

玉米单倍体自然二倍化研究

吴鹏昊^{1,2} 任姣姣¹ 田小龙¹ 王乐乐¹ 李国梁¹ 刘文欣¹ 陈绍江^{1*}

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院/国家玉米改良中心/

北京作物遗传改良重点实验室,北京 100193;

2. 新疆农业大学 农学院,乌鲁木齐 830052)

摘要 本研究以玉米杂交种郑单958诱导产生的玉米单倍体群体为材料,利用流式细胞仪对单倍体自然条件下的二倍化现象进行了观察。结果表明,在自然条件下,体细胞加倍与生殖细胞加倍并不显著相关,雌雄穗加倍存在差异,并且雌穗自然加倍率较高。雄穗可育单倍体植株的体细胞基本上处于单倍状态(1C),少数体细胞中存在单倍体与二倍体细胞的倍性嵌合现象,并检测到了1%~2%的非整倍体(1.5C)现象。体细胞二倍化有随雄穗育性水平升高而增加的趋势。

关键词 流式细胞仪;玉米;单倍体;自然加倍;二倍化

中图分类号 S 513

文章编号 1007-4333(2016)01-0001-07

文献标志码 A

Studies on haploid spontaneous diploidization in maize

WU Peng-hao^{1,2}, REN Jiao-jiao¹, TIAN Xiao-long¹, WANG Le-le¹,

Li Guo-liang¹, LIU Wen-xin¹, CHEN Shao-jiang^{1*}

(1. College of Agronomy and biotechnology/National Maize Improvement Center of China/

Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. College of Agronomy, Xinjiang Agriculture University, Urumqi 830052, China)

Abstract Based on the haploid population from maize hybrid Zhengdan958, flow cytometer was used to observe the haploid spontaneous diploidization. The results showed that in the natural condition, there was no significant correlation between germ cell and somatic cell, and difference in diploidization between tassels and ears, which was found higher than tassels. Most of male fertile haploids were detected to stay in the state without diploidization (1C), only a few fertile haploids had been found to be the chimera, and there were about 1% - 2% fertile haploids being detected to have aneuploidy (1.5C). There was a trend that somatic cell doubling increased with haploid fertility raised.

Keywords flow cytometer; maize; haploid; spontaneous doubling; diploidization

单倍体通过加倍而实现育性恢复是高通量生产(Doubled haploid, DH)系的关键环节^[1]。自然条件下,玉米单倍体雌穗育性恢复效率较高,雄穗较低^[2-3],因此,雄穗自然加倍效率高成为影响玉米单倍体育种高效应用的主要限制因素之一^[4]。然而,目前对单倍体雄穗育性恢复的认识还主要集中于一些田间观察^[5-8],对单倍体育性恢复过程中的二倍化特点尚缺少深入研究。

了解单倍体倍性是研究育性恢复重要途径。目前倍性研究已有多种方法,如籽粒和植株表型、细胞倍性的特征如染色体数减半等^[9]。前人还通过比较研究发现小麦、大麦和黑麦中气孔的保卫细胞的长度会随着DNA含量的变化而发生变化^[10-12],由此建议将观察气孔保卫细胞的长度用来作为鉴定的方法^[13-14]。直接对植株倍性进行鉴定的方法主要有2个,一是染色体计数的方法^[15],通过对根尖细胞临

收稿日期:2015-06-08

基金项目:现代农业产业技术体系(CARS-02-09);国家“863”计划项目(2011AA10A103)

第一作者:吴鹏昊,博士,主要从事玉米遗传育种研究,E-mail:craie788@126.com

通讯作者:陈绍江,教授,博士生导师,主要从事玉米遗传育种研究,E-mail:chen368@126.com

时制片,以细胞中染色体数目来判断植株个体的倍性^[16-18];二是利用流式细胞仪^[19]检测植株个体中DNA的含量以判断细胞倍性。流式细胞仪从上个世纪80年代起在临床医学研究上应用广泛,可以进行定性和定量分析且具有速度快、精度高等优点^[20]。在作物测量中,流式细胞仪能够检测不同器官组织中分裂间期细胞的DNA含量^[21]。

