



第二集

单倍体育种资料集

科学出版社

单倍体育种资料集

第二集

中国科学院植物研究所编译

科学出版社

1973

内 容 简 介

本书收集选译了 1970 至 1972 年间国内外有关单倍体育种的主要资料,书中介绍了国内一些单位在开展小麦、水稻、烟草和辣椒等单倍体育种工作方面的进展情况。全书内容包括水稻、小麦、小黑麦、粟、番茄、颠茄等十多种植物上应用花药培养和子房培养诱导单倍体的方法及试验结果。

本书可供育种工作者、有关科研人员、干部和高等院校师生参考。

单倍体育种资料集 第二集

中国科学院植物研究所编译

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1973 年 6 月第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1973 年 6 月第一次印刷 印张: 6 1/2 插页: 7

印数: 0001—13,200 字数: 158,000

统一书号: 13031·98

本社书号: 207·13—10

定 价: 0.95 元

目 录

小麦 <i>Triticum vulgare</i> 花粉植株的诱导及形态发生过程的研究	中国科学院植物研究所 单倍体育种协作组 黑龙江省农业科学实验所 (1)
小黑麦 (<i>Triticale</i>) 和辣椒 <i>Capsicum annuum</i> 花粉植株的诱导	中国科学院植物研究所形态学及细胞学研究室 (18)
从烟草花药培养单倍体植株及其染色体加倍的技术	中国农业科学院烟草研究所 单倍体育种协作组 中国科学院植物研究所 (26)
从水稻花药诱导植株的研究初报	黑龙江省牡丹江地区农业科学研究所 (39)
花药培养的进度报告	N. Sunderland (46)
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> 花粉粒中胚状体的形成	N. Sunderland, F. W. Wicks (73)
从花粉中获得单倍体植物	J. P. Nitsch and C. Nitsch (97)
从硫磺烟草 (<i>Sulfur tobacco</i>) 花药产生的绿和浅黄色单倍体幼苗	L. G. Burk (118)
从起源于花药的烟草单倍体叶片组织重组二倍体	M. J. Kasperbauer, G. B. Collins (120)
用组织培养技术产生纯合的二倍体植株	T. Kochhar, P. Sabharwal, J. Engelberg (130)
从花药培养的拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> 单倍体愈伤组织和植株	P. M. Gresshoff, C. H. Doy (134)
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> 单倍体的发育和分化	P. M. Gresshoff, C. H. Doy (142)

- 滋养培养在番茄单倍体无性系发育中的利用……………
 …………… W. R. Sharp, R. S. Raskin, H. E. Sommer (155)
- 从颠茄 *Atropa belladonna* 离体花粉粒产生单倍体植株
 …………… M. Zenkteler (161)
- 石刁柏 *Asparagus officinalis* 花药的离体培养……………
 …………… G. Pelletier, C. Raquin, G. Simon (164)
- 白花曼陀罗 *Datura metal* 和水稻花药培养中花粉胚状
 体和愈伤组织的个体发育早期及其后的器官发生
 …………… R. D. Iyer, S. K. Raina (171)
- 水稻配子细胞的全能潜在性和单倍体的产生……………
 S. Guha, R. D. Iyer, N. Gupta, M. S. Swaminathan (184)
- 小麦花药中愈伤组织的形成…………… T. Fujii (188)
- 从山羊草属 *Aegilops* 花药培养产生单倍体白化植株
 …………… M. Kimata, S. Sakamoto (190)
- 用花药培养育成粟的单倍体植株……………
 …………… 伴 義之・国分禎二・宮司佑三 (194)
- 黑麦草 *Lolium* 和大麦 *Hordeum* 花粉愈伤组织的离体
 发育…………… D. Clapham (203)
- 未受精的茄子 *Solanum melongena* 胚珠和玉米 *Zea*
mays 子房的离体培养 ……………
 …………… H. Uchimiya, T. Lameya, N. Takahashi (212)

