中 国 科 学
1987 年 3 月　　B 辑　　第 3 期

桑树花药培养获得单倍体植株

林寿康　计东风　秦 俊
（浙江省农业科学院，杭州）

摘　要

本文取花粉发育为单核至单核靠边期的花药，接种于脱分化培养基，28℃黑暗培养 15 日，后每日用 2000 Lux 光照 12 h，35 日后形成胚状体，其诱导率可达 13.6%；当胚状体长至 3 mm，颜色开始转绿后转移至分化培养基，分化绿苗率可达 37.21%；在苗高 2—3 cm 时于基部切下，置发根培养基处理 2—4 日后转移至无激素培养基培养，发根率可高达 95%以上；胚状体的染色体数均为单倍体（$n = 14$），经植株幼叶染色体鉴定，成功地获得了桑树单倍体植株.

桑树是重要的多年生木本经济作物，是发展蚕业生产的重要物质基础. 由于桑树和大多数木本植物一样，虽然基因资源丰富，但它是杂合体，因此优良的隐性基因难以表现，同时由于没有纯系，杂种优势也难以利用，并且优良的个体必须经过嫁接、扦插等营养繁殖手段才能得以推广. 如果能用生物工程育种法，开展桑树花药培养，获得单倍体植株，并加倍成纯合二倍体，通过对各种各样基因纯系的选择或配合力的测定，就可能选育出理想的个体或优良的杂交组合，得到高产、抗性强、叶质优，而个体间又高度一致的有性系，从而结束目前桑树育种、良种繁育与推广的低效高成本劳动，并为桑树生理、生态、生化、遗传与变异规律等的研究提供良好的材料.

在木本植物中，用花药培养的方法，目前只成功地诱导出杨树、橡胶、葡萄、苹果等 20 余种植物的单倍体植株[1]. 在桑树方面，国内尚未见过报道，国外日本于 1976 年以来虽有过一些报道，但未见获得单倍体植株. 作者于 1978 年起开展了桑树花药培养的研究，获得一批花粉植株[2]，染色体鉴定为单倍体[3]. 现将研究结果报告如下.

一、试验材料与方法

1. 试验材料与接种技术

供试桑树品种有“团头荷叶白”、“红沧桑”、“国桑 21 号”、“实选 1 号”、“海桑”[1]等.

镜检后摘取花粉发育为单核至单核靠边期的花穗，在超净工作台上，用 70%酒精表面消毒 10 s，再放入饱和漂白粉液中浸泡 15 min，然后用无菌水冲洗三次，解剖取出花药并接种于培养基上，每管接种 15 个花药，接种后用透明纸和尼龙薄膜封闭管口，放入试管笼置培养室

1986 年 1 月 25 日收到，1986 年 9 月 26 日收到修改稿.

1）为雄性不育的品种.

中培养，温度保持 28℃，黑暗培养 15 日，然后每日用日光灯照明 12h，光照强度约为2000Lux.

2. 培养程序

用 ϕ 30 × 200 mm 的试管，每管注入 20 ml 的培养基，在 15 kg 压力下灭菌 20 min，冷却后取出置洁净而黑暗的场所(烘箱中)贮存 4—5 日.

培养的第一步是诱导花药中的花粉细胞脱分化继而形成小胚状体，继续长大使花药开裂，胚状体从中长出；第二步是使胚状体继续生长发育，形成具有茎、真叶、顶芽等器官的无根小苗；第三步是诱导无根小苗形成根系，长成完整小植株，然后移植于盆钵直至栽植于大田中.

3. 组织学、细胞学观察技术

(1) 接种前对花穗进行花粉发育时期的镜检时，用醋酸洋红染色以便观察.

