



单倍体育种 浅 说

陕西人民出版社

单倍体育种浅说

西北植物研究所遗传室花药培养组 编

陕西人民出版社

单倍体育种浅说

西北植物研究所遗传室花药培养组 编

陕西人民出版社出版

陕西省新华书店发行 西安新华印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张1.75 插页 2 字数 28,000

1978年1月第1版 1978年1月第1次印刷

统一书号: 16094·76 定价: 0.20元

前 言

单倍体育种，是一项有效地克服杂种后代性状分离，缩短育种时间，提高选择效率的育种新技术。这一新技术的研究和应用是在我国无产阶级文化大革命运动的推动下开展起来的。我国有关专业研究单位和广大科技人员遵照伟大领袖和导师毛主席关于“有了优良品种，即不增加劳动力、肥料，也可获得较多的收成”的教导，自一九七〇年开展研究工作以来，坚持批判刘少奇、林彪及王、张、江、姚“四人帮”的反革命修正主义科研路线，坚持科研为无产阶级政治服务，为工农兵服务，与生产劳动相结合，大搞群众运动，短期内取得了显著成果，并将单倍体育种的研究推向一个新的阶段。当前一个群众性的单倍体育种实验活动正在全国蓬勃发展，新的研究成果不断出现，形势一派大好。为了配合农业学大寨，普及大寨县的群众运动和社队贫下中农科技队伍、知识青年开展单倍体育种科学实验的需要，我们编写了《单倍体育种浅说》一书，供从事这项工作的同志参考。

由于我们实践知识浅薄和水平所限，书中如有不妥或错误之处，诚希读者提出批评指正意见。

编 者

一九七六年十一月

目 录

一、花粉单倍体育种法的发展及其意义…………… (1)

(一) 花粉单倍体植物的发现及其研究工作的进展 …………… (1)

(二) 单倍体植物和单倍体育种的概念…………… (3)

1. 什么是单倍体植物…………… (3)

2. 什么是单倍体育种…………… (4)

(三) 获得单倍体植物的途径…………… (4)

1. 孤雌生殖…………… (5)

2. 孤雄生殖…………… (5)

3. 无配子生殖…………… (5)

(四) 单倍体植物在育种工作中的用途…………… (6)

1. 克服杂种性状分离, 缩短育种时间…………… (6)

2. 快速获得自交系…………… (8)

3. 有利于远缘杂种新类型的培育和稳定…………… (8)

4. 单倍体植物与诱变育种相结合可加速诱变育种的进程 …………… (9)

二、诱导培养单倍体植物的一般过程…………… (10)

(一) 花粉细胞单性发育成植株的生物学基础…………… (10)

1. 世代交替…………… (10)

2. 植物细胞的“全能性”	(10)
(二) 由花粉培养单倍体植物的程序	(11)
1. 诱导花粉细胞分裂增殖形成愈伤组织	(11)
2. 诱导愈伤组织分化幼苗	(20)
3. 促使花粉幼苗健壮成长	(22)
三、培养花粉单倍体植株的主要技术环节	(23)
(一) 培养基的组成与配制	(23)
1. 培养基的组成	(23)
2. 培养基的配制	(25)
(二) 花药的接种与培养	(29)
1. 接种用具的准备与灭菌	(29)
2. 花粉发育时期的鉴定	(29)
3. 接种材料(花药)的灭菌	(30)
4. 接种与培养	(30)
(三) 愈伤组织的检查与转移	(31)
(四) 花粉植株幼苗的培植	(31)
1. 小麦花粉植株的越冬	(31)
2. 小麦、烟草、水稻花粉植株的培植要点	(33)
四、花粉单倍体植物的染色体加倍	(35)
(一) 单倍体的鉴定——根尖细胞染色体数的检查	(35)
(二) 染色体加倍的方法	(36)
1. 化学药剂处理	(36)

2. 物理因素处理促使染色体自然加倍	(37)
3. 利用单倍体体细胞的组织培养进行染色体加倍	(38)
五、花药培养工作中存在的主要问题	(39)
(一) 进一步提高花粉育株的成功率	(39)
(二) 简化培养基和培养程序	(39)
(三) 研究白化苗的成因及解决办法	(40)
(四) 染色体加倍问题	(40)

