

玉米单倍体胚芽鞘节组织培养特性研究

杜何为^{1,2}, 刘志鹏¹, 严建兵¹, 李建生¹

(¹ 中国农业大学国家玉米改良中心, 北京 100193; ² 长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434025)

摘要: 【目的】研究玉米单倍体胚芽鞘节组织培养特性, 为单倍体加倍提供一条新的途径。【方法】以 Reid 群、黄早四群和温热 I 群群内杂交 20 个组合的单倍体胚芽鞘节为外植体, 分析愈伤组织的诱导率和分化率, 并对再生植株根尖染色体数目进行观察和花粉育性分析; 同时使用 SSR 分子标记, 分析再生植株的基因型。【结果】Reid 群和黄早四群的单倍体芽鞘节愈伤组织的诱导率比温热 I 群高, 达极显著水平; 共获得 15 株单倍体植株, 根尖染色体数目为 10; I-KI 染色发现, 散粉的花药, 其花粉为部分可育; 15 株单倍体植株的遗传稳定, 未见变异。【结论】Reid 群和黄早四群的单倍体胚芽鞘节组培特性较好, 温热 I 群较差; 组织培养产生的单倍体植株遗传型均来自双亲的重组类型。建立了玉米单倍体胚芽鞘节组织培养体系。

关键词: 玉米; 单倍体; 胚芽鞘节; 组织培养

Tissue Cultural Characterization of Haploid Coleoptilar Node in Maize

DU He-wei^{1,2}, LIU Zhi-peng¹, YAN Jian-bing¹, LI Jian-sheng¹

(¹ National Maize Improvement Center of China, China Agricultural University, Beijing 100193;

² College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei)

Abstract: 【Objective】 The aim of this research is to test and characterize maize haploid plants generated from coleoptilar node by means of tissue culture in order to create a new method to obtain doubled-haploid lines. 【Method】 The haploid coleoptilar nodes of 20 hybrid F₁ combinations came from Reid, Huangzaosi and Tem-tropic I group, respectively, were submitted to induction and differentiation frequency test. Both chromosome number of root tip cells and pollen fertility in regenerated plants were analyzed. Forty-seven SSR makers were used to evaluate the genotype of the regenerated haploid plants. 【Result】 The callus induction frequency was significantly higher in Reid and Huangzaosi groups than that of Tem-tropic I group. All the root tip cells from 15 regenerated plants were found to contain only 10 chromosomes, suggesting that they were haploid plants. After colchicines treatment, I-KI staining of the pollen grains in shedding anthers revealed that they partially sterile. Based on SSR makers date, it was noted that all the genotypes of regenerated haploid plants originated from the recombination of their two parents. 【Conclusion】 Reid and Huangzaosi groups were much better than Tem-tropic I group in terms of maize haploid plant generation through tissue culture.

Key words: maize (*Zea mays* L.); haploid; coleoptilar node; tissue culture

0 引言

【研究意义】近年来单倍体育种技术广泛应用于玉米育种, 但自然和化学加倍率仍然偏低^[1-2]。以玉米单倍体胚芽鞘节为外植体, 通过愈伤组织扩繁, 以期分化出大量的单倍体植株, 从而提高单倍体加倍的成

功率。【前人研究进展】Zabirova 等^[1]研究了不同玉米材料的自然加倍率, A344 和 A663 的自然加倍率分别为 4.2% 和 3.8%, 而 Kr123c0 和 F₂ 的自然加倍率为 0。韩学莉等^[2]使用不同的秋水仙素浓度和不同的加倍方法, 结果发现浸种法成活率较高, 但加倍率低; 注射法加倍率较高, 但成活率较低。使用秋水仙素或除

收稿日期: 2009-12-31; 接受日期: 2010-04-08

基金项目: 国家“863”计划(2009AA101103)

作者简介: 杜何为, 博士研究生。Tel: 0716-8066182; E-mail: duhewei666@163.com。通信作者李建生, 教授, 博士。Tel: 010-62732422; E-mail: lijiansheng@cau.edu.cn

草剂, 处理小孢子、花药、单倍体愈伤组织、单倍体茎尖或单倍体幼胚, 可得到双单倍体植株^[3-8]。Kato 以 N₂O 气体, 在单倍体植株长至 6 叶 1 心时期进行处理, 约 44% 的单倍体植株可以自交结实^[9]。玉米小孢子和花药培养, 受基因型限制, 培养周期长, 且分化率低; 单倍体茎尖及幼胚的加倍技术受专利的保护, 而气体加倍难以应用于大田育种。2006 年, Sidorov 等报道了以玉米胚芽鞘节为外植体, 成功诱导出 I 型愈伤组织^[10], 但单倍体胚芽鞘节组织培养技术、以及各杂种优势群单倍体胚芽鞘节组培特性的研究未见报道。【本研究切入点】玉米单倍体胚芽鞘节取材方便, 不受季节性影响, 本研究以 Reid 群、黄早四群和温热

