



甘蓝花药培养胚状体诱导形成影响因子研究

张恩慧, 欧承刚, 许忠民, 程永安

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西杨陵 712100)

摘要: 用甘蓝 F_1 、 F_2 和自交系 S_3 3 个世代 6 种基因型材料进行甘蓝花药培养诱导胚状体形成影响因子研究。结果显示: (1) 高浓度蔗糖对甘蓝胚状体形成具有显著的诱导作用, 6% 蔗糖浓度是甘蓝花药培养的最适浓度, 其胚状体的诱导率最高达 12.2%; (2) 材料基因型是影响花药培养的主要因素, F_2 和 F_1 代材料胚状体诱导效果好, 且胚状体诱导率 F_2 代(F_2 P192 和 F_2 P194) 18.9% 比 F_1 代(F_1 S17 和 F_1 S13) 17.1% 较高, 但差异不显著, 自交系 S_3 代材料很难诱导出胚状体; (3) B_5 培养基比 MS 培养基更适合甘蓝花药胚状体的诱导培养。结果表明, 甘蓝 F_2 代是其花药诱导培养胚状体的最佳基因型材料, $B_5 + 2.0$ mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L KT + 6% Suc 是甘蓝花药诱导培养胚状体的最适培养基。

关键词: 甘蓝; 花药; 组织培养; 诱导; 胚状体

中图分类号: Q813.1; S635 **文献标识码:** A

Factors Affecting Embryoid Induction and Formation of Cabbage Anthers in Culture

ZHANG En-hui, OU Cheng-gang, XU Zhong-min, CHENG Yong-an

(College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Six genotypes in three generations, cabbage F_1 and F_2 and inbred S_3 were used in anther culture to study the factors affecting embryoid induction and formation of cabbage anthers in culture. It was shown that (1) high sucrose concentration exerted significant inductive effect on embryoid formation and the optimum sucrose concentration of cabbage anther culture was 6% and the embryoid induction rate reached as high as 12.2% at this sucrose concentration; (2) The genotypes of the materials were the major factor affecting cabbage anther culture and the materials in cabbage F_1 and F_2 performed better in embryoid induction and the embryoid induction rate in F_2 (F_2 P192 and F_2 P194) was 18.9%, higher but not significantly than the embryoid induction rate of 17.1% in F_1 (F_1 S17 and F_1 S13) and the inbred materials in S_3 were difficult to be induced to produce embryoids; (3) B_5 medium was more suitable to induce cabbage anthers to produce embryoids in culture than MS medium. These indicated that cabbage materials in F_2 were the best materials for embryoid induction of cabbage anthers in culture and the optimal medium for embryoid induction of cabbage anthers was $B_5 + 2.0$ mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L KT + 6% sucrose.

Key words: cabbage; anther; tissue culture; induction; embryoid

结球甘蓝 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) 是世界各国普遍栽培的一种主要蔬菜。甘蓝属 2 年生异花授粉作物, 其杂种优势明显, 到目前为止, 生

