

提高大白菜小孢子植株获得率的研究

韩 阳¹ 叶雪凌² 冯 辉^{2*}

(¹辽宁大学生命科学系, 沈阳 110036; ²沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161)

摘 要: 大白菜小孢子胚发生过程中胚胎发育不同步, 以子叶形胚数量最多。发育较好的胚状体成苗率较高, 子叶形胚和萌发胚成苗率分别为 20%和 90.5%; 较干燥的培养基更利于小孢子胚成苗, 最适的琼脂含量是 1.2%。培养基中添加 200 mg·L⁻¹活性炭可以大幅度提高小孢子胚成苗率, 及时地将成熟的子叶形胚转移至再生培养基上, 对提高植株获得率至关重要。

关键词: 大白菜; 游离小孢子培养; 胚状体; 植株再生率

中图分类号: S 634.1; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 06-1092-03

Studies on Enhancing of Plantlet Regeneration in Isolated microspore Culture of Chinese Cabbage

Han Yang¹, Ye Xueling², and Feng Hui^{2*}

(¹Department of Life Sciences, Liaoning University, Shenyang 110036, China; ²College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: During the microspore embryogenesis of Chinese Cabbage, the embryo development was not synchronism and cotyledonary embryos was the highest (80%). The better embryos develop, the yield of higher plantlet regeneration rate is. And the regenerated plant rate of cotyledonary embryos and germinated embryos were 20% and 90.5% respectively. Dry culture medium was favor of regenerating plantlet, optimum agar content was 1.2%. Culture medium supplemented with activated charcoal 200 mg·L⁻¹ could evidently raise regenerated plant rate, which was as 2.225 times as control (without activated charcoal). Transferring mature cotyledonary embryos to the regenerating culture medium in time was essential to increasing plantlet regeneration rate.

Key words: Chinese cabbage; Isolated microspore culture; Embryo; Plantlet regeneration

1 目的、材料与方法

对影响大白菜小孢子植株获得率的几个因素进行了研究, 旨在完善大白菜小孢子培养的方法, 加快这一技术在大白菜育种实践中的应用。以大白菜 [*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Oleson] 杂交种 ‘福田 50’ 为材料。2002年 8月 15日种子催芽后 4 下春化处理 25 d, 9月 10日播种于温室, 盆栽, 11月底开花。参照 Sato等^[1]的方法分离、纯化小孢子。调整小孢子密度为 1~2 ×10⁵ 个·mL⁻¹; 将小孢子悬浮液分装于 60 mm培养皿中, 每皿 2.5 mL, 于 33℃下暗培养 24 h, 再转入 25℃恒温箱中培养。3周后可见小孢子胚形成。小孢子胚在 NLN培养基中培养 4周后转至固体再生培养基上, 转移前在自然光下培养 3 d。上述试验均设 3次重复。

2 结果与讨论

2.1 胚状体发育时期对植株获得率的影响

小孢子培养 3周后, 有大量小孢子胚发生 (图版, 1), 但是胚状体发育是不同步的 (图版, 2)。

收稿日期: 2005-01-04; 修回日期: 2005-04-04

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目 (20022041)

* 通讯作者 Author for correspondence

同一皿中已萌发的胚（子叶已扩大、变绿的胚）占 3%左右，子叶形胚占 80%左右，心形胚占 10%左右，鱼雷形胚和球形胚数量极少，还有一些畸形胚。

取萌发胚、子叶形胚、鱼雷形胚、心形胚和球形胚，分别接种于添加 3%蔗糖和 0.8%琼脂，pH 5.8 的 MS 培养基上，3 周后统计成苗率，结果见表 1。

由表 1 可见，成苗率与胚胎发育时期密切相关，成熟的子叶形胚成苗率可达 20%，远高于发育不完全的胚。子叶已扩大的萌发胚成苗率更高，可达 90%以上；发育早期的胚较难成苗，尤其是心形胚和球形胚成苗率为 0。胚状体发育不一致是白菜游离小孢子培养中普遍存在的问题，本试验证明发育成熟的子叶形胚和已萌发胚胎成苗率较高，但是由于萌发胚在总胚胎中所占比例较少，而且，培养液中胚胎数量越多萌发胚所占比例越少，可能是营养成分限制了胚的进一步发育，因此小孢子植株的获得仍然要以转接子叶形胚为主。

