

青花菜×甘蓝杂种游离小孢子培养关键因素研究

杨艳艳¹, 张彦峰², 胡体旭¹

(1. 西北农林科技大学·作物抗逆与高效生产全国重点实验室 陕西杨凌 712100;
2. 陕西省杂交油菜研究中心 陕西杨凌 712100)

摘要:青花菜×甘蓝杂种材料在减数分裂过程中能够产生多种配子类型,产生变异程度较大的新资源,为优化青花菜×甘蓝杂种材料游离小孢子体系,获得优质的青花菜双单倍体(double haploid,DH)植株,丰富种质资源。对5份青花菜材料和1份甘蓝材料杂交获得的F₁分别进行游离小孢子培养,探究花蕾各时期的形态学特征;并研究基因型、蔗糖浓度、4℃处理花蕾时间、32℃处理小孢子时间等关键培养因素对小孢子出胚率的影响。结果表明,5份F₁材料花蕾的P/A(花瓣长度/花药长度)值为0.8~0.9之间时,花蕾中单核靠边期的小孢子占比为60%~70%,最适宜取样;5份材料均能够产生胚状体,胚诱导率为0.52~16.79胚·蕾⁻¹,材料H1(23ZXQ1×LC18)的胚诱导率最高,为16.79胚·蕾⁻¹,后续采用此材料分别进行不同预处理试验。小孢子在N17(含17%蔗糖浓度的NLN液体培养基)中预处理,胚诱导率最高,为8.93胚·蕾⁻¹;花蕾在4℃处理3d,小孢子胚诱导率最高,为10.01胚·蕾⁻¹;小孢子在32℃处理3d,胚诱导率最高,为17.96胚·蕾⁻¹。综上所述,5份F₁材料花蕾的P/A值介于0.8~0.9时,花蕾中单核靠边期小孢子占比最多,可作为花蕾取样的判断标准;花蕾在4℃预处理3d、用N17培养基在32℃预处理小孢子3d,能够明显提高出胚率。

关键词:青花菜;甘蓝;杂交种;游离小孢子培养;体系优化

中图分类号:S635

文献标志码:A

文章编号:1673-2871(2025)12-132-09

Research on the key factors influencing isolated microspore culture in broccoli×cabbage hybrid

YANG Yanyan¹, ZHANG Yanfeng², HU Tixu¹

(1. Northwest A&F University/State Key Laboratory for Crop Stress Resistance and High-Efficiency Production, Yangling 712100, Shaanxi, China; 2. Hybrid Rapeseed Research Center of Shaanxi Province, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: The broccoli × cabbage hybrid materials can produce various gamete types during meiosis, generating new resources with significant variation. This contributes to optimizing the isolated microspore culture system of broccoli × cabbage hybrids, obtaining high-quality broccoli double haploid(DH) plants, and enriching germplasm resources. Isolated microspore culture was applied to F₁ hybrids derived from five broccoli and one cabbage line to investigate the morphological characteristics of flower buds at different developmental stages and analyzed the effects of key culture factors-including genotype, sucrose concentration, cold pretreatment duration of buds at 4°C, and heat shock duration of microspores at 32 °C on the embryogenesis rate. The results showed that for all five F₁ materials, when the P/A(petal length/anther length) ratio of the flower buds were between 0.8 and 0.9, the proportion of microspores at the uninucleate late stage reached 60%-70%, indicating the optimal sampling period. All five materials produced embryooids, with embryo induction rates ranging from 0.52 to 16.79 embryooids per bud. Material H1(23ZXQ1×LC8) exhibited the highest embryo induction rate at 16.79 embryooids per bud and was subsequently used for further pretreatment experiments. Pretreating microspores in N17 medium(NLN liquid medium containing 17% sucrose) resulted in the highest embryo induction rate of 8.93 embryooids per bud; Pretreating flower buds at 4°C for 3 days yielded the highest embryo induction rate of 10.01 embryooids per bud. Treating microspores at 32 °C for 3 days achieved the highest embryo induction rate of 17.96 embryooids per bud. In conclusion, P/A ratio between 0.8 and 0.9 corresponds to the highest proportion of microspores at the uninucleate late stage in broccoli × cabbage flower buds and can serve as the criterion for bud sampling. To significantly enhance embryo induction efficiency, flower buds should be pre-treated at 4 °C for 3 days, followed by pretreatment of the isolated microspores in N17 medium at 32 °C for 3 days.

Key words: Broccoli; Cabbage; Hybrid; Isolated microspore culture; System optimization

收稿日期:2025-02-26;修回日期:2025-06-15

基金项目:2024年农业财政专项项目(杨管农发(2024)83号)

作者简介:杨艳艳,女,在读硕士研究生,主要从事青花菜遗传育种研究。E-mail:2251819901@qq.com

通信作者:胡体旭,男,副教授,主要从事蔬菜遗传育种研究。E-mail:htx0729@nasuaf.edu.cn

青花菜(*Brassica oleracea* L. var. *italica*)又名西蓝花,是甘蓝的变种,颜色碧绿,花球富含硫代葡萄糖苷,具有抗癌功效,在蔬菜市场中占有重要地位,深受人们的喜爱。据FAO(联合国粮食及农业组织)2022年数据,我国青花菜种植面积居世界首位,但目前我国蔬菜市场上自主培育的青花菜品种占有率仅为15.6%^[1],优良的青花菜品种大多由日本引进,这严重限制了我国青花菜产业的发展,因此,加快我国青花菜育种速度、培育新种质显得尤为重要。

通过传统育种手段育成纯系至少需要6~8年,而通过游离小孢子培养技术获得100%纯系仅需1~2年,能够在短时间内创制出稳定的育种材料,大大缩短了育种年限^[2],同时游离小孢子培养使得隐形性状易于表达,创制出的双单倍体材料能够用于基因定位和遗传图谱构建^[3]。

