

甘蓝型油菜与青花菜种间杂种子房离体培养研究

唐 征^{1,2}, 刘 庆², 张小玲², 罗天宽², 胡彩英²

(¹ 浙江大学农业与生物技术学院, 浙江杭州 310027; ² 温州市农科院生物所, 浙江温州 325006)

摘要: 利用子房离体培养的方法克服了甘蓝型油菜与青花菜杂种后代杂种胚的衰亡, 并通过组织培养技术获得了杂交后代。试验结果表明: 授粉后 15d 的子房离体培养效果最好, 获得 7 粒饱满种籽, 其中 2 粒发芽, 发芽率为 0.29; 1/2MS+B5 有机 + IAA 1.5mg/L + 蔗糖 50g/L 为最佳的子房离体培养基, 平均每个角果可得到杂种 0.17 粒, 杂种发芽率可达 66.7%; 通过比较父母本和杂交后代性状, 发现杂交后代的生物学性状偏向父本。

关键词: 远缘杂交; 子房离体培养; 组织培养; 性状比较

中图分类号: S336 **文献标识码:** A

In vitro Culture of Interspecific Hybrid Ovaries on *Brassica napus* and *Brassica oleracea* L. var. *italica* Phenck

Tang Zheng^{1,2}, Liu Qing², Zhang Xiaoling², Luo Tiankuan², Hu Caiying²

(¹ Department of Agronomy and bio-technology, Zhejiang University, Hangzhou 310027;

² Institute of Biotechnology, Academy of Agricultural Sciences, Wenzhou 325006)

Abstract: Interspecific hybrid of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* L. var. *italica* Phenck was obtained by in vitro tissue culture of ovaries. The best data of in vitro culture of ovaries, which was pollinated 15 days ago, resulted in 7 full seeds (including 2 sprouts) and a germination rate of 29%. The most appropriate culture medium was 1/2MS+B5 organic + IAA 1.5mg/L + sucrose 50g/L on which we had average 0.17 hybrid seeds per legume and a germination rate of 66.7%. We drew a conclusion that biological characters of this interspecific hybrid were mostly similar to those of male parent in comparison with both parents.

Key words: Distant hybridization, In vitro Culture of ovaries, Tissue culture, Comparison of characters

青花菜俗称西兰花, 原产于地中海东部沿岸地区, 为十字花科, 甘蓝的一个变种, 营养丰富, 风味极佳, 是一种高档的营养和保健蔬菜。由于青花菜适应性广, 容易栽培, 供应期长, 近年来我省青花菜的种植面积逐年增加, 成为主要的出口创汇蔬菜。青花菜在我国栽培时间短, 我国在青花菜育种方面的工作处于极端落后的位置, 极大的限制了我国青花菜产业的发展。青花菜生产用种大多是从日本, 美国等国进口而来。生产用的青花菜多为杂种一代, 由人工杂交或优良的自交不亲和系杂交而成; 但人工杂缴费工费时, 制种成本高, 而且

种子质量不稳定; 自交不亲和系亲本繁殖难度大, 亲本多代自交退化, 种子质量也难以保证。利用雄性不育系配制一代杂种, 可以克服以上两种途径的缺点, 制种成本低, 种子纯度高, 已成为育种的一大趋势。本试验试图通过对基本培养基、杂种子房发育天数对甘蓝型油菜×青花菜种间杂种离体子房发育影响的研究, 探讨甘蓝型油菜×青花菜种间杂种子房离体培养的最佳技术, 以及种间杂交苗组织培养技术, 为克服甘蓝型油菜×青花菜种间杂交不孕, 成功转育青花菜细胞质不育系找到有效方法, 为青花菜雄性不育系的利用打下

基金项目: 浙江省温州市重点科研项目“利用远缘杂交转育青花菜细胞质雄性不育系的研究”(N2005A003)。

第一作者简介: 唐征, 男, 1971 年出生, 江西奉新人, 浙江大学在读硕士研究生, 农艺师, 主要从事蔬菜育种和生物技术研究。先后发表论文近 20 篇。通信地址: 325006 浙江省温州市新桥街 1 号温州市农科院生物所。Tel: 0577-86181080, E-mail: tzheng05@163.com。

收稿日期: 2006-07-18, 修回日期: 2006-07-18。

基础。

1 材料与方法

1.1 材料

甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 细胞质雄性不育系, 青花菜 (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Phenck) 自交系 2004426B, 两个材料均于 2004 年 9 月种植于温州市农科院试验场。

1.2 试验方法

1.2.1 远缘杂交 以甘蓝型油菜雄性不育系为母本, 青花菜自交系 2004426B 为父本配制种间杂交组合。于 2005 年 2 月开花前 1~2d 人工辅助授粉。

1.2.2 子房离体培养 剪取授粉后的子房, 用 70% 酒精浸泡 1min, 再用 0.1% 的升汞消毒 15min, 然后用无菌水冲洗 4 次, 接种在不同的培养基中。培养 30d 后, 在超净工作台上剥取杂种种子, 接种在无激素的 MS 培养基上, 20d 后统计发芽种子数。

