

# 春白萝卜游离小孢子培养的研究

张 丽, 郑 鹏 婧

(北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100097)

**摘 要:**以 9 个春白萝卜品种为试材, 研究了基因型对春白萝卜游离小孢子成胚率及 4℃ 低温花蕾预处理+培养基中添加活性炭对游离小孢子胚状体发生的影响, 以期建立春白萝卜自交系快速纯化体系。结果表明: 在 7 个春白萝卜基因型中诱导出了胚状体, 其中“大师”的成胚率最高, 达到 23 个胚/30 个花药。单纯的 4℃ 低温花蕾预处理和培养基中添加 100 mg/L 的活性炭对春白萝卜离体小孢子成胚没有明显的促进作用。而将二者结合起来可以促进春白萝卜离体小孢子培养中胚状体的发生。合适的低温预处理时间在不同品种之间存在差别。

**关键词:**萝卜; 游离小孢子培养; 低温预处理; 活性炭

**中图分类号:**S 631.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)23-0031-03

萝卜是我国传统的大众化蔬菜作物, 长期以来一直是我国主要消费的蔬菜作物之一, 其栽培面积仅次于马铃薯和大白菜, 位居第 3 位。近年来, 萝卜产业快速发展, 栽培面积不断扩大, 出口、加工业成为萝卜产业新的增长点。新品种的推广应用在萝卜产业发展中起到了重要作用。长期以来我国萝卜的品种选育以秋萝卜为主, 自从 20 世纪 90 年代以来, 国外春白萝卜品种进入中国市场, 以秋萝卜为主导的消费市场格局被打破。目前, 在我国种植的春白萝卜品种中, 90% 来自日本及韩国。我国的春白萝卜育种水平与国外尚存在差距, 缩短这种差距已经成为我国萝卜育种工作者急需解决的问题。采用常规的育种手段来缩短这种差距需要很长的时间, 只有通过现代生物技术手段才能尽快缩短差距, 实现我国萝卜育种水平的跨越式发展。

纵观近代世界蔬菜品种育种新技术, 游离小孢子培养技术具有纯化快速, 一次性为育种提供大量可供选择的材料等优点, 是跨越式提高育种水平的一项非常实用的技术。研究表明, 萝卜是十字花科作物中最不容易进行游离小孢子培养成功的材料之一。Lichter<sup>[1]</sup>首次报道了萝卜游离小孢子技术。Takahata<sup>[2]</sup>在日本萝卜品种中获得了胚状体。张丽<sup>[3]</sup>在中国萝卜中获得了小孢子培养的成功。目前, 国内已有关于萝卜小孢子培养成功的报道<sup>[4-5]</sup>。但基因型范围狭窄、成胚率低等仍然是限

制该技术规模化应用的瓶颈。另外, 这些研究中所用的供体材料几乎全部为秋萝卜品种, 关于春白萝卜小孢子培养的研究尚鲜见报道。

该文以 9 个春白萝卜品种为试材, 研究了 4℃ 低温花蕾预处理、培养基中添加活性炭对游离小孢子胚状体发生的影响, 以期快速纯化春白萝卜品系提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为 9 个春白萝卜品种, 分别为“藤风”、“四月早生”、“春耐病总太”、“大师”、“元光”、“珍珠白雪”、“玉观音”、“二年子”、“白玉雪”。于 2012 年 1 月 15 日播种于温室, 3 月 20 日定植于露地, 4 月中旬于盛花期取新鲜花蕾进行试验。

### 1.2 试验方法

1.2.1 小孢子培养方法 选取 2~4 mm 长的花蕾, 4℃ 条件下处理 1~3 d, 用含有 2% 有效氯离子的次氯酸钠溶液表面灭菌, 放入灭过菌的研钵内, 加少量 B<sub>5</sub>-13 液体洗涤培养基, 用无菌研棒碾压花蕾, 挤出小孢子。用 40 μm 孔径的尼龙网过滤小孢子悬浮液, 除去大组织块, 收集滤液 10 mL 于离心管中, 1 000 r/min 离心 3 min。弃去上清液, 沉淀物加 5 mL B<sub>5</sub>-13 洗涤培养基, 摇匀, 1 000 r/min 离心 3 min, 重复 2 次。弃去上清液, 所得沉淀物即为纯净小孢子。将纯化后的小孢子用 1/2 NLN 液体培养基稀释, 每个花蕾加 1 mL 培养基, 以每皿 5 mL 小孢子悬浮液分装入直径为 60 mm 的无菌玻璃培养皿内, 用石蜡膜封口, 先在 33℃ 恒温箱中热激处理 1 d, 再转至 25℃ 下静置暗培养, 直至长出胚状体。培养基中添加 100 mg/L 的活性炭溶液, 以不加活性炭的 1/2NLN 培养基为对照。

