

芥蓝游离小孢子培养及植株再生研究

赵前程, 李素文, 文正华, 孙德岭

(天津科润蔬菜研究所, 天津 300384)

摘要: 对12个基因型的芥蓝进行了游离小孢子培养及植株再生研究。结果表明: 供体基因型对诱导胚胎发生至关重要; 最佳热激温度为 32℃, 24 h; 单核靠边期到双核期的小孢子最适合进行胚胎诱导; NLN 培养基中的最佳蔗糖浓度为 130 g·L⁻¹; 添加活性炭可以提高成胚速度和质量; 15~25℃的供体植株生长的环境温度决定着游离小孢子培养的成败, 将子叶型胚胎转移到 MS 固体培养基上可直接发育成植株。

关键词: 芥蓝; 游离小孢子培养; 胚胎发生; 再生植株

中图分类号: S 635.903.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)09-0004-03

自 1982 年 Lidher^[1] 首次报道甘蓝型油菜游离小孢子培养获得再生植株以来, 芸薹属中很多种作物通过游离小孢子培养获得了再生植株。而芥蓝(*Brassica alba* Bailey) 游离小孢子培养报道较少, 只有 Takahata Y^[2]、何杭军等^[3] 在基因型、培养方式以及植株再生方面进行了研究。试验以芥蓝的 12 个基因型为试材, 对供体植株生长环境, 游离小孢子的培养方法和培养基以及植株再生等方面进行了研究, 以期丰富芸薹属作物游离小孢子培养技术研究。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的芥蓝品种均为市售种子, 翠宝(CB)、绿宝(LB)、香菇芥蓝(XG)、澄海粗条(CH)、四季甜脆芥蓝(SJ)、鸡腿芥蓝(JT)、白花芥蓝(BH)、澳洲粗条(AZ)、香港早花(XZ1)、香港中花芥蓝(XZ2)、香港迟花芥蓝(XC)、尖叶中花(JY)共 12 个品种(以下各品种名称均以代号代替)。2005 年 3 月下旬直接播种于田间, 4 月下旬初花期后取蕾进行试验。

1.2 方法

1.2.1 小孢子发育时期的确定 取幼嫩花序花蕾, 用醋酸洋红染色法鉴定小孢子发育时期, 确定进行培养的最佳时期。

1.2.2 小孢子的分离和培养 供试材料在初花后 3 d 开始进行试验, 在花序上选取长度为 4.0~5.0 mm 的花蕾, 用 2%(W/V) 有效氯的安替福民溶液表面消毒

15 min, 无菌水冲洗 3 次, 每次 5 min。洗涤后将花蕾放于无菌研钵中, 加入少量 B₅-10(含 B₅ 大量、微量元素、铁盐和有机成分, 10%蔗糖, pH 6.0, 112℃灭菌 20 min) 洗涤培养基, 用研棒轻压, 使小孢子从花蕾游离到液体培养基中, 用 50 μm 孔径尼龙网过滤, 收集滤液, 用 100 g 离心 3 次, 每次 3 min。第 3 次离心后, 将小孢子悬浮于经过滤灭菌的 LNLN-13 液体培养基(含 NLN 大量、微量元素、铁盐和有机成分, 13%蔗糖, pH 6.0 抽滤灭菌), 小孢子密度调整到 1~2×10⁵ 个·mL⁻¹, 每个无菌培养皿(直径 60 mm)中放入 2 mL 小孢子悬浮液, 加入活性炭水悬液, 终浓度为 0.5 g·L⁻¹, Parafilm 封口, 高温预处理后置 25℃暗培养。试验过程中每个试验处理 3 皿, 3 次重复。3 周左右调查小孢子胚胎发生情况, 转到 4 000 lx、16 h·d⁻¹、25℃条件下继续培养。期间用倒置显微镜观察细胞分裂、胚胎发育过程。

1.2.3 高温预处理对胚胎发生的影响 将分装了小孢子悬浮液的培养皿分别放在 30℃、32℃、34℃和 36℃下培养 24、48、72 h, 对照为 25℃, 供试品种为 CB。

1.2.4 不同蔗糖浓度对胚胎发生的影响 NLN 培养基中分别添加 100、130、150 g·L⁻¹ 的蔗糖, 比较不同渗透压对小孢子胚胎发生的影响, 供试品种为 CB、CH、LB。

1.2.5 活性炭对胚胎发生的影响 活性炭悬浮液含琼脂糖 0.5 g·L⁻¹、活性炭 10 g·L⁻¹ 的水悬浮液, 112℃高压灭菌 20 min 后备用, 小孢子悬浮液分装到培养皿中, 将活性炭悬浮液混匀后加入, 终浓度 0.5 mg·mL⁻¹, 对照为不加活性炭, 供试品种为 CB、CH、LB。

