

甘蓝型油菜小孢子培养胚发生能力的遗传分析

张凤兰¹, 高田义人²

(1 北京蔬菜研究中心, 北京 100089; 2 日本国立岩手大学 农学部, 盛冈, 020- 8550)

摘要: 用 4×4 完全双列杂交研究了甘蓝型油菜小孢子培养胚状体发生能力的遗传规律。结果表明: 多数 F_1 的胚产量与具高胚发生能力的亲本相近, 部分 F_1 的胚产量与双亲中亲值接近。胚状体发生能力主要由基因的加性效应控制。高胚发生能力由显性核基因控制。广义和狭义遗传力分别为 97.2% 和 81.1%。由 Lisandra(高胚发生能) \times Kamikita(低胚发生能) 的 F_2 群体胚发生数的分离结果得出小孢子胚状体发生能力由具加性效应特点的两个基因位点控制。

关键词: 甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.); 小孢子培养; 胚状体发生能力; 遗传

中图分类号: S634.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000- 7091(2001) 01- 0027- 06

通过雄配子的离体培养(游离小孢子培养)获得单倍体株, 经染色体加倍而获得纯合的双单倍体株, 是加快育种材料稳定的有效方法。芸苔属作物中, 自从 Lichter^[1] 报道甘蓝型油菜小孢子培养获得成功以来, 对完善和应用这项技术的研究很多, 包括对影响胚状体发生因素的研究^[2]、胚状体发生过程细胞学特点的研究^[3] 及小孢子培养技术在育种上的应用研究^[4] 等。然而, 和其他组织培养技术一样, 甘蓝型油菜小孢子培养的胚状体发生受基因型的影响很大^[5, 6], 但对控制胚状体发生能力的遗传机制尚缺乏研究。

本研究用 4×4 完全双列杂交方法, 探讨了甘蓝型油菜小孢子培养的胚状体发生能力的遗传规律, 为通过遗传改良方法使小孢子培养能在范围较广的基因型中获得小孢子胚, 缩小基因型间的胚发生能力差异提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料

“Topas”和“Lisandra”为早熟西洋甘蓝型油菜品种, 具有高的小孢子培养胚发生率^[6], “Kizakino”和“Kamikita”为晚熟的日本甘蓝型油菜品种, “Kizakino”胚发生能力极低, “Kamikita”无胚发生能力。1996 年春采用以上 4 个材料为亲本进行了 4×4 完全双列杂交, 人工套袋蕾期去雄授粉获得自交和 12 个 F_1 种子。另外通过自交获得“Lisandra” \times “Kamikita”的 F_2 种子。所有材料于 1997 年 10 月种于无控温的玻璃温室中, 抽苔后每周浇 1 次 5- 10

– 5 Hyponex 营养液。

1.2 小孢子培养方法

参照 Takahata^[4]的方法进行。取长 3~ 4 mm 的花蕾,用含有效 Cl⁻ 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 液体培养基中用研棒将花蕾捣碎, 用无菌微孔布(45 μm) 过滤, 将小孢子收集在离心管中, 在 1 000 r/ min 下离心 3 min, 上清液去掉, 加入新的 B5– 13 培养基, 将小孢子悬浮后再次离心, 3 次重复。用血球计数盘在显微镜下进行小孢子计数, 并用 1/2NLN– 10^[4] 培养基调整小孢子浓度为 5× 10⁴ 个/ mL。将小孢子悬浮液分注于 60 mm× 15 mm 的培养皿中, 每皿 2 mL。在 32.5 °C 恒温箱中培养 4 d 后, 转移到 25 °C 的培养室中在黑暗条件下培养 3 周。

1.3 试验设计和数据分析

每个亲本和 F₁ 取 3 株用于小孢子培养, 每株培养 4 个培养皿。培养 3 周后调查各处理产生的总胚状体数。数据经平方根转化后, 进行统计分析。双列杂交分析用 Ukar^[7] 编的计算机程序(参照的 Hayman 1954a, b 方法^[8,9]) 进行, 广义和狭义遗传力用 Mather and Jinks^[10] 的方法计算。

