

综述

植物单倍体技术及其应用的研究进展

李英 王佳 季乐翔 李昊 叶梅霞 郭斌 陈仲 安新民*

(北京林业大学林木育种国家工程实验室, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室,
国家林业局树木花卉育种与生物工程重点开放实验室, 北京 100083)

摘要 该文较全面地综述了获得植物单倍体的相关途径及其在基础科学研究和植物育种方面的重要应用, 着重介绍了一种基于着丝粒改造的染色体消除法诱导单倍体的策略及植物单倍体在基因组学研究中潜在的应用价值, 旨在促进植物单倍体技术的完善并开拓其应用领域。

关键词 单倍体; 染色体消除; 花药培养; 基因组学; 育种

1 引言

正常的二倍体含有两套染色体, 分别来自父本和母本。而单倍体植物则只含有一套染色体, 来自母本或是父本。目前得到单倍体的方法主要有两种: 第一, 通过培养配子体从而获得父系或是母系单倍体, 但是对于一些特殊的植物或基因型材料而言, 这一方法是不可行的; 第二, 种间杂交是获得单倍体植物的另一个相对有效的方法。该方法是利用种间杂交过程中, 受精作用后父本或母本一方的染色体组消失而得到单倍体的后代。染色体组消失的分子机理至今还不清楚, 但是有一种假说认为, 存在种间差异的亲本着丝粒与有丝分裂纺锤体之间非均等性互作导致染色体选择性消失。由于单倍体能够在相对较短的时间内使性状得以纯合, 在很大程度上缩短植物育种进程; 此外, 随着分子技术的快速发展, 植物单倍体在基因组学研究方面, 尤其在基因组测序、基因功能的鉴定和构建分子遗传图谱等领域的作用越来越突出。本文侧重介绍一种基于着丝粒改造的单倍体诱导策略, 以及植物单倍体在基因组学研究中潜在的应用, 旨在促进单倍体培养技术的完善并开拓其应用领域。

2 获得单倍体的主要途径

自1920年Harland^[1]发现第一株单倍体棉花到现在已经有90余年, 这期间相继获得了源于不同种属的单倍体植物并在多个研究领域得以成功应用。单倍体自发产生的频率很低, 远远满足不了科研工作者对单倍体材料的需求。为此, 人们开始尝试通过

多种途径来获得植物单倍体。在此, 将主要介绍几种获得植物单倍体的途径, 并着重介绍一种利用基因工程技术实现染色体组消除而获得非转基因型单倍体的新方法。

2.1 花药、花粉培养

自1964年Guha等^[2]首次报道通过培养曼陀罗花药获得单倍体植株以来, 该方法已经在多种植物上获得成功。近期通过花药培养获得单倍体的植物如表1所示。花粉培养又称为游离小孢子培养, 是以单个花粉粒作为外植体进行离体培养的技术, 其在十字花科植物单倍体的培养中应用较广泛。与花药培养相比, 花粉培养的最大优点是再生植株中单倍体和双单倍体的比例较高。花药和花粉培养是获得单倍体的主要手段, 但是仍然存在一些局限: 无论是花粉培养还是花药培养都不同程度地受到基因型、供试材料的生长发育阶段、预处理条件等的影响。

2.2 染色体消除

早在1967年, Weiss等^[25]就发现人与小鼠的体细胞杂交过程中存在染色体消失的现象, 并预言称这一发现将不仅关系到人类染色体上基因的定位, 还将有助于其他物种遗传现象的研究。随后, 相继在多种植物的种间杂交中发现这一奇特现象, 但是种间杂交导致体细胞染色体消失的分子基础尚不清楚, 有一种假说认为, 存在种间差异的亲本着丝粒与

