

大白菜游离小孢子培养研究进展

王秀英, 巫东堂*, 赵军良, 赵俊, 李改珍, 郭尚

(山西省农业科学院蔬菜研究所, 030032)

摘要: 综述了国内外大白菜游离小孢子培养的最新研究成果。重点讨论了大白菜游离小孢子培养的影响因素: 材料的基因型、供体植株的生理状况、小孢子发育时期、分离和培养方法、预处理、培养基及其添加物、胚状体诱导、植株再生和倍性鉴定等。展望了大白菜游离小孢子培养技术的应用前景, 同时指出了这一研究领域存在的问题。

关键词: 大白菜; 游离小孢子培养; 进展

大白菜 (*Brassica rapa* ssp. *Pekinensis*) 是十字花科芸薹属 (*Brassica*) 中最重要的蔬菜作物之一, 原产中国, 是中国乃至世界性的大宗蔬菜。大白菜在中国种植广泛, 其品种繁多, 风味各异, 且生长期短, 适应性强, 可以周年供应, 在蔬菜市场中占据重要地位。由于大白菜是异花授粉植物, 杂种优势十分明显, 因此培育纯合稳定的双单倍体 (DH 系) 植株在遗传育种研究中具有非常重要的意义。

小孢子是高等植物生活史中雄配子体发育过程中短暂而重要的阶段, 是减数分裂后四分体释放出的单核细胞。游离小孢子培养是指不经过任何形式的花药预培养, 直接从花蕾或花药中获得游离的、新鲜的小孢子群体而进行培养的方法。1982年 Lichter^[1]首次报道了在芸薹属作物中应用游离小孢子培养技术, 并取得了成功。大白菜游离小孢子培养研究始于 1989 年, 日本学者 Sato^[2]首次利用大白菜游离小孢子进行培养, 获得了再生植株。以后的二十几年时间里许多学者相继对影响小孢子成胚及植株再生的因素进行了探讨, 并取得了很大进展。

1 胚的诱导

胚的诱导在整个小孢子培养过程中占有举足轻重的地位, 胚诱导成功与否受材料基因型、供体植株生理状况、小孢子发育时期、培养基、培养方式、培养条件等多种因素影响。

1.1 基因型

基因型对胚的诱导的影响主要表现在 2 个方面, 一是能否诱导出胚, 即供体材料培养的成功率, 二是在能诱导出胚的前提下, 比较不同基因型材料之间胚诱导率的高低。北京农业生物技术研究中心的曹鸣庆等^[3]报道, 胚培养成功率为 94%, 胚诱导率最高的基因型平均每个花蕾出胚 359.28 个; 而河南省农科院园艺所的栗根义等^[4]研究表明, 胚诱导培养成功率为 93%, 最高诱导率为每个花蕾平均产胚 178 个; 山西省农科院蔬菜所王秀英等^[5]的研究结果是培养成功率为 50%, 胚诱导率最高的基因型平均每个花蕾出胚 86.41 个; 许艳辉等^[6]的试验, 培养成功率为 18.9%, 胚诱导率最高的基因型平均每皿产胚 187 个, 出胚量最低的基因型平均每个花蕾出胚都在 1 个以下。张凤兰等^[7]认为不同基因型大白菜胚状体发生能力有明显差异。小孢子胚胎发生能力同其他遗传性状一样, 是一种受基因调控的遗传特性^[8]。

1.2 供体材料的生理状况

供体材料的生理状况对胚的诱导有直接影响。Sato 等^[2]对生长在人工气候室 (温度 20 ℃, 光照 16 h/d, 光照强度 10 000 lx) 内的材料进行小孢子培养, 获得了较理想的结果。张凤兰^[7]报道, 来源于 14~18 h 长日照, 15~20 ℃ 的供体植株的胚诱导率

基金项目: 山西省农科院院育种基础 (编号: YYZJC0919)。

通讯作者: 巫东堂。

高。曹鸣庆^[3]研究发现,生长在10~25℃控温温室的材料,小孢子胚产量较高;生长在温度日变化10~35℃条件下的田间材料,小孢子胚产量明显下降。王秀英等^[9]将供体材料种植在不可控温的连栋温室内,由于通风条件不太好,15:00左右温度可达40℃,但生长在里面的夏白菜出胚率较高,而春白菜和秋白菜出胚率则较低,可能是由于夏白菜耐高温的原因。

