BnLRR1*、*BnCPI1*、*BnCYP78A*、*BnWOX2*、*BnCYP81F* 在发育的胚以及孢子体组织中表达,目前还没有找到从小孢子向配子体(花粉)发育转化的关键基因。调控小孢子发生的大多数基因都是转录因子,如 *LEC1*、*LEC2*、*FUS3*、*ABI3*、*BBM1*、*WOX2* 和 *WOX9* 等。Malik 等取培养 3 d 或 7 d 后产胚率高的 Topas - DH4079 和产胚率低的 Allons、Westar 以及 Garrison 等材料的小孢子研究基因表达谱,发现 *BnLEC1*、*BnLEC2*、*BnBBM1* 和 *BnUP1* 诱导模式与产胚率紧密相关;异位表达分析结果表明,*LEC1*、*LEC2* 和 *BBM1* 是体细胞组织中诱导胚发生的关键基因,*LEC1*、*LEC2* 和 *FUS3* 是拟南芥合子胚和体细胞胚发生途径中的关键基因;从胚再生能力低的油菜品种 Westar 中再生获得 4 个 DH 系,这 4 个 DH 系具有比 Westar 材料更强的再生能力,且能够稳定遗传^[56-57]。通过分析胚发生相关基因在 DH2 家系与 Westar 材料中的表达模式发现,*BnLEC1* 在 Westar 材料的小孢子培养中比 DH2 材料培养的 1、3 d 明显推迟表达,*BnLEC2*、*BnABI3*、*BnBBM1*、*BnUP1* 和 *BnWOX9* 的表达量在 Westar 品种小孢子培养的整个过程比 DH2 材料低。然而,花粉特异表达基因优先在胚再生能力低的 Westar 品种中表达,结合油菜种子 cDNA 芯片数据发现,在 Westar 和 DH2 材料热处理 7 d 的小孢子中存在 117 个差异表达基因,其中部分差异表达基因可能由小孢子供体植株杂合基因型决定,或者是体细胞变异导致了基因功能的多方面改变。

