

# 提高油菜游离小孢子胚诱导频率的研究

田保明<sup>1,3</sup>, 蒋武生<sup>2</sup>, 张晓伟<sup>2</sup>, 原玉香<sup>2</sup>, 耿建峰<sup>2</sup>,  
曹刚强<sup>1,3</sup>, 韩永平<sup>2</sup>, 赵 珍<sup>3</sup>, 廉玉利<sup>3</sup>

(1. 郑州大学 离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450001;

2. 河南省农业科学院生物技术研究所, 河南 郑州 450002; 3. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001)

**摘要:**以 11 个甘蓝型油菜基因型为材料, 采用 NLN 培养基进行游离小孢子培养, 对如何提高可培养的基因型范围和产胚率进行了研究。结果表明, 11 个油菜基因型中有 10 个基因型可以诱导出胚, 培养成功率达 90.9%, 表明采用 NLN 培养基进行游离小孢子培养油菜基因型范围比较宽, 但各基因型间小孢子胚产量差别很大, 每花蕾产胚量为 0.08~3.53 个, TR4 和 TR9 两个基因型每花蕾产胚可达 3.23, 3.53 个。以 TR4 和 TR9 两个基因型为试材, 进一步改进培养基和培养方法, 采用 NLN 培养基中添加激素和活性炭方法, 可大大提高产胚率, 产胚量分别达到 7.11 和 10.05 个/蕾; 接种后, 小孢子经 33℃ 高温预处理可显著影响产胚量。子叶形小孢子胚在光下适当培养后转入 B<sub>5</sub>+BA 0.2 mg/L+NAA 0.02 mg/L 继代培养基上, 大多数胚能长成绿芽, B<sub>5</sub>+6-BA 0.2 mg/L+3% 蔗糖+1% 琼脂培养基有利于小孢子胚长成植株。

**关键词:** 油菜; 游离小孢子培养; 诱导率; 小孢子胚

中图分类号: S634.301 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)01-0116-04

## Studies on Improving the Frequency of Isolated Microspore-derived Embryos in *Brassica napus* L.

TIAN Bao-ming<sup>1,3</sup>, JIANG Wu-sheng<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-wei<sup>2</sup>, YUAN Yu-xiang<sup>2</sup>,  
GENG Jian-feng<sup>2</sup>, CAO Gang-qiang<sup>1,3</sup>, HAN Yong-ping<sup>2</sup>, ZHAO Zhen<sup>3</sup>, LIAN Yu-li<sup>3</sup>

(1. Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. Bio-Technology Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

3. Bioengineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** The application of microspore culture technique was restricted because of its low frequency of embryogenesis. Two methods of enhancing the frequency of embryogenesis were employed in the study, namely, activated charcoal and 6-BA treatment in NLN-13 media. Eleven *Brassica napus* genotypes (TR4-11) were used for isolated microspore culture. Among the 11 genotypes, 10 produced microspore-derived embryos. The production of microspore-derived embryos varied remarkably among these varieties. Embryo yield per bud is from 0.08 to 3.53. TR4 and TR9 were the best genotypes for microspore culture and their frequency of embryogenesis is 3.23 and 3.53, respectively. When treated with 0.5 mg/L activated charcoal after adding 0.2 mg/L 6-BA in NLN-13 media, TR4 and TR9 produced 7.11 and 10.05 embryos per bud respectively, 2.88 and 6.52 higher than CK. Average embryo yield increased after pretreated in 33℃ for 24 hours. Microspore-derived embryos on B<sub>5</sub> medium with 6-BA 0.2 mg/L and 3% Sucrose and 1% agar was good for regenerated plants. When microspore embryoid developed into the globular stage and early torpedo stage, adding fresh medium and transferring the cultures under shaking would greatly improve the synchronization of embryo development and reduce the abnormal embryoids.