I 群 20 个杂交组合的单倍体胚芽鞘节为外植体, 分析愈伤组织的诱导率和分化率。【拟解决的关键问题】研究玉米单倍体胚芽鞘节组织培养特性, 为玉米单倍体育种提供一条可行的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 玉米单倍体诱导系是来源于 Stock6 的母本单倍体诱导系; 以 Reid 群、黄早四群和温热 I 群的 23 份自交系为材料, 基于杂种优势群内组配的原则, 配置 20 个 F₁ 杂交组合 (表 1)。所有杂交种及单倍体诱导系种植于中国农业大学上庄实验站。

表 1 20 份供试 F₁ 杂交组合材料

Table 1 The material list of 20 hybrids and their parents

群体 Group	材料 Materials
Reid 群 Reid group	LH132/郑 58, 郑 58/121, LH82/郑 58, D133A/488B, D133A/490A, 郑 58/B73, D133A/3H61, LH132/LH198
黄早四群 Huangzaosi group	4444/D1-16, 昌 72/齐 1261, 西 502/昌 72, J853/LX9801, J853/京 24, D1-16/昌 72
温热 I 群 Tem-tropic I group	178/127, 87-1/127, 齐 319/127, 178/138, 178/齐 319, 87-1/178

1.1.2 培养基成分 整个试验采用 5 种培养基, 包括 MSVS34 发芽培养基^[10]、MSW57 诱导培养基^[10]、N6 继代培养基、分化培养基和生根培养基。各培养基的组分如下:

MSVS34 发芽培养基: MS 大量元素、微量元素及有机物, 40 g·L⁻¹ 麦芽糖, 0.1 g·L⁻¹ 酪蛋白水解物, 1.95 g·L⁻¹ MES, 0.75 g·L⁻¹ 氯化镁, 0.5 g·L⁻¹ 谷氨酰胺, 0.1 g·L⁻¹ 抗坏血酸, 10 mg·L⁻¹ 毒莠定, 3 mg·L⁻¹ BAP, 8 g·L⁻¹ 琼脂, pH 5.8;

MSW57 诱导培养基: MS 大量元素、微量元素及有机物, 0.5 mg·L⁻¹ 盐酸硫胺素, 0.5 g·L⁻¹ 酪蛋白氨基酸, 30 g·L⁻¹ 蔗糖, 1.38 g·L⁻¹ 脯氨酸, 3.4 mg·L⁻¹ 硝酸银, 0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D, 2.2 mg·L⁻¹ 毒莠定, 8 g·L⁻¹ 琼脂, pH 5.8;

N6 继代培养基: N6 大量元素、微量元素及有机物, 0.5 g·L⁻¹ 酪蛋白水解物, 0.7 g·L⁻¹ 脯氨酸, 2 mg·L⁻¹ 2,4-D, 30 g·L⁻¹ 蔗糖, 2.7 g·L⁻¹ 明胶, pH 5.8;

分化培养基: MS 大量元素、微量元素及有机物, 100 mg·L⁻¹ 肌醇, 0.5 g·L⁻¹ 脯氨酸, 0.5 g·L⁻¹ 酪蛋白水解物, 250 mg·L⁻¹ 谷氨酰胺, 25 mg·L⁻¹ 琥珀酸, 30 g·L⁻¹

蔗糖, 3.0 g·L⁻¹ 明胶, pH 5.8;

生根培养基: MS 大量元素、微量元素及有机物, 0.5 mg·L⁻¹ NAA, 30 g·L⁻¹ 蔗糖, 1.2 g·L⁻¹ 明胶, pH 5.8。

1.1.3 SSR 引物名称 参照王风格等^[11]的研究, 选用 47 对 SSR 引物, 用于单倍体植株的基因型分析, 引物名称及其在基因组上的定位见表 2。

1.2 方法

1.2.1 籽粒处理 以 20 个 F₁ 杂交种作母本, 分别与单倍体诱导系杂交。待种子成熟、干燥后, 从每一材料挑选 100 粒紫顶白胚的籽粒, 分别装入信封, 开口放入干燥器内。使用 250 mL 的烧杯, 盛 200 mL 5.25% 次氯酸钠溶液, 再加入 2 mL 浓盐酸, 放入干燥器中央, 密封处理 8—15 h。将籽粒取出, 放入烧杯, 于超净工作台加入 70% 乙醇处理 1 min; 去 70% 乙醇, 加入 2% 次氯酸钠溶液, 浸泡 20 min; 用无菌水洗 4—5 次, 最后用无菌水浸泡过夜; 剥离成熟胚, 接种于 MSVS34 培养基中, 放置 25℃ 光照培养, 光照强度 2 000 lx, 每天光照 16 h, 培养 7—10 d。

