



第一集

单倍体育种资料集

中国科学院植物研究所

科学出版社

7-53

单倍体育种资料集

第一集

中国科学院植物研究所编译

科学出版社

1972

内 容 简 介

本书共收集选译了二十二篇国内外有关单倍体育种资料。第一篇,综合国内外资料概括地介绍了单倍体育种的原理和方法;其余选译的 21 篇国外资料,反映了 1964 年以来单倍体育种进展情况,详细地介绍了从菸草、水稻和甘蓝等作物的花药培养单倍体植物的方法。

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 第一集

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

*

1972 年 9 月第 1 版

1972 年 9 月第一次印刷

定价: 0.50 元

前 言

“种”是农业“八字宪法”的重要组成部分。随着我国社会主义农业生产的迅速发展,对育种工作提出越来越高的要求。目前采用的杂交、辐射和杂种优势利用等育种方法,在农业生产上起着重要作用,但是这些方法的共同缺点是育种周期长、选育手续繁琐。近几年来,在植物组织培养技术日益发展的基础上,通过花药离体培养,从花粉培育单倍体植物的试验在许多作物上获得成功。这一技术应用于育种工作,形成了一种多快好省的育种方法——单倍体育种法。单倍体育种法,利用单倍体植物作为一个中间环节,能够显著加快育种速度,简化选育手续,是育种工作中的一项重大技术革新。

目前单倍体育种正处于试验阶段,国内已有不少单位开展了这方面的科学实验。为了促使这项新技术早日在农业生产上发挥作用,遵照毛主席关于“洋为中用”的教导,我们选译了国外近几年来有关单倍体植物培养和单倍体育种方面的主要资料,供育种工作者和有关科研人员参考。此外,在本书的第一篇中,我们综合国内外研究结果,介绍了单倍体育种的一般原理和花药培养的基本方法,同时报道了国内一些单位最近在这方面取得的进展,以便读者对于单倍体育种有一个全面的了解。

编 译 者

1972 年 7 月

目 录

单倍体植物的培养及其在育种上的意义·····	
····· 中国科学院植物研究所单倍体育种组 (1)	
从曼陀罗 <i>Datura</i> 离体花药产生胚·····	
····· S. Guha, S. C. Maheshwari (19)	
曼陀罗 <i>Datura</i> 离体花粉粒中胚的细胞分裂和分化·····	
····· S. Guha, S. C. Maheshwari (22)	
从曼陀罗 <i>Datura</i> 离体花粉粒发育的胚状体·····	
····· S. Guha, S. C. Maheshwari (26)	
从离体培养的雄蕊获得单倍体菸草·····	
····· J. P. Bourgin, J. P. Nitsch (38)	
起源于花粉粒的单倍体植株·····	
····· J. P. Nitsch, C. Nitsch (45)	
从起源于花粉粒的单倍体菸草获得突变体·····	
····· J. P. Nitsch, C. Nitsch, P. Péreau-Leroy (52)	
从离体培养的单倍体愈伤组织产生二倍体菸草·····	
····· J. P. Nitsch, C. Nitsch, S. Hamon (57)	
菸草属 <i>Nicotiana</i> 雄核发育实验·····	
····· J. P. Nitsch (64)	
用花药进行组织培养从花粉分化出菸草的幼小植物·····	
····· 中田和男 田中正雄 (88)	
用花粉进行组织培养育成菸草的单倍体·····	
····· 中田和男 田中正雄 (99)	

