

活性炭对小白菜游离小孢子培养的影响

蒋武生, 张晓伟, 姚秋菊, 原玉香, 耿建峰

(河南省农业科学院 园艺研究所, 河南 郑州 450002)

摘要:以 24 个小白菜品种为材料, 通过在 NLN 培养基中添加不同浓度活性炭, 研究其对游离小孢子培养的影响。结果表明: 在 NLN-13 培养基中添加活性炭(0.5 g/L), 有利于小孢子胚的诱导和形成, 供试材料(N4、N8)添加活性炭处理胚诱导率较未添加活性炭的处理分别提高 19.66 5 倍。采用添加活性炭(0.5 g/L)的 NLN 培养基对 24 份小白菜品种进行游离小孢子培养, 有 20 份材料诱导出胚, 培养成功率为 83.3%。表明添加活性炭的培养基对小白菜游离小孢子培养有较好的效果。不同基因型间胚诱导率差别较大, 每花蕾诱导胚数为 0.4~86.7 个。依据胚诱导率的高低可将其分为极易诱导、易诱导、难诱导和不能诱导出胚 4 类。B₅+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.02 mg/L+活性炭 0.5 g/L+3%蔗糖+1%琼脂培养基有利于幼胚长成植株。

关键词: 小白菜; 游离小孢子培养; 小孢子胚; 诱导率; 活性炭

中图分类号: S634.303.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)05-0093-04

Influence of Activated Charcoal on Isolated Microspore Culture in Chinese Cabbage

JIANG Wu-sheng, ZHANG Xiao-wei, YAO Qiu-ju, YUAN Yu-xiang, GENG Jian-feng

(Institute of Horticulture, Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Fluency of activated charcoal on isolated microspore culture in Chinese cabbage was studied. The results showed that NLN-13 liquid medium with activated charcoal(0.5 g/L)was obviously better in frequency of microspore-derived embryos and frequency of regenerated plants. Frequency of microspore-derived embryos in N4 and N8 was increased 19 and 66.5 times. Isolated microspores from 24 varieties of Chinese cabbage were cultured in NLN-13 liquid medium with activated charcoal (0.5 g/L), 20 varieties were produced microspore-derived embryos. Embryo yield per bud (frequency microspore-derived embryos)was from 0.4 to 86.7. Microspore-derived embryos on B₅ medium with 6-BA 0.2 mg/L and NAA 0.02 mg/L and activated charcoal 0.5 g/L and 3% sucrose and 1% agar is good to regenerated plants.

Key words: Chinese cabbage; Isolated microspore culture; Microspore-derived embryos; Frequency; Activated charcoal

小白菜(*Brassica campestris* ssp. *chinensis*)属于十字花科芸薹属, 是我国种植面积较大和供应期较长的叶用蔬菜。其品种繁多, 生长周期短, 适应性强, 可常年生产供应, 在各地蔬菜市场上占据重要地位。小白菜是异花授粉植物, 杂交优势非常明显, 其单倍体纯系材料在育种研究中具有重要意义。游离小孢子培养是单倍体育种技术中快速获得纯系的一种有效方法, 与常规多代自交获得纯系相比, 具有周期短、效率高、纯系稳定等特点。在芸薹属作物中, 先后对油菜^[1-4]、芥菜^[5-9]、甘蓝^[2, 6]、大白菜^[7-10]、小白菜^[11-13]和花椰菜^[14]等进行了游离小孢子培养并获得了再生植株。国内外学者^[7-13]对影响白菜等游离小孢子培养的某些因素(基因型、培养基、供体

植株的生长条件、高温预处理等)进行了研究, 取得了明显的进展。通过优化培养基和改进培养方法, 使部分材料小孢子胚诱导率有了提高。

我国钟仲贤^[11]、李岩^[12]和蒋武生^[13]等曾对小白菜花药和游离小孢子进行了培养, 并在部分基因型中得到了再生植株。但小孢子发育同步性差, 胚诱导率和出苗率低, 基因型适应范围狭窄, 很难在育种生产中应用。活性炭是一种吸附剂, 在油菜^[4]游离小孢子培养中具有提高小孢子胚成苗率的作用。但在小白菜中是否有类似的效果未见报道。本试验以小白菜为材料, 就活性炭在游离小孢子培养中对胚诱导和形成的影响进行了研究。

