

冬花椰菜的小孢子胚胎发生研究

杨 清* 曹鸣庆

(北京市蔬菜研究中心, 北京, 100081)

J. E. Chauvin

(法国德艾米利欧雷顿植物试验站, 瑞尼斯)

摘 要

应用花药培养技术在四个冬花椰菜 (*Brassica oleracea* L. ssp. *botrytis*) 基因型中获得小孢子胚胎。培养基中加入硝酸银能明显促进胚胎发生。在含125mg/l 硝酸银的培养基上胚产量最高。培养基中加入0.5g/l活性碳, 能提高小孢子胚胎发生频率。另外在培养基中用琼脂糖代替琼脂, 也能提高胚产量。

关键词 冬花椰菜 花药培养 小孢子 胚胎发生

最近几年来, 在花椰菜花药培养方面已有若干报道。杨清在1987年获得直接经胚胎发生而再生的秋花椰菜花粉植株〔1〕。Okendon (1988) 报道, 他在英国用花药培养方法获得秋花椰菜的小孢子胚及再生株〔2〕。以上研究都是在秋花椰菜上进行的。冬花椰菜是最重要的花椰菜类型, 但至今未见类似报道。本文将介绍在冬花椰菜花药培养方面的初步研究结果。

材料与方 法

本项研究于1989年在法国国立农业研究院勃罗古勒姆 (Plougoulm) 蔬菜作物改良站进行。

供试植物材料为四个冬花椰菜基因型: 自交系JLT98、自交系JLT13、自交系JLT8和品种D198。在预备试验中它们对花药培养均有良好反应。供体植株种植在塑料大棚中。

试验中共使用6种不同的培养基。基本培养基均为K1, 即Keller的改良B5培养基, 蔗糖含量140g/l〔3〕。6种培养基分别如下:

M₁培养基: K1 + 琼脂 8 g/l;

M₂培养基: K1 + AgNO₃ 500mg/l + 琼脂 8 g/l;

M₃培养基: K1 + AgNO₃ 125mg/l + 琼脂 8 g/l;

M₄培养基: K1 + 活性碳 5 g/l + 琼脂 8 g/l;

M₅培养基: K1 + 活性碳 0.5g/l + 琼脂 8 g/l;

M₆培养基: K1 + 琼脂糖 7 g/l。

经常规热压消毒后的培养基置于直径为55mm的塑料培养皿中, 每皿约 8 ~ 10ml。

从供体植株取花序, 3.5%次氯酸钙溶液表面消毒 5 分钟, 无菌水冲洗三次, 每次 5 分钟。将消毒花序置于洁净工作台上, 仔细挑选长3.0~3.5mm的花蕾, 在解剖镜下剥取花药, 置培养基上。每培养皿放置24枚花药(相当于4枚花蕾)。

接种后的花药先在35℃暗培养24小时, 后转于23℃下继续暗培养。二周后加光照培养, 光强500~1000lux, 每日照明16小时。

试验结果

大约培养四周后, 在若干花药裂口上见有胚状体出现。在有胚状体发生的花药中, 大多数只有1个胚状体, 少数产生2个以上胚状体, 最多达6个。胚状体发育不同步, 从球形胚、心形胚、鱼雷胚直至成熟胚同时并存。

在试验中, 从4207枚花药上共获得88个胚状体。表1为四个基因型在6种培养基上胚产量详细情况。从中可以清楚地看到培养基对小孢子胚胎发生影响极大。其中M₁和M₄培养基

表1 培养基对四个冬花椰菜基因型雄性生殖的影响

培养基	基因型	培养花药数	获得胚数	产量(胚数/100花药)*	
M1	D198	216	0	0	C
	JLT98	190	0	0	C
	JLT8	256	0	0	C
	JLT13	190	1	0.53	C
M2	D198	216	4	1.85	B
	JLT98	190	2	1.05	B
	JLT8	256	5	1.59	B
	JLT13	190	4	2.11	B
M3	JLT98	165	10	6.06	A
	JLT8	256	20	7.80	A
	JLT13	190	11	5.79	A
M4	D198	216	1	0.46	C
	JLT98	190	0	0	C
	JLT8	256	0	0	C
	JLT13	190	0	0	C
M5	JLT8	256	5	1.59	B
	JLT13	288	6	2.01	B
M6	JLT8	256	9	3.50	B
	JLT13	240	10	4.17	B

*用相同字母标记的胚产量差异不显著。不同字母表示胚产量差异显著。差异显著性水平为1%。

几乎不能诱导小孢子胚胎发生。在含硝酸银的 M_2 和 M_3 培养基上,都获得了胚胎。其中含硝酸银125mg/l的 M_3 培养基效果更好。在用琼脂糖替换了琼脂的 M_6 培养基上也获得了比较理想的胚产量。最后,使用低浓度活性碳(0.5g/l)的 M_6 培养基,也能促进小孢子胚胎发生。

