

# 影响油菜萝卜胞质不育系恢复材料花药培养的若干因素\*

李红梅 李旭锋\*\* 廖衍慧 吴书惠 李琳

(四川联合大学生物系 成都 610064)

**摘 要** 对 OguCMS × Ad-6(F<sub>4</sub>) 的 TCF<sub>2</sub> 代进行了花药离体培养。目的是诱导单倍体植株和纯合的二倍体植株。采集含单核靠边期的花芽,一部分放在 4℃ 条件下黑暗贮存 5d,一部分直接解剖培养。探讨了培养基和培养温度对花药培养的影响。结果表明经过 5d 的 4℃ 低温预处理的花芽,再经过 33℃, 2d 和 30℃, 6d 的培养后花药出愈率明显高于其他条件。另外以 B5 作为基本培养基附加 10% 或 8% 的蔗糖以及 0.5mg/L 2, 4-D、0.2mg/L BA 和 0.2mg/L NAA 对诱导花药出愈有促进作用,在附加 5mg/L BA 和 3% 蔗糖的 MS 培养基上,诱导形成了丛生芽。

**关键词** 油菜, 萝卜胞质雄性不育系, 恢复材料, 花药, 培养

**分类号** Q945.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0315-21

花药离体培养技术最早开始于 1964 年,现在已经广泛应用于育种工程。人们利用这项技术,可以从重要的农作物品种中得到单倍体或纯合的二倍体<sup>[1,2]</sup>。通过花药培养与常规育种相结合的手段,研究人员已经在较短的时间内培育出了烟草、水稻、小麦等的新品种。而通过花药培养诱导小孢子胚,进而建立油菜纯系的技术也日趋完善起来<sup>[3]</sup>。对于油菜来说,建立油菜萝卜胞质雄性不育系(OguCMS)的恢复系至今仍是世界瞩目的一项重要课题。李旭锋等通过植物染色体工程创建了油菜—蓝花子染色体异附加材料,其中 Ad-6 对油菜 OguCMS 有恢复能力<sup>[4,5]</sup>。本实验就是利用 OguCMS × [OguCMS × Ad-6(F<sub>4</sub>)] 的再测交后代中的恢复株(简称 OguCMS)进行花药离体培养,目的是得到纯合的恢复植株,以培育油菜 OguCMS 的恢复系。本文着重探讨影响油菜萝卜胞质不育系恢复材料花药培养的关键因素,包括温度、培养基、激素、蔗糖以及培养方法等。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

四川大学李旭锋等创建的油菜恢复材料对油菜 OguCMS 两次测交后的恢复株(TCF<sub>2</sub>),即油菜 OguCMS ♀ × [油菜 OguCMS ♀ × Ad-6(F<sub>4</sub>) ♂] ♂ 中的恢复株。

### 1.2 实验材料的采集和鉴定

采集花序轴伸长之前的始花期花蕾。开花初期,主要采集主枝上的花蕾,开花后期,

\* 国家自然科学基金、国家“九·五”攻关、四川省“九·五”攻关资助项目(No. 39570457)。

\*\* 通讯联系。

收稿日期:1998-07-22,修回日期:1998-12-14。

材料则主要来源于侧枝。

鉴定小孢子发育时期的方法是:剥取 1~2 个花药,放于清洁的载片上,加一滴醋酸洋红染液,将花药撕破,使花粉散出,除去药壁等组织碎片,加盖片,酒精灯上加热数秒钟后,均匀用力压片,半小时后,即可在显微镜下观察。此时细胞质呈浅红色,而细胞核为红色。选取小孢子发育到单核靠边期或双核早期的花蕾。为操作方便,可把花粉的发育时期与花蕾的外部形态联系起来,例如根据萼片的长度或萼片与花药的长度比等外部形态标志来选择花药进行培养。通过实验我们认为萼片长度为 2~4mm,萼片/花药的比值在  $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{3}{4}$  之间的花蕾中符合培养要求的花药含量最高,培养效果最好。