- 关于花药培养得到的菸草植物和使单倍体染色体
数加倍的处理……………田中正雄 中田和男 (105)
- 菸草花粉单倍体植株的栽培……………
…………… N. Sunderland, F. M. Wicks (118)
- 花粉植物及其意义…………… N. Sunderland (123)
- 从水稻花粉培养诱导单倍体植株……………
…………… H. Nüzeki, K. Oono (130)
- 从水稻植株的花药和子房培养出现各种不同倍性
的植株……………T. Nishi, S. Mitsuoka (134)
- 水稻的组织培养……………新関宏夫 (141)
- 从芥属 *Brassica* 植物的花粉粒诱导单倍体植株…
…………… T. Kameya, K. Hinata (154)
- 从羊茅属 *Festuca* — 黑麦草属 *Lolium* — 杂种产生
单倍体植株……………W. Nitzsche (164)
- 高频率产生大麦(*Hordeum vulgare* L.) 单倍体…
…………… K. J. Kasha, K. N. Kao (166)
- 从花粉育出单倍体植物……………新関宏夫 (171)
- 从花粉育成植物……………新関宏夫 (184)

单倍体植物的培养及其在育种上的意义

中国科学院植物研究所单倍体育种组

很早以前就有人提出过在育种工作中利用单倍体植物的设想，但由于找不到一种大量获得单倍体植物的方法而无法实现。1964年 Guha 和 Maheshwari 在进行曼陀罗花药培养试验时发现从花药中长出许多胚状体，1966年又进一步研究证明它们是从花粉发育而成的幼小的单倍体植物。这个发现立即引起了育种工作者的注意，紧接着开始在烟草、水稻等作物上进行从花粉培育单倍体植物的试验，并相继获得成功。近几年来，单倍体培养技术和育种实践相结合正逐步形成一种新的育种方法——单倍体育种法。单倍体育种法运用实验胚胎学、植物细胞学和植物生理学的近代技术，开辟了一条快速育种的新途径，是对传统育种方法的一次重大技术革新，目前国内外正在大力进行试验研究。

一、单倍体植物在育种上的作用

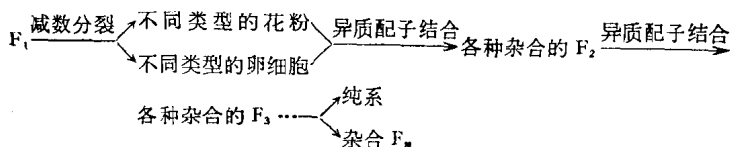
一般的栽培作物从细胞遗传学上来说都是二倍体植物，即在其细胞中包含着来自父母双方的两套遗传物质——染色体。在细胞中只具有一套染色体的植物在植物学上叫做单倍体。以水稻为例，水稻的二倍体有24个染色体，而其单倍体只有12个染色体。单倍体植物在自然界中偶然也有发现，但出现的频率极低。植物的花粉是由花粉母细胞经过减数分裂

而形成的，它们的染色体数目为体细胞的一半，因而是单倍体。从花粉培育出的植物一般都是单倍体植物。

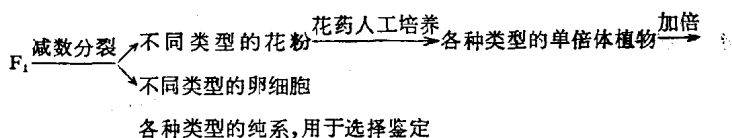
单倍体植物只有一套染色体，在有性生殖过程中不能进行正常的减数分裂，因而它们几乎是完全不育的。由于这一点，单倍体植物本身在育种上没有利用价值。但是如果在育种工作中把单倍体做为一个中间环节，就能够很快地获得纯系，加快育种速度，并能创造出植物的新类型。下面分别说明单倍体植物在杂交育种、杂种优势利用、诱变育种和远缘杂交中可能起到的作用。

1. 利用单倍体植物克服杂种分离、缩短杂交育种周期

在杂交育种时，由于杂种后代的不断分离，要获得一个稳定的品系通常需要五年以上的时间。杂种分离的原因是杂种一代 (F_1) 在进行有性生殖时来自双亲的两套染色体上的遗传物质发生重组，结果产生许多遗传结构不同的雌雄配子（卵细胞和精子），异质配子的结合又形成杂合的 F_2 ， F_2 由于同样的原因继续分离。随着杂种代数的增加，同质配子结合的机率也增加，因此在四代以后可能出现同质结合的纯系。杂种分离过程可用下列图式来表示：