收稿日期: 2011-04-25 接受日期: 2011-05-20

国家林业公益性项目(No.201004009)和国家“863计划”(No.2009AA10Z107)资助项目

*通讯作者。Tel/Fax: 010-62336248, E-mail: xinminan@163.com

表1 花药培养的最新进展

种类	参考文献
Species	References
<i>Anemone coronaria</i>	[3-4]
<i>Cucumis sativus</i>	[5]
<i>Lycopersicon</i>	[6-7]
<i>Cocos nucifera</i>	[8]
<i>Eriobotrya japonica</i>	[9]
<i>Musa balbisiana</i>	[10]
<i>Phlox drummondii</i>	[11]
<i>Capsicum annuum</i>	[12-13]
<i>Brassica campestris</i>	[14]
<i>Carum carvi</i>	[15]
<i>Coffea arabica</i>	[16]
<i>Oryza sativa</i>	[17-18]
<i>Physalis ixocarpa</i>	[19]
<i>Salix viminalis</i>	[20]
<i>Selenicereus and Hylocereus</i>	[21]
<i>Solanum sessiliflorum</i>	[22]
<i>Triticosecale</i>	[23]
<i>Triticum turgidum</i>	[24]

纺锤体之间发生互动而导致染色体选择性消失。据最新报道, Ravi等^[26]利用着丝粒介导法轻易地通过种子获得拟南芥父系和母系两种单倍体植株。利用该方法成功地从四倍体植株的杂交组合中获得了二倍体拟南芥。

着丝粒位于染色体上, 通过与纺锤体微管结合在细胞分裂时调控染色体分离以保证基因组在上下代之间的稳定。研究中对着丝粒特异性组蛋白基因 *CENH3* 进行改造获得突变体 *GFP-tailswap*, 以该突变体为母本与野生型父本杂交得到杂合型合子, 由

于双方亲本的着丝粒互作, 使得来自突变体的染色体组在合子的有丝分裂中丢失, 经发育得到只含有野生型亲本一套染色体的种子, 单倍体的最高诱导率达50%。技术路线如图1所示。另外, 通过交换亲本获得了父系和母系两种拟南芥单倍体植株, 除了创造 *GFP-tailswap* 突变体以外, 利用以 *GFP* 标记的全长 *CENH3* 转基因植物材料也获得了拟南芥单倍体植株, 只是诱导率较前者低很多^[26]。上述办法依赖于 *CENH3* 基因的改造, 除了此类方法外, 基因沉默例如 *RNAi* 的方法很可能是诱导或是消除 *CENH3* 基因功能的另一突破^[27]。

基于着丝粒蛋白 *CENH3* 改造的单倍体诱导策略虽然在育种过程中涉及到转基因, 但后代却是正常的非转基因植物。其一旦被鉴定为非转基因植物, 将会得以广泛的应用, 特别是在强烈抵制转基因植物的欧洲国家。此类方法将基因工程技术与常规的杂交育种手段相结合, 达到了在分子水平上间接地改变染色体倍性的目的, 为进一步探索单倍体的形成机理提供了很好的依据。由于 *CENH3* 普遍存在于真核生物中, 且拟南芥细胞中着丝粒的DNA结构与大部分植物细胞内的着丝粒DNA结构有很大的相似性, 因此有理由相信这一方法将是获得植物单倍体的一次突破性进展。

2.3 辐射花粉或化学药剂处理诱导孤雌生殖

辐射诱导孤雌生殖是指将经辐射处理后失去受精能力的花粉授在正常的柱头上, 虽然它不能与卵细胞结合, 却能刺激卵细胞分裂并发育成单倍体的胚胎, 从而得到母系单倍体植株。这一项技术已经在很多种植物中取得成功^[28]。另外, 有些化学药

