

浅析几个因子对甘蓝型油菜游离小孢子胚胎发生的影响

黄先群^[1] 毛堂芬^[2] 李丽^[1] 董颖苹^[2] 刘永翔^[1] 徐涵^[3]

1. 贵州省农业生物技术重点实验室, 贵阳, 550006; 2. 贵州省生物技术研究所, 贵阳, 50006; 3. 法国图卢兹综合科学研究所, 图卢兹, 31300, 法国

摘要: 为了快速纯合杂交后代材料, 提高重组基因型的选择机率, 对 40 个杂交 F1 代组合进行小孢子分离培养。其中, 有 9 个材料产生小孢子胚 (占 22.5%), 仅 4 个材料 (10.0%) 获得了再生植株并种植大田, 表明基因型是影响小孢子胚胎发生的一个主要因素。4 个杂交组合材料的胚胎发生率为 0.08-0.86 胚/蕾, 平均为 0.25 胚/蕾。细胞学检测表明, 本试验杂交组合材料的最适取样花蕾长度为 3.5mm。大田取样采取切取花序, 然后在 4℃冰箱中插水加散射光保存 4~5 天不影响胚胎发生。热激培养 2 天后小孢子的膨大率是衡量小孢子胚胎能否发生的一个有效指标。

关键词: 油菜; 小孢子; 胚胎发生; 组织培养

Analysis of several factors that affect isolated microspore embryogenesis in *Brassica napus*

Huang Xian-Qun^[1], Mao Tang-Fen^[2], Li Li, Dong Ying-Ping^[2], Liu Yong-Xiang^[1], Xu XuHan^[3]

¹Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Guiyang, 550006, China;

²Guizhou Institute of Biotechnology, Guiyang, 550006, China;

³Institut de la Recherche Interdisciplinaire de Toulouse (IRIT-ARI), Toulouse, 31300, France

Abstract: Isolated microspore culture has greatly contributed to rapeseed haploid breeding, and is thus one of the most important technologies in rapeseed breeding and genetic engineering. Many parameters show effects on the in vitro microspore morphogenesis, and difficulties are encountered especially when microspore is collected directly from field-grown plants. The present isolated microspore culture used field-grown F1 plants from 40 cross combinations, in which 9 cross combinations produced embryos in culture (22.5% of total tested cross combinations), and plants regenerated in 4 cross combinations among them (10% of total tested cross combinations). The ratio of the embryogenesis of the 4 cross combinations ranged 0.08 - 0.86 embryo/bud, at an average of 0.25 embryo/bud. Cytological analysis showed that the stage of flower bud at 3.5mm in length gave rise to the best embryogenesis. Branches with rachises collected from field-grown plants could be stored at 4℃ for 4-5 days in room light that facilitated lab analysis and culture. The percentage of microspore enlargement at 2 days after heat shock culture is an important marker for embryogenesis.

Key words: *Brassica napus*; microspore; embryogenesis; in vitro culture

游离小孢子培养和植株再生是指从花药中分离出小孢子, 在离体培养条件下诱导小孢子产生胚胎或不定芽, 再生成植株的技术。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^[1]。

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机率, 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

项目基金: 该项目获得贵州省国际科技合作重点项目资助[黔科合外G字(2005)400107号]; 贵州省农业动植物育种专项项目资助[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, 贵州省贵阳市人, 研究员, 主要从事农作物生物技术研究。

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, 特别适合于产量、抗性等数量性状的分析, 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, 是本世纪各国研究和开发的竞争重点和热点。

自1982年Lichter^[2]首次在甘蓝型油菜小孢子培养成功以来, 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^[3]; 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”^[4]和“中双9号”^[5]品种等; 在诱变育种和突变体筛选方面, 其研究和应用也越来越广泛^[6, 7, 8], 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^[8, 9]等。因此, 单倍体育种有着广阔的应用前景。

由于影响游离小孢子培养和植株再生的因素较多, 尤其是生长在大田环境下的植株, 小孢子发育不一致, 胚产生频率不稳定(太低或难以得到胚状体), 这是限制该技术广泛应用的一个问题。本文通过取材于大田环境下甘蓝型油菜小孢子的培养过程, 对几个影响小孢子发育的因素和小孢子胚胎发生的预示指标进行研究, 力求对早期小孢子离体条件下胚胎发生机制的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

