

引文格式: 张洁, 柯筱纯, 刘园园, 等. 蔓菁游离小孢子培养体系的优化[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2022, 37(1): 131–136. DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202103067

## 蔓菁游离小孢子培养体系的优化\*

张洁<sup>1,2</sup>, 柯筱纯<sup>1,2</sup>, 刘园园<sup>1,2</sup>, 王春涛<sup>1</sup>, 杨永平<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国科学院昆明植物研究所, 中国西南野生生物种质资源库, 云南昆明 650201;

2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:**【目的】优化蔓菁游离小孢子培养体系, 提高出胚率, 为蔓菁品种的纯化和种质创新提供重要基础。【方法】将 54 个蔓菁品种小孢子低温 (4 ℃) 和高温 (33 ℃) 各处理 24 h, 从中筛选出 1 个出胚率较高的品种, 通过调整活性炭—琼脂糖及植物激素配比优化其小孢子培养体系。【结果】蔓菁品种 KTRG-B-15 的小孢子出胚数最多, 为 25 胚/30 蕾; 高质量浓度琼脂糖可以抑制小孢子成胚; 添加 0.1 mg/L NAA 和 0.2 mg/L 6-BA 时出胚数最多, 为 137 胚/30 蕾。【结论】小孢子培养体系优化有效提高了蔓菁小孢子的出胚数, 优化后的出胚效率是优化前的 5.48 倍。

**关键词:** 蔓菁; 游离小孢子培养; 出胚率; 优化

中图分类号: S631.2

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2022) 01-0131-06

## Optimization of the Microspore Culture System in Turnip (*Brassica rapa* var. *rapa*)

ZHANG Jie<sup>1,2</sup>, KE Xiaochun<sup>1,2</sup>, LIU Yuanyuan<sup>1,2</sup>, WANG Chuntao<sup>1</sup>, YANG Yongping<sup>1</sup>

(1. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, The Germplasm Bank of Wild Species in Southwest China, Kunming 650201, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** [Purpose] Optimizing the microspore culture system in turnip to improve the embryo yield, providing an important basis for the purification of turnip varieties and germplasm innovation.

[Method] After treatments at low temperature (4 ℃) and subsequent high temperature (33 ℃) for 24 hours respectively, one variety of turnip with a higher embryo emergence rate were screened from 54 varieties of turnip, and the microspore culture system of turnip was optimized by adjusting the ratio of activated carbon-agarose and the ratio of plant hormones. [Results] Microspore embryogenesis of the variety KTRG-B-15 was the highest (25 embryos/30 buds). High mass concentrations of agarose could inhibit microspore embryogenesis. Microspore embryogenesis was as high as 137 embryos/30 buds after 0.1 mg/L NAA and 0.2 mg/L 6-BA were used in culture medium.

[Conclusion] The optimization of microspore culture system effectively improves the number of microspore embryogenesis in turnip, which is 5.48 times higher than that before optimization.

**Keywords:** *Brassica rapa* var. *rapa*; isolated microspore culture; embryo rate; optimizing

收稿日期: 2021-03-18

修回日期: 2021-06-05

网络首发日期: 2021-12-28

\*基金项目: 中国科学院基金项目 (29KFJ-FP-2019-05)。

作者简介: 张洁 (1995—), 女, 云南昆明人, 在读硕士研究生, 主要从事蔓菁自交不亲和株系研究。

E-mail: zhangjie1@mail.kib.ac.cn

\*\*通信作者 Corresponding author: 杨永平 (1965—), 男, 江西安远人, 硕士, 研究员, 主要从事植物适应性演化及资源利用研究。E-mail: yangyp@mail.kib.ac.cn