### 1.3 培养材料的处理

将选好的花蕾,取出一半用保湿的塑料袋装好,于 4℃ 冰箱中黑暗贮存 5d,另一半材料直接用于实验。实验时,将花蕾首先放入 70% 的酒精中浸泡 30~60s 后,放入 0.15% 的氯化汞中表面消毒 8~10min,再以无菌水洗涤 3 次,每次 5min,然后将花蕾放于吸水纸上,剥出花药,均匀的接种于诱导出愈的培养基上(培养基配方见表 2,3),分别进行 30℃, 6d; 32.5℃, 3d; 33℃, 2d 和 35℃, 1d 的高温黑暗培养后将温度降至 30℃ 继续培养 6d,再将温度调至 25℃,恒温培养 2 周后,便可观察到花药上有愈伤组织生成,待愈伤组织长至直径约 4mm 时,转至分化培养基上(培养基配方见表 4),见光培养 2 周后,可分化成苗,将小苗转到生根培养基上(Ms + NAA0.05mg/L),长成完整的植株后,即可移栽。

本实验中培养器皿均采用 100mL 的广口三角瓶,接种密度为每瓶 20 粒花药;黑暗培养阶段在电热恒温培养箱中进行,光照培养阶段则在温控培养间中进行,光照时数为 9h/d,光强为 2000lx,相对湿度 60% 左右。

### 1.4 愈伤组织的染色体数目鉴定

当花药培养产生的愈伤组织长至 2~4mm 时,取生长旺盛的愈伤组织块放入 0.1% 的  $\alpha$ -溴代萘溶液中,于 4℃ 条件下暗处理 3h,然后取出用蒸馏水清洗 3 次,放入卡诺固定液(无水乙醇:冰醋酸 = 3:1)中固定 2~24h 后,放入 70% 的酒精中保存。取处理后的愈伤组织块放入 1mol/L HCl 中于 60℃ 酸解 10min,取出后用蒸馏水洗涤 3 次,在蒸馏水中放置 10min 后,利用压片法制片,镜检。

## 2 结 果

### 2.1 温度对花药愈伤组织诱导的影响

在培养过程中对花药进行解剖发现,经 4℃ 低温预处理的材料,当高温培养 2d 后,便可发现小孢子进行了 2 次均等分裂(见图版 I-A)。25℃ 恒温培养 1 周后,再次对花药进行解剖观察,发现小孢子已分裂形成较大的细胞团(见图版 I-B),恒温培养 2 周后,花药表面便形成了 2~4mm 的愈伤组织团,此时统计不同温度处理后出愈的花药数,如果不对花蕾进行低温前处理,而只是对培养的花药进行高温处理,那么花药上形成花粉胚性愈伤组织的频率为 0;只对花蕾进行低温前处理,而不对培养的花药进行高温处理,那么花药出愈率也为 0;只有在材料经历低温和高温联合处理的情况下,花粉胚性愈伤组织才能形成(见表 1)。由此可见,低温前处理和高温诱导在花药培养过程中缺一不可。从表 1 可以看出,最佳的联合处理温度为:将花蕾在 4℃ 条件下黑暗贮存 5d,然后将花药在 33℃ 条件

下暗培养 2d, 再于 30℃ 条件下暗培养 6d, 此时的出愈率最高为 21.43%。

表 1 高温对花药愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of high temperature on calli induction of anther culture

Material	Deal with high temperature		Number of anther inoculated	Number of calli induced	Rate/%
	T/℃	t/d			
OguCMS×Ad-6	30	6	295	12	4.07
	32.5	3	312	43	13.78
	33	2	392	84	21.43
(F <sub>4</sub> ) TCF <sub>2</sub>	35	1	298	24	8.05

① Buds were pretreated at 4℃ for 5d.

② After the high temperature culture anthers were incubated at 30℃ for 6d and then 25℃.

