

- 35 谢建坤,庄杰云,樊叶杨,等.水稻矮败型细胞质雄性不育恢复基因的定位[J].中国水稻科学,2001,15(3):151~154.
- 36 张群宇,刘耀光,张桂权,等.野败型水稻细胞质雄性不育恢复基因 Rf-4 的分子标记定位[J].遗传学报,2002,29(11):1001~1004.
- 37 Iwabuchi M. Processing following by complete editing of an altered mitochondrial atp6 RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice[J]. EMBO J, 1983, 12(4): 1437.
- 38 易平,汪莉,孙清萍,等.红莲型细胞质雄性不育线粒体相关嵌合基因的发现[J].科学通报,2002,47(2):130~133.
- 39 沈志伟,孙崇荣,曹凯鸣,等.水稻叶绿体 DNA 克隆片段的分析和 rbcI 基因在重组质粒上的定位[J].遗传学报,1989,16(6):430~435.
- 40 孙崇荣,衫浦昌弘.水稻叶绿体 DNA 中原核 infA 基因同源结构的分析[J].生物化学与生物物理学报,1990,22(4):345~348.
- 41 李大东,王斌.水稻线粒体 atpA 基因的克隆及其与细胞质雄性不育的关系[J].遗传,1990,12(4):1~4.
- 42 王斌,张学文.与 BT 型细胞质雄性不育水稻相关联的双链 RNA[J].遗传学报,1990,17(4):289~293.
- 43 Ajaki H. A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial atp 6 may cause sterility[J]. Curr Genet, 1994(5):52.
- 44 钱晓茵,高燕萍,杨金水.野败型水稻核质互作与基因差异表达[J].复旦学报,1998,37(2):163~167.
- 45 李小明,郑用琏,张方东.红莲型细胞质雄性不育水稻线粒体 DNA 的 RFLP 分析[J].遗传,2000,22(4):201~204.
- 46 姚方印,李广贤,朱常香,等. BT 型细胞质雄性不育水稻及其三系的线粒体 DNA 研究[J].西北植物学报,2001,21(5):839~843.

## 影响油菜游离小孢子培养再生因素的研究进展

黄先群<sup>1</sup> 蒋敏华<sup>1,2</sup> 毛堂芬<sup>3</sup> 李丽<sup>1</sup> 董颖苹<sup>3</sup> 徐涵<sup>4</sup>

(1. 贵州省农业生物技术重点实验室 贵阳 550006;

2. 南京农业大学生命科学学院生化与分子生物学 江苏南京 210000;

3. 贵州省农科院生物技术研究所 贵阳 550006; 4. 法国图卢兹综合科学研究所 RIT-ARD)

**摘要:** 游离小孢子培养已经成为油菜遗传育种和生物工程的重要内容。由于影响游离小孢子形态发生的因素较多,尤其是生长在大田环境下的植株,小孢子发育不一致,游离小孢子形态发生频率低,因此形态发生诱导率低仍然是限制该技术广泛应用的一个问题。为此,深入和全面了解影响小孢子形态发生能力及再生体系的各种因素,掌握这一领域的研究动态和今后发展的方向,有助于优化油菜小孢子的再生体系、促进油菜育种。本文总结了油菜游离小孢子形态发生的研究进展,并认为应用分子技术克服小孢子离体形态发生障碍有极大的发展潜力。

**关键词:** 油菜 游离小孢子 离体培养 单倍体

游离小孢子培养是指在人工条件下离体诱导小孢子产生胚胎(或先产生愈伤组织后再诱导产生胚胎),再由诱导出的胚胎培养成再生植株的技术。小孢子培

养是单倍体育种的重要手段之一。单倍体是指含有配子染色体数的植物体,即指植物细胞核内染色体组经一次或几次减数分裂直到不能再进行自然减数分裂的最基本染色体数的量级。自然界高等植物单倍体出现的频率很低,比如,棉花 0.00033%~0.0025%,小麦 0.48%,玉米为 0.005%,油菜 0.3%。我国已在小麦、水稻、玉米、烟草、甘蔗、甜菜、油菜等 40 多种植物中获得了花粉单倍体植株,其中小麦、玉米、甘蔗、甜菜、橡胶、柑桔等 19 种作物由我国首先培育成功<sup>[1]</sup>。

小孢子通过离体培养和染色体加倍获得纯合二倍体,成为遗传稳定的品系。在育种上,可缩短育种周期,增加重组基因型的选择几率,这是因为数量性状应用于选择的加性遗传变异所占比重较大,也没有主效基因的显性效应,使得组合内的基因型易于区别,世代间的选择效应更大;在物种进化研究上,可研究各染色体组之间的同源或部分同源的关系,从而对物种之间的亲缘关系和物种进化作研究;在遗传分析上,单倍体是研究基因性质及其作用的良好材料,利用畸变类型可确定连锁群及基因量的效应等遗传学研究;在基因

收稿日期:2006-07-27。

基金项目:贵州省国际科技合作重点项目[黔科合外 G 字(2005)400107 号];贵州省农业动植物育种专项项目[黔农育专字(2006)027 号];教育部春晖计划(2006 年)基金资助。

作者简介:黄先群(1958~)女,研究员,博士;主要从事农作物生物技术研究。

定位方面, 双单二倍体群体 (DH 群体) 的等位基因都是固定的, 可以用于新标记的作图并重复进行检验, 特别适合于抗性数量性状的分析, 是一个永久性的群体。因此, 把单倍体及加倍单倍体应用于分子生物学和基因工程, 特别是应用于 QTL 测定和构建作物分子遗传图谱、筛选和克隆植物基因等, 以最终获得其知识产权, 将是本世纪各国研究和开发的竞争重点和热点。