目前游离小孢子培养技术已经在芥蓝^[4]、白菜^[5]、萝卜^[6]、甘蓝^[7]等多种蔬菜上得到应用,创制出了丰富的种质^[8~10]。但是我国青花菜小孢子培养起步较晚,由于基因型、培养条件等多方面因素的影响,其培养时易出现仅发生细胞分裂而不形成胚状体,或是产生胚状体,但其诱导效率普遍不高等问题^[11~13]。游离小孢子培养中,根据诱导发生胚状体能力的大小,可分为易出胚基因型和难出胚基因型,针对难成胚材料,可与易出胚材料杂交,用获得的F₁进行游离小孢子培养,能够提高胚状体产量^[14~16]。本试验以1份易出胚甘蓝材料作为父本,5份难出胚青花菜材料作为母本,进行杂交,将甘蓝的品质性状转入青花菜中,用F₁作为供体植株进行游离小孢子培养,对培养过程中的关键因素进行探索,旨在提高青花菜×甘蓝杂种游离小孢子的出胚率,以获得大量青花菜双单倍体材料,创制出优异的青花菜种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料

5份难出胚的青花菜材料均由西北农林科技大学干旱与逆境胁迫重点实验室提供,分别编号为23ZXQ1、23ZXQ2、23ZXQ3、23ZXQ4和23ZXQ9,1份易出胚甘蓝材料由陕西省杂交油菜研究中心提供,编号为LC18。2023年5月在陕西省杂交油菜研究中心人工气候室播种5份青花菜和1份甘蓝亲本材料,8月分别进行杂交,11月收获种子,编号为H1(23ZXQ1×LC18)、H2(23ZXQ2×LC18)、H3(23ZXQ3×LC18)、H4(23ZXQ4×LC18)、H5

(23ZXQ9×LC18)。2023年11月播种5份F₁材料,春化完成后移栽到人工气候室(昼夜温度25℃/18℃、光照强度3500 lx,光周期16 h·d⁻¹),次年4月中旬开花,进行游离小孢子培养试验。为确保花蕾的数量,试验材料以盆栽和分期播种的方式种植,植株生长期进行常规管理。

1.2 方法

1.2.1 花蕾取样时期的确定 为了能够直观地辨别镜检时小孢子单核靠边期时的细胞形态以及对应的花蕾形态,准确地采集花蕾,以5份F₁材料为研究对象,测量不同长度的花蕾、花瓣及花药,比较细胞形态与花蕾形态的对应关系。

2024年4月中旬,待植株进入盛花期,于晴天上午(08:00—11:00)采集5份F₁植株上生长健壮的未开放花蕾(纵径分别为2~3、3~4、4~5、5~6 mm花蕾,每份材料各取3个花蕾),观察测量花蕾的形态,统计各材料大部分小孢子处于单核靠边期的花瓣长度和花药长度,3次重复。

参照Seguí-Simarro^[17]的方法,采用DAPI染色并观察细胞核在小孢子细胞中的位置,记录小孢子主要发育时期(单核前期、单核靠边期及双核花粉粒时期),并拍摄5~10个明场及荧光视野照片以对比小孢子形态特征,3次重复。

为了探究春化时间对单核靠边期花蕾的影响,对材料H1~H5植株进行不同春化时间处理,将H1、H3、H5分别春化1、3个月后移栽至人工气候室;H2、H4现蕾需更长春化时间,故将其分别春化2、4个月后移栽至人工气候室。待植株进入盛花期,采集未开放花蕾,统计各个材料大部分小孢子处于单核靠边期的花瓣长度和花药长度,并计算其比值(P/A)。每处理3株,3次重复。

1.2.2 基因型对胚诱导效率的影响 为探究基因型对小孢子胚状体诱导效率的影响,以5份F₁作为试验材料进行游离小孢子培养,选取健康植株上处于单核靠边期的小孢子花蕾,在4℃预处理3 d,参照陈丽潇等^[18]的分离方法,纯化后,用N17(含17%蔗糖的NLN培养基)悬浮小孢子沉淀物,每培养皿(75 mm×15 mm)加入6 mL悬浮液,用Parafilm膜封口,32℃预处理小孢子2 d后,更换至N13(含13%蔗糖的NLN培养基)中,在25℃培养箱中暗培养,第30天时统计各基因型出胚率(出胚率=出胚数/花蕾数),每处理3次重复,每重复3皿。

1.2.3 小孢子不同处理的效果 以胚状体诱导率最高的H1为试材,研究不同蔗糖浓度、低温和热激

预处理对小孢子胚状体诱导率的效果。

不同蔗糖浓度处理:参照前人研究^[2],采摘 H1 的新鲜单核靠边期花蕾在 4 °C 预处理 3 d, 分离小孢子并分别用 N9、N13、N17(分别含 9%、13%、17% 蔗糖的 NLN 培养基)悬浮培养, 32 °C 黑暗热激处理 2 d, 转至 N13 培养基中, 25 °C 暗培养。胚状体形成后, 转入 25 °C、59 r·min⁻¹ 摆床进行光照振荡培养。30 d 后统计各处理出胚率, 每处理 3 次重复, 每重复 3 皿。

4 °C 低温处理:采摘 H1 的新鲜花蕾在 4 °C 中低温预处理, 设置 4 个处理时间, 分别为 0、1、2、3 d, 以 0 d 为对照。分离纯化小孢子, 用 N17 悬浮小孢子沉淀后, 分装在不同培养皿中, 32 °C 黑暗热激 2 d, 转至 N13 培养基中, 25 °C 暗培养。胚状体形成后, 转入 25 °C、59 r·min⁻¹ 摆床光照振荡培养。30 d 后统计出胚率, 每处理 3 次重复, 每重复 3 皿。

32 °C 高温热激处理:采摘 H1 的新鲜花蕾在 4 °C 预处理 3 d, 分离纯化小孢子, 用 N17 悬浮小孢子沉淀后, 分装在不同培养皿中, 于 32 °C 分别热激 0、1、2、3 d, 以 0 d 为对照(25 °C 培养), 随后将小孢子转至 N13 培养基中, 25 °C 暗培养。胚状体形成后, 转入 25 °C、59 r·min⁻¹ 摆床光照振荡培养。30 d 后统计出胚率, 每处理 3 次重复, 每重复 3 皿。

