

# 羽衣甘蓝游离小孢子培养技术研究及应用

冯 辉<sup>1\*</sup>, 姜凤英<sup>1,2</sup>, 冯建云<sup>1</sup>, 王超楠<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161; <sup>2</sup> 辽宁省农业科学院花卉研究所, 沈阳 110161)

**摘 要:** 以 10 个羽衣甘蓝杂交种为试材进行游离小孢子培养, 研究胚状体发生和小孢子胚成苗的影响因素, 以及小孢子植株倍性鉴定和单倍体加倍方法。结果表明, 盛花期为最佳取样时期; 培养基中 13% 的蔗糖较为适宜; 继代培养以  $MS + 6-BA\ 2\ mg \cdot L^{-1} + NAA\ 0.1\ mg \cdot L^{-1}$  为宜, 平均增殖系数为 5.06; 小孢子再生植株成活率 74.6%; 小孢子植株自然加倍率为 23.33% ~ 37.50%; 单倍体试管苗的加倍处理以秋水仙素浓度  $70\ mg \cdot L^{-1}$ , 处理时间 9 ~ 11 d 为宜, 加倍率达 54.55%。

**关键词:** 羽衣甘蓝; 小孢子培养; 加倍单倍体

中图分类号: S 635 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 04-1019-04

## Establishment and Application of the System for Isolated Microspore Culture in Kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.)

FENG Hui<sup>1\*</sup>, JIANG Feng-ying<sup>1,2</sup>, FENG Jian-yun<sup>1</sup>, and WANG Chao-nan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; <sup>2</sup> Floriculture Institute of Liaoning Academy of Agricultural Science, Shenyang 110161, China)

**Abstract:** Isolated microspore culture was carried out by ten hybrids of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.). The frequency of embryogenesis, embryos germinated plantlets, ploidy identification of microspores-derived plantlets and chromosome doubling techniques for haploid plantlets were studied. The results showed that the buds in flourishing florescence were the best for the purpose of microspore culture. The sucrose content of 13% was optimal in medium.  $MS + 6-BA\ 2\ mg \cdot L^{-1} + NAA\ 0.1\ mg \cdot L^{-1}$  was optimal medium for subculture and the average propagation quotient reached 5.06. The survival rate of microspore-derived plantlets reached 74.6%. The DH plants rate of spontaneous was in the range of 23.33% - 37.50%. The treatment of  $70\ mg \cdot L^{-1}$  colchicine for 9 - 11 d was optimal for haploid seedlings and led to 54.55% doubled haploid plantlets.

**Key words:** Kale; *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.; Microspore culture; Doubled haploid

自 Litcher (1989) 首次进行羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) 小孢子培养以来, 其培养体系仍停留在诱导胚状体发生和获得再生植株阶段 (Duijs et al, 1992; 汤清林 等, 2000; 姜凤英和冯辉, 2005), 加倍单倍体 (DH) 迄今还未见有报道。作者以引自日本的 10 个优良羽衣甘蓝  $F_1$  代杂种为试材, 通过游离小孢子培养体系的优化, 首次获得了加倍单倍体植株, 为选育羽衣甘蓝新品种奠定了基础。

## 1 材料与方法

10 个引自日本的羽衣甘蓝  $F_1$  代杂交种: ‘红鸠’, ‘白鸠’, ‘红欧’, ‘白欧’, ‘青汁ケ４ル’,

收稿日期: 2007 - 01 - 15; 修回日期: 2007 - 05 - 08

基金项目: 国家 ‘863’ 项目 (20060110Z1072); 国家自然科学基金项目 (30671414)

\* E-mail: fenghuiaaa@263.net; Tel: 024-88487143

‘圆叶红心’，‘圆叶白心’，‘皱叶红心’，‘皱叶白心’和‘皱叶玫红’。7月中旬穴盘育苗，8月中下旬分盆，11月移到温室进行长光照处理，花期取材。

花期选取处于单核晚期和双核早期的羽衣甘蓝花蕾（长度 3.0~4.5 mm），用于分离、纯化小孢子。纯化后用 NLN-13 培养液稀释密度至  $1 \sim 2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ ，以每皿 2.5 mL 小孢子悬浮液分装入直径 60 mm 的培养皿内，石蜡膜封口，先在 33℃ 恒温箱中热激处理 1 d，再转至 25℃ 下静置暗培养。2~3 周后观察胚状体发生情况。

