

植物单倍体的产生、鉴定、形成机理及应用

殷丽琴^{1,2}, 付绍红², 杨进², 李云², 王继胜², 王茂林¹

1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064;

2. 成都市农林科学院作物所, 成都 611130

摘要: 单倍体(Haploid)是指含有配子染色体数目的个体, 对其进行基因组加倍可以快速获得纯合双单倍体(Doubled haploid, DH)。单倍体和双单倍体在植物品种选育、突变体筛选、基因功能鉴定、细胞学研究、遗传群体构建等方面具有重要作用, 是近年来植物领域的一大研究热点。本文从单倍体和双单倍体的产生途径、鉴定、形成机理以及应用等方面较全面地综述了单倍体的最新研究进展, 为单倍体的研究利用作一定的参考。

关键词: 单倍体; 双单倍体; 鉴定; 遗传机制; 应用

Generation, identification, formation mechanism and application of plant haploids

Liqin Yin^{1,2}, Shaohong Fu², Jin Yang², Yun Li², Jisheng Wang², Maolin Wang¹

1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. Institute of Crop Research, Chengdu Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Chengdu 611130, China

Abstract: Haploids are individuals with gametophytic chromosome numbers. Homozygous doubled haploids can be quickly gained by genome doubling. Haploids and doubled haploids play an important role on crop breeding, mutant screening, gene functional analysis, cytological studies, construction of genetic population and so on, and have been a research hotspot of plants in recent years. In this review, we summarize the production means, identification, the genetic mechanism and the applications of haploids and doubled haploids. We hope to provide a reference for study and application of haploids and doubled haploids.

Keywords: haploid; doubled haploid; haploid identification; genetic mechanism; application

单倍体是指含有配子染色体数目的个体。1922年 Guha 首次在曼陀罗(*Datura stramonium* L.)中发现天然单倍体^[1], 1964 年 Guha 和 Maheshwari 对曼陀

罗花粉进行培养首次在离体条件下获得单倍体植株^[2], 1970 年 Kasha 通过种间杂交和体外胚胎挽救获得大麦(*Hordeum vulgare* L.)单倍体^[3], 至今人们已获得上

收稿日期: 2016-04-06; 修回日期: 2016-05-23

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(编号: JFYS2016ZY03002156)资助[Supported by “13th Five-year” National Key Research Projects (No. JFYS2016ZY03002156)]

作者简介: 殷丽琴, 在读博士, 助理研究员, 研究方向: 分子遗传学及基因工程。E-mail: yinlq1118@163.com

通讯作者: 王茂林, 博士, 教授, 研究方向: 植物分子遗传学及油菜遗传育种。E-mail: mlwang@scu.edu.cn

杨进, 硕士, 高级农艺师, 研究方向: 油菜育种与栽培。E-mail: yjjing@163.com

DOI: 10.16288/j.yczs.16-121

网络出版时间: 2016/9/9 11:35:33

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160909.1135.002.html>

百种植物单倍体。随着单倍体技术的不断发展和改进,单倍体已成为重要的遗传材料和研究对象,是当前植物领域的一大研究热点。对单倍体基因组进行加倍可在一个世代内获得遗传上 100% 纯合的双单倍体品系,从而大大加快植物品种选育进程。单倍体和双单倍体还可用于突变体筛选、转基因研究、基因功能鉴定、遗传群体构建、细胞学研究等。本文从单倍体及双单倍体的获取途径、鉴定方法、遗传机制、应用以及展望等几个方面较全面地综述了单倍体技术的研究进展。

1 单倍体产生途径

成功获取单倍体是单倍体技术应用的前提和基础。目前生产上获取单倍体的方法主要有花药培养、小孢子培养、雌核培养、辐射诱导、种间杂交、远缘杂交、诱导系诱导、着丝粒介导法等,按来源可将单倍体产生途径划分为体外和体内两大类。

1.1 体外途径

体外获取单倍体主要是通过对植物配子体细胞(雄配子体和雌配子体)进行离体培养,诱导其从配子体发育途径转向孢子体发育途径,进而形成单倍体胚胎。

1.1.1 花药/小孢子培养

花药培养和小孢子培养是两种常见获得父本单倍体的方法。花药培养以植物组织花药为培养对象,其操作简单,但单个花药产胚率低且易受花药壁等体细胞的干扰。小孢子培养则以游离小孢子为对象,其培养密度高,每毫升培养基中可获得 1000 个以上的胚胎^[4],且避免了亲本组织的干扰,便于对单个小孢子进行细胞学、微生物学和功能基因组学等研究,因而该技术更受欢迎。小孢子培养技术已成功获得小麦(*Triticum aestivum* L.)、大麦(*Hordeum vulgare* L.)、玉米(*Zea mays* L.)、烟草(*Nicotiana tabacum* L.)、油菜(*Brassica campestris* L.)等重要植物的单倍体,然而其使用范围受物种和基因型限制,以致部分植物物种及基因型无法利用该方法获取单倍体^[5]。因此应对该技术不断进行改善,以开发出不依赖物种和基因型的改良法,扩大其适用范围。

1.1.2 雌核培养

雌核发育是体外获得母本单倍体的方法之一,

其过程类似于孤雌生殖。雌核培养产生的单倍体遗传性质稳定、白化苗率低^[5,6],然而雌性配子分离较难^[6],且一个胚珠中仅含一个卵细胞,导致该技术在生产上使用频率较低,目前仅在洋葱(*Allium cepa* L.)和甜菜(*Beta vulgaris* L.)上应用较多。雌核发育诱导效率受多种生物和非生物因素影响,如植物基因型、配子体发育状态、花芽预处理、培养基组成、培养条件等,其中供体植物基因型和生长环境是关键影响因素^[5]。

1.2 体内途径

体外途径获取单倍体技术性高、劳动强度大、花费时间长、成本高,受物种和基因型限制,胚胎发育率和再生率低,易出现白化苗和分离畸变,且染色体成功加倍率较低^[7]。相比之下体内途径操作简单,通常不需要进行细胞培养,存在较明显的优势。

1.2.1 自发形成单倍体

研究发现自然界中很多植物能自发地产生单倍体,然而其发生频率较低,在生产上应用有限。目前对植物自发产生单倍体的具体机制了解较少,有待深入研究。

1.2.2 辐射花粉诱导法

研究发现辐射处理过的植物花粉不能与胚珠内卵细胞正常受精,但其可在柱头上萌发,并通过花粉管伸长刺激卵细胞形成单倍体胚胎。该技术已成功用于获取烟草、洋葱、黄瓜(*Cucumis sativus* L.)、苹果(*Malus domestica*)、康乃馨(*Dianthus caryophyllus* L.)等植物的单倍体^[8]。在诸多影响因素中,辐射剂量是影响该方法的主要因素之一。辐射剂量偏低,花粉生殖核部分受损但仍能与卵细胞结合,产生后代几乎是杂交种和突变体;而辐射剂量偏高,胚胎形成率降低但后代多为单倍体。因此使用该方法需筛选出合适的辐射剂量。此外辐射诱导产生的单倍体胚胎通常还需进行体外挽救才能存活。

1.2.3 种间杂交或远缘杂交

利用种间杂交或远缘杂交获取单倍体是目前最常用的体外单倍体产生方法,该方法最早应用于大麦,利用球茎大麦(*Hordeum bulbosum* L.)花粉给大麦授粉可得到大麦单倍体^[3]。小麦×玉米^[9]和小麦×大麦^[10]

杂交系统常常用于生产小麦单倍体,其中小麦×大麦的单倍体诱导率最高可达 76%^[10]。同一物种不同倍性间杂交也能产生单倍体,如银叶委陵菜(*Potentilla leuconota* D. Don)的二倍体与四倍体杂交^[11],柑橘(*Citrus reticulata* Blanco)二倍体与三倍体杂交^[12]等。

