

芥蓝游离小孢子培养初报

何杭军^{1,2} 王晓武^{1*} 汪炳良²

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ² 浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 杭州 310029)

摘要: 以芥蓝的 5 个基因型为试材, 对游离小孢子培养诱导胚状体发生及植株再生进行了初步探讨。结果表明: 供体基因型对成功诱导胚状体发生至关重要; 振荡培养明显有利于胚状体的发育; 改良 MS 和 B₅ 培养基对诱导植株再生没有差别。

关键词: 芥蓝; 游离小孢子; 胚状体; 振荡培养; 再生植株

中图分类号: S 635 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 02-0239-02

Embryogenesis and Plant Regeneration of Chinese Kale via Isolated Microspore Culture

He Hangjun^{1,2}, Wang Xiaowu^{1*}, and Wang Bingliang²

(¹ *Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China*; ² *Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

Abstract: Isolated microspores of 5 Chinese kale genotypes were cultured. It was found that only those late-uninucleate and binucleate microspores could grow into division. The results also showed that genotypes had important impact on embryoid induction. Effect of shaking culture on embryoids development was examined. The results demonstrated that slow shaking could promote development of embryoids and increase the proportion of cotyledonary embryoids. MS and B₅ media showed no difference on plant regeneration.

Key words: Chinese kale; Isolated microspore; Embryoid; Shaking culture; Plant regeneration

1 目的、材料和方法

芸薹属作物中, 自德国 Licher^[1]首次报道利用游离小孢子培养获得再生植株后, 目前, 已在多种芸薹属作物中获得小孢子培养的再生植株。而芥蓝小孢子培养未见有成功报道。本文以芥蓝的 5 个基因型为试材, 初步研究了诱导胚状体发生的技术和程序, 同时还研究了不同培养基对植株诱导的影响, 以期对芥蓝的遗传育种提供一种较为有效的方法。

试材的编号分别为 A30、A42、A43、A95、A99。于每天早晨 7 时左右, 选取芥蓝的主花序或第一分枝花序处于花序轴伸长前后的花蕾用于游离小孢子培养。将生长状况良好的花蕾用 75% 的酒精消毒 30 s, 再用 7% 的饱和次氯酸钠消毒 15 min, 并用预冷的无菌水冲洗 3 次, 每次 5 min。然后将消毒过的花蕾置于灭过菌的研钵中, 加入少量 B₅ 洗涤培养基^[2], 用研棒迅速将花蕾研碎, 挤出小孢子, 然后用 300 目的双层尼龙网过滤, 收集滤液。滤液在 100 g 的速度下离心 3 次, 每次 5 min, 最后一次用 NLN-13^[1,3] 培养基清洗。清洗 3 次后的小孢子重悬于 NLN-13 培养基中, 培养基不加任何激素。用血球计数板调整小孢子密度为 2×10^5 个/mL, 然后以每皿 2 mL 小孢子悬浮液分装入 $\Phi 60$ mm 的玻璃培养皿, Parafilm 封口, 置于 33℃ 恒温箱静置暗培养 48 h 后, 然后于 25℃ 下继续静置培养约 2~3 周后统计胚状体的数目。

收稿日期: 2003-04-08; 修回日期: 2003-06-12

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wangxw@mail.caas.net.cn

小孢子培养 15~18 d 后已有从球形至子叶期各个阶段的胚状体。挑出子叶期的胚接种到改良 MS 和 B₅ 培养基上, 暗培养 24 h 后置于 25℃, 6000 lx, 14 h/d 光照的条件下继续培养, 胚状体经过 3~4 周继代培养后长成幼苗。

2 结果与分析

2.1 基因型对芥蓝胚状体发生的影响

游离小孢子培养 1 d 后, 部分小孢子就出现明显的膨大, 培养 2~3 d, 小孢子就出现细胞分裂。在 5 个供试的基因型中有 3 个观察到小孢子的细胞分裂, 但最终只有 A99 基因型获得胚状体, 还有两种未有任何反应。具有胚胎发生能力的 A99 出胚率约为 6.72 胚/蕾, 其余材料出胚率为零。研究表明, 基因型对成功诱导小孢子胚胎发生影响很大, 这与前人的研究结果一致。

2.2 振荡培养对胚状体生长发育的影响

小孢子培养 15~18 d 后已有从球形至子叶期各个阶段的胚状体, 挑出子叶期的胚, 将剩下的胚分成两组, 一组继续在 25℃ 培养箱中静置培养; 另一组置于 60 r/min、25℃ 的摇床上培养, 两组都每隔两天更换新鲜培养基。培养 10 d 后, 发现在振荡条件下幼胚发育迅速, 胚体粗壮, 且最终大部分幼胚都能发育成子叶期的胚。而静置培养的幼胚发育迟缓, 较幼小, 只有少部分能发育至子叶期胚。在振荡培养条件下子叶期胚状体的频率约是静置条件下的 3 倍, 高达 67.41%。

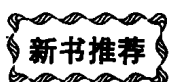
2.3 不同培养基对植株再生的影响

将子叶期的胚状体挑出并转至改良 MS 和 B₅ 培养基中培养, 两者都不加任何激素。培养 2~3 d, 胚状体开始变绿, 胚根伸长并长出根毛, 经过一星期左右的培养, 整个胚状体都变成绿色, 并在象两片子叶的地方抽出小芽。最终, MS 和 B₅ 培养基都能成功诱导胚状体成苗, 除了一些幼弱的胚状体在诱导过程中褐化外, 其余的胚状体都能成功诱导成苗。

本文首次报道了芥蓝小孢子培养成功并获得了再生植株, 研究还证明, 振荡培养对提高芥蓝小孢子胚状体的发育具有明显的促进作用。究其原因, 这可能与振荡培养促进幼胚的呼吸作用以及把毒素迅速稀释有关。本项研究未在较广的基因型范围内获得成功, 说明成功诱导芥蓝的小孢子培养的影响因素还很多, 有待再进行研究。

参考文献:

- 1 Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Plant Breeding, 1982, 105: 427~434
- 2 Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 1968, 50: 151
- 3 Lichter R. Anther culture of *Brassica napus* in a liquid medium. Z Pflanzenphysiol., 1981, 103: 229~237



新书推荐

《生物信息学：序列与基因组分析》(影印版)

本书全面系统地介绍了生物信息学方面的理论与应用, 深入浅出, 图文并茂, 资料丰富, 内容新颖。本书专门为有生物学背景的读者精心设计; 对内容的讲解极为清晰, 并配有大量图示; 用自然的语言讲解算法与理论, 避免了大量使用复杂的公式与符号; 用生物学问题及其解决方案来作为理论支撑; 充分利用表格, 一目了然地提供各种最新的生物信息学资源, 是从事和即将从事生物信息学研究的科研人员、技术人员、研究生的重要参考书和入门书。

定价: 82 元 (含邮费)。

购书者请汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部
邮编 100081。

