

网络出版时间:2013-06-20 16:17

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130620.1617.024.html>

羽衣甘蓝小孢子胚植株再生的影响因素分析

戴希刚^{1,2}, 施雪萍¹, 包满珠¹

(1 华中农业大学 园艺林学学院, 湖北 武汉 430070; 2 江汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430056)

[摘要] 【目的】建立羽衣甘蓝小孢子胚植株再生体系, 完善羽衣甘蓝小孢子培养技术, 为高效稳定地获得羽衣甘蓝双单倍体植株奠定基础。【方法】以名古屋-红、白珊瑚、红鸥、白舞、桃舞、帝王-桃红、P3、X18 和 X35 等 9 个基因型羽衣甘蓝为试验材料, 研究基因型、培养基、琼脂质量分数、低温处理、胚龄和激素对羽衣甘蓝小孢子胚状体植株再生的影响。【结果】9 个基因型羽衣甘蓝的小孢子胚植株成苗率差异很大, 其中“红鸥”的胚状体成苗率最高, 达到 88.6%; 附加质量分数 1.0% 琼脂的 MS 培养基最适合植株再生; 低温处理对胚状体的再生有一定促进作用, 但影响不明显; 25~30 d 胚龄胚状体的再生能力较强。附加 1.5 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L NAA 激素的 MS 培养基有利于胚状体的再生成苗, 95% 以上的植株能够很好地生根, 移栽成活率达 75% 以上。【结论】对羽衣甘蓝而言, 基因型不是其小孢子胚再生能力的惟一决定因素, 培养基中有一定量的盐分是小孢子胚再生所必需的条件, 小孢子胚萌发成苗时需要相对干燥的环境; 在小孢子发育过程中增加脱分化阶段, 可使畸形胚、鱼雷型胚或心型胚先形成愈伤组织, 再分化形成植株。

[关键词] 羽衣甘蓝; 小孢子胚; 植株再生; 基因型

[中图分类号] S681.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)07-0201-08

Influencing factors of microspore-derived plant regeneration in ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*)

DAI Xi-gang^{1,2}, SHI Xue-ping¹, BAO Man-zhu¹

(1 College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China;

2 College of Life Sciences, Jiangnan University, Wuhan, Hubei 430056, China)

Abstract: 【Objective】Plant regeneration system of microspore-derived embryos was established, and the microspore culture technology was improved to obtain DH (double haploid) plant of ornamental kale efficiently and stably. 【Method】Nine genotypes of ornamental kale, such as Red nagoya, White coral, Red gull, White dancing, Prach dancing, Peach dancing, Peach emperor, P3, X18 and X35, were used as experimental material to investigate the effects of genotype, basal medium, agar concentration, cold treatment, embryoid age and PGR on plant regeneration from microspore-derived embryos. 【Result】The results showed that there were significant differences in the frequencies of plant regeneration from embryoids among the various genotypes. The cultivar ‘Red gull’ achieved the highest frequency of plant regeneration (88.6%). MS medium with 1.0% agar was suitable for plant regeneration. Cold treatment of embryoid could promote the regeneration, but had no significant effect. Embryoid with 25—30 d age showed highest

[收稿日期] 2012-09-24

[基金项目] 农业部“948”项目(20032Z36); 武汉市科技计划项目(201250499145-13)

[作者简介] 戴希刚(1981—), 男, 湖北云梦人, 讲师, 博士, 主要从事园林植物遗传育种研究。E-mail: xg_dai@163.com

[通信作者] 包满珠(1963—), 男, 甘肃漳县人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事园林植物遗传育种研究。
E-mail: mzbao@mail.hzau.edu.cn

regeneration capacity. The frequency of regeneration was enhanced when embryoids were cultured on medium MS+1.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA. More than 95% showed rooting ability in regenerated plants, among which 75% survived when transplanted.【Conclusion】 Genotype was not the only deciding factors for plant regeneration of microspore-derived embryos. It was required for plant regeneration of microspore-derived embryos that culture medium should contain a certain amount of salt. A relatively dry environment was essential for germination of microspore-derived embryos. Cold treatment played an insignificant role in plant regeneration of microspore-derived embryos. The abnormal embryos, torpedo embryo or heart-shaped embryo could dedifferentiate to callus firstly, and then differentiated to plants.