**Key words:** *Brassica napus* L.; Isolated microspore culture; Frequency; Microspore-derived embryos

收稿日期: 2006-08-19

基金项目: 国家“863”项目(2001AA241102)

作者简介: 田保明(1964-), 男, 河南许昌人, 教授, 博士, 主要从事油菜生物技术及遗传育种研究

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

双单倍体育种与常规育种相比具有明显的优势: 单倍体小孢子经加倍后, 基因型纯合, 无需杂交育种过程中的多代自交, 因而纯合速度快, 特别适用于难以稳定性状的纯合, 而且, 利用小孢子培养技术获得 DH 群体, 用于遗传分析及分子标记遗传图谱的研究日趋广泛, 因此, 单倍体纯系材料在十字花科芸苔属作物育种中具有重要价值。花药和花粉培养是快速获得纯系的一种有效方法, 而游离小孢子培养还具有花药培养所不具备的单细胞单倍体、群体数量多、自然分散性好、不受体细胞干扰、便于遗传操作等优点。自 Nitsch<sup>[1]</sup>首次开展游离小孢子培养之后, 该方法就引起作物育种学界的广泛关注和兴趣。在芸苔属作物中, 先后对油菜、芥菜、大白菜、小白菜、甘蓝和芜菁<sup>[1-5]</sup>等进行了游离小孢子培养并获得了再生植株。油菜是游离小孢子培养研究开展较早并获得成功的材料之一, Lichter<sup>[2]</sup>、Suanson<sup>[6]</sup>、Keller<sup>[7]</sup>和我国钟维瑾<sup>[8]</sup>、石淑稳<sup>[9]</sup>、官春云<sup>[10]</sup>、陈军<sup>[11]</sup>、朱家成<sup>[12]</sup>等曾对油菜游离小孢子培养进行了研究, 通过选择基因型、控制供体植株的生长条件、改进培养基成分和高温预处理培养, 使部分材料小孢子胚产量有了明显的提高。但多数具有价值的油菜材料小孢子胚产量低而不稳定, 在田间栽培条件下小孢子胚诱导率通常不到 1%。本试验以生产中应用的油菜品种(系)为材料, 对提高油菜小孢子胚诱导率进行研究, 筛选诱导甘蓝型油菜小孢子再生胚状体的最佳条件, 为建立油菜小孢子高效转化体系奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为 11 个油菜品种或组合材料, 材料代号分别为 TR1, TR2, TR3, TR4, TR5, TR6, TR7, TR8, TR9, TR10, TR11。上述材料在前一年秋季将种子播于大田, 自然越冬后于第 2 年春季 3 月 10 日至 4 月 30 日进行培养。

### 1.2 方法

从供体植株主花序或顶部分枝花序上取 2.0~4.0 mm 长的花蕾, 在显微镜下镜检小孢子确定发育时期, 选取小孢子处于单核中期至双核早期的花蕾(2.0~3.0 mm), 用 75% 酒精浸 30 s, 0.1% HgCl<sub>2</sub> 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 2~3 mL, 用玻棒挤破花蕾散出小孢子, 将小孢子悬浮液用 400 目滤网过滤, 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  $1 \times 10^{-5}$  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 封口。小孢子先放入 33 °C 恒温培养箱中高温培养 24~72 h, 然后转入 25 °C 下黑暗培养, 每天取少量材料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。

将小孢子胚在光照下培养变绿, 然后转入 B<sub>5</sub>+BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L 固体培养基上长成绿芽。在该培养基上继代培养, 可以形成较多幼芽。然后将幼芽转入 B<sub>5</sub>+NAA 0.1 mg/L 生根培养基上可以生根, 形成完整植株。