本研究拟利用流式细胞仪对玉米单倍体进行细胞学鉴定,探讨单倍体二倍化的特点和规律,以期为玉米单倍体育种技术优化提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

以玉米杂交种郑单958为母本,以单倍体诱导系CAU5^[17]为父本进行单倍体诱导,收获的杂交结实籽粒根据R1-nj标记对单倍体进行挑选。将获得单倍体籽粒于2012年夏天进行种植观察,种植密度为75 000株/hm²,在6~7叶期去杂株之后,共得到2 117株玉米单倍体植株。同期种植二倍体亲本自交系郑58作为对照材料。试验材料种植于北京上庄中国农业大学上庄实验站。

表1 流式细胞仪检测可育单倍体倍性取样总体情况

Table 1 Samples of fertile haploids detected by flow cytometer

项目 Item	露药级别 Anther level						露粉级别 Pollen level				总计 Total
	0	1	2	3	4	5	0	I	II	III	
株数 Plant number	50	30	22	26	21	25	50	28	29	24	305

1.3 流式细胞仪对植株倍性检测方法

在单倍体散粉吐丝期,取合适的营养组织器官对不同雄穗育性恢复等级的可育单倍体利用流式细胞仪检测不同类型细胞中DNA的含量,检测的方法根据Palomino等^[23]描述的方法进行稍加改进。具体步骤如下所示:

1)玉米叶片细胞悬浮液制备。在玉米散粉吐丝期剪取新鲜组织0.5g左右,置于培养皿中,在培养皿中加入2mL裂解液(表2),用锋利的刀片迅速切割叶片以破坏组织细胞壁,用移液器吸取0.5mL汁液并用滤膜过滤2次,4℃条件下1 000 r/min离心10 min;

2)细胞悬浮液特异染色。将离心好的悬浮液弃去上清之后,加入400mL碘化丙啶(Propidium iodide,PI,质量浓度为5 μg/mL),4℃避光静置

1.2 自然加倍单倍体育性恢复调查

单倍体的雄穗散粉等级参照Kleiber等^[5]和Geiger等^[22]的分类标准,将散粉单倍体露药等级按照可见花药占雄穗比例由无到多分为0~5级,露粉等级按照可育花粉量由无到多分为0~Ⅲ级;散粉特征在出现单个花药散粉开始记录,直到不再显露花药和抖落花粉为止,以此期间露药和露粉的最大量作为单株雄穗育性恢复的表型。雌穗育性恢复以郑单958花粉与本试验中单倍体雌穗进行授粉,统计结实株数占授粉株数的比率作为雌穗育性恢复的表型特征。

由于流式细胞检测成本较高,本试验选取具有代表性的不同露药和露粉等级各20株以上进行细胞倍性测定,共测定可育单倍体205株。对不同散粉等级中可育单倍体的植株倍性进行分析,并统计不同倍性植株所占比率。在散粉期取样,选择可育单倍体或者散粉单倍体进行测定(表1),取样器官或组织包括植株顶端叶片,同时对同一单株雌穗的外层苞叶以及未受精花丝以及同一叶片的不同部位(叶尖部、叶鞘部及之间的叶中部)进行检测比较差异。本试验细胞倍性定标材料为自交系郑58。

30 min,等待上机测定;

3)流式细胞仪测定DNA含量。流式细胞仪为美国BD公司FACSCalibur流式细胞仪(Flow Cytometry),分析的软件为CellQuest Pro。

表2 改进的细胞裂解液配方

Table 2 Improved lysates formula

成分 Component	终含量/(mmol/L) Content	用量/mg Dosage
Tris	15	363
Na ₂ EDTA	2	148.9
Spermine	0.5	20.2
KCl	80	1 193
NaCl	20	233.8
TrionX-100	0.10%	200 μL

