

网络出版时间:2015-05-11 15:03

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.06.017

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150511.1503.017.html

# 甘蓝小孢子单倍体植株加倍技术探讨

程芳芳<sup>1</sup>,张恩慧<sup>1</sup>,杨安平<sup>2</sup>,程永安<sup>1</sup>,许忠民<sup>1</sup>,董 韩<sup>1</sup>,霍柳青<sup>1</sup>

(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】**比较甘蓝单倍体植株(H 植株)茎生叶及其愈伤组织的秋水碱处理时间及愈伤组织大小对再生植株加倍效果的影响,筛选加倍效果最佳的秋水碱处理时间与合适的外植体,为扩大甘蓝小孢子双单倍体植株(DH 株)群体及提高甘蓝小孢子培养效率奠定基础。**【方法】**以 3 个甘蓝 H 植株(H10-23,H10-3 和 H10-5)的茎生叶为试材,用 2.0 mg/L 秋水碱溶液浸泡处理 H 植株叶片外植体及其愈伤组织以获得再生 DH 植株,设置 15,30 和 60 h 3 个处理时间,比较分析秋水碱处理叶片外植体和愈伤组织的时间对加倍效果的影响;同时用 2.0 mg/L 秋水碱溶液处理大(直径 $\geq 1$  cm)、中(1 cm $>$ 直径 $\geq 0.5$  cm)、小(直径 $< 0.5$  cm)3 种类型的愈伤组织 30 h,比较愈伤组织大小对加倍效果的影响。**【结果】**2.0 mg/L 秋水碱处理甘蓝单倍体植株叶片外植体 30 h,可获得 44.80% 的平均再生 DH 株加倍率;2.0 mg/L 秋水碱处理愈伤组织 30 h,可获得 58.13% 的平均再生 DH 株加倍率;2.0 mg/L 秋水碱处理中等大小的愈伤组织 30 h,可获得 51.11% 的再生 DH 株加倍率。**【结论】**用 2.0 mg/L 秋水碱处理甘蓝 H 植株茎生叶及其愈伤组织 30 h,可获得较高比例的 DH 株。

**[关键词]** 秋水仙素;DH 株;愈伤组织;单倍体;甘蓝;叶片再生;加倍技术

**[中图分类号]** S635.103.6

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2015)06-0167-07

## Technology discussion of doubling cabbage haploid plants

CHENG Fang-fang<sup>1</sup>,ZHANG En-hui<sup>1</sup>,YANG An-ping<sup>2</sup>,CHENG Yong-an<sup>1</sup>,  
XU Zhong-min<sup>1</sup>,DONG Han<sup>1</sup>,HUO Liu-qing<sup>1</sup>

(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 effect of colchicine treatment time of cauline leaves in cabbage haploid plants(H plants) and size of callus in colchicine on doubling effect of regenerated plants to screen the optimal treatment time and the suitable explants for expanding cabbage double haploid plants (DH plants) groups and improving culturing efficiency of cabbage microspore. **【Method】**Using cauline leaves of three H plants (H10-23,H10-3 and H10-5) as test materials,2.0 mg/L colchicines was used to treat leaf explants of H plants and callus to obtain regenerated DH plants. Three treatment time periods (15 h,30 h and 60 h) and 3 types of callus (large callus with diameter of larger than 1 cm,medium with diameter of larger than 0.5 cm and less than 1 cm, and small with diameter of less than 0.5 cm) with treatment time of 30 h were tested. **【Result】**Average double rates of DH plants by treating the explant of cabbage leaf blade,callus and medium callus in 2.0 mg/L colchicine for 30 h were 44.80%,58.13% and

**[收稿日期]** 2013-12-20

**[基金项目]** 国家科技支撑计划项目(2012BAD02B01);西北农林科技大学农业科技推广基金项目(NYY2012-10);陕西省科学技术研究发展计划项目(2012NKC02-05,2012KTCL02-09);杨凌职业技术学院科学研究基金项目(A2010014);陕西省教育厅科学研究项目(自然科学专项)(11JK0642)

**[作者简介]** 程芳芳(1988—),女,山西长治人,在读硕士,主要从事甘蓝生物技术研究。E-mail:215797704@qq.com

**[通信作者]** 张恩慧(1960—),男,陕西扶风人,教授,硕士,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

51.11%, respectively. 【Conclusion】 Cauline leaf of cabbage H plants and its callus soaked in 2.0 mg/L colchicine for 30 h had high DH plant ratio.