1.2.4 胚状体成苗及倍性检测 待 5 份 F₁ 材料游离小孢子获得的胚状体发育至第 30 天时, 转接到

B5 固体培养基上(20 g·L⁻¹ 蔗糖, 8 g·L⁻¹ 琼脂, pH 5.8), 转接完成后, 放 25 °C 培养室培养(光照强度 3500 lx, 光周期 16 h·d⁻¹), 中途更换 3~4 次 B5 固体培养基, 直至获得植株。

幼苗长至 3~4 片真叶时, 采用流式细胞仪进行植株倍性检测, 检测方法参照杨鼎等^[19]的报道, 对照材料为 F₁ 二倍体植株, 根据出现的峰值进行倍性判断。

1.3 数据分析

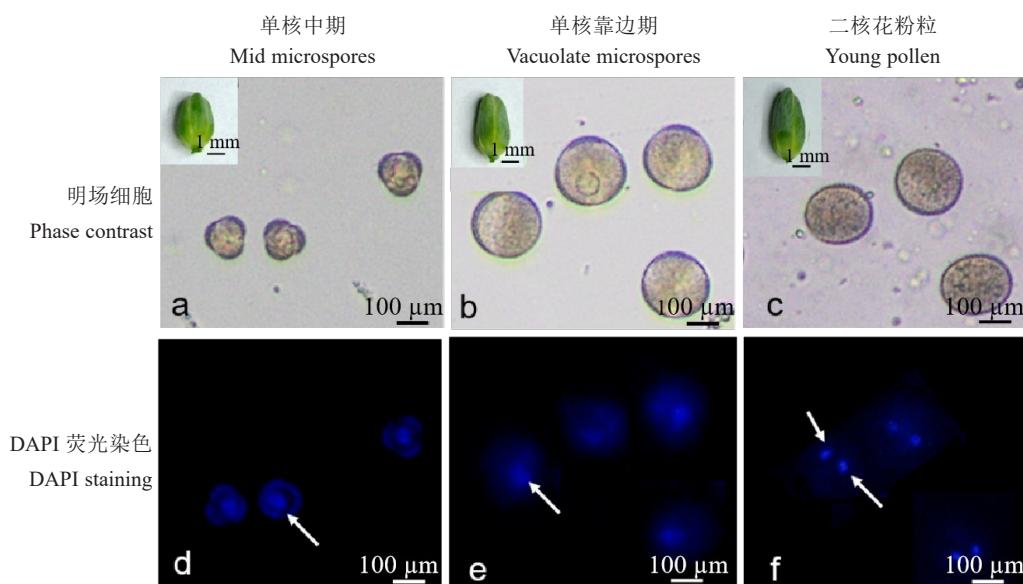
采用 Excel 2019 整理试验数据, 采用 SPSS 19.0 软件进行方差分析, 采用 Duan 法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 小孢子发育时期与花器官形态的对应关系

花蕾中小孢子不同阶段细胞特征如图 1 所示, 单核中期(图 1-a, 图 1-d)小孢子形态呈梅花状, 有 3 个萌发孔, 荧光显微镜下可观察到细胞核位于细胞中央; 随着细胞发育, 细胞呈现圆形, 荧光显微镜下观察到单个细胞核位于细胞边缘, 为单核靠边期(图 1-b, 图 1-e); 细胞呈椭圆形, 内容物充实, 有 2 个细胞核, 此时为二核花粉粒时期(图 1-c, 图 1-f)。

同一基因型在相同条件下由于受春化时间的影响, 植株生理状态及花蕾形态表现出明显差异

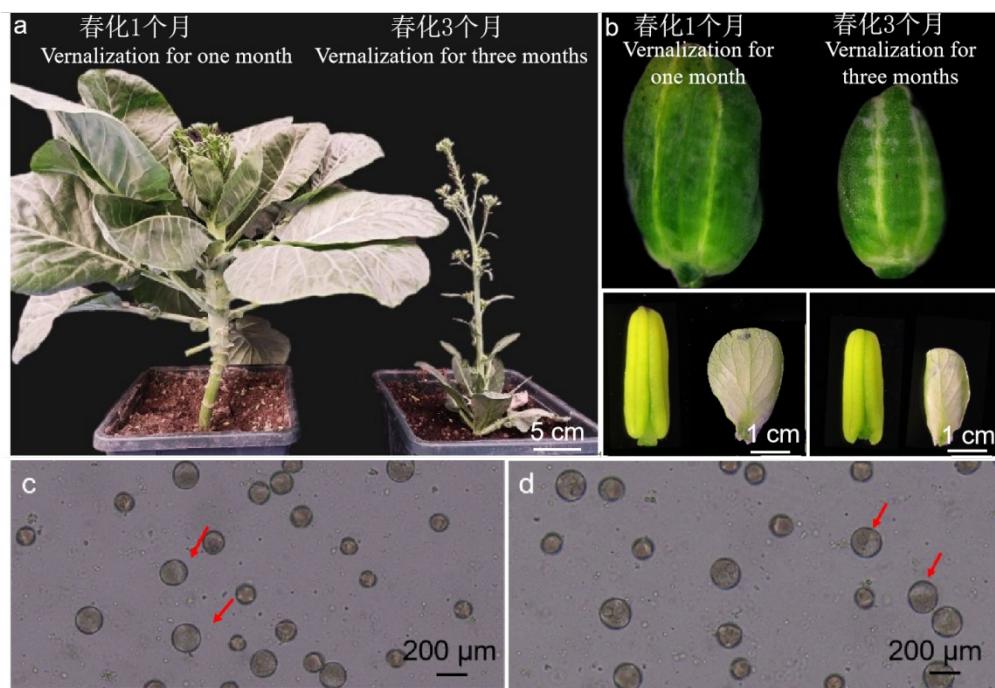


注:a~c. 明场细胞; d~f. DAPI 荧光染色; a~c 左上角为对应的花蕾;白色箭头所指为细胞核。

Note: a-c. Phase contrast. d-f. DAPI staining. The upper left corner of a-c show the corresponding flower buds. White arrows point to the cell nucleus.

