

# 芸薹属蔬菜花药——花粉培养研究进展

袁惠燕, 侯喜林

(南京农业大学园艺学院, 210095)

**摘要:**近年来,单倍体育种逐步得到发展。花药和花粉培养是获得单倍体和纯合二倍体的主要方法之一。现主要综述了芸薹属蔬菜在诱导花粉植株的花药及花粉培养方面的工作,并分析了花培存在的问题和发展前景。

**关键词:**芸薹属蔬菜;花药培养;花粉培养;单倍体

**中图分类号:**S634.03.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2002)02-0048-02

芸薹属蔬菜种质资源十分丰富,主要有三大类:白菜类(结球白菜、不结球白菜等),甘蓝类(结球甘蓝、花椰菜、嫩茎花椰菜、抱子甘蓝等),芥菜类(大头菜、榨菜、雪里蕻等),是重要的叶菜类蔬菜。我国在芸薹属蔬菜常规育种方面成绩显著,但随着育种目标的不断推进,仅仅依靠常规育种手段已不能满足育种工作的需要,研究并寻求运用包括生物技术在内的新技术、新手段来解决这些问题对于进一步提高芸薹属蔬菜的育种水平至关重要。花药和花粉培养是单倍体育种的重要方法之一。由于培养方法日趋完善,培养效率逐年提高,使这一技术开始被广泛应用于常规杂交育种,逐渐成为作物改良和新品种培育工作的一个重要手段。

## 1 研究概况

自1964年由Guha和Mahesheshwari首次在毛叶曼陀罗上通过花药培养获得单倍体植株以来,先后在许多重要作物上获得成功。在芸薹属蔬菜中,花药培养和花粉培养已在结球白菜(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*)<sup>[1]</sup>,甘蓝(*B. oleracea* ssp. *capitata*),油菜(*B. napus* L.)<sup>[3]</sup>,埃塞俄比亚芥菜(*B. carinata*)等蔬菜中有许多成功的报道,并在供试材料、培养基、培养方法和培养条件、植株的诱导和移栽以及花粉植株的倍性和加倍等方面有较深入的研究<sup>[2,3,4,5]</sup>。目前,油菜上已获得大量小孢子植株用于大田生产,结球白菜中利用小孢子培养产生纯合的自交不亲和系配制的F<sub>1</sub>杂种在河南省广泛种植<sup>[6]</sup>。

## 2 采样处理

### 2.1 采样

花粉的发育时期是影响培养效果的重要因素。就多数植物而言,单核中期至晚期的花粉最容易形成花粉胚或花粉愈伤组织。曹鸣庆等认为结球白菜小孢子胚胎发生的启动期,大约在减数分裂后,小孢子第一次有丝分裂前的间期G<sub>2</sub>。具体说是在单核中期到单核靠边期。细胞学观察与植物学结合确定合适的取材标准是切实可行的。Kott等研究表明,

甘蓝型油菜品种Triton适宜的花蕾为2.7~3.9 mm,花药长为2.0~2.5 mm,花瓣长/花药长为1/3~2/3,而G231这三项指标分别为3.8~4.6 mm,2.5~3.0 mm和2/3~1。花培的效果还与植株的生长环境、生理状态等因素有关。在许多物种中,从其幼株花药中获得了高频率的雄核发育,并发现雄核发育频率随株龄的增长而降低。官春云<sup>[7]</sup>在油菜小孢子培养中,通过对植株两种生长状况的研究表明,来自生长室的供体植株,花蕾中处于单核期至双核期的小孢子同步化程度高,增长速度快,小孢子成胚的百分率高,达5.11%。

### 2.2 处理

为了提高花培的成功率,需要在接种前对试验材料进行预处理。在芸薹属蔬菜上主要运用的是低温预处理。低温预处理可以明显提高花粉胚的诱导率。关于低温处理提高花粉胚胎发生能力的作用机理存在两种不同的看法。C. Nitsch等认为。低温可以改变花粉粒第一次有丝分裂的纺锤体取向,由于细胞分裂面的改变,花粉粒的极性分化不起作用,因而形成两个均等的细胞,他们认为正是这种均等的细胞分裂使得花粉朝着形成胚胎的方向发育。然而Sunderland的实验表明,低温处理有丝分裂时的或刚完成有丝分裂的花粉的效果比单核小孢子更加明显,而这时有丝分裂轴向已经决定可,因此Sunderland认为,低温作用的机理不在于改变纺锤体取向,而是保持花粉活力,使它们不致在数天中死亡,在此期间营养细胞得以完成细胞质的改组转向胚胎发生。

