

# 雙單倍體 在遺傳及育種上之應用

農試所生技組 夏奇鋮 陳威臣 曹進義

作物組 林子凱

## 一、前言

植物的生活史中包含孢子體世代(2n)與配子體世代(n)，其中配子體世代因為體積小或存在的時間較短，往往被忽視而成為隱形的世代；但對於一些演化層級較低的苔蘚或蕨類植物而言，配子體世代與孢子體世代在生活史中佔有相同之地位，由此推論，高等植物的配子體原本應該具有與孢子體相同之分化能力，但可能因為演化上的用進廢退，而逐漸喪失了此功能。由配子體分化而來的植株，其染色體數是孢子體的一半，也就是所謂的單倍體，染色體經過自然或人為倍加後遂成為雙單倍體(doubled haploid, DH)，DH的等位基因具有同質性，是進行遺傳研究及育種工作的最佳材料。

## 二、獲得DH的各種途徑

目前異交作物之商業品種以育成一代雜交品種(F<sub>1</sub>)最為普遍，F<sub>1</sub>具有雜種優

勢強、整齊度高，且自行留種後植株之優良性狀難以保持等特性，因此成為經濟規模栽培與商業化推廣的最佳選擇。在生產F<sub>1</sub>的過程中，首先必須純化固定遺傳背景與選育具有雜種優勢的兩親本，其過程也就是所謂的自交系培育。自交系親本一般而言需6-8世代方能育成，若作物本身具有自交不親和性或自交弱勢等障礙，則自交親本培育所需的人力與時間成本就更高。DH因為具有全基因體的同質性，是遺傳背景100%的純系，適合作為生產雜交品種的親本，因此獲得DH的各種途徑遂受到重視。

DH可經由生體(*In vivo*)或經由生體外(*In vitro*)方法誘導而得。*In vivo*獲得DH之途徑，一般可經由孤雌生殖、假性受精、遠源雜交而產生；*In vitro*得到DH之方法，主要藉由配子體的組織培養，這種再生的途徑稱為gametophytic pathway或gametic embryogenesis，一般可藉由花藥培養、小孢子培養、子房培養或胚珠培養而得之。獲得DH之最佳途徑對各種作物而言並不相同，例如栽培種大麥利用遠源之球莖大麥花粉授粉，由球莖大麥而來的染色體在雜交幾天後會自動

作者：夏奇鋮研究員  
連絡電話：04-23317327

消失，將幼胚取出進行胚培養，可以得到一定比率的DH與單倍體。此外學者並發現普通小麥與球莖大麥或玉米雜交，燕麥與玉米雜交，小黑麥與 *Imperata cylindrica* 等植物屬間雜交，馬鈴薯與 *S. phureja* 種間雜交，也能造成父本染色體被剔除，從而誘導母本單倍體的產生 (Germana, 2011)。In vitro 方法中則以花藥培養最為普遍，但十字花科作物自油菜發展出小孢子游離培養技術後，獲得DH植株之方法已改採效率較高的小孢子培養 (圖一)。影響小孢子培養獲得DH之因子，包括供應植株之基因型、生長環境及營養條件、花蕾之前處理、培養基之組成、培養與再生條件以及染色體倍加處理等 (夏等, 104)。

### 三、DH在遺傳研究上之應用

茲將DH在遺傳研究方面之應用分述如下：

(1) 建構遺傳連鎖圖譜：DH之每個基因座上具有相同的等位基因，因此在DH族群當中，個體基因型排列組合之頻率易於估算，是繪製遺傳圖譜的最佳族群 (DH mapping population)。此

外，DH族群自交繁殖之後代，因遺傳背景不會再變化，被視為是一個永久性的群體，其植株外表型可以進行重複調查試驗，與其他建構遺傳連鎖圖譜之材料族群相較，具有在材料交換性、延續研究性以及數量遺傳研究方面之優勢。但如果把DH族群與F<sub>2</sub>族群相比較，有研究指出DH族群具有較大之分離偏差 (segregation distortion)，推測其原因可能在DH生產過程中包括組織培養、胚分化特性基因的選擇性以及具稔性DH植株選拔所造成，但以上諸點可藉由擴大DH族群的個體數來減少偏差 (Pink *et al.*, 2008)。

(2) 基因座定位：由於DH在每一個基因座上的等位基因都是相同的，DH族群可以用多年期、多地點對同一群體進行重複試驗，觀察在不同環境下外表型的表現，從而使性狀調查之數據分析更加準確，且研究的延續性可以獲得保證，這點對於數量性狀基因座定位尤其重要。