收稿日期: 2008-07-26

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2001AA241125); 河南省重大科技攻关项目(072101110400)

作者简介: 蒋武生(1957-), 男, 河南民权人, 副研究员, 主要从事蔬菜生物技术育种研究。

1 材料和方法

1.1 供试品种

试验于2002年9月至2006年10月在河南省农业科学院园艺研究所生物技术实验室进行。供试材

表 1 供试材料的代号和来源

Tab. 1 Code and origin of tested materials					
代号 Code	基因型 Genotype	来源 Origin	代号 Code	基因型 Genotype	来源 Origin
N1	青梗 308 Qinggeng 308	日本 Japan	N13	台湾大头清江 Taiwandatouqingjiang	台湾 Taiwan
N2	绿星青菜 Luxingqingcai	江苏 Jiangsu	N14	黄帮 Huangbang	辽宁 Liaoning
N3	五月慢 Wuyueman	北京 Beijing	N15	乌塌菜 Wutacai	湖北 Hubei
N4	改良奶白菜 Gailiangnaibaicai	北京 Beijing	N16	金夏时青梗菜 Jinxiashiqinggengcai	日本 Japan
N5	京绿 2 号 Jinglu 2	北京 Beijing	N17	精选黄心菜 Jingxuanhuangxincai	北京 Beijing
N6	京绿 3 号 Jinglu 3	北京 Beijing	N18	金光快菜 Jinguanguai cai	韩国 Korea
N7	京绿 7 号 Jinglu 7	北京 Beijing	N19	三宝小型白菜 Sanbaoxiaoxinghaicai	韩国 Korea
N8	寒笑 Hanxiao	江苏 Jiangsu	N20	热抗青青菜 Rekangqingqingcai	河北 Hebei
N9	暑绿 Shulu	江苏 Jiangsu	N21	京都冠军 Jingdouguanjun	日本 Japan
N10	黑白菜 Heibai cai	湖北 Hubei	N22	日本青梗 Ribenqinggeng	日本 Japan
N11	黄心乌白菜 Huangxinwubaicai	湖北 Hubei	N23	花冠 Huaguan	日本 Japan
N12	黑叶白菜 Heiyebaicai	广东 Guangdong	N24	早生金品 21F Zaoshengjinpin21F	新西兰 New Zealand

1.2 方法

1.2.1 花蕾的选择、消毒和小孢子游离培养 从供体植株主花序或顶部分枝花序上取 2.0~4.0 mm 长花蕾,取出小孢子在显微镜下镜检,确定合适的发育时期。选取小孢子处于单核中期至双核初期的花蕾(2.0~3.0 mm),用 75%酒精浸 30 s,0.1%HgCl₂ 消毒 5 min,无菌水冲洗 3 次以上。然后将花蕾置入 10 mL 试管中,加入 Keller-13 冲洗液 2~4 mL,用玻棒挤破花蕾散出小孢子,将小孢子悬浮液用孔径为 50 μm 滤网过滤,收集滤液在 600 r/min 下离心 3 min,沉降小孢子,弃去上清液。再加入 Keller-13 冲洗液,重新悬浮小孢子,离心重复 3 次。最后加入 NLN-13 培养液,用血球计数板计数,调整小孢子浓度为 1×10⁵ 个/mL。将小孢子悬浮液分装至 60 mm×15 mm 培养皿中,每皿 2 mL,用 Parafilm 膜封口。小孢子先放入 33℃恒温培养箱中高温培养 24 h,然后转入 25℃下黑暗培养。每份材料培养 5~9 皿,每天取 1 皿在倒置显微镜下观察小孢子分裂情况和形成小细胞团数目。培养 30 d 后统计小孢子胚数目,并计算诱导率。

诱导率(胚/蕾)=诱导小孢子胚数/培养花蕾数

1.2.2 胚培养和生根 将小孢子胚在光照下培养变绿,然后转入 B₅+0.2 mg/L 6-BA+0.02 mg/L NAA 固体培养基上长成绿芽。在该培养基上继代培养可以分化出较多幼芽。然后转入 B₅+0.1 mg/L NAA 生根培养基上可生根形成完整植株。

