

胡萝卜游离小孢子培养与植株再生技术研究

尹立荣¹, 管长志¹, 陈磊¹, 付任胜¹, 霍文娟², 赵恒²

(1. 天津市农业生物技术研究中心, 天津 300384; 2. 天津市农业科学院, 天津 300192)

摘要:对“长城红玥”、“宝冠”2个胡萝卜自交品种进行游离小孢子培养, 研究花序与小孢子发育的相关性, 以期获取游离小孢子和最佳灭菌的方法。结果表明: 不同基因型间游离小孢子培养难易存在差别, 通过诱导胚性愈伤组织, 芽分化, 成功培养出单倍体和双单倍体再生植株, 再生株系 46.9% 植株是单倍体, 53.1% 植株是双单倍体, 诱导胚性愈伤组织、分化再生植株和生根的最佳培养基分别是 HLB+0.5 mg/L 2,4-D、MS+0.5 mg/L 6-BA 和 MS(或 W14)+1.0 mg/L NAA。

关键词:胡萝卜; 游离小孢子培养; 再生植株; 双单倍体

中图分类号:S 631.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)15-0126-04

游离小孢子培养是单倍体培养技术之一, 由于产生的再生植株较单一, 没有体细胞的参与, 且单倍体植株出现比率较大, 所以近年对这一方法研究的较多, 在黄瓜^[1]、菜花^[2]、辣椒^[3]等蔬菜作物^[4]上取得了较好的进展。胡萝卜花药培养研究较多^[5-8], 游离小孢子培养研究较少^[9-10]。由于胡萝卜自交纯合稳定遗传的时间在 5 a 以上, 培育 1 个杂交新品种一般要 7 a 以上时间, 而利用游离小孢子培养技术能迅速获得纯合的双单倍体, 2 a 内使所需资源基因完全纯化, 对品种选育技术具有很好的辅助作用。该研究旨在利用多种作物游离小孢子直接获得二倍体的特性, 对胡萝卜进行游离小孢子培养研究, 目的是利用胡萝卜现有资源快速创造所需要的新种质, 既丰富杂交育种的亲本, 同时又缩短育种周期。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用两性花胡萝卜“长城红玥”、“宝冠”2个品种, 于试验取样上年 7 月底播种种植, 11 月上旬收获后冬贮, 翌年 3 月中旬栽植种株, 5 月中旬植株开始抽苔, 6 月初植株进入开花期进行试验。

1.2 试验方法

1.2.1 取样时间的确定

取 4 个不同花序开放程度的

花蕾, 通过镜检观察确定开花时期与小孢子发育间的关系, 以便获取单核靠边期的游离小孢子。

1.2.2 游离小孢子获得 取样时间为早上 9:00 左右, 用密闭容器取回整个花序, 放入自来水中冲洗 5 min, 用镊子取下小花放入烧杯中, 用 70% 乙醇灭菌 50 s, 转入 0.1% 升汞灭菌 4 min, 无菌水冲洗 6 次, 吸干水分后放入无菌研钵中, 加入 2 倍试材重量的胡萝卜专用液体培养基。用研棒研碎试材后, 过孔径为 50 μm (400 目) 筛, 取其液体待用。用低速医用离心机, 进行如下 4 个处理, 即选用 800 r/min, 离心 2 和 3 min; 1 000 r/min, 离心 2 min; 1 200 r/min, 离心 2 min。

1.2.3 游离小孢子培养因素的优化 诱导培养基及其外源激素: W14、MS、HLB、B₅、NLN、W14、W14T 6 种培养基, 其中代号为 HLB 培养基是该研究筛选优化出的胡萝卜游离小孢子诱导胚性愈伤组织的专用培养基(下同)。蔗糖含量为 50 g/L。在培养基中分别加入浓度为 1 mg/L 的 2,4-D 和 IBA, pH 6.0, 共计 12 个处理, 每个处理 20 瓶(2 个品种)。在初次筛选出的 HLB 培养基和诱导激素的基础上, 加入 0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L 4 个浓度的 2,4-D, 进行激素用量水平的筛选, 每个处理 25 瓶(2 个品种), 以无激素为对照。分化培养基及其外源激素: 选择 W14、MS、HLB 3 种培养基, 蔗糖含量 30 g/L, 选用 6-BA 为分化培养的激素, 浓度为 1 mg/L, 培养基 pH 为 6.0, 共分 3 个处理, 每处理 40 块胚性愈伤组织试材, 每块试材直径 1 cm。选用 MS 培养基: 激素选用 6-BA、KT、IBA、玉米素 4 种, 浓度是 0.5、1.0、2.0 mg/L 6-BA; 1.0 mg/L KT、IBA; 0.1 mg/L 玉米素。蔗糖含量 30 g/L, pH 6.0, 共 6 个处理, 无激素处理为对照, 每处理试材 40 块, 直径 1 cm。生根培养基及其外源激素: 选用