种间杂交或远缘杂交产生母本单倍体的机制主要有两种假说,第一种假说认为两个精核中一个与胚珠中极核正常受精形成有生理功能的胚乳,并刺激未受精卵细胞发生孤雌生殖产生单倍体胚胎;另一种假说认为在双受精发生后,杂种胚胎中的父本染色体在胚胎发育早期消失而形成单倍体^[5],即单一亲本染色体发生消失。目前已在 75 个单子叶植物物种和 35 个双子叶植物物种中发现了单一亲本基因组消失现象^[13]。

1.2.4 单倍体诱导系

1952 年 Chase 等^[14]首次在玉米中发现天然单倍体,之后 Coe^[15]发现玉米自交系 Stock6 能高频诱导母本植株产生单倍体种子。对 Stock6 进行改良获得了一批优良玉米单倍体诱导系,如 WS14、MHI、CAUHOI、RWS 和 PHI 系列等,诱导率可高达 11%~16%^[16,17]。

关于玉米单倍体诱导系的作用机制尚不完全清楚,早期主要有两种猜测:一是卵细胞未受精而发生孤雌生殖形成单倍体;二是双受精完成后、原基细胞分裂前诱导系染色体逐步消失而形成单倍体^[18]。Wedzony 等^[19]支持染色体选择性消失假说,其观察了诱导系 RWS 自交 20 d 内胚胎发育情况,发现约 10% 胚胎的芽原基细胞中均含有大小不一的微核。Li 等^[20]从形态和分子水平上发现有诱导系基因渗入到单倍体中,Xu 等^[21]证实了玉米单倍体诱导过程中发生了双受精,暗示了染色体消失是玉米单倍体诱导的基础,认为染色体丢失是一个逐步过程,可能只发生在部分胚乳细胞中,胚胎中染色体丢失发生在胚胎发育的早期,而胚乳中染色体消失则慢些。Zhao 等^[22]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,找到了染色体选择性消失的直接证据,此外在单倍体后代中还发现了约 44 Mb 的父本染色体片段,进一步证实了诱导系染色体渗入现象。因此玉米单倍体诱导系的作用机制为单一亲本

染色体选择性消失,然而染色体消失的原因和具体过程尚不清楚。

1.2.5 着丝粒介导法

以上获取单倍体的方法只适用于部分植物物种或基因型,对多数物种来说以上方法全都不适用。近年来在模式作物拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)上开发了一种着丝粒介导染色体消失的方法,该技术类似于种间杂交或诱导系诱导,在胚胎发育早期转基因亲本的染色体被选择性丢失从而获得父本单倍体或母本单倍体^[23]。该方法涉及对 CENH3 蛋白进行改造,CENH3 是组蛋白 H3 的一个突变体,其特异性定位于着丝粒上,取代了原着丝粒核小体中的 H3。研究发现 CENH3 在染色体上的位置即是着丝粒的位置,CENH3 在染色体上重新定位将会导致形成新的功能性着丝粒,反之亦然^[24]。DNA 复制后不能保证 CENH3 在着丝粒上重新定位则导致染色体不能正常分离,而 CENH3 异位着陆则形成双着丝粒染色体,导致染色体在分离时发生断裂^[6]。

Ravi 等^[23]发现拟南芥 *cenh3* 无效突变体具有致死性,用组蛋白 H3 的 N 末端尾部代替 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,该结构能挽救 *cenh3* 突变体的致死性。通过转基因技术获得 *GFPtailswap cenh3*^{-/-} 植株,该植株雄性不育但能产生少量花粉,当作父本与野生型杂交能产生约 5% 的母本单倍体,当作为母本与野生型杂交能产生 25%~50% 的父本单倍体^[23]。由于 CENH3 广泛存在于真核生物中且具有高度进化保守性,理论上该着丝粒介导法同样适用于其他植物产生单倍体后代^[23,25]。近年来科研人员在香蕉(*Musa nana* Lour.)、大麦、短柄草(*Brachypodium distachyon*)、木薯(*Manihot esculenta* Crantz)、棉花(*Gossypium* spp.)、百脉根(*Lotus corniculatus* L.)、水稻、大豆(*Glycine max* (L.) Merr.)、甜菜、柳枝稷(*Panicum virgatum* L.)和烟草等作物上开展了相关实验^[26]。Raychaudhuri 等^[27]间接证明了对 CENH3 进行操作可以在除拟南芥外的其他物种上获得单倍体,发现通用靶向蛋白降解法充分降解了果蝇(*Drosophila melanogaster*)精子中的 Cid 蛋白(相当于 CENH3 蛋白),导致第一次有丝分

裂时父本着丝粒不能整合纺锤体上而形成雌核单倍体胚胎。近来研究还发现,用亲缘关系较远物种的 CENH3 代替拟南芥 CENH3 和对 CENH3 进行氨基酸点突变均可获得拟南芥单倍体诱导系^[28]。然而这些方法的工作原理尚未完全解析,还值得深入探索。

2 双单倍体产生方法

为充分发挥单倍体的应用价值,通常要对其进行基因组加倍以获得纯合双单倍体。当前使用最广泛的染色体加倍法为秋水仙素处理,此外还有染色体自发加倍法,以及最新发现的诱导系直接诱导法。

2.1 单倍体自发加倍

研究发现多数单倍体植物具有染色体自我加倍的趋势和能力^[29]。拟南芥双单倍体主要通过单倍体自发加倍获得^[30],一株单倍体拟南芥能收获 50~5000 粒双单倍体种子^[25]。染色体自发加倍事件可发生配子体离体培养过程中,其受物种、基因型、培养条件、培养基成分等多种因素影响^[31,32],加倍率最高可达 70%^[33,34]。染色体自发加倍事件还可发生在单倍体体细胞中,通过形成单倍体配子体而获得双单倍体后代^[23]。此外单倍体还可通过产生未减数分裂配子获得双单倍体种子^[23]。目前单倍体自发加倍的机理尚不完全清楚,主要有核内复制、细胞核融合、核内有丝分裂等假说^[31]。尽管单倍体自发加倍操作简单、安全,避免了使用化学加倍剂,但其加倍效率通常较低,难以满足实际生产需求,往往需要通过人工加倍获取大量双单倍体。

2.2 单倍体人工加倍

人工诱导单倍体染色体加倍主要是利用化学试剂进行处理。秋水仙素是最常用的染色体加倍试剂,其与微管蛋白结合抑制有丝分裂过程中微管聚合;甲基氨基草磷、氨基乐灵、拿草特、氟乐灵等除草剂也能有效地使染色体加倍,且毒性较秋水仙素低^[35]; N_2O 气体能有效地加倍玉米染色体^[36]。秋水仙素加倍效率高,适合大规模生产 DH 系,但其成本高、毒性大,耗费劳动力,且化学试剂处理容易产生混倍体,高浓度或长时间处理可能导致四倍化现象。

2.3 诱导系直接诱导

目前生产上获取植物 DH 系至少要经历两个生

育期,一是获取单倍体,二是对单倍体进行加倍。理论上获得的 DH 系可以直接用于育种,但由于加倍效率等原因以及 DH 系自交第一代所结种子数目偏少,如 Kleiber 等^[37]发现经过人工加倍的玉米 DH 系自交后代平均每穗只结实 3.82 粒种子,通常需要再延长一个生育期以获得足够的种子。如开发一种直接从母本植株上获取双单倍体的方法将能进一步缩短育种时间。

