

植物体细胞遗传 与作物改良

胡 含 陈 英 主编



北京大学出版社

植物体细胞遗传与作物改良

胡 含 陈 英 主编

北 京 大 学 出 版 社

植物体细胞遗传与作物改良

胡含 陈英主編

責任編輯：李蕙兰

北京大学出版社出版

（北京大学校内）

北京通县燕山印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

850×1168毫米 32开本 9.5印张 300千字 插图20

1988年8月第一版 1988年8月第一次印刷

印数：00001—3000册

ISBN7-301-00637-3/Q·015

定 价：3.70 元

前 言

自六十年代后期以来，由于一些重要作物相继通过细胞（小孢子、原生质体）培养被诱导成再生植株，植物细胞、组织培养已成为国际上最活跃的研究领域之一。在这一技术基础上应运产生的植物体细胞遗传学不仅大大扩大了高等植物的变异来源，并为从细胞水平到分子水平研究高等植物的遗传机理开辟了道路。细胞培养又是细胞工程、基因工程的重要基础。它的发展将为作物改良带来重大的革新。许多科学家为这一新兴领域的进展和前景感到很大的鼓舞，并积极投入到这项科学技术的研究、利用和开拓中来。

我国植物细胞、组织培养方面的研究起步不算晚，几位老一辈科学家早在四十年代就曾做出重要贡献。但在全中国形成一支较大的队伍是在七十年代、开始于花药培养的研究。在花药培养研究中有一鲜明特点，就是密切与作物改良相结合。目前国际上已有200余种植物通过花药培养获得再生植株，其中我国首先培育出来的有40余种，它们主要是粮食、油料、蔬菜、林木、果树等重要经济植物。其中小麦、玉米与烟草等的花药培养已开始在育种中发挥作用，水稻已有一批花培良种在生产上推广。林木果树的花药培养是一项更复杂，从一定意义上讲，也可能是会给这些植物的遗传育种带来更大价值的技术。我国在这方面也取得可喜的进展。其中橡胶、杨树的几个种、楸子与葡萄等已获得一批花粉植株。进一步研究、利用这些宝贵材料不仅会揭示多年生经济植物的遗传规律，也将为育种提供新的有效途径。已经开始将细胞培养技术用于重要作物的改良，这是我国这项研究的重要特点，为国际上所瞩目。

我国在原生质体培养与细胞杂交的研究方面，近10年来也奠定了良好的基础。除几种模式植物，如烟草、矮牵牛、胡萝卜等外，科学家在禾本科、豆科等植物的原生质体培养与植株再生方面也做出一些优秀的工作。在细胞杂交方面，通过原生质体融合已获得种内、种间和属间杂种，并将烟草瘤细胞的T-DNA转入杂种植株，为体细胞遗传和遗传操作研究的进一步开展打下基础。

细胞、组织培养是分离和诱导产生突变体的有效途径。这方面研究在我国虽然起步较晚，但最近在抗病、耐盐、抗氨基酸类似物的筛选上也取得一定进展。

围绕上述的研究，我国科学家在改进、提高细胞培养技术和有关基础研究方面，如细胞的去分化和再分化，花粉的雄核发育与形态发生、培养过程中的遗传稳定性和变异性、花粉植株的细胞学和遗传学，以及花药培养力的遗传等都做了不少工作。为花药培养单倍体育种的理论与实践积累了丰富的资料，为细胞培养技术进一步发展和利用打下了基础。

在这本书中我们对我国近十几年来的上述有关工作做了简要概述和评论。涉及的内容主要是我国科学家的工作。回顾是为了能够更好地前进。相信在未来的十几年中，也即二〇〇〇年前，我国科学家一定会在这个领域中做出更大的成绩，为国家工农业发展开拓出更多的应用途径，并做出应有的贡献。

胡 含 陈 英 1984.1.