Key words: ornamental kale; microspore-derived embryos; plant regeneration; genotype

羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* var. *acephala*)为十字花科芸薹属甘蓝种的一个变种,是 2 年生草本植物,以观叶为主,其叶片形态美观多变,转色后的心叶色彩更加丰富艳丽,整个植株形似牡丹,故被形象地称为“叶牡丹”。羽衣甘蓝耐寒性强,观赏期长(可达 4 个月之久),观赏价值极高^[1]。目前,在羽衣甘蓝小孢子培养方面国内外已有一些报道^[2-6],但大多集中在胚状体发生因素及如何提高胚状体诱导率上,而有关羽衣甘蓝小孢子胚成苗的影响因素、植株移栽等的研究较少。小孢子在诱导成胚后,能否再生出正常植株,直接影响小孢子培养技术在羽衣甘蓝育种实践中的应用,而小孢子胚植株再生受到诸

多因素的影响。本试验以羽衣甘蓝 9 个基因型为试验材料,研究了基因型、培养基、琼脂质量分数、低温处理、胚龄和激素对其小孢子胚植株再生的影响,初步建立了羽衣甘蓝小孢子胚植株再生体系,完善了羽衣甘蓝小孢子培养技术,以期为高效稳定地获得羽衣甘蓝双单倍体植株并将其应用于育种实践奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料由羽衣甘蓝 6 个商业品种及 3 个杂交种共 9 个基因型组成,其主要特征及来源见表 1。

表 1 供试 9 个基因型羽衣甘蓝的主要特征及来源

Table 1 Main features and sources of 9 genotypes of ornamental kale

基因型 Genotype	特征 Main character	来源 Source
名古屋-红 Red nagoya	半矮生,叶卷皱,心叶红色,外叶绿色 Semi dwarf, wrinkled leaves, red center leaves, and green external leaves	浙江虹越花卉有限公司 Zhejiang Hongyue Flower Co. ,Ltd
白珊瑚 White coral	中生,叶齿裂,心叶白色,外叶绿色 Mid height, slit leaves, white center leaves, and green external leaves	浙江虹越花卉有限公司 Zhejiang Hongyue Flower Co. ,Ltd
红鸥 Red gull	矮生,叶缘皱缩,心叶红色,外叶深绿色 Dwarf, wrinkled leaf margin, red center leaves, and dark green external leaves	农友种苗(中国)有限公司 Know-You Seed (China) Co. ,Ltd
白舞 White dancing	矮生紧凑,叶缘波形,心叶白色,外叶绿色 Dwarf, compact, wave shaped leaf margin, white center leaves, and green external leaves	农友种苗(中国)有限公司 Know-You Seed (China) Co. ,Ltd
桃舞 Peach dancing	矮生紧凑,叶缘波形,心叶桃红,外叶深绿 Dwarf, compact, wave shaped leaf margin, peach center leaves, and dark green external leaves	农友种苗(中国)有限公司 Know-You Seed (China) Co. ,Ltd
帝王-桃红 Peach emperor	矮生,叶卷皱,心叶红色,外叶绿色 Dwarf, wrinkled leaves, red center leaves, and green external leaves	农友种苗(中国)有限公司 Know-You Seed (China) Co. ,Ltd
P3	中生,叶卷皱,心叶红到绿,外叶绿色 Mid height, wrinkled leaves, center leaves from red to green, and green external leaves	自交系 Q2704×Q4606 的 F ₁ 代杂种 F ₁ crossed between inbred lines Q2704×Q4606
X18	中生,叶卷皱,心叶红色,径大,外叶深绿 Mid height, wrinkled leaves, red center leaves, larger diameter, and dark green external leaves	名古屋-红 DH 系×大阪-红 DH 系的 F ₁ 代杂种 F ₁ crossed between DH lines of ‘Red nagoya’ and ‘Red osaka’
X35	半矮生,叶微皱,心叶桃红,外叶深绿 Semi dwarf, microfold leaves, peach center leaves, and dark green external leaves	桃舞 DH 系×名古屋/红 DH 系的 F ₁ 代杂种 F ₁ crossed between DH lines of ‘Peach dancing’ and ‘Red nagoya’

1.2 小孢子的分离与培养

小孢子的分离按照 Dai 等^[4]的方法进行。将分离获得的小孢子,用 NLN-16^[7](蔗糖质量分数为 16%)液体培养基悬浮。取小孢子悬浮液分装到培养皿中,小孢子密度 $4\times 10^4\text{ mL}^{-1}$,石蜡膜封口。将培养皿置于 32.5℃ 下热激处理 48 h,然后转至 25℃ 下黑暗培养,待出现肉眼可见胚状体后,放于摇床上振荡(60 r/min)培养。3~4 周后将不同发育时期的胚状体转至固体培养基上进行植株再生(25℃,16 h 黑暗/8 h 光照,40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$)。

