

# 甘蓝型油菜小孢子培养技术的几项改进

刘雪平, 刘志文, 涂金星, 陈宝元, 傅廷栋

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室 国家油菜改良武汉分中心, 武汉 430070)

**摘要:**本研究在 NLN-16 和 NLN-13 的培养基中分别加入 0.1mg/L 6-BA 和 0.05% 的活性碳, 结果表明 6-BA 对小孢子再生胚有明显地促进作用, 再生胚的频率比对照增加 26 枚/皿, 经分析达到显著水平; 而 0.05% 的活性碳对小孢子再生胚促进作用不显著。对甘蓝型油菜小孢子培养再生植株的染色体加倍及移栽的研究结果表明, 在小孢子培养初期加 50mg/L 秋水仙碱加倍效率最佳, 加倍率达到 67.6%。小孢子培养的再生苗移栽至大田后, 采用遮阳网覆盖小苗, 移栽成活率达到 87.6%。

**关键词:**甘蓝型油菜; 小孢子培养; 技术改进

中图分类号: S336

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2003)04-0433-04

## Improvement of Microspores Culture Techniques in *Brassica napus*. L

LIU Xue-Ping, LIU Zhi-Wen, TU Jin-Xing, CHEN Bao-Yuan, FU Ting-Dong

(National Subcenter of Oil Improvement, National Key Lab of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** The application of microspore culture technique was restricted because of its low frequency of embryogenesis and chromosome doubling. Two methods of enhancing the frequency of embryogenesis were employed in the study, namely, activated charcoal treatment in NLN-13 media and 6-BA treatment in NLN-16 media. The treatment with 0.05% activated charcoal produced 24 embryos per plate, which increased 1.7 embryos per plate, as compared with the treatment without activated charcoal. However, the analysis of T-test showed that it was not significant. After adding 0.1mg/L 6-BA in NLN-16 media, the frequency of embryogeny was 38.3 embryos per plate, and it was 26 embryos more per plate than that of CK. Analysis of T-test is significant. This indicates that 6-BA promotes embryogeny in microspore culture. Adding 50mg/L colchicines in NLN-16 media, the doubling frequency was 67.6%. The plantlets transplanted into field with two methods of light-covered net and plastic films were investigated. A survival rate of 87.6% was obtained using light-covered method whereas 57.7% survived using plastic film method.

**Key words:** *Brassica napus*. L; microspore culture; techniques improvement

自从 Lichter 对甘蓝型油菜小孢子培养获得成功<sup>[1]</sup>后, 该技术经过十几年的发展和完善, 小孢子再生胚的频率有了很大的提高<sup>[2~10]</sup>。国外通常将供体植株种植在人工气候室内, 供体植株受外界环境影响小, 小孢子发育较为一致, 小孢子再生胚的数量稳定。在国内, 对甘蓝型油菜小孢子培养研究起步较晚, 直到 1990 年, 钟维瑾首次对大田甘蓝型油菜小孢子培养获得成功<sup>[11]</sup>后, 国内一些研究者相继开展了甘蓝

型油菜小孢子培养的研究工作<sup>[12~15]</sup>, 其它作物也开展了相关的研究<sup>[16]</sup>。理论上双单倍体育种与常规育种相比具有明显的优势: 单倍体小孢子经加倍后, 基因型纯合, 无需杂交育种过程中的多代自交, 因而纯合速度快, 特别适用于难以稳定性状的纯合, 如甘蓝型油菜黄籽性状的纯合<sup>[17]</sup>。在基础研究领域, 利用小孢子培养技术获得 DH 群体, 用于遗传分析及分子标记遗传图谱的研究日趋广泛<sup>[18~19]</sup>。但小孢子培

收稿日期: 2002-06-28; 修回日期: 2002-12-27

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助(39825117)(National Science Fund for Distinguished Young Scholars, Project No. 39825117)

作者简介: 刘雪平(1975-), 男, 江西樟树人, 博士研究生, 主要从事油菜分子生物学研究。

通讯作者: 涂金星(1964-), 男, 副教授, 主要从事油菜遗传育种研究。Tel: 027-87287007; Fax: 027-87287209; E-mail: tujx@mail.hzau.edu.cn

