

单倍体育种技术在油菜育种材料创新上的应用研究*

I. 甘蓝型油菜游离小孢子胚状体的诱导发生

饶勇¹ 徐涵³ 毛堂芬² 李超¹ 陈静¹ 肖华贵¹

(1 贵州省农业科学院油料研究所 贵阳 550006; 2 贵州省农业科学院生物技术研究所 贵阳 550006;)

(3 Institut de la Recherche Interdisciplinaire de Toulouse, France)

摘要: 利用游离小孢子培养技术,对9个甘蓝型杂交油菜(品种)组合的F₁代进行离体小孢子培养。2月底,当供体植株的第一朵花开时,取长度在2.5~3.5mm的花蕾通过离心分离出小孢子,并在NLN13液体培养基中浅层培养诱导胚状体产生,培养30天左右,可见到多种类型的胚状体产生。其中,黔杂991、黔杂271和黔杂18分别诱导出了30个、12个和2个胚状体,其余组合未能产生胚状体。表明:不同基因型材料,不同培养密度和不同生理状态,其小孢子胚状体产生的频率差异较大。

关键词 单倍体育种技术 杂种一代
游离小孢子 胚状体

游离小孢子培养是植物单倍体育种的重要手段之一,通过单倍体染色体加倍,可迅速获得纯合的2倍体,成为遗传稳定的品系。自Lichter等(1982)首次进行甘蓝型油菜游离小孢子培养和植株再生获得成功以来,国内外已进行了较多的应用研究^[1-7,10],一些研究者已建立起了较为成功的培养技术体系^[4-7]。但在国外,一般供体植株均种在人工气候室中,有利于对其各生长期进行调控。本研究是供体植株种植在自然条件下,研究其胚状体诱导发生、胚状体苗的培养及试管苗继代越冬、染色体加倍及田间移栽等配套方法和技术体系,以加快油菜育种进程,缩短育种周期,提高育种水平。本文主要对不同基因型材料、小孢子发育时期和接种密度、不同生理状态对游离小孢子胚状体发生的影响加以报导。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为黔杂991、黔杂271、黔杂18、黔杂208、黔杂209、黔杂903、RX901、RX905、RX106。

1.2 方 法

1.2.1 花蕾的选择和采集

当供体植株第一朵花开时,取主花序上长度在2.5~3.5mm的花蕾,用解剖镜检查可见花药为淡绿色透明状,用45%醋酸洋红压片检查花粉发育时期,可见有的花粉正处于单核靠边期,有的处于双核初期或双核期,本试验选取正处于单核靠边期的花蕾。这样的花蕾在每个主花序上约6~10个。

1.2.2 花蕾消毒

将采集的花蕾用70%的乙醇消毒20~30s,转入7%的NaClO溶液中浸泡10~15min,然后用无菌水洗涤三次,每次5min。

1.2.3 培养基

pH=5.8~6.0,小孢子提取液采用B5培养液,诱导小孢子胚状体产生用蔗糖浓度为13%的NLN培养液(也称NLN13培养基)。

1.2.4 花粉小孢子游离及收集

将消毒好的花蕾置于小烧杯中,加B5培养液,用小三角瓶将小孢子压出,通过300目尼龙网膜过滤到离心管里,于800r/min下离心2min,去掉上清液;再加入B5培养液,于1000r/min下离心1min,去掉上清液;再加B5培养液,于1000转/分的转速下离心1min,重复2次,最后倒出上清液,向离心管中加入少量NLN液体培养基,分装到60mm×15mm的培养皿中培养。

1.2.5 游离花粉小孢子培养

将盛有游离花粉小孢子的培养皿放于25℃的黑暗培养箱中,采用液体浅层静置培养。

2 试验结果

在供试的9个材料中,共选摘169个合适的花蕾。通过花粉小孢子在悬浮液中培养,8天后观察,发现有3个材料的小孢子已部分分裂为两个细胞(图1),即黔杂991、黔杂271和黔杂18。培养15天后,可见分离小孢子体积继续膨大并同时出现4个细胞的花粉粒。培养20天观察到3个材料的花粉小孢子形成了多细胞团(图2)。特别是黔杂991和黔杂271,几乎每个培养皿里都有多细胞团。培养23天可见到细胞团进一步长大形成球形和心形胚状体。培养30天左右肉眼可见到多种类型的胚状体发生(图3)。其中黔杂991的10个花蕾诱导出30个胚状体,黔杂271的31个花蕾诱导出12个胚状体,黔杂18的10个花蕾诱导出2个胚状体。



图1 图2 图3

2.1 不同基因型材料对小孢子胚状体的产生的影响

从表1可知,9个供试材料中,有3个获得了胚状体,占30%,平均每蕾产胚量变化在0~30个胚之间。其中黔杂991的产胚量最高,达30个。这些结果表明:不同基因型材料对小

* 教育部留学回国学者基金资助,留法学者援黔服务团合作项目

孢子胚状体发生能力有较大影响,这与前人研究结果相符^[1,3,7]。

2.2 小孢子不同培养密度对产胚量的影响

由表 2 知:小孢子不同培养密度(每个培养皿 5ml 液体培养基中含有 1 个、2 个、3 个、4 个和 5 个花蕾)其产胚量不同,结果表明:在 $\Phi 60\text{mm} \times 15\text{mm}$ 的培养皿中加培养 2 个花蕾,产胚量最高,若每个培养皿中低于 2 个花蕾或者超过 2 个花蕾,其成胚率都将下降,甚至不能形成胚状体。