1.3 小孢子植株再生的影响因素

1.3.1 基因型对小孢子植株再生的影响 将由 9 种不同基因型材料获得的生长良好的子叶形胚接种在 MS 培养基(附加质量分数 1.0%的琼脂和 2%的蔗糖,pH 5.8)上,培养 6 周后统计成苗率,计算公式为:成苗率=成苗数/接种胚数 $\times 100\%$ 。

1.3.2 基本培养基对小孢子植株再生的影响 将基因型‘名古屋-红’、‘桃舞’和 X35 生长良好的子叶形胚分别转入 MS、1/2MS、B5、1/2B5 固体培养基(附加质量分数 1.0%的琼脂和 2%的蔗糖,pH 5.8)上培养,6 周后统计并计算成苗率。

1.3.3 琼脂质量分数对小孢子植株再生的影响 将基因型‘名古屋-红’和‘桃舞’生长良好的子叶形胚转至琼脂质量分数为 0.8%,1.0%和 1.2%的 MS 培养基(附加蔗糖的质量分数为 2%,pH 5.8)上进行培养,6 周后统计计算成苗率。

1.3.4 低温处理对小孢子植株再生的影响 将基因型‘名古屋-红’和 X35 生长良好的子叶形胚状体转至 MS 培养基(附加质量分数 1.0%的琼脂和 2%的蔗糖,pH 5.8)上,4℃ 下低温处理 5 和 10 d 后再置于室温环境下培养,以未经过低温处理为对照。培养 6 周后统计并计算成苗率。

1.3.5 胚龄对小孢子植株再生的影响 以基因型‘名古屋-红’和 X18 为研究材料,将 20~25,26~

30,31~35,36 d 以上 4 个胚龄的胚状体转入 MS 培养基(附加质量分数 1.0%的琼脂和 2%的蔗糖,pH 5.8)上分别进行培养,6 周后统计并计算成苗率。

1.3.6 MS 培养基附加激素对小孢子植株再生的影响 将基因型‘名古屋-红’和‘桃舞’生长良好的子叶形胚状体,分别转入 3 种附加不同激素的 MS 培养基(附加质量分数 1.0%的琼脂和 2%的蔗糖,pH 5.8)上进行培养,这 3 种附加激素的培养基为 MS+0.1 mg/L GA₃、MS+1.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 和 MS+0.5 mg/L IBA,以不加任何激素的 MS 培养基为对照,培养 6 周后统计并计算成苗率。

1.4 小孢子再生植株的生根与移栽

将小孢子再生植株接种到不含激素的 1/2MS 培养基(附加质量分数 1.0%的琼脂和 2%的蔗糖,pH 5.8)上进行生根培养;培养 1 月后,将具 4~5 片真叶、根系生长良好的小孢子再生植株在室内进行炼苗;1 周后,将再生植株移栽到盛有 V(泥炭土):V(珍珠岩)=1:2 的塑料杯(底部穿孔)中,压实根部,注意保湿;1 周后将移栽植株放置在温室中养护,养护 2 周左右即可将植株移栽大田。

2 结果与分析

2.1 基因型对小孢子胚植株再生的影响

由表 2 可以看出,供试的 9 个基因型羽衣甘蓝小孢子胚再生成苗的能力有很大差异,其中‘红鸬’胚状体的成苗率最高,达到 88.6%,且此基因型小孢子胚无需经过继代培养就能在较短时间内成苗;其他几个基因型,如‘名古屋-红’、P3 和 X18 胚状体的成苗率也均在 70%左右。在前期研究^[8]中出现最高胚胎发生率的‘桃舞’,其小孢子胚成苗率较低,仅为 31.3%。9 个基因型中,以‘白珊瑚’的成苗率最低,仅为 20.0%,而且后期所得的 4 株苗全部夭折。

表 2 供试 9 种基因型对羽衣甘蓝小孢子胚植株再生的影响

Table 2 Effect of genotypes of donor material on microspore-derived plant regeneration in ornamental kale							
基因型 Genotype	接种胚数 No. of embryoids	成苗数 No. of plantlets	成苗率/% Rate of regeneration	基因型 Genotype	接种胚数 No. of embryoids	成苗数 No. of plantlets	成苗率/% Rate of regeneration
名古屋-红 Red nagoya	50	34	68.0 d	帝王-桃红 Peach emperor	35	13	37.1 g
白珊瑚 White coral	20	4	20.0 i	P3	60	43	71.7 c
红鸬 Red gull	35	31	88.6 a	X18	35	27	77.1 b
白舞 White dance	35	15	42.9 f	X35	35	18	51.4 e
桃舞 Peach dance	80	25	31.3 h				

注:同列数据后标不同小写字母表示在 P=5%水平上差异显著。下表同。
Note:Different lowercase letters indicate significant difference at P=5% level. The same below.