(3) 形態發生與基因表現研究：小孢子培養除了可獲得DH植株作為育種應用外，同時也是研究胚分化的極佳模式系統 (Soriano *et al.*, 2013)。胚分化研



圖一、青花菜小孢子培養。小孢子胚(A)，胚發育為瓶苗(B)，DH植株生長之情形(C)。

究一般取受精後之結合子(zygote)作為材料，但結合子胚在發育早期一旦被分離培養其成活率低，且可取得之結合子胚數量有限是其缺點。反觀利用油菜小孢子誘導胚分化的過程，游離小孢子於培養液中易於觀察，利用簡單的溫度變化即可達到誘導胚分化的效果，充足的小孢子數量加上分化的高度同步化，讓油菜小孢子培養成為研究胚分化的最佳模式系統。小孢子的胚分化除了作為觀察形態分化之用，亦為研究胚分化有關基因之表達與調控的最佳材料。

- (4) 遺傳種原的保存：種原收集的數量雖然對種原的保存具有代表性，但種原的利用才是更具意義的課題。通常針對特定的性狀在種原庫中搜尋，只會得到少數相關的種原，這些種原的代表性因此顯得特別的重要。Frankel(1984)建議以核心種原(core collection)的收集為主，亦即以最少的重複收集代表最大的多樣性。但即便如此，異交作物如Brassica屬作物，其基因組(genome)常存在結構相似的近同源基因，在核心種原收集時，近同源基因的存在對於多樣性評估有一定的困難度。若以核心種原為主，利用小孢子培養以每一種質(accessions)生產一個DH作為取樣結構所建立DFFS (Diversity Fixed Foundation Sets)是一種可行的策略，利用基因型固定之品系而非原有之種原進行分子標誌基因型鑑別(Marker genotyping)，在技術上相對簡單，尤其像*B. oleracea*種原間

原本來就存在有許多近同源基因，如果一個分子標誌在非同質結合基因型品系中有表現，有可能代表不同之基因座或相同基因座上的等位基因；但是在2倍體的物種中，DH個體每一個基因座只會有一個等位基因，因此分子標誌產出之多型性，即可確定代表為不同之基因座。

#### 四、雙單倍體在突變上之應用

DH可以作為誘導(inducing)及固定(fixing)突變的一個快速捷徑(Szarejko and Forster, 2007)。一般突變大多為隱性，必需要在 $M_2$ 或 $M_3$ 方能篩選及鑑定。傳統突變誘導處理施用種子( $M_0$ )， $M_0$ 種子長成後之 $M_1$ 植株，通常只有少數顯性突變容易被選出，但對於大多數的隱性突變，必需等到 $M_2$ 方可進行篩選，對於一些數量遺傳控制的性狀，更要等到 $M_3$ 才能進行選拔，並於 $M_4$ 加以確認。新的作法是利用 $M_1$ 植株來生產DH，DH植株隨即在田間進行表現觀察，此法在時間及選拔效率上皆較傳統方法提升，更重要的是在遺傳上從 $M_1$ 而來之同質突變體(DH)，其基因分離比為1:1，遠比 $M_1$ 自交後代基因分離比3:1簡單，意味著可以用較少數量之選拔族群以及增加突變體發現的機率。此外突變誘導亦可以施用於小孢子培養階段，將篩選提前至小孢子階段，亦即於試管內進行篩選而非田間篩選，可節省大量之篩選成本，利用此法在耐鹽、抗殺草劑及抗病篩選上皆有成功之實例。

## 五、雙單倍體在育種上之應用

運用DH技術於育種流程可以縮短育種時程及提高選種效率，一般自交系經過6世代自交後約可達到98%的遺傳背景同質性，運用DH技術則於當代即得到100%的同質體。以一年一作之自交系育成時間來看，可以從原本的6年縮短至1-2年；在新品種育成的期程方面，尤其對於生長期較長的晚生種而言，可以節省50%的時間，也就是節省3-7年，對於早生種而言，亦可節省2年的時間。從人力成本上來看，如果以6年育成一個自交系來看，其間至少需要5次的自交授粉，而DH植株只需進行一次的自交授粉，這意味著DH只經過一次的基因重組，可以保留較高的親本遺傳組合，或是保留較多的可累積基因差異(additive genetic variation)；相對而言，也因為DH生產過程中只經過一次的減數分裂，不利於打破原有不良的基因連鎖。此外，DH因當代即可育成，減少了許多田間天然環境適應性篩選的機會，或是基因型與環境交感效應的評估。但也由於DH的遺傳同質性可以讓他在不同的環境考察數量基因之表現，提供較佳的雜交組合內及雜交組合間的差異評估，以及具有選拔所需群體小以及隱性基因也能表達的優點。此外，DH可以在較早的世代選拔，對於一些有自交弱勢的作物如黑麥(rye)、自交