1.2.3 不同浓度活性炭对提高胚诱导率的影响 选取来自北京、江苏、日本和韩国的 4 个品种(N4, N8, N16, N19),分别在 NLN-13 培养基中添加 0.0.3,

料为生产中应用的 24 个小白菜品种,品种代号为 N1-N24(表 1)。这些材料来自国内外不同的地区,材料类型多、基因型丰富,具有广泛的代表性。各品种种子在试验前一年秋季播于大田,自然越冬后于第 2 年春季 3—4 月进行培养。

0.5, 1.0 g/L 活性炭,比较不同浓度活性炭对小孢子胚诱导率的影响。

1.2.4 不同基因型胚诱导率比较 以 NLN+13%蔗糖+0.5 g/L 活性炭为培养基,对来自国内外的 24 个小白菜基因型进行游离小孢子培养,比较不同的基因型对胚诱导率的影响。

1.2.5 活性炭对胚成苗率的影响 选取胚诱导率高的 3 个基因型(N9, N13, N14),将胚见光后分别转入 B₅+0.2 mg/L 6-BA+0.02 mg/L NAA+0.5 g/L 活性炭+3%蔗糖(A)和 B₅+0.2 mg/L 6-BA+0.02 mg/L NAA+3%蔗糖(B)的固体培养基上,研究活性炭对小孢子胚培养成苗率的影响。

2 结果与分析

2.1 不同浓度活性炭对小孢子胚诱导率的影响 由表 2 结果可以看出,N4(改良奶白菜)、N8(寒笑)、N16(金夏时青梗菜)、N19(三宝小型白菜)4 个基因型在添加 0.3~1.0 g/L 活性炭后,小孢子胚诱导率均有显著提高。N16, N19 在添加活性炭 0.5 g/L 的 NLN 培养基中,胚的诱导率分别达每花蕾 3.4, 4.0 个胚,而在未添加活性炭 NLN 培养基中均未诱导出小孢子胚;N4, N8 也有类似的结果,在添加活性炭的处理中分别较对照提高了 19, 66.5 倍,活性炭对小孢子胚的诱导效果极显著。4 份材料均以 0.5 g/L 活性炭的效果最好,0.3 g/L 的处理次之,1.0 g/L 的处理较差,而未添加活性炭的对照最差。表明活性炭处理对游离小孢子培养胚诱导率的提高具有显著的促进作用,最适的处理浓度为 0.5 g/L。

表 2 不同浓度活性炭对小孢子胚诱导率的影响

Tab. 2 Influence of different concentration activated charcoal on frequency of microspore embryos

代号 Code	活性炭处理/(g/L) Activated charcoal conduct	培养花蕾数/个 No. of buds	诱导胚数/个 No. of embryos	诱导率/(胚/蕾) Frequency (Embryos / Bud)	代号 Code	活性炭处理/(g/L) Activated charcoal conduct	培养花蕾数/个 No. of buds	诱导胚数/个 No. of embryos	诱导率/(胚/蕾) Frequency (Embryos / Bud)
N4	0	16	2	0.1	N16	0	18	0	0
	0.3	10	9	0.9		0.3	9	28	3.1
	0.5	10	20	2.0		0.5	9	31	3.4
	1.0	12	5	0.4		1.0	9	15	1.7
N8	0	12	2	0.2	N19	0	12	0	0
	0.3	8	90	11.3		0.3	10	39	3.9
	0.5	8	108	13.5		0.5	10	40	4.0
	1.0	12	37	3.1		1.0	8	11	1.4

2.2 不同基因型小孢子胚诱导率比较

采用小孢子胚诱导率较高的NLN+13%蔗糖+0.5 g/L 活性炭培养基,对来自国内外的小白菜不同基因型进行游离小孢子培养,结果见表3。在供试的24个基因型中,有20个获得了小孢子胚,诱导出胚的材料占供试材料的83.3%。但不同基因型小孢子胚诱导率差别极大,N13诱导率最高,平均每花蕾86.7个胚,N7等4个基因型诱导率为0。依据诱导率的高低可将材料分为极易诱导、易诱导、难诱导和不能诱导出胚4类。其中,N13,N14,N21为极易