1.2.2 单倍体胚芽鞘节愈伤组织诱导及继代培养 待成熟胚萌发后, 剔除胚根、胚或胚芽呈紫色的材料,

表 2 47 对 SSR 分子标记名称及其在基因组上的分布

Table 2 47 SSR markers and their genomic locus

SSR 标记 SSR marker	基因组定位 Genomic location	SSR 标记 SSR marker	基因组定位 Genomic location	SSR 标记 SSR marker	基因组定位 Genomic location	SSR 标记 SSR marker	基因组定位 Genomic location
bnlg1007	1.02	bnlg1523	3.02	bnlg2305	5.07	phi080	8.08
bnlg439	1.03	phi053	3.05	bnlg161	6.00	phi233376	8.09
umc2112	1.04	umc1136	3.10	bnlg249	6.01	umc2084	9.01
umc1335	1.06	phi072	4.01	bnlg1702	6.05	phi065	9.03
umc1147	1.07	bnlg490	4.04	phi299852	6.07	umc1492	9.04
bnlg1671	1.10	bnlg2291	4.06	umc1545	7.00	umc1231	9.05
bnlg2331	1.11	umc1999	4.09	umc1066	7.01	phi041	10.00
phi96100	2.00	umc1940	4.09	umc1125	7.04	umc1432	10.02
umc2007	2.04	umc2115	5.02	phi328175	7.04	bnlg1712	10.03
bnlg1940	2.08	umc1705	5.03	phi116	7.06	umc2163	10.04
bnlg1520	2.09	umc1429	5.03	bnlg2235	8.02	umc1506	10.05
umc2105	3.00	mmc0081	5.05	umc1741	8.03		

选取胚根、胚和胚芽为无色的单倍体材料。单倍体幼苗长至 5—6 cm，切取约 1 cm 的胚芽鞘节（茎节上、下各 0.5 cm），并用手术刀等分，切面紧贴培养基，接种于 MSW57 愈伤组织诱导培养基中，于 25℃ 光照培养，光照强度 2 000 lx，每天光照 16 h，培养 21 d。将从胚芽鞘节诱导出的愈伤组织转移至 N6 继代培养基，25℃ 暗培养，每 21 d 继代一次。

1.2.3 单倍体植株再生及移栽 将单倍体愈伤组织转入分化培养基，25℃ 光照培养，光照强度 2 000 lx，每天光照 16 h；分化再生的植株，长至 3—5 cm，转入生根培养基；生根良好的植株，移栽花盆，于温室中生长 7—10 d；移栽成活的植株，最后种植于温室。

1.2.4 染色体数目观察 再生植株移栽花盆时，切取 1—2 个根尖，用卡诺固定液（无水乙醇：冰醋酸=3：1）固定 2 h 以上。ddH₂O 清洗数次后，加入适量的纤维素酶和果胶酶混合物酶解 2 h，压片。在显微镜下观察染色体数目，并拍照。

1.2.5 玉米花粉 I-KI 染色 再生植株抽雄后，有部分雄穗能散粉。取散粉的花药，放在载玻片上，滴加一滴 0.2% I-KI 溶液，压片。放在显微镜下观察，并拍照。

1.2.6 单倍体植株加倍处理 使用 1% 的洗衣粉溶液，配制 0.05% 的秋水仙素溶液。再生植株长至 4 叶 1 心和 6 叶 1 心时，分别取少许 0.05% 的秋水仙素溶液滴入心叶。

1.2.7 单倍体叶片 DNA 提取 采用 CTAB 法提取和

纯化单倍体叶片基因组 DNA^[12]，并检测 DNA 的浓度和质量，将 DNA 样品稀释至 10 ng·μL⁻¹，4℃ 保存备用。

1.2.8 再生植株基因型分析 选用 47 对 SSR 引物，对再生单倍体植株的基因型进行分析。PCR 反应体系（25 μL）为：10×Taq Buffer 2.5 μL（Transgene 公司），2 mmol·L⁻¹ dNTP（Transgene 公司）2 μL，Taq 酶（5 U·μL⁻¹）（Transgene 公司）0.2 μL，各 1 μL 的双向引物（0.1 μmol·L⁻¹），模板 DNA（10 ng·μL⁻¹）5 μL，ddH₂O 13.3 μL，最后滴一滴液体石蜡油。PCR 扩增程序为：95℃ 3 min；95℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 1 min（35 循环）；72℃ 10 min；4℃ 保存。

