

网络出版时间:2013-12-25 11:05

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.01.017

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.01.017.html

株龄、栽培环境及温度对甘蓝小孢子 诱导出胚的影响

张恩慧¹,程芳芳¹,杨安平²,程永安¹,许忠民¹,马青山¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100;2 杨凌职业技术学院 生物工程系,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】研究甘蓝小孢子供体植株的株龄、栽培环境以及环境温度对胚产量的影响,为提高甘蓝小孢子胚产量提供参考。【方法】以 12 个甘蓝品种为试材,从露地栽培的成株与半成株,栽培于温室与露地的同一品种成株及温室栽培采用 24,28,32 ℃处理的甘蓝成株上采摘花蕾,分析其游离小孢子的胚产量,比较 3 种因素对甘蓝小孢子诱导出胚的影响。【结果】甘蓝半成株花蕾品质优于成株,其花蕾小孢子胚产量为 16.8~30.3 胚/蕾,高出成株 9.6~18.7 胚/蕾;温室栽培有利于甘蓝植株生长,其胚产量为 3.27~33.84 胚/蕾,比露地栽培高 0.69~15.16 胚/蕾;温室最高气温 28 ℃处理有利于甘蓝小孢子诱导出胚,胚产量最高,为 31.1 胚/蕾。【结论】甘蓝半成株于温室 28 ℃下生长时,其花蕾小孢子能够获得较高的胚产量。

【关键词】 甘蓝;露地栽培;温室栽培;环境温度;株龄;小孢子;胚状体

【中图分类号】 S635.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)01-0120-05

Influence of plant age, cultivation environment and temperature on cabbage embryo induction by isolated microspore culture

ZHANG En-hui¹, CHENG Fang-fang¹, YANG An-ping², CHENG Yong-an¹,
XU Zhong-min¹, MA Qing-shan¹

(1 College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Department of Biological Engineering, Yangling Vocational & Technical College, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This study investigated the effects of plant age, cultivation environment and temperature on the embryo induction rate. 【Method】 12 cabbage varieties were taken as experimental materials. Buds were picked from adult and semi-adult cabbages in open field, same adult cabbages in greenhouse and open field, and adult cabbages in greenhouses with temperatures of 24, 28, and 32 ℃. Their microspore embryo production was analyzed and the effects of plant age, cultivation environment and temperature were compared. 【Result】 The buds quality of semi-adult cabbages was better than that of adult cabbages. The embryo production rates of semi-adults were 16.8—30.3 embryo/bud, which were 9.6—18.7 embryo/bud higher than that of adult cabbages. Greenhouse cultivation benefited plant growth with the embryo production rates of 3.27—33.84 embryo/bud, which were 0.69—15.16 embryo/bud higher than that of open cultivation. Greenhouse with the highest temperature of 28 ℃ was the best for embryo production with a production rate of 31.1 embryo/bud. 【Conclusion】 Semi-adult cabbages planted in a greenhouse with the high-

【收稿日期】 2013-01-25

【基金项目】 国家大宗蔬菜产业技术体系项目(CARS-25-G-47);国家科技支撑计划项目(2012BAD02B01);陕西省教育厅科学研究项目(自然科学专项)(11JK0642);陕西省科学技术研究发展计划项目(2012K01-09-2);西北农林科技大学农业科技推广基金项目(NYY2012-9);杨凌职业技术学院科学研究基金项目(A2010014)

【作者简介】 张恩慧(1960—),男,陕西扶风人,教授,硕士生导师,主要从事甘蓝育种与生物技术研究。

E-mail: ganlan606@126.com

est temperature of 28 °C had the highest embryo production.

