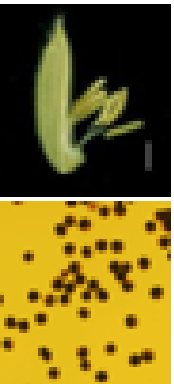


## 第6章 花药与花粉培养 (P133)

# 第一节 花药与花粉培养的意义

## 一、概念

- **花药培养**：是指将完整的花药接种到培养基上，诱导形成单倍体再生植株的方法；
- **花粉培养**：则是指将处于一定发育阶段的花粉从花药中分离出来接种到培养基上，诱导形成单倍体再生植株的方法,也称为小孢子培养(**microspore culture**)。



- 两者的异同点

- 培养目的相同，均获得小孢子植株。
- 花药培养属于器官培养；而花粉培养属于细胞培养。
- 花粉培养没有药壁组织干扰；可计数小孢子产胚率；可观察雄核发育的全过程；单倍体产量高。但技术更复杂。

## 二、花药与花粉培养的意义：

- 1、克服杂种后代性状分离，**缩短育种年限**：杂种**F1**花药培养，经过减数分裂，父母双方的染色体经过交换重组，育成花粉植株经染色体加倍，其后代性状经过重组并不再分离、从中选择符合育种目标的重组品系是稳定纯合的，**缩短育种年限（从7-8年变成4年左右）**。

# 控制杂种分离，缩短育种年限，加速F<sub>1</sub>代杂合体的纯化

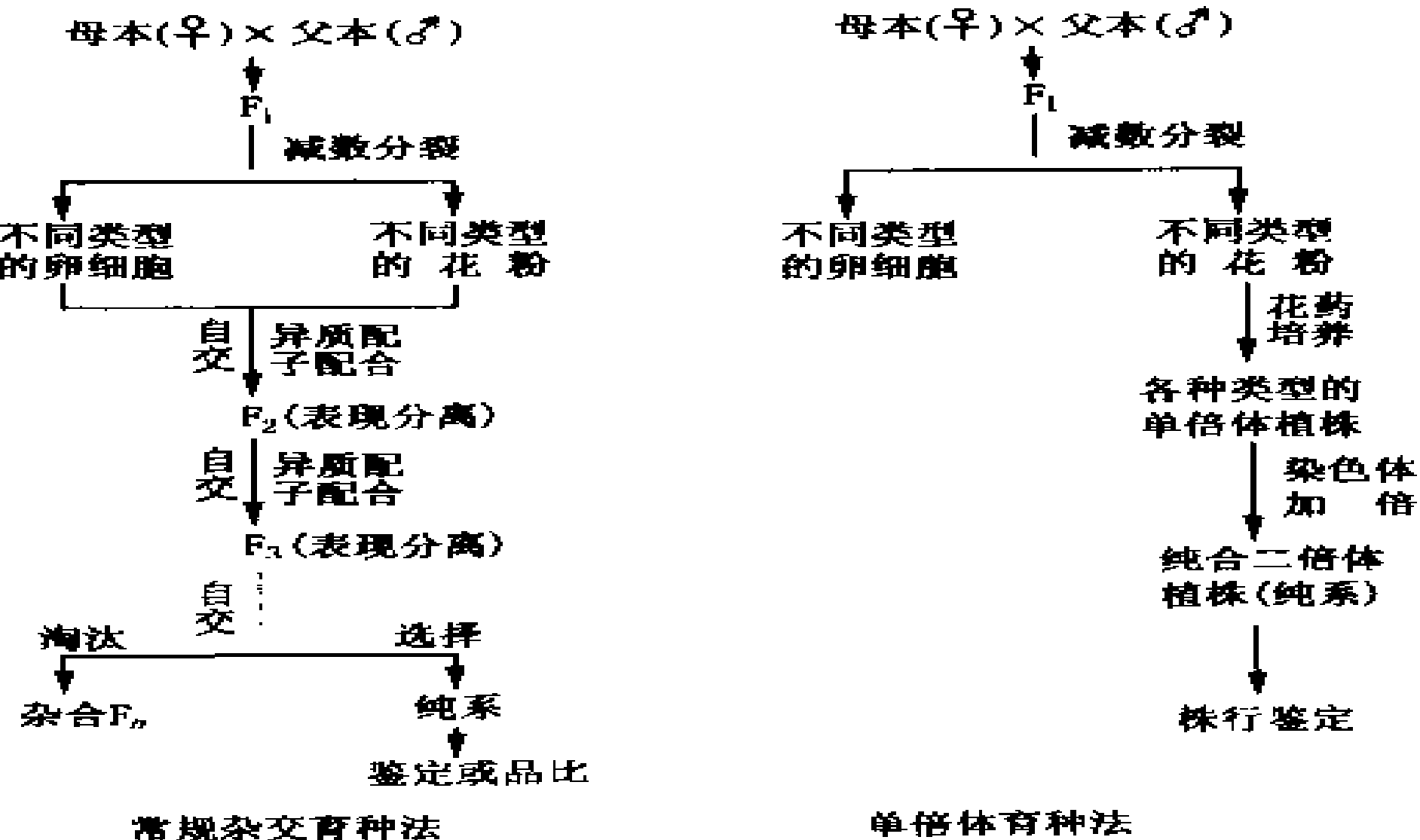


图 6-2 自花传粉作物常规杂交育种和单倍体育种程序比较

供体植株 小孢子 ( $n$ )	花培 雄核发育	花粉植 株 ( $n$ )	自然加倍 人工加倍	纯合植株DH ( $2n$ )
---------------------	------------	------------------	--------------	--------------------

一年内获得纯系

## 2、提高了目标基因型的选择效率

例子1:

二倍体供体植株基因型为*AaBb*，若要从后代中选择基因为*AAbb*的纯合单株

常规方法：*AAbb*出现的概率为1/16，并且不能将*AAbb*与*Aabb*、*aAbb*区分开。

	<u><b>AB</b></u>	<u><b>aB</b></u>	<u><b>Ab</b></u>	<u><b>ab</b></u>
<u><b>AB</b></u>	<b>AABB</b>	<b>AaBB</b>	<b>AABb</b>	<b>AaBb</b>
<u><b>aB</b></u>	<b>aABB</b>	<b>aaBB</b>	<b>aABb</b>	<b>aaBb</b>
<u><b>Ab</b></u>	<b>AabB</b>	<b>AabB</b>	<b><b>AAbb</b></b>	<b><b>Aabb</b></b>
<u><b>ab</b></u>	<b>aAbB</b>	<b>aabB</b>	<b><b>aAbb</b></b>	<b>aabb</b>

