

大白菜游离小孢子胚诱导及植株再生*

付文婷,张鲁刚*,胥宇建,张立志,牛 娜

(西北农林科技大学 园艺学院,农业部西北园艺植物种质资源利用重点开放实验室,陕西杨凌 712100)

摘 要:以 15 个大白菜[*Brassica campestris* ssp. *Pekinensis* (Lour.) Olsson]自交系和杂交种为试材进行游离小孢子培养,研究了影响胚状体发生及植株再生的几个主要因素。结果表明,有 12 个品种的游离小孢子在 NLN-13 液体培养基上诱导出胚;各品种间小孢子胚产量差别很大,每个花蕾产胚在 0.25~65.4 个之间;将成熟的子叶形胚及时转移至再生培养基上,对提高植株获得率至关重要;在 NLN-13 液体培养基上附加 0.2 mg · L⁻¹ 的 6-BA 对胚状体的发生和发育有促进作用;B₅ + 0.2 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.02 mg · L⁻¹ NAA 的培养基有利于小孢子胚发育成植株;1/2 MS + 0.1 mg · L⁻¹ NAA 为小孢子植株生根最适宜的培养基。

关键词:大白菜;小孢子;胚状体;再生植株

中图分类号:S634.1

文献标识码:A

文章编号:1004-1389(2010)03-0139-05

Isolated Microspore Culture and Plantlet Formation
in Heading Chinese Cabbage

FU Wenting,ZHANG Lugang*,XU Yujian,ZHANG Lizhi and NIU Na

(College of Horticulture,Northwest A&F University,Key Laboratory of Horticulture Plant Germplasm
Resource Utilization in Northwest China,Ministry of Agriculture,Yangling Shaanxi 712100,China)

Abstract: Isolated microspore culture was carried out with 15 F₁ hybrids and inbred lines of heading Chinese cabbage(*Brassica campestris* ssp. *Pekinensis* (Lour.) Olsson). Major factors influenced embryogenesis in Chinese cabbage during microspore culture were investigated. The results showed that 12 varieties of heading Chinese cabbages were cultured in NLN-13 liquid medium and produced microspore-derived embryos and plantlet regeneration. The production of microspore-derived embryos varied remarkably among these varieties. Embryo yield per bud ranged from 0.25 to 65.4. Transferring mature cotyledonary embryos to the regeneration medium in time was essential to increase plantlet regeneration rate. The effect of different hormone concentrations in NLN medium on embryogenesis was compared. It showed that NLN-13 medium added with 0.2 mg · L⁻¹ 6-BA promoted genesis and development of the embryoids. Microspore-derived embryos on B₅ medium with 6-BA 0.2 mg · L⁻¹ and NAA 0.02 mg · L⁻¹ were favorable to regenerating plantlets. For rooting of microspore plantlets,1 / 2 MS added with 0.1 mg · L⁻¹ NAA was suitable.

Key words: Heading Chinese cabbage; Microspore; Embryoid; Plantlet

大白菜[*Brassica campestris* ssp. *Pekinensis* (Lour.) Olsson]是原产于中国的一种重要蔬菜作物,杂种优势明显。游离小孢子培养是一种在单细胞水平上获得双单倍体纯系的方法,可在较

短的时间里获得优良纯系^[1],加快一代杂种的选育进程。因此,游离小孢子培养是创造稳定变异材料的理想方法,虽然大白菜上已有小孢子培养成功的报道^[1-2],然而对影响小孢子胚发生和发育

* 收稿日期:2009-09-15 修回日期:2009-10-15
基金项目:国家科技支撑计划(2008BADB1B01);国家 863 计划(2006AA100108-4-7);陕西省重大科技专项(2008ZDKG-03)。
作者简介:付文婷(1984—),女,在读硕士,研究方向为蔬菜生物技术与育种。E-mail:baby_vox_fan@163.com
* 通讯作者:张鲁刚,教授,博士生导师,主要从事蔬菜生物技术和遗传育种研究。E-mail:lugangzh@163.com

因素的研究^[3-8]普遍表明,基因型是影响大白菜游离小孢子培养的重要因素。不同基因型材料的培养条件不完全相同,因此,大白菜游离小孢子培养是一项长期性的工作。本研究在前人研究的基础上,以自育大白菜材料为试材,对影响大白菜游离小孢子胚状体的诱导和植株再生的主要因素进行进一步研究,旨在优化培养体系,创制新的育种材料,扩展这一技术在大白菜育种实践中的应用。

