

羽衣甘蓝小孢子再生植株的倍性鉴定及加倍

王玉书¹,王欢²,高美玲¹,祁宏英¹,陈阳¹,田欣¹,金一锋¹,冯辉^{3*}
(1. 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 齐齐哈尔大学 化学与化学工程学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006; 3. 沈阳农业大学 园艺学院,辽宁 沈阳 110161)

摘要: 为了提高羽衣甘蓝小孢子植株中二倍体比例,以波浪叶红心、皱叶红心、红欧、白欧为供试材料,利用流式细胞仪对其小孢子再生植株的倍性进行分析,采用秋水仙素溶液对单倍体植株和游离小孢子进行诱导加倍。结果表明:含 75 mg/L 秋水仙素的培养基处理单倍体试管苗,波浪叶红心与皱叶红心的双单倍体比例分别为 20.0%、5.0%,效果较差;1 000 mg/L 秋水仙素溶液浸根处理的波浪叶红心与皱叶红心的双单倍体比例分别为 53.3% 和 25.0%,效果较好;50 mg/L 秋水仙素溶液处理小孢子 36 h,4 份材料的加倍效果均最好,其中红欧双单倍体比例高达 55.6%。

关键词: 羽衣甘蓝; 再生植株; 倍性鉴定; 加倍

中图分类号: S635 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004 - 3268(2015)07 - 0107 - 05

Ploidy Identification and Chromosome Doubling in Microspore Regenerated Plantlet of Kale

WANG Yushu¹, WANG Huan², GAO Meiling¹, QI Hongying¹, CHEN Yang¹,
TIAN Xin¹, JIN Yifeng¹, FENG Hui^{3*}
(1. Department of Life Sciences, Agriculture and Forestry, Qiqihaer University, Qiqihaer 161006, China;
2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihaer University, Qiqihaer 161006, China;
3. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: In order to increase the proportion of diploid kale microspore plantlets, the ploidy level of microspore plantlets(Bolangyehongxin, Zhouyehongxin, Hongou, Baiou) was identified by the DNA flow cytometry, and the haploid plantlets and isolated microspore were treated with colchicines solution. The results showed that the haploid plantlets were cultured in MS medium containing 75 mg/L colchicines, the diploid induction rate of Bolangyehongxin and Zhouyehongxin were 20.0% and 5.0% respectively, the effect was worse; the root of haploid plantlets were soaked in 1 000 mg/L colchicine, the diploid induction rate of the above two varieties were 53.3% and 25.0% respectively, the effect was better; the isolated microspore was treated with 50 mg/L colchicine for 36 h, the diploid induction rates of the four varieties were the highest, the Hongou double haploid ratio was the highest with 55.6% .

Key words: kale; regenerated plantlet; ploidy identification; doubling

羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *acephala*) 是十字花科芸薹属甘蓝种的一个变种, 叶片形态美观多变, 色彩绚丽, 被形象地称为“叶牡丹”, 观赏期长达

3~4 个月, 在我国观赏植物生产中占有重要的地位^[1]。羽衣甘蓝为绿体春化型植物, 选育杂交种亲本自交系一般需要 7~8 a。而通过小孢子培养产生

收稿日期: 2015 - 01 - 21
基金项目: 国家自然科学基金项目(31401908); 齐齐哈尔大学青年教师科研启动支持计划项目(2014k - M21)
作者简介: 王玉书(1985 -), 女, 黑龙江富锦人, 讲师, 博士, 主要从事观赏植物遗传育种与分子生物学研究。
E - mail: wangys1019@126.com
* 通讯作者: 冯辉(1961 -), 男, 辽宁法库人, 教授, 主要从事蔬菜遗传育种和分子生物学研究。
E - mail: fenghuiaaa@263.net

的单倍体加倍可获得全部基因同质的双单倍体纯系(DH系),因此可以快速纯化育种材料,加快育种进程,是一种较为成熟的生物技术育种方法^[2]。此外,游离小孢子培养也为遗传转化和基因定位提供了良好的途径^[3-4]。