**Key words:** colchicine; DH plants; callus; haploid; cabbage; leaf regeneration; double technology

甘蓝小孢子培养技术正逐步趋于完善,其将成为未来甘蓝育种的主要途径。一般而言,在植物界由小孢子胚形成的再生植株群体中,仅有 10%~50%可自然加倍形成双单倍体植株<sup>[1-3]</sup>,但有相当一部分单倍体植株(Haploid plants,简称 H 植株)不能自然加倍成为双单倍体植株(Double haploid plants,简称 DH 株),使其不能正常开花结籽和配制杂交种,达不到育种需求,因此国内外研究者均致力于植物单倍体加倍技术研究。目前常用的加倍方法有物理、化学诱导法和体细胞融合法及遗传转化法等,这几种方法相比较,化学诱导方法效果好、嵌合率低且操作简单,是目前植株加倍最常用的方法<sup>[4-5]</sup>。化学诱导通常使用的诱导剂有秋碱、植物激素和特殊除草剂等<sup>[6-8]</sup>。根据化学诱导剂的处理部位,可以分为活体诱导和离体诱导;活体诱导通常是在种子或植株生长点浸泡或涂抹加倍染色体的试剂,进一步诱导发育成二倍体或多倍体;而离体诱导的处理部位是细胞或组织,离体诱导染色体加倍的试验条件比较容易控制,嵌合体诱导率较低,因此近年来利用组织培养方法离体诱导多倍体逐渐受到重视。

目前,有关十字花科蔬菜单倍体染色体加倍方法的研究,国内外报道的主要有物理诱导和化学诱导 2 种方法,且普遍采用秋碱染色体加倍技术,包括秋碱浸根、注射或涂塞顶芽和腋芽、离体培养加倍等<sup>[9-11]</sup>。对于甘蓝小孢子的单倍体加倍研究,采用向小孢子热激培养基中添加秋碱的方法,可使其加倍率高达 82%<sup>[12]</sup>。从甘蓝育种应用上考虑,热激培养添加秋碱虽能获得较高的双单倍体比率,但还存在一定数量的 H 植株。为了充分利用再生单倍体植株,研究其加倍技术显得极为迫切。基于此目的,本研究拟在借鉴前人单倍体加倍技术研究的基础上,探索以甘蓝小孢子 H 植株茎生叶作为外植体,通过秋碱处理外植体和离体培养的方法加倍单倍体,旨在寻找一种新的甘蓝 H 植株加倍方法,为高效利用小孢子再生苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料代码为 H10-23、H10-3 和 H10-5,是

通过甘蓝游离小孢子培养获得的再生苗中经田间花期形态鉴定的 H 植株,由西北农林科技大学园艺学院甘蓝育种研究室提供。

### 1.2 方法

1.2.1 小孢子再生苗的栽培与倍性鉴定 2011-08,对 3 个不同甘蓝 F1 品种通过花蕾培养获得再生苗,于 2011-10 定植于塑料大棚;2012-04,当小孢子再生植株抽薹开花后,通过植株形态学和花器结构鉴定倍性,标记 H 植株。

1.2.2 H 植株叶片的采集 选择供试 H 植株的茎生幼嫩叶片,由叶柄处剪下放入冰盒带回室内。随后对叶片用体积分数 70%酒精消毒 30 s,再用 1 g/L 升汞消毒 8 min,无菌水冲洗后将叶片切成 1 cm 见方的小方块作为外植体。

1.2.3 外植体秋碱处理 (1)外植体处理时间与再生。以 H10-23、H10-3 和 H10-5 的茎生叶为外植体,将其浸泡在 2.0 mg/L 的秋碱(0047, Sanland Chemical)溶液中,设置 15, 30 和 60 h 等 3 个浸泡时间处理外植体。随后将其接种在 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+琼脂 8 g/L+蔗糖 30 g/L 的不定芽分化培养基上,在温度(25±1)℃、光照时间 16 h/d、光强 2 000 lx 的条件下培养。待不定芽长到一定高度时转接至生根培养基 MS+NAA 0.3 mg/L+琼脂 8 g/L+蔗糖 30 g/L 上培养再生植株。当再生植株长出 4 片真叶时进行移栽,通过田间倍性鉴定比较秋碱浸泡时间对 H 植株的加倍效果。

(2)秋碱处理时间对愈伤组织加倍效果的影响。用 2.0 mg/L 秋碱对 H10-3 和 H10-5 中等大小(0.5 cm≤直径<1.0 cm)的愈伤组织分别处理 15, 30 和 60 h,然后接种到不定芽分化和生根培养基上诱导再生植株。当再生植株长出 4 片真叶时进行移栽,通过田间倍性鉴定比较秋碱处理时间对愈伤组织加倍效果的影响。

(3)外植体产生愈伤大小的处理与再生。将 H10-5 的茎生叶作为外植体接种到不定芽分化培养基上进行诱导培养,待长出愈伤后,将其按直径(D)分为大(D≥1.0 cm)、中(0.5 cm≤D<1.0 cm)、小(D<0.5 cm)3 种类型。选用 2.0 mg/L 秋碱浸泡处理 3 种类型愈伤组织 30 h,随后转至不定芽分化和生根培养基上诱导再生植株。当再生植株长出 4