将 PCR 扩增产物于 4% 低熔点琼脂糖凝胶中，130 V 电泳 2 h，然后于凝胶成像系统观察、拍照。

2 结果

2.1 单倍体胚芽鞘节愈伤组织的诱导率与分化率统计

从 884 个单倍体胚芽鞘节、1 768 个外植体中，共得到 570 块愈伤组织，诱导出的愈伤组织均为 I 型愈伤组织，且长势较弱。供试材料愈伤组织的诱导率和分化率的结果见表 3。

不同杂种优势群的愈伤组织诱导率差异较大，Reid 群（40.24%）高于黄早四群（37.85%），温热 I 群较低（15.13%）。同一杂种优势群内，诱导率差异也较大。在 Reid 群中，诱导率最高的是 76.3%（郑 58/B73），最低的只有 18.1%（D133A/3H61），LH82/

表 3 单倍体胚芽鞘节愈伤组织的诱导率及分化率统计

Table 3 The induction and differentiation frequency of haploid coleoptilar node derived from 20 hybrids

群体 Group	组合 Combination	外植体数 Number of explants	愈伤数 Number of callus	诱导率 Induction frequency (%)	诱导率平均数 Average in duction frequency	再生植株数 Number of regenerated plant		分化率 Differential frequency (%)	分化率平均数 Average differential frequency
						分化数 Total plants	成活数 Survive plants		
Reid 群 Reid group	LH132/郑 58 LH132/Zheng58	84	31	36.9	40.24**	0	0	0	4.89
	郑 58/121 Zheng58/121	120	47	39.1		0	0	0	
	LH82/郑 58 LH82/Zheng58	104	42	40.4		2	0	4.8	
	D133A/488B	108	34	31.5		4	2	11.8	
	D133A/490A	80	39	48.8		3	0	7.7	
	郑 58/B73 Zheng58/B73	80	61	76.3		9	6	14.8	
	D133A/3H61	72	13	18.1		0	0	0	
	LH132/LH198	78	24	30.8		0	0	0	
黄早四群 Huangzaosi group	4444/D1-16	86	30	34.9	37.85**	0	0	0	3.18
	昌 72/齐 1261 Chang72/Qi1261	98	44	44.9		3	2	6.8	
	西 502/昌 72 Xi502/Chang72	88	57	64.8		7	5	12.3	
	J853/LX9801	74	19	25.7		0	0	0	
	J853/京 24 J853/Jing24	64	16	25.0		0	0	0	
	D1-16/昌 72 D1-16/Chang72	88	28	31.8		0	0	0	
温热 I 群 Tem-tropic I group	178/127	112	15	13.4	15.13*	0	0	0	0.00
	87-1/127	96	29	30.2		0	0	0	
	齐 319/127 Qi319/127	104	16	15.4		0	0	0	
	178/138	64	8	12.5		0	0	0	
	178/齐 319 178/Qi319	80	11	12.5		0	0	0	
	87-1/178	88	6	6.8		0	0	0	

*和**分别表示达到 0.05 显著水平和 0.01 极显著水平

* and ** indicate significant different at 0.05 and 0.01 level, respectively

郑 58 和 D133A/490A 的诱导率在 40% 以上, 其余材料的诱导率在 30.0% 以上。黄早四群中, 西 502/昌 72 的诱导率较高 (64.8%), 其次是昌 72/齐 319 (44.9%), J853/LX9801 和 J853/京 24 的诱导率较低, 25.0% 左右, 4444/D1-16 和 D1-16/昌 72 的诱导率在 30.0% 以上。温热 I 群的材料难以诱导愈伤组织, 诱导率最高的只有 30.2% (87-1/127), 而其它材料的诱导率都低于 20%。不同杂种优势群的单倍体茎节愈伤组织诱导率, 经 *t* 测验分析发现, Reid 群与温热 I 群 ($P=0.003$)、黄早四群与温热 I 群 ($P=0.04$) 之间差异极显著, 而 Reid 群与黄早四群之间差异不显著 ($P=0.395$) (表 3)。

不同杂种优势群, 单倍体愈伤组织分化率差异较大, Reid 群和黄早四群都获得了单倍体再生植株, 而温热 I 群没有分化出单倍体植株。Reid 群中, 郑 58/B73、D133A/488B、D133A/490A 和 LH82/郑 58 的分化率分别为 14.8%、11.8%、7.7% 和 4.8%。共分化