目 录

前 言

第一章 小麦花药培养.....(1)

一、花粉单倍体与加倍单倍体的产生.....(2)

(一) 影响花粉植株诱导频率的因素

(二) 产生加倍单倍体——染色体加倍

二、花药培养在小麦遗传与育种中应用的可能性.....(11)

(一) 花粉植株的遗传(染色体)稳定性和变异性

(二) 隐性性状易于显现

(三) 花粉植株的多样性——配子类型在植株水平上的充分显现

三、花药培养在遗传与育种上的应用.....(19)

(一) 选育新品种

(二) 花粉植株的染色体工程

四、展望.....(23)

参考文献.....(24)

第二章 水稻花药及游离花粉粒培养.....(27)

一、离体条件下的雄核发育与形态发生.....(27)

(一) 雄核发育途径

(二) 花粉发育的活体显微电影观察

(三) 形态发生的两种途径与影响形态发生的因素

二、影响花粉植株诱导频率的因素.....(33)

(一) 花粉发育时期

(二) 花药培养前后不同物理、化学因素处理的作用

(三) 合成培养基

(四) 马铃薯培养基

(五) 花药液体漂浮培养

(六) 不同基因型水稻花药培养力的差异

(七) 供体植株的生长条件对花药培养生产力的影响

三、游离花粉粒培养.....(50)

四、花粉白苗问题.....(54)

(一) 培养基的影响

(二) 培养时期温度的影响

(三) 白化苗的细胞学和生理生化研究

五、结束语.....(58)

参考文献.....(60)

第三章 水稻花粉植株的遗传与作物改良.....(68)

一、花粉植株的倍性与单倍体加倍.....(68)

(一) 花粉植株的倍性

(二) 二倍体植株的来源

(三) 单倍体植株染色体加倍方法

二、花粉植株的遗传.....(74)

(一) 加倍单倍体的纯合性

(二) 培养过程中的变异

(三) 不同基因型小孢子再生植株的能力

(四) 花粉植株后代的分离及其原因

三、花药培养在水稻改良中的应用.....(85)

(一) 花药培养在育种上应用的特点

(二) 花药培养用于品种间杂交育种

(三) 花药培养在远缘杂交育种中的应用

(四) 诱变育种与突变体筛选

四、结束语.....(95)

参考文献.....(96)

第四章 玉米花药培养及其单倍体育种.....(102)

一、玉米花粉植株的诱导.....(102)

(一) 愈伤组织或胚状体的诱导

(二) 再生植株

(三) 花粉植株的移栽

(四) 花粉愈伤组织和植株的人工加倍

二、玉米花粉诱导物及其再生植株的遗传稳定性和变异性	(114)
(一) 花粉诱导物及其植株的遗传稳定性	
(二) 花粉植株的变异	
三、玉米花粉植株单倍体育种	(122)
(一) 缩短纯系选育世代	
(二) 花粉纯系的主要农艺性状表现	
(三) 纯系的生活力	
(四) 花粉纯系的配合力测定与杂交组合选配	
(五) 优良组合的产比、区域试验和试种	
四、结束语	(129)
参考文献	(129)
第五章 木本植物的花药培养	(135)
一、木本植物花药培养的成就	(135)
二、花药培养在树种改良中利用的可能性	(140)
三、诱导花粉植株的主要技术	(142)
(一) 培养基中的无机盐	
(二) 有机成分	
(三) 蔗糖	
(四) 激素	
(五) 培养温度及光照条件	
四、花药培养中的雄核发育	(150)
(一) 影响雄核发育的因素	
(二) 雄核发育途径	
(三) 雄核发育速度	
(四) 雄核发育与药壁细胞的关系	
五、花药培养中小植株的形态发生	(155)
(一) 胚状体及小植株形态发生的多样性	
(二) 胚状体器官原基分化的非同步性	
六、小植株的移栽与培育	(159)
七、花粉植株染色体数变化及染色体加倍	(160)
(一) 移栽前花粉植株的染色体数变异	