1.2.6 供体植株生长温度对小孢子培养的影响 从 4 月初到 5 月下旬用自计温度计记录田间环境温度, 观察环境温度对小孢子胚胎发生的影响。

2 结果与分析

2.1 小孢子不同发育时期观察及培养效果

第一作者简介: 赵前程(1971-), 男, 硕士, 副研究员, 主要从事花椰菜生物技术、新品种选育研究工作。

基金项目: 天津市重点自然科学基金资助项目(06YFZJC02300); 天津市科技创新专项资金资助项目(06FZZDNC01103)。

收稿日期: 2007-04-10

在显微镜中观察到单核早期的小孢子呈三裂状, 体积较小, 细胞质中无液泡, 细胞核大, 位于细胞正中, 此时的小孢子发育时期为单核早期。对这个时期占大多数的小孢子群体进行培养始终没有胚胎发生; 单核靠边期到双核期的小孢子体积增大呈圆形(双核期小孢子体积更大), 细胞中形成大液泡, 细胞核被挤到靠近细胞壁处。此阶段的小孢子进行培养出胚率最高; 三核期小孢子(花粉)其形状呈椭圆形, 用这个阶段的小孢子培养不能获得胚胎发生。

表 1 不同基因型对小孢子胚胎发生的影响

| 品种 | 细胞分裂 | 胚胎产量/胚·蕾 ⁻¹ | 子叶型胚/胚·蕾 ⁻¹ |
|-----|------|------------------------|------------------------|
| CB | + | 22.5 | 8.7 |
| CH | + | 16.8 | 7.0 |
| LB | + | 11.2 | 4.8 |
| XZ1 | + | 8.3 | 2.6 |
| JT | + | 6.6 | 1.5 |
| BH | + | 3.5 | 0.5 |
| AZ | + | 1.8 | 0.4 |
| XG | + | 0.8 | 0 |
| XZ2 | + | 0.2 | 0 |
| SJ | + | 0 | 0 |
| XC | - | 0 | 0 |
| JY | - | 0 | 0 |

注 +、- 表示有无。

2.2 芥蓝游离小孢子培养过程中胚胎发生的细胞学观察
小孢子在 NLN 培养基中高温预处理 24 h 后, 可见部分小孢子直径增大 1~2 倍, 3~4 d 可见小孢子开始第

表 3 不同蔗糖浓度对胚胎产量的影响

| 基因型 | 100/g·L ⁻¹ | | 130/g·L ⁻¹ | | 150/g·L ⁻¹ | |
|-----|-----------------------|------|-----------------------|------|-----------------------|------|
| | 子叶胚 | 胚胎总数 | 子叶胚 | 胚胎总数 | 子叶胚 | 胚胎总数 |
| CB | 4.0 | 8.2 | 8.4 | 20.5 | 0 | 8.2 |
| CH | 2.0 | 4.5 | 7.0 | 16.2 | 0 | 9.2 |
| LB | 2.6 | 6.0 | 4.6 | 11.2 | 0 | 7.8 |

一定的蔗糖浓度可以维持小孢子内外的压力平衡。从表 3 可以看出: 3 个处理中, 蔗糖浓度为 130 g·L⁻¹ 的胚胎产量最高, 100 g·L⁻¹ 及 150 g·L⁻¹ 的浓度处理胚胎发生均明显减少。试验中发现: 蔗糖浓度还影响胚胎的发育质量, 100 g·L⁻¹ 的浓度中子叶型胚胎所占胚胎总数的比例最高, 而 150 g·L⁻¹ 的浓度处理只能获得心型胚, 不能获得子叶型胚胎。

2.6 活性碳对小孢子胚胎发生频率的影响

表 4 添加活性炭对小孢子胚胎产量的影响 胚·蕾⁻¹

| 基因型 | CK | | 添加活性炭 | |
|-----|-----|------|-------|------|
| | 子叶胚 | 胚胎总数 | 子叶胚 | 胚胎总数 |
| CB | 6.0 | 15.6 | 8.2 | 21.8 |
| CH | 2.0 | 7.5 | 6.6 | 16.0 |
| LB | 0 | 3.2 | 4.5 | 10.2 |

培养基中添加活性炭, 可以促进胚胎发育, 提高子叶型胚胎在群体中的比例。供试的 3 个基因型中, 添加活性炭均可以明显提高胚胎产量, 其中对于 LB 作用最为明显, 产量是对照的 3.19 倍, 并且对照处理不能获得子叶型胚胎, 添加活性炭后, 子叶型胚胎提高到 4.5 胚·蕾⁻¹。

