

用小孢子培养创建大白菜双单倍体永久作图群体

张凤兰, 赵岫云

(北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100089)

摘要:用高抗 TuMV 的高代自交系 91-112 和高感 TuMV 的小孢子双单倍体系 T12-19 杂交的 F₁ 植株进行小孢子培养, 多次继代培养使小孢子再生苗安全越冬, 再经移栽驯化后进行低温处理, 定植到日光温室。通过加强田间管理, 有效地提高了小孢子培养生产双单倍体的成功率和结实水平, 得到一个具有 146 个大白菜双单倍体系的作图群体。

关键词:大白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*); 小孢子培养; 双单倍体; 遗传作图

中图分类号: S634.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)04-0055-03

Establishing Doubled Haploid Population with Microspore Culture for Genetic Mapping in Chinese Cabbage

ZHANG Feng-lan, ZHAO Xi-yun

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100089, China)

Abstract: Microspore culture was carried out in hybrid plants between a high generation inbred line 91-112 and a DH line T12-19, which are high resistant and susceptible to TuMV, respectively. The survive frequency of regenerated plants and seed set of DH plants were highly improved by successive subculture during summer, low temperature treatment after domestication and transplanted in greenhouse. A DH population with 146 lines was obtained.

Key words: Chinese cabbage; Microspore culture; Doubled haploid; Genetic mapping

20 世纪 90 年代以来, 由于分子生物学技术的飞速发展, 利用 DNA 分子标记研究和定位数量性状座位或基因 (Quantitative Trait Loci, QTL) 的研究也有了飞跃的发展, 复杂的数量性状可剖分为若干离散的孟德尔因子所决定的组分, 进而确定其在染色体上的位置及其与其他基因的关系^[1,2]。

自从 Paterson Andrew^[1] 第一次运用分子标记进行番茄 QTL 定位以来, 对各种性状的 QTL 定位的研究报道很多。所用群体分为两类: 一类为暂时性群体, 如 F₂, F₃, BC, 三交群体等, 另一类为永久性群体, 如双单倍体 (Doubled haploid, DH)、重组自交系 (recombination inbred line, RIL) 群体等。与暂时性群体相比, 永久群体具有以下优点: (1) 由于所有的等位基因都是固定的, 可以无限地用于新标记的作图, 并可在研究小组之间共享。(2) 种子可多次繁殖, 可

以重复进行检验, 特别适合于抗性等数量性状的分析^[3]。DH 群体来自于 F₁ 的杂种配子, 由于品系内的完全同质性和完全纯合性, 是适合于构建 QTL 遗传图谱的永久性群体。DH 群体与其他永久群体如重组自交系和近等基因系相比还具有构建仅需 1~2 年时间, 构建费用较低的优点。

本文叙述了白菜通过游离小孢子培养构建双单倍体 (DH) 群体的方法和过程。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为高抗芜菁花叶病毒 (TuMV) 的 91-112 和高感 TuMV 的 T12-19, 91-112 为连续自交筛选 9 代的高代自交系, 高抗 TuMV, 叶面较平, 叶球叠抱。T12-19 是通过对北京地方品种和日本引进

收稿日期: 2002-09-09

基金项目: 北京市科技新星资助项目 (954812900)

作者简介: 张凤兰 (1964-), 女, 山东莱西人, 研究员, 博士, 主要从事十字花科蔬菜遗传育种工作。

品种的杂种 F_1 进行小孢子培养得到的双单倍体系, 高感病毒病, 叶面皱, 叶色深绿, 植株生长势弱。

9 月下旬将 91- 112 和 T12- 19 的 F_1 种子播于空调温室中育苗, 10 月中旬定植于玻璃温室中, 2 月份抽薹开花后, 进行小孢子培养。种株管理同常规。

1.2 方法

1.2.1 小孢子培养方法 小孢子培养参照 Takahata^[4] 的方法进行。取长 2~ 3 mm 的花蕾, 用含活性氯 2% 的 NaClO 溶液消毒 15 min, 无菌蒸馏水洗 3 次, 将消毒液洗净。无菌条件下在含蔗糖 13%、pH 6.0 的 B5- 13 液体培养基^[5] 中用研棒将花蕾捣碎, 用无菌微孔布 (45 μ m) 过滤, 将小孢子收集在离心管中, 在 1 000 r/min 下离心 3 min, 去掉上清液, 加入新的 B5- 13 培养基, 将小孢子悬浮后再次离心, 重复 3 次。用血球计数盘在显微镜下进行小孢子计数, 并用 $1/2\text{NLN}-10^{[4]}$ 培养基调整小孢子浓度为 1×10^5 个/mL。将小孢子悬浮液分注于 60 mm \times 15 mm 的培养皿中, 每皿 2~ 3 mL。在 32.5 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 1 d 后, 转移到 25 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中在黑暗条件下培养 21 d, 观察小孢子胚的发育情况。