(二) 成活植株的染色体数变异	
(三) 染色体加倍	
八、展望	(165)
参考文献	(166)
第六章 花药培养中小孢子的雄核发育	(170)
一、雄核发育研究的概况和意义	(170)
二、小孢子的雄核发育	(171)
(一) 小孢子的雄核发育途径	
(二) 雄核发育的超微结构和细胞化学变化	
三、关于雄核发育的启动机理	(181)
(一) 雄核发育的预成性——二型性花粉	
(二) 细胞孤立化与启动雄核发育的关系	
(三) 温度对雄核发育的影响	
(四) 激素和生长素对去分化的影响	
四、花粉植株的形态建成	(187)
参考文献	(190)
第七章 大麦、小麦和芍药花粉胚胎发生及白化花粉植株的亚微结构	(195)
一、花粉在活体植株上的发育	(196)
(一) 正常花粉	
(二) 正常花粉群体中的异常花粉 (E花粉)	
二、离体条件下花粉的胚胎发生	(202)
(一) 孢子体途径的有丝分裂	
(二) 花粉胚胎发生的胞质特征	
(三) 花粉胚胎发生过程中细胞壁的形成方式	
(四) 离体条件下的花药壁	
三、白化花粉植株的亚微结构特征	(209)
(一) 白化植株的质体	
(二) 白化现象与花粉发育过程中质体发育动态的可能联系	
四、讨论和结论	(212)
参考文献	(214)

第八章 植物原生质体的培养和再生植株	(218)
一、原生质体的分离.....	(219)
(一) 材料来源	
(二) 分离方法	
二、原生质体的培养.....	(225)
(一) 培养基	
(二) 培养方法	
(三) 培养的环境条件	
三、原生质体的发育和再生植株.....	(231)
(一) 发育	
(二) 再生植株	
四、粮食作物原生质体的培养.....	(236)
五、结束语.....	(237)
参考文献.....	(238)
第九章 通过原生质体融合进行遗传重组	(243)
一、原生质体的选择.....	(244)
二、融合.....	(245)
(一) 诱导融合的方法	
(二) 融合体的形成	
三、融合体的发育.....	(248)
(一) 异核体的核融合和染色体行为	
(二) 亲缘关系对融合体发育的影响	
(三) 培养基对融合体发育的影响	
(四) 异胞质体的发育	
四、杂种细胞的选择.....	(251)
(一) 互补选择	
(二) 机械分离杂种细胞法	
五、体细胞杂种植株.....	(255)
(一) 种内杂种	
(二) 种间杂种	
(三) 属间杂种	

(四) 科间杂种细胞	
六、遗传重组	(257)
(一) 倍性	
(二) 双磷酸核酮糖羧化酶	
(三) 同工酶	
(四) 冠瘿瘤细胞标记转移	
(五) 胞质雄性不育的转移	
七、结束语	(262)
参考文献	(263)
第十章 高等植物细胞突变体的筛选与作物改良	(268)
一、细胞诱变与筛选的优越性	(268)
二、细胞突变体的筛选方法与判断标准	(269)
(一) 突变体的筛选方法	
(二) 突变体的判断标准	
三、筛选抗性突变体的研究概况	(271)
(一) 抗氨基酸及其类似物	
(二) 抗病	
(三) 抗除草剂和杀菌剂	
(四) 耐盐	
(五) 耐寒	
(六) 耐旱	
(七) 抗金属	
四、结束语	(285)
参考文献	(286)
图版 I—Ⅺ	(295)

第一章 小麦花药培养

胡 含

自从六十年代中期 Guha 和 Maheshwari 以毛叶曼陀罗 (*Datura innoxia*) 为材料通过花药离体培养直接获得单倍体胚状体以来, 国内、外学者对诱导花粉发育产生单倍体相当重视。这是因为获得大量单倍体对遗传学以及形态发生等研究和育种实践都有重要意义。