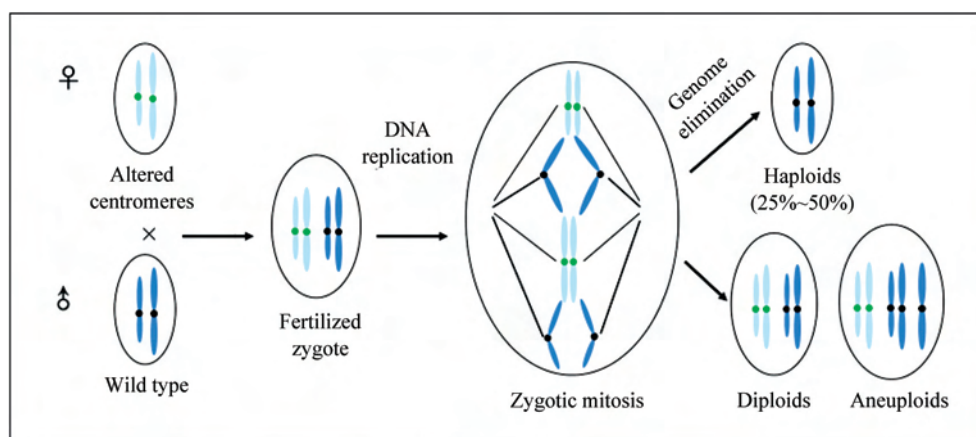


图1 基于着丝粒改造的单倍体诱导策略(根据参考文献[27]修改)

Fig.1 Altering centromeres to produce haploid plants (modified from reference [27])

剂如二甲基亚砷、秋水仙碱、甲苯胺蓝(toluidine blue, TB)等也能诱导植物孤雌生殖。将拟南芥、芥菜和紫露草三种植物的雄蕊摘除,后用油菜素内酯分别涂抹柱头,成功获得了拟南芥和芥菜的单倍体植株,但仅得到混倍体紫露草^[29]。这一类方法尤其适合花药培养或是胚胎培养不易成功的植物种类。选择合适的辐射剂量或药剂浓度是这类方法成功与否的关键也是研究难点。

2.4 离体雌核发育

离体雌核发育也称大孢子发育技术,目前这方面研究的对象主要是未授粉子房或是胚珠,通过对其进行离体培养获得植物单倍体的方法已经在多种植物上取得成功^[30]。离体雌性生殖器官不仅在单独培养时会产生单倍体,另外,将雌性生殖器官与花粉或者花药共培养时能够显著提高愈伤组织或胚的诱导率^[19]。Lantos等^[31]将辣椒的子房和其游离小孢子共培养成功获得辣椒单倍体。并且发现当把辣椒的子房换成小麦的子房时也取得成功,这其中的化学机理还有待进一步研究。与花药和花粉培养相比,由该方法获得的再生植株具有白化苗比率低、倍性变异小的特点;此外,这项技术尤其适用于雄性不育的植物种类。

2.5 远源花粉刺激孤雌生殖

对于一些相对特殊的植物或基因型材料而言,远源花粉刺激孤雌生殖是得到单倍体的一种理想手段。远源花粉不易使母本的卵细胞受精,但是能刺激卵细胞发育,使之开始分裂并发育成胚,并由此产生单倍体或经核内复制形成双倍体,这种技术已经在多种植物上获得成功。在多数情况下,外源花粉常常取自于某些特定基因型的玉米植株^[32]。在远源花粉授粉时,去雄后延迟授粉可以大大提高孤雌生殖的诱导率,而且延迟天数对诱导效果影响很大。

3 单倍体植株的鉴定

鉴别单倍体植株和二倍体植株的方法有许多,主要有形态学特征观察、细胞学水平观察、流式细胞仪技术、荧光定量PCR技术等。针对不同的植物材料或是成本等采取合适的鉴定手段是获得高效、准确试验结果的前提。

3.1 形态学特征鉴定法

由于单倍体的细胞个体较小,无论是植株的叶片面积、花茎还是种子的大小都比正常二倍体要小

很多,所以易于根据外观特征进行鉴定。这是一种直观便捷的方法,但往往需要植物生长发育到一定时期才能够进行。所以,对于一些生长周期较长的木本植物来说不太适用。

3.2 细胞学观察鉴定法

计算细胞中染色体的数目即染色体计数法是鉴定植株倍性水平的最直接准确的方法,但是对于一些染色体较小的植物种类则不适用。另外,由于植株的染色体倍性水平与气孔保卫细胞叶绿体数目通常呈正相关性,这样在幼苗期即可以测定植株的倍性水平。该方法快速、简易、可靠,尤其适合一些染色体较小的种或者品种,但是叶绿体计数法无法分辨嵌合体^[33]。