产上使用的优良品种几乎全为自交不亲和系作亲本配制的一代杂种^[1]。但采用多代自交分离纯化选育自交不亲和系配制一代杂种,这种方法纯合速度慢,而且连续自交多代后存在植株衰退现象^[2]。采用细胞工程技术,进行甘蓝花药培养和单倍体育种研究,能够为优良种质资源获得和培育一代杂种新品种创建一条新的有效途径。近年来,花药培养技术发展迅速,成为世界各国开展植物育种和作物改良的重要手段。胡道芬^[3](1995)报道,自1964年印度Guba和Maheshwari首次从毛叶曼陀罗(*Datura innoxia* Mill.)花药培养中获得单倍体植株以来,花培技术已经在多种植物上得到单倍体植株;我国通过花培育种与常规育种紧密结合已育成如小麦^[4]‘京花1号’、水稻^[3]‘中花8号’、玉米^[5]‘桂三1号’、甜椒^[6]‘海花3号’等花培新品种。Kameya^[7](1970)离体培养青花菜(*B. oleracea* var. *italica*)获得花粉植株,但由愈伤组织分化的小植株的倍性往往不稳定。Keller^[8](1981)首次报道了羽衣甘蓝(*B. oleracea* var. *acephala*)花药培养的成功。Gorecka^[9](1997)通过花药培养获得结球甘蓝的纯合系。国内在甘蓝类方面报道甚少,陈世儒^[10](1991)、王怀名^[11](1992)通过皱叶甘蓝和花椰菜花药培养获得单倍体植株。在国内外的报道中,花药培养中花粉胚状体形成诱导率相对较低,对单倍体植株获得产生了一定困难。为此本研究选用甘蓝不同基因型材料,在前人工作基础上针对甘蓝花药培养中诱导花粉胚状体形成的几个主要因素进行研究,为建立高效的甘蓝花药培养胚状体诱导体系奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验选用西北农林科技大学园艺学院正在选育的6种甘蓝育种材料,其中S₃P67HZ、S₃P2022为自交三代的自交系,F₁S17、F₁S13为F₁代品种,F₂P192、F₂P194为F₂代品种。实验材料均于2003年8月定植于园艺学院试验地,常规管理;11月20日将植株材料连根挖起,冬季贮存地窖中假植覆盖越冬;2004年3月15日将植株材料重新定植至纱网棚,4月中旬植株抽薹现蕾后分别取6种甘蓝育种材料花蕾进行花药培养。

1.2 方 法

分别采摘供试材料植株一级分枝的幼花序置于冰箱(4℃)进行预处理3d。然后选取蕾长1.5~2.0mm花蕾,即镜检花药小孢子处于单核靠后期

的花蕾接种。将经过低温预处理的材料用70%酒精浸泡消毒10s,然后浸入0.1%升汞(HgCl₂)溶液中,消毒10min后再用无菌水冲洗4次,即可用于接种。接种时,先将花蕾置于垫有经过消毒的滤纸的培养皿中,吸去多余水分,用镊子剥开花蕾,取下花药接种。实验选在B₅+2.0mg/L 2,4-D+2.0mg/L KT的培养基中,设蔗糖3%、6%和10%3种浓度下接种6个基因型材料花药,或在MS和B₅中加2.0mg/L 2,4-D+2.0mg/L KT进行花药培养诱导胚状体。培养基均用0.8%琼脂固化,pH5.8,在1.2kg/cm²压力下灭菌20min。接种后先在30℃高温下暗培养3d,再转入温度为25~28℃、光强3000~4000lx、光照时间为12h的光培养室进行培养。

诱导出的胚状体转移到蔗糖浓度为3.0%、pH5.8的1/2MS+1.0mg/L BA+1.0mg/L KT+0.1mg/L NAA分化培养基上进行芽分化培养;分化芽切下转移到生根培养基1/2MS+2.0mg/L KT+0.1mg/L NAA+0.8% Agar中诱导生根,待分化的绿苗长到2~3片叶,根长1~2cm时,取出移栽到装有灭过菌的无机基质的聚丙烯组织培养瓶中炼苗1~2周后移栽到装有培养土的钵中正常管理,待幼苗长大后定植露地。

2 结果与分析

2.1 不同蔗糖浓度对胚状体形成诱导的影响

由表1可以看出,供试材料花药在B₅+2.0mg/L 2,4-D+2.0mg/L KT的培养基中分别添加浓度为3%、6%和10%的蔗糖进行甘蓝花药诱导花粉胚状体的培养,3种蔗糖浓度平均诱导率分别为5.93%、12.2%和11.0%,蔗糖浓度为6%和10%处理下,花粉胚状体的诱导率极显著高于3%蔗糖浓度处理,但6%和10%蔗糖浓度处理之间的差异不显著。表明低浓度蔗糖对甘蓝花药诱导花粉胚状体有一定的抑制作用,高浓度蔗糖有利于胚状体的诱导培养,因此,6%的蔗糖浓度应为甘蓝花药培养的最适浓度。

2.2 基因型对胚状体形成诱导的影响

由表1可知,供试6个材料花药在B₅+2.0mg/L 2,4-D+2.0mg/L KT的培养基中,蔗糖浓度为3%、6%和10%的条件下诱导培养,不同基因型材料中同种基因型花粉胚状体诱导频率在3种蔗糖浓度中表现一致趋势的差异性;诱导率较高是在6%蔗糖浓度下的F₂P194和F₁S17,分别为22.1%

