

红菜薹游离小孢子培养与植株再生

王涛涛^{1,2}, 李汉霞¹, 张继红¹, 卢永恩¹, 叶志彪^{1,2*}

(1. 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070; 2. 作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 以 5 个红菜薹 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *pupurea* Hort.) 基因型为试材, 探讨了基因型和活性炭对产胚量的影响。结果表明: 产胚量最高的是基因型 8902, 达到 42 个/皿, 最少的为零; 加适量活性炭可以使产胚量提高近 3 倍。同时, 对胚状体进一步再生成苗因素也进行了研究: 在培养基中添加 1.2% 的琼脂浓度再生率最高, 达到 50.1%; 4℃ 下处理 10 d 可使再生成苗率从 45% 提高到 65%; 随胚状体年龄的延长, 其再生成株率明显降低, 最适的胚龄是 20~24 d; 而培养基 B5 和 MS 对小孢子再生率的影响不大。

关键词: 红菜薹; 游离小孢子; 胚状体; 植株再生

中图分类号: Q813.1⁺1; S634.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2004)06-0569-03

Isolated Microspore Culture and Plant Regeneration in Purple Flowering Stalk (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *pupurea* Hort.)

WANG Tao-Tao^{1,2}, LI Han-Xia¹, ZHANG Ji-Hong¹, LU Yong-En¹, YE Zhi-Biao^{1,2*}

(1. College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Wuhan 430070, China)

Abstract: The influences of the genotype and the activated charcoal were investigated on the embryoid yields of microspore in purple flowering stalk (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *pupurea* Hort.) among 5 genotypes. The results showed, the highest mean yield was up to 42 embryoids per petri dish, while the lowest was zero. The efficiency of embryoid increased by 3-fold when the activated charcoal was added into the liquid media properly. The embryoids produced from microspore culture were further conducted to regenerate plantlet. The regeneration frequency was the highest (up to 50.1%) while solidified with 1.2% of agar in the medium. When treated at 4℃ for 10 days, the regeneration frequencies of the embryoids rose from 45% to 65%. The optimal ages of embryoids (20—24 d) were vital to plant regeneration, the regeneration frequency decreased remarkably along with the increase of the age of embryoids. The media, B5 and MS, had no distinct difference for plant regeneration.

Key words: Purple flowering stalk (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *pupurea* Hort.); Isolated microspore; Embryoid; Plant regeneration

红菜薹 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *pupurea* Hort.) 是我国长江流域的特产蔬菜。常规育种方法, 需经过多代自交选择才能获得遗传相对稳定的材料, 是一个非常费时、耗力的过程。游离小孢子培养技术因为能加快育种进程, 提高选择效率

而受到各国育种者的倾爱。红菜薹的游离小孢子培养可加速材料的纯化和稳定, 但关于红菜薹的小孢子培养研究较少, 仅李光涛等^[1]作过初步研究, 且出胚率低。影响红菜薹胚状体再生成株的因素尚未见报道, 笔者对红菜薹小孢子培养和植株再生的几个

收稿日期: 2004-01-08, 修回日期: 2004-04-22。

作者简介: 王涛涛 (1976—), 男, 博士研究生, 从事芸薹属蔬菜的小孢子培养和生物技术研究。

* 通讯作者 (E-mail: zbye@mail.hzau.edu.cn)。

影响因素作了研究和分析,意在提高红菜薹小孢子培养的再生频率和成苗率,为红菜薹快速而高效的育种打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料:红菜薹十月红一号、8902、十月早、红杂 60 和红霞 40 五个基因型。

1.2 方法

小孢子培养 选取单核靠后期至双核初期的小孢子进行培养,花蕾灭菌、研碎、过滤后,用 B5 培养基悬浮,重复离心 3 次纯化小孢子,用 NLN 培养基(含 13% 的蔗糖)将小孢子密度调整为 5×10^4 个/mL。每个处理做 6 皿,2 皿为 1 个重复,设 3 个重复。32℃ 下热激 2 d 后转至 25℃ 黑暗中培养,出胚后置于摇床上振荡培养,20 d 后统计胚状体的数目。

