

十字花科作物游离小孢子技术研究进展

史庆馨

(黑龙江省农业科学院园艺分院, 哈尔滨 150069)

中图分类号:S634.03.6 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2003)04-0009-01

早在20世纪70年代末,我国已有通过大白菜花药培养获得单倍体植株的报道,但几十年过去了,花药培养技术并没有在十字花科作物上大力推广,究其原因,花药培养基因型限制范围狭窄,且受体细胞影响较大,所以至今未能推广开。与植物花药培养相比,游离小孢子培养消除了小孢子和花药壁、绒毡层细胞之间可能存在的营养竞争现象,使得能在更大基因型范围内,以更高的频率诱导小孢子胚胎发生。由于培养的是已经分离纯净的小孢子,所产生的再生株,全部来自于小孢子,无论它是单倍体亦或是双单倍体,由其所获双单倍体植株,在遗传上是纯合的,可以加速目标选择性状的稳定。小孢子数量巨大,易分散,还能方便地进行诱变处理和突变体筛选研究。选择的突变小孢子可能经胚胎发生直接得到纯合突变体,有利的隐性突变能得到表达,避免了常规育种中隐性基因因不能及时表达而丢失。

1 影响胚状体发生因素及其再生植株的诱导

1.1 供体植株

1.1.1 供体植株生长的光、温条件 提供花蕾的供体植株的生理状况对小孢子胚胎发生是至关重要的。国外供体植株是在人工气候室里生长的,光温条件可以严格控制,所以产胚率很高,同步性很好。国内没有这样好的条件,只能依靠自然条件,所以自然条件下的光温就很重要,大部分实验表明多数基因型的供体植株生长在日照14 h~18 h(小时)和温度15℃~20℃时较为适宜,在这样的光温条件下,较容易诱导胚胎发生,小孢子胚产量较高。特别是对小孢子胚胎发生能力较差的基因型,供体植株生长环境适宜与否,对胚产量的影响格外明显。

1.1.2 株龄 无论是二倍体品种,还是四倍体品种,株龄对小孢子胚胎发生率影响显著。植株主花枝和一级侧枝的花蕾少量开花到一级侧枝的花蕾已有2/3开花之前(即盛花期),采集适宜花蕾进行小孢子培养是最佳时期。

1.1.3 连续摘除将开花的花蕾 为避免不适宜取材的大花蕾消耗营养,使幼小花蕾及适宜取材花蕾发育良好,进行人工连续摘除将开花的花蕾,能明显提高小孢子胚胎发生率。

1.1.4 花蕾的大小 小孢子所处的发育时期是影响游离小孢子培养成败的又一个关键因素。小孢子胚胎发生是在单核中期到单核靠边期。进行游离小孢子培养时,可以通过花蕾长度这一形态指标来估计小孢子所处的发育阶段。但是供体植株的生长状况以及基因型的不同导致花蕾的长度也不同。白菜的花蕾长度一般在2 mm~3 mm(毫米),甘蓝型油菜一般在3 mm~4.5 mm(毫米)。

1.1.5 前期低温处理花蕾 低温预处理花蕾,可以提高品种的成胚量。-20℃低温处理10 h~24 h(小时),有利于小孢子成胚。

1.2 培养基

1.2.1 培养基中加入活性炭 NLN培养基中添加适量的活性炭,对提高小孢子胚胎发生率有明显作用。尤其是对胚胎

发生难的基因型效果更显著。适宜添加量为0.05 mg/ml~0.1 mg/ml(毫克/毫升)。添加适量活性炭对提高胚状体发育整齐性也有明显作用,有助于形成子叶型胚。加活性炭可以克服毒性物质的危害,由于不同的基因型早期释放的有毒物质不同,活性炭的作用效果有很大差异,低胚胎发生率的基因型往往释放有毒物质的能力比胚胎发生率高的基因型要强得多,所以加活性炭的效果明显。

1.2.2 NLN培养基中蔗糖浓度 培养基中适宜的渗透压有利于小孢子胚发生,实验表明,NLN培养基中所含蔗糖浓度13%,对甘蓝型油菜胚状体诱导和发育的综合效果最好。

1.2.3 培养基中小孢子浓度 不同品种间的最适小孢子培养浓度有一定差异,各品种都有自己适宜小孢子浓度。在适宜浓度下,小孢子成胚率高,整齐性好。

1.2.4 培养基的水份 培养基水份状况不但影响着植株再生率,还影响着小孢子胚的发育形态。适宜的培养基水份状况有利于胚的存活和生长。成熟小孢子胚如果在液体培养基中滞留,就不能满足小孢子胚萌发前对相对干燥环境的生理需求,从而影响以后的正常生长和发育。

1.2.5 培养基的通气性 小孢子在培养两周后,由静止培养改为60 r·min⁻¹振荡培养,可以改善液体培养基的通气性,使子叶胚率大大提高,胚也更健壮,提高了胚发育的同步性和胚质量,促进了胚在成苗培养基上的直接成苗。

1.3 热激处理

将提取分装好的小孢子培养皿置于33℃暗培养24 h~72 h(小时),后转入25℃培养箱继续暗培养。33℃的高温热激,促进胚状体诱导,提高诱导频率。

2 胚状体发生过程中细胞学特点

接种时小孢子为圆球形。高温预处理组中,经过1 d(天)的培养后,活小孢子膨大,保持圆球形。其分裂频率高,脱壁率也高,连续分裂逐渐形成多细胞团,培养9 d(天)后,小孢子发育成肉眼可见的胚,15 d(天)可形成大量的球形胚和心形胚,40 d(天)形成鱼雷形及子叶形胚。而未经高温预处理的小孢子严重液化并伴随细胞死亡,没有诱导出胚。

3 小孢子培养技术在育种上的应用

河南农科院已经利用游离小孢子技术培育了多个品种。北京及天津的科研单位也正在利用小孢子技术进行自交系的纯化工作。而且北京市蔬菜中心还利用大白菜的小孢子胚状体获得了抗除草剂转基因植株。

总之,游离小孢子技术对蔬菜育种工作将有很大的贡献。此外,在进行系统诱变,抗性突变体筛选等方面也将大有作为。

参考文献:

- [1] 曹鸣庆,李岩,刘凡等.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.
- [2] 栗根义,高睦枪,赵秀山等.高温预处理对大白菜游离小孢子培养的效果[J].实验生物学报,第26卷第2期.
- [3] 申书兴等.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,第22卷第4期,10.

收稿日期:2003-01-20