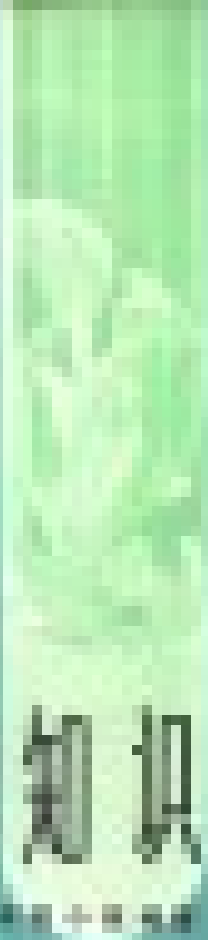


单倍体育种知识

上海市农科院作物所单倍体育种研究小组编著

上海人民出版社



单倍体育种知识

上海科学技术出版社出版 (上海) 100010

（上海）100010

单倍体育种知识

上海市农科院作物所
单倍体育种研究小组 编著

前 言

花粉培养单倍体育种法的研究发展极为迅速，目前已在许多作物上通过花粉培养获得单倍体植株。这一新的育种技术，我国在短期内取得了很大的成绩，不少县农业科研单位也都试验成功，现正逐步成为群众性的科学实验项目。为了便于从事此项工作的同志掌握这一新的育种技术，我组在实验和交流的基础上编写了《单倍体育种知识》这本小册子，供基层开展此项工作时参考。

这项新技术正在日新月异地发展，随着生产与科研的发展，这本小册子势必会显得局限。由于我们工作实践太少，书中不免会有错误及不当之处，欢迎批评指正。

编著者 1974年11月

目 录

花粉培养单倍体育种法的发展及其意义	1
一、单倍体育种法的产生	1
(一) 什么叫单倍体	1
(二) 获得植物单倍体的途径	2
(三) 花粉培养单倍体育种法的发展	3
(四) 单倍体育种的工作内容	4
二、单倍体培养在育种上的意义	6
(一) 能较早稳定杂种后代的性状和缩短育种年限	6
(二) 提高选择的正确性和效率	9
(三) 节省田间试验的土地和劳力	11
(四) 克服远缘杂种不育性与分离的困难	11
(五) 快速地培育异花作物的自交系	12
单倍体培养的一般过程	13
一、单倍体培养的步骤	13
(一) 诱导愈伤组织的产生	13
(二) 愈伤组织分化成幼苗	14
(三) 使分化的小苗正常生长和健壮	21
二、花粉单性发育成植株的生物学原理	21
(一) 世代交替	22
(二) 植物具有再生的特性	23
(三) 植物细胞的全能性	23
花粉培养单倍体植株的操作技术	25
一、培养前玻璃器皿的准备	25

(一) 玻璃器皿的清洗工作·····	25
(二) 棉花塞的准备·····	26
二、培养基的配制·····	26
(一) 配制培养基母液的方法·····	26
(二) 移液与定容·····	28
(三) 调整 pH 值·····	29
(四) 包扎和消毒灭菌·····	29
三、花药的接种与培养·····	30
(一) 接种工具的准备·····	30
(二) 接种前花粉细胞发育时期的检定·····	30
(三) 接种花药的消毒·····	31
(四) 接种方法·····	32
四、花粉愈伤组织的诱导与分化培养·····	32
(一) 花粉愈伤组织的培养·····	32
(二) 愈伤组织分化成苗的过程·····	33
五、防止污染的措施·····	34
花粉植株幼苗的培植和染色体的加倍·····	36
一、花粉植株幼苗的培植·····	36
(一) 砂培法·····	36
(二) 水稻花粉幼苗的培植要点·····	37
二、单倍体植株染色体加倍方法·····	38
(一) 根尖细胞的检查·····	38
(二) 染色体加倍的方法·····	38

花粉培养单倍体育种法的发展及其意义

一、单倍体育种法的产生

杂交育种,是农作物育种中行之有效的办法,也是目前作物育种的主要方法。但通过杂交获得后代,其性状一时不能稳定,需经五、六代或更长代数的连续选育,才能得到一个稳定的类型或品系供生产进一步试种。其主要原因是杂种后代的性状分离和不稳定,因此,杂交育种往往由于年限长,不能很好适应农业生产发展的要求。为此,在育种上大家十分注意研究如何控制杂种后代显性、分离的途径和方法,以达到缩短育种周期。很早以前就有人提出过在育种工作中利用单倍体植株的设想,即由单倍体植株经过染色体加倍恢复为二倍体时,它的遗传性就能相对稳定,其后代性状整齐一致,从而缩短育种年限。