2.2 基本培养基对小孢子胚植株再生的影响

表 3 显示,不同基本培养基对羽衣甘蓝小孢子胚状体植株再生有一定影响。3 个供试基因型胚状体在 MS 和 B5 培养基上的成苗率均明显较 1/2MS

和 1/2B5 培养基高,而 MS 和 B5 培养基之间无明显差异。相对而言,‘名古屋-红’中胚状体在 B5 培养基上的成苗率稍高,而‘桃舞’和 X35 在 MS 培养基上的成苗率较高。

表 3 基本培养基对羽衣甘蓝小孢子胚植株再生的影响

Table 3 Effect of basal medium on microspore-derived plant regeneration in ornamental kale

基因型	基本培养基	接种胚数	成苗数	成苗率/%
Genotype	Basal medium	No. of embryoids	No. of plantlets	Rate of regeneration
名古屋-红 Red nagoya	MS	20	14	70.0 b
	1/2MS	20	10	50.0 d
	B5	20	15	75.0 a
	1/2B5	20	12	60.0 c
桃舞 Peach dance	MS	30	10	33.3 a
	1/2MS	30	5	16.7 c
	B5	30	8	26.7 b
	1/2B5	30	3	10.0 d
X35	MS	30	18	60.0 a
	1/2MS	30	11	36.7 b
	B5	30	17	56.7 a
	1/2B5	30	5	16.7 c

2.3 琼脂质量分数对小孢子胚植株再生的影响

琼脂质量分数对小孢子胚状体植株再生的影响如表 4 所示。由表 4 可以看出,当 MS 培养基中添加的琼脂质量分数为 0.8%时,大部分胚状体在培养过程中变褐死亡,只有少部分能正常再生成植株;当琼脂质量分数提高至 1.0%,1.2%时,其可明显提高胚状体的再生能力,说明 MS 培养基中的琼脂质量分数对羽衣甘蓝小孢子胚状体的再生影响很

大。‘名古屋-红’在琼脂质量分数为 1.0%时的成苗率最高,但与琼脂质量分数为 1.2%时的成苗率无显著差异;对‘桃舞’而言,琼脂质量分数为 1.2%和 1.0%时的成苗率显著高于琼脂质量分数为 0.8%。综上可知,MS 培养基中添加琼脂的质量分数为 1.0%和 1.2%时,其对提高胚状体的成苗率有显著促进作用。

表 4 琼脂质量分数对羽衣甘蓝小孢子胚植株再生的影响

Table 4 Effect of agar content on microspore-derived plant regeneration in ornamental kale

基因型	琼脂质量分数/%	接种胚数	成苗数	成苗率/%
Genotype	Agar concentration	No. of embryoids	No. of plantlets	Rate of regeneration
名古屋-红 Red nagoya	0.8	30	13	43.3 b
	1.0	30	22	73.3 a
	1.2	30	20	66.7 a
桃舞 Peach dance	0.8	30	6	20.0 c
	1.0	30	9	30.0 b
	1.2	30	14	46.7 a

2.4 低温处理对小孢子胚植株再生的影响

由表 5 可见,将小孢子胚状体置于 4℃下进行低温处理后,供试 2 个基因型羽衣甘蓝小孢子胚植株再生的成苗率均有所提高。低温处理 5 d 后,胚状体的成苗率与未经过低温处理的对照没有显著差异;低温处理 10 d 后,成苗率较对照提高了 15%以上。这说明低温处理对胚状体的再生有一定促进作用,但作用并不是很明显。

2.5 胚龄对小孢子胚植株再生的影响

表 6 结果表明,胚龄对羽衣甘蓝小孢子胚状体植株再生有很大影响。对于‘名古屋-红’,26~30 d 胚龄小孢子胚状体的再生能力最强,成苗率最高达 73.3%;随着胚龄的进一步增加,胚状体的成苗率显著下降。研究中发现,超过 36 d 胚龄的胚状体在小孢子胚胎发生培养基上就已经出现褐化现象,且很多长出次生胚,这些次生胚基本不能再生成植株。对于 X18 而言,20~25 d 胚龄胚状体的成苗率最

低,31~35 d 胚龄胚状体的成苗率最高,而一旦胚龄超过 36 d,其再生能力亦显著下降。

表 5 低温处理对羽衣甘蓝小孢子胚植株再生的影响

Table 5 Effect of cold treatment on microspore-derived plant regeneration in ornamental kale

基因型	低温处理时间/d	接种胚数	成苗数	成苗率/%
Genotype	Duration of cold treatment	No. of embryoids	No. of plantlets	Rate of regeneration
名古屋-红 Red nagoya	0	30	20	66.7 b
	5	30	21	70.0 ab
	10	30	23	76.7 a
X35	0	30	16	53.3 b
	5	30	17	56.6 ab
	10	30	19	63.6 a

