

大白菜游离小孢子培养技术研究

江 伟, 王小霞, 鲜开梅, 崔辉梅

(新疆石河子大学农学院园艺系 832003)

摘 要: 游离小孢子培养技术是获得大白菜单倍体植株的有效途径之一。通过对影响大白菜游离小孢子胚胎发生的主要因素—材料基因型、供体母株生长状态、小孢子发育时期、培养方法、培养条件和影响植株再生频率的因素以及小孢子植株的加倍方法等进行了综述。

关键词: 大白菜; 游离小孢子培养; 胚状体

中图分类号: S 634. 103. 6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)05-0049-03

大白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* Olson)属十字花科芸薹属蔬菜作物,在我国秋、冬季的蔬菜生产与供应中居主导地位,成为我国栽培面积最大、产量最高的蔬菜作物。

大白菜是异花授粉作物,杂种优势十分明显。但传统育种方式和单倍体育种相比有着育种效率低、经济性状易劣变等缺点,因此以游离小孢子培养为主的新的单倍体育种方式正在逐步发挥着更大的作用。

前人在曼陀罗和烟草、甘蓝型油菜花药培养中发展了游离小孢子培养技术, Lichter^[1] 1982 年首次报道了在芸薹属作物中应用游离小孢子培养技术,并取得了成功。1989 年,日本学者 Sato^[2] 在进行大白菜游离小孢子培养时,从一个品种中得到了小孢子胚和再生植株。而我国在大白菜游离小孢子培养技术研究上,最初的报道是在 1993 年^[3,4,5,6]。研究普遍认为,植株基因型^[3,5]、小孢子发育时期^[5,7]、培养前的预处理^[4,8]、供体母株生长条件^[3,8] 对小孢子成胚有重要影响;此外胚状体类型^[5]、培养方式对植株再生^[9] 有着至关重要作用。

1 供试材料对胚胎发生的影响

1.1 材料的基因型

材料的基因型是决定胚胎发生高低和有无的重要因素。它对大白菜游离小孢子成胚能力的作用体现在两个方面:第一是不同的基因型对小孢子能否成胚起着至关重要的作用。栗根义等、曹鸣庆等、李岩等^[3~7] 认为大白菜是具有较强小孢子发生能力的栽培植物种。但

是也有相反的报道,如许艳辉等^[10] 的试验。第二是成胚的数量有着巨大的差异。在 1993 年,曹鸣庆等研究发现,产胚量最高的 2 个基因型平均每个花蕾产胚 359.28 个,而大多数基因型产胚量为 2 个蕾以下。张凤兰、栗根义也分别在 1993 和 1994 年通过实验证明不同基因型大白菜胚状体发生能力有明显差异。可见,小孢子胚胎发生能力同其它遗传性状一样,是一种受基因调控的遗传特性。

1.2 供体母株生长状态

供体植株生长的温度条件是影响小孢子培养的关键因素。1988 年, Keller^[11] 报道,现蕾开花期植株处于较低温度条件下,昼夜温度为 10℃~5℃胚状体产量较高,而在 20℃~15℃条件下小孢子不能形成胚状体。日照长度对小孢子产胚量也有一定影响。曹鸣庆等^[3] 报道,在小孢子培养工作中,若有人工气候室,尽量使植株生长在 14~16h 的日照及 15℃~20℃的温度条件下,以便得到更好的培养结果。在无人工气候室的情况下,小孢子培养工作尽量在春季(3~4 月份)进行,以避免秋季日照短、温度高等对小孢子培养不利的环境条件。种植密度对小孢子胚胎发生有一定影响。1988 年, Chuong 等用 6 种基因型材料设置两种种植密度,其中在 4 个基因型中,高密度产胚量显著降低。

1.3 小孢子发育时期

Sato 等成功进行了大白菜游离小孢子培养时所选取的大白菜花蕾的长度为 2.0~2.5mm,该长度的花蕾中大多数小孢子处于单核靠边期,所以研究认为单核靠边期的小孢子最适合进行游离小孢子培养;同时又指出,应该对影响大白菜游离小孢子培养的其它潜在因素做进一步的研究和探索,例如花蕾大小、培养前的高温预处理、环境条件等。在 1988 年, Kott^[12] 研究发现小孢子的发育阶段和花蕾中花瓣与花药长度的比值密切相关。在 1993 年,曹鸣庆等^[3] 也发现蕾长与小孢子发育进程密切相关。大白菜花蕾长 2.0~2.5mm 时,胚产量最

第一作者简介:江伟(1981-),男,山东人,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.