Key words: cabbage; open culture; greenhouse culture; environment temperature; plant age; microspore; embryoid

甘蓝是十字花科中一种重要的蔬菜作物。甘蓝小孢子培养是指利用花粉细胞的全能性,在特定的培养基上诱导培养花粉小孢子,促其发育成单倍体或双单倍体植株的一种育种技术。该技术近年来在国内外均有研究报道^[1-5],但小孢子诱导胚产量低和出胚材料基因型范围窄等诸多问题,严重地制约着甘蓝单倍体育种的进程。据研究报道,甘蓝小孢子诱导胚产量低受基因型、培养条件、糖浓度、花粉发育时期等诸多因素的影响^[6-11],但有关小孢子供体甘蓝生长环境温度或株龄影响的研究尚未见报道。同时,研究证实,植物的生长温度是小孢子培养成败的决定性因素,而且甘蓝株龄、栽培环境在一定程度上影响甘蓝花蕾的发育程度,进而影响到小孢子培养的效率^[12-13]。为此,本研究以 12 个甘蓝品种为试材,分析株龄、栽培环境及温度对甘蓝小孢子诱导出胚的影响,旨在为提高甘蓝小孢子胚产量提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为 Q2、Q4、Q5、碧实绿、万福、绿球 66、将军、QG65、F1-03、翠宝、HP57 和 HP20 等 12 个甘蓝品种,均由西北农林科技大学园艺学院甘蓝育种和生物技术研究室提供。

1.2 方法

1.2.1 不同株龄甘蓝植株的栽培 (1)成株栽培。2011-07-10 将具有 6 片真叶的 12 种供试甘蓝苗定植于大田,于 12-06 将已结球紧实的植株带根挖起移植于地窖假植越冬,翌年 03-10 取出移栽到露地纱网棚或温室内培养至抽薹显蕾。

(2)半成株栽培。2011-08-25 将 12 种供试甘蓝露地播种育苗,09-28 定植田间,冬前植株进入包球初期露地越冬,翌年 03-20 在半成株田上搭建纱网棚或与成株一起移栽到温室,培养至抽薹显蕾。

1.2.2 游离小孢子出胚诱导 在已抽薹的甘蓝植株上,选取小孢子发育处于单核靠边期的花蕾,游离出小孢子。参照朱守亮等^[14]和杨安平等^[15]的研究成果,将洗液 B5 培养基中的蔗糖质量分数设为 14%,小孢子热激培养和诱导培养的培养基 NLN 中的蔗糖质量分数设为 17%与 14%,转速为 1 500 r/min,进行游离小孢子的出胚诱导。

1.2.3 不同株龄甘蓝上花蕾小孢子出胚的比较

以 Q2、Q4 和 Q5 3 个甘蓝品种为试材,分别选取露地纱网棚内成株和半成株上的 4.0~5.8 mm 花蕾,倒置显微镜下观察确定小孢子发育时期,然后诱导培养小孢子,比较不同株龄甘蓝上花蕾发育同步性和胚产量。花蕾发育同步性是指相同长度的花蕾中小孢子所处的单核靠边期的一致性。依据单核靠边期小孢子所占比例(A),将其评判为很差($A \leq 65\%$)、较差($65\% < A \leq 70\%$)、较好($70\% < A \leq 75\%$)和很好($A > 75\%$)4 个层次。胚产量=胚状体数/花蕾数(下同)。

1.2.4 温室和露地栽培甘蓝花蕾小孢子出胚的比较 越冬后,选取供试 12 个甘蓝品种的成株,分 2 部分分别栽植于温室和露地纱网棚;抽薹显蕾后至花蕾生长到 4.0~5.8 mm 时选摘,并游离出小孢子诱导培养,比较露地和温室 2 种环境条件下花蕾小孢子的胚产量。

1.2.5 温度对甘蓝小孢子出胚的影响 选用在地窖中通过低温春化的甘蓝品种 Q4 成株为试材,将其栽植于加温温室中,当植株抽薹显蕾后,在采蕾前 2 d 的中午,将温室内温度设定为 24,28(CK),32 °C,培养植株花蕾生长,于第 3 天上午 10:00 选采 4.0~5.8 mm 花蕾,培养小孢子出胚,比较温度对甘蓝花蕾小孢子胚产量的影响。

