

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

徐艳辉¹, 冯 辉², 张 凯¹

(1. 辽宁省农业科学院园艺研究所, 沈阳 110161; 2. 沈阳农业大学园艺系, 沈阳 110161)

摘 要:以多种类型的大白菜品系及 F_1 为试材, 探索了若干因素对大白菜游离小孢子培养效果的影响。结果表明: 不同基因型的大白菜游离小孢子的成胚能力差异极大, 产胚量最高的基因型达到 187 个皿, 最低的为 0 个皿; NLN-13 液体培养基中 BA 的浓度为 0.2mg/L(毫克/升), 有利于小孢子胚状体的发生; NLN-13 液体培养基中添加少量活性炭可明显促进小孢子胚状体的形成; 大白菜小孢子植株在 1/2MS+3%蔗糖+0.8%琼脂+0.1mg/ml(毫克/升) NAA 的生根培养基上生根良好, 将已生根的小孢子植株移到 1/2壤土+1/2 粪土的盆中便可成活与生长。

关键词:大白菜; 游离小孢子; 胚状体; 植株再生

中图分类号: S634.103.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2001)03-0006-03

大白菜游离小孢子培养做为植物生物技术领域中细胞工程和基因工程研究的重要内容一直受到国内外学者们的普遍关注, 培养所产生的单倍体经过加倍后获得双单倍体是大白菜育种的新方法并已引起育种工作者们的广泛重视。关于影响大白菜游离小孢子胚胎发生的因素及植株再生有过少量报道^[1~10]。但对液体培养基成份对大白菜游离小孢子胚胎发生的影响还未见报道。本试验对东北地区生长在自然条件下的大白菜小孢子胚胎发生及小孢子植株的再生、扩繁、生根、移栽问题进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料全部由辽宁省农业科学院十字花科研究室提供的大白菜自交系、品系及 F_1 , 共计 37 份, 包含直筒型、包头型中的早、中、晚熟的多种类型。均采用小株栽培方式, 于每年 2 月初于日光温室中育苗, 4 月上中旬定植田间, 用国产日记温度计记录田间昼夜温度变化。

1.1.2 大白菜品系沈快 325-1、沈快 325-2、早白 15-1、早白 15-2、改良快菜的经游离小孢子培养获得的胚状体及小孢子植株。

1.2 方法

1.2.1 于初花期至盛花期自大白菜母株的主枝、一级侧枝上取大小适宜的花蕾, 以 30 个为一组, 放入 25ml 的小三角瓶中, 加入 70% 的乙醇溶液表面消毒 30s(秒), 无菌水冲洗一遍, 然后用 20% 的安替福民溶液表面消毒 15min(分), 无菌水冲洗三遍, 加入 5ml(毫升) B_5 液体洗

涤培养基(蔗糖浓度为 13%), 用玻璃棒挤压花蕾, 使小孢子游离于 B_5 洗涤培养基中, 用 50 μ m(微米)孔径的尼龙网过滤, 收集滤液于离心管中, 1000r \cdot min⁻¹离心 3min(分), 小孢子沉积于离心管底部, 弃去上清液, 加入 5ml(微米) B_5 洗涤培养基悬浮小孢子, 再离心。如此重复三次, 最后倒掉上清液, 加入 NLN-13 液体培养基(蔗糖浓度为 13%且已抽滤灭菌)悬浮小孢子, 用血球计数板计数, 用 NLN-13 液体培养基将小孢子浓度调至 1~2 \times 10⁵个/ml(毫升)。将小孢子悬浮液分装于直径为 60mm(毫米)培养皿中, 每皿 2ml(毫升), 石蜡膜封口, 每个处理分装 4 皿, 设三次重复。33 $^{\circ}$ C 条件下暗培养 1d(天)后转入 25 $^{\circ}$ C 条件下继续暗培养, 15d(天)后统计胚状体数目。

