

几种影响羽衣甘蓝小孢子胚状体成苗的因素

姜凤英^{1,2} 冯辉^{1,*} 王超楠¹ 冯建云¹ 李雁雁¹

¹沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161; ²辽宁省农业科学院花卉研究所, 沈阳 110161

摘要 羽衣甘蓝成熟小孢子胚转到固体培养基上可直接萌发成苗。成苗率与基因型、培养基成分和培养温度有关。MS+1.0%琼脂+3%蔗糖是适宜的成苗培养基; 100 mg·L⁻¹活性炭对鱼雷形胚成苗起促进作用; 10℃低温培养10 d可提高成苗率。

关键词 羽衣甘蓝; 小孢子培养; 胚状体; 小植株

Several Factors Influencing the Plantlet Formation of Microspore Embryoid in Kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.)

JIANG Feng-Ying^{1,2}, FENG Hui^{1,*}, WANG Chao-Nan¹, FENG Jian-Yun¹, LI Yan-Yan¹

¹College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; ²Institute of Floriculture, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, China

Abstract Mature microspore embryoids of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) transferred to solid medium could form plantlets. Rate of the plantlet formation was directly related to the genotype, medium and temperature. MS added with 1.0% agar and 3% sucrose was suitable medium for the plantlet formation. 100 mg·L⁻¹ activated carbon could promote torpedo embryoids grow into plantlets. It was beneficial to the plantlet formation that embryoids were cultured in low temperature at 10℃ for 10 d in solid media.

Key words kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.); microspore culture; embryoid; plantlet

自Lichter (1982)采用游离小孢子培养技术,获得了甘蓝型油菜小孢子胚状体和单倍体植株,这一技术已广泛应用于十字花科芸薹属作物品种改良实践(Cao等1995; Fukuoka等1998; Wang 1999)。但是,还未见羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.)小孢子胚状体成苗的报道。前人的研究表明,羽衣甘蓝小孢子培养可以成胚,但是胚状体进一步分化成苗十分困难(姜凤英等2005; Dias 1999; Lichter 1989)。在前期研究工作中,我们曾通过游离小孢子培养获得了一些不同杂交种材料的羽衣甘蓝胚状体。在本文后续的胚状体分化成苗试验中,又获得了大量小孢子胚状体再生植株。现将影响羽衣甘蓝胚状体成苗若干因素的试验结果报道如下。

材料与方法

羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) F₁杂交种:‘红欧’、‘绿叶多汁’、‘圆叶红心’、‘圆叶白心’、‘皱叶红心’、‘皱叶白心’和‘皱叶玫红’,经游离小孢子培养获得了胚状体。将不同发育时期的胚状体转入B₅

或MS培养基中,添加不同浓度的活性炭。以琼脂浓度调节培养基中水分含量,蔗糖浓度为3%,pH 5.8。经10℃低温预培养或直接在光照培养室中培养,30 d继代1次。

结果与讨论

1 培养基中水分含量对胚状体成苗的影响

将子叶形胚分别转至琼脂含量为0.8%、1.0%、1.2%和1.4%的MS培养基上,放入光照培养室。接种后部分小孢子胚正常萌发,2~3 d子叶由黄变绿,胚根伸长并长出根毛。3周后有的胚状体发育成2~4片真叶的小植株,有的形成叶状或茎状组织,部分褐化死亡。由表1可知,胚状体成苗率与培养基水分含量密切相关。随着培养基水分含量的增加,成苗率先升后降,显示1.0%的琼脂是较适合成苗的浓度。

收稿 2005-07-08 修定 2005-11-23

资助 国家“863”项目(2004AA241120)。

*通讯作者(E-mail: fenghuiaaa@263.net, Tel: 024-88487143)。

表1 培养基水分含量对羽衣甘蓝小孢子胚成苗的影响

Table 1 Effect of moisture of media on the plantlet formation in kale

琼脂含量/ %	接种胚数/ 个	成苗率/ %	绿色组织 形成率/%	死亡率/ %
0.8	28	49.63	25.37	25.00
1.0	32	56.25	28.12	15.63
1.2	30	35.61	17.72	46.67
1.4	24	9.64	7.03	83.33

2 基本培养基对胚状体成苗的影响

将部分子叶形胚分别转入 B₅ 和 MS 的培养基中, 琼脂浓度为 1.0%, 蔗糖为 3%, 在光照培养室中培养, 3 周后统计成苗率。表 2 结果显示, 转入 MS 培养基的胚状体成苗率是 B₅ 培养基的 3 倍。而 B₅ 培养基中的胚状体褐化率是 MS 培养基的 4.4 倍。转入 B₅ 培养基的胚状体大部分小孢子胚胚根伸长, 但胚芽不生长而发生褐化。还有一些小孢子胚, 出现胚芽愈伤组织化, 愈伤组织又发生褐化, 但胚根发育正常。这说明, MS 是羽衣甘蓝最适成苗培养基。

表2 基本培养基对羽衣甘蓝小孢子胚成苗的影响

Table 2 Effect of media on the plantlet formation in kale

培养基	接种胚数/ 个	获得小植 株数/株	褐化胚数/ 个	成苗率/ %	褐化率/ %
B ₅	32	6	22	18.75	68.75
MS	32	18	5	56.25	15.63