基金项目:新疆维吾尔自治区高等学校科研计划资助项目(XJEDU2005I41)和石河子大学科学技术研究发展计划资助项目(ZRKC2005049)。

收稿日期:2007-01-11

高, 蕾长 2.6~3.0mm 时, 胚产量次之; 蕾长小于 2.0mm 或大于 3.6mm 时, 均不能诱导胚胎形成。

2 培养方法和培养条件对胚胎发生的影响

2.1 预处理和预培养方法

自从在甘蓝型油菜花粉培养中首次用高温处理提高了花粉胚的诱导频率以来, 该方法也被广泛用于芸薹属植物的游离小孢子培养。高温预处理在大白菜游离小孢子培养中也收到了良好的效果。实验证明, 接种后 33℃~35℃, 暗培养 24h, 对胚状体诱导的效果最为理想。

1995 年, 刘公社^[8]等人应用 FDA 和 DAPI 荧光显微技术观察了高温处理对大白菜小孢子培养的影响。研究结果表明, 小孢子对预培养敏感的时期是最初的 24h, 更长时间并非必要。前 12h 对诱导分裂至关重要, 后 12h 有利于小孢子继续分裂形成胚状体。培养 24h 后再给予高温是无效的。

2.2 培养条件

2.2.1 培养基类型 目前在大白菜游离小孢子培养中主要使用 NLN 培养基, 只有张凤兰采用 BM 培养基, 而这两种培养基成分大量元素、微量元素含量相同, 差别仅在于 BM 培养基的烟酸、叶酸、生物素、VB₁、VB₆ 和甘氨酸等有机附加物含量是 NLN 的一半, 并且不含肌醇。Sato 认为, 大量元素含量对胚胎产量有重要影响, 减半的 NN 大量元素(即 NLN 大量元素)比 NLN 更有效。Keller 等研究也认为将 NLN 液体培养基的大量元素减少到一半, 有利于小孢子胚胎发生。但至今在 B5 和 MS 培养基上未见有成功的报导。

2.2.2 碳源 在培养基成分中, 普遍采用蔗糖作为碳源, 以提供能量和维持细胞渗透压。由于不同植物细胞渗透压差异大, 因此各种植物小孢子培养要求不同的蔗糖浓度。甘蓝型油菜以 13% 为宜, 甘蓝(*B. oleracea*)最适合的蔗糖浓度为 14%。大白菜一般采用 13%。

2.2.3 激素 培养基中的激素成分常常对诱发细胞生长和分裂起重要作用。不同种类、不同品种、不同基因型的植株, 对培养基中激素的有无、种类和水平的反应是不同的, 且前人未能取得一致结果。徐艳辉^[10]发现, BA 对大白菜小孢子胚发生有一定的促进作用, 最佳浓度为 0.2mg/L; 但对难成胚的基因型作用不大。在 2002 年, 石淑稳报道, 附加 0.1 或 0.5mg/L 2,4-D 可显著促进小孢子分裂和胚状体产生。许多研究者也使用了不加外源激素的培养基, Lichter^[11]报导, 培养基中省去植物生长调节剂可提高胚产量; 栗根义、曹鸣庆等人也发现纯粹的 NLN 培养基对大白菜胚胎的诱导率可达很高的水平。

2.2.4 活性炭 小孢子培养中加入活性炭能提高胚状体的发生率, 已经在同属的油菜、绿菜花以及其它科属的烟草、甜椒、辣椒、玉米、龙眼等中有类似报道。关于

活性炭的作用, Weatherhead 和 Hensaw 在 1979 年认为活性炭能吸附培养基中的 5-羟甲基糠醛, 这是在高压灭菌时由蔗糖还原而产生的一种物质, 它对离体组织的生长有一定的抑制作用。许艳辉^[10]报道适量的活性炭(0.01~0.02g/L)有利于胚状体的形成。