片真叶时,移栽并通过田间倍性鉴定比较愈伤组织大小对加倍效果的影响。

1.2.4 倍性鉴定 倍性鉴定采用再生植株生殖生长期植株形态学观察与气孔保卫细胞叶绿体计数<sup>[12-14]</sup>相结合的方法进行。在再生植株开花期观察记录每个植株的主要形态学特征,包括植株的形态大小、生长势、花器官大小和花粉形态,以此鉴定倍性。当植株表现生长势相对较弱、个体较小、花蕾小而瘪、花小、无雄蕊或雄蕊发育不正常、无花粉时,即为 H 植株;当植株表现为生长健壮、与正常二倍体表现相同、雄蕊和雌蕊发育均正常、有花粉时,即为 DH 株;当植株表现为植株生长势强、个体大,花蕾和花大时,不管有或无花粉,即为多倍体。在再生植株花期形态学鉴定的同时,对气孔保卫细胞叶绿体数进行镜检,根据袁素霞等<sup>[14]</sup>的研究方法鉴定倍

性。

1.2.5 数据统计与分析 所得数据采用 SAS(Statistical Analysis System) 8.1 软件进行差异显著性分析与 Duncan's 多重比较分析。计算公式为:

白化率=(白化数/接种外植体数)×100%;

褐化率=(褐化数/接种数)×100%;

DH 株加倍率=(再生 DH 株株数/再生植株总数)×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 秋碱处理时间对甘蓝叶片外植体加倍效果的影响

图 1 表明,通过 2.0 mg/L 秋碱处理,能够促使甘蓝小孢子 H 植株茎生叶离体培养再生的植株部分加倍产生 DH 株。

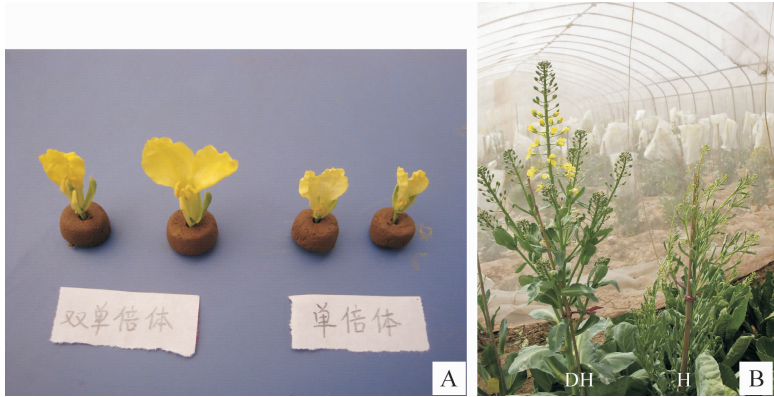


图 1 甘蓝双单倍体(DH)与单倍体(H)的花器与植株形态

A. 甘蓝双单倍体(左)与单倍体(右)花器形态;B. 甘蓝双单倍体(左)与单倍体(右)植株形态

Fig. 1 Floral organs and plants of double haploid (DH) and haploid (H) of cabbage

A. Floral organs in double haploid (left) and haploid (right) of cabbage;

B. Plants in double haploid (left) and haploid (right) of cabbage

由表 1 可知,秋碱处理不同时间对外植体再生植株的加倍效果不同,处理 15 h 时,3 种试材的 DH 株加倍率平均为 39.36%,比对照高出 32.55%,其中 H10-3 材料的加倍率最高,为 41.18%;处理 30 h 时,3 种试材的 DH 株加倍率平均为 44.80%,比对照高出 37.99%,其中 H10-3 的加倍率仍最高,为 57.14%;处理 60 h 时,3 种试材的 DH 株加倍率平均为 47.37%,比对照高出 40.56%,其中 H10-5 的加倍率最高,为 56.0%。经秋碱处理的叶片外植体再生植株中,DH 株加倍率均高于对照,并呈现出极显著差异;秋碱处理时间中,加倍率最高的为 60 h,30 h 次之。3 种试材间再生 DH 株加倍率也存在差异,H10-3 处理 30 h 的加倍效果较好,H10-23 和 H10-5 处理 60 h 的加倍效果较好;但秋碱处理时间

过长,易导致外植体发生严重白化或褐化现象,影响再生植株数量。由此可知,秋碱处理叶片外植体能够促使细胞染色体加倍,并可以获得再生加倍的植株,秋碱浸泡叶片外植体 30 h 培养再生植株的 DH 株加倍效果较好。

### 2.2 秋碱处理时间对甘蓝愈伤组织加倍效果的影响

由表 2 可知,秋碱作用时间对愈伤组织再生植株的加倍效果有极显著影响。未经秋碱处理的愈伤组织中,H10-5 和 H10-3 2 种材料的再生植株总数为 48 株,DH 株加倍率为 6.09%;秋碱浸泡 15 h 时,2 种材料的再生植株总数为 33 株,DH 株加倍率为 46.06%;处理 30 h 时,2 种材料的再生植株总数为 47 株,DH 株加倍率为 58.13%;处理 60 h 时,2

