

甘蓝小孢子培养中花蕾长度与细胞单核期的关系

张恩慧¹, 马英夏¹, 杨安平², 许忠民¹, 程永安¹, 马勇斌¹

(1. 西北农林科技大学 园艺学院, 农业部西北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室,

陕西杨凌 712100; 2. 杨凌职业技术学院 生物工程系, 陕西杨凌 712100)

摘 要: 以甘蓝杂种一代品种抽薹植株初花期的花蕾为供体材料, 通过镜检观察得出, 在甘蓝植株 1 次分枝花序上花蕾肉眼可见间隔为 5 d 时, 花粉小孢子形状呈现在不明显的三裂形与正圆形间, 细胞发育正处在单核靠边时期; 花蕾生长的长度为 4.50~5.49 mm, 花粉细胞发育所处的单核靠边期的小孢子平均所占比例为 76%。采用 NLN-14 培养基对不同发育时期的小孢子诱导培养, 可见所选花蕾的小孢子多数发育处在单核靠边期, 小孢子离体培养容易诱导出胚状体。

关键词: 甘蓝; 花蕾; 小孢子; 发育; 胚状体

中图分类号: S635.1

文献标志码: A

文章编号: 1004-1389(2012)06-0124-05

Relationship between the Length of Buds and Uninucleate Stage of Isolated Microspore Culture in Cabbage

ZHANG Enhui¹, MA Yingxia¹, YANG Anping², XU Zhongmin¹,
CHENG Yongan¹ and MA Yongbin¹

(1. College of Horticulture, Northwest A&F University, Key Laboratory of Horticultural Plant Biology and Germplasm Innovation in Northwest China, Ministry of Agriculture, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. Department of Biotechnology, Yangling Vocation& Technical College, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: The buds of F₁ cabbage were selected as the research materials in this study, microspores were observed under inverted microscope. The buds from the first branch of cabbage to be examined by the unaided eye, the results showed that microspore from three splits form to perfect circular form after five days, the development of microspore was at late uninucleate stage, the length of buds was in the range of 4.50 to 5.49 mm, the rate of microspore at late uninucleate stage was 76%. Different development stage microspore were cultured by NLN-14, it was easy to induce embryoids when the majority microspore development stage was late uninucleate stage.

Key words: Cabbage; Bud; Microspore; Development; Embryoid

植物界游离小孢子培养是直接从花蕾获取游离态的小孢子群体进行培养诱导其胚胎发生形成单倍体 (Haploid), 进而加倍形成双单倍体 (Double Haploid) 植株的过程, 这种双单倍体植株的自交后代则是 DH 系。植物单倍体育种中游离小孢子培养产生的 DH 植株基因纯合、性状稳定, 将其作为亲本材料可以直接应用于杂交品种

选配。自 Lichter 于 1982 年首次从油菜小孢子培养物中获得小孢子植株以来, 许多作物利用小孢子培养都获得小孢子植株或在品种选育中得到有效利用^[1]。国外欧美等国家在 80 年代已推出一批以 DH 株系作为亲本的杂交组合^[1,2]。国内在十字花科作物上研究小孢子培养技术从 20 世纪 90 年代才开始, 主要在油菜^[3,4]、白菜类^[5]、菜

收稿日期: 2011 11 10 修回日期: 2011 12 26

基金项目: 国家大宗蔬菜产业技术体系项目 (CARS 25); “十一·五”国家科技支撑计划资助项目 (2006BAD01A7-2-04); 陕西省 1311 重大科技专项 (ZDKG 125); 西安市农业科技攻关资助项目 (GG06090)。

