

# 植物花粉花药培养

山东农业大学生命科学学院

- 1964年，培养曼陀罗花药获得单倍体植株。
- 多种高等植物通过花药培养已获得单倍体植株，约1/4是我国首次培养成功的，一些优良品种已在生产上大面积推广。

植物花粉花药培养技术为植物育种基础研究开辟了一条新途径，或者说多了一种选择。

## 第1节 花药花粉培养的概念

# 一、花药和花粉培养的概念

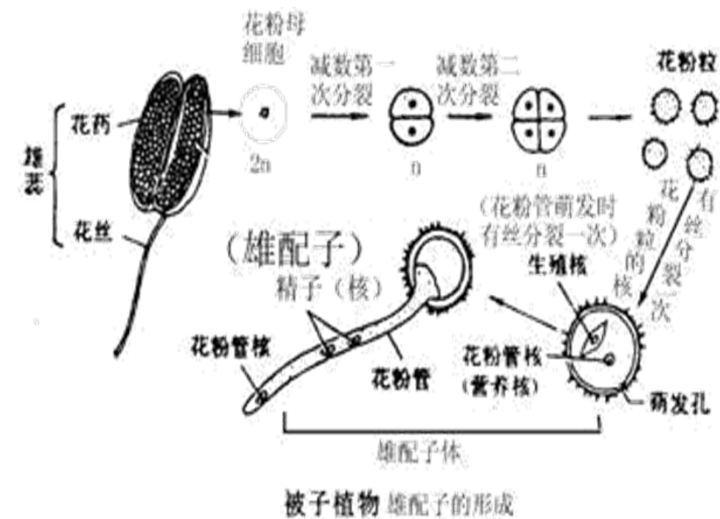
- 花药

植物花的雄性器官。

包括：

- ◆二倍的药壁和药隔组织

- ◆单倍的雄性性细胞-花粉粒

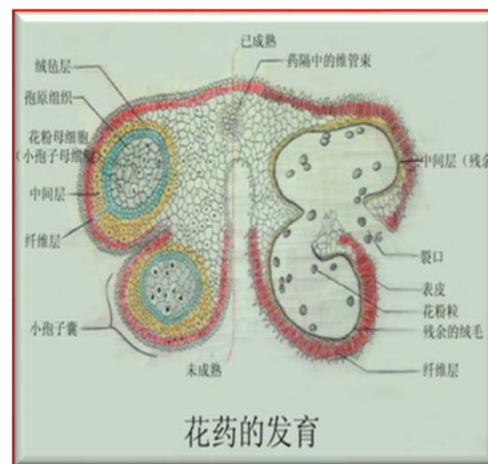


- 花粉培养

将花粉从花药中游离出来，分散成游离状态，接种在培养基上诱导培养，改变其发育途径，不形成配子，而进行分裂分化(像体细胞一样)，再生完整植株。

花药培养  
属于  
器官培养

花粉培养  
属于  
细胞培养



但两者培养目的一样，诱导花粉细胞产生单倍体植株。

- **花粉培养优越性** (与花药比) :

- ①不存在花药中的有害物质，不影响小孢子启动第一次分裂。
- ②排除了药壁、药隔、花丝的干扰，从小孢子中获得的材料是纯合的。
- ③小孢子能均匀地接触化学和物理诱变因素，是研究吸收、转化和诱变的好材料。
- ④小孢子培养可观察到雄核发育的全过程，是很好的遗传和发育研究体系。
- ⑤小孢子培养可从每个花药中获得更多单倍体。

## 二、植物花药花粉培养应用

- 单倍体植物只具有单套染色体组，本身没有多大价值，但经染色体加倍成为双单倍体后，与常规育种有机结合，育种优势巨大。
- 单倍体尤其是双单倍体与生物技术密切结合，使作物育种发生革命性的变化。

**双单倍体(DH)**

- 1. 作物育种

- ◆利用F1代杂交种的花药或花粉培养获得单倍体，经染色体加倍，可缩短育种周期，增加重组型的选择机率。

- 常规育种中双亲基因差别越大，双显性个体和双隐性个体的选择效率越低。
- 单倍体育种的双显性个体和双隐性个体出现的概率相等，从而提高了选择效率。



- ◆常规物理化学诱变，由于显性基因的掩盖，隐性基因在处理的当代不表现。
- ◆花粉诱变处理后，经离体培养再生，如有突变在当代植株中就会表现出来，经染色体加倍成为稳定的纯系。
- ◆将花药培养和抗病虫育种结合，导入抗病虫基因，培育抗病虫新的种质材料或新品种。
- ◆用于栽培品种提纯复壮、新型自交系选育等。
- ◆我国把花药培养与常规育种有机结合，已先后育成小麦、水稻、玉米、油菜等作物新品种。



油菜花儿开

- 2. 物种进化研究

- ◆查明其原始亲本染色体组的构成

- 利用单倍体材料可查明其原始亲本染色体组的构成。单倍体植物减数分裂时，形成二价染色体的可能性及其数目和形状，能够说明有无同源染色体：如果在单倍体减数分裂期发现大量的二价染色体，同时植株表现出高度可育性，说明核内有相同的染色体组，产生此单倍体的植物则是多倍体。

- ◆追溯染色体组之间的同源关系

- 通过对单倍体孢母细胞减数分裂时的联会情况分析，结合利用DH群体进行限制性片断多态性 (RFLP)、随机扩增多态性 (RAPD) 分析等，可以追溯各个染色体组之间的同源或部分同源的关系。

- 3. 遗传分析

- ◆单倍体是研究基因性质及作用最佳实验材料。单倍体细胞内每一种基因(无论是显性还是隐性)都只有1个，都能发挥其对性状发育的作用。
- ◆用单倍体培养技术已构建出多种植物的DH群体并用于遗传分析。
- ◆二倍体与单倍体杂交，可发生畸变类型，用于确定连锁群及基因剂量效应等遗传学研究。

- 4. 分子生物学

- 为构建RFLP和只RAPD连锁图，需要建立合适的作图群体。作图群体大致分为四类：

- ◆ 基于单交产生的F2群体

- ◆ 回交群体

- ◆ 重组近交系群体

- ◆ DH群体

回交(backcross, BC) 重组近交系(recombinant inbred lines, RIL)

- DH群体具有以下优点：
- ◆是一个永久性群体，所有等位基因都是纯合的，可无限地用于新标记的作图。
- ◆可重复进行检验，特别适合于抗性等数量性状的分析，从自交产生的10~20个植株的混合样品中，准确进行基因型的分子标记。
- ◆某些作物构建DH群体比构建RIL群体省时，如利用花药培养创建小麦DH群体并用于小麦数量性状基因座(QTL)遗传图谱的构建。

- 5. 植物基因克隆筛选

- ◆把已知的转座基因转化异源植物，通过转座因子标签法定向诱导突变体，已成为克隆植物基因的有效途径之一。
- ◆该方法关键是筛选到转座因子引起的表型突变体。
- ◆由于单倍体可直接表达隐性基因的性状，因此更适于在细胞水平筛选突变体。

## 第2节 花粉小孢子的发育途径

- 即花粉形成植株的途径。
- 离体培养条件下，花粉是产生花粉植株的原始细胞，其第一次有丝分裂，在本质上与合子的第一次孢子体分裂相似。
- 把小孢子或花粉沿孢子体途径发育成花粉植株的过程称为“**雄核发育**”。



## 一、活体小孢子发育途径

- 花粉发育时期对诱导雄核发育是极其重要的。花粉母细胞经减数分裂形成四分体，其有多种模式，以四面体和等二面体最普遍。
- 体细胞组织分泌出胼胝质到四分体表面；
- 花粉四分体的胼胝质壁溶解并释放出四个小孢子，小孢子细胞质浓厚，中央有一细胞核。
- 当液泡发生时，小孢子体积迅速增加，细胞核被挤向一边。