1 材料与方法

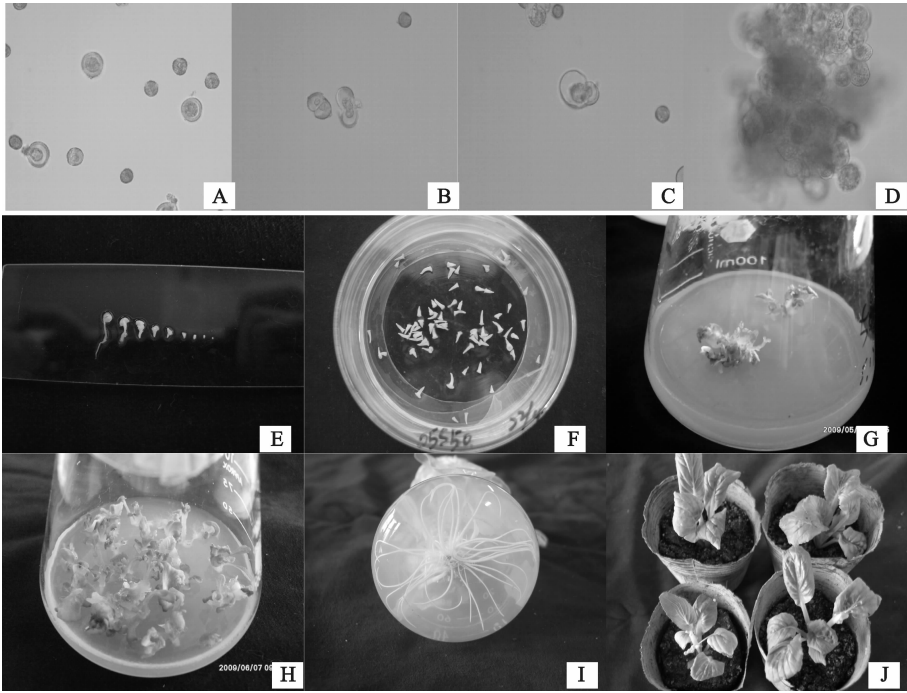
供试材料(表 2)由西北农林科技大学园艺学院大白菜课题组提供,其中羞月由种子市场购得,其余均为自育材料或品种。供试材料于 12 月中下旬分两批育苗,前后相隔 20 d,2 月下旬定植于西北农林科技大学园艺学院试验田,3 月下旬到 4 月底取花蕾。参照 Sato 等^[9]的方法分离、纯化小孢子。调整小孢子密度为 1×10^5 个 $\cdot$ mL⁻¹。将小孢子悬浮液分装至 60 mm $\times$ 15 mm 培养皿中,每皿 3 mL。于 33℃ 下暗培养 24 h,再转入 25℃

恒温箱中暗培养。在培养过程中每天取少量培养材料观察小孢子的分裂情况。2 周后可见小孢子胚形成。小孢子培养 3 周后,将形成的子叶型胚状体,置 25℃,3 000 lx、16 h/d 光照条件下培养,当胚状体转绿后,即将胚状体转到固体再生培养基 B₅。上述试验均设 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 小孢子在离体培养中的发育特征

大白菜小孢子在 NLN-13 培养基中经 33℃ 高温处理 24 h 以后,部分小孢子开始膨大,形状为圆球形,个别为卵圆形(图 1-A)。3 d 后,少数圆球形膨大的小孢子出现第 1 次细胞分裂,部分小孢子出现脱壁现象。小孢子分裂方式多为对称性分裂(图 1-B),个别为不对称分裂(图 1-C)。7 d 后可在显微镜下观察到细胞多次分裂形成的小细胞团(图 1-D)。10 d 后肉眼可见球形胚形成,15~18 d 可形成从圆球形至子叶形不同发育时期的胚(图 1-E)。



A. 小孢子膨大 Microspores expansion;B. 细胞均等分裂 Cell division in equal;C. 细胞不均等分裂 Cell division in unequal;D. 细胞分裂形成的细胞团 Cell mass divided from cells;E. 发育不同步的胚状体 Embryos at different development stages;F. 小孢子培养 3 周后形成的胚状体 Embryos cultured from microspores for three weeks; G,H. 小孢子胚芽分化及植株再生 Microspore plumule differentiation and plantlet regeneration;I. 再生植株诱导生根 Induction of roots from shoots;J. 移栽成活的植株 Well-grown transplants

