

不结球白菜小孢子胚成苗及倍性变异研究

马丽华, 沈火林, 王娟娟, 郭 爽, 谭 芳

(中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100094)

摘要: 以不结球白菜小孢子胚为外植体, 对胚发育成苗过程中基本培养基、激素配比、基因型及生根条件进行了研究, 并对再生植株的染色体倍性进行了鉴定。研究表明: 适于小孢子胚芽分化的培养基为 $B_5 + GA_3 0.1 \text{ mg/L} + \text{蔗糖 } 3\% + \text{琼脂 } 1.2\%$, 在此培养基上 6 号、14 号、31 号的子叶型胚状体的出芽率分别为 53.33%, 85.24%, 75.55%, 平均出芽数分别为 5.66, 3.83, 3.28 个; 为了诱导获得健壮新根, 提高植株再生率, 最适宜的生根培养基为 $MS + IBA 0.1 \text{ mg/L} + \text{蔗糖 } 3\% + \text{琼脂 } 0.6\%$, 生根率达 100%, 平均根数 9.70 条。对 133 株再生植株进行了染色体倍性鉴定, 结果发现不结球白菜自然加倍率很高, 且倍性变异情况比较复杂, 其中四倍体植株所占比例最高, 达到 56.39%, 二倍体植株占 39.10%, 三倍体植株占 3.01%, 而单倍体植株仅占 1.50%。

关键词: 不结球白菜; 小孢子胚; 植株再生

中图分类号: S634.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)增刊-0200-04

Plant Regeneration of Microspore-derived Embryos and Ploidy Variation in Non-heading Chinese Cabbage

MA Li-hua, SHEN Huo-lin, WANG Juan-juan, GUO Shuang, TAN Fang

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Microspore-derived embryos of non-heading Chinese cabbage were used as explants. Process of the plant regeneration of embryos was studied through optimization of basic culture medium, hormone combination, genotype and rooting condition, and the ploidy of chromosome of regenerated plants were identified. The study showed that the best medium for shoot differentiation of microspore-derived embryos was B_5 medium supplemented with $0.1 \text{ mg/L } GA_3$, 3% sucrose and 1.2% agar. Shoot differentiation rate of cotyledary embryos of No. 6, No. 14 and No. 31 were 53.33%, 85.24% and 75.55%, while the average number of shoots per embryo were 5.66, 3.83 and 3.28 respectively. To induce strong roots and raise plant regeneration rate, the most suitable medium for rooting was MS with $0.1 \text{ mg/L } IBA$, 3% sucrose and 0.6% agar. Root differentiation rate was 100% and 9.70 roots per explant. The ploidy of 133 regenerated plants was identified, the result showed that the non-heading Chinese cabbage had a high level of spontaneously-produced doubling rate and the case of ploidy variation was complicated. The rate of tetraploid plants was 56.39% which was the highest, the rate of diploid plants was 39.10%, the rate of triploid plants was 3.01% and haploid plants with the rate of 1.50% only.

Key words: Non-heading Chinese cabbage; Microspore-derived embryos; Plant regeneration

游离小孢子培养已在大部分芸薹属作物中获得成功^[1]。通过小孢子培养快速、有效地获得的双单倍体(DH)系,可直接用于培育新品种或作为优良亲本间接应用于品种改良。虽然芸苔属作物游离小孢子培养的产胚率相对较高,但是小孢子胚成苗率仍然较低,通常不到 50%,有时甚至低于 10%^[2,3]。小

孢子胚在分化培养基上,存在胚停止生长、愈伤化和褐化、畸形生长等现象,直接影响到小孢子培养技术在育种中的应用。而有关不结球白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis* Tsen et Lee)小孢子胚进一步发育成苗的报道很少,本文对基本培养基、激素配比、基因型等对不结球白菜小孢子胚进

收稿日期: 2007-03-02

基金项目: 上海市“登山计划”重大项目“优质安全青菜种质创新与分子育种”(06DE19104)