筛选抗病、优质、含油量高的甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 亲本, 组配杂种F₁代杂交组合材料(参见表3)。F₁代杂种植株种植大田, 在油菜开花期选择合适的花蕾进行小孢子分离培养。实验时间是2006、2007年贵阳地区春季油菜开花期和2006年威宁油菜夏繁开花期。

1.2 方法

1.2.1 镜检

将1.5~5.0mm长度的花蕾进行核荧光染色液染色, 在倒置显微镜下观察(Olympus BX51), 确定最适小孢子发育期(单核期和二核早期)。所用的染色液配方为: Tris 30mg, EDTA 7.5 mg, NaCl 20mg, 5-Bromo-2-Deoxyuridine 6 μg, Phenylendiamine 20mg, Hoechst33258 18 μg, 甘油 12ml, 蒸馏水 8ml。

1.2.2 材料消毒

在油菜开花3~7天左右, 选取小孢子发育时期在单核期和二核早期的花蕾, 将其放入滤布中, 用70%酒精消毒1min左右, 然后用0.1%升汞消毒10min, 无菌水冲洗3~5次。

1.2.3 小孢子分离

分离小孢子所用的溶液为含13%蔗糖的B₅无激素液体培养基, pH5.8~6.0。小孢子用DUCHEFA BIOCHEMIE公司生产的NLN培养基培养, 蔗糖浓度为13%, pH 5.9。将已灭菌的花蕾在上述B₅洗液用玻璃棒轻轻将花粉挤出, 经300目尼龙网膜过滤到离心管里, 于800rpm/min离心8min, 去掉上清液; 再加入相同的B₅培养液在同样转速下离心5min, 去掉上清液, 加入NLN-13液体培养基(加50mg/L的秋水仙碱, pH5.8~6.0)悬浮小孢子, 稀释到所需的密度(1~2个蕾/ml), 分装到培养皿中或小三角瓶中培养。

1.2.4 培养

小孢子先在32℃的温度下热激培养2天, 然后用NLN-13培养基离心两次, 再在相同培养基(不含秋水仙碱)、25℃恒温箱中静置培养2~3周。胚胎产生后将其在80rpm的摇床上、25℃条件下暗培养1~2周, 然后将正常发育的小孢子胚转入B₅固体培养基(0.8%琼脂, 5%蔗糖, pH 5.8~6.0), 置入22℃、16h光周期培养箱内培养, 2~3周转换一次培养基直到植株生长成为正常不定芽苗, 然后再生根培养基和盆栽驯化, 最后移栽大田。对未能发育成正常植株的胚在B₅培养基上继续进行培养。

2. 试验结果与分析

2.1 培养基的配制

实验初期(2006年春季), 培养基的配制是采用大量元素(含糖13%)高温灭菌(定容为900ml), 有机物(定容为100ml)过滤灭菌。共做了20多个杂交组合, 100多个单株, 1000多个培养皿的试验。在培养2天后用倒置显微镜观察, 发现小孢子没有膨大, 培养1月左右均未有变化, 也没有胚状体产生。其原因可能是含有高糖的NLN大量元素培养基经高温灭菌产生了一些影响小孢子发育的有毒物质或阻碍物质, 致使小孢子不能膨大和进一步发育。2006年夏繁油菜开花期, 将培养基全部采用过滤灭菌, 2天后小孢子有所膨大, 最终获得胚状体。因此, NLN培养基全部采用过滤灭菌更有利于小孢子产生胚胎。

用于小孢子培养的李LN培养基首先需要配制近20种母液, 然后再配成所需的培养基, 操作过程比较烦琐, 有些试剂需要的量很微小, 在配置的过程中可能出错而不知; 此外, 有些需要特殊溶剂溶解, 这些溶剂可能会对小孢子的发育产生不良影响。采用DUCHEFA BIOCHEMIE公司生产的粉剂NLN培养基, 可以简化操作程序, 节省时间, 消除不利因素的影响。