最近 Wu 等^[38]发现用玉米单倍体诱导系 CAUHOI 给二倍体玉米授粉,在母本植株上除了收获到单倍体种子、二倍体杂交种,还收获到少量的双单倍体种子,但其双单倍体诱导率非常低,不超过 0.1%。虽然体内诱导产生双单倍体的频率很低,但其只需一步即可获得纯合双单倍体,省去了染色体加倍环节,为植物育种提供了新的思路 and 策略。该方法真正应用于玉米育种还需要克服几个问题,如提高双单倍体产生率、培育产生足够双单倍体的诱导系、阐释体内诱导双单倍体的机制等。近来在油菜上也发现了类似现象,付绍红等^[39]报道了一种甘蓝型油菜纯合四倍体诱导系。该诱导系为人工合成的八倍体甘蓝型油菜,当作为花粉供体与四倍体甘蓝型油菜杂交时能高频率地诱导产生纯合四倍体后代,其诱导率最高可达 100%,一般都在 50% 以上。与游离小孢子培养技术相比,油菜纯合四倍体诱导系法具有明显的优势,其操作简单、无需体外染色体加倍且无需特别实验设备等,然而其诱导机理未知,值得深入研究。

3 单倍体和双单倍体鉴定

在单倍体产生过程中常常伴随着多种杂株的出现,如花药培养和体外雌核培养过程中易受到花药壁细胞、花芽体细胞、子房体细胞等干扰;远缘杂交、辐射花粉诱导、诱导系诱导等方法产生的单倍体中往往含有自交或杂交植株。如不及时去除杂株,将会大大降低单倍体的纯度。快速、准确鉴别单/双单倍体是 DH 技术商业化的一个关键环节。

3.1 表型鉴定

单倍体与其二倍体植株在形态上往往存在明显差异,可通过观察表型鉴别单倍体。一般来说,单倍体植株长势较弱、株高偏低、叶片偏小、种子较

小等, 花朵或花药退化且绝大多数植株不育或育性大大降低^[7,40]。如玉米单倍体幼苗长势弱, 胚根和胚芽鞘较小^[41]; 大麦、小麦和黑麦叶片气孔保卫细胞的长度与基因组倍性水平和 DNA 含量相关性很高^[42,43]; 玉米 1~8 叶期单倍体和双单倍体植株的平均气孔长度显著低于二倍体杂交种^[44]。此外单倍体种子浮力、种胚大小等都可作为表型鉴定的依据^[45,46]。随着科技的发展, 一些先进的物理技术也被用于鉴定单倍体, 如光学投影层析、衍射增强投像、微型核磁共振成像等^[7]。然而表型鉴定始终只是一种间接鉴定方法, 容易受环境因素影响, 特别是当单倍体与杂交种倍性差异较小的时候。

3.2 染色体计数法

以植物根尖、性母细胞或其他分生组织为研究材料, 对有丝分裂或减数分裂细胞进行染色体计数可直接准确地鉴定单倍体。然而染色体计数法操作繁琐、效率较低, 特别是针对染色体较小的一些植物, 如甘蓝型油菜^[47]。

3.3 流式细胞仪法

基于流式细胞仪检测细胞核 DNA 含量是一种快速准确判断植物倍性的方法^[48]。该方法可在植物发育早期快速、高效地鉴定单倍体, 同时还能检测到混倍体, 是当前主流鉴定植物倍性的方法, 但其对样品质量要求较高。

3.4 遗传标记法

除了表型观察和倍性检测, 多种遗传标记也被用于鉴定单倍体, 如玉米花青素标记^[16]、玉米含油率标记性状^[49]、拟南芥 GFP 荧光蛋白标记^[25]、番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 生长素 *aux2* 基因致死标记、羽衣甘蓝叶片无毛标记、马铃薯花青素标记、烟草花叶病毒标记、甜菜子叶下胚轴彩色标记、可可豆叶腋花青素斑点标记及梨子 (*Pyrus* spp.) 显性红色标记等^[7]。

遗传标记具有稳定遗传性, 在植物生长发育早期即可快速、直观地鉴别单倍体, 然而其稳定表达可能受到其他因素的干扰。当母本携带抑制花青素对胚胎着色的 *CI-I* 基因时, 基于 *R1-nj* 标记鉴定玉米单倍体的准确度将会下降^[50], 供体基因型、紫红色种皮表达基因^[50]、环境条件等都会影响 *R1-nj* 基

因的表达。Melchinger 等^[49]报道了根据含油率高低区别单倍体和杂交种, 该方法准确度较高, 但必须使用高含油率的单倍体诱导系^[51], 且该方法受到诱导系诱导率、两亲本遗传差异和含油率高低、单倍体和杂交种含油率差异、与含油率相关的表型变异、以及阈值设定等多种因素影响。

此外, 遗传标记的构建通常需要借助转基因等手段, 操作较繁琐, 特别是针对一些多倍体植物。为快速鉴定拟南芥单倍体, Ravi 等^[25]将种子储藏蛋白 2S3 启动子与 GFP 荧光蛋白基因连接并导入 *CENH3/cenh3-1 GFP-tailswap/GFP-tailswap* 植株中, 连续两代自交获得纯合稳定的拟南芥单倍体诱导系 *cenh3-1/cenh3-1 GFP-tailswap/GFP-tailswap At2-S3::GFP/At2S3::GFP*。由于物种间遗传背景存在差异, 目前通用遗传标记较少, 有待不断开发。

3.5 分子标记法

单倍体倍性和双单倍体纯合性也可从 DNA 水平上进行检测。RT-PCR 技术可用于检测植株倍性水平^[52], 该方法适合表达水平易受倍性变化调控的基因。共显性标记 SSR 已被用于鉴定多种植物的单倍体和双单倍体^[6,53], 其可在幼苗早期快速鉴定, 但检测的遗传位点数目有限。近年来 SNP 标记^[22]和简化基因组测序技术^[30]也被用于鉴定单倍体来源和筛选双单倍体。研究还发现酶促切割错配法 (Enzymatic mismatch cleavage, EMC) 可用于检测双单倍体的纯合性及其亲本来源^[54]。EMC 本是一种检测基因突变的方法, 其原理是核酸内切酶识别并切割 DNA:DNA 异源双链核酸分子的错配碱基, 通过凝胶电泳分析酶切片段大小即可确定错配碱基的位置。Hofinger 等^[54]对该方法进行改良, 采用 *CEL* 核酸内切酶, 同时设置阳性对照和阴性对照以监测酶切活性和假阳性错误, 选择亲本之间具有杂合多态性的引物来筛选双单倍体。利用 EMC 筛选双单倍体简单、便捷, 不需特别设备, 筛选效率比 SSR 标记更高, 适用于大多数二倍体和多倍体物种。