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20211227.1337.003.html>



蔓菁 (*Brassica rapa* var. *rapa*) 是十字花科 (Cruciferae) 芸苔属 (*Brassica*) 二年生草本植物, 是青藏高原及周边高海拔地区传统种植的农作物, 主要食用部位是膨大的肉质根, 具有食用和药用价值<sup>[1-3]</sup>。目前, 蔓菁栽培主要以农家自留品种为主, 品种较为混杂且性状不稳定, 极大地限制了蔓菁产品的开发<sup>[4]</sup>。因此, 获得遗传性状稳定的蔓菁纯合品系是蔓菁新品种选育的必要条件。通过连续自花授粉获得遗传性状稳定的品种是传统育种的重要方法, 但蔓菁自交不亲和的特性限制了自花授粉, 因此其品种纯化需要探索其他方法。

目前, 小孢子培养已成为作物育种的重要手段之一。通过小孢子培养获得纯合的二倍体植株, 一方面能缩短作物育种周期, 另一方面还可以分离出植物自身的隐性性状, 进而丰富作物育种资源<sup>[5]</sup>。游离小孢子培养受许多因素的影响<sup>[6]</sup>, 其中物种的基因型和小孢子的发育阶段是培育小孢子胚状体的决定性因素<sup>[7]</sup>。在白菜型油菜和甘蓝的游离小孢子培养中, 选择单核靠边期到双核早期的小孢子更容易产生胚状体<sup>[8-9]</sup>。由于小孢子胚状体的诱导能力受基因调控, 不同物种甚至同一物种的不同基因型出胚率也存在差异<sup>[10-12]</sup>。

在小孢子培养中, 激素、活性炭和琼脂糖的配比及浓度会影响小孢子的产胚率<sup>[13-16]</sup>。这些培养条件与植物种类密切相关, 不同植物的小孢子培养需要经过试验探索才能得出最佳条件。目前, 蔓菁游离小孢子培养多以新疆蔓菁为试材<sup>[17-18]</sup>, 为全面了解不同品种蔓菁小孢子的培养体系差异, 本研究以多个蔓菁地方品种为研究对象, 优化其游离小孢子的培养体系并比较不同地方品种出胚率的差异, 为蔓菁的品种选育、创制和遗传改良提供纯合的二倍体株系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料来自于实验室收集的 54 个蔓菁地方品种 (表 1)。传统种植的蔓菁经过持续种植和多次繁殖后, 地方品种已经对当地环境形成独特的适应性, 可以认为传统种植的地方品种具有独特的基因型。因此, 在收集地方品种前, 对蔓菁地方品种来源开展详细咨询, 收集的品种仅包括传统种植的地方品种种子, 不包括商业化的种

子。将 54 个地方品种的种子在 4 ℃ 环境中放置 30 d 进行春化, 然后将种子播种于装有腐殖土的花盆中, 植株进入盛花期后选取花蕾进行试验。

### 1.2 游离小孢子的分离纯化

蔓菁抽薹开花后, 取下植株主枝和一级侧枝的花序轴放在 4 ℃ 冰箱中进行 24 h 低温预处理。通过镜检测定蔓菁小孢子处于单核靠边期时的花蕾长度, 然后选择单核靠边期的蔓菁花蕾, 30 个为 1 组放入 50 mL 离心管中。在离心管中加入 75% 乙醇溶液浸泡 30 s, 去掉乙醇后再加入 2% 次氯酸钠溶液浸泡 15 min, 以对花蕾表面进行杀菌; 去掉次氯酸钠溶液后用无菌水洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入少量 B<sub>5</sub> 培养液 (13% 蔗糖, pH 5.8) 后用无菌玻璃棒碾碎花蕾。破碎的花蕾组织混合液用双层 300 目无菌尼龙网过滤后放于 10 mL 无菌离心管中, 离心 3 min (1 000 r/min) 后去除上清液, 得到纯净小孢子。

### 1.3 不同基因型蔓菁品种小孢子出胚培养

54 个蔓菁品种的小孢子出胚培养主要参照王春丽<sup>[19]</sup>的方法。用 1/2 NLN-13 培养液将小孢子的密度调至约  $1 \times 10^5$  个/mL, 然后将 3 mL 小孢子悬浮液分装于直径为 60 mm 的培养皿中; 用封口膜封口后放入 33 ℃ 恒温培养箱中暗培养 24 h, 统计各品种小孢子在高温热激 24 h 后是否发生细胞膨胀; 然后转移到 25 ℃ 的培养室中继续暗培养, 25 d 后统计小孢子出胚数。选择 1 个出胚率最高的蔓菁品种通过调整活性炭—琼脂糖配比及植物激素配比优化蔓菁小孢子培养条件。