油菜小孢子雄性单性生殖过程包含 3 个阶段(1)胚性细胞发育途径;(2)细胞起始分化;(3)小孢子胚形成过程。



2 单倍体诱导技术的研究现状

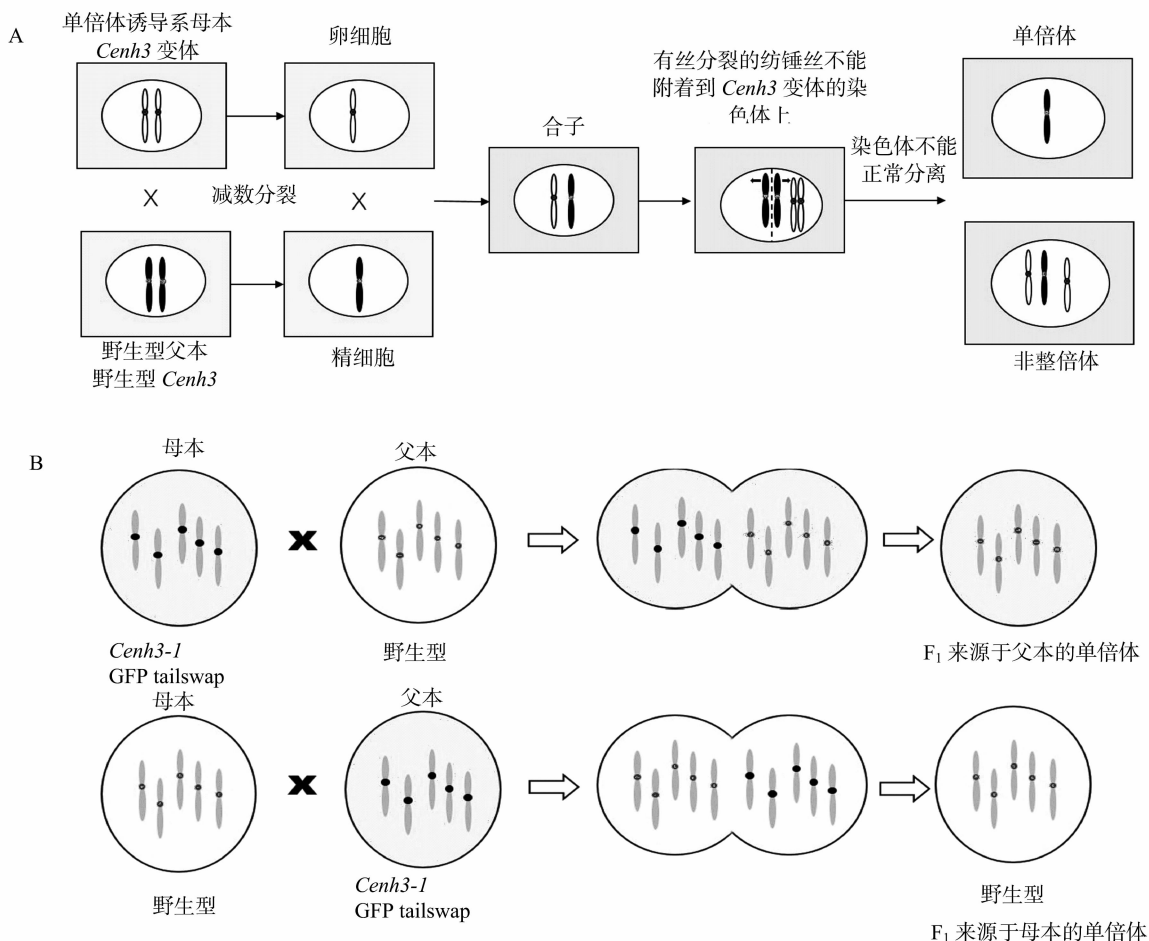
2.1 单倍体诱导技术分子机制

首先在玉米中发现天然单倍体,之后对玉米自交系 Stock6 进行改良获得一批优良的玉米单倍体诱导系,诱导率高达 11% ~ 16%^[58]。经过研究其作用机理是双受精完成后,原基细胞分裂前诱导系染色体逐渐消失而形成单倍体(图 2 - A)^[59-60]。Xu 等发现,在授粉后 7 d 内大部分诱导系的染色体被排出细胞外,初步确定了染色体选择性消失的原因,另外在单倍体后代中发现了约 44 Mb 的父本染色体片段,证实了诱导系染色体发生渗入的过程^[61]。为了开发出能够在多数物种中都适用的单倍体诱导方法,近年来在模式植物拟南芥中采用着丝粒介导染色体消失的方法诱导单倍体,Cenh3(由 CENH3 在 H3 位点突变形成)是组蛋白 H3 的一个突变体,其特异性定位于着丝粒上,Dwivedi 等通过对 CENH3 蛋白进行改造,如将 CENH3 的 N 末端用组蛋白 H3 的 N 末端代替,或对 CENH3 蛋白进行点突变以及用其他类型的突变体进行替代等使得 CENH3 异位着陆形成双着丝粒染色体,导致染色体在分离的时候发生断裂^[62]。拟南芥 *Cenh3* 突变体具有致死性,利用组蛋白 H3 的 N 末端尾部替换 CENH3 的 N 末端尾部,同时将绿色荧光蛋白(GFP)添加到 N 端终点,形成的 GFPtailswap 蛋白,定位于着丝粒上,该结构克服了 *Cenh3* 突变体的致死表型。利用转基因技术获得 GFPtailswap *Cenh3*^{-/-} 基因型植株,该植株雄性不育但是能够产生少量花粉,作为父本与野生型进行杂交能够产生 5% 的母本单倍

体,作为母本与野生型进行杂交能够产生 25% ~ 50% 的父本单倍体(图 2 - B)。虽然 GFPtailswap 技术过程是含有转基因事件的,但所得的单倍体植株的基因都来源于非转基因的亲本,不含有转基因成分。CENH3 在不同物种中存在进化的保守性,因而可以通过对油菜等近缘物种的 *CENH3* 基因进行修饰来获得单倍体诱导系。

2.2 单倍体诱导技术的应用前景

CENH3 介导的单倍体诱导相比目前单倍体诱导方法的优势在于不须要经过组织培养的过程,能够避免组织培养中小孢子胚的发生过程受限于植株基因型。花粉培养产生来源于父本的单倍体,雌蕊培养产生来源于母本的单倍体。而单倍体诱导系统既可用于父本又可用于母本单倍体的诱导。单倍体诱导系能够用于细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)系的背景改良,比如具有 CMS 遗传背景的单倍体诱导系作为母本与不同基因型的材料进行杂交所得到的单倍体后代具有母本的 CMS 遗传背景。虽然单倍体诱导系是转基因材料,但是杂交后所得到的单倍体是非转基因材料,能够直接应用于植物育种。此外,单倍体诱导技术能够用于反向育种的研究,2012 年 Wijnker 等将拟南芥 Landsberg 和 Columbia 2 种生态型 F₁ 代杂交种中决定减数分裂交换的 *DMC1* 基因进行突变,使得杂交种重组抑制^[63]。采用单倍体诱导系与杂交种进行杂交得到单倍体,加倍后获得双单倍体。对含有不同亲本染色体组合的双单倍体进行基因分型,选择不同亲本染色体的组合进行性状考察,可确定原始杂交种的类别。油菜与拟南芥



