

王丽丽,王鑫,吴海东,等. 微型大白菜“娃娃菜”优异双单倍体的创制与评价[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):236-238.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.065

# 微型大白菜“娃娃菜”优异双单倍体的创制与评价

王丽丽,王鑫,吴海东,田云,吕艳玲

(辽宁省农业科学院蔬菜研究所,辽宁沈阳 110161)

**摘要:**以 7 个“娃娃菜”优良杂交种为试材进行小孢子培养,通过优化培养条件建立高效培养体系。结果表明,不同基因型间的小孢子胚诱导能力差异极显著,33 ℃ 条件热击 48 h,胚诱导率达最大值;NLN-13+0.05 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA 为适宜的诱胚培养基,MS+3%蔗糖+0.75%琼脂+0.1 g/L 活性炭是小孢子植株继代和壮苗的适宜培养基,MS+3%蔗糖+0.7%琼脂+0.1 mg/L NAA 是小孢子植株适宜的生根培养基。通过游离小孢子培养,获得大量的小孢子胚状体和再生植株 195 株,筛选获得 2 个优异的双单倍体(DH 系)植株。

**关键词:**微型大白菜;游离小孢子培养;胚状体;再生植株;娃娃菜;双单倍体(DH 系);热击

**中图分类号:**S634.102.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)06-0236-03

大白菜是我国主要的蔬菜作物之一,备受育种工作者的关注。随着消费者对大白菜的球色、品质提出更高要求,为满足市场和消费者需求,研究者倾向于注重球色、品质以及品种的新、奇、特等开展各种类型大白菜品种的育种研究。“娃娃菜”别称微型大白菜,其名字起源于中国,是一种小株型、具有特殊食用价值的大白菜,外形美观、可密植、耐贮藏、耐运输,可保证产品的整齐一致,有利于实现产业化。娃娃菜由于生长周期一般为 45~50 d,相对较短,因此病虫害也较普通大白菜少,在生长过程中施用农药量也少,是一种绿色、安全的蔬菜。另外,娃娃菜纤维含量较少,营养物质含量更加丰富,口感更好。尽管“娃娃菜”的概念起源于中国,产地和消费市场均在中国,但我国开展娃娃菜育种较国外晚,目前市场上使用最多的却是韩国和日本品种,选育具有自主知识产权的娃娃菜品种是亟待解决的问题。

游离小孢子培养技术在花椰菜、菜薹、芥蓝、普通白菜、大白菜、青梗菜、小松菜等多种芸薹属农作物<sup>[1-7]</sup>上获得成功,用游离小孢子培养技术创制的双单倍体纯系(DH 系)作亲本可以加快育种进程。本试验选用引自韩国的 4 个娃娃菜杂交种及国内 3 个娃娃菜杂交种为材料,对影响娃娃菜胚状体发生及其成苗的关键因素如基因型、低温预处理及激素等进行系统分析,以更好地利用游离小孢子培养技术创制新、奇、特蔬菜品种 DH 系,创新种质资源,丰富大白菜品种类型。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于 2013 年 9 月在辽宁省农业科学院蔬菜研究所基地进行,试验材料共 7 个,分别为爱娃、小巧娃娃菜、明月娃娃菜、金玲等 4 个引自韩国的娃娃菜杂交种及秀丽娃娃菜、津夏三号、金春娃 2 号等 3 个中国产的娃娃菜杂交种。试材分

3 批播种,第 1 批于 8 月下旬开始,将萌动种子在 4 ℃ 冰箱中春化处理 25 d,9 月下旬播种于穴盘,11 月初栽植于花盆中温室培育,12 月中旬至翌年 3 月开花取样;第 2、第 3 批试材各延迟 30 d 播种,春化及定植时间顺延。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 游离小孢子培养方法** 小孢子培养采用常规方法,略有改进。开花期,采集健壮植株上长 2~3 mm 的花蕾,用流动的清水冲洗 5 min,75% 乙醇表面消毒 30 s,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液灭菌 8 min,无菌水洗 3 次,每次 5 min;沥干水分,B<sub>5</sub> 液体洗涤培养基中用玻璃棒碾压花蕾,挤出小孢子;小孢子悬浮液经孔径为 50 μm 的尼龙网过滤,1 100 r/min 离心 3 min;弃上清液,所得沉淀物即为纯净小孢子;将分离纯化的小孢子用 NLN-13 培养基悬浮,用直径为 60 mm 的培养皿分装,每皿 5 mL,Parafilm 膜封口;33 ℃ 条件下暗培养,然后转至 25 ℃ 条件下暗培养,直至 14~21 d 长出肉眼可见的胚状体。