(2) 染色体鉴定，于上午 10 时左右，取旺盛生长中的胚状体和花粉植株的幼叶，用饱和对氯苯预处理 4 h，水洗二遍，卡诺液固定 4—8 h，经 95%，85%，70%，50%，35% 酒精各 5 min 复水，清水洗涤二遍，用 1 N HCl 在 60℃下酸解 10—15 min，水洗后，用 4%铁矾媒染 3—4 h 以上，至材料变灰褐色，彻底水洗干净，用 0.5%苏木精染色数小时，镜检时用 40%醋酸分色和软化，徒手压片，镜检.

二、试验结果与讨论

1. 胚状体的诱导

(1) 培养基的影响　培养基组成成分对胚状体的诱导成功是极为重要的一个方面，在试验初期对常用于木本植物花药培养的脱分化培养基进行了筛选[4]，用同一桑品种的花药接种在激素成分相同的 MS[5]，$\frac{1}{2}$ MS，White[6] 等三种脱分化培养基上，分别接种 800 个花药，结果在 MS 培养基上得到 5 个胚状体，诱导率为 0.62%，而在其他两种培养基上接种均未得到胚状体.

培养基中的激素种类和浓度对培养效果有极大的影响，脱分化培养基中必须同时加入细胞分裂素与生长素. 细胞分裂素类主要是用 6-苄基腺嘌呤 (6-BA). 在试验中发现，6-苄基腺嘌呤用量低于 0.1 ppm，往往起不到防止花药过早老化变褐，失去培养价值的作用，如果 6-苄基腺嘌呤用量高于 3 ppm，虽然能较长时间地维持花药不变褐色，但同时也明显地抑制了花药的生长速度和胚状体的诱导率. 因此，6-苄基腺嘌呤的用量以 1—2 ppm 为宜. 生长素类曾用过 2·4 二氯苯氧乙酸 (2·4-D)、萘乙酸 (NAA)、吲哚乙酸 (IAA)、吲哚丁酸 (IBA) 等的不同种类、不同浓度试验结果表明，在桑树的花药培养中，2·4 二氯苯氧乙酸、萘乙酸的作用力太强，容易导致花药形成愈伤组织，而一旦花药形成愈伤组织后，就很难再形成胚状体或分化生长芽，故以作用较弱的吲哚乙酸或吲哚丁酸为好，但由于吲哚乙酸较吲哚丁酸更易氧化分解，所以在试验中以吲哚丁酸为主. 根据试验吲哚丁酸浓度低于 0.1 ppm 时，花药生长速度慢并逐渐黄化枯死，很难诱导胚状体，而浓度高于 2 ppm 时，则容易使花药形成愈伤组织，对胚状体的诱导也不利，所以生长素浓度一般宜控制在 1—2 ppm.

(2) 材料的遗传差异　桑树花药培养和其他植物一样，胚状体的诱导效果受材料基因型的影响，在试验过程中我们注意到，虽然不同桑品种对培养基成分的要求不尽相同，但也不能掩盖不同桑品种之间在胚状体诱导上的显著差异 (表 1).

表 1 不同桑品种和胚状体的诱导 (1985 年)

桑品种名	接种花药数(个)	胚状体诱导数(个)	胚状体诱导率(%)
团头荷叶白	1500	204	13.60
红 沧 桑	1425	55	3.86
国桑21号	1500	43	2.87
实选 1 号	1350	6	0.44
海 桑	600	0	0

从表 1 可见,在同样用 MS 脱分化培养基的条件下,"团头荷叶白"的胚状体诱导率(胚状体数/接种花药数×100) 最高,达 13.6%,其次是"红沧桑"和"国桑 21 号","实选 1 号"接种 1350 个花药,只有 6 个胚状体形成,其诱导率仅为 0.44%, 而"海桑"一个胚状体也没有诱导成功.

(3) 花药的发育时期 对花药发育时期的试验结果(见表 2).