**第一作者简介:**张丽(1970-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail: zhangli@nercv.org.

**基金项目:**国家科技支撑计划资助项目(2012BAD02B00); 首都现代农业育种服务平台建设资助项目(D111100001311002)。

**收稿日期:**2013-06-27

1.2.2 胚状体的再生 将胚状体转至  $B_5$ -2 生芽培养基中,琼脂浓度为 0.8%,将转移好的胚状体置于 25℃ 的光照培养箱中培养,直至长成小孢子植株;选择生长正常的小孢子植株,转移至含有 0.05 mg/L IBA 的  $B_5$ -2 生根培养基上,琼脂浓度为 0.5%。

2 结果与分析

2.1 基因型对春白萝卜游离小孢子培养的影响

由表 1 可知,在 7 个基因型中获得了胚状体,6 个基因型中获得了再生苗。在获得胚状体的 7 个基因型中,4 个来源于日本,分别为“藤风”、“四月早生”、“春耐病总太”和“大师”;3 个来源于韩国,即“元光”、“珍珠白雪”和“玉观音”。而未成胚的基因型“二年子”为日本品种,“白玉雪”为韩国品种。不同品种之间的成胚率存在差别,“大师”的成胚率最高(23 个/30 个花药),“四月早生”的

成胚率最低(1 个/30 个花药)。

以“大师”为例,观察了离体小孢子的发育及胚状体再生的过程(图 1)。

表 1 基因型对春白萝卜游离小孢子成胚率的影响

品种	成胚率/个·(30 个花药) <sup>-1</sup>	成苗数/棵
“藤风”	11	5
“四月早生”	1	1
“春耐病总太”	6	2
“大师”	23	18
“二年子”	0	0
“白玉雪”	0	0
“元光”	2	0
“珍珠白雪”	3	3
“玉观音”	4	3

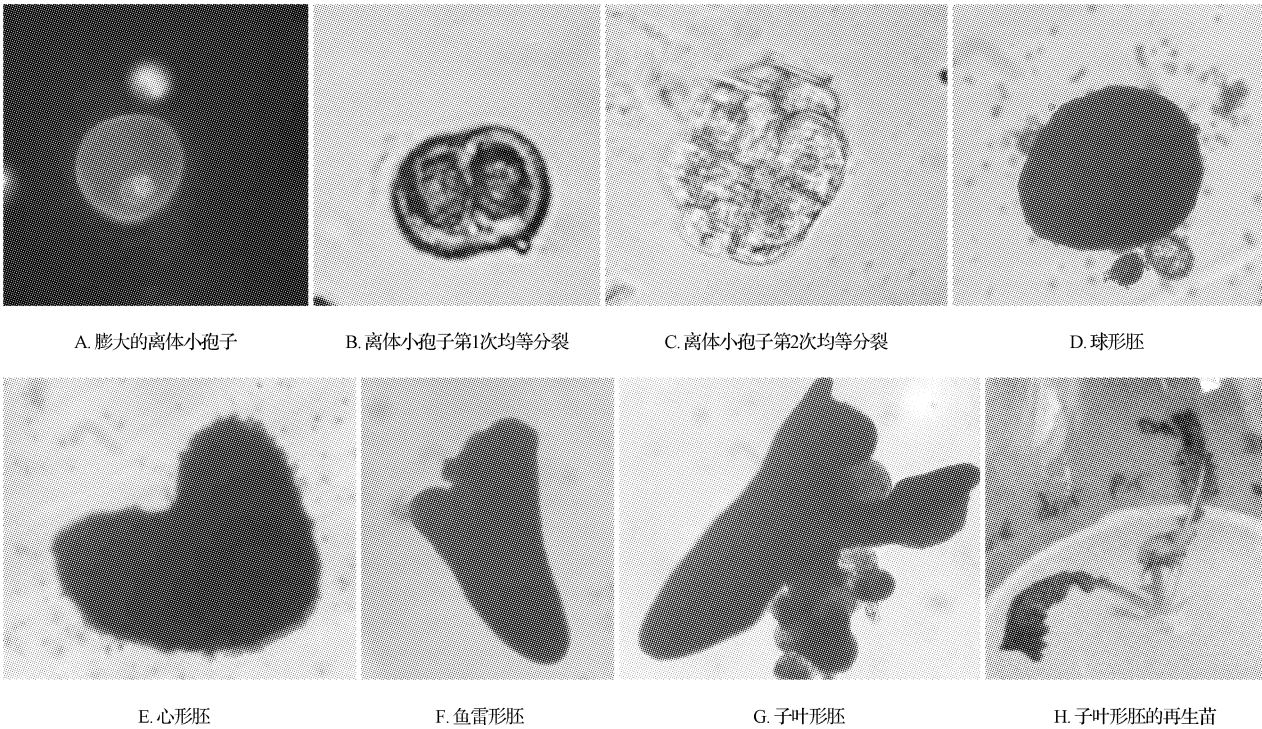


图 1 “大师”春白萝卜品种离体小孢子的发育及胚状体的再生过程

2.2 不同处理对春白萝卜游离小孢子培养的影响

由表 2 可知,花蕾经 4℃ 低温预处理 1~3 d 后,用 1/2 NLN 培养基进行离体小孢子的培养,只有“春耐病总太”和“大师”获得了胚状体,成胚率分别为 2 个/30 个花药和 9 个/30 个花药。以不经过低温预处理的新鲜花蕾为试材,用添加 100 mg/L 的活性炭的培养基进行培养,没有一个基因型获得胚状体。花蕾低温预处理结合培养基中添加活性炭,在 7 个基因型中获得了胚状体。可见,单纯的低温预处理及活性炭处理对春白萝卜小孢子的胚状体发生没有显著的促进作用,而将二者结合在一起可以促进其胚状体的诱导。合适的低温预处理时