## 2.2 培养基类型对花药愈伤组织诱导的影响

为了选择一种最佳的诱导花药出愈的培养基, 选用了三种基本培养基, (培养基配方见表 2)。结果发现接种在 MS 培养基上的花药, 培养 1 周后, 便开始褐化死亡; 接种在 Licher 培养基上的花药, 在培养 1 周后, 颜色仍为淡绿色, 说明其仍保持有生活力。对其进行解剖发现有极少数小孢子进行分裂, 但药隔及花药柄等部位的体细胞明显的愈伤化, 培养 2 周后观察, 形成的愈伤组织多集中于药柄部位; 而 B5 培养基上接种的花药, 在恒温培养 2 周后形成小孢子胚性愈伤组织的频率最高, 可达到 21.43%。详细结果见表 2。

从表 2 我们可以看出, 在相同的激素配比和相同的蔗糖浓度前提下, 改变基本培养基的类型, 便导致出愈率产生极大的差异。这说明花药培养过程中, 小孢子的脱分化和愈伤化过程对大量元素、微量元素、有机物、铁盐的浓度要求比较苛刻, 而 B5 培养基的有机和矿物成分可能对小孢子形成胚性愈伤组织有利。

表 2 基本培养基对花药愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of basal medium on the calli induction of anther culture

Basal medium	Number of anther inoculated	Calli	Rate/%
MS	376	0	0
Licher	392	3	0.77
B5	392	84	21.43

Added 2, 4-D 0.5mg/L, 6-BA 0.2mg/L, NAA 0.2mg/L, Sucrose 8% to basal medium, respectively.

## 2.3 激素对花药愈伤组织诱导影响

通过前面的实验选定以 B5 作为花药愈伤组织诱导的基本培养基, 为了选择一种最佳的激素组合, 设置了 9 种激素配方, 诱导花药出愈。当花药在 25℃ 条件下恒温培养 2 周后, 统计其出愈情况, 结果见表 3。

通过表 3 我们可以看出, 不加任何激素的情况下, 花药出愈率为 0, 含 2, 4-D 的配方比不含 2, 4-D 的培养基较易诱导花药出愈。

## 2.4 激素对愈伤组织分化的影响

当愈伤组织长至 2~4mm 时(见图版 I-C), 我们将其转至通常所用的分化培养上(MS + BA2.0mg/L + NAA0.2mg/L), 结果发现愈伤组织上长出大量的根毛, 而并不分化出芽。于是采用降低 NAA 浓度, 提高 BA 剂量, 以及去掉 NAA, 添加 KT 等多种手段诱导其出苗(培养基配方见表 4)最终在 MS 附加 BA 5mg/L 的培养基上诱导愈伤组织形成了

表 3 激素对花药愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of hormones on the calli induction of anther culture

2,4-D	Combinations of hormones/(mg/L)				Number of anther innoculated	Number of calli induced	Rate/%
	6-BA	NAA	KT	IAA			
—	—	—	—	—	198	0	0
—	0.05	0.5	—	—	395	5	1.3
—	0.05	1.0	—	—	189	0	0
—	0.1	0.5	—	0.3	196	1	0.51
0.1	0.1	0.1	—	—	379	22	5.80
0.2	—	0.5	—	—	205	6	2.92
0.5	0.2	0.2	—	—	392	84	21.43
1.0	—	1.0	—	—	212	4	1.89
2.0	—	0.1	1.5	—	400	13	3.25

Basal medium: B5

表 4 激素对愈伤组织分化出芽的影响

Table 4 Effect of hormones on the shoots regeneration from calli

Combinations of hormones/(mg/L)			Number of regeneratal calli	Number of shoots
BA	KT	NAA		
1.0	—	—	0	0
2.0	—	—	0	0
2.0	—	0.2	0	0
2.0	2.0	0.2	0	0
3.0	—	—	0	0
3.0	—	0.2	0	0
5.0	—	—	3	24
5.0	—	0.01	0	0
6.0	—	0.01	0	0
8.0	—	0.01	0	0

Basal medium: MS; Number of calli inoculated are 6

丛生芽(见图版 I-D)。丛生芽生长 1 周后,我们统计了出芽情况,结果见表 4。

从表的数据我们可以看出诱导愈伤组织成芽难度较大,并且通过我们的观察发现,诱导形成的芽大多呈畸形。我们在实验中还发现,凡是含 NAA 的培养基,无论浓度高低,均诱导愈伤组织生根,但不长芽。只含 6-BA 的培养基,当 6-BA 浓度为 5.0mg/L 时诱导愈伤组