3.3 流式细胞仪鉴定法

细胞核中DNA含量反应一个细胞的倍性,因此常常用DNA含量来估计细胞的倍性。流式细胞术则通过测定目的DNA的相对荧光强度来分析DNA的含量进而确定目的植株的倍性。该方法的显著特点是快速、高效、准确,特别适用于植物的倍性鉴定,尤其在植物多倍体的鉴定方面,具有显著的优势。这一技术已经成功应用于黄瓜^[34]、椰子^[8]等植物的倍性鉴定,尤为重要的是它能分辨出嵌合体^[35]。随着倍性育种研究的不断深入和研究对象范围的不断扩大,流式细胞仪的应用会越来越普遍。

3.4 分子标记技术鉴定法

随着分子生物技术的快速发展,以DNA分子为基础的倍性测定方法比如DNA分子标记技术^[36]正在逐渐代替以往的以同工酶为基础的鉴定方法。前者不仅可以将在体细胞分化的二倍体植株与单倍体自发加倍形成的双单倍体植株区分开,而且在鉴定基因型高度杂合材料的倍性时具有优势。DNA分子标记鉴定法已经在龙胆^[37]、椰子^[38]等多种植物中得以成功应用。由于此项技术涉及到引物设计等过程,因此,对被测植物的基因组测序情况有一定的要求。

3.5 实时荧光定量PCR鉴定法

实时荧光定量PCR是一种在RNA水平上鉴定植物倍性水平的方法^[39],根据实验的不同需求分为绝对定量和相对定量两种。植物倍性水平鉴定时一般采取相对定量PCR的方法,即以二倍体为参照,分析目标基因的表达在被测植株中相对于二倍体的改变量。目前,该技术已经在拟南芥^[40]、水稻^[41]等多种植物的倍性鉴定中得到成功地应用。该方法简便、

容易操作,高通量,适合单个基因表达变化的研究,且可变因素较少。但是,并非每一个基因位点的表达都受到倍性变化的调控。因此,选择合适的基因位点是应用这项技术进行倍性鉴定的难点。

4 单倍体的应用

单倍体已经在多个研究领域得以成功应用,无论在植物生物学,还是遗传学研究方面有着重大而深远的意义。以下将详细介绍单倍体在基础科学研究和植物育种方面的应用,尤其是单倍体在基因组学研究方面的潜在的应用价值。

4.1 植物育种

单倍体育种还是获得植物新品种的途径之一。最为人熟知的是天竺葵单倍体品种“Kleine Liebling”(2n=9),它不但是细胞学研究的理想植物材料,还是非常成功的园艺品种^[42]。单倍体加倍后得到的双单倍体(doubled haploid, DH)株系能够使性状在相对较短的时间内得以纯合,在提高了育种效率的同时降低了育种的成本。目前,这一技术已经在多种植物的育种中得到成功应用,据报道玉米DH株系已经实现了商业化生产^[43]。此外,通过DH株系的杂交在F1代实现杂种优势是单倍体育种的又一个重要应用。比如观赏花卉龙胆(*Gentiana triflora*)通过花药培养的方法首次成功获得用以实现F1杂种优势的DH株系^[37]。有些植物特别是雌雄异株的多年生木本植物如杨树,其生长周期较长、基因组高度杂合,单倍体育种将是克服以上问题的理想选择。