第一作者: 张恩慧, 男, 教授, 硕士生导师, 从事甘蓝育种与生物技术研究。E-mail: ganlan606@126.com

花^[1]等作物上取得成功和培育成新品种。甘蓝类蔬菜同样为十字花科芸薹属作物,但其利用游离小孢子培养获得后代其难度较大,特别在结球甘蓝(简称甘蓝)中至今还未见 DH 系在杂种一代组合中的研究利用^[1,6]。国内外科学家虽然在甘蓝上已有小孢子培养研究报道,但因其出胚较其他作物困难,即多数基因型材料对普通培养无反应或出胚材料胚产量较低^[7],成为目前这项技术有效利用的最大障碍。甘蓝游离小孢子培养和植株再生因其影响因素居多,诱导培养促其多数基因型材料出胚或出胚材料提高出胚率,需要特定的培养技术,其中用于游离小孢子培养的花蕾选择标准是其首要的技术之一。十字花科作物的花粉小孢子发育分为四分体时期、单核时期、双核时期和三核时期,并非任何时期的小孢子都适于培养,单核时期又可细分为单核早期、单核中期和单核靠边期;不同阶段的花粉小孢子对外界刺激的敏感程度不同,因而小孢子诱导出胚结果不同^[8-9]。笔者通过对甘蓝游离小孢子培养研究认为,甘蓝以单核靠边期或双核早期的花粉培养诱导胚状体效果最佳,花蕾选取是关键;但仅靠显微镜观察选择花蕾,因花蕾大小范围较广,比较费时费工。因此,本试验对甘蓝花蕾长度与其小孢子发育时期对应关系进行研究,旨在为甘蓝小孢子培养选准花蕾提供形态标准及技术体系的建立提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试材为西北农林科技大学园艺学院甘蓝育种研究室提供的杂种一代秦甘 80、秦甘 70 和新引 11 共 3 个品种。

1.2 方法

1.2.1 花蕾供体植株培养 供体甘蓝 3 个杂种一代品种于 2010-08-05 露地育苗,当幼苗生长有 7 片真叶时定植在西北农林科技大学园艺学院农场试验田,正常栽培管理,冬前植株培土,半成株露地越冬,翌年 3 月植株开始抽薹时搭建纱网棚,培养植株抽薹现蕾,健壮生长。

1.2.2 花蕾花粉细胞发育形态观察 选用甘蓝杂种一代品种秦甘 70 为试材,在 4 月 18 日当抽薹植株 1 次分枝花序上生长出肉眼可见花蕾后标记花蕾,待现蕾 3 d 后于每天 10:00,摘取生长不同日龄的饱满花蕾。随即将花蕾置卡诺氏固定液[V(冰醋酸):V(纯酒精)]=1:3 固定 24 h,之后

转移到 $\varphi=70\%$ 酒精中,在 0~4 °C 冰箱中保存。在制片时,用镊子从固定的花蕾中取出花药置载玻片上,轻轻挤压,将花粉小孢子涂于载玻片上,去除杂质,盖上盖玻片,烤片、压片,在显微镜下观察细胞形态和花粉小孢子处于不同发育时期所占比例。

1.2.3 花蕾长度对应的小孢子发育单核靠边期观察 春季栽培 3 个供试甘蓝品种成株,在其抽薹植株 1 次分枝花序上选取不同长度的花蕾,用坐标纸的长度刻度将花蕾分为 1.5~2.99 mm、3.0~4.49 mm、4.5~5.49 mm 和 5.5~6.49 mm 共 4 个区组。卡诺氏固定,步骤同上。在倒置显微镜下观察不同花蕾长度区域内花粉小孢子发育时期,确定小孢子单核靠边期的花蕾长度。

