

# 秋水仙素加倍玉米单倍体胚性愈伤组织的初步研究

李高科<sup>1</sup>, 陈琦<sup>2</sup>, 孟鑫<sup>2</sup>, 林海建<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>广东省农业科学院作物研究所/广东省农作物遗传改良重点实验室, 广州 510640; <sup>2</sup>四川农业大学玉米研究所, 成都 611130)

**摘要:**以玉米单倍体胚性愈伤组织为遗传转化受体, 结合化学加倍方法, 可以在较短时间内获得纯合稳定的个体, 加快转基因植株的纯合时间。本研究基于二倍体幼胚胚性愈伤组织诱导方法, 获得玉米单倍体愈伤组织, 并分析了单倍体愈伤组织检出率, 不同继代次数后的褐化率和死亡率, 以及二倍体愈伤组织与单倍体愈伤组织的生长速率等重要指标。同时, 采用 0.005%~0.03% 秋水仙素处理单倍体愈伤组织, 分析处理后单倍体愈伤组织的死亡率, 成株后的散粉率, 大花药(花粉活力强)植株比率, 结实率以及结实大于 5 粒的植株比率等指标。研究结果表明, 基于改进的二倍体愈伤组织诱导方法, 能够正常诱导出单倍体胚性愈伤组织, 单倍体愈伤组织检出率为 4.2%, 与诱导系 MT-1 对自交系 18-599(红)的诱导率相当。单倍体愈伤组织的褐化率和死亡率均与同继代次数下的二倍体愈伤组织褐化率存在一定差异, 且继代 3 次后的单倍体愈伤组织褐化率和死亡率最高。以愈伤组织直径为参考, 单倍体愈伤组织的生长速率低于二倍体愈伤组织, 在生长早期可作为判断单倍体和二倍体愈伤组织的重要参考指标。经不同浓度和时间的秋水仙素处理后, 单倍体愈伤组织的散粉率、大花药植株比率、结实率以及结实大于 5 粒植株比率随处理浓度和时间的增加而提高, 而存活率和小花药(活力较低或无活力)比率随处理浓度和时间的增加而下降。由此表明, 秋水仙素处理可提高玉米愈伤组织成株后的散粉率和结实率, 结实率的提高又取决于大花药比率的提高。本研究综合分析了玉米单倍体愈伤组织诱导及加倍过程中的诸多因素, 筛选出 0.01% 秋水仙素处理 12 h 和 0.02% 秋水仙素处理 3 h 作为玉米单倍体愈伤组织加倍的较优处理模式。

**关键词:** 玉米单倍体; 胚性愈伤组织; 秋水仙素; 化学加倍

## Preliminary Study on Colchicine Doubling Haploid Embryogenic Callus of Maize

LI Gao-ke<sup>1</sup>, CHEN Qi<sup>2</sup>, MENG Xin<sup>2</sup>, LIN Hai-jian<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Crops, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Guangdong Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Guangzhou 510640; <sup>2</sup>Maize Research Institute of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130)

**Abstract:** Using maize haploid embryogenic callus as genetic transformation receptor and combining with chemical doubling method, homozygous individuals whenever hosting a transgenic element might be obtained in a short time. This study attempted to obtain haploid callus from maize using diploid embryogenic callus induction method, followed by analyzing the detection rate of haploid callus, browning rate and mortality after different subculture times, as well as diploid callus and haploid callus growth rate and other important indicators. The haploid callus was treated with 0.005%-0.03% colchicine, and the mortality rate of haploid callus, powder dispersal rate after adult, ratio of large anther (strong pollen vigor), seed setting rate and plant ratio of more than 5 seeds were analyzed. The results showed that induction of haploid embryogenic callus was applicable using the improved method of diploid callus induction. The detection rate of haploid callus is 4.2%, similar to the induction

收稿日期: 2021-04-08 修回日期: 2021-05-06 网络出版日期: 2021-07-21

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210408003>

第一作者研究方向为玉米遗传育种, E-mail: ligaoke790326@163.com

通信作者: 林海建, 研究方向为玉米遗传育种, E-mail: linhj521@163.com

**基金项目:** 广东省重点领域研发计划项目(2018B020202008); 广东省农业科学院“十四五”农业优势产业学科团队建设项目(202115TD); 广东省级乡村振兴战略专项(粤财农[2020]100号)

**Foundation projects:** Guangdong Provincial Key Research and Development Program(2018B020202008), “14th Five-Year” Discipline Team Construction Project of Agricultural Advantage Industry, Guangdong Academy of Agricultural Sciences(202115TD), Guangdong Provincial Rural Revitalization Strategy Special Project(YUE Cainong[2020]No. 100)

rate of 18-599 (red) by MT-1 lines. The browning rate and mortality of haploid callus were different with diploid callus of the same time of subculture, and both the browning rate and mortality rate of haploid callus reached the highest level after three inductions. With callus diameter as reference, the growth rate of haploid callus was lower than diploid, which could be used as an key reference indicator to distinguish haploid and diploid callus in the early growth period. After being treated with colchicine of different concentrations for different period of time, the pollinating rate, rate of large anther, seed setting rate and ratio of plants with more than 5 seeds of haploid callus increased as the concentration increases and the time prolongs, and survival rate and small anther (of poor or no viability), on the other hand, drops as the concentration increases and the time prolongs. The results showed that colchicine treatment could enhance the pollinating rate and seed setting rate of maize callus in adult plants where higher seed setting rate was dependent on higher rate of large anther. Collectively, this paper includes analysis of multiple factors in the process of callus induction and doubling of maize haploid. And screened out 0.01% colchicine treatment for 12 h and 0.02% colchicine treatment for 3 h as better modes for doubling of maize haploid callus.