种材料的再生植株总数为 43 株,DH 株加倍率为 44.23%。方差分析表明,秋碱处理愈伤组织不同时间所获得的再生 DH 株加倍率存在一定差异,其中以浸泡 30 h 处理的加倍率极显著高于其他处理。秋碱处理愈伤组织同时可诱导出多倍体再生植株,H10-5 和 H10-3 浸泡 60 h 的再生植株中三倍体植

株(图 2-A)分别有 4 株和 2 株,四倍体植株(图 2-B)分别有 5 株和 2 株,其三倍体或四倍体植株数均较其他处理高出 1~5 株。秋碱浸泡 60 h 易导致白化和褐化现象严重发生。由此得出,秋碱加倍处理甘蓝愈伤组织 30 h 的加倍效果较好,愈伤组织发生白化和褐化的比例较低,DH 株加倍率最高。

表 1 秋碱处理时间对甘蓝叶片外植体加倍效果的影响

| Table 1 Influence of treatment time of cabbage leaf explants in colchicine on doubling effect |                                  |                                           |                         |                           |                                                     |                                        |                                         |                                       |                                         |                                                 |                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 秋碱处理<br>时间/h<br>Colchicine<br>treatment<br>time                                               | 供试<br>材料<br>Selected<br>material | 接种数<br>Number<br>of<br>inoculated<br>leaf | 白化率/%<br>Albino<br>rate | 褐化率/%<br>Browning<br>rate | 再生植<br>株数<br>Number<br>of<br>regeneration<br>plants | 加倍效果 Doubling effect                   |                                         |                                       |                                         |                                                 |                                          |
|                                                                                               |                                  |                                           |                         |                           |                                                     | H 植株<br>株数<br>Number<br>of H<br>plants | DH 株<br>株数<br>Number<br>of DH<br>plants | 三倍体<br>株数<br>Number<br>of<br>triploid | 四倍体<br>株数<br>Number<br>of<br>tetraploid | DH 株<br>加倍率/%<br>Double<br>rate of<br>DH plants | 平均加<br>倍率/%<br>Average<br>double<br>rate |
| CK                                                                                            | H10-23                           | 35                                        | 0 F                     | 11.43 gF                  | 33                                                  | 30                                     | 3                                       | 0                                     | 0                                       | 10.00 gF                                        | 6.81 bB                                  |
|                                                                                               | H10-3                            | 35                                        | 0 F                     | 5.71 hG                   | 25                                                  | 22                                     | 2                                       | 1                                     | 0                                       | 8.00 gF                                         |                                          |
|                                                                                               | H10-5                            | 35                                        | 0 F                     | 17.14 fE                  | 41                                                  | 38                                     | 1                                       | 1                                     | 1                                       | 2.43 hG                                         |                                          |
| 15                                                                                            | H10-23                           | 35                                        | 0 F                     | 22.86 eD                  | 22                                                  | 12                                     | 9                                       | 1                                     | 0                                       | 40.91 dC                                        | 39.36 aA                                 |
|                                                                                               | H10-3                            | 35                                        | 5.71 D                  | 22.86 eD                  | 17                                                  | 9                                      | 7                                       | 1                                     | 0                                       | 41.18 dC                                        |                                          |
|                                                                                               | H10-5                            | 35                                        | 2.86 E                  | 25.71 dCD                 | 25                                                  | 14                                     | 9                                       | 0                                     | 2                                       | 36.00 eD                                        |                                          |
| 30                                                                                            | H10-23                           | 35                                        | 2.86 E                  | 25.71 dCD                 | 22                                                  | 14                                     | 6                                       | 2                                     | 0                                       | 27.27 fE                                        | 44.80 aA                                 |
|                                                                                               | H10-3                            | 35                                        | 8.57 C                  | 28.57 cC                  | 7                                                   | 2                                      | 4                                       | 0                                     | 1                                       | 57.14 aA                                        |                                          |
|                                                                                               | H10-5                            | 35                                        | 11.43 B                 | 28.57 cC                  | 26                                                  | 11                                     | 13                                      | 0                                     | 2                                       | 50.00 bB                                        |                                          |
| 60                                                                                            | H10-23                           | 35                                        | 5.71 D                  | 28.57 cC                  | 18                                                  | 8                                      | 8                                       | 1                                     | 1                                       | 44.44 cC                                        | 47.37 aA                                 |
|                                                                                               | H10-3                            | 35                                        | 14.29 A                 | 57.14 aA                  | 12                                                  | 4                                      | 5                                       | 3                                     | 0                                       | 41.67 dC                                        |                                          |
|                                                                                               | H10-5                            | 35                                        | 11.43 B                 | 34.29 bB                  | 25                                                  | 7                                      | 14                                      | 2                                     | 2                                       | 56.00 aA                                        |                                          |

注:同列数据后标不同小写字母表示差异达到显著水平( $P<0.05$ ),标不同大写字母表示差异达到极显著水平( $P<0.01$ )。下表同。  
Note: Different lowercase letters in each column indicate significant difference ( $P<0.05$ ), and different uppercase letters indicate extremely significant difference ( $P<0.01$ ). The same below.