本试验首先对供试的 11 个油菜组合材料, 采用 NLN 培养基进行游离小孢子培养, 探讨可培养的基因型范围和不同基因型对产胚率的影响; 随后, 针对产胚量最高的 TR4 和 TR9 两个基因型, 采用添加激素和活性炭等方法, 进一步改进培养基, 探讨进一步提高油菜游离小孢子胚诱导频率的方法和技术。本试验共设计 6 种 NLN 改良培养基: A. NLN+蔗糖 13%; B. NLN+蔗糖 13% (高压灭菌); C. NLN+蔗糖 13%+活性炭 0.5 mg/L; D. NLN+蔗糖 13%+6-BA 0.01 mg/L+NAA 0.1 mg/L; E. NLN+蔗糖 13%+6-BA 0.05 mg/L+NAA 0.3 mg/L; F. NLN+蔗糖 13%+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L。上述除 B 培养基外, 均在推滤灭菌前调 pH 值为 5.8, 然后用 0.45 和 0.22 μm 微孔滤膜推滤 2 次备用。此外, 设计 33 °C 高温预处理小孢子 24, 48 和 72 h, 比较高温处理时间对小孢子胚形成的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 小孢子在离体培养中的细胞学特征

油菜小孢子在 NLN-13 培养基中 33 °C 高温培养以后, 部分小孢子体积膨大近 1 倍, 形状为圆球形, 个别为卵圆形。3~4 d 后, 少数小孢子膨大出现第 1 次细胞分裂, 另外部分小孢子具有脱壁现象。小孢子分裂方式多为对称性分裂, 个别为不对称分裂。9 d 后可在显微镜下观察到细胞多次分裂形成的小细胞团。12~14 d 后, 肉眼可见到圆球状胚形成, 16~20 d 可形成从圆球形至子叶形不同发育时期的胚。

### 2.2 不同因素对小孢子胚形成的影响

2.2.1 基因型 基因型对油菜游离小孢子胚形成的影响见表 1。在供试的 11 个基因型中, 有 10 个获得了胚, 培养成功率达 90.9%。不同基因型间形成

胚的数量差别极大, TR9 和 TR4 平均每花蕾产胚在 3 个以上, TR1, TR5 和 TR11 等材料平均每花蕾产胚均在 0.5 个以下。

表 1 不同基因型对小孢子胚产量的影响

Tab 1 Influence of different genotype on the yield of microspore embryos

基因型 Genotypes	培养花蕾 数/个 No. of buds	产胚数/个 No. of embryos	每花蕾胚数/个 Embryos / bud
TR1	54	23	0.43
TR2	16	0	0.00
TR3	20	60	2.00
TR4	142	459	3.23
TR5	46	13	0.28
TR6	42	118	2.81
TR7	26	39	1.50
TR8	136	398	2.93
TR9	304	1 074	3.53
TR10	114	151	1.32
TR11	24	2	0.08

注: 培养基为 NLN+ 蔗糖 13%, 33℃ 1 d

Note: Medium is NLN + Sucrose 13%, 33℃ for 1 day

2.2.2 培养基 从表 2 可以看出, 培养基成分对小孢子胚的诱导和形成影响极大。其中, 培养液灭菌方法、激素组合浓度及添加活性炭成分至关重要。在 TR9 和 TR4 两材料中, 培养液灭菌方法均以推滤除菌效果较好, 平均每花蕾分别形成 3.56 和 3.22 个胚, 而同样的培养液采用高压灭菌的仅形成了 2.06 和 1.56 个胚。

激素组合, 以不加激素的 NLN-13(A) 效果最好, 加入 6-BA 0.01 mg/L+ NAA 0.1 mg/L (D) 和 6-BA 0.05 mg/L+ NAA 0.3 mg/L (E) 次之, 加入 6-BA 0.1 mg/L+ NAA 0.5 mg/L (F) 最差, 未诱导出小孢子胚。

表 3 高温处理时间对小孢子产胚数的影响

Tab 3 Influence of high temperature treatment time on yield of microspore embryos

基因型 Genotypes	处理时间/h Treatment time	培养花蕾数/个 No. of buds cultured	小孢子胚数/个 No. of microspore embryos	平均每花蕾胚数/个 No. of microspore embryos
TR9	24	16	26	1.63
TR9	48	16	20	1.25
TR9	72	16	18	1.13
TR4	24	12	28	2.33
TR4	48	12	10	0.83
TR4	72	12	12	1.00