### 1.4 不同质量浓度配比的琼脂糖与活性炭处理

将候选蔓菁品种的小孢子转至含不同琼脂糖 (250 和 500 mg/L) 和活性炭 (10、15 和 25 mg/L) 配比的 1/2 NLN-13 培养基中进行试验, 以不添加琼脂糖和活性炭的处理为对照, 25 d 后统计小孢子出胚数。

### 1.5 不同质量浓度植物生长激素处理

在 1/2 NLN-13 培养基中加入不同质量浓度的 NAA (0.05、0.10 和 0.20 mg/L) 和 6-BA (0.05、0.10 和 0.20 mg/L) 对候选蔓菁品种进行游离小孢子培养, 以不添加 NAA 和 6-BA 的处理为对照, 25 d 后统计小孢子出胚数。

### 1.6 小孢子再生培养

小孢子再生培养主要参考柯筱纯<sup>[20]</sup>的方法。将小孢子胚状体转移到 1/2 MS 固体培养基

(MS+1% 琼脂+120 mg/L 活性炭+4% 蔗糖) 上诱导成苗; 成苗后将其移到生根培养基 (1/2 MS+0.8% 琼脂+1% 蔗糖) 上培养 20~30 d; 将生根后的小苗移到盛有腐殖土的花盆中继续生长。

### 1.7 小孢子植株倍性及表型鉴定

采用流式细胞术进行蔓菁小孢子再生植株的倍性鉴定, 确定二倍体植株的比例。取 0.5 g 小孢子再生植株材料放置在培养皿中, 用刀片快速切碎后加 WPB 裂解液 2 mL 裂解细胞, 游离出细胞核, 使用滤网过滤后获取细胞核悬液作为待测样品。利用同样的方法提取基因组大小已经明确的大豆 (*Glycine max*, 威廉姆斯品种) 叶片细胞核悬浮液作为标准样品。取适量待测样品和标准样品的细胞核悬液混匀作为 1 组, 在混合细胞核悬液中加入 PI 染料 150  $\mu$ L, 置于暗处染色 30 min。使用流式细胞仪 (CyFlow Space-3000) 检测样品倍性, 采用 488 nm 的蓝光激发, 在计算机上用流式细胞仪自带的软件观察荧光强度, 每组样品收集 5 000~10 000 个颗粒, 荧光信号的强度代表其核内物质浓度, 试验数据 CV 值需小于 5%。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因型对小孢子胚诱导的影响

对 54 个蔓菁品种的花蕾进行小孢子培养, 有 41 个品种的小孢子在 33  $^{\circ}$ C 热激处理 24 h 之后开始膨大, 膨大比例为 75.92 %。继续诱导小孢子成胚发现: 能发生小孢子膨大的 11 个品种均能诱导出小孢子胚状体, 占总品种数的 20.37%。KTRG-B-15 和 KTRG-B-102 蔓菁品种的出胚率最高, 均为 25 胚/30 蕾 (表 1)。说明因品种不同引起的基因型差异是诱导蔓菁小孢子成胚的重要因素, 选择出胚率高的蔓菁品种进行试验更易获得小孢子胚状体。由于实验室收集的 KTRG-B-102 蔓菁品种的种子较少, 所以将 KTRG-B-15 蔓菁品种作为后续分析的试验材料。

### 2.2 活性炭与琼脂糖对小孢子胚诱导的影响

由表 2 可知: 培养基中添加活性炭与琼脂糖质量浓度分别为 10 和 250 mg/L 为最佳组合, 诱导 KTRG-B-15 蔓菁品种出胚数为 38 胚/30 蕾; 不添加琼脂糖和活性炭的 1/2 NLN-13 培养基诱导小孢子的出胚数为 33 胚/30 蕾; 而最高质量浓度的琼脂糖和活性炭处理后小孢子的出胚数明显减少。