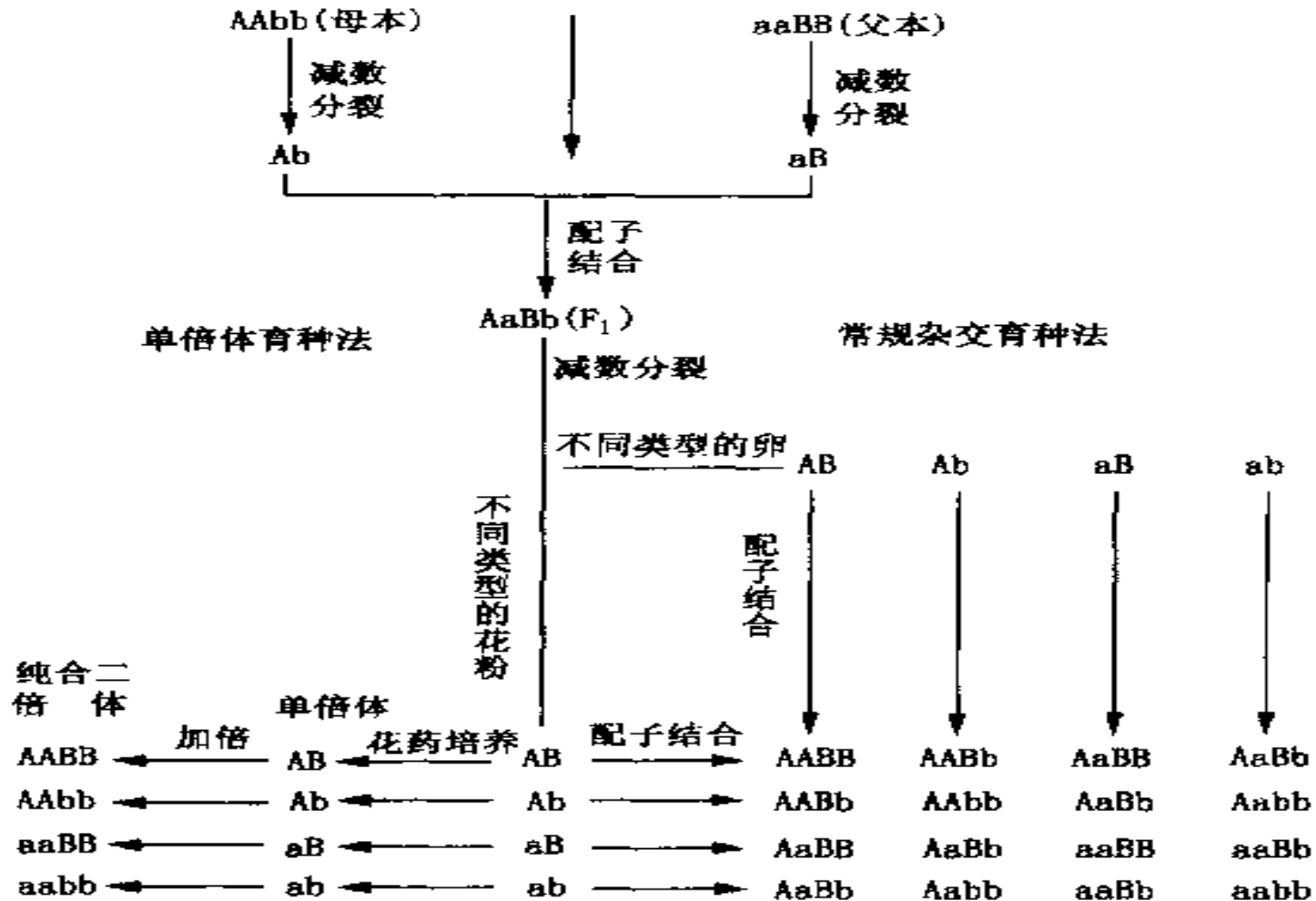
二倍体供体植株基因型为 $AaBb$ ，若要从后代中选择基因为 $AAbb$ 的纯合单株

单倍体方法： $AAbb$ 出现的概率为 $1/4$ 。

		<u>单倍体</u>	<u>二倍体</u>
供体亲本 $AaBb$	花培	$AB$ -----	$\rightarrow AABB$
		$aB$ -----	$\rightarrow aaBB$
		$Ab$ -----	$\rightarrow \mathbf{AAbb}$
		$ab$ --	$\rightarrow aabb$



# 提高常规育种的效率



如涉及多对基因，有些还有连锁关系，情况更复杂

# 提高常规育种的效率

## 常规育种

目标基因型比例  $1/2^{2n}$  (F<sub>2</sub> 群体)

$$1/2^{2 \times 12} = 1/16777716$$

## 单倍体育种

$1/2^n$  (花粉植株)

$$1/2^{12} = 1/4096$$

双亲性状差别为  $n$  对基因差别时，常规育种隐性纯合体 ( aabb--- ) 出现的几率为  $1/16777716$ ，单倍体育种隐性纯合体 ( aabb--- ) 出现的几率为  $1/4096$ 。两者选择效率相差 4000 倍，

上述实例明显看出，两者基因差别越多，选择效率相差越大。上例所选择的特定基因是隐性 ( aabb--- )。如果将选择的特定基因定为显性 (AABB---),那么两者的选择效率相差会更大。根据孟德尔分离定律，具有 A - B - 基因型的个体，占  $9/16$ ；具有 A - b -; a - B - 两种基因型个体各占  $3/16$ 。常规育种中由于杂合基因的干扰，想获得显性纯合基因型的个体就需要花更长的时间。

# 有利于隐性性状的选择

常规育种

亲本基因型 AAbb x aaBB

F1 基因型 AaBb

F1 配子基因型



F2 基因型 9A-B-:3A-bb:3aaB-:laabb

单倍体育种

AAbb x aaBB

AaBb

AB : Ab : aB : ab=1: 1: 1: 1 (花药培养单倍体)

