

基因型与培养条件对羽衣甘蓝小孢子胚胎发生的影响

戴希刚^{1,2}, 施雪萍¹, 包满珠^{1,*}

¹华中农业大学园艺林学学院, 武汉430070; ²江汉大学生命科学学院, 武汉430056

摘要: 本文详细地研究了小孢子发育时期、基因型与培养条件对羽衣甘蓝小孢子胚胎发生的影响, 建立了一个稳定、高频地获得小孢子胚胎的有效体系。结果表明, 不同基因型材料相同大小的花蕾其小孢子发育时期存在很大差异, 需针对不同基因型材料选取适合大小的花蕾。供试的37个基因型中, 有20个获得了胚状体, 占供试材料的54.1%, 其中基因型‘桃舞’获得了最高的出胚率, 为123.6个·皿⁻¹。自交系的出胚率比商业品种和F₁代杂种的出胚率要低得多, 且自交代数越高, 小孢子的胚胎发生能力就越弱。在热激培养48 h后加液培养对小孢子的发育能起到积极作用, 向培养基中添加激素和活性炭对小孢子的胚胎发生无促进作用。

关键词: 羽衣甘蓝; 小孢子培养; 胚胎发生; 基因型; 培养条件

Effects of Genotype and Culture Condition on Microspore Embryogenesis of Ornamental Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*)

DAI Xi-Gang^{1,2}, SHI Xue-Ping¹, BAO Man-Zhu^{1,*}

¹College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ²College of Life Sciences, Jiangnan University, Wuhan 430056, China

Abstract: We have developed an efficient and reliable protocol for deriving microspore embryogenesis in ornamental kale by evaluating the effects of genotype and culture condition on microspore embryogenesis. There were significant differences on the microspore development stage in the same size buds of different genotypes. So the suitable size buds should be selected in view of the different genotypes. Of all the 37 genotypes, 20 genotypes (54.1%) produced embryos. The genotype ‘Peachy Dancing’ showed the highest embryogenesis frequency with yield of 123.6 embryos per dish. The embryogenesis frequency of inbred lines was lower than that of commercial cultivar and F₁ hybrid, and the embryo yield decreased with increased generation of inbreeding. Medium addition enhanced embryo yield, and additions of plant growth regulator, active charcoal or colchicines into NLN medium had no effect on microspore embryogenesis.

Key words: ornamental kale; microspore culture; embryogenesis; genotype; culture condition

羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* var. *acephala*)是十字花科芸薹属甘蓝种的一个变种, 两年生草本植物, 耐寒性强, 能耐-6℃左右低温, 观赏期随低温期的长短可达4个月, 具有较高的观赏价值。最近十年已成为我国广大地区冬季及早春时节用于绿化美化的重要景观植物。羽衣甘蓝属异花授粉植物, 杂种优势十分明显, 当前生产上广泛应用F₁代杂种。利用游离小孢子培养技术, 在羽衣甘蓝育种工作上经1~2个有性世代即可获得纯合育种材料, 从而大大地节省了时间、人力和物力, 缩短育种周期, 加速育种进程。自从Lichter (1982)首次成功地在甘蓝型油菜上通过小孢子培养形成植株以后, 这一技术在许多十字花科植物上得到了不断的改进和发展。迄今为止, 小孢子培养在芸薹属的近20种植物上获得成功(Takahata和Keller

1991; Osolnik等1993; Duijs等1992; Dias 2001; 严准等1999; 何杭军等2004)。羽衣甘蓝游离小孢子培养在国内已有报道(冯辉等2007; Zhang等2008; Dai等2009)。但是, 这些报道只是围绕某一或少数几个因素进行研究, 且小孢子胚产量低, 完善、高效的羽衣甘蓝小孢子培养体系还没有建立起来。本文利用一系列不同基因型的羽衣甘蓝来研究小孢子发育时期、基因型和培养条件对其小孢子胚胎发生的影响, 以期建立一个稳定、高频地获得羽衣甘蓝小孢子胚胎的有效体系。

收稿 2012-10-19 修定 2012-11-07

资助 农业部“948”项目(2003-Z36)。

* 通讯作者(E-mail: mzbao@mail.hzau.edu.cn; Tel: 027-87282435)。

材料与方法

1 试验材料

实验材料包括羽衣甘蓝21个商业品种、10个

自交品种及6个杂交组合。来源及主要特征见表1。实验材料每年9月上旬播种育苗, 10月初定植大田, 株行距30 cm, 次年3月抽薹开花, 3月中旬到4月上旬花期取材。常规田间管理。

