小白菜小孢子胚状体诱导成苗及利用

王超楠　冯　辉　姜凤英　刘如娥　周　英

摘　要　以10个小白菜 F_1 为试材进行游离小孢子培养,研究小孢子胚发生及其成苗的主要影响因素,并对获得的双单倍体以及用其配制的杂交组合的园艺学性状进行鉴定。结果表明,品种间小孢子出胚率差异较大;NLN-13培养基中大量元素减半有利于小孢子胚发生,胚诱导率达100%;培养基中添加适量的6-BA和NAA可以提高小孢子出胚率;小孢子胚成苗培养基的适宜琼脂浓度为1.0%,小孢子胚成活率可达85.88%;MS+3%蔗糖+0.8%琼脂是小孢子再生植株继代和壮苗的适宜培养基,MS+3%蔗糖+0.8%琼脂+NAA 0.1 mg·L^{-1}是小孢子再生植株生根的适宜培养基;双单倍体及其与自交系配成的杂交组合整齐一致。

关键词　小白菜　小孢子培养　胚状体　双单倍体

小白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *cammunis* Tsen et Lee.)又名青菜、小油菜,在我国广泛种植。小白菜小孢子培养最早见于曹鸣庆等[1]的报道,通过游离小孢子培养首先获得了小白菜小孢子胚状体。此后,李岩等[2]和蒋武生等[3]获得了类似的结果。但是,利用这项技术进行小白菜育种的研究鲜见报道。本试验利用10个小白菜优异 F_1 进行游离小孢子培养获得再生植株,并用双单倍体纯系试配杂交组合。

1　材料与方法

1.1　试验材料

供试材料为引自日本的10个小白菜 F_1(表1)。2005年9月初种子催芽后于4 ℃冰箱中处理20 d;9月下旬播种于穴盘;11月初栽植于温室花盆中,进行长光照(14 h·d^{-1})处理;12月中旬～翌年3月陆续开花。

1.2　试验方法

试验在沈阳农业大学蔬菜试验基地和蔬菜学科实验室进行。

花期采集健壮植株上2～4 mm长的花蕾(小孢子发育处于单核靠边期至双核早期)分离小孢子。小孢子分离纯化和悬浮培养参照栗根义等[4]和姜凤英等[5]的方法。

①分别在标准NLN-13培养基(CK)、大量元素减半的1/2 NLN-13培养基,以及添加6-BA(0.05～0.10 mg·L^{-1})和NAA(0～0.2 mg·L^{-1})的1/2 NLN-13培养基上诱导10个小白菜 F_1 小孢子胚状体的发生,并调查各品种的出胚率。

②在1/2 NLN-13培养基中分别添加不同浓度的活性炭和琼脂糖(表2),观测小白菜小孢子胚状体发生及发育情况。

③将子叶形胚状体转至琼脂含量分别为0.8%、1.0%、1.2%的MS培养基上,置于25 ℃、12 h·d^{-1}光照培养箱中培养,观测琼脂含量对小孢子胚成苗的影响。

④将成苗培养基上的小孢子再生植株进行继代培养和生根处理。

小孢子植株倍性鉴定采用田间植株形态学调查、气孔特征鉴定、花粉生活力检测以及花粉母细胞染色体计数相结合的方法。田间植株形态学调查:记录每个小孢子再生植株的主要形态学特征,即生长势、叶片颜色、花器官大小、花药发育状况、自交结籽情况等性状,鉴定小孢子植株倍性[6]。气孔特征鉴定:用镊子小心撕取再生植株叶片的下表皮,将其平展到载玻片上,滴1滴清水或碘-碘化钾染液,染

王超楠,女,硕士研究生,沈阳农业大学农学院,110161,E-mail:chaonan229@163.com
冯辉(通讯作者,电话:024-88487143,E-mail:fenghuiaaa@263.net),姜凤英,刘如娥,周英,沈阳农业大学园艺学院,110161
收稿日期:2007-01-11;修回日期:2007-04-05
基金项目:国家自然科学基金(30671414),国家"863"项目(20060110Z1072)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