### 2.3 植物生长激素对小孢子胚诱导的影响

由表 3 可知: 不同激素配比会影响蔓菁小孢子出胚率。0.10 mg/L NAA 和 0.20 mg/L 6-BA 组合下, KTRG-B-15 蔓菁小孢子出胚数量最多, 为 137 胚/30 蕾。

### 2.4 小孢子再生植株倍性鉴定及表型差异分析

将 KTRG-B15 蔓菁小孢子胚状体继续培养, 获得 44 株再生植株。其中 4 株被鉴定为单倍体植株, 占比为 9.09%; 38 株被鉴定为二倍体植株, 占比为 86.40%; 2 株被鉴定为嵌合体植株, 占比为 4.54 %。表明小孢子胚在发育过程中存在自然加倍现象, 且二倍体植株的比例较高。

## 3 讨论

小孢子培养技术在育种上有着广泛的运用。吴江生等<sup>[21]</sup>通过建立甘蓝型油菜小孢子培养技术, 配合染色体加倍、试管苗继代越冬和田间移栽配套技术, 成功培育出优质高产的品种华双 3 号, 推广种植面积超过 133 万  $\text{hm}^2$ 。北京市蔬菜研究中心利用小孢子培养技术进行亲本选育, 获得抗除草剂和抗黑斑病植株<sup>[22]</sup>。芸苔属小孢子培养研究最早始于 1982 年, LICHTER<sup>[23]</sup>利用游离小孢子培养技术成功培育出第 1 株甘蓝型油菜小孢子植株; 20 世纪末, 国内外学者在多个品种上尝试建立小孢子培养体系, 并着重研究影响小孢子成胚的因素。轩正英等<sup>[12]</sup>以 8 个新疆蔓菁品种为材料进行小孢子培养研究, 最终获得 73 胚/30 蕾的成胚效率, 为蔓菁品种选育提供重要基础。

物种遗传背景是小孢子胚胎发生的决定因素, 同一物种不同品种间小孢子的成胚比例明显不同。轩正英等<sup>[12]</sup>对新疆蔓菁品种的研究发现: 8 个蔓菁品种只有 4 个能诱导出胚; 汪维红等<sup>[24]</sup>用 7 个品种的黄心乌白菜进行小孢子游离培养, 但仅有 3 个品种出胚; 耿建峰等<sup>[25]</sup>用 54 个白菜品种进行试验, 结果表明小孢子胚诱导数差别极大。本研究用 54 个蔓菁地方品种 (基因型) 进行游离小孢子培养, 有 11 个品种能诱导出胚状体, 且出胚数量存在差异。国内种植的蔓菁多以地方品种为主, 这些地方品种在不同的自然和人工选择压力下可能已经形成不同的遗传特征, 可能会进一步影响其小孢子出胚能力, 其具体机制还需进一步研究。

添加活性炭和琼脂糖对不同物种小孢子的成

表 1 不同产地的蔓菁地方品种及其对小孢子胚诱导的影响  
Tab. 1 Different origins of turnip varieties and their effect on the microspore embryo induction.