4 单倍体形成的分子基础及诱导机理

4.1 小孢子胚胎发育分子基础

体外单倍体胚胎发育经历了从配子体发育途径

向孢子体发育途径的转化, 该过程受到多种内部和外部因素的影响, 研究单倍体胚胎形成的分子遗传学机制具有重要意义。小孢子胚胎形成过程可分为 3 个阶段, 即获得胚性能力、启动细胞分裂和完成胚胎发育^[55]。通常认为外界胁迫条件促使小孢子进入胚胎发育进程^[56]。小孢子在培养过程中代谢水平发生变化, Bhojwani 等^[57]发现胚性烟草小孢子的蛋白质和 RNA 含量大约是非胚性花粉粒的 1/6, 表明进入胚性发育阶段花粉的正常生物合成途径受到限制。Corral-Martínez 等^[58]发现胚性甘蓝型油菜小孢子中存在大量的自噬现象, 而非胚性小孢子中则不存在, 并认为大量的自噬和杂质清除体外是小孢子胚胎形成的一个先决条件。Boutilier 等^[59]对离体培养 2~3 d 的甘蓝型油菜小孢子进行基因表达谱分析, 发现 *BABY BOOM(BBM)* 转录因子基因与胚胎发育相关, 其在小孢子胚胎和合子胚胎发育中优先表达, *BBM* 异位表达能诱导拟南芥和甘蓝型油菜的幼苗体细胞自发形成胚胎。*BBM* 转录因子在植物细胞分裂中也起着重要作用, 是第一个被公认的与胚性小孢子细胞分裂起始相关的基因。目前运用功能基因组方法已鉴定了一批与大麦、小黑麦、油菜等小孢子胚胎形成相关的基因^[55,60-66], 如 *LEC*、*WUS*、*TaTPD1-like*、*TAA1b*、*GSTF2*、*GSTA2*、*TaNF-YA*、*TaAGL14*、*TaFLA26*、*CHI3*、*XIP-R*、*Tad1*、*WALI6*、*TaEXPB4*、*TaAGP31-LIKE*、*TaME1*、*TAA1b*、*GSTA2*、*TaEXPG4*、*TaEXPB4*、*TaME1*、*Tad1*、*XIP-R1*、*TaAGL14*、*TaNF-YA*、*SERK2* 和 *SERK1* 等。此外小孢子胚胎形成能力可能受加性效应位点控制^[67]。

4.2 单一亲本染色体消失机制

胚胎发育早期单一亲本染色体消失是不稳定种间/种内杂交产生植物单倍体的原因所在^[13], 然而目前其具体作用机制尚不清楚, 主要有以下几种假说: 细胞周期不同步^[68], 核蛋白合成不同步^[69], 父母本基因组不平衡^[3], 有丝分裂间期^[70]或中期^[71]亲本基因组空间分离, 姐妹染色单体分离故障^[72], 形成多极纺锤体^[73], 染色体被排出细胞核^[74], 着丝粒选择性失活^[70,75], 以及宿主特异性核酸酶降解外源染色体^[76]等。动物细胞中也存在类似现象, 关于其机理主要有着丝粒过早分离假说^[77]、亲本基因组空间分

离假说^[78]、有丝分裂后期染色体滞后假说^[79]及、DNA 损伤未修复假说^[80]等。

上述多种假说的一个共同特征是植物通过多种方式识别宿主与外源或受损 DNA, 并瞄准后者将其清除。在小麦×玉米的杂种胚中, 玉米染色体不能聚集到中期细胞板周围, 后期分裂时落后于小麦染色体并产生大量微核^[69]; 在大麦×珍珠粟(*Pennisetum glaucum*)的杂种胚形成过程中, 所有珍珠粟染色体呈现异染色质化和 DNA 微核片段化并在授粉后 6~23 d 随机消失^[74], 该过程类似于程序性细胞死亡事件^[81]; 大麦×球茎大麦杂种胚则是通过核出芽的方式将球茎大麦染色体排出体外^[82]。染色质及微核消失的原因主要有核酸内切酶被特异性染色质拓扑结构激活, 翻译后组蛋白修饰指导染色质凝集、片段化等^[83]。

近期研究发现单倍体形成与 CENH3 蛋白有关。在稳定的杂种胚胎中, 一个亲本产生的 CENH3 蛋白能支持另一个亲本染色体着丝粒的功能, 如在燕麦×玉米的杂种胚胎中, 由于玉米 *CENH3* 基因沉默, 燕麦 CENH3 蛋白弥补了玉米 CENH3 的功能^[84]; 拟南芥×*Arabidopsis arenosa* 杂交种的每条染色体上均检测到了拟南芥 CENH3^[85]; 尽管双亲都表达了 CENH3 基因, 但燕麦×珍珠粟杂交种中仅燕麦 CENH3 蛋白被组装在染色体上^[86]。在不稳定的杂种胚胎中, CENH3 蛋白不能成功组装到其中一个亲本的着丝粒上, 进而导致单一亲本染色体消失。Sanie 等^[75]对大麦×球茎大麦杂种胚胎中 CENH3 的功能进行研究, 发现球茎大麦 CENH3 蛋白失活, 而大麦的 CENH3 蛋白却不能成功整合到球茎大麦染色体上, 导致球茎大麦着丝粒失活而形成母本单倍体。当拟南芥 *CENH3* 单倍体诱导系与野生型杂交, 诱导系基因组消失产生单倍体^[23], 而诱导系本身能稳定自交, 说明突变体着丝粒与野生型着丝粒在杂种胚中发生竞争, 导致诱导系亲本着丝粒失活^[28]。CENH3 功能受到多种蛋白的调控, 对其中任何一个进行操作都可能导致着丝粒失活^[87]。

5 单倍体及双单倍体应用

5.1 植物遗传育种

采用传统育种方法, 获得一个纯合稳定品系至

少需要 6~8 代的自交, 而通过 DH 技术只需 1~2 代即可获得遗传上 100% 纯合的品系, 尤其是针对一些二年生、多年生和自交退化严重的植物, DH 技术能大大节约了育种时间和成本。DH 技术还可用于解锁杂交种或地方品种的遗传特性, 去除群体中致死或有害等位基因, 获取新的种质资源等^[88]。

DH 技术已成为培育植物新品种的重要方法之一。早先人们从自发形成的单倍体中选育出了天竺葵(*Pelargonium hortorum*)新品种 Kleine Liebling 及其突变体^[89], 随着单倍体技术和染色体加倍方法不断发展, 双单倍体技术已广泛用于开发植物新品种, 目前已经选育并推行了大麦、小麦、油菜、水稻、玉米、烟草、茄子(*Solanum melongena* L.)、辣椒(*Cap-sicum annuum* L.)、西瓜(*Citrullus lanatus*)、芦笋(*Asp-aragus officinalis* L.)等超过 300 多份的 DH 系衍生品种^[5,6]。部分 DH 系衍生品种推行面积较大, 如小麦品种 Glossa 在罗马尼亚推行的 5 年时间内占了全国小麦种植面积的 16%^[90]; 2007 年加拿大种植面积最广的 5 个小麦品种中有 3 个是 DH 系衍生品种^[91]; 杜邦先锋公司 2011 年通过 DH 技术获得的玉米自交系比公司前 80 年繁殖的自交系还多, 且绝大部分油菜自交系也来自 DH 技术^[6]。目前不少育种公司和科研机构正在筹建 DH 技术平台。

5.2 QTL 作图及基因组测序

很多植物性状受数量遗传基因控制, 遗传特性复杂, 通常采用 QTL 作图法来解析其遗传基础。构建分离群体是 QTL 作图的必要条件之一, 过去常用 F_2 、 F_3 和回交群体, 但群体内杂合度高、表型和基因型不稳定, 后逐步被重组自交系(Recombinant inbred line, RIL)群体所代替。重组自交系群体是通过多代自交而来, 每个品系都几乎是纯合的亲本基因组组合, 然而其通常需要自交至 F_8 代, 耗费大量时间。采用 DH 技术能快速从 F_1 或杂合子中获得纯合、永久性分离群体, Seymour 等^[30]用同样的拟南芥亲本分别构建 DH 系和重组自交系, 比较两个群体在 QTL 定位上的差异, 结果发现二者的重组率和亲本等位基因频率相类似, 并用新构建的 DH 系成功定位了拟南芥开花时间和叶柄长度的 QTL, 表明 DH 系群体可以代替重组自交系成为拟南芥遗传研究的一种快速、便捷的方法。目前 DH 作图群体已