表 1 不同基因型材料产胚量的差异

材料	花蕾数 (个)	胚状体数 (个)	小孢子产胚率 (胚数/10 蕾)
黔杂 991	10	30	30.0
黔杂 271	31	12	12.0
黔杂 18	10	2	0.6
黔杂 208	22	0	0
黔杂 209	20	0	0
黔杂 903	15	0	0
RX901	23	0	0
RX905	18	0	0
RX106	16	0	0

表 2 不同培养密度对产胚量的影响

平均产胚量 密度	材料								
	黔杂 991	黔杂 271	黔杂 18	黔杂 208	黔杂 209	黔杂 903	Rx 903	RX 905	RX 106
1 个花蕾/皿	1.5	1	1.0	0	0	0	0	0	0
2 个花蕾/皿	6	4	3	0	0	0	0	0	0
3 个花蕾/皿	2.67	1.5	1.4	0	0	0	0	0	0
4 个花蕾/皿	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5 个花蕾/皿	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.3 小孢子发育时期对产胚量的影响

从表 3 知:分别在 2 月 26 日、2 月 27 日、3 月 1 日、3 月 5 日取相同供体材料进行小孢子培养,黔杂 271 在 2 月 27 日取材,黔杂 991 和黔杂 18 在 3 月 1 日取材为最适取材时期,其他时间取材则降低产胚量(表 3)。

表 3 不同发育时期对产胚量的影响

平均产胚量 密度	材料								
	黔杂 991	黔杂 271	黔杂 18	黔杂 208	黔杂 209	黔杂 903	Rx 903	RX 905	RX 106
2 月 26 日	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 月 27 日	0	12	0	0	0	0	0	0	0
3 月 1 日	30	0	2	0	0	0	0	0	0
3 月 5 日	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3 小结与讨论

本试验结果表明:单双倍体植株可以通过游离小孢子培养获得,在 9 个供试材料中,只有少数材料通过小孢子培养能发育成鱼雷形胚状体并成长为植株,说明不同基因型材料产生小孢子胚状体的数量不同,不同发育时期相同供体植株进行小孢子培养,只有处于单核靠边期的花粉粒能产生胚状体。研究还

发现,不同接种密度对产胚率也有影响,在每个培养皿($\Phi 60\text{mm} \times 15\text{mm}$)中培养 2 个花蕾效果最好,每个培养皿低于或者超过 2 个花蕾其成胚率下降,甚至不能形成胚状体。本研究还发现,供试的 9 个材料中,只有 3 个材料形成了胚状体,其它 6 个材料一个胚状体都没有形成,这除了与材料的基因型有关外,可能与实验操作有关:在用 7% 的 NaClO 消毒时,浓度过高,一些材料可能因脱水失去活性;在离心提取小孢子时,离心速度过高,时间过长,部分小孢子被压死;在用培养皿培养时,培养皿没有进行震荡,降低了胚状体的诱导发生。同时,我们采用的自然条件下的供体植株,材料的小孢子发育同步性可能较差,这或许会影响产胚量的结果,所有这些都还有待进一步研究。另外,据余凤群、官春云和陈军研究,供试材料生长条件、供试材料低温处理、小孢子培养条件、激素、培养基组成也影响胚状体的发生^[1-3,8-9,11]。

参考文献

- 1 余凤群,刘后利 供体材料和培养基成分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
- 2 余凤群,刘后利 甘蓝型油菜游离小孢子培养中挽救小胚状体的研究 华中农业大学学报,1995,14(6): 522~ 525
- 3 官春云 油菜小孢子培养和双倍体育种研究: 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
- 4 陈军,陈正华,刘澄清等 甘蓝型油菜游离小孢子培养的胚状体发生[J] 遗传学报,1995,(22)4: 307~ 315
- 5 Licher R. Induction of haploid plants from Isolated pollen of Brassica napus Z Pflanzenphysiol Bd 105 S 1982: 427-434
- 6 Wong R., S. C., S. Y. Zee, E. B. Swanson. Isolated Microspore Culture of Chinese Flowering cabbage [J] plant cell report, 1996, 15: 396- 400
- 7 Mathias R. An Improved in vitro culture procedure for Embryoids Derived from Isolated Microspores of Rape (Brassica napus L.), 1992, 100: 320- 322
- 8 石淑稳,周永明,吴江生等 甘蓝型油菜小孢子培养染色体加倍、试管苗继代越冬和田间移栽配套技术的研究及其在油菜育种中的应用 中国农学通报,2001,17(2): 57~ 59
- 9 石淑稳,刘后利 甘蓝型油菜及其种间和属间杂种小孢子胚状体的诱导 华中农业大学学报,1993,12(6): 544~ 550
- 10 余凤群 芸苔属植物未成熟小孢子培养技术的研究和应用 中国油料,1994,16(2): 70~ 73
- 11 朱应泽,刘玉贞,汪良中等 人工合成甘蓝型油菜游离小孢子培养及其植株再生研究初报 四川农业大学学报,1999,17(2): 167~ 171