

花粉植株染色体倍性及加倍技术研究进展

袁惠燕, 姜茜, 张琪

(苏州大学 城市科学学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 主要介绍了国内外花粉植株染色体倍性、倍性鉴定以及染色体加倍技术的研究进展。

关键词: 花粉植株; 染色体; 倍性

中图分类号: Q 944.58 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)02-0061-04

植物花培育种主要包括离体培养产生单倍体植株和单倍体植株的纯合加倍两大技术。在这两方面国内外学者已进行了大量的研究,并取得了显著的成就^[1-3]。现就当前国内外在花粉植株倍性和加倍技术方面的研究进展做一综述。

1 花粉植株倍性及影响因素

1.1 花粉植株倍性

从理论上讲,花粉植株应当都是单倍体,但实际情况并非如此。在几乎所有试验过的植物种类上都发现过非单倍体的花粉植株。非单倍体植株的出现频率与植物种类、花粉年龄和培养基的成分有关。烟草花粉植株绝大多数是单倍体^[4],其它由胚状体途径形成花粉植株的种类,如曼陀罗^[5]、辣椒^[6]等也产生较高比例的单倍体植株。由花粉愈伤组织长成的花粉植株中,非单倍体的出现是经常的、大量的。水稻通过花药培养产生的花粉植株除单倍体外,还有二倍体、三倍体、四倍体、五倍体以及各种异数体^[7-9]。Chen Chung-mong 等^[10]对他们获得的 450 株粳稻花粉植株的倍性考察的结果是:47.7%为单倍体,46.7%为二倍体,1.9%为三倍体,3.6%为四倍体,0.2%为五倍体。水稻花粉植株倍性的分布因培养基成分,特别是激素配比、培养方法和条件以及愈伤组织转移分化培养时的大小等发生变化。谷明光^[11]观察玉米花粉胚性组织中,单倍体的含量占 90.2%,二倍体 2.1%,非整倍体 7.7%,单倍体细胞随着培养时间的延长而具有上升的趋势,表明花粉胚胎的倍性较为稳定,受培养时间的影响较少。胡含等(1978, 1980)^[12-13],黄佩霞(1977)^[14],Chen Ying^[15]等(1978)在小麦、水稻的花药培养诱导产生的花粉植株中单倍体和二倍体之和所占的比例与玉米^[16](90%)结果相近似。Oono^[17]报道了水稻花药培养中花粉植株单倍体和二倍体两者出现的频率为 90%。此外,类似的结果在双子叶

植物的烟草和曼陀罗的花粉植株中也观察到^[18,19]。

1.2 二倍体植株的来源

在花药培养产生的再生植株中,二倍体的来源是一个重要的问题。许多研究者都是通过对其后裔进行鉴定来判明其来源。即取杂合体 F₁ 植株的花药接种,根据诱导产生的二倍体植株的第 2 代是否有形态分离来确定它们的来源。中国科学院遗传所三室二组^[20]从小麦和水稻 F₁ 植株的花药培养得到二倍体花粉植株的后代,整齐而不分离,因此认为这些二倍体并不是来自体细胞的。Niizeki 和 Oono^[21]也提供了一个有力的证据,证明这些二倍体确是起源于花粉。从水稻的籼粳杂种 F₁ 的花药得到单倍体和二倍体,这些二倍体的植株之间在好几个性状上很不一样,即出现了分离,而所有来自 F₁ 植株体细胞愈伤组织的植株性状都是一样的。现在都知道,杂种一代是不分离的,如果有分离,则必然来自经过减数分裂的花粉细胞。但是许多研究者也发现二倍体的再生植株中确有少数在后代发生性状分离^[8,14,22-23]。其原因可能是单倍体加倍以后某一位点上一对等位基因的一个发生了突变,而另一个未变,因而在这一位点上杂合的,从而出现了分离^[24]。因此一些研究者又进一步用带有遗传标记的品种做杂交组合的亲本进行花药培养来查证这一问题^[10,25]。