将子叶形胚状体转入 MS 固体成苗培养基中，以琼脂浓度调节培养基中水分含量，蔗糖浓度为 3%，pH 5.8，在光照培养室中培养，30 d 继代 1 次。

将在成苗培养基上长成幼苗的再生小植株，于无菌条件下去除大叶片，取长 2~3 cm 的顶芽或腋芽部分，移入 MS 固体培养基上，添加不同浓度配比的 6-BA 和 NAA，蔗糖 3%，琼脂 0.8%，pH 5.8，25℃ 光照培养，30 d 后统计增殖情况。经多次继代培养后获得一定数量的试管苗，经生根诱导后，移栽成活即获得小孢子再生植株。

采用根尖细胞有丝分裂染色体计数及花粉母细胞减数分裂染色体计数，对再生植株进行倍性鉴定。将单倍体试管苗转接在添加不同浓度秋水仙素的 MS 固体培养基上，继续培养 5~9 d 进行加倍处理，以提高加倍单倍体植株获得率。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因型及培养条件对小孢子胚诱导的影响

在 NLN-13 基本培养基上，小孢子经培养 2~3 周后，‘红欧’、‘圆叶红心’、‘圆叶白心’、‘皱叶红心’和‘皱叶白心’5 个品种获得了胚状体，占供试材料的 50%。其中‘圆叶红心’胚状体诱导率最高，达 0.73 胚·蕾<sup>-1</sup>；‘红欧’胚诱导率最低，只有 0.10 胚·蕾<sup>-1</sup>。方差分析结果表明，不同基因型材料之间小孢子胚诱导率存在显著差异。取样时期以盛花期最佳，初花期次之，末花期取样没有获得胚状体。培养基蔗糖浓度试验结果表明，13% 的蔗糖浓度较为适宜，16% 的蔗糖浓度次之，10% 的蔗糖浓度不适宜羽衣甘蓝小孢子培养。

### 2.2 胚状体的发育

同一皿中胚状体的发育是不同步的，有子叶形胚、鱼雷形胚、心形胚、球形胚、畸形胚和萌发胚。在成苗培养基上，部分萌发胚、子叶形胚与种子萌发一样，子叶转绿，胚根伸长，胚轴也很快伸长，进一步发育成具有真叶的小植株。鱼雷形胚有两条成苗途径：一是胚根伸长，子叶萌发，与子叶形胚状体成苗相似；另一种是经脱分化后，形成绿白致密的愈伤组织，再分化成幼苗。另有部分萌发胚、子叶形胚和鱼雷形胚胚根伸长，但胚芽不生长而是发生褐化，得不到小植株。心形胚和球形胚转接后，大部分胚状体颜色变褐而死亡，少部分能分化成苗。

### 2.3 试管苗的继代培养

以‘皱叶红心’试管苗为材料，筛选羽衣甘蓝继代培养的适宜培养基，结果见表 1。在不加植物生长调节剂的培养基中，顶（腋）芽只有其本身的芽形成小植株，均未有幼芽的分化；在添加少量植物生长调节剂的培养基中，增殖系数不高，达到 3.00 左右；而当细胞分裂素浓度与生长素的比例适宜时，增殖系数达到 5.00 左右，最高可达 6.13。对各培养基的平均增殖系数进行邓肯

表 1 6-BA 和 NAA 对羽衣甘蓝继代增殖的影响  
Table 1 Effects of 6-BA and NAA on propagation of kale

6-BA (mg · L <sup>-1</sup> )	NAA (mg · L <sup>-1</sup> )	平均增殖系数 Average propagation frequency	分化情况 Differentiation situation
0	0	1.00fF	无幼芽分化 No sprout differentiation
2	0	2.84eE	丛状 Bush fom
2	0.02	3.12dD	丛状 Bush fom
2	0.05	4.47cC	丛状 Bush fom
2	0.10	5.06bB	丛状 Bush fom
2	0.20	6.13aA	聚丛状 Poly-bush fom

