

白菜小孢子培养中不同因素对玻璃化及褐变形成的影响

董晓颖, 程 斐, 李培环, 刘维信

(青岛农业大学 园艺学院, 山东 青岛 266109)

摘 要:以白菜小孢子为试材,以 B₅ 培养基为基本培养基,研究胚状体诱导期、幼苗生长期,添加不同浓度蔗糖、琼脂、2,4-D、6-BA、马铃薯和弱光培养时间对外植体产生玻璃化及褐变的影响。结果表明:在胚状体诱导期,糖浓度较低时和添加 2,4-D 均可增加玻璃化的发生率。培养 3、5、7、9 d 的玻璃化率分别为 52.00%、37.50%、23.91% 和 22.92%,褐变率分别为 20.00%、14.58%、8.69% 和 8.33%,3、5、7 d 处理间存在极显著差异;较高浓度的糖、琼脂及添加马铃薯对抑制幼苗玻璃化的产生有利;6-BA 可明显促进玻璃化的发生,且随浓度的增加,幼苗玻璃化程度明显加重。除弱光培养时间外,其它因素对褐变率的影响均较小。

关键词:白菜;小孢子培养;玻璃化;褐变

中图分类号:S 634.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)08-0085-05

小孢子培养是白菜等作物育种的重要手段。但在培养过程中,经常出现玻璃化和褐变现象,这些现象的发生,直接影响培养的成苗率和育种效率,严重者将导致外植体的死亡。

在植物组织培养中,导致外植体玻璃化及褐变发生的因素很多。对于玻璃化现象形成的机理说法不一,有研究认为,培养容器中的相对湿度和培养基中的水分状态是引起玻璃化的主要原因^[1-2]。也有研究表明,试管苗玻璃化是内部生理失调的外在表现^[3]。细胞分裂素的浓度和培养温度也与玻璃化苗发生密切相关^[4-5]。总之,玻璃化现象是植物组织培养中特有的一种生理性病变,是培养环境中的一些物理、化学和生化因子共同作用使植物组织新陈代谢紊乱所致。褐变是由于外植体中的多酚氧化酶被激活,使细胞的代谢发生变化。酚类物质被氧化后产生呈棕褐色的醌类物质,它们会逐渐扩散到培养基中,抑制其它酶的活性,毒害整个外植体组织。褐变发生的原因与外植体品种、年龄、外植体取样的时间、培养基类型、温度和光照等有关^[6]。

外植体的玻璃化、褐变是一个复杂的生理问题。前人的研究主要针对植物营养器官的培养方面,而对于小

孢子培养中外植体出现玻璃化及褐变的研究甚少,特别是影响玻璃化发生因素的研究更少。现以白菜的小孢子为试材,研究在组织培养中,不同蔗糖、琼脂、马铃薯、6-BA、2,4-D 浓度及培养条件对玻璃化和褐变产生的影响,旨在为小孢子培养中有效控制玻璃化和褐变的发生、提高成苗率提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2009 年 4 月至 2010 年 7 月在青岛农业大学园林园艺学院生物实验室进行。供试材料取自青岛农业大学园林园艺学院蔬菜育种试验园,为 AMS×早 5 白菜杂交种的花蕾。

1.2 试验方法

1.2.1 胚状体诱导期的培养 以 B₅ 培养基为基本培养基,分别添加不同浓度蔗糖(80、100、120 g/L)和不同浓度的 2,4-D(0.5、1.0 mg/L)、琼脂 6 g/L、活性炭 1 g/L。从供体植株上取小孢子处于单核靠边期的花蕾,在无菌条件下,先将花蕾用 75% 的酒精浸泡约 30 s,然后用 0.1% 升汞浸泡 7 min,再用无菌水冲洗 3~5 次,在已灭菌的滤纸上把花药从花蕾中剥出,接种于预先配好的各种培养基中。每处理接 6 瓶,每瓶接种约 20 个花药。培养 20 d 后调查各处理胚状体诱导、玻璃化、褐变及死亡情况。

1.2.2 幼苗生长期的培养 将在弱光下培养 3、5、7、9 d 后的幼胚苗分别转接到 B₅+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂的培养基上。将在弱光下培养 5 d 后的幼胚苗分别转接

第一作者简介:董晓颖(1957-),女,本科,教授,现主要从事园艺植物组织培养等研究工作。E-mail:dxylph@163.com.