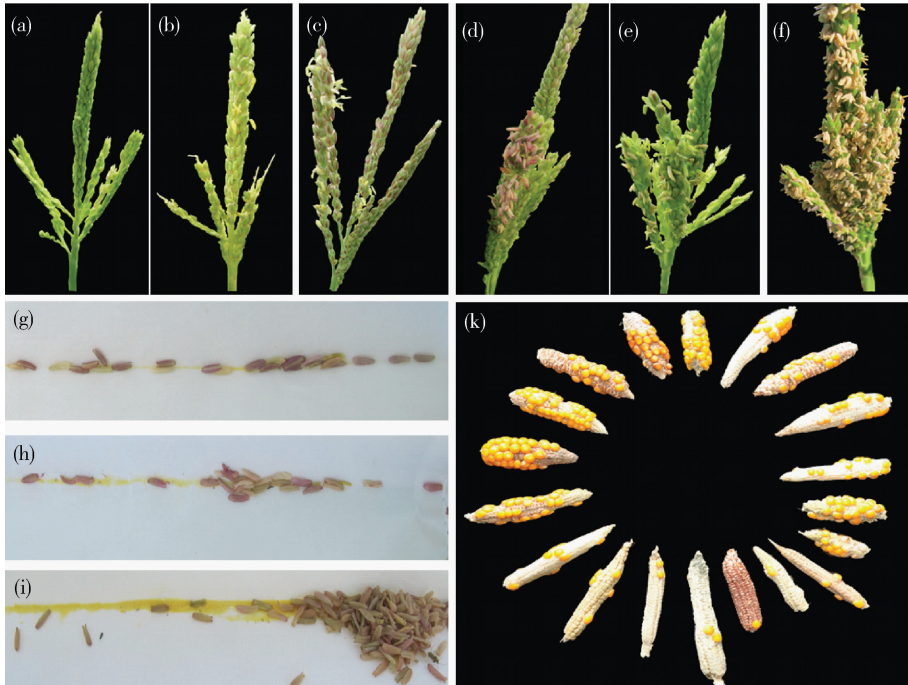
1.4 单倍体植株农艺性状鉴定

在单倍体散粉后 10 d 对所有检测的可育单倍体植株进行植株农艺性状测量,包括株高、穗位、叶长、叶宽、雄穗长度、雄穗分支数和叶绿素含量(穗上叶、穗位叶和穗下叶,用 SPAD-502 检测),随机选取 100 株不育单倍体作为对照。利用 SAS9.3 进行 *t* 检验,比较植株农艺性状的差异,并利用 Spearman 相关性检验对可育等级与体细胞二倍化之间的相关性进行分析。

2 结果与分析

2.1 自然加倍单倍体育性恢复特征

通过田间调查,单倍体不同等级雄穗育性恢复及雌穗育性恢复的观察结果如图 1 所示。根据不同级别统计单倍体群体中雌雄穗不同育性恢复情况,结果显示,各等级间单倍体群体雄穗育性恢复比率均具有一定差异,其中从露药级别来看,不同露药级别占总体单倍体比率最小的为 4 级和 5 级,株数



(a) 完全不育; (b) 露药 1 级; (c) 露药 2 级; (d) 露药 3 级; (e) 露药 4 级; (f) 露药 5 级; (g) 露粉 I 级; (h) 露粉 II 级; (i) 露粉 III 级; (k) 单倍体雌穗与二倍体正常花粉杂交结实情况

(a) Sterile; (b) Anther 1st; (c) Anther 2nd; (d) Anther 3rd; (e) Anther 4th; (f) Anther 5th; (g) Pollen I; (h) Pollen II; (i) Pollen III; (k) Harvested haploid ear which crossed by normal diploid pollen

图 1 单倍体群体雄穗和雌穗育性自然恢复田间特征及分类

Fig. 1 Field performances and classifications of spontaneous doubling haploids

表 3 单倍体群体育性恢复整体表现

Table 3 Spontaneous doubling analysis of fertile haploids

项目 Item	露药级别 Anther level						露粉级别 Pollen level			
	0	1	2	3	4	5	0	I	II	III
株数 Plant number	1 314	559	124	60	30	30	1 748	181	104	84
雄穗育性恢复比率/% Male fertile rate ^a	62.06	26.41	5.86	2.83	1.42	1.42	82.57	8.55	4.91	3.97
结实株数 Kernel-bearing plants number	1 198	504	114	57	28	29	1 613	167	99	80
雌穗育性恢复比率/% Female fertile rate ^b	91.17	90.16	91.94	95.00	93.33	96.67	92.28	92.27	95.19	95.24

