

# 芸薹属作物小孢子技术的发展与应用

史庆馨

(黑龙江省农科院园艺分院, 哈尔滨 150069)

中图分类号: S68 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2005)04-0014-02

## 1 游离小孢子培养技术的发展

被子植物的花药中, 细胞按染色体的倍性可分为两类: 一类是单倍体细胞, 即由花药中的花粉母细胞减数分裂后形成的小孢子(未成熟花粉); 另一类是二倍体细胞, 如药隔、药壁及花丝等组织。1950年 Tulecke 首次成功地培养了数种裸子植物的成熟花粉粒, 发现在特定的培养基上, 一些花粉可以不按正常的发育途径发育成成熟花粉, 而是形成愈伤组织, 1964年印度学者 Guha 和 Ma heshuari 首次报道从毛茛陀罗花药培养中获得了单倍体植株。1972年 Sharp 等用看护培养法培养番茄的离体花粉, 获得单倍体无性繁殖系。1973年 Nitsch 等首先成功应用游离小孢子培养技术获得毛茛陀罗的小孢子胚与再生株。1982年, 德国的 Lichter 等人成功诱导出甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.) 小孢子胚及再生植株。自此芸薹属作物游离小孢子培养技术进入快速发展阶段。在芸薹属作物中, 小孢子培养已在埃塞俄比亚芥、黑芥、大白菜、结球甘蓝、小白菜和芜菁等蔬菜上获得成功。1989年日本学者 Sato 首次报道成功地诱导出大白菜游离小孢子胚和再生植株。1992年国内学者曹鸣庆等报道大白菜游离小孢子培养获得成功。目前, 游离小孢子培养技术已经涉及芸薹属的6个主要栽培种。

已报道经由游离小孢子培养获得再生株

的芸薹属植物一览表

种名	作物名称(变种拉丁名)	发表作者时间
<i>B. napus</i>	甘蓝型油菜 (var. <i>oleifera</i> )	Lichter, 1982
<i>B. carinata</i>	埃塞俄比亚芥	Chuong et al. 1985
<i>B. nigra</i>	黑芥	Hetz et al. 1989
<i>B. deiracea</i>	结球甘蓝 (var. <i>capitata</i> )	曹鸣庆等 1990
	嫩茎花椰菜 (var. <i>italica</i> )	Takahata et al. 1991
	芥蓝 (var. <i>albogloba</i> )	Takahata et al. 1991
	花椰菜 (var. <i>botrytis</i> )	Duijs et al. 1992
	球茎甘蓝 (var. <i>fimbriata</i> )	Duijs et al. 1992
	皱叶甘蓝 (var. <i>sabauda</i> )	Duijs et al. 1992
	抱子甘蓝 (var. <i>gemmifera</i> )	Duijs et al. 1992
<i>B. campestris</i>	大白菜 (var. <i>pekinensis</i> )	Sato et al. 1989
	小白菜 (var. <i>chinensis</i> )	李岩等 1993; 曹鸣庆等 1993
	白菜型油菜 (var. <i>oleifera</i> )	Burnett et al. 1992
	紫菜薹 (var. <i>purpurea</i> )	李光涛 1996
	菜薹 (ssp. <i>Parachinensis</i> )	Wang
<i>B. juncea</i>	大头菜 (var. <i>napiformis</i> )	李岩等 1992
	叶用芥菜 (var. <i>foliosa</i> )	Hiranatsu et al. 1995
	茎芥 (var. <i>amida</i> )	刘冬等
	芥菜型油菜 (var. <i>oleifera</i> )	Thiagarajah et al. 1990
	包心芥菜 (var. <i>capitata</i> )	陈玉萍 1998
	球茎甘蓝 (var. <i>caulorapa</i> )	严淮