2 结果与分析

2.1 株龄对甘蓝小孢子出胚的影响

由图 1 及表 1 可以看出,供试 Q2、Q4 和 Q5 3 个甘蓝品种的成株抽薹显蕾时间较晚,植株生长势弱,相同长度花蕾的小孢子单核靠边期同步性较差;适宜花蕾的持续取样时间为 11~13 d,其小孢子诱导胚产量为 7.2~11.6 胚/蕾。3 个甘蓝品种的半成株抽薹显蕾时间均较早,植株花枝健壮,花蕾饱满、小孢子发育同步性很好,适宜花蕾的持续取样时间达 14~18 d,其小孢子诱导胚产量为 16.8~30.3 胚/蕾。这些结果表明,甘蓝半成株上的花蕾品质优于成株花蕾,其花蕾小孢子诱导胚产量比成株高 9.6~18.7 胚/蕾。经方差分析可知,除 Q2 和 Q5 成株的小孢子诱导胚产量无显著差异外,其余处理的胚产量均存在极显著差异,且半成株的胚产量极

显著高于成株。由此可见,甘蓝半成株上花蕾比成株上花蕾更易诱导出胚状体。

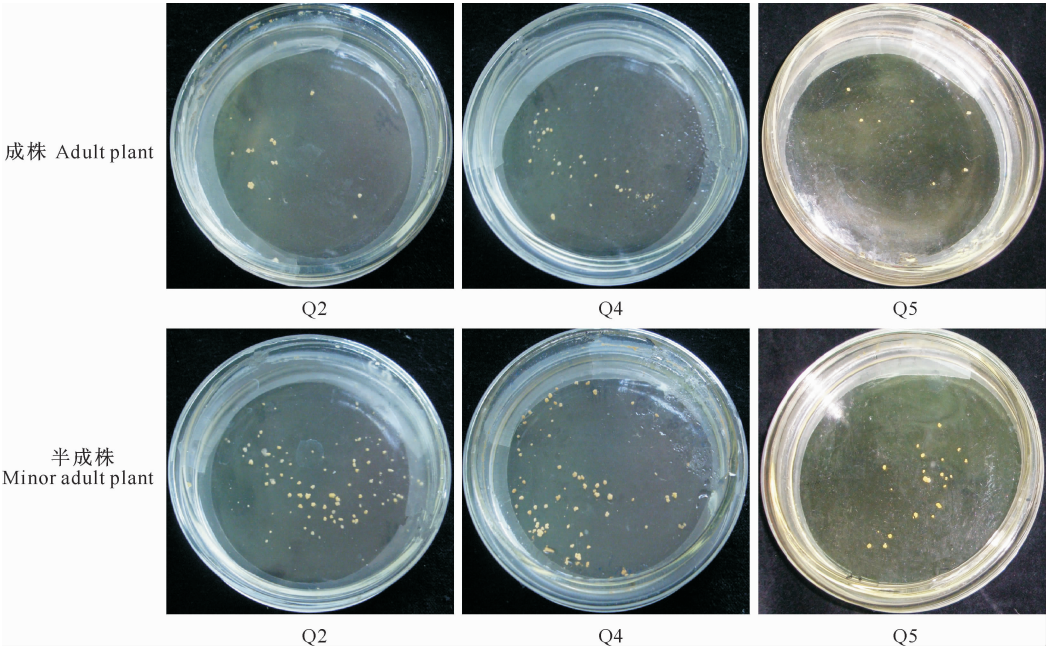


图 1 甘蓝成株和半成株上花蕾小孢子的诱导出胚效果
Fig. 1 Embryo induction results of buds from semi-adult and adult cabbages

表 1 株龄对甘蓝小孢子出胚的影响

Table 1 Influence of plant age on embryo induction

材料 Material	株龄 Plant age	显蕾日期 Bud showing date	适宜花蕾的 持续取样时间/d Suitable time for bud sampling	花蕾发育 同步性 Bud developing synchrotron	花蕾数 Number of buds	胚状体数 Total number of embryos	胚产量/ (胚·蕾 ⁻¹) Production of embryo
Q2	成株 Adult plant	04-06	11	较差 Poor	20	166	8.3 eE
	半成株 Minor adult plant	04-01	14	很好 Better	20	416	20.8 bB
Q4	成株 Adult plant	04-08	11	较好 Good	20	232	11.6 dD
	半成株 Minor adult plant	04-02	17	很好 Better	20	606	30.3 aA
Q5	成株 Adult plant	04-10	13	很差 Poorer	20	144	7.2 eE
	半成株 Minor adult plant	04-04	18	很好 Better	20	336	16.8 cC

注:根据 Duncan 测验,同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下表同。

Note: According to Duncan's test, different lowercase letters in same column indicate significant difference($P<0.05$), while different up-percase letters indicate extremely significant difference ($P<0.01$). The same below.