关于小麦属的花药培养, 最初日本 Fujii (1970) 曾培养了 6 个种的花药, 但仅在野生一粒小麦 (*Triticum aegilopoides*) 和野生二粒小麦 (*T. dicoccoides*) 上得到了花药愈伤组织, 而在普通小麦上没有取得成功。中国科学院遗传研究所 (1972) 欧阳俊闻等 (1973) 于 1971 年 4 月首次从小麦花药中培养出植株, 并证明其来源于花粉。当时绿苗诱导频率为千分之七 (1972)。

近十年来, 我国欧阳俊闻等 (1973, 1983)、朱至清等 (1975)、胡含等 (1979, 1982)、胡道芬等 (1983) 以及法国 J. de Buyser and Henry (1979, 1981)、Picard 等 (1973) 和美国 Schaeffer 等 (1979) 在小麦花药培养研究上作了大量的工作。首先, 在提高诱导花粉绿色植株频率上, 对影响花粉植株诱导频率的诸因素作了系统的研究, 改进了培养基和培养方法, 从而大大地提高了诱导小麦花粉绿苗的频率, 例如我们研究室从最初的千分之几, 提高到目前供试材料的平均诱导率为 5 % 左右。一般材料可达 10—30 %, 即每 100 个花药可诱导出绿苗 10—30 株, 而个别材料如西阿诺 (Ciano) 在合适的培养条件下可高达 50—70 % (1983)。与此同时, 曾君祉等 (1980), 潘景丽等 (1978)、王敬驹等

(1973)对小麦雄核发育研究、提高花粉植株诱导频率、以及植物细胞分化等实践与理论问题作了系统的探讨(参见第六章)。其次,我国的学者很重视将花药培养技术应用于育种工作,一些单位先后选育出一批花粉小麦新品种和新品系,在生产上已试种推广。法国和美国的学者们对于他们所获得的小麦花粉株系也正在进行评比和鉴定。第三,开展了花粉植株的遗传学、细胞遗传学研究。从理论上探讨了小麦再生植株能力的遗传特性,花粉植株的遗传稳定性和变异性以及在植株水平上进行配子分析问题。一方面为将花药培养技术直接应用于作物改良提供理论根据,同时也为植物体细胞遗传学和单倍体遗传学研究开辟新途径。

一、花粉单倍体与加倍单倍体的产生

(一)影响花粉植株诱导频率的因素

科学工作者在花药培养研究上积累了一些有价值的试验结果,花粉绿苗的诱导频率正在不断地提高,下述诸因素,对提高花粉植株诱导率具有重要作用。

1. 供体植株的基因型 花药供体植株的基因型对花药培养有明显的影 响。在我们早期的工作中(1973),即观察到不同材料(不同品种或不同杂交组合)在形成愈伤组织的种类和数量上有较大差异。近年来,欧阳俊闻等(1983)较系统地研究了花粉愈伤组织和花粉绿苗诱导频率的基因型差异的遗传基础。他们发现,杂种 F_1 花药培养的花粉愈伤组织和花粉绿苗的诱导频率在少数情况下居两亲本之间;在多数情况下都高于双亲,有的甚至成几倍以至几十倍地高于双亲,表现出强烈的杂种优势。例如小偃759和科冬58便是这样。凡是以小偃759或科冬58做为亲本之一的杂种 F_1 ,其花粉愈伤组织和花粉绿苗的诱导频率都远远高于两个亲本。从这些强优势组合如“京红5号 $\times$ 小偃759”的 F_1 花药培养得来的花粉株系再取花药做培养时,花粉愈伤组织和花粉