1.2.2 将有胚状体产生的培养皿移出培养箱见光 1~3d(天), 胚状体变绿后取子叶型胚接种到分化培养基上, 50d(天)后统计成苗数; 选取生长正常的小孢子植株, 切下带有腋芽及一片叶片的器官接种到 0.8%琼脂+0.1mg/L KT+0.5mg/L(毫克/升)BA+3%蔗糖的 MS 培养基上, 两周后统计成活率; 将扩繁及再生成活的小孢子植株接种到 1/2MS+0.1mg/L(毫克/升)NAA+0.8%琼脂+3%蔗糖的培养基上, 两周后统计生根率。

2 结果与分析

2.1 基因型对大白菜游离小孢子胚胎发生的影响

不同基因型的大白菜小孢子胚胎发生能力差异很大。供试的 37 个基因型的大白菜包含了直筒型和包头型中早、中、晚熟的多种类型, 结果有 7 个基因型得到了胚状体, 胚状体产量差异很大。产胚量由高到低依次为:

收稿日期: 2001-01-11

沈快 325-1, 产胚量为 187 个/皿, 沈快 325-2, 产胚量为 168 个/皿, 早白 15-1 和早白 15-2 产胚量为 38 个/皿, 改良快菜, 产胚量为 14 个/皿, 亚蔬一号, 产胚量为 7 个/皿, 214-1 产胚量为 3 个/皿, 辽白七号, 产胚量为 1 个/皿, 其余 30 个基因型无胚状体产生(见表 1)。

大白菜游离小孢子培养不同基因型

表 1 的小孢子成胚数目

序号	品种名称	成胚数目	序号	品种名称	成胚数目
1	超级夏王	0	20	改良 19 号	0
2	亚蔬一号	7	21	秋早 60	0
3	豫圆 50	0	22	改良德丰	0
4	夏阳白菜	0	23	辽白八号	0
5	夏光	0	24	绿丰 70	0
6	夏辉	0	25	绿丰 75	0
7	改良快菜	14	26	绿丰一号	0
8	沈快一号	0	27	绿丰二号	0
9	东亚快菜	0	28	199-2	0
10	小杂 60	0	29	214-1	3
11	小杂 61	0	30	214-2	0
12	秋珍白一号	0	31	218-1	0
13	秋珍白二号	0	32	沈快 325-1	187
14	秋珍白六号	0	33	沈快 325-2	168
15	秋珍白七号	0	34	早白 15-1	38
16	中白六号	0	35	早白 15-2	38
17	胶白四号	0	36	231-1	0
18	顶上	0	37	辽白七号	1
19	鲁春白一号	0			

2.2 BA 对大白菜游离小孢子胚胎发生的影响

表 2 BA 对大白菜游离小孢子培养小孢子成胚的影响

产胚数 基因型	BA 浓度				
	0 mg/L	0.05 mg/L	0.1 mg/L	0.2 mg/L	0.4 mg/L
超级夏王	0	0	0	0	0
鲁春白一号	0	0	0	0	0
亚蔬一号	0	0	1	9	0
辽白七号	0	0	0	1	0
绿丰一号	0	0	0	0	0

以超级夏王、鲁春白一号、亚蔬一号、辽白七号, 绿丰一号为试材, 以 NLN-13 为基本培养基加入 BA 使其浓度分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.4mg/L(毫克/升), 进行游离小孢子培养, 15d(天)后统计成胚数。表 2 的结果表明: BA 对大白菜小孢子胚胎发生有一定的促进作用, 供试的 5 个基因型有两个基因型得到了小孢子胚, 当 BA 的浓度为 0.2mg/L(毫克/升)时, 各基因型的产胚量最高, 其中亚蔬一号为 9 个/皿, 辽白七号为 1 个/皿, 但是对难以成胚的基因型, BA 的作用似乎不大。