作者简介: 马丽华(1981-),女,河北石家庄人,在读硕士,主要从事蔬菜遗传育种与生物技术方面的研究工作

通讯作者: 沈火林(1965-),男,上海人,副教授,硕士,主要从事蔬菜遗传育种的教学与科研工作。

一步成苗的影响进行了研究, 并对再生植株的染色体倍性进行了鉴定, 旨在为不结球白菜小孢子培养技术的应用提供理论依据。

1 材料和方法

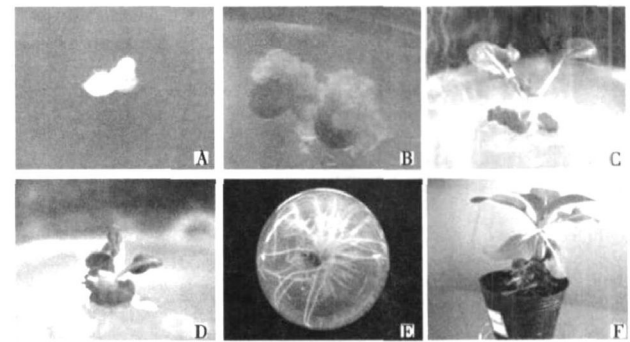
以不结球白菜高代自交系 6 号、14 号、31 号 3 个品系为试材, 进行了游离小孢子培养。小孢子在无激素的 NLN 液体培养基(蔗糖 13%, 0.22 μ m 滤膜过滤灭菌)中浅层培养, 先经 24 h、33 $^{\circ}$ C 热激处理 1 d, 后转入(25 \pm 1) $^{\circ}$ C 暗培养。约 2 周后, 出现肉眼可见胚状体, 由静置培养改为 60 r/min 低速振荡培养。1 周后, 将形成的子叶型胚状体, 置于 3 000 lx、16 h/d 光照条件下培养, 当胚状体转绿后, 即可用于小孢子胚的成苗试验。每个处理接种外植体 30~ 45 个, 3 次重复, 对各处理的统计结果用 SAS 数据处理软件进行邓肯氏新复极差分析。

2 结果与分析

2.1 基本培养基和激素配比对小孢子胚芽分化的影响

将 14 号不结球白菜的小孢子胚接种于附加不同浓度 6-BA、NAA 和 GA₃ 的 MS 或 B₅ 培养基上, 含蔗糖 3%, 琼脂 1.2%, 记录小孢子胚生长发育情况, 8 周后统计出芽率。出芽率= (出芽胚状体数/接种胚状体数) \times 100%。结果表明: 在 B₅ 附加 0.1 mg/L GA₃ 的培养基上, 小孢子胚芽的分化速度快, 出芽率高, 达到 82.51%, 平均出芽数 3.42 个, 在此培养基上, 多数小孢子胚会有根的分化, 但其根系细弱, 需转入生根培养基进一步获得健壮植株(图 1-C)。在 MS-2 培养基上小孢子胚芽的分化情况次之。在含较低浓度 BA 的 MS-3 培养基上, 小孢子胚芽的分

化速度慢, 叶片略畸形(图 1-D), 若继续在该培养基上培养, 则矮化丛生芽现象比较严重。随着 BA 浓度的提高, 小孢子胚芽的分化受到明显抑制, 在附加 1 mg/L BA 的 B₅-3 培养基上, 子叶畸形, 再生芽多呈玻璃质化。而在不含任何激素的 MS-1、B₅-1 培养基上, 胚状体均发生愈伤化, 最终褐化死亡(图 1-B)。可见, B₅-2 是诱导小孢子胚芽分化的最适培养基(表 1)。



A. 小孢子胚; B 小孢子胚愈伤化并开始褐化; C. 小孢子胚在分化培养基中分化; D. 畸形苗; E. 再生苗生根情况; F. 小孢子胚再生植株。
A. Microspore derived embryo; B. Microspore derived embryo calli and browned; C. Differentiation of microspore-derived embryo; D. Abnormal plantlet; E. Rooting of the regenerated plantlet; F. Regenerated plant

图 1 小孢子胚培养

Fig. 1 Microspore-derived embryos culture

2.2 基因型对小孢子胚芽分化的影响

以 6 号、14 号、31 号的小孢子胚为试材, 接种到上述 B₅-2 分化培养基上, 8 周后统计出芽率。供试的 3 个基因型中, 出芽率最高的为 14 号, 达到 85.24%, 平均出芽数 3.83 个, 再生芽生长健壮。31 号次之, 2 种基因型间无显著差异。6 号出芽率最低, 为 53.33%, 出芽数较多, 生长势弱, 说明基因型对不结球白菜小孢子胚芽分化的影响较大, 3 种基因型的出芽率差异显著, 但总体来说, 小孢子胚芽的分化率均在 50% 以上, 出芽率较高(表 2)。

