

大白菜游离小孢子培养最新研究进展

李维薇¹, 蔺忠龙^{1, 3}, 白现广^{1, 3}, 吕广磊^{2, 3}, 程在全³

(1. 云南大学 生命科学学院 云南 昆明 650091; 2. 云南农业大学 农业与生物技术学院, 云南 昆明 650201;

3. 云南省农业科学院 生物技术与种质资源研究所, 云南 昆明 650223)

摘要: 综述了影响大白菜游离小孢子培养的主要因素: 材料的基因型、小孢子发育时期、亲本植株的生理状况、培养技术以及胚状体发生及植株再生等的研究情况。同时也对大白菜游离小孢子培养技术发展前景进行了展望。

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(2009)02—0133—03

大白菜是十字花科芸薹属中最重要的蔬菜作物之一, 是异花授粉植物 杂种优势十分明显。但是 近年来常规育种的不足在实际工作中日渐明显。因此, 各国学者开始寻找育种的新途径和新方法。游离小孢子培养技术是近年来兴起的一门加快育种进程的新方法。它具有单细胞、单倍体和较高胚胎发生率及较高同步性等特点, 通过这种途径可以迅速获得纯合双单倍体, 进而获得纯合亲本系统, 大大加快育种进程。

1 供试材料对小孢子胚胎发生的影响

1.1 供体材料的基因型对小孢子胚胎发生的影响

基因型是影响小孢子胚胎发生率的关键性因素。不同基因型的供体材料在同样试验条件下, 胚状体产量不同。基因型对白菜小孢子胚胎发生能力的决定作用体现在两个方面: 第一是基因型的反应范围。曹鸣庆等报道, 将 17 个基因型大白菜进行培养, 有 16 个基因型获得小孢子胚, 反应范围 94%^[1]; 栗根义等用 13 份大白菜进行游离小孢子培养, 其中 12 份得到了小孢子胚, 反应范围为 93%^[2]。曹鸣庆认为大白菜是具有较强游离小孢子胚胎发生能力的栽培植物种^[1]。但是也有相反的报道, 如许艳辉等的试验, 大白菜 37 个基因型中只 7 个得到胚状体, 比率为 18.9%^[1]。基因型对白菜小孢子胚胎发生能力的决定作用体现的另一方面是胚胎发生频率的差异。曹鸣庆研究发现, 产胚量最高的基因型平均每个花蕾产胚 359.28 个, 而产胚量最少的基因型每个花蕾平均产胚胎仅为 0.6 个^[1]。其他研究者也有相

似的报道, 张凤兰认为不同基因型的大白菜胚状体发生能力有明显差异^[3]。在对四倍体大白菜植株的游离小孢子培养中同样证明基因型对小孢子胚胎发生能力有显著影响。芸薹属的其它植物中也普遍存在不同亲本类型的材料, 小孢子培养的效率有差别现象。由此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 亲本植株的生理状况对小孢子胚胎发生的影响

亲本植株的生理状况对胚状体诱导频率有直接影响。曹鸣庆研究发现, 供试母株的生长条件是大白菜游离小孢子培养技术成败的关键。生长在 10~25℃控温温室的材料, 小孢子胚产量较高, 每个花蕾平均为 129.91 个; 生长在温度日变化在 10~35℃条件下田间的材料, 小孢子胚产量明显下降, 每个花蕾平均为 38.31 个, 为前者的 29.5%^[1]。张凤兰在大白菜小孢子培养中, 以生长在 14~16 h 日照及 15~20℃的温度条件下的供体植株胚状体发生率和植株再生率高^[3]。因此, 应将试验材料放在光照、温度条件可以严格控制的人工气候室中栽培为最佳。

1.3 小孢子发育时期对小孢子胚胎发生的影响

选择合适的花粉发育时期是提高花粉植株诱导频率的重要因素。胚胎发生的激发启动, 大致发生在单核中期至单核靠边期这一暂短的发育过程中。据报道大白菜游离小孢子培养中, 诱导胚状体发生的小孢子所处最佳时期是单核后期。该时期的小孢子最大特征是有 一个大的中央液泡, 占整个细胞的 50% 以上。细胞核被挤压到靠近细胞壁, 细胞质相对不透明, 其内含有丰富的核糖体, 随机分布着大量的粗面内质网、线粒体、质体等颗粒。曹鸣庆发现, 蕾长与小孢子发育进程密切相关。当大白菜花蕾长为 2.0~2.5 mm 时, 小孢子正处于单核中期至单核晚期(单核靠边期), 此时小孢子胚产量最高; 蕾长 2.6~3.9 mm 时, 9.12% 的小孢子处于单核