织生芽;当 6-BA 浓度低于 5.0mg/L 时,只是促进愈伤组织的体积增大,其他没什么变化;当 6-BA 浓度高于 5.0mg/L 时愈伤组织逐渐褐化,最后变成黑色;6-BA, KT, NAA 联合使用也不能诱导成芽,只是使愈伤组织体积增大。

## 2.5 蔗糖浓度对花药培养的影响

蔗糖浓度是影响花药培养的又一关键因素。共设计了 20%、13%、12%、10%、8%、3% 六种蔗糖浓度进行花药培养,结果花药的生长情况为:在 20%、13%、12% 的蔗糖浓度下,恒温培养 1 周后对花药进行解剖观察,发现小孢子进行不同程度的分裂,有的分裂成几个细胞,有的形成较大的细胞团,但在继续培养的过程中花药的出愈率均很低;在 10%、8% 的蔗糖浓度下,花药出愈率较高,分别达到 5.80% 和 21.43%;在 3% 的蔗糖浓度下则完全没有愈伤组织形成。根据这个结果我们推测较高的蔗糖浓度对启动小孢子的分裂有一定的作用,但浓度过高会抑制其继续生长,也不利于小孢子的存活;而蔗糖浓度过低,不利于小孢子分裂;只有当蔗糖浓度适中时,才能满足小孢子的存活、分裂以及继续生长的要求。因而 10%、8% 的蔗糖浓度对诱导花药愈伤组织的形成有利。但在愈伤组

织进一步分化出芽的过程中,需将蔗糖浓度调低到 3% 左右,较低的蔗糖浓度对愈伤组织分化出芽有利。这是因为较低的蔗糖浓度条件下,愈伤组织变成疏松的颗粒状团块,增加了透气性、透光性和透水性。这就使许多颗粒状愈伤组织的表面容易形成芽点,有利于丛生芽的形成。

## 2.6 培养方法对花药培养的影响

采用了 3 种培养方法:a. 固体培养基直接培养法。b. 液体悬浮培养法。c. 固体培养基上的液体浅层培养法。花药在这 3 种培养基上恒温培养 2 周后,进行对照。结果发现固体培养基直接培养的效果优于后两者;固体培养基上液体浅层培养的效果又优于液体悬浮培养。详细结果见表 5。

表 5 培养方法对花药培养的影响

Table 5 Effect of culture method on anther culture

Medium/(mg/L)	Number of anthers inoculated	Number of calli induced	Rate/%
B5 + 2,4-D 0.5 + BA 0.2 + NAA 0.2 + sucrose 8% + agar 0.8%	392	84	21.43
B5 + 2,4-D 0.5 + BA 0.2 + NAA 0.2 + sucrose 8%	385	0	0.00
B5 + 2,4-D 0.5 + BA 0.2 + NAA 0.2 + sucrose 8% + <B5 + 0.8% agar>	388	11	2.83

从表 5 可以看到,培养基的组成相同,只是培养方法的不同,就造成了培养结果的极大差异。可见,培养方法对花药胚性愈伤组织的形成影响很大。这是因为小孢子生长在花药里面,通气状况本来就比较差,如果将花药接种在液体培养基中就更增大了通气的难度,如能保持花药悬浮于液面,通气性会稍好些,但在培养过程中,花药自己会吸水沉入液面以下,引起氧气供应的不足,抑制其生长。

## 2.7 染色体倍性鉴定

通过花药培养得到了 138 块愈伤组织,运用染色体数目鉴定技术对其进行了鉴定。随机抽取了 26 块愈伤组织,结果发现有 21 块愈伤组织中存在单倍体细胞( $n=19$ ;见图版 I-E)其余 5 块为 2 倍体( $2n=36$ ;见图版 I-F)。