**Key words:** maize haploid; embryogenic callus; colchicine; chemistry double

自 1996 年第 1 例转基因作物被批准商业化后, 转基因技术在作物品种改良中得到了广泛应用<sup>[1]</sup>。截至目前, 该技术已在水稻、棉花、玉米等 100 多种植物中得到了广泛应用, 涉及包括作物品质、抗性、产量等性状<sup>[2]</sup>。玉米是我国重要的粮食作物, 对保障我国粮食安全具有举足轻重的作用, 自第 1 例转基因玉米 Bt176 问世以来, 转基因玉米已在全球累计种植 7.5 亿 hm<sup>2</sup><sup>[3]</sup>。截至 2015 年, 转基因玉米仍然是转基因事件获批最多的作物类型<sup>[4]</sup>, 虽然我国还未放开转基因玉米的商业化应用, 但面对国际转基因新品种、新技术的垄断, 技术和资源的储备就显得尤为紧迫与必要。遗传转化是植物转基因过程中至关重要的环节, 其中受体材料的选择在一定程度上决定了遗传转化效率<sup>[5]</sup>。玉米胚性愈伤组织、原生质体、茎尖和幼嫩子房等器官或组织均能作为遗传转化的受体材料<sup>[6-8]</sup>, 其中胚性愈伤组织较为常用, 目前已有采用多种组织作为外植体成功诱导出胚性愈伤组织的报道<sup>[9-10]</sup>。玉米幼胚胚性愈伤组织具有较强的继代和再生植株能力, 在玉米上是构建转基因受体系统的理想材料, 同时诱导能力受遗传控制<sup>[11]</sup>, 存在一定的基因型差异<sup>[12-13]</sup>。如四川农业大学玉米研究所早期选育的优良受体材料 18-599 (红), 其胚性愈伤组织能力在当时鉴定的所有材料中表现突出, 在相当长的一段时间内被国内外多家单位用作玉米遗传转化的受体材料<sup>[14]</sup>。此外, 包括 Hi-II, B104 等遗传转化效率更高, 更稳定的基因型受体材料为玉米转基因技术的发展提供了材料基础<sup>[15-16]</sup>。

采用基因枪和农杆菌介导是玉米导入外源基因的主要方法<sup>[17-18]</sup>, 但无论采用哪种方法, 外源基因同时整合到同源染色体相同座位的可能性极小, 因而

获得的第 1 代转基因植株 (T<sub>0</sub>) 在这一位点往往是杂合的, 要获得纯合的转基因个体必须经过不断连续的自交, 这个过程需要花费较长的时间。玉米单倍体技术可以在短时间内获得稳定的纯合个体, 将自交系的选育时间从原来的 6~8 代, 缩短至 2 代, 大大提高了育种效率<sup>[19]</sup>。因此, 将单倍体技术应用于玉米的遗传转化, 能够在短时间内获得纯合的转基因个体, 从而加快转基因育种进程。染色体加倍是单倍体技术的关键环节, 直接决定了获得纯合双单倍体系 (DH 系) 的效率<sup>[20]</sup>。有研究报道, 玉米幼胚能够成功诱导出单倍体愈伤组织并分化成苗, 并成功的进行了遗传转化<sup>[20-21]</sup>, 但对单倍体愈伤组织加倍方法的研究还鲜有报告。因此, 本研究通过利用玉米单倍体诱导系 MT-1, 诱导转基因优良受体材料 18-599 (红) 产生单倍体幼胚, 并以愈伤组织为研究材料, 通过优化愈伤组织鉴别方式和化学试剂加倍处理, 为今后利用玉米单倍体愈伤组织作为转基因遗传受体, 加快转基因个体纯合时间提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

玉米自交系 18-599 和高频孤雌生殖诱导系 MT-1, 化学药剂选用高纯度秋水仙素 (99.99%, Sigma)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 单倍体诱导与幼胚挑选** 采用诱导系 MT-1 为父本、18-599 (红) 为母本杂交, 杂交后用羊皮纸袋套袋并记录授粉时间。选取授粉后 12~14 d 的玉米果穗, 全部取出幼胚并接种至诱导培养基中, 培养基组成: N6 培养基、2.0 mg/L 2, 4-D、1000 mg/L L-脯氨酸、500 mg/L 水解酪蛋白以及 30 g/L 蔗糖,

pH 值 5.8; 单倍体愈伤组织的筛选方法参照廖长见等<sup>[20]</sup>的方法进行。

**1.2.2 玉米单倍体愈伤组织的检测与继代** 利用光照初选获得玉米单倍体愈伤组织, 再经细胞压片和流式细胞仪检测, 细胞压片检测细胞倍性参照蔡华等<sup>[22]</sup>方法进行; 流式细胞仪检测细胞倍性参照许蕾等<sup>[23]</sup>的方法进行。将筛选获得的单倍体愈伤组织转接至继代培养基中, 继代培养基的组成: N6 培养基、2.0 mg/L 2, 4-D、600 mg/L L-脯氨酸、550 mg/L 水解酪蛋白和 25 g/L 蔗糖。单倍体愈伤组织每培养 15 d 为一个继代周期, 所有培养条件均为 26 ℃ 暗培养, 继代 3 次。以二倍体愈伤组织为对照, 分别统计不同继代次数后单倍体愈伤组织褐化率、死亡率和愈伤组织直径, 并以直径测算获得相应的生长速率。

**1.2.3 玉米单倍体愈伤组织的化学处理** 分别配制质量分数为 0.005%、0.01%、0.02%、0.03% 4 种浓度的秋水仙素分化培养基, 培养基组成: N6 培养基、650 mg/L-脯氨酸、480 mg/L 水解酪蛋白和 25 g/L 蔗糖。将长势一致的单倍体愈伤组织转入上述培养基分别培养 3 h、6 h 和 12 h, 再转入不含秋水仙素的分化培养基中进行分化成苗, 并统计转移后单倍体愈伤组织的存活率。

