

芸薹属蔬菜花药培养研究进展

王小霞,樊新民,崔辉梅

摘要:花药培养是获得单倍体和纯合二倍体的主要方法之一,现主要从试验材料、花药预处理、培养基、培养条件等方面综述了芸薹属蔬菜花药培养的研究进展,并分析了花培存在的问题和发展前景。

关键词:芸薹属蔬菜;花药培养;单倍体;研究进展

中图分类号:S 634 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)01-0035-03

芸薹属种质资源十分丰富,是重要的叶菜类蔬菜。在芸薹属上主要采用的是常规育种方法,但是随着育种目标的不断推进,仅仅依靠常规育种手段已不能满足工作的需要。单倍体育种技术为缩短育种年限,提高育种效率提供了可能。花药培养是单倍体育种的重要方法之一,由于培养方法日趋完善,培养效率逐年提高,这一技术已被广泛应用于常规杂交育种,逐渐成为作物改良和新品种培育工作的一个重要手段。

1 研究概况

自1964年由Guha和Mar-heshwari首次在毛叶蔓陀罗上通过花药培养获得单倍体植株以来,花药培养先后在许多重要作物上获得成功。芸薹属蔬菜

中,国外在白菜型油菜(*B. campestris* var *oleifera*)^[1],甘蓝型油菜(*B. napus* var *oleifera*)^[2,3],青花菜(*B. oleracea* var *italica*)^[4],结球甘蓝(*B. oleracea* var *capitata*)^[5]等蔬菜中有成功的报道。国内也有很多成功的报道,如油菜^[6]、甘蓝型黄籽油菜^[7]、羽衣甘蓝^[8]等。主要研究的是如何提高花培的成胚率上。这是影响花培能否应用于育种实践的重要因素。

2 花药培养的影响因素

2.1 试验材料

2.1.1 基因型 试验证明,花药对离体培养的反应在很大程度上受基因型的影响。曹鸣庆等^[9]报道,将17个用于大白菜常规育种的基因型在NLN-13液体培养基中进行游离小孢子培养,有16个基因型经由小孢子胚胎发生途径获得了小孢子胚,各基因型之间发生频

率存在很大的差异。原玉香等^[10]对20个基因型的人工合成的甘蓝型油菜进行的花药培养中也发现基因型不同,胚的诱导率也不同,且易诱导基因型与难诱导基因型间诱导率差别相当悬殊。由此可见基因型在花培中起着关键的作用。Jacobsen和Sopory在做马铃薯的花药培养时发现,通过把两个培养反应差的系杂交,有可能将控制形成花粉胚的基因累积起来,从而选出花粉植株形成频率显著高于亲本的新系。Kuginuki等^[11]在大白菜上也进行了尝试,并获得成功。

2.1.2 生理状态 花培的效果还与植株的生长环境、生理状态等因素有关。Lo K H.等^[12]进行油菜小孢子培养的供体植株来源于光温等条件受到严格控制的人工气候室,这样可获得高的基因型频率和产胚量。官春云^[13]在油菜小孢子培养中,通过对植株两种生长状态的研究表明,来自生长室的供体植株,花蕾中处于单核期至双核期的小孢子同步化程度高,增长速度快,小孢子成胚的百分率高,达5.11%。

2.1.3 花粉发育时期 花粉的发育时期是影响培养效果的重要因素。就多数植物而言,单核中期至晚期的花粉最容易形成花粉胚或花粉愈伤组织。一般认为花蕾的长度、瓣药比是判断小孢子发育阶段的可靠指标。但邹金美等^[14]在试验过程中观察到:处于始花期的主花序上的花蕾长度较大而花瓣与花药的比值较小;而在末花期的主花序上的花蕾长度较小而瓣药比较大,盛花期则介于始花期和末花期之间。这说明在开花的不同时期,花粉的发育速度不同,导致相同的花蕾长度而花蕾中单核靠边期花粉细胞占总花粉细胞的比例不同。

2.2 花药预处理

为了提高花培的成功率,需要在接种前对试验材料进行预处理。低温预处理在花培上比较常用。芸薹属蔬菜一般使用的预处理温度为4℃^[7,15,16]。朱彦涛等认为,若对花蕾冷藏处理时,一般适于1d内取蕾培养,超过1d则花蕾发黄,小孢子的生活力迅速下降;若对1~3cm长的花序冷藏处理时,一般适于4d内取蕾培养。

