

储玉凡,陈野,付文苑,等.芥菜小孢子培养及染色体加倍技术体系的优化[J].华中农业大学学报,2024,43(2):144-153.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.02.017

芥菜小孢子培养及染色体加倍技术体系的优化

储玉凡¹,陈野¹,付文苑^{1,2},姚培杰¹,张志琪¹,兰凯¹,余长春¹,万正杰¹

1. 华中农业大学园艺林学学院/果蔬园艺作物种质创新与利用全国重点实验室,武汉 430070;
2. 贵州省农业科学院园艺研究所,贵阳 550006

摘要 为探究不同芥菜基因型和培养条件对小孢子培养效果的影响,建立适合芥菜小孢子培养及染色体加倍的最佳方案,对芥菜8个不同变种的34份自交系进行小孢子培养,比较不同热激时间、活性炭浓度、小孢子密度对出胚率的影响。结果显示,基因型对芥菜小孢子培养成功与否影响较大,34份材料中11份材料成功培养出胚状体;不同材料间出胚效果差异明显,其中,大头菜出胚率最高,可达23.85胚/蕾;芥菜小孢子出胚最佳条件为32℃热激1~2 d,培养基含活性炭3~5 g/L,小孢子密度为 $1.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ 个/mL。染色体加倍试验结果显示,1 g/L秋水仙素溶液浸泡茎尖1 h的处理加倍效率高、嵌合体少,可应用于芥菜染色体的加倍。

关键词 芥菜;小孢子培养;双单倍体;小孢子胚胎发生;染色体加倍

中图分类号 S637 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)02-0144-10

双单倍体(double haploid, DH)对于快速获得纯系、提高育种效率具有重要意义^[1],传统上通过多代自交获得纯系需要5 a以上的时间,利用单倍体育种获得DH系则可在2 a内得到纯系。获得DH系的常见方法包括:单倍体诱导系法、小孢子培养法、着丝粒组蛋白H3介导法等。玉米DH系通常由单倍体诱导系诱导产生单倍体后再进行染色体加倍获得^[2],十字花科作物主要通过小孢子培养获得DH系。目前,小孢子培养技术已广泛应用于油菜、白菜等十字花科作物^[3-4],极大地推进了育种进程。

芥菜(*Brassica juncea*)是全世界广泛种植的一种十字花科作物,是重要的蔬菜、油料和调料作物,其遗传背景复杂、变种众多、用途广泛。芥菜具有明显的杂种优势,生产上常利用杂种优势进行新品种选育。因此,纯合亲本的选育对芥菜育种工作至关重要^[5]。目前以宽柄芥为主的叶用芥菜小孢子培养技术体系已经逐步建立^[5],然而芥菜其他变种的小孢子培养尚未见报道,完善芥菜小孢子培养技术对提高芥菜育种效率意义重大。

小孢子培养受到各种因素的影响,基因型和培养条件都会影响小孢子培养效果^[6];其中,基因型对

小孢子的胚胎发生能力起着至关重要的作用,芥菜遗传背景复杂且变种众多,研究各变种的小孢子培养效果不仅有利于探究基因型对小孢子培养的影响,还能够为小孢子培养出胚的遗传机制提供新线索。前人研究表明,培养条件(如热激处理、活性炭、小孢子密度等)在小孢子培养过程中发挥重要作用^[7-9],但这些因素对芥菜各变种小孢子培养的影响尚不清楚。同时,小孢子培养的单倍体植株无法正常产生配子,需对单倍体植株进行染色体加倍^[10]。然而,芥菜单倍体的最佳染色体加倍条件仍不清晰。因此,本研究选用8个变种的芥菜进行小孢子培养,对热激处理、活性炭、小孢子密度进行梯度处理,寻找适合芥菜的小孢子培养条件,优化芥菜小孢子培养技术;并采用不同秋水仙素处理组合,筛选出适用于芥菜的染色体加倍方案。

1 材料与方法

1.1 试验材料

根据芥菜的性状特征,芥菜分为16个变种^[11],选取8个变种34份芥菜自交系作为试验材料(表1),

收稿日期:2023-09-19

基金项目:中央高校基本科研业务费专项(2662021YLQD004);国家自然科学基金项目(32072573;32172601);芥菜薹优质多抗新品种培育与推广项目(HBZY2023B004-4-4);贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑[2022]一般086)

储玉凡, E-mail: chuyufan@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 万正杰, E-mail: wanzj@mail.hzau.edu.cn

包括分蘖芥 (*Brassica juncea* var. *multiceps* Tsen et Lee)、笋子芥 (*Brassica juncea* var. *crassicaulis* Chen et Yang)、宽柄芥 (*Brassica juncea* var. *latipa* Li)、茎瘤芥 (*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee)、大叶芥 (*Brassica juncea* var. *rugosa* Bailey)、大头菜 (*Bras-*

sica juncea var. *megarrhiza* Tsen et Lee)、结球芥 (*Brassica juncea* var. *capitata* Hort)、叶瘤芥 (*Brassica juncea* var. *strumata* Tsen et Lee), 材料定植于华中农业大学国家蔬菜改良中心华中分中心, 于2021年秋至2023年春季进行试验。

