

# 绿菜花游离小孢子培养、胚胎发生和植株再生

张德双

曹鸣庆

秦智伟

(北京农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100081)

(东北农业大学, 哈尔滨 150030)

**摘 要** 取花蕾长 3.0~5.5mm 的花序, 7% (W/V) 饱和次氯酸钙溶液(加一滴吐温 20) 表面消毒 15min, 无菌水洗 3 次。然后轻压花蕾, 过滤, 收集滤液, 离心后, 将小孢子悬浮于经过滤灭菌的改良的 1/2NLN 培养基中。石蜡膜封口, 置温度梯度培养箱作 32.5℃、1d 的高温热激诱导处理, 后置 25℃ 下继续培养。本试验对 13 份绿菜花供试材料的游离小孢子培养能力进行初步研究, 其中 8 种基因型(占全部材料的 61.5%) 有胚胎发生, 并获得 5 种基因型的再生株, 共 207 株。基因型对绿菜花游离小孢子培养的影响很大, 基因型 '巴绿青花菜' 出胚率最高, 达 37.08 胚/蕾。同时, 对培养基中加入活性炭悬浮液和更换培养基的作用进行了研究。

**关键词** 绿菜花 游离小孢子培养 胚胎发生 植株再生

70 年代初, Nitsch 等<sup>[1]</sup>首先在毛叶曼陀罗等茄科植物成功地应用游离小孢子培养方法获得胚胎和再生株。1982 年, 在芸薹属作物上, 德国 Lichter<sup>[2]</sup>首先报道采用游离小孢子培养诱导小孢子胚胎发生和植株再生。绿菜花(*Brassica oleracea* var. *italica*) 的游离小孢子培养, 最早见于 1991 年 Takahata 等<sup>[3]</sup>的报道。由于技术难度大, 迄今在国内还没有见到绿菜花游离小孢子培养成功的报道。

我国的绿菜花常规育种存在费时费工、种子量有限、国内资源贫乏等问题。绿菜花维生素 C 含量极高, 达 140mg/100g 鲜重; 其它营养成分也较高, 还含有吲哚甲醇、 $\beta$ -胡萝卜素等防癌的物质, 是富含营养保健成分的蔬菜之一。本项研究工作, 旨在研究和完善绿菜花游离小孢子培养的方法, 为绿菜花的遗传育种研究提供新的生物技术育种手段。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试的 13 种基因型见表 1。

### 1.2 实验方法

1.2.1 小孢子的分离和培养 取花蕾长 3.0~5.5mm 的花序, 7% (W/V) 饱和次氯酸钙溶液(加一滴吐温 20) 表面消毒 15min, 无菌水洗 3 次, 每次 5min。然后将无菌的花蕾放于研钵中, 加入少量 B5 洗涤培养基<sup>[4]</sup>, 用研棒轻压, 使小孢子从花蕾游离到液体培养基中, 45 $\mu$ m 孔径尼

龙筛网过滤, 收集滤液, 100g 离心 3 次, 每次 3min。最后一次离心后, 将小孢子悬浮于经过滤灭菌的改良的 1/2NLN 培养基中<sup>[3, 5]</sup>。用血球计数器将小孢子密度调整为  $1 \times 10^5$ /ml, 每个 60mm 无菌塑料或玻璃培养皿中放入 2ml 小孢子悬浮液, 石蜡膜封口, 置温度梯度培养箱作 32.5℃、1d 热诱导处理, 后置 25℃下继续培养, 2~3 周后分类计数从球形期到子叶期各阶段的胚数量, 并转到 6000lx、14h/d 的光照、25℃温度下继续培养。