2.2 培养基中水分含量对小孢子植株获得率的影响

以琼脂含量调节培养基中水分含量。取子叶形胚状体分别转至琼脂含量不同的 MS 培养基上（培养基含蔗糖 3%，pH 5.8），3 周后统计成苗率，结果见表 2。

转接后部分小孢子胚正常萌发，继续培养发育成正常幼苗（图版，3），从试管中移出后长成植株（图版，4）；部分小孢子只有胚根伸长，胚芽不生长而发生褐化（图版，5）。以成苗率为指标，琼脂含量为 1.2%和 1.0%的培养基较为适宜，成苗率分别为 50.5%和 43.8%；琼脂 0.8%和 1.4%的培养基成苗率较低；液体培养基和含琼脂 0.75%的培养基中不能成苗，即较干燥的培养基有利于小孢子胚成苗，这一结果和刘凡等^[2]的研究结论相一致。

在液体培养基（静置培养）和水分含量较高的培养基中，95%以上的小孢子胚都有胚根发生，但胚状体不能继续发育；在部分材料中，胚芽愈伤组织化，然后愈伤组织发生褐化，但同时胚根发育为正常根系（图版，6）。

2.3 活性炭对小孢子植株获得率的影响

将子叶形胚状体分别转至含活性炭 0、100、200和 400 mg · L⁻¹的 MS 培养基上（蔗糖 3%，琼脂 0.8%，pH 5.8），3 周后统计成苗率，结果见表 3。

由表 3 可见，培养基中添加活性炭比不含活性炭培养基成苗率高 20% ~ 122.5%，其中添加 200 mg · L⁻¹活性炭处理的成苗率为对照的 2.225 倍，表明添加 200 mg · L⁻¹活性炭的培养基最有利于小孢子胚成苗。其原理可能是活性炭吸附了琼脂中不利于细胞生长的某些杂质。申书兴等^[3]也曾报道活性炭对大白菜小孢子胚状体发生有很好的促

表 1 大白菜小孢子胚发育时期对成苗率的影响

Table 1 Effect of developmental stages of embryos on the plantlet regeneration rate

胚胎发育时期 Developmental stages of embryos	接种胚胎数 Number of embryo	成苗数 Number of of regenerated plantlet	成苗率 Rate of regenerated plantlet (%)
子叶形胚 Cotylednary embryo	180	36	20 a
鱼雷形胚 Torpedo embryo	165	7	4.2 b
心形和球形胚 Heart and globular embryo	300	0	0 c
萌发胚 Germinated embryo	180	163	90.5 d

注：不同字母为差异达显著水平（ $P < 0.05$ ）。以下各表相同。

Note: The differences of the values followed by different letters in the column are significant $P < 0.05$. The meaning is same in the following tables

表 2 培养基琼脂含量对大白菜小孢子植株获得率的影响

Table 2 Effect of agar content of media on the plantlet

琼脂含量 Agar content (%)	接种胚 胎数 Number of embryo	成苗数 Number of regenerate plantlet	成苗率 Rate of regenerated plantlet (%)	仅生根未成苗 胚胎百分数 Percent of only rooted embryo (%)
0	180	0	0 a	100 a
0.75	180	0	0 a	95 a
0.80	180	36	20.0 b	51.4 b
1.00	180	79	43.9 c	26.2 c
1.20	180	91	50.5 c	19.3 c
1.40	180	22	12.2 b	16.1 c

表 3 培养基中活性炭（AC）含量对大白菜小孢子植株获得率的影响

Table 3 Effect of activated charcoal (AC) on the plantlet

AC (mg · L ⁻¹)	接种胚胎数 Number of embryo	成苗数 Number of of regenerated plantlet	成苗率 Rate of regenerated plantlet (%)
0	180	36	20.0 a
100	135	34	25.2 a
200	180	80	44.5 b
400	150	36	24.0 a