小麦 *Triticum vulgare* 花粉植株的诱导 及形态发生过程的研究

中国科学院植物研究所 单倍体育种协作组
黑龙江省农业科学实验所

摘 要

采用离体培养小麦花药的方法,成功地诱导小麦花粉形成了单倍体植株。在附加 2—20 毫克/升的 2,4-D 和各种有机附加成分的 MS 培养基上,属于 27 个杂种或品种的 21094 个花药中有 103 个花药产生了愈伤组织。这些愈伤组织均着生在裂开的药室内,显微观察证明它们是由花粉经过多次细胞分裂形成的。愈伤组织转移在含有 0.2—2 毫克/升的萘乙酸(或吲哚乙酸)及 0.2—2 毫克/升的动力精(或 15% 椰乳)的 MS 培养基上培养 5 天以后即陆续分化出幼苗。此外,还发现接种在含有 20% 椰乳或者吲哚乙酸及动力精各 2 毫克/升的 MS 培养基上的花药直接从药室内产生出幼苗。已检查的 6 株幼苗的根尖细胞的染色体数均为 21,表明它们是单倍体。单倍体植株能够抽穗而不结实。

引 言

Guha 和 Maheshwari 在进行曼陀罗花药培养时,发现从花药中长出许多胚状体,进一步研究证明它们是从花粉发育成的幼小单倍体植物^[1,2]。这一发现揭示了被子植物的生殖细

胞和体细胞一样,具有发育成完整植物体的全部潜能,同时也为在实验条件下研究植物的细胞分化、胚胎发生和器官形成过程提供了一种有效的方法。不仅如此,这项研究在育种工作上还有着明显的应用价值。如果把杂种的花粉培养成单倍体植物,经过染色体加倍处理即成为不分离的纯合二倍体,这样就很容易获得纯系,从而显著缩短育种时间,并简化选育手续。由于上述两方面原因,近年来广泛开展了花粉培养的研究。到目前为止,已培养成功的植物种类除曼陀罗外,还有烟草^[3,4]、水稻^[5]、甘蓝^[6]、茶^[7]、紫鸭跖草^[8]、黑麦草^[9]、多花黑麦草和苇状羊茅的杂种^[10]、颠茄^[11]、粟^[12]、山羊草^[13]、石刁柏^[14]和百合^[15]等。

关于普通小麦 (*Triticum vulgare*) 的花粉培养,国外尚无成功的报道。Fujii^[16] 曾培养了小麦属的 6 个种的花药,仅在野生一粒小麦 (*T. 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。我们于 1971 年开始普通小麦花药培养的研究,已从杂种花药培养出单倍体植株,并正在利用它们进行单倍体育种工作。

一、材料和方法

材料和接种技术 供试的小麦包括春小麦的 43 个杂种(F_1 , F_2)和一个品种(新曙光一号)。采取花粉为单核靠边期(细胞核移到花粉边缘,细胞质较稀薄)或双核初期的花药进行培养。用醋酸洋红法涂片镜检确定花粉的发育时期。供接种用的麦穗在饱和的漂白粉溶液中浸泡消毒 10 分钟,经无菌水冲洗两遍,在无菌条件下取出花药接种于培养基上。接种后的花药放置在日夜温差变动于 17—28℃ 的室内进行培养,

不加人工光照。诱导愈伤组织分化幼苗时，白天在室内用日光灯和碘钨灯照明。

培养基 基本培养基采用稍加改动的 Murashige-Skoog 培养基(简称 MS 培养基)，它包含下列成分(毫克/升): NH_4NO_3 (1650), KNO_3 (1900), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (370), KH_2PO_4 (170), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (440), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (27.8), $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (37.3), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (22.3), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (8.6), H_3BO_3 (6.2), KI (0.83), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.025), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.25), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.025), 甘氨酸 (2.0), 盐酸硫胺素 (0.4), 盐酸吡哆素 (0.5), 肌醇 (100), 烟酸 (0.5), 蔗糖 (60000), 琼脂 (8000)。

为了研究培养基中的生长素和各种有机附加物对花药形成愈伤组织的影响,安排了下述几组试验:

(1) 2,4-D 浓度试验。在 MS 基本培养基中分别加入下列浓度的 2,4-D (毫克/升): 0.2, 2.0, 5.0, 10, 20。试验以杂种 F_2 (龙 69-124 $\times$ 70-653-2) 为材料,每一浓度处理接种 140 个花药。