2.2 小孢子发育期

选择合适的小孢子发育期是小孢子培养的关键环节。据报道, 最适合游离小孢子培养的时期是单核靠边期和二核早期。由于本实验选用的油菜是种植大田, 温度不能控制, 小孢子的最适发育时期难以用一个准确尺度来进行判断, 因此在实验中采用镜检、花蕾长度和开花时期综合指标进行选择。首先是镜检, 起初采用传统的苯酚染液和醋

酸洋红染色, 效果很不理想, 看不到细胞核, 难以找到最适的单核靠边期 (图 1, 2), 这主要是由于单核期小孢子的细胞壁开始增厚, 用普通颜料染色, 多数细胞观察不到细胞核; 而个别能看到细胞核的都在发育早期 (1.5mm 花蕾), 如四分体时期。

在 2006 年夏繁试验中, 采用 Hoechst 荧光染色来观察小孢子的发育情况。结果在以前苯酚染液和醋酸洋红染色看不到细胞核的材料中都可以观察到细胞核 (图 3~6)。在开花 3~7 天的 3.5mm 的花蕾中, 观察到 70% 以上的小孢子处于单核靠边期 (图 5)。据报道, 小孢子发育的同一性和单核靠边期小孢子所占的比例与小孢子的诱导频率有很大的关系。单核靠边期小孢子所占比例大, 诱导率高。通过荧光染色观察, 对于本试验所用的甘蓝型油菜材料而言, 一般 1.5mm 花蕾的小孢子处于四分体时期和单核早期 (图 3), 2~3mm 的花蕾有部分单核靠边期出现 (图 4), 3.5mm 的有 70% 左右的小孢子处于单核靠边期 (图 5), 4.0mm 以上的又逐渐减少, 5.0mm 的出现双核中期和三核期 (图 6), 因此, 取样最适的花蕾大小为 3.5mm。

2.3 取样时间

2007 年春季油菜开花期前后共取 10 次样来进行小孢子的培养。取样时间从 1 月 23 日到 3 月 13 日。实验结果表明 (表 1), 1 月和 2 月上中旬取样的材料, 在游离小孢子培养 2 天后, 小孢子没有膨大, 也没有胚产生; 从 2 月下旬到 3 月初取样的材料小孢子膨大率较高, 50% 左右的材料有膨大现象, 最高可达 88.9%, 胚胚发生率为 8.3-33.3%; 3 月中旬取样的杂交组合材料小孢子有膨大, 但没有胚产生。在产生胚的 9 个材料中, 有 6 个是 3 月 1 日取的样, 说明取样时间对胚胎发生率有一定的影响。此外, 采取的花枝放在冰箱里插水保存 3-5 天并不影响小孢子的胚胎发生率 (表 2)。

一般情况下, 小孢子膨大率 50% 以上的材料比较容易产生胚, 胚胎发生率也高; 而膨大率 50% 以下的胚产生率较低或难以产生胚; 没有膨大的材料则不能产生胚。但试验中, 也有个别材料膨大率较高, 但不能产生胚, 如 431 (表 3)。这表明, 膨大率高的小孢子能否产生胚, 与后期的发育条件也有一定关系。但在热激培养 2 天后 (2 DAC: 2 days after culture) 小孢子是否膨大和膨大率是否高 (>50%) 是小孢子产生胚的一个基本条件, 也是衡量小孢子胚胎能否发生的一个有效指标。

表 1 2007 年油菜开花期小孢子培养实验情况

Table 1. Results of microspore culture performed in Jan.- March 2007

取样日期 Sampling date (月/日)	实验日期 Experimen tal date (月/日)	株数 No. of cross combinations	单株数 No. of cultured Fl plants	花蕾数 No. of flower buds	株膨大数 No. of cross combinations in which microspore enlarged 2DC	株膨大率 (%) Percentage of enlarged cross combinations	株胚胎发生 数 No. of embryogenic cross combinations	株胚胎 发生率 (%) Percentage of cross combinations in which embryo produced
123	123	3	5	96	无	0	0	0
130	131	9	18	325	无	0	0	0
25	26	10	>10	877	无	0	0	0
213	214	6	>6	279	无	0	0	0
226	227	10	10	289	6	60.0%	1	10.0%
3.1	32	9	17	416	5	55.6	3	33.3%
3.1/32	33	8	12	312	7	87.5%	2	25.0%
3.1/32	34	12	21	403	9	75.0%	1	8.3%
3.1/33	35	14	24	503	11	78.6%	3	21.4%
3.13	3.14	9	>18	435	4	44.4%	0	0

