



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103299896 A

(43) 申请公布日 2013.09.18

(21) 申请号 201310153396.9

(22) 申请日 2013.04.27

(71) 申请人 山东省农业科学院蔬菜研究所

地址 250100 山东省济南市历城区工业北路  
202号

(72) 发明人 赵智中 张志刚 刘栓桃 李巧云  
王淑芬 卢金东 徐文玲 刘贤娴  
付卫民

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221

代理人 彭成

(51) Int. Cl.

A01H 1/02(2006.01)

A01H 4/00(2006.01)

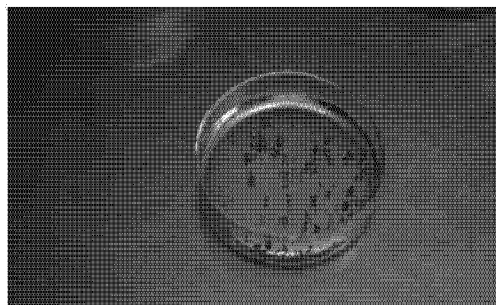
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

### (54) 发明名称

一种广适性耐抽苔春白菜游离小孢子的培养方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种广适性耐抽苔春白菜游离小孢子的培养方法,包括以下步骤:(1)取易于进行游离小孢子培养的高代自交系材料,与待培养小孢子的耐抽苔春白菜材料进行杂交,得杂交种子;(2)将杂交种子播种于营养钵,温室大棚自然春化,第二年3月底至4月下旬,抽苔开花期,取花蕾按常规方法进行游离小孢子培养,得再生植株。本发明采用简单的杂交方法,将市售不同背景的春白菜与易于进行游离小孢子培养的自交系材料进行杂交,有效改善了供体植株基因型状态,显著拓宽了耐抽苔春白菜游离小孢子培养的供体植株选择范围,有利于提高不同背景春白菜双单倍体材料的获得几率,极大地提高了春白菜育种效率。



1. 一种广适性耐抽苔春白菜游离小孢子的培养方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 取易于进行游离小孢子培养的高代自交系材料,与待培养小孢子的耐抽苔春白菜材料进行杂交,得杂交种子;

(2) 将杂交种子播种于营养钵,温室大棚自然春化,第二年3月底至4月下旬,抽苔开花期,取花蕾进行游离小孢子培养,得再生植株。

2. 根据权利要求1所述的一种广适性耐抽苔春白菜游离小孢子的培养方法,其特征在于:还包括以下步骤:(3) 将获得的再生植株诱导生根后移栽至温室,自然越冬,来年根据抽苔开花时期选择晚抽苔再生植株,即为耐抽苔双单倍体植株;自交结实后即获得纯系耐抽苔材料。

3. 根据权利要求1所述的一种广适性耐抽苔春白菜游离小孢子的培养方法,其特征在于:所述易于进行游离小孢子培养的高代自交系材料为夏白菜材料94610、秋早熟材料J3或06-21-1。

4. 根据权利要求1所述的一种广适性耐抽苔春白菜游离小孢子的培养方法,其特征在于:所述待培养小孢子的春白菜材料为各种耐抽苔春白菜一代杂种或自交几代的春白菜材料。

5. 根据权利要求1或4所述的一种广适性耐抽苔春白菜游离小孢子的培养方法,其特征在于:所述待培养小孢子的春白菜材料为日本春白菜品种菊锦、韩国春白菜品种阳春、韩国春白菜品种三宝或韩国春白菜品种强势。

