

大白菜黄心品种花药培养影响因素的研究

李 丹, 冯 辉, 刘如娥, 杨 硕

(沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:以 7 个大白菜杂交种为试材进行花药培养, 分析了培养基 pH、激素和氨基酸浓度对胚状体发生的影响, 以及活性炭对胚状体成苗的促进作用。结果表明: 以 MS 为基本培养基, 其适宜的 pH 为 5.6~6.1, 激素浓度为 NAA 2 mg/L+6-BA 4 mg/L, 脯氨酸浓度为 4 mg/L; 添加 0.8% 的活性炭有利于胚状体继代培养和成苗。

关键词: 大白菜; 花药培养; 胚状体; 再生植株

中图分类号: S 634.103.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)11-0071-03

大白菜(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*)两性花异花授粉, 杂种优势十分显著。在大白菜杂交种选育中, 需首先纯化亲本。传统的亲本系统纯化方法主要是连续自交培育自交系。近年来, 育种工作者成功开发了通过小孢子培养进行单倍体育种的亲本系统纯化方法。芸薹属农作物游离小孢子培养已成为快速纯化亲本的新技术^[1]。

大白菜游离小孢子培养已有许多报道^[25]。但是, 利用已经建立的培养体系对于一些特异的大白菜品种, 如黄心春结球大白菜还难以诱导成胚及获得再生植株。与游离小孢子培养相比, 花药培养虽然胚状体诱导率

低, 但其出胚的基因型广泛, 而且获得的胚状体胚形正、成苗率高^[69]。该研究以前期游离小孢子培养研究中筛选出的易成胚和难成胚两类大白菜为试材, 通过改进培养条件优化花药培养技术, 解决黄心春结球大白菜单倍体育种技术的难题。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 7 个大白菜品种包括在小孢子培养过程中难出胚的黄心春结球品种‘春菜’、‘春泉’、‘春黄’和‘江山’, 易出胚品种‘福田 50’、‘早熟 5 号’和‘北京新 3 号’。

1.2 试验方法

试验于 2007~2008 年在沈阳农业大学蔬菜遗传育种实验室进行。9 月初将萌动种子在 0~4℃冰箱中春化处理 20 d 后播种于穴盘。幼苗长至 5 片真叶后, 定植于花盆, 放在温室中培育。盛花期取 3~5 株主花序和侧花枝上长度为 2~3 mm 的花蕾, 在超净工作台上先用 75% 的酒精消毒 30 s, 再用 0.1% 的 HgCl₂ 表面消毒 5 min, 无菌蒸馏水冲洗 3 次, 每次 5 min。用镊子剥开花蕾, 取出花药, 去除花丝接种到培养基上。每皿 15~18 个花药。用 Parafilm 封口后, 置于 34℃高温黑暗条件下

第一作者简介: 李丹(1982-), 女, 硕士, 现从事农作物细胞培养技术研究工作。E-mail: lidan8013@163.com。

通讯作者: 冯辉(1961-), 男, 博士, 教授, 沈阳农业大学园艺学院院长, 蔬菜学国家重点学科遗传育种方向学术带头人。E-mail: fenghuiaaa@263.net。

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(nyhyzx07-007)。

收稿日期: 2009-06-20

Abstract: To investigate the effects of nutrient solution formulations on the growth and quality of loose leaf lettuce "203". The authors performed experiment on four kinds of different doses (Sunqiao formula standard dose, 1.5 times the dose, 2 times the dose and 0.5 times the dose) and two kinds of temperature: the appropriate temperature (25~30℃) and high temperature (30~40℃). The results showed that under the condition of the high temperature, when at the dose 1.5 times, the growth treats of lettuce such as stem diameter, plant dry and fresh weight were much better than others, it was also superior to other treatment in vitamin C, soluble protein and soluble sugar, when at the appropriate temperature, the growth and quality of lettuce showed the best performance on condition of standard-dose formulations of Sunqiao.

Key words: Nutrient solution formulations; New vertical device; Lettuce

热激培养, 然后转至 25℃培养箱中暗培养。

1.2.1 培养基 pH 值对胚状体诱导的影响 将花药接种到不同 pH 值的 MS 培养基上进行培养, 设 pH 值 5.6~5.7、5.7~5.8、5.8~5.9、5.9~6.0 和 6.0~6.1 5 个处理。

1.2.2 植物生长调节剂诱导小孢子胚效果分析 在 MS 培养基, 设置添加 2 mg/L 6-BA、2 mg/L NAA、2 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA、2 mg/L 6-BA+4 mg/L NAA、4 mg/L 6-BA、4 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA 等 6 种激素浓度的配比。以不含生长调节剂的 MS 培养基作对照。

1.2.3 培养基中氨基酸种类和含量对小孢子胚诱导的影响 在 MS 基本培养基上, 设 2 mg/L 丝氨酸、2 mg/L 丝氨酸+2 mg/L 脯氨酸、4 mg/L 丝氨酸+2 mg/L 脯氨酸、2 mg/L 脯氨酸、4 mg/L 脯氨酸、6 mg/L 脯氨酸 6 种浓度配比。以不含氨基酸的 MS 培养基作对照。