株胚胎发生率: 产生胚的株数/株数 x 100%; 株膨大率 (%): 膨大株数/株数 x 100%。

2.4 基因型

本试验 2007 年的 40 个参试材料中, 有 9 个杂交组合产生胚 (22.5%), 仅 4 个杂交组合 (10.0%) 获得了再生植株, 胚胎发生率为 0.08-0.86 胚/蕾, 平均为 0.25 个/花蕾 (表 2, 3)。有 8 个杂交组合的材料完全不膨大, 也没有胚状体和胚体产生 (其中 418, 505, 1183 是重复取样)。以上结果表明小孢子胚胎发生能力受基因型的影响 (表 3)。

2.5 其他因素

有些杂交组合同一天取样, 不同时间进行实验, 其膨大和产生胚的情况不一样, 例如杂交组合 446, 3 月 1 日取样, 3 月 2 日培养的未膨大, 3 月 3 日培养的有膨大, 这些材料可能要求低温处理时间较长; 有些杂交组合材料相同, 取样时间和试验批次均相同, 结果有的单株产生胚, 有的就不产生胚, 例如杂交组合材料 450 和 540, 表明单株间存在个体差异; 在试验的 40 个材料中, 有 8 个材料 (占 20.0%) 两次重复的试验结果不一致, 一次培养中小孢子膨大, 一次培养中小孢子不膨大 (如 451, 499, 525, 534, 537 等), 表明小孢子胚状体发生能力的重复性不易控制, 实验条件对培养结果也会造成很大的影响 (表 3)。

表 2 2007 年春季油菜开花期部分材料小孢子培养产生胚情况

Table 2. Results of microspore culture performed in Feb.-March 2007

编号 No.	取样时间 Sampling date	实验时间 Experimental Date	花蕾数 No. of flower buds	杂交组合 Cross combination	株数 No. of plants	胚胎发生数 No. of embryos	胚胎发生率 (%) * Embryo production
445**	3.1	3.3	17	827R x 丹	1	有胚 (死亡)	—
540**	2.26/3.1	2.27/3.2	34/64	Sarepta x 549	-/2	有胚 (死亡)	—
M436	3.3	3.5	29	Q x 85-1	2	25	0.86
M473	3.3	3.5	37	Q x Rocabo	2	4	0.11
450	3.1	3.5	37	827R x 4312	1	5	0.13
526	3.1	3.2	43	花油5号 x 82-11	3	5	0.19
537	3.1	3.3	32	Sarepta x 油研10号	1	10	0.31
539	3.1	3.4	25	伦比 x 85-26	1	2	0.08
837	3.1	3.2	84	549 x DAN	2	21	0.25
9			402		>19	72	0.25

*: 胚胎发生率 (胚/蕾) = 产生的胚数/花蕾数; **: 有些产生胚的材料资料记载不全, 胚胎发生数和胚胎发生率 (%) 未统计。

以上结果表明, 小孢子的胚胎发生受诸多因素的综合影响, 如基因型、小孢子发育期、培养基、取样时间、低温处理时间、实验条件、个体差异等等。

表 3 2007 年春季油菜小孢子培养膨大情况

Table 3. Results of microspore enlargement in culture performed in Spring 2007.