花粉母细胞 (pollen mother cells, PMCs)

- 第一次有丝分裂时，小孢子产生一个大而疏松的营养核和一个小而致密的生殖核。
- 第二次有丝分裂仅限于生殖核，形成两个精子，它们处在花粉或花粉管中。
- 小孢子从里到外被绒毡层、中层、药室内壁和表皮包围着。

## 二、离体小孢子发育途径

- 1966年，Guha等观察到毛叶曼陀罗小孢子形成胚状体的全过程，由此确定了小植株起源于花粉。

- 花药培养在其他物种上陆续取得成功，对小孢子形成花粉植株的形态发生过程进行系统研究观察发现：

①雄核发育的多种途径。

②雄核发育过程中出现的一些异常核行为和有丝分裂，如核融合、核同步分离、核内有丝分裂等。

这种细胞学上的变异可以解释有时花药培养中产生部分多倍体或混倍体植株的原因，为染色体变异后代植株的应用提供了细胞学依据。

## (一) 雄核发育途径

离体培养时，尽管雄核发育可在四分体时期和双核花粉期被诱导，但最适宜诱导的时期是第一次有丝分裂或之前。

- 小孢子在培养过程中呈现不同的发育模式。不同种植物的雄核发育途径不同。
- 一般根据小孢子第一次有丝分裂的情况将雄核发育分为A途径(不均等分裂)和B途径(均等分裂)。
- 其中，A途径又根据第二次分裂及其以后的情况细分为A-V途径、A-G途径、A-VG途径(又称E途径)及C途径。

小孢子的第一次有丝分裂按配子体方式进行，为不均等分裂，形成营养细胞和生殖细胞（或营养核和生殖核）又可分为以下几种途径

多细胞花粉（或多核花粉）由营养细胞重复分裂衍生而成，生殖细胞以游离核的形式存在一个周期后退化，或分裂一至数次存在于多核花粉的一侧，有的甚至到球形胚形成仍存在。生殖核并不参与花粉孢子体的形成，在花粉中往往可以观察到生殖细胞的存在。

生殖细胞进行多次分裂，形成胚状体，营养细胞不分裂或者仅分裂数次形成胚柄结构。由生殖细胞形成的细胞群其核致密，染色后着色较深，容易同营养细胞衍生而来的细胞群区分开来。

## 雄核发育

根据小孢子第一次有丝分裂的情况

A 途径  
(不均等分裂)

B 途径  
(均等分裂)

根据小孢子第二次有丝分裂的情况

A-V途径

A-G途径

A-VG途径  
又称E途径

C 途径

又称 E途径。花粉内的营养细胞和生殖细胞独立分裂，形成两类细胞群，各群的子细胞都类似其母细胞。

小孢子第1次有丝分裂为均等分裂，形成两个大小相近细胞（或游离核）后，由这两个细胞（或游离核）连续分裂产生单一类细胞组成的多细胞花粉或多核花粉。

获得的花粉植株群体中除单倍体外，常有相当比例二倍体、三倍体、四倍体、非整倍体等植株，即小孢子培养过程中自发加倍现象。Sunderland 1977年提出C途径，即生殖细胞和营养细胞通过核融合后共同形成多细胞花粉，产生非单倍体植株，生殖核与营养核共同参与了花粉植株的形成。

## (二) 雄核发育的启动机理

### 1. 雄核发育与P-花粉的形成

- 无论雄核发育采用哪种途径，孢子或雄配子体都是偏离了正常的发育途径，形成了形态不同于正常花粉的胚性花粉粒（核位于花粉粒的中心，醋酸洋红压片观察，花粉粒着色较浅，有液泡和两个清晰着色的核）。
- 这类花粉是具潜能的胚胎发生花粉，体积小，细胞质稀薄，不积累淀粉，染色浅或不着色，将其称为P-花粉（或E-花粉或小花粉或不染色花粉）。

胚胎发生花粉 (potenti ~ embryogenic pollen) 小花粉 (small pollen, S-花粉) 不染色花粉 (nonstain pollen, NS-花粉)

- 小孢子胚胎发生的起源有两种说法：
- ①只有P-花粉在离体条件下才能诱导胚胎发生，而这类花粉在供体植株花药内就已经决定，但是可通过调节供体植株的生长环境及利用某些化学物质喷洒于植株上，提高P-花粉的数目，提高花药培养效果；
- ②只有P-花粉才有胚胎发生能力，花药在离体条件下通过不同的预处理，可使花药内大量具有成熟能力的花粉转变成P-花粉，所以预处理后培养效果明显提高。



- **2. 雄核发育与饥饿处理**

- 花粉短期饥饿处理，再供给发育所需营养，对花粉胚胎发生非常重要。饥饿可改变小孢子发育的方向。
- 饥饿对花粉营养核DNA复制的影响。花粉在正常发育过程中，小孢子完成减数分裂形成雄核和营养核后，雄核在很短的时间内就进入s期，开始DNA的复制，使DNA的含量达到2C水平。营养核DNA在整个孢子体花粉发育过程中，一直保持1C水平，即保持在G1期或C0期。

- 但是，如果对未成熟花粉进行一种饥饿处理，则雄核 DNA完成复制后，大部分花粉粒的营养核也随之开始DNA的复制。此结果表明，对花粉胚胎发生的诱导，最关键的过程之一是对停滞在G1期营养核的去抑制作用。但这种去抑制作用需要一系列生理生化过程来实现。
- 如：Zarsky等(1990)研究了饥饿作用对烟草未成熟花粉生化和细胞学方面的影响。结果发现引起花粉粒内蛋白质、水溶性糖、淀粉和 RNA量的减少，引起线粒体退化。表明饥饿作用：

- ①引起配子体细胞质的正常形成过程中止。
- ②引起含有中心球结构的花粉粒 (C-type) 形成，这种花粉以后转移到胚胎发生培养基上，可形成前期胚状体。
- ③还引起液泡花粉粒 (V-type) 形成，在下一步培养过程中，绝大多数死亡。
- ④引起核体积减小，这间接地说明配子体核糖体形成的中止。核糖体形成的中止再结合蛋白质和RNA含量的减少，表明在饥饿花粉中携带配子体发育途径的信息分子退化或消失。

- ⑤引起  $\text{Ca}^{2+}$  的重新分布，这种变化与胚胎发生有关。饥饿可能通过配子体细胞质退化、 $\text{Ca}^{2+}$  的重新分布以及结构的变化从而导致营养细胞的去抑制作用，使之进入S期，这是花粉胚胎发生的前提。
- ⑥在非洲菊愈伤组织上发现，连续5d饥饿处理会诱导蛋白质和碳水化合物含量的减少，但是谷氨酰胺脱氢酶及蛋白酶的活性分别达到对照的5倍和2倍。
- 甘露醇预处理能引起大麦花药内源激素 (ABA, IAA, 2-ip) 含量和过氧化物酶活性急剧增加、花药内可溶性蛋白质种类及含量发生变化，最终引发小孢子脱分化。甘露醇预处理，能明显提高花粉存活频率，改变小孢子发育途径，促进小孢子DNA复制和染色体数目的加倍。

- 饥饿作用机制

- 饥饿可能使本来停止在G1期的营养核重新启动，开始DNA的复制和进一步发育。
- 首先诱发内源激素 ABA含量增加，进而导致mRNA、蛋白质和糖等一系列相应的生理生化变化，最终启动营养核 DNA的复制开始花粉胚胎发生。

### 三、花粉植株形态发生方式

- 如果不考虑小孢子核的早期分裂行为，花粉植株的形态发生有两种途径，即：
  - ① 胚状体发育途径 (直接发生途径)。
  - ② 愈伤组织发育途径 (间接发生途径)。