责任作者:刘维信(1965-),男,博士,教授,现主要从事蔬菜遗传育种等研究工作。E-mail:liuweixin2006@163.com.

收稿日期:2015-12-16

到1)B₅+(30、50 g/L)蔗糖+8 g/L琼脂的培养基上;2)B₅+50 g/L蔗糖+(6、8 g/L)琼脂的培养基上;3)B₅+(0.1、0.5 mg/L)6-BA+NAA 0.1 mg/L+50 g/L蔗糖+8 g/L琼脂的培养基上;4)B₅+30 g/L马铃薯+30 g/L蔗糖+8 g/L琼脂的培养基上。每处理6瓶,每瓶接3~5个幼苗。培养15 d后调查各处理的玻璃化苗率及褐变苗率。

1.2.3 培养方法及条件 首先将花药接种到胚状体诱导培养基上置于35℃高温下暗处理24 h,随后转入24℃培养箱中继续暗培养直至出现胚状体,胚状体长至1~3 mm时转入弱光(室内自然光)下分别培养3、5、7、9 d,当胚状体变绿后转到幼苗培养基上进行光培养,每天光照12 h,光照强度为2 000 lx,培养温度24℃。

1.3 数据分析

试验数据采用DPS数据处理系统进行分析。

表1 胚状体诱导期不同蔗糖浓度对玻璃化和褐变率的影响

Table 1 Effect of different sucrose concentration on the vitrification and browning rate in the anther culture

培养基 Medium	蔗糖浓度 Concentration of sucrose (g·L ⁻¹)	接种花药数 Number of anther inoculated	出胚花药数 Number of anther forming embryo	出胚率 Percentage of embryo forming /%	玻璃化率 Percentage of vitrification /%	褐变率 Percentage of browning /%	死亡率 Death rate /%
B ₅	80	146	62	42.46	2.05a	36.23a	19.26
B ₅	100	149	56	37.58	0.67b	38.58a	23.17
B ₅	120	150	59	39.33	0.67b	38.66a	21.34

注:同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05),下同。

Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant difference at 0.05 level, the same below.

2.1.2 不同2,4-D浓度对玻璃化和褐变的影响 由表2可知,培养基中添加2,4-D后,培养材料的玻璃化率增高而褐变率略有下降。2,4-D浓度为0.5 mg/L和1.0 mg/L时的玻璃化率均明显的高于不添加2,4-D的。而2个浓度的褐变率则分别比不添加的低6.4%和13.1%。培养基中添加2,4-D后,不论浓度高低,其出胚

2 结果与分析

2.1 胚状体诱导期不同蔗糖和2,4-D浓度对玻璃化和褐变的影响

2.1.1 不同蔗糖浓度对玻璃化和褐变的影响 培养基蔗糖浓度不同,对花药出胚率、玻璃化、褐变均有一定的影响。由表1可知,随着培养基中蔗糖浓度的增加,材料的玻璃化率降低,而褐变率则有所提高。在80 g/L蔗糖浓度培养基中,花药的玻璃化率较高为2.05%,比在100 g/L和120 g/L蔗糖浓度中培养的高67.3%。但褐变率却分别比2个高糖处理的低6.5%左右,但褐变率间差异不显著。与100 g/L和120 g/L蔗糖浓度培养的相比较,80 g/L蔗糖浓度培养出的胚率较高而死亡率较低。说明在胚状体诱导期较低浓度的蔗糖虽有利于胚状体的诱导,但易导致花药玻璃化的发生。

率明显低于不添加的,而死亡率则明显高于不添加的。由此说明,在胚状体诱导期向培养基中添加2,4-D更易导致材料的玻璃化发生,并导致出胚率的降低和死亡率的升高。2种浓度的2,4-D相比,浓度较低时褐变率较高,而浓度较高时褐变率反而较低,说明高浓度的2,4-D可能有抑制褐变产生的作用。

表2 胚状体诱导期不同2,4-D浓度对玻璃化和褐变率的影响

Table 2 Effect of 2,4-D concentration on the vitrification and browning rate in the anther culture