诱导出胚类基因型,胚诱导率在每花蕾10个胚以上,占培养材料的12.5%;N3,N5,N6,N8,N9,N10,N16,N17,N18,N19,N20,N23,N24为易诱导类基因型,胚诱导率在每花蕾1~10个胚之间,占培养材料的54.1%;而N1,N2,N4,N11,为难诱导类基因型,胚诱导率在每花蕾0.4~1个胚之间,占培养材料的16.7%;N7,N12,N15,N22为未诱导出胚类基因型,占培养材料的16.7%(表3)。表明基因型是影响小白菜小孢子胚诱导的关键因素。

表 3 不同基因型在添加活性炭的 NLN-13 培养基中的诱导率

Tab. 3 Frequency of microspore embryos for different genotypes in NLN-13 medium with activated charcoal

代号 Code	培养花蕾数/个 No. of buds	诱导胚数/个 No. of embryos	诱导率/(胚/蕾) Frequency (Embryos / Bud)	代号 Code	培养花蕾数/个 No. of buds	诱导胚数/个 No. of embryos	诱导率/(胚/蕾) Frequency (Embryos / Bud)
N1	36	18	0.5	N13	11	954	86.7
N2	30	12	0.4	N14	26	380	14.6
N3	10	48	4.8	N15	36	0	0
N4	40	20	0.5	N16	18	74	4.1
N5	28	67	2.4	N17	9	48	5.3
N6	20	60	3.0	N18	18	68	3.8
N7	36	0	0	N19	10	40	4.0
N8	72	142	2.0	N20	22	46	2.1
N9	90	326	3.6	N21	34	359	10.6
N10	12	21	1.8	N22	36	0	0
N11	16	10	0.6	N23	63	210	3.3
N12	34	0	0	N24	38	67	1.8

表 4 活性炭对小孢子胚成苗率的影响

Tab. 4 Influence of activated charcoal on plant frequency of microspore embryos

代号 Code	处理 Conduct	培养胚数/个 No. of embryos	成苗数/株 No. of plants	成苗率/% Frequency of plants
N9	A	124	71	57.3
	B	127	67	52.7
N13	A	120	63	52.5
	B	162	78	48.1
N14	A	48	34	70.8
	B	40	23	62.5

2.3 活性炭对小孢子胚培养成苗率的影响

选取胚诱导率较高的3个基因型(N9,N13,

N14),将胚分别转入添加活性炭(0.5 g/L)的A培养基和未添加活性炭的B培养基上,比较活性炭对

小孢子胚培养成苗率的影响(表 4)。结果表明,N9,N13,N14 3 个基因型在添加活性炭(0.5 g/L)的 A 培养基上,胚成苗率均有程度不同的提高。此外,小孢子胚还在添加活性炭的培养基中生长较健壮。

2.4 胚再生植株和移栽

小白菜小孢子培养胚的发育具有不同步性,在同一器皿中同时存在球形、心形、鱼雷形和子叶形等不同类型的胚。子叶形胚在适当见光培养后,转入Bs+0.2 mg/L 6-BA+0.02 mg/L NAA+0.5 g/L 活性炭+3%蔗糖的固体培养基上继代培养,多数胚能长成幼苗;之后在该培养基上每月继代一次,能形成较多的小苗,再将高度在 2~5 cm 的健壮绿苗转入MS+0.1 mg/L NAA 生根培养基上,15 d 左右能长出新根,形成完整植株。较小的心形和球形胚,转入添加活性炭和 1%琼脂固化的继代培养基上,也有部分胚能形成幼苗。取生根并生长健壮的植株,洗净根上的培养基,移入盛有园田土的营养钵中,栽后喷水,并用塑料膜和遮阳网覆盖,保持合适的温湿度,一般 7 d 后可生根,10~15 d 可成活。在温度稍低的秋季移栽,成活率在 90%以上。