- 1. 胚状体发育途径

- 这种途径中小孢子的行为与合子的一样，经历了如同活体条件下诱导胚发生的各个阶段。
- 如烟草，大多数处于球形胚阶段的胚，从花粉粒外壁释放出来进一步发育，4~8周内子叶展开，在花药上可见到花粉植株。

- **2. 愈伤组织发育途径**

- 与胚状体发育途径相比，小孢子没有经历胚发生阶段，分裂数次形成愈伤，从花药壁上冒出来。这种发育方式很普遍，是由复杂的培养基打破了小孢子的极性造成的。这种愈伤组织要么在同一培养基上分化形成胚、根、芽，要么必须转到另一培养基中分化。
- 一般这种途径是不希望出现的，这种途径产生的植株会出现遗传变异且倍性复杂。



## 第3节 植物花药花粉培养技术

## 一、植物花药培养

- 在适宜的气候条件下，从生长健壮的植株上选取一定大小的花蕾。先用醋酸洋红压片镜检，观察花粉的发育时期并确定花蕾大小与花粉发育年龄的相关性，根据所得结果采集一定大小的花蕾。
- 未开放花花蕾中的花药为花被包裹，处于无菌状态。
- ①用70%的酒精棉球擦洗花的表面即可。
- ②可先70%酒精浸泡30~60s，然后1%次氯酸钠浸10~20min或0.1%氯化汞消毒3~10min，无菌水冲洗3~5次。

- 花药消毒前也可进行各种预处理，处理方式因物种而异。
- 无菌条件下取花药时要特别小心，防止花药损伤，因为花药受损常会刺激花药壁形成愈伤组织，同时这种损伤可能也会使花药产生一些不利于培养的物质。
- 选用琼脂固体培养基或液体培养基均可。一般先在25℃有光或黑暗条件下进行脱分化培养。
- 2~3周后，花药中的小孢子经大量分裂形成胚或愈伤组织，并逐渐撑破花药壁，好似花药表面形成的突出物。
- 转入分化培养基上，经过4~5周培养，形成小植株。

## 二、植物花粉培养

- 花粉培养需将花粉从花药中分离出来。以单个花粉粒作为外植体进行离体培养。所以与花药培养相比，花粉培养前必须进行花粉的分离与纯化。

## (一) 花粉分离与纯化方法

### 1. 自然散落法

- 花蕾消毒后取出花药，接种在培养基上。一段时间后，花粉囊自动裂开，小孢子散落出来，收集小孢子，用新鲜培养基调整密度后培养。
- 此法操作简单，不需专门仪器，可以连续收集，在水稻、大麦、小麦、玉米上已成功采用。
- 此法效率低，易受花药组织影响。

- **2. 挤压法**

- 消毒花药置于适量提取液中，轻轻挤压花药将花粉释放到提取液中，过筛除去比小孢子大的组织碎片，经离心沉淀小孢子，清洗2~3次，制成小孢子悬浮液用于培养。
- 此法简便易行，不需专门装置，可分离单花蕾或花药，用于在大麦、小麦、玉米、水稻等作物。
- 此法不宜大规模游离小孢子，受操作因素影响大。

- 3. 研磨过滤收集法

- 与挤压法相似，不同之处是把消毒过的花蕾置于无菌的研钵中研磨，挤出小孢子。
- 此法用于甘蓝、大白菜、小白菜、红菜苔等小孢子培养。

- 4. 磁搅拌法

- 将花药接种于盛有培养液的三角瓶中，放入磁棒置磁力搅拌器上，低速旋转至花药透明。
- 该法分离花粉比较彻底，但对花粉有机械损伤，所需时间长，用得不太普遍。

- 5. 小型搅拌(超速旋切)法

- 小型搅拌器用不锈钢或耐高温塑料制成。通过刀具高速转动使花药破碎，游离出小孢子。
- 设备可更换多种型号，方便灭菌，操作方便，重复性好，可一次处理大量材料，最早用于油菜小孢子的提取分离培养。
- 油菜花序，玉米、大麦、小麦雄穗切段等均可直接放入容器中处理。提取小孢子所需时间短，得率高，成活率高，应用广泛。



- 6. 小孢子分离和纯化

- 提取的小孢子混合液，需经过过筛、离心等除去杂质。
- 采用花序或穗切段时，杂质甚至比小孢子量还要多。
- 不同物种甚至同一物种不同品种所用的筛子孔径由于小孢子的大小不同而有所不同。
- 采用级联过筛时，第一级可以选用孔径较大的，以便使大杂质去除，最后一级应选用略大于小孢子直径的筛子。
- 过筛，一般经80~300g离心收集小孢子。

- 各种作物小孢子的密度不同，需要经实验调整，获得理想的小孢子得率和成活率。
- 使用聚果糖、聚蔗糖、蔗糖配成不连续梯度纯化小孢子，获得同步性较高的群体。
- 用聚果糖梯度纯化大麦小孢子，结果为：
  - 0 / 20%梯度界面小孢子成活率70%
  - 20% / 30%界面小孢子存活率4%
  - 30%以上的只有碎片和已死的小孢子

## (二) 花粉培养方式

- 1. 平板培养

- 花粉置固体培养基上培养获得胚状体，进而分化成植株。

- 2. 液体培养

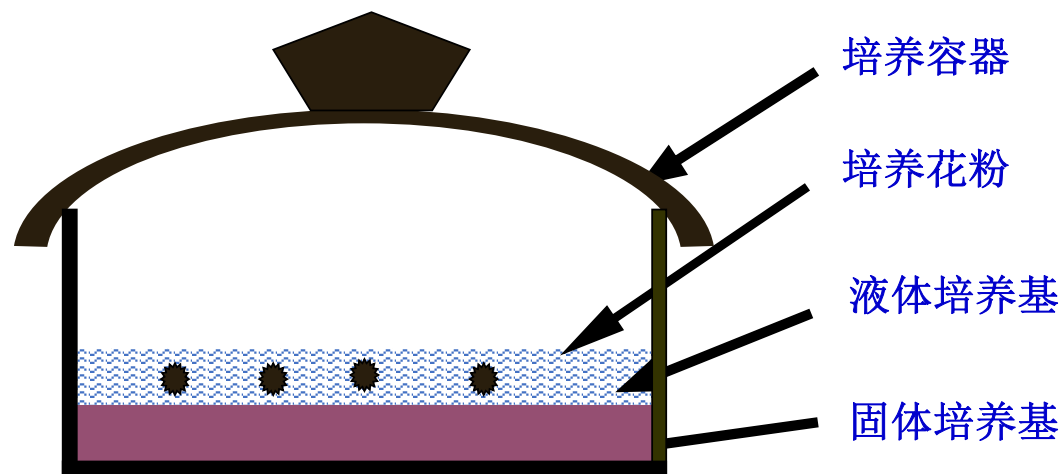
- 花粉悬浮在液体培养基中培养。液体培养易通气不良，影响细胞生长分裂，将培养物置于摇床上震荡，使其处于良好的通气状态。