**1.2.2 小孢子培养体系优化处理方法** 将分离纯化的小孢子悬浮液分别在 33 ℃ 条件下进行 24、48、72 h 热击暗培养 21 d,统计胚诱导率,比较 33 ℃ 热击处理不同时间对小孢子胚发生的影响;在 NLN-13 培养基中添加不同浓度 6-BA 和 NAA 培养 21 d,统计胚诱导率,比较培养基中 6-BA、NAA 浓度及其配比对小孢子胚发生的影响;将子叶形胚转入到添加不同浓度 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基中培养 25 d,统计胚成苗率,比较 MS 培养基中 6-BA、NAA 浓度及其配比对小孢子胚成苗的影响;将分生苗转入 MS 培养基中继代培养,每 25~30 d 继代 1 次,9 月下旬,将经过多次继代培养获得的试管苗转入到添加不同浓度 NAA 的 MS 培养基中培养 25 d 左右诱导生根,后移至花盆中温室培育。

### 1.3 统计与分析方法

利用流式细胞仪鉴定再生植株倍性;应用 DPS 2000 统计软件采用邓肯氏新复极法差对数据进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同品种小孢子胚诱导情况

由表 1 可知,NLN-13 培养基上培养小孢子 14~21 d,7

收稿日期:2016-01-07

基金项目:辽宁省科学事业公益基金(编号:2013002001)。

作者简介:王丽丽(1981—),女,河北沧州人,博士,助理研究员,主要从事十字花科蔬菜遗传育种研究。E-mail:wanglili\_81@163.com。  
通信作者:田云,硕士,副研究员。E-mail:clouctian@163.com。

个参试品种中有 3 个品种诱导出胚状体,诱导率为 42.9%;不同品种间的胚诱导能力有极显著差异,津夏三号相对最高,平均每蕾产胚为 1.51 个。

表 1 基因型对“娃娃菜”小孢子胚诱导率的影响

品种	品种来源	胚诱导能力 (胚/蕾)
津夏三号	天津科润	1.51A
秀丽娃娃菜	浙江温州	1.04B
金春娃 2 号	北京农林科学院蔬菜研究中心	0.54C
爱娃	韩国	0.00D
小巧娃娃菜	韩国	0.00D
明月黄娃娃菜	韩国	0.00D
金铃	韩国	0.00D

注:同列数据后不同大写字母表示处理间在 0.01 水平上差异极显著。下同。

2.2 小孢子胚诱导体系优化

2.2.1 热击处理对胚诱导的影响 将分离纯化的小孢子悬浮液在 33℃条件下分别热击暗培养不同时间。由表 2 可知,热击处理对娃娃菜小孢子胚诱导能力的影响效果明显,同一品种热击培养不同时间,其小孢子胚诱导能力差异极显著;不进行热击或热击培养 24 h,津夏三号等 3 个品种均未诱导出小孢子胚状体;热击 48 h 为最佳培养时间,胚诱导能量达到最大,津夏三号、秀丽娃娃菜、金春娃 2 号的平均每蕾产胚分别为 1.35、1.08、0.45 个,热击超过 48 h,胚诱导能力下降。

表 2 33℃热击处理对娃娃菜小孢子胚诱导的影响

热击时间 (h)	胚诱导能力(胚/蕾)		
	津夏三号	秀丽娃娃菜	金春娃 2 号
0	0.00C	0.00C	0.00C
24	0.00C	0.00C	0.00C
48	1.35A	1.08A	0.45A
72	0.95B	0.87B	0.04B

2.2.2 激素浓度对小孢子胚状体诱导的影响 由表 3 可知,添加适宜浓度 6-BA 和 NAA 的 NLN-13 培养基可以提高胚状体的诱导能力;胚状体发生培养基适宜的激素浓度为 6-BA 0.05 mg/L + NAA 0.05 mg/L,以津夏三号的胚诱导效果最高,平均每蕾产胚 1.35 个。

表 3 6-BA 和 NAA 对娃娃菜小孢子胚诱导的影响

6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	胚诱导能力(胚/蕾)		
		津夏三号	秀丽娃娃菜	金春娃 2 号
0.00	0.00	0.00D	0.00C	0.00C
0.05	0.00	0.04C	0.00C	0.00C
0.05	0.05	1.35A	1.01A	0.44A
0.05	0.10	1.15B	0.95A	0.04B
0.10	0.05	0.58C	0.46B	0.02B
0.10	0.10	0.09C	0.00C	0.00C