注: a 雄穗育性恢复比率/% = 每个等级散粉株数/总单倍体株数 × 100; b 雌穗育性恢复比率/% = 每个等级杂交授粉结实株数/每个等级杂交授粉株数 × 100。

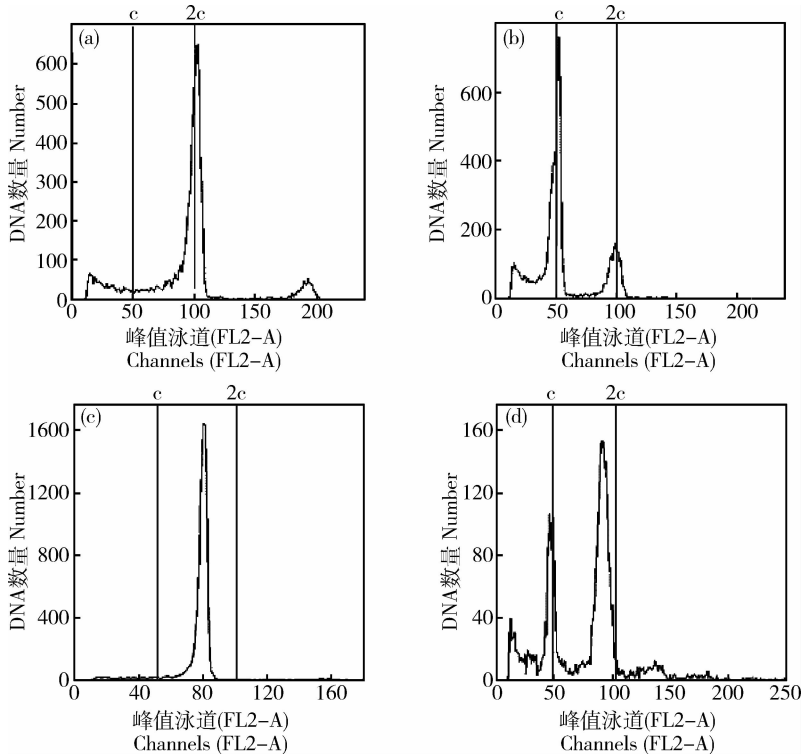
Note: a Male fertility/% = Plant number in each fertility level/Total haploid number × 100; b Female fertility/% = Harvested ear number with kernels in every fertility level/Plant number being crossed in every fertility level × 100.

都为30株,仅各占1.42%,最大的为1级,株数为559株,占26.41%;以露粉级别划分,不同露粉级别占总体单倍体比率最小的为露粉Ⅲ级,只有3.97%,最大的为露粉Ⅰ级,占到8.55%。对不同雄穗散粉等级的单倍体植株杂交二倍体花粉,可以看出无论是整体而言,还是对于雄穗散粉每个等级(包括不育)而言,雌穗的育性恢复效率相对较一致,都在90%以上。由以上结果可知,自然加倍单倍体雌穗育性恢复能力较强,雄穗育性恢复能力相对较差。

2.2 可育单倍体的植株倍性

根据流式细胞仪的检测植株组织,标样二倍体植株叶片(自交系郑58) G_1 最高峰值所在的位置定

为二倍体的峰值位置即2C,不育单倍体植株 G_1 期会在0到2C的中间位置处出现一个明显的峰值,即为1C。由于所检测的玉米材料本身为已知的二倍体,设定本试验进行检测的二倍体的峰值为100道的位置(图2(a)),预测一般不育单倍体应当在50道的位置出现峰值,同时对来自不同材料的不育单倍体流式细胞仪检测发现与预测吻合(图2(b))。对可育单倍体进行检测,与不育单倍体峰值相同的记为单倍型个体,即1C;与正常可育二倍体峰值相同的记为二倍型个体,即2C;处于2个峰值之间的个体记为非整倍型个体,即1.5C(图2(c));同时含有2个峰值的记为混倍型的倍性嵌合个体,记为1C-2C(图2(d))。