表1 37个羽衣甘蓝实验材料的名称、主要特征及来源

Table 1 The name, main character and source of 37 materials of ornamental kale

材料	特征	来源
‘名古屋-红’	半矮生, 叶卷皱, 心叶红色, 外叶绿色	浙江虹越花卉有限公司
‘名古屋-桃红’	半矮生, 叶卷皱, 心叶桃红色, 外叶绿色	农友种苗
‘白珊瑚’	中生, 叶齿裂, 心叶白色, 外叶绿色	浙江虹越花卉有限公司
‘红珊瑚’	中生, 叶齿裂, 心叶红色, 外叶深绿色	农友种苗
‘东京-白’	半矮生, 圆叶, 心叶白色, 外叶绿色	浙江虹越花卉有限公司
‘日落’	茎干高立, 圆叶, 心叶红色, 外叶绿色	浙江虹越花卉有限公司
‘白鸥’	矮生, 叶缘皱缩, 心叶白色, 外叶绿色	农友种苗
‘红鸥’	矮生, 叶缘皱缩, 心叶红色, 外叶深绿色	农友种苗
‘大阪-白’	半矮生, 叶缘波形, 心叶白色, 外叶绿色	农友种苗
‘大阪-红’	半矮生, 叶缘波形, 心叶红色, 外叶深绿色	农友种苗
‘白舞’	矮生紧凑, 叶缘波形, 心叶白色, 外叶绿色	农友种苗
‘红舞’	矮生紧凑, 叶缘波形, 心叶红色, 外叶深绿	农友种苗
‘桃舞’	矮生紧凑, 叶缘波形, 心叶桃红, 外叶深绿	农友种苗
‘白孔雀’	中生, 叶深裂, 心叶白色, 外叶绿色	农友种苗
‘红孔雀’	中生, 叶深裂, 心叶红色, 外叶深绿色	农友种苗
‘朝代-白’	半矮生, 叶缘波浪形, 心叶白色, 外叶绿色	农友种苗
‘朝代-红’	半矮生, 叶缘波浪形, 心叶红色, 外叶深绿	农友种苗
‘帝王-桃红’	矮生, 叶卷皱, 心叶红色, 外叶绿色	农友种苗
‘京华-红’	包卧, 圆叶, 心叶红色, 外叶深绿色	农友种苗
‘红鹰二号-白’	半矮生, 叶缘小褶, 心叶白色, 外叶绿色	农友种苗
‘红鹰二号-红’	半矮生, 叶缘小褶, 心叶红色, 外叶深绿色	农友种苗
Q45	半矮生, 叶卷皱, 心叶红色, 外叶深绿色	‘名古屋-红’ F ₂ 代
Q46	半矮生, 叶微皱, 心叶黄绿色, 外叶绿色	K13-2 (西南农大) F ₂ 代
Q1-2	半矮生, 叶微皱, 心叶红到绿色, 外叶绿色	‘名古屋-红’ F ₃ 代
Q11-1	中生, 叶卷皱, 心叶红到绿色, 外叶深绿	‘名古屋-红’ F ₃ 代
Q20-1	半矮生, 叶微皱, 心叶绿色, 外叶深绿色	‘名古屋-红’×‘大阪-白’ F ₃ 代
Q28-1	中生, 叶微皱, 心叶红色, 外叶深绿色	K13-2×‘名古屋-红’ F ₃ 代
Q42	半矮生, 叶卷皱, 心叶黄绿色, 外叶绿色	K17×‘名古屋-红’ F ₃ 代
Q2003	半矮生, 叶皱褶, 心叶外叶均为深绿	‘名古屋-红’×‘大阪-白’ F ₃ 代
Q2704	矮生, 叶散, 缘小褶, 心叶黄绿, 外叶深绿	‘名古屋-红’ F ₃ 代
Q4606	半矮生, 叶卷皱, 心叶红到绿, 外叶绿色	K17 F ₃ 代
P1	中生, 叶皱褶, 心叶黄绿色, 外叶深绿色	Q2003×Q2704
P2	中生, 叶散, 缘卷皱, 心叶红到绿, 外叶绿	Q4606×Q2704
P3	中生, 叶卷皱, 心叶红到绿, 外叶绿色	Q2704×Q4606
X18	中生, 叶卷皱, 心叶红色, 径大, 外叶深绿	‘名古屋-红’ DH系×‘大阪-红’ DH系
X35	半矮生, 叶微皱, 心叶桃红, 外叶深绿色	‘桃舞’×‘名古屋-红’ DH系
X48	中生, 叶波浪形, 心叶红色, 外叶深绿色	‘晚霞’×‘名古屋-红’ DH系