2.2.3 振荡培养对小孢子胚状体发育的影响 将培养 15 d 的小孢子胚状体在 25℃恒温摇床上 50 r/min 继续暗培养发现,与不振荡培养相比,振荡培养有利于促进子叶形胚状体的发育,胚状体生长速度加快(图 1-A)。

2.3 激素浓度对胚成苗的影响

试验结果表明,子叶形胚转入不含任何激素的 MS + 3%

蔗糖 + 0.8% 琼脂 + 0.1 g/L 活性炭培养基上培养 14~21 d,子叶形胚形成愈伤组织(图 1-B),并没有形成不定芽,而转入含有 1 mg/L 6-BA、0.1 mg/L NAA 的 MS + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + 0.1 g/L 活性炭培养基上培养,会分生出不定芽(图 1-C),添加激素浓度如过高,则影响不定芽的质量,产生畸形苗。在实际操作过程中,最好先将子叶形胚转入不含激素的 MS 培养基培养,形成愈伤组织后再转入含有激素的 MS 培养基,以促进更多丛生苗的形成。

2.4 继代和生根培养

将获得的小孢子分生苗转入 MS + 3% 蔗糖 + 0.75% 琼脂 + 0.1 g/L 活性炭培养基上进行继代培养,每隔 25 d 左右继代 1 次,经 2~3 次继代,小孢子由纤弱植株逐渐复壮形成再生植株(图 1-D);试管苗长到 6~7 片真叶时,将壮苗转到 MS + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂 + 0.1 mg/L NAA 的生根培养基上,培养 25 d 左右即可生出粗壮、整齐的白色根系,炼苗后移栽至花盆在温室中培育。目前,已经获得 195 株小孢子再生植株。须说明的是,小孢子植株继代和壮苗培养过程中,在培养基中添加 0.1 g/L 的活性炭会有利于小孢子植株的复壮。

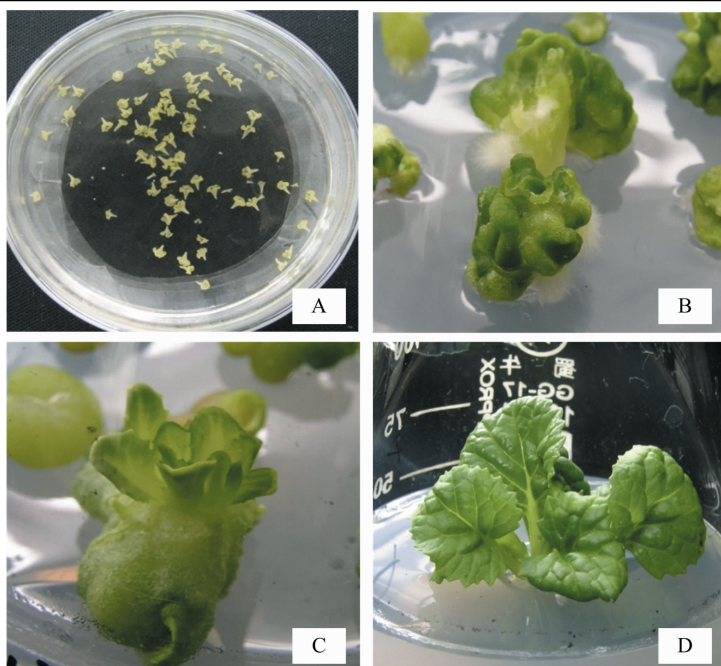
2.5 DH 系评价

对获得的再生植株测定其育性及倍性,结果表明,获得的 195 株再生植株,可育株有 167 株,不育株有 28 株,可育株中单倍体植株有 4 株,双单倍体植株有 155 株,四倍体植株有 8 株。经秋季田间性状鉴定,筛选出 2 个优良的 DH 系 15W05、15W16(图 2)。

3 讨论与结论

目前,有对春结球黄心大白菜、抗根肿病大白菜、耐抽薹大白菜等游离小孢子培养技术的研究报道<sup>[8-10]</sup>,主要是对影响胚状体发生及其成苗的关键因素包括基因型、低温预处理及激素等进行系统分析,完善小孢子培养技术体系。本试验将游离小孢子培养技术与育种实践相结合,重点研究娃娃菜游离小孢子的培养,旨在将该技术应用于创制新、奇、特的大白菜品种,以丰富大白菜种质资源。