2,4-D浓度 2,4-D concentration (mg·L ⁻¹)	接种花药数 Number of anther inoculated	出胚花药数 Number of anther forming embryo	出胚率 Percentage of embryo forming/%	玻璃化率 Percentage of vitrification /%	褐变率 Percentage of browning /%	愈伤率 Percentage of callus formation/%	死亡率 Death rate /%
0	149	56	37.58	0.67b	38.58a	0.00	23.17
0.5	119	21	17.65	3.36a	36.13a	2.35	40.51
1.0	164	32	19.51	3.66a	33.53b	11.67	31.63

注:培养基中蔗糖浓度为100 g/L。

Note: Sucrose concentration in the medium was 100 g/L.

2.2 幼苗生长期各培养因素对玻璃化和褐变的影响

2.2.1 弱光培养时间对幼苗玻璃化和褐变的影响

弱光培养时间对幼苗生长期玻璃化和褐变苗的发生均有影响。从表3可知,在3~7 d内,随着弱光处理时间的延长,幼苗的玻璃化率和褐变率均有明显的下降,但处理9 d与7 d玻璃化率和褐变率无显著差异。处理5 d的玻璃化率比处理3 d低27.9%,处理7 d的比处理3 d低54.0%。同样,处理5 d和处理7 d褐变率分

别比处理3 d低27.1%和56.6%。表现在死亡率上,也具有同样的表现趋势。说明在幼苗生长期在一定的处理天数范围内,较长的弱光处理时间可抑制幼苗的玻璃化和褐变发生,有利于提高成苗率。

2.2.2 糖浓度对幼苗玻璃化和褐变的影响 由表4可知,在2种糖浓度处理中,培养基中较高蔗糖浓度处理的玻璃化率较低,蔗糖浓度为50 g/L的玻璃化率比30 g/L的低27.3%。不同蔗糖浓度处理的褐变率结果与

玻璃化的结果相反,蔗糖浓度较高为 50 g/L 时的褐变率比 30 g/L 时高 14.3%。死亡率的结果与玻璃化率的结果趋势一致,表现为蔗糖浓度较高时死亡率较低。这说

明,培养基中糖浓度较低时更易导致幼苗玻璃化的产生,而较高浓度的蔗糖有导致褐变率升高的趋势。

表 3 弱光培养时间对幼苗玻璃化和褐变率的影响

Table 3 Effect of culture time in weak light on the vitrification and browning rate in the anther culture							
弱光培养时间	接种幼苗数	正常苗数	正常苗率	玻璃化苗数	玻璃化率	褐变率	死亡率
Culture time under	Seedlings	Normal	Percentage of normal seedlings	Seedlings with	Percentage of vitrification	Percentage of browning	Death rate
low light/d	inoculated	seedlings	/ %	vitrification	/ %	/ %	/ %
3	50	12	24.00	26	52.00A	20.00A	4.00
5	48	22	45.83	18	37.50B	14.58B	2.08
7	46	30	65.22	11	23.91C	8.69C	2.17
9	48	32	66.67	11	22.92C	8.33C	2.08

注:培养基琼脂浓度为 8 g/L,蔗糖浓度为 30 g/L。同列不同大写字母表示极显著差异(P<0.01)。
Note:The medium had 8 g/L agar and 30 g/L of sucrose. Different capital letters in the same column indicated significant difference at 0.01 level.

表 4 不同蔗糖浓度对幼苗玻璃化和褐变率的影响

Table 4 Effect of sugar concentration on the vitrification and browning rate in the anther culture							
蔗糖浓度	接种幼苗数	正常苗数	正常苗率	玻璃化苗数	玻璃化率	褐变率	死亡率
Sucrose concentration	Seedlings	Number of normal	Percentage of normal	Number of seedlings	Percentage of vitrification	Percentage of browning	Death rate
/(g·L ⁻¹)	inoculated	seedlings	seedlings/ %	with vitrification	/ %	/ %	/ %
30	60	28	46.67	22	36.67A	13.33a	3.33
50	45	25	55.56	12	26.67B	15.55a	2.22

注:所用材料在弱光下培养 5 d。
Note:The materials were cultured under low light for 5 days.