6. 根据权利要求1所述的一种广适性耐抽苔春白菜游离小孢子的培养方法,其特征在于:所述营养钵的规格为:20cm×20cm。

## 一种广适性耐抽苔春白菜游离小孢子的培养方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种广适性耐抽苔春白菜游离小孢子的培养方法,属于细胞工程育种领域。

### 背景技术

[0002] 对育种家而言,快速纯化育种材料是提高育种效率的主要手段。常规纯化材料的方法是连续自交,往往需要6~8代才能培育出可用作杂交育种的亲本材料,这往往需要6~8年的时间。通过游离小孢子培养只须1~2年就可以得到多种基因型的纯合体,因此,游离小孢子培养是创造稳定变异材料的理想方法,能明显缩短育种进程,提高育种效率。大白菜游离小孢子培养受供体植株基因型的影响非常明显[曹鸣庆,李岩,刘凡.基因型和供体植株生长环境对大白菜游离小孢子胚胎发生的影响.华北农学报,1993,8(4):1-6;申书兴,梁会芬,张成合等.提高大白菜小孢子胚胎发生及植株获得率的几个因素研究.河北农业大学学报,1999,22(4):65~68]。一般而言,冬性弱的夏材料和秋材料游离小孢子培养容易成功,反之耐抽苔春白菜材料则不易成功。自从1989年Sato[Sato T,Nishio T,Hirai M,Plant regeneration from isolated microspore cultures of Chinese cabbage(*Brassica campestris* ssp.*Pekinensis*).Plant Cell Reports,1989,8:486-488]率先对结球大白菜进行游离小孢子培养并获得成功以来,该领域在夏、秋早熟和秋白菜的游离小孢子培养技术方面已日趋成熟[曹鸣庆,李岩,刘凡.基因型和供体植株生长环境对大白菜游离小孢子胚胎发生的影响.华北农学报,1993,8(4):1-6;栗根义,高睦枪,赵秀山.大白菜游离小孢子培养.园艺学报,1993,20(2):167-170;李岩,刘凡,曹鸣庆.通过游离小孢子培养方法获得小白菜三个变种的胚胎和植株.华北农学报,1993,8(3):92-97;曹鸣庆,李岩,蒋涛,西尾刚.大白菜和小白菜游离小孢子培养试验简报.华北农学报,1992,(02):119-120],并成功应用于育种实践,先后育成了“豫白菜11号”等早熟白菜品种[栗根义,高睦枪,耿建峰等.春秋适应型大白菜新品种豫白菜11号的选育.河南农业科学,1999,3:24-26;耿建峰,原玉香,张晓伟等.耐热早熟大白菜豫新60及其栽培技术.河南农业科学,2003,5:43]。相比较而言,春白菜的游离小孢子培养一直没有得到技术上的突破。虽然也有少量报到,但进展十分缓慢。如2001年Ajisaka[Ajisaka H,Kuginuki Y,Yui S,Enomoto S&Hirai M.Identification and mapping of a quantitative trait locus controlling extreme late bolting in Chinese cabbage(*Brassica rapa* L. ssp.*Pekinensis* syn.*campestris* L.)using bulked segregant analysis.Euphytica,2001,118:75-81]等对PLNo.2×A9302的F1代进行小孢子培养获得了耐抽苔双单倍体材料DH27,但PLNo.2来源于无球叶的大白菜地方品种“Osaka Shirona Bansei”,并不是真正的结球春白菜。我国学者近年来也对春白菜小孢子培养进行了不断尝试,主要致力于改进培养基配方并对培养条件进行优化,也取得了一定的进展,但大多只得到胚状体[周英,冯辉,王超楠,刘如娥.大白菜小孢子胚诱导及植株再生.沈阳农业大学学报,2006,37(6):816-820;潘洪艳,冯辉.2009.春结球黄心大白

菜小孢子胚诱导和植株再生。中国蔬菜, 8:32-35]。总体而言, 目前耐抽苔春白菜游离小孢子培养体系远未建成, 其离春白菜育种实践仍有很大差距。因此亟待建立适应性好的春白菜游离小孢子培养技术体系。

### 发明内容

[0003] 针对上述现有技术, 针对春白菜游离小孢子培养方面的不足, 本发明提供了一种广适性耐抽苔春白菜游离小孢子的培养方法, 可以对各种春白菜材料进行培养, 大大缩短了春白菜亲本材料的纯化年限, 对提高春白菜新品种培育效率意义尤为重大。

[0004] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0005] 一种广适性耐抽苔春白菜游离小孢子的培养方法, 包括以下步骤:

[0006] (1) 供体植株基因型改良: 取易于进行游离小孢子培养的高代自交系材料, 与待培养小孢子的耐抽苔春白菜材料进行杂交, 得杂交种子;