1.3 小孢子的发育时期

栗根义等^[4]研究发现,小孢子培养的最佳时期是单核晚期至双核早期,此时的花蕾长度为2.0~2.5 mm,花瓣与花药长度比为1/2~3/4。另外,花蕾大小还与基因型、生长条件及花蕾在植株上所处的位置有关^[10],因此在培养之前,必须进行镜检以确定小孢子发育时期。而王秀英等^[11]研究发现,即使是小孢子发育处于单核晚期至双核早期,取蕾时间不同,胚诱导率也不同,下午取蕾的胚诱导率要比上午高。石淑稳等^[12]研究报道,同一材料第一天取蕾培养效果好,第二天取蕾培养效果则不一定好,这可能与田间植株每天所遇到的自然气候不同有关,因此同一个材料往往需要重复接种培养。笔者在小孢子培养的实际工作中也遇到过同样的情况。

1.4 小孢子的分离和培养方法

小孢子培养为液体悬浮培养。挤压法是最常用的分离方法,是将无菌花蕾在研钵或大试管内挤破散出小孢子,经过滤、离心、纯化,转移到液体培养基中进行培养。培养方法是小孢子先经33℃热激24 h后,转入25℃常温培养至胚形成。培养方式有液体静置培养和振荡培养2种。蒋武生等^[13]研究发现,转入25℃常温培养,采取连续振荡培养的方式,有利于小孢子胚的诱导形成和子叶胚的比例提高。申书兴等^[14]研究报道,小孢子先静置培养2周,再振荡培养1周(60 r/min),可促使原胚迅速发育成子叶胚,并提高胚发育的同步性。顾宏辉等^[15]的研究结果表明,33℃热激后更换培养液能明显提高胚状体产量和改善胚状体质量。

1.5 培养材料预处理

蒋武生等^[10]研究认为,在培养前对花蕾进行低温(4~6℃)预处理1~4 d,可促进小孢子脱分化和诱导成胚。而耿建峰等^[16]的研究结果是将供试花蕾接种前放在4℃条件下处理,对小孢子胚诱导率

影响不大,处理时间超过5 d诱导率则明显下降。

高温预处理是小孢子分离纯化后在33℃下培养24 h左右。栗根义等^[17]对高温预处理的小孢子培养的细胞学特征进行了研究,经过1 d培养,活体小孢子明显膨大,培养3 d后小孢子开始细胞分裂,培养9 d后小孢子发育成肉眼可见的胚。高温预处理改变了小孢子发育途径,由配子体发育转变为孢子体发育而诱导出胚,未经高温处理的小孢子则没有诱导出胚。刘公社等^[18]进一步研究认为,若以高温诱导的小孢子分裂频率为评价指标,小孢子接受高温处理的敏感期位于前12 h,以胚胎发生频率为评价指标,敏感期位于前24 h内。李菲等^[19]的研究结果是大白菜小孢子胚再生植株具有较高的自然加倍率,这与小孢子培养高温预处理诱导激发小孢子单核自然加倍为二倍体密切相关。

1.6 培养基及其添加物

目前在大白菜游离小孢子培养中主要使用NLN培养基+13%蔗糖,培养效果最好,至今在B5和MS培养基上未见有成功的报道。培养基添加物有氨基酸、激素和活性炭等。谷氨酰胺对胚的正常发育有利,能降低畸形胚的比率,提高成苗率。关于植物激素的作用是促进还是抑制,目前为止研究者未能取得一致结论。Sato^[2]认为,添加激素(NAA 0.5 mg/L + 6-BA 0.05 mg/L)与否,小孢子胚的诱导率差别不显著。蒋武生等^[20]多年来对大白菜的研究结果均以不添加激素的NLN培养基效果最好。而徐艳辉等^[6]研究发现,细胞分裂素(BA)对大白菜小孢子胚发生有一定的促进作用,最佳浓度为0.2 mg/L,但对难成胚的基因型作用不大。石淑稳等^[12]报道,91-810和91-806等植株的小孢子在不加2,4-D的培养基中不产生胚状体,当培养基中添加0.1 mg/L 2,4-D后小孢子产生了胚状体。蒋武生等^[6,13,21]报道添加适量的活性炭有利于胚状体的形成。活性炭能吸附培养基中的5-羟甲基糠醛,它对离体组织的生长有一定的抑制作用。

2 胚状体发生及植株再生

胚发育具有不同步性,在同一培养皿中原胚、球形胚、心形胚、鱼雷形胚和子叶形胚并存,同时还有畸形胚。不同类型的胚成苗率不同,子叶形胚成苗率最高,球形胚难以再生成苗,心形胚和鱼雷

