

羽衣甘蓝的小孢子胚诱导和植株再生

姜凤英^{1,2} 冯辉^{1,*} 王超楠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 以羽衣甘蓝10个品种的游离小孢子培养, 研究其胚状体及其再生植株诱导方法的结果表明, 琼脂糖和活性炭对诱导胚状体发生及发育有促进作用; 改良MS培养基中添加0.01%的活性炭可促进植株再生; 确定1/2MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹是优化生根的培养基; 小孢子再生植株成活率可达74.6%。

关键词 羽衣甘蓝; 小孢子; 胚状体; 植株再生

Embryogenesis and Plant Regeneration from Isolated Microspore Culture of Kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.)

JIANG Feng-Ying^{1,2}, FENG Hui^{1,*}, WANG Chao-Nan¹

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

Abstract Isolated microspores of 10 kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) varieties were cultured. It was found that only those late-uninucleate and binucleate microspores could grow into division. Genotypes and mediums had important impact on embryoid induction. Agarose and active carbon not only could promote embryoid induction, but also increase the proportion of cotyledonary embryoids. Improved MS medium with 0.01% active carbon could promote plant regeneration. 1/2MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹ medium was suitable for rooting. The rate of lived plant regeneration was 74.6%.

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

羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.)又名叶牡丹, 属十字花科芸苔属甘蓝种的一个变种, 二年生草本, 是一种最接近甘蓝野生种的蔬菜或观叶植物, 更是一种营养食疗蔬菜。另外, 用游离小孢子培养技术可以快速地获得纯合系, 在蔬菜杂交育种中有广阔的应用前景, 已成为当前生物技术育种中的方法之一^[1~5]。但此技术在羽衣甘蓝中的应用还不成熟^[6~9], 迄今还未见用此法培养羽衣甘蓝小孢子成功的报道。本文以10个羽衣甘蓝F₁品种为试材, 对其游离小孢子培养技术优化进行了探讨^[10,11], 诱导出胚状体, 并获得再生植株。现报道如下。

材料与方 法

10个羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) F₁杂交种: “红鸠”、“白鸠”, “红欧”、“白欧”, “绿叶多汁”(青汁ケール), 大阪系列“圆叶红心”、“圆叶白心”, 名古屋系列“皱叶红心”、“皱叶白心”和“皱

叶玫红”。7月中旬穴盘育苗, 8月中下旬分盆, 11月份移到温室中光照处理, 花期取材。

羽衣甘蓝现蕾后, 摘取健壮植株的花蕾, 采用醋酸洋红压片后在生物显微镜下观察, 选取单核靠边期至双核早期小孢子所占比例较大的花蕾(花蕾长度3.0~5.5 mm)分离小孢子。

分离小孢子时, 花蕾先用70%的酒精消毒30 s, 再用0.1%的升汞消毒10 min, 以无菌水冲洗3次, 每次5 min。消毒后的花蕾放入灭过菌的小烧杯内(加少量B₅洗涤培养基), 用无菌研棒碾压花蕾, 挤出小孢子, 再用40 μm尼龙筛网过滤, 收集滤液于10 mL离心管中, 以89×g离心3 min。弃去上清液, 沉淀物加B₅洗涤培养基, 摇匀, 再以22×g离心3 min。重复2次, 弃去上清液, 所得沉淀物即为纯化小孢子。

收稿 2005-04-14 修定 2005-09-15

资助 国家“863”项目(2004AA241120)。

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

纯化后的小孢子用NLN-13培养液稀释浓度至 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 个 \cdot mL $^{-1}$ (用血球计数板计数),以每皿2.5 mL小孢子悬浮液分装入直径为60 mm的无菌玻璃培养皿内,用石蜡膜封口,先在33℃恒温箱中热激处理1 d,再转至25℃下静置暗培养。2周后观察胚状体发生情况。

结果与讨论

1 基因型对小孢子胚胎发生的影响

在NLN-13培养基上,游离小孢子热激培养1 d后,部分小孢子即明显膨大。培养2~3 d后,小孢子出现第1次细胞分裂。在10个品种中,有4个品种的小孢子发生细胞分裂,最终有3个品种(“红欧”,大阪系列“圆叶红心”、“圆叶白心”)获得胚状体;其他6个品种无任何反应。这

