

培养基对白菜×白芥属间杂种子房发育的影响¹⁾

巩振辉 何玉科²⁾ 王 鸣 王晓峰

(西北农业大学园艺系, 陕西杨陵 712100)

摘 要 试验在 White 培养基上获得了最好的结果, 其次是 Heller 和 Nitsch 培养基, 在 MS 培养基上杂种子房发育最差, 添加改良 White 培养基附加维生素可明显促进子房的发育和杂种子房的形成, 增加生物素可进一步促进 White 培养基维生素作用的发挥, 但肌醇和泛酸则会抑制 White 维生素的作用, 杂种子房发育的培养基蔗糖浓度范围为 25~50 g/L, 以 50~75 g/L 为宜, 白菜花器提取液或水解酪蛋白均对子房发育有促进作用, 但并非必要条件。

关键词 白菜, 白芥, 远缘杂交, 离体子房培养

中图分类号 S634.103.5, S634.403.5, S603.5

在杂种子房培养中, 营养条件包括培养基附加成分, 是幼小子房赖以生长发育的物质条件, 历来受到生物技术研究者的高度重视。关于芸苔属种间及近缘属间杂种子房的培养技术已有许多报道^[1~7]。然而, 关于 *Brassica* 与 *Sinapis* 属间杂种离体子房培养国内外则极少见报道。*Sinapis* 属内的白芥(*Sinapis alba* L.) 具有许多抗病虫珍贵性状^[8], 探讨白菜与白芥属间杂种子房培养技术, 对于 *Brassica* 与 *Sinapis* 属间基因的交流, 解决大白菜抗病育种中抗源不足、抗性不高的问题均具有重要的理论和实践意义。本试验试图通过白菜×白芥杂种子房不同的培养基、附加维生素、蔗糖浓度及有机添加物等处理的试验研究, 探索白菜与白芥属间杂种离体子房培养的最佳技术。

1 材料和方法

1.1 试材与来源

白芥品种“Trialba”引自荷兰, 白菜品种 NW₄ 由西北农大芸苔属蔬菜课题组提供。

1.2 试验方法

配制 NW₄×Trialba 组合。于开花前 2 d 去雄套袋, 开花当天授粉, 切取授粉后第 6 d 子房, 测量子房长度后(接种子房平均长度 9.99 mm, 标准差 0.93), 用 70% 酒精浸泡 1 min, 再用 0.1% 的升汞消毒 10 min, 无菌水冲洗 3 次后, 接种于不同处理的培养基中, 培养基加琼脂 0.8%。接种后置于温度 22±2℃, 光照强度 1500 lx, 每天光照 14 h 的环境中培养 36 d 后, 调查统计培养子房数、成熟角果平均长度、获得的种子数、杂种在 MS 无激素培养基中的发芽数、每角果平均种子数及杂种子房发芽率。在上述相同材料和方法下, 对不同培养基和附加维生素、不同蔗糖浓度、不同有机添加物等处理进行试验。

以 Nitsch, White, Heller 和 MS 分别作为基本培养基, 添加 IAA 1.5 mg/L, 蔗糖

收稿日期: 1994-09-13

1) 国家自然科学基金资助项目; 2) 现在中国科学院上海植物生理研究所工作, 邮编 200032

50 g/L,按不添加任何维生素,添加改良 White 培养基附加维生素(V_{B1}) 0.5 mg/L,甘氨酸 15 mg/L,烟酸 2.5 mg/L 和 V_{B6} 0.5 mg/L)、生物素(0.01 mg/L)、肌醇(100 mg/L)和泛酸(1.0 mg/L)设置处理(见表 1)。

以 W-2 培养基(表 1)为基本培养基,附加 IAA 1.5 mg/L.蔗糖浓度处理按 25,50,75,100,125,150,175,200 g/L 设计。

以 W-2 培养基(表 1)为基本培养基,添加 IAA 1.5 mg/L,蔗糖 50 g/L,设不添加任何天然有机物、加水解酪蛋白 300 mg/L、椰乳 10%、白菜花器提取液 500 ml/L 等 4 个处理。白菜花器提取液是每 100 mL 水加白菜当天开放花器 50 个,开水煮淋 5 min 后过滤。

2 结果与分析

2.1 培养基对白菜×白芥子房发育的影响

除 N-3,N-4 培养基各接种 14 个子房外,其余供试培养基均接种 15 个子房,其结果(表 2)表明,成熟角果平均长度,在 White 培养基发育最长,其次是 Heller、Nitsch 培养