| 编号<br>code | 产地<br>origin                 | 细胞膨大<br>cell expansion | 每30蕾出胚数<br>number of<br>embryos from<br>30 buds | 编号<br>code | 产地<br>origin               | 细胞膨大<br>cell expansion | 每30蕾出胚数<br>number of<br>embryos from<br>30 buds |
|------------|------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------|------------|----------------------------|------------------------|-------------------------------------------------|
| KTRG-B-02  | 云南香格里拉<br>Shangri-La, Yunnan | —                      | 0                                               | KTRG-B-47  | 云南兰坪<br>Lanping Yunnan     | —                      | 0                                               |
| KTRG-B-03  | 青海囊谦<br>Nangqian, Qinghai    | +                      | 0                                               | KTRG-B-54  | 云南宁蒗<br>Ninglang, Yunnan   | —                      | 0                                               |
| KTRG-B-07  | 四川阿坝<br>Aba, Sichuan         | +                      | 0                                               | KTRG-B-56  | 新疆昌吉<br>Changji, Xinjiang  | +                      | 0                                               |
| KTRG-B-09  | 云南会泽<br>Huize, Yunnan        | +                      | 0                                               | KTRG-B-58  | 西藏八宿县<br>Basu, Tibet       | +                      | 5                                               |
| KTRG-B-11  | 河北定州<br>Dingzhou, Hebei      | +                      | 2                                               | KTRG-B-60  | 新疆昌吉市<br>Changji, Xinjiang | +                      | 0                                               |
| KTRG-B-14  | 四川甘孜<br>Ganzi, Sichuan       | —                      | 0                                               | KTRG-B-61  | 云南宁蒗<br>Ninglang, Yunnan   | —                      | 0                                               |
| KTRG-B-15  | 云南玉龙<br>Yulong, Yunnan       | +                      | 25                                              | KTRG-B-63  | 云南宁蒗<br>Ninglang, Yunnan   | —                      | 0                                               |
| KTRG-B-17  | 西藏拉萨<br>Lhasa, Tibet         | —                      | 0                                               | KTRG-B-64  | 新疆和静<br>Hejing, Xinjiang   | +                      | 12                                              |
| KTRG-B-19  | 四川西昌<br>Xichang, Sichuan     | +                      | 0                                               | KTRG-B-65  | 新疆柯坪<br>Keping, Xinjiang   | +                      | 0                                               |
| KTRG-B-20  | 云南玉龙<br>Yulong, Yunnan       | —                      | 0                                               | KTRG-B-66  | 云南宁蒗<br>Ninglang, Yunnan   | +                      | 0                                               |
| KTRG-B-21  | 云南云龙<br>Yunlong, Yunnan      | —                      | 0                                               | KTRG-B-69  | 云南玉龙<br>Yulong, Yunnan     | +                      | 0                                               |
| KTRG-B-23  | 云南洱源<br>Eryuan, Yunnan       | +                      | 0                                               | KTRG-B-70* | 尼泊尔<br>Nepal               | +                      | 2                                               |
| KTRG-B-25  | 云南剑川<br>Jianchuan, Yunnan    | +                      | 0                                               | KTRG-B-76  | 浙江温州<br>Wenzhou, Zhejiang  | —                      | 0                                               |
| KTRG-B-26  | 云南云龙<br>Yunlong, Yunnan      | +                      | 3                                               | KTRG-B-86* | 不丹<br>Bhutan               | +                      | 10                                              |
| KTRG-B-27  | 云南剑川<br>Jianchuan, Yunnan    | +                      | 0                                               | KTRG-B-89* | 不丹<br>Bhutan               | +                      | 1                                               |
| KTRG-B-31  | 云南晋宁<br>Jinning, Yunnan      | +                      | 0                                               | KTRG-B-95* | 不丹<br>Bhutan               | +                      | 0                                               |
| KTRG-B-36  | 云南兰坪<br>Lanping, Yunnan      | +                      | 0                                               | KTRG-B-98* | 不丹<br>Bhutan               | +                      | 0                                               |
| KTRG-B-37  | 云南兰坪<br>Lanping, Yunnan      | +                      | 0                                               | KTRG-B-99* | 不丹<br>Bhutan               | +                      | 0                                               |
| KTRG-B-38  | 云南兰坪<br>Lanping, Yunnan      | +                      | 0                                               | KTRG-B-102 | 新疆柯坪<br>Keping, Xinjiang   | +                      | 25                                              |
| KTRG-B-39  | 云南兰坪<br>Lanping, Yunnan      | +                      | 0                                               | KTRG-B-103 | 四川西昌<br>Xichang, Sichuan   | +                      | 0                                               |
| KTRG-B-40  | 云南兰坪<br>Lanping, Yunnan      | +                      | 0                                               | KTRG-B-104 | 云南昆明<br>Kunming, Yunnan    | +                      | 0                                               |
| KTRG-B-41  | 云南兰坪<br>Lanping, Yunnan      | +                      | 0                                               | KTRG-B-105 | 西藏尼玛<br>Nima, Tibet        | +                      | 0                                               |
| KTRG-B-42  | 云南兰坪<br>Lanping, Yunnan      | —                      | 0                                               | KTRG-B-108 | 西藏尼玛<br>Nima, Tibet        | +                      | 0                                               |
| KTRG-B-45A | 云南兰坪<br>Lanping, Yunnan      | +                      | 12                                              | KTRG-B-109 | 西藏尼玛<br>Nima, Tibet        | +                      | 0                                               |
| KTRG-B-45B | 云南兰坪<br>Lanping, Yunnan      | —                      | 0                                               | KTRG-B-112 | 云南会泽<br>Huize, Yunnan      | +                      | 11                                              |
| KTRG-B-45C | 云南兰坪<br>Lanping, Yunnan      | +                      | 0                                               | KTRG-B-113 | 云南会泽<br>Huize, Yunnan      | +                      | 0                                               |
| KTRG-B-46  | 云南兰坪<br>Lanping, Yunnan      | —                      | 0                                               | KTRG-B-168 | 云南会泽<br>Huize, Yunnan      | +                      | 0                                               |

