

大白菜游离小孢子培养若干因素探讨

方淑桂, 陈文辉, 曾小玲, 朱朝辉, 牛媛媛, 廖晓珍

(福州市蔬菜科学研究所, 福建 福州 350012)

摘要: 以早熟和中晚熟大白菜为试材, 在福州环境条件下, 研究基因型和供体植株的生理状况对小孢子胚胎发生和植株再生的影响。试验结果表明, 两种类型的大白菜小孢子胚胎诱导率无明显差异, 不同品种材料的小孢子胚胎发生频率存在很大差异; 供体植株采蕾期的气温条件是小孢子胚胎发生的关键因素, 采蕾之前3 d的气温在14°C/24°C(夜/昼)最适宜小孢子发育; 盛花期的花蕾和供体植株营养状况良好, 有利于胚胎发生及植株再生。

关键词: 大白菜; 小孢子培养; 基因型; 生理状况

中图分类号: Q 813.12; S 634.1

文献标识码: A

Several factors for culture of isolating microspores of Chinese cabbage

FANG Shu-gui, CHEN Wen-hui, ZENG Xiao-ling, ZHU Chao-hui, NIU Yuan-yuan, LIAO Xiao-zhen

(Fuzhou Institute of Vegetable Science, Fuzhou, Fujian 350012, China)

Abstract: The varieties of early-mature and middle-late-mature Chinese cabbage were used to study the influence of genotype and physiological status of donor plants on microspore embryogenesis and plant regeneration. The results showed that induction ratio of the embryoid was significantly different among the different donor plants and the embryo productivity had no significant difference between the early-mature varieties and middle-late-maturing ones. The temperature from three days before bud plucking to the plucking day was a key factor and 14°C/24°C (night/day) was most suitable to induce microspore embryogenesis. The bud in full florescence and the donor plant with good nutritional status were also beneficial to induce microspore embryogenesis and plant regeneration.

Key words: Chinese cabbage; Microspore culture; Genotype; Physiological status

游离小孢子培养技术在十字花科蔬菜育种上应用已有成功报道^[1], 影响大白菜游离小孢子胚胎发育的因素研究较多, 而供体植株的生理状况对小孢子培养的影响研究, 主要在人为控制条件下进行^[2,3]。人工气候室设备成本较高, 一般科研单位不具备条件, 而南方冬春温暖, 日照时间长, 温差较大, 适合大白菜生长发育。本试验旨在探讨在南方自然条件下, 大白菜基因型及供体植株的生理状况对小孢子培养的影响, 为南方大白菜游离小孢子培养提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选用耐热早熟和冬性、半冬性的中晚熟材料各20份, 于福州地区适宜季节播种, 大株留种, 利用

自然条件栽培。

1.2 试验方法

1.2.1 培养方法 采用曹鸣庆^[1]等方法, 取主花序上0.2~0.3 cm的花蕾, 用含有效氯为2.5%的次氯酸钠溶液表面消毒15 min, 无菌水冲洗3次。然后将花蕾置于研钵中, 加入经高温灭菌的B5洗涤液, 用研杵轻轻挤压花蕾, 使小孢子充分游离到溶液中。以50 μm孔径尼龙网过滤, 并将10 ml的悬浮液收集于离心管, 1 000 r·min⁻¹下离心3 min, 弃上清液, 再加入B5洗涤液离心, 重复3次, 弃上清液, 加入浓度为0.5 mg·L⁻¹NAA和0.05 mg·L⁻¹6-BA的NLN-13液体培养基, 小孢子密度调整为1×10⁵~2×10⁵个·ml⁻¹。分装于直径6 cm的培养皿中, 每皿3 ml。用Parafilm膜封口后, 将培养皿置于33°C恒温培养箱处理26 h, 然后

收稿日期: 2004-04-15 初稿; 2004-11-20 修改稿

作者简介: 方淑桂(1956—), 女, 副研究员, 主要从事生物技术与蔬菜遗传育种研究。

基金项目: 福建省重大科技项目(2003N022)。

于 25 ℃ 条件下静止暗培养。

1.2.2 小孢子胚状体的培养和再生植株的获得
出现肉眼可见的胚状体后，置于摇床上培养 ($60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、25 ℃ 黑暗下)，胚状体发育到子叶期时转置于 25 ℃、6 000 lx、16 h · d⁻¹ 光照下培养 5~7 d。胚转绿后转到含 3% 蔗糖和 1.2% 琼脂的 MS 固体培养基上培养（光温同上），2 周后将再生株转到大量元素减半的含 0.8% 琼脂的 MS 固体培养基上培养。

1.2.3 再生株的驯化移植 当再生株长到 4~5 片叶子的健壮苗时，即可驯化。将试管苗移出并洗净培养基，种植于直径 8 cm 的营养钵中，基质为 2 份泥炭土和 1 份蛭石，覆盖塑料膜或大烧杯保湿，1 周后试管苗即可成活，揭去覆盖物（光温同上），适时浇水，两周后移出温室，炼苗 3~5 d 后移植于大田^[4]。

1.2.4 细胞学方法 小孢子离体培养期间，用倒置显微镜直接观察小孢子形态变化，细胞分裂和早期胚胎发生过程。球形期后的胚胎变化用双目实体解剖镜观察。

1.3 单因子试验

1.3.1 供体植株的株龄试验 选择胚胎发生能力强的早、中晚熟材料各 3 份，于初花期、盛花期、末花期的植株上采集适宜的花蕾，每个材料取 10 个花蕾，混合培养，每处理 6 盘。

1.3.2 供体植株的营养水平试验 选择出胚率高的早熟材料 3 个，各取 2 株，加强肥水管理，抽苔后每周浇 1 次复合肥，对照为管理水平一般的同一

品种。在盛花期各材料取 25 个蕾做 5 盘，进行 3 次。

1.3.3 供体植株采蕾期的气温试验 温度分几个区段（采蕾之前 1~3 d 的最高和最低气温）：5~15 ℃、8~18 ℃、11~21 ℃、14~24 ℃、17~27 ℃、20~30 ℃。每个区段取出胚率高的材料 5 个混合，培养 5 盘，每次均取相同的材料。

单因子试验均设 3 次重复。20 d 后统计胚胎发生率，再生株在分化成完整的苗时统计，各处理统计结果用邓肯氏新复极差测验。

2 结果与分析

2.1 小孢子胚胎诱导

2.1.1 不同品种材料对小孢子胚胎发生的影响 供试材料早、中晚熟各 20 份，其中早熟材料有 16 份产生胚状体，诱导率为 80%；中晚熟有 15 份产生胚状体，诱导率为 75%，两者无明显差异。但不同材料的胚胎生产能力差异很大，早、中晚熟类型均有此现象。早熟材料产胚量最高的是白阳和庆农，每蕾可诱导出 78 个胚；最少的是福白 23 和夏珍白，每蕾只有 2 个。中晚熟产胚量最高的是 18-1 和丰抗 70，每蕾可达 136 个；最少的是 87-114 和德阳 01，每蕾只有 1 个。

2.1.2 供体植株的株龄对小孢子胚胎发生的影响

供体植株的株龄对小孢子胚胎发生的影响差异极显著，盛花期采的花蕾胚产量最高，平均每盘可诱导出 355.0 个胚状体；初花期产量就明显下降，平均每盘只有 101.5 个；末花期产量更低，每盘 33.5 个，不到盛花期的 1/10（表 1）。

表 1 株龄对小孢子胚胎发生的影响

Table 1 Influence of plant age on microspore embryogenesis

（单位：个·皿⁻¹）

品 种	初花期		盛花期		末花期	
	出胚数	再生苗	出胚数	再生苗	出胚数	再生苗
18-1、魁 5、丰抗 70(中晚熟)	105	20	368	110	38	2
白阳、庆农、夏阳(早熟)	98	19	342	101	29	1
平均出胚数	101.5 B		355.0 A		33.5 C	
平均再生苗率(%)		19.2 B		29.7 A		4.5 C

注：表中同行数据后不同大写字母表示在 0.01 水平上差异显著。

2.1.3 供体植株的营养水平对小孢子胚胎发生的影响 供体植株的营养水平对小孢子胚胎发生有一定的影响，从表 2 看出，处理与对照的胚胎发生量

存在显著差异，营养水平高的小孢子产量也高，一般比对照增产 10.3%~12.8%。

2.1.4 供体植株采蕾期的气温对小孢子胚胎发生

的影响 福州地区冬春气温多变, 最低气温一般是1月份在2℃左右, 11月份与3月份有时最高气温会达到30℃左右。本试验从冬到春各气温段均做了5次。从试验结果看, 采蕾期温度条件不同, 所采的花蕾小孢子胚胎发生量差异显著, 夜间气温低于11℃和白天气温高于27℃, 所采的花蕾小孢子多

不能发育; 气温在14~24℃时胚产量最高; 在11~21℃和17~27℃时小孢子也能发育, 但产量明显降低(表3)。而低温(<11℃)或高温(>27℃)过后4d, 气温稳定在11~27℃时, 所取的花蕾小孢子胚胎发生正常。

表2 营养水平对小孢子胚胎发生的影响

Table 2 Effect of nutritional status on microspore embryogenesis

品种	处理	出胚数 (个·皿 ⁻¹)	比对照增减 (%)	再生苗 (个·皿 ⁻¹)	再生率 (%)
白阳	高营养管理	268 a	12.6	86	32.1 a
	一般管理(CK)	238 b		72	30.3 b
庆农	高营养管理	273 a	12.8	87	31.9 a
	一般管理(CK)	242 b		73	30.2 b
极早40	高营养管理	182 a	10.3	57	31.3 a
	一般管理(CK)	168 b		50	29.8 b

注: 同列数据后不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

表3 气温对小孢子胚胎发生的影响

Table 3 Influence of temperature on microspore embryogenesis

处理	5~15℃	8~18℃	11~21℃	14~24℃	17~27℃	20~30℃
出胚率(个·皿 ⁻¹)	0	3	25.0 B	86.0 A	15.0 C	0
再生苗(个·皿 ⁻¹)	0	0	6.0 B	28.0 A	2.0 C	0
再生率(%)	0	0	24.0 B	32.6 A	13.3 C	0

注: 表中同行数据后不同大写字母表示在0.01水平上差异显著。

2.2 小孢子的再生植株

2.2.1 供体植株的株龄对小孢子植株再生的影响

供体植株的株龄对小孢子植株再生影响显著。初花期培养的小孢子胚胎的平均成苗率是19.2%; 盛花期成苗率最高, 达到29.7%; 而末花期由于大部分胚都停留在球形期和鱼蕾期, 少量能发育成子叶胚, 但转绿慢, 生活力弱, 只有4.5%能成苗(表1), 差异极显著。

2.2.2 供体植株的营养水平对小孢子植株再生的影响 供体植株的营养水平对小孢子植株再生有显著的影响, 胚状体的再生率在29.8%~32.1%(表2), 高营养管理的再生植株质量好, 生长健壮, 移栽成活率高。

2.2.3 供体植株采蕾期的气温对小孢子植株再生的影响 供体植株采蕾期的气温对小孢子植株再生有显著的影响。在11~21℃条件下培养的小孢子胚

胎再生率为24.0%, 14~24℃的再生率为32.6%, 17~27℃的再生率为13.3%, 差异极显著(表3)。

3 小结与讨论

3.1 大白菜早、中晚熟类型的小孢子诱导

Sato等^[5]于1989年首次报道了在春性早熟类型大白菜上诱导小孢子胚胎发生成功。一般认为我国的冬性或半冬性大白菜, 应用游离小孢子培养技术比较困难^[2]。但本研究显示, 早熟类型与中晚熟类型(冬性、半冬性)的胚胎诱导率在75%~80%, 无明显差异, 中晚熟类型的胚产量反而比早熟类型的高。这可能是南方早熟类型的母株生育期较短, 并在炎热的早秋渡过发育期, 植株生长不良, 营养消耗大, 所以胚产量低; 中晚熟类型供体植株从营养生长到生殖生长时间长, 经越冬后于春天开花, 温差大, 养分积累多, 小孢子发育同步性好, 有利于

胚胎诱导。

3.2 提高小孢子胚诱导率的几个因素

大白菜游离小孢子培养技术，除了实验室内严格控制污染，培养基中增加适宜的添加物外，供体植株的生长环境、营养状况、株龄等都是关键因素。本试验的供体植株是在南方自然条件下栽培，不加任何控制条件下进行的。本研究表明，在采蕾之前1~3 d内，适宜小孢子发育的温度为11~27℃，最适宜温度14~24℃，低于11℃或高于27℃时小孢子不发育。这可能是适宜的温度条件下，供体植株新陈代谢旺盛，有利于小孢子分化所需的外源物质的积累，加快细胞分裂分化形成胚状体。官春云^[6]研究表明，生长在人工气候室内的植株，其小孢子发育同步性强，而且单核期的小孢子细胞核体积、细胞质体积以及核质比都比较大，即细胞生理活性高。试验中还发现，取初花末期到末花前期的盛花期的适宜花蕾，小孢子诱导率可明显提高。严准等^[7]认为，初花期的花蕾营养水平高，小孢子分化程度较低，代谢旺盛，有利于小孢子接受外界环境条件的刺激，改变发育方向，从而提高胚的诱导频率。供体植株的营养水平高，植株生长健壮，可提高小孢子发生率。这可能与花蕾发育期具有充足的养分，提高了花蕾内小孢子发育同步性和细胞生理活性有关。

3.3 提高小孢子植株再生率的因素

小孢子发育成胚状体再分化成苗，除了要求选

择适宜大小的子叶期胚及时转接到较干燥的固体培养基上^[8]外，供体植株的生理状况对提高植株再生频率至关重要。生长在11~27℃的温度条件下，加强肥水管理，在盛花期进行游离小孢子培养，诱导出的胚发育好、健壮，有利于胚状体分化成再生植株，提高成苗率。

关于采蕾之前1~3 d内要求严格的日温差，而4 d以前的温度变化与小孢子发育关系不明显，还有待于进一步研究。

参考文献：

- [1] 曹鸣庆, 刘凡. 荚苔属蔬菜游离小孢子培养研究进展 [C]. 园艺学年评, 1996, 2: 63—90.
- [2] 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.
- [3] 张凤兰, 钱贵婧文, 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.
- [4] 方淑桂, 陈文辉, 曾小玲, 等. 大白菜游离小孢子培养技术研究初报 [J]. 福建农业学报, 2003, 18 (2): 123—126.
- [5] Sato T, Nishio T, Hirai M. Plant regeneration from isolated microspore culture of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *Pekinensis*) [J]. Plant Cell Rep, 1989, 8: 486—488.
- [6] 官春云. 油菜小孢子培养和双单倍体育种研究 [J]. 作物学报, 1995, 21 (6): 665—670.
- [7] 严准, 田志宏, 孟金陵. 甘蓝游离小孢子培养初步研究 [J]. 中农业大学学报, 1999, 18 (1): 5—7.
- [8] 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.