表明,部分基因型在热激处理之后,以NLN-13培养基培养可以改变小孢子细胞的发育方向。但细胞分裂形成胚状体的过程还需优化。

2 培养基对小孢子胚胎发生的影响

在添加不同配比生长调节剂(0.05~0.6 mg \cdot L $^{-1}$ 6-BA+0~0.4 mg \cdot L $^{-1}$ NAA)的NLN-13培养基上,游离小孢子经培养2~3 d后,在10个基因型中,有8个品种的小孢子细胞分裂,但最终有6个品种(“红欧”,大阪系列“圆叶红心”、“圆叶白心”,名古屋系列“皱叶红心”、“皱叶白心”和“皱叶玫红”)获得胚状体。有较高胚胎发生能力的“皱叶红心”,其出胚率约为0.83个 \cdot 蕾 $^{-1}$ 。除基因型外,培养基成分也是影响小孢子胚胎发生能力的关键因子。培养基成分对成功诱导小孢子胚胎发生的作用优于基因型的影响(表1)。

表1 基因型及培养基对羽衣甘蓝小孢子胚胎发生的影响

Table 1 Effects of genotypes and medium on embryogenesis of microspore in kale

培养基	出胚率/个 \cdot 蕾 $^{-1}$									
	红鸠	白鸠	红欧	白欧	圆叶红心	圆叶白心	皱叶红心	皱叶白心	皱叶玫红	绿叶多汁
NLN-13	0	0	0.06	0	0.17	0.42	0	0	0	0
NLN-13+6-BA	0	0	0.21	0	0.06	0.81	0.83	0.08	0	0
NLN-13+6-BA+NAA	0	0	0.43	0	0.14	0.19	0.13	0.67	0.28	0

3 琼脂糖和活性炭对小孢子胚胎发生及发育的影响

在上述NLN-13培养基上,分别添加50、100、150 μ L的500 mg \cdot L $^{-1}$ 琼脂糖和10 g \cdot L $^{-1}$ 活性炭,对10个品种中未获得胚状体的4个基因型进行游离小孢子培养。20 d后,添加50、100 μ L琼脂糖和活性炭的培养基上“绿叶多汁”品种成功诱导出胚状体,而“红鸠”、“白鸠”、“白欧”仍未获得胚状体。再将试验中获得的发育不一致的胚状体(图1-a),挑出子叶期的胚,将剩下的胚分成两组,一组在添加100 μ L琼脂糖和活性炭的新鲜培养基上培养,另一组置于未加琼脂糖和活性炭的相同基本培养基上培养。继续培养15 d后,前一个培养基上幼胚发育迅速,胚体粗壮,且最终大部分幼胚都能发育成子叶期的胚;而后者的幼胚发育迟缓,较幼小,只有少部分能发育至子叶期胚(表2)。

表2 琼脂糖和活性炭对羽衣甘蓝小孢子胚胎发生的影响

Table 2 Effects of agarose and active carbon on embryogenesis of microspore in kale

500 mg \cdot L $^{-1}$ 琼脂糖+10 g \cdot L $^{-1}$ 活性炭体积/ μ L	出胚率/个 \cdot 蕾 $^{-1}$			
	绿叶多汁	红鸠	白鸠	白欧
0	0	0	0	0
50	0.26	0	0	0
100	0.44	0	0	0
150	0	0	0	0

4 胚培养和再生植株的获得

羽衣甘蓝小孢子胚发育的一致性较差,为此,我们将试验中获得的鱼雷形、子叶形胚状体都转至改良MS+0.01%活性炭+1.0 g \cdot L $^{-1}$ 琼脂的培养基上,置于25℃、12 h \cdot d $^{-1}$ 光照的培养室中培养,经过30 d胚状体培养分化成幼苗。鱼雷形