(2) 各种有机附加物的影响。在含有 2 毫克/升 2,4-D 的 MS 培养基中分别添加下列有机附加物: 动力精、脱氧核糖核酸 (DNA) 碱水解物、核糖核酸 (RNA) 碱水解物、核糖核酸酸水解物、核苷酸、三磷酸腺苷 (ATP)、酵母浸出汁和蜂乳。DNA 碱水解物按 Hurst^[17] 的方法制备。RNA 碱水解物的制备参照 Bolanger 和 Montreuil^[18] 的方法而略有修改。RNA 酸水解物按 Vischer 和 Chargaff^[19] 的方法制备。每种附加物的每一浓度处理一般接种 200 个以上的花药。

(3) 蔗糖浓度试验。为研究培养基渗透压对花药愈伤组织形成的影响,配制了五种蔗糖浓度的培养基,浓度值分别为 1%, 3%, 6%, 9% 和 12%。各组处理均加有 2,4-D 2 毫克/升。试验以杂种 F_2 (龙 69-124 $\times$ 70-653-2) 为材料,每

组处理接种 130—140 个花药。

为诱导愈伤组织分化幼苗，在基本培养基中分别加入下列三种组合的附加成分：1. 吲哚乙酸和动力精；2. 萘乙酸和动力精；3. 萘乙酸和椰乳。调整各组合中两成分的比例进行了比较试验。

为探讨花粉不经过愈伤组织阶段直接形成幼苗的可能性，接种花药在下述两种培养基上：(1) MS 基本培养基附加 20% 椰乳；(2) MS 基本培养基附加吲哚乙酸和动力精各 2 毫克/升。蔗糖浓度均为 3%。

所有培养基 pH 均调整到 6.0，分装后在 15 磅压力下灭菌 15 分钟。

显微制片 用醋酸洋红涂片法和石蜡切片法观察花粉发育成愈伤组织的过程，为检查细胞染色体数，取幼苗根尖和茎尖，经 0.04% 的秋水仙素溶液处理 5 小时，用酒精-醋酸 (3:1) 固定 10 小时。固定的根尖和茎尖在浓盐酸-酒精 (1:1) 中离析 10 分钟，然后在一滴醋酸洋红中压片。石蜡切片用孚尔根反应或苏木精-PAS 反应染色。

二、結果和討論

1. 花粉愈伤组织的诱导 在接种后的数天内，花药由绿色变为淡黄色。培养 7 天后，在含有 2,4-D 的各组培养基上从一些花药的花丝断口处长出愈伤组织，它们显然是由二倍体的花丝组织产生的。花丝愈伤组织的特点是表面圆滑湿润，呈半透明状，生长较快，可以长大到直径 1 厘米左右，但转移培养后未见分化产生幼苗。