表 1 培养基和激素对小孢子胚芽分化的影响

Tab. 1 Effect of medium and hormone on shoot differentiation of microspore-derived embryos

培养基代号 Medium name	培养基配方 Medium type	出芽率/% Shoot differentiation rate	平均出芽数 Average No. of shoots per embryo
MS-1	MS	0 d	0 c
MS-2	MS+ GA ₃ 0.1 mg/L	53.33 \pm 5.77 b	3.96 \pm 0.56 b
MS-3	MS+ 6-BA 0.2 mg/L	25.76 \pm 5.17 c	7.05 \pm 0.63 a
B ₅ -1	B ₅	0 d	0 c
B ₅ -2	B ₅ + GA ₃ 0.1 mg/L	82.51 \pm 2.92 a	3.42 \pm 0.63 b
B ₅ -3	B ₅ + 6-BA 1 mg/L + NAA 0.02 mg/L	3.33 \pm 5.77 d	0.67 \pm 1.15 c

2.3 小孢子胚再生芽的生根培养

选取 14 号小孢子胚的再生芽为试材, 以 MS 含蔗糖 3% 和琼脂 0.6% 的培养基为对照, 附加 NAA 或 IBA, 各设 2 种梯度, 共 5 个处理, 接种后 14 d 统计生根情况。在这 5 种培养基上均能生根(表 3),

但是生根数和根的生长状况有很大差异。试验表明, 在 MS 附加 0.1 mg/L IBA 的培养基上, 生根较多, 平均根长 2.67 cm, 生根速度快, 4~ 6 d 可见根的分化(图 1-E)。在 MS+ NAA 0.1 mg/L 的培养基上根少且短。当 NAA 或 IBA 的浓度提高到 0.5 mg/L

时,根虽然较多,但是根系发育不正常,通常有 2 种类型的根出现:一种根短粗,发根速度慢;另一种根细长,根毛呈棉絮状,着生在培养基表面,可见较高浓度的生长素对于根的分化有负面影响。而在不加任何激素的处理中,根细长、发根量少,植株移栽成活率低。因此,以 MS+ IBA 0.1 mg/L 为最佳生根培养基。

表 3 小孢子胚再生芽在生根培养基上的生根情况

Tab. 3 Rooting of regenerated shoots of microspore-derived embryos on root induction medium

激素/(mg/L) Hormone		生根率/% Root differentiation rate	平均根数 Root number	平均根长/cm Root length	生长状况 Growth state
NAA	IBA				
0	0	100	3.70±1.15 c	2.23±0.42 a	根少,细长,多呈半透明状
0.1	—	100	6.30±0.80 c	1.67±0.32 ab	根少,较短,白色,侧根少
0.5	—	100	13.00±2.31 a	0.87±0.38 b	根多,极短粗,白色,无侧根,根毛极发达呈白色絮状
—	0.1	100	9.70±1.51 b	2.67±0.81 a	根较多,根长,健壮,白色,侧根发达
—	0.5	100	11.27±1.50 ab	2.13±0.71 a	根多,短粗,白色,侧根多,根毛发达呈白色絮状

2.4 再生植株倍性鉴定

利用流式细胞光度仪(BD FACSCalibur),通过自动分析、检测细胞 DNA 含量的分离峰,来鉴定再生植株的染色体倍性。以已知的二倍体不结球白菜为对照,即二倍体的分离峰出现在 100 分离强度附近,

表 2 基因型对小孢子胚芽分化的影响

Tab. 2 Effect of genotypes on shoot differentiation of microspore-derived embryos

基因型 Genotype	出芽率/% Shoot differentiation rate	平均出芽数 Average No. of shoots per embryo
6 号	53.33% ±5.77 b	5.66 ±0.43 a
14 号	85.24% ±5.02 a	3.83 ±0.31 b
31 号	75.55% ±6.94 a	3.28 ±0.55 b

每个待测植株分别测定 1 次,峰值在 100 附近的被测样本即为二倍体,而处在 50, 150, 200 附近的分别为单倍体、三倍体和四倍体。对 6 号、14 号、31 号共 133 株再生植株进行倍性检测,单倍体、二倍体、三倍体和四倍体同时存在(图 2)。