编号 No.	取样时间 Sampling date	实验时间 Experimental date	花蕾数 No. of flower buds	株数 No. of cultured F1 plants	2天后调查膨大情况 Microspore enlargement 2 DAC	杂交组合 Cross combination
416	3.1	3.3	53	3	有, 中	827R x 006
418	3.1/3.13	3.2/3.14	50/21	2/混	无/无	827R x Wipor
422	3.1	3.4	45	3	有, 少	827R x (D x 白)
431	3.3	3.5	43	2	有膨大, 良	云油21 x 827R
436	3.3/3.13	3.5/3.14	29/60	2/混	有, 良/有, 良 (产生胚/无胚)	Q x 85-1
437	3.3/3.13	3.5/3.14	29/88	1/混	有, 中	C-9 x Rocabo
445	3.1	3.3	17	1	有, 良 (产生胚)	827R x DAN
446	3.1/3.1	3.2/3.3	45/27	2/1	无/有, 良	827R x 388
448	3.13	3.14	37	混	有, 中	827R x 81-11
450	3.1/3.1	3.5/3.5	37/27	1/1	有, 良/有, 良 (产生胚/无胚)	827R x 4312
451	3.1/3.13	3.3/3.14	30/15	2/混	有/无	827R x 5392
457	3.1	3.2	35	2	无	(5392 x WST) x (C x 白)
473	3.3/3.13	3.5/3.14	37/84	2/混	有, 良/有, 良 (产生胚/无胚)	Q x Rocabo
475	2.26	3.27	31	1	无	827R x 4312
493	3.1	3.4	37	2	无	827R x 5392
499	2.26/3.1	2.27/3.4	33/23	1/1	无/有, 少	Q x 85-1
505	2.26/3.1	2.27/3.2	26/23	1/1	无/无 聚集	Q x 5392
514	3.1	3.4	31	2	有, 中	(D x 白) x 827R
515	3.1	3.4	29	1	有, 少	(D x 白) x 88-402
525	2.26/3.1/3.1	2.27/3.4/3.5	30/37/38	1/2/2	有, 中/无 聚集/无	C-9 x DAN

526	2.26/3.1	2.27/3.2	26/43	1/3	有, 良/有, 良(无胚/产生胚)	花油5号 x 82-11
527	3.1/3.1	3.4/3.5	35/26	2/1	有, 良/有, 少	C-9 x DAK
531	2.26	2.27	36	1	有, 少	SAM x Q
532	3.1	3.5	59	2	无 聚集	云油21 x Q
534	2.26/3.1	2.27/3.2	35/33	1/1	无/有, 少	388 x Q
535	2.26/3.1	2.27/3.3	10/30	1/1	有, 少/有, 中	5392 x WET
537	3.1/3.1	3.3/3.5	32/30	1/1	有, 良/无(产生胚/无胚)	Sarepta x 油研10号
539	3.1	3.4	25	1	有, 良(产生胚)	伦比 x 85-26
540	2.26/3.1/3.1/3.1	2.27/3.2/3.3/3.5	34/64/53/65	1/2/2/3	有, 良/有, 良/有, 良/有, 良(产生胚/产生胚/无/无)	Sarepta x 549
541	3.1	3.2	39	1	有, 中	Cesar x 82-11
544	3.2	3.4	22	1	无	DAN x 82-11
545	3.2	3.4	37	2	有膨大, 中	DAM x ZA7
546	2.26	2.27	28	1	有, 少	DAR x C-9
794	3.3	3.5	18	2	有, 少	4312 x 827R
798	3.3/3.13	3.5/3.14	34/17	2/混	有, 少/无	(SAM x 82-11) x DAN
801	3.3	3.5	31	1	有, 良	油研11号
837	3.1	3.2	84	2	有, 良(产生胚)	549 x DAN
838	3.2/3.13	3.4/3.14	57/82	3/混	有, 中/无	马努 x 82-11
846	3.2	3.4	25	1	有, 少	WST x 82-11
1183	3.2/3.13	3.3/3.14	70/31	1/混	无 聚集/无	388 x Q
40			2358	>97		

*混: 是混合取样, 单株数在 2 株以上; 表中第 6 栏资料中, 没有标注的材料均没有产生胚。

3 讨论

据报道, 在影响小孢子培养再生的诸多因素当中, 供试材料基因型是影响油菜小孢子胚状体产量的主要因素之一, 不同品种间诱导频率差异显著^[10, 11, 12, 13, 14, 15]。本试验2007年春季的40个参试材料中, 有9个材料产生胚(22.5%), 仅4个材料(10.0%)获得了再生植株。周永明和Scarth^[12]在供试的8个甘芥种间杂种材料中有4个对培养有反应; 朱家成等^[11]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。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^[16, 17], Cloutler等^[18]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。