自 1982 年 Lichter<sup>[2]</sup>首次培养成功甘蓝型油菜小孢子以来, 小孢子培养技术在油菜上的应用日益成熟。在品质育种方面, 利用小孢子离体培养早期筛选低 (高) 芥酸、低硫甙葡萄糖苷的基因型, 再通过单倍体加倍技术和结合传统育种手段可获得低 (高) 芥酸、低硫甙葡萄糖苷的品种<sup>[3]</sup>; 在品种选育方面, 华中农业大学和中国农科院油料所利用小孢子培养技术选育出“华双 3 号”<sup>[4]</sup>和“中双 9 号”<sup>[5]</sup>品种等; 在诱变育种和突变体筛选方面, 其研究和应用越来越广泛<sup>[6~12]</sup>, 如利用小孢子培养阶段将草酸作为抗性诱变剂进行抗菌核病材料的筛选<sup>[8,9]</sup>等。同时, 油菜小孢子培养还用于基因转化<sup>[13,14]</sup>, DH 群体来构建遗传图谱、基因定位等。因此, 单倍体育种有着广阔的应用前景。

游离小孢子培养已经成为油菜遗传育种和生物工程的重要内容。在国内, 也已建立了一些有效的技术体系。但是, 由于影响该技术的因素较多, 尤其是生长在大田环境下的植株, 小孢子发育不一致, 胚产生频率不稳定或难以得到胚状体, 因此胚状体诱导率低仍然是限制该技术广泛应用的一个问题。因此, 了解影响小孢子胚胎发生能力及再生体系的各种因素, 以及这一领域的研究进展, 有助于采取有效措施优化油菜小孢子的再生体系, 将这一技术更为广泛地应用于育种和基础研究。油菜游离小孢子再生体系包括基因型、取样时间、低温预处理、消毒、分离小孢子、高温处理 (热激)、小孢子染色体加倍、诱变处理、静置培养、震荡培养、生根培养等几个方面, 下面就这些影响因子逐一论述, 以期对开展这方面研究的同行提供参考。

## 1 基因型

供试材料基因型是影响小孢子胚状体产量的最主要因素。这一结果在甘蓝型油菜<sup>[15~26]</sup>、芥菜型油菜<sup>[27]</sup>和白菜型油菜<sup>[28~30]</sup>上均有报道。不同品种间甚至同一品种内的个体间, 诱导频率差异显著<sup>[16~17,31~33]</sup>。春性材料的产胚量高于冬性材料<sup>[21]</sup>。

周永明和 Scarth<sup>[22]</sup>在供试的 8 个甘芥种间杂种材料中有 4 个对培养有反应; 刘泽等<sup>[34]</sup>报道, 基因型间小孢子胚一次性成苗率的变幅为 11.5% ~ 61.5%; 饶

勇等<sup>[17]</sup>对 9 个甘蓝型杂交油菜组合的  $F_1$  代进行离体小孢子培养, 结果小孢子胚状体产生的变幅在 0 ~ 30 个/花药之间; 王汉中等<sup>[25]</sup>通过对 42 份甘蓝型油菜的研究表明, 不同基因型材料的小孢子产胚率存在明显差异, 平均每蕾产胚变幅为 0 ~ 11.67 个; 张国庆等<sup>[35]</sup>研究甘蓝型油菜小孢子基因型影响植株的再生, 不同材料间百分率为 9.5% ~ 37.5%。朱家成等<sup>[20]</sup>对 78 个甘蓝型油菜材料进行了离体小孢子培养, 其中仅 5 个材料获得了再生植株。因此, 小孢子成胚明显受基因型的影响。此外, 在芸薹属的几种植物中利用分子标记技术, 已证实了基因位点控制了胚产量和再生能力<sup>[36,37]</sup>, Cloutier 等<sup>[38]</sup>也在甘蓝型油菜品种中鉴定出与小孢子培养反应有关的 RFLP 区段等。

有研究表明, 油菜离体小孢子胚胎发生能力具有较高的遗传力 (80% 以上), 小孢子培养的胚胎发生能力是可以遗传的, 表明其胚产量主要由遗传因素决定<sup>[19,34,39]</sup>。李恂等报道<sup>[40]</sup>, 高胚产量的双亲,  $F_1$  杂种胚产量也高, 低胚产量的双亲,  $F_1$  杂种胚产量也低, 高胚产量与低胚产量的亲本杂交, 杂种的胚产量似乎受母本的影响较大。高胚产量的材料, 胚出现时间最早, 鱼雷状胚较多, 小孢子发育的同步性较好; 而其他材料出现胚的时间较晚, 鱼雷状胚较少, 多为心形胚、球状胚或一些畸形胚, 小孢子发育同步性差。周永明和 Scarth 的研究结果也表明<sup>[16]</sup>, 种间杂种小孢子胚的形成, 很大程度上取决于两个种亲本的胚胎发生能力。如所用的两对亲本具有较强的胚形成能力, 它们的杂种也具有相对较高的胚产量。一些材料的正反交间胚产量明显差异表明, 细胞质对杂种小孢子胚胎发生起作用; 但另外一些材料的正反交组合间却不显著; 而改变供体植株的种植条件, 正反交间的差异也随之缩小。张凤兰和高田义人认为<sup>[19]</sup>, 甘蓝型油菜小孢子胚发生能力由基因的加性和显性核效应控制, 以加性效应为主, 受具加性效应的 2 个基因位点控制。正反交的胚发生能力无显著差异, 小孢子胚发生能力不受细胞质因子的影响。因此, 细胞质对杂种小孢子胚胎发生的作用是与品种和栽培条件有关。

