

赵志刚. 芥菜型油菜、白菜型油菜种间杂种的小孢子培养[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 80–82.

# 芥菜型油菜、白菜型油菜种间杂种的小孢子培养

赵志刚

(青海大学农林科学院/青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室培育基地/国家油菜改良中心青海分中心/  
青海省春油菜遗传改良重点实验室, 青海西宁 810016)

**摘要:**以芥菜型油菜、白菜型油菜杂种后代  $BC_1F_4$  群体植株为材料, 确定适合杂种后代植株小孢子培养的条件。结果表明: 处于单核靠边期且 2.4~2.6 mm 的蕾最适合小孢子培养; NLN-10、NLN-13 培养液中小孢子发育出胚情况较好; B5 培养基中添加 6-BA、NAA 对芥白杂种后代植株胚的萌发有促进作用。

**关键词:** 芥菜型油菜; 白菜型油菜; 种间杂种; 小孢子培养

**中图分类号:** S634.303 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0080-03

小孢子培养技术能快速纯合目标性状, 加快育种进程, 已被广泛应用于芸薹属作物的遗传育种。Sodhi 等应用小孢子技术在人工合成的甘蓝型油菜中选育了新型的 CMS<sup>[1]</sup>。通过小孢子培养获得单倍体并经染色体加倍得到的 DH 群体是进行遗传绘图、分子标记的良好材料。Lombard 等利用 DH 群体构建、整合甘蓝型油菜遗传连锁图<sup>[2]</sup>。Pilet 等利用 DH 群体进行黑胫病抗性性状的分子标记<sup>[3]</sup>。张永泰等通过对 3 株甘蓝型油菜-白芥单体异附加系进行小孢子培养获得了二体异附加系<sup>[4]</sup>。种间杂交是拓宽基因池的重要手段之一, 它可以在品种间转移优良性状, 已经被广泛应用于作物品质改良。通过种间杂交将野生水稻的优良性状转移到栽培种中, 提高了栽培水稻的抗性<sup>[5-6]</sup>。芸薹属是十字花科具有重要经济价值的一个属, 其中油料作物应用范围最广、经济价值最高<sup>[7]</sup>。Liu 等通过种间杂交将芥菜型油菜的优良性状导入甘蓝型油菜中, 提高了甘蓝型油菜的品质、产量、抗性等<sup>[8]</sup>。杜德志等通过白菜型油菜、甘蓝型油菜杂交培养了一批可在高海拔地区正常成熟的新型特早熟春性甘蓝型油菜资源<sup>[9]</sup>。然而, 种间杂交后代中获得的具有期望性状的植株分离广泛, 需要较长时间才能稳定, 小孢子培养技术可以解决这一难题。芥菜型油菜、白菜型油菜种间杂交产生大量染色体数目处于 2 个亲本种中间的个体, 利用小孢子培养技术不仅可以固定杂种后代获得的优良性状, 还可以获得大量附加系, 为白菜型油菜的遗传改良提供材料。然而, 白菜型油菜、芥菜型油菜培养胚胎发生频率低、继代技术难度大, 难以有效获得再生植株<sup>[10-13]</sup>。本研究以杂种后代  $BC_1F_4$  群体植株为供体材料, 研究不同因素对小孢子发育及出胚情况的影响, 旨在为确定适合芥白杂种后代植株小孢子的培养条件提供依据。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

收稿日期: 2013-04-11

基金项目: 国家“973”计划(编号: 2011CB111508); 国家科技支撑计划(编号: 2011BAD35B04); 青海省应用基础研究(编号: 2011-Z-701)。

作者简介: 赵志刚(1978—), 男, 内蒙古多伦人, 博士, 副研究员, 从事油菜分子细胞遗传学研究。E-mail: 13897474887@126.com。

以生长在光周期为 16 h/d、营养丰富的温室条件下的芥白杂交后代  $BC_1F_4$  群体为供体植株。

### 1.2 方法

1.2.1 单核靠边期蕾的确定 09:00(约 17℃)取始花期主花序或第 1 次分枝花序上的花蕾, 分别挑取 2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0 mm 大小的花蕾, 用 DAPI 染色后, 在荧光显微镜下观察小孢子的发育时期, 确定处于单核靠边期蕾的大小。