### 2.3 小孢子胚继代、植株再生和移栽

油菜小孢子胚的发生具有不同步性, 在同一皿中同时存在从球形至子叶形不同发育类型的胚。统计 TR9 组合 188 个小孢子胚中各类型胚: 子叶形胚和鱼雷形胚为 69.3%, 球形和心形胚为 31.7%。将子叶形小孢子胚在光下适当培养后转入 B<sub>5</sub>+ BA 0.2 mg/L+ NAA 0.02 mg/L 继代培养基上, 大多数胚能长成绿芽。之后在该培养基上每月继代 1 次,

TR9 每花蕾产胚分别为 3.56, 1.25 和 0.11 个, 前者是后二者的 2.85 和 32.36 倍。

在 TR9 和 TR4 两材料中, 添加活性炭 0.5 mg/L (C) 较未添加的对照 (A) 小孢子胚产量增加 1.82, 1.21 倍, 表明在适量的蔗糖基础上, 活性炭对小孢子胚胎发生和形成具有促进作用。

表 2 不同培养基对小孢子胚产量的影响

Tab 2 Influence of different mediums on the yield of microspore embryos

材 料 Genotypes	培养基 Mediums	培养花蕾数/个 No. of buds	产胚数/个 No. of embryos	每花蕾产胚数/个 Embryos / bud
TR9	A	18	64	3.56
TR9	B	18	37	2.06
TR9	C	20	201	10.05
TR9	D	20	25	1.25
TR9	E	36	4	0.11
TR9	F	36	0	0.00
TR4	A	36	116	3.22
TR4	B	18	28	1.56
TR4	C	18	128	7.11
TR4	D	20	17	0.85
TR4	E	20	10	0.50
TR4	F	20	7	0.35

2.2.3 高温处理时间 在 NLN+ 蔗糖 13% (A) 基本培养基上, TR9 和 TR4 两个基因型游离小孢子预先在 33℃ 下分别处理 24, 48, 72 h, 然后转置 25℃ 下暗培养 30 d, 诱导形成小孢子胚, 结果列于表 3。两基因型经过 24, 48 和 72 h 的高温处理后, 均诱导出了胚并以 24 h 小孢子胚诱导率较高。24 h 高温处理的小孢子胚诱导率是 48 和 72 h 高温处理的 1.90 和 1.86 倍。因而小孢子培养的高温处理时间以 24 h 最好。

能形成数量较多的小苗。再将高度在 3~5 cm 的健壮绿苗转入 MS+ NAA 0.1 mg/L 生根培养基上, 10~15 d 能长出新根形成完整植株。较小的心形和球形胚, 转入 1% 琼脂固化的继代培养基上, 也有部分胚能形成绿芽。将生根并生长健壮的植株, 移入盛有园田土的营养钵中。移栽时洗净根上的培养基, 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 9 月中下旬移栽,成活率可达 90% 以上。

### 3 结论和讨论

#### 3.1 在甘蓝型油菜小孢子培养和花药培养中,不同材料胚状体发生频率显著不同

对油菜游离小孢子培养的研究结果表明,油菜不同杂交组合材料均可诱导出一定数量的小孢子胚。在供试的 11 个基因型中,有 10 个形成了胚,品种基因型诱导成功率为 90.9%,但不同基因型之间小孢子产胚数相差极大。多的 TR9 和 TR4 平均每花蕾产胚在 3 个以上,少的 TR1、TR5 和 TR11 平均每花蕾产胚均在 0.5 个以下。TR2 未诱导出胚,这些与以往石淑稳等研究的结果相同。基因型的差别可能有细胞核某些功能基因作用的结果。

#### 3.2 培养基成分对小孢子胚的诱导和形成影响很大

油菜小孢子培养以 NLN-13 液体培养基效果较好,较低的蔗糖浓度有利于胚状体的发育,蔗糖浓度以 13% 的效果最好<sup>[13,14]</sup>。本研究采用 NLN-13 液体培养基,对不同基因型的诱导成功率为 90.9%,也进一步证明了较低的蔗糖浓度有利于胚状体的成功诱导和发育。

Gland 等在油菜小孢子培养中发现添加活性炭可促进胚的发育。本研究中,添加活性炭较未添加的对照小孢子胚产量增加显著,结果表明,适量的活性炭对小孢子胚胎发生和形成具有促进作用。