讨 论

M_1 培养基曾在我们的秋花椰菜花药培养试验中获得很高的胚产量(18.8%) [1]。但是,本试验中 M_1 培养基几乎不能使冬花椰菜产生小孢子胚胎。造成这种差异的原因,可能主要在于这二种类型花椰菜在小孢子胚胎发生方面具有不同的遗传决定因素。在其它作物上,如大麦 [4]、小麦 [5]、抱子甘蓝 [6] 等等,均已有过这方面的报道。

本项研究清楚地表明,一定含量的硝酸银对冬花椰菜小孢子胚胎发生具有十分积极的促进作用。Biddington等也曾发现,硝酸银能明显提高球茎甘蓝小孢子胚胎产量 [10]。硝酸银在雄性生殖过程中的机制目前尚不清楚。有一种假说认为,它可能通过抑制离体外植体内乙烯的生物合成而起作用。

一般认为,活性碳能改进花椰菜花药培养。但活性碳的促进作用与使用浓度有关。当浓度高达5g/l时,这种作用消失殆尽。镜检观察,在 M_4 培养基上只有极少数小孢子能进入分裂期。活性碳的促进作用,在于它能吸附来自琼脂、花药壁和大龄胚的代谢抑制物,诸如若干酚类物质。活性碳能吸附培养基中80%以上的酚类物质。与此同时,活性碳也能吸附萘乙酸、激动素和铁螯合物等有用成分。这可能就是过量的活性碳对小孢子胚胎发生产生负作用的主要原因。

在植物花药培养中,凝固剂有时也有举足轻重的作用 [9]。本试验证实了这一点。在四个冬花椰菜基因型中只有一个能在 M_1 培养基上产生极少的胚,而在含琼脂糖的 M_6 培养基上,四个基因型都能产生胚胎,而且产量颇丰(表1)。

本试验探讨了改进冬花椰菜花药培养的技术措施,所获结果仅是初步的。在方法上,特别是培养基和培养条件方面,还有待进一步改进。

参 考 文 献

- [1] Ockendon, D. J.: The ploidy of plants obtained from anther culture of cauliflower: (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), *Ann. Appl. Biol.*, 1988 (113): 319—325
- [2] Keller, W. A. et al: In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris*, *Can. J. Genet. Cytol.*, 1975 (17): 655—666
- [3] Foroughy-Wehr, B. et al: On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L., *Theor. Appl. Genet.*, 1982 (62): 233—239
- [4] Marsolais, A. A. et al: The influence of anther cold pretreatments and donor plant genotypes on in vitro androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1984 (3): 69—79
- [5] Ockendon, D. J.: Anther culture in brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) II.

- Effect of genotype on embryo yields, *Ann. Appl. Biol.*, 1935 (107) : 101—104
- [6] Heberle—Bors, E. et al: Environmental control and evidence for predetermination of pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* pollen, *Protoplasma*, 1981 (103) : 249—255
- [7] Dunwell, J. M. et al: Influence of genotype, plant growth temperature and anther incubation temperature on microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera*, *Journal of Experimental Botany*, 1985 (36) : 679—689
- [8] Koda, T. et al: Effects of phytohormones and gelling agents on plant regeneration from protoplasts of red cabbage, *Agric. Biol. Chem.*, 1988 (52) : 2337—2340
- [9] Biddington, N. L. et al: Silver nitrate increases embryo production in anther culture of brussels sprouts, *Ann. Bot.*, 1988 (62) : 181—185
- [10] Yang, Q. Essais d'induction de plantes androgenetiques chez le chou-fleur (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* D. C.) et etudes cytologiques des structures obtenues. These de doctorat, ENSA et Universite de Rennes, France, 1989: 131

Microspore Embryogenesis from Anther Culture of Winter Cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. *botrytis*)

Yang Qing

Cao Mingqing

(*Beijing Vegetable Research Centre, Beijing*)

J. E. Chauvin

(*Station d'Amelioration des Plantes, INRA, Rennes, France*)

Abstract

Microspore embryogenesis was induced by performing anther culture on four winter cauliflower genotypes. The most important improvement of embryogenesis was obtained on the culture medium containing 125mg/l silver nitrate. The addition of active charcoal at a low concentration (0.5g/l) increased the frequency of microspore embryogenesis. The 5g/l concentration led to poor yields. The gelifiant agent seems to have a strong effect on embryogenesis, in that the medium solidified with agar led to limited embryogenesis for only one genotype, whereas the medium solidified with agarose could induce embryogenesis for all genotypes.

Key words: Winter cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. *botrytis*) ; Anther culture; Microspore embryogenesis