1.2.2 NLN 液体培养基 将 NLN 培养液分别设定 10%、13%、17%、20% 4 个蔗糖浓度梯度, 简称为 NLN-10、NLN-13、NLN-17、NLN-20 液体培养基, 分别观察记录不同蔗糖浓度培养液下小孢子的发育状态及出胚情况。

1.2.3  $B_5$  固体培养基 设加激素  $B_5$  固体培养基、普通  $B_5$  固体培养基 2 种培养基, 加激素培养  $B_5$  培养基中添加 1.2 mg/L 6-BA、0.25 mg/L NAA。

1.2.4 小孢子培养方法 挑取始花期处于单核靠边期的花蕾, 用 84 消毒液消毒 15 min 后用无菌水冲洗 3 次, 置于无菌试管中, 加入少量 13% 蔗糖溶液, 用玻璃棒研碎花蕾, 经双层尼龙网过滤, 1 100 r/min 离心 4 min, 沉淀小孢子, 弃上清液后加入 NLN 培养液悬浮小孢子, 分装在培养皿中(约有花蕾 1~2 个/mL), 32℃ 黑暗培养 48 h 后, 25℃ 黑暗培养 10 d 左右, 待肉眼可见胚形成, 50 r/min 25℃ 摇床黑暗培养 2 周后, 置 4℃ 冰箱中处理 15 d 后转入  $B_5$  固体培养基中培养。

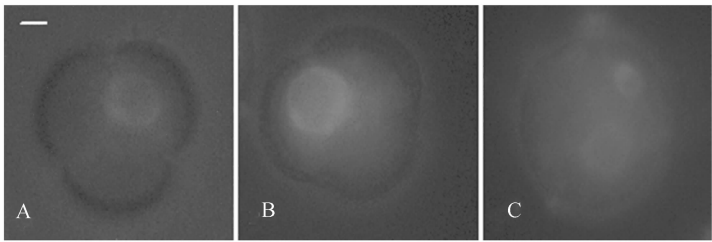
## 2 结果与分析

### 2.1 单核靠边期蕾的确定

于始花期分别挑取 2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0 mm 大小的花蕾, 用 DAPI 染色后, 在荧光显微镜下观察小孢子的发育时期, 每材料 100 倍镜下取 8 个视野, 分别计算处于单核中期、单核靠边期及双核期小孢子的数目及比例(图 1), 结果如表 1 所示。在 2.0~2.6 mm 之间, 随着花蕾的增大, 单核靠边期孢子所占比例逐渐增大, 2.6 mm 时达到最大。当蕾达到 2.8 mm 时, 开始出现双核期孢子, 随着花蕾的继续增大, 单核靠边期孢子比例下降, 双核期孢子比例增加。由此可知, 处于单核靠边期且 2.4~2.6 mm 的蕾最适合小孢子培养。

### 2.2 不同蔗糖浓度 NLN 液体培养液对小孢子发育的影响

32℃ 黑暗培养 2 d 后, 在 40 倍显微镜下观察小孢子的发



A—单核中期孢子；B—单核靠边期孢子；C—双核期孢子

图1 不同发育时期的小孢子

表1 不同大小蕾的小孢子发育时期

蕾的大小 (mm)	单核中期孢子		单核靠边期孢子		双核期孢子	
	数目 (个)	比例 (%)	数目 (个)	比例 (%)	数目 (个)	比例 (%)
2.0	74	86	12	14	0	0
2.2	51	61	32	39	0	0
2.4	23	19	96	81	0	0
2.6	5	6	77	94	0	0
2.8	6	12	29	58	15	30
3.0	8	11	16	23	46	66