1.4 F₂ 群体的分离分析

对“Lisandra”×“Kamikita”的 F₂ 群体的 80 个单株进行小孢子培养, 分析其胚状体发生能力的分离规律。

2 结果与分析

2.1 亲本及其 F₁ 的胚状体发生能力分析

2.1.1 亲本的小孢子胚产量比较 4 个亲本的小孢子培养的平均胚产量和方差分析结果列于表 1。可见, “Topas”和“Lisandra”的胚状体发生能力极显著的高于“Kizakino”和“Kamikita”, 但 2 个高胚发生率的亲本“Topas”和“Lisandra”间及 2 个低胚发生率的亲本“Kizakino”和“Kamikita”间差异不显著。说明亲本的小孢子胚状体发生能力存在真实稳定的差异, 故可作为遗传变异规律研究的试材。

表 1 亲本的胚产量比较

亲本	平均胚产量 ¹	新复极差测验	
		5%	1%
Topas	924	a	A
Lisandra	720	a	A
Kizakino	8	b	B
Kamikita	0	b	B

注: ¹ 1× 10⁵ 个小孢子所产生的不定胚。

2.1.2 F₁ 的胚产量比较 12 个 F₁ 的小孢子培养平均胚产量结果列于表 2。由表 2 可见, 所有的 F₁ 都有胚发生, 说明高胚发生能力为显性, 但 F₁ 的胚产量差异很大, 表现最低的为“Kamikita”×“Kizakino”, 平均每培养皿的不定胚数只有 41 个, 表现最高的为“Lisandra”×“Topas”, 平均每培养皿的不定胚数为 2 537 个。对表 2 进行分析, 可以得出以下的结论: 2 个高胚发生率的亲本间的 F₁ 的胚产量仍表现高, 高和低胚发生率亲本间的 F₁ 除“Topas”和

“Kamikita”的正反交组合外,均高于中亲值;2个低和无胚发生率的亲本间的F₁均有胚产生,但胚产量仍表现较低。

表 2 双列杂交 F₁ 的胚产量比较

组合 ¹	平均胚产量 ^④	新复极差测验		中亲值 (MP)	F ₁ - MP
		5%	1%		
L×T	2 537	a	A	822	1 715
T×L	1 800	b	B	822	978
Ki×T	1 048	c	C	465	583
L×Ki	1 031	c	C	364	667
Ki×L	712	cd	CD	364	348
T×Ki	626	cde	CDE	465	161
L×Ka	494	cde	CDE	360	134
Ka×L	490	cde	CDE	360	130
T×Ka	375	def	DEF	462	- 87
Ka×T	198	ef	EF	462	- 264
Ki×Ka	80	ef	EF	4	76
Ka×Ki	41	f	F	4	37

注: ¹ T: Topas; L: Lisandra; Ki: Kizakino; Ka: Kamikita; ^④为 1×10⁵ 个小孢子所产生的不定胚。

2.1.3 正反交的胚产量比较 将高×低胚发生率的组合作正交,低×高胚发生率的组合作反交,进行两组成对数据平均数的测验,其t值为2.23<t_{0.05}=3.812,正反交无显著差异,说明甘蓝型油菜小孢子培养胚状体发生能力不受细胞质基因的影响,主要由核基因控制。

2.2 甘蓝型油菜小孢子培养胚状体发生能力的双列杂交遗传分析

2.2.1 配合力的方差分析 双列杂交F₁及亲本的小孢子培养胚产量的平均值和方差分析结果列于表3和表4。由表4可见,组合间小孢子胚产量差异极显著,可以进行配合力分析^[11,12]。

表 3 双列杂交亲本及 F₁ 的小孢子培养胚产量

♀	♂				
	Topas	Lisandra	Kizakino	Kamikita	T _i
Topas	924	1 800	626	375	3 725
Lisandra	2 537	720	1 031	494	4 782
Kizakino	1 048	712	7	80	1 847
Kamikita	198	490	41	0	729
T _j	4 707	3 722	1 705	949	11 083

表 4 双列杂交亲本及 F₁ 的小孢子培养胚产量的方差分析结果

变异来源	DF	SS	MS	F 值
重复	2	187 172	93 583	1.479
基因型	15	21 312 250	1 420 816	22.458**
误差	30	1 897 980	63 266	
总和	47	23 397 400		