形胚有部分胚能成苗。

转移到不添加或添加少量激素的B5或MS培养基上,部分胚成苗。小孢子胚成苗率差异很大,Sato的实验中,成苗率为5%~10%。不能成苗的原因很多,其中一个重要原因是胚发育停留在某一阶段(特别是球形胚和心形胚或鱼雷形胚),子叶形胚缺乏茎尖生长点^[22]。将胚及时转入固体培养基,并适当低温处理^[23],培养基中添加适量的活性炭^[24],将培养基中的琼脂浓度从0.8%提高到1.2%等措施^[25]都可以提高胚的成苗率。

3 小孢子植株的倍性

游离小孢子培养发育成的植株,理论上讲都应该是单倍体,实际上是单倍体、双单倍体、四倍体、非整倍、嵌合体等并存,以双单倍体所占比例最大,其次是单倍体。大白菜小孢子植株有自然加倍为二倍体的特点,自然加倍率为60%~70%^[26]。据笔者观察,双单倍体植株的花器正常,能够蕾期自交结子,最多1株可收19.3g种子。四倍体、非整倍、嵌合体等倍性的植株往往表现高度不孕,结籽率很低甚至不结籽而被自然淘汰。单倍体植株所占比例很小,为了能使单倍体植株正常结籽,必须诱导染色体加倍。现今诱导染色体加倍的化学药剂主要是秋水仙碱,浓度为0.01%~0.41%,而以0.2%左右的浓度应用最广。

4 大白菜游离小孢子培养技术的应用前景

大白菜游离小孢子培养技术是现代兴起的一项细胞工程技术,是在单细胞水平上获得DH纯系的方法,能够在较宽的基因型范围内以较高的胚状体发生率获得小孢子胚和再生植株,而小孢子植株又具有自然加倍为二倍体的特点,可在1~2年内获得优良自交系和自交不亲和系,用于育种可大大缩短育种年限,从而提高育种效率。游离小孢子培养技术与传统育种技术的有机结合必将成为常规育种的一个重要组成部分。

小孢子诱导形成的DH株系隐性性状易于表达,给人工选择带来了最大的便利。植株群体中有单倍体、双单倍体、多倍体等多种类型,为遗传分析和分子标记育种提供各类研究材料。小孢子具有单细胞、单倍性、群体数量多,自然分散性好、不受体

细胞干扰、便于遗传操作等优点,可直接诱发突变并进行抗病和抗逆基因筛选。小孢子和小孢子胚是植物基因工程的理想受体,可用于遗传转化得到纯合、性状稳定的转化株,具有广阔的应用前景。

游离小孢子培养技术成为获得大白菜单倍体和DH植株的重要途径。虽然如此,目前的研究水平尚未达到随意操控基因型的程度,这一领域存在的问题的核心是尚未完全了解小孢子是如何被激发进入孢子体发育途径的。揭开小孢子胚胎发生之谜,从任意基因型生产足够数量的小孢子胚及DH系,还需要研究者进一步探索与发现。

参考文献

- [1] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* L. [J]. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 1982,105(5):427-434.
- [2] Sato T, Nishio T, Hirai M. Plant regeneration from isolation microspore of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *Pekinensis*) [J]. Plant Cell Reports, 1989,8(8):486-488.
- [3] 曹鸣庆,李岩,刘凡.基因型和供体植株生长环境对大白菜游离小孢子胚胎发生的影响[J].华北农学报,1993,8(4):1-6.
- [4] 栗根义,高睦枪,赵秀山.大白菜游离小孢子培养[J].园艺学报,1993,20(2):167-170.
- [5] 王秀英,巫东堂,赵军良,等.影响大白菜游离小孢子培养若干因素的研究[J].山西农业大学学报:自然科学版,2009,29(3):243-247.
- [6] 许艳辉,冯辉,张凯.大白菜游离小孢子培养中若干因素对胚状体诱导和植株再生影响[J].北方园艺,2001(3):6-8.
- [7] 张凤兰,丁贯靖久,吉川宏昭.环境条件对白菜小孢子培养的影响[J].华北农学报,1994,9(1):95-100.
- [8] 申书兴,赵前程,刘世雄,等.四倍体大白菜小孢子植株的获得与倍性鉴定[J].园艺学报,1999,26(4):232-237.
- [9] 王秀英,巫东堂,赵军良,等.大白菜品种间小孢子培养胚诱导率比较[J].山西农业科学,2008,36(12):67-68.
- [10] 蒋武生,张晓伟,原玉香,等.大白菜游离小孢子培养技术研究进展及应用[J].河南农业科学,2009(9):151-154.
- [11] 王秀英,巫东堂,赵军良,等.影响大白菜游离小孢子培养因素的研究[J].中国瓜菜,2009,22(2):10-12.
- [12] 石淑稳,周永明,吴江生,等.甘蓝型油菜小孢子培养、染色体加倍、试管苗继代越冬和田间移栽配套技术的研究及其在油菜育种中的应用[J].中国农学通报,2001,17