但是, 也发现经活性炭处理获得的胚状体在光下转绿、萌发、成苗等方面都差于未经活性炭处理获得的小孢子胚。Kott^[12]认为这可能是因活性炭的吸附作用无选择性, 在吸附培养基中有吸附有害毒性物质的同时还吸附培养基中的生长调节剂、铁盐、维生素等与胚生长和分化密切相关的物质。对于活性炭的最适使用浓度以及最佳使用时间还有待进一步研究, 应在发挥它的正面作用的同时, 尽量降低其负面效应。

3 胚状体发生及植株再生研究

3.1 胚状体发生及植株再生

前人指出, 一般在培养 1~3d 小孢子开始第 1 次细胞分裂, 7~11d 可形成大量肉眼可见的球形胚, 15d 左右可形成心形、鱼雷及子叶形胚。栗根义等^[5]报道鱼雷及子叶形胚出现较晚(40d 形成鱼雷及子叶形胚); 胚状体的发育并不同步, 原胚、球形胚、心形胚、鱼雷形胚及子叶形胚并存, 同时还有许多畸形胚。

转移到 B5 或 MS 琼脂培养基上, 部分胚状体成苗。小孢子胚成苗率差异很大, Sato 的实验中, 成苗率为 5%~10%。不能成苗的原因是胚发育停留在某一阶段(特别是球形胚、心形胚)或者是鱼雷形胚、子叶形胚缺乏茎尖生长点^[9]。曹鸣庆等^[7]报道, 心形期至鱼雷期的胚胎移植后半数以上发育为幼苗, 其中 5%~10% 为白化苗。

刘凡等^[9]对培养基的水分状况与大白菜小孢子胚发育及成苗的关系作了若干研究表明, 大白菜的成熟小孢子胚在 NLN-13 液体培养基中滞留时间的长短对以后的胚培养影响甚大。研究还发现, 培养基的水分状况对胚状体再生成植株影响很大, 以含 1.2% 琼脂的 MS 培养基成苗率最高, 达到 85.8%。

3.2 小孢子植株的倍性

游离小孢子培养发育成的植株, 并不像所期望的那样都是单倍体。其中不但有二倍体, 还有多倍体和非整倍体, 但单倍体和二倍体比例大。小孢子经培养所产生的单倍体小植株常常表现高度不孕, 为了使之能正常结籽, 与育种实践相结合, 必须诱导染色体加倍。现今诱导染色体加倍的化学药剂多为秋水仙碱, 浓度为 0.01%~0.41%, 而以 0.2% 左右的浓度应用最广。处理时间依处理浓度的高低而定, 浓度高, 处理时间短; 浓度低, 处理时间长。用秋水仙碱使染色体加倍的方法有两种, 一是先移栽后加倍。在 1991 年 Mathias 将具 3~4 叶的幼苗转到 B5 培养基中, 附加 10~100mg/L 秋水仙碱; 二是加倍后移栽到土壤中, 加倍效率最高达 50%; 秋

水仙碱浓度为 500mg/L, 处理时间为 4~8d。

4 存在问题与展望

大白菜杂种优势育种中, 现在主要用常规自交的方法纯化亲本。要育成纯合可利用亲本需要 3~4a, 而采用游离小孢子培养技术, 在 2~3a 内即可获得完全纯合的等基因纯系, 可大大缩短育种年限, 提高育种效率。此外, 游离小孢子培养方法还可以应用于诱变和突变体筛选、基因转化等研究, 通过花粉培养建立的双、单倍体群体更是分子标记和基因图谱的理想材料。

大白菜游离小孢子培养研究虽然取得了很大进展, 但是在理论和应用上仍存在许多问题, 远远没有达到建立起完善的、高频的、再生体系的程度。今后应加强理论研究和实验技术两方面的工作, 深入探讨小孢子发育的调控机理, 进一步研究各种因素对胚胎发生、小孢子成胚能力和再生植株加倍的影响, 改进培养方法、培养基配方及培养条件, 建立能稳定、高效地获得纯合二倍体的游离小孢子培养体系。

我们可以预言, 游离小孢子培养技术与传统育种技术的有机结合必将成为常规育种的一个重要组成部分。

参考文献:

[1] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated of Brassica napus. Z