2.3 培养基

2.3.1 培养基类型 芸薹属蔬菜花药培养常用的培

第一作者简介:王小霞,女,1980年生,硕士研究生,研究方向为蔬菜种质与遗传育种。
通讯作者:崔辉梅, E-mail: chm_agr@shzu.edu.cn.
收稿日期:2006-08-10

培养基有 Nitch、MS、B5、NLN, 较为常用的为 B5 和 NLN^[17]。林呐等^[7]比较了 Miller、MS、B5 3 种培养基对愈伤组织诱导频率的影响, 结果表明 B5 培养基的效果最好。邹金美等^[14]把不同基因型的羽衣甘蓝花药分别接种到 Keller、MS 和 Nitch 3 种基本培养基上, Keller 培养基诱导胚状体的能力最强, Nitch 培养基居中, MS 培养基诱导率最低。Keller 的基本配方最适合于羽衣甘蓝花药培养诱导胚状体。此外, 将 Keller 培养基的有机成份加倍, 则可以明显提高胚状体的诱导效率, 甚至能够提高 2 倍以上。由此说明培养基中的谷氨酰胺、肌醇、VB₁ 和 VB₆ 等有机成份在诱导胚状体中所起的重要作用。

2.3.2 激素 一般的花药培养都是通过培养基中加入激素产生愈伤组织, 再促使愈伤组织分化产生形成植株的。培养基中激素种类、浓度、配比常常对诱导细胞生长和分裂起重要作用。花粉究竟是发育为胚还是愈伤组织, 在很大程度上取决于培养基中激素的种类和浓度。调节激素成分还可以影响到是花药的二倍体的体细胞组织生长增殖还是单倍体细胞花粉增殖^[18]。油菜花培中, 适当降低 2, 4-D 用量, 能提高胚状体的诱导频率, 抑制花药体细胞形成愈伤组织和植株^[19]。特别值得一提的是: 寸守铎等(1997)在甘蓝型油菜花药培养过程中, 在不同时期, 加入适量的多效唑, 对胚状体的形成具有明显的促进作用, 其诱导率可从 71.5% 提高到 411.1%。

2.3.3 无机及有机营养物质 培养基中无机及有机营养物质对花药培养也有一定的影响。Dias & Martins (1999)对甘蓝类蔬菜花药培养研究发现, 诱导培养基中添加 10 mg/L 的 AgNO₃ 后, 出胚率大大增加, 而在未加 AgNO₃ 的培养基中, 这些基因型几乎没有胚状体形成。另外, 对 AgNO₃ 的反应依基因型的不同而有差别。戴林建^[20]还认为 AgNO₃ 的应用可能解决芸薹属植物组织培养过程中由于根的产生而抑制不定芽形成的关键问题。有时附加物对于花粉愈伤组织的生长是有益的。常用的有维生素、氨基酸、核酸碱基、糖类等。氨基酸对花药培养十分重要。Olsen 将培养基中 20 mM NH₄NO₃ 减至 2 mM, 同时补加 5.1 mM 谷氨酰胺, 使大麦花药培养绿苗产量提高到 464%。研究认为采用谷氨酰胺或天冬酰胺代替高浓度的硝酸铵对花药培养最有利。关于氨基酸对花药培养的作用机理, 研究甚少。Zhang 等认为脯氨酸与含羟基脯氨酸的蛋白质的合成有关, 而这种蛋白质是花粉壁的组成成分。而 Zhu 等^[21]报道了不同的氨基酸补加到培养基中, 能影响愈伤组织中同工酶的酶谱及过氧(化)物酶的活

性, 并且表现出一定的相关性, 从而提出氨基酸与过氧(化)物酶基因的表达相关, 而这种酶的活性似乎与植株再生能力有关。因为随着愈伤组织继代次数的增加, 则绿苗分化率逐渐降低, 而对应的过氧(化)物酶的活性也逐渐降低。

2.3.4 蔗糖 蔗糖是作为碳源和渗透压调节剂加在培养基中。不同植物细胞渗透压差异很大, 因此各种植物花培要求不同的蔗糖浓度。芸薹属蔬菜花药培养使用的浓度一般为 10%^[14, 22]。