一般而言, 杂种  $F_1$  代小孢子产胚率具有明显的杂种优势, 或与具高胚发生能力的亲本相近, 或与双亲中亲值接近, 这可能与所用的材料遗传背景的差异有关<sup>[19,23,31,34]</sup>。可以通过将无胚或难成胚材料的品种与高胚发生能力的品种杂交的手段, 将控制高胚发生能力的遗传因子导入到无胚发生能力的基因型中, 通过遗传改良的方法扩大能诱导出小孢子胚胎发生的基因型范围<sup>[23,19]</sup>。

甘蓝型油菜为常异交作物,品种群体或由品种杂交形成的  $F_1$  有一定程度的异质性,因此,同一材料不同单株间胚状体发生能力亦有差异。因此,小孢子培养最好单株取材,特别对难成胚材料或对培养反应低的材料,通过在群体内多选株试验和单株培养,有可能从中筛选得到反应较好的植株<sup>[23,31]</sup>。

## 2 取样

### 2.1 供体植株生长环境

供体植株的来源有生长室(人工气候室)、温室和大田。来自生长室的供体植株,其初花期花蕾中处于单核期至双核期的小孢子占 95%,无三核期小孢子,小孢子成胚率高;而取自普通温室的供体植株,同一发育时期的花蕾中处于单核期至双核期的小孢子百分数只占 75%,三核期小孢子占 21%<sup>[41]</sup>;而取自大田供体材料污染率高、小孢子发育时期不统一且活力差,小孢子培养的脱分化启动及胚状体诱导均较困难<sup>[42,43]</sup>,因而能培养成功的基因型数量及其产胚频率明显降低。

花蕾中小孢子发育的一致性对胚状体的再生有很大影响,即单核晚期的小孢子多,胚状体再生频率高;反之小孢子发育一致性差的材料,胚状体再生频率低<sup>[44]</sup>。供体植株种植在生长室中比种在温室的植株花蕾小孢子同步化程度较高,有利于找到最佳时期接种,同时小孢子核质指数高,新陈代谢活跃,有利于孢子脱分化,促进胚胎发生<sup>[45]</sup>。

供体植株生长的温度条件是影响小孢子培养的重要因素,植株生长在较低的温度条件下(10 白天,5 黑夜周期)有利于胚状体的形成,能显著改善杂种小孢子胚产量和质量<sup>[15~16,25,42,45]</sup>。周永明和 Scarth 报道<sup>[16]</sup>,当供体植株种植在昼夜温度为 21/16 条件下,两个白菜型油菜亲本,一个具有相对较高的胚产量,而另一个在多次重复试验中均对培养无反应。但是,当把其种植在低温(昼夜温度 10/5)条件下时,两者间的差异明显缩小。分期播种对胚状体形成无明显不利影响,并能延长供花期<sup>[46]</sup>。

### 2.2 取样时期

在油菜游离小孢子培养中,小孢子的发育时期是影响小孢子培养的关键因素。研究表明,油菜小孢子培养的最佳时期是单核晚期(单核靠边期)和二核早期。在此之前进行培养,由于小孢子缺乏相应的机制而不能感受培养条件的诱导,因此不能启动胚胎发生途径;当小孢子发育到近成熟花粉时,由于雄配子体已过度分化,也不能诱导启动胚胎发生途径<sup>[47]</sup>;此外,发育过晚的小孢子会产生某种有毒物质抑制胚状体的产

生,所以发育过早或过晚取样的小孢子都不宜小孢子的胚胎发生<sup>[44~45,48]</sup>。

确定单核期小孢子发育的最适宜的取样时期有 4 种方法:

(1)镜检:确定小孢子发育时期的最直接、有效的方法是镜检。通过醋酸洋红压片或荧光染色观察,镜检小孢子发育时期,选取处于单核晚期至二核早期的小孢子进行培养。

(2)花蕾大小:花蕾大小反映小孢子发育进程,也是小孢子发育时期的外部形态标志。有研究认为,以蕾长 2.0~3.0 mm 较好<sup>[20,25,28,40,46]</sup>;另一些报道认为,2.5~3.5 mm<sup>[21,31,49]</sup>或 3~4 mm 的花蕾处于单核靠边期<sup>[7,32,50,51,52]</sup>,还有些报道则认为,大小为 3.8~4.5 cm 的花蕾中,单核晚期小孢子占 75%以上,小孢子发育一致性高,再生胚状体最多<sup>[45,50]</sup>。这些差异可能是由于所用材料的基因型不同而造成的,与植株的生长环境也有一定关系。