表 6 胚龄对羽衣甘蓝小孢子胚植株再生的影响

Table 6 Effect of embryoids age on microspore-derived plant regeneration in ornamental kale

基因型	胚龄/d	接种胚数	成苗数	成苗率/%
Genotype	Embryoids age	No. of embryoids	No. of plantlets	Rate of regeneration
名古屋-红 Red nagoya	20~25	30	17	56.6 b
	26~30	30	22	73.3 a
	31~35	30	11	36.6 c
	≥36	30	5	16.6 d
X18	20~25	30	4	13.3 d
	26~30	30	17	56.7 b
	31~35	30	21	70.0 a
	≥36	30	12	40.0 c

2.6 MS 培养基中附加激素对小孢子胚植株再生的影响

由表 7 可以看出,附加 1.5 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L NAA 的 MS 培养基对羽衣甘蓝小孢子胚状体的植株再生有显著作用,羽衣甘蓝胚状体在该培养基上经过脱分化后形成愈伤,从愈伤上诱导出芽苗,切下绿芽接种到不含激素的 MS 上即可正常生长。添加了 GA₃ 或 IBA 的培养基对胚状体的成苗率不但没有提高作用,反而表现出明显的抑制作用。

表 7 培养基中附加激素对羽衣甘蓝小孢子胚植株再生的影响

Table 7 Effect of hormone on microspore-derived plant regeneration in ornamental kale

基因型	含不同激素培养基	接种胚数	成苗数	成苗率/%
Genotype	Combination of hormone	No. of embryoids	No. of plantlets	Rate of regeneration
名古屋-红 Red nagoya	对照 Contrast	20	12	60.0 b
	MS+0.1 mg/L GA ₃	20	4	20.0 d
	MS+1.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA	20	14	70.0 a
	MS+0.5 mg/L IBA	20	9	45.0 c
桃舞 Peach dance	对照 Contrast	20	5	25.0 c
	MS+0.1 mg/L GA ₃	20	4	20.0 c
	MS+1.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA	20	15	75.0 a
	MS+0.5 mg/L IBA	20	7	35.0 b

2.7 小孢子植株的生根与移栽

当正常的子叶形胚状体转移到固体培养基上后,子叶渐渐变绿,1 周后胚轴伸长,子叶膨大,有根毛长出(图 1A);3 周后,子叶生长点开始生长,逐渐长出真叶(图 1B)。将鱼雷形胚、畸形胚或心形胚,

虽然 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 对胚状体的再生需要经过愈伤途径,但其确实能够提高胚状体的再生分化率。且试验中观察到,对于在一般培养基上不能再生的畸形胚和鱼雷形胚,在该培养基上经过一段时间的诱导后均能分化出芽,因此在 MS 培养基中附加 1.5 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L NAA 对羽衣甘蓝小孢子胚状体的再生有十分积极的作用。

放到加有 1.5 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L NAA 的 MS 培养基上培养,经脱分化后,诱导出愈伤组织,中途继代 1 次,约 6 周后可分化出芽苗(图 1C),但球形胚不能再生。将子叶形胚再生出的芽苗转到 1/2MS 上进行生根培养,1 个月后,95%以上的植株