据报道, 同一杂交组合的材料不同单株间胚状体发生能力亦有差异, 同一杂交组合的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^[19, 20]。我们的试验结果也证明了这一点, 这可能与田间植株每天所遇到的自然气候不同有关, 因此一个杂交组合的材料往往需要重复接种培养。在进行品种间小孢子产胚能力比较时, 为了消除单株间个体差异, 每个基因型每次取3~5株上的花蕾混合较好; 而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进行单株培养, 有可能从中筛选得到反应较好的植株。

供体植株的生长环境(温度条件)也是影响小孢子培养的一个重要因素。来自生长室的供体植株(10℃白天, 5℃黑夜周期), 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%; 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, 因此胚产生频率不稳定或难以得到胚状体^[21, 22, 23, 24, 25]。我们的试验结果再次证明, 花蕾中小孢子发育的一致性对胚胎的发生有很大影响, 即单核晚期的小孢子多, 胚胎发生频率高; 而小孢子发育一致性差的材料, 胚胎发生频率低。

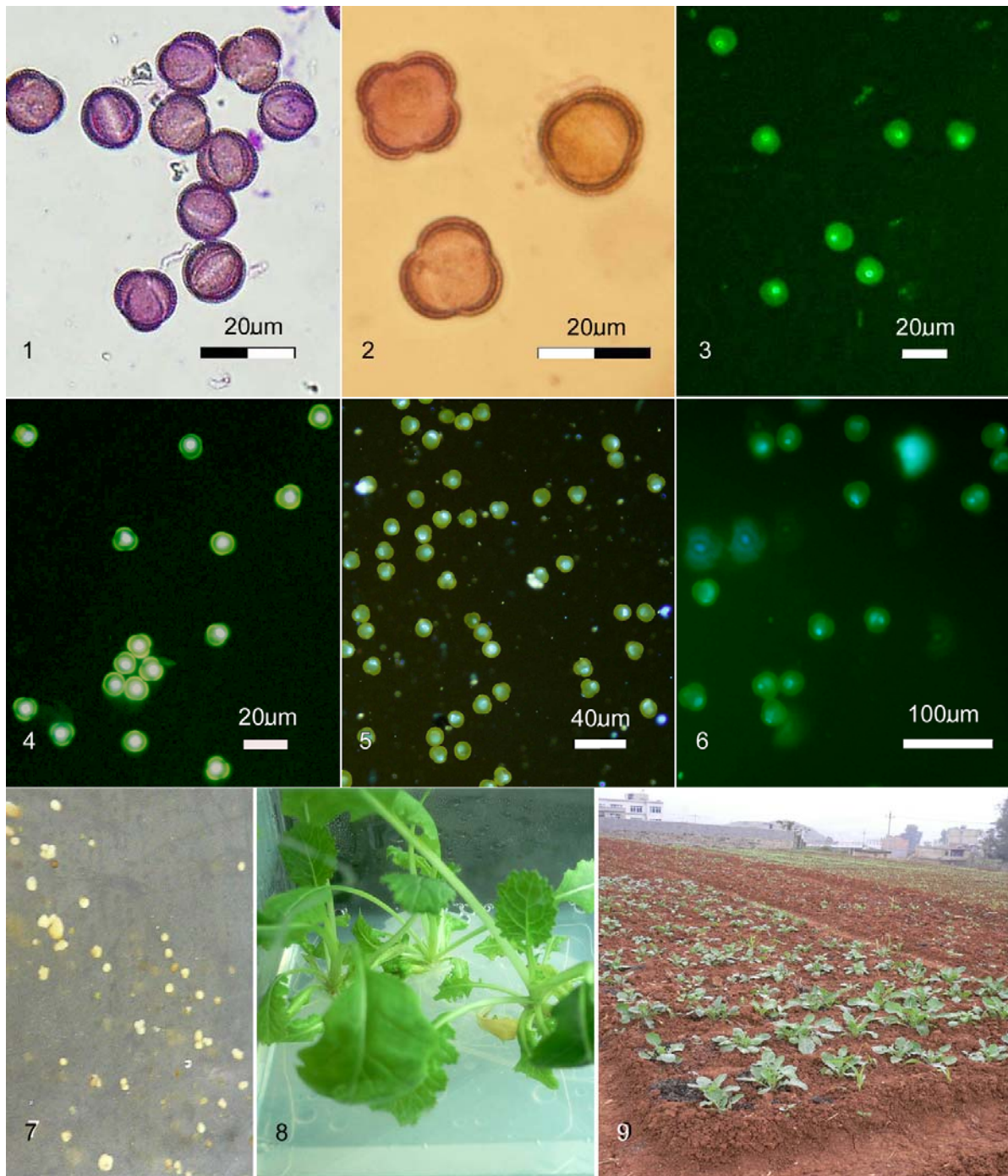
由于贵州种植的多是两年生冬性或半冬性油菜, 一年只开一次花, 并且大部份材料集中在3月上、中旬开花, 有效取样时间比较集中, 也较短暂; 而大田环境下生长的植株小孢子发育不一致, 小孢子培养的脱分化启动及胚胎诱导均较困难; 因此, 要将该技术作为一个常规技术来应用, 需要改善实验条件(如建立人工气候室), 即时检测和低温调节材料的发育时期。在本试验中, 以花蕾作为保存材料的最佳保存时间为1天, 超过1天则材料有些发黄并产生异味。切取花序在4℃冰箱中插水保存(加散射光), 可以保存3~5天而不影响后续培养中胚胎的发生, 这对异地取样(夏繁)和调节同步发育时期进行小孢子培养尤为实用。