1.2.4 游离小孢子诱导培养胚胎发生的细胞学观察 选取 4 个长度区段花蕾各 20 个用 $\varphi=70\%$ 酒精消毒 30 s,再用 1 g/L HgCl 消毒 10 min,无菌水洗 3 遍。将花蕾转入灭菌的试管中,加入少量 NLN-14 培养基,用玻璃棒研磨花蕾游离小孢子。将小孢子提取液通过 300 目双尼龙网过滤入 10 mL 离心管中,加入 NLN-14 培养基至 10 mL,Parafilm 膜封口。2 000 r/min 离心后将小孢子沉淀物均匀悬浮于 10 mL NLN-14 培养基中,移液枪移入 $d=6$ mm 培养皿中,每皿 2 mL,再添加 NLN-14 培养基 1 mL,培养皿静置在 33 °C 恒温箱中热激,黑暗培养 48 h,取出后将悬浮小孢子的培养皿静置在 25 °C 及黑暗条件下继续培养。培养期间,每天 10:00,将培养皿放置在倒置显微镜下,观察小孢子形态变化、细胞分裂及胚胎发生过程。

2 结果与分析

2.1 甘蓝花粉细胞发育形态与小孢子单核靠边期的关系

在显微镜下观察到,供试品种花蕾现蕾生长 3 d 时从花蕾中释放出来的花粉细胞大部分处于四分体时期,个别处于单核早期(图 1-A)。单核早期的细胞,细胞壁很薄,细胞核位于中央,细胞质中无液泡,呈小梅花状。现蕾生长 4 d 时,花粉细胞壁增厚成两层,即外壁和内壁,细胞体积增大,此时大多数小孢子发育到单核中期(图 1-B);现蕾生长 5 d 时,花粉细胞随着内容物的增多和液泡的形成变大,细胞核被挤到细胞边缘,靠近细胞壁,称单核靠边期,此时细胞略呈正圆形,三裂

形状不明显(图 1-C);现蕾生长 6 d 时,花粉细胞继续膨大,细胞正圆形,细胞核进行有丝分裂产生一个较小的生殖核和一个较大的营养核,细胞进入双核期(图 1-D);现蕾生长 7 d 时,花粉细胞继续增大,生殖核经过一次有丝分裂形成两个精核,这时一个小孢子细胞内含有 3 个核,称为三核期;现蕾生长 8 d 时,花粉细胞明显膨大变圆直至椭圆形,核也不明显,细胞进入成熟期,变为成熟花粉粒。由此得出,通过对花粉细胞发育各时期所特有的细胞形态的了解,可以获得在不染色的情况下,快速判断花蕾中花粉细胞所处的时期,小孢子形态表现正圆状、细胞核被挤到细胞边缘,即为单核靠边期的特征标志。

2.2 甘蓝花蕾长度与小孢子发育单核靠边期的关系

由表 1 可知,对供试甘蓝杂种一代 3 个品种的植株上生长的花蕾,按照不同长度划分后在倒置显微镜下观察,3 个品种在所划分的 4 个花蕾长度区组中小孢子发育所处时期基本表现出一致性。在花蕾长度为 1.5~2.99 mm 和 5.5~6.49 mm 时甘蓝小孢子所处的单核靠边期所占比例均小于 40%,在 1.5~2.99 mm 区组的小孢子大多处于单核早期和中期,而在 5.5~6.49 mm 区组的小孢子大部分为三核花粉和椭圆形的成熟花粉粒,在花蕾长度 3.0~4.49 mm 和 4.5

~5.49 mm 两区组范围内甘蓝小孢子所处的单核靠边期所占比例均大于 57%,其中在 4.5~5.49 mm 区组范围内,甘蓝小孢子所处的单核靠边期平均所占比例为 76%。杨安平^[2]的研究表明,油菜和大白菜等十字花科作物小孢子培养所选花蕾小孢子处于单核靠边期有利于胚状体的诱导形成。由此表明,在甘蓝进行小孢子培养时,所选花蕾长度为 4.5~5.49 mm 时取蕾进行游离小孢子培养比较适宜,易于诱导出胚状体,品种间虽有差异,但差异不明显。