注：“\*”表示产地为国外；高温热激后小孢子发生膨大用“+”表示，未发生膨大用“—”表示。  
Note: “\*” means overseas; the expansion of microspores after high temperature heat shock was expressed as “+”, and no expansion was expressed as “—”.

胚过程影响不同。有研究认为：活性炭能够促进小孢子胚状体诱导，在培养基中加入适宜的活性炭可以吸附有害物质，从而促进小孢子胚的产生<sup>[26]</sup>。

也有研究显示：高含量的活性炭对植物小孢子胚诱导存在抑制作用。徐艳辉等<sup>[27]</sup>发现活性炭质量浓度为 0.02 mg/mL 时，3 个基因型大白菜产胚量

表 2 不同质量浓度活性炭和琼脂糖组合下每 30 蕾蔓菁小孢子的出胚数

Tab. 2 Embryos number of microspore embryogenesis per 30 buds of turnip under different mass concentration compositions of activated carbon and agarose

| 琼脂糖质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )<br>agarose mass concentration | 活性炭质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )<br>activated carbon mass concentration |    |    |    |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----|----|----|
|                                                             | 0                                                                    | 10 | 15 | 25 |
| 0                                                           | 33                                                                   | —  | —  | —  |
| 250                                                         | —                                                                    | 38 | 19 | 25 |
| 500                                                         | —                                                                    | 22 | 27 | 12 |

表 3 不同质量浓度 NAA 和 6-BA 组合下每 30 蕾蔓菁小孢子的出胚数

Tab. 3 Embryos number of microspore embryogenesis per 30 buds of turnip under different mass concentration compositions of NAA and 6-BA

| NAA质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )<br>NAA mass concentration | 6-BA质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )<br>6-BA mass concentration |      |      |      |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------|------|------|
|                                                         | 0                                                         | 0.05 | 0.10 | 0.20 |
| 0                                                       | 20                                                        | —    | —    | —    |
| 0.05                                                    | —                                                         | 51   | 44   | 62   |
| 0.10                                                    | —                                                         | 38   | 112  | 137  |
| 0.20                                                    | —                                                         | 66   | 42   | 27   |

最多;而当活性炭质量浓度超过 0.04 mg/mL,对小孢子产生起抑制作用。在蔓菁小孢子成胚过程中,添加活性炭和琼脂糖对小孢子胚状体诱导没有明显差异。这一现象与 KELLER<sup>[28]</sup>的研究结果一致,加入活性炭和琼脂糖并不能提高小孢子的出胚率,甚至高质量浓度的活性炭或琼脂糖会使小孢子胚状体数量减少。

