

甘蓝和青花菜杂种小孢子培养

陈文辉, 方淑桂, 曾小玲, 朱朝辉, 廖晓珍

(1. 福州市蔬菜科学研究所, 福州 350012)

摘要:对甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*) × 青花菜(*Brassica oleracea* var. *italica*)的 20 个杂种及相应的父母本进行游离小孢子培养, 并对影响甘青杂种小孢子胚胎发生的主要因子进行探讨, 适于小孢子培养的培养基为 1/2NLN, 附加 0.5 mg L⁻¹ NAA、0.05 mg L⁻¹ BA、5 mg L⁻¹ AgNO₃、0.2 mg L⁻¹ 2,4-D 和 0.1 mg L⁻¹ 活性炭。结果有 14 个杂种能产生胚状体, 诱导率 70%; 不同杂种间小孢子胚胎发生频率存在很大差异, 最高的是绿洲 808 × 夏宝, 平均每蕾 16.2 个胚。诱导杂种胚状体发生的最佳时期是小孢子单核靠边期至双核期, 34 °C 热激 2 d 有利于小孢子细胞对称分裂。在含糖 170 g L⁻¹ 的液体培养基中培养 3 d, 添加低糖 (含糖 110 g L⁻¹) 的培养液, 可显著提高出胚率。

关键词:甘蓝; 青花菜; 杂种; 小孢子培养

中图分类号: S 635.036

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)04-0321-06

Isolated-microspore Culture of F₁ Hybrids between *Brassica oleracea* var. *capitata* and var. *italica*

CHEN Wen-hui, FANG Shu-gui, ZENG Xiao-ling, ZHU Chao-hui, LIAO Xiao-zhen

(1. Fuzhou Institute of Vegetable Research, Fuzhou 350012, China;)

Abstract: Microspore culture of twenty F₁ hybrids between cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) and broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and their corresponding parents were carried out, and the major factors affecting microspore embryogenesis was investigated. Liquid medium 1/2NLN was used for microspore culture, which contained 0.5 mg L⁻¹ NAA, 0.05 mg L⁻¹ BA, 5 mg L⁻¹ AgNO₃, 0.2 mg L⁻¹ 2,4-D and 0.1 mg L⁻¹ active carbon. Results showed that fourteen F₁ hybrids could produce embryoids, the induced frequency being 70%. The highest embryo producing rate appeared in 'Luzhou808 × Xiabao' with averaging 16.2 embryos developed per flower bud. The optimum period of microspores for embryoid development was from late uninucleate (late anaphase I) stage to binucleate (anaphase II) stage. The heat-shock treatment at 34°C for 2 days was beneficial for stimulating symmetric unclean division of microspore cells. The embryo production was significantly increased in liquid medium containing 170 g L⁻¹ sucrose for 3 days and then by adding low sucrose content (110 g L⁻¹).

Key words: *Brassica oleracea* var. *capitata*; *Brassica oleracea* var. *italica*; Hybrid; Isolated-microspore culture

结球甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) 和青花菜 (*Brassica oleracea* var. *italica*) 是芸苔属甘蓝的两个变种, 两者杂交易获杂交种子。青花菜富含维生素, 品质口感均优。为培育新的甘蓝种质资源, 将青花菜的品质性状转入甘蓝, 育成优质的甘蓝新

品种, 用常规方法要进行杂交、回交和自交分离, 需好几个世代才能选育出理想的材料。而用游离小孢子培养方法对甘青杂种进行培养, 利用小孢子数量多、在离体培养过程中易发生突变、选择机会大和自然加倍率高等特点, 可快速获得双单倍体纯系,