2.3 甘蓝小孢子单核靠边期与诱导培养时胚胎发育关系

甘蓝花粉不同发育时期的小孢子在 NLN-14 培养基中,经 33 ℃ 高温热激培养 48 h 后,其发育所处双核期或三核期的小孢子中仅有极少数膨大(图 2-A),而发育所处单核靠边期的小孢子中部分膨大,直径增大至原来的 2~3 倍,膨大的小孢子中大部分呈圆球形,极少数呈卵圆形(图 2-B)。在 25 ℃ 下继续培养,双核期或三核期的膨大小孢子几乎停止膨大,单核期膨大小孢子中卵圆形的小孢子停止发育或继续膨大至细胞壁破裂,个别的能进行核的第一次不对称分裂;圆球形的小孢子也有近乎 80% 停止发育,约 20% 的 3~4 d 后可见小孢子开始第一次均等分裂(图 2-C)或不均等分裂(图 2-D),7~8 d 后可见多次分裂形成的

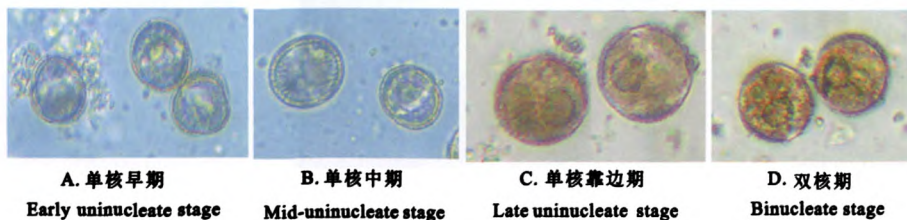


图 1 花粉细胞形态(倒置显微镜 400×)

Fig. 1 Comparison of pollen morphology (under 400× inverted microscope)

表 1 甘蓝供试品种不同长度区组花蕾小孢子发育所处单核靠边期比例

Table 1 The ratio of cabbage microspore at late uninucleate stage in different length range of buds %

材料 Material	单核靠边期比例 The ratio of microspore at late uninucleate stage			
	1.5~2.99 mm	3.0~4.49 mm	4.5~5.49 mm	5.5~6.49 mm
秦甘 70 Qingan 70	≤40	66.0	83.0	≤40
秦甘 80 Qingan 80	≤40	71.0	76.0	≤40
新引 11 Xinyin 11	≤40	57.0	69.0	≤40
平均数 Average	≤40	64.7	76.0	≤40

注:每区组选取 5 个花蕾测定花蕾长度,每蕾镜下观察小孢子发育时期随机选 5 个视野,统计小孢子单核靠边期所占比例,计算平均值。
Note: Microspore of five buds were observed under inverted microscope, the data represents an average of microspore at late uninuclear stage proportion of five microscopic field of vision.