育情况,每浓度培养液取10个视野,并统计膨大小孢子所占比例,结果发现 NLN - 13 培养液中膨大小孢子的比例最低,仅为 24%,NLN - 10,NLN - 17 培养液、NLN - 20 培养液膨大的小孢子所占比例较高,分别为 35%、53%。随着蔗糖浓度升高,膨大小孢子的比例呈增加趋势。4 种 NLN 液中小孢子培养 4 d 后均出现部分膨大小孢子裂解停止生长的情况,这可能与芥白杂种后代的基因型有关。一般来说,膨大小孢子数目越多,小孢子发育出胚情况越好。本研究中培养 2 d 后膨大的小孢子所占比例越高,出胚成苗情况越差。NLN - 17 培养液每皿成胚数仅为 1 个,不能正常成苗。NLN - 20 培养液未出胚。NLN - 13 培养液出胚情况最好,每皿成胚数为 3 个,成苗数最多,其次为 NLN - 10 培养液,每皿成胚数为 2

个,仅 1 个发育成苗(表 2)。结果表明,NLN - 13、NLN - 10 培养液适合芥白杂种后代植株小孢子的培养。

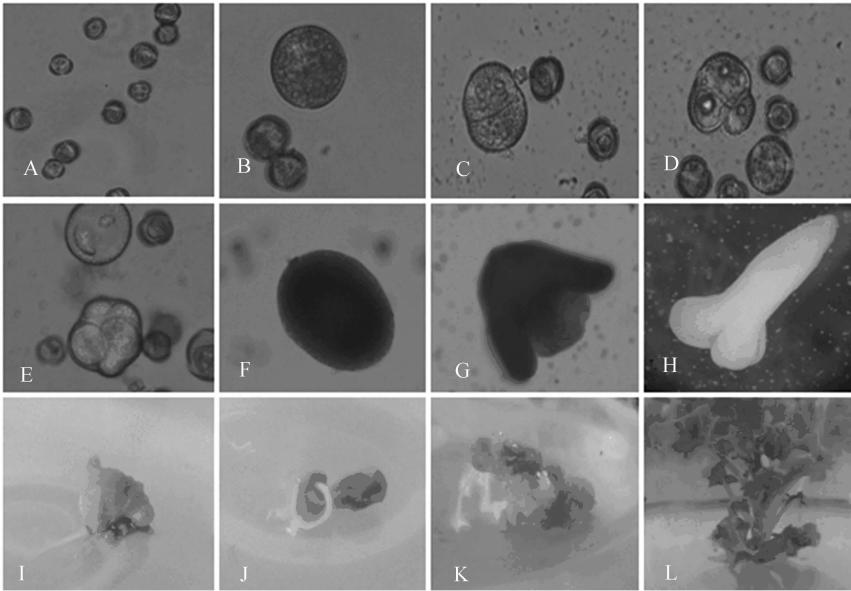
表2 不同蔗糖浓度 NLN 液体培养液对小孢子发育的影响

培养基类型	2 d 后膨大的小孢子 所占比例(%)	每皿成胚数 (个)	成苗数 (个)
NLN - 10	31	2	1
NLN - 13	24	3	2
NLN - 17	35	1	0
NLN - 20	53	0	0

2.3 小孢子的发育过程

通过观察不同蔗糖浓度培养液处理下小孢子的发育情况,发现芥白杂交后代在 NLN - 13 培养液中小孢子发育出胚情况最好,因此以 NLN - 13 培养液为例研究小孢子的发育过程。

小孢子培养是具有胚状体发生能力的小孢子发育成胚状体的过程。刚游离出的小孢子能在培养液中均匀悬浮(图 2 - A),32 ℃ 黑暗培养 48 h 后,可见部分小孢子明显膨大(图 2 - B),转移至 25 ℃ 黑暗培养 72 h 后出现第 1 次分裂,分裂成 2 个细胞(图 2 - C),4 d 后第 2 次分裂,分裂成 4 个细胞(图 2 - D),6 d 后出现细胞团(图 2 - E),10 d 左右出现肉眼可见胚,置于显微镜下观察,可见球形胚、心形胚、子叶形胚状体(图 2 - F至H)。将出胚培养基放到摇床上避光摇



A—刚游离小孢子；B—膨大小孢子；C—小孢子分裂1次；D—小孢子分裂2次；E—分裂成细胞团；F—球形胚；G—心形胚；H—子叶形胚；I—再生植株褐变；J—再生植株；K—绿色簇状组织；L—单倍体苗