[0007] 所述易于进行游离小孢子培养的高代自交系材料为夏白菜材料 94610、秋早熟材料 J3 或 06-21-1。

[0008] 所述待培养小孢子的春白菜材料为各种耐抽苔春白菜一代杂种或自交几代的春白菜材料, 进一步地, 为日本春白菜品种菊锦、韩国春白菜品种阳春、韩国春白菜品种三宝或韩国春白菜品种强势。

[0009] 上述白菜材料均为现有技术中已公开出售的材料, 均可从市场上买到, 其品种名称为所属领域技术人员公知的。

[0010] (2) 杂交种的游离小孢子培养: 将杂交种子播种于营养钵, 常规管理, 温室大棚自然春化, 第二年 3 月底至 4 月下旬, 抽苔开花期, 取花蕾按常规方法进行游离小孢子培养, 得再生植株。

[0011] 所述营养钵的规格为: 20cm×20cm。

[0012] (3) 再生植株性状调查: 将获得的再生植株诱导生根后移栽至温室, 自然越冬, 来年根据抽苔开花时期选择晚抽苔再生植株, 即为耐抽苔双单倍体植株; 自交结实后进行其它性状调查即获得纯系耐抽苔材料。

[0013] 本发明的广适性耐抽苔春白菜游离小孢子的培养方法, 有益效果如下: 由于长期以春白菜为供体植株进行游离小孢子培养成功的几率较低, 通过将不同背景的春白菜材料与易于进行游离小孢子培养的自交系材料杂交, 显著改善了春白菜游离小孢子培养的供体植株状态。即使通过常规培养基配方, 也能显著提高杂种游离小孢子培养时再生植株的产生频率, 从而在后续耐抽苔性状筛选中, 大大提高耐抽苔纯系材料的获得比例, 亦即提高耐抽苔春白菜的纯化效率, 对缩短育种年限、提高春白菜育种效率起明显促进作用。

[0014] 本发明的特点是: 采用简单的杂交方法, 将市售不同背景的春白菜与易于进行游离小孢子培养的自交系材料进行杂交, 有效改善了供体植株基因型状态, 显著拓宽了耐抽苔春白菜游离小孢子培养的供体植株选择范围, 有利于提高不同背景春白菜双单倍体材料的获得几率。经证实, 获得了极耐抽苔的双单倍体材料, 极大地提高了春白菜育种效率。

[0015] 应用前景: 利用该方法, 可以在三年内获得耐抽苔春白菜纯系材料, 与常规自交纯化相比 (一般需要 6~8 年即 6~8 代连续自交), 能显著缩短育种年限、加快育种进程、提高春白菜育种效率。

[0016] 本发明的方法首先通过改进供体植株的状态、再利用大白菜游离小孢子培养的常规方法,大大拓宽了春白菜游离小孢子培养的供体植株选择范围、简化了操作步骤,通过对再生植株耐抽苔性的调查,获得了双单倍体耐抽苔春白菜材料。本发明的方法的应用将显著扩大春白菜游离小孢子培养的基因型谱,缩短春白菜材料的纯化年限,提高春白菜育种效率。

#### 附图说明

[0017] 图 1:亲本菊锦的小孢子培养结果示意图,图中,亲本菊锦的小孢子在完成几次分裂之后停止发育并死亡。

[0018] 图 2:高频游离小孢子胚诱导材料 94610 的小孢子胚示意图,图中,培养皿中的漂浮物和悬浮物是转绿的小孢子胚(显绿色,但因按照审查指南相关规定,只能提交黑白颜色的视图,所以图中显示为灰色,特此说明)。

[0019] 图 3a:07-ZY4 在液体培养基中的胚状体示意图,图 3b:07-ZY4 转绿的胚状体移入固体培养基示意图。

[0020] 图 4:再生植株 09-552 的抽苔示意图,图中可见,09-552 的抽苔最晚,明显晚于 09-555。

[0021] 图 5a:以 09-552 配制的杂交组合春季播种收获产品时的短缩径调查图,图 5b 为对照,对照是其亲本菊锦。

#### 具体实施方式

[0022] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明。实施例中的实验方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0023] 实施例 1 不同春白菜材料与高代自交系材料杂交组合配制