养技术在大规模的应用于育种过程中还存在一些问题:大田里的供体植株受环境影响较大<sup>[20]</sup>,小孢子再生胚的频率不稳定,且受供体植株基因型的影响,因而限制了它在育种中的应用;秋水仙碱对小孢子再生胚的染色体加倍效率偏低及大面积移栽无菌苗不易成活等原因制约着该技术的广泛应用。本文对小孢子培养中的几个技术环节进行改进,有效提高了小孢子再生胚、染色体加倍和移栽成活的频率。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

本研究供试材料由陈宝元教授提供:F-1(Quantum × No. 2127-17),材料种植在华中农业大学试验田,常规方法栽培管理。

### 1.2 研究方法

小孢子培养参考余凤群的方法进行<sup>[21]</sup>,在初花期取 3~4mm 左右的蕾,放入已灭菌的烧杯中(所需器件及液体均须灭菌且在无菌条件下操作),70%酒精消毒 1min,0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 10min,无菌水冲洗 3 次,每次 5min。取消毒好的蕾放入试管,加入 1mL 的 B<sub>5</sub>-13(B<sub>5</sub> 液体培养基,蔗糖浓度为 13%)提取液,用玻棒碾成匀浆,倒入装有 0.44μm 尼龙膜的漏斗中过滤,用 10mL 的离心管收集滤液。加 B<sub>5</sub> 提取液至所需刻度,离心 5min,转速 1000r/min。弃上清液,加 B<sub>5</sub> 提取液重新悬浮,离心 5min,转速 500r/min,重复该操作一次。弃上清液,加入 NLN-16 培养基重新悬浮,分装到直径为 6cm 的培养皿中,密度为 2 蕾/mL,每皿 2mL,放入 32℃ 暗培养两天,加入 NLN-13 培养基,2mL/皿 进行等量稀释,放入 25℃ 继续暗培养 2~3w。待肉眼可见胚,置于摇床上,转速为 55 转/min,在 25℃ 振荡培养 1w,达到子叶期的胚转入固体 B5-G(含 0.1mg/LGA3)培养基上继代培养,成苗后适时移栽。

## 2 结果分析

### 2.1 活性碳对小孢子培养的影响

小孢子在 25℃ 培养时,NLN-13 的培养基中加入活性碳,终浓度为 0.05%,以不含活性碳等量稀释作对照,设置 3

个重复,处理与对照的结果见表 1。

表 1 活性碳对小孢子培养的影响

Table 1 The effect of activated charcoal in microspores culture

处理 Treatments	枚/皿 No. of embryos/plate			平均数 Means
活性碳 Activated charcoal	35	21	16	24.0±5.7
对照(CK)	22	25	20	22.3±1.5

从表 1 可知,加活性碳处理的小孢子再生胚频率比对照增加 1.7 枚/皿,但没有达到显著水平,表明活性碳对小孢子再生胚促进作用不明显。观察发现加入活性碳处理后,达到子叶期的胚增多,且胚的两极发育正常,畸形胚少。其原因可能是活性碳可以吸附小孢子培养过程中排放的有害物质,改善了小孢子的发育环境。

### 2.2 6-BA 对出胚率的影响

小孢子在 32℃ 培养时,NLN-16 的培养基中加入 6-BA,终浓度为 0.1mg/L,以不含 6-BA 的 NLN-16 的培养基作对照,设置 3 个重复,处理与对照的结果见表 2。

表 2 6-BA 对出胚率的影响

Table 2 The effect of 6-BA in microspores culture

处理 Treatments	枚/皿 No. of embryos per plate			平均数 Means
6-BA	39	41	35	38.3±1.8*
对照(CK)	6	21	10	12.3±4.9

从表 2 可知,加 6-BA 处理的小孢子再生胚频率比对照增加 26 枚/皿,经分析达到显著水平,表明 6-BA 对小孢子再生胚有明显地促进作用。但加入了 0.1mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 后,观察发现畸形胚增多,可能是激素浓度偏高所致,其原因有待于进一步研究。畸形胚需要继代多次才能成苗。