出 18 株单倍体植株, 成活了 8 株。在黄早四群, 西 502/昌 72 和昌 72/齐 1261 的分化率分别是 12.3% 和 6.8%, 共分化出 10 株单倍体植株, 其中 7 株成活。温热 I 群的 6 个材料, 没有分化出单倍体植株 (表 3)。

2.2 再生植株的染色体数目及花粉育性鉴定

对再生植株的根尖染色体数目分析发现, 所有再生植株根尖细胞都含有 10 条染色体 (图 1-3), 说明 15 株再生植株都是单倍体植株。花粉镜检发现, 15 株再生植株中, 其中 9 株雄花花粉完全不育, 6 株部分花药散开 (图 1-1), 且部分花粉能被 I-KI 染色, 表现为可育; 但也有少量的花粉粒不能被染色, 表现为不育 (图 1-2), 说明散粉的花药中只有部分花粉粒加倍成功。

2.3 再生单倍体植株的基因型分析

利用 SSR 分子标记对单倍体双亲多样性的分析表明: 单倍体植株的遗传型均来自双亲的重组类型。在

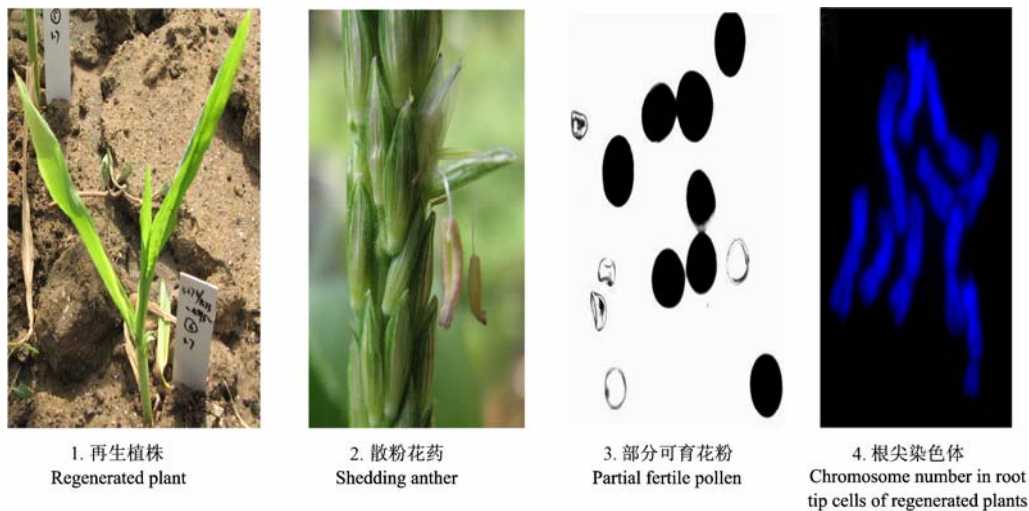


图 1 再生植株的染色体数目及花粉育性检测

Fig. 1 Identification of chromosome number and pollen fertility of regenerated plants

郑 58 与 B73 中共检测到 29 个多态性位点, D133A 与 488B、西 502 与昌 72、昌 72 与齐 1261 的多态性位点分别是 21、16 和 14。进一步用多态性 SSR 标记检测再生植株的基因型, 结果表明, 郑 58/B73 遗传背景的 6 株单倍体, 6-10 位点来源于郑 58, 19—23 位点来源于 B73; D133A/488B 背景的 2 株单倍体植株, 来自 D133A 的位点是 9 和 8 个, 12 和 13 个位点来自于

488B; 西 502/昌 72 的单倍体材料, 4—12 个位点与西 502 相同, 4—12 个位点与昌 72 相同; 昌 72/齐 1261 背景的 2 株单倍体, 6 和 5 个位点分别来自昌 72, 8 和 9 个位点分别来自齐 1261。遗传相似性分析发现, 郑 58/B73 遗传背景的 6 株单倍体, 与 B73 的遗传相似性系数都在 0.80 以上, 而与郑 58 的遗传相似性系数低于 0.6, 发生了偏分离 (表 4)。

