不同基因型大白菜小孢子胚状体诱导及植株再生

施 柳[1,2]，王雅琼[1,2]，李云龙[1,2]，朱祝军[1,2]，郑伟尉[1,2]，臧运祥[1,2]

(1.浙江农林大学 农业与食品科学学院，浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室，浙江 临安 311300；2.浙江农林大学 生物种业研究中心，浙江 临安 311300)

摘 要：以9个大白菜品种的花蕾为试材，研究了基因型、6-BA以及不同固体培养基对大白菜小孢子胚发生的影响，以期为其它十字花科蔬菜小孢子培养体系的建立提供技术参考。结果表明：不同基因型大白菜的小孢子胚诱导率具有明显差异，9个大白菜品种中有6个诱导出胚状体，'北京特好吃火锅菜'出胚率最高，达到每蕾12.38胚；添加0.3 mg/L的6-BA可以促进小孢子胚状体的形成，以'北京特好吃火锅菜'提升效果最显著；添加0.01 g/L活性炭的MS固体培养基比B_5培养基更适于成熟胚状体发育成苗。

关键词：大白菜；小孢子培养；胚状体；再生植株

中图分类号：S 634.1 **文献标识码**：A **文章编号**：1001－0009(2014)06－0101－04

大白菜(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)属十字花科芸薹属叶用蔬菜，因其营养丰富、耐贮运、食用方法多样而深受人们喜爱。随着生活水平的提高，人们对于蔬菜品质的要求也越来越高，这就要求蔬菜育种工作者培育出更多优质新品种。传统育种方法耗时长，需要5～7年的连续自交才能获得自交系，与之相比，游离小孢子培养只需要2～3年，大大缩短了育种周期，有利于蔬菜新品种的培育，同时也是创造稳定变异材料的理想方法。

自1981年Lichter首次在甘蓝型油菜上进行了小孢子培养并成功获得再生植株之后，游离小孢子培养在植物育种工作中的应用逐渐受到广泛关注[1]。1989年，日本学者Sato等[2]首次在春早熟大白菜品种上培养获得小孢子胚和再生植株。1992年，曹鸣庆等[3]开始在国内进行大白菜小孢子培养。自此，国内学者也开始了对大白菜小孢子培养方面的研究，并应用到新品种培育中。姚秋菊等[4]采用游离小孢子培养技术育成了大白菜一代杂种'豫新58'。不过，影响大白菜小孢子培养胚发生的因素有很多，不同基因型间胚状体诱导率差异也很大。因此，该试验以不同品种的大白菜为试材，研究了基因型和培养基组分等对大白菜小孢子培养胚发生的影响，以期为大白菜新品种培育提供纯合的种质材料，提高大白菜育种效率，加快育种进程。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为9个大白菜商业品种，分别为'橘红心白菜'、'沂丰桔红心'、'红圣白2号'、'北京特好吃火锅菜'、'秦白二号'、'精品改良青杂三号'、'北京抗病新三号'、'丰抗70'、'胶白七号'。所有种子均于2012年8月下旬在浙江农林大学农学试验基地播种育苗，待幼苗长至6片真叶后，定植于大田，按常规方法栽培，翌年3月抽薹开花。

以NLN-13(蔗糖浓度为13%的NLN培养基)为基本培养基，pH调至5.8，在超净工作台上用过滤器抽滤灭菌后，用于胚诱导试验。

1.2 试验方法

1.2.1 胚培养 胚诱导采用暗培养，植株再生则在光照周期16 h/8h的条件下培养，培养温度均为25℃。在初花期上午9:00～11:00，取3～5株主花序或侧枝花序上长度为2.5～3.5 mm的花蕾，置于4℃冰箱48 h。小孢子分离纯化参照Sato等[2]的方法。取花蕾30个为1组，经70%乙醇溶液表面消毒30 s后，再用0.1%$HgCl_2$溶液灭菌10 min，无菌水洗涤5次。沥干水分后，在B_5液体培养基中用玻棒碾压花蕾，挤出小孢子。含小孢子的悬浮液经孔径40 μm的尼龙网过滤后，800 r/min离心5 min。弃上清液，加入5 mL B_5液体培养基重新悬浮后，800 r/min离心5 min，重复2次。将分离纯化的小

第一作者简介：施柳(1990-)，女，上海人，硕士研究生，研究方向为蔬菜生物技术。E-mail：shiliu0719@126.com.