生长素和细胞分裂素能调节植物的生长和发育,在培养基中加入少量不同配比的生长素和细胞分裂素可显著增加小孢子胚状体数量<sup>[14,29]</sup>。杨易等<sup>[30]</sup>研究发现:添加 0.1 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L NAA 后,菜心小孢子的出胚率最高。不同品种的 NAA 和 6-BA 最适质量浓度配比不同,这可能是受品种制约。因此,需根据不同品种的特性调整激素配比以促进诱导小孢子胚状体。蔓菁 KTRG-B15 品种受 6-BA 和 NAA 质量浓度影响较大,适量添加 6-BA 和 NAA 可以提高该品种的成胚效率(137 胚/30 蕾),且高于新疆蔓菁品种诱导小孢子胚状体数量<sup>[12]</sup>。

目前,可以通过 DNA 流式细胞仪倍性鉴定和花粉母细胞染色体计数等方法鉴定小孢子再生植株的倍性<sup>[31-33]</sup>。本研究发现:单倍体、二倍体和嵌合体同时存在,证明游离小孢子培养过程中有染色体发生自然加倍。盛鹏<sup>[32]</sup>对 6 个大白菜品种的小孢子自交后代抽薹性进行评价,结果表明

有 2 个群体为极晚抽薹。本研究从 38 株二倍体植株中发现 1 株早花的再生植株(约 4 个月进入生殖生长,其余再生植株处于营养生长状态),为后期蔓菁耐抽薹品系的研究提供了良好的遗传材料。

4 结论

KTRG-B-15 蔓菁品种单核靠边期的花蕾 4 ℃ 预处理 24 h,游离小孢子于添加 0.10 mg/L NAA 和 0.20 mg/L 6-BA 的 1/2 NLN-13 液体培养基中 33 ℃ 热激处理 24 h,25 ℃ 暗培养,其出胚率最优(137 胚/30 蕾)。优化后的出胚率是优化前的 5.48 倍。

[参考文献]

[1] 陶月良,邱君正,林华,等. 芜菁、萝卜和大头菜块根品质及营养价值比较研究[J]. 特产研究, 2002, 24(1): 37. DOI: 10.3969/j.issn.1001-4721.2002.01.014.

[2] THEJASS P, KUTTAN G. Immunomodulatory activity of sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate from broccoli (*Brassica oleracea*)[J]. Phytomedicine, 2007, 14(7): 539. DOI: 10.1016/j.phymed.2006.09.013.

[3] 钱晓薇,朱睦元,刘春蕾,等. 芜菁叶汁对小鼠辐射损伤的防护效应[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2001, 27(4): 411. DOI: 10.3321/j.issn.1008-9209.2001.04.015.

[4] 尹盼盼. 液体培养法快速测定甘蓝自交亲和性的方法研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.