2 小孢子的分离与培养

自供试植株主花序或一级分支花序上采摘健康的花序, 选取适当大小的花蕾, 置于灭过菌的三角瓶中, 用70%酒精进行表面消毒1 min, 再将其浸

泡于0.1% HgCl₂溶液中10 min, 然后用无菌水冲洗3次(每次5 min)。消毒好的花蕾转移到50 mL圆底试管中, 加入少量B₅ (Gamborg等1968)液体培养基(含13%蔗糖, 不含激素, pH 5.8), 用玻璃棒碾碎

花蕾使小孢子释放出来, 小孢子悬浮液用45 μm 尼龙网过滤到10 mL的玻璃离心管中(所有器皿均灭过菌), 滤液经离心机100 $\times g$ 离心5 min, 弃上清液, 加B₃培养基重新悬浮后再以100 $\times g$ 离心5 min, 重复2次, 直至小孢子悬浮液清澈透明。去上清液后, 用NLN (Lichter 1982)液体培养基悬浮小孢子。NLN培养基经过0.22 μm 过滤器(Nalgene[®], 美国)过滤灭菌。小孢子悬浮液分装到75 mm \times 15 mm培养皿中, 每皿6 mL, 小孢子密度保持在 4×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ (血球计数板计数), 培养皿以石蜡膜(Parafilm[®])封口。将盛有小孢子悬浮液的培养皿于32.5 $^{\circ}\text{C}$ 下热激处理48 h后转至25 $^{\circ}\text{C}$ 下黑暗培养, 待出现肉眼可见的胚状体后, 置于摇床上振荡(60 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)培养, 4周后统计胚产量。

3 小孢子发育时期对小孢子胚胎发生的影响

以基因型‘名古屋-红’和X35为研究对象。分别选取大小为2.0~2.5 mm、2.5~3.0 mm、3.0~3.5 mm、3.5~4.0 mm和4.0~4.5 mm的花蕾, 将分离出的小孢子培养于NLN-16培养基中, 并同时用显微镜观察各花蕾大小对应的小孢子发育时期情况, 以此来研究小孢子发育时期对胚胎发生的影响。

4 不同基因型对小孢子胚胎发生的影响

为了研究不同基因型的小孢子胚胎发生情况, 将37个基因型的羽衣甘蓝小孢子在含16% (*W/V*)蔗糖的NLN培养基(NLN-16)上持续培养3~4个星期。

5 培养条件对小孢子胚胎发生的影响

5.1 加液培养对胚胎发生的影响

将4种基因型‘名古屋-桃红’、‘白舞’、X18和X35的游离小孢子培养于NLN-16 (含16%蔗糖的NLN)培养基中, 32.5 $^{\circ}\text{C}$ 热激48 h后, 打开培养皿, 再向每皿中加入等体积的NLN-16或NLN-13 (含13%蔗糖的NLN)培养基, 之后转移到25 $^{\circ}\text{C}$ 下继续培养。以没有添加培养基的处理作对照。在本实验中蔗糖起始浓度为16%的处理再加入等体积的16%或13%蔗糖培养基称为加液培养。

5.2 激素对胚胎发生的影响

以基因型‘名古屋-红’和P3为研究对象, 将游离小孢子培养于加有不同浓度(0.05和0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)BA的NLN-16培养基中, 以不加激素的培养基为对照, 分析激素BA对羽衣甘蓝小孢子胚诱导率的影响。

5.3 活性炭(AC)对胚胎发生的影响

以基因型‘名古屋-红’、‘桃舞’和‘帝王-桃红’

为研究对象, 将游离小孢子培养于添加了浓度为100、200、300和400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭的NLN-16培养基中, 以不添加活性炭的NLN-16作对照。活性炭溶液的配法: 1 g活性炭、0.5 g琼脂糖和100 mL双蒸水, 灭菌后使用。

6 数据统计分析

小孢子胚胎发生频率即胚产量以每皿出胚的个数(个 $\cdot\text{皿}^{-1}$)计数, 本试验中, 均采用单因素试验, 每个处理设3次重复(每个重复5皿)。所得数据采用SAS软件进行方差分析与多重比较(LSD法, $P<0.05$), 以平均值 \pm 标准偏差列入表格, 后面所跟不同小写字母表示数据之间有显著差异。