(一) 什么叫单倍体

由植物的生殖细胞不经受精结合,单性发育成植株,这种植株的细胞内的染色体,只有原有的一半,叫做单倍体。一般水稻根、茎、叶等部位的细胞内含有 24 ($2n=24$) 条染色体为二倍体,它的生殖细胞(花粉或胚囊卵细胞)因经过减数分裂,染色体减半成为 12。由水稻花粉或胚囊卵细胞单性发育成的水稻植株即为单倍体水稻植株。目前大量进行的是用花粉培养使它单性发育获得单倍体植株。另外,花粉培养中所指的“单倍体”与植物学,遗传学上所指的倍数性的含义不完全相

同。各种植物都有一定数目的染色体，并由一定的基数与倍数所构成，如水稻是二倍体植物，有 24 条染色体，即基数为 12，倍数是 2，构成 $2 \times 12 = 24$ 条染色体。水稻花粉培养成的植株，其染色体未经加倍前只有 12 条，为单倍体。普通小麦是六倍体植物，细胞内有 42 条染色体，基数为 7，倍数是 6 即 $6 \times 7 = 42$ 条染色体，其花粉植株有 21 条染色体，但不称三倍体 ($3 \times 7 = 21$) 而称单倍体；又如陆地棉为四倍体植物，有 52 条染色体，即 $4 \times 13 = 52$ ，其花粉植株应为 26 条染色体。中棉是二倍体植物，有 26 条染色体，即 $2 \times 13 = 26$ ，其花粉植株应为 13，而陆地棉的单倍体不是中棉。由此可见花粉培养的“单倍体”其含义实际是半倍性，即其染色体为原来植物的一半，只有单套染色体的意思。

(二) 获得植物单倍体的途径

获得单倍体植株的途径有二个方面：一是无融合生殖（即孤雌生殖），由植物胚囊中的卵细胞、极核、反足细胞以及助胎细胞不经受精单性发育而获得植株。另一种是花粉离体人工培养，使单性发育成植株（即孤雄生殖）。

植物的无融合生殖，在自然界是存在的，如柑桔类植物的种子内往往有多胚，其中有一些胚是未经受精的胚囊卵细胞发育成的，玉米中也有频率极低的单倍体植株发生。用人工的方法也能诱导胚囊卵细胞单性发育产生单倍体，如进行远缘的异属花粉授粉，可以刺激柱头，引起胚囊卵细胞发育成种子；另外弱化花粉授粉，即将花粉人工贮藏数十小时到几天后用以授粉，这种花粉萌发能力微弱，不能完成正常的受精作用，但能引起胚囊卵细胞发育成种子；还有用药物如 2, 4-D、赤霉素（九二〇）、秋水仙素等处理柱头，或用异常温度刺激花朵、经高剂量射线照射的花粉授粉、机械刺激子房等，也能使

少数胚囊卵细胞单性发育获得单倍体。但因诱导孤雌生殖的办法获得单倍体的频率太低，在育种和生产实践上目前还不能应用。然而仍有这方面的研究。

（三）花粉培养单倍体育种法的发展

自从 1966 年野生植物曼陀罗的花粉在国外培养成功以来，花粉培养的研究工作发展十分迅速。十几年来，植物离体组织培养技术的发展，使离体的植物组织或单个细胞培养成完整的植株。特别近几年，已能广泛地使植物的花粉细胞通过人工培养使它发育成为单倍性的植株。花粉培养单倍体植株的成功，使多年来设想利用单倍体选育种的愿望实现了，相继在烟草、水稻、茶树等方面获得成功。我国科学院遗传研究所、植物研究所还首先在小麦、小黑麦、辣椒、茄子等方面取得成功。同时，在改进和发展培养技术方法的基础上使培养成功率大大提高。例如烟草花粉培养试验由最初成功率只有接种花药的 6%，现已提高到 70% 以上。山东省烟草研究所在一年内培养成二千多株烟草的单倍体植株，并用此法育成两个烟草品种。又如水稻最初国外试验成功率只有 0.57%，而中国科学院植物研究所改进培养技术，查明适于培养的花粉发育时期，使水稻培养的成功率提高到 16% 以上。目前更有许多研究单位，已把成功率提得更高。在我国虽然这方面的研究时间很短，但已经通过花粉培养的方法，培养成功许多品系，中国科学院遗传研究所自 1971 年到 1972 年已用此法培养成多个水稻、小麦的新品系，其中较突出的是他们培养小麦科春五号 × 小偃 759 杂种一代(F_1)的花粉，一举获得了一个优良品系。因为这个品系较推广品种有较好的性能，现正在国营农场、公社生产队试种。上海市农业科学院，用水稻垦桂 × 科情 3 号杂种一代的花粉培养成的新品系 302，也正在加