2.3 活性碳对大白菜游离小孢子成胚的影响。

以改良快菜、早白 15-1、亚蔬一号为试材, 以 NLN-13 为基本培养基, 加少量活性碳, 使其浓度分别为 0、

0.01、0.02、0.04mg/ml(毫克/毫升)进行大白菜游离小孢子培养, 15d(天)后统计成胚数, 结果见表 3。供试三个基因型均有胚状体发生。当活性碳浓度为 0.02mg/ml(毫克/毫升)时, 各基因型产胚量最高, 改良快菜为 112 个/皿, 早白 15 为 26 个/皿, 亚蔬一号为 7 个/皿。当活性碳浓度超过 0.04mg/ml(毫克/毫升)时, 则对胚状体发生有抑制作用。上述结果说明, 在 NLN-13 液体培养基中添加适量活性碳有利于促进大白菜小孢子胚状体的形成, 其适宜浓度为 0.01~0.02mg/ml(毫克/毫升)。

表 3 活性碳对大白菜游离小孢子培养小孢子成胚影响

产胚数 基因型	活性碳浓度			
	CK	0.01 (mg/mL)	0.02 (mg/mL)	0.04 (mg/mL)
改良快菜	2	0	12	0
早白 15-1	0	12	26	0
亚蔬一号	0	0	7	0

2.4 基因型对大白菜小孢子胚状体植株再生的影响

(见表 4)将沈快 325-1、改良快菜、早白 15-1 中已变绿的子叶型胚分别接种到 1.0%琼脂的 M₅₀ 分化培养基上, 50d(天)后统计成苗数, 结果表明: 基因型对大白菜小孢子胚状体再生成苗的影响较大, 供试的三个基因型中, 成苗率最高的为沈快 325-1 自交系, 成苗率为 80%, 成苗率最低的为早白 15 自交系, 成苗率为 67%。从表 4 的结果还可以看出, 三个基因型的成苗率差异很大, 但胚状体的成苗率均较高, 达到了一半以上。

表 4 基因型与大白菜小孢子胚状体成苗的关系

项目	基因型		
	改良快菜(F ₁)	沈快 325-1	早白 15-1
接种胚数	28	30	36
成苗数	20	24	24
成苗率(%)	71	80	67

2.5 大白菜小孢子植株的扩繁、生根和移栽

选取再生正常的小孢子植株, 切下带有腋芽及一片叶片的器官, 接种到 0.8%琼脂+3%蔗糖+0.1mg/L(毫克/升)KT+0.5mg/L(毫克/升)BA 的 M_s 固体培养基上, 记录其生长状况, 15d(天)后统计成活率。(见表 5)结果表明小孢子植株无性扩繁比较容易, 尽管各基因型间的成活率有差异, 但小孢子植株无性扩繁的成活率均达到 80%以上, 成活率最高的基因型沈快 325-1 达到了 92.5%。将再生成功的小孢子植株接种到 1/2MS+0.8%琼脂+0.3%蔗糖+0.1mg/L(毫克/升)NAA 的生根培养基上, 记录其生长状况, 15d(天)后统计生根率。(见表 5)小孢子植株的生根率均较高, 沈快 325-1 的生根率为 95%, 早白 15-1 的生根率为 85%。将已生根的试管苗去掉三角瓶塞, 在室内锻炼 2~3d(天)后, 移栽到

成份为 1/2 壤土 + 1/2 粪土基质的花盆内, 适当遮阴并注意水分管理, 15d(天)后统计成活率。(见表 5)供试的两个基因型的小孢子植株成活率均达到 100%。因此, 在外界环境条件适宜的情况下, 尽早将小孢子植株移出培养瓶, 有利于其成活和生长发育。

表 5 大白菜游离小孢子培养小孢子植株的扩繁、生根、移栽结果

项目	扩繁		生根		移栽	
	沈快 325-1	早白 15-1	沈快 325-1	早白 15-1	沈快 325-1	早白 15-1
接种株数	40	40	100	100	20	20
成活(生根)数	37	33	95	85	20	20
成活(生根)率	92.5%	82%	95%	85%	100%	100%