实验结果

1 小孢子发育时期对小孢子胚胎发生的影响

表2显示了小孢子不同发育时期对其胚胎发生的影响。在基因型‘名古屋-红’中, 花蕾大小在3.0~3.5 mm时, 小孢子的发育时期大部分处在单核靠边期至双核早期, 其小孢子胚胎发生率也最高, 为44.1个 $\cdot\text{皿}^{-1}$; 花蕾在2.5~3.0 mm大小时小孢子处在单核早期到单核中期阶段, 此时的小孢子有一定的胚胎发生率; 当花蕾大小为2.0~2.5 mm时, 小孢子大部分在单核早期, 甚至四分体期, 其小孢子胚胎发生率极低; 花蕾大小为4.0~4.5 mm时, 此时的小孢子多处双核晚期到三核期, 小孢子的胚胎发生率也非常低, 仅为0.9个 $\cdot\text{皿}^{-1}$ 。基因型X35中, 小孢子胚胎发生能力最强的花蕾大小为3.5~4.0 mm, 此时的小孢子都处在单核中期到双核早期, 其中双核靠边期到双核早期的居多; 花蕾在2.0~2.5 mm时, 小孢子基本都还处在四分体时期, 所以其小孢子完全没有胚胎发生现象。综合考虑, 羽衣甘蓝单核中期到双核早期的小孢子胚胎发生率都较高, 应该选择该阶段的小孢子进行游离小孢子培养。比较两个基因型各不同花蕾大小的小孢子胚胎发生率的结果表明, 不同基因型材料的相同大小的花蕾其小孢子发育时期存在很大的差异, 从表1中可知, 适合基因型X35胚胎发生的花蕾要比适合基因型‘名古屋-红’的大。因此, 在对羽衣甘蓝进行游离小孢子培养时, 需针对不同基因型的材料选取适合大小的花蕾。

2 不同基因型对小孢子胚胎发生的影响

供试材料的基因型被认为是游离小孢子培养

表2 小孢子发育时期对羽衣甘蓝小孢子胚胎发生的影响

Table 2 Effect of different microspore stage on embryogenesis in ornamental kale

基因型	花蕾长度/mm	小孢子发育时期				胚产量/个·皿 ⁻¹
		四分体	单核早期	单核中期	单核晚、双核早期	
‘名古屋-红’	2.0~2.5	+	+			0.2±0.4 ^d
	2.5~3.0		+	+		17.4±5.9 ^c
	3.0~3.5				+	44.1±7.7 ^a
	3.5~4.0				+	25.8±6.8 ^b
	4.0~4.5					0.9±1.3 ^d
X35	2.0~2.5	+				0 ^b
	2.5~3.0		+			0.8±0.8 ^b
	3.0~3.5		+	+		3.0±0.7 ^b
	3.5~4.0			+	+	18.6±5.1 ^a
	4.0~4.5				+	1.4±1.7 ^b

同一基因型中同列不同英文字母表示差异显著($P<0.05$)。

成功与否的最重要的影响因素,不同基因型小孢子的胚胎发生能力存在很大差异。不同基因型小孢子胚胎发生能力结果见表3。在供试的37个羽衣甘蓝基因型中,有20个获得了胚状体,占供试材料的54.1%。其中不同的基因型间出胚率差异很大,胚胎发生能力最强的基因型是‘桃舞’,其平均出胚率是123.6个·皿⁻¹,其次是‘名古屋-红’,平均出胚率是53.7个·皿⁻¹。在出胚的这些基因型中,‘红鸢’、‘朝代-白’、Q45、P3和X35的胚产量也都较高,在20~30个·皿⁻¹左右,其余基因型的胚产量都较低。‘东京-白’、‘白孔雀’、Q11-1、Q42和P1的胚胎发生能力都非常低,其出胚率都还不足1.0个·皿⁻¹。在20个出胚的基因型中有12个是商业品种(占商业品种的57.1%),4个自交种(占自交种的40%),4个杂交组合(占杂交组合的66.7%)。在10个自交种中,出胚率高的2个基因型Q45和Q46均为F₂代自交系,5个F₃代自交系中仅有Q11-1和Q42两个基因型出胚,且出胚率极低,而在3个F₃代自交系中均没有见到胚状体出现。这一现象说明自交代数越高,其小孢子胚胎发生能力就越弱。由表3还可以观察到,属同一系列的羽衣甘蓝不同品种间小孢子胚胎发生率也存在很大差异,如‘名古屋-红’和‘名古屋-桃红’,‘白珊瑚’和‘红珊瑚’,‘白舞’、‘红舞’和‘桃舞’,‘朝代-白’和‘朝代-红’等。图1显示6种基因型的羽衣甘蓝小孢子胚胎发生情况。

3 培养条件对小孢子胚胎发生的影响

3.1 加液培养对胚胎发生的影响

4个不同基因型(X35、‘名古屋-桃红’、X18和

表3 羽衣甘蓝37个不同基因型的小孢子胚胎发生能力

Table 3 Capacity of microspore embryogenesis in 37 different genotypes of ornamental kale