如图式所表明，异质配子的结合是不能形成纯系的原因。很明显，如果能从杂种后代的花粉培育成单倍体植物，再使它加倍变成二倍体植物，就能避免异质配子的结合而得到纯合的二倍体。这个过程可表达为：



按照上述程序, 通过 F_1 代的花药培养即可得到单倍体植物并进一步获得纯系。这样从杂交的时间算起, 只需两年时间就能得到稳定而不分离的品系, 显然大大加快了育种的速度, 缩短了育种的周期。在自花授粉的作物中应用这种方法是切实可行的。

2. 通过单倍体植物快速获得自交系

在玉米、高粱等常异花传粉作物的杂种优势利用工作中, 为了获得自交系需要耗费大量时间和人力进行连续多年的人工自交, 而且手续十分繁琐。而从单倍体植物加倍得到的纯合二倍体植物实际上就是标准的自交系。因此通过单倍体途径只要一年时间就可以得到许多自交系。但是玉米和高粱的花药培养技术至今尚未突破, 急需在这方面开展试验研究。

3. 单倍体植物的辐射诱变与化学诱变

单倍体植物只有一套遗传物质, 表现在性状上没有所谓显性掩盖隐性的问题。如果用辐射或诱变剂处理单倍体植物, 当代就表现出性状变异。好的单倍体突变植株一经选出, 即可加倍处理, 使之变成纯系用于选种工作, 这是一种快速简便地获得新品种的好方法。Nitsch 等(1969)进行的烟草单倍体辐射诱变实验证实了这种设想。除了处理单倍体植株外, 预先照射或用诱变剂处理培养用的花药也可能获得诱变了的单倍体植株。

4. 从远缘杂种的花粉培育单倍体植物

远缘杂种通常存在不育性，但它产生的花粉中有少数是有生活力的，有可能从它们培育成单倍体植物。这样得到的单倍体植物染色体数目可能变化很大。存在着下述三种可能性：

(1) 只有双亲中的某一套染色体，加倍之后和亲本之一相同；

(2) 具有父、母本的染色体各一套，即所谓双单倍体，加倍之后成为双二倍体；

(3) 具有一部分母本染色体和一部分父本染色体，加倍之后得到自然界中不存在的二倍体新类型。Nitzsche (1970) 报导，从羊茅 *Festuca* 和黑麦草 *Lolium* 杂种的花粉培育出少量的单倍体植株，说明在这一方面进行试验是可行的，也是很有意义的。

二、从花药培养单倍体植物的方法

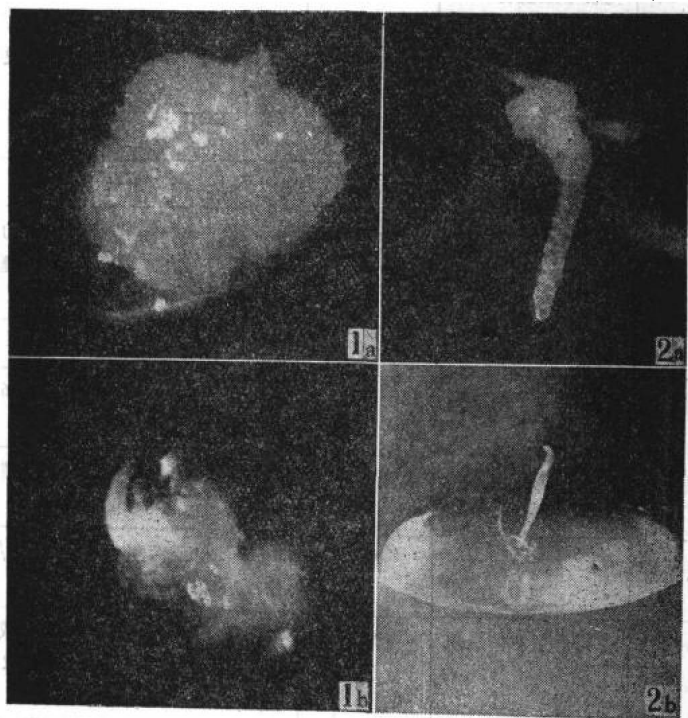
单倍体育种的首要问题是如何获得大量的单倍体植株。目前采用的方法主要是离体培养花药，使花粉发育为单倍体植物。同时也在探索其他的途径 (Kasha 和 Kao 1970)。据我们所知，用花药培养单倍体植物的试验已经在曼陀罗、烟草、水稻、甘兰、鸭跖草、粟、颠茄、茶等近十种植物上获得成功。最近中国科学院植物研究所和黑龙江省农业科学实验所联合进行小麦花药培养实验，已经从花药中得到小植物，正在进行进一步的试验。

