

羽衣甘蓝游离小孢子胚胎发生、 植株再生与增殖的研究

祝朋芳, 王卫珍, 李 琚, 刘 畅, 年玉欣

(沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要:以 20 份羽衣甘蓝材料为试材, 采用游离小孢子培养的方法, 研究了胚胎发生、胚状体成苗和丛生芽继代培养的影响因素。结果表明: 在诱导胚胎发生过程中, 基因型是关键因素, 供试材料中有 15 份诱导出胚, 诱导率为 75%; 最适蔗糖浓度也与基因型有关; 在不同基因型中, 6-BA 与 NAA 最佳浓度配比为 1:1 或 2:1。与 B_5 相比, MS 培养基更有利于胚状体成苗。丛生芽转接周期为 15 d 时增殖效果最好, 平均增殖系数为 10.3。

关键词:羽衣甘蓝; 游离小孢子; 胚胎发生; 植株再生; 增殖

中图分类号:S 635.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)13-0111-05

羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) 属十字花科芸薹属甘蓝种观赏植物, 耐寒性强, 是冬季花坛的重要材料。杂种优势利用是羽衣甘蓝新品种选育的主要方式, 游离小孢子培养技术可以快速地为提供纯合的育种材料, 一般情况下, 游离小孢子培养只要经过 1~2 代就可获得纯合的自交系, 大大缩短了育种年限^[1-2]。1989 年, Lichter^[3]首次对羽衣甘蓝游离小孢子培养获得胚状体。近年来, 芸薹属芸薹种植物的游离小孢子培养技术已取得长足进展, 但甘蓝种植物游离小孢子培养仍存在产胚率不高等诸多问题^[4-7], 此外还受供体植株基因型等因素的影响, 阻碍了实际应用^[8]。该试验研究了 3 种主要因素对羽衣甘蓝游离小孢子胚诱导率的影响, 并对植株再生和丛生芽增殖进行了系统研究, 旨在为建立稳定、高效的游离小孢子培养体系提供技术支撑, 为羽衣甘蓝杂种优势的利用提供理论与实践依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

以 20 个羽衣甘蓝材料为试材(表 1)。

1.2 试验方法

该试验于 2013—2014 年在沈阳农业大学试验基地进行, 于 2013 年 7 月 20 日穴盘育苗, 8 月 22 日定植, 10 月末至 11 月初移至日光温室, 2014 年 1 月末花期取材。

第一作者简介:祝朋芳(1971-), 女, 博士, 教授, 现主要从事观赏植物遗传育种与分子生物学等研究工作。E-mail: pfzhu2013@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31101566)。

收稿日期:2015-01-19

常规田间管理。

1.2.1 羽衣甘蓝游离小孢子培养方法 游离小孢子分离方法参考姜凤英等^[9], 从供试植株的主花序取适宜的花蕾, 经 75% 乙醇溶液消毒 30s, 0.1% $HgCl_2$ 溶液消毒 7min, 无菌水洗滌; 加 13% 蔗糖质量分数的 B_5 培养基于无菌小烧杯中(pH=5.8, 下同), 无菌研棒挤出小孢子, 经 45 μm 的尼龙网膜过滤, 1 000 r/min 离心 3min, 弃上清液, 重复 3 次, 所得沉淀物即为纯化的小孢子; 用血球计数板计数, 将小孢子悬浮于 NLN-13 培养液(13% 蔗糖质量分数)中, 小孢子密度调整到 1×10^5 个/mL, 将其装入直径为 60 mm 的培养皿中, 每皿 2 mL, 石蜡膜封口。在恒温箱中 33℃ 热激 24 h, 再转至 25℃ 下暗培养, 待出现肉眼可见胚状体时转至摇床上振荡(40 r/min)培养。小孢子胚诱导率以每皿出胚数/接种小孢子数计算(单位为 10^{-5})。每个处理分装 5 皿, 重复 3 次。2 周后统计胚诱导率。

1.2.2 蔗糖浓度对胚胎发生的影响 以‘新 10 号’、‘红鹿’、‘16-3-1’为试材, 将分离纯化的小孢子悬浮液分别培养在蔗糖浓度为 10%、13%、16% 的 NLN 培养基中。

1.2.3 激素及其配比对胚胎发生的影响 以‘新 10 号’、‘红鹿’、‘16-3-1’为试材, 将游离小孢子悬浮液培养在含有 0.8 g/L 谷氨酰胺的不同浓度 6-BA(0.1 mg/L 和 0.2 mg/L)以及不同浓度配比(6-BA 和 NAA)的 NLN-13 培养基中。以不添加激素为对照。