(3)开花时间:大部分研究报道,最适宜取样时间为主花序第 1 朵花开后 3~7 d,此时小孢子核质指数高,新陈代谢活跃,有利于孢子脱分化,最适合于培养且成胚率较高<sup>[15,40,42,44,46,49,50]</sup>。牛应泽等报道<sup>[49]</sup>,主花序第 1 朵花开后 6 天左右,70%的小孢子为单核晚期(胚数为 7/蕾),第 9 天取样 40%为单核晚期(胚数为 0.2/蕾),12 d 没有胚。祁永琼等<sup>[44]</sup>的研究也表明,最适取材时期是主花序第 1 朵花开后第 4 天,此时的花蕾产胚率最高,单核晚期的小孢子占 80%左右,小孢子发育同步高,有利于再生出胚状体,再生的胚状体数目最多,取材时期过早或晚得到的胚状体就很少。但也有报道认为<sup>[20,25]</sup>,取始花期前、后一周或第 1 朵花开后的 3~12 d 的花蕾培养效果最好,此时处于单核靠边期及双核早期的小孢子在小孢子群体中所占比例较大。以开花时间为标准的取样时间因品种、气候、栽培环境等因素而有所差异。

(4)花药颜色:李恂等<sup>[40]</sup>报道,当花药为黄色或黄带点绿时,小孢子发育时期为三核期;当花药为黄带绿时,大多数小孢子发育时期为二核期,少数为单核晚期;当花药为绿带黄和绿带点黄时为单核期;当花药为绿色时为单核早期。因此,在小孢子培养中,取花药颜色为绿带黄或绿带点黄最为适宜。这个结果与刘勇等<sup>[46]</sup>的报道是一致的。

除此之外,就取样部位而言,有的学者认为取主花序花蕾效果较好<sup>[20,42]</sup>,有的则认为主花序和上部一次分枝花序上的花蕾培养效果一致<sup>[25,28,53,54]</sup>。在进行品种间小孢子培养产胚率比较时,为了消除可能的单株

间差异,每个基因型每次取 3~5 株上的花蕾混合较好<sup>[34]</sup>;而为了筛选高胚率材料,单株取样效果较好。同一材料第一天取的蕾培养效果好,第二天取的蕾培养效果则不一定好,这可能与田间植株每天所遇到的自然气候不同有关,因此一个材料往往需要重复接种培养<sup>[47]</sup>。

### 3 低温处理

有些文献报道,接种前的低温预培养可显著提高胚状体诱导频率<sup>[35,44,46]</sup>,花蕾于 4~8 处理 6~12 h 效果较好<sup>[25,47]</sup>;或低温预处理以 4、1~2 d 对脱分化启动最为有利。时间过长,则小孢子活力降低,花蕾采集后马上进行培养,小孢子活力虽高,但脱分化频率却很低<sup>[20,42,49]</sup>。但也有另外的报道认为,花粉在花药中的低温预培养是多余的,对胚状体再生影响不大,不经低温预处理也可获得高的成胚率,反而低温预处理时间越长,胚状体产生有所下降<sup>[45,50,55,56]</sup>。这可能与供体植株的生长环境有关。如有些冬油菜在 1,2 月份开花取样,此时夜晚温度比较低,早上取的材料已经低温处理;还有的供体植株来源于生长温度较低(10/5,白天/黑夜)的人工气候室,对这些材料进行低温处理,效果不明显,反而处理时间过长,小孢子活力下降,导致胚状体产量下降<sup>[44]</sup>。

还有研究认为,低温预处理的效果与所采用的基因型不同而表现各异。如花蕾于 4~8 的冰箱中进行处理,有的基因型的小孢子能形成大量的胚,有的则形成少量胚,有的则细胞不分裂<sup>[44]</sup>。

此外,国内油菜小孢子培养的供体植株一般来自于大田自然环境,可供取样的有效时间很短,供体材料低温有效保存时限的长短对延长取样培养时间、有效缓解大田材料取材与培养之间的矛盾具有重要作用。

朱彦涛等<sup>[43]</sup>研究了供体材料低温预处理的方式、处理时间和花序长度对小孢子产胚率影响,结果表明,花序的冷冻处理,其小孢子无胚胎发生能力;1~3 cm 长的花序冷藏处理,一般适于 4 天内取蕾培养;10~20 cm 长的花序冷藏处理,一般适于 8 天内取蕾培养;30~40 cm 长的花序冷藏处理,一般适于 10 天内取蕾培养(时间长,要求 NLN 培养和散射光)。对花蕾冷藏处理,一般适于 1 天内取蕾培养,超过 1 天则花蕾发黄,小孢子的生活力迅速下降。其原因可能是,随着花序长度的增加,体内一些抑制胚胎发生的物质浓度降低,花序离体贮存对小孢子的不良影响程度就越小,维持小孢子生活力所需的正常营养物质的合成和供应也就越充分,因而适宜于培养的时间也就相应延长。

· 40 ·

朱彦涛等<sup>[43]</sup>的研究还表明,随着所处理花序长度的增加,培养材料的污染率也大大降低。花蕾冷藏若超过 1 天,则培养材料的污染率明显上升,经统计达 66.67%;在处理花序中,供试材料冷藏若超过 4 天,则污染率由 4 天内的 15.63% 增加到 43.75%,也呈上升趋势。处理花序的污染率明显低于处理花蕾,这可能是由于花蕾柄较短,细菌很容易从花蕾柄伤口处进入花蕾,致使表面消毒难以真正达到完全杀灭细菌的目的;而对于花序来说,细菌进入外植体的距离较长,其屏障作用相应增强,污染率则相应降低。