绿苗的诱导频率在各株系间发生非孟德尔式的分离，即有高于高频率亲本的，有居两亲本之间的，也有低于低频率亲本的。但不管怎样，它们一律都远低于杂种 F_1 ，即表现了杂种优势的消失。对两个组合（西阿诺×花培1号，卡捷敏×花培1号）的正反交 F_1 做了花药培养试验，两个组合的正交 F_1 的花粉愈伤组织和花粉绿苗的诱导频率都和反交 F_1 的大致相同。根据上述结果可以做如下分析：（1）花粉愈伤组织和花粉绿苗的诱导能力都是可遗传的性状。由于它们在 F_1 花粉产生的株系间的分离不遵循孟德尔规律，以及 F_1 花药培养有杂种优势的表现，再加上易受环境条件（如培养温度等）的影响而发生很大变动，因此可以认为，它们可能是多基因控制的数量性状；（2）正交 F_1 及反交 F_1 的诱导频率大致相同的事实表明，细胞质基因对诱导频率没有什么作用。Bullock, Baenziger 和 Schaeffer 等（1982）以三个杂交组合 F_1 的花药进行正反交试验，获得与上述试验相同的结果和结论。（3）诱导频率的杂种优势只存在于杂合态的杂种 F_1 ，在纯合态的花粉株系上就消失，这表明杂种优势的出现主要是药壁基因型的作用，而不是花粉基因型的作用，因为只有药壁是杂合的。

此外，供体植株基因型对诱导花粉愈伤组织和花粉绿苗频率的影响还表现在小麦品种的春、冬性上。一般说来，春性小麦品种诱导频率高于冬性小麦。表1-1是欧阳俊闻等1981年以三个春小麦品种和三个冬小麦品种为材料在相同培养条件下，即接种花药后在28℃条件下诱导花粉愈伤组织和花粉植株所得的结果，它们表明三个春小麦品种诱导花粉绿苗的频率分别为11.9%、20.9%和34.3%，而三个冬小麦品种的频率为2.2%、0.3%和1.3%，相差数十倍。

2. 供体植株的生理状态 供体植株的生理状态也明显地影响花粉愈伤组织的诱导和绿苗的再生。表1-2是我们以欧柔品种为材料，取主穗与分蘖穗花药接种，培养在相同条件下（24.℃）

的结果。表1-2表明取自主穗花药进行培养其花粉绿苗的诱导频率较取自分蘖穗的花药要高2.7倍。

表 1-1 春、冬性小麦不同基因型对诱导花粉愈伤组织频率的影响(1981)

基 因 型	接 种 花药数	花粉愈伤 组 织 数	诱导花粉 愈伤组织 频率(%)	愈伤组织 产生绿苗		愈伤组织 产生白苗		诱导绿苗 频率(%)
				数	%	数	%	
春小麦								
京红5号	251	127	50.5	30	23.5	59	46.5	11.9
Pitic 62	262	125	47.7	55	43.6	14	11.2	20.9
Ciano	267	137	51.3	92	66.9	10	7.3	34.4
冬小麦								
科冬58	312	62	19.9	7	11.3	13	20.3	2.2
农林10号	306	14	4.6	1	7.1	4	28.6	0.3
(50512× 78-5268)F ₁	223	29	13.0	3	10.3	7	23.1	1.3

表 1-2 供体植株生理状态不同诱导花粉植株的影响 (1981)

处 理	接种花药数	愈 伤 组 织		绿 苗	
		数	%	数	%
主 穗	1186	516	43.5	92	7.8
分 蘖 穗	1134	240	21.2	33	2.9

供试品种：欧柔

生长在大田条件下与温室条件下的供体植株因培养条件不同，它们所具有的生理条件也各异，进行花药培养时，诱导花粉愈伤组织和花粉绿苗的结果也不同。欧阳俊闻等1978—1980年所获得的结果表明（表1-3），在不同生育条件下四个小麦品种的花粉愈伤组织和花粉植株的诱导频率有明显差异。应该提出的

是，表1-3中所用Pitic 62与京红5号两个品种的花粉植株诱导率较表1-2中的结果有明显降低，这是因为表1-3诱导花粉愈伤组织的培养温度为25°C，低于欧阳俊闻等所测定的适宜培养温度26—30°C（1983），而表1-2试验的培养温度为28°C。但即使如此，表1-3结果仍表明取自大田的花药，虽然培养在较不适宜的温度条件下，但其花粉植株的诱导率仍高于温室中生长的供体花药，这进一步说明供体生理状态对诱导花粉愈伤组织和花粉植株频率的重要影响。