### 2.3 秋水仙碱的浓度对小孢子再生胚及加倍效率的影响

小孢子在 32℃ 培养时,设置 A、B、C 3 种不同浓度秋水仙碱对小孢子进行处理,2000~2002 年的数据见表 3。

表 3 不同浓度秋水仙碱对小孢子再生胚及加倍率的影响

Table 3 The effect of different colchicine concentration in microspores culture

处理 Treatment	秋水仙碱(mg/L) Colchicine concentration	枚/皿 No. of embryos per plate	移栽成活基因型(株) No. of transplant	双单倍体基因型(株) Doubled haploid plants	加倍效率 Ratios of doubling
A	13	50.4	384	96	25.0%
B	50	900	1535	1037	67.6%
C	1000	0	0	0	0

注:A 处理在 NLN-16 培养液中加入 13mg/L 秋水仙碱,32℃ 对小孢子处理两天,加入不含秋水仙碱 NLN-13 培养基在 25℃ 继续培养;B 处理在 NLN-16 培养液中加入 50mg/L 秋水仙碱,在 32℃ 对小孢子处理两天,离心重新收集小孢子,用不含秋水仙碱 NLN-13 培养基 25℃ 下继续培养;

C 处理在 NLN-16 培养基中加入 1000mg/L 秋水仙碱,在 32℃ 对小孢子处理两天,加入不含秋水仙碱 NLN-13 培养液 2mL 在 25℃ 继续培养。

从表 3 的数据可知, A 处理再生频率为平均 50.4 枚/皿,表明低浓度的秋水仙碱对小孢子毒害作用不明显,但秋水仙碱浓度过高小孢子不能再生胚,如 C 处理,反复接种不能再生出胚。从 A、B 两处理可知,在一定范围内加倍效率随秋水仙碱浓度的提高而增加。A 处理的加倍效率为 25.0%。B 处理的加倍效率为 67.6%,在小孢

子培养过程中秋水仙碱的最适浓度有待于进一步研究。

#### 2.4 再生小植株的大田移栽技术

经小孢子培养再生的幼苗需要经过多次继代培养,待温度适宜再移栽至大田,采用两种不同的覆盖材料,对幼苗的成活率进行统计,结果见表 4。

表 4 不同覆盖材料及移栽时间对成活率的影响

Table 4 Influence on survivor in different materials covered

	遮阳网 Light-covered net					塑料薄膜 Plastic film				
	移栽苗 No. of transplant	419	330	360	370	389	250	340	240	210
成活苗 No. of survivor	381	296	305	322	333	178	223	121	104	83
成活率(%) ratios of survivor	90.9	89.7	84.7	87.0	85.6	71.2	65.6	50.4	49.5	51.9

从表 4 分析可知,用遮阳网作为覆盖材料,幼苗成活率平均达到 87.56%,塑料薄膜作为覆盖材料,幼苗成活率平均达到 57.7%,经分析两者差异达到显著水平。塑料薄膜保温但不透气,因而湿度大,小苗容易死。遇到高温天气,这种现象在低洼地表现的尤为突出。而遮阳网即可遮阴又可内外透气,小苗生长环境与外界相似,可随外界环境的变化而变化,因而成活率明显提高。

### 3 讨 论

本研究对小孢子培养中的几个技术环节进行改进,在 NLN-16 的培养基中加入 6-BA,对小孢子再生胚有显著地促进作用。而 NLN-13 的培养基中加入活性炭对小孢子再生胚促进作用不显著。小孢子培养再生植株的染色体加倍及移栽的研究,结果表明在小孢子培养初期加倍效率最佳,幼苗移栽后,采用遮阳网覆盖小苗,提高了移栽成活率。小孢子再生胚频率与供体植株的基因型<sup>[12]</sup>和生长状况<sup>[14]</sup>有关,油菜小孢子培养的接种最佳时期是在单核晚期,由于在自然条件下温、光、水变化不定,小孢子发育同步化程度低,因而小孢子再生胚频率不稳定,同一材料在不同时期再生胚频率不同(数据未发表)。石淑稳研究表明不同来源的品种其诱导反应有差别<sup>[12]</sup>,一般杂种小孢子的诱导反应比品种好。对那些暂时不能诱导再生胚的材料,可能是培养条件和培养技术等不适合,所以得不到再生胚。