1.3 花粉植株变异的原因

动植物培养细胞的重要特点之一是染色体的数目和结构的不稳定,在花粉植株中也有相同的现象。花药培养过程中产生异常有丝分裂的原因是:①在离体条件下,容易发生核内复制和核融合,同时单倍体组织在离体条件下较二倍体组织在染色体的数目和结构上容易发生变异^[26-28]。②培养基中的激动素和植物生长素如 2,4-D 等能诱发核内复制和纺锤体异常,从而使染色体加倍。刘贵仁等^[29]进行石刁柏花药培养获得的愈伤组织中出现了不同程度的混倍体,并认为提高 2,4-D 浓度会使愈伤组织多倍化加重。③延长愈伤组织的培养时间,可以促进细胞的多倍化和非整倍化^[28,30-31]。最近有人用 DNA 限制性片段长度多态性(RFLP)分析指出,长时间

第一作者简介:袁惠燕(1976),女,讲师,从事园艺植物育种和栽培研究。

收稿日期:2007-08-25

的培养愈伤组织可引起基因组 DNA 大规模的缺失和重排^[32,33]。

2 花粉植株倍性鉴定的方法

单倍体育种中, 尽早确定花粉植株的染色体倍性, 以便对单倍体植株进行人工加倍和更好的利用不同倍性的育种材料, 对于提高育种效率是非常必须的。要在有限的时间内鉴定大量的材料, 准确简便易行的方法尤为重要。

2.1 气孔保卫细胞长度

在显微镜下观察气孔保卫细胞的长度, 是近年来采用较多的单倍体鉴定方法。通过卡方适应性测定表明, 气孔保卫细胞长度在单倍体与二倍体植株间存在着真实差异。王培^[34]通过多次试验证明, 单倍体气孔保卫细胞长度一般在 $60\mu\text{m}$ 以下, 二倍体植株气孔保卫细胞长度一般大于 $65\mu\text{m}$ 。这种鉴定方法准确率在 90% 以上, 且操作方便、快速。

2.2 叶绿体数

国外学者在许多植物中发现染色体倍性与气孔保卫细胞叶绿体数呈正相关^[35]。已有报道 8 片真叶时用气孔保卫细胞叶绿体计数法判定烟草花粉植株单倍体和二倍体的方法, 准确率达 95% 以上^[36]。刘仁祥等^[37]以烟草展开第 5 叶为材料, 用植株气孔保卫细胞叶绿体数倍性分界法能早期、快速判定经秋水仙碱处理的烟草花粉植株是单倍体、二倍体或多倍体, 其判定结果与开花结实情况有非常高的吻合率。

2.3 细胞染色体数

染色体倍性鉴定, 传统上采用根尖、茎尖染色体直接计数。根尖、茎尖样品先用秋水仙碱、对二氯苯或 8-羟基喹啉水溶液预处理, 使中期染色体缩短。然后在 1:3 的冰醋酸-纯酒精中杀生固定。在固定液中停留 1~2 d, 根尖即可用醋酸-地衣红涂布或压碎法制片。在检查单倍体根尖细胞染色体数时, 应注意到: 由于单倍体植株根尖细胞具有二倍化的倾向, 也就是细胞中染色体组可能自然加倍, 因而仅进行根尖分析, 还不能完全为植物的染色体提供可靠的证据; 辅助的根尖以外细胞如嫩叶细胞, 花粉母细胞等的染色体观察也是必要的, 可以排除嵌合体的干扰。

2.4 同工酶分析

同工酶是基因表达的直接产物, 酶的变异较直接的反映了遗传物质变化的程度。通过选择某一同工酶为稳定杂合性的植株, 然后进行花药培养。起源于体细胞的植株其同工酶是由来自父母双方的杂合等位基因编码, 由于等位基因同工酶是共显性表达的, 因而再生植株表现出杂合的酶带类型。而来源于花粉的单倍体或自然加倍的植株, 各等位基因是纯合的, 在酶谱上表现出一条酶带。因此, 利用 2 种或 2 种以上由不同染色体

上基因编码的同工酶, 就可以准确的鉴定花粉起源的植株。Wu 和 Kiang^[38]首先利用酯酶同工酶的遗传多态性鉴定了水稻花粉植株, 以后该法在番茄、花椰菜、辣椒、杨树上取得成功的应用^[39,42]。