- 3. 双层培养

- 花粉置固体—液体双层培养基上培养。

- 双层培养基的制作方法：

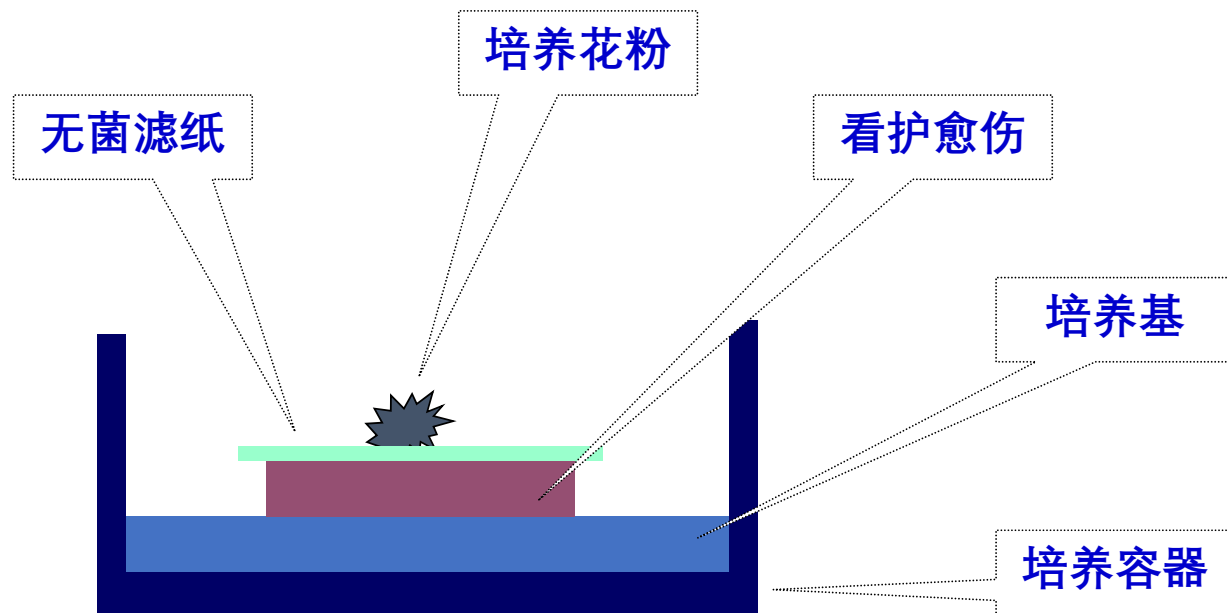
- 在培养皿中铺加一层琼脂培养基，待其冷却凝固并保持表面平整，然后在其表面加入少量液体培养基。



花粉固—液双层培养设计示意图

- 4. 看护培养

- 配制好花粉粒悬浮液和琼脂固体培养基后将完整的花药或花药的愈伤组织放在琼脂培养基上，将圆片滤纸放在花药或愈伤组织上，然后将花粉置于滤纸的上方。
- 用此法培养番茄花粉形成了细胞无性繁殖系。



花粉看护培养设计示意图

- 5. 微室培养

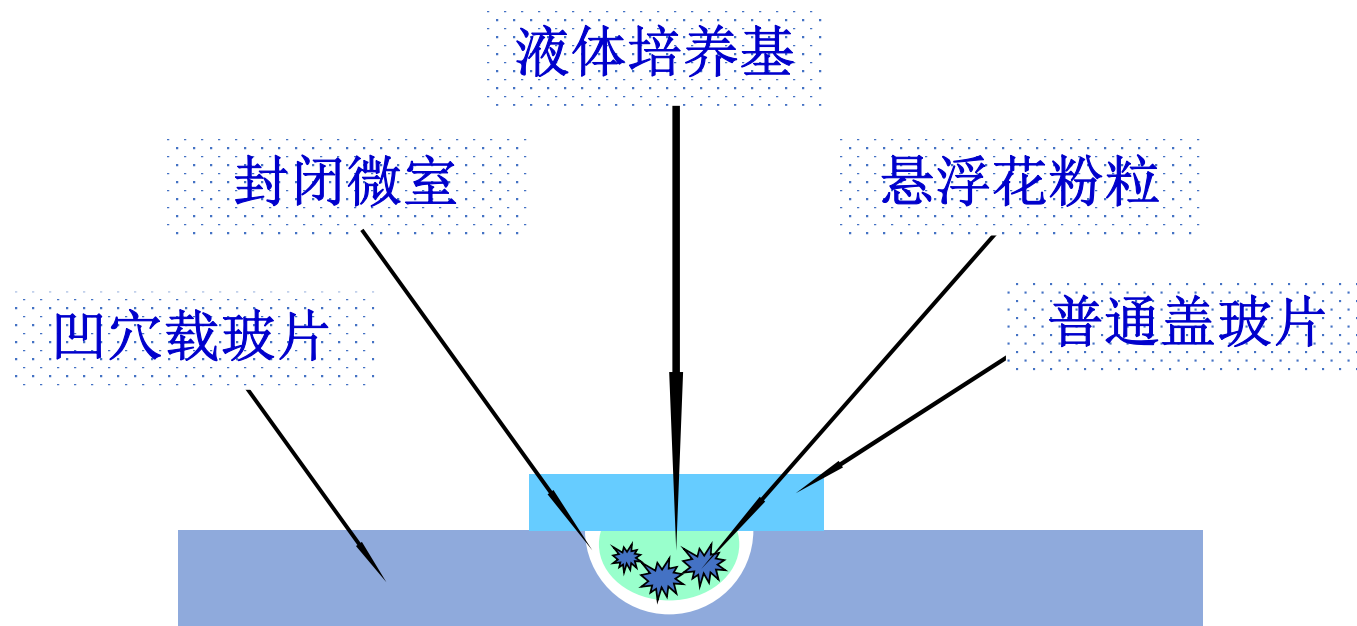
- 将花粉培养在少量培养基中。

- 具体做法有两种：

- ①在一块小的盖玻片上滴一滴琼脂培养基，在其周围放一圈花粉，将小盖玻片粘在一块大的盖玻片上，然后翻过来放在一块凹穴载玻片上，用四环素药膏(或石蜡—凡士林的混合物)密封。

- ②取一滴悬浮花粉的液体培养基滴在盖玻片上，然后翻过来放在凹穴载玻片上密封。
- 该法便于培养过程中进行活体观察，把细胞生长、分裂、分化及形成细胞团全程记录。
- 但培养基太少，水分易蒸发，养分和pH都发生变化，影响花粉细胞的进一步发育。用此法曾诱导油菜花粉形成细胞团，但未能继续发育。





花粉微室培养设计示意图

- **6. 条件培养基培养**

- 在预先培养过花药的液体培养基中或在加入失活的花药提取物的合成培养基中，接入花粉培养。
- **做法1:**
- 将发育时期合适的花药接种在培养基中一段时间后，去掉花药并离心清除培养基中残留的花粉，用所得上清液(即条件培养基)再培养合适的花粉。

- **做法2:**

- 将花药接种在合适的培养基上一段时间，然后将这些花药取出浸泡在沸水中杀死细胞，用研钵研碎，离心取上清液即为花药提取物。
- 提取液过滤灭菌后，加入培养基中，再接种花粉培养。
- 条件培养基和失活的花药提取物中含有促进花粉发育的物质，有利于花粉培养成功。

### 三、移栽驯化技术

- 花粉植株非常娇嫩，很难移植。
- 需采取逐步过渡的方式（即炼苗），使其适应从异养到自养的变化。
- 移栽的关键是保持高空气湿度(80%~90%，1~2周)和低土壤湿度。

## 四、白化苗现象

- 禾谷类作物花粉白化苗比例高(可达80%)，是单倍体育种的障碍。和绿苗相比，花粉白化苗除缺乏绿色外，并无其他明显的形态学变异。花粉白化苗因没有发育完好的叶绿体，缺乏叶绿素，只能在异养条件下生长一段时间，很难开花结实，这给其遗传研究带来了难以克服的困难。

## (一) 白化花粉植株的亚微结构特征

**例：**小麦花粉培养中绿苗和花粉白化苗虽在形态、营养生长和染色体倍性上无明显差异，但白苗的生殖生长和雌蕊发育均不正常，在离体培养条件下，它不能完成有性世代和产生种子。在花粉白化苗的细胞中，常发现有微核存在，叶肉细胞的细胞质中存在着原质体，质体早期发育正常，但发育到一定阶段即停止发育，在质体中缺乏核糖核蛋白体。某些胚性花粉粒和白苗的茎段分生细胞中出现染色体断片和微核。