A—对 *CenH3* 基因修饰诱导单倍体发生过程。对 *CenH3* 基因的修饰会影响蛋白质功能。修饰后的着丝粒在减数分裂时行为正常，但比野生型细胞中着丝粒的活性低。经过修饰的 *CenH3* 基因染色体的着丝粒在有丝分裂时期不能重新引导染色体定位到纺锤丝，从而导致染色体不能分离，最终导致 2 个姐妹染色单体中分别含有单倍体和非整倍体

B—将 GFPtailswap *CenH3*^{-/-} 基因型单倍体诱导系分别作为母本和父本与正常植株杂交，会出现染色体清除现象

图2 单倍体诱导发生的分子机制

属于近缘种,通过 GFPtailswap 技术创建油菜单倍体诱导系,能够重现优势杂交油菜品种的亲本基因型。

3 展望

从 20 世纪 60 年代单倍体诱导创建二倍体技术体系建立以来,研究者们不断致力于体系改进,以提高效率。随着在育种过程中的不断实践,该技术体系在遗传转化以及基因组研究等领域的应用不断拓展,与此同时,人们对其提出了更高的要求,建立适用性更广泛、效率更高的技术体系是目前研究的重点。

前人利用单倍体诱导创建二倍体的技术创建了不同的 DH 群体,并分别定位了小孢子胚再生途径的主效 QTL,同时通过比较基因组学挖掘出大量在小孢子胚发生过程中的相关基因,将这些基因与 QTL 定位区间进行比较,可以快速获得油菜小孢子

诱导胚发生的关键基因。由于甘蓝型油菜基因组复杂,数量性状控制基因的图位克隆进展缓慢,同源基因的拷贝数较多,阻碍了差异表达基因与定位区间的匹配。目前可以利用白菜、甘蓝和甘蓝型油菜的基因组比对,筛选出更为准确的候选基因。此外,基于华中农业大学建立的 60K SNP 芯片检测平台,利用与油菜重要性状关联的分子标记,加快重要农艺性状关键基因的克隆。如果利用分子设计育种方法将与小孢子胚发生途径相关的基因组区间与控制油菜产量以及含油量的位点关联,则可以在对小孢子胚发生、秋水仙碱诱导染色体加倍以及诱导小孢子直接成苗等 3 个关键步骤进行改良的同时,快速获得油菜栽培种或者育种材料。随着模式植物拟南芥单倍体诱导系统的创建和完善,在油菜中开发的着丝粒蛋白修饰介导的单倍体诱导系统可被用于不同细

胞质来源亲本的改良以及反向育种研究。

参考文献:

- [1] Ferrie A M R, Caswell K L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2011, 104 (3): 301–309.
- [2] Szarejko I, Forster B P. Doubled haploidy and induced mutation[J]. *Euphytica*, 2007, 158(3): 359–370.
- [3] Custers J B M. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.) [M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003.
- [4] da Silva D J C. Protocol for broccoli microspore culture [M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003.
- [5] Ferrie A. Microspore culture of *Brassica* species [M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003.
- [6] Ferrie A M R, Keller W A. Optimization of methods for using polyethylene glycol as a non-permeating osmoticum for the induction of microspore embryogenesis in the Brassicaceae[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 2007, 43(4): 348–355.
- [7] Friedt W, Zarhloul M K. Haploids in the improvement of Crucifers [M]. Berlin: Springer, 2005.
- [8] Hansen M. Protocol for microspore culture in *Brassica* [M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003.
- [9] Ravi M, Chan S W L. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination [J]. *Nature*, 2010, 464 (7288): 615–618.
- [10] Barro F, Martín A. Response of different genotypes of *Brassica carinata* to microspore culture[J]. *Plant Breeding*, 2008, 118(1): 79–81.
- [11] Siebel J, Pauls K P. A comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in *Brassica napus* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1989, 78(4): 473–479.
- [12] Takahata Y, Fukuoka H, Wakui K. Utilization of microspore-derived embryos [M]//*Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 2005.
- [13] Ferrie A M R, Palmer C E, Keller W A. Haploid embryogenesis [M]//Thorpe T A. *In vitro* embryogenesis in plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995: 309–344.
- [14] Dirks R, van Dun K, de Snoo C B, et al. Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2009, 7(9): 837–845.
- [15] Pink D, Bailey L, McClement S, et al. Double haploids, markers and QTL analysis in vegetable brassicas[J]. *Euphytica*, 2008, 164(2): 509–514.
- [16] Thomas W T B, Forster B P, Gertsson B. Doubled haploids in breeding[M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003.
- [17] Maluszynski M. Officially released mutant varieties — The FAO/IAEA database[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2001, 65(3): 175–177.
- [18] 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(5): 501–506.
- [19] Barro F, Fernandezescobar J, Mdela V, et al. Modification of glucosinolate and erucic acid contents in doubled haploid lines of *Brassica carinata* by UV treatment of isolated microspores [J]. *Euphytica*, 2003, 129: 1–6.
- [20] Beaithe M E, Fletcher R S, Kott L S. Reduction of saturated fats by mutagenesis and heat selection in *Brassica napus* L. [J]. *Euphytica*, 2005, 144: 1–9.
- [21] Sonntag K, Rudloff E. Microspore mutagenesis in transgenic oilseed rape for the modification of fatty-acid composition [J]. *Acta Universitatis Latviensis Biology*, 2004, 676: 227–230.
- [22] Barro F, Fernandez – Escobar J, de la Vega M, et al. Doubled haploid lines of *Brassica carinata* with modified erucic acid content through mutagenesis by EMS treatment of isolated microspores[J]. *Plant Breeding*, 2008, 120(3): 262–264.
- [23] McClinchey S L, Kott L S. Production of mutants with high cold tolerance in spring canola (*Brassica napus*) [J]. *Euphytica*, 2008, 162(1): 51–67.
- [24] Liu S, Wang H, Zhang J, et al. *In vitro* mutation and selection of doubled-haploid *Brassica napus* lines with improved resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 24(3): 133–144.
- [25] Beversdorf W D, Kott L S. An *in vitro* mutagenesis/selection system for *Brassica napus* [J]. *Iowa State Journal of Research*, 1987(4): 435–443.
- [26] Xu L, Najeeb U, Naeem M S, et al. *In vitro* mutagenesis and genetic improvement[M]. New York: Springer, 2012.
- [27] Yun H E, Wan G, Chen S, et al. Effects of mutagenic treatments of isolated microspores and microspore-derived embryos on embryogenesis and plant regeneration in oilseed rape [C]//*International Rapeseed Congress*, 2007.
- [28] Dormann M, Oelck M, Wang H M. Transformed embryogenic microspores for the generation of fertile homozygous plants; USA, 6316694[P]. 2001–11–13.
- [29] Fukuoka H, Ogawa T, Matsuoka M, et al. Direct gene delivery into isolated microspores of rapeseed (*Brassica napus* L.) and the production of fertile transgenic plants [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17: 323–328.
- [30] Guerche P, Charbonnier M, Jouanin L, et al. Direct gene transfer by electroporation in *Brassica napus* [J]. *Plant Science*, 1987, 52(1/2): 111–116.
- [31] Jardinaud M F, Souvré A, Alibert G. Transient *GUS* gene expression in *Brassica napus* electroporated microspores [J]. *Plant Science*, 1993, 93: 177–184.
- [32] Jones – Villeneuve E, Huang B, Prudhomme I, et al. Assessment of microinjection for introducing DNA into uninuclear microspores of rapeseed[J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 1995, 40(4): 97–100.
- [33] Nehlin L, Möllers C, Bergman P, et al. Transient β -gus and gfp gene expression and viability analysis of microprojectile bombarded microspores of *Brassica napus* L. [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2000, 156(2): 175–183.
- [34] Pechan P M. Successful cocultivation of *Brassica napus* microspores and proembryos with *Agrobacterium* [J]. *Plant Cell Reports*, 1989, 8