3 染色体加倍技术

花培再生的单倍体植株不能结实, 必须经过染色体的加倍才能得到育种所需要的纯合二倍体植株。为此对加倍技术的研究一直是花培育种所面临的重要的课题。完善的加倍技术必须简单、易行, 具有较高的加倍率, 且对植物有较低的伤害。

3.1 自然加倍

利用离体培养过程中染色体自然加倍的现象得到二倍体纯合植株是目前花培育种中最为常见的加倍方法。但自然加倍受多种因素的影响, 其中受花培物种影响最大, 如自然加倍率水稻花培为 70%, 烟草花培几乎为 0, 小麦的花培在 20%~30%。许多学者试图通过改善培养基成分、培养条件等提高自然加倍率。王培^[43]、欧阳俊闻^[44]提出小麦接种后 3~5 d 将培养温度提高到 32~34℃, 可将加倍率提高到 40% 左右, Torrey^[31], 胡含^[28]提出通过提高继代培养次数提高加倍率。

花粉植株自然加倍主要是通过核内有丝分裂进行的。核内有丝分裂与接种花药的发育时期, 培养基中激素的种类和水平, 花粉植株发生的方式以及愈伤组织继代培养时间的长短有直接关系。以烟草为例, 接种双核期花粉比接种单核期花粉能获得更多的二倍体; 在含有细胞分裂素的培养基上产生的愈伤组织比在不加激素的基本培养基上产生的愈伤组织的二倍体比率显著增高; 通过胚状体途径产生的花粉植株几乎都是单倍体, 而经由愈伤组织产生的花粉植株有不少是二倍体; 愈伤组织继代培养的时间越长, 二倍体比例越高。

3.2 人工加倍

利用离体培养过程中染色体自然加倍的现象得到二倍体纯合植株是目前花培育种中最为常见的加倍方法, 但自然加倍受多种因素的影响, 其中受花培物种影响最大, 如自然加倍率水稻为 70%, 烟草几乎为 0, 小麦的在 20%~30%。尽管自然加倍可以提供一定数量的纯合二倍体, 但仍有相当数量的单倍体植株需要经过人工加倍才能成为二倍体植株。

对染色体的人工加倍最早是采用物理方法如热冲击法, γ -射线冲击法等, 而最为有效的加倍方法是采用药剂处理, 除常用的秋水仙碱外, 还有一些有机杀菌剂^[45,46]。

人工加倍可以处理花粉离体培养脱分化期单倍体细胞^[47], 愈伤组织^[48,49]以及单倍体植株^[23, 50, 51]。染色体人工加倍最有效的方法是用 0.1%~0.5% 的秋水仙碱溶液处理生长点、芽或分蘖节。对烟草等双子叶植物来

说 将具有 3~4 片真叶的试管苗置于灭过菌的 0.4%秋水仙碱溶液中, 浸泡 24~48 h, 用无菌水洗净后再接种于新鲜培养基上, 可使单倍体幼苗有 25%左右加倍成为二倍体。另一种方法是处理生长在田间的单倍体植株的顶芽、腋芽或花芽, 用 0.2%~0.4%的秋水仙碱溶液浸过的脱脂棉球幼芽上, 为防止药液挥发, 每隔一定时间滴依次相同浓度的秋水仙碱溶液, 处理 24~48 h 后, 去掉棉球, 并用清水洗去残余药液, 经处理的幼苗 50%以上可以加倍结实。禾本科植物的染色体加倍, 一般采用加有助渗剂二甲基亚砷(1%~2%)的秋水仙碱浸泡分蘖节的方法。在分蘖盛期, 将花粉植株从土壤中挖出, 洗净根部泥土, 浸泡在秋水仙碱溶液中, 注意一定要将分蘖节没入药液中。处理应在较低温度和暗中或弱光下进行, 以免强光照射, 使秋水仙碱分解失效。处理完毕后, 用流水冲洗根部半小时, 充分洗去残留药液, 然后移入土中。由于不同植物对秋水仙碱的耐受能力不同, 因此秋水仙碱使用浓度的大小和处理时间的长短, 要视不同植物而异。例如, 小麦一般采用 0.04%秋水仙碱溶液处理 8 h, 水稻采用 0.2%的秋水仙碱处理 24 h。