[0024] 1.1 供试材料的选择与种植

[0025] 供试材料包括四个市售的春白菜品种和四份高代自交系材料,春白菜品种分别是一份日本春白菜品种菊锦和三份(韩国春白菜品种阳春、三宝、强势,高代自交系材料分别夏白菜材料 94610、秋早熟材料 J3 和 06-21-1、春白菜材料 06-101-4。

[0026] 根据耐抽苔性预测,材料和品种于 11 月下旬至 12 月中旬分 3 批育苗,来年 3 月 10 日定植于 50 目的防虫网棚中,地面覆盖地膜,3 月下旬起陆续开花,开花 1 周后人工杂交配制杂交组合。

[0027] 1.2 供试材料杂交组合配制及人工杂交

[0028] 分别配制 4 个杂交组合,07-ZY4(菊锦 × 94610)、07-ZY32(阳春 × J3)、07-ZY40-1(三宝 × 06-21-1)、07-ZY46-1(强势 × 06-101-4),春季开花期,人工挑蕾去雄,杂交授粉,套袋使种荚授粉完成后收获种子备用。

[0029] 实施例 2 不同春白菜材料、高代自交系材料以及其杂交组合的游离小孢子培养

[0030] 2.1 各种材料的种植(见实施例 1 的 1.1)

[0031] 2.2 各种培养基的准备

[0032] 小孢子提取液及小孢子洗液 B5W:B5 液体培养基加 13%蔗糖, pH5.8, 高压灭菌。

[0033] 小孢子热激处理培养液 NLN-13:NLN 液体培养基加 13%蔗糖, pH5.8, 0.22 μm 微孔

滤膜过滤除菌。

[0034] 小孢子暗培养的培养液 NLN-10 :NLN 液体培养基加 10% 蔗糖, pH5. 8, 0. 22  $\mu$  m 微孔滤膜过滤除菌。

[0035] 小孢子胚生长培养基 B5G :B5 固体培养基添加 6-BA0. 2mg/mL + NAA0. 02mg/mL + 3% 蔗糖, pH5. 8, 高压灭菌。

[0036] 再生植株生根培养基 MS0 :MS 固体培养基, 不添加任何激素, pH5. 8, 高压灭菌。

[0037] 所有培养基配方详见 [ 官春云, 李恂, 李文彬, 芸薹属植物的生物技术, 湖南科学技术出版社, 2001]。

[0038] 2. 3 小孢子的游离和培养

[0039] 在晴天上午 10 时前后取健壮花枝, 选取 2. 5-3. 5mm 的花蕾, 流水冲洗 30min, 在超净工作台上用 2% 的 NaClO 表面消毒 30min, 无菌水冲洗 5 次备用。

[0040] 加 3-5mLB5W, 用玻璃研棒挤出小孢子, 以孔径 50  $\mu$  m 的滤网过滤, 滤液转入 50mL 的离心管中, 100g 离心 2min, 弃上清, 加入 10mL 相同洗液, 再次离心, 重复 3 次, 之后加入一定体积的 NLN-13 培养液摇匀, 用血球计数板调整小孢子密度至  $0. 75-1. 5 \times 10^5$  个 /mL, 33 $^{\circ}$ C 黑暗热激处理 24h。次日, 100g 离心 2min, 弃上清, 加入等体积的 NLN-10 培养液摇匀, 分装到直径为 6cm 的玻璃培养皿, 3mL/ 皿, 每个材料或品种分装 10-15 皿, 石蜡膜封口后 25 $^{\circ}$ C 黑暗培养。待形成 2-3mm 长的子叶胚时转入 4000Lux、16h 光照 /8h 黑暗的光照条件下培养, 子叶胚转绿后, 转入 B5G 固体培养基光照培养。待幼苗长大后转入 MS0 培养基诱导生根。两周至 4 周期间统计产胚量、计算产胚率和再生植株产率。结果见表 1 所示。

[0041] 表 1 游离小孢子培养结果

[0042]