(a)正常可育二倍体自交系郑58(2C);(b)单倍型个体(1C);(c)非整倍型个体(1.5C);(d)混倍型个体(1C-2C)

(a) Normal fertile diploid inbred Zheng58 (2C); (b) Haploid type (1C); (c) Aneuploidy type (1.5C); (d) Mix-ploidy type (1C-2C)

图2 流式细胞仪检测可育单倍体植株倍性

Fig. 2 Detection of fertile haploids

2.3 可育单倍体不同组织体细胞倍性表现

对可育单倍体叶片倍性检测结果(表4)表明,所有检测材料中都没有检测到完全二倍化(2C)的个体,其中不育型个体(包括无花药和无花粉)及雄穗可育度较低的植株全部为单倍型(1C)个体;露药

等级和露粉等级较高的个体中检测到了少量混倍型个体(1C-2C),占总体比率为4.5%;另外,在可育单倍体中还检测到了少量非整倍型个体(1.5C),比率约为1.5%。对同一叶片的3个不同部位进行检测,峰值结果显示倍性基本一致。

进一步对可育单倍体的其他营养组织器官检测发现,无论是单倍型个体还是混倍型个体,来自同一散粉等级个体的雌穗苞叶和未受精花丝的倍性与叶片检测结果均表现一致。同时,体细胞二倍化程度随着雄穗育性水平升高而增加,但两者之间并不显

著相关($\alpha=0.05$ 水平)(表 5),这说明单倍体生殖细胞的加倍与体细胞的加倍可能是 2 个相对独立的过程,并且从两者占总体比率上看,生殖细胞较体细胞更容易发生自然加倍。

表 4 雄穗可育单倍体植株叶片的流式细胞检测结果

Table 4 Leaf ploidy detection of haploid plants with different fertile level

类型 Type	露药级别 Anther level					露粉级别 Pollen level			总计 Total
	1	2	3	4	5	I	II	III	
单倍型/% (1C)Haploid	100	100	88.5	85.7	88.0	100	100	87.5	94.1
二倍型/% (2C)Diploid	0	0	0	0	0	0	0	0	0
非整倍型/% (1.5C)Aneuploid	0	0	3.8	4.8	0	0	0	4.2	1.5
混倍型/% (1C-2C)Chimera	0	0	7.7	9.5	12.0	0	0	8.3	4.4
总计/个 Total	30	22	26	21	25	28	29	24	205

表 5 体细胞二倍化程度与可育等级相关性检验

Table 5 Correlation test between somatic cell diploidization degree and haploid fertility

类型 Type	参数 Parameter	结果 Result
露药可育等级 Anther level	相关系数	0.87
	显著性	0.06
露粉可育等级 Pollen level	相关系数	0.87
	显著性	0.33

2.4 可育单倍体及不育单倍体植株农艺性状比较

植株农艺性状是体细胞状态的具体体现^[2],通过比较可育单倍体和不育单倍体在 7 个农艺性状上

的差异,发现两者在所调查的 7 个农艺性状上没有显著差异($\alpha=0.05$ 水平)(表 6),此与单倍体体细胞二倍化程度较低是一致的。

表 6 可育单倍体与不育单倍体植株农艺性状比较

Table 6 Comparison of traits between fertile haploids and sterile haploids

类型 Type	株高/ cm Plant height	穗位/ cm Ear height	叶长/ cm Leaf length	叶宽/ cm Leaf width	雄穗长/ cm Tassel length	雄穗 分支数 Tassel branch number	穗上叶 叶绿素含量 Chlorophyll content of leaf above ear	穗位叶 叶绿素含量 Chlorophyll content of ear leaf	穗下叶 叶绿素含量 Chlorophyll content of leaf below ear
可育单倍体 Fertile haploid	106.24	33.9	35.27	6.62	18.03	7.00	48.84	48.18	48.70
不育单倍体 Sterile haploid	106.06	33.31	36.18	6.55	17.07	6.45	48.06	47.65	47.74
t 值 t value	0.07	0.56	0.81	0.15	0.89	1.30	1.42	0.92	0.59
显著性(双侧) Significance test (Two tail)	0.94	0.58	0.24	0.82	0.37	0.19	0.16	0.36	0.55