图 1 花蕾中小孢子不同阶段细胞特征

Fig. 1 Characterization of microspore/pollen stages of buds at different developmental stages



注:a. 经历不同春化时间的 H1 植株;b. 经历不同春化时间的单核靠边期花蕾、花药及花瓣;c. 春化 1 个月花蕾中的小孢子;d. 春化 3 个月花蕾中的小孢子。

Note: a. H1 undergone different vernalization time; b. Petals and anthers from two buds including majority vacuolate microspores stages undergone different vernalization time; c. Microspores from the bud undergone vernalization for one month; d. Microspores from the bud undergone vernalization for three months.

图 2 经历不同春化时间后 H1 植株生理状态

Fig. 2 Characterization of H1 undergone different vernalization time

(图 2,以 H1 为例)。材料 H1 经 1 个月春化处理,植株表现出较强的生长势,叶片肥大,花蕾发育饱满且尺寸较大;春化时间延长至 3 个月,植株长势弱,叶片小,花蕾发育受限,其花蕾横径和纵径均小于 1 个月春化处理植株(图 2-a~b)。这一现象表明,环境因素会影响植株的生理状态,从而影响花蕾长度,仅以花蕾长度作为小孢子发育时期的形态

学判断标准,会导致一定偏差。

P/A(花瓣长度/花药长度)不会因环境差异发生太大改变,用 P/A 判断小孢子的发育时期更为可靠^[20]。为了建立直观的花蕾取样标准,避免盲目取样,对不同春化时间处理的花蕾进行测量并解剖分析。结果表明(表 1),5 份材料经历了不同的春化时间,但 P/A 值介于 0.8~0.9 时,60%~70% 小孢子处

表 1 单核靠边期花蕾经历不同春化时长的 P/A 值

Table 1 Petal/Anther of plants buds including vacuolated microspores stages undergone different vernalization time

编号 Code	春化时间/月 Vernalization time/Month	花瓣长度 Petal length/cm	花药长度 Anther length/cm	花瓣长度/花药长度 P/A	单核靠边期小孢子占比 Frequency of vacuolated microspore/%
H1	1	3.2~4.3	4.1~4.5	0.79~0.95	60.7~68.9
	3	2.6~3.7	3.4~4.0	0.76~0.93	
H2	2	3.4~4.4	4.2~4.6	0.81~0.97	58.7~67.3
	4	2.9~3.7	3.6~4.0	0.80~0.93	
H3	1	2.7~3.9	3.8~4.2	0.72~0.94	62.4~69.6
	3	2.4~3.3	3.2~3.6	0.74~0.92	
H4	2	2.7~3.7	3.8~4.1	0.71~0.90	61.5~70.2
	4	2.4~3.2	3.2~3.5	0.75~0.91	
H5	1	2.8~4.0	3.9~4.3	0.72~0.93	63.9~71.4
	3	2.5~3.6	3.4~3.8	0.74~0.94	

于单核靠边期,P/A 并未随着春化时间发生太大的变化,此时花瓣长度短于花药长度,该比值可以作为杂种材料的取样依据。

2.2 不同基因型对出胚率的影响

基因型对小孢子胚状体诱导数量的影响如图 3 所示,5 份材料均能诱导形成胚状体,但是不同基因

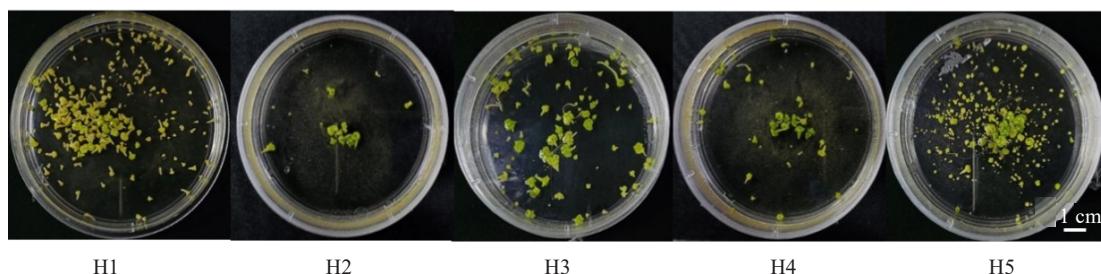


图 3 不同基因型游离小孢子胚状体诱导结果

Fig. 3 Results of different genotypes used and embryos obtained for isolated culture

型诱导的胚状体数量存在差异。

在相同的培养条件下,5 份材料的小孢子出胚率存在显著差异(表 2)。材料 H1 的出胚率为 16.79 胚·蕾⁻¹,显著高于其他材料,H5、H3 出胚率分别为 9.58 和 1.91 胚·蕾⁻¹,H2 和 H4 的出胚率相对较低,仅为 0.52 和 0.92 胚·蕾⁻¹。以上结果表明,在小孢子培养中,基因型对小孢子胚状体诱导效率具有重要影响。H1 出胚率最高,可用于研究不同蔗糖浓度、低温、热激预处理对小孢子出胚率的影响。

2.3 不同蔗糖浓度处理小孢子对出胚率的影响

不同蔗糖浓度处理 H1 小孢子对胚状体诱导数量的影响如图 4 所示,随着蔗糖浓度的增加,出胚数量

表 2 不同基因型游离小孢子胚状体诱导结果

Table 2 Results of different genotypes used and embryos obtained for isolated microspores culture

编号 Code	花蕾数 Flower bud number	出胚数 Embryo number	出胚率/(胚·蕾 ⁻¹) Embryo formation rate/ (Germ·Bud ⁻¹)
H1	24	403	16.79±1.06 a
H2	23	12	0.52±0.04 d
H3	32	61	1.91±0.02 c
H4	36	33	0.92±0.03 d
H5	36	345	9.58±0.12 b

注:同列不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著。下同。

Note: Different small letters in the same column indicate significant difference among different treatments at 0.05 level. The same below.