基本培养基试验: (I) 1/2MS+B5 有机 +IAA1.5mg/L+ 蔗糖 50g/L; (II) MS+B5 有机 +IAA1.5mg/L+ 蔗糖 50g/L; (III) White+VB60.5mg/L+VB10.5 甘氨酸 15mg/L+ 烟酸 2.5mg/L+ IAA1.5mg/L+ 糖 50g/L, 培养基加琼脂 0.8%, pH5.8。

授粉后子房不同发育天数试验: 以 (II) 为培养基, 对授粉后 3、6、9、12、15、18、21d 的杂种子房进行离体培养。

1.2.3 增殖培养 当无激素的 MS 培养基上的杂交苗长到 1cm 左右, 切取顶芽, 接种到 (IV) MS+BA0.2 mg/L+2,4-D0.2 mg/L+NAA0.001 mg/L, 琼脂 0.7%, pH5.8 培养基上进行增殖培养, 25d 后统计增殖倍数。

1.2.4 生根培养 经增殖培养后, 杂交苗已达到较大的群体数量, 切取正常、健壮的植物接种到 (V) 1/2MS+NAA0.01 mg/L, 琼脂 0.7%, pH5.8 培养基上进行生根培养, 20d 后考察生根情况。

1.2.5 试管苗移栽 组培苗根长到 1.5cm 时, 选生根整齐的瓶苗移栽, 25d 后考察成活情况。

1.2.6 分别在苗期、结球期和花期考察杂交后代及两亲本性状 培养室温度: $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 每天 12h40 瓦日光灯补充光照。

2 结果与分析

2.1 子房发育天数对杂种子房离体培养的影响

授粉不同天数的子房接种在培养基上培养 30d 后, 剥取所有肉眼可见的杂种种子, 接种在无激素的 MS 培养基上培养, 20d 后统计发芽种子数。结果表明

表 1 子房发育天数对杂种子房离体培养的影响

授粉后天数	接种子房数	饱满种子数	平均每角果种子数	发芽种子数	种子发芽率%
3	40	0	0	0	0
6	60	0	0	0	0
9	54	0	0	0	0
12	48	1	0.02	0	0
15	48	7	0.15	2	0.29
18	48	1	0.02	0	0
21	36	0	0	0	0

(见表 1), 授粉后 15d 的子房有杂种种子发芽, 授粉后 12d 和 18d 都能得到少量饱满种子, 但都没有发芽, 3~9d 的子房和授粉后 21d 的子房离体培养都没有获得杂种种子。可见授粉后时间太短或太长进行离体培养, 都不利于获得杂种种子。授粉后时间太短进行子房的离体培养, 效果不好, 可能是因为子房与胚的早期发

育对营养条件要求很严格, 简单的培养基无法满足其要求, 因此难以获得杂种种子; 而授粉后时间过于延长杂种核与卵细胞质的代谢, 或杂种胚胎与胚乳的发育不协调性增强, 导致了杂种胚的败育, 无法挽救。因此, 应该适时地将杂种子房进行离体培养, 提供适宜的营养环境及发育的外界环境可能有利于降低这种代谢的

表 2 培养基对甘蓝型油菜 × 青花菜离体子房发育的影响

培养基	接种子房数	饱满种子数	平均每角果种子数	发芽种子数	种子发芽率%
I	36	6	0.17	4	66.7
II	36	0	0	0	0
III	36	5	0.14	2	40.0

不协调性。

2.2 培养基对甘蓝型油菜 × 青花菜离体子房发育的影响

将授粉后 15d 的子房接种在 I、II 和 III 培养基上培养, 30d 后剥取所有肉眼可见的杂种种子, 接种在无激素的 MS 培养基上培养, 20d 后统计发芽种子数 (表 2)。从表 2 可以看出, 在 III 和 I 培养基上获得的饱满杂

种种子数相差不大 (平均每角果种子数分别为 0.14 和 0.17), 但杂种种子发芽率差别很大。在 III 培养基上获得的饱满种子 5 粒, 能发芽的种子只有 2 粒, 发芽率为 40.0%, 在 I 培养基上获得的 6 粒种子 4 粒发芽, 发芽率达到 66.7%。由此可见, 在 I 培养基上发育的种子活力要比 III 培养基上的种子强; 在 II 培养基上未获得能发芽的种子, 也未获得较饱满的种子, 说明高离子浓度

的培养基不适合甘蓝型油菜×青花菜种间杂种子房离体培养,1/2MS培养基较适合于甘蓝型油菜×青花菜种间杂种子房离体培养。

2.3 继代增殖培养

当子房离体培养获得的杂交后代在MS₀上长到1cm左右,切取顶芽接种到IV培养基(琼脂0.7%,pH5.8)上进行增殖培养,几天后顶芽基部先形成愈伤组织,以后陆续分化形成不定芽,不定芽形成正常苗后,可以转接到生根培养基上生根,也可以切成带一叶的茎段和顶芽继续扩大增殖,茎段的腋芽会萌动出芽,其基部和顶芽的基部也会分化出不定芽。用这种方式增殖,每隔25d可增殖5倍。