表 1 附加不同维生素成份的培养基设计

培养基	处 理				
	1	2	3	4	5
Nitsch	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5
White	W-1	W-2	W-3	W-4	W-5
Heller	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5
MS	MS-1	MS-2	MS-3	MS-4	MS-5

注:处理:1.基本矿物质;2.处理 1+改良 White 培养基附加维生素;3.处理 2+生物素;4.处理 2+肌醇;5.处理 2+泛酸。

表 2 培养基对杂种子房发育的影响

培养基	培养子房数(A)	成熟角果平均长度(mm±SD)	获得的种子数(B)	发芽的种子数(C)	每角果平均种子数(B/A)	种子发芽率(%)
N-1	15	18.17±1.50	20	11	1.3	55.0
N-2	15	21.8±2.70	21	13	1.4	65.0
N-3	14	22.8±2.31	23	20	1.6	87.0
N-4	14	18.4±1.85	18	11	1.3	61.1
N-5	15	18.1±2.13	16	8	0.5	50.0
和/平均	73	19.8±3.03	98	63	1.3	64.9
W-1	15	30.0±1.89	24	17	1.6	70.8
W-2	15	32.8±1.77	31	31	2.1	100.0
W-3	15	33.4±1.89	32	32	2.1	100.0
W-4	15	30.6±2.13	23	20	1.5	87.0
W-5	15	29.0±1.99	17	15	1.1	88.2
和/平均	75	31.2±2.52	127	115	1.7	90.6
H-1	15	23.2±2.01	19	11	1.3	57.8
H-2	15	25.6±1.79	20	12	1.3	60.0
H-3	15	26.0±1.84	23	17	1.5	73.9
H-4	15	25.0±2.25	17	17	1.1	100.0
H-5	15	23.8±2.78	18	7	1.2	38.9
和/平均	75	24.7±2.36	97	64	1.3	65.9
MS-1	15	15.6±3.25	14	10	0.9	71.4
MS-2	15	18.6±3.29	16	10	1.1	62.5
MS-3	15	21.6±4.58	19	15	1.3	78.9
MS-4	15	17.1±4.13	15	7	1.0	46.7
MS-5	15	19.2±4.34	15	4	1.0	26.7
和/平均	75	18.4±4.36	79	46	1.1	58.2

基,在 MS 培养基杂种子房发育最短;每角果平均种子数,以 White 培养基最多,MS 培养基最少;种子发芽率也是在 White 培养基为最高,在 MS 培养基最低。

在 White 培养基中添加改良 White 培养基附加维生素及其他维生素的试验表明,添加改良 White 培养基附加维生素(W-2 培养基)可明显促进子房的发育和杂种种子的形成,而增加生物素(W-3)可进一步促进 White 培养基维生素作用的发挥,但肌醇(W-4)和泛酸(W-5)则有抑制 White 维生素的作用。

在添加不同维生素的培养基(W-2,W-3,W-4 及 W-5)和不添加任何维生素的培养基(W-1)里均获得了杂种种子,说明维生素对于白菜×白芥杂种种子的形成并非必要条件,然而添加 White 维生素及生物素可有效地促进子房发育和杂种种子的形成。

2.2 蔗糖浓度对白菜×白芥子房发育的影响

表 3 表明,在供试蔗糖浓度范围内,各处理对子房的增长无明显差异。但仅在 25~150 g/L 蔗糖的各处理中获得了杂种,其中以 50 g/L 和 75 g/L 蔗糖处理获得的杂种数量最高。说明杂种子房发育的蔗糖浓度范围为 25~150 g/L,蔗糖浓度过高或较低均不利于杂种的产生。适宜的蔗糖浓度(50~150 g/L)可有效地增加杂种种子产量,提高种子发芽率。过高的蔗糖浓度,尤其是蔗糖浓度超过 150 g/L 甚至会完全抑制杂种胚的形成。这一结果与 Inomata 在白菜×甘蓝杂种子房培养中关于蔗糖浓度的试验结果不尽相同。Inomata 在 210 g/L 蔗糖的处理中仍获得了白菜与甘蓝的杂种种子^[3],而本试验在 175 g/L 及 200 g/L 的蔗糖处理中均未获得种子,这可能是白菜×甘蓝杂种胚珠液与白菜×白芥杂种胚珠液渗透压不同所致。