[5] 谭德冠,孙雪飘,张家明. 植物游离小孢子培养[J]. 热

- 带农业科学, 2013(6): 23. DOI: 10.3969/j.issn.1009-2196.2013.06.007.
- [6] 王超楠, 闻凤英, 罗智敏, 等. 球茎甘蓝小孢子培养中影响胚诱导的几个因素[J]. 中国蔬菜, 2010(10): 35. DOI: 10.3865/j.issn.1001-3547.2011.02.004.
- [7] SEGUÍ-SIMARRO J M, NUEZ F. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis[J]. *Physiologia Plantarum*, 2010, 134(1): 3. DOI: 10.1111/j.issn.1399-3054.2008.01113.x.
- [8] 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. DOI: 10.7606/j.issn.1004-1389.2011.7.020.
- [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. DOI: 10.3321/j.issn.1000-2421.1999.01.002.
- [10] 刘泽, 周永明, 石淑稳, 等. 甘蓝型油菜离体小孢子胚胎发生能力的遗传分析[J]. 作物学报, 2000, 26(1): 104. DOI: 10.3321/j.issn.0496-3490.2000.01.001.
- [11] 施柳, 王雅琼, 李云龙, 等. 不同基因型大白菜小孢子胚状体诱导及植株再生[J]. 北方园艺, 2014(6): 104.
- [12] 轩正英, 马国财. 新疆芜菁小孢子培养成胚影响因素研究[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(13): 2540. DOI: 10.14088/j.cnki.issn.0439-8114.2017.13.036.
- [13] 桑玉芳, 张恩慧, 杨安平, 等. 甘蓝游离小孢子培养中影响胚状体形成的主要因素[J]. 西北农业学报, 2007, 16(2): 127. DOI: 10.3969/j.issn.1004-1389.2007.02.029.
- [14] 李岩. 通过游离小孢子培养方法获得小白菜三个变种的胚胎及植株[J]. 华北农学报, 1993, 8(3): 95. DOI: 10.3321/j.issn:1000-7091.1993.03.017.
- [15] 兰素缺, 李光威, 权书月, 等. 碳源组份及浓度对小麦花药培养和游离小孢子培养的影响[J]. 华北农学报, 2002, 17(z1): 95. DOI: 10.3321/j.issn:1000-7091.2002.z1.020.
- [16] 牛应泽, 刘玉贞. 人工合成甘蓝型油菜游离小孢子培养及其植株再生研究初报[J]. 四川农业大学学报, 1999, 17(2): 167. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2650.1999.02.008.
- [17] 王娜, 贾凯, 妥秀兰, 等. 芜菁小孢子培养及其胚状体离体发育过程[J]. 西北农业学报, 2016, 25(9): 1392. DOI: 10.7606/j.issn.1004-1389.2016.09.017.
- [18] 乔丽桃, 高杰, 吴玉霞. 芜菁小孢子胚胎发生及其显微结构观察研究[J]. 天津农业科学, 2014, 20(5): 14. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6500.2014.05.003.
- [19] 王春丽. 青花菜游离小孢子培养及其植株再生技术研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [20] 柯筱纯. 蔓菁游离小孢子培养体系建立及双单倍体(DH)群体形态多样性分析[D]. 北京: 中国科学院大学, 2019.
- [21] 吴江生, 石淑稳, 周永明, 等. 甘蓝型双低油菜品种华双3号的选育和研究[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(1): 1. DOI: 10.3321/j.issn:1000-2421.1999.01.001.
- [22] 刘凡, 姚磊, 李岩, 等. 利用大白菜小孢子胚状体获得抗除草剂转基因植株[J]. 华北农学报, 1998, 13(4): 93. DOI: 10.3321/j.issn.1000-7091.1998.04.017.
- [23] LICHTER R. Anther culture of *Brassica napus* in a liquid culture medium[J]. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 1981, 103(3): 229. DOI: 10.1016/S0044-328X(81)80155-9.
- [24] 汪维红, 赵岫云, 于拴仓, 等. 黄心乌白菜游离小孢子培养及植株再生[J]. 西北农业学报, 2010, 19(4): 135. DOI: 10.3969/j.issn.1004-1389.2010.04.030.
- [25] 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): 115. DOI: 10.3321/j.issn:0513-353X.2007.01.022.
- [26] 赵前程, 蔡荣旗, 刘莉莉, 等. 影响花椰菜游离小孢子培养因素的研究[J]. 江苏农业科学, 2007(4): 93. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1302.2007.04.037.
- [27] 徐艳辉, 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. DOI: 10.3969/j.issn.1001-0009.2001.03.007.
- [28] KELLER T. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L.[J]. *Plant Science*, 1991, 74(2): 235. DOI: 10.1016/0168-9452(91)90051-9.
- [29] 姜凤英, 冯辉, 王超楠. 小白菜小孢子培养胚状体的诱导[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(5): 764. DOI: 10.3969/j.issn.1000-1700.2006.05.020.
- [30] 杨易, 陈汉才, 沈卓, 等. 菜心游离小孢子培养高频胚诱导培养基优化[J]. 广东农业科学, 2020, 47(5): 42. DOI: 10.16768/j.issn.1004-874X.2020.05.005.
- [31] 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): 975. DOI: 10.3321/j.issn:0513-353X.2006.05.008.
- [32] 盛鹏. 大白菜亲本材料快速纯化技术研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2010.
- [33] 刘祎, 刘争辉, 何旭, 等. 利用流式细胞术鉴定黑麦草倍性方法的研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(9): 213.

责任编辑: 何承刚