多细胞团(图 2-E),25 d 可见到子叶型胚状体(图 2-F)。在小孢子培养中,胚胎发生的过程中存在发育同步性不一致的情况。因此,在同一皿的胚

胎群体中同时存在球型胚(图 2-G)、心型胚(图 2-H)和鱼雷型胚(图 2-I)等各个时期的胚状体。

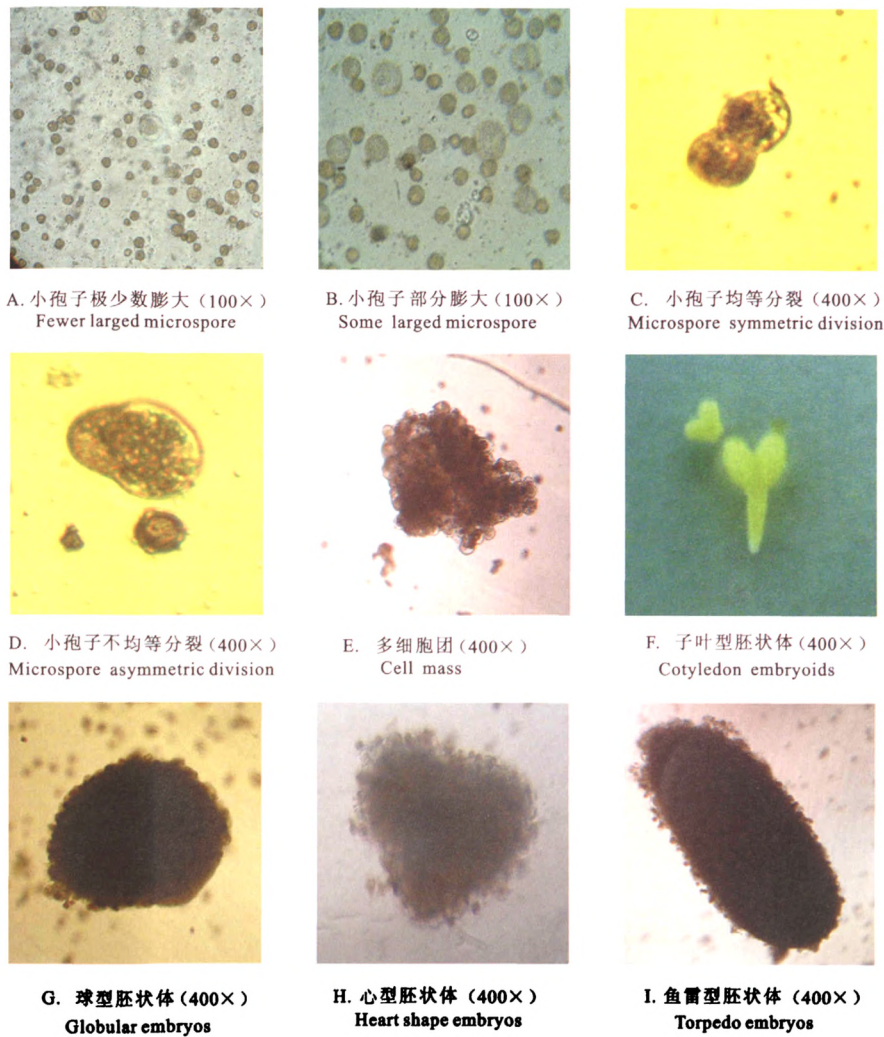


图 2 小孢子发育形态

Fig. 2 The development and morphology of microspore

3 讨论

3.1 甘蓝花蕾的大小不论以其生长天数或长度计算,两者是紧密联系的;它们都与小孢子发育阶段密切相关,可据此作为小孢子群体是否适于诱导培养的指标。本试验认为,甘蓝根据花蕾长度取材是一种快捷、准确的用于游离小孢子培养选择花蕾方法,选用已充分通过春化阶段的植株在外界自然条件下栽培、抽薹开花,以肉眼可见花蕾

后生长 5 d 的花蕾或以所选长度为 4.5 ~ 5.49 mm 的饱满花蕾比较适宜小孢子培养,此时花蕾的小孢子多数处在单核靠边期,容易诱导出胚状体。

3.2 十字花科作物中油菜、大白菜等花蕾中的小孢子胚状体诱导率以单核靠边期到双核早期阶段最高,处于这一时期的花蕾长度为 2.5 ~ 3.5 mm;花粉小孢子群体中,大圆形细胞主要是双核早期小孢子,其比例处于 50% 左右,适于小

孢子培养^[9]。本试验观察,甘蓝花蕾长度为 4.5~5.49 mm 时,花粉小孢子所处的单核靠边期所占比例为 76%。由此说明,甘蓝在进行小孢子培养时,所取花蕾长度为 4.5~5.49 mm 时容易诱导出胚状体,此时小孢子细胞形态标志处于不明显的三裂形状与正圆形状间。