2.2 栽培环境对甘蓝小孢子出胚的影响

由表 2 可以看出,在露地和温室 2 种环境下生长的 12 个甘蓝品种,除 HP20、HP57 和翠宝外,其他 9 个品种的胚产量均表现为温室栽培高于露地栽培,差值为 0.69~15.16 胚/蕾,且除碧实绿外,其余 8 个甘蓝品种在温室与露地的小孢子胚产量均存在极显著差异。F1-03 在温室中的胚产量为 2.37 胚/蕾,露地中未见出胚。由此可见,温室栽培的甘蓝更有利于小孢子诱导出胚。

2.3 温度对甘蓝小孢子出胚的影响

小孢子供体植株生长的环境温度对小孢子的发育起着重要作用,温度过低或过高都会导致小孢子

发育不正常,从而影响小孢子的出胚情况。由图 2 及表 3 可以看出,24 或 32 ℃处理 2 d 的甘蓝 Q4 花蕾小孢子发育同步性差,适宜诱导培养的花蕾长度为 5.1~5.6 mm 或 4.5~4.8 mm;其小孢子诱导的胚产量均较少,分别为 11.8 和 23.2 胚/蕾。而 28 ℃处理 2 d 后,Q4 品种花蕾小孢子发育同步性最好,花蕾适宜长度为 4.9~5.1 mm,最大值和最小值仅相差 0.2 mm;其小孢子诱导出胚数最多,胚产量高达 31.1 胚/蕾,显著高于其他 2 个处理。由此可见,28 ℃环境温度下培养的甘蓝花蕾易游离出小孢子,有利于提高胚产量。

表 2 栽培环境对甘蓝小孢子出胚的影响

Table 2 Influence of growing environment on microspore embryo induction

材料 Material	温室栽培 Greenhouse culture			露地栽培 Open culture		
	花蕾数 Number of buds	胚状体数 Total number of embryos	胚产量/ (胚·蕾 ⁻¹) Production of embryo	花蕾数 Number of buds	胚状体数 Total number of embryos	胚产量/ (胚·蕾 ⁻¹) Production of embryo
万福 Wanfu	25	846	33.84 aA	30	743	24.77 bB
碧实绿 Bishilü	24	511	21.29 cC	40	824	20.60 cdC
Q4	32	665	20.78 cdC	24	327	13.63 fF
绿球 66 Lüqiu 66	30	587	19.57 dCD	28	364	13.0 fF
Q2	28	489	17.46 eDE	30	266	8.87 gG
QG65	45	783	17.40 eDE	25	56	2.24 ijkJ
将军 Jiangjun	28	370	13.21 fF	20	27	1.35 lkIJ
Q5	30	278	9.27 gG	24	138	5.75 hH
HP20	34	123	3.62 iI	22	354	16.09 eE
F1-03	26	85	3.27 ijI	40	0	0 lJ
HP57	25	46	1.84 jkJ	35	225	6.43 hH
翠宝 Cuibao	35	23	0.66 lkJ	34	105	3.09 ijI