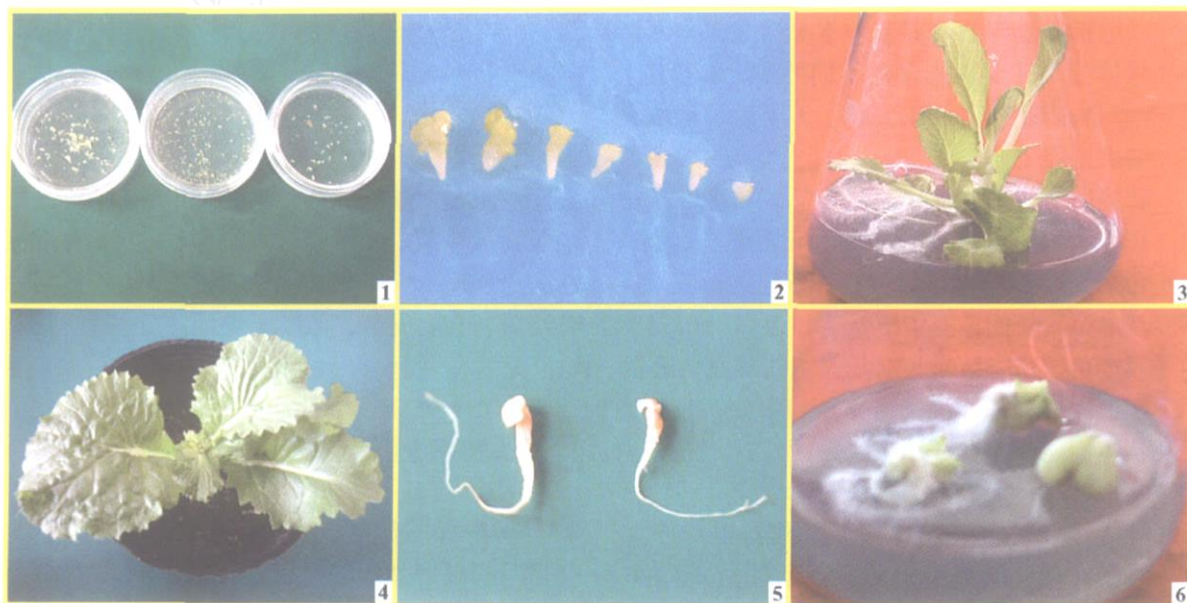
进作用, 可提高胚状体整齐度。

2.4 胚胎在液体培养基中滞留时间对成苗率的影响

取培养 21、25、30、35、40 d 的子叶形胚, 接种于再生培养基 (MS附加 3% 蔗糖, 0.8% 琼脂, 200 mg · L⁻¹ 活性炭, pH 5.8), 3 周后统计成苗率。结果表明, 成熟小孢子胚在 NLN 液体培养基中滞留时间的长短对之后胚培养的影响很大。在液体培养基中培养 21 d 的胚在 MS 琼脂培养基上发育最好, 3 周后 78% 的胚发育成幼苗; 随着在液体培养基中培养时间的延长, 成苗率逐渐下降, 培养 35 d 的子叶胚成苗率仅有 8.5%; 而在液体培养基中培养 40 d 的胚转到 MS 培养基上成苗率为 0。这一结果表明, 及时将成熟的子叶形胚转移至再生培养基上, 对提高植株获得率至关重要。

参考文献:

- 1 Sato T, Nishio T, Hirai M. Plant regeneration from isolation microspore of Chinese cabbage (*B. rassaica campestris* ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep.*, 1989, 8: 486 ~ 488
- 2 刘 凡, 李 岩, 姚 磊, 曹鸣庆. 培养基水分状况对大白菜小孢子胚成苗的影响. *农业生物技术学报*, 1997, 5 (2): 131 ~ 136
Liu F, Li Y, Yao L, Cao M Q. Effects of water state in culture medium on germination and growth of microspore-derived embryos of Chinese cabbage (*B. rassaica campestris* ssp. *pekinensis*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1997, 5 (2): 131 ~ 136 (in Chinese)
- 3 申书兴, 梁会芬, 张成合, 王文雅, 刘世雄, 李振秋, 王东平, 郭英华. 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. *河北农业大学学报*, 1999, 22 (4): 65 ~ 68
Shen S X, Liang H F, Zhang C H, Wang W Y, Liu S X, Li Z Q, Wang D P, Guo Y H. The studies on formation of microspore embryo and plantlet in Chinese cabbage. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 1999, 22 (4): 65 ~ 68 (in Chinese)



图版说明: 大白菜小孢子胚成苗过程 1. 小孢子培养 3 周后形成的胚状体; 2. 发育不同步的胚状体; 3. 小孢子胚发育成正常幼苗; 4. 移栽成活的小孢子植株; 5. 胚状体的胚根伸长, 胚芽不生长而发生褐化; 6. 胚状体愈伤组织化, 但胚根发育为正常根系。

Explanation of plates: Process of development of embryos microspores in Chinese cabbage 1. Embryos after microspores culture for three weeks; 2. Embryos in various developmental stages; 3. A regenerated plantlet; 4. A regenerated plant transferred to the pot; 5. Radicles grew and plumules browned; 6. Embryos formed calli and radicles developed root systems