用于水稻、玉米、油菜、小麦、大麦等多种植物的 QTL 分析。

单倍体和双单倍体也可用于基因组测序。基因组测序是从分子水平上解析植物遗传奥秘, 加深人们对生物的遗传基础、生化机制、染色体结构、基因表达调控、物种进化等认识。目前已完成了 70 多种植物基因组的测序工作。然而杂交种基因组高度杂合, 加大了全基因组测序工作难度, 严重阻碍了测序后的序列拼接。与杂交种相比, 自交系和双单倍体基因位点纯合、遗传基础较简单, 且可以长期保存、重复利用, 在全基因组测序、组装和拼接上存在较大的优势, 如 Jaillon 等^[92]以连续多年自交的近纯合(93%)葡萄(*Vitis vinifera* L.)品系为材料进行了全基因组测序。目前多种植物物种的自交系/双单倍体已被用于参考基因组测序。

5.3 突变体筛选

由于单倍体基因位点为单拷贝, 显、隐性基因均能表达, 因此对单倍体细胞、组织或植株进行筛选能大大提高突变体筛选效率。人们利用单倍体技术先后筛选出了高光合活性烟草株系^[93]、矮秆马铃薯^[94]、抗病西瓜^[95]、巨型胚水稻^[96]等突变体。

5.4 单倍体基因工程

基因组学和测序结果表明植物表型与候选基因之间存在很大的关联性, 然而目前仅有少数基因的功能被注释, 绝大多数的基因功能未知。多种正向遗传学和反向遗传学方法用于验证基因的功能, 然而其研究对象一般为二倍体或多倍体, 导致隐性突变基因或转基因不能在 M_1 或 T_0 代植株上表现出来, 需要自交多代获得纯合基因型, 同时验证多个基因的功能则需要自交更多代, 花费的时间、成本和空间成倍增加, 成为植物基因功能验证的重要障碍和瓶颈之一。采用单倍体策略则能大大提高基因功能鉴定效率。Ravi 等^[25]利用拟南芥单倍体获得 5 个隐性突变位点全部纯合个体的概率为 1/56.5, 远远高于理论值 1/1024。

对单倍体进行转基因可快速获得纯合转基因植株。Chauhan 等^[97]以普通小麦花药单倍体胚胎为外植体, 转入大麦 *HVA1* 基因, 获得了耐干旱、遗传稳定的小麦单倍体植株, 对其进行加倍获得纯合双

单倍体, 这些转基因植株遗传稳定, 直至 T4 代才出现转基因沉默现象。对单细胞烟草小孢子进行转基因具有快速、再生、独立的特点, 且不会产生嵌合体或体细胞无性系变异^[98]。此外单倍体技术结合基因工程技术在获得纯合转基因植株的同时可以去除标记基因^[99]。单倍体技术还可与多种基因编辑技术联合, 在一个生育期内获得含有目标性状的 DH 系或进行基因功能分析^[100]。目前单倍体转基因还存在一些技术难题, 如转基因后小孢子或单倍体胚胎生活力降低, 单倍体诱导方法受到物种和基因型限制, 单倍体加倍效率不高, 以及早期转基因单倍体鉴定方法较少等^[101]。

5.5 单倍体细胞遗传学研究

单倍体还可用于细胞遗传学研究。异源多倍体植物含有多套亚染色体组, 不同亚染色体组之间往往存在部分同源性, 以多倍体的单倍体为研究对象有助于了解部分同源染色体配对、染色体重排、基因组进化和多倍体起源等问题。甘蓝型油菜是由 A 和 C 亚基因组组成的异源四倍体, 其中 A 和 C 染色体组相似性很高, Nicolas 等^[102]观察了单倍体甘蓝型油菜减数分裂过程中染色体重排的程度和规律, 结果发现了大量染色体重排现象, 染色体重排主要是由 A-C 亚基因组间的部分同源区域重组引起, 其次是 A-A 和 C-C 之间的同源区域重组。Nicolas 等^[103]利用单倍体与整倍体甘蓝型油菜杂交, 研究了 *PrBn* (*Pairing regulator in B. napus*) 基因对染色体重组上的影响, 结果发现 *PrBn* 既能抑制部分同源染色体重组又能抑制同源染色体重组。Marta 等^[104]则以拟南芥单倍体为研究对象, 探索了在没有同源染色体存在情况下的减数分裂行为, 结果发现野生型单倍体中几乎不存在染色体交叉和联会, 第一次减数分裂单价体不均匀地分配到两个子细胞中; 单倍体减数分裂从 DNA 双链断裂开始, 不过断裂位点仅为二倍体的一半。此外, 利用单倍体技术与染色体加倍方法构建不同倍性的植物材料, 有利于研究倍性水平对基因表达、基因沉默、新基因形成、基因剂量效应等的影响。

5.6 DH 技术与其他育种方法联合

DH 技术可与多种育种方法联合使用以提高育

种效率。DH 技术与标记辅助选择法 (Marker-assist selection, MAS) 结合能显著提高育种精度、降低育种时间和成本, 该联合育种法已成功改良多种植物抗性, 如小麦抗赤霉病^[105]、水稻抗稻瘟病^[106]、玉米抗条纹病^[107]等。标记辅助育种技术受遗传标记数量及分布的影响, 多数情况下仅能检测出少量遗传变异, 然而数量遗传性状同时受主效和微效 QTL 控制, 研究难度较大。随着多种植物全基因组测序完成和生物信息学迅猛发展, 大量 SNP 标记被开发出来, 从全基因组水平上研究数量遗传性状已成为当前植物遗传研究的热点之一。利用 DH 系进行全基因组选择育种 (Genome wide selection, GWS) 能大大提高植物育种效率^[6]。DH 技术与反向育种 (Reverse breeding, RB) 结合能解密杂交品种的亲本基因型, 从杂交品种中获得纯合的原亲本品系。该方法由 Wijnker 等^[108]首次提出, 通过沉默拟南芥杂交种中编码减数分裂重组蛋白的 *DMC1* 基因以获得同源染色体未重组的配子体, 同时与拟南芥单倍体诱导系杂交得到相应的单倍体后代, 再经过染色体加倍后获得纯合 DH 系, 之后通过基因型分析和重新组合 DH 系, 筛选出杂交后能得到原始杂交种的亲本组合。

6 展 望

自首次发现单倍体植株以来, 单倍体和双单倍体技术取得了长足发展, 并在植物育种、遗传研究、细胞学研究等方面发挥了重要作用。但是, 单倍体及双单倍体技术的应用仍存在很多挑战, 如单倍体产生方法严重受物种和基因型的影响, 很多重要的经济作物至今仍无法开展单倍体相关研究, 虽然着丝粒介导基因组消失法理论上被认为能用于开发所有植物的单倍体, 然而目前除了拟南芥外很少有成功的案例, 需要进一步的评估和验证; 单倍体加倍方法较少, 加倍效率有待提高; 单倍体及双单倍体的鉴定方法单一繁琐、自动化水平低, 严重影响其商业推广应用; 单倍体诱导及胚胎形成的分子遗传机制和细胞学进程了解较少; 单倍体转基因效率低等。令人高兴的是, 近年来科研人员发现了直接诱导产生双单倍体的方法, 该方法省去了染色体加倍环节, 进一步缩短育种时间, 具有非常大的应用潜力, 然而目前仅在玉米和油菜上有报道, 其产生机理未知, 有待深入研究。

参考文献(References):