表 1 供试的 13 种基因型

材料名称	株系名称	种子来源
Galaxy	galaxy	北京蔬菜研究中心农场
碧杉	碧杉	同上
B105-1	B105-1C	北京蔬菜研究中心绿菜花课题组
B105-12	B84-2	同上
B105-13	B93-1	同上
B105-11	B92-1	同上
巴绿青花菜	巴绿青花菜	东北农业大学园艺系
bc-11	B95-228	同上
bc-13	B95-236	同上
青绿青花菜	青绿青花菜	同上
bc-1	三芳交配东京绿	同上
bc-23	95B3-1-9	同上
bc-7	B95-228	同上

1.2.2 胚培养和再生株的获得 将获得的子叶期小孢子胚转置于 25℃, 6000lx, 14h/d 光照下培养 24~72h。胚转绿后, 移到含糖 2%(W/V) 和 1.2% 琼脂粉的 B5-2 固体培养基的 90mm 培养皿或 100ml 三角瓶中继续培养。光温同上, 直到幼苗长成(约 3~4 周)。将带根幼苗洗去根部残留培养基后, 移栽到含蛭石、花卉营养土(1:2)的营养钵中。前一周内用大烧杯罩苗, 以保持湿度, 有利于保持组培苗的驯化。待幼苗生长健壮后, 定植于温室。

1.2.3 细胞学方法 小孢子离体培养期间, 用 Nikon TMD-EF2 倒置相差显微镜直接观察小孢子形态变化、细胞分裂和早期胚胎发生过程。球形期后的胚胎形态变化用双目实体解剖镜观察。

1.2.4 影响绿菜花游离小孢子胚胎发生的单因子实验

1.2.4.1 不同基因型对绿菜花游离小孢子培养的影响 对所供试的 13 份材料进行游离小孢子培养, 比较不同基因型的胚胎发生能力, 从中筛选出胚胎发生率高的基因型, 以供下列实验应用。

1.2.4.2 活性炭的加入及更换培养基的作用 活性炭的加入方法是, 用 1g 活性炭加 0.05g 琼脂糖溶于 100ml 无菌水中。在 112℃下高压灭菌 20min, 配成活性炭悬浮液。悬浮液中活性炭与琼脂糖吸附, 在常温下不凝固。在培养开始时, 每培养皿加入 0.1ml 活性炭悬浮液, 也可以在更换培养基后加入活性炭<sup>[6]</sup>。

更换培养基的作法是, 取 1~2ml 0.38M (13%) 糖浓度的洗涤培养基加入到每个培养皿中, 吸出所有溶液并在 100g 下离心 5min, 然后沉淀物用 1.5ml 新鲜 1/2NLN 培养基重新悬浮, 更换培养基试验于培养 24h 后进行, 有时更换几次, 并结合加入活性炭<sup>[6, 7]</sup>。每个处理重复 3 次, 三周后统计出胚量。

2 结果与分析

2.1 绿菜花小孢子胚胎发生的细胞学观察

游离小孢子在 1/2NLN 培养基中于 32.5℃培养 24h 后, 可见部分小孢子直径增大到 1~2 倍, 3~4d 可见到小孢子开始第一次分裂(图 1)。8~9d 可见经多次细胞分裂形成的多细胞

团,同时脱去小孢子外壁。11~13d可见原胚的出现。随后相继可见到球形胚、心形胚、鱼雷胚和子叶胚各阶段的胚(图2~5),整个过程大约持续18~22d,最后形成再生株(图5)。



图 1 球形胚 (×200)

2.2 提高出胚率的单因子实验研究

2.2.1 基因型对绿菜花游离小孢子胚胎发生影响 在13种供试基因型中,11种观察到小孢子细胞分裂,8种获得胚。具有胚胎发生能力的基因型中,出胚率最高的为“巴绿青花菜”,达37.08胚/蕾;最低的为“B105-13”,0.31胚/蕾;前者为后者的119.6倍。而“bc-13”、“青绿青花菜”、“bc-1”虽有细胞分裂,但未见胚胎发生。“bc-23”、“bc-7”则没有任何反应(表2)。