表1 小孢子培养所用34份芥菜自交系

Table 1 34 inbred lines of mustard used for microspore culture

编号 Code	变种类型 Variety types	编号 Code	变种类型 Variety types
A1	<i>Brassica juncea</i> var. <i>multiceps</i> Tsen et Lee	A18	<i>Brassica juncea</i> var. <i>multiceps</i> Tsen et Lee
A2	<i>Brassica juncea</i> var. <i>multiceps</i> Tsen et Lee	A19	<i>Brassica juncea</i> var. <i>multiceps</i> Tsen et Lee
A3	<i>Brassica juncea</i> var. <i>crassicaulis</i> Chen et Yang	A20	<i>Brassica juncea</i> var. <i>multiceps</i> Tsen et Lee
A4	<i>Brassica juncea</i> var. <i>latipa</i> Li	A21	<i>Brassica juncea</i> var. <i>strumata</i> Tsen et Lee
A5	<i>Brassica juncea</i> var. <i>tumida</i> Tsen et Lee	A22	<i>Brassica juncea</i> var. <i>strumata</i> Tsen et Lee
A6	<i>Brassica juncea</i> var. <i>rugosa</i> Bailey	A23	<i>Brassica juncea</i> var. <i>megarrhiza</i> Tsen et Lee
A7	<i>Brassica juncea</i> var. <i>rugosa</i> Bailey	A24	<i>Brassica juncea</i> var. <i>megarrhiza</i> Tsen et Lee
A8	<i>Brassica juncea</i> var. <i>megarrhiza</i> Tsen et Lee	A25	<i>Brassica juncea</i> var. <i>rugosa</i> Bailey
A9	<i>Brassica juncea</i> var. <i>megarrhiza</i> Tsen et Lee	A26	<i>Brassica juncea</i> var. <i>rugosa</i> Bailey
A10	<i>Brassica juncea</i> var. <i>capitata</i> Hort	A27	<i>Brassica juncea</i> var. <i>rugosa</i> Bailey
A11	<i>Brassica juncea</i> var. <i>megarrhiza</i> Tsen et Lee	A28	<i>Brassica juncea</i> var. <i>capitata</i> Hort
A12	<i>Brassica juncea</i> var. <i>capitata</i> Hort	A29	<i>Brassica juncea</i> var. <i>multiceps</i> Tsen et Lee
A13	<i>Brassica juncea</i> var. <i>latipa</i> Li	A30	<i>Brassica juncea</i> var. <i>latipa</i> Li
A14	<i>Brassica juncea</i> var. <i>capitata</i> Hort	A31	<i>Brassica juncea</i> var. <i>latipa</i> Li
A15	<i>Brassica juncea</i> var. <i>megarrhiza</i> Tsen et Lee	A32	<i>Brassica juncea</i> var. <i>rugosa</i> Bailey
A16	<i>Brassica juncea</i> var. <i>megarrhiza</i> Tsen et Lee	A33	<i>Brassica juncea</i> var. <i>tumida</i> Tsen et Lee
A17	<i>Brassica juncea</i> var. <i>megarrhiza</i> Tsen et Lee	A34	<i>Brassica juncea</i> var. <i>tumida</i> Tsen et Lee

1.2 DAPI 荧光染色观察

芥菜花期 FAA 固定花蕾 24 h, 固定后更换至 75% 乙醇中浸泡保存。选择不同长度 (1.0~2.0、2.0~3.0、3.0~4.0、4.0~5.0 mm) 的花蕾进行 DAPI 染色, 具体方法参照文献 [12], 染色后置于荧光显微镜下观察。

1.3 游离小孢子培养

小孢子培养过程与培养基配方参照甘蓝型油菜和白菜的小孢子培养方法 [3, 13]。采摘健壮无病虫害的芥菜花序, 清水冲洗 30 s 后于 4 °C 冰箱中处理 24 h, 取出后清水冲洗 5 min; 挑取花蕾于超净工作台, 30 mL 蒸馏水洗 2 min, 转入 75% 的乙醇消毒 30 s; 加入 30 mL 蒸馏水洗 2 min, 转入 15% 的 NaClO 溶液消毒 15 min; 蒸馏水洗 3 次后取花蕾置于灭菌的离心管中, 加入少量 B5-13 培养基洗涤, 玻璃棒轻压花蕾使花粉游离到 B5-13 培养基中获得小孢子提取液; 提取液经 48 μm 筛过滤, 离心管收集滤液后 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 20 mL 左右的 B5-13 培养基悬液后离心, 过程重复 3 次; 最后加入 NLN-13 液体培养基将小孢子沉淀物重悬, 每 4 mL 分装于培养皿 (含 1 g/L 的活性炭 100 μL), 每个处理 3 次生

物学重复, 25 °C 黑暗培养 20 d 后观察出胚情况, 出胚率由平均每个花蕾产生的胚状体个数 (胚/蕾) 表示。

1.4 植物倍性鉴定

采用流式细胞仪 (Partec®, model: space, 德国) 进行倍性鉴定 [14], 剪取新鲜幼嫩叶片 0.5 cm² 收集于离心管, 滴加细胞裂解液 60 μL 于叶片上, 用刀片将叶片切碎后加入 500 μL 染色液, 用 30 μm 微孔滤膜过滤至样品管, 上机检测。

1.5 花粉活力 TTC 染色

取芥菜单倍体和双倍体新鲜的花蕾进行 TTC 染色实验, 用镊子夹取花药置于载玻片上, 加入 2 滴 TTC 染料, 用镊子挤压释放花粉粒, 花粉与 TTC 染料溶液在 37 °C 下充分反应 15 min 后, 在显微镜下观察染色情况并拍照。

1.6 染色体加倍

利用秋水仙素对单倍体植株进行染色体加倍 [10, 15], 将秋水仙素溶解抽滤灭菌后分别稀释至 0.5、1、2 g/L, 黑暗储存; 剪取单倍体植株上含有 1 叶 1 心的茎尖, 置于 3 种不同浓度的秋水仙素中浸泡; 每个浓度设 3 个时间处理: 1、2、4 h; 浸泡完成后取出, 用蒸馏水清洗 2 次, 再转移至新的 MS 生根培养基培

养20 d, 茎尖分生组织生长出新的叶片后, 对新生嫩叶进行倍性鉴定, 检测其加倍效果。

1.7 数据分析

采用Excel整理数据, 使用SPSS 20.0进行方差分析, 采用Duncan's多重比较法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