## (二) 白化苗产生的影响因素及机理

### ◆ 影响花粉植株白化苗的因素



#### 内部因素

供体植株基因型、花药和花粉本身状态。



在内部因素中，基因型和花粉发育时期的影响最为明显

#### 外部因素

低温预处理、培养基成分、生长激素水平和种类、培养条件和方法、愈伤组织转分化时间等。



在外界因素中，用28℃以上高温和高浓度2, 4-D 诱导培养，延迟愈伤组织转分化培养，可明显地促进花粉白苗发生。而花药经4~10℃低温预处理适当时间，可减少白苗发生，提高绿苗率。

小麦花药培养，高浓度的蔗糖可获得高频率的花粉愈伤组织，但会提高花药培养中的白苗率。

- ◆ 质体DNA的缺失可能是出现白化苗的直接原因。
- 从小麦的花粉白苗和绿苗中提取出较完整的DNA相比较，结果表明：白苗质体DNA有相当大的一段易缺失区域，相对分子质量、含量都比绿苗少得多，如相对分子质量仅及正常质体DNA相对分子质量的1/4，质体DNA在总DNA中的比例仅为绿苗的1/6。
- 这些结果说明小麦花粉白苗的质体DNA是不健全的。缺失基本上都发生在植株再生的过程中，因为诱导再分化之前的愈伤组织内的质体基因组还保持完整。



- ◆核基因是控制花药培养(包括绿苗率)的关键因素。
- 小麦花粉白苗发生是由核基因控制的，或是由核DNA变异引起的。
- 核基因可能是通过控制花粉质体变态，质体DNA结构改变、缺失过程发生的迟早、快慢、程度和频率而影响花粉白苗发生的。
- 这一推测可解释基因型的差异和通过一些措施可以降低白苗发生、提高花粉绿苗率的原因。

- ◆小麦“中国春”的5B上的一个基因可增加白苗率
- 用1B上带GPI同工酶标记的小麦 1BL / 1RS易位系进行杂交及F1后代的花药培养发现，GPI同工酶标记在所有的白苗中表现为严格的1：1分离，而在绿苗中则表现为很高的偏分离，因此推测1B染色体上有一个基因在能产生绿苗的花粉中有半致死效应。

- ◆ 离体培养中高频发生的体细胞无性系变异是花粉白苗大量出现的原因之一。
- 用水稻DH群体进行分子作图发现，几乎所有DH株系都不同程度地发生了RFLP变异，这些变异都集中发生在少数一些探针上，而且同一类变异往往在不同的DH株系上的表现是相同的。
- 表明染色体上存在易变异点，通常集中分布在染色体的某些特定区域，相互紧密连锁，变异的频率和类型与供体植株的基因型密切相关。

- 这些变异大都发生在培养过程的单倍体阶段，因为它们几乎都是纯合的。
- 表明染色体上存在易变异点，通常集中分布在染色体的某些特定区域，相互紧密连锁，变异的频率和类型与供体植株的基因型密切相关。
- 这些变异大都发生在培养过程的单倍体阶段，因为它们几乎都是纯合的。

- 尽管这些结果均来自正常的绿苗DH系，但不难推知，花粉白苗可能也发生了甚至更为严重的无性系变异，然而无法对白苗进行这种系统研究。
- 高频发生的无性系变异与白苗发生及与核基因控制和质体基因组缺失有无直接联系，是一个有趣的问题。

### (三) 白化苗的控制

小麦花药培养中，采取一些措施可减少或阻止白苗发生，提高花粉绿苗率：

- ①取主茎和大分蘖穗，取花粉发育处于单核中晚期的幼穗。花药接种时，幼穗穗轴中部花药全取，下部多取，上部少取。
- ②幼穗4℃低温离体预处理24h。

- ③脱分化一般暗培养，30～32℃时出愈率高，但白苗多。29℃培养效果较为理想。
- ④脱分化培养基一般情况下用2.0mg/L的2,4-D与0.5mg/L的KT或6-BA配合使用。
- ⑤诱导愈伤组织分化阶段，把培养基的碳源由11%蔗糖改为9%蔗糖+2%麦芽糖。
- ⑥前期产生的愈伤组织分化能力较强，后期产生的愈伤组织分化能力降低，白苗率相对较高，所以出愈后应提早进行转分化培养。

## 五、影响花粉花药培养的因素

### (一) 基因型

植物基因型是影响离体诱导单倍体成功的最重要的因素之一。

- 培养17个不同基因型的大白菜游离小孢子其中16个得到小孢子胚，2个产胚量约350个/蕾，多数产胚量2个/蕾以下。
- 各种基因型水稻花药培养力(愈伤组织诱导率和绿苗分化率)由大到小的顺序为糯型、粳x籼杂种、粳型、籼型杂交稻、籼型。
- 21个小麦品种花药培养，仅有10个基因型得到了单倍体组织。



## (二) 植株生长条件和生理状态

植株生长条件(如光周期、光强、温度和矿质营养)和生理状态影响雄核发育。

- 一般来说，年幼植株上开花始期的花比开花末期的花更好，老年病弱甘蓝和白菜型油菜的小孢子胚产量，比幼年健康植株的小孢子高。
- 烟草，短光周期(8h)和高光强(16 000lx)比较好。
- 大麦，低温(18℃)和高光强(20 000lx)较好。
- 油菜，高光强和一定的温度变化较好。
- 曼陀罗属植株，生长在24℃下的雄核发育频率(45%)比17℃(8%)的高。

- 烟草植株，氮饥饿处理可提高花药培养效果。
- 用Hoagland溶液每2周浇灌1次，烟草花粉的生活力保持较长。
- 小麦、水稻、大麦等禾本科植物，大田植株比温室植株、主茎穗比分蘖穗愈伤组织诱导率高。
- 植株生长条件决定P-花粉的频率，如短日照和低温对烟草本身生长不利，但花药内含有大量的P-花粉。
- 将引起雄性不育的因子喷洒到植株上能促进P-花粉的形成。这是因为花药内大量花粉粒竞争营养而造成自然营养不良，花粉产生饥饿作用。

- 对植株进行低温、短日照、氮饥饿、喷洒生长物质和乙烯利等预处理，能干扰或阻止营养物质的合成或运输，影响母体的营养状态。
- 在花粉发育过程中对植株进行这些处理，导致花粉粒饥饿，提高花药内P-花粉的比率，提高花药培养效果。

### (三) 花粉发育时期

花粉发育时期对雄核发育至关重要。

- 1. 花粉粒发育时期及观察

①单核期 (单核早期→单核居中期→单核靠边期)

②二核期      ③三核期      ④成熟期

- 单核早期

随着花药发育，花粉四分体的胼胝质壁溶解，细胞壁增厚变圆，绒毡层无退化现象也无明显液泡，花粉粒进入单核早期。

- 单核居中期

而后，单核花粉粒的核位于细胞中央即单核居中期。

- 单核靠边期

接着细胞体积迅速增大，绒毡层开始退化，中央大液泡形成，细胞核移到一边，细胞壁裂为三段，且具有三条明显的沟，为单核靠边期。

- 二核期

单核花粉充实后，接着进行一次有丝分裂，形成两个细胞核，向着大液泡的为营养核、较大，贴近花粉壁的为生殖核、较小，细胞壁三角形不如靠边期明显，此时为二核期。

- 三核期

有的物种在二核期之后，生殖细胞继续分裂为两个精细胞，细胞壁渐渐变圆，即为三核期。

- 成熟期

花粉粒进一步膨大，花粉壁与沟不再明显核也不明显，花粉进入成熟期。

- 不同植物诱导愈伤组织形成和胚状体发生的适宜小孢子发育时期不同。

- 2. 花粉发育时期的确定

- 花药接种前，用醋酸洋红染色压片镜检，确定花粉发育时期，找出花粉发育时期与花蕾或幼穗形态性状的相关性，便于取材。

- 如烟草：

单核早期花蕾长      1. 1~1. 2cm

单核晚期花蕾长      1. 8~2. 0cm

双核早期花蕾长      2. 1~3. 0cm

双核晚期花蕾长      3. 9~4. 5cm



- 花蕾的外部形态指标:
- 花蕾长度、颜色等因物种、品种、发育状态、气温变化、营养条件、采收时期等差异较大。
- 瓣药比(花瓣长/花药长)则相对固定, 用瓣药比判断芸薹属蔬菜花粉粒的发育时期具有实际意义。