基因型	胚产量/个·皿 ⁻¹	基因型	胚产量/个·皿 ⁻¹
‘名古屋-红’	53.7±7.6 ^b	‘红鸢二号-白’	0 ^f
‘名古屋-桃红’	2.0±0.8 ^f	‘红鸢二号-红’	0 ^f
‘白珊瑚’	5.9±3.2 ^f	Q45	24.4±6.7 ^d
‘红珊瑚’	0 ^f	Q46	10.6±4.2 ^e
‘东京-白’	0.4±0.7 ^f	Q1-2	0 ^f
‘日落’	0 ^f	Q11-1	0.2±0.4 ^f
‘白鸢’	3.3±2.2 ^f	Q20-1	0 ^f
‘红鸢’	33.3±11.8 ^c	Q28-1	0 ^f
‘大阪-白’	0 ^f	Q42	0.3±0.5 ^f
‘大阪-红’	1.4±1.0 ^f	Q2003	0 ^f
‘白舞’	3.0±0.8 ^f	Q2704	0 ^f
‘红舞’	0 ^f	Q4606	0 ^f
‘桃舞’	123.6±16.8 ^a	P1	0.7±0.9 ^f
‘白孔雀’	0.5±1.0 ^f	P2	0 ^f
‘红孔雀’	0 ^f	P3	25.4±4.9 ^d
‘朝代-白’	23.2±3.8 ^{d,e}	X18	1.2±0.8 ^f
‘朝代-红’	0 ^f	X35	19.2±6.1 ^e
‘帝王-桃红’	3.2±1.3 ^f	X48	0 ^f
‘京华-红’	0 ^f		

同列不同英文字母表示差异显著($P<0.05$)。

‘白舞’)被用来研究加液培养对胚胎发生的影响(表4),在这4个基因型的加液培养中,向NLN-16中添加NLN-16 (NLN-16+NLN-16)均对小孢子胚胎发生表现出积极作用,出胚率比对照提高了3~7倍。虽然在基因型X18中,NLN-16+NLN-13的胚胎发生反应比NLN-16+NLN-16好,但是二者之间没有显著差异,而且NLN-16+NLN-13的胚胎发生

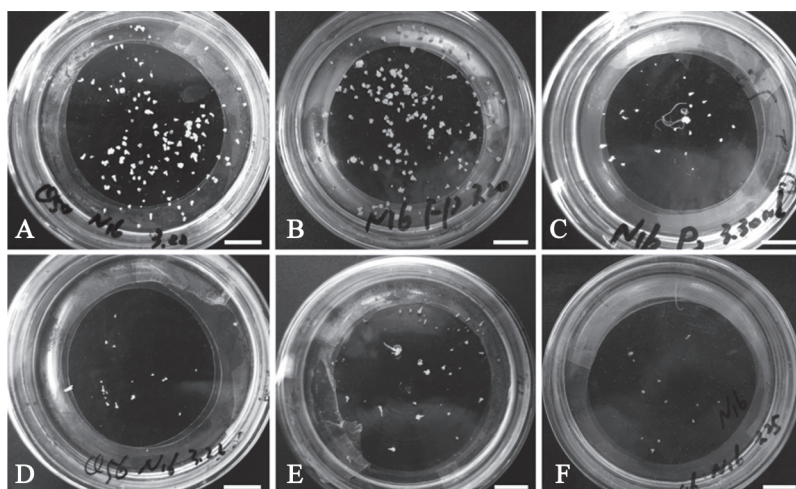


图1 羽衣甘蓝几种不同基因型的小孢子胚胎发生情况

Fig.1 Microspore embryogenesis in different genotypes of ornamental kale

A: '名古屋-红', B: '桃舞', C: P3, D: '朝代-白', E: '红鸱', F: Q46。所有标尺均为1 cm。

率在基因型X35、'名古屋-桃红'和'白舞'中显著低于NLN-16+NLN-16, 因此, 可以认为NLN-16+NLN-16为羽衣甘蓝小孢子培养最适加液处理方式。基因型'名古屋-桃红'和X18中, NLN-16+NLN-13的胚胎发生反应都明显高于对照NLN-16, 而在X35和'白舞'中NLN-16+NLN-13的胚胎发生率却明显低于对照NLN-16。在基因型X35中试验了NLN-13+NLN-13的效果, 结果表明NLN-13+NLN-13显著低于NLN-16+NLN-16甚至对照。