1.2.2 植株再生方法 获得的胚状体经过 7 d 光下培养后, 将子叶期的成熟胚置于含 2% 蔗糖、1.6% 琼脂的固体 B5- 2 培养基上, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、16 h 日照、光强 $30\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光照培养箱中培养 21~ 28 d。再生芽伸长到 2 cm 以上时, 切芽插入装有含 2% 蔗糖、0.8% 琼脂的 B5- 2 培养基的三角瓶中, 继代培养至生根、成苗。

1.2.3 再生苗的田间管理 9 月上旬将越夏的小孢子再生苗从三角瓶中移出, 用自来水冲去根部的培养基, 栽于装满草炭土和蛭石的营养钵中(质量比为 1:1, 直径 8 cm) 中, 用塑料布或烧杯覆盖, 慢慢扩大塑料布或烧杯的通风口, 使再生苗逐渐适应生长环境的湿度条件, 温度管理以白天 25 $^{\circ}\text{C}$ 、夜间 15~ 18 $^{\circ}\text{C}$ 为宜。再生苗根系恢复生长后, 将苗放入 5 $^{\circ}\text{C}$ 的环境条件下处理 20~ 30 d 后, 定植于日光温室中, 行距 50~ 60 cm, 株距 30~ 33 cm。抽薹开花后, 套袋薹期自交, 调查花粉有无和结实情况。

2 结果与分析

2.1 小孢子培养的胚状体发生情况

小孢子培养工作从 2001 年 2 月 29 日开始, 3 月 31 日结束, 共进行了 7 次, 每次培养 30~ 40 个花蕾, 15~ 20 个培养皿。在 32.5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下黑暗培养 24 h,

在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 3 d 后, 在倒置显微镜下观察到一部分小孢子体积增大, 第一次细胞分裂在这些变大的小孢子中产生。经 10~ 14 d 培养后, 在培养皿中可观察到球状胚状体, 随着培养的进行, 逐步观察到心形、鱼雷形、成熟及畸形胚状体。小孢子胚状体的发育不同步, 培养 21 d 后, 可以发现培养皿中有各种发育时期的胚。7 次培养共计获得了小孢子再生胚 3 800~ 4 200 个, 平均每培养皿产胚 30~ 36 个, 每蕾产胚 15~ 18 个。其中子叶期成熟胚 1 407 个, 占 35%。

2.2 胚状体的芽再生情况

研究发现成熟胚经继代培养芽再生率显著高于其他发育时期的胚, 因此在诱导胚状体芽再生时, 只将 1 407 个成熟胚置于 B5- 2 芽再生培养基上, 为提高芽再生率, 固体培养基的琼脂浓度高达 1.6%。经过 30 d 的培养后, 获得 605 个芽长超过 2 cm 的再生芽, 芽再生率为 43%。将再生芽继代于装有琼脂浓度 0.8% 的 B5- 2 培养基的三角瓶中, 获得 481 株成苗的再生株。

2.3 小孢子再生株的越夏

2 月下旬开始进行小孢子培养, 5 月上旬即可得到第一批小孢子再生苗, 这时北京的外界气温一般上升很快, 已进入炎热的夏季。如果将得到的小孢子再生苗移栽到温室或露地, 由于气温高, 再生苗很难生长良好。另外在 7~ 9 月期间开花也很难得到后代种子。根据北京的气候特点, 最好在 9 月份以后将再生苗移到外界。5~ 8 月份期间, 可通过连续切芽培养的方法保存小孢子再生苗。具体做法是: 小孢子苗在三角瓶中生长 20~ 30 d, 在无菌条件下将中心芽切下 (2~ 3 cm 长), 再插入装有同样培养基的新三角瓶中。继代培养需进行 4~ 5 次。

2.4 再生苗的低温处理

过去为了促进春化, 小孢子再生苗从三角瓶定植到温室营养钵以前, 往往先将生长在三角瓶中的小孢子再生苗在低温下处理一段时间, 再移栽驯化, 这样做严重影响再生苗的营养生长, 植株生长很弱就过早抽薹开花, 冬性弱的品种甚至在三角瓶内抽薹开花。本实验改进的措施是先将小孢子再生苗移植到营养钵中驯化, 待根系生长稳定, 苗长到 5~ 6 片叶以上时再放到 5 $^{\circ}\text{C}$ 的环境条件下低温处理 20~ 30 d 后定植到日光温室。