## 3 培养基成分

### 3.1 基本培养基

基本培养基的组成对花培成功率有明显的影响。在芸薹属蔬菜花药培养中常用的基本培养基是MS和B5。而在花粉培养是主要使用NLN培养基,在MS和B5上未见有成功的报道。

### 3.2 碳源

早期实验证明,双糖中的蔗糖是最好的碳源,培养基中蔗糖的浓度还起着调节渗透压的作用。由于不同植物细胞渗透压差异甚大,因此各种植物花培要求不同的蔗糖浓度。对甘蓝型油菜6%~10%的蔗糖对花粉愈伤组织或胚状体的形成是适宜的,而在花粉培养时则要求13%的蔗糖。

### 3.3 激素

培养基中的激素成分常常对诱发细胞生长和分裂起重要作用。激素中主要包括生长素和细胞分裂素。在花药培养时,调节激素成分不但可以影响花粉发育的类型,是形成胚状



**第一作者简介:**袁惠燕,女,1976年出生,江苏无锡人,1999年毕业于扬州大学农学院园艺系,同年考入南京农业大学园艺学院,攻读蔬菜学硕士学位,师从侯喜林教授,主要从事十字花科芸薹属蔬菜生物技术与遗传育种方向的研究。

收稿日期:2001-12-06

体还是形成愈伤组织,而且还可以影响到是二倍体的体细胞组织生长增殖还是单倍体花粉细胞生长增殖的问题。不同品种、不同基因型的植株对培养基中激素的有无、种类和水平的反应是不同的。对结球白菜纯粹的 NLN 培养基中胚状体的诱导率可达很高的水平,而对不结球白菜适量的生长素和细胞分裂素对小孢子胚胎的发生具有促进作用。

这里特别值得一提的是多效唑在花培中的作用。寸守铤等<sup>[8]</sup>研究表明,芥菜型油菜进行低温预处理的同时,在浸泡花序轴的溶液中加入适当浓度的多效唑有利于提高胚状体的诱导率。在上述实验的基础上,在培养基中加入 0.5 mg/L 的多效唑可使胚状体诱导率达 214%。关于多效唑的作用机理主要是认为它能促进细胞内蛋白质、核酸的积累,使原生质变浓,从而促进细胞的分裂。

### 3.4 活性炭

在花培中经常使用活性炭,在油菜的花药培养中加入 0.5%~1.0% 的活性炭可以有效的提高花粉植株的产量。实验证明,活性炭主要通过吸附而发生作用,这种吸附是无选择性的,活性炭不但可以吸附琼脂中不利于花粉细胞生长的某些杂质,同时也可以吸附各种植物激素<sup>[9]</sup>。

## 4 培养方式和培养条件

### 4.1 培养方式

初期的花药培养工作都用加有琼脂固化的培养基。后来逐步发展了双层培养、液体培养、分步培养等各种方式。杨清<sup>[10]</sup>通过花药漂浮培养明显提高花椰菜小孢子胚产量。寸守铤等<sup>[8]</sup>以云南芥菜性油菜为试材进行花药液体漂浮分步培养,胚状体诱导频率达 42.1%。而固体培养方法仅为 3.2%。

### 4.2 培养条件

培养条件中最重要的是温度。试验结果表明,离体培养的花药对温度比较敏感。早期多用 25℃~28℃ 的温度进行花药培养,现在知道花药在较高的温度下培养效果更好,特别是最初几天经历一段高温培养出愈率会明显提高。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<sup>[11]</sup>认为在结球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。

## 5 花粉植株倍性及染色体加倍

### 5.1 花粉植株倍性

花药培养时,由胚状体产生的小植株几乎都是单倍体植株。T.J. Orton 等用同工酶法测定了 762 株嫩茎花椰菜花药胚状体植株,确定只有一株是孢子体起源的。而由愈伤组织分化出的小植株倍性就比较复杂。邓立平等<sup>[12]</sup>对 104 株白菜花粉植株的根尖或幼叶进行了染色体镜检,其中单倍体占 46.15%,二倍体占 33.65%,四倍体占 6.73%,其它是混倍体。