可长生出旺盛的根系(图 1D)。将生根的植株移栽到盆钵中,成活率达 75% 以上(图 1E)。在温室中

养护一段时间后,即可将小孢子植株移栽到大田(图 1F)。

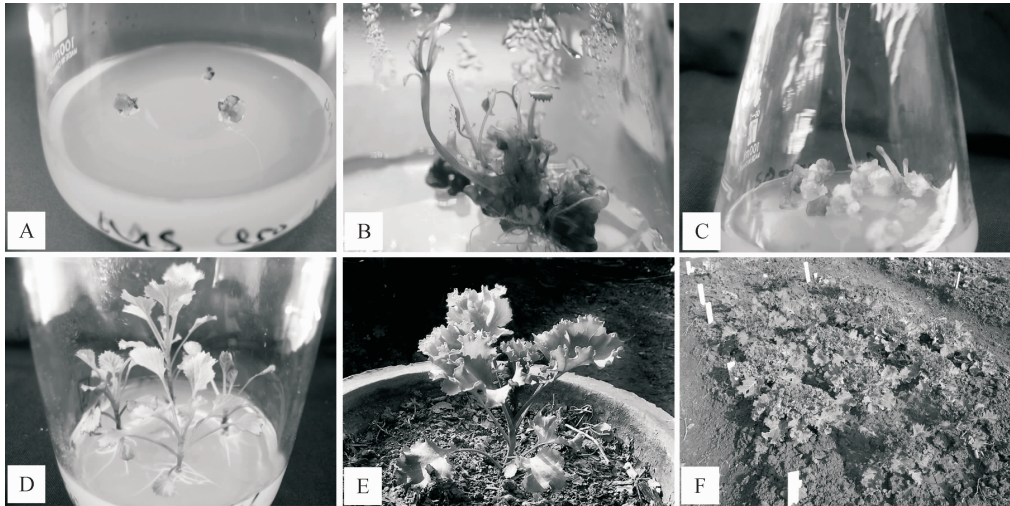


图 1 羽衣甘蓝小孢子植株的生根与移栽

A. 胚状体萌发生长;B. 植株形成;C. 畸形胚在诱导培养基上分化成苗;
D. 植株在生根培养基中生根;E. 移栽到盆中;F. 移栽到大田

Fig. 1 Rooting and transplanting of microspore-derived plants of ornamental kale

A. Germination of embryos;B. Plantlet developed from embryo;C. Plantlet formation of abnormal embryoids;
D. Rooted plantlets;E. Regenerated plants growing in pots;F. Regenerated plants growing in field

3 讨 论

3.1 基因型对小孢子胚状体再生的影响

基因型是控制小孢子胚状体再生的重要影响因素,不同基因型小孢子诱导出的胚状体的再生能力有显著差异。徐艳辉等^[9]研究了 3 个基因型大白菜小孢子胚状体植株再生的差异,结果表明,基因型对大白菜小孢子胚状体再生成苗影响较大。本试验中,羽衣甘蓝基因型‘红鸥’胚状体的成苗率最高,为 88.6%,而‘白珊瑚’的成苗率最低,仅为 20.0%,这说明基因型对羽衣甘蓝胚状体直接成苗的影响比较显著。本研究发现,羽衣甘蓝胚胎发生能力强的基因型^[8]所得胚状体的再生能力一般也较强,而胚胎发生率低的基因型,其胚状体的再生能力也相对较弱,这与徐艳辉等^[9]的研究结果相似。但也有例外存在,如基因型‘桃舞’在所有基因型中胚胎发生率最高,但其胚状体的再生能力却很低,这说明基因型不是胚状体再生能力的惟一决定因素。

3.2 培养条件对小孢子胚状体再生的影响

关于基本培养基对胚状体植株再生的影响,在芸薹属小孢子培养中尚少有研究,现有的多数报道均直接以 MS 或 B5 作为基本培养基^[10-11]。袁素霞等^[12]研究表明,相对于 MS 培养基,B5 培养基更适于结球甘蓝和青花菜小孢子胚的植株再生。张国庆

等^[13]研究认为,在甘蓝型油菜小孢子胚培养中,1/2 MS 或 1/2B5 培养基较 MS 或 B5 的培养效果要好,这与本研究结果不同。但总的来说,培养基中有一定量盐分是小孢子胚状体再生的必需条件。

本试验通过提高培养基中琼脂的质量分数,有效提高了小孢子胚状体的成苗率,同时减少了玻璃化苗。刘凡等^[14]对大白菜小孢子胚成苗的研究发现,培养基的水分状况对胚状体再生影响很大,含质量分数 1.2% 琼脂的 MS 培养基较含质量分数 0.8% 琼脂时的植株成苗率高。王汉中等^[15]通过增加培养基中的琼脂质量分数,提高了甘蓝型油菜胚状体的直接成苗率。据此推断,与合子胚发育时需要相对干燥的环境相似,小孢子胚状体萌发成苗时环境湿度也不能太大,否则容易形成玻璃化苗而褐化死亡,高质量分数琼脂可降低植物组织的玻璃化。

低温处理对小孢子胚状体再生具有一定的影响。余凤群等^[16]将甘蓝型油菜的小孢子转移到固体培养基上后进行 10 d 的低温处理(10℃),大大提高了小孢子的一次成苗率(51.2%)。高素燕等^[17]对转接后的不结球白菜小孢子胚于 4℃ 进行 5 d 的冷处理后,胚芽诱导率和出芽数均显著提高。本试验通过对羽衣甘蓝胚状体进行 5 和 10 d 的低温处理,也提高了胚状体的成苗率,说明低温处理对羽衣甘蓝小孢子胚的再生有一定积极作用,但作用

