

培养基成分对黔白大白菜杂交种小孢子胚诱导的影响

赵大芹¹, 陶莲¹, 张朝君¹, 毛堂芬², 徐涵³

(1. 贵州省园艺研究所, 贵州省园艺工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550006; 2. 贵州省农业科学院 生物技术研究所, 贵州 贵阳 550006; 3. 法国图卢兹综合科学研究所, 图卢兹 31300)

[摘要] 以 2 个黔白大白菜杂交组合为材料, 进行游离小孢子培养, 探讨了培养基成分对小孢子成胚率的影响。结果表明: NLN 培养基添加 13% 蔗糖的培养效果最好; 添加 0.05 mg/L 6-BA 和 0.10 mg/L NAA 的培养基显著提高了小孢子胚的诱导率和成熟胚的比例; NLN-13 液体培养基中添加适量活性炭可明显促进小孢子胚状体的形成, 对胚胎发育的同步性也有很好的作用。

[关键词] 大白菜; 小孢子培养; 培养基成分; 胚状体; 诱导率

[中图分类号] S634.1

[文献标识码] A

The Effect of Media Composition on Embryoid Differentiation Rate of Microspores of Qianbai Chinese Cabbage Hybrid Combinations

ZHAO Daqin¹, TAO Lian¹, ZHANG Chaojun¹, MAO Tangfen², XU Han³(1. *Guizhou Horticultural Institute, Guizhou Horticultural Engineering Research Center, Guiyang, Guizhou 550006*; 2. *Bio-technological Institute, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang, Guizhou 550006, China*; 3. *Toulouse Science Research Institute, Toulouse 31300, France*)

Abstract: The microspores from two hybrid combinations of Qianbai Chinese cabbage were cultured to investigate the effect of media composition on the embryoid differentiation rate. The results showed that the best induced effect was from NLN media+13% sucrose, the NLN media+0.05 mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA significantly improved the embryoid induced rate and ratio of mature embryos and NLN-13 liquid media+rational active carbon obviously promoted the embryoid formation and development.

Key words: Chinese cabbage; microspore culture; media composition; embryoid; induced rate

大白菜游离小孢子培养作为植物生物技术领域中细胞工程和基因工程研究的重要内容, 一直受到国内外学者们的普遍关注, 培养所产生的单倍体经过加倍后获得双单倍体是大白菜育种的新方法。目前游离小孢子培养技术的发展, 使其在大白菜中已能有效地诱导胚状体的形成^[1~3]。但该技术涉及的影响因素较多, 每一个因素的变化都可能导致成胚率及胚胎发育的差异, 其中培养基成分对小孢子胚的诱导和形成影响极大。本试验在前人工作的基础上, 探讨了 NLN 培养基中蔗糖浓度、外源激素和添加活性炭对胚胎发生的影响, 以寻求黔白大白菜 F₁ 杂交种小孢子胚高频发生的培养条件。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

以贵州省园艺研究所配制的大白菜组合 37×88 和 38×26 作为供试材料。2006 年 11 月上旬育苗, 12 月上旬定植于贵州省园艺研究所蔬菜试验地, 采用常规栽培管理。2007 年 3 月上中旬至 4 月上中旬取花蕾进行游离小孢子培养。小孢子培养步骤为:

(1) 取材。初花期至盛花期, 晴天 7:00~10:00, 选取植株主花序或侧枝主要花序上长度为

3 mm 左右的花蕾备用。

(2) 消毒。以 30 个花蕾为一组, 放入 25 mL 的小三角瓶中, 用 75% 的酒精表面消毒 30 s, 然后用 8% 次氯酸钠溶液消毒 15 min, 无菌水洗涤 3~4 次, 每次洗涤 2~3 min。