[J]. Pflanzenphysiol. 1982, 105: 42-43.
[2] Sato T. et. al. Plant regeneration from isolated microspore culture of Chinese Cabbage (Brassica campestris ssp. Pekinensis) [J], Plant Cell Reports 1989, 8: 486-488.
[3] 曹鸣庆, 李岩, 刘凡. 基因型及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.
[4] 栗根义, 高睦枪, 赵秀山. 高温预处理对大白菜游离小孢子培养的效果(简报) [J], 实验生物学报. 1993 26(2): 165-166.
[5] 栗根义, 高睦, 赵秀山. 大白菜游离小孢子培养 [J]. 园艺学报. 1993 20(2): 167-170.
[6] 李岩, 刘凡, 曹鸣庆. 通过游离小孢子培养方法获得小白菜三个变种的胚胎和植株 [J]. 华北农报. 1993 8(3): 92-97.
[7] 曹鸣庆, 李岩, 蒋涛等. 大白菜和小白菜游离小孢子培养试验简报 [J]. 华北农学报. 1992, 7(2): 119-120.
[8] 刘公社, 李岩, 刘凡, 曹鸣庆. 高温对大白菜小孢子培养的影响 [J]. 植物学报. 1995 37(2): 140-146.
[9] 刘凡, 李岩, 姚磊等. 培养基水分状况对大白菜小孢子胚成苗的影响 [J]. 农业生物技术学报. 1997, 5(2): 131-136.
[10] 许艳辉, 冯辉, 张凯. 大白菜游离小孢子培养中若干因素对胚状体诱导和植株再生影响 [J]. 北方园艺. 2001, (3): 6-8.
[11] Keller W A, Fan Z, Pechan P et al. An efficient method for culture of isolated microspore of Brassica napus. In: Proc. 7th Inter Rapeseed Cong 1988. 152-157.
[12] Kott L S, Plosni L, Beversdorf W D. Cytological aspects of isolated microspore culture of Brassica napus L. can JBot. 1988 66: 165-166.

Study on Isolated Microspore Culture in Chinese cabbage

JIANG Wei¹, WANG Xiao-xia¹, XIAN Kai-mei¹, CUI Hui-mei
(1. Department of Horticulture, Shihezi University, Xinjiang 832003)

Abstract: Isolated Microspore culture is one of the methods to obtain haploid. In this paper, the progress of isolated microspore culture was reviewed; the major factors affecting regeneration; the methods of reduplication; the major factors affecting the formation of embryo, for example, experimental material, culture medium, raise condition, a phase of microspore growth.

Key words: Chinese cabbage; Isolated Microspore culture; Somatic embryogenesis

杏 树 整 形 因 种 而 异

杏树整形应根据品种特性而定。开张性品种宜采用自然开心形, 直立性品种宜采用自然圆头形或疏散分层形。

自然开心形整形 在主干上培育 3~4 个主枝, 主枝直线延伸, 每个主枝上再侧向配置 2~3 个侧枝。整形过程: 栽培一年距地面 70~80cm 定干, 定干后第二年, 在 20cm 整形带内先留 3~4 个生长健壮、长势好、向四周均匀分布的新枝作为主枝。选留主枝后的当年冬季, 根据各主枝生长情况修剪。本着主枝间相互平衡的原则, 分别在饱满芽处短截。剪口留外芽, 使主枝向外延伸, 开张角度。第二年冬剪时, 仍按上述方法短截。

多主枝自然圆头形整形 在主干上选留 5~6 个主枝, 主枝上适当配置侧枝, 使树冠呈多主枝自然圆头形。整形过程: 苗木栽植后, 距地面 70~80cm 定干, 每二年选留 5~6 个主枝剪截成自然开心形。主枝上每隔 40~50cm 选留一个侧枝, 侧枝上面选留小枝和结果枝组。

疏散分层整形 建立两层主枝, 第一层 4~5 个或 3~4 个主枝; 第二层 2~3 个主枝后落头开心。整形过程: 幼树定植后, 距地面 70~80cm 定干, 在 20~30cm 的整形带内, 均匀地选留 3~4 个主枝, 保留中央领导干。在距第一层主枝 80~90cm 处选留第二层主枝, 层内主枝距离 30cm 左右。选留第二层主枝后, 将中央领导干落头开心。