采用“DIALl”双列杂交分析程序^[7],对表3数据进行了配合力方差分析,结果见表5和

表 6。控制甘蓝型油菜小孢子培养胚状体发生能力的基因的加性效应和显性效应的 F 值都表现显著,正反交效应的 F 值不显著(表 5),一般配合力的 F 值为 36.84,其差异达极显著水平,而特殊配合力的 F 值只有 0.71,差异不显著(表 6),说明甘蓝型油菜小孢子胚发生力由基因的加性和显性效应控制,以加性效应为主,不受细胞质因素的影响。

表 5 用 Hayman 方法^[8,9]计算的双列表的方差分析结果

来 源	DF	SS	MS	F 值
加性效应	3	2 295.42	765.14	117.99 ^{* *}
显性效应	6	488.73	81.45	12.56 ^{* *}
母性效应	3	43.23	14.41	2.22
正反交效应	3	49.91	16.63	2.57
误差	30		6.49	

注:胚产量经平方根转化后进行计算。

表 6 甘蓝型油菜小孢子培养胚发生力的配合力分析结果

来源	DF	SS	MS	F 值
GCA	3	1 712.86	570.95	36.84 ^{* *}
SCA	2	30.99	15.50	2.39 ^{* *}
正反交	6	93.14	15.52	2.39
误差	22		7.29	

注:胚产量经平方根转化后进行计算。

2.2.2 遗传参数分析 遗传参数的结果列于表 7。可见,甘蓝型油菜小孢子培养胚发生力的遗传力极高,受环境条件影响小,其广义遗传力为 97.2%,狭义遗传力为 81.1%。

表 7 遗传参数表

项 目	估计值
平均显性度	0.808
显性基因比例	0.306
基因数	1.932
广义遗传力	0.972
狭义遗传力	0.811

注:胚产量经平方根转化后进行计算。

表 8 F₂ 群体胚产量的分离分析

胚产量	植 株 数		x ²	P
	观察数	理论值 ¹		
> 700	4	5	1.683	0.70 < P < 0.80
100~ 700	16	20		
15~ 100	31	30		
1~ 15	23	20		
0	6	5		
总和	80	80		

¹ 理论比例为 1:4:6:4:1,即对 2 个具加性效应的基因位点,含显性基因位点分别为 0,1,2,3,4 个的基因型比例。

2.3 小孢子胚发生能力的分离规律

对“Lisandra”×“Kamikita”的 F₂ 群体的 80 个单株进行小孢子培养,观察其胚产量的分离情况,结果见图 1 和表 8。F₂ 群体胚产量的变异范围为 0~ 1 378,根据胚产量可以将 F₂ 植株分为 5 组,胚产量为 0 的植株有 6 株,在 1~ 15 之间的有 23 株,15~ 100 之间有 31 株,100~ 700 之间有 16 株,高于 700 的有 4 株,F₂ 群体的胚产量呈连续正态分布(图 1)。x² 测验表明,F₂ 群体的不定胚产量符合 1:4:6:4:1 的理论分离比例(表 8),说明小孢子胚发生能力由具加性效应的 2 个基因位点控制。

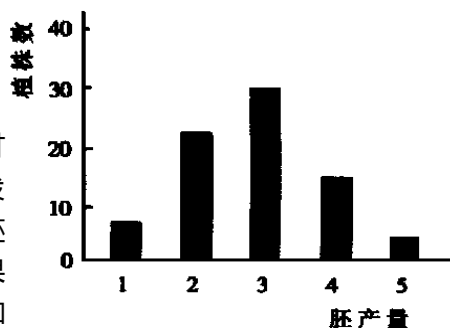
3 讨论

小孢子胚发生能力的基因型差异在白菜^[13, 14]和甘蓝型油菜^[5, 6]上有较多报道, 本研究进一步证实了胚发生能力由遗传因子控制, 并首次对甘蓝型油菜小孢子胚发生能力进行了数量遗传及 F_2 的分离分析。研究结果表明: ①甘蓝型油菜小孢子胚发生能力由基因的加性和显性效应控制, 以加性效应为主; ②正反交的胚发生能力无显著差异, 小孢子胚发生能力不受细胞质因子的影响; ③高胚发生力由显性核基因控制; $\frac{1}{4}$ 广义和狭义遗传力很高; $\frac{1}{2}$ 小孢子胚发生能力受具加性效应的 2 个基因位点控制。