- [1] Blakeslee AF, Belling J, Farnham ME, Bergner AD. A haploid mutant in the Jimson weed, "*Datura stramonium*". *Science*, 1922, 55(1433): 646–647. [DOI]
- [2] Guha S, Maheshwari SC. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 1964, 204(4957): 497. [DOI]
- [3] Kasha KJ, Kao KN. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature*, 1970, 225(5235): 874–876. [DOI]
- [4] Forster BP, Heberle-Bors E, Kasha KJ, Touraev A. The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci*, 2007, 12(8): 368–375. [DOI]
- [5] Murovec J, Bohanec B. Haploids and doubled haploids in plant breeding. In: Abdurakhmonov IY. Plant Breeding. Croatia: INTECH Open Access Publisher, 2012: 87–106. [DOI]
- [6] Dwivedi SL, Britt AB, Tripathi L, Sharma S, Upadhyaya HD, Ortiz R. Haploids: constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(6): 812–829. [DOI]
- [7] Dunwell JM. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol J*, 2010, 8(4): 377–424. [DOI]
- [8] Kurtar ES, Balkaya A. Production of *in vitro* haploid plants from *in situ* induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2010, 102(3): 267–277. [DOI]
- [9] Jauhar PP, Xu SS, Baenziger PS. Haploidy in cultivated wheats: induction and utility in basic and applied research. *Crop Sci*, 2009, 49(3): 737–755. [DOI]
- [10] Polgári D, Cseh A, Szakács É, Jäger K, Molnár-Láng M, Sági L. High-frequency generation and characterization of intergeneric hybrids and haploids from new wheat-barley crosses. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(8): 1323–1331. [DOI]
- [11] Asker S. A monoploid of *Potentilla argentea*. *Hereditas*, 1983, 99(2): 303–304. [DOI]
- [12] Germanà MA, Chiancone B. Gynogenetic haploids of Citrus after *in vitro* pollination with triploid pollen grains. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2001, 66(1): 59–66. [DOI]
- [13] Ishii T, Karimi-Ashtiyani R, Houben A. Haploidization via chromosome elimination: means and mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, 2016, 67(1): 421–438. [DOI]
- [14] Chase SS. Monoploids in maize. In: Gowen JW. Heterosis. Ames: Iowa State College Press, 1952: 399. [DOI]
- [15] Coe Jr EH. A line of maize with high haploid frequency. *Am Nat*, 1959, 93(873): 381–382. [DOI]
- [16] Geiger HH, Gordillo GA. Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica*, 2009, 54(4): 485–499. [DOI]
- [17] Rotarencu V, Dicu G, State D, Fuia S. New inducers of maternal haploids in maize. *Maize Genet Coop Newslett*, 2010, 84: 1–7. [DOI]
- [18] Prigge V, Xu XW, Li L, Babu R, Chen SJ, Atlin GN, Melchinger AE. New insights into the genetics of *in vivo* induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. *Genetics*, 2012, 190(2): 781–793. [DOI]
- [19] Wedzony M, Röber FK, Geiger HH. Chromosome elimination observed in selfed progenies of maize inducer line RWS. In: XVIIth International Congress on Sex Plant Reproduction. Lublin, Poland: Maria Curie-Skłodowska University Press, 2002: 173. [DOI]
- [20] Liang L, Xu XW, Jin WW, Chen SJ. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. *Planta*, 2009, 230(2): 367–376. [DOI]
- [21] Xu XW, Li L, Dong X, Jin WW, Melchinger AE, Chen SJ. Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through *in vivo* induction of a maternal haploid in maize. *J Exp Bot*, 2013, 64(4): 1083–1096. [DOI]
- [22] Zhao X, Xu XW, Xie HX, Chen SJ, Jin WW. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers. *Plant Physiol*, 2013, 163(2): 721–731. [DOI]
- [23] Ravi M, Chan SWL. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature*, 2010, 464(7288): 615–618. [DOI]
- [24] Burrack LS, Berman J. Flexibility of centromere and kinetochore structures. *Trends Genet*, 2012, 28(5): 204–212. [DOI]
- [25] Ravi M, Marimuthu MPA, Tan EH, Maheshwari S, Henry IM, Marin-Rodriguez B, Urtecho G, Tan J, Thornhill K, Zhu F, Panoli A, Sundaresan V, Britt AB, Comai L, Chan SWL. A haploid genetics toolbox for *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun*, 2014, 5: 5334. [DOI]
- [26] Tek AL, Stupar RM, Nagaki K. Modification of centromere structure: A promising approach for haploid line production in plant breeding. *Turk J Agric For*, 2015, 39(4): 557–562. [DOI]
- [27] Raychaudhuri N, Dubruille R, Orsi GA, Bagheri HC, Loppin B, Lehner CF. Transgenerational propagation

- and quantitative maintenance of paternal centromeres depends on Cid/Cenp-a presence in *Drosophila* sperm. *PLoS Biol*, 2012, 10(12): e1001434. [DOI]
- [28] Karimi-Ashtiyani R, Ishii T, Niessen M, Stein N, Heckmann S, Gurushidze M, Banaei-Moghaddam AM, Fuchs J, Schubert V, Koch K, Weiss O, Demidov D, Schmidt K, Kumlehn J, Houben A. Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(36): 11211–11216. [DOI]
- [29] Zabirowa ER, Shatskaya OA, Shcherbak VS. Line 613/2 as a source of a high frequency of spontaneous diploidization in corn. *Maize Genet Coop Newslett*, 1993, 67: 67. [DOI]
- [30] Seymour DK, Filiault DL, Henry IM, Monson-Miller J, Ravi M, Pang A, Comai L, Chan SWL, Maloof JN. Rapid creation of *Arabidopsis* doubled haploid lines for quantitative trait locus mapping. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(11): 4227–4232. [DOI]
- [31] Seguí-Simarro JM, Nuez F. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. *Cytogenet Genome Res*, 2008, 120(3–4): 358–369. [DOI]
- [32] Jakše M, Hirscheegger P, Bohanec B, Havey MJ. Evaluation of gynogenic responsiveness and pollen viability of selfed doubled haploid onion lines and chromosome doubling via somatic regeneration. *J Am Soc Hortic Sci*, 2010, 135(1): 67–73. [DOI]
- [33] Testillano P, Georgiev S, Mogensen HL, Coronado MJ, Dumas C, Risueno MC, Matthys-Rochon E. Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during *in vitro* maize induced microspore embryogenesis. *Chromosoma*, 2004, 112(7): 342–349. [DOI]
- [34] Anderson JA, Mousset-Déclaus C, Williams EG, Taylor NL. An *in vitro* chromosome doubling method for clovers (*Trifolium* spp.). *Genome*, 1991, 34(1): 1–5. [DOI]
- [35] Häntzschel KR, Weber G. Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. *Protoplasma*, 2010, 241(1–4): 99–104. [DOI]
- [36] Kato A, Geiger HH. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. *Plant Breeding*, 2002, 121(5): 370–377. [DOI]
- [37] Kleiber D, Prigge V, Melchinger AE, Burkard F, Vicente FS, Palomino G, Gordillo GA. Haploid fertility in temperate and tropical maize germplasm. *Crop Sci*, 2012, 52(2): 623–630. [DOI]
- [38] Lv HH, Wang QB, Yang LM, Fang ZY, Liu YM, Zhuang M, Zhang YY, Yang YH, Xie BY, Wang XW. Breeding of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) with fusarium wilt resistance based on microspore culture and marker-assisted selection. *Euphytica*, 2014, 200(3): 465–473. [DOI]
- [39] 付绍红, 张汝全, 杨进, 李云, 王继胜, 邹琼, 陶兰蓉, 康泽明, 唐蓉. 甘蓝型油菜纯合四倍体诱导系的选育方法: 中国, CN103858753A. 2014-06-18. [DOI]
- [40] Delaat AMM, Gohde W, Vogelzakg MJDC. Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breeding*, 1987, 99(4): 303–307. [DOI]
- [41] Battistelli GM, Von Pinho RG, Justus A, Couto EGO, Balestre M. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. *Genet Mol Res*, 2013, 12(4): 4230–4242. [DOI]
- [42] Borrino EM, Powell W. Stomatal guard cell length as an indicator of ploidy in microspore-derived plants of barley. *Genome*, 1988, 30(2): 158–160. [DOI]
- [43] Sood S, Dhawan R, Singh K, Bains NS. Development of novel chromosome doubling strategies for wheat × maize system of wheat haploid production. *Plant Breeding*, 2003, 122(6): 493–496. [DOI]
- [44] Choe E, Carbonero CH, Mulvaney K, Rayburn AL, Mumm RH. Improving *in vivo* maize doubled haploid production efficiency through early detection of false positives. *Plant Breeding*, 2012, 131(3): 399–401. [DOI]
- [45] Maletskaya EI, Yudanov SS, Maletskii SI. Haploids in apozygotic seed progenies of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Sugar Tech*, 2009, 11(1): 60–64. [DOI]
- [46] Aalders LE. Monoploidy in cucumbers. *J Hered*, 1958, 49(1): 41–44. [DOI]
- [47] Weber S, Ünker F, Friedt W. Improved doubled haploid production protocol for *Brassica napus* using microspore colchicine treatment *in vitro* and ploidy determination by flow cytometry. *Plant Breeding*, 2005, 124(5): 511–513. [DOI]
- [48] Ochatt SJ. Flow cytometry in plant breeding. *Cytom Part A*, 2008, 73A(7): 581–598. [DOI]
- [49] Melchinger AE, Schipprack W, Würschum T, Chen SJ, Technow F. Rapid and accurate identification of *in vivo*-induced haploid seeds based on oil content in maize. *Sci Rep*, 2013, 3: 2129. [DOI]
- [50] Chaikam V, Nair SK, Babu R, Martinez L, Tejomurtula J, Boddupalli PM. 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. *Theor Appl Genet*, 2015, 128(1): 159–171. [DOI]