植株再生 以 8902 中发育至子叶型且生长良好的胚状体为试验材料,对琼脂浓度、低温、胚龄以及培养基类型等因素进行了研究。其中琼脂浓度设为 0.8%、1.0%、1.2% 等 3 个处理;低温处理在 4℃ 下处理 10 d;胚龄分为 20~24 d、25~29 d 和 30 d 以上 3 个阶段;培养基采用 MS 和 B5。培养 60 d 后统计胚状体的成苗率。

试验设计与数据分析 本试验中,均采用单因子试验,每个处理重复 3 次。在数据分析中,百分数经反正弦转换,其它数据经平方根转换后,进行方差分析,若达到显著水平,则用邓肯新复极差测验法进行多重比较。

2 结果与分析

红菜薹小孢子培养再生成株主要经历了 2 个阶段,即诱导小孢子胚状体的形成(见图 1)和胚状体进一步发育成植株(见图 2)。

2.1 小孢子胚胎发生因素的影响

基因型对小孢子胚胎发生的影响 不同基因型的红菜薹小孢子胚胎发生能力相差很大,在供试的 5 个红菜薹基因型中,只有 3 个产生了胚状体,并且基因型间的产胚率差异达到了极显著。其中 8902 产胚率最高,平均每皿达 42 个,十月早次之,每皿 10 个,十月红一号最少,每皿仅 2 个。红杂 60 和红霞 40 两个品种没有产生胚状体。

活性炭对小孢子胚胎发生的影响 以 8902 为材料,在小孢子培养的过程中,添加 0.08% 活性炭,可以使成胚数从未加的 12 个/皿提高到 42 个/皿,

差异达到极显著水平,出胚数提高了近 3 倍,说明活性炭可显著提高红菜薹的胚胎发生(图 1)。



图 1 红菜薹小孢子诱导出的胚状体
Fig.1 The embryoids induced from microspores of purple flowering stalk

2.2 胚状体再生成株的影响因素

琼脂浓度对胚状体再生成株的影响 在植物组织培养中,通常用添加 0.8% 的琼脂做固体培养基,但在红菜薹小孢子形成的胚状体再生成苗的过程中,提高琼脂浓度可有利于胚状体成苗。由表 1 可以看出,当琼脂浓度为 1.2% 时,再生率最高达到 50.1%;与浓度为 1.0% 时的 42.5% 差异不显著,但两者均极显著地高于琼脂浓度为 0.8% 时的再生率(25%)。由此可以看出,随着琼脂浓度的升高再生率也增大,但当浓度超过 1% 时,其促进效果不明显。

表 1 琼脂浓度对胚状体植株再生的影响
Table 1 The effect of the agar concentration on regeneration frequency

培养基 Media	再生率(%) Regeneration frequency		
MS+0.8% Agar	25.0	a	A
MS+1.0% Agar	42.5	b	B
MS+1.2% Agar	50.1	b	B

低温处理对胚状体植株再生的影响 刚转入固体培养基的胚状体 4℃ 下处理 10 d 后,再转入 25℃ 下培养,其出苗率大大提高,达到 65%。而未经低温处理的胚状体出苗率为 45%,两者间达到极显著差异。可见低温对提高红菜薹胚状体的再生率是非常有效的。

胚龄对植株再生的影响 不同胚龄的胚状体植株再生的研究发现,胚龄在 20~24 d 时再生率最高,达到 66.7%。但随着滞留时间的增长,成苗率明显下降。超过 30 d 后,许多成熟的绿胚逐渐变黄,变

褐,甚至死亡,其再生率仅为 27.3%(见表 2)。

表 2 胚龄对胚状体植株再生的影响
Table 2 The effect of embryoid age on regeneration frequency

胚龄(d) Age of embryoid	再生率(%) Regeneration frequency	
20~24	66.7	A
25~29	50.6	B
>30	27.3	C