**1.2.4 单倍体愈伤组织成株后加倍效果的统计** 统计经不同秋水仙素浓度和时间处理后的单倍体植株散粉率、大花药植株比率、小花药植株比率、结实率以及结实大于 5 粒的植株比率。计算公式如下:

$$\text{散粉率} = \frac{\text{大花药植株数} + \text{小花药植株数}}{\text{愈伤组织成株数}},$$

$$\text{大(小)花药比率} = \frac{\text{大(小)花药植株数}}{\text{愈伤组织成株数}},$$

$$\text{结实率} = \frac{\text{结实植株数}}{\text{愈伤组织成株数}},$$

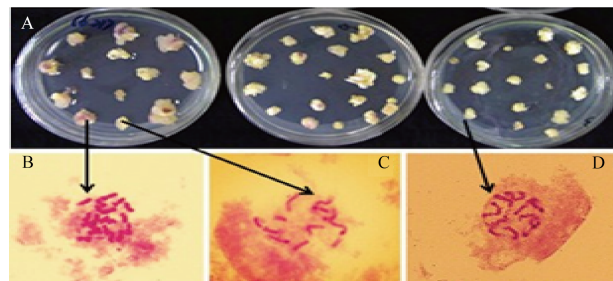
$$\text{结实大小 5 粒植株比率} = \frac{\text{结实大小 5 粒植株数}}{\text{愈伤组织成株数}}。$$

## 2 结果与分析

### 2.1 单倍体愈伤组织的检出情况

本研究选取授粉后 12~14 d 的玉米幼胚, 该发育阶段的二倍体幼胚还未显色, 难以通过颜色区分二倍体和单倍体, 须将全部幼胚进行培养, 再通过光照处理和细胞学倍性检测筛选出单倍体愈伤组织。本研究共诱导 72 个玉米果穗, 挑选出 5862 个玉米幼胚, 全部进行胚性愈伤组织的诱导, 共诱导愈伤组

织 5092 个, 愈伤组织诱导率 86.87%。对全部愈伤组织采用 2000 lx 光照强度, 20 ℃, 14 h/10 h 光暗周期培养 20 h 筛选单倍体愈伤组织。经光照处理后, 大部分二倍体愈伤组织开始显色, 并经细胞学检测, 最终确认单倍体愈伤组织 246 个(图 1 A、C、D), 其余为非单倍体愈伤组织(图 1A、B), 单倍体愈伤组织检出率为 4.2%, 与 MT-1 对自交系 18-599(红)的诱导率基本吻合。



A: 愈伤组织的光照筛选, 紫色为非单倍体愈伤组织; B: 细胞学检测出的二倍体愈伤组织; C、D: 细胞学检测出的单倍体愈伤组织

A: Represents the callus screened by light, the purple color calluses are diploid, B: Diploid callus detection by cytological, C, D: Haploid callus detection by cytological

图 1 玉米单倍体愈伤组织的细胞学鉴定

Fig.1 Cytogenetic identification of maize haploid callus

### 2.2 单倍体与二倍体愈伤组织活力的比较

比较了继代 1~3 次后的单倍体和二倍体愈伤组织褐化率、死亡率以及以愈伤组织直径为参考的生长速率。从表 1 可知, 单倍体愈伤组织无论是继代 1 次还是 3 次, 其死亡率均显著高于二倍体愈伤组织, 且不同继代次数后的单倍体愈伤组织死亡率也存在较大差异, 其中继代 3 次后的单倍体愈伤组织死亡率最高, 而二倍体愈伤组织死亡率在不同继代次数后基本保持稳定。愈伤组织褐化率是衡量愈伤组织质量的重要指标, 本研究结果表明, 不同继代次数下单倍体和二倍体愈伤组织褐化率均具有较大差异, 随着继代次数的增加, 单倍体和二倍体愈伤组织的褐化率均呈上升趋势, 且二倍体愈伤组织褐化率提高幅度较大, 在同等继代次数下, 单倍体愈伤组织的褐化率均显著低于二倍体愈伤组织。以愈伤组织直径代表愈伤组织的生长情况, 从图 2 可以看出, 继代 1 次后, 二倍体愈伤组织直径在各时间段均高于单倍体愈伤组织, 继代 2 次后, 除个别时间点外, 二倍体愈伤组织的生长仍然高于单倍体愈伤组织, 但在继代 3 次后, 二倍体愈伤组织生长情况已基本与单倍体愈伤组织保持一致, 由此可见, 继代次数对不同倍性愈伤组织生长的影响存在差异。



表 1 不同继代次数下单倍体和二倍体愈伤组织死亡率和褐化率  
Table 1 Mortality and browning rate between haploid and diploid callus in different subculture times

继代次数 Transgenerational number	死亡率(%) Mortality		褐化率(%) Browning rate	
	单倍体 Haploid	二倍体 Diploid	单倍体 Haploid	二倍体 Diploid
1	3.98 ± 0.23b	2.79 ± 0.24ab	57.32 ± 2.0b	62.14 ± 2.28c
2	4.06 ± 0.20b	2.61 ± 0.23b	61.15 ± 1.86a	66.75 ± 2.89b
3	4.72 ± 0.36a	2.83 ± 0.14a	62.47 ± 3.15a	69.41 ± 2.37a

同列不同的小写字母代表  $P<0.05$  差异水平  
Different lowercase letters in the same column represent the level of significant difference ( $P<0.05$ )