3.3 花粉植株愈伤组织再生

近年来组织培养技术有很大进展, 用培养单倍体植物幼苗的根、幼芽、茎的基部或叶片中脉等组织的方法可获得自发加倍的二倍体植株^[52-53]。由于愈伤组织中核内有丝分裂频率较高, 因此再生植株二倍体的百分率也提高。Kasperbauer 和 Collin^[54] 用培养单倍体烟草植株的叶片中脉切段, 发现有“老”的叶片(生长达完全伸展后仍留在植株上已 3~4 周的叶片)的中脉直接再生形成的小苗中 1/3 是二倍体, 而由幼叶中脉培养出的都是单倍体。采用不同的组织培养, 加倍的效果稍有差异。Collin 等^[55] 的试验结果表明, 用烟草叶组织培养的加倍成功率为 67%, 而根部组织培养的加倍成功率则为 59%。

参考文献

[1] FABJANSKI S F, ALTOSAAR I, ARNISON P G. Heat shock response during anther culture of broccoli(*Brassica oleracea* var. *italica*) [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1991, 26: 203-212.
[2] LAZAR M D, SCHAEFFER G W, BAENZIGER P S. Cultivar and cultivar× environment effects on the development of callus and polyhaploid plants from anther cultures of wheat [J]. *TAG*, 1984, 67: 273-277.
[3] 韩凤来, 陈利明, 沈革志. 等. 石刁柏的花药培养与植株再生 [J]. *上海农业科学*, 1994 10(2): 85-88.
[4] RAGHAWEN V. Origin and development of pollen embryoids and pollen calluses in cultured segments of *Hyoscyamus niger* (Henbane), *Amer J J. Bot.*, 1978, 65: 984-1002.
[5] GUHA S, MAHESHWARI S C. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* in vitro [J]. *Nature*, 1966 212: 97-98.
[6] 王玉英, 郭仲琛, 李春玲. 甜柿子椒类(*Capsicum annuum* var. *gros-sum Bell*)花药培养的初步研究 [C]// 花药培养学术讨论会文集. 北京: 科