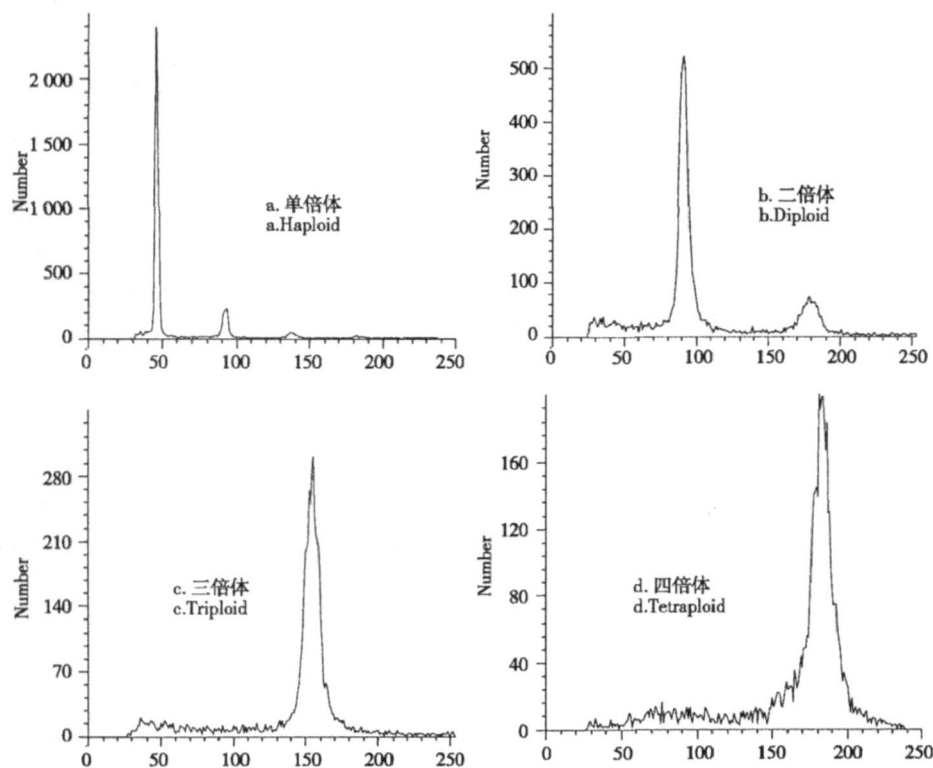


图 2 再生植株流式细胞仪鉴定结果

Fig. 2 Identification of regenerated plants by flow cytometry

6 号的小孢子再生株全部为二倍体,自然加倍率为 100%。14 号再生株群体有 3 种倍性,即二倍体、三倍体和四倍体,没有单倍体出现。其四倍体比

率显著高于其他 2 种基因型,达到 77.27%。31 号的再生株有单倍体、二倍体和四倍体 3 种倍性,其中半数以上为四倍体,单倍体仅占 4.76% (表 4)。多

种倍性共存的现象说明, 不结球白菜小孢子再生株存在染色体自然加倍现象, 小孢子再生株有多倍化趋势。不同基因型间, 小孢子再生株的倍性变异情况有明显差别。

表 4 不同基因型再生植株的倍性变异

Tab. 4 Ploidy variation of regenerated plants with different genotypes									
基因型 Genotype	鉴定植株数 No. of plants identified	单倍体 Haploid		二倍体 Diploid		三倍体 Triploid		四倍体 Tetraploid	
		株数 No. of plants	百分比 / % Percent	株数 No. of plants	百分比 / % Percent	株数 No. of plants	百分比 / % Percent	株数 No. of plants	百分比 / % Percent
6 号	25	0	0	25	100	0	0	0	0
14 号	66	0	0	11	16. 67	4	6. 06	51	77. 27
31 号	42	2	4. 76	16	38. 10	0	0	24	57. 14
总计 Total	133	2	1. 50	52	39. 10	4	3. 01	75	56. 39

2. 5 再生植株的移栽

待小孢子再生株有 4~ 6 片真叶, 植株生长健壮, 根系完整, 可移入土壤中, 使其进一步生长发育。移栽前打开瓶口炼苗 1~ 2 d。取出幼苗, 洗净根部培养基, 移栽于含蛭石: 草炭: 园土(1: 1: 2) 的营养钵中。开始 1 周注意保湿, 在(25 ± 2) °C、3 000 lx、16 h/d 光照条件下, 适时浇水, 待小植株成活后移至温室。移栽成活率可达 100%。