附 录

一、术语注释	(41)
二、化学试剂的纯度和称量	(44)
三、几种药品的配制方法	(44)
四、试剂的微量浓度的表示法	(44)
五、铬酸洗涤液的配制	(45)
六、几种基本培养基成分	(45)

一、花粉单倍体育种法的发展及其意义

(一) 花粉单倍体植物的发现及其研究工作进展

早在六十年代以前，有人就提出过利用单倍体植物进行育种的设想，但因没有找到大量获得单倍体植物的方法而未能实现。一九六四年，印度人古哈和马赫胥瓦里发现从离体培养的毛茛属植物的花药中生长出胚状体，一九六六年进一步研究确定这些胚状体是来源于花粉的单倍体植物。古哈等人的这一发现报导之后，很快引起了许多国家（日本、印度、丹麦、西德、法国、英国、美国、加拿大、苏联）育种工作者的高度重视，并相继开展了研究工作。一九六九——一九七四年先后在意大利、加拿大召开的国际植物组织培养会议上，花药培养被列为重要的议题进行讨论。截至目前，约有三十余种植物成功地得到了花粉单倍体植株。但国外的工作现在仍然停留在花药培养技术中一些理论问题的实验研究阶段，尚未应用于育种实践和农业生产。

我国科技人员在毛主席革命路线指引下，在文化大革命运动的推动下，从一九七〇年开展花药培养研究工作以来，

走与工农相结合的道路，大搞群众运动，短短几年时间，就取得了显著成果。除首次诱导出小麦、小黑麦、小冰麦、油菜、玉米、辣椒、茄子等多种植物的花粉植株外，用单倍体育种法培育出的烟草新品种“单育一号”已于一九七四年推广种植；一九七五年又培育出“花育一号”、“花育二号”、“单丰一号”、“杜花一号”、“单粳一号”等水稻新品种；在小麦上也选育出春性品种“花培一号”，许多单位和地区培育出不少小麦新品系，现正进行品比鉴定，即将应用于生产。

此外，花药培养技术也有很大进展，单倍体育种控制性状分离的效果基本肯定，花粉育株的成功率有显著提高，如小麦由1%以下提高到13%以上。中国科学院北京植物研究所通过对于培养基基本成分的革新，建立了一种效果好的水稻花药培养基——氮6(N₆)培养基，在这种培养基上，根据二十个水稻杂种花药培养试验结果计算，花粉愈伤组织的平均诱导率达16.29%，比米勒培养基的平均诱导率3.39%提高四点八倍。中国科学院遗传研究所研究改进的简化培养基，即马铃薯培养基，诱导小麦花粉愈伤组织和绿苗的频率比对照提高四、五倍，最高的可达十七倍。马铃薯培养基应用于水稻的花药培养，诱导绿苗的频率一般高于或接近人工合成培养基。尤其许多四级农业科技网，在缺乏仪器、药品的情況下，破除迷信，解放思想，因陋就简，土法上马，大胆革新，取得了令人鼓舞的成绩。如江西省黎川县农科所用适宜的井水代替蒸馏水，用普通白沙糖代替试剂蔗糖，培养出了许多水稻绿苗；河南偃师县大口公社肖村大队科研站，用通风土

窑代替用空气调节器控制温度的培养室，使小麦花粉植株安全地渡过了高温季节。这对进一步简化培养手续，推动单倍体育种的群众性的科学实验活动，有很大的现实意义。我们对于小麦单倍体植株的染色体加倍，采用低温处理法（详见“染色体加倍”部分）也收到良好效果。