2.2.2 活性炭的加入及更换培养基的作用 由表3看出,培养前加入活性炭的处理出胚率为15.32胚/蕾,比对照提高2.5倍,而单纯更换新鲜培养基的2个处理不仅不能提高出胚率,反而大大抑制了胚胎发生。更换培养基后加活性炭的处理,等同于培养前不加入活性炭(表3)。

图 2 心形胚 (×200)

表 2 不同基因型对出胚率的影响

基因型	膨大	细胞分裂	球形胚	子叶胚	胚产量 (胚/蕾)
Galaxy	+	+	+	+	31.80
碧杉	+	+	+	+	15.00
B105-1	+	+	+	+	21.33
B105-12	+	+	+	+	0.63
B105-13	+	+	+	+	0.31
B105-11	+	+	+	+	0.67
巴绿青花菜	+	+	+	+	37.08
bc-11	+	+	+	+	26.25
bc-13	+	+	-	-	0
青绿青花菜	+	+	-	-	0
bc-1	+	+	-	-	0
bc-23	-	-	-	-	0
bc-7	-	-	-	-	0

表 3 活性炭的加入及更换培养基对出胚率的影响

处 理	总胚数(个)	出胚率(胚/蕾)
对照	12	6.11
活性炭(培养前加入)	30	15.32
更换培养基(培养1d后更换)	0	0
更换培养基(培养2d后更换)	0	0
培养1d后更换培养基并加入活性炭	10	5.07

在对“碧杉”进行研究时发现,小孢子膨大现象比较普遍,有的有核分裂,但在2~3次分裂

后停滞, 最终未能诱导胚胎发生。加入活性炭后, 子叶胚比对照提前 3~4d 出现, 数量和质量也提高。但并非所有基因型对活性炭的加入都有反应, 如基因型 'Galaxy' 的小孢子胚胎发生能力较强, 加入活性炭后胚胎发生率反而下降。

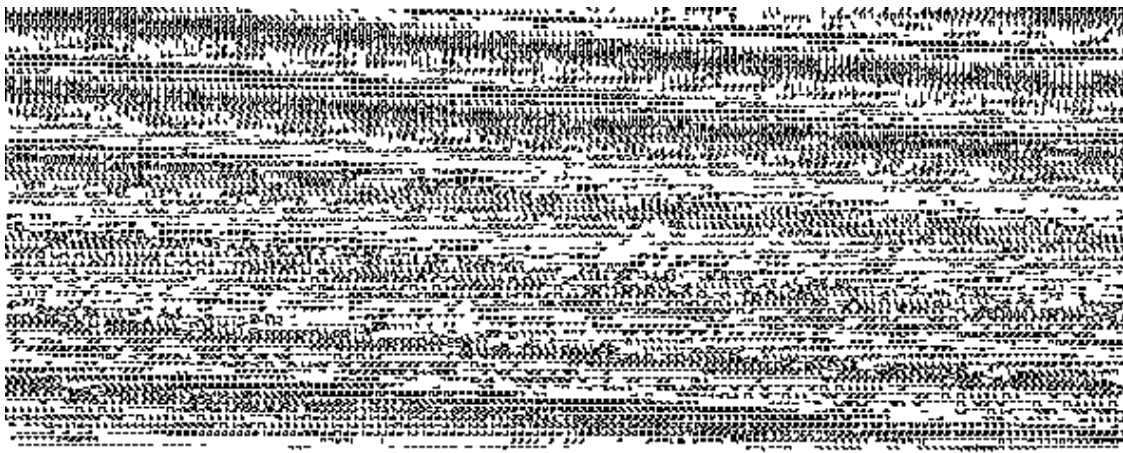


图 3 鱼雷胚 (×100)