### 4 材料消毒和小孢子的分离

将花蕾(或花序)放入 10 cm 试管,用 70% 酒精消毒 0.5~1 min,再经次氯酸钠(含有效成分 5%~7%)或 0.1% 升汞消毒 10 min,无菌水冲洗 3~5 次(每次 3~5 min)。分离小孢子所用的溶液为 B<sub>5</sub> 无激素培养基(B<sub>5</sub> 大量元素、微量元素、铁盐、有机物, pH 5.8~6.0),为了保持一定的渗透压, B<sub>5</sub> 培养基的蔗糖浓度为 10%~13%<sup>[7,20,22,25,32,33,40,44,46]</sup>,也可用 1/2 浓度的 B<sub>5</sub> 培养基<sup>[16,33]</sup>。再将已灭菌的花蕾在上述 B<sub>5</sub> 洗液用玻璃棒轻轻将花粉挤出,经 300~400 目尼龙网膜过滤到离心管里,800~1 000 r/min 离心 1~5 min,去掉上清液;再加入 B<sub>5</sub> 培养液,于同样转速下离心 1~5 min,去掉上清液,重复 2~4 次<sup>[16,25,28,31,52,54,57]</sup>;最后倒出上清液,向离心管中加入 NLN-13 或 NLN-16 液体培养基(含 NLN 大量、微量、铁盐和有机成分、13% 或 16% 的蔗糖, pH 5.8~6.0)悬浮小孢子,并稀释到所需的密度,然后分装到培养皿(2~4 ml/皿, 60 mm)中或小三角瓶中培养。

小孢子培养密度直接影响小孢子的成胚数,浓度过高过低均会降低供试材料的成胚数。用血球计数板测定每毫升小孢子密度, NLN-13 或 NLN-16 液体培养基调节小孢子浓度为 0.75~1 × 10<sup>5</sup> 个小孢子/ml<sup>[40]</sup>,或为 (2~8) × 10<sup>4</sup> /ml<sup>[46,58]</sup>。小孢子密度也可以用每毫升培养基接种花蕾数来表示。官春云报道<sup>[41]</sup>,培养密度以 1 蕾/ml 效果最好,而小孢子密度在 0.75 蕾/ml 和 1.25 个蕾/ml 的处理,其小孢子的成胚率和鱼雷型胚的百分率均不及 1 蕾/ml 处理的一半。这个结果同余凤群和刘后利<sup>[23]</sup>、祁永琼等<sup>[44]</sup>、胡武强和朱彦涛<sup>[33]</sup>、李秀萍和杜德志<sup>[21]</sup>的报道是一致的。而有些文献报道,每毫升培养基接种 1.2~2 个花蕾的小孢子较适宜,超过 2 个花蕾其胚产量下降,甚至不能形成胚状体<sup>[20,25,31,47,49,59]</sup>,也有接种 0.4<sup>[17]</sup> 或 0.5 个花蕾/ml 的报道<sup>[58]</sup>。

## 5 小孢子的诱导培养

### 5.1 热激

诱导小孢子再生胚状体,起始培养温度是一个很重要的因素,当小孢子接种到培养基上,需要高温条件来启动分裂和改变小孢子的定向过程,从配子体发育方式变为孢子体发育方式。对大部分基因型来说,胚状体产生的频率在 32 ℃ 时最高;低温培养,胚的质量较好;而变温处理(32 ℃, 1~3 d,接着 25 ℃ 左右 2~3 周)效果最佳,可得到优质高产的胚状体<sup>[15, 16, 22, 25, 28, 42, 44, 46, 47, 49, 52, 58, 60~62, 59]</sup>。

周伟军等报道<sup>[54]</sup>,对油菜分离小孢子分别进行 32 ℃ 和 30 ℃ 热激暗培养 3 d 和 7 d 处理后转入常温下培养,其胚胎发生好、产胚率高,获得了大量正常胚体。Keller 和 Armstrong<sup>[56]</sup>将小孢子先经 35 ℃, 18~36 h 预培养,再在 25 ℃ 下连续培养时,得到的小孢子胚数最高。而 Iqbal 等<sup>[63]</sup>、Mollers 等<sup>[64]</sup>、李恂等<sup>[40]</sup>、张冬青等<sup>[32]</sup>和顾宏辉等<sup>[57]</sup>对油菜分离小孢子进行 30 ℃ 暗培养 5~14 d,也取得了较为理想的结果。宋来强等<sup>[31]</sup>、胡武强和朱彦涛<sup>[33]</sup>报道,起始培养 1~2 d 给予 33 ℃ 左右的高温处理有利于小孢子诱导,表明一定温度的热激处理均能获得良好胚状体。热激处理的小孢子培养反应有明显提高,而未经高温培养的处理基本上没有胚状体发生,表明高温热激是小孢子培养诱导胚状体成功的关键步骤<sup>[31]</sup>。高温可能使小孢子发育同步化,增加处于发育周期中诱导敏感阶段的小孢子数<sup>[65]</sup>。

田保明报道<sup>[65]</sup>,甘蓝型春油菜用 30 ℃ 预培养 14 d 最适宜;甘蓝型冬油菜用 35 ℃ 培养 1 d 后,接着用 30 ℃ 培养 6 d 的预处理,得到的胚数最高;白菜型油菜作材料时,35 ℃ 预处理 2 d 对激励胚的形成效果最好。可见,不同基因型与高温处理存在明显的相互作用关系,若用新的基因型需对高温处理和处理时间进行相应调整。

### 5.2 单倍体加倍

油菜离体培养单倍体的自然加倍现象普遍存在于离体小孢子细胞分裂、胚胎形成、植株营养生长和生殖生长时期<sup>[66]</sup>;但频率较低,约为小孢子再生植株群体的 10%~30%<sup>[67]</sup>。而一些基因型的油菜花粉胚状体再生的绿苗,尽管经过多次继代培养,染色体仍很难自然加倍<sup>[68]</sup>。