根据现有资料，从花药产生单倍体植物通过两种方式：

(1) 在离体培养的花药中，花粉经过类似胚胎发育的过

程直接形成单倍体植物,如烟草、曼陀罗;

(2) 在离体培养的花药中,花粉形成愈伤组织,再从愈伤组织诱导单倍体植株,如水稻、甘兰。然而我们在小麦上进行的初步试验表明,两种方式之间并不存在绝对的界限。花粉是直接发育成苗还是形成愈伤组织,主要取决于培养基中生长素的浓度。当培养基中有较高浓度的 2, 4-D 并附加动力精时,小麦花药产生愈伤组织。如果培养基中只含有椰乳或者含有动力精和低浓度的吲哚乙酸(其活性比 2, 4-D 低很



图一 小麦花药产生植株的两条途径

1. 在含有椰乳和 2, 4-D 的培养基上, 从花药中长出愈伤组织(1a), 经过转移培养再由愈伤组织分化出幼芽(1b); 2. 在只含椰乳的培养基上, 从花药中直接长出胚状体(2a), 并进一步发育为植株(2b)。

多), 则从花药中直接分化出胚状体(图一; 培养基配方见表一)。

下面根据我们和中国农业科学院烟草研究所及黑龙江省农业科学实验所共同试验的结果, 以烟草和水稻为例, 简要介

表一 几种作物花药培养用的培养基

作物	培养目的	培养基	
		基本培养基	附加成分
烟草	花粉形成植物	培养基 H	一般不需要。但加入吲哚乙酸 0.1 毫克/升, 动力精 0.2 毫克/升, 腺嘌呤 40 毫克/升可获得更好效果。
	使苗生长健壮	培养基 T	
水稻	花粉形成愈伤组织	Blaydes	2, 4-D 1—5 毫克/升
	愈伤组织分化苗	Blaydes	吲哚乙酸 0.5—1 毫克/升, 动力精 2 毫克/升; 或者萘乙酸 0.5 毫克/升, 椰乳 15%。
	使苗生长健壮	改良 White	
甘 兰	花粉形成愈伤组织	改良 Nitsch	2, 4-D 1 毫克/升, 动力精 1.6 毫克/升; 或者 10% 椰乳。
	愈伤组织分化苗	改良 Nitsch	萘乙酸 0.5—1 毫克/升, 动力精 1 毫克/升; 或者 10% 椰乳。
小麦 ^①	花药产生植物	MS	20% 椰乳; 或者吲哚乙酸 2 毫克/升, 动力精 2 毫克/升。
	花药产生愈伤组织	MS	2, 4-D 2 毫克/升, 椰乳 15%; 或者 2, 4-D 2 毫克/升, 动力精 2 毫克/升。
	愈伤组织分化苗	MS	吲哚乙酸 0.5—1 毫克/升, 动力精 2 毫克/升。