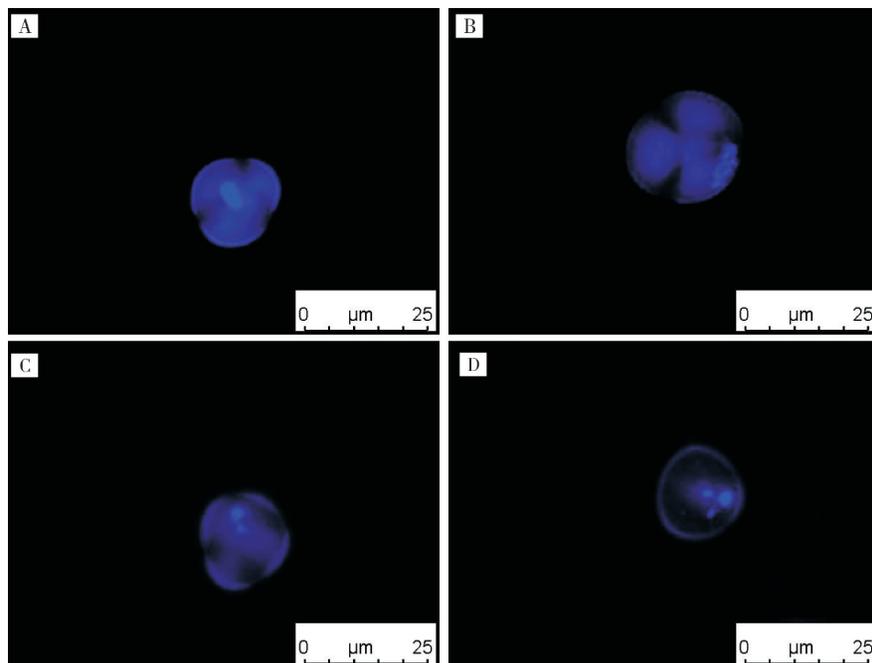
2.1 DAPI染色确定供试花蕾长度

选取不同长度的花蕾, 用DAPI荧光染液染色后在荧光显微镜下观察其小孢子发育情况。结果显示, 小孢子发育可明显观察到4个特征发育阶段, 单核期(图1A)-单核靠边期(图1B)-双核期(图1C)-三核期(图1D)。小孢子随花蕾的生长而逐渐发育, 小孢子发育时期与花蕾长度相对应, 观察不同长度(1.0~2.0, 2.0~3.0, 3.0~4.0, 4.0~5.0 mm)花蕾DAPI

染色结果发现, 2.0~3.0 mm花蕾中的小孢子有80%以上处于单核阶段, 分裂能力较强, 因此, 在后续的研究中选取2.0~3.0 mm长度的花蕾进行小孢子培养。

2.2 基因型对小孢子培养的影响

分别对34份芥菜材料进行小孢子培养, 结果如表2所示, 在相同的培养条件下, 共有11份材料获得胚状体, 不同材料之间出胚率差异很大。每皿总出胚数最高的材料为A8, 达143.10胚, 最低的材料为A27, 平均每皿仅0.1胚; 出胚率最高的材料为A8, 为23.85胚/蕾, 其次为A23, 为14.18胚/蕾, 二者均属于大头菜; 同一变种的出胚率也不同, 8种供试的大头菜材料中仅有2种材料可诱导胚状体形成。这些结果表明, 基因型对芥菜小孢子培养效果起决定作用。



A: 单核期 Uninucleate stage; B: 单核靠边期 Late-uninucleate stage; C: 双核期 Binucleate stage; D: 三核期 Trinucleate stage.

图1 小孢子发育的过程

Fig. 1 The process of microspore development

2.3 小孢子胚胎发育及植株再生

将小孢子培养诱导获得的胚状体转入B5-3培养基进行光照培养, 胚状体子叶一端逐渐转变为绿色呈叶片状, 另一端生出根系, 具体过程如图2A~D所示; 胚状体转移至不定芽诱导培养基后, 每个胚可分化产生1~3个不定芽(图2E、F、G), 选取健壮的不定芽转入MS生根培养基进行培养, 形成完整植株(图2H)。

2.4 热激处理对小孢子培养的影响

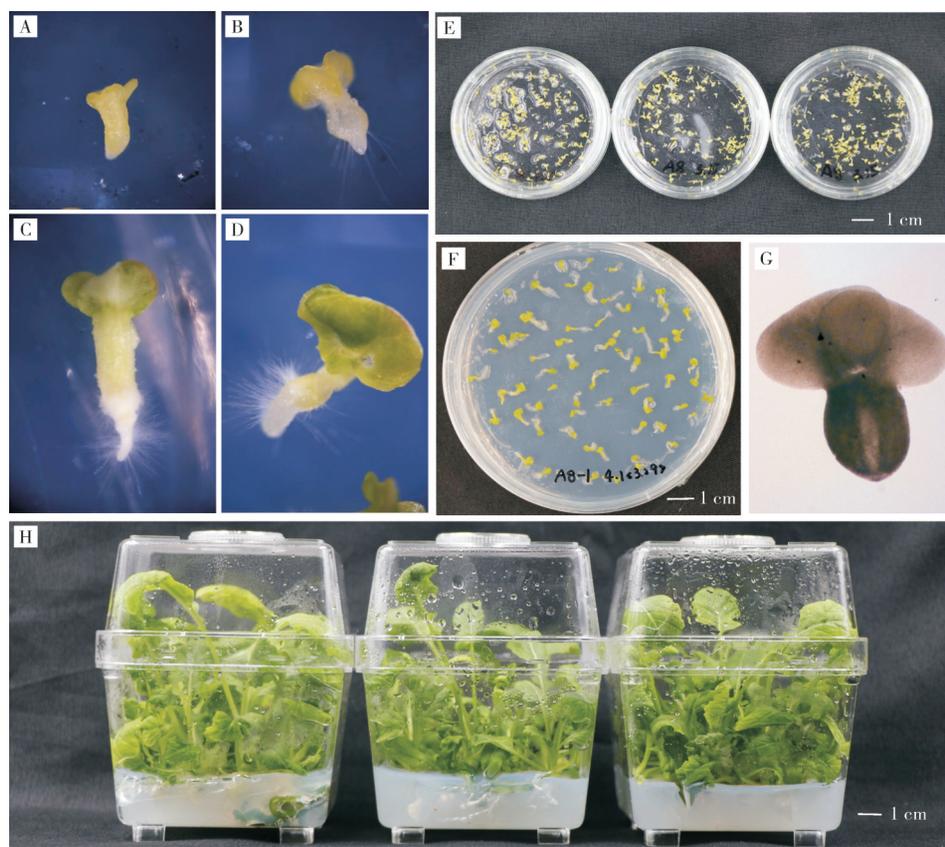
选取出胚率较高的4个变种材料, 大头菜A8、根瘤芥A33、结球芥A28和宽柄芥A31进行后续研究。由表3可知, 大头菜A8在32℃热激处理2d的出胚率最高, 为31.33胚/蕾; 而根瘤芥A33、结球芥A28和宽柄芥A31在32℃热激处理1d时出胚率最高, 分别为2.67胚/蕾、1.00胚/蕾和1.39胚/蕾; 没有经过热激处理的小孢子则不能产生胚状体。以上结果表明, 热

