

二、结果与分析

将一叶一心期幼苗放于 $0 \pm 1^\circ\text{C}$ 的生长箱中, 每小时取样测定电导率、SOD 活性及可溶性蛋白质含量, 测定结果见表 1。

表1 低温下相对电导率、SOD活性和可溶蛋白含量变化

项 目	时 间 (h)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
相对电导率	0.157	0.144	0.140	0.155	0.170	0.211	0.222	0.273	0.324
可溶蛋白(mg/gFW)	31.79	20.89	20.72	19.91	19.58	24.03	23.58	37.66	32.74
SOD (活性/mg蛋白)	8.13	10.95	13.32	15.63	15.49	12.47	13.31	8.49	9.33

从表 1 可以看出, 相对电导率随低温的延长而逐渐增大, 6 小时后猛增, 标志着细胞膜遭到明显破坏。SOD 活性变化表现为先上升后下降的规律。在低温下植物体内 SOD 活性在前 3 小时逐渐增大, 且上升速度较快, 这是植物对逆境的积极反应, 借增加 SOD 活性来保护细胞膜不被破坏。3 小时后, SOD 活性降低, 4 小时后便出现明显下降趋势。而细胞膜透性在 6 小时后才突然增大, 说明低温对 SOD 的破坏早于对膜的不可逆破坏。

可溶性蛋白质含量在低温下逐渐降低, 表明低温下大分子逐渐被降解。在 6 小时后可溶性蛋白质含量又突然上升, 这可能是由于植物不断失水, 使组织含水量下降, 从而表现出单位鲜重组织内蛋白质含量相对提高。值得注意的是, 植物相对电导率和可溶性蛋白含量都是在 6 小时突然增高的, 说明植物体内水分平衡的破坏与膜透性不可逆破坏几乎是同时发生的。两者之间的关系值得做进一步研究。 (北京市农林科学院蔬菜中心 刘明池)

大白菜和小白菜游离小孢子培养试验简报

Brief Report on Isolated Microspore Culture Experiments in Two Chinese Cabbages (*Brassica campestris* spp. *pekinensis* and *B. campestris* spp. *chinensis*)

植物的游离小孢子离体培养方法最先在毛叶曼陀罗 (*Datura innoxia*) 上, 以后又在烟草、矮牵牛、马铃薯等茄科植物上试验成功。八十年代初, 在十字花科芸薹属的油菜 (*Brassica napus* L.) 上获得突破, 后相继在该属的埃塞俄比亚芥菜 (*B. carinata*)、黑芥 (*B. nigra*)、大白菜 (*B. campestris* spp. *pekinensis*) 和结球甘蓝 (*B. oleracea* spp. *capitata*) 上获得成功。在植物育种应用方面, 游离小孢子离体培养方法较花药培养表现了更大的应用前景。它不仅能以更高的效率获得单倍体来缩短常规育种周期, 而且还可以比较方便地用于诱变、离体抗性选择和遗传转化。本文将介绍我们在大白菜和小白菜 (*B. campestris* spp. *chinensis*) 游离小孢子离体培养方面的初步进展。

一、材料和方法

1. 试验材料 大白菜选用“小杂56”、“北京70”、“北京75”等杂交品种 (北京蔬菜研究

中心育种一室提供)和“台湾45日”、“红梅”等品种(日本野菜试验场T.Sato博士赠送);小白菜选用“大花菜心”、“青梗49心”、“60天青梗菜心”、“塌棵菜”等品种(北京蔬菜研究中心小品种课题组提供)。

2. 试验方法 供试材料的种子在萌动后经春化处理,种植于部分控温温室中,温度大约为白天18~22℃,夜间12~16℃。从供体植株摘取长2~6mm的花蕾(视基因型而异)。7%过氯酸钙饱和滤液加一滴吐温20消毒花蕾表面,15分钟后无菌水冲洗花蕾三遍。经表面消毒后的花蕾放置在无菌玻璃研钵中,加3ml的B5洗涤培养基后用研棒反复捣挤花蕾,以孔径50μm的尼龙筛网过滤。收集滤液,连续在台式离心机上离心三次:第一次5分钟,130g,后两次均为3分钟,100g。然后将分离的小孢子悬浮于NLN82培养基中,小孢子密度调至100 000/ml,注入直径55mm无菌塑料培养皿,每皿2ml,石蜡膜封口后,置于温度梯度培养箱中暗培养。培养温度处理如下:(1)35℃培养24小时后,移入26℃继续培养;(2)33℃培养72小时后,移入26℃培养;(3)一直在30℃下培养。培养期间用倒置显微镜观察小孢子的形态变化和胚胎发生进程。心形期以后的小孢子胚移植到B5琼脂培养基上继续发育,培养温度为21℃,每日光照14小时,6 000 lx。幼苗长成后在温室中移栽入钵,继续观察。

二、结果与讨论

大白菜和小白菜的小孢子胚胎发生与已报道的油菜、甘蓝等小孢子胚胎发生的情况相近。培养24小时后在倒置显微镜下观察,可见部分小孢子开始膨胀,直径大约增加1.5~2.0倍。72小时后,有些膨大小孢子开始第一次核分裂,对称和不对称分裂方式均有。培养5~7天,原胚形成。12~14天时发育为球形胚,此时肉眼可辨。15天以后可见有心形胚漂浮在培养基内。3周时鱼雷胚形成。

试验结果表明,大白菜和小白菜的小孢子胚胎发生除与培养时小孢子所处的发育阶段有重大关系(待发表,本文不作介绍)外,还和初始培养时的温度高低和持续时间有密切关系。如对于小白菜品种“大花菜心”而言,35℃、24小时的处理未见有细胞分裂和胚胎发生。而33℃、72小时的处理中可观察到众多小孢子分裂;在转入26℃培养后的2~4天,已可见有数十至数百细胞组成的原胚形成。一直在30℃下培养的处理中,也有小孢子分裂和原胚形成,但数量明显低于上一处理。

将心形期至鱼雷期的胚移于B5琼脂糖培养基上,半数以上继续发育为幼苗。其中有5~10%左右为白化苗,移栽后不能成活。绿苗移栽后成活率在90%左右,长势普遍较弱。

从大白菜的“红梅”、“台湾45日”、“小杂56”、“北京70”等品种和小白菜的“大花菜心”、“塌棵菜”、“青梗49心”、“60天青梗菜心”等品种中都已获得了小孢子胚胎,但不同品种间诱导频率差异甚大。目前已从大白菜的“红梅”、“台湾45日”、“小杂56”和小白菜“大花菜心”四个品种中获得200余小孢子胚胎植株。其中,运用游离小孢子离体培养方法获得小白菜的小孢子胚胎及其植株再生,在国内外尚未见报道。

本研究为北京科委项目,得到日本国际协力事业团(JICA)资助,在此致谢。

(北京市农科院蔬菜研究中心生物技术室 曹鸣庆 李岩 蒋涛)

(日本农林水产省放射线育种场第一研究室 西尾刚)