障礙如雌雄異株、自交不親合及長幼年期的木本作物而言更為重要。最後，DH的稔性也是需要觀察的重點，推測弱勢或不稔性可能與較多不良隱性基因的累積，以及分離偏差(segregation distortion)所造成。目前大麥、油菜與春小麥、玉米等作物已可將育種工作實際架構於DH生產技術(表一)，在黑麥、燕麥、黑小麥、馬鈴薯、甘藍類蔬菜等作物，雖然DH生產量不如前述之3種作物，但DH之數量亦足夠育種工作順利進行(Turesson et al. 2007)。

DH與分子標誌的合併使用：於育種流程中同時運用DH與分子標誌兩種技術，可以提早目標基因固定的世代(Marn and Fleck, 2007)。以回交工作為例，可以在雜交後的早期世代即建立DH族群，迅速固定目標基因，再搭配分子標誌的基因型資料進行選種，可以減少環境因子對選拔效應所產生的影響，讓選種工作變得簡單又有效率(Foroughi and Wenzel, 1990)。此外曠日廢時的多基因堆疊(pyramiding)育種，亦可藉由DH族群來縮小育種所需族群之數量，再配合分子標誌精確分辨雜交後代之基因型，可提高選種之效率。

表一、德國Saaten Union Resistenzlabor 公司組織培養單位每年生產之DH數量表 (Turesson et al. 2007)

作物	DH生產方式	DH line數
春大麥與冬大麥	花藥培養	85,000
春油菜與冬油菜	小孢子培養	25,000
春小麥與冬小麥	玉米授粉	15,000

## 六、結語

運用DH於育種具有純合速度快、選拔群體小以及隱性基因得以表達的優點，可縮短育種年限並提高選拔效率。將DH生產技術與其他技術如誘變、基因轉殖、分子標誌輔助選種（MAS）相結合，可以創造出更高的效率與產值。例如傳統育種實施困難且耗費時間的基因堆疊，運用DH並配合實施MAS，可加速並提高選種效率，精準快速的達成育種目標。育種中常需要引進特定性狀且必須不斷回交的過程，亦可利用DH合併MAS來快速達成。此外，多基因控制的QTL導入亦可藉相同方法來達成。新興的育種方法如反向育種，其目標與雜交育種相反，希望完全阻止同源染色體的交叉、交換，亦即同源染色體在減數分裂中、後期，可以如同單價體一般隨機分離，生產基因互補性的DH雜交後，重建原親本配制的雜種。未來吾人對胚分化需要投入更多的基礎研究、建立更簡易大量的DH生產方法，以及思考如何適時於育種過程中使用DH技術，亦即DH技術與各種其他生物技術與分子遺傳知識的結合運用將越來越多元，達到提高育種效率並突破目前育種瓶頸的目標。

## 七、參考文獻

- 夏奇鈺、陳威臣、曹進義。2015。十字花科蕈苔屬植物利用小孢子培養育成純系親本簡介。農業試驗所技術服務季刊 104:14-17。
- Foroughi-wehr B. and G. Wenzel. 1990. Recurrent selection altering with haploid steps- a rare breeding procedure for combining agronomic traits in inbreeders. *Theor Appl Genet.* 80: 564-568.
- Frankel O. H. 1984. Genetic perspectives of germplasm conservation. In: Arber W., K. Limensee, W. J. Peakcock, and P. A. W. Starlinger (eds) *Genetic manipulation: impact on man and society.* Cambridge University Press. Cambridge, pp 161-170.
- Germana M. A. 2011. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep.* 30:839-857.
- Pink D. et al. 2008. Double haploids, markers and QTL analysis in vegetable brassicas. *Euphytica* 164: 509-514.
- Soriano, M., H. Li, and K. Boutilier. 2013. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Cell Rep.* 26: 181-196.
- Szarejko I., and B. P. Forster. 2007. Doubled haploidy and induced mutation. *Euphytica* 158: 359-370.
- Turesson S., C. Dayteg, P. Hagberg, O. Manninen, P. Tanhuanpaa, T. Tenhola-Roininen, E. Kiviharju, J. Weyen, J. Forster, J. Schondelmaier, J. Lafferty, M. Marn, and A. Fleck. 2007. Molecular markers and doubled haploids in European plant breeding. *Euphytica* 158: 305-312.