收稿日期: 2005-12-12 接受日期: 2006-03-27

基金项目: 福建省科技厅重大项目 (2003N022) 资助

缩短育种年限并提高育种效率。自 Lichter^[1]首次从甘蓝型油菜小孢子培养获得胚状体后,国内外已相继在油菜、白菜、青花菜、甘蓝、萝卜等芸苔属作物上获得成功^[2-4],并被用于种间杂种的研究^[5,6],但迄今尚未有甘蓝变种间杂种小孢子培养的报道。本试验对甘蓝、青花菜及其 F₁ 代进行小孢子培养,对影响杂种小孢子胚胎发生的有关因子进行了研究,旨在建立甘青杂种小孢子培养的高效技术体系,为甘蓝优质育种提供新的途径。

1 材料和方法

1.1 供试材料

10 个甘蓝品种与易出胚的青花菜绿洲 808 经正、反交后的杂交一代(F₁)及相应的亲本共 31 份为试材(表 1),在自然条件下栽培,2004 年 8 月上旬播种,9 月上旬定植,2005 年 1 月中旬至 4 月上旬供体材料陆续开花进行试验。

1.2 亲本及杂种小孢子培养

为确定甘青杂种小孢子培养的适宜培养基,以芸苔属游离小孢子培养常用的 Lichter^[1]修改的 NLN 培养基为基础,对大量元素、蔗糖浓度、激素和生长素作不同水平的试验,结果 1/2 NLN-14(大量元素减半、蔗糖含量 140 g L⁻¹)添加 0.5 mg L⁻¹ NAA、0.05 mg L⁻¹ BA、5 mg L⁻¹ AgNO₃、0.2 mg L⁻¹ 2,4-D 和 0.1 mg L⁻¹ 活性炭的培养基最好。因此,利用以上筛选出的 1/2 NLN-14 培养液作基本培养基。小孢子分离培养基本上参照常规的方法和程序进行^[7,10],将离心后的小孢子悬浮于经过滤灭菌的培养基中,用血球计数器将小孢子密度调整为 1.5×10⁷ 个 ml⁻¹,分装于直径为 6 cm 的培养皿中,每皿 3 ml,用 Parafilm 膜封口,置于黑暗中进行 34℃ 热激预处理 48 h,然后于 25℃ 的黑暗条件下静止培养。

1.3 小孢子发育时期的试验

用绿洲 808 与夏宝的正反交 F₁ 为材料,在盛花初期取 2.6–3.5、3.6–4.5、4.6–5.5、5.6–6.5 mm 长度的花蕾,分别进行分离,取沉淀物用醋酸洋红染色,在显微镜下观察花蕾长度与小孢子发育时期的关系,每个指标观察 2 个视野,统计各时期的小孢子数量,并分别进行培养。

1.4 热激预处理

将接种了绿洲 808×夏宝的 F₁ 小孢子的培养皿分别在 32℃、33℃、34℃、35℃ 下进行 24 h、48 h 的热激处理,以在 25℃ 恒温下培养为对照。

1.5 更新和加液培养

用绿洲 808×夏宝的 F₁ 小孢子进行更新或加液培养试验。更新培养液培养设 3 个处理:初始用含蔗糖 170 g L⁻¹ 的培养液培养 3 d 后重新离心(800 r min⁻¹),分别更换含蔗糖 170 g L⁻¹、140 g L⁻¹ 和 110 g L⁻¹ 的培养液继续培养。加液培养设 1 个处理:即初始用蔗糖 170 g L⁻¹ 的培养液 1.5 ml 培养,3 d 后添加等量的含蔗糖 110 g L⁻¹ 的培养液培养。以一直在蔗糖 140 g L⁻¹ 的培养液中培养的为对照。

1.6 胚状体的发育与植株再生

培养至出现肉眼可见胚状体时,置摇床进行振荡(60 r min⁻¹)暗培养,形成子叶形胚状体时,进行光照(24℃ 16 h d⁻¹)培养,1 周后转到含 20 g L⁻¹ 蔗糖和 12 mg L⁻¹ 琼脂无激素的 MS 分化培养基上培养,长出不定芽后转到 20 g L⁻¹ 蔗糖、0.1 mg L⁻¹ IBA 的 1/2MS 生根培养基上培养。