## （四） 预 处 理

接种前或后，对花药适当预处理，可以增加绿苗产量，提高质量。

- 在花药培养中，采用的预处理方法很多，有高低温、化学物质、离心、射线等处理方法。

- 1. 高低温处理
- 包括低温预处理、低温后处理及热击处理。
- 低温预处理 是指在接种之前将材料用0℃以上低温处理一段时间后再行接种。
- 低温后处理 是指花药接种后，先低温下培养一段时间，再移至正常温度下继续培养。
- 热击处理 花药接种后，先在较高温度下培养数天，再移至正常温度下继续培养。
- 近年的研究表明：多数物种的花药培养中，上述几项变温措施均可在不同程度上提高花粉愈伤组织或花粉胚状体的诱导率，提高花粉植株的再生频率。

- 自1973年用低温处理毛叶曼陀罗的花药能显著提高花粉胚状体诱导频率以来，相继在水稻、小麦、大麦等多种作物上获得了类似的结果。
- 不同材料所需处理温度和时间不相同，往往有较大的差异。
- 处理温度一般在1~14℃，处理时间最短的只有几小时，最长可达30~40d。
- 如：

水稻	5~10℃处理	3~12d
小麦	1~5℃处理	2~7d
玉米	4~8℃处理	7~14d

- 同样一个材料，由于处理温度不同，所需的适宜处理时间也不一样。
- 一般说来，较低的温度需要处理较短的时间，较高的温度则需要较长的处理时间。
- 水稻花药接种到培养基上，先用8℃低温处理4～8d，再转移到26℃培养，可显著提高愈伤组织诱导率，并观察到经过预处理的材料再进行后处理也同样有效。
- 1983年在水稻花药培养中发现，用6～8℃低温后处理3～12d，愈伤组织诱导率和绿苗分化率较对照有所提高。
- 关于低温后处理的研究目前报道不多。

- 低温预处理的作用机制可能是：
- ①引起花药内源激素发生变化，进而影响愈伤组织的形成。
- ②引起小孢子的孤立化，花药壁细胞和绒毡层在低温预处理过程中逐渐退化解体。
- ③使绝大多数小孢子保持其生活力。
- 归根结底，低温仍然是通过花粉饥饿起作用。

- 热击处理取得引人注目的效果：
- 水稻离体小穗35℃处理15min，明显提高花药愈伤组织的诱导率。
- 小麦花药接种后先35℃培养8d，再25℃培养，明显提高愈伤组织的诱导率和绿苗分化率。
- 辣椒花药接种后32℃处理12～60h，促进愈伤组织的形成，但超过60h反而抑制愈伤组织的形成。

- 2. 化学处理

- 化学物质处理的方法有以下几种：

- ①高糖处理

- ②甘露醇处理

- ③秋水仙素处理

- ④乙烯利处理

- (1) 高糖处理

- 接种前用高糖预处理花药一定时间，再转移到适宜的糖浓度下培养，可大幅度提高愈伤组织和胚状体的诱导率。
- 玉米在25%的蔗糖溶液中处理6~8min，能显著提高愈伤组织诱导率。



- **(2) 甘露醇处理**

- 麦类作物常用甘露醇预处理。甘露醇预处理明显提高大麦花粉存活率和小孢子质量抑制淀粉积累，促进小孢子发育。
- 甘露醇不能作为碳源，其作用是造成小孢子短时间内的营养饥饿，引起小孢子去分化；提供适当渗透压环境，促进小孢子营养代谢。

- **也有人认为：**

- 对花药进行预处理渗透压不重要，这可能是由于花粉粒在花药内受到花药壁的保护使预处理溶液没有直接接触花粉粒，所以不需要适宜的渗透压环境，预处理只是给花药内的花粉提供一个营养饥饿。
- 但是对游离小孢子培养来讲，要维持小孢子不发生质壁分离而死亡，培养基的渗透压是非常重要的。

- (3) 秋水仙素处理

- 秋水仙素处理扰乱了对不对称分裂起决定作用的细胞骨架，使单核花粉的细胞核移向中央，导致均等分裂。改变小孢子的有丝分裂、诱导其像体细胞一样生长。
- 用含0.05%秋水仙素+2%二甲基亚砷的基本培养基浸泡烟草花药并暗培养4~12h，单核花粉数量从4.5%上升到19%，这些单核比正常小孢子核大。

- (4) 乙烯利处理

- 乙烯利是一种杀雄剂。
- 用100mg/L乙烯利喷施烟草植株花芽，营养核偶尔发生分裂10d后从这种芽上取花进行培养，其雄核发育提高了25%。
- 在花粉母细胞正在减数分裂时，用乙烯利喷“中国春”小麦，因发生额外有丝分裂，使多核花粉增多。
- 在苜蓿属、紫露草属、矮牵牛属、烟草属和小麦的一些栽培品种中观察到了诱导额外核分裂和核群的形成。
- 也有报道用酒精、顺丁烯二酰肼等化学物质进行预处理的。

- 3. 物理处理

- 射线、离心、紫外光等物理处理可以促进雄核发育。

- (1) r射线处理

- r射线对小孢子也有刺激作用。r射线辐射可诱导番茄花药愈伤组织的形成，4Gy处理花药愈伤组织的诱导率达71.7%，对照37.5%。
- r射线与低温结合更有效。4Gy和10℃ (9d) 处理效果最好，愈伤组织诱导率72.7%，这种处理的植株再生频率也最好。

- (2) 离心处理

重力作用可打破微管，影响小孢子的发育。烟草花蕾在花药没取出前在适当低温的冷冻离心机500g的转速下离心1h，可明显提高单倍体植株的得率。

- (3) 磁场处理

在花椰菜花药培养过程中，采用磁场强度300、500、700mT预处理大部分花粉处于单核中期和单核靠边期的花蕾，结果表明，磁场预处理可明显提高愈伤组织诱导率，且对培养基的选择性降低。

## (五) 培养基

### 1. 基本培养基

- 作物种类不同，对培养基的要求不同，根据花药培养的特殊要求，研制出适合不同植物的新型培养基。
- 常用的基本培养基有：
- 适于烟草的：
  - ◆ H培养基 (Bourgin等, 1967)

- 适于小麦的:

- ◆ C17培养基 (王培等, 1986)
- ◆ W14培养基 (欧阳俊闻, 1988)
- ◆ 马铃薯- II 培养基 (Chuang等, 1978)
- ◆ Chu培养基 (Chu等, 1990)
- ◆ BAC1培养基 (Ziauddin等, 1992)



- 适于大麦的：

- ◆FHG培养基

(Hunter, 1988)

- ◆Kao培养基

(Kao, 1991)

- 适于水稻的：

- ◆B5培养基

(黄鸿枢等, 1978)

- ◆通用培养基

(杨学荣等, 1980)

- ◆SK3培养基

(陈英等, 1978)

- 适于玉米的：

- ◆正14培养基

(母秋华等, 1980)