3 讨论

在以往的研究中, 人们大都以不含激素的 MS 或 B₅培养基作为进一步诱导小孢子胚发育成苗的培养基, 且小孢子胚的成苗率差异很大。李岩等^[3]报道, 在小白菜形成的小孢子胚胎中仅 7. 6% 的胚能直接在 B₅琼脂培养基上发育成植株等。Sato 等^[4]的试验中, 大白菜小孢子胚成苗率为 5% ~ 10%。刘凡等^[5]通过提高 MS₀培养基的琼脂含量, 可使大白菜小孢子胚成苗率从 37. 5% 提高到 85. 8%。但是本试验表明, 不结球白菜的小孢子胚在不含激素的 MS 或 B₅琼脂培养基上, 容易发生愈伤化, 最终褐化死亡, 胚状体不能成苗。而附加 0. 1 mg/L GA₃的 B₅培养基, 有利于小孢子胚芽的分化, 分化率可达 85. 24%, 不同基因型间芽的分化率差异较大, 但均在 50% 以上。小孢子胚在芽分化培养基上会同时分化芽和根, 但是生成的根系通常较弱, 继代时根会大量损失, 影响植株成活率, 因此有必要将小孢子胚的再生芽转入生根培养基, 进一步获得健壮植株。在 MS 附加 0. 1 mg/L IBA 的生根培养基上, 10 d 左右即可长出健壮新根, 再生植株移栽成活率 100%。

一般来说, 在白菜类蔬菜作物的小孢子胚胎发生过程中, 染色体自然加倍现象比较普遍, 通常有 50% ~ 70% 的自然加倍率^[2, 6]。这种自然加倍所得的 DH 株, 省去了用秋水仙素等方法进行人工加倍的步骤, 对于游离小孢子技术的直接应用十分有利。在本试验供试的 3 种基因型中, 二倍体小孢子再生

株占 39. 10%, 四倍体再生株占 56. 39%, 而单倍体再生株仅占 1. 50%。再生植株中单倍体获得率低, 倍性复杂的现象在油菜、矮牵牛和黑麦上也曾见报道^[7- 9]。多种倍性植株的产生被认为是在离体条件下, 处于单核靠边期至双核早期的花粉在培养过程中发生了核内复制或核融合, 从而导致了多种倍性植株的出现^[7]。本试验中四倍体植株较多, 而单倍体植株少的原因可能是 ①材料本身的自然加倍率高, 且小孢子再生株向多倍体发展的趋势强; ②外源激素及继代培养时间长短的影响; ③单倍体小孢子再生株在发育过程中, 由于生活力弱, 培养过程中易被淘汰, 具体原因还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 曹鸣庆, 刘 凡. 芸薹属(*Brassica*) 蔬菜游离小孢子研究进展[J]. 园艺学年评, 1996, 2: 63- 90.

[2] 曹鸣庆, 李 岩, 蒋 涛. 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.

[3] 李 岩, 刘 凡, 曹鸣庆. 通过游离小孢子培养方法获得小白菜三个变种的胚胎及植株[J]. 华北农学报, 1993, 8(3): 92- 97.

[4] Sato T, Noshio T, Hirai M. Plant regeneration from isolated microspore cultute of Chinese cabbage(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) [J]. Plant Cell Reports, 1989, 8: 486- 488.

[5] 刘 凡, 李 岩, 姚 磊, 等. 培养基水分状况对大白菜小孢子胚成苗的影响[J]. 农业生物技术学报, 1997, 5(2): 131- 136.

[6] 张凤兰, 钉 贯, 靖 久. 大白菜小孢子再生植株自然加倍率的探讨[J]. 农业新技术, 1993, 11(2): 23- 25.

[7] Keller W A, Rajhathy T, Lacapra J. In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris* [J]. Can J Genet Cytol, 1975, 17: 655- 666.

[8] Engvild K C. Triploid petunias from anther cultures[J]. Hereditas, 1973, 74: 144- 147.

[9] Thomas E, Wenzel G. Embryogenesis from microspores of rye [J]. Naturwissenschaften, 1975, 62: 40- 41.