表 3 蔗糖浓度对杂种子房发育的影响

蔗糖浓度 (g/L)	考 察 角果数 (A)	成熟角果 平均长度 (mm±SD)	获得的 种子数 (B)	种 子 发芽数 (C)	每角果平 均种子数 (B/A)	种 子 发芽率 (%)
25	16	30.2±2.73	17	12	1.1	70.6
50	16	31.5±4.08	33	30	2.1	91.0
75	16	31.6±3.26	33	30	2.1	91.0
100	16	30.5±2.92	15	10	0.9	66.7
125	16	30.1±2.94	10	7	0.6	70.0
150	16	30.1±2.58	8	3	0.5	37.5
175	16	30.2±2.47	0	0	0.0	0.0
200	16	29.1±2.66	0	0	0.0	0.0

2.3 有机添加物对白菜×白芥子房发育的影响

表 4 表明,供试各处理成熟角果长度无明显差异,且均获得了杂种种子。水解酪蛋白、

表 4 有机添加物对杂种子房发育的影响

有机添加物	接 种 子房数 (A)	成熟角果 平均长度 ($\bar{x}\pm Sxmm$)	获得的 种子数 (B)	种 子 发芽数 (C)	每角果平 均种子数 (B/A)	种 子 发芽率 (%)
CK	16	31.2±3.42	33	31	2.1	93.9
CH	16	32.5±3.27	36	34	2.3	94.4
CW	16	31.8±2.98	34	33	2.1	97.1
FM	16	31.8±2.62	36	36	2.3	100.0

注:CK.不添加任何有机物;CH.水解酪蛋白;CW.椰乳;FE.白菜花器提取液。

椰乳和白菜花器提取液处理获得的种子数均高于不添加任何有机物(CK)处理,其中以白

菜花器提取液和水解酪蛋白处理效果最佳。这一结果说明,在 W-2 培养基里添加水解酪蛋白、椰乳、白菜花器提取液有利于白菜×白芥杂种种子的生产,但这些有机物并非杂种生产的必要条件,这与前人研究结果一致^[2]。比较 3 种有机物效果,以白菜花器提取液和水解酪蛋白更好。

3 讨 论

Inomata^[3]在进行小白菜与羽衣甘蓝的种间杂种子房培养时,对 White, Heller, Nitsch 和 MS 等 4 种培养基对杂种子房发育的影响进行了研究,结果表明,MS 培养基上杂种胚的形成率比其他培养基高,杂种获得率也高,在没有微量元素的 White 培养基上也能形成杂种^[3]。然而,梁红等进行的白菜与甘蓝的种间杂种子房培养^[9], Bajaj *et al*^[10]进行的 *Brassica napus* 和 *B. juncea* 的种间杂种子房培养,都在 White 培养基上获得了良好的效果。本试验表明,供试的 4 种培养基,白菜与白芥属间杂种子房在 White 培养基上发育最长,平均每角果种子数最多,其杂种发芽率也最高。上述研究结果是否说明,芸苔属不同作物种间或与其近缘属间的杂种子房培养适宜的培养基是有差异的。进一步分析不同培养基中 NO_3^- 含量不难看出,白菜×白芥杂种子房的发育及杂种种子的形成,以 NO_3^- 含量低的 White 培养基(275.6 mg/L)为适,而 NO_3^- 含量高的 MS(2439.3 mg/L), Nitsch(454.3 mg/L)和 Heller(437.7 mg/L)不利于杂种子房的发育和种子的形成。

蔗糖是芸苔属作物种间及近缘属间杂种子房培养中应用最多、效果最为理想的碳水化合物。在杂种子房培养中,关于适宜的蔗糖浓度的报道很不一致。一些学者^[11~14]对芸苔属与萝卜属杂种子房培养、白菜子房培养、白菜与甘蓝杂种子房培养技术研究认为,适宜的蔗糖浓度范围为 8~130 g/L。本试验表明,白菜×白芥杂种子房培养的适宜蔗糖浓度超过 100 g/L 则会明显降低杂种种子产量,175~200 g/L 的蔗糖浓度对白菜×白芥杂种种子的形成有抑制作用。这一试验结果和 Inomata 在白菜与甘蓝杂种子房培养上的结论不一致,可能是由于不同作物之间的远缘杂种子房对蔗糖浓度的敏感性不同造成的。