1.2.4 胚状体成苗 以‘16-3-1’的子叶型胚状体为试材, 将其转接到 MS 和 B_5 培养基中, 添加 1% 琼脂和 3% 蔗糖, 转接 30 个胚状体, 在 25℃, 16 h/d 下培养, 5 周后统计成苗率和褐化率。成苗率(%) = 成苗数/接种胚

数 $\times 100\%$, 褐化率(%)=褐化数/接种胚数 $\times 100\%$ 。

1.2.5 丛生芽继代培养 将‘16-3-1’经游离小孢子获得的非子叶型胚状体转接到 MS+0.2 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+1%琼脂+3%蔗糖诱芽培养基中,胚状体通过愈伤组织产生丛生芽,然后将丛生芽转接到 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+0.7%琼脂+3%蔗糖继代培养基中,转接周期分别为 15、20、25、30 d,转接 100 d 后调查平均增殖系数、增殖潜力、健壮程度及褐化情况。增殖系数=转接后丛生芽数/转接前丛生芽数。

1.3 数据分析

采用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析与多重比较(LSD法, $P<0.05$)。

表 1

基因型对游离小孢子胚胎发生的影响

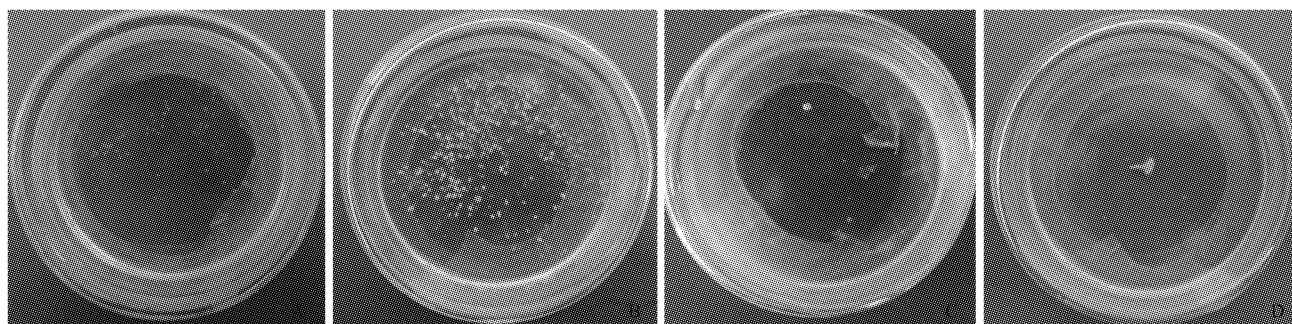
Table 1

Effect of genotypes on embryogenesis in kale

基因型 Genotype	杂合度 Heterozygosity	胚诱导率 Frequency of embryos/ $\times 10^{-5}$	基因型 Genotype	杂合度 Heterozygosity	胚诱导率 Frequency of embryos/ $\times 10^{-5}$
‘新 10 号’	F ₃	11.5a	‘红鹿’	F ₁	1.2efg
‘D10’	F ₄	9.3a	‘16-3-6’	F ₃	1.0efg
‘红鹤’	F ₃	8.2ab	‘42 红’	F ₅	0.8fg
‘HeiZ-粉’	F ₃	5.0bc	‘16-3-1’	F ₆	0.7g
‘红寿’	F ₃	4.7cd	‘白孔雀’	F ₃	0.7g
‘HeiZ-红’	F ₃	2.7cde	‘6BZ’	F ₄	0h
‘红海星’	F ₁	2.7cde	‘SR-圆叶泛粉’	F ₃	0h
‘42 白’	F ₄	2.3def	‘FenZ-红’	F ₃	0h
‘DHZ-2’	F ₄	1.7efg	‘HeiZ-白’	F ₃	0h
‘SR-黄玫瑰’	F ₃	1.7efg	‘白碟’	F ₆	0h

注:不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著,下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.



注: A. 球型胚早期; B. 球型胚; C. 鱼雷型胚; D. 子叶型胚。

Note: A. Globular embryos in initial stage; B. Globular embryos; C. Torpedo embryos; D. Cotyledonary embryos.