自从 Lichter^[5]首次成功地在甘蓝型油菜上通过小孢子培养获得植株以来,这一技术在许多十字花科植物上得到了不断的改进和发展。迄今,小孢子培养已经在芸薹属 10 多种植物上获得了成功^[6-10]。羽衣甘蓝小孢子培养也取得了一定的进展^[11-13]。但是,羽衣甘蓝小孢子培养中再生植株自然加倍效率低、存活率低的问题仍然存在^[14],关于其单倍体植株加倍技术的研究未见报道。本研究采用秋水仙素溶液对羽衣甘蓝小孢子再生植株和游离小孢子进行加倍处理,并采用流式细胞仪 DNA 含量分析法来鉴定植株倍性,研究不同处理对羽衣甘蓝小孢子再生植株的加倍效果,以期筛选出行之有效的加倍方法,为应用小孢子培养技术进行羽衣甘蓝遗传改良提供有益参考。

1 材料和方法

1.1 材料

以羽衣甘蓝红欧、白欧、皱叶红心和波浪叶红心 4 个品种为试材,8 月中旬穴盘育苗,9 月中下旬分盆,11 月份移到温室接受 16 h 长光照处理,翌年于花期取材进行小孢子培养。

1.2 试验方法

1.2.1 小孢子植株的获得 于花期采集大小合适的花蕾进行游离小孢子培养,获得胚状体,胚植株再生获得小孢子植株,具体方法参照姜凤英等^[15]的方法。经几次继代后,采用流式细胞仪 DNA 含量分析法鉴定小孢子植株染色体倍性,具体参照袁素霞等^[16]的测定方法,以普通二倍体植株嫩叶作对照。鉴定为单倍体的植株用于植株加倍试验,处理后的植株倍性鉴定方法同上。

1.2.2 加倍方法的比较

1.2.2.1 不同质量浓度秋水仙素处理切根单倍体植株的加倍效率 将波浪叶红心和皱叶红心的单倍体小孢子植株根部切除(保留 3 对真叶),转至含 0 mg/L(CK)、50 mg/L、75 mg/L 和 100 mg/L 秋水仙素的 MS 培养基中处理 7 d,之后转入不含诱变剂的相同培养基中。

1.2.2.2 不同质量浓度秋水仙素浸根处理单倍体植株的加倍效率 以波浪叶红心和皱叶红心的单倍

体试管苗作为研究对象,生根后将其根部清洗干净后浸于秋水仙素质量浓度为 0 mg/L(CK)、500 mg/L、1 000 mg/L 和 2 000 mg/L 的溶液中,时间均为 4 h,处理完毕后用水冲洗根部,移栽于小钵中,精心管理直至植株恢复生长。

1.2.2.3 不同时间秋水仙素处理小孢子的加倍效率 以同一次接种的花蕾为材料,利用秋水仙素对 4 个供试材料的游离小孢子进行处理。设置秋水仙素质量浓度为 50 mg/L,5 种预处理时间分别为 0 h(CK)、24 h、36 h、48 h、72 h,比较不同处理时间下植株加倍效率的差异。

1.2.3 试管苗移栽 将小孢子植株在室温条件下炼苗 2~3 d,从培养基中取出,把培养基清洗干净,之后移栽到营养钵中,置于温室中培养,用塑料薄膜遮盖保湿。温室内白天温度控制在 $(28 \pm 5)^\circ\text{C}$ 、夜晚温度在 $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$,光照为自然光照,当光照强烈时遮盖黑色遮阳网以降低温度。待植株长出 5~6 片真叶时鉴定倍性。