3.2 激素对胚胎发生的影响

本试验通过在NLN-16培养基中添加不同浓度的细胞分裂素BA来研究激素对羽衣甘蓝小孢子胚胎发生的影响, 结果见表5。在两个被试的基因型('名古屋-红'和'桃舞')中, 加入0.05和0.1 mg·L⁻¹的BA后并没有提高小孢子的胚胎发生率, 反而严重降低了小孢子的胚产量。因此, 向NLN-16中添加细胞分裂素BA会阻碍小孢子的分裂, 对小孢子胚胎发生起消极作用。0.1 mg·L⁻¹的BA比0.05 mg·L⁻¹的BA对小孢子的胚胎发生阻碍性更大。

3.3 活性炭对胚胎发生的影响

在NLN-16培养基中添加活性炭(AC)对小孢子胚胎发生的影响情况见图2。对于基因型'帝王-桃红', 添加AC虽然增加了小孢子的胚胎发生率, 但是与不添加活性炭的对照差异不显著。对于基因型'名古屋-红'、'桃舞'和X35而言, 不管添加多大浓度的AC都对小孢子的分裂有强烈的抑制作

表4 加液培养对羽衣甘蓝小孢子胚胎发生的影响

Table 4 Effect of medium addition on embryogenesis in ornamental kale

基因型	加液培养(起始培养基+添加培养基)	胚产量/个·皿 ⁻¹
X35	NLN-16 (对照)	17.2±6.2 ^b
	NLN-16+NLN-16	51.2±7.1 ^a
	NLN-16+NLN-13	3.8±2.3 ^c
	NLN-13+NLN-13	0.3±0.5 ^c
'名古屋-桃红'	NLN-16 (对照)	2.0±1.3 ^c
	NLN-16+NLN-16	14.5±4.5 ^a
	NLN-16+NLN-13	9.3±3.1 ^b
X18	NLN-16 (对照)	0.8±1.2 ^b
	NLN-16+NLN-16	3.5±2.4 ^a
	NLN-16+NLN-13	5.3±2.0 ^a
'白舞'	NLN-16 (对照)	2.8±0.8 ^b
	NLN-16+NLN-16	13.3±2.2 ^a
	NLN-16+NLN-13	0.5±0.8 ^c

同一基因型中同列不同英文字母表示差异显著($P < 0.05$)。

用, 且培养出的胚状体质量较差, 部分出现褐化。因此, 我们认为AC对羽衣甘蓝小孢子胚胎发生并不起作用, 它对多数羽衣甘蓝基因型的小孢子胚胎发生反而起抑制作用。

讨 论

1 基因型的影响

芸薹属多种作物小孢子培养研究表明, 游离小孢子培养的胚胎发生是一个十分复杂的过程,

表5 BA对羽衣甘蓝小孢子胚胎发生的影响
Table 5 Effect of BA on microspore embryogenesis
in ornamental kale

基因型	BA浓度/mg·L ⁻¹	胚产量/个·皿 ⁻¹
‘名古屋-红’	0	51.6±10.9 ^a
	0.05	8.7±6.3 ^b
	0.1	1.5±0.6 ^c
‘桃舞’	0	119.6±13.3 ^a
	0.05	40.5±7.8 ^b
	0.1	24.5±2.8 ^c

同一基因型中同列不同英文字母表示差异显著($P<0.05$)。

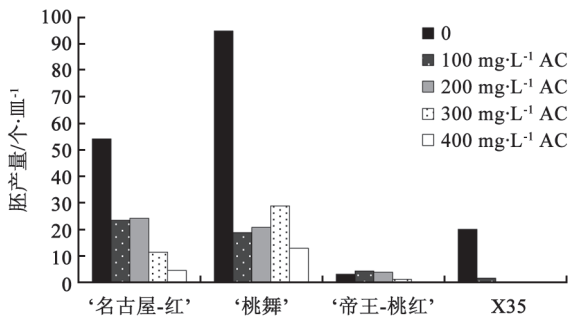


图2 活性炭对羽衣甘蓝游离小孢子胚胎发生的影响
Fig.2 Effect of AC on microspore embryogenesis
in ornamental kale