2.7 供体植株生长温度对小孢子培养的影响

一次分裂, 观察到均等或不均等的两种分裂方式。5 d 后可见多细胞团产生, 10 d 可见原胚出现, 14 d 可见到球形胚、心形胚、鱼雷胚、子叶胚等各阶段的胚产生。在小孢子胚胎发生的过程中存在非同步性, 表现在同一皿中的胚胎群体中同时存在着各个时期的胚(图版 A-D)。

表 2 高温预处理对胚胎产量的影响

| 温度/℃ | 24 h | 48 h | 72 h |
|--------|------------------------|------|------|
| | 胚胎产量/胚·蕾 ⁻¹ | | |
| 25(CK) | 0 | - | - |
| 30 | 6.3 | 6.8 | 0.5 |
| 32 | 20.8 | 15.0 | 0 |
| 34 | 14.4 | 4.2 | 0 |
| 36 | 0 | 0 | 0 |

2.3 基因型对芥蓝胚胎发生的影响

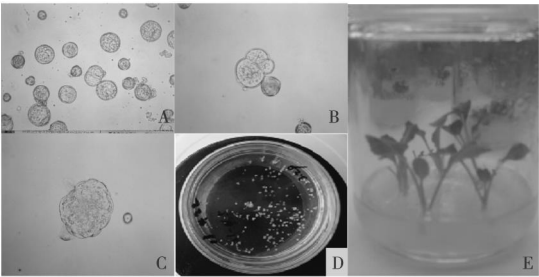
不同的基因型胚胎发生能力不同, 在供试的 12 个基因型中, 有 10 个观察到小孢子的细胞分裂, 8 个基因型获得胚胎。其中以 CB 胚胎发生能力最强, 出胚率为 22.5 胚·蕾⁻¹(表 1)。

2.4 高温预处理对小孢子胚胎发生的影响

高温预处理是诱导小孢子胚胎发生的必要条件, 本试验中, 最佳的处理条件是 32℃、24 h。30℃、34℃处理 24 h、48 h, 小孢子胚发生明显减少, 34℃处理 72 h 及 36℃的各处理均没有小孢子胚胎发生。

2.5 蔗糖浓度对胚胎发生的影响

采蕾前的环境温度影响小孢子的胚胎发生。从试验结果分析, 采蕾前 5 d 内夜间最低温度低于 10℃, 昼间最高温度高于 30℃时, 进行小孢子培养, 不能获得胚胎发生。当环境温度在 15~25℃时, 胚胎产量最高; 最高温度升高、最低温度降低, 胚胎产量均下降。



各个时期芥蓝小孢子胚胎发生及植株再生图

图版说明: A. 小孢子培养 3 d 后的第一次分裂; B. 4~8 d 细胞的细胞团; C. 培养 6 d 后的多细胞团; D. 培养 14 d 后的胚胎; E. 芥蓝再生植株。

2.8 植株再生

将已经转绿子叶型胚胎移入固体 MS 培养基(含

MS 大量、微量、铁盐和有机成分, 3%蔗糖, 0.7%琼脂, pH 5.8), 在 24℃、16h 光周期下光照培养 4~5 周后, 发育成植株(图版 E), 切取试管苗继代、扩繁培养, 将试管苗转移到生根培养基上(MS+NAA 0.01 g·L⁻¹) 诱导生根, 当根长度达到 4~5 mm 时, 打开培养瓶盖, 进行练苗, 4 d 后移栽下地。

3 结论与讨论

芥蓝的游离小孢子培养受到基因型、采蕾时期的环境温度、小孢子发育时期、高温预处理温度和时间、渗透压等方面的影响。其中基因型决定着胚胎是否发生和发生的多少。试验中的 12 个基因型中, 有 8 个基因型的诱导出胚胎, 成功率为 66.7%, 这个结果高于结球甘蓝、青花菜等其它甘蓝类蔬菜^[4,5]; 不同的基因型的胚胎发生能力也不同, 例如试验中的供试品种 CB 的胚胎发生率为 22.5 胚·蕾⁻¹, 而 XC、JY 2 个品种对培养没有任何反应, 这种结果与大白菜、甘蓝型油菜一样, 也存在基因型障碍^[6,7]。如何克服基因型障碍、提高诱导率是游离小孢子培养研究工作者共同的课题。

高温预处理是将小孢子由原来的配子体发育进程转换到孢子体发育过程的转换“开关”。这种处理已经成为所有作物游离小孢子培养的必需环节。试验中高温处理的温度、时间最佳组合为 32℃、24 h。这个组合也是芸苔属大多数作物的最佳组合^[8]。