表 2 秋碱处理时间对甘蓝愈伤组织加倍效果的影响

| Table 2 Influence of colchicine treatment time on doubling effect of cabbage callus |                                  |                                                   |                         |                           |                                                 |                                           |                                         |                                       |                                         |                                                 |                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 秋碱处理<br>时间/h<br>Time of<br>callus in<br>colchicine                                  | 供试<br>材料<br>Selected<br>material | 处理<br>愈伤数<br>Number<br>of<br>inoculated<br>callus | 白化率/%<br>Albino<br>rate | 褐化率/%<br>Browning<br>rate | 再生植株数<br>Number<br>of<br>regeneration<br>plants | 加倍效果 Doubling effect                      |                                         |                                       |                                         |                                                 |                                          |
|                                                                                     |                                  |                                                   |                         |                           |                                                 | H 植株<br>株数<br>Number<br>of<br>H<br>plants | DH 株<br>株数<br>Number<br>of DH<br>plants | 三倍体<br>株数<br>Number<br>of<br>triploid | 四倍体<br>株数<br>Number<br>of<br>tetraploid | DH 株<br>加倍率/%<br>Double<br>rate of<br>DH plants | 平均加<br>倍率/%<br>Average<br>double<br>rate |
| CK                                                                                  | H10-3                            | 35                                                | 0 E                     | 14.29 gE                  | 27                                              | 26                                        | 2                                       | 0                                     | 0                                       | 7.41 F                                          | 6.09 cC                                  |
|                                                                                     | H10-5                            | 35                                                | 0 E                     | 8.57 hF                   | 21                                              | 19                                        | 1                                       | 1                                     | 0                                       | 4.76 G                                          |                                          |
| 15                                                                                  | H10-3                            | 35                                                | 2.86 D                  | 34.28 dC                  | 14                                              | 6                                         | 7                                       | 1                                     | 0                                       | 50.00 C                                         | 46.06 bB                                 |
|                                                                                     | H10-5                            | 35                                                | 2.86 D                  | 25.71 eD                  | 19                                              | 9                                         | 8                                       | 2                                     | 0                                       | 42.11 D                                         |                                          |
| 30                                                                                  | H10-3                            | 35                                                | 5.71 C                  | 37.14 cC                  | 15                                              | 4                                         | 9                                       | 1                                     | 1                                       | 60.00 A                                         | 58.13 aA                                 |
|                                                                                     | H10-5                            | 35                                                | 2.86 D                  | 28.57 fD                  | 32                                              | 8                                         | 18                                      | 2                                     | 3                                       | 56.25 B                                         |                                          |
| 60                                                                                  | H10-3                            | 35                                                | 8.57 B                  | 65.71 aA                  | 13                                              | 4                                         | 5                                       | 2                                     | 2                                       | 38.46 E                                         | 44.23 bB                                 |
|                                                                                     | H10-5                            | 35                                                | 11.43 A                 | 57.14 bB                  | 30                                              | 6                                         | 15                                      | 4                                     | 5                                       | 50.00 C                                         |                                          |

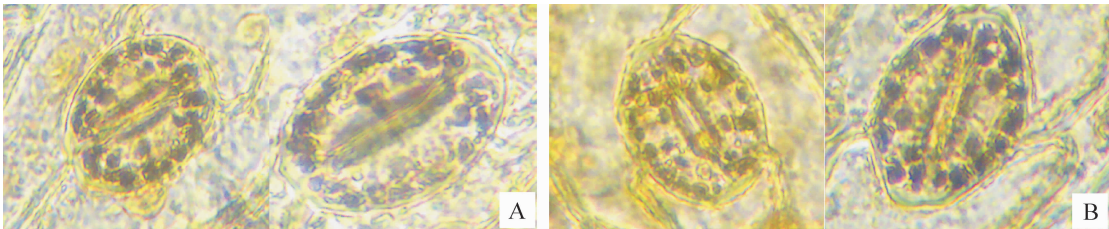


图 2 甘蓝三倍体与四倍体的气孔保卫细胞叶绿体  
A. H10-3(左)与 H10-5(右)三倍体;B. H10-3(左)与 H10-5(右)四倍体

Fig. 2 Chloroplast in stomatal guard cells of triploid and tetraploid cabbages

A. H10-3 (left) and H10-5 (right) triploid plants; B. H10-3 (left) and H10-5 (right) tetraploid plants

2.3 秋碱处理不同大小甘蓝愈伤组织对加倍效果的影响

从表 3 可以看出,甘蓝小孢子 H 植株叶片经培养诱导出的小块愈伤组织用秋碱处理后,再生植株数为 18 株,DH 株加倍率为 33.33%;中等大小愈伤组织经秋碱处理后,再生植株数为 45 株,DH 株加倍率为 51.11%;大块愈伤组织经秋碱处理后,再生植株数为 44 株,DH 株加倍率为 40.91%;表明不同大小的愈伤组织经秋碱处理后,其 DH 株加倍率存