染色体加倍



AAB B: AAb b: aaBB: aabb=1: 1: 1: 1

常规育种，双隐性纯合体 (aabb) F2 出现的几率为 1/16；单倍体育种双隐性纯合体 (aabb) 出现的几率为 1/4。两者选择效率差 4 倍。

**3、快速培养异花授粉植物自交系：**如玉米只要一年时间可获与多代自交效果相同的标准自交系，在果树林木多年生异花植物中通过花培获自交系，以利用杂种优势。

利用纯系进行遗传研究，**木本植物9科11属20种**获花粉植株，杨树、橡胶、柑桔、葡萄、苹果、荔枝、龙眼、枸杞、茶树。

木本植物：苹果**自花不孕**，很难获得完全纯合的无性系，通过花培已获得优良品种元帅，金冠、国光、赤阳、视光等花粉植株，成为杂交育种亲本和纯系间的杂种优势。

## 4、对单倍体植株的染色体配对行为的研究

1)进行染色体组型分析。

2)物种进化研究： 可探索亲本染色体组的构成。

分析单倍体植物减数分裂时，形成二价体的数目和形状，能确定染色体组内是否存在同源染色体。

**5、遗传分析** 单倍体植株中基因不受显隐性的影响，每一个基因的作用均能表现出来。能用来研究基因的性质及其作用。还可用于基因的剂量效应分析。

**6、构建连锁图谱** 双单倍体（DH）群体是永久性群体，能有效地用于遗传图谱的构建

**7、用作基础遗传研究的各个领域:**花药、花粉培养在研究细胞分化、激素诱导原理、胚胎发生、植株再生等遗传学、细胞生物学的理论问题上也具有重要意义.

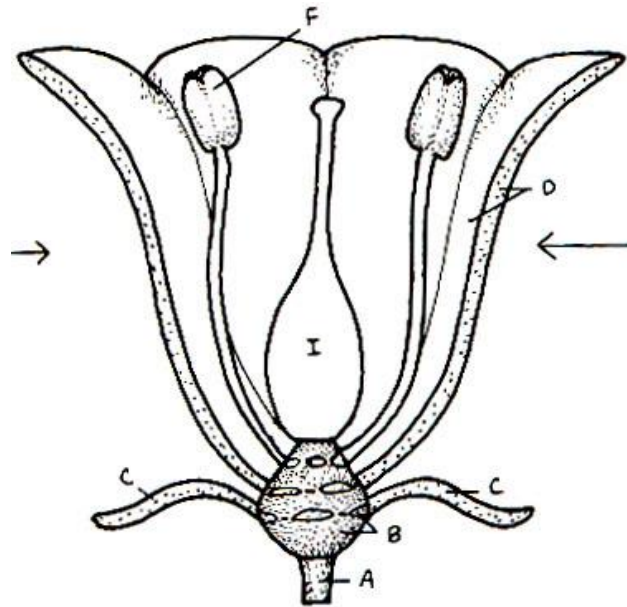
**Doy等（1973）**用拟南芥和蕃茄的花粉单倍体植株为受体，研究了大肠杆菌3个基因系统以病毒为载体的基因导入及随后的表达。

- 自然界中，单倍体频率**0.001-0.01%**，难以研究利用



## 植物单倍体培养方法：

- 花药培养、花粉培养
- 胚珠或子房培养（未受精）



### 三、单倍体诱导途径

- 1) 花药培养：直接将花药做为外植体，通过培养和诱导使得花药中的花粉改变发育途径形成单倍体植株。
- 2) 花粉培养：也称作小孢子培养，是将花粉从花药中分离出来，成为分散或游离的状态，通过培养使得花粉启动脱分化，进而发育成单倍体植株。
- 3) 染色体消除法：利用远缘杂交中杂合子亲本一方的染色体可以被自动排除，仅留下单一亲本的配子体染色体的特性，诱导单倍体植株。
- 4) 孤性生殖的诱导：对未授粉雌蕊、子房、胚珠进行离体培养，诱发孤性生殖，产生单倍体植株。

## 玉米单倍体诱导技术升级！中国农科院领衔利用基因编辑技术创制玉米单倍体诱导系

DH（双单倍体，Doubled Haploid, DH）育种技术是利用自然发生或人工诱导亲本产生单倍体植株，再通过自然或化学加倍获得二倍体纯合自交系。孤雌生殖单倍体诱导双单倍体育种技术是指利用父本较高频率诱导孤雌生殖性，诱导系（父本）与受体（母本）授粉杂交后，双授精的过程中，父本精核并未与受体卵核形成合子，诱导产生卵核单倍体结实，再通过染色体加倍形成遗传纯合系的育种技术。该技术仅需两个世代即可获得纯系，与传统育种选系遗传纯合需要7-8个世代相比，具有重要的技术优势与应用价值，已成为玉米育种选系的主要策略。因此，选育具有高单倍体诱导率的玉米株系具有重要的应用价值。

2018年7月16日，中国农业科学院作物科学研究所玉米基因编辑创新研究组联合中国农业大学在国际知名期刊 *Molecular Plant* 上发表了题为 *Genome Editing and Double Fluorescence Proteins Enable Robust Maternal Haploid Induction and Identification in Maize* 的研究论文，报道了该合作团队利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术定点突变创制了高效孤雌生殖单倍体诱导系，并为其配套了完善的组织特异表达的双荧光蛋白标记，以应用于单倍体鉴定。该研究为基因编辑技术创制作物孤雌生殖单倍体诱导系，并同时具备高效单倍体筛选与鉴定标记，为作物双单倍体育种技术体系提供了范例，具有很高的应用价值。

DH 关键技术环节包括单倍体诱导、单倍体筛选、染色体加倍。2017年，美国和中国科学家分别独立克隆了MATRILINEAL (MTL)/ZmPLA1基因，该基因突变能够提高玉米单倍体诱导的成功率【1,2】。在这项最新的研究中，研究人员采用基于CRISPR原理的RNA指导的Cas9核酸酶玉米基因编辑技术对玉米MATRILINEAL (MTL)/ZmPLA1基因自然突变发生位点上游5bp位置进行靶向突变，突变率达到87.06%。以杂交种ZY7、ZY8和该团队自主培育的杂交种中单99为受体，验证了所获诱导系能够高效诱导单倍体，诱导率可达11%，平均诱导率7.47%。

## 四、植物花药/花粉培养历史

1964年，印度Guha和Maheshwari对毛叶曼陀罗的花药进行培养并获得了单倍体植株，从此以后，这项技术被迅速推广。



毛叶曼陀罗

- 【功效】：定喘，风湿痹痛，脚气，疮疡疼痛。并作外科手术麻醉剂。
- 【性味归经】：辛，温，有毒。
- 【处方名】：洋金花、曼陀罗花
- 【拉丁名】：毛曼陀罗 *Datura innoxia* Mill.

