

2.6 C_i 值大小排序

由表 4 可以看出, C_i 值与产量序值有差别。考虑到本地区植棉的经济效益, 中 51504、鲁棉研 16 号这两个品种的 C_i 值分别为 1、2 位, 主要表现为霜前花率、衣分高, 高产、稳产性好, 特别是中 51504, 尽管产量居第三位, 但枯萎病指和马克隆值接近理想解, C_i 值跃为第一位, 这两个品种在本地区有进一步示范和推广价值; ZGK9708 虽然产量位于第二位, 但由于其生育期、枯萎病指和马克隆值与理想解有一定的差距, C_i 值位于第三位; 渝棉 1 号为高品质棉, 品质各性状接近或等于理想解, 但由于该品种产量和稳产性与理想解相差较大, 故 C_i 值排列第五, 25 系和冀 668 在产量、衣分、黄萎病指、马克隆值、稳产性等性状与理想解相差较大, 故其 C_i 值分列第七和第六位, 而且这三个品种的 C_i 值均低于对照中棉所 35。

3 讨论

3.1 根据 C_i 值的大小, 本地区 4 点区试试验中, 中 51504 和鲁棉研 16 号这两个品种综合性状表现优良, 有进一步推广价值。

3.2 运用 DTOPSIS 法综合评价作物品种, 使品种的综合性状这一模糊指标量化为该品种的相对接近度

C_i , 为预测新品种提供了较为客观的量化指标, 而且原理简单, 计算简便, 易于通过微机应用 EXCEL 软件操作。

3.3 DTOPSIS 法采用了正向和逆向指标, 使各性状的量化指标更为合理、客观。

3.4 由于各地生态和生产限制因素的不同, 受植棉经济效益、市场对棉花品质要求的影响, 在人为确定综合评价的性状指标和权重时, 各地差异较大, 而这也是 DTOPSIS 法评价品种的关键所在, 也是造成评价产生差异的主要原因, 因此评价指标和权重的确定, 要结合当地的生态条件和生产的实际情况而定。

参考文献

- 1 魏明森, 陈蓉娟 棉花品种的多级模糊综合评定方法[J]. 中国棉花, 1986, (5): 18~ 22
- 2 刘录祥, 孙其信, 王士芸 灰色系统理论应用于作物新品种综合评估初探[J]. 中国科学, 1989, 22(3): 22~ 27
- 3 王国印 模糊概率在棉花品种综合评估中的应用初探[C]. 第二届全国青年作物遗传育种学术会文集, 北京: 中国科学技术出版社, 1992: 150~ 153
- 4 卢为国, 李卫东, 梁慧珍等 DTOPSIS 综合评价大豆新品种的初步探讨[J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(3): 22~ 26
- 5 刘辉 应用 DTOPSIS 法对棉花新品种综合评估初探[J]. 中国棉花, 2001, 28(8): 13~ 15
- 6 温振民 用高稳系数法分析玉米杂交种高产、稳产性的探讨. 作物学报, 1994(4): 508~ 512

单倍体育种技术在油菜育种材料创新上的应用研究^{*}

II. 胚状体培育及试管苗越冬

李超^{**} 饶勇¹ 陈静¹ 肖华贵¹ 毛堂芬² 徐涵³

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

3 Institut de la Recherche Interdisciplinaire de Toulouse, France)

摘要: 利用游离小孢子培养技术对 9 个甘蓝型油菜品种(组合)的 F_1 代进行离体小孢子培养。在 NLN-13 培养基中诱导胚状体发生, 将胚状体放置于含有多菌灵和链霉素的培养基中培养, 结果表明: 20mg/L 浓度的多菌灵和链霉素可以提高胚状体的成苗率。将胚状体接种于含有 0.05mg/L 2, 4-D 和 0.01mg/L 6-BA 的 MS 培养基中培养, 愈伤组织能快速分化形成不定根和丛芽。

关键词 油菜 单倍体 胚状体 育种

游离小孢子培养是将花粉培育成单倍体植株, 其染色体是自然或人工加倍得到纯合二倍体的一种育种方法。这种染色体加倍产生的纯合二倍体, 在遗传上非常稳定, 不发生性状分离, 形成性状稳定一致的近等基因系(DH 系), 为遗传育种研究提供良好的育种材料。应用这一技术, 能缩短育种年限, 加速育种进程, 转接优良基因^[1-3]。由于单倍体选择的显性方差减少, 加性方差成倍增加, 所以, 在同一选择周期中, 单倍体选择