① 植物研究所和黑龙江省农业科学实验所 1971 年试验结果。

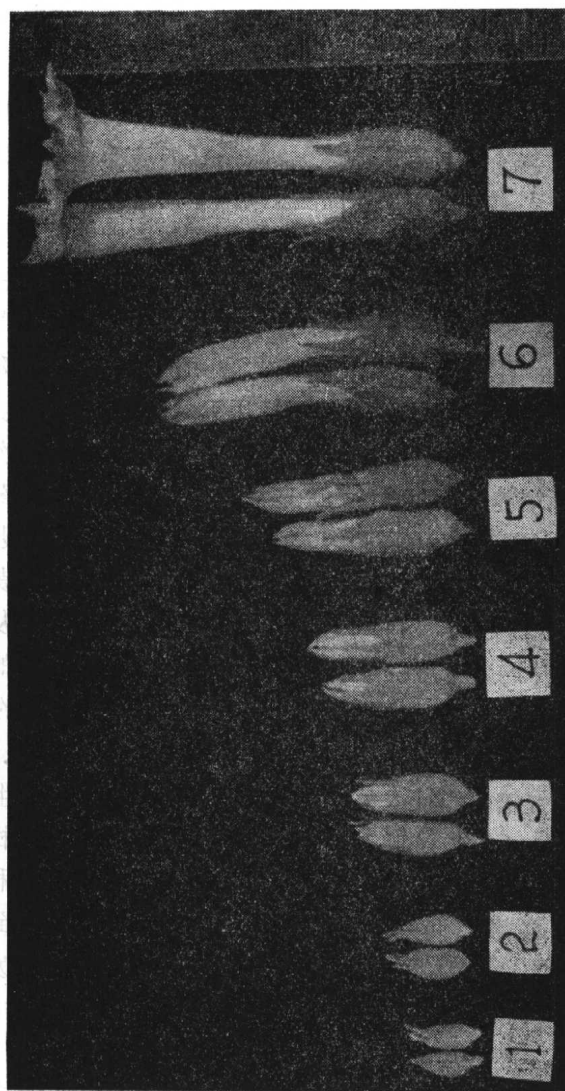
绍两种不同的花药培养方法。

1. 从烟草花药培养单倍体植物

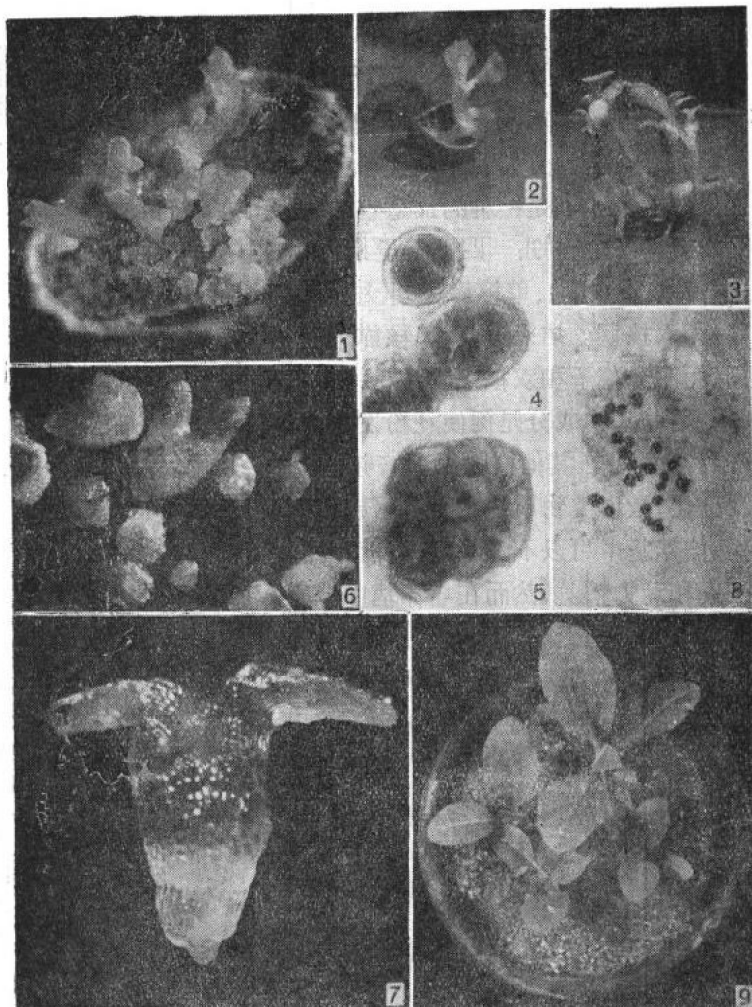
花药培养基采用培养基 H (也可用 Blaydes 或 RM-1964 培养基, 配方见本文后面的附表)。配制好的培养基分装到试管或三角瓶中, 在 15 磅压力下热压灭菌 20 分钟。