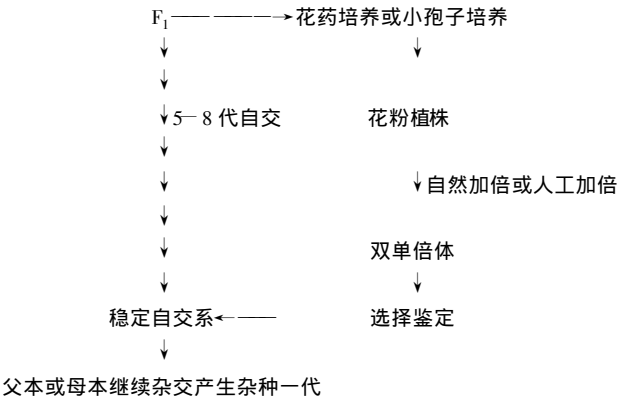
## 2 游离小孢子技术的应用

### 2.1 突变体的筛选

由于单倍体的每个基因都是单拷贝的, 各种隐性基因都可以表现出来, 加倍后形成的双单倍体各基因均处于纯合状态, 突变体很容易表现出来, 从而大大提高了抗性或其他突变体的筛选效率。游离小孢子受到某些外因刺激, 如: 渗透压调节剂, 病原菌, 冷热刺激等, 都会增加基因突变的频率。在小孢子离体培养时, 按育种目标添加一定的选择压力, 是在细胞水平上进行突变体筛选的最简易方法。在油菜上, 用 x 射线、 $\gamma$  射线或叠氮化钠等物理、化学方法处理离体小孢子后在一定的培养基上选择培养, 已得到抗除草剂突变体<sup>[1]</sup>, 刘勇认为, 以毒素及类似物代替病原物作为抗性诱变剂, 结合小孢子培养技术, 可直接在单细胞单倍体水平进行抗病源筛选<sup>[2]</sup>。由于小孢子生活力较脆弱, 过度的刺激易导致其丧失生活力, 因此研究适宜的诱变条件是十分重要的。张凤兰(1999)报道用紫外线照射, 结合软腐病筛选方法获得3个抗软腐病的植株, 并找到了白菜小孢子感受紫外线的最敏感时期为游离小孢子培养后8h(小时), 最适照射时间为12s(秒)。

### 2.2 在常规育种中的应用

#### 2.2.1 在植物育种中使后代迅速纯合 杂交育种与单倍体育种的周期比较



父本或母本继续杂交产生杂种一代

利用小孢子培养技术, 可使杂种后代的多种目标性状基因在两个种植季节内达到纯合稳定, 比常规育种要缩短4~5年, 加快育种进程。

2.2.2 提高选择效率  $F_1$  自交后代中, 1对基因控制纯隐性基因型出现机率为1/4 而小孢子后代纯隐性基因型出现机率为1/2 当控制基因对数增加为5对时, 自交后代中出现纯隐性基因型机率为1/1024, 而小孢子后代为1/32, 在育种中, 由于小孢子产生的DH 后代是一个纯系群体, 隐性基因在双单倍体群体中出现的频率(1/2<sup>n</sup>)是常规育种中  $F_2$  群体

收稿日期: 2005-03-10

( $1/2^{2n}$ )的 $2^n$ 倍( $n$ 位基因对数),可在一个很小的群体中选育出符合育种目标的个体,有效地提高隐性基因的选择效率。河南农科院栗根义等在1998年以后,利用游离小孢子技术培育出一系列大白菜品种,累计推广面积20万 $\text{hm}^2$ (公顷)<sup>[3]</sup>。

2.2.3 排除杂种优势对后代选择的干扰 对于杂交育种来讲,由于低世代许多基因位点尚处于杂合状态,会有不同程度的杂种优势表现,对个体的选择会造成一定误差。采用DH群体进行选种育种,由于各基因位点在理论上均处于纯合状态,选择到的变异能更大程度上代表真实变异。

## 2.3 在基因工程中的应用

2.3.1 作为转基因工程受体 目前进行转基因主要采用农杆菌介导、微注射、电穿孔、基因枪等,与通常的外源基因受体细胞原生质体相比,小孢子因其产生数量多,体积小,单倍性和单细胞特性,成为一种优良转基因受体。外源基因导入后,经过自发加倍或人工加倍,可以最大限度地降低转基因植株的嵌合性和杂合性。刘凡等报道采用农杆菌介导,向白菜小孢子胚转移抗除草剂基因,成功地获得了抗除草剂基因的转化株。以小孢子为受体实现基因转化的另外一种方法为显微注射法。Neuhaus等用显微注射法将外源基因导入含12个细胞的油菜小孢子原胚,转基因植株的频率高达51%。1988年Weber等用荧光标记外源DNA,证明激光微束可定向穿透细胞壁与细胞膜,能够将外源DNA导入植物细胞内,从而发现了一个新的植物转化途径。陈军首次以甘蓝型油菜小孢子为受体,利用激光微束穿刺法成功地导入芜菁花叶病毒外壳蛋白基因,并最终获得一株转化植株<sup>[4]</sup>。

2.3.2 应用于染色体工程 Eber等培养了甘蓝型油菜单倍体植株产生的小孢子,用流细胞仪和同工酶分析了培养的单倍体植株小孢子形成的植株的染色体数和谐带特征,发现在一些植株中出现酶位点缺失。结果表明在小孢子形成之前染色体发生了重排,因此培养单倍体植株的小孢子可以获得非整倍体。利用小孢子培养技术可以获得大量非整倍体,纯合