另一类愈伤组织是从药室内长出的，经显微观察确定它们是由花粉发育而形成的(见后)，我们称它为花粉愈伤组织。

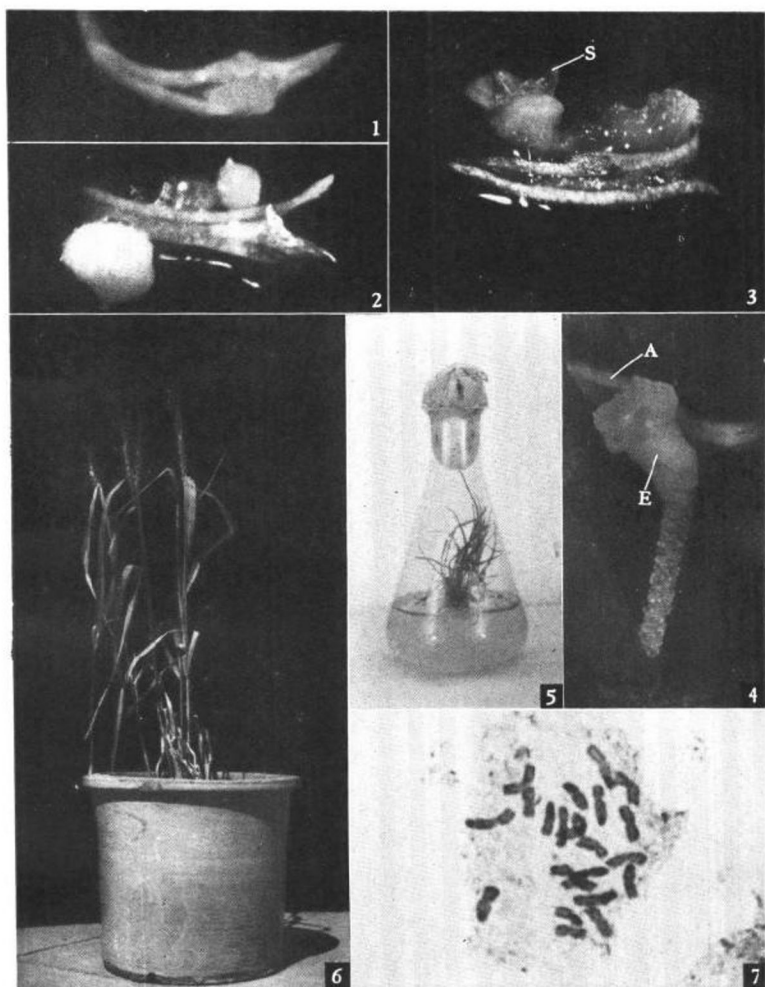


图 一

1. 培养 30 天的小麦花药,从裂开的药室中生长出愈伤组织;
2. 花药两侧的药室均产生愈伤组织;
3. 转移培养 6 天的花药愈伤组织,已分化出幼芽(S);
4. 在附加 20% 椰乳的 MS 培养基上,从花药(A)中长出的胚状体(E);
5. 从愈伤组织分化形成的单倍体幼苗;
6. 已抽穗的单倍体植株;
7. 单倍体植株根尖细胞的 21 个染色体。

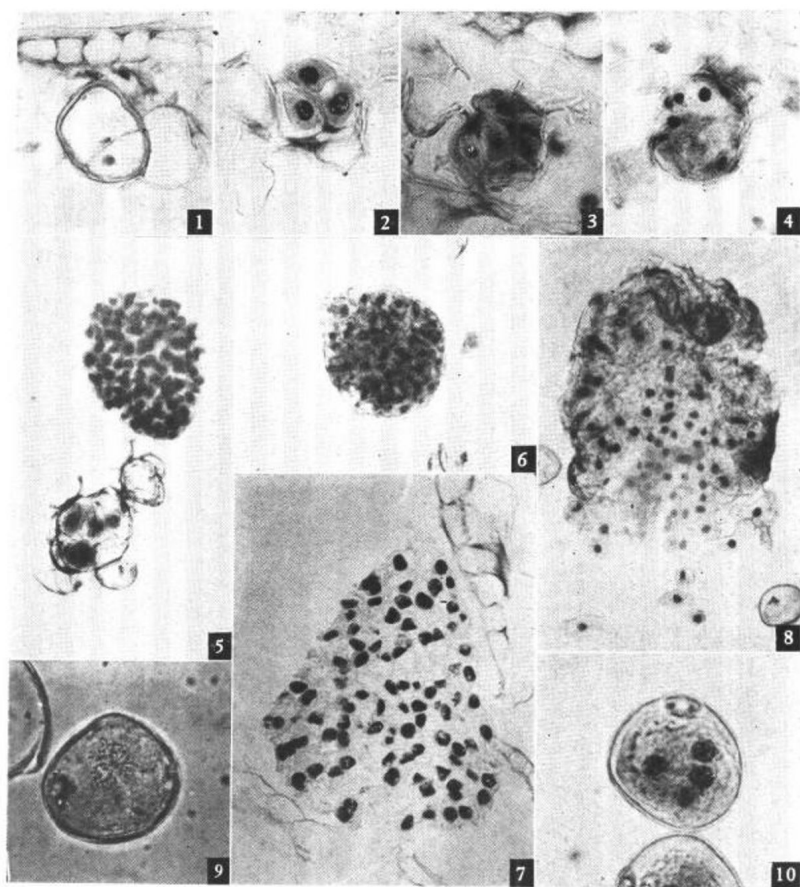


图 二

(1—4 和 7 为石蜡切片; 5—6 和 8—10 为醋酸洋红涂片)