图2 小孢子发育过程

晃 2 周左右,胚进一步发育,明显变大,将其置于 4 ℃ 冰箱中低温处理 15 d 后转胚。

#### 2.4 胚状体的萌发与植株再生

将低温处理后的胚状体分别转移到普通 B<sub>5</sub> 培养基、加激素 B<sub>5</sub> 培养基中,观察胚状体的萌发、植株再生情况。转移到普通 B<sub>5</sub> 培养基中的胚状体均不能发育成正常植株,转移 10 d 后褐化死亡(图 2-I)。转移到加激素 B<sub>5</sub> 培养基中的胚大部分能正常萌发,7 d 后长出 2 片真叶(图 2-J),20 d 后发育成单倍体植株(图 2-L),50 d 后现蕾,有的胚发育成绿色簇状组织(图 2-K)。芥白杂种后代的胚状体萌发能力弱,在普通 B<sub>5</sub> 培养基中不能正常萌发,在加 6-BA、NAA 激素的 B<sub>5</sub> 培养基中生长较好,说明 6-BA、NAA 能促进胚状体萌发。

### 3 结论与讨论

小孢子培养是将植物的小孢子直接从花药中分离出来,使小孢子启动脱分化并发育成愈伤组织或单倍体胚,进而发育成完整植株的一种技术。小孢子培养技术可以提高育种效率,现已广泛应用于十字花科、禾本科、茄科等作物<sup>[14-16]</sup>。本研究以芥菜型油菜、白菜型油菜杂种后代 BC<sub>1</sub>F<sub>4</sub> 群体植株为供体材料进行小孢子培养,诱导成功频率明显偏低。影响油菜诱导频率的因素很多,包括花蕾长度、蔗糖浓度、培养基、及基因型组合等多种因素<sup>[17-18]</sup>。周永明等证实了种间杂种小孢子胚的形成很大程度上取决于 2 个亲本的胚胎发生能力<sup>[19]</sup>。芥菜型油菜、白菜型油菜相对于甘蓝型油菜来说,出胚能力差,培养体系不完善,出胚率偏低,导致其种间杂种后代群体小孢子的诱导频率更低。蔗糖浓度在诱导单倍体植株中起重要作用。NLN-17、NLN-20 培养基中小孢子发育较好,膨大的小孢子比例明显较 NLN-10、NLN-13 培养基高。这是因为高浓度蔗糖在小孢子分裂的早期起到调节渗透压的作用。随着小孢子的发育,低蔗糖浓度的 NLN-10、NLN-13 培养基出胚、成苗情况较好,NLN-17、NLN-20 培养基均未出胚。由此可知,芥白杂种后代植株在高蔗糖浓度培养基中的出胚能力差,低蔗糖浓度更有利于出胚,这与顾宏辉等的结论<sup>[10]</sup>一致。芥白杂种 BC<sub>1</sub>F<sub>4</sub> 植株小孢子形成的子叶形胚在普通 B<sub>5</sub> 培养基中不能正常分化成苗,在加激素的 B<sub>5</sub> 培养基中正常生长并能形成单倍体苗,说明 6-BA、NAA 能促进胚状体的分化。许多植物组织诱导产生芽时表现出对细胞分裂素的绝对需要。细胞分裂素在芽的增殖过程不可缺少,少量生长素对芽的分化、增殖更为有利<sup>[20]</sup>。本研究初步建立了芥白杂种后代群体的小孢子培养体系,成功获得了 BC<sub>1</sub>F<sub>4</sub> 植株小孢子培养再生植株,相对于已报道的芥菜型油菜、白菜型油菜等芸薹属作物的小孢子培养,芥白杂种后代植株的小孢子培养率偏低,培养条件有待进一步优化。

#### 参考文献:

- [1] Sodhi Y S, Chandra A, Verma J K, et al. A new cytoplasmic male sterility system for hybrid seed production in Indian oilseed mustard *Brassica juncea* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 114 (1): 93-99.
- [2] Lombard V, Delourme R. A consensus linkage map for rapeseed (*Brassica napus* L.): construction and integration of three individual maps from DH populations [J]. Theoretical and Applied Genetics,