加倍体等染色体变异株,为染色体研究创造宝贵材料。1999年申书兴报道从四倍体大白菜小孢子植株中也获得了三体,且三体出现频率较高<sup>[3]</sup>。

## 2.4 消除致死基因

在杂合体中,致死基因常因杂合不容易被消除,而小孢子由于是单倍体,带有致死基因的个体即使加倍后形成双单倍体也会由于基因的纯合而被淘汰。

## 2.5 遗传性状研究

一些研究者将通过小孢子培养技术构建的DH群体用于分析形态性状、生理性状及分子标记性状的遗传。近代生物学中,DH系成为分子标记作图的良好群体,它在一定程度上成为一种永久 $F_2$ 群体,同 $F_2$ 群体相比,DH群体可以多年多点对同一群体进行重复试验,从而使结果更加准确,且保证了研究的延续性。Tanhuanpaa等利用甘蓝型油菜小孢子衍生植株及其来自相同亲本的 $F_2$ 群体,分析了RFLP和RAPD标记的分离及连锁,认为小孢子培养技术有助于某些基因型个体的出现。在油菜育种中,为了培育早熟品种以及黄粒品种,研究者通过完全纯合DH系,分别对甘蓝型油菜种子颜色和春化反应这两个性状的遗传特性进行了研究,以确定油菜种子颜色与春化作用的遗传性。

## 参考文献:

- [1] Swanson E B et al. Microspore mutagenesis and Selection; Canola plants with field tolerance to the imidazolidones. Theor Appl Genet, 1989 78(4): 525~530.
- [2] 刘勇,刘红雨等.利用小孢子培养技术筛选油菜抗菌核病材料[J].西南农业学报,1997,10(植保专辑):108~111.
- [3] 栗根义,高睦枪,耿建峰等.春秋适应型大白菜新品种豫白菜11号的选育[J].河南农业科学,1999(3):24~26.
- [4] 陈军,王兰凤,刘澄清等.用激光微束穿刺转化甘蓝型油菜小孢子的研究[J].激光生物学报,1998,7(2):103~107.
- [5] 申书兴,陈苏,李振秋等.四倍体大白菜小孢子培养获得初级三体的细胞学观察[J].园艺学报,2000,27(2):145~147.

秋延后蔬菜是晚夏初秋播种,秋季栽培,延迟到冬季上市的一类蔬菜。由于其市场售价较高,效益好,面积逐年加大,被菜农和市民接受。为了使菜农较全面地掌握其栽培技术,获得优质、高产、高效,现将主要技术关键介绍如下:

一是适期播种,营养钵育壮苗。茄子6月10日前后播种,番茄6月15日前后播种,辣椒7月下旬播种,黄瓜7月下旬到8月5日前播种,西葫芦8月5日前后播种,西瓜、香瓜7月上旬播种,豌豆8月中旬直播。除豌豆外,其余种类均消毒、浸种催芽,点播于营养钵内。苗龄约25d~30d(天),茄果类带蕾移栽,瓜类5片真叶左右移栽。

二是扣顶棚、盖遮阳网、防暴雨强光。由于7~8月光照强度高达15~20万 $\text{Lx}$ (勒克斯),是蔬菜需光饱和点3~5万 $\text{Lx}$ (勒克斯)的3~4倍,病毒病除蚜虫传病、种子带毒、缺肥水外,诱其发生的一个重要原因是高温和强光,而这段时间暴雨时常发生,因此扣顶棚、盖遮阳网可有效防止病毒病的发生,是秋延栽培能否成功的关键之一。

三是强化“三肥三水”管理:即育苗期、定植期,果实膨大期的肥水管理。苗期的肥水供应要使营养钵保持湿

润。天晴每天要浇一次水,隔3d~5d(天)施带色水一次,或将复合肥浸5d~7d(天),按1%的浓度兑水浇施。定植时要在覆膜前灌足水,使土壤湿度保持60%(手握土团指缝有水不滴)。施足底肥,注意土肥拌匀,灌水后盖膜定植,定植后看苗,看天及时灌水,促进发棵。果实膨大期要追施一次重肥,将复合肥10kg(公斤)浸化后兑水1000kg(公斤),开膜孔施于畦中,促进果实迅速膨大。

四是及时整枝打杈、打顶。蕃茄1杆半整枝,三至四苔果打顶,辣椒第一开花节位以下侧枝全部摘除,第一苔、二苔果及时采摘,四至五苔果以上顶芽全部摘除,以利营养集中于果实。黄瓜2m(米)后打顶。茄子第一苔果以下侧枝除掉,留三个分枝生长挂果。西瓜二蔓整枝,注意授粉。

五是及时扣边膜,保温,促进果实迅速生长。10月夜温下降到15℃时,及时加盖边膜保温。同时也要防止晴天棚内高温30℃时通风换气。11月以后低温寡照,注意防冻。

六是病虫害防治。秋延栽培的蔬菜虫害主要是蚜虫、斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、红蜘蛛。病害主要是病毒病和后期果实的灰霉病,注意选用适当的药剂及时喷施防治。