2 结果与分析

2.1 不同基因型材料染色体自然加倍率差异分析

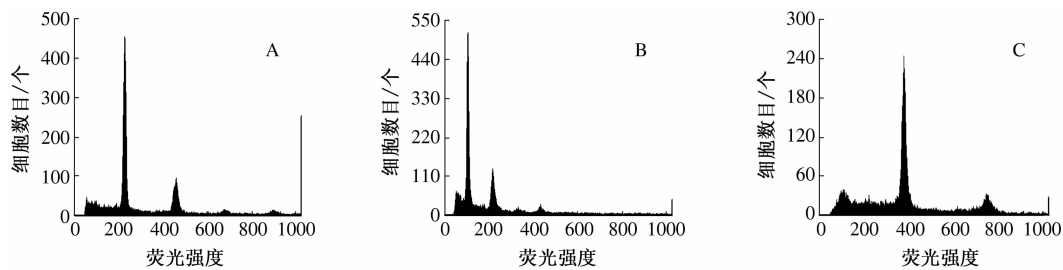
随机取 4 个品种的 63 株小孢子试管苗进行了倍性鉴定,通过流式细胞仪可以清楚地检测出植株倍性水平,二倍体(对照)与双单倍体的分离峰都出现在荧光强度 200 处(图 1A),二者没什么区别;单倍体的分离峰出现在荧光强度 100 处(图 1B);四倍体分离峰出现在荧光强度 400 处(图 1C),在本试验中未检测出其他倍性的材料,结果如表 1 所示。4 份供试材料的小孢子植株自然加倍率之间存在较大差异。其中,皱叶红心 31 株再生植株中 30 株为单倍体,双单倍体比例最低,仅为 3.23%;而红欧、白欧和波浪叶红心具有不同倍性的自然分布,3 个品种中红欧双单倍体比例最高,为 33.3%。单倍体如果不进行人工处理,在生长后期不能正常授粉受精从而失去利用价值,极大地浪费了试验材料。因此,尽早鉴定出小孢子植株倍性,及时对自然加倍率低的基因型进行人工加倍非常有必要。

2.2 不同质量浓度秋水仙素处理对切根单倍体植株加倍的影响

将供试的单倍体试管苗切去根部,接种到含不同质量浓度秋水仙素的 MS 固体培养基中 7 d 后,转入无秋水仙素的 MS 培养基中继续培养,培养过程中发现试管苗叶片干枯脱落,茎基部形成肿块,阻碍植株吸收营养,大部分植株死亡,仅有少数植株可以

生出新芽,新芽转到新鲜培养基上可以继续生长形成完整植株。不同质量浓度秋水仙素处理对小孢子植株加倍结果如表 2 所示,秋水仙素为 50 mg/L 时,波浪叶红心获得了 1 株加倍植株,加倍率为 10.0%;当培养基中秋水仙素质量浓度提高至 75 mg/L,双单倍体比例有所增加,波浪叶红心和皱叶红心的双单

倍体比例分别为 20.0% 和 5.0%;当培养基中秋水仙素质量浓度提高至 100 mg/L,2 个基因型均没有得到加倍植株。由此看出,这种加倍方法处理的植株双单倍体比例较低,并且后期小植株死亡率很高,因此不宜用于遗传育种研究。



A:双单倍体(二倍体); B:单倍体; C:四倍体

图 1 小孢子植株流式细胞仪鉴定结果

表 1 羽衣甘蓝小孢子植株的倍性变异

品种	鉴定株数	单倍体		双单倍体		四倍体	
		株数	百分比/%	株数	百分比/%	株数	百分比/%
红欧	15	7	46.7	5	33.3	3	20.0
白欧	11	7	63.6	3	27.3	1	9.1
波浪叶红心	6	5	83.3	1	16.7	0	0
皱叶红心	31	30	96.8	1	3.2	0	0
总计	63	49	77.8	10	15.9	4	6.3

表 2 秋水仙素对切根单倍体植株染色体加倍的影响

秋水仙素质量 浓度/(mg/L)	单倍体株数		双单倍体株数		双单倍体比例/%	
	波浪叶红心	皱叶红心	波浪叶红心	皱叶红心	波浪叶红心	皱叶红心
0	15	10	0	0	0	0
50	10	10	1	0	10.0	0
75	10	20	2	1	20.0	5.0
100	8	9	0	0	0	0