氏新复极差测验，不同处理之间存在极显著差异，6-BA 2 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup>虽然增殖率最高，但从生芽苗长势细弱，呈聚丛状，不利于壮苗培养。羽衣甘蓝继代适宜培养基为 MS + 6-BA 2 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup>，平均增殖系数为 5.06。

2.4 试管苗的移栽

4个品种小孢子植株移栽成活情况见表 2。各品种小孢子植株移栽成活率有一定差异。‘皱叶红心’和‘圆叶红心’的成活率较高，分别达 78.9% 和 75.0%；‘红欧’的移栽成活率最低，仅为 66.7%。

2.5 染色体自然加倍

通过植株形态观察和花粉母细胞染色体计数，对 67 个小孢子植株倍性进行了鉴定，结果见表 3。供试的 4 个品种的小孢子植株倍性差别较大。6 个‘红欧’的小孢子植株均为单倍体；7 个‘皱叶白心’的小孢子植株均为加倍单倍体；‘皱叶红心’和‘圆叶红心’的小孢子植株有多种倍性植株出现。

表 2 基因型对小孢子植株移栽成活的影响  
Table 2 Effect of genotypes on the survival rate of microspore-derived plantlets in kale

品种 Variety	移栽株数 Number of trans- planted plantlets	成活株数 Number of survival plantlets	成活率 Survival rate (%)
红欧 Hong'ou	9	6	66.7
圆叶红心 Yuanyehongxin	32	24	75.0
皱叶红心 Zhouyehongxin	147	116	78.9
皱叶白心 Zhouyebaixin	10	7	70.0

表 3 小孢子植株的倍性分布  
Table 3 Spontaneous ploidy induction of the microspore-derived plants in kale

品种 Variety	鉴定植株 Plants	单倍体 Haploid plants	加倍单倍体 DH plants	高倍体 Polyploid plants	嵌合体 Chimeric plants	自然二倍化率 Rate of spontaneous diploidization (%)
红欧 Hong'ou	6	6	0	0	0	0.00
圆叶红心 Yuanyehongxin	24	6	9	2	1	37.50
皱叶红心 Zhouyehongxin	30	17	7	4	2	23.33
皱叶白心 Zhouyebaixin	7	0	7	0	0	100.00

由表 4 可知，秋水仙素浓度为 100 mg · L<sup>-1</sup> 时对试管苗的毒害作用较大，处理 5 d 的试管苗死亡率已达到 45.45%，处理 11 d 试管苗全部死亡。秋水仙素浓度为 70 mg · L<sup>-1</sup>，处理时间为 9 d 较为适宜，加倍率达到 54.55%；其次为 70 mg · L<sup>-1</sup>，处理 11 d，加倍率 44.44%。

表 4 秋水仙素浓度和处理时间对单倍体加倍的影响  
Table 4 Effect of colchicine concentration and duration on ploidy induction of haploid plantlets

秋水仙素 Colchicine		处理苗数	幼苗死亡率	染色体加倍频率
处理浓度 Concentration (mg · L <sup>-1</sup> )	处理时间 Duration (d)	Number of treated plantlets	Death rate of plantlets (%)	Efficiency of chromosome doubling (%)
0	0	15	13.33	15.38
40	5	12	16.67	20.00
40	7	16	18.75	23.08
40	9	13	23.08	30.00
40	11	8	25.00	33.33
70	5	11	18.18	22.22
70	7	14	21.43	36.36
70	9	15	26.67	54.55
70	11	13	30.77	44.44
100	5	11	45.45	33.33
100	7	11	63.64	50.00
100	9	11	81.82	50.00
100	11	12	100.00	-

### 3 讨论

基因型对甘蓝类植物小孢子胚状体的发生有较大影响。张德双等 (1998) 在 13 个绿菜花供试材料中发现只有 8 种基因型有胚胎发生, 并获得了 5 种基因型再生植株。本试验以 10 个羽衣甘蓝品种为材料, 有 5 个基因型的胚状体诱导获得成功, 并获得 4 种基因型再生植株。可见, 并不是所有的基因型都可以通过游离小孢子培养的方法获得小孢子胚。