表 2 花药的发育时期和胚状体的诱导 (1985 年)

花药发育时期	接种花药数(个)	胚状体诱导数(个)	胚状体诱导率(%)
单核早期	555	13	2.30
单核中期	450	109	24.22
单核晚期	600	51	8.50

在用 MS 为脱分化培养基,并用同一品种("团头荷叶白")接种的条件下,接种单核中期的花药比接种单核早期(四分体刚分开时)和单核晚期 (核紧靠花粉内壁) 的花药效果要好得多,胚状体的诱导率可达 24.22%, 因此,桑树花药培养的接种时期以单核中期为最适宜.

(4) 低温预处理的影响 用 5—6℃低温预处理花穗的比较试验结果(表 3).

表 3 5—6℃低温预处理和胚状体的诱导 (1979 年)

低温预处理(h)	接种花药数(个)	胚状体诱导数(个)	胚状体诱导率(%)
0(对照)	200	3	1.50
24	200	1	0.50
72	200	1	0.50
144	200	0	0

随着低温预处理时间的延长,胚状体形成的个数逐渐减少,当处理的时间延长到 144h, 就不产生胚状体, 这和烟草 (Nitsch 1972 年) 等作物结果有所不同. 在本实验范围内低温预处理并不能提高桑树花药培养过程中胚状体的诱导效果.

(5) 培养时间与胚状体诱导数量的关系 根据对"团头荷叶白"等三个桑品种花药, 接种在同样的 MS 脱分化培养基上,每隔 5 日调查一次,统计 200 管所得胚状体个数如图 1.

从图 1 可见,"团头荷叶白"自接种后第 40 日才发生胚状体, 55—105 日胚状体发生个数达到高峰,此后发生数量较少;而"红沧桑"和"国桑 21 号"两个桑品种, 自 35 日即有胚状体的

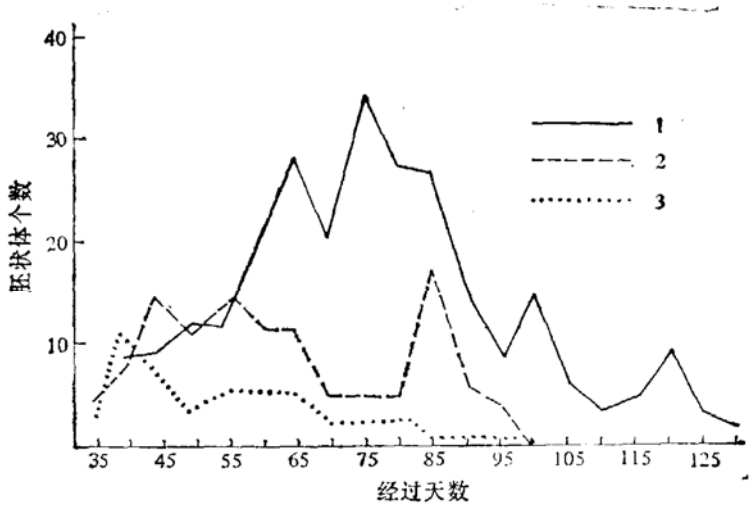


图 1　培养时间与胚状体诱导数量的关系

(——1为团头荷叶白，------2为红沧桑，……3为国桑 21 号)

发生，第 40—90 日胚状体发生数量最多，100—105 日后极少.

2. 花粉植株的诱导

(1) 培养基的影响　　分化培养基仍为 MS 培养基，为了有利于胚状体的分化，适当降低生长素的浓度，而稍稍提高细胞分裂素的浓度，虽然会使胚状体的生长速度有所减慢，但能提高胚状体的成苗率，同时能比较有效地防止胚状体形成愈伤组织. 吲哚丁酸最低使用浓度为 0.05 ppm，最高为 2 ppm，当生长素达到 2 ppm 时，胚状体接触培养基部位极易长出愈伤组织，即使已分化出茎叶的也会进一步脱分化而形成一团愈伤组织. 细胞分裂素浓度低于 0.5 ppm 时，即使生长素吲哚丁酸的浓度仅为 0.05 ppm，也较容易形成愈伤组织，而当细胞分裂素 6-苄基腺嘌呤浓度高于 3 ppm 时，胚状体的生长速度显著变慢. 一般说来，生长素吲哚丁酸的浓度 0.1—0.5 ppm，细胞分裂素 6-苄基腺嘌呤的浓度 1—2 ppm 比较适宜. 在这样的激素浓度配比下，产生的小苗极易形成多芽苗，从而为珍贵的花粉植株的保存、繁殖和利用带来方便.