(3) 离心。将花蕾放入无菌小研钵中, 加入少量 B5 洗涤培养基, 用研棒轻轻碾碎花蕾挤出小孢子, 双层滤网(63/44 μm) 过滤, 将滤液收集在 10 mL 离心管中, 滤液经过 1000 rpm 离心 3 min, 小孢子沉积于离心管底部, 弃去上清液, 加入 5 mL B5 洗涤培养基将悬浮的小孢子再离心, 如此重复 3 次, 倒掉上清液, 沉积的小孢子待用。

(4) 培养。将小孢子悬浮于经过滤灭菌的 NLN-13 培养基中, 用血球计数器将小孢子密度调至 1×10⁵ 个/mL, 每个培养皿(60 mm×15 mm) 中加入 2.5 mL 悬浮液, Parafilm 封口后置于 33℃ 恒温培养箱处理 24 h, 然后转至 25℃ 培养箱中暗培养, 出胚后统计小孢子胚数量。

1.2 试验设计

1.2.1 蔗糖浓度试验 在 NLN 基本培养基中, 分别加入 8%、10%、13%、14% 和 15% 的蔗糖, 比较培养基中蔗糖浓度对小孢子胚状体诱导的影响。每个处理 5 皿, 3 次重复。

[收稿日期] 2007-07-11; 2007-10-14 修回

[基金项目] 贵州省农业动植物育种专项[黔农育专字(2005)029]

[作者简介] 赵大芹(1962-), 女, 副研究员, 从事蔬菜育种与栽培技术研究。

1.2.2 外源激素试验 在培养基中加入不同浓度的 6-BA 和 NAA, 以不加激素为对照, 共设 5 种 NLN 培养基, 分别为 A: NLN-13(蔗糖浓度为 13% 的 NLN 培养基); B: NLN-13+0.05 mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA; C: NLN-13+0.10 mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA; D: NLN-13+0.2 mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA; E: NLN-13+0.5 mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA。上述培养基在推滤灭菌前调 pH 值至 5.8, 然后用 0.45 μm 和 0.22 μm 微孔滤膜推滤 2 次备用。每个处理 5 皿, 3 次重复。

1.2.3 添加活性炭试验 在 NLN 培养基中分别添加 0, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00 mg/mL 活性炭, 15 d 后统计胚状体数目和各发育时期的胚状体数, 计算小孢子胚胎发生率和成熟胚的比例。每个处理 5 皿, 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 培养基中蔗糖浓度对胚状体诱导的影响

试验结果(表 1)表明, 材料 37 \times 88 和 38 \times 26 均以加入 13% 蔗糖的培养基对胚状体诱导和发育的综合效果较好, 平均每花蕾分别形成 28.6 个和

表 1 蔗糖浓度对胚状体诱导的影响
Table 1 The effect of different sucrose concentration on embryoid induction %

材料 Material	不同蔗糖浓度的产胚率(胚/蕾) Producing embryoid rate (embryoid/bud)				
	8%	10%	13%	14%	15%
37 \times 88	0	1.2	28.6	3.7	0
38 \times 26	0	2.3	14.7	0.9	0

14.7 个胚; 而加入 10% 和 14% 蔗糖的培养基仅形成了 0.9~3.7 个胚, 对胚状体的诱导极少; 含 8% 和 15% 的蔗糖处理未获得胚状体。

2.2 培养基中外源激素对小孢子胚诱导的影响

表 2 表明, 培养基 B 对胚状体的发生和发育有促进作用, 显著提高了小孢子胚的诱导率和成熟胚的比例, 37 \times 88 平均每个花蕾的产胚率从 27.3 胚提高到 53.6 胚, 子叶型胚比例从 48.96% 提高到 53.79%; 38 \times 26 平均每个花蕾的产胚率从 13.9 胚提高到 26.7 胚, 子叶型胚比例从 47.72% 提高到 52.77%; 培养基 C 对胚状体的发生有一定的促进作用, 但对胚状体的发育没有促进作用; 而添加较高浓度的 6-BA 可大大降低小孢子胚的诱导频率, 培养基 D 和 E 对上述两材料小孢子胚的诱导和形成没有产生正的效果, 反而使小孢子胚诱导率下降。