2.2.3 琼脂浓度对幼苗玻璃化和褐变的影响 从表 5 可知,培养基中琼脂浓度的高低只对幼苗的玻璃化产生有一定的影响,而对幼苗的褐变发生影响较小。较高浓度琼脂处理的玻璃化率低于较低浓度的,即琼脂浓度 8 g/L 处理的玻璃化率比 6 g/L 处理的低 7.3%。2 个浓

度处理的死亡率结果与玻璃化率的结果一致,8 g/L 处理的死亡率率比 6 g/L 处理的低 24.2%。说明在幼苗生长阶段,培养基中较高的琼脂浓度对抑制幼苗玻璃化的发生和提高成苗率有一定的作用。

表 5 不同琼脂浓度对幼苗玻璃化和褐变率的影响

Table 5 Effect of agar concentration on the vitrification and browning rate in the anther culture							
琼脂浓度	接种幼苗数	正常苗数	正常苗率	玻璃化苗数	玻璃化率	褐变率	死亡率
Agar concentration	Seedlings	Number of normal	Percentage of normal	Number of seedlings	Percentage of vitrification	Percentage of browning	Death rate
/(g·L ⁻¹)	inoculated	seedlings	seedlings/ %	with vitrification	/ %	/ %	/ %
6	44	18	40.91	18	40.91a	15.91a	2.27
8	58	26	44.83	22	37.93b	15.52a	1.72

注:培养基的糖浓度为 50 g/L。
Note:Sugar concentration in the medium was 50 g/L.

2.2.4 6-BA 浓度对幼苗玻璃化褐变的影响 由表 6 可知,在幼苗生长期培养基中添加 6-BA 和 NAA,明显增加了幼苗玻璃化和褐变的发生率。添加激素的 2 个处理,幼苗的玻璃化率分别比不添加激素的高 15.7%和 41.8%,幼苗的褐变率分别比不添加激素的高 22.4%和

10.8%;在培养基中 NAA 浓度相同(0.1 mg/L)时,较高 6-BA 浓度处理的玻璃化率明显的高于较低浓度处理的,0.5 mg/L 6-BA 处理的玻璃化率比 0.1 mg/L 6-BA 处理的高 31.0%。而较高 6-BA 浓度处理的幼苗褐变率则低于较低浓度处理的,0.5 mg/L 6-BA 处理的褐变率比

表 6 不同 6-BA 浓度对幼苗玻璃化和褐变率的影响

Table 6 Effect of 6-BA concentration on the vitrification and browning rate in the anther culture								
6-BA 浓度	NAA 浓度	接种幼苗数	正常苗数	正常苗率	玻璃化苗数	玻璃化率	褐变率	死亡率
6-BA concentration	NAA concentration	Seedlings	Number of normal	Percentage of normal	Number of seedlings	Percentage of	Percentage of	Death rate
/(mg·L ⁻¹)	/(mg·L ⁻¹)	inoculated	seedlings	seedlings/ %	with vitrification	vitrification/ %	browning/ %	/ %
0	0	58	26	44.83	22	37.93C	15.52b	1.72
0.1	0.1	40	13	32.50	18	45.00B	20.00a	2.50
0.5	0.1	46	7	15.22	30	65.21A	17.39a	2.17

注:培养基的蔗糖浓度为 50 g/L。
Note:Sucrose concentration in the medium was 50 g/L.

0.1 mg/L 6-BA 处理的低 13.1%。这说明,培养基中添加激素,更易导致幼苗玻璃化和褐变的发生,从幼苗的死亡率上也能说明这一点。但在 NAA 浓度相同而 6-BA 浓度不同的处理中,较高浓度的 6-BA 促进了玻璃化幼苗的发生,而对幼苗的褐变有一定的抑制作用。

2.2.5 不同马铃薯浓度对幼苗玻璃化和褐变的影响

由表 7 可知,在幼苗生长期的培养基中添加马铃薯可降

低幼苗玻璃化的发生,且随着添加浓度的升高,抑制玻璃化的作用越好。添加马铃薯的 2 个处理玻璃化率分别比不添加处理的低 29.1%和 37.5%;培养基中添加马铃薯后,幼苗褐变有增大的趋势,但差异不显著。培养基中添加马铃薯对降低幼苗的死亡率也有一定的作用。上述结果说明,在幼苗培养阶段,向培养基中添加马铃薯,有利于减少幼苗玻璃化的发生和提高成苗率。