以上试验均取 20 个花蕾,培养 5 皿,3 个重复。培养过程中用倒置显微镜观察小孢子发育情况,光照培养前统计出胚情况,并用邓肯新复极差法进行产胚量间差异显著性测定。

2 结果和分析

2.1 不同亲本和杂种的胚胎发生

结球甘蓝与其它芸苔属作物相比,其游离小孢子培养是最不容易诱导成功的材料之一,许多甘蓝基因型对培养无反应,少部分有反应的产胚量也极低^[1,2,8]。在本试验条件下,10 个甘蓝品种只有 4 个产生胚状体,且出胚率低,平均每蕾只有 0.5–6.1 个,其余 6 个材料经多次重复试验均无反应(表 1)。

绿洲 808 青花菜每个花蕾产胚 25.6 个,是出胚率高的基因型。

供试 20 个 F₁ 材料中有 14 个能产生胚状体,出胚率为 70%。但不同 F₁ 小孢子培养出的胚量差异显著,最高的是绿洲 808×夏宝,平均每蕾 16.2 个,最低的是绿洲 808×秋绿,平均每蕾 1.6 个,相差 10 倍(表 1)。试验观察发现:(1)不同杂种小孢子出胚快慢

表1 亲本及正反交杂种胚胎发生情况
Table 1 Embryogenesis in parents and reciprocal hybrids

亲本 Parents	来源 Origin	胚* Embryo	正交杂种 Cross	胚* Embryo	反交杂种 Reciprocal cross	胚* Embryo
夏宝 Xiabao	中国 China	6.1 A	夏宝×绿洲808 Xiabao×Luzhou808	15.8 A	绿洲808×夏宝 Luzhou808×Xiabao	16.2 A
珍宝 Zhenbao	日本 Japan	3.0 B	珍宝×绿洲808 Zhenbao×Luzhou808	8.8 B	绿洲808×珍宝 Luzhou808×Xiabao	8.6 B
丹麦王 Danmai wang	日本 Japan	1.0 C	丹麦王×绿洲808 Danmai wang×Luzhou808	6.1 C	绿洲808×丹麦王 Luzhou808×Danmai wang	6.0 C
怡夏 Yixia	香港 H.K.	0.5 D	怡夏×绿洲808 Yixia×Luzhou808	4.3 D	绿洲808×怡夏 Luzhou808×Yixia	4.5 D
四季获 Sijihuo	日本 Japan	0	四季获×绿洲808 Sijihuo×Luzhou808	2.4 E	绿洲808×四季获 Luzhou808×Sijihuo	2.3 E
早丰 Zaofeng	日本 Japan	0	早丰×绿洲808 Zaofeng×Luzhou808	2.3 E	绿洲808×早丰 Luzhou808×Zaofeng	2.0 E
秋绿 Qiulu	日本 Japan	0	秋绿×绿洲808 Qiulu×Luzhou808	1.8 F	绿洲808×秋绿 Luzhou808×Qiulu	1.6 F
夏丸 Xiawan	日本 Japan	0	夏丸×绿洲808 Xiawan×Luzhou808	0 G	绿洲808×夏丸 Luzhou808×Xiawan	0 G
夏光 Xiaguang	中国 China	0	夏光×绿洲808 Xiaguang×Luzhou808	0 G	绿洲808×夏光 Luzhou808×Xiaguang	0 G
夏王 Xiawang	中国 China	0	夏王×绿洲808 Xiawang×Luzhou808	0 G	绿洲808×夏王 Luzhou808×Xiawang	0 G
绿洲808 Luzhou808	中国 China	25.6				

同栏数据后不同大写字母表示在0.01水平上差异极显著。*表示每个花蕾诱导的胚数。Different letters within a column indicate significant differences at $p=0.01$. *Number of embryos per flower bud.