图 4 悬浮培养 22d 的各时期小孢子胚

图 5 小孢子培养成苗

### 3 讨论

本项研究结果表明, 绿菜花游离小孢子培养受基因型、加入活性炭悬浮液的影响和制约。

基因型是影响绿菜花游离小孢子胚胎发生的关键性因素。在出胚的 8 种基因型中, '巴绿青花菜' 出胚率最高, 达 37.08 胚/蕾; 'B105-13' 最低, 为 0.31 胚/蕾。有 5 种基因型没有获得胚, 需进一步探索培养方法和条件, 增加能诱导小孢子胚胎发生的基因型的数量。有些绿菜花基因型在培养过程中, 有众多小孢子膨大破裂, 胚胎发生停留在 4~8 个细胞阶段。这是由于培养小孢子本身释放有毒代谢产物所致。活性炭的加入能吸附培养基中有害物质, 不仅能有效地提高出胚数量, 也促使胚提前成熟, 能有效促进胚胎发生的诱导。而采用更换新鲜培养基的方法不能提高出胚率, 甚至还有负面影响。Gland 等<sup>[6]</sup>认为, 小孢子分泌的有害物质释放和积聚, 可导致游离小孢子培养的失败。通过改善通气条件, 更换培养基和加入活性炭, 可以克服这一问题。本实验得到同样的结论。

本项研究结果表明, 在绿菜花育种工作中, 游离小孢子培养表现了更大的应用前景和应用价值。

### 参 考 文 献

- 1 Nitsch C, et al. Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen *Datura innoxia* culture dans l'anthere ou isole de l'anther. C R Acad Sci Ser D, 1973, 276: 303~306
- 2 Lichter R. Induction of haploid plant from isolated pollen of *Brassica napus* z pflanzenphys; d, 1982, 105 427~434

- 3 Takahata Y, et al. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. Plant Sci, 1991, 74: 235 ~ 242
- 4 Gamborg OI, et al. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. Exp Cell Res, 1968, 50: 151 ~ 158
- 5 Keller, et al. The production and utilization of microspore derived-haploids in *Brassica* crops. In : sk Sens: ki Gies Plant Cell Culture in Crop Improvement. New York: Plenum Press, 1982, 163 ~ 183
- 6 Gland A, et al. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus*. J Plant Physiol, 1988, 132: 613 ~ 617
- 7 Keller WA, et al. An efficient method for culture of isolated microspore of *Brassica napus*. In: Proc 7th Intern Rapeseed Cong, 1988, 152 ~ 157
- 8 Cao MQ, et al. Embryogenesis and plant regeneration of sauerkraut cabbage (*Brassica oleracea* L, ssp *capitata*) via *in vitro* isolated microspore culture. C R Acad Sci Paris, t310, Serie 3, 1990, 203 ~ 209

## Embryogenesis and Plant Regeneration of Broccoli via Isolated Microspore Culture

Zhang Deshuang      Cao Mingqing

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100081)

Qin Zhiwei

(Northeast Agriculture University, Harbin 150030)

**Abstract** Buds of 3.0 ~ 5.5mm in length of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) were removed from the raceme, surface sterilized with full-strength commercial bleach (7% sodium hypochlorite) for 15 min and rinsed 3 times with sterile deionized water. Then they were squeezed, filtered, prepared and centrifuged. The density of the suspension was cultured in modified liquid medium 1/2 NLN lacking growth substances. They were sealed with parafilm and incubated in darkness at 32.5 °C for one day and then incubated at 25 °C continually. 13 genotypes of broccoli were used in the isolated microspore culture study. Microspore-derived embryos were produced in 8 genotypes and 207 microspore-derived plants were produced in 5 genotypes. Of the eight genotypes in which microspore-derived embryos were gained, the best one was "Balu broccoli" which produced 37.08 embryos per bud. Genotypes influenced isolated microspore culture of broccoli significantly. The addition of active carbon suspension to culture media and the alternation of culture media were also studied.

**Key words:** Broccoli; Isolated microspore culture ; Embryogenesis; Plant regeneration