- 2001, 103 (4): 491-507.
- [3] Pilet M L, Duplan G, Archipiano M, et al. Stability of QTL for field resistance to blackleg across two genetic backgrounds in oilseed rape [J]. Crop Science, 2001, 41 (1): 197-205.
- [4] 张永泰, 李爱民, 陆莉, 等. 通过甘蓝型油菜和白芥属间杂种后代的小孢子培养获得二体异附加系 [J]. 作物学报, 2006, 32 (11): 1764-1766.
- [5] Amante-Bordeos A, Stith L A, Nelson R, et al. Transfer of bacterial blight and blast resistance from the tetraploid wild rice *Oryza minuta* to cultivated rice, *Oryza sativa* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 84: 345-354.
- [6] Fu X L, Lu Y G, Liu X D, et al. Progress on transferring elite genes from Non-AA genome wild rice into *Oryza sativa* through interspecific hybridization [J]. Chinese Journal of Rice Science, 2008, 15 (2): 79-87.
- [7] Calderón M C, Ramírez M C, Martín A, et al. Development of *Hordeum chilense* 4H<sub>ch</sub> introgression lines in durum wheat: a tool for breeders and complex trait analysis [J]. Plant Breeding, 2012, 131 (6): 733-738.
- [8] Liu Z S, Guan C Y, Chen S Y, et al. Transfer of superior traits from *Brassica juncea* into *Brassica napus* [J]. Agricultural Science and Technology, 2010, 11 (6): 49-52.
- [9] 杜德志, 姚艳梅, 胡琼, 等. 新型特早熟春性甘蓝型油菜的遗传多样性及其杂种优势 [J]. 中国油料作物学报, 2009, 31 (2): 114-121.
- [10] 顾宏辉, 张冬青, 周伟军. 换培养液和秋水仙碱处理对白菜型油菜小孢子胚胎发生的影响 [J]. 作物学报, 2004, 30 (1): 78-81.
- [11] 高素燕, 侯喜林, 李英, 等. 不结球白菜小孢子胚植株再生及倍性研究 [J]. 西北植物学报, 2009, 29 (6): 1091-1096.
- [12] Agarwal P K, Agarwal P, Custers J M, et al. PCIB an antiauxin enhances microspore embryogenesis in microspore culture of *Brassica juncea* [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2006, 86 (2): 201-210.
- [13] Lionneton E, Beuret W, Delaitre C, et al. Improved microspore culture and doubled-haploid plant regeneration in the brown condiment mustard (*Brassica juncea*) [J]. Plant Cell Reports, 2001, 20 (2): 126-130.
- [14] Kim J, Lee S S. Identification of monogenic dominant male sterility and its suppressor gene from an induced mutation using a broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) microspore culture [J]. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 2012, 53 (3): 237-241.
- [15] Santra M, Ankrah N, Santra D K, et al. An improved wheat microspore culture technique for the production of doubled haploid plants [J]. Crop Science, 2012, 52 (5): 2314-2320.
- [16] Corral-Martínez P, Seguí-Simarro J M. Efficient production of callus-derived doubled haploids through isolated microspore culture in eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. Euphytica, 2012, 187 (1): 47-61.
- [17] 龙卫华, 浦惠明, 戚存扣, 等. 油菜小孢子高效培养体系构建 I. 影响小孢子成胚的若干因素研究 [J]. 江苏农业学报, 2008, 24 (6): 792-796.
- [18] 星晓蓉. 白菜型油菜小孢子培养成胚率及植株再生的影响因素 [J]. 西北农业学报, 2011, 20 (7): 94-97, 117.
- [19] 周永明, Scarth. 甘蓝型油菜和白菜型油菜种间杂种的小孢子培养 [J]. 植物学报, 1995, 37 (11): 848-855.
- [20] Kwangsoo K, Hyeonjun C, Youngseok J. Effects of culture condition on embryogenesis in microspore culture of *Brassica napus* L. domestic cultivar Tammiyuchae [J]. Korean Journal of Crop Science, 2012, 57 (4): 317-323.