1. 在培养的花药中由花粉形成的 2 细胞球, 胞间有细胞壁, 花粉壁仍保留;
- 2—4. 由花粉形成的多细胞球, 花粉壁仍保留;
5. 同一花药中的两个多细胞球, 一个由 5—6 个细胞组成 (下), 另一个已有很多细胞 (上);
- 6—7. 由很多细胞组成的多细胞球;
8. 由花粉形成的愈伤组织块, 具管状细胞;
9. 在培养 13 天的花药中的一个花粉, 一个核处于分裂中期, 另一核为退化状态;
10. 在培养的花药中的 4 核花粉。

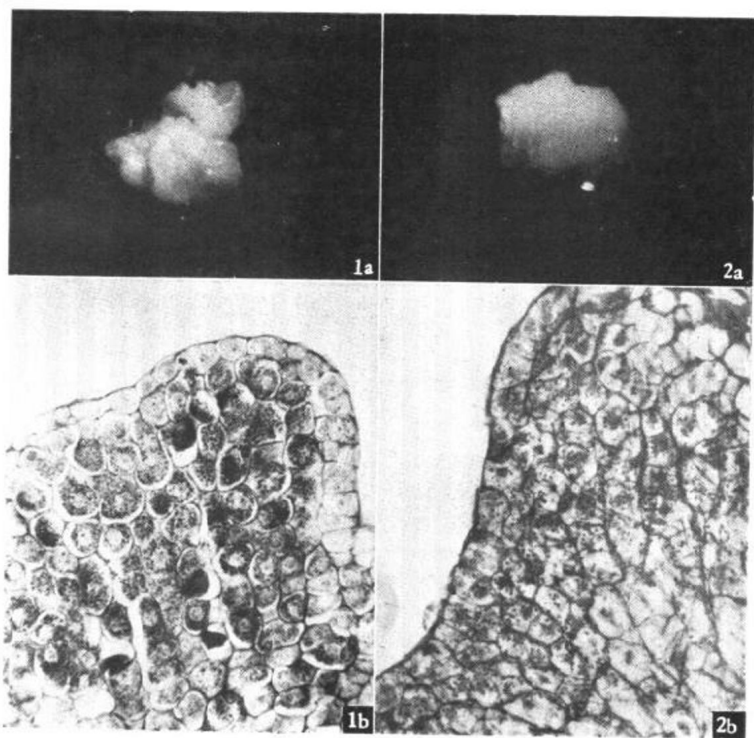


图 三

1. 易于分化的花粉愈伤组织 (1a) 及其切片 (1b), 愈伤组织表面富于皱褶, 细胞质内含有多量染色颗粒 (苏木精染色);
2. 不易分化的花粉愈伤组织 (2a) 及其切片 (2b), 愈伤组织表面光滑、较透明, 细胞质中含有多量淀粉粒 (PAS 反应染色)。

花粉愈伤组织在培养的第 15 天才开始出现,大量出现在培养后的 20—35 天,直到 60 天后还有发生。花粉愈伤组织一般发生于花药的一侧,有时两侧的药室都有(图一·2)。愈伤组织通常着生在裂开的药室内部(图一·1),有时在着生处用肉眼观察不到药室有明显的裂口,但在解剖镜下仍可看到愈伤组织是从药室的裂缝中长出。花粉愈伤组织呈淡黄色、球状、质地较致密,转移培养后易分化形成幼苗。

将花丝愈伤组织除外,统计了花粉愈伤组织出现的频率。供试的 44 个杂种和品种中有 17 个杂种的花药在各种培养基上均未形成花粉愈伤组织,其余 26 个杂种和 1 个品种的 21094 个花药共产生了 103 个花粉愈伤组织,总的出现频率为 0.49%。在一个最好的试验组合中,花粉愈伤组织的出现率达到了 6.43%(见表 1)。

表 1 2,4-D 浓度对小麦花药产生愈伤组织的影响

基本培养基为 MS 培养基,材料为 F_2 (龙 69-124 $\times$ 70-653-2),
接种花药主要为花粉单核靠边期。

2,4-D 浓度 (毫克/升)	接种花药数	愈伤组织数	百分数(%)
0.2	140	0	0
2.0	140	3	2.14
5.0	140	4	2.86
10	140	1	0.71
20	140	9	6.43