1.2.4 培养基活性炭含量对胚状体成苗的影响 将诱导出的胚状体, 转至活性炭浓度分别为 0%、0.4%、0.8%、1.2%、1.6% 的 MS 培养基上, 置于 25℃、12h/d 光照培养箱中培养, 3 周后统计生长发育情况。

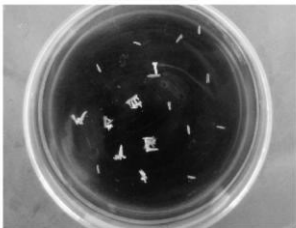
2 结果与分析

2.1 培养基 pH 值对胚状体发生的影响

表 1 结果表明, 不同 pH 值之间的产胚率有显著差异。pH 6.0~6.1 和 5.6~5.7 时, 各品种的胚状体诱导率均为 0; 在 5.9~6.0 和 5.7~5.8 范围内时, 胚状体诱导率较低; 在 5.8~5.9 范围内时, 胚状体诱导率最高。

表 1 培养基 pH 值对大白菜花药培养胚状体发生的影响

pH	胚状体诱导率/%						
	福田 50	早熟五号	北京新三号	春菜	春泉	春黄	江山
5.6~5.7	0	0	0	0	0	0	0
5.7~5.8	5.67	4.71	2.30	0.24	0.20	0.18	0.35
5.8~5.9	35.80	30.76	15.27	6.22	6.98	7.07	8.57
5.9~6.0	3.45	1.30	2.31	0.19	0.09	0.10	0.25
6.0~6.1	0	0	0	0	0	0	0



2.2 NAA 和 6-BA 对胚状体发生的影响

表 2 表明, 添加适宜浓度的生长调节剂, 可以提高胚状体诱导率, 尤以黄心品种最为明显, 适宜的生长调节剂配比 2 mg/L 6-BA+4 mg/L NAA, 其次为 2 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA, 黄心品种胚状体诱导率比对照增加了 1~2 倍。

表 2 培养基 NAA 和 6-BA 含量对大白菜花药培养胚状体诱导的影响

激素浓度/mg·L ⁻¹		胚状体诱导率/%				
6-BA	NAA	北京新三号	春菜	春泉	春黄	江山
0	0	15.27	6.22	6.98	7.07	8.57
2	0	21.44	9.60	10.01	9.74	12.39
0	2	22.03	10.03	10.36	10.32	13.40
2	2	30.56	13.34	14.17	13.50	18.31
2	4	35.71	18.21	19.30	20.22	25.66
4	0	28.91	11.57	12.13	14.81	17.90
4	2	25.28	10.98	10.80	12.16	13.59

2.3 丝氨酸和脯氨酸对胚状体诱导的影响

表 3 表明, 培养基中添加一定浓度的丝氨酸后, 胚状体的诱导率有所下降, 说明丝氨酸对大白菜花药培养的胚状体发生有抑制作用。培养基中添加脯氨酸, 能提高胚状体的诱导率。脯氨酸适宜浓度为 4 mg/L, ‘北京新三号’胚状体诱导率最高可达到 29.34%, 黄心品种的胚状体诱导率比对照增加了 1 倍以上。图 1 为在添加 4 mg/L 的 MS 培养基上诱导出的‘春黄’花药胚状体。

表 3 培养基丝氨酸和脯氨酸浓度对大白菜花药培养胚状体诱导的影响

氨基酸浓度/mg·L ⁻¹		胚状体诱导率/%				
丝氨酸	脯氨酸	北京新三号	春菜	春泉	春黄	江山
0	0	15.27	6.22	6.98	7.07	8.57
2	0	12.28	5.46	5.57	6.07	6.93
2	2	13.86	5.89	5.70	6.23	7.15
4	2	11.22	4.63	5.01	5.70	5.47
0	2	21.30	9.73	10.21	11.19	13.45
0	4	29.34	15.43	13.70	16.37	19.32
0	6	22.19	10.26	10.84	11.60	13.65

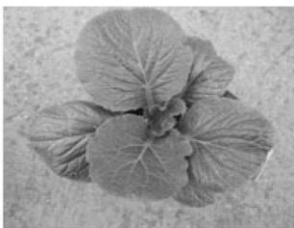
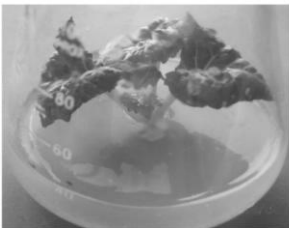