供体植株的生长环境决定着小孢子的生理状态, 从而决定能否成功诱导出胚胎, 近来许多研究都表明: 10~25℃植株生长温度最适合进行小孢子胚胎发生^[5,6,9]。研究表明, 采蕾前 5 d 内, 10~30℃的芥兰生长环境都可以诱导出小孢子胚胎, 但是 15~25℃时胚胎发生频率最高。目前有关环境温度对小孢子胚胎发生控制的机理, 还缺乏较为深入的研究。

小孢子的发育阶段也是胚胎是否发生的决定因素。但不同的研究略有差异, 张德双等^[10]在青花菜上、严准等^[11]在甘蓝上认为双核期最有利于小孢子胚胎发生, 而

曹鸣庆等^[9]认为单核靠边期最适合大白菜小孢子胚胎发生。研究表明, 单核靠边期到双核期的小孢子都适合胚胎发生, 这与方淑桂等^[5]在青花菜上的研究一致。

试验还表明, 适合芥蓝小孢子培养的培养基蔗糖浓度为 130 g·L⁻¹, 这与大白菜、甘蓝型油菜等作物上的研究基本相同^[8,12], 此外培养基中添加适量的活性炭可以促进芥蓝小孢子胚胎发育, 提高胚胎质量, 其机理可能是活性炭吸附了培养基中一些小孢子及解体小孢子释放的内容物所产生的有害物质^[13]。

参考文献

- [1] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* [J]. *Z Pflanzenphysiol*, 1982, 105(1), 427-434.
- [2] Takahata Y. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L [J]. *Plant Sci.*, 1991, 74: 235-242.
- [3] 何杭军, 王晓武, 汪炳良. 芥蓝游离小孢子培养初报 [J]. *园艺学报*, 2004, 31(2): 239-240.
- [4] 方淑桂, 张朝辉, 曾小玲, 等. 结球甘蓝游离小孢子及植株再生 [J]. *园艺学报*, 2006, 33(1): 158-160.
- [5] 方淑桂, 张朝辉, 曾小玲, 等. 影响青花菜的游离小孢子培养若干因素 [J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2005, 34(1): 51-55.
- [6] 曹鸣庆, 李岩, 刘凡. 基因型和供体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.
- [7] 余凤群, 刘后利. 供体材料和培养基成份对甘蓝型油菜小孢子胚状体产量的影响 [J]. *华中农业大学学报*, 1995, 14(4): 327-331.
- [8] 曹鸣庆, 刘凡. 芸苔属蔬菜游离小孢子培养研究进展 [J]. *园艺学年评*, 1996(2): 63-90.
- [9] 方淑桂, 张朝辉, 曾小玲, 等. 花椰菜游离小孢子培养及影响因素 [J]. *福建农业学报*, 2006, 21(2): 138-142.
- [10] 张德双, 曹鸣庆, 秦智伟. 绿菜花双核期小孢子所占比例对游离小孢子培养的影响 [J]. *园艺学报*, 1998, 25(2): 201-201.
- [11] 严准, 田志宏, 孟金陵. 甘蓝游离小孢子培养的初步研究 [J]. *华中农业大学学报*, 1999, 18(1): 5-7.
- [12] 杨淑琴, 娄虹, 韩阳. 芸苔属蔬菜游离小孢子培养研究进展 [J]. *辽宁大学学报, 自然科学版*, 2005, 32(1): 91-96.
- [13] Hansen M. Microspore culture of *Swede* (*Brassica napus* ssp. *Rapifera*) and the effect of fresh and conditioned media [J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 12: 496-500.

Isolated Microspore Culture and Plant Regeneration of Chinese Kale

ZHAO Qian-cheng, LI Su-wen, WEN Zheng-hua, SUN De-ling
(Tianjin Kerun Vegetable Research Institute, Tianjin 300384, China)

Abstract: Isolated microspores culture and plant regeneration of 12 genotypes of Chinese Kale (*Brassica albolabra* Bailey) was studied. The result showed that donor plant genotype was critical to induce embryogenesis. The optimal temperature for heat shock was 32℃ for 24h. Late uninuclear stage to binuclear stage microspores were suitable for inducing embryogenesis. The optimal sucrose concentration in NLN medium was 130g·L⁻¹. The addition of activated charcoal could improve embryo formation rate and quality. Donor plant growing at 15~25℃ would decide the success and failure for isolated microspore culture. At last, plant regenerated from cotyledon embryo after transferring to MS medium.

Key words: Chinese Kale (*Brassica albolabra* Bailey); Isolated microspores culture; Embryogenesis; Plant regeneration