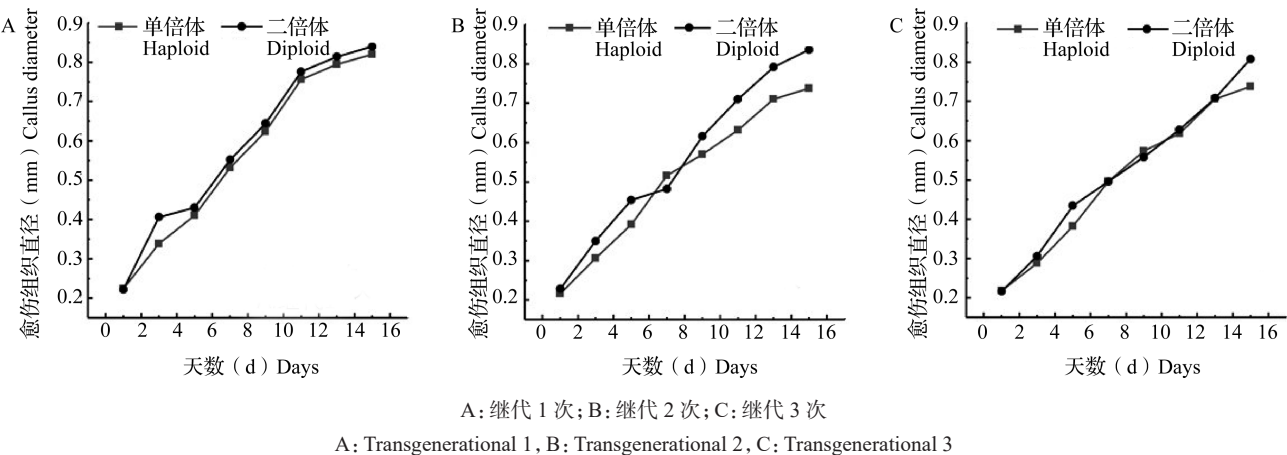


图 2 不同继代次数下单倍体与二倍体愈伤组织的生长趋势  
Fig.2 The growth trend of haploid and diploid callus under different subculture times

2.3 秋水仙素处理对愈伤组织存活率的影响

秋水仙素对愈伤组织存在一定的伤害,从表 2 可知,秋水仙素处理浓度对不同继代次数后的愈伤组织存活率影响均达极显著水平,随着处理浓度的提高,愈伤组织存活率在 3 个处理时间上均表现出明显的下降趋势。同样,不同处理时间对单倍体愈伤组织存活率影响也较为明显,在同一处理浓度下,

随着处理时间的延长,3 种继代次数后的单倍体愈伤组织存活率同样也表现出下降趋势,结合处理浓度分析,浓度越高,处理时间越长,单倍体愈伤组织的存活率越低。在绝大部分情况下,同一处理浓度和处理时间下秋水仙素对不同继代次数的单倍体愈伤组织存活率影响不明显。

表 2 秋水仙素处理对不同继代次数单倍体愈伤组织存活率的影响  
Table 2 Effects of colchicine treatment concentration and time on survival rate of haploid callus with different subculture times

处理时间(h) Processing time	继代次数 Subculture times	处理浓度(%) Treatment concentration			
		0.005	0.01	0.02	0.03
3	I	0.84 ± 0.03aA	0.76 ± 0.02aB	0.56 ± 0.04aC	0.35 ± 0.03aD
	II	0.82 ± 0.04aA	0.71 ± 0.02bB	0.59 ± 0.01aC	0.33 ± 0.02aD
	III	0.87 ± 0.03aA	0.77 ± 0.03aB	0.54 ± 0.08aC	0.32 ± 0.02aD
6	I	0.69 ± 0.03bA	0.56 ± 0.02cB	0.36 ± 0.04bC	0.14 ± 0.03cD
	II	0.72 ± 0.04bA	0.58 ± 0.02cB	0.40 ± 0.01bC	0.17 ± 0.02bD
	III	0.67 ± 0.03bA	0.53 ± 0.03cB	0.31 ± 0.08cC	0.21 ± 0.02bD
12	I	0.59 ± 0.03cA	0.5 ± 0.02cB	0.35 ± 0.04bC	0.13 ± 0.03cD
	II	0.62 ± 0.04bcA	0.59 ± 0.02cB	0.42 ± 0.01bC	0.16 ± 0.02bD
	III	0.61 ± 0.03cA	0.53 ± 0.03cB	0.31 ± 0.08cC	0.18 ± 0.02bD

a、b、c 分别代表每个处理浓度和时间下不同继代次数后愈伤组织存活率的差异显著;A、B、C 和 D 分别表示同一继代次数和处理时间下不同秋水仙素处理浓度的愈伤组织存活率差异极显著  
a, b and c represent respectively significant difference of callus survival rate of different subculture times under same treatment concentration and time, A, B, C and D respectively indicated the extremely significant difference of callus survival rate under different colchicine concentrations at the same subculture times and treatment time



2.4 秋水仙素化学加倍单倍体愈伤组织的效果

由表 3 可知,不同秋水仙素处理浓度和时间后的单倍体愈伤组织,其成苗后散粉率,大花药植株(花粉量大,育性高,图 3A、C)比率、结实率以及结实大于 5 粒的植株比率均存在差异。随着处理浓度的提高和时间的延长,除小花药植株(无花粉,或少花粉,育性低,图 3B、D、E)比率外,植株散粉率、大花药植株比率、结实率以及结实大于 5 粒植株比率均呈上升趋势,因此,秋水仙素处理玉米单倍体愈伤组织具有加倍效果。在较低浓度的秋水仙素处理下,随着处理时间的延长,愈伤组织成株后的散粉率呈现出无规律的增加趋势,但随着处理浓度进一步增加,其散粉率明显增加,且增长稳定,并在 0.03% 秋水仙素浓度下达到最高值,但在该浓度秋水仙素处理下,随着处理时间的延长,单倍体愈伤

组织成株后的散粉率又保持在一个相对较高且稳定的水平,说明该浓度的秋水仙素处理对散粉率的影响可能已达上限。随着秋水仙素处理浓度的提高,大花药占比呈明显的上升趋势,与结实率保持在一个相对平行的水平,由此推测大花药占比与结实率具有较强的相关性。在 0.03% 秋水仙素浓度,不同处理时间下散粉率变化虽然不明显,甚至出现下降趋势,但大花药占比出现明显上升趋势,同时结实率和结实大于 5 粒种子的植株比率也相应提高。通过进一步对大花药和小花药花粉活力的检测发现,大花药中的花粉粒活力正常(图 3 C),而小花药则表现出少花粉(图 3 D)和花粉畸形不育(图 3 E),由此推测高浓度的秋水仙素处理,可能提高大花药比例,进而促进有效花粉占比,促进结实(图 4)。