3 讨论

前人研究表明: 基因型对大白菜游离小孢子培养的影响很大, 这与本试验的研究结果是一致的, 小孢子培养成败的关键是基因型的选择。前人研究还认为应用大白菜游离小孢子培养技术能够在较宽的基因型范围内以较高的产胚量获得小孢子胚, 本试验对 37 个不同基因型的大白菜进行了游离小孢子培养, 品种类型包含了从早熟到晚熟, 从春结球到秋白菜的多种类型, 结果只在为数不多的几种基因型上得到了小孢子胚, 比率为 18.9%。这与前人的研究结果不尽相同。出现这种结果的原因不能单纯地归结为基因型, 基因型是小孢子胚胎发生启动与否的内在因素, 而影响小孢子成胚的其它因素尚有许多, 这些因素也包含了小孢子启动与否的外在因素, 只有在内外条件均适宜的情况下, 才会有小孢子胚胎的形成。本试验中还发现, 在 NLN-13 液体培养基中添加适量的活性碳对大白菜小孢子胚状体的诱导有明显的促进作用。这与前人在禾本科作物中的研究结果一致。活性碳对小孢子胚胎发生有促进作用, 可能是吸附了小孢子培养过程中产生和释放的有毒物质。

参考文献

[1] 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.
 [2] 李岩, 刘凡, 曹鸣庆. 通过游离小孢子培养方法获得小白菜三个变种的胚胎植株[J]. 华北农学报, 1993, 8(3): 92~97.
 [3] 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
 [4] 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.
 [5] 栗根义, 高睦枪, 赵秀山. 高温预处理对大白菜游离小孢子培养的效果(简报)[J]. 实验生物学报, 1993, 26(2): 165~166.
 [6] 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.
 [7] 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: 140~146.
 [8] 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.

早春瓜菜幼苗无生长点的原因

李德泽

早春瓜菜育苗时, 由于土壤水分中盐分浓度过高或土壤通气不良, 土壤温度低等其它因素的影响, 使植物不能从土壤中吸收所需的水分, 发生过度缺水, 破坏植物水分平衡, 不利植物生理活动的进行, 特别是对苗龄较大的瓜菜苗, 叶片大, 叶数多, 蒸腾消耗水分多, 生长点易形成“花打顶”, 这种现象称为“生理干旱”。

早春的幼苗长期感受低温, 新根发生少, 根吸水能力弱, 即使土壤含水量较多, 根也难以从土壤中吸收水分, 来满足需水量、需肥量最大、生命活动最旺盛的生长点需要。如果低温持续时间较长, 将会导致“生长点枯死”。待温度升高, 根系恢复吸水能力, 在幼苗的上部叶片的叶腋处, 选留一个较健壮的侧芽, 让其迅速生长形成新的主茎, 对以后的产量没什么影响, 若幼苗已衰老应考虑重新播种育苗。

解决方法:

1. 加强防寒保温, 增加光照, 提高室温。
2. 加强幼苗管理, 待幼苗恢复正常生长, 喷 1~2 遍大民绿兴。
3. 适时定植, 促使新根发生。
4. 适时整枝, 选留健壮侧芽代替主茎。

(黑龙江省齐齐哈尔市蔬菜研究所, 161041)

1995, 14(4): 326~331.

[9] 刘凡, 李岩, 姚磊, 等. 培养基水分状况对大白菜小孢子胚成苗的影响[J]. 农业生物技术学报, 1997, 5(2): 131~136.

[10] Sato T, Nishio T, Hirai M, Plant regeneration from isolated microspore cultures of chinese Cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Reports* 1989, 486~488.



第一作者简介: 徐艳辉, 女, 1966年生人, 蔬菜学硕士, 1991年毕业于分配到辽宁省农业科学院园艺研究所工作至今, 先后曾获辽宁省农业厅科技进步二、三等奖各一项, 参加选育的两个大白菜新品种“辽白七号”、“辽白八号”已通过了品种审定, 并获得辽宁省种子管理局制种技术国际领先的认定。现主要从事十字花科蔬菜育种研究。