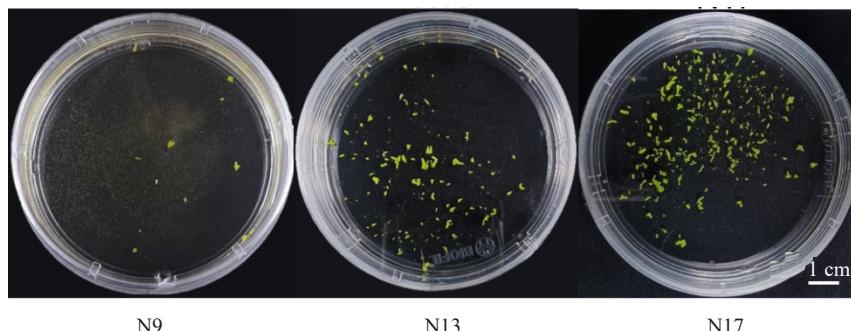


图 4 不同蔗糖浓度对胚状体诱导数量的影响

Fig. 4 Effects of different sucrose concentration on embryos induction number

表 3 不同蔗糖浓度对胚状体诱导率的影响

Table 3 Effects of different sucrose concentration on embryos induction efficiency

w(蔗糖) Sucrose concentration/%	出胚率/(胚·蕾 ⁻¹) Embryo formation rate/(Germ·Bud ⁻¹)
9	0.52±0.05 c
13	4.16±0.09 b
17	8.93±0.32 a

随之增加。

蔗糖浓度对 H1 小孢子胚状体诱导效率具有显著影响(表 3)。N9 处理小孢子胚状体出胚率最低,为 0.52 胚·蕾⁻¹;N13 处理出胚率为 4.16 胚·蕾⁻¹;N17 处理出胚率最高,为 8.93 胚·蕾⁻¹。由此表明,N17 更有利于青花菜×甘蓝杂种小孢子胚状体的产生。

2.4 4 °C 处理花蕾时间对出胚率的影响

低温处理花蕾时间对 H1 小孢子胚状体诱导数

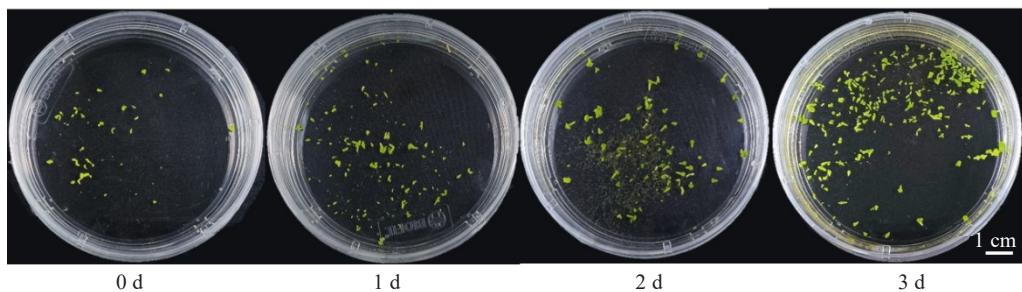


图 5 4 °C 处理花蕾时间对胚状体诱导数量的影响

Fig. 5 Effects of 4 °C treatment duration of buds on embryos induction number

量的影响如图 5 所示,在 0~3 d 内,随着低温处理时间的增加,出胚数量随之增加。

4 °C 低温处理花蕾对 H1 胚状体的诱导效率具有显著影响(表 4)。未经 4 °C 低温处理时,出胚率最低,为 3.02 胚·蕾⁻¹;经过 1 d 低温处理后,出胚率为 5.16 胚·蕾⁻¹;经过 2 d 低温处理后,出胚率达到 6.93 胚·蕾⁻¹;4 °C 低温处理 3 d, 小孢子出胚率最高,为 10.01 胚·蕾⁻¹。以上结果表明,在 0~3 d 范围内,随着花蕾在 4 °C 中低温处理时间的增加,小孢子出胚率明显上升,适当延长低温处理时间有利于青花菜×甘蓝杂种小孢子胚状体的产生。

2.5 32 °C 热激处理时间对出胚率的影响

32 °C 热激处理 H1 小孢子时间对胚状体诱导数量的影响如图 6 所示,在 0~3 d 内,随着热激处理时间的增加,出胚数量随之增加。

32 °C 热激处理对 H1 小孢子胚状体的诱导效

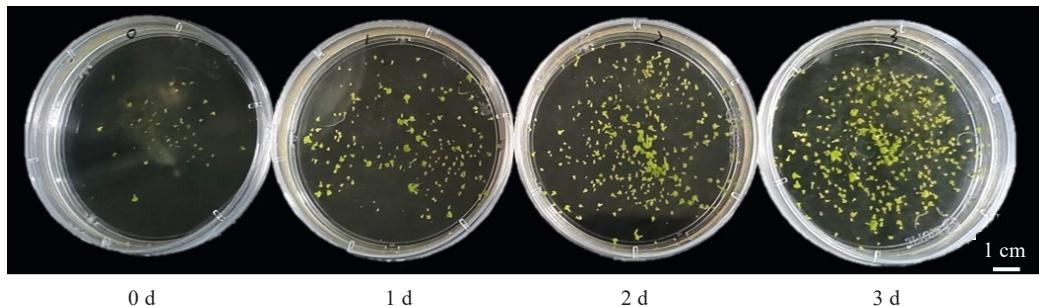


图 6 32 °C 热激处理时间对胚状体诱导数量的影响

Fig. 6 Effects of 32 °C pretreatment time on embryos induction number

表 5 32 °C 热激处理时间对出胚率的影响

Table 5 Effects of 32 °C pretreatment time on embryos induction efficiency

32 °C 处理时间 Time of 32 °C treatment/d	出胚率/(胚·蕾 ⁻¹) Embryo formation rate/(Germ·Bud ⁻¹)
0	3.33±0.15 d
1	9.57±0.26 c
2	14.89±0.99 b
3	17.96±0.13 a