(2) 不同材料胚状体对成苗的影响　　材料的遗传类型不同，胚状体的成苗能力差异很大. 在相同的培养条件下，“国桑 21 号”分化产生绿苗的频率最高，达 37.21%，其次是“红沧桑” 32.73%，“团头荷叶白”尽管胚状体诱导频率最高，但绿苗的分化能力却不及“国桑 21 号”和“红沧桑”，仅达 18.14%，“实选 1 号”6 个胚状体仅分化产生绿苗 1 株 (表 4).

表 4　不同桑品种和绿苗的分化　(1985 年)

桑品种名	胚状体数(个)	绿苗数(株)	分化率(%)
团头荷叶白	204	37	18.14
红 沧 桑	55	18	32.73
国桑21号	43	16	37.21
实选 1 号	6	1	16.67

当然所有的胚状体不一定都能成苗，但在相同的条件下也可以看出，不同材料的胚状体分

化成苗的能力与其产生胚状体的能力并不一定都成正相关.

(3) 不同形状胚状体对分化的影响　不同形状的胚状体，形成绿苗的效果不一样(表 5).

表 5　不同形状胚状体的分化效果(　1984 年)

胚状体形状	胚状体数(个)	分化成苗数(株)	分化成苗率(%)
螺　型	19	0	0
喇叭型	71	11	15.49
子叶型	126	30	23.80

在相同的条件下，用同一品种("团头荷叶白")的胚状体培养，螺型胚状体(图 2) 转移后生长迅速，但不久即变褐死亡或转变成愈伤组织，很难分化成苗，子叶型胚状体(图 3) 分化成苗率最高，达 23.80%，喇叭型胚状体(图 4) 能分化成苗，但生长所需时间较子叶型胚状体长.



图 2　螺型胚状体

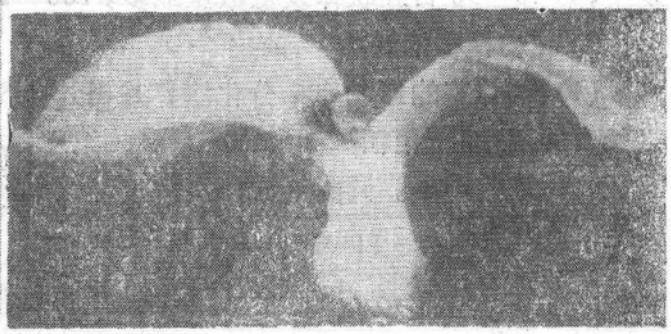


图 3　子叶型胚状体



图 4　喇叭型胚状体



图 5　发根处理后根系生长情况

(4) 胚状体的转移适期　当花药中的花粉发育形成胚状体后就逐渐长大，开始紧靠药壁，通过药壁细胞从培养基中吸取有效养分，但随着胚状体的进一步长大，花药裂开，胚状体长到药壁外，和药壁细胞的接触没有以前紧密，接触部分又相对变小，此时如果胚状体部分又不

直接接触培养基，那么由于所吸收养分不能满足生长的需要，而往往导致胚状体生长缓慢，并逐渐失去生机以至枯死，当胚状体一旦失去生机后，即使再转移到分化培养基上也难以分化成苗．因此需要经常观察，一般当胚状体长到 3 mm 左右，颜色开始转绿后转移较为适宜，过小由于肉眼分辨不清，操作不便，并且容易碰伤．此外，当胚状体转移到分化培养基时，要注意尽可能使胚状体贴住培养基，使其吸收面积增大，吸收养分增多，从而促进分化和加速植株的生长．