色 2～3 min,盖上盖玻片,在光学显微镜下观察并统计气孔保卫细胞的长度、宽度、密度以及保卫细胞叶绿体数[7],每次随机观测 10个气孔,3次重复。花粉生活力检测:取再生植株的花药分别置于载玻片上,滴 1滴醋酸洋红染液,用镊子挤出花粉,在光学显微镜下观察花粉生活力,每个材料随机观察 3个视野,根据花粉的大小及染色情况,以正常二倍体植株为对照,判断小孢子植株的倍性[6]。花粉母细胞染色体数目鉴定:上午 9:00～11:00采摘再生植株直径 1～2 mm的花蕾,经冰水混合物预处理 24 h,再用卡诺试剂固定 24 h,4 ℃下保存于 70 %乙醇中。观察时,剥取直径约 1 mm大小花蕾的花药,移至载玻片上,用解剖针横切花药,然后挤出花粉母细胞;或者用解剖针将花药捣碎,然后去掉花药,用卡宝品红染色 1～2 min,盖上盖玻片,在光学显微镜下观察染色体数目并判断植株倍性[7]。

培养获得的小孢子再生植株于 2006年 4月移栽至花盆中,6月初开花后二倍体植株自交,并与自交系杂交。收获的种子于 8月播种于穴盘内,9月移栽至花盆中。10月上旬测定株高、开展度、叶长(叶片长 +叶柄长)、叶片长、叶片宽、叶柄长、叶柄宽、叶片数和单株质量,计算变异系数。

2 结果与分析

2.1 培养基成分对小白菜小孢子胚状体发生的影响

由表 1可以看出,1/2 NLN - 13培养基可以明显提高小孢子的胚诱导率,14～20 d后 10个品种均得到了胚状体,诱导率达 100 %。品种间出胚率差异较大,最高的菜园达 21.46胚·蕾$^{-1}$;最低的夏帝仅为 0.40胚·蕾$^{-1}$。在 1/2 NLN - 13培养基中添加 6 - BA和 NAA,除菜园外,各品种出胚率均有所提高,对出胚率较低的品种效果尤为明显。

表 1 培养基对小白菜小孢子胚状体发生的影响

培养基	出胚率 胚·蕾$^{-1}$									
	清江白	长阳	华冠	宝菜	冬妃	夏帝	宝冠	菜园	金夏蒔	皇冠
1/2 NLN - 13	0.62 F	1.35 DE	1.84 CD	0.45 F	1.42 DE	0.40 F	2.71 C	21.46 A	5.88 B	0.80 EF
1/2NLN - 13 +6 - BA +NAA	1.53	3.82	2.95	1.23	2.15	3.20	4.40	19.81	6.20	3.21
NLN - 13(CK)	0	0	0.90	0	0	0.20	2.64	0	0.64	0.25

注:表中同行数据后不同大写字母表示差异极显著(α =0.01)。

2.2 琼脂糖和活性炭对小白菜小孢子胚发生及发育的影响

由表 2可以看出,加活性炭处理的出胚率明显高于不加活性炭的处理,而且加入活性炭后胚状体形状有明显改善,畸形胚较少,子叶形胚状体达到 90 %以上;同时添加琼脂糖和活性炭处理的出胚率比只加活性炭的处理更高;适宜活性炭浓度为 25.0 mg·L^{-1}、琼脂糖浓度为 0.50 g·L^{-1}。

表 2 琼脂糖和活性炭对小白菜小孢子胚发生及发育的影响

活性炭	琼脂糖	出胚率 胚·蕾$^{-1}$				子叶形胚占胚状体总数 /%
mg·L^{-1}	g·L^{-1}	冬妃	夏帝	金夏蒔	皇冠	
110	10	1.00	0.40	2.28	0.80	83.72
25.0	0	1.62	1.42	4.37	1.56	92.21
12.5	0.25	1.65	2.75	3.21	1.83	90.65
25.0	0.50	2.00	3.84	6.20	3.00	95.89

2.3 培养基琼脂含量对小白菜小孢子胚成苗的影响

由表 3可知,琼脂含量为 1.0 %的成苗培养基上小孢子胚成活率最高,为 85.88 %。部分小孢子胚正常萌发,2～3 d子叶由黄变绿,两极开始萌动,胚根伸长并长出根毛。3周后,一些子叶形胚直接发育成小植株,有的形成叶状、茎状或芽状组织,有的褐化死亡。

表 3 培养基琼脂含量对小白菜小孢子胚成苗的影响

琼脂含量 /%	接种胚数 /个	成活数 /个	成活率 /%
0.8	62	46	74.19
1.0	85	73	85.88
1.2	50	30	60.00

2.4 试管苗继代培养和生根

将在成苗培养基上成苗的小孢子再生植株于无菌条件下去除老叶,移入不加激素的 MS + 3 %蔗糖 +0.8 %琼脂培养基上进行继代培养。几次继代后,成苗的纤弱植株逐渐复壮(图 1)。将壮苗转到 MS +3 %蔗糖 +0.8 %琼脂 +NAA 0.1 mg·L^{-1}的生根培养基上,12 d后即可生出粗壮、整齐的白色根系。将生根苗移栽到温室苗床基质中,获得再生植株(图 2)。10个品种共获得小孢子再生植株 207株,成活率 95.8 %。