4.2 基因组测序

人类基因组测序技术已经有不少报道,其在医疗上的作用早就备受关注,但是一直苦于没有针对DNA大片段的核苷酸序列的测定技术,直到Rousseau等^[44]提出利用单倍体材料进行相关基因测序的方法来解决分子诊断检测中对序列的高精确度要求等一系列的问题。据国内相关媒体报道,由于采用了马铃薯单倍体材料和新一代的DNA测序技术,测序速度提高了10倍以上,而且使基因组测序的成本降低了90%。对于多年生树木而言,由于存在遗传背景复杂、基因组高度杂合的问题,利用传统的方法对其全基因组精确测序难度极大。因此,建立并应用单倍体这一全新的测序策略对于杨树等遗传背景复杂、基因组高度杂合的木本植物的基因组学研究无疑具有重要而深远的意义。

4.3 功能基因的发掘与鉴定

拟南芥^[45]、水稻^[46]等植物基因测序工作的完成标志着以突变诱导、插入失活、转座子示踪等技术手段研究功能基因的反向遗传学成为新的研究热点,诱变产生并鉴定各种突变体,建立饱和突变体库将是进行功能基因组学研究的有效手段。利用单倍体进行功能基因的研究已经在酵母的酿酒性能^[47]、藜类的抗逆性^[48]等多个研究领域开展并取得一定成果。在筛选突变体方面,以往这一过程大多是在植株水平上进行,这就存在工作量大的问题。近来,虽然有人设计出在细胞水平上进行筛选的策略,但是不能确定是否将目标组织与周围组织分离开。在单倍体水平上进行则可以解决这个问题。由于从正常二倍体产生的单倍体只含有一套染色体,所以不管是显性基因还是隐性基因都能在RNA和表现型水平上得到表达。

4.4 基因工程育种

小孢子是单细胞,是外源基因的理想受体细胞,诱导成株后易于使目的基因在个体水平上表达,一旦加倍成功便能得到纯合的二倍体植株,且不会有嵌合体的干扰。有利于实现分离和克隆重要性状的功能基因,揭示相应的分子机理以及采用基因工程技术对性状进行遗传调控,从基因水平上进行品质和产量上的改良。以单倍体植株或是组织器官作为转基因受体已经在烟草^[49]、水稻^[50]等多种植物中得到成功应用。由于单倍体只有一套染色体,将单倍体作为转基因的载体,避免了等位基因分离,得到的植株通过加倍处理便得到纯合的二倍体植株,既减少外源基因的损失,又可以缩短育种周期。

4.5 遗传图谱的构建及QTL作图

与F2、F3、BC_n等暂时性群体不同,双单倍体群体属于永久性群体,即双单倍体群体上的等位基因都是固定的,可以无限地用于新标记作图,种子可繁育多次,便于重复检验。双单倍体DH株系在遗传上具有绝对纯合性,不仅是利用分子标记构建分子遗传图谱的理想材料,也适用于构建数量性状位点QTL (quantitative trait loci)遗传图谱。以单倍体或是双单倍体DH作为研究材料,利用分子标记构建遗传图谱已经在杨树^[51]、小麦^[52]等多种植物中取得成功。据报道,目前已经设计出适用于单倍体基因座研究的生物模型,并且开发出了执行这些功能的软件,这将在很大程度上促进单倍体植物材料在遗传图谱构

建上的应用。

5 展望

本文较全面地综述了植物单倍体的发展史,从了解到植物单倍体可以在植物体内自发产生到今天可以预见性地通过多种途径获得单倍体植株,这不得不说是单倍体育种史上的一大进步。目前,其已经在植物基础研究和育种方面发挥了重要的作用,但是我们也发现,有关倍性效应表达调控机理的研究只是局限在基因组的某个特异位点^[53-54],植物单倍体的应用往往限制于在相对较短的时间内得到基因型纯合的植株和实现杂种优势育种。染色体工程的建立与应用^[27]、RNAi^[55]及Tilling^[56]等一系列先进技术的涌现,将在很大程度上扩大其应用范围和提高育种效率。随着现代生物技术的快速发展,植物单倍体不但没有被遗忘,单倍体植物材料及其产物反而被越来越多的研究者所青睐。单倍体技术必将在植物生物技术的发展和育种工作中发挥重要的作用。