## 3 小 结

采用花药离体培养技术,对 OguCMS × Ad-6(F4)的 TCF<sub>2</sub> 群体中的恢复材料进行了培养。在培养过程中存在着若干制约培养成败的关键因素。温度是所有关键因素中最重要的一项。我们认为对材料进行低温前处理和高温预培养是必不可少的过程,该结果证实了 George L 等 1982 年提出的观点<sup>[6]</sup>,通过实验,我们认为较好的联合处理温度为 4℃ 条件下黑暗贮存 5d;33℃ 黑暗培养 2d,30℃ 保存 6d,最后置于 25℃ 恒温培养。通过上述高低温联合处理得到了 21.43% 的花药出愈率。在花药培养过程中,基本上可分为两个阶段。第一阶段是愈伤组织诱导;第二阶段是芽的分化。激素在这两个阶段中都起着同样重要的作用。我们认为 2,4-D 对于小孢子脱分化形成愈伤组织有促进作用,而 6-BA 对于愈伤组织分化成苗意义重大。采用的培养基,最佳的出愈培养基为 B5 + 2,4-D 0.5mg/L + BA 0.2mg/L + NAA 0.2/L + 腺素 20mg/L + sucrose 8% + agar 0.8%;最佳的

分化培养基为 MS + BA 5.0mg/L + sucrose 3% + agar 0.8%。蔗糖浓度和培养方法是影响实验成败的另外 2 个因素。8% 或 10% 的蔗糖浓度对小孢子的存活, 启动小孢子分裂以及保证其继续生长有利; 固体培养基上直接培养的效果要优于液体悬浮培养和液体浅层培养。分析其原因可能是液体培养基的通气性较差, 而小孢子进行旺盛的分裂和代谢需要有充足的氧气供应, 供氧不足是抑制花药生长的原因之一。在我们所做的实验中, 固体培养基上花药出愈率可达 21.43%, 浅层培养的出愈率仅为 0.77%, 液体培养则无愈伤组织形成。至今, 我们通过花药培养已诱导生成了丛生苗, 并已转至生根培养基上。待其长成完整的植株后便可移栽到实验田中。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] J. Reinert, Y. P. S. Bajaj. In: J. Reinert Eds, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer, Berlin. Heidelberg, New York, 1977, p. 251.
- [ 2 ] Hu Han. In: *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*. Beijing Science Press, 1978, p. 3.
- [ 3 ] W. A. Keller, A. I. Dela Roche. In: S. K. Sen Eds, *Plant Cell Culture in Crop Improvement*. Giles Plenum Press, New York, 1983, pp. 83~169.
- [ 4 ] 李旭峰, 杨毅等. (第三届全国青年作物遗传育种学术会文集), 1994, (3): 210~212.
- [ 5 ] 李旭峰, 杨毅等. (四川大学学报)(自然科学版), 1995, 32(5): 599~603.
- [ 6 ] Leela George, P. S. Rao. *Plant Science Letters*, 1982, 26: 111~116.

## Some Factors Effecting the Anther Culture of Rapeseed Restorers of OguCMS\*

Li Hongmei Li Xufeng Liao Yanhui Wu Shuhu Li Lin

(Department of Biology, Sichuan Union University, Chengdu 610064)

**Abstract** We use the technique of anther culture to induce haploids and homozygous diploids from TCF<sub>2</sub> of OguCMS × Ad-6(F4). Buds containing uninucleate microspores were harvested and either pretreated (5 day at 4℃) or dissected immediately after harvest. various culture media and incubation temperature were tested. The result showed first that bud pretreatment can improve the induction rate of callus and secondly that an incubation treatment for 24h at 33℃ followed by 6 days at 30℃ increased the induction rate of callus. High numbers of callus were induced by culturing the anthers on B5 medium containing 10% or 8% sucrose addition with 0.5mg/L 2, 4-D, 0.2mg/L BA and 0.2mg/L NAA. Shoots regenerated from callus on the MS medium addition with 5mg/L BA.