- **Nitsch 和 Norreel (1973)** 烟草花粉培养（游离小孢子培养）  
**Chu (1973)** 小麦花粉培养

（早期花药培养主要依靠小孢子的自然胚胎发生产生单倍体，能自发形成胚胎发生的基因频率较低，效率极低）

- **80年代后期到90年代期间**，花培技术迅速发展。许多作物小孢子培养已经成功。十字花科、麦类、水稻、玉米等。
- **90年代**，一些先前被认为是不易进行小孢子培养的基因型也相续成功**Konzak (1999)**。

# 中国主要农作物

- 1、水稻 我国的水稻花培新品种主要有中国科学院李梅芳培育的“中花”系列丰产优质的粳稻新品种，还有各省、地农业院校和科研院所培育出的不同物点的粳稻和糯稻新品种，如晚熟粳稻“朝花矮”、“晚粳11号”（广西韩光禧），中晚熟抗病粳稻“浙农大40号”、“45号”，早熟籼稻“赣早籼11号”（江西农科院）等。
- 2、小麦 中科院遗传所育成的“花培1号”，北京农林科学院的胡道芬等用复合杂交F1代的花粉育成了第一个冬小麦品种“京花1号”，接着又育成了京花3号、5号等品种，以后，全国各地的农科院所也取得了丰硕的成果





### 3、玉米 广西玉米研究所杭玲等育成了玉米的花培品种“桂三1号”。

此外，在其他作物上也取得了一系列的成果，如在烟草上育成了“单育1号”，甜椒上育成了“海花3号”等这些成果都是通过单倍体育种获得的。



玉米



甜椒



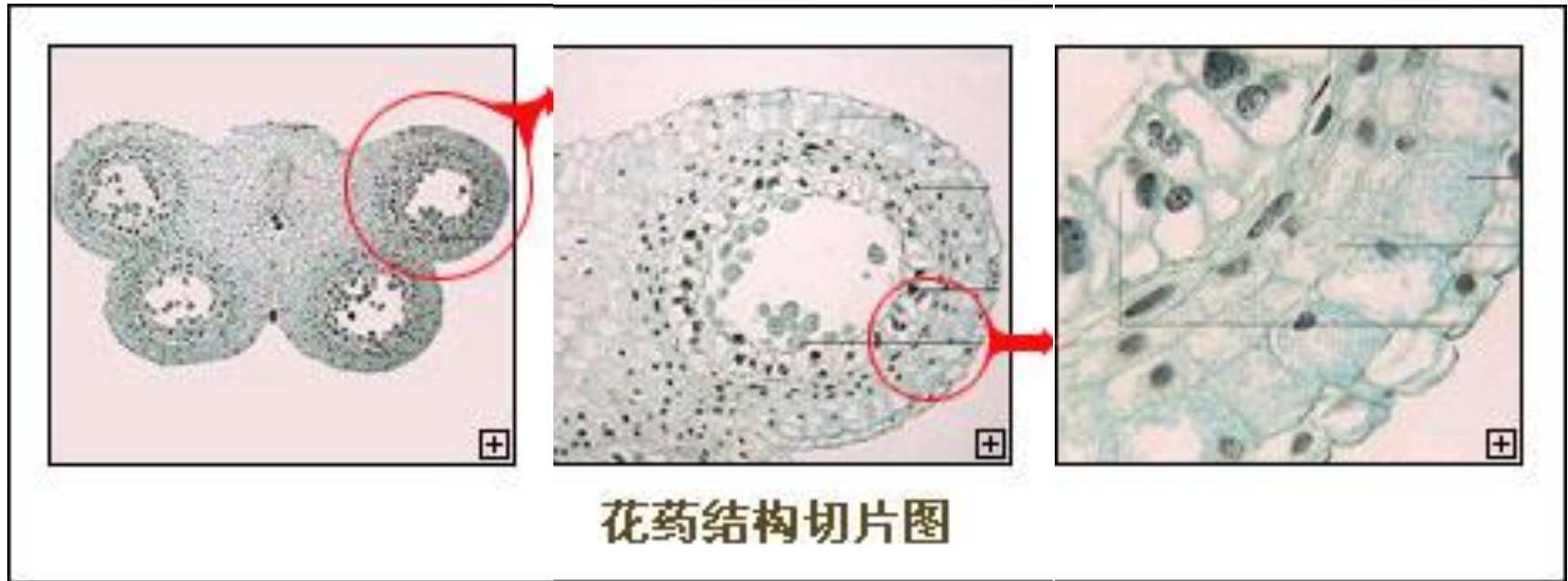
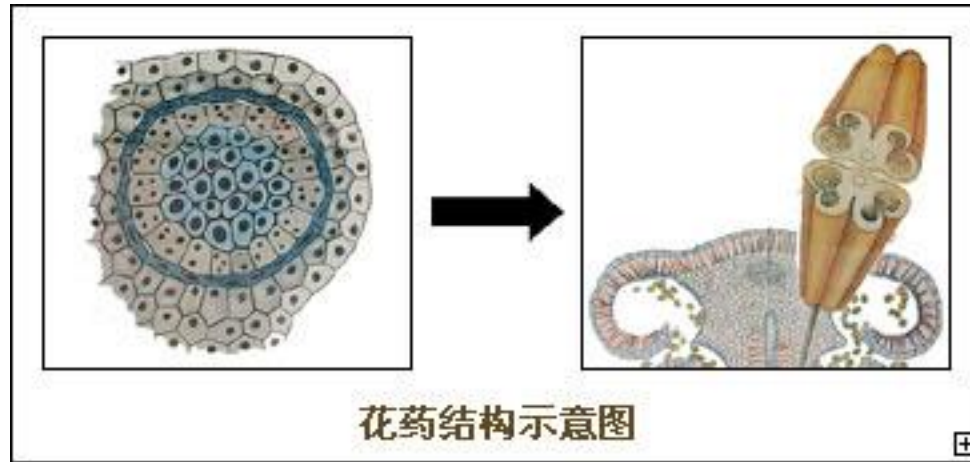
烟草