单倍体加倍通常用秋水仙碱来处理,秋水仙碱处理后的小孢子再生植株中双单倍体频率为 44%~93%<sup>[67]</sup>。秋水仙碱处理方式有整株、浸根、芽、小孢子

诱导的胚、分离的小孢子等。有研究报道,秋水仙碱处理整株,有 53% 的处理植株结实,但植株生长迟缓,结实率下降<sup>[58]</sup>;用秋水仙碱处理小孢子再生植株的根或芽所产生的二倍体植株多是可孕和不孕花共生的嵌合植株,自交后产生的单株种子很少,难以达到遗传和育种所需的群体量<sup>[68, 69]</sup>;用秋水仙碱处理小孢子诱导胚,植株加倍率为 32%;秋水仙碱直接处理刚分离的离体小孢子,可使 67%~92% 的染色体加倍率,同时还刺激了培养小孢子的胚胎发生,能获得大量发育正常的油菜胚体,从而提高植株再生率<sup>[57, 58, 61, 62, 67, 70~72]</sup>;此外,秋水仙碱处理小孢子,其再生植株全株的花均能自交结籽,嵌合植株很少<sup>[68, 69]</sup>。

近几年来,在直接用秋水仙碱处理刚分离小孢子以提高二倍体频率方面作了较多研究。在甘蓝型油菜处理浓度和处理时间方面,Zhao 等<sup>[60]</sup>用 10 mg/L 秋水仙碱处理 42 h 后,再稀释至 5 mg/L 培养出胚,小孢子胚发生频率 15% 以上,经秋水仙碱诱导出胚的再生植株的二倍体率为 90%。石淑稳等报道<sup>[68, 69]</sup>,分离的小孢子在含 10~50 mg/L 秋水仙碱的 NLN 培养基中处理 48 h 后,再生植株加倍率 80% 以上。Hansen 和 Andersen<sup>[61]</sup>报道,秋水仙碱处理油菜小孢子的浓度在 40 mg/L 以下时,能略微提高胚产量;当浓度高于 120 mg/L 时对出胚有负作用;处理时间以 12 h 为最好。Chen 等<sup>[73]</sup>用 500~1 000 mg/L 秋水仙碱处理刚分离的小孢子 8~20 h,获得了平均 70% 二倍体加倍频率。Mollers 等<sup>[64]</sup>用 50 mg/L 秋水仙碱对油菜小孢子进行处理 24 h 后,得到 80%~90% 的二倍体胚;10 mg/L 秋水仙碱处理 72 h,二倍体胚体达 80%,其再生的植株与正常的二倍体植株无差异。Zaki 和 Dickinson<sup>[71]</sup>的研究结果表明,用秋水仙碱 25 mg/L 处理油菜小孢子 12 h 能显著提高胚产量,长时间及高浓度处理会抑制胚产量。秋水仙碱作用于小孢子第 1 次有丝分裂前期,促进了小孢子对等分裂数量,激活小孢子从配子体向孢子体发育。秋水仙碱直接处理小孢子对于小孢子反应差的基因型提高出胚潜力优于反应好的基因型。在白菜型油菜秋水仙碱处理刚分离小孢子的处理浓度和时间方面,顾宏辉等报道<sup>[28]</sup>,白菜型油菜的分离小孢子用 0.8 mg/L 秋水仙碱处理 2 d,能显著地提高出胚产量,比对照未处理胚产量高 33.5%,再生植株二倍体率达 74.3%;而过高秋水仙碱浓度(4~20 mg/L)未能提高出胚产量,且对胚状体萌发和小植株再生产生不利影响。这表明白菜型油菜分离小孢子对秋水仙碱处理可能更为敏感。

综上所述,利用分离小孢子直接进行秋水仙碱加

倍染色体处理的加倍技术具有操作方便、省工省时、加倍效率高、废液少等优点,更为安全、快速和有效,是油菜小孢子培养中一种最具应用前景的染色体加倍方法。

### 5.3 诱导培养基

培养基的配方在很大程度上决定小孢子胚胎发生的诱导率。自从 Lichter 于 1982<sup>[21]</sup>年使用和改进了培养基 (NLN 培养基) 后,很多实验都证实了该培养基对诱导小孢子胚状体形成的有效性,并基本沿用该培养基<sup>[7, 15, 16, 23, 25, 40]</sup>。Keller 和 Armstrong 报道<sup>[56]</sup>,将大量元素降至 NLN 的 1/2 时,能提高胚状体频率;而在 B<sub>5</sub> 和 MS 培养基上未能诱导形成胚状体。余凤群和刘后利报道<sup>[23]</sup>,培养基成分以 NLN 为最佳,1/2 MS 和 1/2 B<sub>5</sub> 培养基上仅能形成少量胚状体;培养基的 pH 以 5.8 为佳,提高 pH 至 6.8 和 7.8,显著不利于胚状体形成和发育。王亦菲等<sup>[42]</sup>比较了 NLN、B<sub>5</sub>、MS 基本培养基对小孢子培养胚状体诱导频率的影响,发现其中 NLN 的效果最好,B<sub>5</sub> 次之,MS 最差,无胚状体产生。