再生苗的加倍效率是实验成败的关键因素之一,在培养初期对小孢子进行加倍其操作简便易行,秋水仙碱的用量少,成本低,加倍植株很少发现有嵌合现象,生长发育与正常双单倍体植株无差别,现蕾开花时发现单倍体植株还可进行第二次加倍。再生苗的加倍效率依植株发育阶段不同而

有差别,幼苗时期加倍效率稍高,且秋水仙碱用量大,易出现嵌合现象,表现为一个植株的某几个花蕾或少数分枝加倍,收获的种子少,一般需要再扩繁一次<sup>[20]</sup>。本研究用 50mg/L 的秋水仙碱在小孢子培养初期对其加倍,加倍效率约为 67.6%。Regine Mathias *et al* 在移栽前采用 50mg/L 的秋水仙碱对小孢子再生苗的加倍处理,加倍效率约为 50%<sup>[6]</sup>。我们对单倍体植株采用 1000mg/L 浸根 4h 后,加倍效率约为 2.6%,表明后者只能作为加倍失败的一种临时补救措施。

无菌苗直接移栽至大田难度大,田间的气温变化较大,成活率降低。少量的无菌苗通常移栽至一次性塑料杯中,外面盖一个带小孔的塑料杯保湿。随着小孢子培养技术的成熟,无菌苗的增多,这种移栽技术难以满足大面积应用,而且费时费力。大量的无菌苗移栽后采用塑料薄膜盖苗,需要选择合适的时间及爽水的田块,而用遮阳网代替塑料薄膜对其要求降低,即可以提高移栽苗的成活率也可以提早移栽,给田间管理带来方便,也给丰产打下良好的基础。经过几年的探索及经验总结,摸索出一套适合再生小植株的大田移栽技术。选择一块爽水的旱地,犁地晒田 2~3d。田块整成深沟窄厢的小畦,有利于排灌水,施足底肥。在 10 月初无菌苗移置一通风处,练苗 3~5 d。选择阴天或晴天的下午移栽,移栽前洗净根上附着的培养基,移栽后浇少量定根水。晴天盖上遮阳网,光照强时盖双层,傍晚揭开遮阳网,酌情浇少量水,第二天上午 9 时再盖上遮阳网。两个星期后,移栽的小苗恢复生长后,揭开遮阳网练苗,施少量的尿素提苗,以后按常规的田间管理方法。