- **2. 碳源**

- 不同植物花粉细胞渗透压有差异，其花药培养要求不同的糖浓度。
- 一般认为单子叶植物比双子叶植物需糖的浓度高：
  - 双子叶植物 烟草、甜椒 3%；
  - 单子叶植物 小麦、水稻 6%；玉米 6%~15%；大麦 10%。
- **同时认为：**
  - 二细胞结构的成熟花粉需低浓度糖。
  - 三细胞结构的成熟花粉需高渗条件。
  - **如：**油菜小孢子培养时，蔗糖的浓度可达13%~17%。

- 糖的种类对花药培养有显著影响。如：
- 以60g/L的麦芽糖代替蔗糖可提高梗稻的游离花粉分裂频率和得苗率。
- Butter等(1997)在玉米花培时比较了8种糖，蔗糖效果最好。
- 高浓度蔗糖和其分解物葡萄糖和果糖阻碍大麦花粉愈伤的诱导和胚状体的形成，而麦芽糖和纤维二糖明显优于蔗糖。
- 麦芽糖或纤维二糖补加蔗糖共同作为碳源时，花粉胚和绿苗产量下降，蔗糖的产物(葡萄糖和果糖)浓度比麦芽糖的产物(葡萄糖)高得多。
- 蔗糖快速代谢导致培养基中含有高浓度的葡萄糖，引起毒害作用。
- 在栽培大麦、野生大麦和春小麦花药培养上麦芽糖是最好的碳源。

- **3. 氨基酸和其他有机物质**

- 氨基酸对花药培养十分重要，越来越受到人们的重视。
- 培养基中20mM硝酸铵减至2mM，同时补加5.1mM谷氨酰胺，使大麦花药培养绿苗产量提高到46.4%。
- 培养基中补加丝氨酸、脯氨酸、天冬氨酸和丙氨酸各40mg/L、谷氨酰胺400mg/L能提高小麦花粉胚状体的数量和质量。
- 在大麦花药培养中，补加8mg/L丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸和天冬酰胺混合物，能增加绿苗得率，提高绿苗和白苗比值(绿苗 / 白苗)。

- 4. 植物激素

- 外源激素在花药培养中具有重要作用。
- 2, 4-D是禾本科花药培养的适宜激素。有的主张使用较低浓度(如0.5~1.0mg/L)，有的主张使用较高浓度(如4.0~5.0mg/L)。
- 2, 4-D用量影响愈伤组织质量，改变愈伤组织的发育途径。
- 据此，在继代培养中利用2, 4-D来优化愈伤组织，提高分化能力。
- 适量的2, 4-D(0.2~2.0mg/L)对大麦花粉愈伤组织的诱导很有利，但浓度过高对胚胎发生不利，为了克服这一矛盾，可将2, 4-D与IAA配合使用，这样既有利于愈伤组织的诱导又有利于胚胎发生；

- 在大麦花药培养中，6-BA和IAA配合使用效果最好，适宜的浓度为6-BA 0.5mg/L、IAA 0.5~1.5mg/L
- 0.2~0.6mg / L多效唑能提高大麦花粉愈伤组织分化率和绿苗产量，提高绿苗和白苗的比值(绿苗 / 白苗)。这表明多效唑能改善花粉愈伤组织质量，对胚胎发生有利。
- 在体外培养时，激素的作用是通过培养物体内乙烯含量的变化来控制DNA的甲基化程度，而低水平的DNA甲基化是胚胎发生所必需的。
- 材料不同则自身所含的乙烯量有高低之分故不同的材料对激素的反应或要求不同。

- 5. 活性炭

- 花培中经常使用活性炭。
- 活性炭可吸附培养基中的某些物质来影响外植体的生长发育，包括激素、维生素、铁盐、琼脂中的不纯抑制物等，还有外植体释放出的代谢物如酚类物质等。
- 离体花药不需要外源激素的植物(如烟草)，在花药培养基中加入活性炭效果特别显著。
- 对外源激素有较强依赖性的植物(如水稻)，在培养基中加入活性炭反而导致不利的影响。

- 6. pH

- 有些作物花药对pH有一定要求。
- 曼陀罗随着pH的变化，胚状体得率也发生变化，pH5.8时效果最好，pH6.5时花粉不发生细胞分裂。
- 油菜小孢子培养 pH6.2效果最好。
- 用甘露醇预处理的小麦花药，pH5.6 时愈伤诱导率最高，pH6.1时绿苗分化率最高，且随着pH增高，白化苗率逐渐下降。



## (六) 培养条件

### 1. 温度

- 任何培养，细胞生长的最适温度都因物种而异。如烟草在27℃下产生的单倍体植株比22℃产生的多。
- 有一个原则，即一个物种花粉发育的最适温度比不分化的愈伤组织生长的最适温度要高。

## • 2. 光照

- 花药暗培养即可再生苗，但光照培养能获得更多更壮的再生苗。
- 烟草小孢子培养1个月时，光对单倍体小植株得率影响很大，红色荧光或低强度白光(500lx)效果最好。
- 在培养最初10d，小孢子对光的敏感性更为重要。小孢子在红光条件下比在白光条件下发育得更快。在红光条件下10d就可用肉眼观察到小胚，在低光强的白光下要15d才能观察到。

- **3. 植板密度**

- 花粉培养中小孢子植板密度和分化培养时愈伤组织植板密度对植株再生有很大影响。
- 大麦小孢子植板密度低于 $5 \times 10^4$ 个/mL时，细胞分化不好；密度为 $5 \times 10^4$ 个/mL和 $1 \times 10^5$ 个/mL时，细胞分化效果好。
- 在固体培养基上愈伤组织植板密度为12.5块/cm<sup>2</sup>和25块/cm<sup>2</sup>时，其绿苗再生情况显著高于5块/cm<sup>2</sup>和50块/cm<sup>2</sup>。

## (七) 花药壁因素

培养中花药组织的存在带来了影响胚产量的一些不清楚的因素。

- 花药内源生长素梯度在花粉粒发育过程中起重要作用。天仙子花粉粒胚发生局限在花药室的周边并与绒毡层紧密相邻，可能是从绒毡层释放出来的物质启动了培养的花药中花粉粒的胚性分裂。
- 花粉对药壁损伤后释放的有毒物质很敏感。

### 第3节 单倍体植株鉴定染色体加倍

## 一、花粉和花药植株的倍性

- 确定新形成植株的倍性很重要，胚形成途径不同，植株在倍性上可能存在很大差异如对2496棵水稻花粉植株进行了染色体计数，发现单倍体占35.4%，二倍体占53.4%，多倍体占5.2%，混倍体占6.0%。

## 1. 染色体直接计数法

- 通过对植株的根尖或茎尖等细胞分裂旺盛处的细胞染色体直接计数是最有效的方法，其中去壁低渗法观察西瓜染色体效果比较好。郭启高等(2000)在离体培养过程中利用不定芽叶尖染色体计数，可以在组织培养早期100%鉴定出倍性。

- 2. 间接鉴定

- (1) 扫描细胞光度仪鉴定

- 采用扫描细胞光度仪 (FCM, 也叫流式细胞仪) 进行鉴定。可迅速测定叶片单个细胞核内DNA含量, 根据DNA含量曲线图推断细胞的倍性。特别是在离体培养过程中, 试管中的芽或小植株很小很嫩时, 此方法仅用1cm<sup>2</sup>的样品就很容易确定其倍性。



- 用流式细胞光度法对甘蓝型冬油菜4个 F1杂种小孢子再生幼苗进行染色体倍数检测。
- 从矩形图上清晰地检测出单倍体、二倍体、三倍体和四倍体以及单倍体加二倍体、二倍体加四倍体和三倍体加六倍体等嵌合体。
- FCM倍数检测的结果与油菜花蕾期进行的花器形态鉴别结果是一致的。