表 1 蔗糖浓度和基因型对甘蓝花药胚状体形成诱导的结果

Table 1 Induction frequencies of cabbage anthers in different genotypes at different sucrose concentrations

蔗糖浓度 Sucrose concentration (%)	供试材料型 Materials	接种花药数(枚) No. of anthers inoculated	胚状体数(个) No. of embryoids induced	诱导率 Induction frequency (%)	平均诱导率 Average induction frequencies(%)	
					各世代 Each generation	蔗糖浓度 Sucrose concentration
3	S ₃ P67HZ	189	0	0	0 b B	5.93 b B
	S ₃ P202	191	0	0		
	F ₁ S17	133	12	9.0		
	F ₁ S13	102	10	9.8		
	F ₂ P192	125	11	8.8		
	F ₂ P194	113	9	8.0		
6	S ₃ P67HZ	208	3	1.4	0.7 b B	12.2 aA
	S ₃ P202	195	0	0		
	F ₁ S17	209	41	19.6		
	F ₁ S13	220	32	14.6		
	F ₂ P192	134	21	15.7		
	F ₂ P194	222	49	22.1		
10	S ₃ P67HZ	128	0	0	0 b B	11.0 a A
	S ₃ P202	135	0	0		
	F ₁ S17	122	20	16.4		
	F ₁ S13	165	26	15.8		
	F ₂ P192	129	17	13.2		
	F ₂ P194	103	21	20.4		

注:不同字母表示邓肯氏新复极差测验差异显著(小写字母为 $P < 0.05$ 水平,大写字母为 $P < 0.01$ 水平)。下同。

Note: Different normal and capital letter in the same columns mean separately significant differences at $P < 0.05$ and 0.01 level by Duncan's SSR Test. It means the same in the following table.

表 2 培养基对甘蓝花药胚状体诱导率的影响

Table 2 Embroid induction frequencies of cabbage anthers on different culture media

供试材料 Materials	培养基 Culture medium substrates	接种花药数(枚) No. of anthers inoculated	胚状体数(个) No. of embryoids induced	诱导率 Induction frequency (%)	世代平均诱导率 Average induction of generations (%)
S ₃ P67HZ	B ₅	208	3	1.4	0.925 c B
	MS	221	4	1.8	
S ₃ P202	B ₅	195	0	0	14.35 b A
	MS	218	1	0.5	
F ₁ S17	B ₅	209	41	19.6	17.03 a A
	MS	202	30	14.9	
F ₁ S13	B ₅	220	32	14.6	9.2 b A
	MS	252	21	8.3	
F ₂ P192	B ₅	215	34	16.3	12.3 a A
	MS	243	27	11.1	
F ₂ P194	B ₅	222	48	22.1	9.2 b A
	MS	215	40	18.6	
平均诱导率 Average induction frequency (%)	B ₅			12.3 a A	
	MS			9.2 b A	

和 19.6%, 相对较低的是 S₃P67HZ 为 1.4%, S₃P202 未诱导出胚状体。不同世代的供体基因型对花药培养诱导率也具有一定影响, 3 种不同世代材料在不同蔗糖浓度中除胚状体诱导率最低的 3% 外, 在 6% 和 10% 中, 以 F₂ 代(F₂P192 和 F₂P194)

基因型的平均诱导率分别最高, 达 18.9% 和 16.8%; 其次是 F₁ 代(F₁S17 和 F₁S13) 基因型, 平均诱导率分别为 17.1% 和 16.1%; 自交系(S₃P67HZ 和 S₃P202) 基因型很难诱导出胚状体; F₂ 代和 F₁ 代与自交系之间诱导率达极显著差异,

但 F_2 与 F_1 间诱导率差异不显著。结果表明甘蓝花药诱导花粉胚状体的效果受材料基因型影响较大,而且不同世代材料间诱导胚状体的差异显著,自交系材料的诱导率很低,不宜作为甘蓝花药培养材料。