在进行花药接种之前, 预先用醋酸洋红压片法镜检确定花粉的发育时期, 并找出花粉发育期和花蕾大小的相应关系。一般选用花粉为单核期的花蕾, 此时花蕾的花冠大约与萼片等长(图二)。花蕾先在 70% 酒精中浸一下, 再放入 10% 的漂白粉溶液中消毒 10 分钟, 然后换用无菌水洗 1—2 次。在无菌条件下从花蕾中取出花药种植到培养基上。培养物在 20—30℃ 下培养, 给以适当的光照。培养的最初几天花药保持绿色, 以后逐渐变黄色至褐色。培养 20 天左右, 花药裂开, 从中长出许多幼小的胚状体(图三.1)。起初它们是淡黄色的, 见光后逐渐变绿。这时取出花药制片镜检, 可以看到从花粉形成胚状体的各个阶段(图三.4—7), 整个过程和正常的胚胎发育非常相似。25 天以后胚状体长成具有两片子叶的幼苗(图三.2)。染色体检查表明这些幼苗是单倍体(图三.8)。如果严格掌握培养的技术条件, 大约有 50% 的花药产生幼苗, 最高可达 61%。一般每个花药中可长出几株到几十株苗(图三.3), 个别的多达 180 多株。在单倍体幼苗的真叶和根尚未长出之前, 将它们一株株地从药室中取出, 分别移植到装有培养基 T 的试管中。当幼苗长出四、五片真叶并形成发达的根系时, 把它们移到花盆里, 盖上塑料薄膜。待缓苗后, 揭去薄膜进行一般管理即可。

我们用上述方法在一个生长季节获得了大约两千株 F_1 的花粉植株, 这个数目已经能够满足选种工作的需要。



图二 不同发育时期的烟草花蕾(品种为革新五号)其中第三时期的花蕾中花粉为单核期,是花药培养最合适的时期(原大)



图三 从离体培养的烟草花药产生单倍体植株

1. 从裂开的花药中长出许多胚状体； 2. 从裂开的花药中长出一株单倍体幼苗； 3. 一个花药产生许多幼苗； 4. 在离体培养条件下花粉分裂成二细胞(上)和多细胞； 5. 花粉发育成的球形胚状体； 6. 胚状体的各个发育时期； 7. 单倍体幼胚已分化出子叶； 8. 花粉植株的根尖涂片(孚尔根染色)，染色体数为 24，表明它们是单倍体； 9. 移入盆栽的单倍体植株。

培养所用的花粉的发育时期是决定实验成败的重要因素。J. P. Nitsch 和 C. Nitsch (1969) 认为单核而尚未形成淀粉粒的花粉最容易发育成胚状体。而 Sunderland (1969) 认为即将进行有丝分裂的单核花粉最好。中田和田中(1968)则提出四分孢子期是接种的最适宜的时间。在我们的实验中把花粉分为四个时期：四分孢子期、单核中央期(核在细胞中央, 细胞质浓厚)、单核靠边期(核移到花粉边缘, 细胞质较稀薄)和双核期。结果证明, 单核靠边期花粉产生植株的频率最高, 而四分孢子和双核期的花粉一般不易发育出单倍体植物。