3 讨论

3.1 基于流式细胞仪的高通量细胞倍性检测方法

快速高效的倍性检测技术有助于对单倍体加倍的机理进行研究,传统的荧光镜检和染色体计数法尽管较为直接有效,但其观察的数量非常有限,加之相关实验操作较为繁琐,难以满足单倍体育种工程化的需求。流式细胞仪的检测方法在速度、精度和准确性上要优于其他方法,可以对大量细胞的DNA含量进行检测。流式细胞检测技术具有试样制备方便、分析快速、相对准确、数据采集量大等优点,已逐步成为植物倍性分析的重要手段^[24-27]。其主要检测原理是根据细胞中DNA的含量多少对细胞倍性进行鉴定,从而能够准确和具体地描述单倍体细胞加倍的状态^[28]。因此,随着流式细胞检测技术的不断改进和测试成本降低,将可实现对玉米单倍体植株进行高通量的倍性检测,从而有助于深化单倍体加倍机理研究,促进单倍体育种技术发展。

3.2 单倍体二倍化程度及特点

在自然条件下,体细胞和生殖细胞均存在倍性转化现象^[29-31],并各具特点。单倍体的二倍化主要表现在雌穗结实性与雄穗的散粉性,本研究观察表明雌穗结实率较高,单倍体的自然加倍能力主要受限于雄穗的散粉性能,此与Chalyk^[4]的研究结果基本一致,说明雌穗发育过程中,生殖细胞的二倍化程度较高;本研究还发现,多数雄穗可育个体的叶片等组织的体细胞基本上处于单倍状态,仅有少数个体二倍化程度较高。就二倍化对农艺性状的影响而言,由于体细胞的二倍化程度较低,对植株的性状影响较小,但在具体的器官组织上,可能存在单倍体细胞与二倍体细胞竞争生长的现象如具体表现为叶片皱缩等现象,此也可能与二倍化时间早晚存在一定关联。另外,本试验中的自然加倍个体体细胞混倍体的数量也远小于以往化学药剂(主要为秋水仙素)处理后的数量^[18],这表明单倍体自然加倍与化学药剂加倍具有不同的加倍途径^[32]。

3.3 单倍体二倍化途径

体细胞与生殖细胞以及雌雄生殖细胞的不相关性表明二倍化可能存在不同的遗传或生物学机制。Wu等^[33]通过对早期加倍单倍体(Early double haploid, EH)检测发现,多数EH个体的体细胞呈现完全二倍化。由此推测,单倍体在自然条件下发生生殖细胞染色体加倍的时候,可能存在两种不同

途径,一种途径是在诱导产生单倍体的同时,或者单倍体籽粒形成时期,已经形成了完全二倍化或者高度二倍化的胚,这些个体在之后的发育中无论从植株表型还是可育程度上都表现为二倍体;另一种途径是已经诱导形成的单倍体胚在后期的生长发育过程中,由于受到内外各种因素的影响,体细胞与生殖细胞的二倍化不完全同步,成为具有单倍体植株特征的可育单倍体。本研究在可育单倍体中检测到一些非整倍体(1.5C),其DNA含量介于二倍体和单倍体之间,发生频率大约在1%左右。由于发生数量极少,传统的细胞学检测手段很难检测到,而利用流式细胞仪则可以较为快速地鉴定。这些非整倍体个体主要存在于可育单倍体中,与单倍体和混倍体一样,是单倍体细胞发生加倍的一种状态。由此推测,二倍化可能存在核内复制、细胞融合或者核内有丝分裂等不同的途径^[32]。因此,需要对这类特殊现象开展进一步研究,以深化对玉米单倍体自然加倍机理的认识。