图 1 小孢子离体发育过程及植株再生

Fig. 1 Isolated microspores development in vitro and plantlets regeneration

2.2 基因型和激素成分对小孢子胚诱导的影响

2.2.1 培养基激素成分对小孢子胚诱导的影响

在培养基中添加不同的植物生长调节剂对大白菜小孢子胚诱导的影响不同(表 1)。本试验在前

人报道的最佳激素浓度的基础上,共设 5 个处理,每处理重复 3 次,每个重复 3 皿。结果表明对于易出胚的材料添加 0.2 mg · L⁻¹ BA 可以极显著提高 05S50 和 08S274 小孢子胚的诱导率,但是随着 6-BA 浓度的增大到 0.3 mg · L⁻¹ 时反而对胚诱导有抑制作用。不加激素的培养基的小孢子胚

表 1 不同培养基对大白菜小孢子胚产量的影响

培养基 Medium	每花蕾胚数 Embryos per bud		
	05S50	08S274	秦白 3 号 Qinbai No. 3
NLN-13+0.2 mg · L ⁻¹ BA	17.58	13.375	0
NLN-13	10.33	1.625	0
NLN-13+0.05 mg · L ⁻¹ IBA	0.5	0	0
NLN-13+0.3 mg · L ⁻¹ BA	0.25	0.125	0
NLN-13+0.05 mg · L ⁻¹ BA+ 0.50 mg · L ⁻¹ NAA	0	0	0

表 2 不同基因型大白菜对小孢子胚产量的影响

Table 2 Effect of different genotypes on the yield of microspore embryos in heading Chinese cabbage			
基因型 Gene type	每皿培养花蕾数 No. of buds per dish	平均每皿产胚数 No. of embryos per dish	平均每花蕾产胚数 No. of embryos per bud
羞月 Xiuyue	4	261.6	65.4
05BRF1-44	4	67.33	16.83
08S274	4	44.57	11.14
05S50	4	30.38	7.59
08S245	4	29.83	7.45
秋早 50 Qinzao 50	4	5.3	1.33
秋早 60 Qiuzao 60	4	4.5	1.13
06Z44	4	3	0.75
06J31	4	2	0.5
08S555	4	1.67	0.42
08S412	4	1	0.25
08S289	4	1	0.25
08S242	4	0	0
08S254	4	0	0
秦白 3 号 Qinbai No. 3	4	0	0

2.2.2 基因型对小孢子成胚的影响 基因型对大白菜游离小孢子胚状体的发生有很大的影响。由表 2 可以看出,在基于上述最佳激素浓度的基础上,供试的 15 个基因型中有 12 个获得了小孢子胚,占培养材料的 80%。不同基因型间小孢子形成胚的数量有很大差别(图 1-F),产胚量最高的是羞月,平均每花蕾产胚 65.4 个,最少的是

诱导次之,而添加 0.3 mg · L⁻¹ BA 和 0.05 mg · L⁻¹ 6-BA+ 0.50 mg · L⁻¹ NAA 的诱导效果最差,基本不出胚,添加 0.05 mg · L⁻¹ 的 IBA 诱导出的胚少且都是畸形胚。而对于难出胚的材料(如秦白 3 号)添加 6-BA 或其他激素没有任何效果。

08S555、08S412、08S289 和 06J31,平均每个花蕾产胚均在 0.55 个以下,二者相差 117 倍。而 08S242、08S254 和秦白 3 号均未诱导出胚。这与以往曹鸣庆^[3]、栗根义等^[1]研究的结果相似。试验还发现有的材料如 08S254 和 08S242,虽然有少数细胞发生分裂,但未能继续分裂成胚。可见,筛选出易出胚的基因型试材是游离小孢子培养成功的关键。

2.3 小孢子植株再生

2.3.1 胚状体在培养基中滞留时间对小孢子成苗率的影响 取培养 15、21、25、30、40 d 的子叶形胚,分别接种于再生培养基(B₅ 附加 3% 蔗糖,1.2% 琼脂,pH 5.8),3 周后统计成苗率。结果表明,成熟小孢子胚在 NLN 液体培养基中滞留时间的长短对后面胚分化影响很大。胚状体在培养基中停留时间过长时,转入分化培养基上只有少部分成苗,多数可能因培养基中营养不足、子叶胚所处的环境湿度过高、或有的胚因褐化死亡产生某种有害物质等原因,造成子叶胚提前衰老或褐化死亡,从而降低了再生植株能力。在液体培养基中培养 21 d 的胚在 B₅ 琼脂培养基上发育最好,3 周后 75% 的胚发育成幼苗。培养 30 d 的子叶胚成苗率仅有 1.5%,而在液体培养基中培养 40 d 的胚转到 B₅ 培养基上不能成苗。这一结果表明,及时将成熟的子叶形胚转移至再生培养基上,对提高植株获得率至关重要,这与刘凡^[10-11]报道相一致。