表2 不同基因型芥菜小孢子培养效果

Table 2 Microspore culture effect of different genotypes of mustard

编号 Code	变种类型 Variety types	子叶型胚状体数 Cotyledonous embryoids No.	畸形胚状体数 Deformed embryoids No.	总胚状体数 Total embryoids No.	出胚率/(胚/蕾) Number of embryoids per bud
A8	<i>Brassica juncea</i> var. <i>megarrhiza</i> Tsen et Lee	132.90±38.38a	10.20±2.74a	143.10±39.10a	23.85±6.52a
A23	<i>Brassica juncea</i> var. <i>megarrhiza</i> Tsen et Lee	79.20±12.20b	5.90±1.37b	85.10±13.16b	14.18±2.19b
A33	<i>Brassica juncea</i> var. <i>tumida</i> Tsen et Lee	12.50±3.37cd	3.70±1.49c	16.20±4.64c	2.70±0.77c
A25	<i>Brassica juncea</i> var. <i>rugosa</i> Bailey	14.00±0.42c	3.20±1.03c	17.20±3.71c	2.87±0.62c
A6	<i>Brassica juncea</i> var. <i>rugosa</i> Bailey	0.20±0.42d	0.00±0.00e	0.20±0.42d	0.03±0.07d
A27	<i>Brassica juncea</i> var. <i>rugosa</i> Bailey	0.10±0.32d	0.00±0.00e	0.10±0.32d	0.02±0.05d
A19	<i>Brassica juncea</i> var. <i>multiceps</i> Tsen et Lee	0.40±0.52d	0.20±0.42e	0.60±0.84d	0.10±0.14d
A28	<i>Brassica juncea</i> var. <i>capitata</i> Hort	1.70±0.95d	1.40±0.70de	3.10±1.29d	0.52±0.21d
A14	<i>Brassica juncea</i> var. <i>capitata</i> Hort	0.30±0.48d	0.30±0.48de	0.60±0.97d	0.10±0.16d
A31	<i>Brassica juncea</i> var. <i>latipa</i> Li	1.60±1.35d	1.00±0.94de	2.60±1.35d	0.43±0.22d
A22	<i>Brassica juncea</i> var. <i>strumata</i> Tsen et Lee	0.60±0.70d	0.60±0.52de	1.20±0.63d	0.20±0.10d

注：不同小写字母表示不同材料间差异显著 ($P < 0.05$)。Note: Different lowercase letters indicate significant differences between different materials ($P < 0.05$).



A~D: 胚状体发育过程 Process of embryoid body development; E: 初代培养 Primary culture under dark condition; F: 继代培养 Green transformation culture; G: 子叶型胚 Cotyledonous embryoid; H: 生根培养 Rooting culture.

图2 胚状体发育及植株再生过程

Fig. 2 Embryoid body development and plant regeneration processes

激处理时间对小孢子胚形成起关键作用,热激处理最佳持续时间为1~2 d,最佳处理时间因基因型对小孢子培养是必要的。芥菜小孢子热激处理的而异。

表3 不同热激处理时间下不同基因型芥菜小孢子培养效果

Table 3 Microspore culture effect of different genotypes of mustard under different heat shock treatment times

编号 Code	处理时间/d Processing days	子叶型胚状体数 Cotyledonous embryoids No.	畸形胚状体数 Deformed embryoids No.	总胚状体数 Total embryoids No.	出胚率/(胚/蕾) Number of embryoids per bud
A8	0	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
	1	139.00±3.61b	17.00±2.00b	156.00±5.20b	26.00±0.87b
	2	167.00±6.56a	21.00±1.00a	188.00±5.57a	31.33±0.93a
	3	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
A33	0	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00c	0.00±0.00c
	1	14.00±1.00a	2.00±1.00a	16.00±1.00a	2.67±0.17a
	2	11.33±1.53b	0.67±0.58b	12.00±1.00a	2.00±0.17b
	3	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00c	0.00±0.00c
A28	0	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b
	1	5.33±2.52a	0.67±0.58a	6.00±3.00a	1.00±0.50a
	2	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b
	3	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b
A31	0	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b
	1	6.33±1.53a	2.00±1.00a	8.33±1.15a	1.39±0.19a
	2	0.67±0.58b	0.33±0.58b	1.00±1.00b	0.17±0.17b
	3	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b

注:不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$),下同。Note: Different lowercase letters indicate significant difference between different treatments at 0.05 level ($P<0.05$), the same as follows.

2.5 活性炭对小孢子培养的影响

活性炭浓度对小孢子培养物胚胎发生的影响结果如表4所示,大头菜A8、结球芥A28和宽柄芥A31

的出胚率在活性炭浓度为3 g/L时最高,分别为27.22胚/蕾、3.11胚/蕾和2.28胚/蕾,显著高于无活性炭处理。在根瘤芥A33中,活性炭的最佳处理浓

表4 不同质量浓度活性炭处理下不同基因型芥菜小孢子培养效果

Table 4 Microspore culture effect of different genotypes of mustard under different concentrations of activated carbon