在极显著差异,但以中等大小愈伤组织的加倍效果较好。秋碱处理大、中、小愈伤组织后诱导再生的植株中,褐化率和白化率分别为 40.00%和 2.86%,17.14%和 2.86%,11.43%和 8.57%,表明不同大小愈伤组织用秋碱处理后,小块愈伤组织易发生白化现象,大块愈伤组织易发生褐化现象。综上可知,中等大小的甘蓝愈伤组织是用秋碱加倍培养诱导再生 DH 株的适宜材料。

表 3 不同大小 H10-5 甘蓝愈伤组织经秋碱处理后对加倍效果的影响

| 愈伤组织大小<br>Callus size | 接种愈伤数<br>Number of inoculated callus | 白化率/%<br>Albino rate | 褐化率/%<br>Browning rate | 再生植株数<br>Number of regeneration plant | 加倍效果 Doubling effect         |                               |                             |                               |                                       |
|-----------------------|--------------------------------------|----------------------|------------------------|---------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
|                       |                                      |                      |                        |                                       | H 植株株数<br>Number of H plants | DH 植株株数<br>Number of DH plant | 三倍体株数<br>Number of triploid | 四倍体株数<br>Number of tetraploid | DH 株加倍率/%<br>Double rate of DH plants |
| 小 Small               | 35                                   | 8.57 A               | 11.43 C                | 18                                    | 11                           | 6                             | 0                           | 1                             | 33.33 C                               |
| 中 Medium              | 35                                   | 2.86 B               | 17.14 B                | 45                                    | 18                           | 23                            | 3                           | 1                             | 51.11 A                               |
| 大 Big                 | 35                                   | 2.86 B               | 40.00 A                | 44                                    | 20                           | 18                            | 3                           | 3                             | 40.91 B                               |

3 讨 论

在植物界,秋碱是一种常用的化学诱导加倍剂,在作物多倍体育种中主要用于细胞染色体加倍,其原理是秋碱能抑制细胞有丝分裂,使染色体停滞在分裂中期,促使染色体加倍。基于植物细胞具有全能性的原理,利用植物器官或组织作为外植体进行离体培养,采用秋碱诱导加倍染色体具有加倍效果好、嵌合率低等优越性。在离体加倍培养中,外植体的类型是影响加倍效果的主要因素之一,本试验选用甘蓝茎生叶及其愈伤组织作为离体加倍外植体加倍甘蓝小孢子 H 植株,均得到了较高的再生 DH 株加倍率,秋碱浸泡茎生叶再生 DH 株的加倍率为 39.36%~47.37%,浸泡愈伤组织再生 DH 株的加倍率为 33.33%~58.13%,这与前人将柿子<sup>[15]</sup>和草莓<sup>[16]</sup>离体叶片及罗汉果<sup>[17]</sup>和水稻幼穗<sup>[18]</sup>愈伤组织等放置在添加秋碱的培养基上离体培养的加倍效果具有一致性。本研究认为,甘蓝叶片及其愈伤组织均可作为离体加倍外植体,但二者之间的加倍效果存在差异,其原因可能是愈伤组织中接触秋碱易被加倍的分裂细胞数量多于叶片所致。

植物离体加倍培养研究中,在适宜质量浓度下,秋碱对加倍外植体的作用时间影响着再生植株的加倍效果,随着秋碱处理时间的延长,其再生植株倍性的加倍效果就越显著,同时秋碱对外植体的毒害作用也随之加剧,如引起外植体发生褐化。闫志刚等<sup>[17]</sup>对罗汉果愈伤组织进行离体加倍研究时发现,

用 2.0 g/L 秋碱处理 48 或 72 h 时愈伤组织全部死亡,而处理 24 h 时有 20.6%的愈伤组织可以正常生长,能获得 42.9%的诱变率;吴志刚等<sup>[19]</sup>对番茄同源四倍体离体诱导的研究表明,用 0.20%秋碱处理愈伤组织 24 h,再生植株诱变率为 12.5%,处理 48 h 为 50.0%,处理 72 h 为 50.0%,褐化率为 3.3%。本试验发现,用 2.0 mg/L 秋碱加倍甘蓝 H 株叶片及其愈伤组织,处理 30 h 较处理 15 或 60 h 的再生 DH 株加倍效果好。

对甘蓝 H 植株愈伤组织进行离体加倍培养时,其愈伤组织大小也是影响秋碱加倍效果的主要因素之一。在愈伤组织诱导加倍培养中,愈伤组织大小与其培养时间有关,培养时间越短,愈伤组织越小,分裂细胞数量越少,细胞代谢越弱;培养时间越长,愈伤组织越大,过早分化细胞的有毒代谢物积累越多,容易导致愈伤组织老化;因而过大的愈伤组织不易被秋碱加倍,过小的愈伤组织容易因秋碱对细胞的抑制作用而形成纺锤体,引起染色体加倍。本试验选择生长旺盛期的中等大小的愈伤组织用秋碱进行加倍离体培养,中等大小愈伤组织的加倍效果较大块和小块愈伤组织显著,试材 H10-5 中等大小愈伤组织获得的再生 DH 株数量较多,再生 DH 株加倍率高达 51.11%。