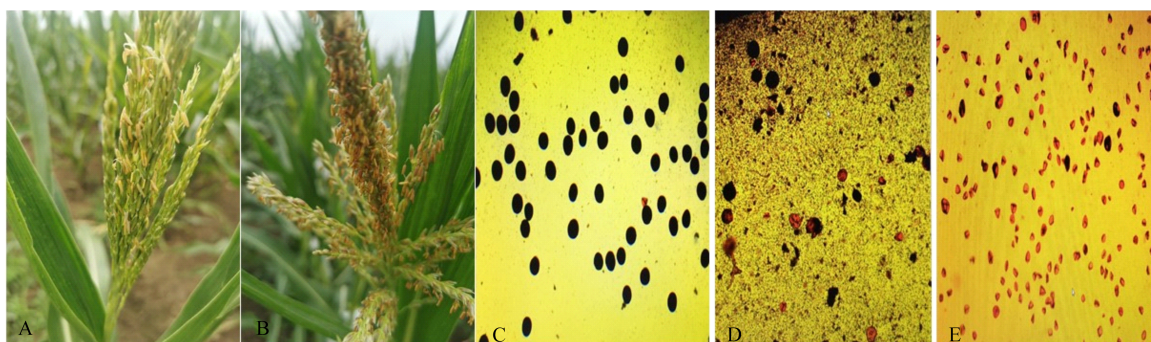
表 3 不同秋水仙素处理浓度和时间对单倍体愈伤组织株加倍效果的影响

Table 3 Effect of different colchicine concentration and time on the doubling effect of haploid callus

处理 Treatment	总株数 Total	散粉株数		大花药株数 No. of with big anther	占比 Percentage	小花药 株数 No. with small anther	占比 Percentage	结实株数 No. with seeds	占比 Percentage	结实 >5 粒 植株数 No. with 5 more seeds		占比 Percentage
		No. of pollen plant	占比 Percentage									
A3	121	37	0.31	11	0.09	26	0.21	16	0.13	4		0.25
A6	105	42	0.40	16	0.15	26	0.25	17	0.16	6		0.35
A12	112	40	0.36	17	0.15	23	0.21	20	0.18	8		0.40
B3	88	27	0.31	16	0.18	11	0.13	18	0.20	9		0.50
B6	92	34	0.37	21	0.23	13	0.14	24	0.26	13		0.54
B12	103	45	0.44	27	0.26	18	0.17	30	0.29	16		0.53
C3	72	28	0.39	16	0.22	12	0.17	22	0.31	9		0.41
C6	78	26	0.33	18	0.23	8	0.10	23	0.29	8		0.35
C12	84	32	0.38	23	0.27	9	0.11	26	0.31	14		0.54
D3	58	32	0.55	20	0.34	12	0.21	23	0.40	13		0.57
D6	63	34	0.54	21	0.33	13	0.21	26	0.41	14		0.54
D12	52	28	0.54	20	0.38	8	0.15	22	0.42	15		0.68

总株数为对不同继代次数的秋水仙素处理后存活的愈伤组织总和,A、B、C 和 D 分别代表秋水仙素处理浓度 0.005%、0.01%、0.02% 和 0.03%,第 1 列的 3、6 和 12 分别代表处理时间 3 h、6 h 和 12 h

In the treatment column, the total plants means the sum of callus survived by colchicine treatment after different subculture times, A, B, C and D represent 0.005%, 0.01%, 0.02% and 0.03% of colchicine treatment concentration, respectively. 3, 6 and 12 in the first column represent the processing time of 3 h, 6 h and 12 h respectively



A: 具有大花药的植株; B: 完全小花药植株; C: 大花药花粉粒 (黑色表明花粉活力正常); D、E: 小花药的花粉粒和无花粉粒  
A: Plants with large anthers, B: Complete floret plant, C: Large anther pollen grain (black indicates normal pollen vitality),

D, E: Small pollen grains and no pollen grains

图 3 单倍体愈伤组织成株后散粉情况及花粉活力检测

Fig.3 Determination of pollen activity after haploid callus formation



A、B、C 分别代表 3 h、6 h、12 h 处理结果

A, B and C respectively represent the results after 3 hours, 6 hours and 12 hours of processing

图 4 0.03% 秋水仙素处理 2 次继代后愈伤组织成植后结实情况

Fig.4 Fruiting condition of callus after secondary subculture treated with 0.03% colchicine

### 3 讨论

从理论上讲,以单倍体为遗传转化受体,结合精准的阳性检测技术和高效的化学加倍技术可以在短时间内获得稳定的阳性植株,避免因连续自交造成目的基因丢失,同时缩短了检测和纯合时间。目前,已有利用玉米单倍体组织进行遗传转化的研究报道,早在 2003 年,蒋武生等<sup>[24]</sup>报道了利用玉米花药培养产生单倍体愈伤组织并成功的将 GUS 基因导入单倍体胚性愈伤组织细胞的报道,之后也有学者采用其他玉米单倍体组织进行遗传转化,证明了玉米单倍体组织作为遗传转化受体是完全可行的<sup>[21, 25-26]</sup>。然而,加倍效率是制约玉米单倍体遗传转化的主要因素,近年来通过采取不同的技术手段已将玉米单倍体加倍效率从不足 5% 的自然加倍率

提升到了组培法化学加倍的 25%~75%<sup>[27]</sup>,大大提升了玉米单倍体二倍化的效率,为玉米单倍体遗传转化快速获得稳定纯合的二倍体转基因植株提供了技术支撑。然而,目前组培化学加倍方法主要以单倍体成熟胚和幼胚为主,同时因专利权的限制,具体方法尚未公开,且因专利费用较高,短时间内难以普及利用。截至目前,国内外还未见利用单倍体愈伤组织作为加倍材料的研究报道。愈伤组织可以连续继代,一个转基因阳性愈伤组织可通过继代获得指数级的增长,即使在加倍效率较低条件下,仍然可以确保获得大量二倍体材料。