目前，一个群众性的单倍体育种的科学实验活动正在全国各地普遍开展，如北京、天津、湖北、山东、河南、上海等省、市的许多县、社、队，开展花药培养都获得良好成绩。我省单倍体育种工作开展得虽晚，但发展较快，目前有十多个单位开展花药培养工作，如宝鸡县宁王公社联合大队和大荔县朝邑公社新关大队科研站、凤县农技站、宝鸡市农科所等单位，在小麦花药培养中取得了可喜成绩；黄陵县仓村公社农技站首次培养早稻花药，也成功地得到了花粉愈伤组织和绿苗。现在，我国花药培养研究工作在应用方面已赶上和超过国际先进水平。这充分体现了我国社会主义制度的无比优越性，它是科研工作为无产阶级政治服务，为工农兵服务，与生产劳动相结合的结果，是无产阶级文化大革命以来在科技战线上所取得的丰硕成果，是毛主席革命路线的伟大胜利。

（二）单倍体植物和单倍体育种的概念

1. 什么是单倍体植物

每一种植物都是由细胞构成的。当细胞分裂时可以看见一些粒状或棒状小体，由于这些小体能被一些染色剂如醋酸

洋红等染色,所以又把这些小体叫做“染色体”。实验证明,染色体是主要的遗传物质基础。每一种植物都有其一定的染色体数目,如小麦为42条,水稻24条,玉米20条,烟草48条,茄子、辣椒为24条等等。

通常能开花结实的植物体,是由精核和卵细胞通过受精作用形成结合子发育成胚,再由胚发育成植物体,这种植物的细胞内含有两套染色体,一套来自父本的花粉细胞,另一套来自母本的卵细胞,因此又称它们为“二倍体植物”。植物的雌雄生殖细胞在发育过程中经“减数分裂”(即染色体减半的细胞分裂),其染色体变为体细胞的一半,因此,两性生殖细胞不经受精结合过程,而由单性细胞(雌性或雄性细胞)发育成的植物体,因细胞中缺少一个亲本的一套染色体,所以称“单倍体植物”。

2. 什么是单倍体育种

单倍体育种就是人工培养植物的花药,使花药中经过减数分裂后形成的花粉细胞发育成单倍体植物,其染色体经加倍处理再变成“纯合”^{〔1〕}二倍体植物,从中选择优良植株,经品比鉴定试验后,如符合育种目标即成新品种。这种育种方法称为“单倍体育种法”。

(三) 获得单倍体植物的途径

自然界产生单倍体植株的方式大致有以下几种:

注:书中出现右上角挂注释号的专业术语,均见附录一中的术语注释。

1. 孤雌生殖

由未受精的卵细胞发育而成。

2. 孤雄生殖

由未与卵细胞结合的雄性细胞(花粉)发育而成。

3. 无配子生殖

由植物胚囊中的“助细胞”或“反足细胞”发育而成(植物胚囊是由大孢子母细胞经过减数分裂后形成的,因此,这些细胞的染色体数也是单倍的)(如图1)。

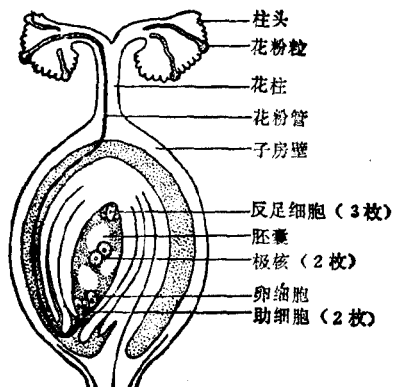


图1 典型的植物雌性器官(雌蕊)结构纵切面模式

在自然界中,人们曾发现许多种植物能产生单倍体,如玉米常有单倍体发生,柑桔类植物种子内往往有多胚现象,其中有的胚就是由未受精的卵细胞发生的。但是自然界中出现单倍体的频率很低,约为0.002—0.02%,根本不能满足育种工作的需要,因此,人们又要采用人工诱发的途径,即人为地利用一定的物理、化学和生物的因素,影响植物体的某种器官和组织,使其细胞繁殖过程脱离常规,从而发育成单倍体植物,如用药物2,4—二氯苯氧乙酸(2,4—D)、“920”(赤霉素)、秋水仙碱等处理雌蕊柱头,用辐射处理的花粉授粉都