培养基的成分是促使花粉发育为单倍体植物的最主要的外界条件。在其他植物组织培养试验中, 为了促使细胞分裂及分化, 激素类物质往往是不可缺少的, 但对烟草花药培养来说, 培养基中可以不加激素, 目前采用的培养基 H 中就没有生长素和动力精。然而在培养基中补充 0.1 毫克/升的吡啶乙酸可以明显地提高每个花药产生小植物的数目。此外, 据我们的实验, 将蔗糖浓度从 2% 提高到 3%, 对于小植物的生长是有利的。为了更切合育种工作的实际需要, 培养基还可以设法进一步简化。据 Nitsch (1969) 报导, 在只含有 2% 蔗糖的培养基上花粉就能发育成球形胚, 但不能进一步长成植株。在此基础上再加入矿物盐(其中铁盐是不可缺少的), 花粉就能够发育为小植物。

2. 诱导水稻花粉产生单倍体植株

从水稻花药培养单倍体植物经过三个步骤:

- (1) 通过花药培养诱导花粉产生愈伤组织;
- (2) 诱导愈伤组织产生单倍体植株;
- (3) 使幼苗生长健壮。

诱导花粉产生愈伤组织: Niizeki 和 Oono (1968) 采用

Blaydes 培养基附加 2,4-D 1—2 毫克/升, 吲哚乙酸 1—2 毫克/升, 动力精 1—2 毫克/升。据我们的试验, 省去吲哚乙酸和动力精, 只加 1—5 毫克/升的 2,4-D 并不影响培养效果 (见表二)。试验采用花粉为单核期的穗子。取穗前先将旗叶鞘用 70% 酒精擦洗一遍。在接种箱内从旗叶鞘中剥出稻穗, 放入 10% 漂白粉溶液中消毒 10 分钟, 换无菌水洗一次。在取花药之前将手用 70% 酒精擦洗两遍, 取花药时以左手持穗, 右手用镊子从颖壳中取出花药放于无菌培养皿中, 待花药有一定数目时, 用接种环将它们接种到培养基上, 在 20—30℃

表二 水稻花药产生愈伤组织的频率
(1971 年实验结果, 花粉为单核靠边时期)

培 养 基	杂 交 组 合	接种的 花药数	产生愈伤 组织的花 药数	%
Blaydes + 2, 4-D 1 毫克/升	F ₁ (杜交 13×京引 143-1)	360	18	5.0
	F ₂ (高 58×系 28)	134	10	7.5
	小 计	494	28	5.7
Blaydes + 2, 4-D 5 毫克/升	F ₁ (杜交 13×京引 179)	28	1	3.6
	F ₁ (杜交 13×京引 16/早粘×永丰)	102	2	2.0
	F ₁ (杜交 10×矮丰 2)	45	7	16
	小 计	175	10	6.0
Blaydes + 2, 4-D 1 毫克/升 IAA 1 毫克/升 动力精 1 毫克/升	F ₁ (杜交 26×京引 1 号)	210	8	3.8
	F ₁ (农垦 2×科情/农垦 2×119)	112	5	4.5
	小 计	322	13	4.0
Blaydes + 2, 4-D 2 毫克/升 IAA 2 毫克/升 动力精 2 毫克/升	F ₁ (农垦 2×科情/农垦 2×京引 119)	90	7	7.8
	F ₁ (杜交 10×矮丰 2 号)	112	4	3.6
	F ₂ (杜交 13×京引 16)	232	2	0.9
	F ₂ (杜交 26×京引 1 号)	150	10	6.7
	小 计	584	23	3.9
总 计		1575	74	4.8