编号 Code	处理质量浓度/(g/L) Concentration	子叶型胚状体数 Cotyledonous embryoids No.	畸形胚状体数 Deformed embryoids No.	总胚状体数 Total embryoids No.	出胚率/(胚/蕾) Number of embryoids per bud
A8	0	81.00±14.80b	6.33±0.58b	87.33±14.22b	14.56±2.37b
	1	98.67±11.02ab	10.67±1.53a	109.33±11.68ab	18.22±1.94ab
	3	149.00±43.09a	14.33±3.21a	163.33±46.31a	27.22±7.72a
	5	116.00±21.79ab	12.67±1.53a	128.67±22.30ab	21.45±3.72ab
	7	8.00±1.00c	2.33±0.58c	10.33±1.53c	1.72±0.25c
A33	0	0.33±0.58c	0.33±0.58b	0.67±1.15b	0.11±0.19b
	1	1.67±1.15c	0.33±0.58b	2.00±1.00b	0.33±0.17b
	3	16.33±0.58b	2.67±0.58a	19.00±1.00a	3.17±0.17a
	5	18.67±2.08a	2.00±1.00a	20.67±2.89a	3.45±0.48a
	7	0.33±0.58c	0.00±0.00b	0.33±0.58b	0.00±0.00b
A28	0	1.00±1.73b	0.33±0.58b	1.33±2.31b	0.22±0.39b
	1	8.67±1.08a	6.00±1.00a	14.67±3.06a	2.44±0.51a
	3	11.33±3.06a	7.33±1.15a	18.67±3.06a	3.11±0.51a
	5	7.00±1.73a	7.00±1.00a	14.00±2.65a	2.33±0.44a
	7	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b
A31	0	1.00±1.00c	0.33±0.58b	1.33±1.53c	0.22±0.25c
	1	6.00±1.73b	3.00±1.00a	9.00±2.65b	1.50±0.44b
	3	9.67±1.53a	4.00±1.00a	13.67±1.53a	2.28±0.25a
	5	1.67±0.58c	0.67±0.58b	2.33±0.58c	0.39±0.10c
	7	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00c	0.00±0.00c

度为5 g/L,达到3.45胚/蕾,显著高于无活性炭处理,同时在不添加活性炭的处理中也发现了胚状体的形成。以上结果表明,活性炭对小孢子培养并不是必需的,但适宜质量浓度的活性炭(3~5 g/L)可显著提高小孢子培养胚产量;高质量浓度(7 g/L)则使小孢子胚诱导率降低。为了解释这一现象,将培养基置于显微镜下进行观察,在含有7 g/L的活性炭处理的培养基中观察到了活性炭团块,小孢子被包裹吸附在活性炭中,从而对小孢子发育产生不利影响。

2.6 小孢子密度对小孢子培养的影响

小孢子密度对出胚效果的影响结果如表5所示,

当培养基中小孢子密度为 0.5×10^5 个/mL时,小孢子数量过少,培养皿中未见胚状体产生;大头菜A8、根瘤芥A33和宽柄芥A31最适合的小孢子密度为 1.5×10^5 个/mL,每皿分别诱导获得150.67、15.00、12.00个胚状体。在结球芥A28基因型中,小孢子最适密度为 2.0×10^5 个/mL,每皿诱导获得13.33个胚状体。以上结果表明,培养期间的小孢子密度会影响小孢子胚状体产生,适合芥菜小孢子培养的小孢子密度为 $1.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ 个/mL,但当培养基中小孢子密度持续升高时,因培养基养分不足导致胚状体数下降。

表5 不同小孢子密度下不同基因型芥菜小孢子培养效果

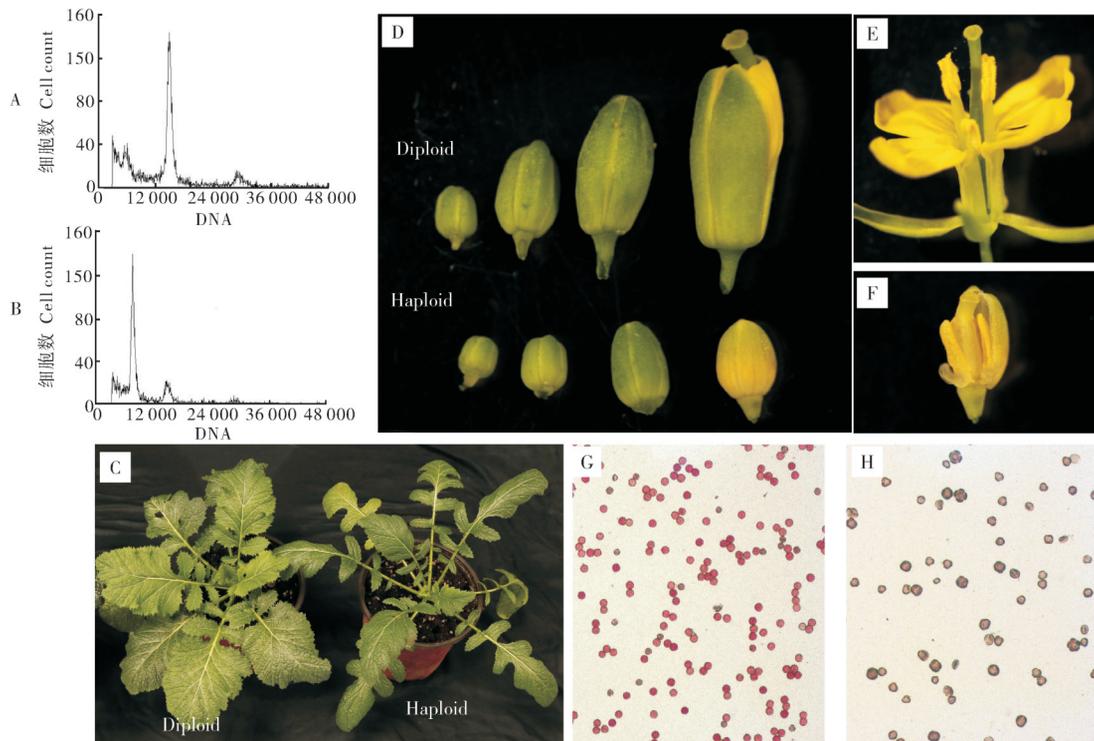
Table 5 Microspore culture effect of different genotypes of mustard under different microspore density