表 4 再生植株的基因型分析

Table 4 Genotypic analysis of regenerated haploid plants

组合名称 Combination name	单倍体植株编号 No.	多态性 SSR 分子标记粉 Polymorphic SSR makers		遗传相似性系数 Genetic similarity coefficients (%)	
		P1	P2	P1	P2
郑 58/B73 Zheng58/B73	1	6	23	51.06	87.23
	2	9	20	57.45	80.85
	3	6	23	51.06	87.23
	4	10	19	59.57	78.72
	5	8	21	55.19	82.98
	6	8	21	55.32	82.98
D133A/488B	1	9	12	74.47	80.85
	2	8	13	72.34	82.98
西 502/昌 72 Xi502/Chang72	1	10	6	87.23	78.72
	2	6	10	78.72	87.23
	3	5	11	76.60	89.36
	4	12	4	91.49	74.47
	5	4	12	74.47	91.49
昌 72/齐 1261 Chang72/Qi1261	1	6	8	82.98	87.23
	2	5	9	80.85	89.36

P1: 母本; P2: 父本 P1: Female; P2: Paternal

从图 2 分析得到，在 15 株单倍体植株中，所检测的多态性位点，SSR 带型都与杂交种的父本或母本相

同，未见杂合和缺失带型，说明再生的单倍体植株，未见无性系变异，遗传稳定性较好。

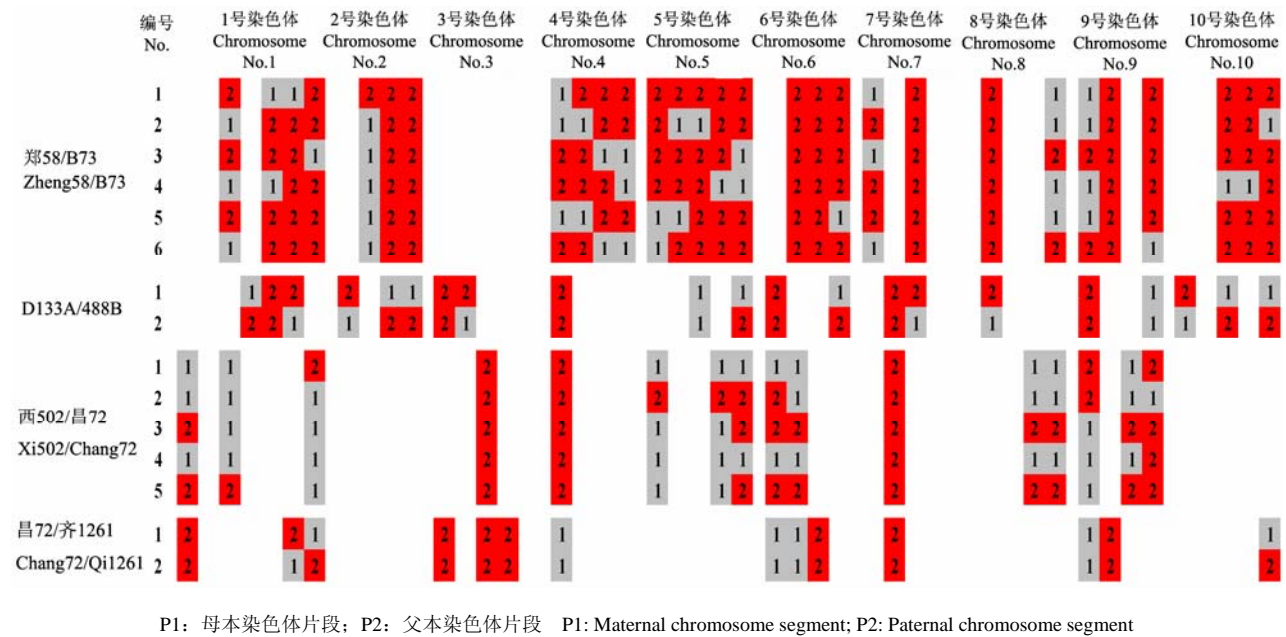


图 2 单倍体植株基因型分析
Fig. 2 Genotypic analysis of 15 haploid plants

3 讨论

3.1 基因型对胚芽鞘节单倍体愈伤组织培养的影响

玉米幼胚愈伤组织的诱导受基因型的影响，II 型愈伤组织的诱导局限于 A188、B73 和 Hi-II 等少数几个基因型^[13-15]。不同杂种优势群的玉米材料，愈伤组织的诱导率和分化率差异较大；同一杂种优势群内，不同基因型差异也较大。张红梅等对 Reid、唐四平头和其它种质等 3 个杂种优势群共 19 份自交系进行了研究，发现唐四平头群的 4 份自交系材料中，黄野四、京 24 和吉 853 分化能力差，不能再生植株，黄早四绿苗分化率仅为 0.5%^[16]。郭新梅等研究了 5 个杂种优势群的 19 个自交系，结果发现 Reid 群体自交系的幼胚组织培养特性较好，B73、黄 C 和 478 的幼胚愈伤诱导率高，适宜作为受体材料进行遗传转化；而在 Lancaster 类群和唐四平头类群中，没有筛选到组织培养特性好的材料^[17]。本研究发现，单倍体胚芽鞘节愈伤组织的诱导和分化受基因型的影响较大，Reid 群与黄早四群较好，温热 I 群较差。Reid 群的郑 58/B73 诱导率和分化率较高，这与张红梅等和郭新梅等报道的二倍体玉米研究结果一致，即 B73 的组织培养特性