图 1 ‘春黄’花药培养 3 周后形成的胚状体 图 2 ‘春黄’花药胚状体萌发 图 3 ‘春黄’花培植株试管苗 图 4 移栽成活的‘春黄’花培植株

2.4 活性炭对胚状体再生植株影响

花药培养获得的胚状体数量通常不是很多, 所以应

尽量在胚状体继代培养和植株再生阶段减少损失。由表 4 可以看出, 在继代培养基中添加一定量的活性炭

可以提高胚状体成苗率。活性炭含量为 0.8%时,‘福田50’的成苗率达 77%,黄心品种的成苗率也达到最高。但是,过高浓度的活性炭反而抑制成苗。图 2 为在添加 0.8%的活性炭的 MS 培养基上转接的‘春黄’花药胚状体萌发情况。

表 4 活性炭对大白菜花药胚状体继代培养成苗的影响

活性炭 含量/%	接种 胚数/个	成苗率/%			
		福田 50	北京新 3 号	春菜	江山
0	100	57	35	32	37
0.4	100	65	38	39	42
0.8	100	77	45	44	51
1.2	100	63	37	34	40
1.6	100	48	29	26	31

胚状体再生植株后,经继代培养壮苗(图 3)移至生根培养基,诱导生根后移栽到装有灭菌基质的营养钵中练苗(图 4)。

3 结论与讨论

通过花药培养快速获得纯系材料,是加快育种进程的有效方法。大白菜花药培养获得的胚状体数量一般不多,但是与游离小孢子培养相比其成胚质量高,容易成苗,而且操作比较简便。该试验结果表明培养基 pH 值是影响大白菜花药培养胚状体诱导的重要因素,此结果与桑玉芳^[9]在甘蓝游离小孢子研究上的结论一致。培养基中添加 NAA 和 6-BA 能提高小孢子胚诱导率,但添加的适宜浓度远大于游离小孢子培养,这可能是花药培养有花药壁的阻隔造成的。培养基中添加脯氨酸,可以提高出胚率,此结果与蒋武生^[11]等在小白菜花药培养上的研究结果一致,但适宜添加的浓度高于小白菜。

在添加活性炭的 MS 培养基上,小孢子胚状体的继

代成活率高,容易成苗,培养基适宜的活性炭浓度为 0.8%,验证了周英等^[9]在大白菜游离小孢子培养上的研究结果。

该试验进一步完善了大白菜花药培养体系,通过改进培养条件提高了大白菜黄心品种出胚率和胚状体成苗率,获得了一批珍贵的黄心大白菜小孢子植株。

参考文献

[1] 姚秋菊 张晓伟 蒋武生,等. 大白菜新品种豫新 55 的选育[J]. 中国蔬菜 2008(5): 37-38.

[2] Sato S, Katoh N, Iwai S. Effect of low temperature pretreatment buds or inflorescence on isolated microspore culture in Brassica rapa (syn. B. campestris)[J]. Breed Sci, 2002, 52(1): 23-26.

[3] 韩阳,叶雪凌,冯辉. 提高大白菜花药植株获得率的研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1092-1094.

[4] 刘凡,莫东发,姚磊. 遗传背景及活性炭对白菜小孢子胚胎发生能力的影响[J]. 农业生物技术学报 2001, 9(3): 297-300.

[5] 周英,冯辉,王超楠. 大白菜小孢子胚诱导和植株再生[J]. 沈阳农业大学学报, 2006 37(6): 816-820.

[6] 李靖,李焕秀,李敏. 蔬菜花药培养研究进展[J]. 中国蔬菜, 2005(6): 36-39.

[7] 王小露 江伟,樊新民. 大白菜花药培养胚状体诱导研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(15): 4507-4508.

[8] 刘如娥 冯辉,王超楠,等. 小白菜花药培养胚诱导和植株再生[J]. 湖北农业科学 2008(7): 737-739.

[9] 宋宝香,冯辉,杨春喜. 基本培养基和蔗糖浓度在大白菜花药培养中对胚状体诱导的影响[J]. 中国农学通报 2005 21(11): 45-46.

[10] 桑玉芳. 甘蓝游离小孢子培养中影响胚状体形成的主要因素探讨[D]. 杨凌 西北农林科技大学硕士学位论文, 2007.

[11] 蒋武生 耿建峰,张晓伟. 基因型和有机附加物对小白菜花药培养胚状体诱导的影响[J]. 中国瓜菜 2006(2): 1-4.

Several Factors Influencing Anther Culture in Yellow Inner Leaf Varieties of Chinese Cabbage

LI Dan, FENG Hui, LIU Ru-q, YANG Shuo

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: Anther culture was carried out by use of seven F₁ hybrids of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). Effects of medium pH value, hormone and amino acids concentration on embryoid inducing were probed, as well as activated carbon on plantlet forming. Results showed that suitable rang of medium pH value was 5.6 ~ 6.1; the appropriate hormone proportion was NAA 2 mg/L+6-BA 4 mg/L; the appropriate amino acid proportion was proine 4 mg/L; 0.8% activated carbon were benefit to the subculture medium.

Key words: Chinese cabbage; Anther culture; Embryoids; Plantlet