2.3.2 植物生长调节剂对小孢子胚芽分化的影响 将所有出胚的小孢子胚接种于附加不同浓度

6-BA、NAA 和 GA₃ 的 B₅ 培养基上(含蔗糖 3%，琼脂 12%)。结果表明(表 3)，单独添加 GA₃ 有一定的芽诱导作用，但出芽率较低。在 NAA 浓度相同的条件下，随着 6-BA 浓度的增大，胚状体的出芽率快速增大，而高浓度的 6-BA 反而会抑制出芽，其中在添加 0.2 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.02 mg · L⁻¹ NAA 的 B₅ 培养基上胚状体分化速度快且出芽率高，而且分化率达到 75%；在添加 0.2 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.01 mg · L⁻¹ NAA 的 B₅ 培养基上分化速度相对添加 0.2 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.02 mg · L⁻¹ NAA 的要慢，出芽率也相对低；在添加 0.3 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.02 mg · L⁻¹ NAA 的 B₅ 培养基中胚芽的分化速度最慢，分化率只有 4.03%。因此，B₅ 培养基上附加 0.2 mg · L⁻¹ 6-BA 和 0.02 mg · L⁻¹ NAA 是大白菜小孢子胚芽分化的适宜培养基。

表 3 培养基中不同激素对比对小孢子胚芽分化的影响

Table 3 Effect of different hormone combinations in medium on microspore plumule differentiation			
NAA /(mg · L ⁻¹)	6-BA /(mg · L ⁻¹)	GA ₃ /(mg · L ⁻¹)	出芽率/% Budding rate
0	0	0.05	11.5
0	0	0.1	35.4
0	0	0.2	28.3
0.01	0.1	0	23.1
0.01	0.2	0	49.5
0.01	0.3	0	8.3
0.02	0.1	0	20.3
0.02	0.2	0	75
0.02	0.3	0	4.03

2.3.3 大白菜小孢子植株生根和移栽 将长出 3~5 片真叶的再生植株转接到 1/2 MS+0.1 mg · L⁻¹ NAA 的培养基上生根，15 d 后统计，其生根率为 100%(图 1-I)。将生长健壮的植株移入装有基质的营养钵中，移栽时洗净根上的培养基，栽后喷水并用塑料膜或塑料杯子覆盖，保持其湿度。10~15 d 可成活(图 1-J)，在温度稍低的秋季 10 月上旬移栽，成活率可达 90%以上。

3 讨论

3.1 不同基因型小孢子胚发育速度及形态学变化

不同基因型的小孢子其发育速度不同，易出胚材料的小孢子比难出胚的发育快且同步性好、整齐健壮，如 05S50(图 1-F)。而难出胚的材料小

孢子经热激培养后小孢子无明显变化。有的材料如 08S254 和 08S242 的小孢子经热激培养 24 h 后大部分都膨大，虽与易出胚材料无明显差别，但继续培养后不继续分裂并逐步失活而不能形成小孢子胚。这说明其小孢子具有启动倾向，由于某种原因致使其不能继续发育成胚状体，其原因有待进一步研究。

本研究发现易出胚材料一般在培养 1~3 d 小孢子开始第 1 次细胞分裂，7~10 d 可形成大量肉眼可见的球形胚，15 d 左右可形成心形、鱼雷及子叶形胚，而栗根义等^[1]报道鱼雷及子叶形胚出现较晚(40 d 形成鱼雷及子叶形胚)，这可能与材料有关。本试验还发现胚状体的发育并不同步，通常是原胚、球形胚、心形胚、鱼雷形胚及子叶形胚并存(图 1-E)，同时还有许多畸形胚出现。