编号 Code	密度/(个/mL) Concentration	子叶型胚状体数 Cotyledonous embryoids No.	畸形胚状体数 Deformed embryoids No.	总胚状体数 Total embryoids No.
A8	0.5×10^5	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00c
	1.0×10^5	85.33±7.02b	13.33±2.31a	98.67±5.03b
	1.5×10^5	135.00±14.53a	15.67±1.53a	150.67±16.01a
	2.0×10^5	134.33±11.02a	13.00±1.00a	147.33±11.50a
	3.0×10^5	0.67±0.58c	0.67±0.58b	1.33±1.15c
	4.0×10^5	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00c
A33	0.5×10^5	0.00±0.00d	0.00±0.00d	0.00±0.00c
	1.0×10^5	5.00±1.73c	1.00±0.00c	6.00±1.73b
	1.5×10^5	12.67±1.15a	2.33±0.58b	15.00±1.00a
	2.0×10^5	10.00±2.65b	3.33±0.58a	13.33±3.21a
	3.0×10^5	1.33±1.15d	0.67±0.58cd	2.00±1.73c
	4.0×10^5	0.00±0.00d	0.00±0.00d	0.00±0.00c
A28	0.5×10^5	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
	1.0×10^5	3.33±1.53b	3.33±1.53b	6.67±0.58b
	1.5×10^5	6.00±1.00a	4.67±1.15ab	10.67±1.53a
	2.0×10^5	6.67±1.15a	6.67±2.31a	13.33±3.06a
	3.0×10^5	6.00±1.00a	5.56±1.53ab	11.67±2.08a
	4.0×10^5	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.58c
A31	0.5×10^5	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
	1.0×10^5	3.33±0.58b	4.67±0.58b	8.00±1.00b
	1.5×10^5	6.00±1.00a	6.00±1.00a	12.00±1.73a
	2.0×10^5	6.00±1.73a	4.67±0.58b	10.67±0.58a
	3.0×10^5	0.33±0.58c	0.33±0.58c	0.67±0.58c
	4.0×10^5	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c

2.7 植物单双倍体鉴定与表型观察

以双倍体植株作为对照,分析植株倍性情况,结果显示,大头菜A8培养所获得的172株再生植株中,有132株为单倍体植株,自然加倍率为23.26%;单倍体植株流式细胞仪鉴定植株峰图的横坐标细胞DNA总量是双倍体植株的一半(图3A、B)。将植株种植于栽培基质中继续培养发现,单倍体植株更加瘦小,

叶片狭长(图3C)。对单倍体植株的花器官进行观察发现,相比于双倍体花器官,单倍体花蕾更小,且在开花前花蕾就逐渐变黄早衰,大多花蕾无法正常开花(图3D、E、F)。用TTC对双倍体和单倍体的花粉进行染色发现,单倍体植株花粉发育停滞在四分体时期,花粉无活力(图3G、H)。



A: 双倍体鉴定植株峰图 Peak map of diploid identified plants; B: 单倍体鉴定植株峰图 Peak map of haploid identified plants; C: 双倍体和单倍体植株形态 Diploid and haploid plant morphology; D: 双倍体与单倍体花器官的比较 Comparison between diploid and haploid floral organs; E: 双倍体花器官 Diploid floral organs; F: 单倍体花器官 Haploid floral organs; G: 双倍体花粉活力 Pollen viability of diploid pollen; H: 单倍体花粉活力 Pollen viability of haploid pollen.

图3 倍性鉴定和花粉染色观察

Fig. 3 Ploidy identification and pollen viability observation

2.8 芥菜染色体加倍方案

采用不同浓度梯度和处理时间的秋水仙素对单倍体大头菜 A8 的茎尖进行浸泡处理, 结果如表 6 所示, 加倍处理后的单倍体植株数随处理时间的延长而减少, 且随处理质量浓度的增高而减少; 使用 1 g/L 秋水仙素处理 1~2 h 和 2 g/L 秋水仙素处理

1 h 的 12 株植株分别产生了 8 株双倍体植株, 处理后的植株双倍体率均达 66.67%, 其中 1 g/L 秋水仙素处理 1 h 产生的嵌合植株最少。以上结果表明, 秋水仙素处理时间和浓度的增加能够使单倍体加倍率增高, 最适芥菜单倍体加倍的处理条件为 1 g/L 秋水仙素处理 1 h。

表6 秋水仙素处理染色体加倍效果

Table 6 Chromosome doubling effect of colchicine treatment

秋水仙素质量浓度/(g/L) Concentration of colchicine	处理时间/h Treatment duration	株数 Number of plants	染色体加倍数 Chromosomal ploidy level			嵌合体率/% Mixed-ploidy rate	加倍效率/% Efficiency of chromosome doubling	
			单倍体 Haploid	双倍体 Diploid	嵌合体 Mixed-ploidy		单倍体 Haploid	双倍体 Diploid
0.5	1	12	7	3	2	16.67	58.33	25.00
	2	12	6	3	3	25.00	50.00	25.00
	4	12	6	4	2	16.67	50.00	33.33
1.0	1	12	3	8	1	8.33	25.00	66.67
	2	12	2	8	2	16.67	16.67	66.67
	4	12	0	7	5	41.67	0.00	58.33
2.0	1	12	1	8	3	25.00	8.33	66.67
	2	12	1	7	4	33.33	8.33	58.33
	4	12	0	5	7	58.33	0.00	41.67

3 讨论

芥菜作为一种异源四倍体,具有复杂的遗传背景和很强的杂种优势,纯合材料的获得对其育种具有重要意义。通过小孢子培养技术获得DH系被认为是最为便捷有效的方法。小孢子培养过程中小孢子的发育阶段、基因型、热激处理、活性炭和小孢子密度等许多因素对小孢子培养至关重要^[16-19]。顾祥昆^[20]对36种芥菜材料进行小孢子培养,出胚率最高为5.87胚/蕾;王萌^[21]对大头菜进行小孢子培养,出胚率最高为2.58胚/蕾。本研究选择处于单核阶段的2.0~3.0 mm花蕾进行小孢子培养,34份材料中有11份获得了胚状体(表1、2),出胚率最高的大头菜可达23.85胚/蕾,相较于过去芥菜小孢子培养研究有一定提升。