目前玉米单倍体的筛选主要基于颜色标记,但胚的显色需要等到成熟胚阶段,因此不能采用颜色标记来区分二倍体和单倍体幼胚。课题组前期利用光照培养可以在早期甄别大部分非单倍体愈伤组



织,鉴定效率为 68%<sup>[20]</sup>,但后期仍然存在一定比率的二倍体愈伤组织,因此采用一种更简便的方式进一步筛选单倍体愈伤组织十分必要。本研究利用愈伤组织直径比较了单倍体愈伤组织和二倍体愈伤组织的生长速率,研究结果表明,在继代 1~2 次后,二倍体愈伤组织的生长速率均明显快于单倍体愈伤组织,尤其在愈伤组织分离培养的早期,这种现象基本上与单倍体植株个体比二倍体个体更小是一致的<sup>[28]</sup>,因此可以利用愈伤组织生长情况作为甄别继代 1~2 次的单倍体愈伤组织和二倍体愈伤组织。继代 3 次以后,单倍体愈伤组织与二倍体愈伤组织生长情况已基本上保持一致,有研究表明,刚诱导出的愈伤组织比较坚硬,生长缓慢,但随着继代 3~4 次,愈伤组织活力增加<sup>[29]</sup>,有可能单倍体愈伤组织表现得更为明显,因此利用愈伤组织生长情况来鉴别单倍体愈伤组织和二倍体愈伤组织最好选择继代 1~2 次后进行。

截至目前,还没有关于利用秋水仙素加倍玉米单倍体愈伤组织的研究报道。但秋水仙素已成功应用于玉米种子、芽尖和成熟胚等单倍体材料的加倍<sup>[30]</sup>。尤其近年来采用的组培加倍方法大大提高了玉米单倍体的加倍效率。李浩川等<sup>[31]</sup>采用 MS 培养基,利用 0.005%、0.01%、0.02% 和 0.03% 的秋水仙素分别处理玉米单倍体成熟胚,最终筛选到 0.005% 的秋水仙素处理 24 h 这一最佳方式,加倍率达 57.61%。相对于玉米种子、芽尖和成熟胚等器官,愈伤组织具有生活力旺盛、分化能力强等特征,是适合进行转基因和化学加倍的优良材料,但因其生长脆弱,对外界环境更为敏感,因此对加倍条件更为苛刻。基于此,本研究在正常成熟胚组培加倍的基础上进行了较大幅度的调整,研究结果基本与成熟胚组培加倍处理结果一致,即随着处理浓度的提高和时间的延长,不同继代次数的愈伤组织存活率均呈明显下降趋势。在本研究中,0.005% 秋水仙素处理 1 h 的愈伤组织存活率为 87%,介于 0.005% 秋水仙素处理 24~36 h 的单倍体成熟胚成苗率 84.84%~91.22% 之间,而 0.03% 处理 6 h 的单倍体愈伤组织存活率仅为 14%,远低于 0.03% 处理 36 h 后单倍体成熟胚 24.23% 的成苗率<sup>[31]</sup>,由此表明单倍体愈伤组织对加倍条件更为敏感。

为了对秋水仙素加倍玉米单倍体愈伤组织的效果进行评价,仅仅考虑成活率是不够的,因此我们对成株后散粉情况和结实情况进行分析。结果发现,随着处理浓度增加和时间的延长,散粉率和结实率

均呈明显的上升趋势,并从数据上表现出显著的正相关关系。进一步分析发现,在散粉的植株中,具有大花药的植株比例呈上升趋势,小花药植株比例呈下降趋势。通过 KI 染色发现,大花药中的花粉较小花药中的花粉活力更强,这可能是秋水仙素处理后结实率和结实大于 5 粒种子植株比率呈上升趋势的重要原因,由此表明,秋水仙素处理不仅可以提高玉米愈伤组织成苗后的散粉率,同时也可以促进有效花粉(大花药)的形成,最终提高结实率以及结实数量。综合处理浓度、处理时间、愈伤组织成活率及加倍效率,筛选出 0.01% 秋水仙素处理 12 h (处理编号 B12-2,成活率 58%,结实率 29%) 和 0.02% 秋水仙素处理 3 h (处理编号 C3-2,成活率 59%,结实率 31%) 2 种较为理想的玉米单倍体愈伤组织处理方式。与玉米单倍体成熟胚加倍处理相比,该两种处理时间更短,但成活率和加倍效率仍需提高。

#### 参考文献

- [1] 魏晓禹,邵诗迪,孙苏,金栋梁,刘智博,焦鹏,关淑艳. 农杆菌介导的玉米幼胚遗传转化体系的建立. 吉林农业大学学报, 2017, 39(6): 640-647  
Wei X Y, Shao S D, Sun S, Jin D L, Liu Z B, Jiao P, Guan S Y. Establishment of agrobacterium-mediated genetic transformation system for young maize embryos. Journal of Jilin Agricultural University, 2017, 39(6): 640-647
- [2] 李志亮,黄丛林,刘晓彬,邢浩春,吴忠义. 转基因植物及其安全性的研究进展. 北方园艺, 2020(8): 129-135  
Li Z L, Huang C L, Liu X B, Xing H C, Wu Z Y. Research progress on transgenic plants and their safety. Northern Horticulture, 2020(8): 129-135
- [3] 焦悦,韩宇,杨桥,黄耀辉,安吉翠,杨亚洲,叶纪明. 全球转基因玉米商业化发展态势概述及启示. 生物技术通报, 2021, 37(4): 10-21  
Jiao Y, Han Y, Yang Q, Huang Y H, An J C, Yang Y Z, Ye J M. Overview and enlightenment of global commercialization of genetically modified maize. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(4): 10-21
- [4] Clive James. 2014 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势. 中国生物工程杂志, 2015(1): 1-14  
Clive J. Global commercialization of biotechnology/genetically modified crops in 2014. Chinese Journal of Bioengineering, 2015(1): 1-14
- [5] 骆翔,刘志颖,章树民,申硕,王德福,王劲松. 植物转基因技术研究进展. 中国农学通报, 2014, 30(15): 234-240  
Luo X, Liu Z Y, Zhang S M, Shen S, Wang D F, Wang J S. Advances in plant transgenic technology. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(15): 234-240
- [6] 张晓玲,龙芸,葛飞,管中荣,张晓祥,王艳丽,沈亚欧,潘光堂. 玉米幼胚胚性愈伤组织再生能力相关性状遗传研究. 遗传, 2017, 39(2): 143-155