本实验重点研究生长在大田环境下的甘蓝型油菜所取材的小孢子的培养过程, 并对小孢子胚胎发生的预示指标进行研究。实验表明, 热激培养2天后小孢子的膨大率是衡量小孢子胚胎能否发生的一个有效指标。在小孢子的膨

大率大于 50%时, 小孢子的胚胎发生出现质的转变。这表明, 小孢子培养密度和膨大小孢子的密度可能都具有集体效应。这种集体效应促使小孢子偏离配子体发育途径。小孢子的膨大过程和起因与联动机制是今后小孢子胚胎发生机制的重点研究课题。

参考文献:

- 1 孙志栋, 王为德, 毛根富, 裘尧军. 作物单倍体研究和应用进展[J]. 种子, 2000 (6): 37~39。
- 2 Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* L. [J]. *Z Pflanzenphysiol*, 1982, 105:427—434.
- 3 陈正华, 寸守铄, 陈之征, 张大卫, 李根泽, 李文彬, 赵富顺, 张丽华, 邱仁芳, 桑建利, 张铁汉, 施慧慧, 姚渝光, 张小雷, 万萌, 王文富, 关月兰. 用细胞工程技术选育油菜“双低”新品种[M]. 植物细胞工程与育种, 1990, 胡会, 王恒之主编, 北京工业大学出版社出版。
- 4 吴江生, 石淑稳, 周永明, 刘后利. 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。
- 5 王汉中, 刘贵华, 郑元本, 王新发, 杨庆. 抗菌核病双低油菜新品种中双9号的选育[J]. 中国油料作物学报, 2002, 24 (4): 71~73。
- 6 何冬丽, 杨光圣. 甘蓝型油菜单倍体离体诱变及其效应的 AFLP 分子标记检测[J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(2): 10~14。
- 7 和江明, 王敬乔, 陈薇, 李根泽, 董云松, 寸守铄. 用 EMS 诱变和小孢子培养快速获得甘蓝型油菜高油酸种质材料的研究[J]. 西南农业学报, 2003, 16 (2): 34~36。
- 8 刘勇, 刘红雨, 曾正宜. 利用小孢子培养技术筛选油菜抗菌核病材料[J]. 西南农业学报, 1997, 10(1): 108~112。
- 9 黄剑华, 陆瑞菊, 周志疆, 王亦菲, 孙月芳, 周润梅. 应用小孢子和花药培养技术筛选油菜抗菌核病材料[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37 (3): 226~227。
- 10 周永明, Scarth R. 甘蓝型油菜和白菜型油菜种间杂种的小孢子培养[J]. 植物学报, 1995, 37(11): 848~855。
- 11 朱家成, 文雁成, 张书芬, 田保明, 王建平. 甘蓝型油菜游离小孢子培养技术研究[J]. 河南农业科学, 2001 (11): 4~5。
- 12 周永明, Scarth R. 甘蓝型油菜和芥菜型油菜杂种小孢子培养获得再生植株[J]. 作物学报, 1996, 22 (4): 399~403。
- 13 宋来强, 贺兴文, 邹晓芬, 程春明, 张建模, 熊任香. 甘蓝型油菜小孢子胚状体诱导的主要影响因素研究[J]. 江西农业学报, 1998, 10 (2):66~69。
- 14 张冬青, 顾宏辉, 张尧峰, 丁厚栋, 周伟军. 双低油菜浙双72的小孢子培养与植株再生研究[J]. 浙江农业学报, 2003, 15(4):219~222。
- 15 胡武强, 朱彦涛. 甘蓝型油菜小孢子子叶胚的高频发生[J]. 陕西农业科学, 1997 (4):8~9。