责任作者：臧运祥(1978-)，男，副教授，现主要从事园艺植物生物技术与分子育种研究工作。E-mail：yxzang@zafu.edu.cn.

基金项目：国家自然科学基金资助项目(31000916)；浙江省重大科技资助项目(2010C12004)；浙江省本科院校中青年学科带头人学术攀登资助项目(pd2013230)；浙江农林大学人才启动资助项目(2009FR047)；浙江农林大学生物种业研究中心预研基金资助项目；浙江农林大学研究生科研创新基金资助项目(3122013240261)。

收稿日期：2013－11－13

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

孢子用 NLN-13 培养基重新悬浮后，分装到直径60 mm 的培养皿，每皿 2.5 mL，石蜡膜封口。33℃条件下暗培养 2 d，转至 25℃下暗培养 15 d 后，开始观察统计小孢子出胚情况。将 NLN-13 培养基中诱导出的胚一部分接种到 MS+3%蔗糖+1.20%琼脂粉+0.01 g/L 活性炭的固体培养基上，另一部分接种到 B_5 固体培养基上，分析不同固体培养基对植株再生的影响。

1.2.2　6-BA 对 3 种基因型大白菜胚诱导的影响　以'沂丰桔红心'、'北京特好吃火锅菜'、'秦白二号'3 个品种为试材，分别置于 NLN-13 和 NLN-13+0.3 mg/L 6-BA 的培养基中暗培养，研究 6-BA 对这 3 种基因型大白菜胚诱导的影响。

1.2.3　生根与移栽　将之前于固体培养基上培养 30 d 左右的再生植株移至 1/2MS 培养基上，促其生长更发达的根系。待幼苗长至瓶口，移栽至栽培基质后，置于 25℃人工气候室光照培养。

2　结果与分析

2.1　不同基因型对大白菜小孢子胚发生的影响

不同基因型大白菜的小孢子于 NLN-13 液体培养基中培养 12 d 后，'胶白七号'首先出现肉眼可见胚状体，其它供试品种随后陆续出胚。从表 1 可以看出，品种间胚状体诱导率存在明显差异，其中，'北京特好吃火锅菜'胚状体诱导率最高，达到每蕾 12.38 胚。在 9 个供试品种中，有 6 个品种获得了胚状体，'橘红心白菜'、'沂丰桔红心'和'红圣白 2 号'没有诱导出胚状体。

表 1　不同基因型对大白菜小孢子胚发生的影响

Table 1　Effect of different genotypes on rate of embryogenesis in Chinese cabbage

品种 Cultivars	产胚率 Rate of embryogenesis/胚·蕾$^{-1}$
'北京特好吃火锅菜'	12.38±2.70a
'秦白二号'	1.56±0.69bcd
'精品改良青杂三号'	0.83±0.65cd
'北京抗病新三号'	0.52±0.24cd
'丰抗 70'	2.13±1.16bc
'胶白七号'	3.17±2.41b
'橘红心白菜'	0±0d
'沂丰桔红心'	0±0d
'红圣白 2 号'	0±0d

注：数据为 3 次重复的算数平均值±标准差；不同小写字母表示差异达显著水平($P<0.05$)；下同。

Note: Data are shown as means of triplicate samples with standard deviation. Different letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

2.2　6-BA 对大白菜小孢子胚诱导的影响

在 NLN-13 培养基中添加 0.3 mg/L 的 6-BA 有利于提高大白菜小孢子的胚状体产生率。由表 2 可知，'北京特好吃火锅菜'平均每个花蕾的出胚率从原来的 11.09 胚，提高到 16.49 胚。'秦白二号'则由 1.47 胚提高到 2.19 胚。但是'沂丰橘红心'在 2 种培养基中均未诱导出胚状体。