能产生单倍体，但频率都很低。近年来，通过花药培养可以获得较多的单倍体植株，这是单倍体育种中的一个突破，因此，目前将这种方法作为一种新的快速育种法被广泛应用。

（四）单倍体植物在育种工作中的用途

单倍体植物只开花不结籽，不能直接应用于育种，但它有一个很大的特点，就是染色体加倍后即成“纯合”的二倍体或“纯系”^{〔2〕}，在育种上就有着重要意义：

1. 克服杂种性状分离，缩短育种时间

一般常规杂交育种，由于后代有一个分离过程，要获得性状稳定的品系或新品种，往往需要四、五代或更长的时间，如采用单倍体育种法，从 F_1 （杂种第一代）的花粉培养成单倍体植株，繁殖一代即可成为稳定的株系或品系，经过品比鉴定试验，表现优良，即可繁殖推广种植。这就显著地缩短了育种年限，加快了育种速度。为了便于说明问题，以杂交后两对遗传因子（“基因”）^{〔3〕}分离的图解与单倍体育种作一比较（如图2）。

假定用于杂交的母本普通小麦向阳4号具有两个分别受一对基因控制的性状：大穗（AA）、感病（bb）；父本小偃759也具有两个分别受一对相应的“等位基因”^{〔4〕}控制的性状：小穗（aa）、抗病（BB）。通过杂交希望从后代中得到具有基因型大穗抗病（即AABB）新品种。杂交时，母本植物经减数分裂产生的卵细胞的基因型是Ab，父本植物经减数分裂产生的精子的基因型是aB。因此，杂交后得到的杂

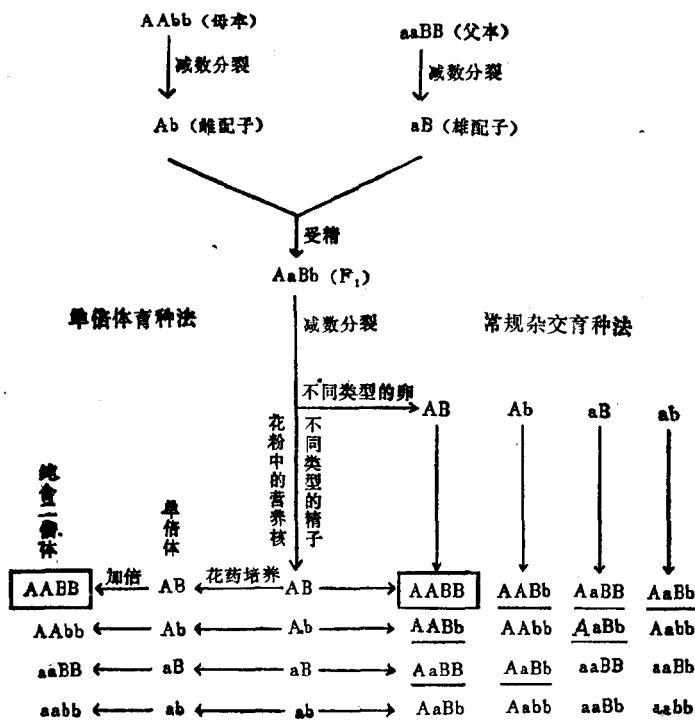


图2 常规杂交育种法和单倍体育种法遗传模式图解

种第一代 (F₁) 的基因型将是 AaBb。这些 F₁ 的植株由于基因型都是一样的，所以性状整齐一致。F₁ 植株性细胞在减数分裂过程中发生基因的重新组合，结果产生 AB、Ab、aB、ab 四种基因型的精子和卵细胞，常规杂交育种时，通过正常的受精过程，四种类型的精子和卵细胞自由结合产生十六种基因型的杂种 (F₂)，这就是所谓遗传型的分离。但杂种的表