表 4 4 °C 处理花蕾时间对小孢子出胚率的影响

Table 4 Effects of 4 °C treatment duration of buds on embryos induction efficiency

4 °C 处理时间 Time of 4 °C treatment/d	出胚率/(胚·蕾 ⁻¹) Embryo formation rate/(Germ·Bud ⁻¹)
0	3.02±0.05 d
1	5.16±0.04 c
2	6.93±0.09 b
3	10.01±0.13 a

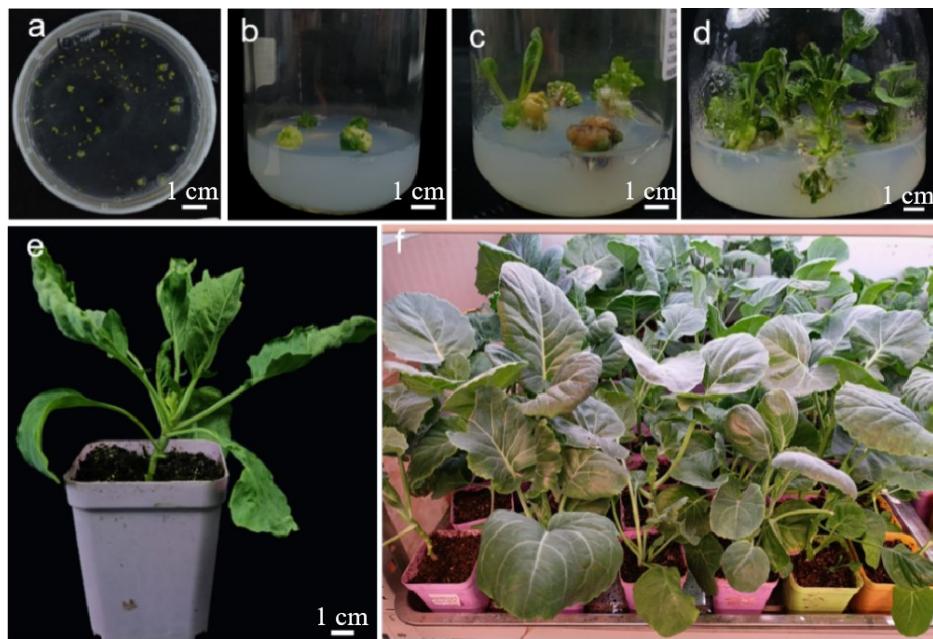
率具有显著影响(表 5)。H1 小孢子未经过 32 °C 热激处理,出胚率最低,为 3.33 胚·蕾⁻¹;经过 1 d 热激处理后,出胚率为 9.57 胚·蕾⁻¹;经过 2 d 热激处理后,出胚率为 14.89 胚·蕾⁻¹;热激处理 3 d 后,出胚率达 17.96 胚·蕾⁻¹。在 0~3 d 内,H1 的出胚率随着小孢子热激处理时间的延长而上升。

2.6 胚状体成苗及倍性检测

将培养皿中胚状体(图 7-a)转接到 B5 培养基

上,第 5 天 1 部分顶部转绿(图 7-b),第 25 天时部分能够分化出幼芽,另一部分胚状体逐渐褐化死亡,将幼芽转接至新的 B5 培养基中(图 7-c),第 40 天在组培瓶中形成健壮的丛生小孢子幼苗(图 7-d),炼苗驯化后,移栽到土壤中,形成完整独立的植株(图 7-e~f)。