培养条件是影响小孢子培养的主要因素之一,培养条件不适可能会导致胚状体数量减少,甚至导致完全无法产生胚状体。本研究发现,热激处理对芥菜胚状体的产生是必需的,未经热激处理的小孢子无法形成胚状体(表3),32℃热激处理1~2 d可使芥菜小孢子产生胚状体;不同材料最适的处理条件也存在差异,大头菜A8在32℃条件下处理2 d的效果最佳,而根瘤芥A33、结球芥A28和宽柄芥31基因型在1 d处理中最佳。Custers等^[22]发现32.5℃热激可以诱导小孢子形成孢子体途径,而17.5℃时的小孢子倾向于遵循配子体途径形成花粉结构。韩笑等^[7]发现32.5℃热激1 d的组合显著提高了花椰菜小孢子胚胎的生成率,而长时间的热激会使小孢子受到高温的胁迫,导致胚状体无法正常形成。本研究也发现处理时间达到3 d时,芥菜小孢子培养无法产生胚状体。

前人研究表明活性炭可以吸收一些由小孢子生长过程产生的生长素和细胞分裂素^[23]。Johansson^[24]研究发现在烟草和海葵的花药培养中添加活性炭可以减少脱落酸对花药培养时的抑制作用,从而促进胚胎发生。本研究发现活性炭对于小孢子培养来说并不是必需的,而在培养基中添加适量的活性炭确实可以提高小孢子培养的发芽率,这与万丽丽等^[3]的结果一致。当活性炭浓度过高时,小孢子被成团的活性炭包裹吸附,限制了小孢子的发育从而未能够产生胚状体。本研究还探讨了不同小孢子培养密度对小孢子培养效果的影响,发现 $1.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ 个/mL的小孢子密度对芥菜来说是最合适的;当低于此密度时,随着小孢子密度的增加,产生

的胚状体数逐渐增加,但当培养基中小孢子密度过高时会导致培养营养不足,从而导致胚状体数减少。邓英^[25]采用不同小孢子密度进行培养时发现每皿8蕾的小孢子密度出胚效果最好,每皿12蕾培养则导致出胚率下降。以上结果表明小孢子培养效果受培养密度的影响,适合的培养密度能够提高出胚率。

小孢子培养产生的单倍体不能自花授粉产生种子,需要对单倍体进行染色体加倍才能自交收种,从而使优良性状得到固定,因此染色体加倍技术的应用对于单倍体育种至关重要。本研究利用1 g/L秋水仙素浸泡茎尖1 h取得了良好的效果,加倍效率高且产生嵌合植株较少;而随着浸泡时间和浓度的增加所获得的单倍体植株数目逐渐变少,这与石淑稳等^[15]对甘蓝型油菜的茎尖进行秋水仙素浸泡处理的结果类似。

综上所述,本研究系统探究了基因型、热激处理时间、活性炭浓度和小孢子密度对芥菜小孢子培养的影响,成功建立了可应用于芥菜的小孢子培养和染色体加倍技术。目前,影响小孢子培养效率的相关基因尚未被发掘,小孢子培养的成功率受到基因型限制较大,小孢子胚胎发生机制也还不明确,仍需要进一步研究胚状体发生所涉及的影响因素及其作用机制,以促进高效通用型培养体系的建立。

参考文献 References

- [1] WANG N, WANG H, ZHANG A, et al. Genomic prediction across years in a maize doubled haploid breeding program to accelerate early-stage testcross testing[J]. *Theoretical and applied genetics*, 2020, 133(10): 2869-2879.
- [2] ZHAO X, XU X W, XIE H X, et al. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers[J]. *Plant physiology*, 2013, 163(2): 721-731.
- [3] 万丽丽, 王转茸, 徐义, 等. 甘蓝型油菜小孢子培养子叶形胚发育成苗研究[J]. *湖北农业科学*, 2021, 60(16): 15-20. WAN L L, WANG Z R, XU Y, et al. Study on seedling development of cotyledon embryo in microspore culture of *Brassica napus* L. [J]. *Hubei agricultural sciences*, 2021, 60(16): 15-20 (in Chinese with English abstract).
- [4] 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. JIA J X. Creation of the germplasm in *Brassica rapa* via microspore culture [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [5] 万正杰, 范永红, 孟秋峰, 等. 中国芥菜种业发展与展望[J]. *中国蔬菜*, 2020(12): 1-6. WAN Z J, FAN Y H, MENG Q F, et al. Development and prospect of Chinese mustard seed indus-