3.2 激素成分对小孢子胚诱导的效果

在培养基中，激素的成分对诱发细胞生长与分裂起重要作用。外源激素主要分为两大类，一是细胞分裂素类，二是生长素类。在大白菜游离小孢子培养中，外源激素对胚形成的影响至今没有取得一致的结果^[9,12]。本试验结果表明，添加 0.2 mg · L⁻¹ 6-BA 可以提高胚的诱导率，但是它对难出胚的材料仍没有效果，而高浓度的 6-BA 反而对易出胚的材料抑制其出胚，这与徐艳辉^[5]报道相一致。有些易出胚的材料不加任何激素也能出胚(如 05S50)，添加 0.05 mg · L⁻¹ IBA 或 0.3mg · L⁻¹ 6-BA 时反而出胚少或不出，而且添加 IBA 时出胚全部都是畸形胚，培养基中添加 0.5 mg · L⁻¹ NAA + 0.05 mg · L⁻¹ BA 时不出胚，这与李岩等^[12]报道的不一致。可见，外源激素不一定是胚胎发生的必要因素，添加适当的激素可以提高易出胚的胚产量，尚没有找到能使难出胚的材料出胚的激素配比。

3.3 植物生长调节剂对小孢子胚芽分化的影响

在 B₅ 培养基上培养小孢子胚，丛生芽的产生主要受植物生长调节剂剂配比的影响。各处理丛生芽诱导率有很大差异。在 B₅ 培养基上附加 0.2 mg · L⁻¹ 6-BA 和 0.02 mg · L⁻¹ NAA 的胚分化速度最快，而且分化率达到 75%，这与蒋武生等^[6]的报道相一致。附加 0.1 mg · L⁻¹ GA₃ 的分化速度虽然慢，刚接种到培养基的子叶胚只膨大不分化，但是分化出的均为健壮且整齐的绿色苗，这与张亚丽等^[13]报道不相一致。结果表明，随着 6-BA 增加到 0.2 mg · L⁻¹，胚芽分化率随

其提高而提高,而增加到 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,分化率反而降低。随着 NAA 浓度的增加其分化率越低。说明 NAA 和 6-BA 的浓度超过一定量均对胚的分化率有一定的抑制作用。本试验还发现 08S555 材料的小孢子经胚性愈伤化,从愈伤组织上分化出不定芽(图 1-G,H),由 5 个胚成苗 142 株,其分化率远远超过了一般品种。可见,此品种具有极强的分化再生能力和较高的分化率。

参考文献:

[1] 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.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 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,1999,26(4):232-237.

[5] 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.

[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] 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.

[8] 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.

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

[10] 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.

[11] 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.

[12] 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.

[13] 张亚丽,张鲁刚,张华敏,等. 早熟大白菜游离小孢子胚诱导及植株再生的研究[J]. 甘肃农业大学学报,2009,6(3):45-49.

(上转第 56 页)

参考文献:

[1] Shook G E. Major advances in determining appropriate selection goals [J]. J Dairy Sci, 2006, 89(4):1349-1361.

[2] 周占琴,武和平,陈小强,等. 布尔山羊的性格行为[J]. 西北农业学报,2008,17(4):10-13.

[3] Barth A D, Brito L F, Kastelic J P. The effect of nutrition on sexual development of bulls [J]. Theriogenology, 2008, 70(3):485-494.

[4] Brito L F, Barth A D, Rawlings N C, et al. Effect of nutrition during calthood and peripubertal period on serum metabolic hormones, gonadotropins and testosterone concentrations, and on sexual development in bulls [J]. Domest Anim Endocrinol, 2007, 33(1):1-18.

[5] Bailey T L, Hudson R S, Powe T A, et al. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo [J]. Theriogenology, 1998, 49:581-594.

[6] Brown B W. A review of nutritional influences on reproduc-

tion in boars, bulls and rams [J]. Reprod Nutr Dev, 1994, 34(2):89-114.

[7] Chandolia R K, Honaramooz A, Bartlewski P M, et al. Effects of treatment with LH releasing hormone before the early increase in LH secretion on endocrine and reproductive development in bull calves[J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1997, 111:41-50.

[8] 张军民. 建立规范的全国公牛后裔测定系统[J]. 中国奶牛, 2008(8):28-30.

[9] Chacón J, Pérez E, Müller E, et al. Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica[J]. Theriogenology, 1999, 52(2):221-231.

[10] Kealey C G, MacNeil M D, Tess M W, et al. Genetic parameter estimates for scrotal circumference and semen characteristics of Line 1 Hereford bulls [J]. J Anim Sci, 2006, 84:283-290.

[11] Brito L F. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil [J]. Theriogenology, 2002, 58(6):1175-1186.