2.3 不同质量浓度秋水仙素浸根处理对单倍体植株加倍的影响

从表 3 可以看出,秋水仙素浸根处理的最佳质量浓度为 1 000 mg/L,波浪叶红心和皱叶红心 2 个

基因型的双单倍体比例分别为 53.3% 和 25.0%,但是在植株移栽后缓苗较慢,成活率较低,花期容易出现花器官畸形的现象。

表 3 秋水仙素浸根处理对单倍体植株染色体加倍的影响

秋水仙素质量 浓度/(mg/L)	单倍体株数		双单倍体株数		双单倍体比例/%	
	波浪叶红心	皱叶红心	波浪叶红心	皱叶红心	波浪叶红心	皱叶红心
0	10	10	0	0	0	0
500	15	9	4	1	26.7	11.1
1 000	15	12	8	3	53.3	25.0
2 000	8	9	3	3	37.5	33.3

2.4 秋水仙素不同预处理时间对离体小孢子加倍的影响

从表 4 可以看出,用 50 mg/L 秋水仙素处理小孢子 24 h 后,再生植株中红欧双单倍体比例最高,为 41.7%;皱叶红心双单倍体比例最低,为 5.3%,

4 个基因型与对照相比双单倍体比例都略有提高。处理 36 h 的 4 个基因型双单倍体比例均为 4 种处理中最高,红欧双单倍体比例为 55.6%,皱叶红心双单倍体比例也达到 14.3%。当处理时间延长到 48 h 时,加倍效率开始呈明显下降趋势。

表 4 秋水仙素对离体小孢子再生植株染色体加倍的影响

处理时间 /h	再生植株数				双单倍体株数				双单倍体比率/%			
	红欧	白欧	波浪叶	皱叶	红欧	白欧	波浪叶	皱叶	红欧	白欧	波浪叶	皱叶
			红心	红心			红心	红心			红心	红心
0	14	20	16	26	5	5	3	1	35.7	25.0	18.8	3.9
24	12	9	8	19	5	3	2	1	41.7	33.3	25.0	5.3
36	18	9	14	21	10	4	5	3	55.6	44.4	35.7	14.3
48	14	10	11	15	3	2	2	1	21.4	20.0	18.2	6.7

3 结论与讨论

由小孢子培养得到的再生植株群体普遍存在倍性复杂的现象^[17-18]。不同倍性植株在一些形态特征上存在差异。单倍体植株花蕾较小,没有花药或花药短缩,生活力、生长势等较正常二倍体差;二倍体植株花器官发育正常,生长势强;倍性水平高的植株叶片、花蕾较二倍体大^[19-20]。然而,植株形态鉴定法易受植株长势、养分条件等因素影响,且需要熟知不同倍性植株的形态特征,影响因素较多并具有一定滞后性。利用流式细胞仪测定 DNA 含量进行倍性分析,可以在早期对植株倍性进行鉴定,省去了不必要的工作量,进而提高育种效率,且准确率高达 94.4%^[21]。但所需仪器设备及药品价格昂贵,鉴定成本较高,很多育种单位尚不具备这种能力。本研究利用流式细胞仪对供试 4 个基因型小孢子植株的倍性进行分析,其中双单倍体植株占 15.9%,单倍体植株比例高达 77.8%,四倍体植株仅占 6.3%,羽衣甘蓝这种自然双单倍体比例低的现象与冯辉等^[14]的研究结果相一致。不同基因型材料之间倍性分布也有明显不同,因此在再生植株生长发育早期阶段,快速、准确地鉴定染色体倍性,及时采取适当的加倍处理显得尤为重要。

单倍体植株能正常地生长到开花期,但由于缺少同源染色体,减数分裂不能正常进行,因而不能形成有活力的花粉,无法正常结实,单倍体植株能否二倍化成为小孢子培养技术的关键性问题,加倍效率的高低直接影响小孢子培养结果。目前普遍采用秋水仙素进行染色体加倍,Polsoni 等^[2]在植株的花期将鉴定出的单倍体拔出,用秋水仙素浸根,提高了双单倍体比例;朱彦涛等^[22]在甘蓝型油菜小孢子植株加倍研究中发现,移栽前对试管苗浸根,植株双单倍体比例和成活率最高;而 Zhou 等^[23]用秋水仙素处理油菜小孢子后再生植株的双单倍体比例达到 70%。本研究系统比较不同秋水仙素加倍方法,单倍体试管苗于含秋水仙素的培养基中进行加倍处理,秋水仙素用量少,但对试管苗生长造成极其不利的影响,效果最差;在单倍体试管苗移栽前用高浓度的秋水仙素水溶液浸根的方法比较简便,但高浓度秋水仙素对试管苗毒