参考文献 (References)

- 1 Harland SC. A note on a peculiar type of "rogue" in Sea Island cotton. *Agr News Barbados* 1920; 19: 29.
- 2 Guha S, Mahesewari SC. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 1964; 204: 497-8.
- 3 Laura M, Safaverdi G, Allavena A. Androgenetic plants of *Anemone coronaria* derived through anther culture. *Plant Breeding* 2006; 125(6): 629-34.
- 4 Laura M, Allavena A. *Anemone coronaria* breeding: Current status and perspectives. *Eur J Hortic Sci* 2007; 72(6): 241-7.
- 5 Song H, Lou QF, Luo XD, Wolukau JN, Diao WP, Qian CT, et al. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2007; 90: 245-54.
- 6 Bal U, Abak K. Haploidy in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): A critical review. *Euphytica* 2007; 158(1/2): 1-9.
- 7 Seguí-Simarro JM, Nuez F. Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by *in vitro* culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *J Exp Bot* 2007; 58(5): 1119-32.
- 8 Perera PIP, Hoche V, Verdeil JL, Bandupriya HDD, Yakandawala DMD, Weerakoon LK. Androgenic potential in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2008; 92(3): 293-302.
- 9 Li JQ, Wang YQ, Lin LH, Zhou LJ, Luo N, Deng QX, et al. Embryogenesis and plant regeneration from anther culture in loquat (*Eriobotrya japonica* L.). *Sci Hortic-Amsterdam* 2008; 115(4): 329-36.
- 10 Bakry F, Assani A, Kerbellec F. Haploid induction: Androgenesis in *Musa balbisiana*. *Fruits* 2008; 63: 45-9.
- 11 Razdan A, Razdan MK, Rajam MV, Raina SN. Efficient protocol for *in vitro* production of androgenic haploids of *Phlox drummondii*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2008; 95: 245-50.
- 12 Kim M, Jang IC, Kim JA, Park EJ, Yoon M, Lee Y. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 2008; 27(3): 425-34.
- 13 Nowaczyk P, Olszewska D, Kisiała A. Individual reaction of *Capsicum* F₂ hybrid genotypes in anther cultures. *Euphytica* 2009; 168: 225-33.
- 14 Wang T, Li H, Zhang J, Ouyang B, Lu Y, Ye Z. Initiation and development of microspore embryogenesis in recalcitrant purple flowering stalk (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *purpurea* Hort.) genotypes. *Sci Hortic* 2009; 121: 419-24.
- 15 Smýkalová I, Smirous P, Kubosiova M, Gasmanova N, Griga M. Doubled haploid production via anther culture in annual, winter type of caraway (*Carum carvi* L.). *Acta Physiol Plant* 2009; 31(1): 21-31.
- 16 Silva AS, Luz JMQ, Rodrigues TM, Marques SV, Marques RV, Pasqual M. *Coffea arabica* L. Anther callus and pro-embryoid induction by different growth regulators. *Biosci J* 2009; 25(4): 19-27.
- 17 Bagheri N, Babaeian-Jelodar N, Ghanbari A. Evaluation of effective factors in anther culture of Iranian rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Biharean Biol* 2009; 3: 117-22.
- 18 Cha-Um S, Srianan B, Pichakum A, Kirdmanee C. An efficient procedure for embryogenic callus induction and double haploid plant regeneration through anther culture of Thai aromatic rice (*Oryza sativa* L. subsp. *indica*). *In Vitro Cell Dev Plant* 2009; 45(2): 171-9.
- 19 Escobar-Guzmán RE, Hernandez-Godinez F, de la Vega OM, Ochoa-Alejo N. *In vitro* embryo formation and plant regeneration from anther culture of different cultivars of Mexican husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2009; 96: 181-9.
- 20 Wojciechowicz MK, Kikowska MA. Induction of multi-nucleate microspores in anther culture of *Salix viminalis* L. *Dendrobiology* 2009; 61: 55-64.
- 21 Garcia RB, Schneider B, Tel-Zur N. Androgenesis in the vine cacti *Selenicereus* and *Hylocereus* (*Cactaceae*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2009; 96(2): 191-9.
- 22 Romani I, Schuelter AR, Mora F, Scapim CA, Vendruscolo ECG. Calli induction through anther culture in peach-tomato plants (*Solanum sessiliflorum* Dunal). *Asian J Plant Sci* 2009; 8: 199-205.
- 23 Zur I, Dubas E, Golemic E, Szechynska-Hebda M, Golebiowska G, Wedzony M. Stress-related variation in antioxidative enzymes activity and cell metabolism efficiency associated with embryogenesis induction in isolated microspore culture of triticale (*Triticosecale* Wittm.). *Plant Cell Rep* 2009; 28(8): 1279-87.