3.3 甘蓝小孢子在培养基中经高温热激培养是获得胚状体的一个关键因素,花粉生长发育所处的阶段不同,可能对高温反应不同。顾宏辉等^[1]研究表明,在油菜花蕾小孢子生长发育过程中内源激素水平在不断改变,由于花粉的成熟使激素出现不平衡,或为小孢子发育所必需的其他一些成分已经耗尽,从而不易促进游离小孢子的膨大。本试验结果得出,甘蓝单核期的小孢子高温培养后部分小孢子膨大,直径增大至原来的 2~3 倍,而双核期或三核期几乎没有小孢子膨大;这可能是甘蓝小孢子双核期或三核期比单核期比较成熟,内部激素不平衡对高温反应不敏感,易导致小孢子停止生长发育,而单核期的小孢子内部激素平衡对高温反应比较敏感,有利促进生长发育,在 25℃ 下培养易分裂形成多细胞团和胚状体。

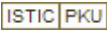
参考文献:

- [1] 顾宏辉,周伟军,胡林军.小孢子培养技术在芸薹属作物种上的应用研究进展[J].农业生物技术学报,2004,12(2):219-223.
 - [2] 杨安平,张恩慧,王莎莎,等.甘蓝类蔬菜小孢子培养研究进展[J].中国农学通报,2008,24(7):332-335.
 - [3] 吴江生,石淑稳,周永明,等.甘蓝型双低油菜品种华双3号的选育和研究[J].华中农业大学学报,1999,18(1):1-4.
 - [4] 王贵春,刘智,杨光圣.利用小孢子培养技术创建高含油量甘蓝型油菜[J].中国油料作物学报,2007,29(4):382-386.
 - [5] 原玉香,张晓伟,耿建峰,等.利用游离小孢子培养技术育成早熟大白菜新品种'豫新60'[J].园艺学报,2004,31(5):704.
 - [6] 张德双,曹鸣庆,秦智伟,等.通过游离小孢子培养获得绿菜花再生植株[J].华北农学报,1997,12(3):102-106,136.
 - [7] 桑玉方,张恩慧.甘蓝游离小孢子培养中影响胚状体形成的主要因素[J].西北农业学报,2007,16(2):125-129.
 - [8] 陈军,陈正华.甘蓝型油菜游离小孢子培养的胚胎发生[J].遗传学报,1995,22(4):307-315.
 - [9] 王伟,杨随庄.高等植物小孢子胚发生的启动[J].生物技术通报,2011(1):14-20.
- (上接第 111 页)
- 叶草植株可在下茬蔬菜种植之前整体翻压到土壤中,增加土壤有机质来源,是一种可行的增加生物多样性的日光温室套作栽培方式。
- 参考文献:
- [1] 张雪艳,田永强,刘军,等.不同栽培制度下温室黄瓜土壤生物学特性的变化[J].应用生态学报,2009,20(4):829-835.
 - [2] 田永强,曹之富,张雪艳,等.不同农艺措施下温室土壤酶活性的动态变化及其相关性分析[J].植物营养与肥料学报,2009,15(4):857-864.
 - [3] Vos J, Vander Putten P E L. Field observation on nitrogen-catch crops. I. Potential and actual growth and nitrogen accumulation in relation to sowing date and crop species[J]. Plant and Soil, 1997, 195(2): 299-309.
 - [4] Gustafson A S, Fleischer, Joelsson A. Catchment-oriented cost effective policy for water protection[J]. Ecological Engineering, 2000, 14(4): 419-427.
 - [5] 杨冬艳,郭文忠.绿肥种植及翻压对日光温室土壤环境的影响[J].北方园艺,2009(5):146-149.
 - [6] 宋述尧.玉米秸秆还田对塑料大棚蔬菜连作土壤改良效果研究[J].农业工程学报,1997,13(1):135-139.
 - [7] 孙权.农业资源与环境质量分析方法[M].银川:宁夏人民出版社,2004.
 - [8] 关松荫.土壤酶及其研究法[M].北京:农业出版社,1987.
 - [9] 赵恩荣.无公害蔬菜产品质量监测技术规范手册[M].北京:中国农业大学出版社,2004.
 - [10] 李春霞,陈卓,王俊忠.不同耕作措施对土壤酶活性的影响[J].土壤通报,2007,38(3):601-603.
 - [11] John J, Breda B, Moornlan D L, et al. Identification of regional soil quality factors and indicators central and southern high plains[J]. Sol Sci Soc Amer, 2000, 64: 2115-2124.
 - [12] Li L, Yang S C, Li X L. Interspecific complementary and competitive interactions between intercropped maize and faba bean[J]. Plant and Soil, 1999, 212: 105-114.
 - [13] 李东坡,武志杰,梁成华.设施土壤生态环境特点与调控[J].生态学杂志,2004,23(5):192-197.
 - [14] 李廷轩,张锡洲,王昌全.保护地次生盐渍化研究进展[J].西南农业学报,2001,14(增刊):103-107.
 - [15] 孙颖,赵晓会,和文祥.绿肥对土壤酶活性的影响[J].西北农业学报,2011,20(3):115-119.
 - [16] Tilman D, Knop S J, Wedin D, et al. The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes[J]. Science, 1997, 227: 1300-1302.