图 1 游离小孢子胚胎发育过程

Fig. 1 Microspore development in dishes

2.2 不同蔗糖浓度对游离小孢子胚胎发生的影响

由表 2 可知,‘新 10 号’在 16%蔗糖浓度中胚诱导率高达 13.5×10^{-5} ,与 10%和 13%蔗糖浓度有差异显著。‘红鹿’在 3 种蔗糖浓度中胚诱导率差异不显著,但以 13%最好,为 2.2。‘16-3-1’在 10%蔗糖浓度的培养基中未见胚状体,在 13%和 16%中出胚率有所提升。由此可见,不同基因型所需要的适宜蔗糖浓度不同,这与余凤群等^[10]的结果相一致。

2 结果与分析

2.1 基因型对游离小孢子胚胎发生的影响

接种 2 周后,有 15 个基因型材料获得了胚状体,占供试材料的 75%(表 1)。不同基因型的小孢子胚胎发生能力存在显著差异。其中胚胎发生能力最强的是‘新 10 号’(图 1 A~B),胚诱导率为 11.5,其次是‘D10’和‘红鹤’(图 1 C),‘白孔雀’胚诱导率较低,且大部分仅停留在球形胚阶段,在‘16-3-1’培养过程中出现了较大的子叶形胚(图 1 D)。(‘6BZ’等 5 个基因型未诱导出胚。在 F₁、F₃₋₆ 各不同杂合度材料中,未发现胚诱导率和杂合度具有明显相关性。

表 2

不同蔗糖浓度对游离小孢子胚胎发生的影响

Table 2 Effect of different sucrose concentrations on embryogenesis in kale

基因型 Genotype	胚诱导率 Frequency of embryos/ $\times 10^{-5}$	10%	13%	16%
‘新 10 号’	4.3c	8.5b	13.5a	
‘红鹿’	0.8a	2.2a	1.2a	
‘16-3-1’	0b	1.4a	2.3a	

2.3 激素及其配比对游离小孢子胚胎发生的影响

由表 3 可知,‘新 10 号’在单独使用 6-BA 的情况下,胚诱导率虽有提高但差异不显著,而在 0.2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 中胚诱导率为 12.3×10^{-5} ,高于对照 3 倍。‘红鹿’在 0.1 mg/L 6-BA 中,胚诱导率最低,仅有 0.7×10^{-5} ,而在 6-BA 与 NAA 各 0.1 mg/L 的等量配比中,胚诱导率高达 10.2×10^{-5} ,表明二者在该浓度下的 1:1 比例可能协同促进了胚状体的发生。‘16-3-1’在 0.2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 胚诱导率最高,为 2.7×10^{-5} 。综上,6-BA 与 NAA 共同作用有助于提高出胚率,不同基因型最佳浓度配比为 1:1 或 2:1。

表 3 激素及其配比对羽衣甘蓝
游离小孢子胚胎发生的影响

激素浓度配比		胚诱导率		
Ratios of hormone concentration/(mg · L ⁻¹)		Frequency of embryos/ $\times 10^{-5}$		
6-BA	NAA	‘新 10 号’	‘红鹿’	‘16-3-1’
0(CK)	0(CK)	4.0a	1.0c	0.0c
0.1	0	7.3a	0.7c	0.0c
0.2	0	5.0a	2.3bc	0.8b
0.1	0.1	0.2b	10.2a	2.5a
0.2	0.1	12.3a	5.7ab	2.7a
0.2	0.2	0.0b	1.5bc	0.7b

2.4 基本培养基对胚状体成苗的影响

将‘16-3-1’子叶型胚状体转接到 MS 培养基中,2 d 后由黄转绿,5 d 左右可见明显伸长的胚轴和胚根(图 2 A),

5 周后长成完整的植株,胚状体成苗率达到 53.3%,高于 B₅(表 4)。而在 B₅ 培养基中生长缓慢,且褐化率较高。

表 4 基本培养基对胚状体成苗的影响

Table 4 Effect of basal medium on microspore-derived regeneration in kale					
基本培养基	胚状体数	成苗数	成苗率	褐化数	褐化率
The basic medium	No. of embryos /个	No. of plantlets /个	Rate of regeneration /%	No. of brown/个	Rate of brown/%
MS	30	16	53.3	14	46.7
B ₅	30	12	40.0	18	60.0