**Key words** Rapeseed restorers, OguCMS, anther, culture

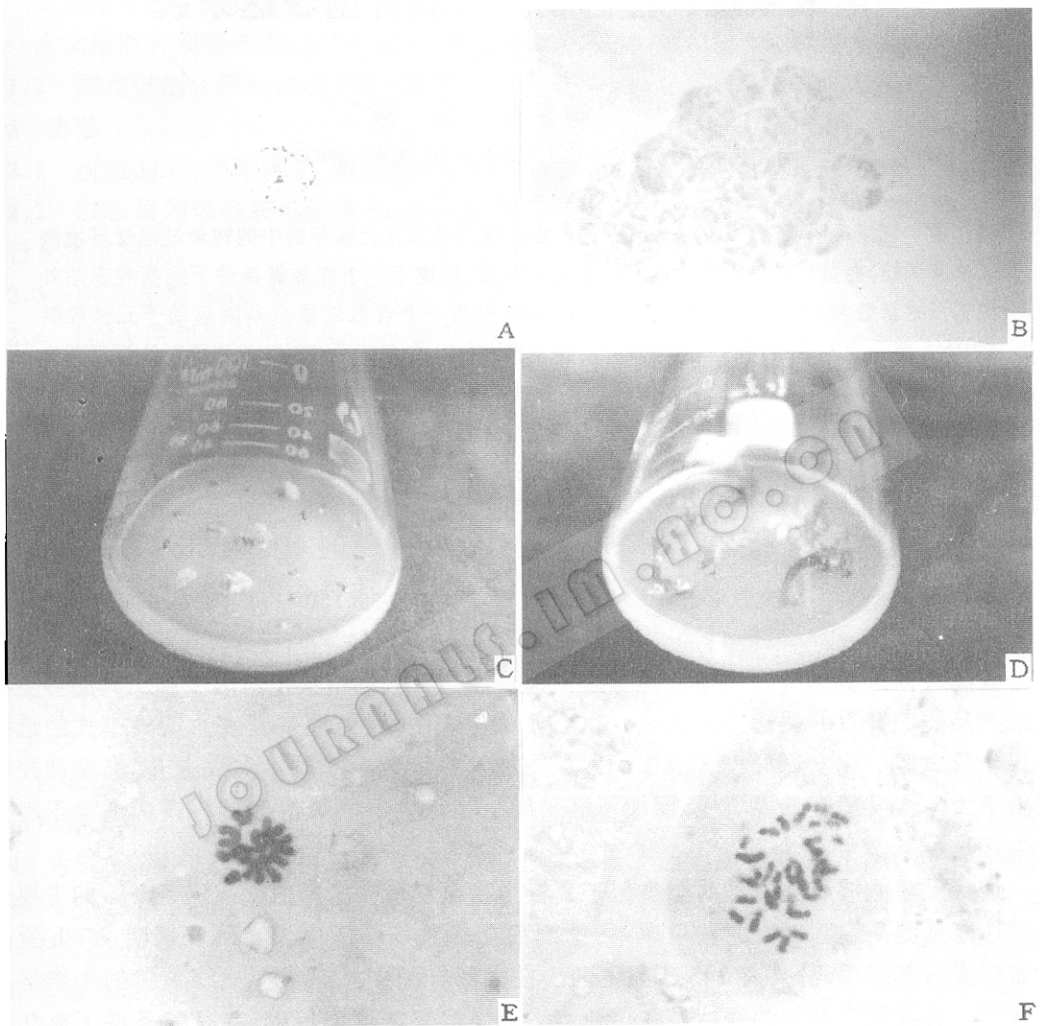
\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No.39570457).

李红梅等:影响油菜萝卜胞质不育系恢复材料花药培养的若干因素

图版 I

Li Hongmei *et al.*: Some factors effecting the anther culture of restorers of rapeseed with OguCMS

Plate I



- A. Second microspore division.
- B. Microspore divided several times after the anthers being cultured a week.
- C. Callus emerging from the anthers.
- D. Shoot bud growing on the rooting medium.
- E. Cell of the haploid calli,  $n = 18$ .
- F. Cell of the diploid calli,  $2n = 36$ .