供体植株	每皿成胚数	每皿成苗数
菊锦	0	0
阳春	0	0
三宝	0	0
强势	0	0
94610	94.6	72
J3	65.3	53
06-21-1	21.9	18
06-101-4	0	0
07-ZY4	2.6	2.1
07-ZY32	2.1	0
07-ZY40-1	1.17	0
07-ZY46-1	0	0

[0043] 结果表明：

[0044] (1) 4 个春白菜品种菊锦、阳春、三宝、强势的游离小孢子培养中, 只有菊锦和强势诱导出少量多细胞团, 分别为接种小孢子总量的 4. 12% 和 0. 83%。细胞团生长极为缓慢, 在完成几次分裂之后停止发育并迅速死亡(见图 1)。阳春和三宝仅观察到极个别小孢子略微膨大, 没有发生细胞分裂；

[0045] (2) 4 个抗病毒高代自交系 94610、J3、06-21-1 和 06-101-4 的游离小孢子培养中,

前 3 种材料均获得了胚状体,平均成胚率分别为 94.6 (小孢子胚的照片如图 2 所示)、65.3 和 21.9 个 / 皿。而耐抽苔的 06-101-4 仅诱导出少量多细胞团,分别为接种小孢子总量的 3.21%,同样生长极为缓慢,在完成几次分裂之后停止发育并迅速死亡;

[0046] (3) 对 4 个转育材料 07-ZY4、07-ZY32、07-ZY40-1、07-ZY46-1 进行游离小孢子培养,前 3 种材料均获得了胚状体,平均成胚率分别为 2.6 (图 3a)、2.1 和 1.2 个 / 皿。其中 07-ZY4 最终获得 9 棵再生植株(图 3b)。07-ZY32 的胚状体停留在鱼类胚阶段不再发育,并最终死亡;07-ZY40-1 的子叶胚转入固体培养基后褐变死亡,二者均未获得再生植株。07-ZY46-1 仅诱导出少量多细胞团,占接种小孢子总量的 1.13%,生长极为缓慢,在完成几次分裂之后停止发育并迅速死亡,最终没能获得再生植株。

[0047] 总之,4 个春白菜品种均没能获得胚状体,4 个转育材料有 3 个获得了胚状体,另 1 个春白菜材料没能获得胚状体,与公开报道的趋势一致。对比 4 个转育材料的 2 个亲本不难发现,能诱导出胚状体的 07-ZY4、07-ZY32 和 07-ZY40-1 的双亲中至少有 1 个亲本是能够诱导出胚状体的材料,亲本之一胚状体发生频率越高(如 94610),其与春白菜组合的胚状体发生频率也相对较高(如 07-ZY4);而未诱导出胚状体的 07-ZY40-1 的双亲都是未诱导出胚状体的耐抽苔春材料。可见,将易于进行游离小孢子培养的材料与难以成功的材料进行杂交,再对杂交后代进行游离小孢子培养,显著提高了杂种游离小孢子培养的成功几率,增加了培养结果的可预见性,在所得再生植株中可望鉴定出耐抽苔性的双单倍体株系。

[0048] 实施例 3 07-ZY4 游离小孢子培养的再生植株耐抽苔性鉴定

[0049] 3.1 再生植株驯化、移栽与自交结实

[0050] 再生植株生根后,洗净根部的培养基转入蛭石:草炭=1:1 的基质中保湿 3-5 天进行驯化,驯化完成后移栽入防虫网中正常管理,11 月末移入日光温室,待开花后选花粉正常单株挑蕾自交授粉,能正常收获种子的植株即为 DH 再生植株。07-ZY4 的 9 棵再生植株中有 7 株收获了自交种子,即 7 个双单倍体株系(编号从 09-552 至 09-558)。