第一作者简介:尹立荣(1961-), 女, 吉林松源人, 本科, 副研究员, 现主要从事胡萝卜新品种选育及种质创新等研究工作。E-mail: ylrgez@sina.com。

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2009BAD8B03); 天津市科技支撑计划资助项目(06YFGZNC01000, 10ZZCKFNC00500); 天津市农业科学院院长基金资助项目(09005)。

收稿日期:2012-05-07

W14、MS 2 种培养基为生根培养基,蔗糖含量 30 g/L, pH 6.0,用 1.0 mg/L NAA、IBA 2 种激素,共 4 个处理,每处理 50 株再生苗。

2 结果与分析

2.1 胡萝卜小孢子发育时期的观察及其取材时期的确定

通过镜检观察 4 个不同花序生长时期,初步确定了不同开花时期与游离小孢子发育间的关系。时期 1:整个花抽出,花序未分离,此时花蕾直径 0.8~1.0 mm,这一时期花中的小孢子都是四分体状态,体积较小,细胞核在中间。时期 2:开始分离的花序,此时花蕾直径 1.0~1.5 mm;花中游离小孢子较多,细胞中液泡较大,细胞核被挤靠边,小孢子此时圆形,细胞直径 17~19 μm 。时期 3:花朵的花药未展开,此时花蕾直径 1.5~2.0 mm,小孢子细胞拉长,变为长圆形,大小为(17~19) $\mu\text{m} \times (34\sim36) \mu\text{m}$ 。时期 4:花朵开花 2 d 后,花蕾直径

3~4 mm,花粉长圆型,细胞直径为(36~38) $\mu\text{m} \times (60\sim62) \mu\text{m}$ 。通过对小孢子形态观察得知,在时期 2,即花序刚分离的花朵,花朵直径达 1.0~1.5 mm,小孢子处于最佳游离状态,这个时期的小孢子易恢复分裂,有助于胚性愈伤组织的产生。

2.2 灭菌剂及灭菌时间的筛选

试验中随着灭菌剂浓度增大及灭菌时间加长,各处理的污染相应减少,但是小孢子存活率也降低,镜检发现小孢子细胞受伤时壁破裂,细胞内的物质溢出,严重可导致小孢子细胞壁消失,细胞白化,通常情况游离小孢子细胞壁破裂就基本上死亡。由表 1 可知,综合存活率和污染率 2 种指标看出,灭菌效果较好的是 0.1% 升汞,灭菌时间 4 min 为最佳,污染率为 0,存活率达到 91%。而 1% 次氯酸钠对胡萝卜花灭菌效果不好,4 个处理中虽然小孢子成活率较高,但是灭菌效果很差,污染很多,这可能是胡萝卜小孢子对该药剂较敏感有关。

表 1 灭菌剂对胡萝卜小花灭菌效果及其对小孢子存活的影响

Table 1 Effect of disinfectants on sterilization and microspores survival of carrot

灭菌剂	灭菌时间	小孢子	存活率	接种数	污染数	污染率
Disinfectants	Sterilization time/min	Number of microspores/个	Survival rate/%	Inoculated number/瓶	Contamination number/个	Contamination rate/%
0.1% 升汞	2	100	100	20	12	60
	4	100	91	20	0	0
	6	100	72	20	0	0
	8	100	41	20	0	0
	10	100	10	20	0	0
1% 次氯酸钠	10	100	86	20	18	90
	15	100	79	20	15	75
	20	100	72	20	7	35
	25	100	50	20	4	20

2.3 游离小孢子的分离

由表 2 可知,在 4 个分离游离小孢子的处理中,通过 800 r/min、持续 2 min 的离心处理后液体有混浊,镜检小孢子正常,但分离效果差。通过 800 r/min、持续 3 min 的离心后,液体上部 2/3 澄清、下部浑浊,小孢子细