参 考 文 献

- [1] 陈绍江,黎亮,李浩川,徐小炜. 玉米单倍体育种技术[M]. 2版. 北京:中国农业大学出版社,2012
Chen S J, Li L, Li H C, Xu X W. *Maize Haploid Breeding* [M]. 2nd ed. Beijing: China Agricultural Publisher, 2012 (in Chinese)
- [2] Chase S S. Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea Mays* L) [J]. *The Botanical Review*, 1969, 35(2): 117-167
- [3] Geiger H H, Gordillo G A. Doubled haploids in hybrid maize breeding[J]. *Maydica*, 2009, 54(4): 485-499
- [4] Chalyk S T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding[J]. *Euphytica*, 1994, 79(1/2): 13-18
- [5] Kleiber D, Prigge V, Melchinger A E, Burkard F, Vicente F S, Palomino G, Gordillo G A. Haploid fertility in temperate and tropical maize germplasm [J]. *Crop Science*, 2012, 52(2): 623-630
- [6] 段民孝,赵久然,刘新香,王元东,邢锦丰,王志永,李绍明,张如养,王乃顺,何瑞娟. 不同种植地点对玉米单倍体自然加倍率的影响[J]. 作物杂志, 2012(2): 68-70
Duan M X, Zhao J R, Liu X X, Wang Y D, Xing J F, Wang Z Y, Li S M, Zhang R Y, Wang N S, He R J. Study on the effect of planting place in maize haploid doubling rate [J]. *Crops*, 2012(2): 68-70 (in Chinese)
- [7] 蔡泉,曹靖生,史桂荣,郭晓明,张建国,赵伟,李树军,殷跃. 玉米单倍体在黑龙江与海南自然加倍效果的对比研究[J]. 玉米科学, 2012, 20(5): 7-9
Cai Q, Cao J S, Shi G R, Guo X M, Zhang J G, Zhao W, Li S J,