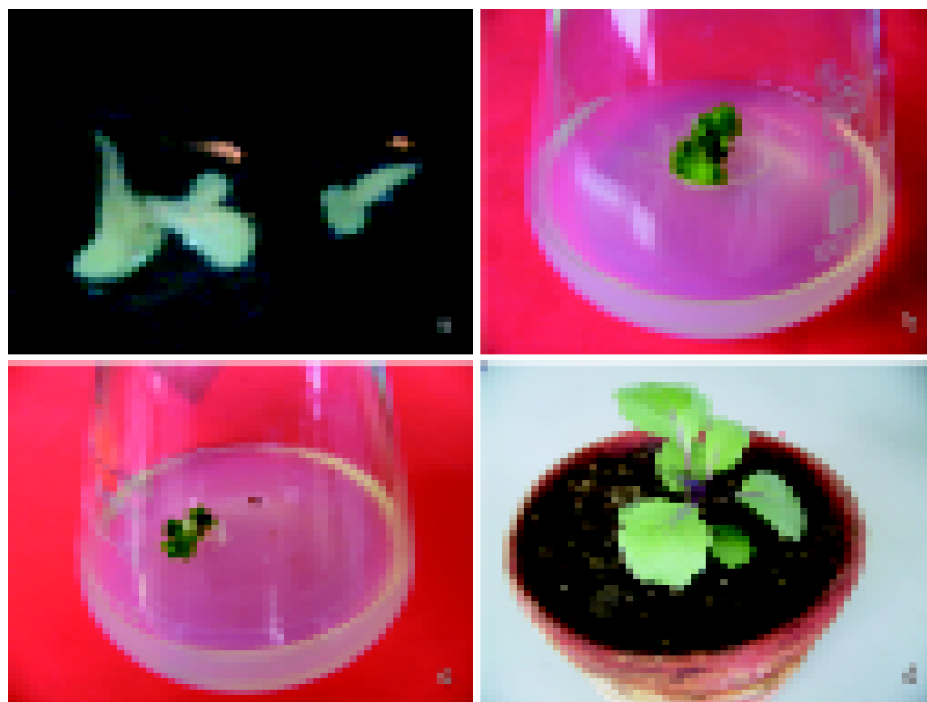


图1 羽衣甘蓝小孢子再生植株的形成过程

Fig. 1 The process of embryoid induction and plant regeneration by isolated microspores in kale

a: 小孢子培养获得的胚状体; b: 小孢子胚直接萌发成苗; c: 小孢子胚经愈伤再分化成苗; d: 移栽成活的小孢子植株。

胚状体有两条成苗途径: 一是胚根伸长, 子叶萌发, 与子叶形胚状体成苗(图1-b)相似; 另一种是经脱分化后, 形成绿白致密的愈伤组织, 再分化成幼苗(图1-c)。幼苗经壮苗培养后转到 $1/2MS+NAA 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 生根培养基上, 15 d后, 4~10条白色根系粗壮、整齐, 生根率达100%。炼苗后, 将生根苗移栽到温室苗床基质中, 成活后获得小孢子植株(图1-d) 29株, 成活率达74.6%。

总之, 本文初步建立了羽衣甘蓝小孢子培养的再生体系, 并获得再生植株。但比已报道的白菜、小白菜、青花菜等十字花科作物小孢子培养的小孢子胚状体诱导率低, 说明影响诱导羽衣甘蓝小孢子培养的因素还很多, 尚应进一步研究。

参考文献

- 1 Chuong PV, Beversdorf WD. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun. *Plant Sci*, 1985, 39: 219~226
- 2 Swanson EB, Coumans MP, Wu SC et al. Efficient isolation of microspore and the production of microspore-derived embryos from *Brassica*. *Plant Cell Rep*, 1987, 6: 94~97
- 3 Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassicaceae* species. *Plant Breed*, 1989, 103: 119~123
- 4 Cao MQ, Charlor F, Dore C. Embryogenesis and plant regeneration of sauerkraut cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata*) via *in vitro* isolated microspore culture. *CR Acad Sci Paris*, 1990, 310: 203~209
- 5 Duijs JG, Voorrips RE, Visser DL et al. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. *Euphytica*, 1992, 60: 45~55
- 6 Keller WA, Armstrong KC. Production of haploids via anther culture in *Brassica oleracea* var. *italica*. *Euphytica*, 1983, 32: 151~159
- 7 Ielu MA, Bollon H. Haploid production from anther cultures of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* and var. *gemmifera*. *CR Acad Sci Paris*, 1986, 300: 71~76
- 8 Takahata Y, Keller WA. High frequency embryogenesis from microspore culture of *B. oleracea*. *Jpn J Breed*, 1990, 40(1): 134~135
- 9 Takahata Y, Keller WA. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Sci*, 1991, 74: 235~242
- 10 Dias JS. Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* L. microspore culture embryogenesis. *Euphytica*, 1999, 108(1): 65~69
- 11 Dias JS, Correia MC. Effect of medium renovation and incubation temperature regimes on tronchuda cabbage microspore culture embryogenesis. *Sci Hortic*, 2002, 93: 205~214