## 第二节、花药培养技术

# 一、花粉的发育

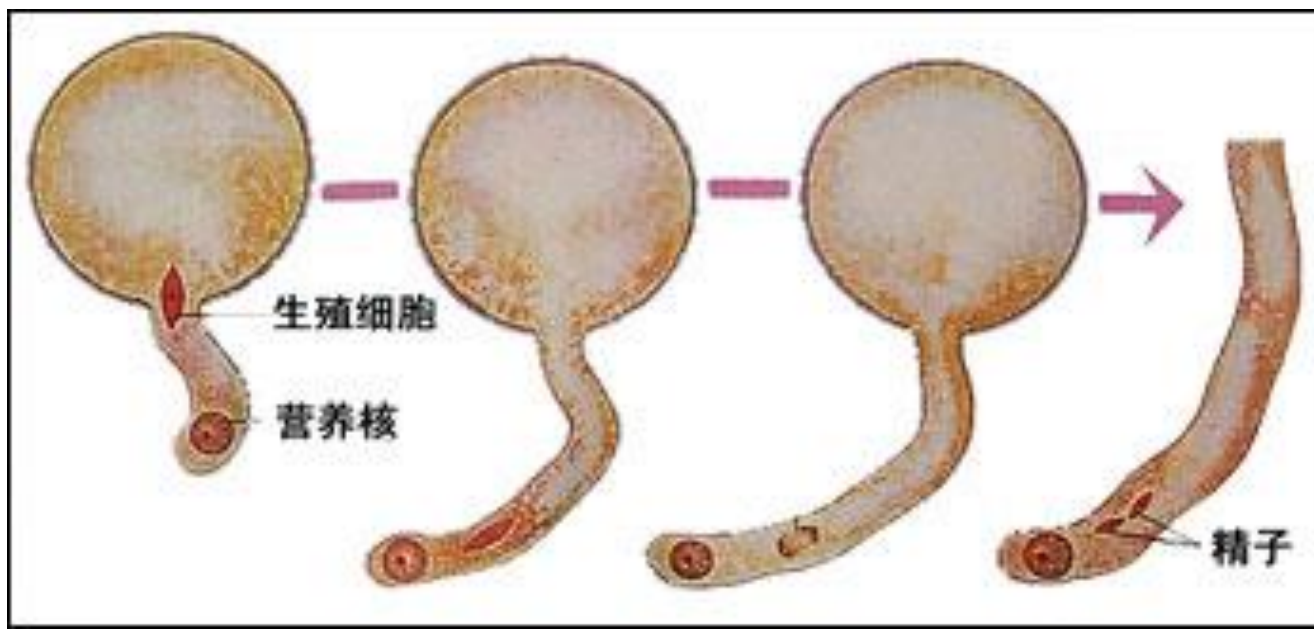
- 花药的结构：花药壁(2n)、药隔(2n)、花粉粒(n)



# 花粉的发育

- (1) 花粉母细胞减数分裂形成四分体
- (2) 胼胝质解体，四个小孢子分开，形成壁，体积增大，各有一个大而圆的核处于细胞中央，随后液泡扩大，核被挤向一边——“单核靠边期”，核中DNA复制。
- (3) 不均等有丝分裂，形成一个较大的营养细胞和一个较小的生殖细胞——“双核期”，或变为——“三核期”成熟花粉粒。

# 花粉粒的形成与发育



## 二、培养方法

### (一) 取材和预处理

选择适合的花粉发育时期非常重要，花粉发育的三个时期：

#### 1. 外植体的选择：

供试材料的遗传背景

供试材料的生理状态

花粉的发育时期

- 用醋酸洋红压片镜检选择合适的花药；
- 掌握该期植株的外部形态特征，选择大致处于该期的花蕾  
如烟草单核靠边期：萼片与花冠等长，花冠略伸出  
水稻叶枕距5-10cm，颖片达最后大小，淡绿色，花丝已伸长，花药顶达颖壳2/3，  
小麦：剑叶上部明显膨大，叶鞘尚未张开，看不到幼穗  
特征随品种栽培条件而有差异，每批材料需抽样镜检一下

- **取材时间：**上午**9**时—下午**4**时，雨水或露水未干以及高温烈日下不宜取材，接种时水稻取上部几个分枝的花药，小麦取中部小穗的花药。



## 2、花药预处理

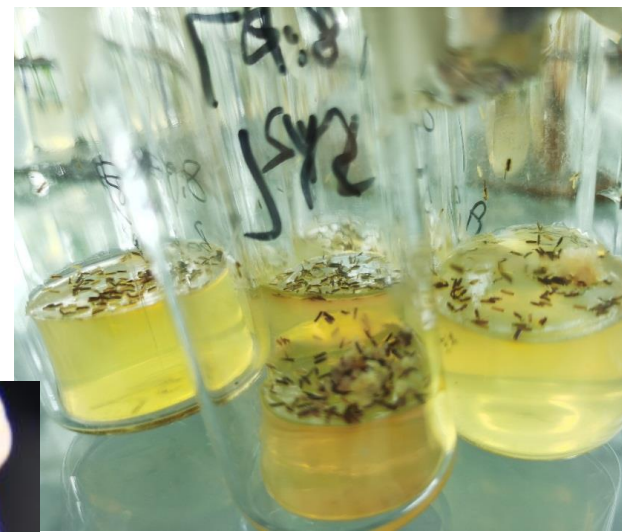
大量试验结果表明，花药培养前给予一定的低温处理是十分必要的。

- 烟草、茄子 **3~5°C 72小时**
- 水稻 **6-10°C 7~10天**
- 柑橘 **3°C 5~10天**
- 马铃薯 **4°C 48小时**

## (二) 灭菌与接种

- 花药被包裹在花蕾或幼穗中，处于无菌状态，表面消毒比较方便，水稻**70%**酒精擦拭后，剥开苞叶取出幼穗浸泡在饱和漂白粉溶液中**10-20**分钟（或**0.1%**升汞**7-10'**）无菌水冲洗**3-5**次，用消毒纱布包起来备用。