胞正常,分离较好,该处理较适合胡萝卜小孢子的分离。当离心力达 1 000 r/min,离心 2 min 后液体上部 4/5 澄清、下部浑浊,有小孢子细胞死亡现象,而离心达力达到 1 200 r/min,2 min 后小孢子的细胞聚集成硬的饼状,基本都死亡。

表 2 离心时间及离心力对游离小孢子提取的影响

Table 2 Effect of rotate time and speed on getting alive microspores of carrot

离心力	离心时间	分离效果	小孢子状态	结果
Rotate rate / $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$	Rotate time/min	Derived effect from liquid	Effect on microspore survival	Results
800	2	有浑浊	细胞正常	不好
800	3	2/3 澄清,下部浑浊	细胞正常	较好
1 000	2	4/5 澄清,下部浑浊	部分细胞破裂死亡	力过大
1 200	2	澄清,底部物质片状	大部分细胞死亡	力过大

通过观察比较,以 800 r/min,持续 3 min 处理比较适合胡萝卜小孢子的分离,离心后去掉 2/3 上清液,镜检小孢子浓度为 1×10^5 个/mL,用吸管吸取 2 mL 放入培养基中培养。

2.4 诱导培养基及其诱导激素的筛选

2.4.1 培养基的筛选 在所选用的 6 种培养基诱导试验中,只有使用 HLB 培养基的处理成功诱导出 5 个胚

性愈伤组织。该培养基是胡萝卜游离小孢子培养的专用诱导培养基,MS、NLN(十字花科)、W14(小麦)、B₅(大豆)、WITHT 不适合胡萝卜小孢子生长。2 种激素中的 2,4-D 可以诱导小孢子产生胚性愈伤组织(表 3)。胡萝卜游离小孢子经过 20 d 诱导培养,在显微镜下可以发现细胞增殖,34 d 以后形成胚性愈伤组织。

表 3 培养基及激素对游离小孢子产生胚性愈伤组织的影响

Table 3 Effect of different media and hormones on formation of carrot embryo calli

激素 Hormones	培养基 Media	接种数 Number of inoculated bottles/瓶	长出愈伤组织数 Number of induced calli/个	诱导机率 Callus frequency /%
2,4-D	W14	20	0	0
	MS	20	0	0
	HLB	20	5	25
	B5	20	0	0
	NLN	20	0	0
IBA	W14	20	0	0
	MS	20	0	0
	HLB	20	0	0
	B5	20	0	0
	NLN	20	0	0
	W14	20	0	0

2.4.2 激素浓度的筛选 由表 4 可知,在 HLB 培养基中加入浓度为 0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L 2,4-D 处理中,浓度 0.5~2.0 mg/L 均诱导出胚性愈伤组织。但 0.5 mg/L 效果最好,长出 19 个胚性愈伤组织,诱导率为 38%;其次为 1.0 mg/L,长出 7 个,诱导率为 14%;2.0 mg/L 长出 1 个,只有 2%的诱导率;激素的浓度太高(3.0 mg/L)

表 5 不同培养基对再生植株分化的影响

Table 5 Effect of different media on regeneration plants from embryo calli of carrot microspore

培养基 Media	胚性愈伤组织数(直径 1 cm/块) Embryo callus number inoculated(1 cm diameter)	再生植株数 Number of plants regenerated/个	分化率 Regeneration plants frequency/%	再生芽生长状况 Growth tendency of regeneration plants
W14	40	15	37.5	长势较好
MS	40	22	75.0	长势较好
HLB	40	17	42.5	植株生长后期较弱

2.5.2 激素的筛选 由表 6 可知,在 MS 培养基上使胚性愈伤组织分化成再生植株效果较好的激素是 6-BA,其中以浓度 0.5 mg/L 效果最好,分化率达到 62.5%,浓度升高则不利于再生植株的生成。另外 1.0 mg/L KT 和