- (7):387.
- [35] Abdollahi M R, Moieni A, Salmanian A H, et al. Secondary embryogenesis and transient expression of the β - glucuronidase gene in hypocotyls of rapeseed microspore - derived embryos[J]. *Biologia Plantarum*, 2009, 53(3):573 - 577.
- [36] Chugh A, Amundsen E, Eudes F. Translocation of cell - penetrating peptides and delivery of their cargoes in triticale microspores[J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(5):801 - 810.
- [37] Chen J L, Beversdorf W D. A combined use of microprojectile bombardment and DNA imbibition enhances transformation frequency of canola (*Brassica napus* L.)[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 1994, 88(2):187.
- [38] Huang B. Genetic manipulation of microspores and microspore - derived embryos[J]. *Vitro Plant*, 1992, 28:53 - 58.
- [39] Neuhaus G, Spangenberg G, Scheid O M, et al. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore - derived embryoids[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 1987, 75(1):30 - 36.
- [40] Swanson E B, Erickson L R. Haploid transformation in *Brassica napus* using an octopine - producing strain of *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 1989, 78(6):831 - 835.
- [41] Abdollahi M R, Moieni A, Mousavi A, et al. High frequency production of rapeseed transgenic plants via combination of microprojectile bombardment and secondary embryogenesis of microspore - derived embryos[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(2):711 - 719.
- [42] Cegielska - Taras T, Pniewski T, Szała L. Transformation of microspore - derived embryos of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) by using *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2008, 49(4):343 - 347.
- [43] Åhman I M, Kazachkova N I, Kamnert I M, et al. Characterisation of transgenic oilseed rape expressing pea lectin in anthers for improved resistance to pollen beetle[J]. *Euphytica*, 2006, 151(3):321 - 330.
- [44] Reiss E, Schubert J, Scholze P, et al. The barley thaumatin - like protein Hv - TLP8 enhances resistance of oilseed rape plants to *Plasmodiophora brassicae*[J]. *Plant Breeding*, 2010, 128(2):210 - 212.
- [45] Zhang F L, Takahata Y. Inheritance of microspore embryogenic ability in *Brassica* crops[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2001, 103(2/3):254 - 258.
- [46] Zhang F, Aoki S, Takahata Y. RAPD markers linked to microspore embryogenic ability in *Brassica* crops[J]. *Euphytica*, 2003, 131(2):207 - 213.
- [47] Wan Y, Rocheford T R, Widholm J M. RFLP analysis to identify putative chromosomal regions involved in the anther culture response and callus formation of maize[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 1992, 85(2/3):360 - 365.
- [48] Cloutier S, Cappadocia M, Landry B S. Study of microspore - culture responsiveness in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by comparative mapping of a F₂ population and two microspore - derived populations[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 1995, 91(6/7):841 - 847.
- [49] Ajsaka H, Kuginuki Y, Shiratori M, et al. Mapping loci affecting the cultural efficiency of microspore culture of *Brassica rapa* L. syn. *campestris* L. using DNA polymorphism[J]. *Breed Sci*, 1999, 49(3):187 - 192.
- [50] Iniguez - Luy F L, Lukens L, Farnham M W, et al. Development of public immortal mapping populations, molecular markers and linkage maps for rapid cycling *Brassica rapa* and *B. oleracea* [J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2009, 120(1):31 - 43.
- [51] Ujjalkumar N, Mohammedm I, Christian M. Early, non - destructive selection of microspore - derived embryo genotypes in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by molecular markers and oil quality analysis[J]. *Molecular Breeding*, 2007, 19(3):285 - 289.
- [52] Kitashiba H, Taguchi K, Kaneko I, et al. Identification of loci associated with embryo yield in microspore culture of *Brassica rapa* by segregation distortion analysis[J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(10):2197 - 2204.
- [53] Ecke W, Clemens R, Honsdorf N, et al. Extent and structure of linkage disequilibrium in canola quality winter rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2010, 120(5):921 - 931.
- [54] Hasan M, Friedt W, Ponskühnemann J, et al. Association of gene - linked SSR markers to seed glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*) [J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2008, 116(8):1035 - 1049.
- [55] Maraschin S F, de Priester W, Spaink H P, et al. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(417):1711 - 1726.
- [56] Malik M R, Wang F, Dirpaul J M, et al. Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus* [J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(1):134 - 154.
- [57] Malik M R, Wang F, Dirpaul J M, et al. Isolation of an embryogenic line from non - embryogenic *Brassica napus* cv. Westar through microspore embryogenesis [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(10):2857 - 2873.
- [58] Rotarencu V, Dieu G, State D, et al. New inducers of maternal haploids in maize[J]. *Maize Genet Coop Newslett*, 2010, 84:1 - 7.
- [59] Britt A B, Kuppu S. *CenH3*: an emerging player in haploid induction technology[J]. *Front. Plant Sci*, 2016, 7:357.
- [60] Watts A, Kumar V, Bhat S R. Centromeric histone H3 protein: from basic study to plant breeding applications [J]. *Plant Biochem, Biotechnol*, 2016, 25:339 - 348.
- [61] Xu X W, Li L, Dong X, et al. Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through *in vivo* induction of a maternal haploid in maize[J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(4):1083 - 1096.
- [62] Dwivedi S L, Britt A B, Tripathi L, et al. Haploids: constraints and opportunities in plant breeding[J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(6):812 - 829.
- [63] Wijner E, van Dun K, de Snoo C B, et al. Reverse breeding in *Arabidopsis thaliana* generates homozygous parental lines from a heterozygous plant[J]. *Nature Genetics*, 2012, 44(4):467 - 470.