(5) 发根形成完整植株　　从分化培养基上分化得到的无根小苗，不经发根处理，就不能长根形成完整的植株．对于花粉植株根系的诱导适期，以新梢长 2 cm 左右时，切除基部的愈伤组织，我们用以下三种方法处理都能诱导新梢长根．

1) 浸入 50 或 100 ppm 的吲哚丁酸溶液中处理 4—8 h，然后转移到无激素的 MS 生根培养基中；2) 转移至含有吲哚丁酸 0.5—2 ppm 的 MS 发根培养基中培养 2—4 日后转入无激素的 MS 生根培养基中；3) 直接转移到含有吲哚丁酸 0.1—0.5 ppm 的 MS 发根培养基中．

这三种方法中以 1)，2) 两种方法诱导出的根系较为理想，而第 3 种方法虽能诱导出幼根，但根系粗而短，不久就停止生长，变红老化．由此表明生长素对桑树根原基的形成有良好的效应，但根原基形成后较高浓度生长素的继续存在显然对幼根的生长发育是不利的．

培养基渗透压的下降，对根系的良好生长有促进效应，当蔗糖浓度由 3% 下降到 2%，同时将 MS 培养基中的大量元素减半，用第 2 种方法能使根系诱导率高达 95% 以上，而且根系生长发育良好，平均每株长根 5 条以上，侧根、根毛发生量也多(图 5) 更有利于对养分的吸收，促进植株生长良好，进而提高移栽成活率．

3. 花粉植株的移栽和越冬

(1) 花粉植株的移栽　　当花粉植株生长健壮而且有发达的根系时，就可以从试管中移出来，用自来水冲洗去沾附的培养基，然后移植于塑料营养钵中，钵中盛经 120℃烘烤 3 h 以上或经高压灭菌的营养土，移栽时浇足水分，然后把营养钵装入食品袋中，袋口用迴形针封住，放在明亮的室内或营养室中，经二个星期左右，把袋口打开练苗直致在阳光下再练苗后移栽于大田中，并加强肥水管理与治虫，这样花粉植株就能生长良好 (图 6)．

(2) 花粉植株的越冬

桑树是多年生木本植物，受自然节律影响，到了冬季就要落叶，停止生长进入休眠，这一自然现象也同样反映到桑树的花粉植株上．由于从花药培养到形成植株，要经过较长时间．一般到了秋季才能使花粉植株移栽于盆钵或大田中．因此如何顺利越冬，乃是关系到花药培养成败的一个关键问题．1984 年花药培养植株，当年有 10 株入土，尽管我们采用加温、人工光照等手段，但仅使其推迟进入休眠期而无法打破其休眠，结果 8 株由于移栽时间较迟，植株矮小，积累养分少而干枯死亡．与此同时，保存在试管中的 8 株植株，到了冬季尽管生长缓慢，但都没有落叶，顺利地通过了越冬期，据此，1985 年我们采用下述方法解决了花粉植株的越冬问题．

1) 尽量使花粉植株在 9 月中旬前入土，这样在江浙地区，有一个半月以上的生长期，冬天再加以温室保护；

2) 9 月中旬前不能入土的植株，就不要使其发根，而在试管中越冬，待翌年入春后再发根入土；



图 6 大田中的花粉植株生长情况



图 7 花粉植株幼叶细胞
(染色体数 $n = 14$)

3) 如果试管里的无根苗长得过高,必需进行发根处理的,待生根后移植于营养钵中,套上食品袋,袋口用迴形针封住,保持高湿环境,置于温室中也能保持不落叶,在生长几乎趋于停止的状态下通过越冬期.

4. 花粉细胞发育过程和染色体观察

(1) 花粉细胞的发育过程

桑树花药接种后 3 日, 即可观察到花药体积有所增大, 10 日以后便可看到许多花粉细胞逐渐变成空粒,也可看到有的花粉细胞核明显增大, 之后中间出现细胞壁, 形成 2 个子细胞, 4 个子细胞,以至更多细胞的细胞团,同时花药壁颜色加深, 并逐渐转变成黄褐色,约经 40 日, 可见到药壁边缘开裂,从中长出胚状体.