对全部试验结果进行的分析表明,花粉愈伤组织出现的频率因培养基成分和供试小麦的品种或杂种组合的不同而表现出明显的差异。

(1) 2,4-D 浓度的影响 从表 1 可以看出,当培养基中的 2,4-D 浓度为 0.2 毫克/升时,花药不形成花粉愈伤组织。

从 2 毫克/升起,随着 2,4-D 浓度的提高,花粉愈伤组织出现率有增高的趋势。到浓度为 20 毫克/升时达到 6.43%。一个例外的情况是在浓度为 10 毫克/升的一组试验中频率下降了,我们分析这可能是其他因素影响的结果。在本实验中最难准确掌握的因素是接种花药的花粉发育时期,花粉发育期的不同往往给实验结果带来误差。总的说来,培养基中 2,4-D 浓度保持在 2—20 毫克/升的范围内是适当的。

(2) 各种有机附加物的影响 在含有 2 毫克/升 2,4-D 的前提下,向培养基中分别添加 8 种有机附加物的比较试验结果表明,动力精对于花粉愈伤组织的形成产生明显的促进作用。从表 2 可以看出,在所有添加动力精的培养基上都产生了花粉愈伤组织,其出现频率比对照(有 2,4-D 而无有机附加物)高 1—2 倍。特别值得提出的是在含有动力精的培养基上花药的形态变化。大约在接种后的 10 天,所有花药的花丝断口连同一部分药隔组织都逐渐变成黑褐色,而且从未产生过花丝愈伤组织。相反地药室却一直保持着新鲜状态。这样,动力精不但促进了花粉愈伤组织的形成,而且有效地抑制了花丝愈伤组织的发生。可以认为,在现有实验水平上,添加 2,4-D (2—20 毫克/升)和动力精 (1.5—3.3 毫克/升)的 MS 培养基是一种较好的诱导小麦花粉形成愈伤组织的培养基。

在附加脱氧核糖核酸碱水解物、核糖核酸碱水解物及核糖核酸酸水解物的培养基上得到了较多的花粉愈伤组织,在其中的某些浓度处理组合中,花粉愈伤组织出现率高于对照,但随着水解物浓度的增高并未发生规律性的变化。其余 4 种附加物对花粉愈伤组织形成未表现明显的促进作用。

(3) 蔗糖浓度的影响 从表 3 列出的结果看,似乎在 1—12% 的范围内变动蔗糖浓度,对花粉愈伤组织的出现无明显作用。但由于本实验接种花药数量较少,从现有数据还不

表 2 有机附加物对小麦花药产生愈伤组织的影响

基本培养基为 MS 培养基添加 2,4-D 2 毫克/升, 蔗糖为 6%。每一浓度处理所接种的花药取自三个以上品种,花药中的花粉主要为单核靠边期。

有机附加物(毫克/升)		接种花药数	愈伤组织数	百分数(%)
—		1875	6	0.32
动力精	(0.4)	411	3	0.73
”	(1.5)	100	1	1.00
”	(2.0)	1045	8	0.77
”	(3.3)	1570	17	1.08
DNA 碱解物	(1.0)	330	3	0.91
”	(15)	300	0	0
”	(30)	250	1	0.40
”	(45)	260	1	0.38
”	(60)	270	1	0.37
RNA 碱解物	(1.0)	680	2	0.29
”	(15)	630	1	0.16
”	(30)	542	1	0.19
”	(45)	900	7	0.77
”	(60)	848	0	0
RNA 酸碱物	(1.0)	610	1	0.16
”	(15)	570	3	0.53
”	(30)	510	2	0.39
”	(45)	440	0	0
”	(60)	450	1	0.22
核苷酸	(20)	320	0	0
”	(40)	313	0	0
”	(60)	320	0	0
”	(80)	260	0	0
”	(40)*	310	2	0.65
ATP	(10)	230	0	0
”	(30)	380	0	0
”	(50)	240	1	0.42
”	(70)	320	0	0
”	(90)	320	0	0
酵母浸出汁	(0.2)	220	1	0.45
”	(1.0)	342	0	0
”	(1.8)	174	1	0.57
”	(2.6)	266	0	0
蜂 乳	(0.6)	430	2	0.47
”	(1.3)	490	0	0
”	(2.0)	480	1	0.21
”	(2.6)	370	0	0