[0051] 3.2 再生植株耐抽苔性鉴定

[0052] 秋季,将双单倍体株系以及对照母本菊锦、父本 94610、春白菜对照阳春,播种于防虫网内。11 月末,各株系选 5 个结球良好的母株定植在日光温室中,以初见花蕾期和开花期为主要依据,确定再生植株自交后代的耐抽苔能力。调查结果见表 2。结果表明:2009 年 12 月 13 日 09-555 最早出现花蕾,之后其他材料和品种陆续出现蕾,09-552 最晚,直到 2010 年 3 月 22 日才出现花蕾。2010 年 1 月 24 日 09-555 最早开花,之后其他材料陆续开花,同样地,09-552 开花最晚(开花示意图见图 4),直到 2010 年 4 月 8 日才开花。对照春白菜品种菊锦和阳春的开花时间分别为 2010 年 4 月 6 日和 3 月 29 日。由此可见,09-552 的耐抽苔能力超过阳春,与其耐抽苔亲本菊锦相当。

[0053] 这表明通过杂交、培养、鉴定三步骤,三年即可获得耐抽苔春白菜纯系材料,而一般自交纯化需要 6~8 年,由此可见,采用次策略显著缩短了材料的纯化年限。

[0054] 表 2 单倍体起源再生植株的耐抽苔性

[0055]

材料或品种	见蕾期	开花期	耐抽苔分级
09-552	2010-3-22	2010-4-8	1
09-553	2010-2-23	2010-3-15	2
09-554	2010-1-27	2010-3-3	3
09-555	2009-12-13	2010-1-24	5
09-556	2010-1-29	2010-3-2	3
09-557	2010-1-11	2010-2-2	5
09-558	2010-1-21	2010-2-16	4
菊锦(Jujin)	2010-3-18	2010-4-6	1
阳春(Yangchun)	2010-3-9	2010-3-29	2

[0056]

[0057] 注：1、2、3、4、5 级分别对应耐抽苔、较耐抽苔、不耐抽苔、较易抽苔和易抽苔

[0058] 实施例 4 以 09-552 配制的春白菜组合耐抽苔性鉴定

[0059] 在鉴定其耐抽苔性的当年，以耐抽苔性较强的 09-552 为母本，以抗病毒自交系 94610 为父本，配制杂交组合，人工挑蕾自交，收获 F1 代种子。

[0060] 来年春季播种 F1，以父、母本为对照，收获产品时通过比较短缩径的长短鉴定 F1 的耐抽苔性。结果表明：所获得的 F1 代短缩径较短，比母本菊锦还要略短（见图 5），属于极耐抽苔类型。鉴定为纯系的耐抽苔材料。如果当年就配制杂交组合，杂交组合再经过一年的耐抽苔性和其它性状调查，即可获得 F1 代的春白菜品种用于其它生产试验。由此可见，通过游离小孢子培养，显著提高了春白菜育种效率。