表 2 不同培养基对小孢子胚状体诱导的影响

Table 2 The effect of different media on embryoid induction of microspores

培养基 Media	37 \times 88				38 \times 26			
	产胚数(个) No. of embryoid	子叶型胚数(个) No. of embryoid with cotyledon	子叶型胚比例(%) Ratio of embryoid with cotyledon	产胚率 (胚/蕾) Embryoid rate (embryoid/bud)	产胚数(个) No. of embryoid	子叶型胚数(个) No. of embryoid with cotyledon	子叶型胚比例(%) Ratio of embryoid with cotyledon	产胚率 (胚/蕾) Embryoid rate (embryoid/bud)
A	819	401	48.96	27.3	417	199	47.72	13.9
B	1608	865	53.79	53.6	801	427	52.77	26.7
C	1176	535	45.49	39.2	579	138	23.83	19.3
D	171	39	22.81	5.7	0	0	0.00	0.0
E	0	0	0.00	0.0	0	0	0.00	0.0

注: 产胚数为 30 个花蕾的胚状体总数。

Note: No. of embryoid is the total embryoid number of 30 bud.

表 3 添加活性炭对小孢子产胚率的影响

Table 3 The effect of active carbon on embryoid rate of microspore (embryoid/bud)

材料 Material	活性炭浓度(mg/mL)							
	0.00		0.05		0.10		0.50	
	产胚率 Embryoid rate (embryoid/bud)	子叶型胚率 Rate of embryoid with cotyledon	产胚率 Embryoid rate (embryoid/bud)	子叶型胚率 Rate of embryoid with cotyledon	产胚率 Embryoid rate (embryoid/bud)	子叶型胚率 Rate of embryoid with cotyledon	产胚率 Embryoid rate (embryoid/bud)	子叶型胚率 Rate of embryoid with cotyledon
37 \times 88	22.1	38.76	35.6	49.81	53.9	55.16	2.9	32.18
38 \times 26	3.5	34.29	29.7	51.85	21.3	50.23	0.0	0.00

2.3 培养基中添加活性炭对小孢子胚诱导的影响

试验结果表明(表 3), 在 NLN-13 液体培养基中添加适量的活性炭对提高小孢子胚胎发生率有明显作用, 但不同浓度、不同基因型间有差异, 37 \times 88 以添加 0.1 mg/mL 活性炭的处理最好, 可使小孢子产胚率比对照高 2 倍多; 38 \times 26 以添加 0.05 mg/mL 活性炭的处理最好, 可使小孢子产胚率提高 8 倍多。同时添加适量活性炭对提高胚状体发育整齐性也有明显作用, 经观察统计, 比未添加活性炭的子叶型胚率提高了 10% 以上。上述结果说明, 添加适量活性炭有利于促进大白菜小孢子胚状体的形成和发育, 其适宜添加量为 0.05~0.1 mg/mL。

3 讨论

3.1 蔗糖一直被认为是花药培养中最有效而不能被其他双糖所取代的碳水化合物^[4], 大白菜的花药和小孢子培养中几乎都是以蔗糖作为碳源, 用来提供能量和维持细胞渗透压, 而且普遍采用 NLN-13 培养基来进行大白菜的小孢子培养。本试验结果与前人研究相同, 蔗糖浓度为 13% 时, 对胚状体诱导和发育的综合效果好。

3.2 Lichter 报道, 在培养基中省去植物生长调节剂可提高胚产量^[5]。本试验结果表明, 培养基中添

(下转第 29 页)

含油率品种高 4.12%~6.47%，平均高 5.20%。

2.5 油研系列品种(组合)在长江上、中、下游的表现

参试长江上、中、下游的油研系列品种(组合)共有 21 个片区·次,35 个品种·次。其中,上游有 8 个片区·次,17 个品种·次,其平均含油率为 43.29%(表 10),在同组参试品种中占第 1 位的有 7 个片区·次,占参试片区的 87.5%,前 3 位的品种 12 个,占总品种次的 70.6%;长江中游参试共 5 个