十字花科作物加倍育种中,秋碱浸根、注射或涂塞顶芽及培养基中添加秋碱离体培养幼苗等,均是常用的加倍方法。石淑稳等<sup>[11]</sup>在油菜单倍体加倍中利用秋碱浸根或浸芽等方法获得二倍体植株,最

高加倍率为 70.59%和 59.26%;张振超等<sup>[20]</sup>和徐丽娟等<sup>[21]</sup>在不结球白菜二倍体加倍中利用涂塞顶芽的方法获得四倍体植株,最高加倍率为 8.42%和 50.00%;李勤菲等<sup>[22]</sup>选择甘蓝型油菜小孢子单倍体、白菜型油菜与栽培甘蓝杂交产生的单倍体、埃塞俄比亚芥与白菜型油菜远缘杂交形成的单倍体等 3 种材料,利用向培养基中添加秋碱培养幼芽的方法获得的平均加倍率为 50.57%。本研究利用甘蓝叶片及其愈伤组织加倍 H 植株,与秋碱浸根、注射或涂塞顶芽及培养基添加秋碱离体培养幼苗等获得了同样的加倍效果,其再生 DH 株的最高加倍率分别为 57.14%和 60.0%,由此表明,用秋碱浸泡叶片和愈伤组织后进行离体培养,是甘蓝 H 植株加倍的一种可行方法。

## 4 结 论

对甘蓝 H 植株茎生叶及其愈伤组织进行秋碱处理是一种高效加倍 H 植株的方法。本研究发现,2.0 mg/L 秋碱处理甘蓝 H 植株叶片外植体 30 h,可获得 44.80%的平均再生 DH 株加倍率;2.0 mg/L 秋碱处理愈伤组织 30 h,可获得 58.13%的再生 DH 株平均加倍率;2.0 mg/L 秋碱处理 H10-5 材料中等大小的愈伤组织 30 h,可获得 51.11%的再生 DH 株加倍率,表明所用方法可用于加倍甘蓝 H 植株,扩大甘蓝再生 DH 植株群体和提高小孢子再生苗的利用效率。

## [参考文献]

[1] 李 梅,孙德岭,赵前程,等. 甘蓝类蔬菜游离小孢子培养研究回顾与展望 [J]. 天津农业科学,2004(1):41-44.  
Li M,Sun D L,Zhao Q C,et al. Retrospect and prospect of studies on isolated microspore cultured in cole crops [J]. Tianjin Agriculture Sciences,2004(1):41-44. (in Chinese)

[2] 曾爱松,宋立晓,高 兵,等. 结球甘蓝小孢子胚植株再生体系的优化 [J]. 江苏农业学报,2013(1):228-230.  
Zeng A S,Song L X,Gao B,et al. Optimization of plant regeneration system for microspore-derived embryos in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences,2013(1):228-230. (in Chinese)

[3] Soriano M,Cistue L,Valles M P,et al. Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2007, 91 (3):225-234.

[4] 王志敏,牛 义,宋 明,等. 多倍体诱导在蔬菜育种上的应用 [J]. 生物学杂志,2004,21(6):35-38.  
Wang Z M,Niu Y,Song M,et al. Advances on applications of ploidy induction in vegetable [J]. Journal of Biology,2004,21

(6):35-38. (in Chinese)

[5] 宗 红,陈运起,王秀峰,等. 蔬菜多倍体育种研究进展 [J]. 山东农业科学,2007(1):17-21.  
Zong H,Chen Y Q,Wang X F,et al. Research progress of polyploid breeding in vegetable [J]. Shandong Agricultural Sciences,2007(1):17-21. (in Chinese)

[6] Thao N T P,Ureshino K,Miyajima I,et al. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 72 (1):19-25.

[7] Saisingtong S,Schmid J E,Stamp P,et al. Colchicine-mediated chromosome doubling during anther culture of maize (*Zea mays* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics,1996,92(8):1017-1023.

[8] Zhao J P,Newcomb W,Simmonds D H,et al. High frequency production of doubled haploid plants of *Brassica napus* CV topas derived from colchicines-induced microspore embryogenesis without heat shock [J]. Plant Cell Reports, 1996, 15 (9): 668-671.