速繁殖进行试种。

目前应用花粉培养的技术，结合植物胚胎学、植物生理学、遗传学、作物育种学的原理和方法，逐步形成一种新的育种法——单倍体育种法，开辟了一条快速育种的新途径。

（四）单倍体育种的工作内容

所谓花粉培养单倍体育种，是指用花粉人工离体培养，使它单性发育成为植株，经染色体加倍恢复为二倍体，从中选育优良的个体，培育成为新品种，简称单倍体育种。

作为单倍体育种的全部内容及过程应包括如下几个方面：

1. 原材料的准备 用花粉培养单倍体只是育种的一种手段，不是育种的目的。用花粉培养成的单倍体（花粉植株）有无育种价值，这要看它是否优良。并非用任何材料培养成的花粉植株都有价值。因此要获得优良的花粉植株后代，选择恰当的培养材料，是花粉培养单倍体育种育成品种的前提。一般采用优良亲本配成的杂交组合的杂种一代植株的花粉或杂种二代中选择优良植株的花粉进行培养。

作物各种特性特征和性状的遗传规律是选择杂交亲本时的主要依据，而这些性状在花粉培育单性发育的繁殖情况下，它的遗传规律与种子繁殖情况是不同的。一般在花粉培养单性发育的繁殖情况下，后代能出现一些种子繁殖情况下不易出现的类型，能提供更多的选择性。选取植株健壮的花粉，花粉肥大、饱满的比较容易培养成功。

对提供花粉培养的亲本可进行无性繁殖或延长生育过程，以使花药采集的时间延长，如水稻、小麦等作物可以用分株、剥分蘖、割去地上部分等方法。也可用遮光（短光照处理）或加辅助光照（长光照处理）等方法延长或缩短生育期。此外

有些作物如棉花、烟草等可以用宿根越冬，扦插繁殖等方法保持该作物长期供采花药的状态。十字花科的植物如油菜等可以用摘心、整枝、割苔等方法延长其生育期。

2. 花粉人工离体培养成植株 这部分工作是目 前单倍体育种研究的中心问题。因为获得较多的花粉植株是单倍体育种的基础。要获得较多的花粉植株与下面的因素有关：

(1) 选择适合的花粉发育时期进行人工培养。并且要注意培植健壮的亲本植株，植株的年龄也很有关系，如烟草、棉花等作物早期的花朵容易培养出幼苗。(2) 选择和改进培养基，不同作物的花粉对于不同培养基其反应是不同的，它们对培养基有不同的要求，特别是生长素的种类与浓度的调整十分重要。(3) 注意改进培养条件，不同作物的花粉在培养中对光、温、湿也都有不同的反应，如水稻在高于 34°C 时容易出现白化苗，小麦在 20°C 左右能较好生长。

3. 对花粉植株的培植、染色体加倍处理、选择、鉴定和繁殖 花粉培养成的植株因它是在试管、三角瓶内长成的，它的营养由培养基提供，而且是在恒温恒湿的情况下生长的，所以较纤弱娇嫩，初从试管内移出时，特别需要精心培植。花粉植株是单倍体，单倍体植株是不能正常结实的，需要进行染色体的人工加倍(加倍的方法见 38 页)处理。有许多作物如水稻、小麦等的花粉植株一般能自行染色体加倍恢复为二倍体(称自然加倍)。即在花粉培养诱导愈伤组织或愈伤组织分化过程细胞分裂增殖时，染色体自行加倍恢复为二倍体，这种植株无须再进行人工加倍就能正常结实。水稻一般有 $40\sim 60\%$ 的花粉植株自然加倍，小麦自然加倍的百分率比较低。