表 7

马铃薯浓度对幼苗玻璃化和褐变率的影响

Table 7

Effect of potato concentration on the vitrification and browning rate in the anther culture

马铃薯浓度 Potato concentration /(g·L ⁻¹)	接种幼苗数 Seedlings inoculated	正常苗数 Number of normal seedlings	正常苗率 Percentage of normal seedlings/%	玻璃化苗数 Number of seedlings with vitrification	玻璃化率 Percentage of vitrification /%	褐变率 Percentage of browning /%	死亡率 Death rate /%
0	60	28	46.67	22	36.67A	13.33a	3.33
15	50	29	58.00	13	26.00B	14.00a	2.00
33	48	29	60.42	11	22.92B	14.58a	2.08

注:培养基的蔗糖含量为 30 g/L。

Note: Sucrose content in the medium was 30 g/L.

3 讨论

玻璃化现象的发生是组培苗不适应培养基和培养环境的结果。适当提高蔗糖浓度,降低培养基中的渗透势,可对培养物造成水分胁迫以降低玻璃化^[4,7]。该试验结果表明,在胚状体培养阶段和在幼苗生长阶段,培养基中较高浓度蔗糖可抑制外植体玻璃化的发生。

在组织培养中玻璃化苗的产生还与植物生长调节物质的影响有关^[6]。该试验结果表明,在胚状体发育期培养基中添加 2,4-D,不论浓度大小,均能增加玻璃化的发生。在幼苗生长期的培养基中加入 6-BA 可明显促进玻璃化的产生,且随浓度的增加作用更强。

当胚状体出现后,在弱光条件下培养时间的长短,是影响后期幼苗出现玻璃化程度的关键因素。弱光培养时间较短时,玻璃化苗的发生率较高,随着弱光培养时间的延长,玻璃化苗的发生率明显下降。试验发现,当弱光培养时间短于 5 d 时,幼胚苗没有完全转绿后将其从较高浓度蔗糖(80、100 g/L)的培养基转到较低浓度糖(30、50 g/L)的培养基继续培养时,可能会因培养基渗透势及培养环境的变化而出现不适,进而导致玻璃化现象的发生。

培养基中琼脂浓度对培养材料的玻璃化影响较小。向培养基中添加不同浓度的马铃薯,对抑制材料的玻璃化有一定的作用。这可能与培养基的渗透势有关。

植物组培中的褐变问题,前人研究的较多。培养材料褐变与多种因素有关^[8]。该试验结果显示,无论是胚状体形成阶段还是幼苗生长阶段,培养基中较高的糖浓度对材料的褐变发生有一定的促进作用。在胚状体形成阶段,向培养基中添加 2,4-D,对材料褐变有一定的抑制作用。在幼苗生长期,培养基中添加 6-BA 会使褐变率升高。培养基中琼脂和马铃薯的浓度大小,对褐变的发生影响不大。

参考文献

- [1] 蔡祖国,徐小彪,周会萍. 植物组织培养中的玻璃化现象及其预防[J]. 生物技术通讯,2005,16(3):353-355.
- [2] 吴淑平,马汉平,龚凤萍,等. 浅析植物组织培养中的褐变问题[J]. 农药与植保,2005(2):27-28.
- [3] 郝瑞庆,杨广东. 大白菜试管苗玻璃化发生机理初探[J]. 植物生理学通讯,2002,18(3):45-47.
- [4] 罗青,张曦燕,李晓莺,等. 不同培养条件对枸杞组培苗玻璃化的影响[J]. 安徽农业科学,2008,36(22):9400-9401,952.
- [5] 孙阳,魏海蓉,程淑云,等. 蓝莓组培苗玻璃化及恢复的研究[J]. 山东农业科学,2008(3):61-63.
- [6] 程家胜. 植物组织培养与工厂化育苗技术[M]. 北京:金盾出版社,2002:61-62.
- [7] 李彬. 满天星试管苗继代培养中玻璃化苗的防治[J]. 甘肃农业科技 1999(3):3-6.
- [8] 马莉贞. 植物组织培养中褐变现象的研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(15):3583-3584.

