

活性炭对大白菜游离小孢子成胚和成苗的影响

盛 鹏, 岳艳玲, 李 祥, 李振星, 李晶晶

(云南农业大学 园林园艺学院 云南 昆明 650201)

摘 要:以日本引进“夏将军”大白菜为试材, 试图建立高效大白菜(*B. campestris* L. ssp. *pekinensis*)的游离小孢子培养植株再生体系, 研究在 NLN 培养基中添加不同水平活性炭对大白菜游离小孢子胚发生和发育的影响。结果表明: 100 mg/L 活性炭可显著促进大白菜游离小孢子成胚, 达 340 胚, 较对照提高 66. 61%。但是随活性炭浓度提高, 对小孢子成胚具有抑制作用; 在 MS 培养基中添加 0~150 mg/L 活性炭对子叶形胚状体成苗没有显著的促进作用, 但 100 mg/L 活性炭处理可促进双苗发生, 成苗率为 131. 25%, 比对照提高了 16. 67%。但活性炭浓度含量过高, 则抑制小孢子的成苗。

关键词:大白菜; 游离小孢子培养; 活性炭; 成胚率; 成苗率

中图分类号:S 634. 1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2010)19—0013—03

自 Sato 等(1989)^[1-2] 利用游离小孢子培养技术在国际上首次成功获得大白菜小孢子胚和单倍体再生植株以来, 大白菜游离小孢子培养技术已得到不断完善^[3-5], 广泛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还是分子标记和基因图谱的理想材料。作为一种在单细胞水平上获得双单倍体纯系的方法, 更是在大白菜优势育种上得到广泛关注^[6-9]。

游离小孢子胚的诱导及植株再生受外植体基因型、生长条件、培养基成分、培养条件等众多因素的影响^[10-12]。1989 年 Gland 等^[13] 在培养中添加活性炭, 发现可促进胚的发育, 有利植株再生。Joao(1999)^[14] 在花椰菜和青花菜小孢子培养的研究中, 也证实了添加活性炭悬浮液可以促进胚向植株的分化。在大白菜游离小孢子的培养研究上, 有人认为添加活性炭对小孢子成胚有促进作用^[15-19], 也有人认为具有抑制作用^[20]。该试验通过在诱导成胚培养基和小孢子胚再生培养基中分别添加不同水平的活性炭, 系统研究活性炭对大白菜游离小孢子培养成胚及植株再生的影响, 为建立高效小孢子植株再生体系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以日本引进“夏将军”, 2008 年 11 月下旬播种于 50 孔穴盘中育苗, 小苗长至 6 片真叶时, 移入花盆, 材料于次年 2 月中旬开花。

1.2 试验方法

1.2.1 小孢子分离纯化 分别取发育时期为单核晚期(I)和双核早期(II)的花蕾 30 个/组, 流水冲洗 30 min, 经 70%乙醇溶液表面消毒 30 s, 再用 0. 1% HgCl₂ 溶液灭菌 8 min, 无菌水洗涤 3 次。沥干水分后, 在 B5 液体洗涤培养基中用玻棒碾压花蕾, 挤出小孢子。含小孢子的悬浮液经孔径 50 μm 的尼龙网过滤, 收集滤液于 10 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 3 min。弃上清液, 沉淀物加 5 mL B5 洗涤培养基, 摇匀, 500 r/min 下离心 3 min, 2 次重复。弃上清液, 所得沉淀物即为纯净小孢子。

1.2.2 不同水平活性炭对大白菜游离小孢子成胚的影响 将分离纯化的小孢子用 NLN 培养基悬浮, 调整小孢子浓度为(1~2)×10⁶ 个/mL。用直径 60 mm 的培养皿分装, 每皿 2. 5 mL, 分别添加 0(CK)、100、200、300 mg/L 活性炭溶液, Parafilm 封口。33℃条件下暗培养 1 d, 然后转至 25℃下继续暗培养, 3 周后统计胚诱导率。胚诱导率=总成胚数/蕾数。

1.2.3 不同水平活性炭对小孢子胚成苗的影响 将子叶形胚状体分别转至含活性炭 0(CK)、50、100、200、300 mg/L 的 MS 培养基和 1/2MS 基培养上(培养基含蔗糖 3%, 琼脂 1. 2%, pH 5. 8), 3 周后统计成苗率。成苗率=(成苗数/接种胚数)×100%。

1.3 数据分析

对试验数据采用 Spss 13. 0 统计分析软件进行方差

第一作者简介: 盛鹏(1981-), 男, 山东潍坊人, 硕士, 现从事蔬菜遗传育种研究工作。

通讯作者: 岳艳玲(1973-), 女, 吉林东辽人, 博士, 副教授, 现从事蔬菜遗传育种研究工作。E-mail: yanling-yue@126. com。

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目(2006C0032Q)。

收稿日期: 2010—07—06

分析。

2 结果与分析

2.1 不同水平活性炭对小孢子胚发生的影响

不同水平活性炭对小孢子胚发生影响很大。从表 1 可知 活性炭浓度为 100 mg/ L 的处理效果最好, 小孢子成胚数为 340 个, 胚诱导率为 11.33 胚/ 蕾, 较 CK 高 66.61%, 说明添加活性炭明显提高小孢子成胚数量。但

继续增加活性炭后, 成胚数则大幅减少, 对小孢子成胚产生抑制作用, 成胚数显著低于 CK, 当活性炭浓度为 200、300 mg/ L 时, 小孢子成胚数分别为 52 个和 10 个, 胚诱导率分别为 1.73、0.33 胚/ 蕾, 较 CK 低 74.56%和 95.15%。说明培养基中添加适量的活性炭有助于小孢子胚发生和发育, 过高水平的活性炭则对小孢子成胚有抑制作用。

表 1 不同水平活性炭对小孢子成胚的影响

Table 1 Effect of different AC concentration on microspore-derived embryos

水平 Level/ mg · L ⁻¹	子叶型 Cotylednary	萌发型 Germinated	鱼雷型 Torpedo	球型 Globular	总出胚数 Total of embryos	胚诱导率 Frequency of embryos / 胚 · 蕾 ⁻¹	较对照高 Higher than CK/ %
0(CK)	100	32	20	52	204	6.80A	—
100	264	20	16	40	340	11.33B	66.61
200	24	4	8	16	52	1.73C	—74.56
300	2	2	2	4	10	0.33D	—95.15

注 不同字母表示在 0.01 水平差异显著。
Note: The different superscript lettet indicate significant difference at 0.01 level.

2.2 不同水平活性炭对小孢子胚成苗的影响

在 MS 培养基和 1/2MS 培养基中添加不同水平活性炭, 小孢子胚成苗情况见表 2。从表 2 可知, 在 MS 培养基中添加 0~150 mg/ L 活性炭, 对子叶形胚成活及成苗没有显著影响, 且在添加 50~100 mg/ L 活性炭的 MS 培养基中, 可提高子叶形胚双苗发生, 其中添加 100 mg/ L 活性炭成苗率最高, 可达 127.2%, 较 CK 高 16.67%。但活

性炭浓度过高, 则对小孢子成苗产生抑制作用, 添加 300 mg/ L 活性炭的成苗率仅有 58%, 较对照低 54.5%, 较添加 100 mg/ L 活性炭处理低 67.2%。说明在 MS 培养基中添加活性炭对促进子叶形胚成苗的作用不大, 且过高浓度对成苗还有显著的抑制作用, 这种抑制作用在 1/2MS 培养基表现尤为明显, 添加 200~300 mg/ L 活性炭的成苗率为 0, 完全抑制成苗。

表 2 不同水平活性炭对子叶形胚成苗的影响

Table 2 Effect of different AC concentration on plantlet regeneration of cotylednary embryos

活性炭浓度 AC concentration / mg · L ⁻¹	总胚数 Total of embryos		成活胚数 Total of Survived embryos		成苗数 Total of plantlet regeneration		成苗率 Rate of regenerated plantlet/ %	
	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
0(CK)	32	32	27	28	36	8	112.5	25
50	32	32	28	4	40	5	125	15.6
100	32	32	29	6	42	3	131.25	9.1
150	32	44	27	4	32	4	100	9.1
200	32	32	25	1	22	0	76.8	0
300	12	12	9	1	7	0	58	0

3 结论与讨论

活性炭是一种多孔径的炭化物, 具有良好的吸附特性。在白菜、油菜、花椰菜等多种作物游离小孢子培养胚状体发生和植株分化有很好的促进作用^[13-19]。这种促进作用可能是由于培养过程中, 没有胚胎发生能力的小孢子会释放出有毒性物质, 活性炭可以吸附培养基中的有毒物质, 使有发生能力的小孢子免遭毒害, 从而提高了胚发生率^[21]。

在活性炭使用量上, 申书兴等^[15] 研究认为活性炭适宜添加量为 50~100 mg/ L 可明显提高产胚率; 耿建峰等^[19] 在培养基中添加 100~500 mg/ L 的活性炭, 供试的 4 个基因型的诱导率都明显提高。该试验结果表明 在小孢子成胚培养基中添加 100 mg/ L 成胚率最高, 达 340 胚 200~300 mg/ L 的用量则对小孢子成胚有显著的抑

制作用, 这与上述研究结果略有差异, 可能是试材基因型不同所致。

在小孢子胚成苗研究上, Joao (1999)^[14] 以花椰菜和青花菜为试材, 认为添加活性炭悬浮液可以促进胚向植株的分化。周英等^[19] 以大白菜为试材, 在 MS 培养基中添加 100 mg/ L 活性炭, 有利于大白菜胚状体的发育, 促进成苗。该研究结果与前人研究结果差异较大, 在 MS 培养基中添加 0~150 mg/ L 活性炭对子叶形小孢子胚成苗没有显著的促进作用, 过高水平的活性炭反而对小孢子成胚有抑制作用, 且在 1/2MS 培养基中这种抑制作用更强, 可能是因为活性炭的吸附是非选择性吸附, 过高的活性炭水平吸附了大量的的小孢子胚成苗的必需营养物质, 造成营养缺乏导致小孢子胚成胚受到抑制。但在 0~100 mg/ L 的用量范围内, 活性炭可提高子叶形胚

双苗的发生,以 100 mg/ L 的添加量中成苗率为最高,达 131.25%。较对照提高 16.67%。其影响机制还有待于进一步研究。

参考文献

[1] Sato T, Nishio T, Hirai M. Plant regeneration from isolation microspore of Chinese cabbage(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) [J] . Plant Cell Reports, 1989, 8: 486-488.
[2] Sato, Katoh N, Lwais et al Effect of low temperature pretreatment of buds or inflorescence on isolated microspore culture in *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*) [J] . Breeding Science, 2002, 52: 23-26.
[3] 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.
[4] 曹家树, 余小林, 黄爱军. 提高白菜离体培养植株再生频率的研究 [J] . 园艺学报, 2000, 27(6): 452-454.
[5] 申书兴, 赵前程, 刘世雄. 四倍体大白菜小孢子植株获得与倍性鉴定 [J] . 园艺学报, 1999, 26(4): 232-237.
[6] 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): 23-24.
[7] 栗根义, 高睦枪. 利用游离小孢子培养技术育成豫白菜 7 号 (豫园 1 号) I [J] . 中国蔬菜, 1998(4): 18-21.
[8] 耿建峰, 原玉香, 张晓伟. 利用游离小孢子培养育成早熟大白菜品种 ‘豫新 5 号’ [J] . 园艺学报, 2003, 30(2): 249.
[9] 韩阳. 大白菜游离小孢子培养体系的构建 [D] . 沈阳: 沈阳农业大学, 2004.
[10] 曹家树, 余小林, 黄爱军. 等. 提高白菜离体培养植株再生频率的研

究 [J] . 园艺学报, 2000, 27(6): 452-454.
[11] 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.
[12] 轩正英, 徐书法, 冯辉. 大白菜游离小孢子培养成胚影响因素的研究 [J] . 辽宁农业科学, 2005(2): 18-19.
[13] Gland A, Lichter R, Schweiger H G. Genetic and exogenous factors affecting Embryogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus* [J] . Plant Physiol, 1988, 132: 613-617.
[14] Joao Carlos Silva Dias. Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis [J] . Euphytica, 1999, 108: 65-69.
[15] 申书兴, 梁会芬, 张成合. 提高大白菜小孢子胚胎发生及植株获得率的几个因素研究 [J] . 河北农业大学学报, 1999, 22(4): 65-68.
[16] 张德双. 白菜类蔬菜小孢子培养胚胎发生及再生株基因型分离比率 [J] . 长江蔬菜, 2004(2): 38-39.
[17] 刘凡, 莫东发. 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.
[18] 耿建峰, 侯喜林. 影响白菜游离小孢子培养关键因素分析 [J] . 园艺学报, 2007, 34(1): 111-116.
[19] 周英, 冯辉. 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.
[20] 韩阳, 叶雪凌, 冯辉. 大白菜小孢子培养影响因素研究 [J] . 中国蔬菜, 2006(7): 16-18.
[21] Kott L S, Polsoni L. Autotoxicity in isolated Microspore Culture of *Brassica napus* [J] . Can. J. Bot, 1998, 66: 1665-1670.

Effect of Activated Carbon on Microspore-derived Embryos and Regenerated Plantlet of Chinese Cabbage

SHENG Peng, YUE Yan-ling, LI Xiang, LI Zhen-xing, LI Jing-jing
(College of Landscape and Horticulture Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

Abstract: The microspore was isolated from Chinese cabbage (*B. campestris* L. ssp. *pekinensis*) from Japan. Studied the effect of different AC concentration on microspore-derived embryos and plantlet regeneration in NLN medium. The results showed that 100 mg/ L AC could significantly promote the microspore embryogenesis up to 340, increasing 66.61% than CK. But the higher concentration AC had inhibition to embryo emergence. The rate of regenerated plantlet in MS with 0~150 mg/ L AC was not different. However, 100 mg/ L AC could promote cotylednary embryos producing double-plantlet. Rate of regenerated plantlet was up to 131.25%, increasing 16.67% than CK, but was inhibited in higher AC.
Key words: Chinese cabbage; isolated microspore culture; activated carbon; frequency of embryos; rate of regenerated plantlet