2.3 不同培养基对胚状体形成诱导的影响

表 2 是 6 个供试材料花药在不同基本培养基 MS($MS+2.0\text{ mg/L } 2,4\text{-D}+2.0\text{ mg/L KT}+6\%$ Suc)和 B_5 ($B_5+2.0\text{ mg/L } 2,4\text{-D}+2.0\text{ mg/L KT}+6\%$ Suc)中进行诱导培养的结果,3 种不同世代材料在 2 种培养基中的表现有所不同,在 MS 和 B_5 2 种培养基中 F_2 、 F_1 代基因型的胚状体平均诱导率分别为 17.03% 和 14.35%,显著高于 S_3 代基因型胚状体平均诱导率 0.925%,且 F_2 代基因型又显著高于 F_1 代基因型。 S_3 代在 MS 中比在 B_5 中诱导率效果好,但诱导率很低,只有 1.8%~0.5%。对 2 种基本培养基进行比较 B_5 培养基的平均诱导率(12.3%)显著高于 MS 培养基中的平均诱导率(9.2%),说明 B_5 培养基是甘蓝花药诱导培养花粉胚状体的最适培养基。

2.4 诱导时间对胚状体诱导率的影响

由图 1 可以看出,分别于接种后 3、7、14、21、25 d 统计 6 种试材的平均诱导率。结果表明,通过 3 d 后的高温暗培养,有部分花药开始从药裂处诱导出胚状体,呈黄绿色(图版 I,1)。随着培养时间的延长,诱导率增加,同时诱导出的胚状体也在逐渐膨大,而花药逐渐变褐(图版 I,2)。同时,有些花药壁侧面长出愈伤组织,这可能是操作过程中引起药壁破裂而产生的愈伤组织,统计诱导率时将其排除在外。在培养 21 d 时,花药呈深褐色,诱导率也基本达到最大值,增长趋势平缓。由此说明,甘蓝花药诱导培养 3 周后即可转入分化培养,若诱导时间过长,易引起胚状体褐化(图版 I,3)。

将上述各培养实验中所获得的胚状体转移到蔗糖浓度为 3.0%、pH 5.8 的 MS($1/2\text{ MS}+1.0\text{ mg/L BA}+1.0\text{ mg/L KT}+0.1\text{ mg/L NAA}$)的分化芽培养基中和 MS($1/2\text{ MS}+2.0\text{ mg/L KT}+0.1\text{ mg/L NAA}+0.8\%$ Agar)诱导生根的培养基中,分化出芽和根(图版 I,4、5),并培养获得了试管苗(图版 I,6、7),随机选取部分绿苗作根尖染色体观察和计数,其染色体数为 $n=9$,表明它们是来源于小孢子的单倍体。对单倍体试管苗经两次继代培养并经染色体加倍后获得了纯合二倍体苗(图版 I,8、9),2005 年田间鉴定整齐度一致,从而建立了高效的甘蓝花药培养技术体系。

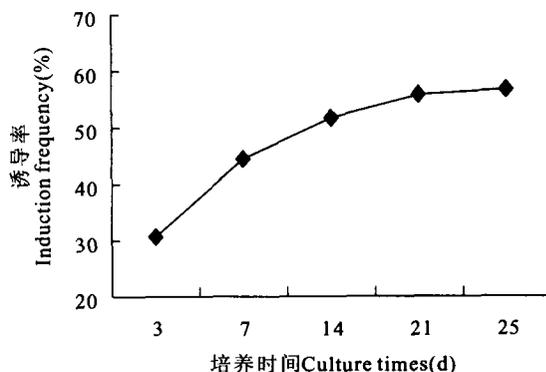


图 1 诱导时间对诱导率的影响

Fig. 1 Induction frequencies embroid at different induction periods

3 讨论

(1)高含量蔗糖对花药培养花粉胚状体形成起着一定诱导启动作用^[12],蔗糖浓度主要是增强培养基渗透压和为花粉小孢子萌发提供碳源,从而影响器官分化和促进花粉胚状体形成,但不同植物细胞渗透压差异甚大,使其花药培养要求的糖浓度可能不同^[3,12]。本研究结果表明,高浓度(6%和 10%)蔗糖处理甘蓝花药诱导花粉胚状体的诱导率显著高于低浓度(3%)蔗糖处理,其中以 6%蔗糖浓度诱导率最高(12.2%),这与其它甘蓝类花药培养研究结果相一致^[8,11,12],而与小麦、籼稻和辣椒的研究结果即 3%的蔗糖浓度比较适合花药培养不同^[3,13]。本研究认为对于甘蓝花药培养可能要求在较高的渗透压和充足的碳源条件下有利于提高产胚量。