- Zhang X L, Long Y, Ge F, Guan Z R, Zhang X X, Wang Y L, Shen Y O, Pan G T. Genetics of callus regeneration in young maize embryos. *Genetics*, 2017, 39 ( 2 ): 143-155
- [ 7 ] 张微,王良群,刘勇,郝艳芳,杨伟,白鸿雁,武肇. 玉米不同部位愈伤组织诱导及植株再生的比较研究玉米幼胚胚性愈伤组织再生能力相关性状遗传研究. *核农学报*, 2017, 31 ( 11 ): 2135-2144
- Zhang W, Wang L Q, Liu Y, Hao Y F, Yang W, Bai H Y, Wu B. Plant regeneration and callus regeneration in young embryos of maize. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2017, 31 ( 11 ): 2135-2144
- [ 8 ] 邢小龙,常纪苹,胡德升,胡彦民,进茜宁,汤继华,付小康,钟立华. 农杆菌介导玉米芽尖生长点遗传转化体系的建立. *西南农业学报*, 2016, 29 ( 5 ): 1023-1026
- Xing X L, Chang J P, Hu D S, Hu Y M, Jin X N, Tang J H, Fu X K, Zhong L H. Establishment of agrobacterium tumefaciens mediated genetic transformation system for maize bud tip growing point. *Journal of Agricultural Sciences in China*, 2016, 29 ( 5 ): 1023-1026
- [ 9 ] 陈靖,董浩,马海珍,孙全喜,刘江,亓宝秀,李新征,董树亭. 玉米幼胚和源于幼苗的幼嫩叶段愈伤诱导及其植株再生的比较. *中国农业科学*, 2011, 44 ( 17 ): 3676-3682
- Chen J, Dong H, Ma H Z, Sun Q X, Liu J, Qi B X, Li X Z, Dong S T. Comparison of callus induction and plantlet regeneration between young embryo and young leaf from seedling of maize. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44 ( 17 ): 3676-3682
- [ 10 ] 张曼,吴颖,苏胜忠,李世鹏,单晓辉,刘宏魁,原亚萍. 玉米茎节再生体系建立及 AGPL 基因遗传转化的研究. *玉米科学*, 2016, 24 ( 3 ): 51-56
- Zhang M, Wu Y, Su S Z, Li S P, Shan X H, Liu H K, Yuan Y P. Genetic transformation of AGPL gene in maize. *Journal of Maize Science*, 2016, 24 ( 3 ): 51-56
- [ 11 ] Armstrong C L, Green C E, Phillips R L, Stucker R E. Genetic control of plant regeneration from maize tissue cultures. *Maize Genet Coop Newsl*, 1985, 59: 92-93
- [ 12 ] 谢友菊,戴景瑞,郝琨. 玉米胚性愈伤组织的诱导及其植株再生的研究. *遗传*, 1987, 9 ( 3 ): 11-13
- Xie Y J, Dai J R, Hao K. Studies on embryogenic callus induction and plant regeneration in maize. *Genetics*, 1987, 9 ( 3 ): 11-13
- [ 13 ] 宋芸,夏燕莉,魏昕,张志明,赵茂俊,荣廷昭,潘光堂. 四种玉米幼胚培养性状的基因效应分析. *中国农业科学*, 2006, 39 ( 1 ): 18-22
- Song Y, Xia Y L, Wei X, Zhang Z M, Zhao M J, Rong T Z, Pan G T. Genetic effect analysis of four maize embryo culture traits. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39 ( 1 ): 18-22
- [ 14 ] 潘光堂,张志明,魏昕,宋芸,赵茂俊,夏燕莉,荣廷昭. 玉米幼胚培养能力性状 QTL 分析. *作物学报*, 2006, 32 ( 1 ): 7-13
- Pan G T, Zhang Z M, Wei X, Song Y, Zhao M J, Xia Y L, Rong T Z. Analysis of QTL for cultivation ability of maize young embryos. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32 ( 1 ): 7-13
- [ 15 ] 贾艾敏. 农杆菌介导的 2mG2-epsps 基因转化玉米幼胚的研究. 成都: 四川农业大学, 2015
- Jia A M. Study on transformation of 2Mg2-EPSPs gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2015
- [ 16 ] 王伟. 玉米高效遗传转化受体材料的筛选. 泰安: 山东农业大学, 2020
- Wang W. Screening of efficient genetic transformation receptor materials for maize. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2020
- [ 17 ] 李志亮,吴忠义,杨清,张希太,叶嘉,邢浩春,陈建中,黄丛林. 基因枪转化法对抗旱基因导入玉米的研究. *生物技术通报*, 2016, 32 ( 5 ): 61-68
- Li Z L, Wu Z Y, Yang Q, Zhang X T, Ye J, Xing H C, Chen J Z, Huang C L. Study on introduction of drought-resistant genes into maize by gene gun transformation. *Biotechnical Bulletin*, 2016, 32 ( 5 ): 61-68
- [ 18 ] 李金红,付莉,关晓溪,霍岩,陶承光,史振声. 根瘤农杆菌介导的玉米幼胚遗传转化体系. *沈阳农业大学学报*, 2018, 49 ( 3 ): 266-271
- Li J H, Fu L, Guan X X, Huo Y, Tao C G, Shi Z S. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of young maize embryos. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2018, 49 ( 3 ): 266-271
- [ 19 ] 杜何为,戴景瑞,李建生. 玉米单倍体育种研究进展. *玉米科学*, 2010, 18 ( 6 ): 1-7
- Du H W, Dai J R, Li J S. Advances in maize haploid breeding. *Journal of Maize Science*, 2010, 18 ( 6 ): 1-7
- [ 20 ] 廖长见,秦燕,陈琦,张扬,陈山虎,林海建. 玉米单倍体胚性愈伤的诱导与鉴定. *核农学报*, 2019, 33 ( 4 ): 0640-0646
- Liao C J, Qin Y, Chen Q, Zhang Y, Chen S H, Lin H J. Induction and identification of haploid embryogenic callus in maize. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2019, 33 ( 4 ): 0640-0646
- [ 21 ] 赵爱菊,陈希勇,高增玉,王江浩. 农杆菌侵染条件对玉米单倍体遗传转化的影响. *河北农业科学*, 2017, 21 ( 6 ): 81-84
- Zhao A J, Chen X Y, Gao Z Y, Wang J H. Effects of *Agrobacterium tumefaciens* infection conditions on genetic transformation of maize haploid. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2017, 21 ( 6 ): 81-84
- [ 22 ] 蔡华,马传喜,乔玉强. 小麦 × 玉米诱导小麦单倍体的形态学及细胞学鉴定. *核农学报*, 2008, 22 ( 2 ): 0127-0130
- Cai H, Ma C X, Qiao Y Q. Morphological and cytological identification of wheat haploid induced by wheat × maize. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2008, 22 ( 2 ): 0127-0130
- [ 23 ] 许蕾,陈佩琳,冯光燕,钟旻悦,景婷婷,黄琳凯,张新全. 利用流式细胞仪鉴定鸭茅倍性. *草业学报*, 2019, 28 ( 3 ): 74-84
- Xu L, Chen P L, Feng G Y, Zhong M Y, Jing T T, Huang L K, Zhang X Q. Identification of ploidy by flow cytometry. *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28 ( 3 ): 74-84
- [ 24 ] 蒋武生,原玉香,耿建峰,张晓伟,韩永平,高睦枪. 玉米单倍体胚诱导与基因枪转化研究 // 中国农业生物技术学会. 全国作物细胞工程与分子技术育种学术研讨会论文集. 北京: 中国农业生物技术学会, 2003: 6
- Jiang W S, Yuan Y X, Geng J F, Zhang X W, Han Y P, Gao M Q. Study on haploid embryo induction and gene gun transformation in maize // Chinese Society of Agricultural Biotechnology. Proceedings of the national symposium on crop cell engineering and molecular technology breeding. Beijing: Chinese Society of Agricultural Biotechnology, 2003: 6
- [ 25 ] 杜何为,刘志鹏,严建兵,李建生. 玉米单倍体胚芽鞘节组织培养特性研究. *中国农业科学*, 2010, 43 ( 15 ): 3098-3105
- Du H W, Liu Z P, Yan J B, Li J S. Studies on the characteristics