### 5.2 染色体加倍

单倍体植株如何加倍成为纯合的二倍体植株,对于将花培技术真正用于实际的育种工作至关重要。目前加倍的途径有二条(1)自然加倍,(2)人工加倍。

5.2.1 自然加倍 花粉植株群体中自发加倍的频率在不同植物上是不同的。自然加倍可能来源于未减数的配子,或最初几次原胚的核内有丝分裂。自然加倍的优点是不会出现核畸变。

5.2.2 人工加倍 人工加倍的方法通常有两种。一是先移栽后加倍。Polsoni 等在开花时根据花的形态判断植株倍性,鉴后将单倍体植株根洗净,用 0.1%~0.34% 的秋水仙素浸泡,砍去植株上部,任其重新生长。二是先加倍后移栽。将具有 3~4 叶,1~3 根的植株通过无菌操作转入 B5 培养基中,附加 10~100 mg/L 秋水仙碱,加倍后移栽入土,开花时,根据花的形态和花粉发育情况判断倍性。

## 6 问题及展望

尽管芸薹属蔬菜花药和花粉培养进展显著,但是仍有一些问题亟待解决。花药培养中进一步提高诱导花粉单倍体植株的频率,减少体细胞干扰等是应该重视的问题。目前主要通过提高蔗糖浓度,减少或不用 2,4-D 来诱导花粉愈伤组织。花粉培养的难度较大,涉及的因素主要有花粉来源植株的基因型及其所处的生理状态、培养基的物理状态及其成分、培养方式等,这些必要的因素尚有待进一步深入研究,以建立各作物的离体花粉培养的最适体系,将对于基础研究和育种实践及基因工程操作具有重要意义。

花药和花粉培养是获得单倍体的重要途径之一。单倍体加倍后能得到纯合亲本,不仅能缩短育种年限,而且可以提高所需基因组合的选择效率。因此花培无论是在育种工作还是基础研究中,都将有广阔的应用前景。

### 参考文献

- [1] Soto T, Nishio T, Hirai M. Plant regeneration from isolated microspore cultures of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *Pekinensis*). *Plant Cell Reports*, 1989(8): 486~488.
- [2] Miyasaka Y, Matsumoto E, Fujimori M. Studies on anther and pollen culture in brassica vegetable crops. *Japan J. Breeding*, 1989, 39(2): 102~103.
- [3] 张凤兰, 钉贵靖久, 吉川宏昭. 环境调经对白菜小孢子培养的影响[J]. *华北农学报*, 1994, 9(1): 95~100.
- [4] 王蒂, 冉毅东, 王汉宁, 等. 不同培养基对甘蓝型油菜花药和花粉培养的效应比较[J]. *中国油料*, 1996, 18(2): 1~3.
- [5] Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassica* species. *plant breeding*, 1989, 103: 119~123.
- [6] 栗根义, 高睦枪, 杨建平. 利用游离小孢子培养技术育成豫白菜 7 号(豫园 1 号)[J]. *中国蔬菜*, 1998 (4): 16~19.
- [7] 官春云. 油菜小孢子培养和双单倍体育种研究 I. 共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.
- [8] 寸守铤, 万萌, 邱仕芳, 等. 芥菜型油菜花药培养诱导花粉胚状体的研究[J]. *西南农业学报*, 1994, 7(3): 32~35.
- [9] 刘用生. 植物组织培养中活性炭的使用[J]. *植物生理学通报*, 1994, 30(3): 214~217.
- [10] 杨清, 曹鸣庆. 通过花药漂浮培养提高花椰菜小孢子胚胎发生率[J]. *华北农学报*, 1991, 6(3): 65~69.
- [11] 刘公社, 李岩, 刘凡等. 高温对白菜小孢子培养的影响[J]. *植物学报*, 1995, 37(2): 140~146.
- [12] 邓立平, 曾烨, 郭亚华等. 白菜花粉植株的诱导[J]. *园艺学报*, 1982, 9(2): 37~42.