对于花粉植株的鉴定，首先是看它后代的性状是否整齐一致，是否相对稳定，其基本性状(成熟期、抗逆性、丰产性)是

否符合育种目标。因而对于花粉植株是按育种的实际需要加以选择和培养。有些花粉植株虽然不能直接作为品种应用，但可以作育种的原始材料或作杂交亲本加以保存和利用。花粉培养也是创造原始材料的一种有效方法。

二、单倍体培养在育种上的意义

用花粉培养单倍体进行育种是作物育种技术上的一项重大改革。它可以与目前所采用的各种育种方法相结合，用以克服各法中的一些缺点和困难，也可以直接用此法创造新的类型。花粉培养获得花粉植株在杂交育种、人工诱变育种、远缘杂交和异花作物自交系选育等方面的作用及意义，大致有如下几个方面。

(一) 能极早稳定杂种后代的性状和缩短育种年限

在进行作物杂交育种时由于杂种后代的性状、特征不断分离，一时不能稳定，通常要经过4~6代才能得到性状相对稳定的个体和株系，在血缘较远的亲本之间杂交，其后代性状稳定的时间(代数)要更长。

作物在不同品种或类型之间进行杂交，所得的杂种有二个基本特征：

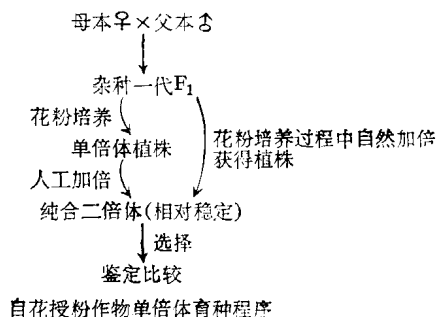
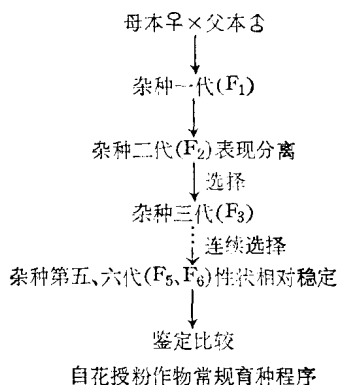
1. 杂种有优势现象 即杂种个体，表现出比亲本生长势旺、个体大、成熟早、结实多、抗逆性强等现象，这叫杂种优势。这种优势在杂种一代最强，从第二代起，显著地减退，以后逐代消失。

2. 杂种具有复杂的遗传性 即杂种具有双亲的遗传可能性。杂种后代个体之间的性状，表现为多种多样，各种性状可以是倾向于某一个亲本或趋向于中间型，此外还可以出现双亲所不具备的新的性状。

同一个杂交组合的杂种一代(F_1)，它的性状特征一般是整齐一致的，并且就某一个性状而言，往往祇相似于某一个亲本，另一个亲本的性状则不表现出来，在遗传学上称为显性和隐性。如一个亲本是高秆，一个亲本是矮秆，杂交后，杂种一代表现为高秆，则高秆是显性，矮秆是隐性，这时矮秆的特性仍是以不同程度的隐伏状态遗传下去。从杂种第二代起杂种优势不断下降，同时性状表现多种多样，即杂种后代发生性状的分离和不一致。以高、矮一对性状为例，在第二代及以后各代中就有高的、矮的、中间型的各种类型。这种性状的分离和不稳定，往往要持续5~6代。这是因为杂种一代(F_1)具有它双亲的遗传可能性，各种遗传特性在生长发育过程中逐步表现出来。杂种一代所产生的花粉，其遗传性是不一致的，同一花朵，或同一花药里的各个花粉粒之间遗传性也是各不相同的，同样，杂种所产生的卵细胞，遗传性也是不一致的。所以在杂种一代开花结实时，即使是自交，也是具有不同遗传性的花粉细胞与不同遗传性的胚囊卵细胞受精结合（称异质结合），仍然产生遗传类型复杂而不稳定的后代，即表现出分离与不一致。同样的原因在杂种第三(F_3)第四(F_4)……以后各代继续出现分离与不一致。随着代数增多，产生的配子（即花粉与胚囊卵细胞）的遗传性差距缩小，异质结合的机会减少，相同遗传类型的配子结合机会增多，相同遗传类型的花粉和胚囊卵细胞受精结合（称同质结合）产生的后代，其性状开始相对稳定和一致。所以要从杂种后代中选得一个性状相对稳定的个体或株系，就得连续种植杂种5~6代或更多代数，这就是杂交育种年限长的原因。