在诱导小孢子胚胎发生中涉及多种外部因素,如供体植株生长条件、生理状态及基因型,培养基组成和培养条件的影响等。另外,供体的基因型也是影响小孢子胚胎发生率的关键性因素。基因型对小孢子胚状体发生能力的影响作用体现在两个方面:一是基因型的反应范围,二是胚胎发生频率。不同基因型的供体材料在同样试验条件下,胚胎发生能力不同。桑玉芳等(2007)在对19个基因性的甘蓝进行小孢子培养中,有16份由胚胎发生,出胚率在0.30~8.45胚·蕾⁻¹之间,其中有6个出胚率低于1。在本试验中,羽衣甘蓝不同基因型间的胚胎发生能力有很大差异。在试验的37个基因型中,只有20个有胚胎发生,在这些出胚的基因型中,最高的123.6个·皿⁻¹,最低的只有0.3个·皿⁻¹。同一系列(如‘白舞’、‘红舞’和‘桃舞’)的羽衣甘蓝不同品种间小孢子胚胎发生率也存在很大差异。在10个自交种中,出胚率高的两个基因型均为F₂代自交系,F₃代自交种出胚率极低,而F₅代自交种均没有出胚。这表明自交代数越高,其小孢子胚胎发生

能力越弱。而自交系的胚胎发生能力又远比其亲本要差,如文中Q45、Q1-2、Q11-1相比于其亲本‘名古屋-红’。自交易导致植物衰退,当植物连续自交达3代以上,会出现发育畸形、生殖能力和结实率明显下降现象(Aslam等1990),因此,我们推断多代自交使得植物生殖能力退化,导致植物进行游离小孢子培养时小孢子分裂能力下降,因而胚胎发生能力也随之减弱。因此我们推断羽衣甘蓝种质越纯合,其小孢子胚胎发生率就会越低。本试验中还发现,由不出胚的F₂代自交系经过组配杂交获得的杂交种(P1、P2和P3)又重新获得了胚胎发生能力。余凤群和刘后利(1995)的研究也表明自交系比F₁代品种的小孢子胚产量低。小孢子胚胎发生能力同其他遗传性状一样,是一种受基因调控的遗传特性,张凤兰和高田义人(2001)通过对甘蓝型油菜小孢子培养胚状体发生能力的研究,发现胚状体发生能力主要由具加性效应特点的两个基因位点控制。因此,有可能通过有性杂交,将高反应基因型具有的胚胎发生能力转移到低或无反应的基因型上,通过遗传改良的方法扩大易于小孢子胚胎发生的基因型范围,Chuong和Beverdord(1985)也曾提出过这一观点。

2 培养条件的影响

Huang等(1990)和陈军等(1995)都报道,培养2d后向培养基中添加培养基的“加液培养法”能提高胚状体诱导频率。我们的实验证实,加液培养确实能显著提高小孢子的胚胎发生率。在被试验的4个基因型中,通过在NLN-16培养基的基础上添加NLN-16培养基,使小孢子出胚率增加了4~7倍。而在NLN-16培养基的基础上添加NLN-13培养基,被试4个基因型中2个增加了出胚率,2个反而降低了出胚率,这可能是由于高浓度水平的蔗糖更有利于羽衣甘蓝小孢子胚胎发生,这在我们前期的研究(Dai等2009)中已被证明。我们认为,在小孢子培养过程中释放出有毒物质,抑制小孢子的分裂,添加培养基能够稀释有毒物质,同时还能补充营养物质,从而有利小孢子的继续发育。此方法与我们前期的试验更换培养基(Dai等2009)的原理一样,但是它避免了更换培养基中需要重新收集小孢子而进行的离心环节,从而不会对小孢子造成机械损伤。因此,这进一步证实了更换培养基对小孢子出胚率有阻碍作用的主要原因应该是更换

培养基时的离心对小孢子造成了伤害。

在一些小孢子培养的研究上, 常强调激素对诱导小孢子胚胎发生的作用(Charne和Bersdorf 1988; 余凤群和刘后利1995)。然而我们的研究表明, 添加0.05和0.1 mg·L⁻¹的BA明显地抑制了小孢子胚胎的发生, 胚产量对比不加激素的对照显著下降。Lichter (1982)也报导在大白菜小孢子培养中省去植物生长调节剂可以提高小孢子胚产量。耿建峰等(2007)在白菜的小孢子培养中, 向培养基中加入不同浓度的BA, 所有基因型的诱导率都有降低的趋势, 在低浓度时降低较小, 差异不大, 超过一定浓度则明显降低。Polsoni等(1988)认为用不含激素的NLN培养基有利于胚状体的形成和发育。因此, 我们认为激素不是羽衣甘蓝小孢子胚胎发生的必要条件, 此结论正与Lionneton等(2001)在芥菜小孢子培养研究中的结论相似。

诸多报道指出添加活性炭可以吸附有毒物质, 从而促进小孢子的胚胎发生(Dias 1999; Prem等2008)。Gland等(1988)在油菜小孢子培养中也发现添加活性炭可促进胚的发育, 有利植株再生, 但不增加胚产率。然而, 在我们的试验中, 向NLN-16培养基中添加不同浓度的活性炭后, 均对小孢子的胚胎发生率不起作用, 对某些基因型反而有明显的抑制作用。这和韩阳等(2006)的报道相同。这有可能是由于我们所使用的AC最低浓度100 mg·L⁻¹仍过大的原因, 因为活性炭不仅能吸附培养过程中材料释放的有害物质, 同时也能吸附培养基中的必要元素(Lichter 1989)。这个需要进一步的验证。