培养基的形态有固体、液体和固液双层培养基,液体培养基诱导小孢子胚的形成优于固体培养基。Lichter<sup>[21]</sup>在甘蓝型油菜的花粉培养中,用液体培养基成功地增加了小孢子胚的数量。Keller 和 Armstrong<sup>[56]</sup>的研究也证明了游离小孢子液体悬浮培养的诱导频率远高于固体培养基,除能增加胚的数量外,胚的发育也更好些。还有研究表明<sup>[72, 74]</sup>,采用液固双层培养基不仅可以提高小孢子胚胎发生率与胚产量,而且对于促进小孢子胚的正常发育效果非常显著,同时对胚胎发生较难的基因型效果也很明显。液固双层培养基中的固相层好象一个营养库,它向液相层缓慢地释放养分,为发育中的胚状体持续不断地供给营养。而王蒂等<sup>[75]</sup>报道,在花粉培养中以液体浅层培养产生的胚状体最多 18.2%,固体 2.7%,双层 8.4%,这可能与实验所用的材料不同有关。NLN 培养基的有机添加物应避免高温消毒而失活,故使用前要用 0.22 μm 孔径的无菌滤膜过滤灭菌。

### 5.4 碳源及浓度

芸薹属植物小孢子培养基几乎均是以蔗糖作为碳源,用 13% 麦芽糖代替蔗糖效果不佳<sup>[23]</sup>。甘蓝型油菜小孢子诱导的蔗糖浓度通常以 13% 较适宜<sup>[7, 15, 22, 40, 42, 47, 49]</sup>。宋来强等<sup>[31]</sup>在培养基所含蔗糖浓度的对比试验中,含蔗糖 13% 的处理对胚状体诱导和发育的综合效果最好,而 9% 和 17% 两处理均未获得成熟胚状体。但在余凤群和刘后利<sup>[23]</sup>的实验中,Topas 中油 821 和保 604 × Topas 以 13% 的蔗糖可获得

最高胚状体产量,而华双 1 号则以 10% 浓度的蔗糖最佳。因此,不同材料可能对蔗糖浓度的需求略有差别。

也有研究认为<sup>[16, 23, 33, 42, 50]</sup>,采取换液和改变蔗糖浓度进行培养的方法有利于胚状体的发生。起始培养用 16% ~ 17% 高浓度的蔗糖,这为小孢子起始培养时维持其活力提供了较合适的渗透压,以及对小孢子的启动和胚状体的诱导都是必须的。但是,过高的蔗糖浓度则对小孢子的进一步发育产生抑制作用,而较低的蔗糖浓度 (13%) 有利于胚状体的发育。因此,2 ~ 3 天后,更换为 NLN-13 培养基,这样可将起始培养阶段释放出的毒素物质清除掉,并增加新鲜氧气而有利于胚状体的发育,为小孢子进一步分裂和发育提供较合适的条件。

余凤群等认为<sup>[76]</sup>,蔗糖浓度对小孢子生长和发育影响显著,挽救球形、心形胚和畸形小胚,用含 13% 的蔗糖和 NLN 培养基效果最好;挽救鱼雷形小胚,蔗糖浓度可降至 2% ~ 8%。有研究报道<sup>[28]</sup>,从起始培养高糖浓度后转入低糖浓度培养并不能提高白菜型油菜小孢子培养的出胚产量,且相对较低糖浓度更有利于出胚。白菜型油菜在 10% 蔗糖浓度的 NLN-10 培养基上培养 2 d 后换成新鲜培养液,能显著提高出胚产量,比不换培养液的胚产量高 1.5 倍,更换培养液还能明显改善胚状体质量。因此,白菜型油菜小孢子培养要求的较适宜蔗糖浓度较低,在低糖浓度下更换培养液能显著提高出胚产量。

### 5.5 激素

关于激素对油菜小孢子胚状体发生的影响,不同研究者结果不尽相同。不同种类激素效果不同,不同供体材料反应不一致。

刘雪平等<sup>[59]</sup>在 NLN-16 和 NLN-13 的培养基中分别加入 0.1 mg/L 6-BA,结果表现出对小孢子再生胚有明显的促进作用,再生胚的频率比对照增加 26 枚/皿,经分析达到显著水平。石淑稳等<sup>[47]</sup>在 NLN-13 培养液中培养加入低浓度的 2,4-D (0.01 ~ 0.1 mg/L),或者与 0.05 mg/L 的 6-BA 配合,结果对甘蓝型油菜某些品种 (系) 和杂种小孢子胚胎发生表现促进作用。张国庆等<sup>[35]</sup>和周伟军等<sup>[70]</sup>在培养基中加入 6-BA 促进了胚萌发和小孢子胚再生。余凤群和刘后利报道<sup>[23]</sup>,以 NLN-13 为基本培养基,应用 7 种激素,试验结果表明,部分激素的作用达显著或极显著水平。2 个对激素需求有差别的材料一致表现为,加入 IAA 不起作用,加入 NAA、BR (油菜素内酯) 具有负作用或没有作用,而加入 6-BA 可显著或极显著提高胚状体产量;而用不含激素的培养基已在 35 个材料中得到胚状体。

王亦菲等<sup>[42]</sup>在诱导培养基中曾单独或配合使用过 0~2 mg/L 6-BA、KT、2,4-D、GA<sub>3</sub>,发现在诱导培养中各种植物激素的作用不大,有些甚至有抑制作用。余凤群等报道<sup>[76]</sup>,在 NLN 培养基中,激素对小胚状体的进一步增大作用不大,用不含激素的 NLN 培养基效果最好。石淑稳等报道<sup>[77]</sup>,属间杂种小孢子在不附加任何激素的 NLN 培养基上产生了 3.9 个胚状体/花药,在附加 2,4-D 0.01 mg/L 的同样培养基上仅产生 0.98 个胚/花药,在附加低浓度的 NAA 和 BA 的处理中则未产生胚状体,表明激素在这一基因型小孢子胚的诱导过程中是不必要的。Polsoni 等认为<sup>[48]</sup>不含激素的 NLN 培养基有利于胚启动和胚质量的提高。