- 24 Cistué L, Romagosa I, Batlle F, Echavarri B. Improvements in the production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 2009; 28(5): 727-35.
- 25 Weiss MC, Green H. Human-mouse hybrid cell lines containing partial complements of human chromosomes and functioning human genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967; 58(3): 1104-11.
- 26 Ravi M, Chan SW. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* 2010; 464(7288): 615-8.
- 27 Chan SW. Chromosome engineering: Power tools for plant genetics. *Trends Biotechnol* 2010; 28(12): 605-10.
- 28 Lim W, Earle ED. Effect of *in vitro* and *in vivo* colchicine treatments on pollen production and fruit set of melon plants obtained by pollination with irradiated pollen. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2008; 95: 115-24.
- 29 Kitani Y. Induction of parthenogenetic haploid plants with brassinolide. *Jap J Genet* 1994; 69: 35-9.
- 30 Bhat JG, Murthy HN. Haploid plant regeneration from unpollinated ovule cultures of niger (*Guizotia abyssinica* (L. f.) cass.). *Russ J Plant Physiol* 2008; 55(2): 241-5.
- 31 Lantos C, Juhasz AG, Somogyi G, Otvos K, Vagi P, Mihaly R, *et al.* Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capiscum annum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2009; 97(3): 285-93.
- 32 Singh S, Sethi GS, Chaudhary HK. Differential responsiveness of winter and spring wheat genotypes to maize-mediated production of haploids. *Cereal Res Commun* 2004; 32(2): 201-7.
- 33 Yuan SX, Liu YM, Fang ZY, Yang LM, Zhuang M, Zhang YY, *et al.* Study on the relationship between the ploidy level of microspore-derived plants and the number of chloroplast in stomatal guard cells in *Brassica oleracea*. *Agr Sci China* 2009; 8(8): 939-46.
- 34 Gémes-Juhász A, Balogh P, Ferenczy A, Kristóf Z. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Rep* 2002; 2(21): 105-11.
- 35 Jaskani MJ, Kwon SW, Kin DH. Flow cytometry of DNA contents of colchicine treated watermelon as a ploidy screening method at M₁ stage. *Pak J Bot* 2005; 37(3): 685-96.
- 36 Diao WP, Jia YY, Song H, Zhang XQ, Lou QF, Chen JF. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. *Sci Hortic-Amsterdam* 2009; 119(3): 246-51.
- 37 Doi H, Takahashi R, Hikage T, Takahata Y. Embryogenesis and doubled haploid production from anther culture in gentian (*Gentiana triflora*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2010; 102(1): 27-33.
- 38 Perera PIP, Perera L, Hoche V, Verdeil JL, Yakandawala DMD, Weerakoon LK. Use of SSR markers to determine the anther-derived homozygous lines in coconut. *Plant Cell Rep* 2008; 27(11): 1697-703.
- 39 Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996; 6(10): 995-1001.
- 40 Olmedo-Monfil V, Durán-Figueroa N, Arteaga-Vázquez M, Demesa-Arévalo E, Aufran D, Grimaneli D, *et al.* Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature* 2010; 464(7288): 628-32.
- 41 Zhang HY, Peng H, Li PC, Deng QM, Xu PZ, Li Y, *et al.* The microarray analysis for gene expression in haploids and diploids derived from twin-seedling rice. *Sci China Ser C* 2008; 51(6): 503-12.
- 42 Daker MG. "Kleine Lieblich" a haploid cultivar of *Pelargonium*. *Nature* 1966; 211: 549-50.
- 43 Lashermes P, Beckert M. Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. *Theor Appl Genet* 1988; 76: 405-10.
- 44 Rousseau F, Gancberg D, Schimmel H, Neumaier M, Bureau A, Mamotte C, *et al.* Considerations for the development of a reference method for sequencing of haploid DNA-an opinion paper on behalf of the IFCC committee on molecular diagnostics. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47(11): 1343-50.
- 45 Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M. *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 1998; 282(5389): 662,679-82.
- 46 Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). *Science* 2002; 296(5565): 92-100.
- 47 Pérez-Ortín JE, García-Martínez J, Alberola TM. DNA chips for yeast biotechnology. The case of wine yeasts. *J Biotechnol* 2002; 98(2/3): 227-41.
- 48 Liu N, Zhong NQ, Wang GL, Li LJ, Liu XL, He YK, *et al.* Cloning and functional characterization of *PpDBF1* gene encoding a DRE-binding transcription factor from *Physcomitrella patens*. *Planta* 2007; 226(4): 827-38.
- 49 Smith HA, Swaney SL, Parks TD, Wernsman EA, Dougherty WG. Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: Expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell* 1994; 6(10): 1441-53.
- 50 Chen C, Xiao H, Zhang W, Wang A, Xia Z, Li X, *et al.* Adapting rice anther culture to gene transformation and RNA interference. *Sci China C Life Sci* 2006; 49(5): 414-28.
- 51 Cervera MT, Storme V, Ivens B, Gusmao J, Liu BH, Hostyn V, *et al.* Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics* 2001; 158(2): 787-809.
- 52 Wang Z, Wu X, Ren Q, Chang X, Li R, Jing R. QTL mapping for developmental behavior of plant height in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 2010; 174(3): 447-58.
- 53 Wang J, Tian L, Madlung A, Lee HS, Chen M, Lee JJ, *et al.* Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. *Genetics* 2004; 167(4): 1961-73.
- 54 Liu B, Wendel JF. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Mol Phylogenet Evol* 2003; 29(3): 365-79.