采用流式细胞仪对再生植株倍性进行鉴定,试验结果表明(图 8-A~B),DNA 含量在相对荧光强度 20 k 时,对照植株出现分离峰,幼苗生长健壮;小孢

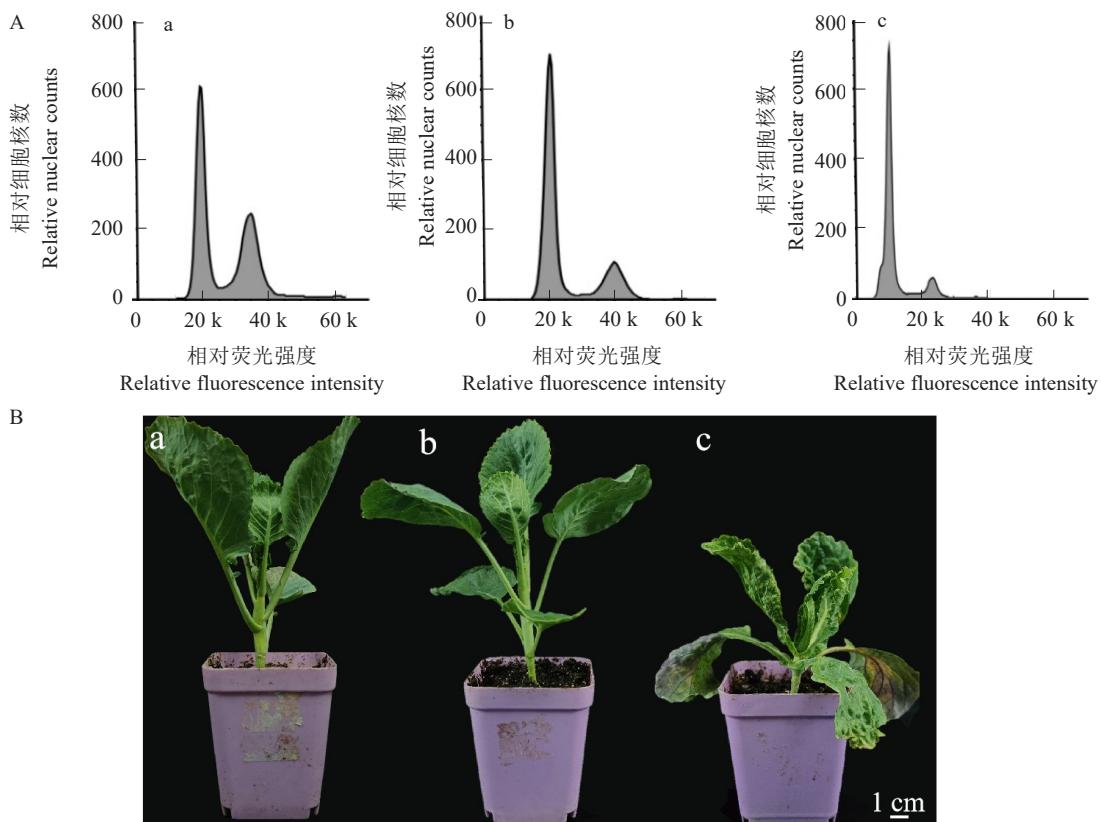


注:a. 子叶胚;b. 胚状体增殖;c. 胚状体分化芽,部分褐化死亡;d. 丛生苗;e~f. 再生植株。

Note: a. Cotyledon embryos; b. Embryoid proliferation; c. Embryoid differentiation into buds, same brown and die; d. Multiple shoot; e-f. Regenerated plants.

图 7 青花菜×甘蓝杂种小孢子胚状体再生植株过程

Fig. 7 Plants regeneration of embryos in broccoli×cabbage hybrid



注:A. 流式细胞仪鉴定再生植株倍性;B. 小孢子再生植株不同倍性表型。a. 对照植株;b. 双单倍体植株;c. 单倍体植株。

Note: A. Flow cytometry analysis of regenerated plants; B. Different ploidy characterization of regenerated plants. a. Control plant; b. Double haploid regenerated plant; c. Haploid regenerated plant.

图 8 再生植株倍性观察

Fig. 8 Ploidy observation of regenerated plants

子诱导的再生植株中分离峰出现在 20k 处,为双单倍体,通过表型观察发现,再生植株大小与对照植株接近一致;小孢子诱导的再生植株中分离峰出现在 10k 处,鉴定为单倍体,外在表型上,植株叶片皱缩,节间缩短,整体高度较双单倍体小。

3 讨论与结论

同一基因型植物因季节以及水肥管理等影响,花蕾外部形态存在差异,邹金美等^[21]研究发现,羽衣甘蓝小孢子处于单核靠边期时,初花期主花序上的花蕾长度长于末花期花蕾的长度,盛花期时,花蕾长度介于两者之间,说明在开花的不同时期,花蕾长度相同,但是花粉的发育速度不同,因此单核靠边期小孢子占比不同,以花蕾大小作为取样标准会存在偏差。本研究在对材料进行不同时间春化处理后发现,小孢子处于单核靠边期时,花蕾大小不同,不能以花蕾大小作为取样标准,与前人研究结果一致。

黄天虹等^[22]对 20 份不结球大白菜进行花蕾取样研究发现,当 P/A 为 0.85~1.10 时,花蕾中小孢子主要处于单核晚期,刘晓东等^[23]在对 14 份四倍体大白菜进行花蕾表型研究后发现,P/A 为 0~0.5 时,单核靠边期的小孢子占比最高。本研究使用 5 份青花菜×甘蓝杂种材料,P/A 为 0.8~0.9 时,单核靠边期小孢子占比为 60%~70%,P/A 并未随着春化时间延长而发生太大改变,可作为采样标准。因此在实际取样过程中,应根据研究材料、外界环境等因素,确定处于单核靠边期的花蕾特征,以获得更多处于单核靠边期的小孢子,采用形态标记与镜检观察相结合的方式,减轻环境及基因型差异带来的影响。

基因型是导致小孢子出胚率存在差异的决定性因素之一,已有的报道显示,并不是所有基因型都能诱导出胚状体^[6,9,24~26]。宋立晓等^[27]研究发现,不同来源地的青花菜胚状体出胚率有所不同,中国台湾的品种出胚率最高,日本品种次之,中国内地品种进行游离小孢子培养时,只发生细胞分裂而不产生胚状体;高素燕等^[28]在对 32 份辣椒材料进行游离小孢子试验后发现,只有 18 个基因型能够诱导出胚状体,诱导率为 56.25%;李金荣等^[29]对 10 份胡萝卜进行研究发现,有 3 个基因型可诱导出胚状体,出胚率最高的为 8.21 胚·蕾⁻¹,出胚率最低的为 2.82 胚·蕾⁻¹,本试验使用的材料均能诱导出胚状体,但是在出胚率上存在显著差异,这与前人的研究结果一致。由此可见基因型对游离小孢子培养的影

响主要体现在两方面:(1)该基因型能否诱导出胚状体;(2)该基因型诱导胚状体的出胚率。

在大多数作物小孢子培养中,预处理被认为是不可或缺的,能够使小孢子由配子体途径转变为孢子体发育途径,最常用的预处理方式有低温处理、热激胁迫。贾凯等^[30]将芫菁花蕾在 4 °C 低温处理后发现,与未经低温处理的相比,胚诱导率不升反降,而本研究将青花菜×甘蓝花蕾在 4 °C 低温处理 3 d,出胚率显著提高。在芸薹属作物中,30~35 °C 热激处理游离小孢子 12~72 h 是最常用的一种胁迫处理方式^[31~33],但由于作物不同,热激处理温度及时间也有所不同,本研究将青花菜×甘蓝材料游离小孢子在 32 °C 热激处理 3 d 后,出胚率最高。碳源是小孢子培养过程中不可或缺的,能够为小孢子发育提供营养物质,同时可调节渗透压。杨易等^[34]在 NLN 培养基中添加不同浓度的蔗糖,对菜心进行预培养发现,在含 10% 蔗糖培养基中,出胚率最高,而在含 16% 蔗糖培养基中,小孢子出胚率最低。本研究表明,在含有 17% 蔗糖培养基中小孢子出胚率最高。