综上所述,在甘蓝型油菜小孢子培养中,因材料不同,适量加入不同种类激素可提高胚状体产量,但激素可能并不是甘蓝型油菜形成小孢子胚状体的必需条件。另外,激素对难成胚材料的作用不大<sup>[23]</sup>。

### 5.6 活性炭等添加物

活性炭对油菜小孢子胚状体发生的影响同激素相似,不同的供体材料、不同的研究者结果不尽相同。有研究报道,培养基中加入活性炭可提高胚状体诱导频率<sup>[15,76]</sup>。培养基中滴加 1 滴 1% 活性炭琼脂悬液,其胚状体产量为 1.2 个花蕾,而未加的对照仅为 0.2 个/花蕾<sup>[31]</sup>。采用含活性炭的 NLN 固液双层培养基,可大大提高产胚的基因型范围及产胚率<sup>[54,57,28,72]</sup>。在含活性炭的固液双层培养基上,10 个供试材料中有 7 个获得了小孢子胚,产胚量最高的达 580 个胚/花蕾。而在单层液体培养基上,仅有 4 个基因型得到了胚,最高产胚量为 48 个/花蕾。前者比后者平均产胚率提高 1~10 倍<sup>[78]</sup>。

Mathias 认为<sup>[72]</sup>,在培养基的固相层中使用活性炭(1%),消除了液相层由培养细胞释放的抑制胚胎发生的毒性物质,如酚醛树脂和 5 羟甲基糠醛,后者是蔗糖经高压消毒产生的一种抑制物质。活性炭还会通过吸收植物生长激素和细胞激动素对培养基中的激素含量进行有益的调节,也能吸收对植物细胞有潜在毒性的脱落酸。

对生长在大田环境下的甘蓝型油菜,活性炭确实能有效提高小孢子胚胎发生。但也发现有些材料即使加入活性炭也得不到胚状体,或者只产生少数的几个,活性炭对小孢子再生胚促进效果不明显,可能由于这些基因型的小孢子脱分化启动特别困难<sup>[42,70,74]</sup>。

其它添加物如 L 脯氨酸 200 mg/L、谷氨酰胺 800 mg/L 则对胚状体的诱导有促进作用。其中,L 脯氨酸有明显的加速小孢子分裂和胚状体发生的作用,首次

观察到小孢子分裂的时间要比对照提前 5 d。L 脯氨酸具有促进小孢子脱分化启动、使小孢子首次有丝分裂发生时间提前作用,这可能与脯氨酸能提高小孢子的抗逆性、增强小孢子的活力有关。谷氨酰胺则对胚状体的继续正常发育有利,两者配合,能降低畸形胚的发生频率,从而提高再生植株频率<sup>[45]</sup>。

有研究报道<sup>[56]</sup>,在培养基中添加 20 mg/L 的多菌灵和链霉素,小苗没有被污染或很少污染,成苗率达 95% 以上;而对照只有 75%~80% 的胚状体发育成苗。多菌灵和链霉素可以抑制真菌和细菌的生长,从而提高了胚状体的成苗率。

## 6 游离小孢子胚的发育

单核晚期小孢子在 NLN 液体培养基和适合的培养条件下培养 1~3 d,首先可观察到细胞膨大和第一次分裂,3 天后进行核均等分裂形成 2 细胞原胚,4~5 d 后部分细胞进行多次分裂,形成 2、3 多细胞团,7~10 d 可见到球状和心形胚,随后发育成鱼雷型胚和子叶型胚<sup>[44,48,79]</sup>。小孢子发育和小孢子胚胎发生进程见图 1<sup>[48,79~81]</sup>。

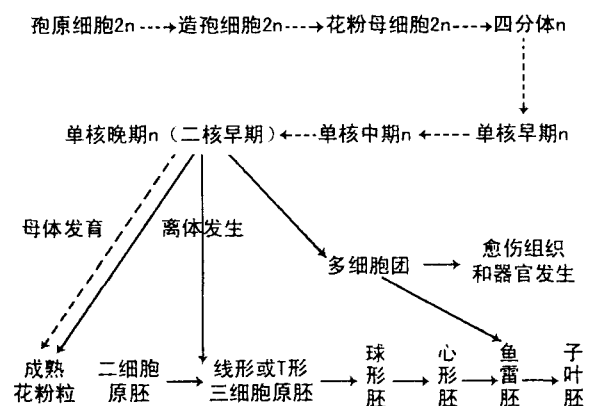


图 1 小孢子发育和小孢子胚胎发生进程

心型、鱼雷型和子叶型胚属于正常胚,它们的两极性发育良好,其中一端具有类似下胚轴结构,形成胚根;另一端常形成具有不完全的二裂片子叶结构,形成胚芽,这样的胚再生频率高。而球型多细胞团的再生植株频率较低,主要是由于极性发育较差;畸形胚则不能再生成苗,这两类胚状体的分化均不完全,有的只长根不分化苗,有的颜色变褐而死,有的形成白化苗,因此小孢子发育再生成植株的频率常取决于胚的早期正常发育<sup>[56]</sup>。

(未完待续,见下期)