好^[16-17]。黄早四群的西 502/昌 72 诱导率较高，且分化出再生植株，是较好的受体材料。而 J853/LX9801 和 J853/京 24 的诱导率低，不能分化出再生植株，这可能是由于 J853 和京 24 组培特性较差所致，与张红梅等的结果一致^[16]。温热 I 群的 6 个材料组培特性较差，愈伤组织诱导率低，且没有分化出再生植株，这可能是由于温热 I 群的材料本身不适于组织培养。

本研究共接种了 884 个单倍体胚芽鞘节，但只分化出 15 株单倍体植株，其中 6 株雄穗散粉。从每一外植体中，并没有分化出大量的单倍体植株，究其原因，是由于单倍体胚芽鞘节愈伤组织的诱导及其分化受基因型的影响较大。因此，对诱导和分化培养基进行改良，提高单倍体胚芽鞘节愈伤组织的诱导率和分化率，是今后研究的重点之一。

3.2 玉米单倍体胚芽鞘节组织培养在育种的利用

快捷、大量地获得玉米 DH 系，可以缩短育种周期、提高育种效率。来源于 Stock6 的单倍体诱导系，单倍体诱导率一般介于 2%—8%，也有的达 10% 以上^[18-23]。利用单倍体籽粒发芽，获得胚芽鞘节比较容易，且不受季节性影响，因此，胚芽鞘节是一种优良的外植体。本研究中，Reid 群、黄早四群和温热 I

群的单倍体愈伤组织平均诱导率分别是 40.24%、37.85%、15.13%，远高于花药和小孢子培养^[24-25]，易于得到单倍体愈伤组织。Zhao 等使用除草剂对单倍体幼胚进行处理，或处理单倍体幼胚愈伤组织，提高了加倍的效率^[7]。Barton 等使用除草剂处理单倍体幼胚，同时也对单倍体茎尖进行加倍处理，获得了成功^[8]。单倍体幼胚的获得受季节性影响，本文研究发现，以幼胚大小来区分单倍体、二倍体幼胚，难度很大，常常判断不准确（数据未给出）。单倍体茎尖组织是优良的外植体，不受季节性影响，但是茎尖的剥离比较困难，难以满足育种的要求。单倍体胚芽鞘节的获得比较方便，有的基因型具有较高的愈伤组织诱导率和分化率。前人研究表明，使用一定浓度的秋水仙素或除草剂溶液，对玉米单倍体愈伤组织进行处理，经分化再生可得到双单倍体植株^[6]；或直接处理单倍体植株，得到 DH 系^[2]。因此，在进一步提高单倍体胚芽鞘节愈伤组织诱导率和分化率的基础上，对单倍体愈伤组织或再生植株进行加倍处理，将会是提高玉米单倍体加倍效率、获得 DH 系的有效途径之一。

4 结 论

Reid 群和黄早四群单倍体茎节愈伤组织的诱导率较高，分别分化出 8 株和 7 株单倍体植株；温热 I 群单倍体愈伤组织诱导率低，未分化出单倍体植株。本文首次以单倍体茎节为外植体，通过组织培养获得了玉米单倍体植株。