朝阳区农产品监控体系的建设及应用

张 宸, 王银忠

(北京市朝阳区种植业养殖业服务中心, 100018)

摘要: 介绍了朝阳区农产品质量监控体系建设工作的发展情况, 并根据现阶段的发展情况提出了进一步提升监控水平的建议。

关键词: 质量安全; 监控体系; 建议

农产品质量是政府重视、社会关注的热点问题, 为了提高农产品的质量安全, 各级政府部门采取了多种措施, 使得农产品质量安全水平有了大幅提升。农产品质量安全监控、检测体系是农产品质量安全体系的主要技术支撑, 是政府实施农产品质量安全管理的重要手段, 承担着为政府提供技术决策、技术服务和技术咨询的重要职责, 在提高农产品质量与安全水平方面发挥着关键与核心作用, 对确保农产品消费安全、提高农产品市场竞争力等

方面具有十分重要的意义。近年来, 朝阳区不断加大农产品质量安全监控工作力度, 目前已取得了很好的效果。

1 朝阳区农产品质量监测工作情况

1.1 朝阳区农产品产销现状

随着城乡一体化进程不断深入, 朝阳区由一个农产品生产大区演变成了农产品消费大区, 农产品生产供应总量所占消费总量的比率不足5%, 外埠进京农产品数量占全区消费总量的95%以上。在加强农产品产地监测的同时, 大力加强外埠进京农产品的监测工作显得十分重要。

1.2 监测工作开展情况

朝阳区植保站自2002年起就开展了农产品质量

- (2):57-59.
- [13] 蒋武生, 姚秋菊, 张晓伟, 等. 活性炭和振荡培养对提高大白菜胚诱导率的影响[J]. 河南农业科学, 2008(4):1-3.
- [14] 申书兴, 梁会芬, 张成合, 等. 提高大白菜小孢子胚胎发生及植株获得率的几个因素研究[J]. 河北农业大学学报, 1999, 22(4):65-68.
- [15] 顾宏辉, 朱金庆, 张国庆, 等. 菜薹小孢子培养及再生植株的倍性鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(6):572-576.
- [16] 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.
- [17] 栗根义, 高睦枪, 赵秀山. 高温处理对大白菜游离小孢子培养的影响[J]. 实验生物学报, 1993, 26(2):165-169.
- [18] 刘公社, 李岩, 刘凡, 等. 高温对大白菜小孢子培养的影响[J]. 植物学报, 1995, 37(2):140-146.
- [19] 李菲, 张淑江, 章时蕃, 等. 大白菜游离小孢子培养胚胎发生中的加倍机制[J]. 园艺学报, 2006, 33(5):974-978.
- [20] 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.
- [21] 刘凡, 莫东发, 姚磊, 等. 遗传背景及活性炭对白菜小孢子胚胎发生能力的影响[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(3):297-300.
- [22] 李岩, 刘凡, 曹鸣庆. 通过游离小孢子培养方法获得小白菜三个变种的胚胎和植株[J]. 华北农学报, 1993, 8(3):92-97.
- [23] 周伟军, 毛碧增, 顾宏辉, 等. 秋水仙碱及热击与低温诱导对油菜小孢子胚状体成苗率的影响[J]. 作物学报, 2002, 28(3):369-373.
- [24] 韩阳, 叶雪凌, 冯辉. 提高大白菜小孢子植株获得率的研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(6):1092-1094.
- [25] 刘凡, 李岩, 姚磊, 等. 培养基水分状况对大白菜小孢子胚成苗的影响[J]. 农业生物技术学报, 1997, 5(2):131-136.
- [26] 张凤兰, 钉贯靖久. 大白菜小孢子再生植株自然加倍率的探讨[J]. 北京农业科学, 1993, 11(2):23-25. 固