第一作者简介: 李维薇(1955-), 女, 在读硕士, 研究方向为分子遗传学。

通讯作者: 程在全

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目(2004C0010Z)。

收稿日期: 2008—10—20

中期, 70.0%的小孢子处于单核靠边期, 小孢子胚产量次之; 蕾长小于 2.0 mm 或大于 3.9 mm 时, 均不能诱导小孢子胚^[4]。因此, 严格选择适宜时期的小孢子是能否培养成功的关键问题之一。

2 培养技术对胚胎发生的影响

2.1 预处理和预培养方法对小孢子胚胎发生的影响

为了提高花粉培养的效率, 通常对试验材料进行预处理。预处理包括: 离心、低温、高温、射线、甘露醇预处理或预培养等方式, 其目的就是从生理生化上改变细胞生理状态、改变其分裂方式和发育途径。高温预处理在白菜游离小孢子培养中也收到了良好的效果, 试验证明接种后 33~35℃, 暗培养 24 h, 对胚状体诱导的效果最为理想。据报道, 花粉培养温度一般以 25℃为宜, 但许多研究表明变温处理即在高温下处理一定的时间之后再转至低温培养有利于提高胚状体的诱导率。刘公社等认为在大白菜游离小孢子培养开始时, 12 h 高温处理能大大促进小孢子均等分裂, 24 h 的高温处理则能大大提高小孢子胚的诱导率^[9]。同时他们在试验中还发现, 高温处理有效地抑制了小孢子的配子体发育途径, 提高了单核小孢子核对称分裂的频率, 认为小孢子对预培养敏感的时期是最初 24 h, 更长时间并非必要。

2.2 培养基类型对小孢子胚胎发生的影响

在大白菜游离小孢子培养中, 绝大多数研究者采用 NLN 基本培养基, 只有张凤兰采用 BM 基本培养基, 而这 2 种培养基中大量元素、微量元素的含量是一样的, 差别仅在于 BM 培养基的烟酸、叶酸、生物素、维生素 B1、维生素 B6、甘氨酸等有机附加物的含量是 NLN 培养基的一半, 且其中不含肌醇。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 NN 更有效^[9]。在激素作用方面, 有些学者研究了 NAA 和 BA 对白菜游离小孢子胚胎发生的影响, 试验结果不一。许艳辉报道 6-BA 对大白菜小孢子胚胎发生有一定的促进作用, 最佳浓度为 0.2 mg/L; 但是对难成胚的基因型, 6-BA 作用不大^[7]。Sato 认为不含激素的培养基与加有 0.5 mg/L NAA + 0.05 mg/L 6-BA 的培养基对胚状体诱导效果相同^[9]。

2.3 接种密度对小孢子胚胎发生的影响

试验证明, 接种密度是小孢子培养能否成功的一个至关重要的因素, 但也是在试验操作中常常被忽略的问题。每毫升培养基接种 1.5~2 个花蕾的小孢子较适宜, 每毫升 2 个花蕾的小孢子较适宜, 每毫升超过 2 个花蕾其产胚率下降, 甚至不能形成胚状体。陈玉萍研究表明每皿 5~10 个花蕾较好^[8]。据官春云报道, 每毫升 NLN 培养基中接种 1 个花蕾的产胚率达 5.11%, 而接种 0.75 个花蕾的小孢子和 1.25 个花蕾的小孢子的处理, 胚胎发生率分别为 2.34%和 1.86%^[9]。因为适宜

培养的花蕾数目, 可能与操作方法有关, 所以较为准确的接种密度应该利用血球计数板观测出的小孢子密度。一般认为 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个/mL 密度最合适, 而最近的研究表明 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 的密度最为合适。

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

大白菜小孢子一般在培养 1~3 d 开始第 1 次细胞分裂, 7~11 d 可形成大量肉眼可见的球形胚, 15d 左右可形成心形、鱼雷及子叶形胚随后可形成鱼雷形、子叶形胚。胚状体的发育并不同步, 同时还会出现许多畸形胚。当各种类型的胚状体转移到改良的 MS 培养基或 B5 培养基时, 其再生植株的能力有很大差异。子叶型、鱼雷形胚再生胚率高, 心形胚少数能再生植株, 球形胚和异常胚不能进一步发育。周伟军发现胚状体转移到固体培养基后立即进行低温诱导(2℃), 常温(24℃)光下培养能很好地萌发并直接、迅速地再生成苗, 继代后可长成完全正常的再生植株。低温诱导处理 10 d, 其萌发率和成苗率均显著高于无低温处理的品种^[10]。Fletcher 等报道, 对培养 3 周以上的子叶形胚进行特定的逆境胁迫(ABA 处理、切除子叶、使胚干燥 45 min), 能够明显提高植株的再生能力^[11]。