3 讨论与结论

在 NLN 培养基中添加活性炭对小白菜游离小孢子培养的研究结果表明,不同来源和不同类型的小白菜基因型均可诱导出小孢子胚。小白菜基因型适应的范围较宽,在供试的 24 个基因型中,有 20 个诱导形成了胚,基因型诱导成功率为 83.3%。但不同基因型间胚诱导率差别极大,最高的 N13 诱导率为每花蕾 86.7 个胚,较低的 N2 仅为每花蕾 0.4 个胚,前者是后者的 216.8 倍,N7 等 4 个基因型未诱导出胚。就供试材料而言,极易诱导出胚和不能诱导出胚的基因型较少,分别占 12.5%,16.7%;多数基因型诱导率在二者之间,占 70.8%。这与以往的研究结果相类似^[8-10]。表明基因型是影响小孢子胚诱导成功与否的关键因素。基因型之间诱导率的差别可能是细胞核某些功能基因作用的结果。

小白菜游离小孢子培养以在 NLN+13%蔗糖培养基中附加 0.5 g/L 活性炭效果较好,供试材料 N4,N8 的胚诱导率分别是不添加活性炭(对照)的 20,67.5 倍。活性炭对提高小孢子培养胚诱导率的作用非常显著,这与田保明等^[4]在油菜中研究的结果相同,推断可能是由于活性炭在游离小孢子培养中吸附了培养基中产生的和小孢子释放的有毒有害物

质有关。供试的 4 个基因型均以添加 0.5 g/L 活性炭的效果最好,0.3 g/L 的处理次之,1.0 g/L 的处理较差,而未添加活性炭的对照最差。高浓度活性炭处理小孢子胚的诱导率下降,主要与活性炭在培养过程中吸附有毒害物质的同时也吸附了培养基中的营养物质有关。

在以往的研究中发现,采用振荡培养代替静置培养有利于大白菜和油菜小孢子胚的诱导和形成,振荡培养可增加培养容器的透气性,促进呼吸作用,把小孢子、小细胞团和培养基中产生的不利物质稀释。在游离小孢子培养中添加适量的活性炭,采用振荡培养的方法,是提高胚诱导率的一种行之有效的方法,可在小白菜单倍体育种中应用。

参考文献:

- [1] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*[J]. Pflanzenphysiol Bd, 1982, 105: 427—434.
- [2] Chuong P V, Beversdorf W D. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata Braur*[J]. Plant Science, 1985, 39: 219—226.
- [3] 朱家成,文雁成,张淑芬,等.甘蓝型油菜游离小孢子培养技术研究[J].河南农业科学,2001(11):4—5.
- [4] 田保明,蒋武生,张晓伟,等.提高油菜游离小孢子胚诱导频率的研究[J].华北农学报,2007,22(1):116—119.
- [5] Hetz E. Plant regeneration from isolated microspore of black mustard(*Brassica nigra*)[C]. X II Eucapia Congress, 1989: 10—15.
- [6] Suanson E B. Microspore culture in *Brassica*[J]. Plant Cell and Tissue Culture, 1990, 11: 159—169.
- [7] Sato T, Nishio T, Hirai M. Plant regeneration from isolated microspore culture of chinese cabbage(*Brissica campestris* ssp. *pekinensis*)[J]. Plant Cell Reports, 1989, 8: 486—488.
- [8] 栗根义,高睦枪,赵秀山.大白菜游离小孢子培养[J].园艺学报,1993,20(2):167—170.
- [9] 曹鸣庆,李岩,蒋涛.大白菜和小白菜小孢子培养试验简报[J].华北农学报,1992,7(2):119—120.
- [10] 蒋武生,原玉香,张晓伟,等.提高大白菜游离小孢子胚诱导率的研究[J].华北农学报,2005,20(6):34—37.
- [11] 钟仲贤,任云英,代维平.青菜花药培养的初步研究[J].植物学报,1978,20(2):180—181.
- [12] 李岩,刘凡,曹鸣庆,等.通过游离小孢子培养方法获得小白菜三个变种的胚胎及植株[J].华北农学报,1993,8(3):92—97.
- [13] 蒋武生,原玉香,张晓伟,等.小白菜游离小孢子培养及其再生植株[J].河南农业大学学报,2005,39(4):398—402.
- [14] 赵前程,佟志强,孙德岭,等.提高花椰菜游离小孢子胚胎植株再生率的研究[J].河南农业科学,2007(7):77—79.
- [15] 郭金英,申书兴,陈雪平,等.十字花科蔬菜游离小孢子培养研究进展[J].河北农业大学学报,2002,25(增刊):122—124.