2.4 试管苗的生根

经过继代增殖培养后,无根苗已经达到了较大的群体数量,即可切取正常、健壮的植株接种到V培养基(琼脂0.7%,pH5.8)上进行生根培养,20d后调查统计,生根率可达98%以上,且根短、较粗壮。

2.5 试管苗的移栽

组培苗根长到1.5cm时,选生根齐整的瓶苗移栽,移栽前,先在阳光较弱的地方放两天,然后把瓶盖打开,放入室内,注意保湿,两天后移入1/3珍珠岩+1/3火泥灰+1/3田园土基质中,用多菌灵可湿性粉剂800倍液浇透杀菌,以后隔十天再浇一次;前一个星期用透光率50%遮荫网盖两层遮荫保湿,每隔一小时用喷壶喷雾保湿一次,以后逐渐减少遮荫的时间和喷雾的次数,25d后就可定植到大田,成活率可达95%以上。



青花菜(父本)



杂交后代



甘蓝性油菜(母本)

图1 杂交后代和父母本苗期性状比较

2.6 种间杂交后代和亲本性状比较

2.6.1 苗期(如图1)

父本:主茎明显,节间较长,蜡质厚,叶色墨绿;

杂交后代:主茎明显,节间较长,蜡质厚,叶色比父本稍淡;

母本:株形散,主茎不明显,节间短缩,叶片丛生,



青花菜(父本)



杂交后代



甘蓝性油菜(母本)

图2 杂交后代和父母本结球期性状比较

蜡质少,叶色青绿。

2.6.2 结球期(如图2)

父本:株形紧凑,花球大,主茎明显,节间较长,叶柄短,附叶少,蜡质厚,叶色墨绿;

杂交后代:株形紧凑,有明显花球,主茎明显,节间较长,叶柄短,附叶少,蜡质较厚,叶色比父本稍淡;

母本:株形散,主茎不明显,节间短缩,叶片丛生,叶柄长,附叶多,蜡质少,叶色青绿,无花球。



左 2:青花菜(父本) 中 2: 杂交后代 右 2: 甘蓝性油菜(母本)

图 3 杂交后代和父母本花性状比较

2.6.3 花(如图3)

父本:花瓣和柱头正常,蜜腺发达,雄蕾长,花药饱满,花粉多,花瓣颜色淡黄;

杂交后代:花瓣和柱头正常,蜜腺发达,雄性不育(经套袋自交和镜检鉴定),雄蕾退化短缩(长度位于父母本之间),花药透明干瘪,花瓣颜色位于父母本之间;

母本:花瓣和柱头正常,蜜腺发达,雄性不育(经套袋自交和镜检鉴定),雄蕾退化短缩,花药透明干瘪,花瓣颜色黄色。

3 讨论

芸薹属种间及近缘属间杂种的子房离体培养技术已多有报道,巩振辉^[1]等在进行白菜×白芥属间杂种子房培养时,发现授粉后6~10d的杂种子房离体培养最好,获得的杂种种子最多,种子发芽率也最高。张小玲^[2]等在研究甘蓝型油菜与花椰菜子房离体培养时,发现12d左右的杂种子房效果最好。本试验结果表明,甘蓝型油菜与青花菜种间杂种子房离体培养以授粉15d效果较好。这可能是不同作物属间杂种与种间杂种的发育对环境条件的要求不同。

Inomata^[3]在进行小白菜与羽衣甘蓝的种间杂种子房离体培养时,认为在White、Heller、Nitsch和MS培养基中,MS培养基效果最好。而梁红^[4]等在白菜与甘蓝的种间杂交子房培养时,在White培养基获得良好

的效果,本试验表明MS培养基与White培养基相比,MS培养基更适合甘蓝型油菜。青花菜种间杂种子房离体培养,可能是MS培养基无机盐种类较全,1/2MS比MS培养效果,说明低离子浓度有利于甘蓝型油菜×花椰菜种间杂种子房的发育与杂种种子的形成。

利用杂交授粉后子房离体培养的方法克服了甘蓝型油菜与青花菜杂种后代杂种胚的衰亡,并通过组织培养技术获得了杂交后代,比较杂交后代和父母本性状,发现杂交后代的性状介于两亲本之间,较偏父本。与梁红^[4]在研究白菜与甘蓝种间杂交得到的结论一致。

参考文献

- [1] 巩振辉,何玉科,王鸣.白菜×白芥属间杂种子房培养技术研究.园艺学报,1995,22(3):245~250
- [2] 张小玲,刘庆.甘蓝型油菜与花椰菜种间杂种子房离体研究初报.中国农学通报,2006,(5):316~318
- [3] Inomata N. Production of hybrids in *Brassic campestris* × *B.oleracea* by culture in vitro of excised ovaries.I. Development of excised on various culture media. Japen J Breed .1979,29(2):115~120
- [4] 梁红,冯午.白菜与甘蓝的种间杂交及其杂种后代的研究.园艺学报,1990,17(3):203~210

(责任编辑:秦守亮)