培养基对胚状体植株再生的影响 采用 B5 和 MS 两种培养基,所用的琼脂浓度为 1.2%。红菜薹小孢子诱导的胚状体再生频率分别为 46.7%和 50%,两者间差异不显著。说明 B5 和 MS 两者培养基均比较适合红菜薹胚状体的再生(图 2)。

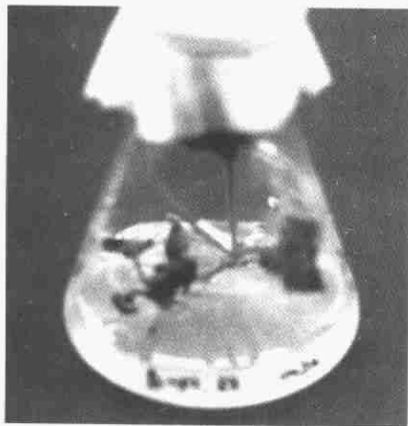


图 2 红菜薹胚状体再生植株
Fig. 2 The plant regenerated from embryoids of purple flowering stalk

3 讨论

离体小孢子胚胎发生能力是由核基因控制的遗传性状,不同基因型其成胚率相差很大^[2],并且有些材料在改进培养技术后仍难获得胚状体^[3-5]。需要选择较多的基因型来进行培养,才可能找到更易出胚的基因型。小孢子培养过程中产生的毒性物质可以抑制胚胎的发生^[6],通过添加活性炭或更换培养基可以减少其毒害^[7]。但更换培养基操作过于麻烦,直接添加活性炭可以明显提高红菜薹成胚率。组培过程中的玻璃化苗现象十分普遍,主要是培养基中琼脂浓度低、相对湿度高造成的。本实验发现琼脂的浓度确实对再生影响比较大,浓度较低时一般通过二次分化后成苗,提高浓度可以提高一次成苗率,从而提高成苗质量。低温对成苗的影响研究相对较少,

周伟军等^[8]在油菜上发现经低温处理后成苗率大幅提高,这在本实验结果中也得到证实。胚龄也是一个影响小孢子成苗的重要因素^[9],胚状体应该及时的转移到固体培养基上,如果在液体培养基中滞留的时间太久,则会变黄、变褐,甚至死亡。

虽然游离小孢子技术已经得到了广泛的应用,但相对于别的作物红菜薹的小孢子培养其出胚率还是比较低,对再生的研究也不够全面、深入,这可能与物种的内在因素有关,也可能需要研究更多的外在因素来提高其效率。

参考文献:

[1] 李光涛,李昌功. 紫菜薹游离小孢子培养再生小植株[J]. 华中农业大学学报, 1996, 22(增刊):111-113.

[2] Guo Y D, Pulli S. Isolated microspore culture and plant regeneration in rye (*Secale cereale* L.) [J]. *Plant Cel Rep*, 2000, 19: 875-880.

[3] Kuginuki Y, Nakamura K, Hida K, Yoshikawa H. Varietal differences in embryogenic and regenerative ability in microspore culture of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) [J]. *Breed Sci*, 1997, 47:341-346.

[4] Zhang F L, Takahata Y. Inheritance of microspore embryogenetic ability in *Brassica* crops [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103:254-258.

[5] Cloutier S, Capadocia M, Landry B S. 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, 91:841-847.

[6] Kott L S. Autotoxicity in isolated microspore of *Brassica napus* [J]. *Can J Bot*, 1988, 66: 1665-1670.

[7] Linnneton E, Bearet W, Delaitre C, Ochatt S, Rancillac M. Improved microspore culture and doubled-haploid plant regeneration in the brown condiment mustard (*Brassica juncea*) [J]. *Plant Cel Rep*, 2001, 20: 126-130.

[8] 周伟军,毛碧增,顾宏辉,唐桂香. 秋水仙碱及热击与低温诱导对油菜小孢子胚状体成苗率的影响[J]. 作物学报,2002,5:369-373.

[9] Kott L S, Beversdorf W D. Enhanced plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus* by chilling, partial desiccation and age selection[J]. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1990, 23: 187-192.