2.5 双单倍体及其杂交组合的整齐性鉴定

金夏蒔的双单倍体(DH)群体各项指标的变异

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

系数均远远小于 F_2群体,且小于 F_1群体,整齐度最高(图 3),说明其确为纯系,可以满足配制杂交组合对亲本整齐度的要求;杂交组合 D_1、D_2整齐度也较高,变异系数接近于 F_1群体,说明用 DH群体作亲本配制的杂交组合可以满足对杂交种整齐性的要求(图 4)。

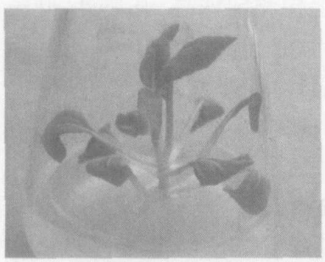


图 1　小白菜小孢子试管苗

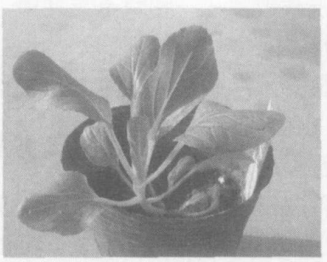


图 2　移栽成活的小白菜小孢子再生植株



图 3　用小白菜 DH 群体配制的一代杂种

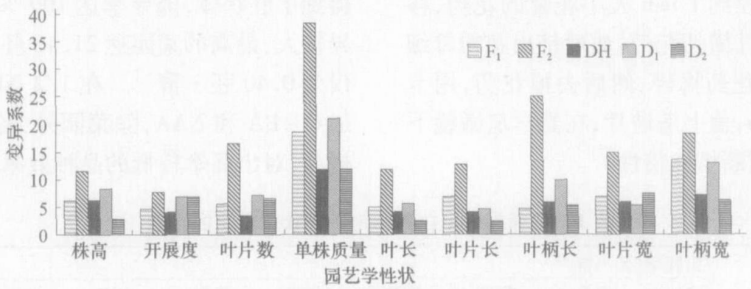


图 4　金夏莳不同群体园艺学性状变异系数

3　结论与讨论

供体材料基因型是影响小白菜小孢子胚发生的因素之一,这与蒋武生等[3]的试验结果一致。1/2 NLN - 13培养基能够提高出胚率,说明低离子浓度有利于小白菜胚的诱导,da Silva Dias[8]在青花菜中有类似的报道。蒋武生等[3]认为添加生长调节剂对小孢子胚发生有抑制作用。但是,本试验中添加适宜浓度的 6 - BA(0.05～0.10 mg·L^{-1})和 NAA(0～0.2 mg·L^{-1})则有利于小白菜胚状体诱导和胚发育,这可能是由于供试材料不同造成的差异。本试验还发现添加适量的活性炭(25.0 mg·L^{-1})和琼脂糖(0.5 g·L^{-1})不仅能提高出胚率,而且子叶形胚的比例大大提高,可达 90 %以上。方淑桂等[9]在青花菜试验中曾得出相似的结果。

刘凡等[10]发现培养基中水分含量对大白菜小孢子胚成活率有很大影响。本试验证明 1.0 %琼脂是小白菜胚成苗培养基适宜的琼脂浓度,该培养基既能满足胚状体萌发所需的干燥条件,又能保证萌发所需的水分,小孢子胚成活率达到 85.88 %。MS +3 %蔗糖 +0.8 %琼脂是继代和壮苗的适宜培养基,MS +3 %蔗糖 +0.8 %琼脂 +NAA 0.1 mg·L^{-1}是生根的适宜培养基。

通过对双单倍体植株自交后代园艺学性状整齐度鉴定,证明本试验获得的双单倍体群体确为纯系,用其试配的杂交组合整齐一致,说明游离小孢子培养技术可用于快速纯化亲本、选育小白菜杂交种。

参考文献

[1] 曹鸣庆,李岩,蒋涛,西尾刚. 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.

[2] 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.

[3] 蒋武生,原玉香,张晓伟,耿建峰,韩永平,郅玉宝. 小白菜游离小孢子培养及其再生植株[J]. 河南农业大学学报,2005,39(4):398 - 401.

[4] 栗根义,高睦枪,赵秀山. 大白菜游离小孢子培养[J]. 园艺学报,1993,20(2):167 - 170.