- 55 Eamens A, Wang MB, Smith NA, Waterhouse PM. RNA silencing in plants: Yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol* 2008; 147(2): 456-68.
- 56 Barkley NA, Wang ML. Application of TILLING and EcoTILLING as reverse genetic approaches to elucidate the function of genes in plants and animals. *Curr Genomics* 2008; 9(4): 212-26.

The Advances of Haploid Techniques and Exploitation in Plants

Li Ying, Wang Jia, Ji Lexiang, Li Hao, Ye Meixia, Guo Bin, Chen Zhong, An Xinmin*

(National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of State Forestry Administration, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract The first haploid cotton with half the normal chromosome complement was discovered in 1920. And in the ninety years since then such plants have been identified in many other species. This review describes the range of techniques available for the induction of haploids and discusses their value in a range of fields, from fundamental research to applied aspects. It will focus on a new technique with which haploid plants were produced by centromere-mediated chromosome elimination and the potential value of plant haploids in genomic research in the purpose of promoting haploid techniques improvement and exploring its application.

Key words haploid; chromosome elimination; anther culture; genomic; breeding

Received: April 25, 2011 Accepted: May 20, 2011

This work was supported by the Forestry Public Benefit Research Foundation (No.201004009) and National High-tech R&D Program of China (No.2009AA10Z107)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-62336248, E-mail: xinminan@163.com