- (2) 细胞形态学鉴定法

- 叶片保卫细胞的大小、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。
- 经不同浓度秋水仙碱溶液加倍处理的烟草花粉植株用叶片气孔保卫细胞叶绿体计数法鉴定染色体倍性。
- 结果表明：
  - 气孔保卫细胞叶绿体数平均值差异极显著单倍体95%以上的叶绿体数在14个以下，双倍体95%以上的叶绿体数则在14个以上。经开花结实实验证其准确率达91%，叶展开到第5片时就可鉴定。

- (3) 植株形态学鉴定法

- 不同倍性的植株在形态上有比较明显的差别，主要表现在子叶、真叶、花等的形状、大小和颜色，开花结实性，花粉着色能力及大小，果实形状及种子的形态等。
- 在植株生长的不同时期抓住这些肉眼易辨的典型特征，就能够有效地将变异植株筛选出来。

- 如生长期四倍体西瓜植株比二倍体叶片肥厚，裂片宽大，叶色深绿，茎节缩短。
- 开花期花瓣颜色深黄，花朵变大，花瓣增宽、肥厚、皱褶，花蕊和子房增大。
- 种子增大加厚、横径和种脐部加宽。
- 三倍体西瓜子叶多数畸形或色浅，叶片薄而不对称。
- 三倍体和单倍体的花粉均不着色。
- 单倍体植株瘦弱，叶片窄小，花小柱头长，花粉粒小，不结实。

- (4) 高 / 低温胁迫法

- 在西瓜子叶组织培养中，用二倍体和四倍体再生苗在高温和低温胁迫时受害死亡情况进行倍性鉴定，高温胁迫的临界点是 $50^{\circ}\text{C}/10\text{h}$ ，低温胁迫临界点是 $0^{\circ}\text{C}/5\text{h}$ 。
- 此方法鉴定的倍性符合度为90%，省去独立单株倍性鉴定过程，只需对试管再生苗进行一次短时处理，即可筛选出四倍体。

- (5) 杂交鉴定法

- 自交鉴定适用于白花授粉植物，自交后代群体分离则该二倍体为杂合的，否则为纯合的。也利用四倍体自交结实率较低的特性鉴定四倍体植株。
- 测交鉴定适用于雌雄异株植物，如石刁柏、啤酒花、猕猴桃等。使雄株和雌株杂交，从F1分离比例来判断亲代雄株的基因型，判断雄亲是来自小孢子还是体细胞。

- (6) 分子标记鉴定

- ①生化标记鉴定

主要是运用同工酶进行鉴定。该标记是一种共显性标记，若等位基因纯合时，无论其拷贝有多少，表现在酶谱带上仅有一条酶带，等位基因杂合时，则呈现不同的酶带。

- 根据这一原理，选择某一同工酶为杂合表现型的植株作为花药供体，分析再生植株的酶谱即可确定其来源。
- 用同工酶基因标记对花粉植株遗传标记的研究在野生稻、辣椒属、杨树、石刁柏上已有不少报道。

- ②分子标记研究

RFLP和RAPID是常用的DNA分子标记技术，近年来作为遗传育种的重要手段得到广泛应用。特别是在遗传理论研究(基因定位、基因图谱)、鉴定染色体的同源性、物种系统发育及分类学上的亲缘关系中发挥了很大作用。



## 二、花粉和花药植株染色体加倍

- 单倍体植株高度不育，要充分利用单倍体，只有将其加倍成纯合的二倍体植株。

## (一) 茎段培养

单倍体愈伤组织培养过程中会有一定频率的核内有丝分裂(没有核分裂的染色体复制)及花粉核的融合,形成二倍体细胞,可利用这点获得纯合二倍体植株。

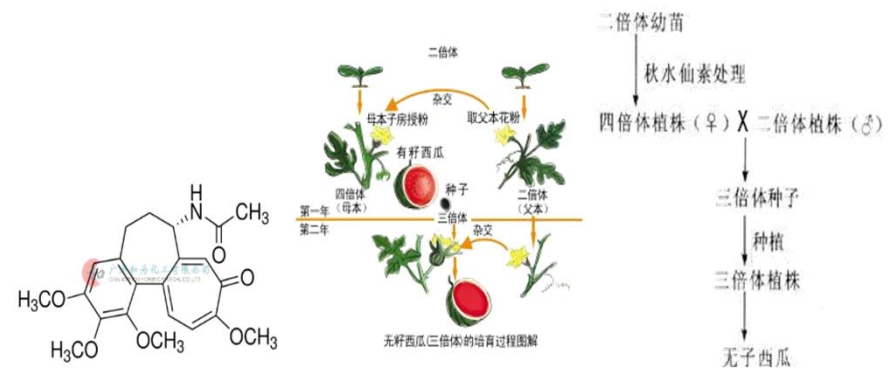
- 将单倍体植株茎段置于含有一定比例的生长素和细胞分裂素的培养基上诱导愈伤。在愈伤组织生长的过程中有大量的纯合二倍体细胞产生,进而再生纯合二倍体植株。



草莓快速繁殖

## (二) 化学试剂诱变

单倍体植物染色体加倍用得最多的是化学诱变法，常用诱变剂有秋水仙素和Oryzalin、tri-fiuralin、APM(amiprophos methyl)等除草剂，其中秋水仙素应用最广泛。



- 1. 秋水仙素诱导

- ①浸泡法

将再生小植株在无菌条件下用秋水仙素直接浸泡，然后转至新鲜培养基中培养。

如用0.2%~0.4%的秋水仙素水溶液浸泡烟草小植株24~48h，加倍率可达35%。

- ②生长锥处理

- \* 用秋水仙素水溶液直接浸生长点。

- \* 将其滴到棉球上然后将棉球置于顶芽或腋芽，诱导分生组织染色体加倍。

- \* 将适宜浓度的秋水仙素调和在载体羊毛脂中，然后将羊毛脂涂抹在单倍体植物顶端分生组织上诱导染色体加倍。

- 如：用0.5%秋水仙素浸泡黄瓜单倍体幼苗生长点2h，得到纯合的双单倍体植株。

- 用秋水仙碱水溶液处理茄子40~42h(每隔4h滴加1次)，加倍率为87.5%。

- 用0.2%~0.4%秋水仙素调和羊毛脂处理烟草24~48h，加倍率为25%。

- ③培养基处理

将单倍体植株材料作为外植体，在附加秋水仙素的培养基中培养一段时间，转入无秋水仙素的培养基中继续培养。

将52份甘蓝型油菜品系(品种)花药单核晚期小孢子，接种在含秋水仙碱的NLN液体培养基中 16~90h后，转入无秋水仙碱的相同培养基诱导胚状体。

### 甘蓝型油菜品系(品种)花药单核晚期小孢子实验结果

秋水仙碱	处理时间	加倍率
10mg/L	48h	65.44%
50mg/L	48h	88.56%
100~800mg/L	16~48h	90%~100%

- 用药量大，费用高，对小孢子毒性大，胚状体再生率低。

- 2. 除草剂诱导

- 以秋水仙碱作对照，用抗微管形成的Oryzalin、trifluralin、APM三种除草剂分别添加适量的二甲基亚砷，处理大白菜小孢子以获得纯合双单倍体。
- 结果发现这三种除草剂与秋水仙碱具有相似的功能，但使用浓度要比秋水仙碱低100倍左右。
- 其中APM对离体加倍表现最为突出，毒性极小，双单倍体的加倍率95%~100%。



- 一般认为单独的二甲基亚砷对单倍体的染色体加倍没有作用，它只是秋水仙碱的一种助渗剂，起主导作用的仍然是秋水仙碱。
- 秋水仙碱并非最佳的染色体加倍诱导物，低浓度 (15~30 $\mu$ M) 的重氮除草剂可有效地诱导西瓜染色体加倍。
- 这类除草剂与纺锤丝蛋白的结合专一，对染色体损伤小，引起其他变异的几率可能比秋水仙碱小，并且在这些再生植株中不存在嵌合体和植株生长延迟现象。