并不显著,故可以在一些再生困难的基因型上试用此方法。

王亦菲等^[18]研究表明,在 MS、B5 基本培养基中附加不同质量浓度的 6-BA、KT、GA₃,结果以 B5 附加 0.5 mg/L GA₃ 为宜;而 MS 培养基上的胚多数不能分化,其余为畸形苗;在 B5 培养基中附加 0.5 mg/L 6-BA 后,产生的分化苗为玻璃苗,而附加 KT 时胚不能分化。余凤群等^[16]报道,1/2MS+0.1 mg/L 6-BA 较 B5+0.1 mg/L GA₃ 利于胚直接发芽。本试验发现,MS+1.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 对羽衣甘蓝小孢子胚状体再生成苗的促进效果最好。添加激素的培养基会使胚状体的再生经过脱分化和再分化过程,经过愈伤途径诱导发芽。本研究发现,在小孢子发育过程中增加脱分化阶段,可使畸形胚和鱼雷型胚,甚至是心型胚脱分化成愈伤组织,再诱导分化形成再生植株,从而有效提高胚状体的成苗率。

3.3 胚状体的状态对小孢子胚状体再生的影响

胚状体的发育并不同步,原胚、球形胚、心形胚、鱼雷形及子叶形胚并存,同时还有许多畸形胚,各种类型的胚状体在固体培养基上的再生能力也有很大差异。通常,子叶形胚、鱼雷形胚属于正常胚,其两极性发育好,一端具有类似下胚轴结构,另一端则类似芽端,有不完全的 2 片子叶结构,再生频率高;少数心形胚也能形成再生植株,但球形胚、畸形胚由于两极性发育较差,转接到固体培养基后很难再生,有的只长根而胚芽端不发育,难以形成小孢子再生植株。申书兴等^[19]对大白菜小孢子培养的研究表明,子叶形胚状体的成苗率为 62.9%,鱼雷形胚的成苗率为 8%,心形和球形胚不能成苗。

胚龄是影响胚状体再生的又一重要因素。本试验发现,不同基因型胚状体再生的最佳胚龄有所差异,但小孢子胚状体胚龄超过 36 d 后,胚状体的成苗率均显著下降。因此应尽早将子叶形胚接种在植株再生培养基上,以避免培养基营养不足及子叶胚所处环境湿度过高等造成子叶胚衰老。王春丽等^[20]在青花菜小孢子胚植株再生研究中发现,小孢子胚状体在液体培养基中滞留时间的长短,对小孢子再生成苗影响很大,随着滞留时间的延长,再生成苗率下降。刘凡等^[14]在大白菜小孢子胚再生研究中发现,14~21 d 胚龄时的成苗率较高。王涛涛等^[21]对红菜薹的研究发现,随胚状体胚龄的延长,其再生成株率明显降低,最适胚龄为 20~24 d。而 Kott 等^[22]在研究甘蓝型油菜不同胚龄胚状体再生

时发现,35 d 胚龄胚状体的萌发率较 21 d 胚龄增加了 3~5 倍。

综上所述,对羽衣甘蓝‘红鸥’而言,将 26~30 d 胚龄的小孢子胚,接种于附加质量分数 1.0% 琼脂的 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 培养基上,并于 4℃ 下低温处理 10 d 后转到室温环境下培养,可以获得较高的再生成苗率。

[参考文献]

- [1] 饶璐璐. 羽衣甘蓝 [J]. 蔬菜, 1997(1): 11-12.
Rao L L. Kale [J]. Vegetables, 1997(1): 11-12. (in Chinese)
- [2] Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassicaceae* species [J]. Plant Breeding, 1989, 103: 119-123.
- [3] Takahata Y, Keller W A. High frequency embryogenesis from microspore culture of *B. oleracea* [J]. Plant Breeding, 1990, 40 (1): 134-135.
- [4] Dai X G, Shi X P, Fu Q, et al. Improvement of isolated microspore culture of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*): Effects of sucrose concentration, medium replacement, and cold pre-treatment [J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2009, 84: 519-525.
- [5] 姜凤英, 冯 辉. 植物生长调节剂对羽衣甘蓝小孢子胚发生的影响 [J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 642-644.
Jiang F Y, Feng H. Effect of the auxin and ctytokin on the frequency of embryogenesis in kale [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33(3): 642-644. (in Chinese)
- [6] 冯 辉, 姜凤英, 冯建云, 等. 羽衣甘蓝游离小孢子培养技术研究及应用 [J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 1019-1022.
Feng H, Jiang F Y, Feng J Y, et al. Establishment and application of the system for isolated microspore culture in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2007, 34(4): 1019-1022. (in Chinese)
- [7] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* [J]. Z Pflanzenphysiol, 1982, 105: 427-434.
- [8] 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, 48(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 Communications, 2012, 48(11): 1113-1119. (in Chinese)
- [9] 徐艳辉, 冯 辉, 张 凯. 大白菜游离小孢子培养中若干因素对胚状体诱导和植株再生的影响 [J]. 北方园艺, 2001(3): 6-8.
Xu Y H, Feng H, Zhang K. Effect of several factors on microspore embryogenesis and plant regeneration in Chinese cabbage [J]. Northern Horticulture, 2001(3): 6-8. (in Chinese)
- [10] Huang B, Sharon B, Kemble R, et al. Effects of culture density, conditioned medium and feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. *Topas* [J]. Plant Cell