表 1-3 不同培养条件下供体植株生理状态不同对诱导花粉植株的影响（1978—1980）

材 料	不同培养 条 件	诱导愈伤 组织的温 度 (°C)	接种花 药 数	诱导花粉 愈伤组织 频率 (%)	愈伤组织 产生绿苗 (%)	愈伤组织 产生白苗 (%)	诱导绿 苗频率 (%)
Pitic 62	大 田 温 室	25°	218	25.7	35.7	25.0	9.2
		26°	244	11.9	3.4	31.0	0.4
花培1号	大 田 温 室	25°	252	7.5	10.5	10.5	0.7
		26°	306	6.2	5.3	10.5	0.3
京红5号	大 田 温 室	25°	288	6.9	25.0	25.0	1.7
		26°	302	5.6	5.9	4.2	0.3
小偃759	大 田 温 室	25°	288	23.0	16.2	44.1	3.0
		26°	315	41.0	2.3	41.9	1.0

3. 花粉发育时期 花粉发育时期是影响花药培养结果的重要因素。Sunderland和Wicks曾对烟草作过系统研究。近年来，何定钢等（1981）较精确地研究了小麦花粉发育过程的形态分期，确定各个发育时期花药对离体培养的反应。材料取自小麦花粉株系171-4-12及四个F₁杂种：烟台6590-720×农大139、山前麦×农大139、欧柔×小偃759和京红5号×小偃759，研究结果表明，除了花粉母细胞及减数分裂时期和三核期（成熟花粉）没有产出愈伤组织外，从四分体期到二核期经常是可以诱导的，但是并非每一花粉发育时期都可获得最好的诱导率。小麦与其它许

多植物一样，单核中期或单核晚期的小孢子时期接种，花粉愈伤组织的诱导频率最高（图1-1）。

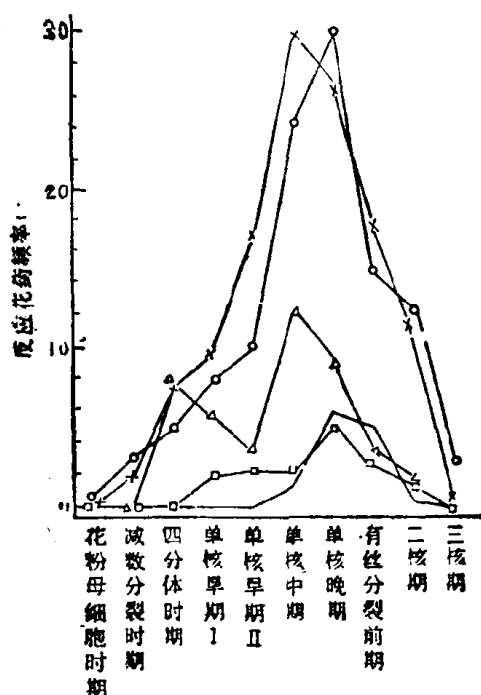


图1-1 不同花粉发育时期花药的诱导频率

$$\left(\frac{\text{反应花药}}{\text{接种花药}} \times 100\% \right)$$

4. 培养基 培养基是诱导花粉粒发育为花粉植株的主要环境因素，（见表1-4）。

（1）提高蔗糖浓度：在我们开始进行花药培养时，发现蔗糖浓度是诱导花粉植株的一个重要因素。当我们将蔗糖浓度从常用的3%提高到6%时，我们首次成功也获得了小麦花粉植株。蔗糖不仅能够调节培养基的渗透压，同时也是最有效的碳源，所以以后的研究工作者都注意蔗糖的浓度。目前已确定小麦花药培养最适宜的蔗糖浓度是9%。