参考文献

- 陈军, 陈正华, 刘澄清, 姚渝光, 张丽华, 关月兰(1995). 甘蓝型油菜游离小孢子培养的胚胎发生. 遗传学报, 22 (4): 307~315
- 冯辉, 姜凤英, 冯建云, 王超楠(2007). 羽衣甘蓝游离小孢子培养技术研究及应用. 园艺学报, 34 (4): 1019~1022
- 耿建峰, 侯喜林, 张晓伟, 蒋武生, 原玉香, 韩永平, 姚秋菊, 成妍, 李英(2007). 影响白菜游离小孢子培养关键因素分析. 园艺学报, 34 (1): 111~116
- 韩阳, 叶雪凌, 冯辉(2006). 大白菜小孢子培养影响因素研究. 中国蔬菜, 1 (7): 16~18
- 何杭军, 王晓武, 汪炳良(2004). 芥蓝游离小孢子培养初报. 园艺学报, 31 (2): 239~240
- 桑玉芳, 张恩慧, 杨安平, 马超, 许忠民, 程永安, 白延红(2007). 甘蓝游离小孢子培养中影响胚状体形成的主要因素. 西北农业学报, 16 (2): 125~129
- 严准, 田志宏, 孟金陵(1999). 甘蓝游离小孢子培养的初步研究. 华中农业大学学报, 18 (1): 5~7
- 余凤群, 刘后利(1995). 供体材料和培养基成份对甘蓝型油菜小孢子胚状体产量的影响. 华中农业大学学报, 14 (4): 327~331
- 张凤兰, 高田义人(2001). 甘蓝型油菜小孢子培养胚发生能力的遗传分析. 华北农学报, 16 (1): 27~32
- Aslam FN, Macdonald MV, Loudon P, Ingram DS (1990). Rapid-cycling *Brassica* species: inbreeding and selection of *B. campestris* for anther culture ability. Ann Bot, 65: 557~566
- Charne DG, Bersdorf WD (1988). Improving microspore culture as a rapeseed breeding tool: the use of auxins and cytokinins in an induction medium. Can J Bot, 66: 1671~1675
- Chuong PV, Beversdorf WD (1985). High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun. Plant Sci, 39: 219~226
- Dai XG, Shi XP, Fu Q, Bao MZ (2009). Improvement of isolated microspore culture of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*): effects of sucrose concentration, medium replacement, and cold pre-treatment. J Horticult Sci Biotech, 84: 519~525
- Dias JS (1999). Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis. Euphytica, 108: 65~69
- Dias JS (2001). Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. Euphytica, 119: 389~394
- Duijs JG, Voorrips RE, Visser DL, Custers JBM (1992). Microspore culture is successful in most types of *Brassica oleracea* L. Euphytica, 60: 45~55
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res, 50: 151~158
- Gland A, Lichter R, Schweiger HG (1988). Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus* L. J Plant Physiol, 132: 613~617
- Huang B, Bird S, Kemble R, Simmonds D, Keller W, Miki B (1990). Effects of culture density, conditioned medium and feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. Plant Cell Rep, 8: 594~597
- Lichter R (1982). Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z Pflanzenphysiol, 105: 427~434
- Lichter R (1989). Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassicaceae* species. Plant Breed, 103: 119~123
- Lionneton E, Beuret W, Delaitre C, Ochatt S, Rancillac M (2001). Improved microspore culture and doubled-haploid plant regeneration in the brown condiment mustard (*Brassica juncea*). Plant Cell Rep, 20: 126~130
- Osolnik B, Bohanec B, Jelaska S (1993). Stimulation of androgenesis in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) anthers by low temperature and anther dissection. Plant Cell Tissue Organ Cult, 32: 241~246
- Polsoni L, Kott LS, Beversdorf WD (1988). Large-scale microspore culture technique for mutation-selection studies in *Brassica napus*. Can J Bot, 66 (8): 1681~1685
- Prem D, Gupta K, Sarkar G, Agnihotri A (2008). Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. Plant Cell Tiss Org Cult, 93: 269~282
- Takahata Y, Keller WA (1991). High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. Plant Sci, 74: 235~242
- Zhang W, Fu Q, Dai XG, Bao MZ (2008). The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration. Sci Horticult, 117: 69~72