- Reports, 1990, 8: 594-597.
- [11] Dias J S. Protocol for broccoli microspore culture [C]// Maluszynski M, Kasha K J, Forster B, et al. Doubled haploid production in crop plants. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003: 195-204.
- [12] 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)
- [13] 张国庆, 许 玲, 周伟军. 甘蓝型油菜小孢子诱导胚冷击、干燥与去子叶处理提高植株再生率研究 [C]//中国作物学会油料作物专业委员会. 食物与能源安全战略中的中国油料; 中国作物学会油料作物专业委员会第五届学术年会论文集. 上海: 中国农业科学出版社, 2004: 285-291.
Zhang G Q, Xu L, Zhou W J. Improvement of plant regeneration by cold shock, drying and cut cotyledon of microspore-derived embryos on *Brassica napus* [C] // Professional Committee of Oil Crops, Crop Science Society of China. China oil of Food and energy security strategy- Proceedings of fifth annual meeting of professional committee of oil crops, crop science society of China. Shanghai: Chinese Agricultural Science Press, 2004(11): 285-291. (in Chinses)
- [14] 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.
Liu F, Li Y, Yao L, et al. Effects of water state in culture medium on germination and growth of microspore-derived embryos of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 1997, 5(2): 131-136. (in Chinese)
- [15] 王汉中, 王新发, 刘贵华, 等. 甘蓝型杂交油菜亲本的小孢子培养技术研究 [J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(1): 1-4.
Wang H Z, Wang X F, Liu G H, et al. Studies on microspore culture of hybrid parents in *Brassica napus* [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2004, 26(1): 1-4. (in Chinese)
- [16] 余凤群, 刘后利. 提高甘蓝型油菜小孢子胚状体成苗率的某些因素研究 [J]. 作物学报, 1997, 23(2): 165-168.
Yu F Q, Liu H L. Studies on plantlet formation of microspore embryoid in *Brassica napus* [J]. Acta Agronomica Sinica, 1997, 23(2): 165-168. (in Chinese)
- [17] 高素燕, 侯喜林, 李 英, 等. 不结球白菜小孢子胚植株再生及倍性研究 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(6): 1091-1096.
Gao S Y, Hou X L, Li Y, et al. Plant development and ploidy of microspore-derived embryos in non-heading Chinese cabbage [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2009, 29(6): 1091-1096. (in Chinese)
- [18] 王亦菲, 陆瑞菊, 孙月芳, 等. 大田油菜游离小孢子培养高频胚状体诱导及植株再生 [J]. 中国农学通报, 2002, 18(1): 20-23.
Wang Y F, Lu R J, Sun Y F, et al. The high frequency embryo induction and plant regeneration derived from microspores for rapes grown in field [J]. Chinese Agricultural Sciences Bulletin, 2002, 18(1): 20-23. (in Chinese)
- [19] 申书兴, 梁会芬, 张成合, 等. 提高大白菜小孢子胚胎发生及植株获得率的几个因素研究 [J]. 河北农业大学学报, 1999, 22(4): 65-68.
Shen S X, Liang H F, Zhang C H, et al. The studies on formation of microspore embryo and plantlet in Chinese cabbage [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 1999, 22(4): 65-68. (in Chinese)
- [20] 王春丽, 王涛涛, 张余洋, 等. 青花菜小孢子胚植株再生及倍性研究 [J]. 中国蔬菜, 2010(4): 36-40.
Wang C L, Wang T T, Zhang Y Y, et al. Studies on plant regeneration and ploidy identification of microspore embryoids in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) [J]. China Vegetables, 2010(4): 36-40. (in Chinese)
- [21] 王涛涛, 李汉霞, 张继红, 等. 红菜薹游离小孢子培养与植株再生 [J]. 武汉植物学研究, 2004, 22(6): 569-571.
Wang T T, Li H X, Zhang J H, et al. Isolated microspore culture and plant regeneration in purple flowering stalk (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *pupurea* Hort.) [J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2004, 22(6): 569-571. (in Chinese)
- [22] Kott L S, Beversdorf W D. Enhanced plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus* by chilling, partial desiccation and age selection [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1990, 23: 187-192.