References

- [1] Zabirowa E, Shatskaya O, Shcherbak V. Line 613/2 as a source of a high frequency of spontaneous diploidization in corn. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 1993, 67: 67.
- [2] 韩学莉, 唐祈林, 荣廷召. Stock6 杂交诱导的玉米单倍体化学加倍效果研究. *玉米科学*, 2009, 17(1): 22-27.
Han X L, Tang Q L, Rong T Z. Study on doubling efficiency of maize haploid induced by Stock6. *Journal of Maize Sciences*, 2009, 17(1): 22-27. (in Chinese)
- [3] Shim Y S, Kasha K J, Letarte J. The relationship between induction of embryogenesis and chromosome doubling in microspore cultures. *Protoplasma*, 2006, 228: 79-86.
- [4] Zhou W J, Hagberg P, Tang D X. Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicine treatment of isolated microspores in spring *Brassica napus*. *Euphytica*, 2002, 128: 27-34.
- [5] Soriano M, Cistué L, Vallés M P, Castillo A M. Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2007, 91: 225-234.
- [6] Petersen K K, Hagberg P, Kristiansen K. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 73: 137-146.
- [7] Zhao Z Y, Bidner D L, Elsing E D, Miller M D, Wu X E, Gordon-Kamm W L. Doubled haploid cells, embryos and plants. USA, 298973. 2007-08-17.
- [8] Gordon-kamm W J, Barton J E, Maddock S E, Wu X E, Zhao Z Y, Williams M E, Hussain T. Doubling of chromosomes in haploid embryos. USA, 800276. 2007-05-04.
- [9] Kato A. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. *Plant Breeding*, 2002, 121: 370-377.
- [10] Sidorov V, Gilbertson L, Addae P, Ducan D. *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Reports*, 2006, 25: 320-328.
- [11] 王风格, 赵久然, 戴景瑞, 易红梅, 匡 猛, 孙艳美, 于新艳, 郭景伦, 王 璐. 玉米通用 SSR 核心引物筛选及高通量多重 PCR 复合扩增体系建立. *科学通报*, 2006, 51(23): 2738-2746.
Wang F G, Zhao J R, Dai J R, Yi H M, Kuang M, Sun Y M, Yu X Y, Guo J L, Wang L. Selection and development of representative simple sequence repeat primers and multiple×SSR sets for high throughput automated genotyping in maize. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(2): 215-223.
- [12] Saghai-Marooif M A, Soliman K M, Jorgensen R A, Allard R W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1984, 81: 8014-8018.
- [13] Bronsema F B F, Oostveen W J F V, Lammeren A A M V. Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature maize embryos of the inbred lines A188 and A632. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, 50: 57-65.
- [14] Songstad D D, Armstrong C L, Petersen W L. AgNO₃ increases type II callus production from immature embryos of maize inbred B73 and its derivatives. *Plant Cell Reports*, 1991, 9: 699-702.
- [15] Vega J M, Yu W C, Kennon A R, Chen X L, Zhang Z Y. Improvement of agrobacterium-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. *Plant Cell Reports*, 2008, 27: 297-305.
- [16] 张红梅, 刘小红, 张红伟, 刘欣洁, 陈 刚, 谭振波. 不同杂种优势类群玉米幼胚愈伤组织的诱导及植株再生特性的研究. *西北植物学报*, 2004, 24(1): 50-55.

- Zhang H M, Liu X H, Zhang H W, Liu X J, Chen G, Tan Z B. Characterization of callus induction and plant regeneration in immature embryo culture among several heterotic groups of elite maize inbreds. *Acta Botanica Borealia-Occident Sinica*, 2004,24(1): 50-55. (in Chinese)
- [17] 郭新梅, 张晓东, 韩立新, 陈耀锋. 不同基因型玉米幼胚愈伤组织的培养特性. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(4): 68-72.
- Guo X M, Zhang X D, Han L X, Chen Y F. Characteristic of callus induced from immature embryo among different maize inbreds. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2007, 35(4): 68-72. (in Chinese)
- [18] Li L, Xu X W, Jin W W, Chen S J. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. *Planta*, 2009, 230: 367-376.
- [19] Eder J, Chalyk S. *In vivo* haploid induction in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104: 703-708.
- [20] Chalyk S T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding. *Euphytica*, 1994, 79: 13-18.
- [21] Rober F K, Gordillo G A, Geiger H H. *In vivo* haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica*, 2005, 50: 275-283.
- [22] Zhang Z L, Qiu F Z, Liu Y Z, Ma K J, Li Z Y, Xu S Z. Chromosome elimination and *in vivo* haploid production induced by Stock6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Reports*, 2008, 27: 1851-1860.
- [23] 才 桌, 徐国良, 刘向辉, 董亚琳, 代玉仙, 李淑华. 玉米高频率单倍生殖诱导系吉高诱系 3 号的选育. 玉米科学, 2007, 15(1): 1-4.
- Cai Z, Xu G L, Liu X H, Dong Y L, Dai Y X, Li S H. The breeding of JAAS3-haploid inducer with high frequency parthenogenesis in maize. *Journal of Maize Sciences*, 2007, 15(1): 1-4. (in Chinese)
- [24] Jäger K, Kőszegi D, Barnabás B. Regeneration capacity of microspore-derived structures produced in anther cultures of maize (*Zea mays* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 2005, 27: 621-629.
- [25] Szarka B, Dévényi M, Mórocz S. Fertile maize lines obtained from isolated microspores. *Euphytica*, 2001, 122: 53-60.

(责任编辑 郭银巧)