- [51] Melchinger AE, Schipprack W, Utz HF, Mirdita V. *In vivo* haploid induction in maize: identification of haploid seeds by their oil content. *Crop Sci*, 2014, 54(4): 1497–1504. [DOI]
- [52] Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 1996, 6(10): 995–1001. [DOI]
- [53] Marimuthu MPA, Jolivet S, Ravi M, Pereira L, Davda JN, Cromer L, Wang LL, Nogué F, Chan SWL, Siddiqi I, Mercier R. Synthetic clonal reproduction through seeds. *Science*, 2011, 331(6019): 876. [DOI]
- [54] Hofinger BJ, Huynh OA, Jankowicz-Cieslak J, Müller A, Otto I, Kumlehn J, Till BJ. Validation of doubled haploid plants by enzymatic mismatch cleavage. *Plant Methods*, 2013, 9(1): 43. [DOI]
- [55] Maraschin SF, de Priester W, Spink HP, Wang M. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *J Exp Bot*, 2005, 56(417): 1711–1726. [DOI]
- [56] Touraev A, Vicente O, Heberle-Bors E. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci*, 1997, 2(8): 297–302. [DOI]
- [57] Bhojwani SS, Dunwell JM, Sunderland N. Nucleic-acid and protein contents of embryogenic tobacco pollen. *J Exp Bot*, 1973, 24(5): 863–869. [DOI]
- [58] Corral-Martínez P, Parra-Vega V, Seguí-Simarro JM. Novel features of *Brassica napus* embryogenic microspores revealed by high pressure freezing and freeze substitution: evidence for massive autophagy and excretion-based cytoplasmic cleaning. *J Exp Bot*, 2013, 64(10): 3061–3075. [DOI]
- [59] Boutilier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang LM, Hattori J, Liu CM, van Lammeren AA, Miki BLA, Custers JBM, van Lookeren Campagne MM. Ectopic Expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell*, 2002, 14(8): 1737–1749. [DOI]
- [60] Joosen R, Cordewener J, Supena EDJ, Vorst O, Lammer M, Maliepaard C, Zeilmaker T, Miki B, America T, Custers J, Boutilier K. Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. *Plant Physiol*, 2007, 144(1): 155–172. [DOI]
- [61] Malik MR, Wang F, Dirpaul JM, Zhou N, Polowick PL, Ferrie AMR, Krochko JE. Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiol*, 2007, 144(1): 134–154. [DOI]
- [62] Muñoz-Amatriaín M, Svensson JT, Castillo AM, Cistué L, Close TJ, Vallés MP. Transcriptome analysis of barley anthers: effect of mannitol treatment on microspore embryogenesis. *Physiol Plantarum*, 2006, 127(4): 551–560. [DOI]
- [63] Muñoz-Amatriaín M, Svensson JT, Castillo AM, Close TJ, Vallés MP. Microspore embryogenesis: assignment of genes to embryo formation and green vs. albino plant production. *Funct Integr Genomic*, 2009, 9(3): 311–323. [DOI]
- [64] Seguí-Simarro JM, Nuez F. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiol Plantarum*, 2008, 134(1): 1–12. [DOI]
- [65] Tsuwamoto R, Fukuoka H, Takahata Y. Identification and characterization of genes expressed in early embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Planta*, 2007, 225(3): 641–652. [DOI]
- [66] Žur I, Dubas E, Krzewska M, Sánchez-Díaz RA, Castillo AM, Vallés MP. Changes in gene expression patterns associated with microspore embryogenesis in hexaploid triticale (\times *Triticosecale* Wittm.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2014, 116(2): 261–267. [DOI]
- [67] Zhang FL, Takahata Y. Inheritance of microspore embryogenic ability in *Brassica* crops. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(2–3): 254–258. [DOI]
- [68] Bennett MD, Finch RA, Barclay IR. The time rate and mechanism of chromosome elimination in *Hordeum* hybrids. *Chromosoma*, 1976, 54(2): 175–200. [DOI]
- [69] Laurie DA, Bennett MD. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat \times maize crosses. *Genome*, 1989, 32(6): 953–961. [DOI]
- [70] Finch RA. Tissue-specific elimination of alternative whole parental genomes in one barley hybrid. *Chromosoma*, 1983, 88(5): 386–393. [DOI]
- [71] Schwarzacher-Robinson T, Finch R, Smith J, Bennett MD. Genotypic control of centromere positions of parental genomes in *Hordeum* \times *Secale* hybrid metaphases. *J Cell Sci*, 1987, 87(2): 291–304. [DOI]
- [72] Ishii T, Ueda T, Tanaka H, Tsujimoto H. Chromosome elimination by wide hybridization between Triticeae or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cells. *Chromosome Res*, 2010, 18(7): 821–831. [DOI]
- [73] Subrahmanyam NC, Kasha KJ. Selective chromosomal elimination during haploid formation in barley following interspecific hybridization. *Chromosoma*, 1973,