表 2　6-BA 对大白菜小孢子胚诱导的影响

Table 2　Effect of 6-BA on rate of embryogenesis in Chinese cabbage

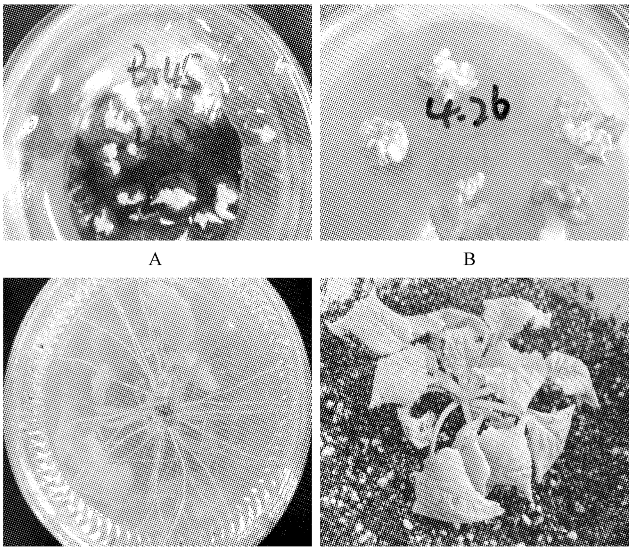
培养基 Medium	产胚率 Rate of embryogenesis/胚·蕾$^{-1}$		
	'沂丰桔红心'	'北京特好吃火锅菜'	'秦白二号'
NLN-13	0±0a	11.09±2.19b	1.47±0.56a
NLN-13+0.3 mg/L 6-BA	0±0a	16.49±2.70a	2.19±1.27a

2.3　固体培养基对植株再生的影响

诱导出的小孢子胚状体长至 6～10 mm 后(图 1A)，从 NLN-13 液体培养基转到 2 种不同的固体培养基，分别为 MS+3%蔗糖+1.2%琼脂+0.01 g/L 活性炭和 B_5 固体培养基。接种到添加活性炭的 MS 培养基上的小孢子胚状体虽然一开始长势没有 B_5 培养基中的小孢子胚状体快，但存活率要比 B_5 培养基高。在添加活性炭的 MS 和 B_5 固体培养基上培养 15 d 左右，胚状体由黄色转变为绿色，分化出小芽，个别附有少量纤弱根系(图 1B)。再转移至 B_5 固体培养基上培养 15 d 左右，小孢子胚状体逐渐形成单个植株。

2.4　生根及移栽

为了使其根系强壮，方便移栽至基质，转移于 1/2MS 培养基培养，每 15 d 左右继代 1 次。待小孢子植株生出粗壮、整齐的白色根系(图 1C)，将试管苗移栽到盆，置于人工气候室培养(图 1D)，9 月份移栽至大田。



A　B　C　D

图 1　大白菜小孢子培养胚发生及植株再生过程

注：A. 小孢子培养 3 周后形成的胚状体；B. 小孢子胚状体萌发；C. 小孢子培养试管苗形成发达根系；D. 移栽成活的大白菜小孢子再生植株。

Fig. 1　The process of microspore embryogenesis and plantlet formation of Chinese cabbage

Note: A. Embryoid from microspore after three weeks culture in Chinese cabbage; B. Embryoid bourgeon in Chinese cabbage; C. The well developed root system of a regenerated plantlet; D. A regenerated plantlet of Chinese cabbage was transferred to horticultural soil mix.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

3 讨论

栗根义等[5]研究表明，不同大白菜品种间胚状体诱导效率差异很大。蒋武生等[6-11]在对大白菜、小白菜、甘蓝、油菜、芥菜、菜薹、花椰菜和青花菜等蔬菜的小孢子培养研究中也得到了类似的结果。该试验研究发现不同基因型的大白菜小孢子胚状体诱导率存在明显差异，在9个供试品种中有6个诱导出胚状体，胚诱导成功率为66.7%。不同基因型之间每蕾出胚率差异较大，最高的为'北京特好吃火锅菜'，出胚率达到每蕾12.38胚，最低的为'北京抗病新三号'，出胚率只有每蕾0.52胚，还有3个品种没有获得胚状体。有研究表明，小孢子胚胎发生能力是一种受基因调控的遗传特性[12-13]。因此，在大白菜游离小孢子培养过程中，筛选出易于诱导出胚状体的基因型材料是培养成功的关键。

培养基中添加一定浓度的植物生长调节剂，有利于提高小孢子胚状体诱导率[14-15]。但也有学者认为，不含任何激素的NLN培养基更利于小孢子胚状体的形成和发育[1,16]。此外，韩阳等[17]研究发现，培养基中添加0.1～1.0 mg/L的NAA对大白菜小孢子胚的发生有抑制作用，并且浓度越高抑制作用越大；2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)对小孢子胚的发生也有较强的抑制作用。该研究结果表明，添加0.3 mg/L的6-BA可以显著提高大白菜小孢子培养的出胚率。这可能是由于不同基因型试材的内源激素含量有差异，所以对于激素的反应不同。