Effect of Different Factors on the Formation of Vitrification and Browning in the Anther Culture of Chinese Cabbage

DONG Xiaoying, CHENG Fei, LI Peihuan, LIU Weixin

(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

绣线菊再生体系的建立

王 大 庆, 张 娇

(黑龙江省农垦经济研究所, 黑龙江 哈尔滨 150036)

摘 要:以金山绣线菊的茎尖、茎段、叶片、叶柄为外植体,以 MS 培养基为基本培养基,在初代、继代增殖和生根培养等不同阶段通过添加不同种类和浓度的激素进行对比试验,建立了适宜金山绣线菊组织培养的再生体系。结果表明:诱导愈伤组织培养基为:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+2.0 mg/L 2,4-D,愈伤组织诱导不定芽培养基为:MS+0.8 mg/L TDZ+0.10 mg/L NAA,生根培养基为:1/2MS+0.25 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA,腋芽增殖培养基为:MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA。

关键词:金山绣线菊;组织培养;再生体系;优化

中图分类号:S 682.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)08-0089-04

金山绣线菊(*Spiraea × bumalda* ‘Golden Mound’)属蔷薇科绣线菊属灌木,产于河南、陕西、山东、江苏、浙江等省,喜光也稍耐阴,不耐寒冷和干旱,耐修剪,且萌芽萌蘖能力强,生态适应性一般。枝繁叶茂,复伞房花序,花瓣粉红色,花期长,观赏性很强,是一种有很高应用和观赏价值的园林植物。我国绣线菊属植物资源丰富,也相继有学者对粉花绣线菊、绣球绣线菊等属内其它品种进行了研究,但是目前很少开展对金山绣线菊的深入研究工作^[1-2]。1978 年报道了日本绣线菊的组织培养和快繁体系^[3-4];之后的中科院昆明植物研究所等几个单位先后报道了椭圆叶绣线菊、粉花绣线菊等变种的组培与快繁技术应用研究情况^[5-8];萤雅茹等^[9]研究得出了柳叶绣线菊由腋芽到成苗的各阶段培养基配方;张立

磊等^[10]以 MS 培养基为基本培养基,初步建立了金叶绣线菊组培快繁模式,可见对于金山绣线菊组织培养的研究不深入;刘慧民等^[11]的研究表明,金山绣线菊是绣线菊家族中抗寒性和生态适应性都较弱的品种,因此,研究构建金山绣线菊的组织培养再生体系可为金山绣线菊进行分子生物学方面的研究(转基因、基因克隆、基因沉默等)奠定理论基础^[12-14]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料选取东北农业大学园艺试验站温室和室外露地栽培的金山绣线菊植株。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的选择与消毒 4—5 月选择晴朗无风天气的上午,分别采集温室和露地栽植长势良好的金山绣线菊当年新生枝的茎段、茎尖、叶片和叶柄作为外植体,不定芽途径的外植体选择温室和室外露地栽培的生长

第一作者简介:王大庆(1969-),男,博士,研究员,现主要从事农业经济等研究工作。E-mail:183189637@qq.com。

收稿日期:2016-02-14

Abstract: The anther of Chinese cabbage and B₅ medium were used to study the effect of adding different concentrations of sucrose, agar, 2,4-D, 6-BA, potato and the culture time in weak light on the formation of vitrification and browning at embryo and seedling growth stage. The results showed that the rate of vitrification was increased by adding 2,4-D and lower concentration of sugar to medium at embryo growth stage. At seedling growth stage, the rate of vitrification and browning was inhibited by the longer culture time in natural light, the rate of vitrification was 52.00%, 37.50%, 23.91% and 22.92% respectively, and the rate of browning was 20.00%, 14.58%, 8.69% and 8.33% respectively in the culture time of 3, 5, 7 and 9 days. There was extremely remarkable difference among 3, 5 and 7 days; the higher concentrations of sucrose, agar, and potato had inhibition to the formation of vitrification; formation of vitrification was promoted by 6-BA, and the higher concentrations, the higher rate of vitrification. Besides the culture time in weak light, the effect of other factors on the rate of browning was little in all the culture stage.

Keywords: Chinese cabbage; anther culture; vitrification; browning