- 42(2): 111–125. [DOI]
- [74] Gernand D, Rutten T, Varshney A, Rubtsova M, Prodanovic S, Br    C, Kumlehn J, Matzk F, Houben A. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. *Plant Cell*, 2005, 17(9): 2431–2438. [DOI]
- [75] Sanei M, Pickering R, Kumke K, Nasuda S, Houben A. Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(33): E498–E505. [DOI]
- [76] Davies DR. Chromosome elimination in inter-specific hybrids. *Heredity*, 1974, 32(2): 267–270. [DOI]
- [77] Zelesco PA, Graves JA. Chromosome segregation from cell hybrids. IV. Movement and position of segregant set chromosomes in early-phase interspecific cell hybrids. *J Cell Sci*, 1988, 89(1): 49–56. [DOI]
- [78] Vig BK, Athwal RS. Sequence of centromere separation: separation in a quasi-stable mouse-human somatic cell hybrid. *Chromosoma*, 1989, 98(3): 167–173. [DOI]
- [79] Sakai C, Konno F, Nakano O, Iwai T, Yokota T, Lee J, Nishida-Umehara C, Kuroiwa A, Matsuda Y, Yamashita M. Chromosome elimination in the interspecific hybrid medaka between *Oryzias latipes* and *O. hubbsi*. *Chromosome Res*, 2007, 15(6): 697–709. [DOI]
- [80] Wang Z, Yin H, Lv L, Feng YY, Chen SP, Liang JT, Huang Y, Jiang XH, Jiang HW, Bukhari I, Wu LJ, Cooke H, Shi QH. Unrepaired DNA damage facilitates elimination of uniparental chromosomes in interspecific hybrid cells. *Cell Cycle*, 2014, 13(8): 1345–1356. [DOI]
- [81] Fukuda H. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol Biol*, 2000, 44(3): 245–253. [DOI]
- [82] Kim NS, Armstrong KC, Fedak G, Ho K, Park NI. A microsatellite sequence from the rice blast fungus (*Magnaporthe grisea*) distinguishes between the centromeres of *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum* in hybrid plants. *Genome*, 2002, 45(1): 165–174. [DOI]
- [83] Houben A, Sanei M, Pickering R. Barley doubled-haploid production by uniparental chromosome elimination. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2011, 104(3): 321–327. [DOI]
- [84] Jin WW, Melo JR, Nagaki K, Talbert PB, Henikoff S, Dawe RK, Jiang JM. Maize centromeres: organization and functional adaptation in the genetic background of oat. *Plant Cell*, 2004, 16(3): 571–581. [DOI]
- [85] Talbert PB, Masuelli R, Tyagi AP, Comai L, Henikoff S. Centromeric localization and adaptive evolution of an *Arabidopsis* histone H3 variant. *Plant Cell*, 2002, 14(5): 1053–1066. [DOI]
- [86] Ishii T, Sunamura N, Matsumoto A, Eltayeb AE, Tsujimoto H. Preferential recruitment of the maternal centromere-specific histone H3 (CENH3) in oat (*Avena sativa* L.) \times pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) hybrid embryos. *Chromosome Res*, 2015, 23(4): 709–718. [DOI]
- [87] Perpelescu M, Fukagawa T. The ABCs of CENPs. *Chromosoma*, 2011, 120(5): 425–446. [DOI]
- [88] Strigens A, Schipprack W, Reif JC, Melchinger AE. Unlocking the genetic diversity of maize landraces with doubled haploids opens new avenues for breeding. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57234. [DOI]
- [89] Daker MG. 'Kleine Liebling', a haploid cultivar of *Pe-largonium*. *Nature*, 1966, 211(5048): 549–550. [DOI]
- [90] S  ulescu NN, Ittu G, Giura A, Must  tea P, Ittu M. Results of using *Zea* method for doubled haploid production in wheat breeding at NARDI Fundulea-Romania. *Rom Agric Res*, 2012, 29(29): 3–8. [DOI]
- [91] Depauw RM, Knox RE, Humphreys DG, Thomas JB, Fox SL, Brown PD, Singh AK, Pozniak CJ, Randhawa HS, Fowler DB, Graf RJ, Hucl PJ. New breeding tools impact Canadian commercial farmer fields. *Czech J Genet Plant Breed*, 2011, 47(S1): S28–S34. [DOI]
- [92] Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Hugu  ney P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruy  re C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Enrico P   M, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Qu  tier I F, Wincker P. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 2007, 449(7161): 463–467. [DOI]
- [93] Medrano H, Primomillo E. Selection of *Nicotiana tabacum* haploids of high photosynthetic efficiency. *Plant Physiol*, 1985, 79(2): 505–508. [DOI]
- [94] Valkonen JPT, Moritz T, Watanabe KN, Rokka VM. Dwarf (di)haploid *pito* mutants obtained from a tetraploid potato cultivar (*Solanum tuberosum* subsp. *Tuberosum*).

- osum) via anther culture are defective in gibberellin biosynthesis. *Plant Sci*, 1999, 149(1): 51–57. [DOI]
- [95] Kuzuya M, Hosoya K, Yashiro K, Tomita K, Ezura H. Powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) resistance in melon is selectable at the haploid level. *J Exp Bot*, 2003, 54(384): 1069–1074. [DOI]
- [96] Park DS, Park SK, Lee BC, Song SY, Jun NS, Manigbas NL, Cho JH, Nam MH, Jeon JS, Han CD, Choi KJ, Kim DH, Woo Y, Koh HJ, Kang HW, Yi G. Molecular characterization and physico-chemical analysis of a new giant embryo mutant allele (*ge¹*) in rice (*Oryza sativa* L.). *Genes Genom*, 2009, 31(4): 277–282. [DOI]
- [97] Chauhan H, Khurana P. Use of doubled haploid technology for development of stable drought tolerant bread wheat (*Triticum aestivum* L.) transgenics. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9(3): 408–417. [DOI]
- [98] Touraev A, Stöger E, Voronin V, Heberle-Bors E. Plant male germ line transformation. *Plant J*, 1997, 12(4): 949–956. [DOI]
- [99] Kapusi E, Hensel G, Coronado MJ, Broeders S, Marthe C, Otto I, Kumlehn J. The elimination of a selectable marker gene in the doubled haploid progeny of co-transformed barley plants. *Plant Mol Biol*, 2013, 81(1–2): 149–160. [DOI]
- [100] Gurushidze M, Hensel G, Hiekel S, Schedel S, Valkov V, Kumlehn J. True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92046. [DOI]
- [101] Shen YO, Pan GT, Lübberstedt T. Haploid strategies for functional validation of plant genes. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(10): 611–620. [DOI]
- [102] Nicolas SD, Le Mignon G, Eber F, Coriton O, Monod H, Clouet V, Huteau V, Lostanlen A, Delourme R, Chalhou B, Ryder CD, Chèvre AM, Jenczewski E. Homologous recombination plays a major role in chromosome rearrangements that occur during meiosis of *Brassica napus* haploids. *Genetics*, 2007, 175(2): 487–503. [DOI]
- [103] Nicolas SD, Leflon M, Monod H, Eber F, Coriton O, Huteau V, Chèvre AM, Jenczewski E. Genetic regulation of meiotic cross-overs between related genomes in *Brassica napus* haploids and hybrids. *Plant Cell*, 2009, 21(2): 373–385. [DOI]
- [104] Cifuentes M, Rivard M, Pereira L, Chelysheva L, Mercier R. Haploid meiosis in *Arabidopsis*: double-strand breaks are formed and repaired but without synapsis and crossovers. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72431. [DOI]
- [105] Yang ZP, Gilbert J, Somers DJ, Fedak G, Procunier JD, McKenzie IH. Marker assisted selection of fusarium head blight resistance genes in two doubled haploid populations of wheat. *Mol Breeding*, 2003, 12(4): 309–317. [DOI]
- [106] de Araújo LG, Prabhu AS, Pereira PAA, da Silva GB. Marker-assisted selection for the rice blast resistance gene *Pi-ar* in a backcross population. *Crop Breed Appl Biot*, 2010, 10(1): 23–31. [DOI]
- [107] Prasanna BM, Chaikam V, Mahuku G, Prasanna BM, Chaikam V, Mahuku G. Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice. Mexico, DF (Mexico): CIMMYT, 2012. [DOI]
- [108] Dirks R, Van Dun K, De Snoo CB, Van Den Berg M, Lelivelt CLC, Voermans W, Woudenberg L, De Wit JPC, Reinink K, Schut JW, Van Der Zeeuw E, Vogelaar A, Freymark G, Gutteling EW, Keppel MN, Van Drongelen P, Kieny M, Ellul P, Touraev A, Ma H, De Jong H, Wijnker E. Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis. *Plant Biotechnol J*, 2009, 7(9): 837–845. [DOI]

(责任编辑: 李付广)