小孢子植株移栽成活能力与植株的倍性有关。单倍体幼苗由于长势较弱, 移栽不易成活; 多倍体和嵌合体植株发育不良, 移栽成活率也较低。

在甘蓝型油菜小孢子培养初期, 用添加低剂量秋水仙素的 NLN 液体培养基进行短期培养, 可以获得较好的加倍效果 (Zaki & Dickinson, 1995; Zhou & Hagberg, 2000; 周伟军 等, 2002)。Mathias 和 Robbelen (1991)、石淑稳等 (2002) 对甘蓝型油菜小孢子植株试管苗进行加倍处理, 获得了 50% 和 80% 左右的加倍率。截止目前, 羽衣甘蓝小孢子植株试管苗加倍处理还未见报道。本试验用含秋水仙素的固体培养基处理单倍体试管苗, 其二倍化频率达 54.55%。

### References

- Duijs J G, Voorrips R E, Visser D L, Custers J B M. 1992. Microspore culture is successful in most types of *B. nassica oleracea* L. *Euphytica*, 60: 45 - 55.
- Lichter R. 1989. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *B. nassicaeae* species. *Plant Breeding*, 103: 119 - 123.
- Jiang Feng-ying, Feng Hui. 2005. Embryogenesis and plant regeneration of ornamental kale via isolated microspore culture. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (5): 884. (in Chinese)
- 姜凤英, 冯 辉. 2005. 羽衣甘蓝游离小孢子培养初报. *园艺学报*, 32 (5): 884.
- Mathias R, Robbelen G. 1991. Effective diploidization of microspore-derived haploids rape, *B. nassica napus* L. by *in vitro* colchicines treatment. *Plant Breeding*, 106: 82 - 84.
- Shi Shu-wen, Wu Jiang-Sheng, Zhou Yong-ming, Liu Hou-li. 2002. Diploidization techniques of haploids from *in vitro* culture microspores of rapeseed (*B. nassica napus* L.). *Chinese Journal of Crop Sciences*, 24 (1): 1 - 5. (in Chinese)
- 石淑稳, 吴江生, 周永明, 刘后利. 2002. 甘蓝型油菜小孢子单倍体二倍化技术的研究. *中国油料作物学报*, 24 (1): 1 - 5.
- Tang Q ing-lin, Song Ming, Zhang Zhong-ling. 2000. The advances of studies on isolated microspore culture in cole crops. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 13 (3): 98 - 103. (in Chinese)
- 汤清林, 宋 明, 张钟灵. 2000. 甘蓝类蔬菜游离小孢子培养研究进展. *西南农业学报*, 13 (3): 98 - 103.
- Zhang De-shuang, Cao Ming-qing, Qin Zhi-wei. 1998. Embryogenesis and plant regeneration of broccoli via isolated microspore culture. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 13 (3): 102 - 106. (in Chinese)
- 张德双, 曹鸣庆, 秦智伟. 1998. 绿菜花游离小孢子培养、胚胎发生和植株再生. *华北农学报*, 13 (3): 102 - 106.
- Zaki M, Dickinson H. 1995. Modification of cell development *in vitro*: The effect of colchicines on anther and isolated microspore culture in *B. nassica napus*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 40: 255 - 270.
- Zhou W J, Hagberg P. 2000. High frequency production of doubled haploid rapeseed plants by direct colchicine treatment of isolated microspore. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 26 (2): 125 - 126.
- Zhou Wei-jun, Tang Gui-xiang, Zhang Guo-qing, Hagberg P. 2002. Studies on efficient production of doubled haploid plants by colchicine treatment in microspore culture of *B. nassica napus*. *Scientia Agricultura Sinica*, 35 (4): 410 - 414. (in Chinese)
- 周伟军, 唐桂香, 张国庆, Hagberg P. 2002. 甘蓝型油菜小孢子秋水仙碱处理提高双单倍体频率研究. *中国农业科学*, 35 (4): 410 - 414.