# 1. 花药接种



## 2. 花粉接种

## (1) 花粉的分离

1)自然散落法(漂浮培养散落小孢子收集法) 将花药接种在预处理液或液体培养基上，待花粉自动散落后，收集培养。

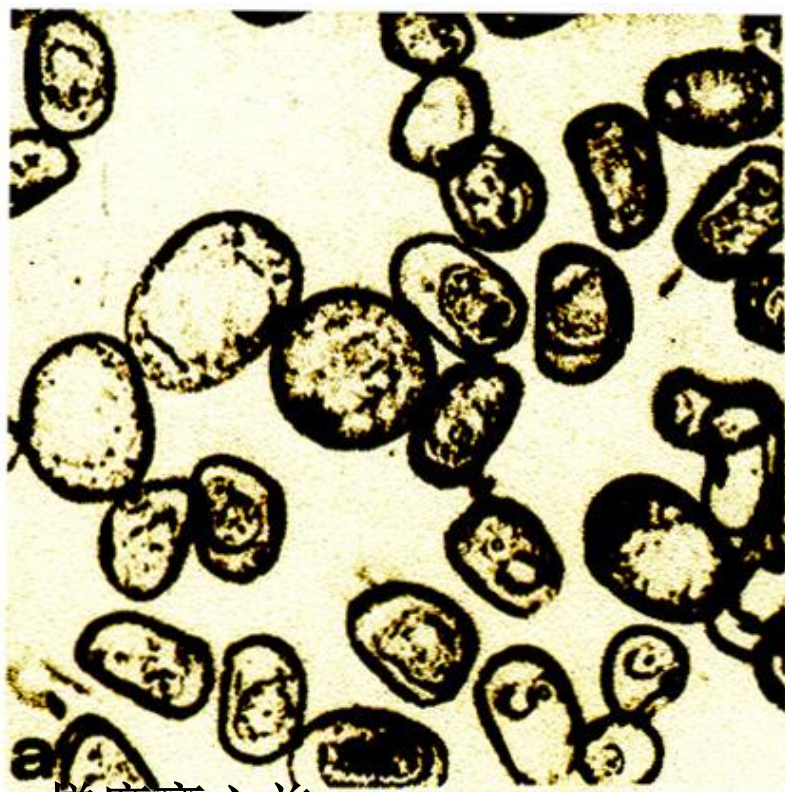
2)挤压法:将花药放入加有6%蔗糖溶液或液体培养基的小烧杯中，用注射器内管在壁上轻压花药挤出花粉。

### 3)机械游离

(1) 磁力搅拌法 用磁力搅拌器搅拌培养液中的花药，使花粉游离出来；

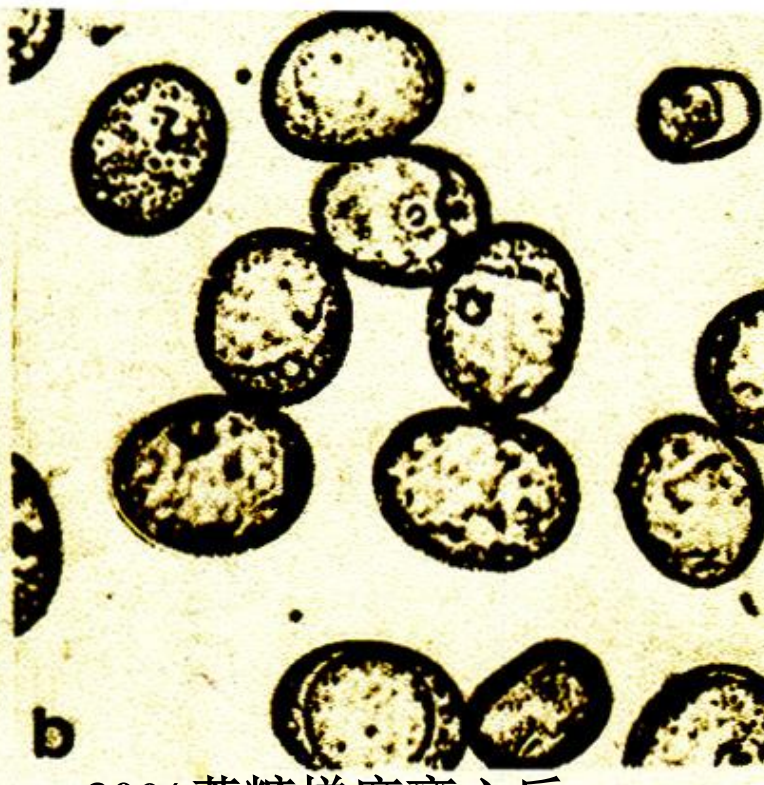
(2) 超速旋切法 通过搅拌器中的高速旋转刀具破碎花蕾、穗子、花药，使小孢子游离出来（此法应用最广）。

**(2)花粉纯化** 对上述方法获得的小孢子混合物进行分级过筛、梯度离心处理纯化小孢子



梯度离心前

(小孢子形态、活力不一致)



30%蔗糖梯度离心后

(获得均一的小孢子群体)

### **(3) 过滤和清洗：滤去药壁等残片**

将花粉混合液过滤（蕃茄**25 $\mu\text{m}$** ，烟草**40 $\mu\text{m}$** ，玉米**100 $\mu\text{m}$** ）。

收集滤液并离心，**200转/分**，离心**1分钟**，用吸管吸去含碎片的上清液，加入新鲜**6%蔗糖液**或培养基，振荡后再离心，重复**2次**，最后一次用液体培养基。



- (4) **计数**：为保证花粉培养的起始密度，用血球计数器测出1ml中所含花粉数目，一般为 $10^3$ - $10^5$ 个/ml.
- (5) 用吸管吸2.5ml悬浮液放入直径5cm的培养皿中，为使通气，液体涂薄些较好，花粉粒不没入培养基中太深，在25℃散射光500lux下培养。

## 植板密度

植板密度与花培效率有很大的相关性。 $5 \times 10^3$ 到 $2 \times 10^4$  / ml 密度均能有效培养。一般来说，足够数量的、但相对低密度的小孢子浓度有利于小孢子竞争营养、氧气、细胞分裂的空间，从而有利于胚状体发生。





### 三、培养基和培养条件(花药培养)

- 1、培养基：合适的培养基是花药培养成功的关键，花培常用的基本培养基有**Ms**、**Miller**、**N6**、**Nitsch H**、**Nitsch T**、**RM**、**White**等多种，根据不同的培养目的和不同的外植体来源而加以选择使用。
- 诱导培养基：基本培养基+生长素（**2,4-D**, **NAA**, **IAA**）（**1-5mg/L**）