甘蓝小孢子培养中花蕾长度与细胞单核期的关系

作者：[张恩慧](#)，[马英夏](#)，[杨安平](#)，[许忠民](#)，[程永安](#)，[马勇斌](#)，[ZHANG Enhui](#)，[MA Yingxia](#)，[YANG Anping](#)，[XU Zhongmin](#)，[CHENG Yongan](#)，[MA Yongbin](#)

作者单位：[张恩慧, 许忠民, 程永安, 马勇斌, ZHANG Enhui, XU Zhongmin, CHENG Yongan, MA Yongbin\(西北农林科技大学园艺学院, 农业部西北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 陕西杨凌 712100\)](#)，[马英夏, 杨安平, MA Yingxia, YANG Anping\(杨凌职业技术学院生物工程系, 陕西杨凌, 712100\)](#)

刊名：[西北农业学报](#) 

英文刊名：[Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica](#)

年，卷(期)：2012, 21(6)

参考文献(9条)

1. [顾宏辉;周伟军;胡林军](#) [小孢子培养技术在芸薹属作物育种上的应用研究进展](#) 2004(02)
2. [杨安平;张恩慧;王莎莎](#) [甘蓝类蔬菜小孢子培养研究进展\[期刊论文\]-中国农学通报](#) 2008(07)
3. [吴江生;石淑稳;周永明](#) [甘蓝型双低油菜品种华双3号的选育和研究\[期刊论文\]-华中农业大学学报](#) 1999(01)
4. [王贯春;刘智;杨光圣](#) [利用小孢子培养技术创建高含油量甘蓝型油菜\[期刊论文\]-中国油料作物学报](#) 2007(04)
5. [原玉香;张晓伟;耿建峰](#) [利用游离小孢子培养技术育成早熟大白菜新品种'豫新60'](#) 2004(05)
6. [张德双;曹鸣庆;秦智伟](#) [通过游离小孢子培养获得绿菜花再生植株](#) 1997(03)
7. [桑玉方;张恩慧](#) [甘蓝游离小孢子培养中影响胚状体形成的主要因素\[期刊论文\]-西北农业学报](#) 2007(02)
8. [陈 军;陈正华](#) [甘蓝型油菜游离小孢子培养的胚胎发生\[期刊论文\]-遗传学报](#) 1995(04)
9. [王炜;杨随庄](#) [高等植物小孢子胚发生的启动\[期刊论文\]-生物技术通报](#) 2011(01)

引用本文格式：[张恩慧](#). [马英夏](#). [杨安平](#). [许忠民](#). [程永安](#). [马勇斌](#). [ZHANG Enhui](#). [MA Yingxia](#). [YANG Anping](#). [XU Zhongmin](#). [CHENG Yongan](#). [MA Yongbin](#) [甘蓝小孢子培养中花蕾长度与细胞单核期的关系\[期刊论文\]-西北农业学报](#) 2012(6)