蒋武生等开展基因型、高、低温预处理、激素对大白菜胚胎发生影响的研究,结果表明,基因型是决定小孢子胚发生的重要因素之一;适当的低温预处理或热击处理能够提高小孢子胚的发生频率;培养基中添加适宜浓度的激素 6-BA、NAA 能促进小孢子胚状体产生。本试验结果表明,不同品种娃娃菜的小孢子胚诱导能力差异显著;影响小孢子胚状体发生及发育的关键因素主要为热击处理、激素浓度及振荡培养;胚状体发生培养基中添加浓度均为 0.05 mg/L 的 6-BA、NAA,小孢子胚诱导率最高,这与前人研究结果<sup>[11-12]</sup>一致。小孢子正常是通过不对称核分裂后发育成花粉,而要让小孢子发育成胚,就要阻断原有的配子体发育,使小孢子进行对称性分裂向孢子体方向发育,才能诱导小孢子胚的发生<sup>[13-16]</sup>。姜立荣等观察白菜小孢子发现,单核晚期,小孢子大部分都有 1 个清晰的占整个细胞 50% 以上的大液泡,25℃条件下小孢子会进行不对称分裂,而经过 32℃处理,对称分裂成为其主要的分裂方式<sup>[13]</sup>。本试验中,热击预处理对娃娃菜小孢子胚发生的作用最为明显,分离纯化的小孢子悬浮液在 33℃条件下热击 24 h,未诱导出小孢子胚状体,热击 48 h 则胚诱导效果达到



A—胚状体; B—愈伤组织; C—分生出不定芽; D—再生植株

图1 娃娃菜小孢子胚发育途径



图2 娃娃菜优异的双单倍体(DH系)植株15W05、15W16

最大值,热击超过 48 h 时胚诱导能力下降,这说明热击处理也是影响小孢子胚发生的重要因素之一。

#### 参考文献:

- [1] 张晓芬,王晓武,张延国,等. 花椰菜游离小孢子培养再生植株研究[J]. 中国蔬菜,2005(1):16-17.
- [2] 王涛涛,李汉霞,张继红,等. 红菜薹游离小孢子培养与植株再生[J]. 武汉植物学研究,2004,22(6):569-571.

- [3] 何杭军,王晓武,汪炳良. 芥蓝游离小孢子培养初报[J]. 园艺学报,2004,31(2):239-240.
- [4] 耿建峰,侯喜林,张晓伟,等. 影响白菜游离小孢子培养关键因素分析[J]. 园艺学报,2007,34(1):111-116.
- [5] 李菲,张淑江,章时蕃,等. 大白菜游离小孢子培养技术高效体系的研究[J]. 中国蔬菜,2014(8):12-16.
- [6] 冯辉,杨硕,王超楠,等. 青梗菜优异 DH 系的创制与利用[J]. 中国农业科学,2009,42(9):3195-3202.
- [7] 于文佳. 小苤菜游离小孢子培养技术的优化[D]. 南京:南京农业大学,2012.
- [8] 潘洪艳,冯辉. 春结球黄心大白菜小孢子胚诱导和植株再生[J]. 中国蔬菜,2009(8):32-35.
- [9] 胡靖锋,戴永娟,汪骞,等. 抗根肿病大白菜小孢子培养优化条件研究[J]. 江西农业大学学报,2011,33(5):893-898.
- [10] 崔丽娟,于拴仓,薛林宝,等. 预处理对晚抽薹大白菜游离小孢子胚胎发生的影响[J]. 西北农业学报,2011,20(10):69-73.
- [11] 蒋武生,原玉香,张晓伟,等. 提高大白菜游离小孢子胚诱导率的研究[J]. 华北农学报,2005,20(6):34-37.
- [12] 包美丽,付颖,郑鹏婧,等. 黄心春结球白菜游离小孢子培养体系的优化[J]. 沈阳农业大学学报,2011,42(4):417-421.
- [13] 姜立荣,刘凡,李怀军,等. 大白菜小孢子胚状体发生早期的超微结构研究[J]. 北京农业科学,1996,16(3):28-31.
- [14] Fan Z, Armstrong K C, Keller W A. Development of microspores *in vivo* and *in vitro* in *Brassica napus* L [J]. Protoplasma, 1988, 147(2):191-199.
- [15] Telmer C A, Newcomb W, Simmonds D H. Microspore development in *Brassica napus* and the effect of high temperature on division *in vivo* and *in vitro* [J]. Protoplasma, 1993, 172(2):154-165.
- [16] Aionesei T, Touraev A, Heberle - Bors E. Pathways to microspore embryogenesis [M]//Haploids in crop improvement II - biotechnology in agriculture and forestry. Berlin: Springer - Verlag, 2005, 56: 11-34.