- 16 Ajsaka H, Kuginuki Y, H da KShiratori, et al. Mapping of loci affecting the cultural efficiency of microspore culture of *Brassica rapa* L. *Syn campestris* L. using DNA polymorphism[J]. *Breed Sci*, 1999, 49:187—197.
- 17 Truco MJ, Quiros CF. Structure and organization of the B genome based on a linkage map in *Brassica nigra*. [J] *Theor Appl Genet*, 1994, 89:590—598.
- 18 Cloutler S., Cappadocia M., Landry BS. Study of microspore-culture responsiveness in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by comparative mapping of a F₂ population and two microspore-derived populations [J]. *Theor Appl Genet*. 1995, 91:841—848.
- 19 余凤群, 刘后利. 供体材料和培养基成份对甘蓝型油菜小孢子胚状体产量的影响[J]. 华中农业大学学报, 1995, 14 (4): 327~332。
- 20 宋来强, 贺兴文, 邹晓芬, 程春明, 张建模, 熊任香. 甘蓝型油菜小孢子胚状体诱导的主要影响因素研究[J]. 江西农业学报, 1998, 10 (2):66~69。
- 21 官春云. 油菜小孢子培养和双单倍体育种研究 I. 供体植株和小孢子密度对小孢子培养的影响[J]. 作物学报, 1995, 21(6):665~670。
- 22 王亦菲, 陆瑞菊, 孙月芳, 周润梅, 刘成洪, 黄剑华. 大田油菜游离小孢子培养高频胚状体诱导及植株再生[J]. 中国农学通报, 2002, 18 (1): 20~23。
- 23 朱彦涛, 李殿荣, 杨淑慎. 低温预处理和基因型对甘蓝型油菜小孢子胚胎发生的影响[J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2005, 33(5):88~94。
24. XuHan X (徐涵), Jing H.-C, Cheng X-F, Iwanowska A., Kieft H, Bergervoet JHW, Groot SPC, Bino RJ, van Lammeren AAM. Polyploidization in embryogenic microspore cultures of *Brassica napus* L. cv. Topas enables the generation of doubled haploid clones by somatic embryogenesis [J]. *Protoplasma*, 1999, 208: 240—247.
25. 黄先群, 蒋敏华, 毛堂芬, 李丽, 董颖苹, 徐涵. 影响油菜游离小孢子培养再生因素的研究进展[J]. 种子, 2006 (25), 10:37-43, 11:46~50。



图版：甘蓝型油菜杂种 F1 代小孢子不同染料染色镜检观察和植株再生

1. 苯酚染液染色 (花蕾长度 2.5cm); 2. 醋酸洋红染色 (花蕾长度 3.0cm); 3~6. Hoechst 荧光染色 (3. 花蕾长度 1.5cm, 示小孢子单核早期; 4. 花蕾长度 2.5cm, 示小孢子单核期; 5. 花蕾长度 3.5cm, 示小孢子单核靠边期; 6. 花蕾长度 5.0cm, 示小孢子 2~3 核期); 7. 小孢子胚状体和愈伤组织; 8. 小孢子再生试管苗; 9. 移栽大田的油菜小孢子再生植株。