现型并不是十六种,因“隐性基因”(a、b)^[5]与“显性基因”(A、B)结合在一起时,隐性基因被显性基因所掩盖,而只表现显性基因的特征,如 AaBb、AABb、AaBB 等均与 AABB 表现一样,所以十六种基因型表现为四种表现型,这四种表现型的比例是:大穗抗病占 9/16,大穗感病占 3/16,小穗抗病占 3/16,小穗感病占 1/16(即通常所谓的9:3:3:1之比)。图中的九种大穗抗病类型中,我们所需要的只是其中的一种,即 AABB 纯结合杂种。选择效率为 1/16。但在 F₂中因无法把它区别出来,只好把它们都留下,到后代再去分离选择,因此,花费劳力时间较长,占地面积较大。如果通过花粉培养和染色体加倍,同时得到 AABB、AABb、aaBB 和 aabb 四种基因型的纯合二倍体植株,其性状均具不同特征,从中即可直接选出需要的大穗、抗病而且后代不再分离的 AABB 植株,选择效率为 1/4。显然单倍体育种和常规杂交育种相比,不但缩短了年限,而且提高了选择效率,从而加快了育种进程。

2. 快速获得自交系

在玉米等作物杂交优势的利用中,很多农业生产单位已成功地利用自交系来配制一代杂种,使产量比一般品种提高 25—30%。配制杂种玉米必须首先提供玉米自交系,而自交系的选育(人工多代连续自花授粉)需花费大量的时间和人力,手续繁杂,如能用单倍体植株加倍获得的纯合二倍体,就是标准的自交系,一年就可获得许多自交系。近来这项培养技术的研究有很大进展,不久将会应用于育种实践。

3. 有利于远缘杂种新类型的培育和稳定

远缘杂交即指亲缘关系较远的不同种、属植物间的杂交，如不同小麦品种之间的杂交、小麦与黑麦、小麦与偃麦草的杂交等。在远缘杂交中常常出现大量不稳定的“非整倍体”杂种^[6]，如普通小麦与偃麦草的杂交后代中，就常出现比普通小麦多一、两个“单价体”^[7]（即偃麦草染色体）的不稳定非整倍体杂种，如果任其自交或天然杂交分离，则多余的偃麦草染色体却常因找不到相同的对应染色体而被丢失。如果通过单倍体培养，首先得到比普通小麦多一、两个偃麦草染色体的单倍体植物，然后再进行人工加倍，使之成为纯合二倍体，就有可能很快地得到比普通小麦多一、两对偃麦草染色体的稳定的非整倍体小麦新类型——“异附加系”^[8]，以及其他类似的远缘杂种新类型。

4. 单倍体植物与诱变育种相结合可加速诱变育种的进程

通常辐射育种和化学诱变育种只能得到频率较低的变异个体。因为经诱变引起新的“突变基因”^[9]常呈隐性状态，所以易被显性基因抑制或掩盖，在当代表现不出来，结果许多有益的变异可能被淘汰掉。但如用单倍体植物、花粉愈伤组织或接种前的花粉作材料，进行诱变处理，因它们只有一套染色体，不受显、隐性的干扰，突变基因当代就可表现出性状的变异。好的单倍体突变个体选出后，经过加倍即成纯系，就可用于选种。这是一种快速简便的诱变育种新方法。

由此可见，单倍体植物在育种上的用途是相当广泛的，是加速作物育种进程，提高选择质量和效率的新方法。同时，在遗传理论的研究方面也有重要意义。

二、诱导培养单倍体植物的一般过程

(一) 花粉细胞单性发育成植株的生物学基础

植物的雄性细胞（花粉）不经过受精作用，能够单性发育成完整的植株，是因为植物界存在着基本的生物学特性。

1. 世代交替

在植物的生活史中有两种生殖方式：无性生殖和有性生殖。这两种生殖方式相互更换，叫做世代交替。就植物的进化过程来看，随着植物的进化，世代交替的形式发生了变化，如低等植物（藻菌类），其配子体能独立生活、繁殖，孢子体不发达；羊齿植物（苔藓、蕨类）的配子体和孢子体都能独立生活；到了种子植物，它们的有性世代（单倍体时期）则成极度“特化”的不能独立生活的生殖细胞雄配子体（花粉）和雌配子体（胚囊），但它们仍具有细胞分裂和分化能力的多细胞结构。这就是花粉人工培养能够发育为单倍体植株的“内在因素”，也是植物界固有的生物学特性。

2. 植物细胞的“全能性”

从植物的繁殖特点来看，植物体的任何器官、组织甚至一个细胞，都有产生完整个体的潜在能力，这叫作植物细胞