如果将杂种一代(F_1)或二代(F_2)的花粉进行人工离体培养，使它单性发育成植株，这种植株再经染色体加倍（自然或

人工)恢复为二倍体时,即成为纯合二倍体(相当于同质结合)。它的性状不发生分离,能相对的稳定,其后代性状趋于一致,这就克服了杂交育种中杂种性状稳定时间(代数)长的困难,从而缩短育种年限。现用图解来比较单倍体育种与常规杂交育种的过程。



由上面的图解可以比较出花粉培养单倍体育种把育种年限大大缩短的优越性。如中国科学院遗传研究所,1971年春,用小麦科春五号 × 小偃 759 F₁ 的花粉培养成花粉植株,在夏

季收获种子，秋季在雷州半岛繁殖观察，1972年春就在北京郊区的国营农场和人民公社进行鉴定试种，因为这品种较推广的科春五号具有更好的生产性能，现已进行示范试种。上海市农业科学院在1972年春，用水稻品种垦桂作母本，科情三号作父本进行杂交，秋季用这个杂交组合的杂种一代(F_1)花粉进行培养获得花粉植株，1973年上半年收获种子，下半年种植鉴定，它的性状相对稳定一致，1973年冬季在海南岛异地加速繁殖，1974年在人民公社进行生产性能鉴定，从杂交开始到获得稳定的品系，全部时间只有3年。通常杂交育种要达到同样进度，即使异地加速繁殖，也需要5~6年。

(二) 提高选择的正确性和效率

选择是育种过程中的重要环节，正确的选择，对一个品种(或类型)的形成具有创造性的作用。对于育种材料、杂种后代、辐射处理材料的选择，是根据育种的目标、性状的遗传传递规律而进行的，也根据既定的育种目标和生产的要求加以选择。但人们在选择过程中往往很难做到正确，原因如下：

(1) 有显隐性和杂种优势的干扰。

(2) 群体大，选择机率虽增大，但工作量相对增大，难以面面俱到。

由于上面二个原因，在选择时常常会产生误选或漏选。

我们在田间对于杂种或其他材料的选择，总是根据这些材料性状表现的优劣加以选择。被选取的个体往往在选择的第一年表现优良，但第二年有可能表现不出优良性，尤其是在杂种后代中，大多数情况是当年选择时很好，甚至很突出，第二年种植后又变了，或是好的性状不能再表现出来，或是分离出一些不良性状，这就是前面所说显性性状和隐性性状的作用。因为那些呈隐性状态遗传传递到下一代的性状，在适当的生

长发育条件下,能再次表现出来,同样也有一些性状在当时没有表现出来,但以后也有可能表现出来的,而当年却只能根据性状表现(现象)的好坏加以选择。由此而受到显性隐性的干扰,产生了误选和漏选。所以在常规育种中总要连续种植与连续选择好几年,待选出的株系,它的性状确是相对稳定了,才能进一步试验。

此外,选择还受到杂种优势和生活力的干扰。虽然杂种二代(F_2)、三代(F_3)的优势不如杂种一代(F_1)强,但还是有一些优势,当有不同程度的优势存在时,往往表现较好,随着优势的下降就失去它的优良性。如用花粉培养,所得的花粉植株,它的遗传性相对稳定,性状一致,这就可以排除上述的干扰,使选择的正确性和效率大大提高。

其次,选择范围(群体)也能大大缩小。如前面所说杂种植株在形成性细胞(花粉和胚囊卵细胞)时就产生分离,即产生不同的遗传性的花粉细胞和胚囊卵细胞,这二者在受精时相互结合,则继续产生多种多样的后代。而花粉虽也是多样的,但由于它不再与不同遗传性的胚囊卵细胞结合,不发生遗传性的重组,所以,遗传性的多样性程度少得多。对花粉植株的选择,相当于对花粉细胞的选择。选择的范围大为缩小。

花粉培养单倍体与诱变育种相结合时,可以大大提高选择的效率。通常辐射育种和化学药剂诱变育种都是处理种子,然后在种植的大田中选择有用的变异类型。通常只能得到百分率极低的变异个体,大约在万分之1~2,主要由于遗传性状显、隐性的干扰和“回复突变”的存在。

所谓显、隐性干扰是指如果经辐射或化学药物处理所引起的变异是属隐性性状的变异,则由于被显性性状抑制或遮盖,在当代(处理的一代)中选不出来。这样即使辐射或化学