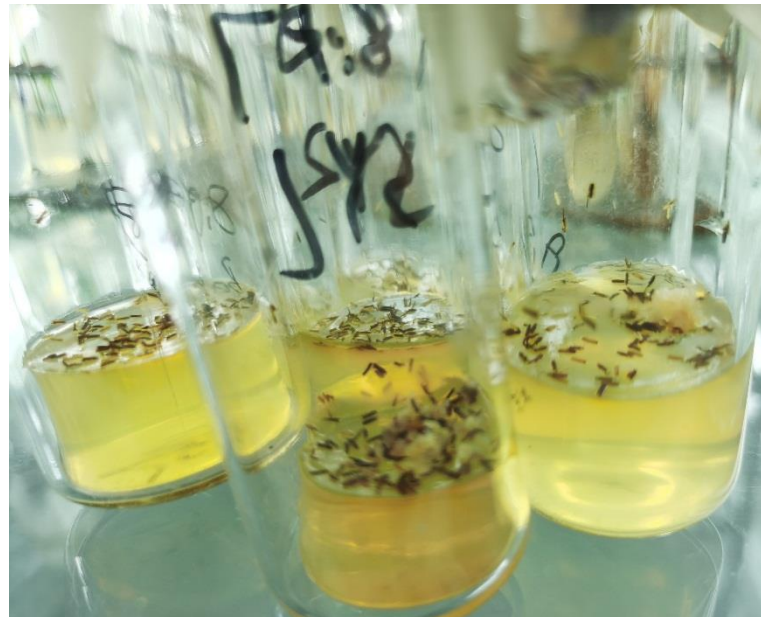
- 花药培养常用的激素有：

细胞分裂素类： **BA— 6-benzyladenine**

**KT— kinetin , Zeatin**

生长素类： **NAA, I A A, 2,4-D**

- 高浓度的**2,4-D**主要诱导花药形成愈伤组织，而不能形成花粉胚状体，从而增加了二倍体细胞发育的机会。



- 番茄花药培养对蔗糖浓度的诱导反应

蔗糖浓度 2% 3% 4% 6% 10% 13% 17%

诱导频率 5% 10% 12% 18% 25% 45% 8%

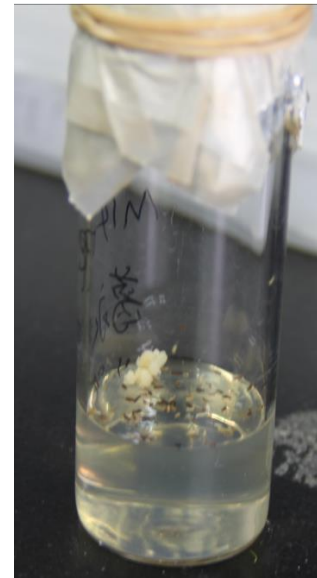


- **分化培养基**：常与诱导愈伤组织的基本培养基相同（无机盐含量，高的有利于分化）但去掉**2,4-D**，改用低浓度的**IAA**或**NAA**（**0.5-1mg/L**），如：烟草：直接产生胚状体，基本培养基用**Nitsch H**，不加或加低浓度的生长素（**IAA 0.1mg/L**）即可成苗。

水稻：诱导培养基：基本培养基**Miller**或**N6**、**合5**，**SK3**附加**2,4-D**（**2-3 mg/L**）（加**15%**椰子汁更好），

分化培养基：**Miller**或**N6**附加**KT**（**2mg/L**）**NAA**、**IAA**各**0.5mg/L**附加**15**椰子汁。

**一次成苗**：**Ms+2,4-D 0.01mg/L+NAA 3mg/L+KT 4.5mg/L**（**2-5株苗/1000个总数**）。



## 2、培养条件

(1) 温度：培养室温度在**20-28℃**范围，不同来源外植体要求的最适温度不同

如小麦宜在**18-25℃**，小麦在**33℃**条件下培养**3~5**天，可提高成愈率和绿苗率

水稻**28-30℃**，水稻：**25℃**培养**0.5%**花粉胚。处理：**35℃**培养**24h**→**25℃**培养**9%**花粉胚。温度超过**30℃**，白苗率高

烟草**25-30℃**为宜，曼陀罗低于**20℃**不能形成花粉胚。

柑橘在**20℃**以下，完全不能形成胚状体，且愈伤组织形成亦很少，当将温度提高到**21~25℃**时便会有胚状体形成，而当温度提高到**26℃**以上时又完全不能形成胚状体。

油菜若将接种后的花药在**30℃**条件下培养**2~3**天，可显著提高花粉胚的形成率

**(2) 湿度：相对湿度维持在75-85%间**

**(3) 光照：愈伤诱导:暗培养**

**分化:2000LX以上, 12-18小时以上**

## 四、花粉植株的诱导途径

### 1 愈伤组织的诱导

对培养发生反应的花药，在培养**3-8**周后，药壁逐渐变褐，由于愈伤组织或花粉植株的生长产生的压力，药壁破裂，长出愈伤或小植株。



- **水稻**：接种**3-4**周，花药变褐，药室纵裂，长出乳白色淡黄色愈伤，

**有二种类型：**

- ①花椰菜形，表面湿润，紧密,生长缓慢，易分化成苗。
- ②不规则形状，颜色白而透明，结构疏松生长快,不容易分化成苗

粳稻诱导率高达**15%**以上，籼和籼粳交**F1**，诱导率低，在**10%-5%**以下。

## 2 分化

愈伤长到**2-3mm**(绿豆大)转移到分化培养基

注意愈伤的**极性**，原来向上的面仍向上，移植后**30-40**天，可分化出芽和根，根芽的分化和愈伤的年龄有关，小麦和水稻以愈伤出现**7-15**天分化频率最高，出芽最快，随愈伤年龄增大分化率降低。