本研究在油菜小孢子培养中加入少量 6-BA 和 NAA 对小孢子胚胎发生具有抑制作用。

#### 3.3 起始高温热激培养显著提高了胚状体再生频率

在诱导小孢子再生胚状体的培养条件中,温度是一个很重要的因素,不同研究者在不同作物的花药、花粉培养中,均采用了低温预处理或高温预培养,以提高胚状体的诱导率。高温热激处理对油菜小孢子培养、胚状体诱导是关键的一步。Pechan<sup>[15]</sup>认为,当小孢子接种到培养基上时,需要高温条件来启动和改变小孢子的定向过程,从配子体发育方式变为孢子体发育方式,高温条件一般为 30~35℃,在这个范围内,随着温度的降低,高温培养时间越长。石淑稳等<sup>[9]</sup>在油菜小孢子起始培养 1~2 d 内给予 33℃ 高温热激,显著提高了小孢子培养反应,提高了胚状体再生频率。在本试验中,33℃ 下 24 h 热激培养,对小孢子再生胚状体最有效,胚状体产量最高。这可能是供体材料基因型不同,对高温的

启动反应不同,而缓慢的振荡培养能改善培养皿内的通气状况,降低有害代谢物质在胚状体周围的累积,减少畸形胚比例,从而提高正常的再生植株频率。

#### 参考文献:

- [1] Nitsch C. Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogène du pollen de *Datura innoxia* culture dans l'anthere ou isolé de l'anthere[J]. CR Acad Sci, Ser D, 1973: 303–306.
- [2] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* Z[J]. Pflanzenphysiol Bd, 1982, 105: 42–43.
- [3] Chuong P V, Deslauriers C, Kott I S. Effects of donor genotype and bud sampling on microspore culture[J]. Can J Bot, 1998, 66(8): 1671–1675.
- [4] Chen Z Z, Snyder S, Fan Z G. Efficient production of doubled haploid plants through chromosome doubling of isolated microspore in *Brassica napus* [J]. Plant Breeding, 1994, 13: 217–221.
- [5] Seiki S, Norio K, Sumrio L, et al. Effect of low temperature pretreatment of buds or inflorescence on isolated microspore culture in *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*) [J]. Breeding Science, 2002, 52: 23–26.
- [6] Suanson E B. Microspore culture in *Brassica* [J]. In Plant Cell and Tissue culture, 1990, 11: 159–169.
- [7] Keller W A, Fan Z, Pechan P, et al. An efficient method for culture of isolated microspores of *Brassica napus* [C]. Proc 7th In Rapeseed Cong, 1987: 71.
- [8] 钟维瑾, 方光华, 唐克轩, 等. 甘蓝型油菜小孢子培养中若干因素对胚状体诱导和植株再生的影响[J]. 上海农业学报, 1990(2): 7–14.
- [9] 石淑稳, 刘后利. 甘蓝型油菜及种间和属间杂种小孢子胚状体的诱导[J]. 华中农业大学学报, 1993, 12(6): 544–550.
- [10] 官春云. 油菜小孢子培养和双单倍体育种和研究[J]. 作物学报, 1995, 21(6): 665–670.
- [11] 陈军, 陈正华, 刘澄清, 等. 甘蓝型油菜游离小孢子培养和胚胎发生[J]. 遗传学报, 1995, 22(4): 307–315.
- [12] 朱家成, 文雁成, 张书芬, 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.
- [13] 张凤兰, 高田义人. 甘蓝型油菜小孢子培养胚发生能力的遗传分析[J]. 华北农学报, 2001, 16(1): 27–32.
- [14] 曹鸣庆, 李岩, 蒋涛, 等. 大白菜和小白菜游离小孢子培养试验简报[J]. 华北农学报, 1992, 7(2): 119–120.
- [15] Pechan P M, Keller W A. Identification of potentially embryogenic microspore in *Brassica napus* L. [J]. Physical Plant, 1988, 74(4): 377–384.