表 2 低温预处理结合培养基中添加活性炭对春白萝卜小孢子成胚率的影响

品种	4℃ 低温预处理 1 d+	4℃ 低温预处理 2 d+	4℃ 低温预处理 3 d+
	100 mg/L 活性炭	100 mg/L 活性炭	100 mg/L 活性炭
“藤风”	11	0	0
“四月早生”	1	0	0
“春耐病总太”	2	0	2
“大师”	4	0	10
“元光”	0	2	0
“珍珠白雪”	0	3	0
“玉观音”	0	4	0

间在不同基因型中存在差别。“藤风”和“四月早生”在低温处理 1 d 后获得的胚状体量最高;而“大师”以处理 3 d 为宜。“元光”、“珍珠白雪”和“玉观音”的合适处理时间为 2 d。

### 3 结论与讨论

该试验对 9 个春白萝卜品种的游离小孢子培养进行了初步研究,在 7 个基因型中获得了胚状体,胚状体诱导率达到 77.8%,其中 6 个基因型的胚状体发育成了再生苗。萝卜是十字花科蔬菜作物中对离体组织诱导最不敏感的蔬菜作物,与秋萝卜相比,春白萝卜的这种“顽固性”更加明显。该研究采用培养前花蕾低温预处理,在培养基中添加活性炭 2 种方法促进了春白萝卜离体小孢子的诱导。低温预处理的作用是为离体小孢子创造逆境,使离体小孢子能够脱离原来的配子体发育途径进而转向孢子体发育途径。而活性炭是一种多孔径的炭化物,具有良好的吸附特性。在白菜、油菜、花椰菜等多种作物游离小孢子培养胚状体发生和植株分化有很好的促进作用<sup>[6-9]</sup>。这种促进作用可能是由于培养过程中,没有胚胎发生能力的小孢子会释放出有毒物质,活性炭可以吸附培养基中的有毒物质,使有发生能力的小孢子免遭毒害,从而诱导胚状体的发生<sup>[10-11]</sup>。与其它十字花科作物相比,该研究中的胚状体诱导率很低,在今后的研究工作中,需要进一步优化培养体系,提高春白萝卜小孢子胚状体诱导率,使其能够在自交系纯

化及新品种改良中发挥作用。

### 参考文献

- [1] Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species[J]. Plant Breeding, 1989, 103: 119-123.
- [2] Takahata Y, Komatsu H, Kaizuma N. Microspore culture of radish (*Raphanus sativus* L.); influence of genotype and culture conditions on embryogenesis[J]. Plant Cell Report, 1996, 16: 163-166.
- [3] 张丽. 萝卜游离小孢子培养技术初探[J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 676-678.
- [4] 陈文辉, 方淑桂, 曾小玲, 等. 萝卜游离小孢子培养研究初报[J]. 福建农业学报, 2006, 21(4): 338-341.
- [5] 周志国, 龚义勤, 王晓武, 等. 不同萝卜品种游离小孢子的诱导及培养体系优化研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(1): 33-38.
- [6] 申书兴, 梁会芬, 张成合. 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, 22(4): 65-68.
- [7] 刘凡, 莫东发. 遗传背景及活性炭对白菜小孢子胚胎发生能力的影响[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(3): 297-300.
- [8] 张德双. 白菜类蔬菜小孢子培养胚胎发生及再生株基因型分离比率[J]. 长江蔬菜, 2004(2): 38-39.
- [9] 耿建峰, 侯喜林. 影响白菜游离小孢子培养关键因素分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(1): 111-116.
- [10] Gland A, Lichter R, Schweiger H G. Genetic and exogenous factors affecting Embryogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus* [J]. Plant Physiol, 1998, 132: 613-617.
- [11] Carlos J, Dias S. Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis[J]. Euphytica, 1999, 108: 65-69.

## Isolated Microspore Culture of Spring-white Radish (*Raphanus sativus* L. var. *longinnatus* Bailey)

ZHANG Li, ZHENG Peng-jing

(Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture, Beijing 100097)

**Abstract:** To establish a spring-white radish microspore culture system, taking 9 spring-white radish cultivars as materials, the effects of genotype on embryoblast rate of isolated microspore in spring-white radish and cold pretreatment for flower buds and medium added with activated charcoal on inducing microspore embryogenesis were studied. The results showed that, microspore embryogenesis were induced among which ‘Dashi’ had the highest microspore embryogenesis rate, reached 23 embryo per 30 anthers. A significant improvement of embryogenesis was achieved by using cold pretreatments and medium with 100 mg/L activated charcoal, while single treatment of cold pretreatment and charcoal had no significant effect. There were differences of suitable cold pretreatments time among different varieties.

**Key words:** radish; microspore culture; cold pretreatment; activated charcoal