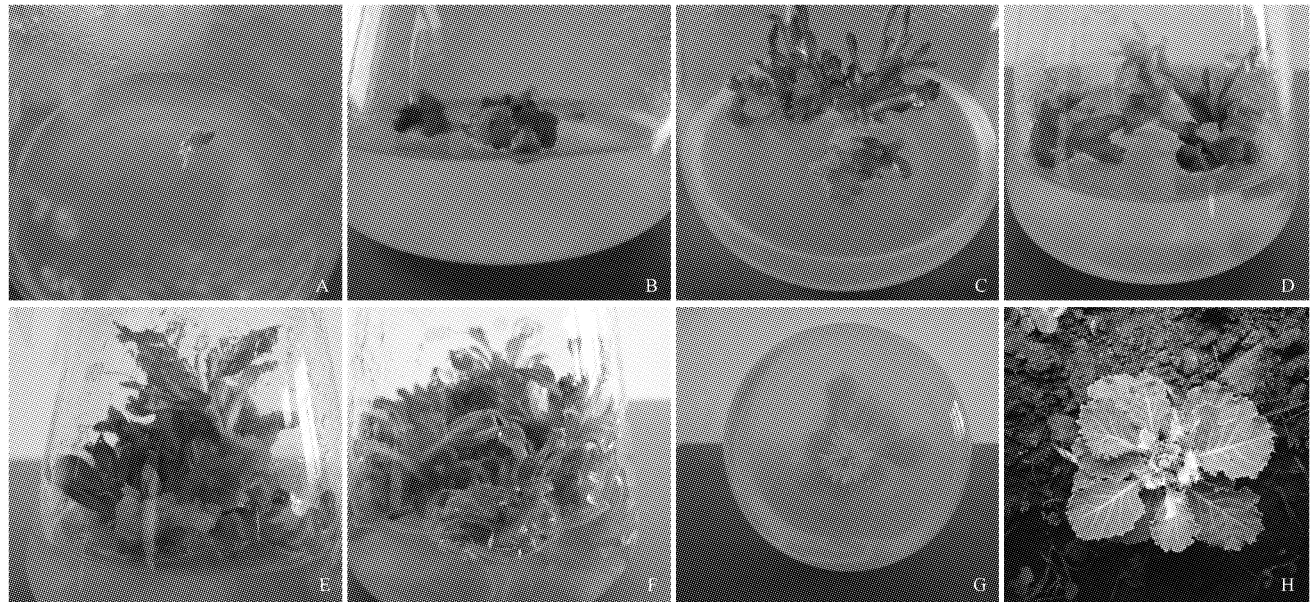
2.5 转接周期对丛生芽继代增殖的影响

接种 2 周左右,‘16-3-1’胚状体产生带有绿色的愈伤组织(图 2 B),之后产生丛生芽(图 2 C),将丛生芽转接到继代培养基中。由表 5 可知,转接周期为 30 d 时,丛生芽增殖较少,且高生长较少,平均增殖系数仅为 2.3,

表 5 转接周期对丛生芽继代增殖的影响

Table 5 Effect of inoculation cycles on propagation of shoots in kale				
转接周期	平均增殖系数	增殖潜力	健壮程度	褐化
Inoculation cycle	Average propagation frequency	Propagation potentiality	Robust degree	Brown
/d				
15	10.3a	+++	+++	无
20	10.0a	++	+++	无
25	7.3b	+	++	无
30	2.3c	+	-	有

注:“-”表示情况差;“+”表示一般;“++”表示较好;“+++”表示很好。
Note:“-”stands for bad;“+”stands for general;“++”stands for better;“+++” stands for the best.



注:A. 子叶型胚转接到固体培养基上;B. 胚状体形成绿色愈伤组织;C. 丛生芽;D. 转接周期 30 d 的丛生芽;E. 转接周期 25 d 的丛生芽;F. 转接周期 15 d 的丛生芽;G. 生根植株;H. 移栽田间。

Note: A. Cotyledon embryos on solid medium; B. Green tissues; C. The multiple shoots; D. Shoots of 30 days inoculation cycle; E. Shoots of 25 days inoculation cycle F. Shoots of 15 days inoculation cycle; G. Plantlets with roots; H. Regenerated plants growing in filed.