差异很大,最快出胚的是夏宝×绿洲808,13 d用肉眼就能见到胚状体,而最慢的是秋绿×绿洲808,40 d才能见到。同时,出胚早的材料出胚率高,胚状体生长快,发育正常,畸形胚少。(2)杂种小孢子培养在个体间发育进程表现出明显的不同步性,夏宝×绿洲808的 F_1 培养3周,大的子叶形胚长约3~4 mm,而最小的球形胚仅0.1 mm(图版1:A-D)。(3)亲本相同的 F_1 正反交材料出胚率没有明显差异,杂种的出胚率介于父母本之间。(4)在青花菜为亲本之一条件下,甘青杂种的胚胎发生与甘蓝亲本关系密切,对培养无反应的甘蓝亲本的 F_1 出胚率低或不出胚,有反应的甘蓝亲本 F_1 都能出胚,出胚率高的 F_1 出胚率也高,成正比例关系。

2.2 小孢子不同发育阶段对胚胎发生的影响

以夏宝×绿洲808正反交 F_1 为材料,比较各时期小孢子培养的出胚量。观察结果表明,只有单核靠边期和双核期的小孢子能发育成正常的胚状体。

镜检发现花蕾长为4.6~5.5 mm时,大部分的小孢子处于单核靠边期和双核期,这时培养的小孢子出胚量最高,平均每蕾产胚16.2个;而花蕾长度在3.6~4.5 mm时,处于单核靠边期和双核期的小孢子比例较少,因此出胚量较低;花蕾长度短于3.6 mm,大部分小孢子处于单核中期以前,培养不出胚状体;花蕾长度大于5.5 mm,大部分小孢子处于三核期,产生正常的胚状体极少(表2)。

2.3 高温热激处理对胚胎发生的影响

高温热激预处理是促进细胞对称分裂,改变小孢子发育方向的主要途径^[9]。本试验用绿洲808×夏宝的 F_1 小孢子进行高温热激处理,结果显示,温度以34℃热激效果最佳,处理48 h比24 h的出胚量多;34℃48 h的处理组合每蕾平均产胚15.8个,明显高于其它的处理组合;25℃恒温培养的小孢子没有诱导胚的产生(表3)。

表 2 甘青杂种不同长度花蕾小孢子的发育阶段对胚胎发生的影响
Table 2 Effects of developmental stage of microspores originated from different length of flower buds on embryogenesis in hybrid

花蕾大小 Length of bud (mm)	小孢子发育时期 Development stages of microspores				胚诱导量(个/蕾) No. of embryo per bud
	单核中期 Medial uninucleate	单核靠边期 Late uninucleate	双核期 Binucleate	三核期 Trinucleate	
	2.6-3.5	++			
3.6-4.5	++	+	+		4.6 B
4.6-5.5	+	++	++	+	16.2 A
5.6-6.5			+	++	2.2 C

+, ++ 分别表示处于该时期的小孢子少和多。同栏数据后不同大写字母表示差异极显著 (P=0.01)。+, ++ means less and more microspore, respectively. Different letters within a column indicate significant differences at P=0.01.

表 3 不同温度热激对甘青杂种小孢子胚胎发生的影响

Table 3 Effects of different heat-shock temperatures on embryogenesis in hybrids

温度 Temperature (°C)	时间 Time (h)	胚诱导量(个/蕾) No. of embryos per bud
35	24	6.0 C*
	48	1.2 E
34	24	9.0 B
	48	15.8 A
33	24	6.9 C
	48	9.6 B
32	24	1.2 E
	48	2.8 D
25		0 F

同列数据后不同大写字母表示差异极显著 (P=0.01)。Different letters within a column indicate significant differences at P=0.01.