表 6 不同激素对植株分化的影响

Table 6 Effect of different hormones on regeneration plants

激素名称及浓度 Hormones and concentration	胚性愈伤组织数(直径 1 cm/块) Callus number inoculated(1 cm diameter)	再生植株数 Number of plants regenerated/个	分化率 Regeneration plants frequency/%	再生芽生长状况 Growth tendency of regeneration plants
0.5 mg/L 6-BA	40	25	62.5	长势较好
1.0 mg/L 6-BA	40	8	20.0	长势较好
2.0 mg/L 6-BA	40	玻璃化	5.0	变形
1.0 mg/L KT	40	细弱	—	弱
1.0 mg/L IBA	40	根状	—	无完整形状
0.1 mg/L 玉米素	40	细弱	—	愈伤组织黄化
CK(无激素)	40	细弱	0	愈伤组织黄化

2.6 生根培养基的筛选

虽然胡萝卜胚性愈伤组织可以直接分化出根、茎、叶成为完整的植株,但是由于多数植株分化时所处的位置在培养瓶的边缘,生长环境不佳,如果不及时将植株转入适宜环境,则很难正常生长。在转移再生植株的过

表 4 2,4-D 对诱导愈伤组织的效果

Table 4 Effect of 2,4-D on induction embryo calli of carrot microspores

2,4-D 浓度 Concentration /mg · L ⁻¹	接种数 Number of inoculated bottles/瓶	长出愈伤组织数 Number of induced calli/个	诱导机率 Callus frequency /%
0.5	50	19	38
1.0	50	7	14
2.0	50	1	2
3.0	50	0	0
0(CK)	50	0	0

则没有愈伤组织出现。

2.4.3 基因型对游离小孢子培养的影响 在获得的 32 个胚性愈伤组织中“宝冠”获得 5 个,而“长城红玥”获得 27 个,可见游离小孢子产生胚性愈伤组织受基因型影响很大,2 个品种间有 5 倍以上的差距。

2.5 分化培养基的筛选

2.5.1 培养基的筛选 在 W14、MS、HLB 3 种培养基中转入直径约 1 cm 左右的胚性愈伤组织,35 d 以后组织开始逐步分化,45 d 左右长成完整的再生植株。但是用 W14 和 MS 培养基的处理再生植株长势较好,其中 MS 培养基上分化率(再生植株数/胚性愈伤组织总数)达到 75%。而 HLB 培养基上再生植株前期生长正常,但是后期生长不良(表 5)。

0.1 mg/L 玉米素处理中,由于胚性愈伤组织恢复分裂生长慢,所以长出的胚较细弱,而加入 IBA 的处理有很多根长出。没有激素加入也可以分化出胚状体,但是很细弱。

程中,原来已经长出的根被人工去掉,以便继续培养成健壮植株,同时无根植株也利于增殖培养。基于以上的原因对生根培养基进行了筛选。试验用的 2 种培养基都能使植株产生根系,而且生根率(生根苗数/再生苗总数)相近,但是用 MS 培养基再生植株长出的根多。应用

的生根激素中 NAA 促进生根的效果好于 IBA, 不仅生根高, 而且长出的根的数量也多(表 7)。再生植株在生根培养基中 20 d 左右开始陆续长出根系, 35 d 左右根系数量可达到 7~11 条。由于胡萝卜再生植株是由丛生芽长出, 没有明显的茎, 生根培养切取时容易破坏植株, 所以操作时应使植株下部带有部分愈伤组织, 以便保持植株的完整。

表 7 不同培养基及激素对再生苗生根的影响

Table 7 Effect of different hormones and media on root formation of regeneration plants

培养基 Media	激素及浓度 Hormons and concentration	再生苗数 Number of regeneration plants/株	生根苗数 Number of rooted plants/株	生根率 Frequency of rooted plants/%	平均根数量 Average number per plant/条
W14	1.0 mg/L NAA	50	47	94	8.56
	1.0 mg/L IBA	50	40	80	6.78
MS	1.0 mg/L NAA	50	48	96	9.75
	1.0 mg/L IBA	50	32	64	5.23

3 结论与讨论

3.1 小孢子再生植株染色体加倍及染色体倍性观察

胡萝卜是属于二倍体作物, 染色体是 9 对 18 条 ($2N=2X=18$), 染色体长度在 $2.5\sim3.5\ \mu\text{m}$, 单倍体植株是 9 条染色体。在愈伤组织分化培养试验中, 通过观察结构不完整植株根尖的染色体倍性, 发现其染色体数目表现复杂, 不仅有二倍体、单倍体, 还发现 2 株四倍体和 1 株非整倍体(14~16 条染色体)现象。