大白菜小孢子胚状体成熟后需要较干燥的生长环境，因此及时将成熟的胚转入相对干燥的培养基更有利于植株再生。韩阳等[18]研究表明，当培养基中的琼脂含量为1.2%时，最有利于大白菜小孢子胚成苗，再生株率为50.5%。该试验研究发现，与B_5培养基相比，添加0.01 g/L活性炭的MS培养基更有利于大白菜小孢子胚状体再生成苗，可能是因为改良过的MS培养基比B_5略干燥，更适合小孢子胚状体的生长。

影响大白菜小孢子胚状体诱导率的因素有很多，该试验仅以基因型、6-BA以及固体培养基为例，研究了其对大白菜小孢子胚发生的影响。但在小孢子培养过程中其它因素，如供体植株生长环境、取材时期、小孢子发育时期以及其它激素如NAA、ZT等都会对小孢子胚发生产生不同程度的影响，仍需进一步研究。

参考文献

[1] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*[J]. Z Pflanzenphysiol,1982,105(5):427-434.

[2] Sato T,Noshio T,Hirai M. Plant regeneration from isolated microspore culture of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*)[J]. Plant Cell Reports,1989,8:486-488.

[3] 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.

[4] 姚秋菊,蒋武生,原玉香,等.游离小孢子培养育成早熟大白菜新品种'豫新58'[J].园艺学报,2008,35(6):929.

[5] 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.

[6] 蒋武生,原玉香,张晓伟,等.提高大白菜游离小孢子胚诱导率的研究[J].华北农学报,2005,20(6):34-37.

[7] 蒋武生,原玉香,张晓伟,等.小白菜游离小孢子培养及其再生植株[J].河南农业大学学报,2005,39(4):398-402.

[8] 田保明,蒋武生,张晓伟,等.提高油菜游离小孢子胚诱导频率的研究[J].华北农学报,2007,22(1):116-119.

[9] 蒋武生,张晓伟,原玉香,等.结球甘蓝游离小孢子培养胚的形成和再生植株[M].中国园艺学会十字花科蔬菜分会.中国十字花科蔬菜研究进展.北京:中国农业科技出版社,2008.

[10] 蒋武生,姚秋菊,张晓伟,等.活性炭和振荡培养对提高大白菜游离小孢子胚诱导率的研究[J].中国瓜菜,2008(4):1-4.

[11] 蒋武生,张晓伟,姚秋菊,等.活性炭对小白菜小孢子培养的影响[J].华北农学报,2008,23(5):93-96.

[12] Gu H H,Zhou W J,Hagberg P. High frequency spontaneous production of doubled haploid plants in microspore cultures of *Brassica rapa* ssp. *chinensis*[J]. Euphytica,2003,134(3):239-245.

[13] Indrianto A,Heberle-Bors E,Touraev A. Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores[J]. Plant Science,1999,143(1):71-79.

[14] 徐艳辉,冯辉,张凯.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[J].北方园艺,2001(3):6-8.

[15] 轩正英,徐书法,冯辉.大白菜游离小孢子培养成胚影响因素的研究[J].辽宁农业科学,2005(2):18-19.

[16] Polsoni L,Kott L S,Beversdorf W D. Large-scale microspore culture technique for mutation selection studies in *Brassica napus*[J]. Can J Bot,1988,66(8):1681-1685.

[17] 韩阳,叶雪凌,冯辉.大白菜小孢子培养影响因素研究[J].中国蔬菜,2006(7):16-18.

[18] 韩阳,叶雪凌,冯辉.提高大白菜小孢子植株获得率的研究[J].园艺学报,2005,32(6):1092-1094.

Microspore Embryogenesis and Plantlet Formation of Different Genotypes of *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*

SHI Liu[1,2],WANG Ya-qiong[1,2],LI Yun-long[1,2],ZHU Zhu-jun[1,2],ZHENG Wei-wei[1,2],ZANG Yun-xiang[1,2]

(1. The Key Laboratory for Quality Improvement of Agricultural Products of Zhejiang Province,Research Center of Bio-Breeding Industry, College of Agriculture and Food Science,Lin' an,Zhejiang 311300;2. Zhejiang Agricultural and Forestry University,Lin' an,Zhejiang 311300)

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

北沙参愈伤组织诱导及悬浮细胞培养研究

苗晓燕，何富强，张筱梅

(保定学院 生化系，河北 保定 071000)