- of maize haploid coleoptile nodal tissue culture. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43 ( 15 ): 3098-3105
- [ 26 ] 沈亚欧, 潘光堂, 江舟, 杨珊, 林海建, 彭焕伟, 张志明, 罗旭, 马浪浪, 李婉蓉, 张兵. 以单倍体玉米茎尖为受体的转基因育种方法. 国家发明专利. 2012104481463. 2014-07-23  
Shen Y O, Pan G T, Jiang Z, Yang S, Lin H J, Peng H W, Zhang Z M, Luo X, Ma L L, Li W R, Zhang B. Transgenic breeding method with haploid maize shoot tip as receptor. National invention patent. 2012104481463. 2014-07-23
- [ 27 ] 才卓, 徐国良, 于明彦, 任军, 代玉仙, 李淑华, 郭琦, 刘小丹, 武阳春, 杜金洹. 玉米单倍体高自然加倍材料吉 Gjb335DH3 的遗传分析与 QTL 初定位研究. *玉米科学*, 2020, 28 ( 6 ): 1-7, 17  
Cai Z, Xu G L, Yu M Y, Ren J, Dai Y X, Li S H, Guo Q, Liu X D, Wu Y C, Du J H. Genetic analysis and QTL mapping of maize ( *Zea mays* L. ) Gjb335DH3. *Journal of Maize Science*, 2020, 28 ( 6 ): 1-7, 17
- [ 28 ] 郭德栋. 植物单倍体的分类、鉴别方法和特性. 齐齐哈尔师院学报, 1979 ( 2 ): 1-10  
Guo D D. Classification, identification and characteristics of plant haploid. *Journal of Qiqihar Normal University*, 1979 ( 2 ): 1-10
- [ 29 ] 李海霞, 谢久凤, 孙金花. 玉米幼胚胚性愈伤组织诱导和继代研究. *江苏农业科学*, 2020, 48 ( 7 ): 74-77  
Li H X, Xie J F, Sun J H. Study on callus induction and subculture of maize young embryo. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020, 48 ( 7 ): 74-77
- [ 30 ] 陈琦, 马海霞, 尹高龙, 林海建, 潘光堂, 张志明, 沈亚欧. 玉米孤雌生殖单倍体诱导及加倍机理研究新进展. *植物遗传资源学报*, 2015, 16 ( 4 ): 759-764  
Chen Q, Ma H X, Yin G L, Lin H J, Pan G T, Zhang Z M, Shen Y O. Advances in the study of the mechanism of maize parthenogenesis haploid induction and doubling. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015, 16 ( 4 ): 759-764
- [ 31 ] 李浩川, 李颜曲, 彦志, 杨继伟, 张朝林, 王盼盼, 崔丽洋, 毛熙岚, 刘宗华. 玉米单倍体成熟胚组培加倍效果研究. *河南农业大学学报*, 2018, 52 ( 1 ): 1-5  
Li H C, Li Y Q, Yan Z, Yang J W, Zhang C L, Wang P P, Cui L Y, Mao X L, Liu Z H. Study on doubling effect of maize haploid mature embryo tissue culture. *Journal of Henan Agricultural University*, 2018, 52 ( 1 ): 1-5