3.2 染色体加倍技术

大白菜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。染色体加倍的方法有人工加倍和自然加倍。自然加倍的频率在不同植物中有较大的差异。张凤兰等报道, 大白菜经由小孢子培养产生的小孢子植株自然加倍率在 50%~70%^[12]。如需人工加倍, 主要用 0.2~4.0 mg/g 秋水仙碱处理单倍体植株使之加倍。

4 存在问题与展望

经过国内外学者数十年的研究探索, 大白菜游离小孢子培养的技术已越来越完善, 胚状体的诱导频率也有了显著提高, 这些都为游离小孢子的广泛应用奠定了基础。在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 5~7 a; 而采用游离小孢子培养技术, 在 2~3 a 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, 但是由于小孢子培养技术本身的机理、小孢子培养的启动等方面还不很清楚, 还没有建立起完善的、高频的再生体系, 故使这一技术的应用受到了很大限制。今后应不断加强理论研究和试验技术两方面的工作, 深入研究

小孢子发育的调控机理,进一步研究各种因素对胚胎发生、小孢子胚胎萌发和再生植株加倍的影响;不断改进培养方法和培养条件以及培养基配方,建立稳定、高效地获得纯合二倍体的游离小孢子培养体系。可以相信,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] 曹鸣庆,李岩,刘凡. 基因型和供试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.
[2] 栗根义,高睦枪,赵秀山. 大白菜游离小孢子培养[J]. 园艺学报, 1993, 20(2): 167-170.
[3] 张凤兰,钉贯靖久,吉川宏昭. 环境条件对白菜小孢子培养的影响[J]. 华北农学报, 1994, 9(1): 95-100.
[4] 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.
[5] 刘公社,李岩,刘凡,等. 高温对大白菜小孢子培养的影响[J]. 植物学

报, 1995, 37(2): 140-146.
[6] Swanson E B, Coumans M P, Wu S C, etc. Efficient isolation of microspores and the production of microspore derived embryos from Brassica[J]. Plant Cell Rep, 1987(6): 94-97.
[7] 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.
[8] 陈玉萍,田志宏,包心芥菜游离小孢子培养的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 1998, 17(1): 93-95.
[9] 官春云. 油菜小孢子培养和双单倍体育种研究 供体植株和小孢子密度对小孢子培养的影响[J]. 作物学报, 1995, 21(6): 665-670.
[10] 周伟军,毛碧增. 秋水仙碱及热击与低温诱导对油菜小孢子胚状体成苗率的影响[J]. 作物学报, 2002, 28(3): 369-373.
[11] Fletcher R, Coventry J, Kott L S. Doubled haploid technology for spring and winter Brassica napus (revised edition) [M]. OAC Publication, Guelph, Ontario Canada: University of Guelph 1998, 42.
[12] 张凤兰,钉贯靖久. 大白菜小孢子再生植株自然加倍率的探讨[J]. 北京农业科学, 1993, 11(2): 23-25.

The Newest Research Development of the Culture of Chinese Cabbage Free Small Spores

LI Wei-wei¹, LIN Zhong-long^{1,3}, BAI Xian-guang^{1,3}, LV Guang-lei^{2,3}, CHENG Zai-quan³

(1. School of life Yunnan University, Yunnan Kunming 650091; 2. Yunnan agricultural university agriculture and biotechnology college, Yunnan Kunming, 650201; 3. Yunnan Province agriculture academy of science biological technology and germplasm research institute, Yunnan Kunming 650223)

Abstract: summarizes the main factors which affected the culture of china cabbage isolated microspore culture, material genotype, the microspore growth time, the parent materialphysiological condition, the culture.
Key words: Chinese cabbage; Free microspore cultivate; Embryoid

蔬菜冷藏过久影响身体健康

在现实生活中,生活节奏日益加快,许多上班族往往趁周末休息进行大采购,尤其是将一星期的蔬菜购买回以后,存放到冰箱里以图方便,殊不知吃这种存放了几天的蔬菜是非常危险的,专家建议并提醒,新鲜蔬菜在冰箱内储存期不应超过3天,否则不利于身体健康。

里储存蔬菜非常危险,而危险也多来自蔬菜本身含有的硝酸盐,因为硝酸盐本身无毒,然而在储藏一段时间之后,由于酶和细菌的作用,硝酸盐被还原成亚硝酸盐,亚硝酸盐是一种有毒物质,它在人体内与蛋白类物质结合,可生成强致癌性的亚硝酸盐类物质。

而且会发生营养素的损失。试验证明,在30℃的屋子里储存24小时,绿叶蔬菜中的维生素C几乎全部损失,而亚硝酸盐的含量则上升了几十倍。

所以,新鲜蔬菜在冰箱内储存期不应超过3天。凡是已经发黄、萎蔫、水渍化、开始腐烂的蔬菜都不要食用,以免影响到身体健康。

专家建议并提醒,长时间在冰箱储存蔬菜不仅会产生有害物质,