学出版社, 1977: 202-205.
[7] NISHI T S, SUOKA Mit. Occurrence of various ploidy plants from anther culture and ovary culture of rice plant. *Japan J. J. Genet*, 1969 44: 341-346.
[8] 陈英, 李良材, 朱进, 等. 水稻花粉植株的诱导条件及其遗传学表现的研究 [J]. *中国科学*, 1974(1): 40-51.
[9] OONO K. Production of haploid plants of rice (*Oryza sativa*) by anther culture and their use for breeding. *Bull. Nalt. Inst J. Agric. Sci.*, 1975 D26: 139-222.
[10] CHEN Chung mong, CHEN Chi-chang, LIN Ming-hua. Genetic analysis of anther-derived plant of rice [J]. *Heredity*, 1982 73: 49-52.
[11] 谷明光. 玉米花粉单倍体植株染色体上异染色质的变异 [J]. *遗传学报*, 1991, 18(3): 235-238.
[12] 胡含. 小麦花粉愈伤组织植株体细胞染色体的变异 [J]. *遗传学报* 1978, 5(1): 23-29.
[13] 胡含. 小麦花粉植株花粉母细胞染色体的变异 [J]. *中国科学* 1980 (5): 485-491.
[14] 黄佩霞. 晚粳鄂花一、二号的选育与花粉植株的观察 [C]// 花药培养学术讨论会文集. 北京: 科学出版社, 1978: 248.
[15] CHEN Ying, LI Liang-cai. Investigation of pollen-derived haploid plants in rice and wheat. [M]// *Proc. Symp. Plant Tissue Culture (Sino-Australian)*. Peking: Science Press, 1978: 199-212.
[16] KU(Gu) Ming-guang. Induction factors and morphocytologica characteristics of pollen-derived plants in Maize(*Zea mays*) [M]// *Proceeding of Symp. On Plant Tissue Culture*. Beijing: Science Press 1978: 35-42.
[17] OONO K. Test tube breeding of Rice by tissue culture [C]// *Proceedings of Symposium on Methods of Crop Breedings* 1978 109-120.
[18] SUNDERLAND N. The role of nuclear fusion in pollen embryogenesis of *Datura innoxia* [J]. *Planta*, 1974 117: 227-241.
[19] COLLINS G B. Meiotic analysis of haploid and doubled haploid forms of *Nicotiana glauca* and *N. tabacum* [J]. *Chromosoma*, 1972, 38: 287-404.
[20] 中国科学院遗传所三室二组. 诱导水稻花粉植株发生的某些因素及植株遗传学表现的研究 [J]. *遗传学通讯*, 1973(2): 13-25.
[21] NIZEKI H, OONO K. Induction of haploid rice plant from anther culture [J]. *Proc. Japan Acad.*, 1968, 44: 554-557.
[22] WOO S C, SU H Y, NG C M, et al. Seed formation on induced haploid plant and cytology of anther callus from hybrid rice [J]. *Bot Bull Acad Sin(Taipei)*, 1973, 14: 61-64.
[23] 孙天恩, 李珍珠, 余维堂. 水稻花培材料的差异性及花粉植株后代变异的研究 [C]// 花药培养学术讨论会文集 (1977). 北京: 科学出版社 1978: 245-247.
[24] 胡含, 庄家骏, 郝子英. 等. 小麦花粉植株的遗传学分系分析 [J]. *遗传学报* 1979 6(1): 3.
[25] KINOSHITA T. Fundamental problems on haploid breeding by means of anther culture in rice plants [J]. *Plant Tissue and Cell Culture* (ed. Alcio Fujiwara), 1982(5): 567-568.
[26] SACRISTAN M D. Cytotypic changes callus from haploid and diploid plants of *crepis capillaris* [J]. *Chromosoma(Berl)*, 1971, 33: 273-283.
[27] KAO K N, MILLER R A, GAMBORY O L, et al. Variations in chromosome number and structure in plant cells grown in suspension cultures [J]. *Can J. genet Cytol.*, 1970, 12(2): 297.
[28] 胡含, 郝子英, 贾双娥. 小麦花粉愈伤组织植株体细胞的变异 [J]. *遗传学报*, 1978, 5(1): 23-30.
[29] 刘贵仁, 严仁玲, 张磊. 等. 石刁柏花药培养与染色体倍性观察 [J]. *吉林农业大学学报* 1990(1): 5-9.

[30] SHIMADA T. Chromosome constitution of tobacco and wheat callus [J]. Japan J. Genet., 1971(4): 235-241.
 [31] TORREY J G. Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long-term plant tissue culture [J]. Physiol Plant, 1967 29: 265-275.
 [32] Hanada T, Guiderdoni E. Genetic selection in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. TAG, 1991 81: 406-412.
 [33] Muller E, Brown P T H, Hartke S. et al. DNA variation in tissue culture-derived rice plants [J]. TAG, 1990 80: 673-679.
 [34] 王培, 陈玉蓉. C17培养基在花药培养中应用的研究 [J]. 植物学报, 1986, 28(1): 38-45.
 [35] CHAUDARI H K, BARROW J Q. Identification of cotton haploids by stomatal chloroplast count technique [J]. Crop Science 1975, 15(6): 45-57.
 [36] 贾兴华. 用气孔保卫细胞叶绿体计数法测定烟草单倍体和二倍体 [J]. 中国烟草 1980(4): 46-53.
 [37] 刘仁祥, 黄莹. 烟草花粉植株染色体倍性的早期快速鉴定 [J]. 贵州农业科学 1998 26(6): 4-7.
 [38] WU L, KIANG Y T. Using an isozyme maker to detect pollen-derived plants from anther culture of wild rice [J]. Bot Bul Acad Sinica., 1979 20: 97-102.
 [39] Zamir D, Tanksley S D, Jones R A. Genetic analysis of origin of regenerated from anther tissues of *Lycopersicon esculentum* Mill [J]. Plant Science Letters, 1981, 21: 223-227.
 [40] ORTON T J, BROWER M A. Segregation of genetic marker among plants regenerated from culture anthers of broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) [J]. Theor Appl Genet., 1985 69: 637-643.
 [41] MUNYON I P. The origin of plantlets and callus tissue obtained by anther culture of chile pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro [J]. 1989, 25(3): 193-296.
 [42] STOEHE M, ZSUFFA L. Genetic evaluation of haploid clonal lines of a single donor plant of *populus maximowiczii* [J]. Theor Appl Genet., 1990,