### 参 考 文 献(References):

[1] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of

- Brassica napus* L.[J]. Z Pflanzenphysiol,1982,105:427~434.
- [2] Chuong P V, Deslauriers C, Kott L S, Beversdorf W D. Effects of donor genotype and bud sampling on microspore culture of *Brassica napus*[J]. Can J Bot, 1988, 66: 1653~1657.
- [3] Kott L S, Polsoni L, Beversdorf W D. Cytological aspects of isolated microspore culture of *Brassica napus* L.[J]. Can J Bot, 1988, 66: 1658~1664.
- [4] Chuong P V, Pauls K P, Beversdorf W D. High frequency embryogenesis in male sterile plants of *Brassica napus* through microspore culture[J]. Can J Bot, 1988, 66: 1676~1680.
- [5] Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassicaceae* Species [J]. Plant Breeding, 1989, 103: 119~123.
- [6] Regine Mathias, Röbbelen G. Effective diploidization of microspore-derived haploids of rape (*Brassica napus* L.) by *in vitro* colchicine treatment [J]. Plant Breeding, 1991, 106: 82~84.
- [7] Qing Yang, Jean E. Chauvin & Yves Herve. study of factors affecting anther culture of cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis) [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1992, 28: 289~296.
- [8] Charne D G, Beversdorf W D. Improving microspore culture as a rapeseed breeding tool : the use of auxins and cytokinins in an induction medium[J]. Can J Bot, 66: 1671~1675.
- [9] Baillie A M R, Epp D J, Hutcheson D, Keller W. A *In vitro* culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris* [J]. Plant Cell Reports, 1992, 11: 234~237.
- [10] Yang-Dang Guo & Sepp Pulli High frequency embryogenesis in *Brassica campestris* microspore culture [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1996, 46: 219~225.
- [11] ZHONG Wei-Jin, FANG Guang-Hua, TANG Ke-Xuan, ZHANG Zhi-Qi, YU Mian-Juan. Plant regeneration from embryoids through isolated microspore culture of *Brassica napus* L. [J]. Acta Agriculture Shanghai, 1990, 64: 11~16.  
钟维瑾, 方光华, 唐克轩, 张智奇, 俞妙娟. 甘蓝型油菜游离小孢子培养诱导胚胎体再生植株 [J]. 上海农业学报, 1990, 6(4): 11~16.
- [12] SHI Shu-Wen, LIU Hou-Li. Induction of embryogenesis through microspore culture of *Brassica napus* species and their interspecific and inter genertic hybrids[J]. Journal of Huazhong Agricultural university, 1993, 12(6) 544~550.  
石淑稳, 刘后利. 蓝型油菜及其种间和属间杂种小孢子胚状体的诱导 [J]. 华中农业大学学报, 1993, 12(6): 544~550.
- [13] CHEN Jun, CHEN Zheng-Hua, LIU Cheng-Qing, YAO Yu-Guang, ZHANG Li-Hua, GUAN Yue-Lan. Embryogenesis of isolated microspore of *Brassica napus* in culture[J]. Acta Genetica Sinica 1995, 22(4): 307~315.  
陈 军, 陈正华, 刘澄清, 姚渝光, 张丽华, 关月兰. 甘蓝型油菜游离小孢子培养的胚胎发生[J]. 遗传学报, 1995, 22(4): 307~315.
- [14] GUAN Chun-Yun. Studies of microspore culture and doubled haploid breeding on rape[J]. Acta Agronomica Sinica, 1995, 21(6): 665~670.  
官春云. 油菜小孢子培养和双单倍体育种和研究[J]. 作物学报, 1995, 21(6): 665~670.
- [15] YU Feng-Qun, LIU Hou-Li. Effects of donor materials and media on microspore embryoid yield of *Brassica napus*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1995, 14(4): 327~332.  
余凤群, 刘后利. 供体材料和培养基成分对蓝型油菜小孢子胚状体产量的影响[J]. 华中农业大学学报, 1995, 14(4): 327~332.
- [16] GUO Xiang-Rong, JIN Jian-Kang, HU Han. Induction and development of embryos the directly isolated microspore culture in bialy[J]. Science in China ( series C), 1997, 27: 50~54.  
郭向荣, 景建康, 胡含. 大麦直接油菜小孢子培养中的脱分化启动和胚胎发生[J]. 中国科学(C辑), 1997, 27: 50~54.
- [17] YU Feng-Qun, LIU Hou-Li. Studying on technique system of microspore culture in *Brassica napus* L[D]. Thesis of PH. D. , Wuhan. Hubei. 1994.  
余凤群, 刘后利. 甘蓝型油菜未成熟小孢子培养技术体系的研究[D]. 博士学位论文, 湖北, 武汉, 1994.
- [18] Ferreira M E, Williams P H, Osborn T C. RFLP mapping of *Brassica napus* using doubled-haploid lines [J]. Theor Appl Genet, 1994, 89 : 615~621.
- [19] Lombard V, Delourme R . A consensus linkage map for rapeseed (*Brassica napus* L.): construction and integration of three individual maps from DH populations[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 491~507.
- [20] Keller W A, Fan Z, Pechan P, Long N, Grainger J. An efficient method for culture of isolated microspores of *Brassica napus* [C]. Proc 7th In Rapeseed Cong, 1987, pp71.
- [21] Chen Z Z, Snyder S, Fan Z G, Loh W H. Efficient production of doubled haploid plant through chromosome doubling of isolated microspores in *Brassica napus* [J]. Plant Breeding, 1994, 113: 217~221.