2.5 双单倍体植株的获得

10 月中旬经过低温处理的小孢子再生苗 332

株定植于日光温室中。抽薹开花后, 观察到 169 株再生苗有花粉产生, 自然加倍率为 50.9 %。通过人工蕾期自交授粉, 最终有 146 株得到自交种子。

3 讨论

3.1 双单倍体群体用于数量性状定位

作物的许多重要经济性状属于微效多基因控制的数量性状。要对数量性状进行 QTL 定位, 首先需要构建一个目的性状的分离群体。目前常用的群体有 F₂群体、回交群体、回交自交系群体(BIL)、双单倍

体群体(DH)、重组自交系群体(RIL)、近等基因系群体(NIL)等。毛传澡和程式华^[6]较详细地比较了各种群体的不同特点(表 1), 可见 DH 群体具有构建时间短、构建费用中等、作图准确度高、需群体较小和为永久群体的特点, 为数量性状研究较理想的作图群体。因此, 大麦^[7]、小麦^[8]、水稻^[9]、玉米^[10]、甘蓝型油菜^[11]、甘蓝^[12]等作物都有用双单倍体群体作图和进行 QTL 定位的报道, 但大白菜迄今未见用双单倍体群体进行作图的研究报道。

表 1 几种作图群体的特点

特 点	F ₂	BC ₁	BIL	DH	RIL	NIL
群体的形成	F ₁ 自交	F ₁ 回交	F ₂ 自交回交后代	F ₁ 花药或花粉培养	F ₂ 自交后代	F ₁ 回交自交后代
准确度	低	低	高	高	高	最高
需群体大小	大	大	小	小	小	小
永久群体	否	否	否	是	是	是
分离比例	1: 2: 1	1: 1	1: 1	1: 1	1: 1	1: 1
构建费用	低	低	高	中等	中等	高
构建时间	短	短	长	短	长	长

3.2 双单倍体群体的构建

用游离小孢子培养技术构建大白菜双单倍体群体, 应特别注意小孢子再生株低温处理的时期和方法、小孢子再生苗的移植、驯化、定植时期和场所, 以及定植后的田间管理, 以提高再生苗的成活率和结实率, 从而提高构建双单倍体群体的效率。

参考文献:

[1] Paterson Andrew H, Lander Eric S, Hewitt John D, *et al.* Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms [J]. *Nature*, 1998, 335: 721– 726.

[2] Lander E S, Botstein D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps [J]. *Genetics*, 1989, 121: 185– 199.

[3] 徐云碧, 朱立煌. 分子数量遗传学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994.

[4] Takahata Y. Microspore culture [A]. In: Recent advances in oilseed Brassicas [C]. Ludhiana: Kalyani Publishers, 1997.

[5] Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells [J]. *Exp Cell Res*, 1968, 50: 151– 158.

[6] 毛传澡, 程式华. 水稻农艺性状 QTL 定位精确性及其影响因素的分析(综述) [J]. *农业生物技术学报*, 1999, 7: 386– 394.

[7] Attari H E, Hayes P M, Rebai A, *et al.* Potential of doubled haploid lines and localization of quantitative trait loci (QTL) for partial resistance to bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *hordei*) in barley [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 96: 95– 100.

[8] Cadalen T, Sourdille P, Chamet G, *et al.* Molecular markers linked to genes affecting plant height in wheat using a doubled – haploid population [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 96: 933 – 940.

[9] Lu C F, Shen L S, Tan Z B, *et al.* Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments by using a doubled haploid population [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 94: 145– 150.

[10] Ma H, Busch R H, Riera-Lizarazu O, *et al.* Agronomic performance of lines derived from anther culture, maize population and single-seed descent in a spring wheat cross [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 99: 432– 436.

[11] Foisset N, Delourme R, Barret P, *et al.* Molecular mapping analysis in *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLP markers on a doubled haploid progeny [J]. *Theor Appl Genet*, 1991, 93: 1017– 1025.

[12] Sebastian R L, Howell E C, King G J, *et al.* An integrated AFLP and RFLP *Brassica oleracea* Linkage map from two morphologically distinct doubled haploid mapping populations [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 100: 75– 81.