- try[J].China vegetables,2020(12):1-6 (in Chinese).
- [6] 杨美翠,赵诗慧,高原,等.油菜双单倍体诱导育种技术进展[J].生物技术进展,2022,12(5):655-663.YANG M C, ZHAO S H, GAO Y, et al.Advances on double haploid induction breeding technology in rapeseed [J].Current biotechnology, 2022, 12(5):655-663 (in Chinese with English abstract).
- [7] 韩笑,刘希玲,文正华.热激处理对花椰菜小孢子培养的影响[J].天津农林科技,2012(2):9-11.HAN X, LIU X L, WEN Z H.Effect of heat shock treatment on microspore culture of cauliflower [J].Science and technology of Tianjin agriculture and forestry, 2012(2):9-11 (in Chinese).
- [8] SHUMILINA D, KORNYYUKHIN D, DOMBLIDES E, et al. Effects of genotype and culture conditions on microspore embryogenesis and plant regeneration in *Brassica rapa* ssp. *rapa* L. [J/OL].Plants, 2020, 9(2):278 [2023-09-19].https://doi.org/10.3390/plants9020278.
- [9] 邓英,唐兵,付文苑,等.叶用芥菜小孢子培养技术体系的完善及DH系创制[J].中国农业大学学报,2018,23(9):60-67. DENG Y, TANG B, FU W Y, et al. Optimization of the isolated microspore culture system of leaf mustard and double haploid line producing [J].Journal of China Agricultural University, 2018, 23(9):60-67 (in Chinese with English abstract).
- [10] 于锡宏,张艳梅,蒋欣梅,等.秋水仙素诱导榨菜四倍体的效应[J].东北农业大学学报,2013,44(10):88-92.YU X H, ZHANG Y M, JIANG X M, et al. Study on effects of colchicines on tetraploid inducement of tuber mustard [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013, 44 (10) : 88-92 (in Chinese with English abstract).
- [11] 杨以耕,刘念慈,陈学群,等.芥菜分类研究[J].园艺学报,1989,16(2):114-121.YANG Y G, LIU N C, CHEN X Q, et al.A study on classification of mustard [J].Acta horticulturae sinica, 1989, 16(2):114-121 (in Chinese with English abstract).
- [12] 赵娟,沈佳,李海梅,等.MTG-DAPI双染色法观察黄瓜花粉细胞半薄切片中线粒体DNA的研究[J].南京农业大学学报,2015,38(1):27-32.ZHAO J, SHEN J, LI H M, et al.The research of detecting the mitochondrial DNA in semi-thin sliced pollen grains of *Cucumis sativus* L. by MTG-DAPI double-staining method [J].Journal of Nanjing Agricultural University, 2015, 38 (1) : 27-32 (in Chinese with English abstract).
- [13] 唐兵,陶莲,卢松,等.白菜游离小孢子培养高频胚诱导技术体系优化[J].热带作物学报,2017,38(10):1913-1920. TANG B, TAO L, LU S, et al.Optimization of high frequency embryo induction system for isolated microspore culture in Chinese cabbage [J].Chinese journal of tropical crops, 2017, 38 (10):1913-1920 (in Chinese with English abstract).
- [14] 刘晓东,孟川,王明秋,等.一种利用流式细胞仪快速检测大白菜倍性的方法:CN110849795B [P]. 2022-04-26. LIU X D, MENG C, WANG M Q, et al.Method for rapidly detecting ploidy of Chinese cabbages by using flow cytometry: CN110849795B [P].2022-04-26 (in Chinese).
- [15] 石淑稳,周永明,吴江生.秋水仙碱处理油菜离体小孢子的染色体加倍效应[J].华中农业大学学报,2002,21(4):329-333. SHI S W, ZHOU Y M, WU J S. Chromosome doubling of *Brassica napus* L. haploid by treating in vitro microspores with colchicine [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2002, 21(4):329-333 (in Chinese with English abstract).
- [16] LI Q F, CHEN Y G, YUE F, et al. Microspore culture reveals high fitness of *B. napus*-like gametes in an interspecific hybrid between *Brassica napus* and *B. oleracea* [J/OL]. PloS One, 2018, 13 (3) : e0193548 [2023-09-19]. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193548.
- [17] ZHAO Y, ZHENG W F, LI J, et al. Effects of genotype and sodium p-nitrophenolate on microspore embryogenesis and plant regeneration in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) [J/OL]. Scientia horticulturae, 2022, 293: 110711 [2023-09-19].https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110711.
- [18] TAKAHASHI Y, YOKOI S, TAKAHATA Y. Effects of genotypes and culture conditions on microspore embryogenesis and plant regeneration in several subspecies of *Brassica rapa* L. [J].Plant biotechnology reports, 2012, 6(4):297-304.
- [19] WANG T T, LI H X, ZHANG J H, et al. Initiation and development of microspore embryogenesis in recalcitrant purple flowering stalk (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *purpurea* Hort.) genotypes [J]. Scientia horticulturae, 2009, 121 (4):419-424.
- [20] 顾祥昆.芥菜游离小孢子培养研究[D].北京:中国农业科学院,2013.GU X K. Investigation of microspore culture in *Brassica juncea* [D].Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2013 (in Chinese with English abstract).
- [21] 王萌.根用芥菜(*Brassica juncea* var. *megarrhiza* Tsen et Lee)花药培养与游离小孢子培养技术体系研究[D].武汉:华中农业大学,2011. WANG M. Studies on the technical system of anther and isolated microspore culture in root mustard (*Brassica juncea* var. *megarrhiza* Tsen et Lee) [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011 (in Chinese with English abstract).
- [22] CUSTERS J B M, CORDEWENER J H G, NÖLLEN Y, et al. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus* [J]. Plant cell reports, 1994, 13(5):267-271.
- [23] WEATHERHEAD M A, BURDON J, HENSHAW G G. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media [J].Zeitschrift für pflanzenphysiologie, 1978, 89 (2):141-147.
- [24] JOHANSSON L. Effects of activated charcoal in anther cultures [J].Physiologia plantarum, 1983, 59(3):397-403.
- [25] 邓英.芥菜(*Brassica juncea* Coss.)游离小孢子培养诱导胚状

体发生因素研究[D].重庆:西南大学,2010.DENG Y. Study on induction factors of embryogenesis of isolated microspore

culture of mustard [D]. Chongqing: Southwest University, 2010 (in Chinese with English abstract).

Optimization of microspore culture system and chromosome doubling technology in mustard

CHU Yufan¹, CHEN Ye¹, FU Wenyuan^{1,2}, YAO Peijie¹, ZHANG Zhiqi¹,
LAN Kai¹, YU Changchun¹, WAN Zhengjie¹

1. National Key Laboratory for Germplasm Innovation & Utilization of Horticultural Crops, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. Institute of Horticulture, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China

Abstract The effects of genotypes and culture conditions on the microspore culture in mustard (*Brassica juncea*) were studied to establish an optimal system of the microspore culture and chromosome doubling in mustard. 34 inbred lines of 8 different varieties of mustard were used to conduct the microspore culture. The effects of heat shock times, concentrations of activated carbon, and densities of microspore on the rate of microspore embryogenesis were analyzed. The results showed that genotypes had a significant impact on the success of microspore culture in mustard, with 11 out of 34 inbred lines successfully producing embryoids. There were significant differences in rates of producing embryo among different inbred lines, among which *Brassica juncea* var. *megarrhiza* Tsen et Lee had the highest rate of producing embryo, reaching 23.85 embryos/anther. The optimal conditions for producing microspores in mustard were 32 °C heat shock for 1-2 days, culture medium containing 3-5 g/L activated carbon, and the density being 1.5×10^5 to 2.0×10^5 microspores/mL. The results of chromosome doubling experiment showed that immersing the stem tips in 1 g/L colchicine solution for 1 hour had a high efficiency of chromosome doubling and low chimerism, which could be used to double the chromosomes in mustard. The results of chromosome doubling test showed that 1 g/L colchicine solution soaked in stem tip for 1 hour had high doubling efficiency and less mixed-ploidy formation, which could be used to double the chromosomes in mustard.

Keywords mustard; microspore culture; doubled haploid; microspore embryogenesis; chromosome doubling

(责任编辑:葛晓霞)