2.3.5 活性炭 近年来活性炭作为一种有效的因子被加入到培养基中。Anagnostakis 将 1% 的活性炭加入烟草花药的培养基中, 从而使花粉植株的产量提高了 1~2 倍。卢钢等^[23]试验发现加活性炭可以克服毒性物质的危害, 由于不同的基因型早期释放的有毒物质不同, 活性炭的作用效果有很大的差异。低胚胎发生率的基因型往往释放有毒物质的能力比胚胎发生率高的基因型要强得多, 所以加活性炭的效果明显。活性炭处理对胚产量的影响在不同基因型上表现不同, 但对成熟胚的发育有明显的促进作用。而 Zhang D S 等^[24]在花椰菜上的试验表明, 部分基因型加入活性炭后, 胚胎发生率反而下降。原玉香等^[19]也在人工合成甘蓝型油菜的花药培养中发现 0.5 g/L 活性炭的加入降低了胚状体的诱导。而 GLANG 等在油菜不同基因型的游离小孢子培养中发现加入质量分数为 1% 的活性炭虽不提高胚产量, 但却促进胚的发育, 有利于植株再生。究竟加不加活性炭和加多少还有待进一步研究。

3 再生植株的移栽

再生植株长至 4~5 片叶大小时可以进行移栽。移栽时洗净试管苗所带培养基, 然后移入装有培养基质的塑料钵中进行练苗, 数天后栽入大田。在这个过程中, 练苗是关键, 练苗所用的培养基质配方是否合适, 是否消过毒, 培养基质透气保水性能如何, 以及培养室中的温、湿度及光照等是否适宜都将影响再生植株的成活率。

4 花粉植株倍性鉴定及染色体加倍

4.1 倍性鉴定

花药培养所得到的再生植株虽是由单雄生殖产生, 但再生植株并不象期望的那样全是单倍体, 其倍性是混杂的。Stipic M 在花椰菜的花药培养中获得的再生植株中单倍体 : 二倍体 : 多倍体为 6 : 79 : 15。Cao M Q 对芜菁游离小孢子培养获得的再生植株的倍性分析, 2 个品种中单倍体的比例分别为 25% 和 83%。如何确定再生植株的倍性水平是值得研究的。长期以

来都是通过显微观察来鉴定个体的染色体倍性, 主要方法有: 花粉粒大小判别法、根尖染色体记数法、气孔保卫细胞叶绿体记数法、保卫细胞长度测量法等, 这些显微方法技术难度大。目前最快速且有效地鉴别花培苗染色体倍性的方法是采用倍性分析仪或称 DNA 流式细胞仪测定法(DNA flow cytometry), 它可以直接测定细胞的 DNA 含量, 从而快速鉴别植株的染色体倍性水平, 并已被成功地用于花椰菜(*B. oleracea uar. bot-rytis*)和青花菜(*B. oleracea uar. italica*)花培苗倍性鉴别上。

4.2 染色体加倍

单倍体植株如何加倍成纯合的二倍体植株, 对于将花培技术真正用于实际的育种工作至关重要, 目前加倍的途径有自然加倍和人工加倍。

4.2.1 自然加倍 花粉植株群体中自发加倍的频率在不同植物上是不同的, 自然加倍可能来源于未减数的配子或最初几次原胚的核内有丝分裂, 自然加倍的优点是不会出现畸变。

4.2.2 人工加倍 人工加倍的方法通常有 2 种, 一是先移栽后加倍, Polsoni 等在开花时根据花的形态判断植株倍性, 然后将单倍体植株根洗净, 用 0.1%~0.34%的秋水仙素浸泡, 砍去植株上部, 任其重新生长。二是先加倍后移栽, 将具有 3~4 叶, 1~3 根的植株通过无菌操作转入 B5 培养基中, 附加 10~100 mg/L 秋水仙碱, 加倍后移栽入土, 开花时, 根据花的形态和花粉发育情况判断倍性。

5 展望

花药培养难度大的原因主要是花粉来源、植株的基因型及其所处的生理状态、培养基的物理状态及其成分、培养方式等, 这些必要的因素尚有待进一步深入研究。同时还应关注这方面的基础性研究, 并通过遗传手段创造适合培养的基因型。另外, 培养基也是一个重要的影响因素, 应该加强筛选工作来找出合适的培养基。随着这些方面的改进, 芸薹属蔬菜的花药培养效率可能会得到很大的提高, 为芸薹属蔬菜育种做出更大的贡献。

参考文献:

[1] Kerler W A, Rajhathy T, Lacapra J. In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris* [J]. *Can Genet Cytol*, 1975, 17: 655—666.
[2] Thomas E, Wenzel G. Embryogenesis from microspore of *Brassica napu* [J]. *Z Pflanzenzucht*, 1975, 74: 77—81.
[3] Keller W A, Amstrong K C. Embryogenesis and plant regeneration

in *Brassica napus* anther Culture [J]. *Can J Bot*, 1977, 55: 1383—1388.
[4] Farbam M W, Canihlia E J. Efficient ploidy determination of anther—derived broccoli [J]. *Hortscience*, 1988, 33(2): 323—327.
[5] Gorecka K. Obtaining homozygous lines of head cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) with the aid of anther culture [J]. *Prace Habilitacyjne*, 1988, 14: 71—75.
[6] 万萌, 邱仕芳, 寸守锐, 等. 多效唑对提高油菜花药培养诱导花粉胚的影响 [J]. *西南农业学报*, 1997, 10(2): 57—61.
[7] 林响, 李加纳, 何凤发, 等. 甘蓝型黄籽油菜花药培养中若干因素影响研究 [J]. *西南农业大学学报*, 2000, 10, 22(5): 421—423.
[8] 黄普照乐, 吴伟锋, 孙崇波, 等. 羽衣甘蓝花药离体培养研究 [J]. *浙江农业科学*, 2005, 2: 114—115.
[9] 曹鸣庆, 李岩, 刘凡. 基因型和供体植株生长环境对大白菜游离小孢子胚胎发生的影响 [J]. *华北农学报*, 1993, 8(4): 1—6.
[10] 原玉香, 蒋武生, 张晓伟, 等. 人工合成甘蓝型油菜的花药培养 [J]. *河南农业大学学报*, 2004, 12, 38(4): 414—416.
[11] Kuginuki K, Nakamura K. Varietal difference in embryogenic and regenerative ability in microspore culture of Chinese Cabbage [J]. *Breeding Science*, 1997, 47(4): 341—346, 391.
[12] Lo K H, Pauls K P. Plant growth environment effects on rapeseed microspore development and culture [J]. *Plant Physiol*, 1992, 99: 468—472.
[13] 官春云. 油菜小孢子培养和双单倍体育种研究 [J]. *作物学报*, 1995, 21(6): 665—670.
[14] 邹金美, 张国广, 潘一山. 羽衣甘蓝花药培养技术体系的研究 [J]. *漳州师范学院学报(自然科学版)*, 2005, 2: 94—97.
[15] Seiki Sato, Norio Kato. 低温预处理白菜型油菜的花芽或花序对离体小孢子培养的影响. 邱敦莲译自 *Breeding Science*, 2002 52(1): 23—26.
[16] 朱彦涛, 李殿荣, 杨淑慎. 低温预处理和基因型对甘蓝型油菜小孢子胚胎发生的影响 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2005, 5, 33(5): 88—94.
[17] 武剑, 龚义勤, 柳李旺, 等. 十字花科蔬菜花粉植株诱导技术研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2000, 28(6): 747—749.
[18] 李靖, 李焕秀, 李敏, 等. 蔬菜花药培养研究进展 [J]. *中国蔬菜*, 2005(6): 36—39.
[19] 钟维瑾, 方光华, 唐克轩. 甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.) 花药培养中若干因素对花粉胚状体诱导和植株再生的影响 [J]. *上海农业学报*, 1990, 6(2): 7—14.
[20] 戴林建. 提高油菜芽苗分化频率研究 [J]. *湖南农业大学学报*, 1999, 25(1): 16—20.
[21] Zhu M Y. Effect of amino acids on callus differentiation in barley anther culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1990 22: 201—204.
[22] Sato T, Nishio T, Hirai M. Plant regeneration from isolated microspore culture of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *Pekinensis*) [J]. *Plant Cell Report*, 1989, 8: 486—488.
[23] 卢钢, 曹家树. 白菜和芜菁杂种小孢子培养研究 [J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2001, 27(2): 161—164.
[24] Zhang D S, Cao M Q, Qing Z W. Effects of genotype and active carbon on microspore embryogenesis in broccoli *Brassica oleracea* ssp. *italica* [J]. *Cruifera new letter*, 1998, 20: 45—47.
(新疆石河子大学农学院园艺系, 832003)