害性强,植株生长后期容易出现花器官畸形。而研究^[24]表明,用 50 mg/L 秋水仙素处理油菜游离小孢子 36 h 的加倍效率最高,达到 52.9%,而且秋水仙素对小孢子发育、胚状体再生和植株生长的影响较小,基本不会影响试管苗移栽成活率;也有研究^[12]认为添加秋水仙素于 NLN 培养基中可以提高胚诱导率,具体的机制还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 王怀名,杜广岑,贾翠莹,等. 观赏羽衣甘蓝的离体繁殖[J]. 华北农学报,1995,10(1):64-69.

[2] Polsoni L, Kott L S, Beversdorf W L. Large scale microspore culture technique for mutation selection studies in *Brassica napus*[J]. Can J Bot,1988,66:1681-1685.

[3] Jain S M, Sopory S K, Veilleux R E. *In vitro* haploid production in higher plants[M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers,1996:143-172.

[4] Stöger E, Fink C, Pfosser M, et al. Plant transformation by particle bombardment of embryogenic pollen[J]. Plant Cell Reports,1995,14(5):273-278.

[5] Lichter R. Efficient yield of embryo by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species[J]. Plant Breed,1989,103:119-123.

[6] Takahata Y, Keller W A. High frequency embryogenesis from microspore culture of *Brassica oleracea*[J]. Jpn J Breed,1990,40(1):134-135.

[7] Duijs J G, Voorrips R E, Visser D L. Microspore culture is successful in most types of *Brassica oleracea* L. [J]. Euphytica,1992,60:45-55.

[8] Dias J S, Martins M G. Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different *B. oleracea* morphotypes[J]. Scientia Horticulturae,1999,82:299-307.

[9] 严准,田志宏,孟金陵. 甘蓝游离小孢子培养的初步研究[J]. 华中农业大学学报,1999,18(1):5-7.

[10] 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.

[11] 冯辉,冯建云,姜凤英,等. 影响羽衣甘蓝游离小孢子培养中胚状体发生的几个因素[J]. 植物生理学通讯,2007,43(3):545-546.

[12] Zhang W, Fu Q, Dai X G, et al. The culture isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration[J]. Scientia Horticulturae,2008,117:69-72.

表 5 不同样地枸杞内生真菌相似性系数 (CS)					
样地编号	SY1	SY2	SH	XS	DSH
SY2	0.333				
SH	0.308	0.333			
XS	0.313	0.267	0.308		
DSH	0.357	0.308	0.364	0.429	
SY3	0.438	0.267	0.308	0.500	0.429

3 结论和讨论

本研究表明,内生真菌广泛分布于枸杞健康枝内,其大多数属半知菌,少数属于囊菌,其中,拟茎点霉属、链格孢属、镰刀菌属和刺盘孢属真菌为信阳野生枸杞枝栖优势真菌。内生真菌在枸杞枝组织内定殖率达 56.8%,枸杞生境是影响其枝栖内生真菌多样性的重要因素。

刘建利对宁夏枸杞 (*Lycium barbarum*) 内生真菌的种类及分布进行了研究,共分离鉴定得到 7 个茎栖真菌 7 个属,分别为青霉属、黑葱花霉属、链格孢属、镰孢霉属、曲霉属、枝梗茎点霉属、根霉属,其中,链格孢属真菌为优势菌群^[11];王维等对黑果枸杞内生真菌进行了分离鉴定,共得到真菌 12 个属(曲霉属、拟青霉属、平脐蠕孢属、毛霉属、葡萄孢属、青霉属、链格孢属、镰刀菌属、腐霉属、茎点霉属、鲜壳孢属、*Thamnomycetes*),其中,优势菌群为曲霉属^[12]。通过对上述研究结果与本研究结果比较可以看出,同属不同种植物体内,其栖居的内生真菌群落结构不同,具有种的特异性。但不同种类枸杞植物体内也有一些共有菌群,如青霉属、链格孢属、镰孢霉属、曲霉属等。说明这些菌群具有广泛的生态适应性。本研究所得到的漆斑菌属、枝孢属、长蠕孢属、拟茎点

霉属、壳梭孢属、毛壳菌属、木霉属为枸杞属植物新记录内生真菌。

参考文献:

[1] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20 (1): 148-152.