### 3 花粉植株的诱导途径

**(1) 胚状体发育途径**                      小孢子经历胚发生的各个阶段，最后子叶展开，形成花粉植株。

**(2) 愈伤组织发育途径**              小孢子分裂数次形成愈伤，再分化形成花粉植株。此途径产生的植株会出现变异且倍性复杂。

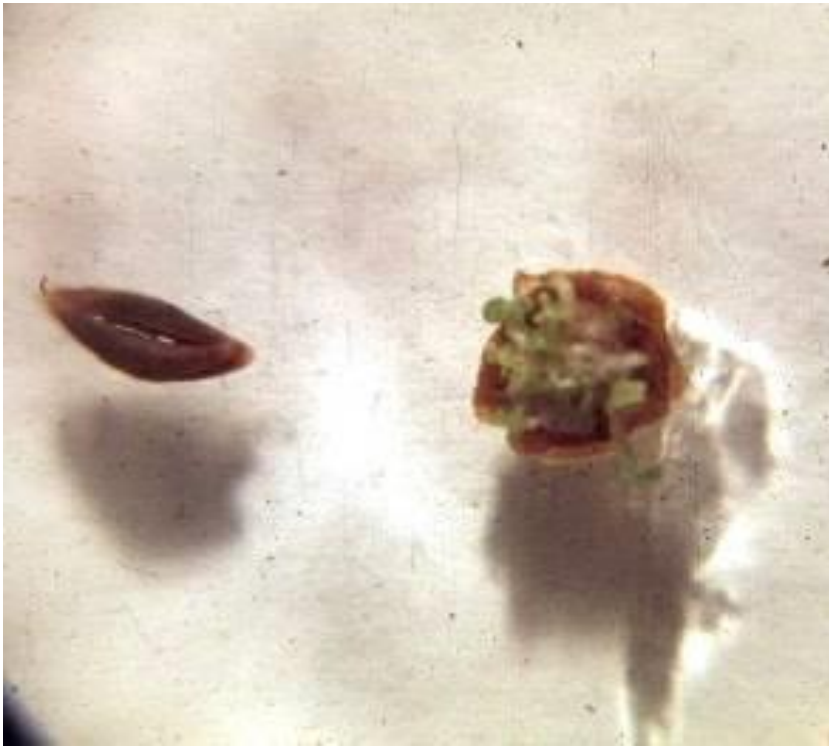
# 胚状体发育途径

## 烟草花药培养



部分花药通过胚状体途径形成小植株

## 烟草花药培养

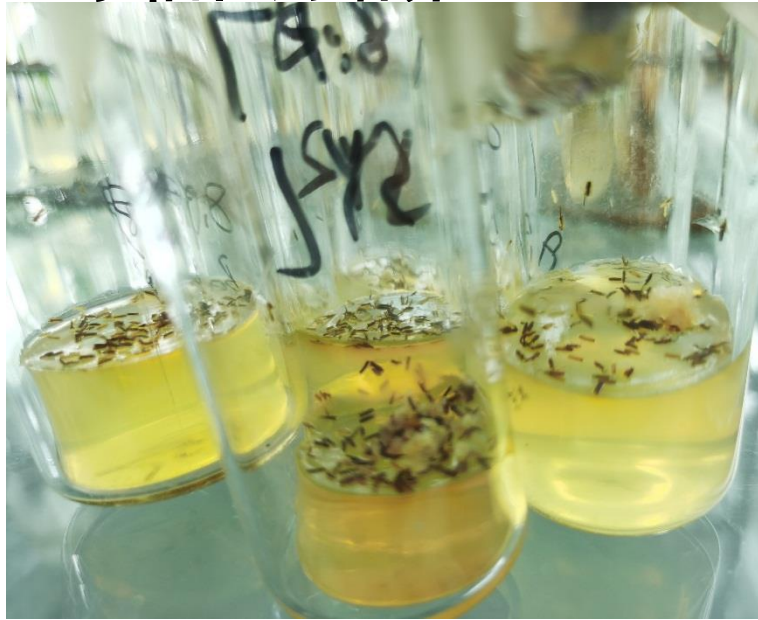


通过胚状体途径再生形成小植株



# 愈伤组织发育途径

## 水稻花药培养



### 3 壮苗:

- 新分化的幼苗细弱根系不发达，将它们转移到**1/2Ms**十多效唑+NAA的培养基上再培养一次，待根系长好即可移栽。



## (五) 移栽

## 第三节 单倍体植株二倍化

- 花药和花粉培养得到单倍体植物，经加倍就是可供育种上选择的纯系，但在花粉植株中混杂有不良性状（当代表现性状），要对花培材料进行选择，对培养规模、性状变异、染色体加倍等环节给予重视。

# 一、倍性鉴定

## 1、染色体直接计数法

通常取根尖、茎尖等分生组织区进行制片，直接计数染色体数目。

## 2、间接鉴定

- (1) 扫描细胞光度仪鉴定（流式细胞仪）      主要测定叶片单个细胞中 **DNA** 的含量确定细胞的倍性。
- (2) 细胞形态学鉴定法      叶片保卫细胞大小、单位面积上的气孔数及保卫细胞中叶绿体的大小和数目与倍性具有高度的相关性。
- (3) 植株形态学鉴定法      单倍体植株瘦弱，矮小，叶片、花、花药，气孔都小于 二倍体，花药空瘪，不结实。
- (4) 检查花粉育性

## 二、染色体加倍

单倍体植株由于染色体不配对，不能形成有活力配子，必须经自然或人工加倍后。**自然加倍**频率较低（但水稻可达**50%-70%**）

**（一）茎段培养** 将单倍体植株的茎段进行培养，诱导愈伤组织形成。由于单倍体愈伤组织在培养过程中会有一定频率的核内有丝分裂，从而形成二倍体细胞，分化出纯合的二倍体植株。

## （二）化学试剂诱变

有秋水仙素、Oryzalin、trifluralin、

APM等。

### 1、秋水仙素诱导

常用秋水仙素处理，其作用在于诱导细胞发生核内有丝分裂，低浓度时阻止纺锤丝形成，高浓度时可破坏纺锤体，使核、质无法分裂，而染色体已复制，收到加倍效果，（但也会造成染色体和基因的不稳定）形成混倍现象。

- （1）浸泡法 无菌条件下以一定浓度的秋水仙素浸泡再生小植株，再转移至新鲜培养基中培养。
- （2）生长锥处理 秋水仙素水溶液直接涂抹生长点（顶芽或腋芽）。
- （3）培养基处理 将单倍体植株和任何一部分作为外植体，种植在附加一定浓度秋水仙素的培养基中培养一段时间后，转入无秋水仙素的相同培养基中继续培养诱导胚状体。

### 2、除草剂诱导（毒性小，引起植株的变异几率小）

## 1)、烟草

- ①**1.5份浓度0.1-0.4%的秋水仙碱+1份羊毛脂混合成糊状，涂在腋芽或生长点上，成功率30-60%。**
- ②**棉花蘸上0.2-0.4%的秋水仙碱包在生长点或腋芽上，经常加药液保湿，24-48hr除药棉，成功率50%。**
- ③**0.2-0.4%的秋水仙碱液浸泡植株24-48hr，37%**

## 2)、水稻

**0.04-0.1%秋水仙碱液浸泡新生分蘖的基部。20-25℃下1-4天后洗净移入土中（自然加倍率40-60%）**

### 3) 小麦

分蘖期在分蘖节纵刻一刀口，在**0.03-0.04%**秋水仙液中，**15°C** 4天，洗净移植，**40%**。



# 本章小结

## 1. 花药与花粉培养的意义

## 2. 花药培养技术

花粉的发育

培养方法

培养基和培养条件

花粉植株的诱导途径

## 3. 单倍体植株二倍化