* 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。

** 作者简介: 李超(1977-), 男, 研究实习员, 从事油菜遗传育种研究。

效率要比二倍体高得多^[4]。因此,单倍体育种技术在油菜育种材料创新上的应用在国内外倍受关注。

胚状体是指在组织培养过程中,一个非合子细胞通过与合子胚相似的胚胎发生过程所形成的胚状体结构,从胚状体可以培育成完整的植株,这是植物细胞全能性的最强有力的证据。国外,1982年Lichter^[5]把甘蓝型油菜的小孢子从花蕾中分离出来,培养在液体培养基中并获得了胚状体,他为以后油菜小孢子的成功培养开辟了新的途径。在我国,1990年钟维瑾等^[6]从甘蓝型油菜小孢子也获得了单倍体植株,1992年在实验室进行甘蓝型油菜小孢子培养技术研究并获得再生植株,随后,一些大学和科研单位也分别从甘蓝型油菜小孢子中诱导出了单双倍体植株。但是,该技术在我国油菜遗传育种中应用的规模和效率远远低于国外,因小孢子胚状体成功培育成植株的难度较大,当小孢子胚状体发育成试管苗时,油菜的最适生长季节已过,不能及时栽入大田,只能在室内不断转接培养以度过酷暑。本研究旨在利用自然条件下的供体植株,探索油菜胚状体培养及试管苗越夏繁殖技术,为提高油菜小孢子胚状体成苗率提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

以甘蓝型杂交油菜黔杂 991、黔杂 271、黔杂 18、黔杂 2008、黔杂 2009、黔杂 9003、黔杂 9105 九个组合的 F₁ 代为材料,于 2001~2002 年度种植在贵州省农业科学院油料研究所试验地,栽培管理与一般大田相同。

1.2 方法

2002 年 2 月 26 日,摘取主花序上 3.0~3.5mm 的花蕾,用 70% 酒精消毒 20~30s 后,经 7% NaClO 消毒 10min,无菌水洗涤 3 次(每次 5min),再加 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 的速度下离心 2min,去掉上清液;再加入 B₅ 培养液,于 1000r/min 的转速下离心 1min,去掉上清液;再加 B₅ 培养液,于 1000r/min 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 13 液体培养基,分装到 60mm × 15mm 的培养皿中培养。每个培养皿中盛 4ml 小孢子悬浮液,密封后先在 32℃ 黑暗条件下培养 48h,后转移到 25℃ 暗培养直至胚状体出现。将胚状体转移至 MS 固体培养基中,放置于 10h 光照,25℃ 的培养箱中培养,在越夏处理试验中,培养基以 MS 培养基为基础,附加不同药物和激素。

2 结果与分析

2.1 胚状体在 MS 固体培养基上的发育

小孢子在暗培养 30d 后发育成胚状体,将胚状体转接到 MS 固体培养基上,于光照培养箱培养 5~10d,胚状体如同种子萌发一样,子叶颜色由黄变绿,两极萌动,胚根伸长,并长满白色根毛。进一步培养,30d 后观察,胚状体发育成具有 2~4 片真叶的小植株,但有的胚状体形成茎状绿色组织,这是由于子叶型、鱼雷型及心型胚状体两极发育正常,一端形成胚根,一端形成胚芽,具有二裂片子叶结构,再生植株频率高。而球形胚状体和畸型胚状体转移到培养基后,分化不完全,有的只长根不分化苗,有的颜色变褐而死,有的形成白化苗。这在水稻等谷类植物上也有类似的报道^[3],因此胚状体发育成植株的频率取决于胚状体的类型。

2.2 多菌灵和链霉素对胚状体成苗的影响

将形成的愈伤组织转接于 MS 固体培养基中,其中一部分培养基中添加 20mg/L 的多菌灵和 20mg/L 链霉素,另一部分培养基中不加任何药物,研究结果发现,加药物的培养基中,小苗没有被污染或很少污染,成苗率达 95% 以上;而没有加药物的培养基中,培养 7~10d 只有 75%~80% 的胚状体发育成苗,从表 1 可看出:20mg/L 浓度的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。

表 1 多菌灵和链霉素对胚状体成苗的影响

材料	黔杂 991		黔杂 271		黔杂 18	
	药物处理	无药物	药物处理	无药物	药物处理	无药物
胚状体(个)	9	9	5	5	1	1
培养基(个)	3	3	3	3	1	1
愈伤组织(个)	3	3	3	3	1	1
丛芽(个)	41	39	20	24	4	5
分装(瓶)	41	39	20	24	4	5
10 天 后 观 察						
成苗数(个)	39	28	19	18	4	4
成苗率(%)	95%	72%	95%	75%	100%	80%
死亡数(个)	2	11	1	6	0	1
死亡率(%)	5%	28%	5%	25%	0	20%

注:药物处理为 20mg/L 浓度的多菌灵和链霉素,在药物处理中发现死亡的胚状体苗属自然死亡,在三角瓶中未发现细菌感染植株。

2.3 激素对小孢子胚状体发育和试管苗繁殖的影响

据部分文献资料报道^[6,8-12],在油菜小孢子胚状体发育成苗和试管苗越夏繁殖过程中均不添加任何激素,仅在小孢子培养时加一些低浓度的 2,4-D 或 6-BA,有利于诱导胚状体的发生。因此,本试验,在供愈伤组织生长发育的部分培养基中加入不同比例的 2,4-D 和 6-BA,结果发现,在没有加激素的培养基中,愈伤组织培养 26d 后出现绿色芽点,分化出一些毛发状