在芸苔属种间及近缘属间杂种子房培养中,许多学者^[2~5]都采用 300 mg/L 的水解酪蛋白。Inomata^[7]在进行白菜与甘蓝杂种子房培养中,关于有机添加物试验表明,在 White 培养中添加 20% 椰乳和 500 mg/L 的水解酪蛋白有利于提高杂种生产率。由此可见,有机添加物,尤其是水解酪蛋白对于杂种的形成和发育是十分有利的。本试验也表明,水解酪蛋白和白菜花器提取液能明显促进白菜×白芥杂种子房的发育及杂种的形成,且两种有机添加物具有同等的作用。这一结果说明,可用白菜花器提取液代替水解酪蛋白。白菜花器提取液取材容易,制作简单,经济方便,研究推广这一天然有机添加物,对于降低杂种子房培养成本,提高杂种产量具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Inomata N. Production of interspecific hybrids in *Brassica campestris* × *B. oleracea* by culture *in vitro* of excised ovaries I Development of excised ovaries in the crosser of various cultivars. *Japan J Genetics*, 1978, 53: 161~173
- 2 Inomata N. Production of interspecific hybrids between *Brassica campestris* and *Brassica oleracea* by culture *in vitro* of excised ovaries I. Effects of coconut milk and dasein hybrolysate on the development of excised ovaries. *Japan J Genetics*, 1978, 53(1): 1~11

- 3 Inomata N. Production of interspecific hybrids in *Brassica campestris* × *B. oleracea* by culture *in vitro* of excised ovaries. I. Development of excised ovaries on various culture media. *Japan J Breed*, 1979, 29(2): 115~120
- 4 Sarashima M. Intergeneric hybridization between radish and two monogenomic species of *Brassica* (*B. campestris* and *B. nigra*). Bulletin of the college of Agriculture, *Utsunomiya University*, 1989, 14(1): 99~104
- 5 Takahata Y. Intergeneric hybridization between *Moricandia arvensis* and *Brassica* A and B genome species by ovary culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 1990, 80(1): 38~42
- 6 Tang K. A comparison of ovary, ovule and embryo culture in producing hybrids from wide crosses among rapid cycling *Brassica* species and *Raphanus*. *Cruciferae Newsletter*, 1988, 13: 82
- 7 Yadav R C. Interspecific hybridization in *Brassica Juncea* × *B. tournefortii* using ovary culture. *Cruciferae Newsletter*, 1991, 14/15: 84
- 8 巩振辉, 何玉科, 王鸣. 白菜与白芥属间花粉-柱头相互作用的研究. 西北农业学报, 1994, 3(1): 35~38
- 9 梁红, 冯午. 白菜与甘蓝的种间杂交及其杂种后代的研究. 园艺学报, 1990, 17(3): 203~210
- 10 Bajaj Y P S, Mahajan S K, Labana K S. Interspecific hybridization of *Brassica napus* and *B. juncea* through ovary, ovule and embryo culture. *Euphytica*, 1986, 35: 103~109
- 11 程光潮译. 胚珠培养用于培养芸苔属与萝卜属的属间或种间杂种. 国外遗传育种, 1986, 6: 34~36
- 12 Inomata N. Culture *in vitro* of excised ovaries in *Brassica campestris* L. I. Development of excised ovaries in culture media, temperature and light. *Japan J Breed*, 1986, 26: 229~236
- 13 Inomata N. New interspecific hybrids between *B. campestris* and *B. oleracea* by ovary culture *in vitro*. *Cruciferae Eucarpia Newsletter*, 1983, 8: 18~19
- 14 Inomata N. Intergeneric hybridization in *Brassica juncea* × *Sinapis pubescens* and *B. napus* × *S. pubescens* and their cytological studies. *Cruciferae Newsletter*, 1991, 14/15: 10~11

Effect of Culture Medium on the Development of Excised Hybrid Ovaries between *Brassica campestris* and *Sinapis alba*

Gong Zhenhui He Yuke Wang Ming Wang Xiaofeng

(Department of Horticulture, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract Three different results of the excised hybrid ovaries from the best to the worst were obtained on the White's mineral, the Heller's mineral and the Nitsch's mineral as well as the Murashige and Skoog's mineral, respectively. Modified White's vitamins added on the tested culture media could accelerate the development of the excised ovaries and the hybrid seeds distinctively. The modified White's vitamins plus biotin could further accelerate the function of the modified White's vitamins. However, the modified White's vitamins plus myo-inositol or pantothenate could lower the function of the modified white's vitamins on the development of the excised ovaries. Sucrose concentration extent was 25~150 g/L for the growth and development of the excised ovaries. The effect of the extraction solution from Chinese cabbage flower organ (500 ml/L) or casein hydrolysate (300 mg/L) in the medium on the development of the excised ovaries was favourable, but not indispensable in culture *in vitro* of the excised ovaries.

Key words Chinese cabbage, white mustard, distant hybridization, excised ovary culture