80: 470-474.
 [43] 王培, 陈玉蓉. 培养温度对小麦花粉植株诱导频率的影响 [J]. 遗传 1982, 4(2): 31-34.
 [44] 欧阳俊闻, 周淑明, 贾双娥. 小麦花药培养对培养温度的反应. II. 不同基因型小麦花药的适宜温度 [J]. 遗传 1984 6(3): 11-15.
 [45] Hansen N T P, ANDERSEN S B. In vitro chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin and APM in *Brassica napus* microspore culture [J]. Physiologia Plantarum, 1995 95(2): 304-309.
 [46] GEOFFRIAUX E, KAHANE R, BELLAMY C. et al. Ploidy stability and in vitro chromosome doubling in gynogenic clone of onion [J]. Plant Science Limerick, 1997 122(20): 201-208.
 [47] 胡忠, 梁汉兴. 改进水稻花药培养的方法途径 [J]. 植物生理学报 1979, 5(2): 131-139.
 [48] 吴甲林. 玉米花粉植株的移栽、染色体加倍及形状观察 [Q] // 花药培养学术讨论会文集. 北京: 科学出版社, 1977: 237-238.
 [49] 胡忠, 梁汉兴. 提高水稻二倍体花粉植株诱导率的方法 [J]. 遗传 1979, 1(5): 37-38.
 [50] 李梅芳, 陈银全, 沈锦骅. 水稻花培后代性状遗传的初步研究 [M] // 沈锦骅. 水稻花培育种研究. 北京: 农业出版社 1983: 147-153.
 [51] 周朴华, 胡继华, 范鸿芝. 一种有效的水稻单倍体植株加倍法 (摘要) [M] // 沈锦骅. 水稻花培育种研究. 北京: 农业出版社, 1983: 240-241.
 [52] MURASHIGE T, NAKANO R. Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploidy plants [J]. J. Heredity, 1966 57: 114-118.
 [53] NITSCH J P. Production de *Nicotiana* diploids a partir de cals haploides cultives in vitro [J]. C. R. Acad Sci., Paris, 1969, 269(D): 1275-1278.
 [54] NITSCH J P. Haploid plants from pollen [J]. Z. Pflanzenzucht, 1972 67: 3-18.
 [55] KASPERBAUER M J, COLLINS G B. Reconstitution of diploids from leaf tissue of anther derived haploids in tobacco [J]. Crop Science 1972 12: 98-101.

The Chromosome Ploidy of Pollen-derived Plant and Technology of Reduplication

YUAN Hui-yan, JIANG Qian, ZHANG Qi

(School of Urbanology, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123 China)

Abstract: The research progresses of chromosome ploidy, ploidy identification and technology of reduplication of pollen-derived plant were introduced in this paper.

Key words: Pollen-derived plant; Chromosome; Ploidy

《北方园艺》常用计量单位表示法

1. 时间: 用 a(年)、d(天)、h(小时)、min(分)、s(秒)表示。
2. 面积: 用 km²(平方千米)、hm²(公顷)、m²(平方米)、dm²(平方分米)、cm²(平方厘米), 亩已废除, 可暂用 667m² 代替。
3. 质量: 用 g(克)、kg(千克)、t(吨)表示。
4. 浓度: 可用 % 表示质量分数和体积分数。质量浓度用

kg·L⁻¹(千克每升)、g·L⁻¹(克每升)、mg·L⁻¹(毫克每升)、μg·L⁻¹(微克每升)。ppm 已经不使用, 可根据具体情况改写成质量分数 mg·kg⁻¹、体积分数 μL·L⁻¹ 或质量浓度 mg·L⁻¹, 数值保持不变。

5. 组合单位

组合单位中不能加入其他信息, 如“V_C 含量 25 mg/100g 鲜重”, 应为“V_C 含量 250 mg·kg⁻¹(鲜样含量)”; “施肥量 140 kg N/hm²” 应为“施 N 肥量 140 kg·hm⁻²”; 组合单位书写错误, 如“mg/kg·d” 应为“mg·kg⁻¹·d⁻¹”。