图 2 ‘16-3-1’小孢子植株再生
Fig. 2 Plant regeneration of ‘16-3-1’

并出现褐化死亡(图 2 D)。转接周期为 25 d 时,平均增殖系数增加明显,但是增殖潜力不强(图 2 E)。转接周期为 20 d 与 15 d 时,平均增殖系数均达到 10.0。随着转接次数的增加,20 d 周期的增殖潜力低于 15 d。15 d 周期时,丛生芽分化速度快,并且芽的质量好,未出现褐化现象(图 2 F)。将茎长 2.0~3.0 cm 的健壮不定芽转接到 1/2MS+0.2 mg/L NAA 培养基中诱导生根(图 2 G),当根长为 0.5~1.0 cm 时,打开瓶盖练苗 2~3 d,之后可进行移栽,在室内养护一段时间后,可将小孢子植株移栽田间(图 2 H)。

3 讨论

该试验对羽衣甘蓝游离小孢子培养的出胚率、成苗率、增殖率等的影响因素进行了系统的研究。该研究发现,在取材的过程中,同一试材的各单株间的出胚率是有所差异的,应选取健壮且花粉量多的植株。在该试验中,诱导出胚状体的基因型比率为 75%,这进一步验证了前人关于芸薹属作物供体基因型对游离小孢子胚胎发生能力的决定性作用^[10-13]。桑玉芳^[14]在 19 个甘蓝(*B. oleracea* L. var. *capitata* DC.)材料中有 16 个基因型诱导出胚状体。该试验通过比较不同杂合度的供体基因型,未见杂合度与胚诱导率间有明显相关性,这与戴希刚等^[15]得出的商品种和 F₁ 代杂种的出胚率要比自交系高的多不同,当然这可能与基因型差异有关。

胚状体成苗常以 MS 和 B₅ 培养基为主^[16-17],该研究发现 MS 优于 B₅,袁素霞等^[18]认为结球甘蓝和青花菜中 B₅ 极显著优于 MS 和 MSS(一种改良 MS),而何杭军等^[19]发现 B₅ 和改良 MS 对诱导芥蓝植株再生没有差异,由此可见,不同的试验材料结果有所不同。对于难以直接成苗的球型胚、鱼雷型胚和心型胚,通过添加激素,经历脱分化和再分化的过程,形成再生植株。该试验在适宜的培养过程下,获得了长度可达 7 mm 的子叶形胚,肉眼清晰可见胚根与胚芽。

继代增殖在游离小孢子培养中具有重要意义,一方面可以扩大相同基因型小孢子植株数目,另一方面可以为倍性鉴定提供足够的试材。该试验系统研究了转接周期对继代繁殖系数的影响,发现 15 d 的继代周期最有利于丛生芽增殖,并有利于减少玻璃化苗,经继代繁殖的小孢子植株得到了非常高的存活率,这为羽衣甘蓝小孢子植株的繁殖应用提供了依据。

参考文献

- [1] 张慧,汪承刚,宋江华,等.芸薹属蔬菜游离小孢子成胚影响因素研究进展[J].中国农学通报,2013,29(10):92-96.
- [2] 张丽,王静.十字花科作物单倍体育种研究进展[J].安徽农业科学,2003,31(2):231-234.
- [3] Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassica ceae* species[J]. Plant Breeding, 1989, 103: 119-123.
- [4] Duijs J G, Voorrips R E, Visser D L, et al. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* [J]. Euphytica, 1992, 60: 45-55.
- [5] Takahata Y, Keller W A. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. [J]. Plant Science, 1991, 74: 235-242.
- [6] 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.
- [7] 李超. 甘蓝型油菜 DH 系群体构建技术优化研究[D]. 重庆: 西南大学, 2009.
- [8] 冯翠, 曾爱松, 严继勇, 等. 影响青花菜游离小孢子培养的因素[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(6): 20-24.
- [9] 姜凤英, 冯辉, 王超楠. 羽衣甘蓝的小孢子胚诱导和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(6): 725-727.
- [10] 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.
- [11] Kuginuki Y, Nakamura K, Hida K I. Varietal differences in embryogenic and regenerative ability in microspore culture of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. spp. *pekinensis*) [J]. Breeding Science, 1997, 47(4): 341-346.
- [12] 冯辉, 姜凤英, 冯建云, 等. 羽衣甘蓝游离小孢子培养技术研究及应用[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 1019-1022.
- [13] 成妍, 班青宇, 王倩, 等. 不结球白菜游离小孢子培养及再生植株的倍性鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(2): 25-29.
- [14] 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, 2007.
- [15] 戴希刚, 施雪萍, 包满珠. 基因型与培养条件对羽衣甘蓝小孢子胚胎发生的影响[J]. 植物生理学报, 2012, 48(11): 1113-1119.
- [16] Huang B, Sharon B, Kemble B, et al. Effects of culture density, conditioned medium and feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. *Topas* [J]. Plant Cell Reports, 1990, 8: 594-597.
- [17] Maluszynski M, Kasha K J, Forster B, et al. Protocol for broccoli microspore culture [C]//Doubled haploid production in crop plants. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003: 195-240.
- [18] 袁素霞, 刘玉梅, 方智远, 等. 结球甘蓝和青花菜小孢子胚植株再生[J]. 植物学报, 2010, 45(2): 226-232.
- [19] 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.