综上所述,在小孢子培养中,基因型对小孢子胚状体诱导效率具有重要影响,出胚率因基因型不同表现出显著差异;出胚率与蔗糖浓度呈正相关,N17 处理最高;出胚率与低温处理花蕾时间呈正相关,花蕾在 4 °C 处理 3 d 后,出胚率最高;出胚率随小孢子热激时间的延长而增加,32 °C 热激处理 3 d 后,出胚率最高。该研究结果为青花菜游离小孢子培养优化提供了理论依据。

参考文献

- [1] 李占省,刘玉梅,韩风庆,等.“十三五”我国青花菜遗传育种研究进展[J].中国蔬菜,2021(1):33-40.
- [2] 伍健缤,陈坤豪,陈木溪,等.芸薹属蔬菜游离小孢子培养研究进展[J].农学学报,2022,12(3):44-49.
- [3] 刘俊峰,张斌,李梅,等.利用 DH 群体构建大白菜分子遗传图谱[J].华北农学报,2015,30(2):156-160.
- [4] 张德双,赵泓,辛晓云,等.芥蓝游离小孢子培养技术优化及其在育种中的应用[J].中国蔬菜,2024(5):75-83.
- [5] 张咪.不结球白菜五月慢游离小孢子培养及其同源四倍体的鉴定[D].南京:南京农业大学,2022.
- [6] 张胜雪,范伟强,王超楠,等.青萝卜游离小孢子培养体系优化[J].中国瓜菜,2022,35(2):34-38.
- [7] 曹冰东,蔡霞,张洁,等.结球甘蓝游离小孢子培养及胚发育成苗研究[J].北方园艺,2022(23):29-37.
- [8] 姚秋菊,张晓伟,王志勇,等.甘蓝新品种豫甘 5 号的选育[J].中国瓜菜,2015,28(6):36-38.
- [9] 张帅宇,常玉瑾,郝广华,等.大白菜抗根肿病 DH 系的创制与鉴定[J].华北农学报,2024,39(3):187-194.

- [10] 张晓伟,姚秋菊,赵艳艳,等.甘蓝优异种质创制及系列新品种选育[Z].郑州:河南省农业科学院园艺研究所,2018.
- [11] 龚丽君.菜花游离小孢子培养技术研究及 SSR 核心引物筛选与应用[D].新疆石河子:石河子大学,2022.
- [12] 刘环环.不结球白菜和青花菜游离小孢子培养技术的研究[D].南京:南京农业大学,2014.
- [13] 王影.青花菜和花椰菜 DH 系的创制[D].沈阳:沈阳农业大学,2020.
- [14] ZENG A S, YAN J Y, SONG L X, et al. Induction and development of microspore-derived embryos in broccoli×white-headed cabbage hybrids microspore culture[J]. Euphytica, 2015, 203(2):261-272.
- [15] 贾俊香.基于小孢子培养的白菜类蔬菜种质创新[D].沈阳:沈阳农业大学,2019.
- [16] 李勤菲.甘蓝型油菜与甘蓝杂种后代的细胞学分析[D].重庆:西南大学,2010.
- [17] SEGUÍ-SIMARRO J M, NUEZ F. Meiotic metaphase I to telophase II as the most responsive stage during microspore development for callus induction in tomato (*Solanum lycopersicum*) anther cultures[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2005, 27(4B): 675-685.
- [18] 陈丽潇,王跃华,刘鑫,等.抗根肿病大白菜小孢子培养及分子鉴定[J].江苏农业科学,2019,47(10):141-143.
- [19] 杨鼎,李崇娟,吕凤仙,等.流式细胞仪对甘蓝花粉倍性的测定[J].湖北农业科学,2024,63(4):78-81.
- [20] 赵丽芬,邓英,付文苑,等.利用小孢子培养技术创制红菜薹早熟 DH 系[J].种子,2024,43(1):137-145.
- [21] 邹金美,张国广,潘一山.羽衣甘蓝花药培养技术体系的研究[J].漳州师范学院学报(自然科学版),2005(2):94-97.
- [22] 黄天虹,张娅,梁超凡,等.不结球白菜游离小孢子培养及植株再生研究[J].核农学报,2019,33(2):240-247.
- [23] 刘晓东,吴芳,孟川,等.四倍体大白菜游离小孢子培养技术[J].园艺学报,2023,50(12):2641-2652.
- [24] KIM M, JANG I C, KIM J A, et al. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27 (3) : 425-434.
- [25] SHMYKOVA N, DOMBLIDES E, VJURTTS T, et al. Haploid embryogenesis in isolated microspore culture of carrots (*Daucus carota* L.)[J]. Life-Basel, 2020, 11(1):20.
- [26] 高润红,何婷,郭桂梅,等.青花菜小孢子培养及再生体系的优化[J/OL].分子植物育种,2023: 1-9[2023-12-01].<https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20231130.1544.004>.
- [27] 宋立晓,冯翠,曾爱松,等.影响青花菜游离小孢子培养胚胎发生的因子[J].江苏农业学报,2010,26(6):1319-1322.
- [28] 高素燕,吕敬刚,焦荻,等.辣椒自然游离小孢子胚状体诱导研究[J].天津农业科学,2019,25(4):11-14.
- [29] 李金荣,欧承刚,庄飞云,等.胡萝卜游离小孢子培养及其发育过程研究[J].园艺学报,2011,38(8):1539-1546.
- [30] 贾凯,吴慧,高杰.新疆芜菁小孢子培养及再生植株倍性检测[J].分子植物育种,2018,16(21):7104-7111.
- [31] 贾凯,吴慧,许建,等.不同处理方法对芜菁游离小孢子出胚率的影响[J].江苏农业科学,2018,46(8):39-42.
- [32] 孙继峰,方智远,袁素霞,等.不同温度预处理对青花菜小孢子胚胎发生的影响[J].园艺学报,2015,42(3):563-568.
- [33] 张琨,王一衡,王琦.青梗菜游离小孢子培养关键因素研究[J].种子,2022,41(5):144-148.
- [34] 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):37-43.