的不定根和丛芽,当丛芽生长至 2~3cm 时,转移至增殖培养基中增殖培养,分化出更多的丛芽,如此循环增殖出更多的丛芽。切取丛芽转移到生根培养基上培养 8d,在 不定芽的茎基部分化出不定根,取根芽正常的试管苗移栽,获得了成活植株,成活率达 100%。研究同时发现(表 2):不同比例的激素对胚状体发育成苗有一定的影响,在含有 0.05mg/L 的 2,4-D 和 0.01mg/L 的 6-BA 的培养基中,愈伤组织能快速分化形成不定根和芽,最终长成试管苗。

表 2 激素对黔杂 991 胚状体的发育及胚状体苗的影响

激素(mg/L)	不定根数(个)	丛生芽数(颗)
0.01 2,4-D	3	5
0.05 2,4-D	8	4
0.10 2,4-D	6	2
0.01 6-BA	1	10
0.10 6-BA	0	4
0.20 6-BA	3	11
0.30 6-BA	2	8
0.05 2,4-D+0.01 6-BA	7	8
0.01 2,4-D+0.2 6-BA	10	5
0.01 2,4-D+0.3 6-BA	9	3

由表 2 可知,加入不同浓度的 2,4-D 和 6-BA 对胚状体根和芽的分化均有一定的影响,当加入 0.01mg/L 和 0.05mg/L 的 2,4-D 时,分别有利于丛芽和根的分化;当加入 0.2mg/L 的 6-BA 时,有利于丛芽和根的同时分化;当同时加入 0.05mg/L 和 0.01mg/L 的 2,4-D 和 6-BA 时,有利于丛芽的分化,同时加入 0.01 和 0.2mg/L 的 2,4-D 和 6-BA 时,有利于根的分化。

2.4 试管苗的越夏繁殖

将继代繁殖的试管苗切取组织进行增殖培养,扩大试管苗的数量,如果不能及时入土栽培,可加入矮壮素,让植株减慢生长,到需要移栽的时候,将健壮的试管苗转移到生根培养基上培养,使其生根长芽,形成完整植株。当植株长到 5~7cm 时,对需移栽的植株进行常温炼苗处理,2~3d 后便可移栽到土壤中。

3 小结与讨论

(1)通过该试验,我们成功培育出胚状体以及胚状体苗,并培养出完整植株。在供试的 9 个材料中,只有三个材料培养出了胚状体,占供试材料的 33%,其余 6 个材料没有形成胚状体,这可能与材料的基因型、小孢子发育时期等因素有关^[2]。

(2)20mg/L 浓度的多菌灵和链霉素可以提高胚状体的成苗率。

(3)将胚状体接种于含有 0.05mg/L 2,4-D 和 0.01mg/L 6-BA 的 MS 培养基中培养,愈伤组织能快速分化形成不定根和丛芽。

(4)进行单倍体培养在作物品种选育上,可加快纯合速度,提高选择效率。用传统方法选育常规品种,一般要经过 5~7 代的自交,方可育出稳定的品种;选育杂交品种,要先育出大量的自交系,自交系的选育也要有 6 代以上的自交,费工费时。而培育出单倍体植株后,通过化学药剂处理使染色体加倍,成为纯合的二倍体,就可大大缩短育种时间;此外依靠传统方法不论是选育定型品种还是选育自交系,均存在植株表现型和基因型不一致的问题,选择效率很低;用单倍体培养育种,植株的基因型和表现型完全一致,通过表现型即可判断出是什么基因型,大大降低了误选的频率。

单倍体培养还可提高诱变育种的效率。在诱变育种中,由于基因突变的机率很低,有时发生突变的是一个隐性基因,从植株上不能直接表现出来,这就需要种植大量的植株。以单倍体植物作诱变材料,突变隐性基因就可表现出来,获得突变体的速度可大大加快,育种时间也可以缩短。

参考文献

- 李梅芳. 水稻花培育种前景. 作物杂志, 1991, (3): 17~18
- 饶勇, 徐涵. 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. 种子, 2003(1): 66~67
- 倪丕冲. 我国水稻花培育种及其应用. 农业科技通讯, 1991, (5): 5~6
- 刘鸿艳, 郑成术. 花药培养育种研究进展. 热带农业科学, 2001, 1: 61~64
- Licher R. Induction of haploid plants from Isolated pollen of Brassica napus. Z Pflanzenphysiol Bd 105. S 1982: 427-434
- 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
- 钟维瑾, 方光华, 唐克轩等. 甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 游离小孢子培养诱导胚状体再生植株. 上海农业学报, 1990, 6(4): 11~16
- 余风群, 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
- 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、试管苗继代越夏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
- 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
- 李秀萍, 杜德志. 春性甘蓝型油菜小孢子培养技术初探. 青海农林科技, 1997(3): 17~19
- 余风群, 刘后利. 提高甘蓝型油菜小孢子胚状体成苗率的某些培养因素研究. 作物学报, 1997, 23(2): 165~168