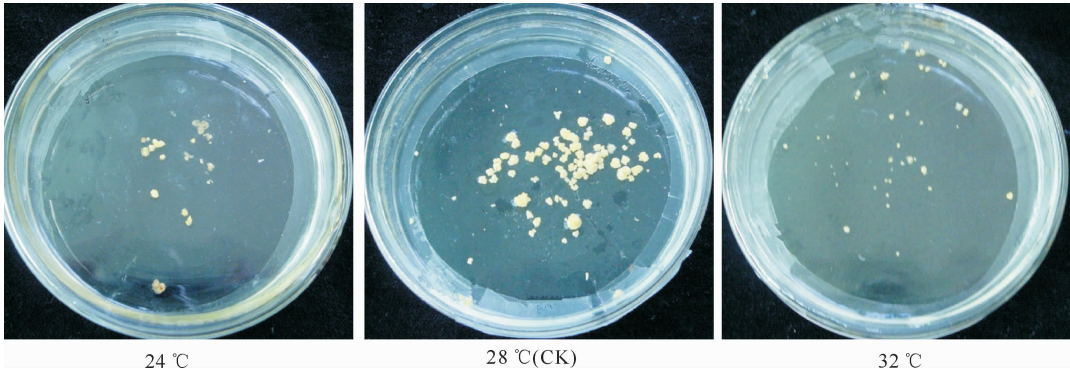


图 2 不同环境温度下甘蓝 Q4 小孢子诱导出胚的效果

Fig. 2 Embryo induction results of cabbage Q4 plant in greenhouses with different temperatures

表 3 环境温度对甘蓝 Q4 小孢子诱导出胚的影响

Table 3 Influence of environment temperature on embryo induction from microspore of cabbage Q4 plant

环境温度/℃ Environment temperature	采蕾长度/mm Appropriate length of bud	花蕾发育 同步性 Bud developing synchrontron	花蕾数 Number of buds	胚状体数 Total number of embryos	胚产量 (胚·蕾 ⁻¹) Production of embryo
24	5.1~5.6	较差 Poor	20	236	11.8 cC
28(CK)	4.9~5.1	很好 Better	20	621	31.1 aA
32	4.5~4.8	较好 Good	20	464	23.2 bB

3 结论与讨论

本研究结果表明,甘蓝成株和半成株均能作为游离小孢子的供体植株,且以半成株花蕾品质较好,表现为花蕾小孢子发育同步性高,胚产量达到16.8~30.3 胚/蕾,比成株高9.6~18.7 胚/蕾。成株和半成株的胚产量会有如此差异,是因为甘蓝植株的生长和发育状况会直接影响花蕾中小孢子的生长发育效果。一般而言,甘蓝成株已完全完成营养生长,转入生殖期会因营养期过长导致植株早衰,这可能引起花蕾小孢子发育同步性差、生长势弱,并导

致其小孢子产胚率低。

本研究发现,甘蓝植株生长在温室更易获得小孢子胚,其胚产量比露地栽培增加0.69~15.16 胚/蕾,这与花椰菜^[13]的表现一致。这是因为,甘蓝抽薹植株生长在相对恒定的栽培环境条件下,受外界自然因素如温度、湿度等影响较小,其植株生长健壮、生殖旺盛,花蕾小孢子生长发育同步性高,有利于小孢子培养,提高胚产量。

综上所述,甘蓝半成株较成株适宜作为游离小孢子培养的花蕾供体;甘蓝花蕾供体植株栽培于28℃温室中,花蕾小孢子诱导产生的胚状体数多,胚产

量高达 31.1 胚/蕾。

[参考文献]