2.4 添加和更换培养基对胚胎发生的影响

在绿洲 808×夏宝的 F₁ 小孢子培养时进行更新或加液试验。结果表明,加液培养的效果最好,产胚量最多,平均每蕾产胚 16.2 个,比对照增产 237.5%。更新培养液培养的 3 个处理,以蔗糖含量 140 g L⁻¹ 的更换培养效果最好,比对照增长 79.17%,但明显低于加液培养的,二者产胚量相差 1 倍;用 170 g L⁻¹ 高糖更换培养的没有胚状体产生;用 110 g L⁻¹ 低糖更换培养的产胚量极显著低于对照(表 4)。

2.5 胚状体的发育及植株再生

甘青杂种的胚状体前期生长很快,当子叶胚转绿后转到固体培养基培养,很多胚状体颜色慢慢变

表 4 添加与更换培养液对甘青杂种胚胎发生的影响

Table 4 Effects of media with changed sucrose content on embryogenesis in hybrids

起始培养液 Initial medium	3 d后更换 培养液 A	3 d后添加 培养液 B	胚诱导量 (个/蕾) No. of embryos per bud	%
1/2 NLN-17	1/2 NLN-17	/	0	0
1/2 NLN-17	/	1/2 NLN-11	16.2 A	337.5
1/2 NLN-17	1/2 NLN-14	/	8.6B	179.17
1/2 NLN-17	1/2 NLN-11	/	3.8 D	79.17
1/2 NLN-14	/	/	4.8 C	100
(Control)				

同列数据后不同大写字母表示差异极显著 (P=0.01)。Different letters within a column indicate significant differences at P=0.01. A: Media with sucrose content changed after 3 days; B: Media in which 110 g L⁻¹ sucrose was added after 3 days.

褐色,停止发育直至死亡;有的胚状体下胚轴延长和加厚,两片子叶融合在一起生长出许多愈伤组织,要经过 2-3 次继代培养,才分化出许多小芽(图版 1:E);有一部分胚状体直接分化出小芽,将小芽转接到生根培养基,10-15 d 就能长出新根,形成完整的植株(图版 1:F)。本试验共培育出 375 个正常的子叶胚,经继代培养,最后培育出 45 株再生植株,成苗率为 12%。

3 结论和讨论

通过对甘蓝、青花菜杂种的游离小孢子培养,能在较大基因范围内获得小孢子植株。本研究结果表明,变种间杂种小孢子胚的诱导效果很大程度上

取决于两个亲本的胚胎发生能力。例如本试验中的夏宝甘蓝和绿洲 808 青花菜都有较强的胚胎发生能力,因此它们的杂种也相应地有较高的出胚量(表 1);6 个没有胚诱导能力的甘蓝亲本,有 3 个正反交杂种能诱导少量胚发生,3 个正反交杂种都不能诱导胚发生,说明基因型在小孢子培养中起了重要作用,这与大白菜、青花菜的小孢子培养结果一样^[8,10]。因此,变种间杂种的小孢子培养应选择胚胎发生能力强的材料作为杂交亲本。本研究显示,正反交杂种的小孢子胚胎诱导率无明显差异,说明变种间杂种胚胎发生能力是由核基因控制的^[11],与细胞质无关,这与周永明研究的细胞质在油菜种间杂种的胚胎发生起作用的结果不同^[6]。在同一青花菜亲本条件下,杂种小孢子胚胎发生能力与甘蓝亲本的胚胎发生能力明显呈正相关,说明品种间控制胚胎发生的核基因可能存在数量上差别,需要进一步研究。

试验表明,高糖培养 3 d 后添加低糖培养液培养,能大幅度提高出胚量,这主要是培养基中高浓度蔗糖作为渗透稳定剂在培养初期能维持小孢子活力。培养 3 d 后添加低糖培养液,主要作用是稀释高浓度蔗糖对细胞团的抑制作用和培养过程中非胚性细胞死亡释放出的毒性物质^[10],并补充营养物质,改善了小孢子发生与发育的培养条件。

甘蓝与青花菜是亲缘关系较近的变种,但二者在植物学性状上有很大差异,研究变种间杂种小孢子培养与利用,为种质资源的创新提供捷径。通过对甘青杂种小孢子再生植株的选育可以获得许多不同于双亲类型的单双倍体纯系,这个方法比利用杂交、回交和连续自交分离筛选的过程要快得多。所获得新的稳定的变异类型对芸苔属近缘变种间的进化、遗传学乃至育种研究都具有潜在的利用价值。