3 不同发育时期的胚状体对成苗的影响

取子叶形胚、鱼雷形胚、心形胚和球形胚等各发育时期的胚状体, 分别接种于添加 1.0% 琼脂和 3% 蔗糖, pH 5.8 的 MS 培养基上, 在光照培养室中培养, 3 周后统计成苗率。表 3 结果表明, 成苗率与胚状体发育时期关系密切, 发育较好的胚状体成苗率远高于发育不完全的胚。子叶形胚的成苗率最高, 鱼雷形胚、心形胚和球形胚依序次之, 畸形胚的成苗率为 0。可见, 胚状体成熟度越高越容易成苗。

4 活性炭对胚状体成苗的影响

取子叶形胚、鱼雷形胚转至含活性炭 100、200 和 300 mg·L⁻¹ 的 MS 培养基上, 蔗糖为 3%,

表3 羽衣甘蓝小孢子胚发育时期对成苗的影响

Table 3 Effect of development stage of microspore-derived embryoids on the plantlet formation in kale

胚状体发育时期	接种胚数/个	成苗数/株	成苗率/%
子叶形胚	32	18	56.25
鱼雷形胚	35	10	28.57
心形胚和球形胚	41	4	9.76
畸形胚	10	0	0

琼脂为 1.0%, pH 5.8, 在光照培养室中培养, 3 周后统计成苗率。表 4 结果表明, 添加活性炭的培养基有利于鱼雷形小孢子胚成苗, 100 mg·L⁻¹ 活性炭的成苗率增大最明显, 但对子叶形胚成苗的作用不大。

表4 培养基中活性炭含量对羽衣甘蓝小孢子胚成苗的影响

Table 4 Effect of activated carbon on the plantlet formation in kale

活性炭含量/ mg·L ⁻¹	子叶形胚 数/个	鱼雷形胚 数/个	子叶形胚 成苗率/%	鱼雷形胚 成苗率/%
0	32	35	56.25	28.57
100	35	31	57.14	54.84
200	27	29	55.56	37.93
300	29	26	55.17	30.77

5 不同杂交种的子叶形胚对胚状体成苗的影响

将获得的各种试材的子叶形胚接种在 MS 培养基上, 琼脂浓度为 1.0%, 蔗糖为 3%, 3 周后统计成苗率。表 5 结果显示, 接种的子叶形胚有的分化成再生植株, 有的仅子叶变绿无真叶出现, 有的褐化死亡。可见不同杂交种的羽衣甘蓝

表5 基因型对胚状体成苗的影响

Table 5 Effect of genotype on the plantlet formation in kale

杂交 种类	接种胚 数/个	成苗 数/株	成苗 率/%	成苗情况
红欧	31	16	51.61	分化成 2~3 片真叶的小植株
圆叶红心	38	22	57.89	分化成 4~5 片真叶的小植株
圆叶白心	35	17	48.57	子叶变绿没有真叶出现
皱叶红心	42	25	59.52	分化成 4~5 片真叶的小植株
皱叶白心	41	23	56.09	分化成 2~3 片真叶的小植株
皱叶玫红	37	0	0	胚褐化死亡
绿叶多汁	38	18	47.37	子叶变绿没有真叶出现

胚状体成苗能力差别很大。

6 低温培养天数对胚状体成苗的影响

将成苗较好的‘圆叶红心’、‘皱叶红心’子叶形胚转至MS的培养基中,琼脂浓度为1.0%,蔗糖为3%,pH 5.8,经10℃低温培养5或10 d,以直接光照培养25℃为对照,3周后观察成苗情况,结果见表6。

表6 低温培养对羽衣甘蓝小孢子胚成苗的影响

Table 6 Effect of low temperature culture on the plantlet formation in kale

杂交种类	10℃处理	接种胚数/个	成苗数/株	成苗率/%
圆叶红心	对照	38	22	57.89
	5 d	40	24	60.00
	10 d	45	29	64.44
皱叶红心	对照	42	25	59.52
	5 d	45	28	62.22
	10 d	50	34	68.00

表6表明,低温可提高胚状体的直接成苗率。10 d的效果优于5 d的。经低温处理的胚状体胚轴伸长,向上生长,而未经低温处理的大多数胚轴不能直立,平卧生长。

此外,我们还作了胚状体放置方式与成苗关

系的实验,胚状体放置分平放和竖插。结果是,成苗率与胚状体的放置方式关系不大。

参考文献

- 姜凤英,冯辉,王超楠(2005).羽衣甘蓝的小孢子胚诱导和植株再生.植物生理学通讯,41(6):725~727
- Cao MQ, Li Y, Liu F, Jiang T, Liu GS (1995). Application of anther culture and isolated microspore culture to vegetable crop improvement. Acta Hort, 392: 27~28
- Dias JS (1999). Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis. Euphytica, 108 (1): 65~69
- Dias JS (2001). Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. Euphytica, 119: 389~394
- Fukuoka H, Ogawa T, Matsuoka M, Ohkawa Y, Yano H (1998). Direct gene delivery into isolated microspores of rapeseed (*Brassica napus* L.) and the production of fertile transgenic plants. Plant Cell Rep, 17 (5): 323~328
- Lichter R (1982). Induction of haploid plants from isolated of *Brassica napus*. Zur 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
- Wang HZ (1999). Application of microspore culture technology in the breeding of rapeseed hybrid. Proceedings of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia, 264~269