Study on Microspore Embryogenesis, Regeneration and Propagation *in vitro* on Ornamental Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*)

ZHU Pengfang, WANG Weizhen, LI Jun, LIU Chang, NIAN Yuxin

(College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

基于 SSR 技术对七十五份栽培葡萄品种的鉴定研究

李雪雁, 梁海永, 宪立杰, 杨敏生

(河北农业大学, 河北省林木种质资源与森林保护重点实验室, 河北 保定 071000)

摘 要:以 75 份葡萄栽培品种为试材, 采用 SSR 分子标记技术, 研究建立一套适合于葡萄 DNA 指纹图库构建的技术体系, 为葡萄种质资源的鉴定和亲缘关系分析提供依据。结果表明: 选用 19 对核心引物, 共扩增出 89 个多态性位点, 利用 DPS 软件, 对其进行聚类分析, 75 份葡萄种质的遗传相似系数在 0.028 3~0.887 3, 平均遗传相似系数为 0.475 39。依据用途, 初步分为鲜食葡萄和酿酒葡萄两大类, 并根据品种来源, 大致分为了欧美杂种、美洲杂种和欧亚种。

关键词:葡萄; SSR 标记; 聚类分析

中图分类号:S 663.102.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)13-0115-05

葡萄 (*Vitis vinifera*) 属葡萄科 (Vitaceae) 葡萄属 (*Vitis* L.) 落叶藤本植物, 是世界最古老的植物之一。葡萄原产于欧洲、西亚和北非一带, 在中国长江流域以北各地均有栽培, 主要产于新疆、甘肃、山西、河北、山东等地。葡萄的用途广泛, 可以鲜食、酿酒、药用及提取色素等。生产实践证明, 优良品种对葡萄增加产量和改善品质起着至关重要的作用^[1]。选用优良葡萄树品种是生产的基础, 同时, 培育和种植新品种也是生产可持续发展的有效途径。现在, 我国葡萄育种研究和生产经营

开始向商业化转移, 越来越多的企业与集体投资产业。由于葡萄新品种蕴涵着巨大的经济利润, 在品种归属上, 侵权行为越来越严重, 产权纠纷案件频发, 极大地损害了消费者与育种者的利益, 影响了农业生产和经济秩序。因此, 建立一套准确、快捷的有关葡萄品种真伪等相关鉴定的检测体系势在必行^[2-10]。

该研究以 75 份葡萄品种为材料, 通过筛选主带清晰、稳定性好、分布均匀且尽可能少的 SSR 标记, 用于构建葡萄品种的 DNA 指纹库, 利用 Data Processing System 软件对所得数据进行分析, 对其进行聚类分析, 以期有效利用 SSR 标记评价葡萄种质资源遗传多样性及亲缘关系提供理论依据, 为如今的品种侵权案件提供科学依据, 对葡萄育种、种质资源管理及其保护具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2011 年 5 月在郑州果树研究所国家果树种质

第一作者简介:李雪雁(1989-), 女, 硕士研究生, 现主要从事树木分子标记及葡萄和梨等指纹图库的建立等研究工作。E-mail: 853464281@qq.com.

责任作者:梁海永(1973-), 男, 本科, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事林业生物技术等研究工作。

基金项目:国家林业局林业公益性行业科研专项资助项目(201104039)。

收稿日期:2015-01-19

Abstract: Using twenty materials in ornamental kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) as material, using microspore culture, influence factors of embryogenesis, plant regeneration and the subculture of multiple shoots were studied systematically. The results showed that the genotype was one of the most important factors to embryogenesis. Fifteen genotypes produced embryos with a seventy-five percent induction ratio. The optimal sucrose concentration was also associated with genotypes. In different genotypes, the best ratio of 6-BA and NAA was 1 : 1 or 2 : 1. Compared with B₅ medium, MS was better in plant regeneration. The best subculture duration shoots was 15 days with an average propagation coefficient of 10.3.

Keywords: *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. ; microspore; embryogenesis; plant regeneration; propagation