(2)花药培养力大小是多基因控制的数量性状,随基因型差异而有很大不同,不同基因型的花药培养条件相互有所区别^[11,12]。本研究结果表明,基因型是影响甘蓝花药培养的主要因素,决定着花药培养胚状体形成的产量和质量,以 F_1 和 F_2 代材料胚状体诱导效果最好,但同世代不同材料之间也存在一定差异。如自交系 S_3 代材料很难诱导出胚状体。这可能与花粉小孢子供体植株的生活力优势和特性有关。作物花药培养多数研究都以 F_1 代作为供试材料,本研究在甘蓝花药培养中首次选用 F_2 代作为试材,研究发现 F_2 代(F_2P192 和 F_2P194)基因型(18.9%)比 F_1 代(F_1S17 和 F_1S13)基因型(17.1%)获得较高诱导率,这与王成社等^[10]在小麦花培研究中的结果一致。这可能是来源于 F_2 代的花粉中遗传重组类型多,有利于诱导出胚状体。

(3)甘蓝类的菜花、青花菜、羽衣甘蓝等花药培养适宜的基本培养基主要为 B₅ 和 MS^[7,8,11]。本研究认为 B₅ 培养基更适合甘蓝花药培养,但不同花源供体材料有所区别,如选用 F₁ 代和 F₂ 代花源,B₅ 培养基比 MS 培养基更适宜花药胚状体的形成;但

选用自交系 S₃ 代花源,MS 培养基比 B₅ 培养基有利花药胚状体的形成。这可能是由于 2 种培养基中的营养元素的比例不同,引起 3 个世代供体植株基因型的花粉小孢子对其的敏感程度不同所致,这有待进一步研究。

参考文献:

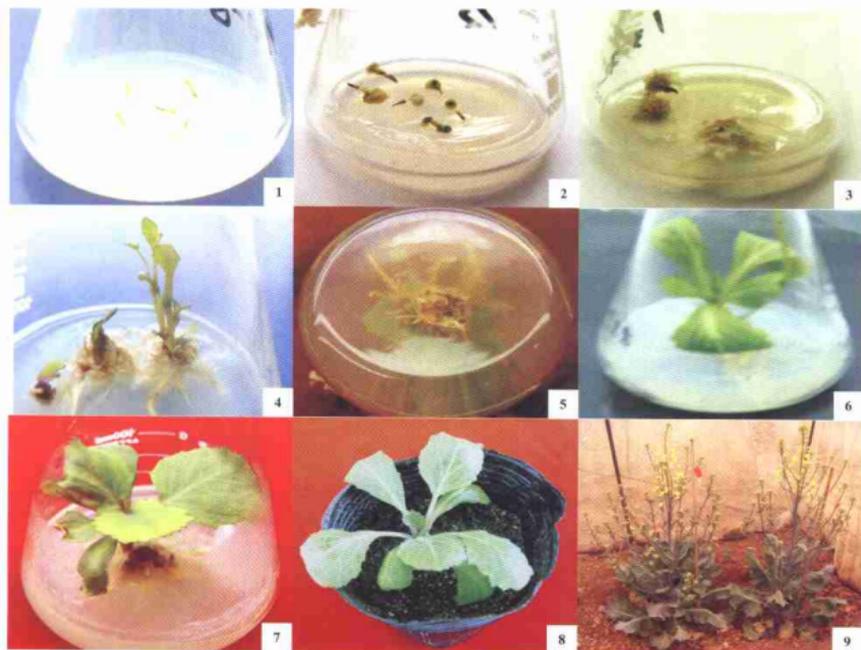
- [1] FANG ZH Y(方智远),LIU Y M(刘玉梅),YANG L M(杨丽梅),WANG X W(王晓武),ZHUANG M(庄 木),ZHANG Y Y(张杨勇),SUN P T(孙培田). A survey of research in genetic breeding of cabbage in China[J]. *Acta Horticulture Sinica* (园艺学报)(增刊), 2002, **29**(Suppl.): 657-663(in Chinese).
- [2] YANG L M(杨丽梅),FANG ZH Y(方智远),LIU Y M(刘玉梅). Breeding of cabbage inbred line with micro-spore culture in China[J]. *Chinese Vegetables* (中国蔬菜), 2003, **6**: 31-32(in Chinese).
- [3] 胡道芬. 植物花培育种进展[M]. 北京:中国农业科技出版社,1996:1-5.
- [4] HU D F(胡道芬),TANG Y L(汤云莲),YUAN ZH D(袁振东). The induction of pollen sporophyte of winter wheat and the development of the new variety "Jinghua No. 1"[J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 1983; **5**: 5-8(in Chinese).
- [5] GUO Y M(郭奕明),YANG Y G(杨映根),GUO ZH CH(郭仲琛). Current advances in anther culture and haploid breeding of Maize[J]. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), 2001, **18**(1): 23-30(in Chinese).
- [6] LI CH L(李春玲),JIANG ZH R(蒋钟仁). The breed successful of 'HAI-HUA No. 3' sweet pepper new variety by anther culture[J]. *Acta Horticulture Sinica* (园艺学报), 1990, **1**: 185-186(in Chinese).
- [7] KAMEYA T, HINATA K. Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica* Jpn. [J]. *J. Breeding*, 1970, **20**: 82-87.
- [8] KELLER W A, ARMSTRONG K C. Production of anther derived dihaploid plants in autotetraploid marrowstem kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) [J]. *Can. J. Genet. Cytol.*, 1981, **23**: 265-269.
- [9] GORECKA K, KRZYZANOWSKA D, ALTMAN A, et al. Plant regeneration from anther derived embryos of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) [J]. *Acta Horticulturae*, 1997, **447**(4): 335-337.
- [10] CHEN SH R(陈世儒),LIU Y Y(刘雁雨). Haploid regeneration from anther culture in *Brassica oleracea* var. *sabauda* L. in China[J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 1991, **27**(1): 41(in Chinese).
- [11] WANG H M(王怀名),G MIX-WAGNER, YANG Y L(杨艳丽). Embryogenesis in anther and pollen culture of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) in China[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* (华北农学报), 1992, **7**(4): 61-67(in Chinese).
- [12] CUN SH X(寸守铤),WAN M(万 萌),QIU SH F(邱仕芳). Study on the induction of pollen embryoid by another culture in *Brassica juncea* in China[J]. *Journal of Southwest Agricultural University* (西南农业学报), 1994, **7**(3): 32-35(in Chinese).
- [13] WANG CH SH(王成社),LI J Q(李景琦),ZOU SH F(邹淑芳). Study of the relationship between the breeding efficiency of another culture and the different hybrid generations as another-donor plants in wheat in China[J]. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 2002, **29**(10): 899-902(in Chinese).

张恩慧,等:甘蓝花药培养胚状体诱导形成影响因素研究

图版 I

ZHANG En-hui, *et al.*, Factors Affecting Embryoid Induction and Formation of Cabbage Anthers in Culture

Plate I



图版 I 1. 诱导的花药胚状体; 2. 膨大的胚状体; 3. 胚状体褐化; 4. 分化出芽和根; 5. 分化出根; 6, 7. 分化出绿苗; 8. 纯合二倍体苗; 9. 纯合二倍体苗的种株。

Plate I Fig. 1, Embryoids induced from cabbage anther; Fig. 2, Bulgy embryoids; Fig. 3, Brown embryoids; Fig. 4, Differentiated sprouts and root; Fig. 5, Differentiated root; Fig. 6, 7, Differentiated seedling; Fig. 8, Zygoid diploid seedling; Fig. 9, Zygoid diploid stock plants.