一般认为, 与植物花药培养相比, 游离小孢子培养在理论和实践上有许多优点。游离小孢子培养消除了小孢子和花药壁、绒毡层细胞之间可能存在的营养竞争现象, 可以更高的频率诱导小孢子胚胎发生, 因此加拿大和欧洲一些国家成功地应用游离小孢子培养技术于甘蓝型油菜的遗传改良中。但由于基因型间存在胚发生能力差异, 有很多的基因型仍无法诱导出小孢子胚, 大大限制了该技术在更大的基因型范围内应用。作者认为可以通过将无胚发生能力的品种与高胚发生能力的品种杂交的手段, 将控制高胚发生能力的遗传因子导入到无胚发生能力的基因型中, 通过遗传改良的方法扩大能诱导出小孢子胚胎发生的基因型范围。

参考文献:

- [1] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* [J]. Z Pflanzenphysiol, 1982, 105: 427– 434.
- [2] Dunwell J M, Cornish M, De Courcel A G L. Influence of genotype, plant growth temperature and anther incubation temperature on microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera* [J]. J Exp Bot, 1985, 36: 679– 689.
- [3] Zaki M A M, Dickinson H G. Structural changes during the first division of embryos resulting from anther and free microspore culture in *Brassica napus* [J]. Protoplasma, 1990, 156: 149– 162.
- [4] Takahata Y. Microspore culture [A]. In: Recent advances in oilseed Brassicas [C]. Ludhiana: Kalyani Publishers, 1997.
- [5] Gland A, Lichter R, Schweiger H G. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore culture of *Brassica napus* L [J]. J Plant Physiol, 1988, 132: 613– 617.
- [6] Ohkawa Y, Nakajima K, Keller W A. Ability to induced embryoid in *Brassica napus* cultivars [J]. Japan J Breed, 1987, 37(Suppl. 2): 44– 45.
- [7] Ukai Y. A microcomputer program DIALL for diallel analysis of quantitative characters [J]. Japan J Breed, 1989, 47(Suppl. 2): 183.



胚产量 1. 0; 2. 1~ 15; 3. 15~ 100;

4. 100~ 700; 5. > 700

图1 “Lisandra” × “Kamikita” F_2 群体小孢子培养胚产量分布图

- [8] Hayman B I. The analysis of variance of diallel tables[J]. Biometrics, 1954a, 10: 235– 244.
- [9] Hayman B I. The theory and analysis of diallel crosses[J]. Genetics 1954b, 39: 789– 809.
- [10] Mather K, Jinks J L. Biometrical genetics[M]. London: Chapman and Hall, 1971.
- [11] 刘来福. 作物数量遗传[M]. 北京: 农业出版社, 1984.
- [12] 马育华. 植物育种的数量遗传学基础[M]. 南京: 江苏出版社, 1980.
- [13] Cao M Q, Li Y, Liu F, *et al.* Application of anther culture and isolated microspore culture to vegetable crop improvement[J]. Acta Horticulturae, 1995, 392: 27– 38.
- [14] Kuginuki Y, Nakamura K, Hida K, *et al.* Varietal differences in embryogenic and regenerative ability in microspore culture of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)[J]. Breed Sci, 1997, 47: 341– 346.

Inheritance of Microspore Embryogenic Ability in *Brassica napus* L.

ZHANG Feng-lan¹, TAKAHATA Yoshihito²

(1 Beijing Vegetable Research Centre, Beijing 100089, China;

2 Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020– 8550, Japan)

Abstract: Inheritance of microspore embryogenic ability in *B. napus* was examined by 4×4 diallel crosses using 2 high responsive cultivars (‘Topas’ and ‘Lisandra’) and 2 low and no responsive ones (‘Kizakino’ and ‘Kamikita’). Most of F_1 hybrids showed that embryo yields similar to the high responsive parent and some showed embryo yields similar to the mid-parent value. Diallel analyses showed that both additive and dominant effects were significant at 1% level in the genetic control of microspore embryogenic ability. Additive gene effects were predominant. High embryogenic ability was controlled by dominant nuclear genes. The broad- and narrow- sense heritabilities were 97.2% and 81.1%, respectively. From the results of segregation of embryo yields in F_2 population of ‘Lisandra’ \times ‘Kamikita’, it is concluded that the microspore embryogenic ability was controlled by two loci with additive effects.

Key words: *Brassica napus* L.; Microspore culture; Embryogenic ability; Inheritance; Diallel analysis