摘　要:以北沙参叶片和茎段为外植体，采用 MS 和 B_5 培养基对其进行愈伤组织诱导，继代培养后进行悬浮培养，研究了不同浓度碳源、6-BA 和 NAA 对其细胞生长的影响，以期为进一步建立北沙参细胞培养体系以及提高其次生代谢物产量奠定试验基础。结果表明：1/2MS+0.4 mg/L 6-BA+1.5 mg/L NAA 琼脂培养基为北沙参愈伤组织诱导的较适宜培养基；1/2MS+0.2 mg/L 6-BA+1.2 mg/L NAA 为适宜的继代培养基；在细胞悬浮培养过程中，分别添加 0.2 mg/L 6-BA、1.6 mg/L NAA 和 20 g/L 蔗糖有利于细胞的生长。

关键词:北沙参；愈伤组织；细胞培养

中图分类号:R 282.71　**文献标识码**:A　**文章编号**:1001－0009(2014)06－0104－03

北沙参(*Glehnia littoralis* Fr. Schmidtex Miq)属伞形科沙参属多年生草本植物，又名海沙参、野沙参、羊乳根等，其主产区为山东、河北、内蒙、辽宁等省。药用始载于"神农本草经"，列为上品，明代"本草纲目"列为五参(人参、党参、玄参、丹参、沙参)之一[1]。经研究表明，北沙参的主要活性成分有欧前胡素、异欧前胡素、佛手柑内酯、补骨质素等 14 种香豆素，还有一种香豆素苷元、多糖、生物碱及挥发油等。药理学研究和临床实践表明，香豆素类成分是主要的有效成分，具有止咳化痰[2]、抗突变[3]、抗菌[4]、抗肿瘤[5]和镇痛镇静[6]等作用。

近年来，由于北沙参的不规范种植，导致其品种退化、混杂、质量下降和疗效降低，严重影响了药材的质量稳定。人们关于北沙参的研究主要集中在化学成分[7]及药理活性等方面[8]，其组织培养[9]仅见零星报道，而细胞悬浮培养则尚鲜见报道，因此保定学院生化系细胞实验室开展了一系列关于北沙参愈伤组织及细胞培养方面的研究。该试验以北沙参叶片和茎段为外植体，对北沙参愈伤组织诱导培养基及细胞悬浮培养条件进行了研究，旨在为北沙参的优质种苗繁育以及次生代谢产物香豆素的大规模生产提供一定的试验依据。

第一作者简介:苗晓燕(1980-)，女，硕士，讲师，现主要从事药用植物次生代谢及调控等研究工作。E-mail:miaoxiaoyan3205@126.com.

基金项目:保定学院重点基金资助项目(2010Z03)；河北省教育厅资助项目(z2012007)。

收稿日期:2013－12－11

1　材料与方法

1.1　试验材料

供试材料北沙参采于安国药材种植基地。

超净工作台(苏州市净化设备公司，型号：YJ-875s)、全温振荡器(哈尔滨东联电子科技有限公司)、低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂)、万分之一电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司)、光照培养箱。

1.2　试验方法

1.2.1　愈伤组织诱导　MS 培养基诱导愈伤组织：取新生北沙参的叶片和茎段为外植体，自来水冲洗 10 min，移至超净工作台，用 70%酒精浸泡 20 s，无菌水冲洗 3 次，再用 0.1%升汞消毒 8 min，无菌水洗涤 3 次，无菌滤纸吸干。用解剖刀将茎段切成 0.5～1 cm，叶片表面划伤，接种于 1/2MS+0.4 mg/L 6-BA+20 g 蔗糖+7 g/L 琼脂培养基，分别添加不同浓度 NAA(0.5、1.0、1.2、1.5、2.0 mg/L)，调 pH 5.8，(25±1)℃，暗培养。B_5 培养

Abstract: Taking flower buds of 9 *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* cultivars as materials, the effect of genotypes, 6-BA and different solid medium on microspore embryogenesis were studied. The results showed that the embryogenesis rate was significantly different among cultivars. Six cultivars were induced to form embryoids and the highest yield was produced in 'Beijing Tehaochihuoguocai' with 12.38 embryoids per bud. Medium supplemented with 0.3 mg/L 6-BA could promote the embryogenesis rate, especially for 'Beijing Tehaochihuoguocai'. The solid MS medium supplemented with 0.01 g/L active carbon was better than B_5 solid medium for plantlet formation from embryoids.

Key words: *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*; microspore culture; embryoid; plantlet

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn