

文章编号:1003-8701(2014)05-0076-04

影响大白菜游离小孢子培养胚胎发生因素的研究

陈晓峰¹, 张明培², 徐榕雪¹, 隋好林^{1*}

(1. 中国农业大学烟台研究院, 山东 烟台 264670; 2. 龙口市种子站, 山东 龙口 265701)

摘要:本研究以福山包头系列大白菜品种为试材,对影响小孢子培养中胚胎发育的重要因素进行了研究。结果表明,基因型对小孢子胚产量影响较大,平均每个花蕾产胚在1.28~38.25个之间;花蕾长度为2.1~3.0 mm时,小孢子胚诱导率最高,超过3.0 mm或者低于2.0 mm胚胎诱导率极低;NLN-13培养基为小孢子培养最佳培养基,培养基中添加激素并未提高小孢子胚胎产量,但添加0.1~0.3 g/L活性炭能明显提高小孢子胚胎产量。

关键词:大白菜;小孢子培养;活性炭

中图分类号:S634.1

文献标识码:A

Studies on Factors Influencing Embryogenesis of Isolated Microspores of Chinese Cabbage

CHEN Xiao-feng¹, Zhang Ming-pei², Xu Rong-xue¹, SUI Hao-lin^{1*}

(1. Yantai Research Institute of China Agricultural University, Yantai 264670;

2. Seed Station of Longkou City, Longkou 265701, China)

Abstract: Factors affected culture of microspore was studied on four Chinese cabbage varieties of 'Fushan-baotou'. Results showed that there was significant difference in embryogenesis ability among different genotypes. The yield of microspore-derived embryo ranged from 1.28 to 38.25. The yield of microspore-derived embryo reach the highest level when the length of flower buds was from 2.1 mm to 3.0 mm, and extremely low when the length of flower buds was more than 3.0 mm or less than 2.0 mm. NLN-13 was the best medium for microspore culture, and hormone added did not improve microspore-derived embryo yield, but addition of 0.1 g/L to 0.3 g/L activated charcoal obviously increased microspore embryo production.

Keywords: Chinese cabbage; Culture of microspore; Activated charcoal

游离小孢子培养是在单细胞水平上获得纯系的培养方法。在芸薹属作物中,Lichter^[1]首次从甘蓝型油菜上成功进行游离小孢子培养,后来日本学者Sato^[2]率先获得大白菜游离小孢子培养的再生植株。我国这方面的研究起步较晚,但发展迅速,目前已对大白菜游离小孢子培养的各个影响因素进行了研究^[3-5]。

游离小孢子培养的关键在于小孢子如何进入胚胎发育途径,即影响小孢子胚胎发生因素等方

面研究。目前,影响小孢子胚诱导因素主要有:基因型^[5-8],供试材料生理状况^[2,8-10]、小孢子发育时期^[6,11-13]、培养材料预处理^[12,14-17]、激素和活性炭等培养基添加成分^[2,6,13,17-19]。本试验对影响福山包头类型大白菜小孢子胚胎发生过程中的因素进行研究,以期建立更为完整的小孢子培养体系。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验于2010.10~2013.10在中国农业大学烟台研究院进行。供试大白菜品种为福山包头莲(001)、新烟杂三号(002)、奇山秋美(003)、金盛秋早(004),由中国农业大学烟台研究院蔬菜课题组提供。供试材料于每年11月下旬育苗,2月下旬定植于试验田,于3月下旬至4月下旬取花蕾进行

收稿日期:2014-04-21

基金项目:中国农业大学烟台研究院课题(YT200907),烟台市科学技术发展计划项目(2010248)

作者简介:陈晓峰(1979-),男,博士,助研,主要从事蔬菜分子生物学和生物技术等方面的教学和科研工作。

通讯作者:隋好林,男,副教授,E-mail:lizz1970@126.com

试验。

1.2 试验方法

1.2.1 游离小孢子培养

大白菜植株现蕾后 ,于每天上午 8:00 ~ 10:00 摘取健壮植株的花序 ,参考付文婷^[20]方法进行小孢子培养。

1.2.2 小孢子发育阶段对胚胎发育的影响

以 002 为试验材料 ,摘取不同长度的花蕾 ,采用赵建平^[21]方法对花粉发育时期观察 ,并统计小孢子在四分体 ,单核早、中、晚期 ,双核期和三核期的比率并进行游离小孢子培养。

1.2.3 基因型对小孢子胚胎发生的影响

4 种试材取长度为 2.0 ~ 2.5 mm 的花蕾 ,进行游离小孢子培养。

1.2.4 培养基激素成分对小孢子胚诱导的影响

以 002 为试验材料 ,参考付文婷^[20]的方法 ,在 NLN-13 培养基中添加不同浓度的激素处理进行

游离小孢子培养。

1.2.5 活性炭对小孢子胚胎发生的影响

取 4 种材料合适大小的花蕾 ,用添加有浓度为 0、0.1、0.3、0.5、1.0 和 1.5 g/L 活性炭的 NLN-13 的培养基进行游离小孢子培养。

以上每个处理按平均每个培养皿 4 个花蕾 ,重复 3 次 ,每个重复 3 皿 ,培养 3 周后进行小孢子胚诱导率统计。

2 结果与分析

2.1 小孢子发育阶段对产胚率的影响

由表 1 看出 ,胚胎发生的最适花蕾长度为 2.1 ~ 3.0 mm ,根据镜检 ,此时绝大部分小孢子处于单核晚期 (单核靠边期) ,少数处于单核中期和双核期 ,这时候产胚率最高可达到 34.28 胚/蕾 ,花蕾长度超过 3.0 mm 和低于 2.0 mm 时产胚率极低。

表 1 002 不同花蕾长度对应小孢子发育阶段所占的比例及小孢子胚产量

花蕾长度 (mm)	不同发育时期小孢子所占比例(%)						小孢子胚产量 (胚/蕾)
	四分体	单核早期	单核中期	单核晚期	双核期	三核期	
1.5 ~ 2.0	6	36	58				1.72
2.1 ~ 2.5			34	66			34.28
2.6 ~ 3.0			8	54	38		27.79
3.1 ~ 3.5				12	74	14	3.36
3.6 ~ 4.0					46	54	0

2.2 基因型对小孢子胚胎发生的影响

由表 2 可以看出 ,供试的 4 个基因型都获得了胚状体 ,但不同基因型间小孢子胚胎发生能力差异很大 ,出胚率最高的 002(38.25 胚/蕾)是出胚率最低的 001(1.28 胚/蕾)的近 30 倍。003 和 004 间在小孢子胚诱导率上无显著差异(19.17 胚/蕾和 21.56 胚/蕾)。由此可见 ,002、003 和 004 胚胎发生较易 ,001 胚胎发生较难。

表 2 基因型对小孢子胚产量的影响

基因型	每皿花蕾数	平均每皿产胚数	平均每花蕾产胚数
001	4	5.11	1.28
002	4	153.00	38.25
003	4	76.67	19.17
004	4	86.22	21.56

2.3 培养基中激素成分对小孢子胚诱导的影响

培养基中添加不同浓度的激素对大白菜小孢子胚诱导的影响不同(表 3)。结果表明 ,4 个品种在不加激素的 NLN-13 培养基的小孢子胚诱导率最高 ,添加 0.1 mg/L 6-BA 的培养基出胚率相对降低 ,添加 0.05 mg/L IBA 所有材料均未出胚。对难出胚的材料 001 ,添加任何激素均未诱导出胚。培养基中添加 0.2 mg/L 6-BA 时只有 002 和 004 有少量小孢子胚产生 ,添加 0.05 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA 时候只有 002 出胚 ,但出胚率不高只有 3.97 胚/蕾。

2.4 活性炭对小孢子胚胎发生的影响

由表 4 可以看出 ,添加活性炭对胚诱导率影响显著 ,不同基因型对最适活性炭浓度的要求不同。活性炭的加入对 001 小孢子胚的诱导率影响不大 ,最大值出现在活性炭含量在 0.1g/L。 0.3g/L

活性炭的加入使 002 产生了最高的胚诱导率 ,比不加活性炭的胚诱导率增加了 62.9% ,随着活性炭浓度的增大胚诱导率减小 ,当活性炭浓度增加到 0.5 g/L 时与不加活性炭的胚诱导率没有明显差别 ,当活性炭浓度为 1.0 g/L 时 ,就对胚诱导率产生明显的抑制作用。003 添加 0.3 g/L 活性炭后胚诱导率明显提高 ,当活性炭浓度增加到 1.0 g/L 时 ,胚诱导率又明显受到抑制。004 在加入 0.1 ~ 0.5 g/L 浓度的活性炭都均可明显促进小孢子胚胎发生 ,超过 1.0 g/L 活性炭时也表现为明显的抑

表3 不同培养基对大白菜胚胎产量的影响

培养基	每花蕾产胚数 (胚/蕾)			
	001	002	003	004
NLN-13	0.78	36.61	18.11	19.86
NLN-13+0.1 mg/L 6-BA	0	17.19	10.14	4.25
NLN-13+0.2 mg/L 6-BA	0	2.86	0	1.22
NLN-13+0.05 mg/L IBA	0	0	0	0
NLN-13+0.05 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA	0	3.97	0	0

表4 活性炭对小孢子胚诱导率的影响 (胚/蕾)

基因型	活性炭浓度(g/L)					
	0	0.1	0.3	0.5	1.0	1.5
001	1.8	2.6	2.2	1.2	0.7	0
002	29.7	39.8	48.3	17.6	8.2	2.9
003	15.9	25.3	30.2	12.1	3.1	1.9
004	17.1	20.6	29.3	19.8	4.4	2.1

制胚胎发生。

3 讨 论

游离小孢子培养中 ,花蕾取材时期是决定小孢子培养能否成功的关键因素之一 ,因此 ,一般以花蕾长度 ,花瓣/花药长度比、花蕾颜色等指标来对花粉发育时期进行确定。本研究表明 ,花蕾长度为 2.1 ~ 3.0 mm 时最适合进行游离小孢子培养 ,这时候小孢子主要处于单核晚期至双核期 ,这与贾根义^[4]、曹鸣庆^[9]和卢钢^[22]研究白菜类蔬菜小孢子培养结果相似 ,区别在于他们认为最适合培养的花蕾长度为 2.1 ~ 2.5 mm。

本研究中的 4 个包头类型大白菜品种 ,除 001 外其余 3 个品种均为杂交种 ,遗传背景相对比较复杂 ,因此品种间出胚数相差甚大。本研究中 4 个品种大白菜均诱导出胚 ,每花蕾产胚在 1.28 ~ 38.25 个之间 ,且高出胚率的品种较低出胚率的同步性较好。这与曹鸣庆^[9]和栗根义等^[11]研究的结果相似。可见基因型是影响小孢子胚胎发育的重要因素。

关于植物激素的作用是促进还是抑制 ,目前为止研究者未能取得一致结论。本试验结果表明 ,不添加激素的 NLN-13 培养基效果最好 ,这与蒋武生^[17]的研究结果一致。培养基中添加 6-BA 并未提高小孢子胚的诱导率 ,而且高浓度的 6-BA 对小孢子培养还有抑制作用 ,这与付文婷^[20]和徐艳辉^[7]研究结果不一致。本研究同样发现培养基中添加 0.05 mg/L IBA 时 ,4 个品种均不出胚 ,添加 0.05 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA 时 ,除易出胚品种 002 外 ,其他品种不出胚 ,这与付文婷^[20]研究结果一致 ,与李岩^[23]和 sato^[2]等报道结果不一致 ,可见外源激素不一定是胚胎发生的必要因素。

本研究中发现 ,添加活性炭对大白菜小孢子胚状体的诱导有明显的促进作用 ,申书兴^[24]、徐艳辉^[7]和韩阳等^[25]也发现添加少量活性炭可以明显促进小孢子胚状体的形成。但是不同基因型的最适活性炭浓度不同 ,低胚胎发生率的基因型对活性炭反应不灵敏 ,适应范围也比较窄 ,对胚诱导率的促进作用不明显 ,其他 3 个品种对培养基中添加活性炭反应灵敏 ,且胚诱导率有明显的提

升。Kott^[26]和孙丹^[27]等研究认为,小孢子培养过程中会产生有毒物质,抑制了胚胎发生和发育,而活性炭起到吸附这些有毒物质的作用。

参考文献:

- [1] Leister D, Ballvora A, Salamini F, et al. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants[J]. Nat Genet, 1996(14): 421-429.
- [2] 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.
- [3] 王秀英,巫东堂,赵军良,等. 大白菜游离小孢子培养研究进展[J]. 蔬菜, 2012(7): 46-49.
- [4] 曹鸣庆,刘凡. 园艺学年评(第2卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 63-90.
- [5] 申书兴,赵前程,刘世雄,等. 四倍体大白菜小孢子植株的获得与倍性鉴定[J]. 园艺学报, 1999, 66(4): 232-237.
- [6] 王秀英,巫东堂,赵军良,等. 影响大白菜游离小孢子培养若干因素的研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2009, 29(3): 243-247.
- [7] 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.
- [8] 张凤兰,钉贯靖久,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.
- [9] 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.
- [10] 王秀英,巫东堂,赵军良,等. 大白菜品种间小孢子培养胚诱导率比较[J]. 山西农业科学, 2008, 36(12): 67-68.
- [11] 栗根义,高睦枪,赵秀山,等. 大白菜游离小孢子培养[J]. 园艺学报, 1993, 20(2): 167-170.
- [12] 蒋武生,张晓伟,原玉香,等. 大白菜游离小孢子培养技术研究进展及应用[J]. 河南农业科学, 2009(9): 151-154.
- [13] 石淑稳,周永明,吴江生,等. 甘蓝型油菜小孢子培养、染色体

加倍、试管苗继代越夏和田间移栽配套技术的研究及其在油菜育种中的应用[J]. 中国农学通报, 2001, 17(2): 57-59.

- [14] 耿建峰,侯喜林,张晓伟,等. 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.
- [15] 刘公社,李岩,刘凡,等. 高温对大白菜小孢子培养的影响[J]. 植物学报, 1995, 37(2): 140-146.
- [16] 李菲,张淑江,章时蕃,等. 大白菜游离小孢子培养胚胎发生中的加倍机制[J]. 园艺学报, 2006, 33(5): 974-978.
- [17] 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.
- [18] 刘凡,莫东发,姚磊,等. 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.
- [19] 蒋武生,姚秋菊,张晓伟,等. 活性炭和振荡培养对提高大白菜胚诱导率的影响[J]. 河南农业科学, 2008(4): 1-3.
- [20] 付文婷,张鲁刚,胥宇建,等. 大白菜游离小孢子胚诱导及植株再生[J]. 西北植物学报, 2010, 19(3): 139-143.
- [21] 赵建平,姚祥坦. 花粉发育时期与取样时期对白菜小孢子胚诱导的影响[J]. 中国园艺文摘, 2008(6): 56-58.
- [22] 卢钢,曹家树. 白菜和芜菁杂种小孢子培养研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2001, 27(2): 161-164.
- [23] 李岩,刘凡,曹鸣庆. 通过游离小孢子培养方法获得小白菜三个变种的胚胎及植株[J]. 华北农学报, 1993, 8(3): 92-97.
- [24] 申书兴,梁会芬,张成合,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, 22(4): 65-68.
- [25] 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.
- [26] Kott L S, Polsoni L, Beversdorf W D. Cytological aspects of isolated microspore culture of *Brassica napus*[J]. Can J Bot, 1988(66): 1658-1664.
- [27] 孙丹,王涛涛,叶志彪,等. 基因型和活性炭对大白菜小孢子胚胎发生的影响[J]. 湖北农业科学, 2005(6): 73-75.

(上接第 66 页)

- [16] Chin-tian L, Smith D. Influence of Nitrogen fertilizer on stands, yield of herbage and protein, and Nitrogenous fractions of field-grown Alfalfa[J]. Agronomy Journal, 1972(64): 527-530.
- [17] Jenkins M B, Botttomtey P J. Seasonal response of uninoculated

alfalfa to N fertilizer: soil N, nodule turn over, and symbiotic effectiveness of *Rhizobium meliloti*[J]. Agronomy Journal, 1984(76): 959-963.

- [18] 谢勇,孙洪仁,张新全,等. 坝上地区紫花苜蓿氮、磷、钾肥料效应与推荐施肥量[J]. 中国草地学报, 2012(2): 52-57.