[9] 杨桂娟,Jiang S H,忻如颖,等. 利用染色体加倍技术创建油菜非整倍体 [J]. 西北植物学报,2008,28(8):1559-1565.  
Yang G J,Jiang S H,Xin R Y,et al. Creation of rapeseed aneuploids by chromosome doubling technique [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2008, 28 (8): 1559-1565. (in Chinese)

[10] 吴安平,殷少华,熊 飞,等. 甘蓝型油菜小孢子加倍培养技术 [J]. 现代农业科技,2010(3):91.  
Wu A P,Yin S H,Xiong F,et al. Technology of microspore doubling culture of *Brassica napus* [J]. Modern Agricultural Sciences and Technology,2010(3):91. (in Chinese)

[11] 石淑稳,吴江生,周永明,等. 甘蓝型油菜小孢子单倍体二倍化技术的研究 [J]. 中国油料作物学报,2002,24(1):2-6.  
Shi S W,Wu J S,Zhou Y M,et al. Diploidization techniques of haploids from *in vitro* culture microspores of rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Chinese Journal of Oil Crop Science, 2002,24(1):2-6. (in Chinese)

[12] 马勇斌. 甘蓝小孢子培养几个因素探讨和 DH 植株再生技术研究 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2011.  
Ma Y B. Discussion on the factors influencing microspore culture and plantlet regeneration technique of DH lines in cabbage (*Brassica oleracea* L.) [J]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University,2011. (in Chinese)

[13] 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)

[14] 袁素霞,刘玉梅,方智远,等. 甘蓝类蔬菜小孢子再生植株染色体倍性与气孔保卫细胞叶绿体数的相关性 [J]. 中国农业科学,2009,42(1):189-197.

- Yuan S X, Liu Y M, Fang Z Y, et al. Relationship between the ploidy level of microspore-derived plants and the number of chloroplast in stomatal guard cells in *Brassica oleracea* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42 (1): 189-197. (in Chinese)
- [15] 陈绪中, 罗正荣, 鄂柿 1 号离体叶片秋水仙素诱导和再生植株倍性鉴定 [J]. *果树学报*, 2005, 22(5): 554-556.
- Chen X Z, Luo Z R. Ploidy verification of regenerated plants of Eshi 1 persimmon from *in vitro* leaves treated with colchicine [J]. *Journal of Fruit Science*, 2005, 22(5): 554-556. (in Chinese)
- [16] 张计育, 李国平, 乔玉山, 等. 秋水仙素对草莓离体叶片再生和多倍体诱导的影响 [J]. *植物资源与环境学报*, 2009, 18(3): 69-73.
- Zhang J Y, Li G P, Qiao Y S, et al. Effects of colchicine on regeneration and polyploid induction from leaf *in vitro* of strawberry [J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2009, 18(3): 69-73. (in Chinese)
- [17] 闫志刚, 白隆华, 马小军, 等. 秋水仙素处理对罗汉果愈伤组织生长及变异的影响 [J]. *湖北农业科学*, 2012, 51(22): 5188-5190.
- Yan Z G, Bai L H, Ma X J, et al. The effect of colchicine treatment on callus growth and variation of *Siraitia grosvenorii* [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2012, 51(22): 5188-5190. (in Chinese)
- [18] 栾 丽, 龙文波, 王 兴, 等. 秋水仙素诱导水稻幼穗愈伤组织创制同源四倍体种质的研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2009, 46(3): 829-837.
- Luan L, Long W B, Wang X, et al. Research on creating autotetraploid rice using colchicum to induce the panicle callus of diploid rice [J]. *Journal of Sichuan University: Natural Science Edition*, 2009, 46(3): 829-837. (in Chinese)
- [19] 吴志刚, 刘丹赤, 宋 明, 等. 番茄同源四倍体离体诱导研究 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(4): 1959-1960, 2002.
- Wu Z G, Liu D C, Song M, et al. Study on *in vitro* induction of autotetraploid of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(4): 1959-1960, 2002. (in Chinese)
- [20] 张振超, 张蜀宁, 张 伟, 等. 四倍体不结球白菜的诱导及染色体倍性鉴定 [J]. *西北植物学报*, 2007, 27(1): 28-32.
- Zhang Z C, Zhang S N, Zhang W, et al. Induction of tetraploidy of non-heading Chinese cabbage with late-bolting and identification of chromosome configuration [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2007, 27(1): 28-32. (in Chinese)
- [21] 徐丽娟, 张蜀宁, 郑于莉, 等. 秋水仙素诱导不结球白菜叶片形态类型与染色体加倍的关系 [J]. *西北植物学报*, 2013, 33(6): 1239-1244.
- Xu L J, Zhang S N, Zheng Y L, et al. Relationship between leaf morphological type and chromosome doubling of non-heading Chinese cabbage induced by colchicine [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2013, 33(6): 1239-1244. (in Chinese)
- [22] 李勤菲, 向竹清, 梅家琴, 等. 秋水仙碱对芸薹属三种单倍体染色体加倍效率 [J]. *中国油料作物学报*, 2011, 33(4): 409-411, 415.
- Li Q F, Xiang Z Q, Mei J Q, et al. Efficiency of chromosome doubling with colchicine in three haploids *Brassica* spp. [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2011, 33(4): 409-411, 415. (in Chinese)