[2] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves[C]// Andrews J H, Hirano S S. Microbial ecology of leaves. New York: Springer-Verlag, 1991: 179-197.

[3] 丁宝章, 王遂义. 河南植物志[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1997: 398.

[4] 河南经济植物志编委. 河南经济植物志[M]. 郑州: 河南人民出版社, 1963: 391.

[5] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.

[6] 戴芳澜. 真菌的形态和分类[M]. 北京: 科学出版社, 1987.

[7] 中国科学院神农架真菌地衣考察队. 神农架真菌与地衣[M]. 北京: 世界图书出版公司, 1989.

[8] 邵力平, 沈瑞祥, 张素轩. 真菌分类学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1984.

[9] 孙剑秋, 郭良栋, 臧威, 等. 药用植物内生真菌多样性及生态分布[J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2008, 38 (5): 475-484.

[10] 柴新义, 陈双林. 青檀内生真菌菌群多样性的研究[J]. 菌物学报, 2011, 30(1): 18-26.

[11] 刘建利. 宁夏枸杞内生真菌的分离及抗氧化活性的测定[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(4): 857-860.

[12] 王维, 马养民, 张弘弛. 藏药黑果枸杞内生真菌的分离鉴定及抑菌活性研究[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48 (4): 262-266.

(上接第 110 页)

[13] Wang Y S, Tong Y, Li Y E, et al. High frequency plant regeneration from microspore-derived embryos of ornamental kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) [J]. Scientia Horticulturae, 2011, 130(1): 296-302.

[14] 冯辉, 姜凤英, 冯建云, 等. 羽衣甘蓝游离小孢子培养体系的研究及其应用[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 1019-1022.

[15] 姜凤英, 冯辉. 羽衣甘蓝游离小孢子培养初报[J]. 园艺学报, 2005, 32(5): 884.

[16] 袁素霞, 刘玉梅, 方智远, 等. 甘蓝类蔬菜小孢子再生植株染色体倍性与气孔保卫细胞叶绿体数的相关性[J]. 中国农业科学, 2009, 42(1): 189-197.

[17] Keller W A, Rajhathy T, Lacapra J. In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris* [J]. Can J Genet Cytol, 1975, 17: 655-666.

[18] 马丽华, 沈火林, 王娟娟, 等. 不结球白菜小孢子胚成苗及倍性变异研究[J]. 华北农学报, 2007, 22 (增刊): 200-203.

[19] 周元昌, Kennedy S. 孢子甘蓝花培苗倍性快速鉴定[J]. 福建农业大学学报: 自然科学版, 2002, 31(1): 55-58.

[20] 刘文革, 王鸣, 阎志红. 蔬菜作物多倍体育种研究进展[J]. 长江蔬菜, 2003(1): 29-33.

[21] 韩阳, 叶雪凌, 冯辉. 大白菜小孢子植株的倍性变异及倍性鉴定方法的研究[J]. 中国蔬菜, 2006(11): 9-11.

[22] 朱彦涛, 李殿荣, 胡新强. 甘蓝型油菜小孢子植株加倍方法及对植株农艺性状的影响研究[J]. 陕西农业科学, 1998(2): 1-10.

[23] Zhou W J, Tang G X, Hagberg P. Efficient production of doubled haploid plants by immediate colchicine treatment of isolated microspores in winter *Brassica napus* [J]. Plant Growth Regulation, 2002, 37(2): 185-192.

[24] 刘志文, 刘雪平, 傅廷栋, 等. 甘蓝型油菜小孢子培养的胚诱导和加倍效率的研究[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(4): 339-342.