但是对获得的 32 个游离小孢子再生株系的观察, 发现有 17 个株系是二倍体, 15 个株系是单倍体, 没有发现多倍体和非整倍体现象。由于游离小孢子在培养前经过孔径为 $50\ \mu\text{m}$ 的尼龙筛网过滤, 大于此孔径的物质无法通过, 胡萝卜体细胞均超过 $50\ \mu\text{m}$, 通过多次镜检观察, 过筛后的液体中没有体细胞, 所以获得的二倍体植株是单倍体经过加倍后的双单倍体植株(DH 株)。

3.2 小孢子再生植株无性系的建立

通过胚性愈伤组织分化后长出的植株, 可以在分化培养基中保存及扩繁。方法是选择带有部分愈伤组织的植株, 转入加入 $0.5\ \text{mg/L}$ 6-BA 激素的 MS 标准培养基中, 再生植株可以不断增殖生长, 选取其中生长较大的植株进行生根培养, 较小的植株继续进行分化培养, 这样可以不断地产生再生植株, 而且植株长势较好。当发现再生植株生长不正常时, 将 $0.5\ \text{mg/L}$ 6-BA 调整为 $0.1\ \text{mg/L}$ 玉米素, 2 种激素间隔使用, 可以很好地保持再生植株的分化生长状态, 利于再生植株无性系的建立和保存。

参考文献

- [1] 詹艳, 陈劲枫, Ahmed AbbasMalik. 黄瓜游离小孢子培养诱导成胚和植株再生[J]. 园艺学报, 2009, 6(2): 221-226.
- [2] 赵前程, 吉立柱, 蔡荣旗, 等. 花椰菜游离小孢子培养及植株再生研究[J]. 华北农学报, 2007, 22(6): 65-68.
- [3] 苏维, 常彩涛. 辣椒单倍体培养研究进展[J]. 天津农业科学, 2010, 16(4): 11-14.
- [4] 申娟, 梁秋霞, 曹刚强, 等. 蔬菜类作物游离小孢子培养中的影响因素[J]. 北方园艺, 2008(6): 64-67.
- [5] Ferrie A M R, Bethune T D, Watere D. Development of double haploidy in umbelliferae [J]. Acta Horticulturae, 2006, 725(2): 829-835.
- [6] Hu K L, Sachiko Matsubara, Kenji Murakami. Haploid Plant Production by Anther Culture in Carrot (*Daucus carota* L.) [J]. J Japan Soc Sci, 1993, 62(3): 561-565.
- [7] Matsubara S, Dohya N, Murakami K. Callus formation and regeneration of adventitious embryos from carrot, fennel and mitsuba microspores by anther and isolated microspore cultures [J]. Acta Horticulturae, 1995, 392: 129-137.
- [8] 庄飞云. 胡萝卜小孢子胚状体和愈伤组织的诱导[J]. 园艺学报, 2010, 37(10): 1613-1620.
- [9] 管长志, 尹立荣, 陈磊. 胡萝卜游离小孢子培养研究初报[J]. 天津农业科学, 2006, 12(2): 11-12.
- [10] 尹立荣, 管长志, 陈磊, 等. 胡萝卜游离小孢子培养技术研究[J]. 园艺学报, 2009, 36(增): 1950.

Study on Isolated Microspore Culture and Plant Regeneration of Carrot

YIN Li-rong¹, GUAN Chang-zhi¹, CHEN Lei¹, FU Ren-sheng¹, HUO Wen-juan², ZHAO Heng²

(1. Tianjin Agricultural Biotechnology Center, Tianjin 300384; 2. Tianjin Academy of Agricultural Science, Tianjin 300192)

Abstract: The culture of isolated microspore with 2 carrot cultivars 'Changchenghongyue', 'Baoguan' were studied. Stage for simpling, methods for microspore isolating and effective sterilizing were fixed. The results indicated that difficult differences were existed between two genotypes in isolated microspore culture, haploid and dihaploid were attained by inducing embryo calli, regeneration and root formation, the ratio of haploid regenerate plant was 46.9%, double haploid was 53.1%. It also showed that the most effective culture media for inducing embryo calli, regenerate plant and root formation were HLB+ $0.5\ \text{mg/L}$ 2,4-D, MS+ $0.5\ \text{mg/L}$ 6-BA and MS(or W14)+ $1.0\ \text{mg/L}$ NAA.

Key words: carrot; isolated microspore culture; plant regeneration; double haploid