- Yin Y. Comparison on natural doubling of maize haploid in Heilongjiang and Hainan Province [J]. *Journal of Maize Sciences*, 2012, 20(5): 7-9 (in Chinese)
- [8] 许洛,王绍新,冯健英.不同生态环境的玉米单倍体自然加倍效果研究[J].河北农业科学,2013,17(3):63-65
Xu L, Wang S X, Feng J Y. Study on natural doubling effect of maize haploid in different ecological environments[J]. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2013, 17(3): 63-65 (in Chinese)
- [9] Ibrokhim A. *Plant Breeding* [M]. Rijeka: InTech Publisher, 2012
- [10] Borrino E, Powell W. Stomatal guard-cell length as an indicator of ploidy in microspore-derived plants of barley[J]. *Genome*, 1988, 30(2): 158-160
- [11] Limin A, Fowler D. The influence of cell size and chromosome dosage on cold-hardiness expression in the *Triceae* [J]. *Genome*, 1989, 32(4): 667-671
- [12] Singh S, Sethi G S. Stomatal size, frequency and distribution in *Triticum aestivum*, *Secale cereale* and their amphiploids[J]. *Cereal Research Communications*, 1995, 23: 103-108
- [13] Sood S, Dhawan R, Singh K, Bains N S, Sood S, Dhawan R. Development of novel chromosome doubling strategies for wheat x maize system of wheat haploid production[J]. *Plant Breeding*, 2003, 122(6): 493-496
- [14] Choe E, Mulvaney K, Rayburn A L, Mumm R H. Improving in vivo maize doubled haploid production efficiency through early detection of false positives[J]. *Plant Breeding*, 2012, 131(3): 399-401
- [15] Maluszynska J. *Doubled Haploid Production in Crop Plants* [M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003
- [16] Li L, Xu X, Jin W, Chen S J. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize[J]. *Planta*, 2009, 230(2): 367-376
- [17] Zhao X, Xu X, Xie H X. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers[J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2): 721-731
- [18] Häntzschel K R, Weber G. Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives[J]. *Protoplasma*, 2010, 241(1/2/3/e4): 99-104
- [19] Bohanec B, Jakse M, Ihan A, Javornik B. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): Induction procedures and genetic analysis of regenerants [J]. *Plant Science*, 1995, 104(2): 215-224
- [20] Galbraith D W, Lambert G M, Macas J, Dolezel J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants[J]. *Current Protocol Cytometry*, 2001, 7(6): 1-22
- [21] Dolezel J, Bartos J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size[J]. *Annals of Botany*, 2005, 95(1): 99-110
- [22] Geiger H H, Schönleben M. Incidence of male fertility in haploid elite dent maize germplasm[J]. *The Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 2011, 85: 22-32
- [23] Palomino G, Hernández L T, de la Cruz Torres E. Nuclear genome size and chromosome analysis in *Chenopodium quinoa* and *C. berlandieri* subsp. *nuttalliae* [J]. *Euphytica*, 2008, 164(1): 221-230
- [24] 刘伟,刘争辉,何旭,Dragovich A Yu,杨起简.利用流式细胞术鉴定黑麦草倍性方法的研究[J].中国农学通报,2011,27(9): 212-215
Liu W, Liu Z H, He X, Dragovich A Y, Yang Q J. DNA content and ploidy determination of rye grass (*Lolium perenne*) by flow cytometry [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(9): 212-215 (in Chinese)
- [25] 柳颀,孔广红,倪书邦,贺熙勇,陶丽,陶亮,宫丽丹.基于流式细胞术的澳洲坚果基因组C值测定[J].中国农学通报,2013,29(34):96-101
Liu J, Kong G H, Ni S B, He X Y, Tao L, Tao L, Gong L D. Estimation of genomic C value of *Macadamia integrifolia* spp by flow cytometry [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(34): 96-101 (in Chinese)
- [26] 李彩琴,王泽槐,徐咏珊,张劲霁,李建国.流式细胞术细胞核分离缓冲液的改良及大、小果型荔枝幼果和果皮细胞分裂活性比较[J].园艺学报,2011,38(9):1781-1790
Li C Q, Wang Z H, Xu Y S, Zhang J A, Li J G. Improvement of the cell nuclei suspensions for flow cytometry and comparison on the cell division activity of litchi fruitlet and pericarp which having different final fruit size [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, 38(9): 1781-1790 (in Chinese)
- [27] 方其,印丽萍,郭水良.应用流式细胞术测定植物DNAC值的实验方法研究[J].植物检疫,2011,25(2):40-44
Fang Q, Yin L P, Guo S L. On method of application of flow cytometry to determine plant DNAC-value [J]. *Plant Quarantine*, 2011, 25(2): 40-44 (in Chinese)
- [28] 汪艳,肖媛,刘伟,李婷婷,胡锐,乔志仙.流式细胞仪检测高等植物细胞核DNA含量的方法[J].植物科学学报,2015,33(1):126-131
Wang Y, Xiao Y, Liu W, Li T T, Hu R, Qiao Z X. Operation skills of flow cytometer for detecting nuclear DNA contents in higher plant cells [J]. *Plant Science Journal*, 2015, 33(1): 126-131 (in Chinese)
- [29] Bauman L F. Production of diploid eggs by normal diploid maize [J]. *The Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 1961, 35: 128-130
- [30] Henry Y. Origin of microspore-derived dihaploid and polyhaploid in vitro plants [J]. *Plant Tissue Culture Biotechnology*, 1998(4): 127-135
- [31] Hoekstra S, van Zijderveld M H, Heidekamp F, van der Mark F. Microspore culture of *Hordeum vulgare* L.: The influence of density and osmolality [J]. *Plant Cell Report*, 1993, 12(2): 661-665
- [32] Segui-Simarro J M, Nuez F. Pathways to double haploidy: Chromosome doubling during androgenesis [J]. *Cytogenet Genome Research*, 2008, 120(3/4): 358-369
- [33] Wu P H, Ren J J, Li L, Chen S J. Early spontaneous diploidization of maternal maize haploids generated by in vivo haploid induction [J]. *Euphytica*, 2014, 200(1): 127-138