影响小孢子胚胎发生的因素较多。本试验得出,在盛花期取单核靠边期至双核期的小孢子,经 34℃ 热处理 48 h,初始培养用 170 g L⁻¹ 高浓度蔗糖的培养液,3 d 后添加低浓度的培养液,胚诱导率可达 70%,最高的每蕾可诱导胚 16.2 个,成苗率是

12%。与芸苔属其它蔬菜小孢子培养结果相比,出胚率是相当高的,但成苗率却比较低,胚培养的条件还需进一步优化。

致谢 本研究得到国家蔬菜工程技术研究中心刘凡研究员的悉心指导,特此致谢。

参考文献

- [1] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* [J]. *Z Pflanzenphysiol*, 1982, 105:427-434.
- [2] Yang L M(杨丽梅), Fang Z Y(方智远), Liu Y M(刘玉梅). Applications of microspore culture technology in inbred line of cabbage [J]. *China Veget(中国蔬菜)*, 2003, (6):31-32.(in Chinese)
- [3] Zhang D S(张德双), Cao M Q(曹鸣庆), Qin Z W(秦智伟). Embryogenesis and plant regeneration of broccoli via isolated microspore culture [J]. *Acta Agri Boreal Sin(华北农学报)*, 1998, 13(3):102-106.(in Chinese)
- [4] Zhang L(张丽). Primary studies on the isolated microspore culture in radish [J]. *Acta Hort Sin(园艺学报)*, 2004, 31(5):676-678. (in Chinese)
- [5] Lu G(卢钢), Cao J S(曹家树). Study on microspore culture of the hybrids between Chinese cabbage and turnip [J]. *J Zhejiang Univ(浙江大学学报)*, 2001, 27(2):161-164.(in Chinese)
- [6] Zhou Y M(周永明), Scarth R. Microspore culture of hybrids between *Brassica napus* and *B. campestris* [J]. *Acta Bot Sin(植物学报)*, 1995, 37(11):848-855.(in Chinese)
- [7] Fang S G(方淑桂), Chen W H(陈文辉), Zeng X L(曾小玲). Several factors affecting isolated microspore culture in broccoli [J]. *J Fujian Agri For Univ(Nat Sci)(福建农林大学学报自然科学版)*, 2005, 34(1):51-55.(in Chinese)
- [8] Tang Q L(汤青林), Song M(宋明), Zhang Z L(张钟灵). Advances in studies on isolated microspore in cole crops [J]. *Southwest Chin J Agri Sci(西南农业学报)*, 2000, 13(3):98-103.(in Chinese)
- [9] Liu G S(刘公社), Li Y(李岩), Liu F(刘凡). Effects of high temperature on the cultures of isolated microspores in *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* [J]. *Acta Bot Sin(植物学报)*, 1995, 37(2):140-146. (in Chinese)
- [10] Cao M Q(曹鸣庆), Lin F(刘凡). Progress in isolated microspore culture in *Brassica* vegetable crops [J]. *Ann Rev Hort Sci(园艺学年评)*, 1996, 2:63-90. (in Chinese)
- [11] Cloutier S, Cappadocia M, Landry B S. Study of microspore culture responsiveness in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by comparative RFLP mapping of a F₂ population and two microspore-derived populations [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 841-847.

图版说明

图版 I

A. 培养 4 d 后小孢子第一次分裂 ($\times 400$); B. 培养 15 d 后形成球形胚 ($\times 400$); C. 17 d 后形成心形胚 ($\times 200$); D. 光照后的子叶形胚; E. 分化出胚芽; F. 再生植株。

Explanation of plate

Plate I

A. First cell division of microspores cultured after 4 days ($\times 400$); B. Globular embryo cultured after 15 days ($\times 400$); C. Heart-shaped embryo cultured after 17 days ($\times 200$); D. Cotyledon-shaped embryo after illumination treatment; E. Differentiated plumules; F. Regenerated plantlet.