片区·次,平均含油率为 44.47%,含油率在同组品种中占第 1 位的有 2 个,占 40%,前 3 位的品种 6 个,占总品种次 100%;下游参试共 8 个片区次,12 个品种·次,平均含油率为 45.14%,在同组参试品种中占第 1 位的 8 个,占参试片区的 100%,前 3 位的品种有 10 个,占参试品种 83.3%。由此看出,在上游选育的高油率品种,在长江中、下游的性状更有良好的表现。

表 10 油研系列品种(组合)在长江流域上、中、下游的含油率表现情况

片区	参试组数 (组)	参试品种数(个)	油研系列品种含油率(%)		油研系列品种在同组参试品种中位次				
			变幅	平均	占第 1 位		占第 2 位 (次)	占第 3 位 (次)	前 3 位占参试 品种总数(%)
					次	占参试组数(%)			
长江上游	8	17	39.26~45.48	43.29	7	87.5	2	3	70.6
长江中游	5	6	42.77~45.29	44.47	2	40.0	2	2	100.0
长江下游	8	12	42.24~47.32	45.34	8	100.0	1	1	83.3

3 小结

3.1 油研系列品种(组合)在参加全国和贵州 44 次区试中,含油率在 39.26%~48.42%,平均为 44.3%;其中含油率在 44%以上出现的频率达 28 次,占总次数的 63.64%,其平均含油率为 45.4%。

3.2 油研系列品种(组合)与同组其它品种相比,含油率平均高 1.85%~4.41%,44 次油研系列品种比 250 次其它品种加权平均高 3.10%。在全国和贵州参试的 25 片区·次中,其含油率排在同组第 1

位的有 21 个,占总试片区·次的 84%。

3.3 油研 10 号在全国区试和作对照的试验中,含油率分别达 44.47%和 45.14%,均居所有同时参试品种的第 1 位,表现出油研 10 号高油分的稳定性。

3.4 油研系列品种(组合)在长江上、中、下游的平均含油率分别为 43.29%、44.47%和 45.34%,表现出上游是高油分品种的在中、下游表现更好。

(责任编辑:高红卫)

(上接第 25 页)

加一定浓度的植物生长调节剂(0.05mg/L 6-BA 和 0.10mg/L NAA)可以提高大白菜小孢子胚的诱导率和成熟胚的比例,这可能是由于试材不同造成的。这一研究结果与余凤群的研究结果一致^[3]。但加入较高浓度的 6-BA(0.2~0.5mg/L 6-BA)对小孢子胚胎发生具有抑制作用。

3.3 在培养基中添加 0.05~0.1mg/mL 的活性炭有利于促进小孢子胚状体的形成和发育。一是提高了小孢子胚胎发生率。二是能提高子叶型胚率,尤其是胚胎发生率高时,效果更显著。其原因主要是由于小孢子培养过程中有一些毒素物质产生,抑制了胚胎发生和发育,活性炭起到吸附有毒物质的作用,并且不同基因型产生的有毒代谢产物的量有差异,因而不同基因型对添加活性炭的反应也不完全一样。Gland 等^[6]在油菜小孢子培养中也发现添加活性炭可促进胚的发育。

影响胚状体诱导率的因素很多,本试验研究了培养基成分中蔗糖浓度、外源激素和添加活性炭对小孢子胚状体形成和发育的影响。但还有很多因素

如培养基的 pH 值、热激处理的温度和时间、采蕾期的时间、温度等因素都影响着胚状体的发生和发育,还需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 余凤群,刘后利. 供体材料和培养基类型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):327-331.
- [4] 余凤群. 芸薹属植物未成熟小孢子培养技术的研究和应用[J]. 中国油料作物学报,1994,16(2):70-73.
- [5] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *rassica napus*[J]. Z Pflanzenphysiol,1982(105):427-434.
- [6] Gland A, Lichter R, Schweiger H G. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus*[J]. Plant Physiol,1988,132:613-617.

(责任编辑:聂克艳)