[5] 姜凤英,冯辉,王超楠. 羽衣甘蓝的小孢子胚诱导和植株再生[J]. 植物生理学通讯,2005,41(6):725 - 727.

[6] 王超楠. 小白菜游离小孢子培养体系的构建与利用[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2007:34 - 38.

[7] 韩阳,叶雪凌,冯辉. 大白菜小孢子植株的倍性变异及倍性鉴定方法的研究[J]. 中国蔬菜,2006(11):9 - 11.

[8] da Silva Dias J C. Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis[J]. Euphytica,2001,119:389 - 394.

[9] 方淑桂,陈文辉,曾小玲,朱朝辉,牛媛媛,廖晓珍. 影响青花菜游离小孢子培养的若干因素[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2005,34(1):51 - 55.

[10] 刘凡,李岩,姚磊,曹鸣庆. 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.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

GA_3及不同比例MS培养基对蕨菜孢子萌发的影响

翟国燕　边　珂　贾克功　朱立新

摘　要　采用 300 mg·L^{-1} GA_3及不同比例的MS培养基对当年和上一年采集的蕨菜孢子进行萌发试验。结果表明，GA_3处理可以促进孢子提早萌发，并且可提高上一年孢子的萌发率，但对提高当年新采集的孢子萌发率作用不明显。全MS培养基对提高孢子萌发量效果最好。

关键词　蕨菜　孢子萌发　GA_3　MS培养基

蕨菜〔*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. var. *latiusculum* (Desv.) Underw.〕为凤尾蕨科蕨属多年生草本植物，富含各种微量元素、氨基酸、维生素、淀粉、生物碱等营养成分[1]，是一种兼有食用、药用价值的野生经济作物。幼嫩的叶柄及未开展的羽状复叶可供食用。野生蕨菜可食用部分的采摘期很短，无法满足市场需求，因此，对蕨菜进行人工繁殖和栽培势在必行。

翟国燕，中国农业大学农学与生物技术学院，北京市海淀区圆明园西路 2号，100094

边珂，贾克功，朱立新（通讯作者，E-mail: yyzzl@cau.edu.cn），中国农业大学农学与生物技术学院，北京市海淀区圆明园西路 2号，100094

收稿日期：2007 - 01 - 11；修回日期：2007 - 04 - 16

目前关于蕨菜人工繁殖技术，主要有孢子播种繁殖法、根茎繁殖法及组织培养法[2-3]。根茎繁殖法虽然成株率和成活率都较高[3]，但繁殖率较低，而且大量挖取根茎易破坏植被，造成水土流失。张金文等[4]将孢子播种在森林土等基质上，得到孢子体幼苗，但仍存在孢子萌发成苗率低等诸多问题，不能满足大量用苗的需要。

在离体条件下进行孢子培养得到孢子体幼苗，可实现批量生产、统一管理，具有成本低、管理方便等优点。该方法在蕨类植物上已有报道[5-9]，但缺乏系统性研究和成熟的方法。本试验对离体条件下的蕨菜孢子繁殖方法进行系统研究，以提高蕨菜孢子在人工繁殖条件下的萌发率，为蕨菜的人工栽培和开发提供依据。

The Establishment and Application of Isolated Microspore Culture Technology System in Brassica campestris L. ssp. chinensis var. communis Tsen et Lee

Wang Chaonan, Feng Hui, Jiang Fengying, et al (College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Liaoning 110161)

Abstract　Isolated microspore culture was carried out with ten F_1 hybrids of pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis* Tsen et Lee). The frequency of embryogenesis, embryos germinated seedling, subculture and root-age of regenerated plantlets, uniform identification of horticultural characters from the DH line progenies and hybrid made with DH lines were studied. The results showed that genotypes had remarkable effect on embryoid induction. Using semi-content of macro-elements in NLN - 13 medium increased the embryoid induction and the frequency of embryogenesis reached 100 %. The suitable concentration of 6 - BA and NAA remarkably enhanced the frequency of embryogenesis. MS medium with 1.0 % agar content was optimal for plantlet regeneration, survival rate of embryo was 85.88 %. MS + 3 % sucrose + 0.8 % agar was the optimal medium for subculture and renewal of pakchoi. MS + 3 % sucrose + 0.8 % agar + NAA 0.1 mg·L^{-1} was the suitable medium for rooting. Analysis of horticultural characters indicated that the DH lines and hybrid made with them were uniform.

Key words　Pakchoi, Microspore culture, Embryoid, Double haploid

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net