* 基本培养基中肌醇减至 1 毫克/升。

能对此问题作出结论。

(4) 品种差异性 花粉愈伤组织的出现频率因小麦的品种或杂种组合不同而表现很大差异。前面已经提到,在供试的 44 个杂种和品种中,有 17 个杂种从未产生过花粉愈伤组织。但有些杂种,如 F_2 (龙 69-124 $\times$ 70-653-2) 却在许多种培养基上都形成较多的愈伤组织 (见表 1、3)。

表 3 蔗糖浓度对小麦花药产生愈伤组织的影响

培养基为 MS 基本培养基添加 2,4-D 2 毫克/升,材料为 F_2 (龙 69-124 $\times$ 70-653-2),接种花药主要为花粉单核边靠期。

蔗糖浓度(%)	接种花药数	愈伤组织数	百分数(%)
1	140	1	0.71
3	140	1	0.71
6	140	1	0.71
9	130	1	0.77
12	130	1	0.77

为了比较品种的差异性,在三种诱导花粉愈伤组织效果较好的培养基上,分别接种了不同杂种的花药。表 4 列出了部分试验结果。在每一种培养基上供试杂种均表现为三种类型:第一类产生较多的愈伤组织,如 F_2 (新一 $\times$ 8189)、 F_2 (浙 908 $\times$ 01-4) 和 F_2 (龙 71-279 $\times$ 青 3013); 第二类偶见愈伤组织,如 F_1 (墨巴 66 $\times$ 东农 101)、 F_2 (小偃 967 $\times$ 龙 70-65) 和 F_2 (龙 71-279 $\times$ 华东 6 号); 第三类未产生愈伤组织,如 F_2 (京红一号 $\times$ 小偃 759)、 F_2 (02 $\times$ 1512)、 F_1 (东农 101 $\times$ 墨巴 65) 和 F_2 (新一 $\times$ 毛阿夫),其中最典型的是 F_2 (新一 $\times$ 毛阿夫),在三种培养基上共接种了该杂种的 1715 个花药而未获得一个花粉愈伤组织。从上述结果来看,花粉培养的成功率在很大程度上取决于试验所用的品种或杂种组合。

不同品种(或杂种)花粉培养成功率表现巨大的差异性可能有两方面原因：一方面不同品种的小麦的花粉形成愈伤组织的能力可能存在着差异性；另一方面可能是某些品种的花药对培养条件有特殊的要求，而这些条件我们现在还未认识到。今后有必要对小麦花粉单性发育的内因和外因作进一步的研究。

表 4 不同杂种组合的花药形成愈伤组织能力的差异

接种花药的发育期主要为花粉单核靠边期

培养基	杂 种 组 合	接种花药数	愈伤组织数	百分数(%)
I*	F ₂ (新一 × 8189)	248	8	3.23
	F ₁ (墨巴 66 × 东农 101)	310	1	0.32
	F ₂ (京红一号 × 小偃 759)	220	0	0
	F ₂ (新一 × 毛阿夫)	520	0	0
II*	F ₂ (浙 908 × 01-4)	255	5	1.96
	F ₂ (小偃 976 × 龙 70-65)	210	1	0.48
	F ₂ (02 × 1512)	180	0	0
	F ₂ (新一 × 毛阿夫)	545	0	0
III*	F ₂ (龙 71-279 × 青 3013)	340	4	1.18
	F ₂ (龙 71-279 × 华东六号)	540	1	0.19
	F ₁ (东农 101 × 墨巴 65)	360	0	0
	F ₂ (新一 × 毛阿夫)	650	0	0

* 培养基 I: MS 基本培养基附加 2,4-D 2 毫克/升、动力精 3.3 毫克/升；

培养基 II: MS 基本培养基附加 2,4-D 2 毫克/升、动力精 2 毫克/升；

培养基 III: MS 基本培养基附加 2,4-D 2 毫克/升、DNA 碱解物 1 毫克/升。

2. 花粉形成愈伤组织的形态学过程

为了确定从花药中产生的愈伤组织的来源，于接种后间隔一定时期采取培养的花药制片观察。在所有制片中从未发现过药壁增生形成愈伤组织的现象，然而在某些制片中看到了游离在药室中的多细胞团块(图二·1—5)，被观察到的最小的多细胞团块由 2—3