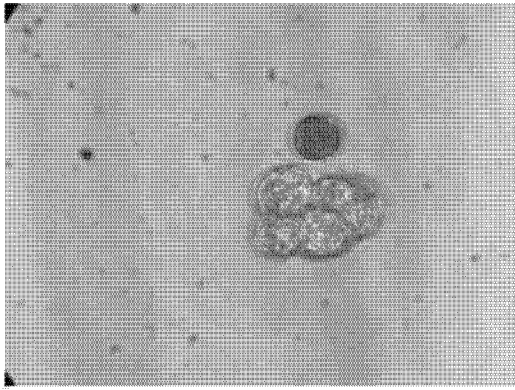


图 1

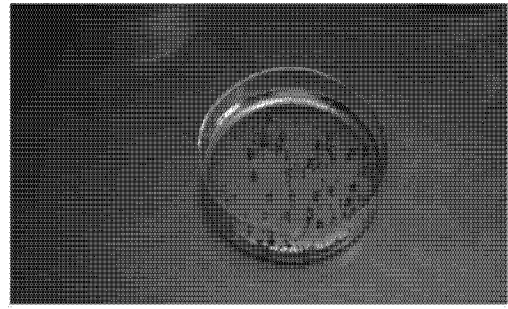


图 2

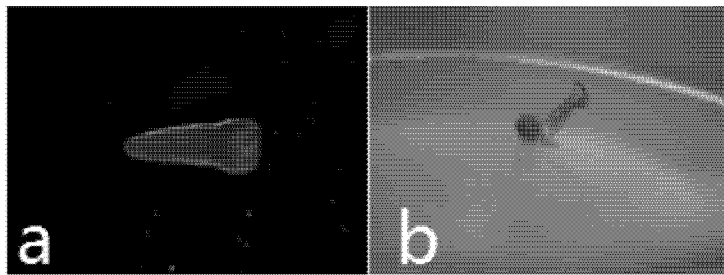


图 3

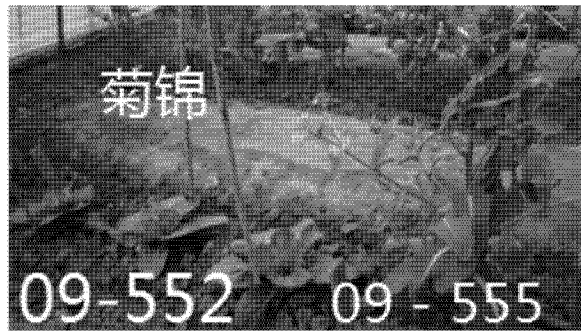


图 4

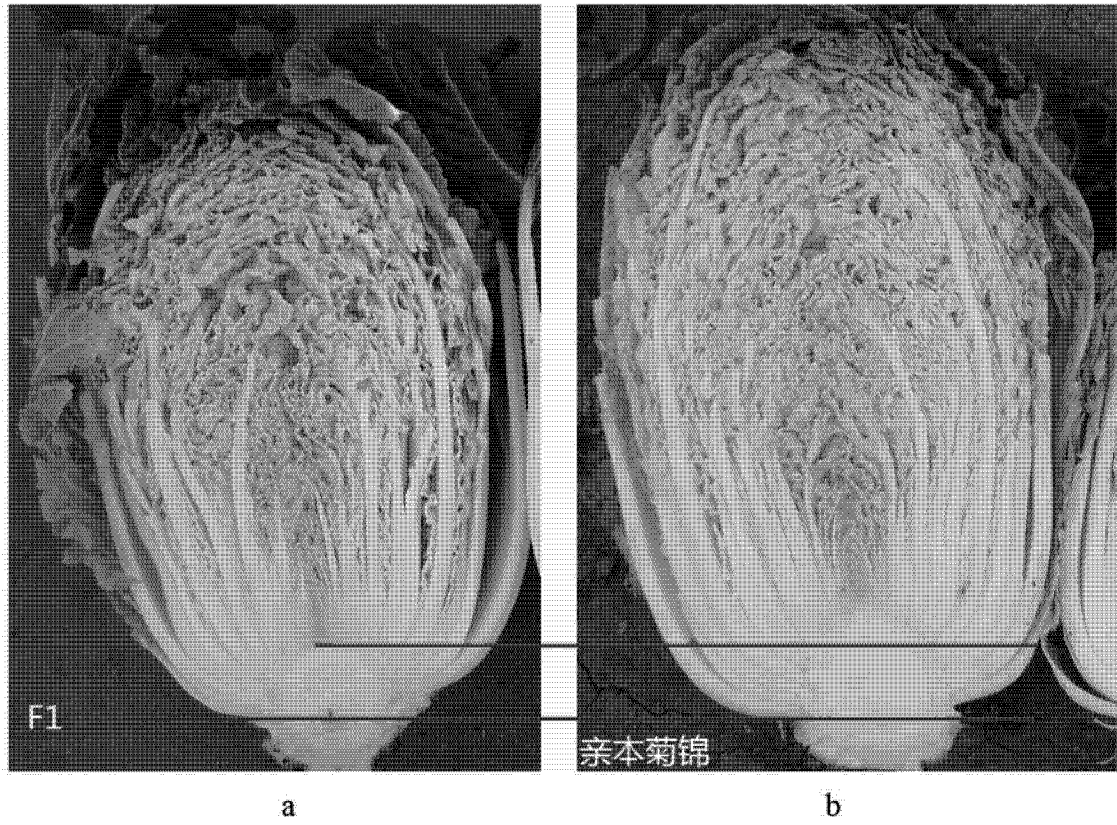


图 5