(2) 染色体观察

1) 对生长旺盛期大小约 3 mm 左右的胚状体, 从不同试管中取出进行细胞学观察, 结果 10 个胚状体 7 个有分裂相出现, 在 39 个有丝分裂中期或接近中期的分裂相中, 均为单倍体, 染色体数为 14.

2) 对移栽于大田,进入生长旺盛期花粉植株的幼叶细胞学观察,有单倍体植株 ($n = 14$, 图 7),也有二倍体植株 ($2n = 28$). 以及混倍体植株(分裂相中有 $n = 14, 2n = 28, 3n = 42$ 等)和非整倍体植株,并且小的花粉植株以单倍体细胞为多, 而大的花粉植株则以二倍体细胞为多,有随着植株生长由单倍体向二倍体变化的趋势,这和葡萄[7]、橡胶[8]、积壳[9]、杨树[10]等木本植物的花药培养植株中出现的情况相一致. 这大概是因为大多数木本植物自花药接种至获得花粉植株,经历了多种外源激素的影响,加以木本植物的生长期长, 因此体细胞染色体数的变异延续到整个生育期,致使染色体的变异十分复杂.

三、小　结

1. 试验表明桑树花药培养采用 MS 培养基是适合的，但必须经脱分化、分化和发根三个阶段，各阶段培养过程中生长素和细胞分裂素浓度的调节及二者配比的控制是桑树花药培养成功的关键.

2. 材料的遗传差异，使胚状体的诱导率有高低之别. 同样花粉植株的诱导也受材料的影响.

3. 花药的发育时期不同，胚状体诱导率差异显著. 而不同形状的胚状体，其分化成苗率亦不同.

4. 桑树的花穗经低温预处理，未能提高胚状体的诱导率. 花药接种后 35—40 日即可产生胚状体，其发生数量最多的是在接种后的第 40—90 日，此后则较少. 胚状体的适宜转移时间以胚状体长至 3 mm 左右，颜色开始转绿为适期.

5. 经花粉细胞发育过程、胚状体和植株幼叶染色体观察，桑树花药培养诱导获得的植株系来源于花粉小孢子，胚状体的染色体数均为单倍体，植株有单倍体，也有二倍体和混倍体等，且有随其生长由单倍体向二倍体变化的趋势.

6. 对所获得的一批花粉植株的观察认为它将有可能直接应用于生产(优良植株或杂交组合)，这种可能性在草本植物中已经得到证实[11]. 它可供育种之用，有可能创造出新的桑种. 可用于桑树生理、生化、生态、遗传和变异规律等研究，以揭示桑树各性状的内在规律，为桑树育种奠定理论基础，从而提高育种效率，是桑树育种的一种新途径，在理论与生产上都具有重要的意义与价值，其社会效益将极大地超越经济范畴.

参　考　文　献

[1] 陈正华，遗传，6(1984)，4：34—37.
[2] 林寿康、计东风，植物生理学通讯，1985，1：33—34.
[3] 林寿康、计东风，蚕桑通报，1985，3：41.
[4] 林寿康、秦俊等，蚕业科学，8(1981)，3：76—78.
[5] Murashige, T. and Skoog, F., *Physiol. Plant.*, 15(1962), 473—479.
[6] White, P. R., *The cultivation of animal and plant cells*, and ed, The Ronald Press Co., New York, 1963.
[7] 邹昌杰、李佩芬，植物学报，23(1981)，1：79-81.
[8] 岑明、陈正华等，遗传学报，8(1981)，2：169—174.
[9] 吴克贤、徐妙珍、解奇明，林业科技，3(1980)，6—10.
[10] 陆志华等，林业科学通讯，1980，1：3—6.
[11] 胡道芬、汤云莲等，中国农业科学，1983，1：29—35.