- [1] 杨安平,张恩慧,王莎莎,等. 甘蓝类蔬菜小孢子培养研究进展 [J]. 中国农学通报,2008(7):332-335.
Yang A P,Zhang E H,Wang S S,et al. Research progress of *Brassica* vegetables microspore culture [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2008(7):332-335. (in Chinese)
- [2] 袁素霞,刘玉梅,方智远,等. 结球甘蓝和青花菜小孢子胚植株再生 [J]. 植物学报,2010,45(2):226-232.
Yuan S X,Liu Y M,Fang Z Y,et al. Plant regeneration from microspore-derived embryos in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) and broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) [J]. Chinese Bulletin of Botany,2010,45(2):226-232. (in Chinese)
- [3] Yuan S X,Su Y B,Liu Y M,et al. Effects of pH,MES,arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2012,110(1):69-76.
- [4] 姜凤英,冯 辉,李 娜,等. 甘蓝类植物游离小孢子培养研究进展 [J]. 辽宁农业科学,2006(5):28-30.
Jiang F Y,Feng H,Li N,et al. Research advance on isolated-microspore culture in cabbage vegetable [J]. Liaoning Agricultural Sciences,2006(5):28-30. (in Chinese)
- [5] 张恩慧,马英夏,杨安平,等. 甘蓝小孢子培养中花蕾长度与细胞单核期的关系 [J]. 西北农业学报,2012,21(6):124-128.
Zhang E H,Ma Y X,Yang A P,et al. Relationship between the length of buds and uninucleate stage of isolated microspore culture in cabbage [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,2012,21(6):124-128. (in Chinese)
- [6] 戴希刚,施雪萍,包满珠. 基因型与培养条件对羽衣甘蓝小孢子胚胎发生的影响 [J]. 植物生理学报,2012(11):1113-1119.
Dai X G,Shi X P,Bao M Z. Effects of genotype and culture condition on microspore embryogenesis of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) [J]. Plant Physiology Journal,2012(11):1113-1119. (in Chinese)
- [7] 桑玉芳,张恩慧,杨安平,等. 甘蓝游离小孢子培养中影响胚状体形成的主要因素 [J]. 西北农业学报,2007,16(2):125-129.
Sang Y F,Zhang E H,Yang A P,et al. Major factors of influence embryoid formation in cabbage isolated microspore culture [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,2007,16(2):125-129. (in Chinese)
- [8] 王超楠,闻凤英,刘晓晖,等. 球茎甘蓝小孢子培养中影响胚诱导的几个因素 [J]. 中国蔬菜,2010(10):35-39.
Wang C N,Wen F Y,Liu X H,et al. Several factors affecting embryoid induction from isolated microspore in kohlrabi (*Brassica oleracea* L. var. *caulorapa* DC.) [J]. China Vegetables,2010(10):35-39. (in Chinese)
- [9] 曾爱松,冯 翠,高 兵,等. 温度胁迫对结球甘蓝游离小孢子胚胎发生的影响 [J]. 江苏农业学报,2011,27(3):623-627.
Zeng A S,Feng C,Gao B,et al. Effect of temperature stress on isolated microspore embryogenesis in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences,2011,27(3):623-627. (in Chinese)
- [10] 毛忠良,张振超,姚悦梅,等. 羽衣甘蓝小孢子胚胎发生观察及再生植株倍性鉴定 [J]. 西北植物学报,2012,32(10):2016-2022.
Mao Z L,Zhang Z C,Yao Y M,et al. *In vitro* microspore embryogenesis and chromosome doubling of kale [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2012,32(10):2016-2022. (in Chinese)
- [11] Sato T,Nishio T,Hirai M. Plant regeneration from isolated microspore cultures of Chinese cabbage (*Brassica ampestris* ssp. *Pekinensis*) [J]. Plant Cell Reports,1989(8):486-488.
- [12] Kasha K J,Simion E,Oro R,et al. Barley isolated microspore culture protocol [J]. Plant Cell-Tissue,2003(5):43-47.
- [13] 方淑桂,朱朝辉,曾小玲,等. 花椰菜游离小孢子培养及影响因素 [J]. 福建农业学报,2006,21(2):138-142.
Fang S G,Zhu Z H,Zeng X L,et al. Broccoli isolated microspore culture and its influence factors [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences,2006,21(2):138-142. (in Chinese)
- [14] 朱守亮,张恩慧,杨安平,等. 2 个甘蓝 F₁ 小孢子培养中高胚产量的诱导技术研究 [J]. 西北农业学报,2009,18(6):237-241.
Zhu S L,Zhang E H,Yang A P,et al. Technology study on improving the rate of embryo induction in microspore culture of two cabbage F₁ [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,2009,18(6):237-241. (in Chinese)
- [15] 杨安平,张恩慧,尚丽荣,等. 结球甘蓝 F₁、F₂、双交种及其亲本的游离小孢子胚胎发生能力分析 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2009,37(8):171-176.
Yang A P,Zhang E H,Shang L R,et al. Analysis on embryogenesis capability of isolated microspore from cabbage F₁,F₂, double hybrid and its parent [J]. Journal of Northwest A&F University:Natural Science Edition,2009,37(8):171-176. (in Chinese)