浙 江 农 林 大 学 学 报，2014，**31**(2)：315 - 321
Journal of Zhejiang A & F University
doi:10.11833/j.issn.2095-0756.2014.02.023

叶用芥菜小孢子离体培养条件

吴慧敏[1]，何 勇[1]，邵泱峰[2]，朱祝军[1]，符庆功[1]

（1. 浙江农林大学 浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室，浙江 临安 311300; 2. 浙江省临安市农业技术推广中心，浙江 临安 311300）

摘要：以 5 个叶用芥菜 *Brassica juncea* var. *foliosa* 品种为试材，研究了游离小孢子培养过程中基因型、低温预处理、高温热激、更新及加液和秋水仙碱等对小孢子胚状体发生的影响。结果表明：有 4 个品种获得胚状体，各品种间胚状体产量存在显著差异，‘特选九心芥’胚产量最高；4 ℃低温预处理 24~48 h 及 33~34 ℃高温热激处理 24~48 h 对诱导胚状体发生和发育有促进作用；更新和添加培养基处理也可促进胚状体发生，以质量浓度为 170.0 g·L^{-1} 的蔗糖起始培养 48 h 后添加等质量浓度 90.0 g·L^{-1} 蔗糖培养基处理效果最佳；1~10 mg·L^{-1} 秋水仙碱 24~48 h 处理可提高小孢子培养反应，增加供试材料胚产量。图 1 表 5 参 19

关键词：园艺学；叶用芥菜；小孢子培养；胚状体；热激；秋水仙碱

中图分类号：S637.2　　　**文献标志码**：A　　　**文章编号**：2095-0756(2014)02-0315-07

In vitro microspore culture of leaf mustard

WU Huimin[1], HE Yong[1], SHAO Yangfeng[2], ZHU Zhujun[1], FU Qinggong[1]

(1. The Key of Laboratory for Quality Improvement of Agricultural Products of Zhejiang Province, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Agricultural Technology Promotion Center of Lin'an City, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: In order to improve the isolated microspore culture system in *Brassica juncea* var. *foliosa*, five different genotypes of *Brassica juncea* var. *foliosa* were used to investigate the contribution of genotype, cool-pretreatment, heat shock, medium replacement and addition, as well as concentration of colchicine on microspore embryogenesis in vitro. Results showed that embryoids were obtained from four genotypes, and significant differences ($P<0.05$, Duncan's MRT) were observed for embryo yield with the highest yield being 'Texuan-jiuxin'. For all cultivars, 24–48 h of cool-pretreatment at 4 ℃ and heat shock at 33–34 ℃ improved embryo yields. Also, medium addition and replacement enhanced microspore embryogenesis with the best treatment using a constant volume for a 90.0 g·L^{-1} sucrose medium supplemented to a 170.0 g·L^{-1} sucrose concentration medium after 48 h. In addition, treating the freshly isolated microspore with 1–10 mg·L^{-1} colchicine for 24–48 h greatly improved ($P<0.05$, Duncan's MRT)embryo yields of the four cultivars. The present results could be used to obtain haploid efficiently for the plant breeding and basic research in *Brassica juncea* var. *foliosa*. [Ch, 1 fig. 5 tab. 19 ref.]

Key words: horticulture; leaf mustard; microspore culture; embryoid; heat shock; colchicine

叶用芥菜 *Brassica juncea* var. *foliosa* 为十字花科 Brassicaceae 芸薹属 *Brassica* 1~2 年生草本植物，其营养丰富，鲜食、加工均宜，深受广大人民群众喜爱，是中国栽培最为普遍的芥菜类蔬菜。目前，生产

收稿日期：2013-03-21；修回日期：2013-06-18

基金项目：浙江省教育厅资助项目(2273000001)

作者简介：吴慧敏，实验师，从事园艺作物遗传育种研究。E-mail：hminw@163.com。通信作者：符庆功，讲师，从事蔬菜种质资源与遗传育种方向研究。E-mail：fuqinggong@163.com

上叶用芥菜仍以常规品种为主[1]，传统育种获得纯系及性状稳定后代需要多代自交和后代性状选择，所需年限较长[2]。利用游离小孢子培养技术获得纯合系，从而缩短杂交育种年限，提高选择效力，加快优良性状转移是当前叶用芥菜育种的重要技术方法和理想途径，目前已在甘蓝型油菜 *Brassica napus*，白菜 *Brassica campestris* ssp. *chinensis*，青花菜 *Brassica oleracea* var. *italica*，甘蓝 *Brassica oleracea* 等芸薹属蔬菜作物育种中得到广泛应用[3-7]。与芸薹属其他蔬菜相比，芥菜种 *Brassica juncea* 蔬菜游离小孢子培养建立困难，相关研究报道不多。目前，在叶用芥菜小孢子离体培养技术体系方面，也仅在金丝芥 *Brassica juncea* var. *multisecta*，雪里蕻 *Brassica juncea* var. *multiceps*，结球芥 *Brassica juncea* var. *capitata*、独山大叶青 *Brassica juncea* var. *rugosa* 等部分品种上有少量研究报道[8-13]。小孢子诱导分化困难、成胚率低，仍然是当前叶用芥菜游离小孢子培养技术体系建立的主要问题。本试验以 5 个不同叶用芥菜品种为材料，研究了不同遗传背景、低温预处理、高温热击、培养基更新及加液、秋水仙碱处理对小孢子胚状体发生及发育的影响，以期为叶用芥菜小孢子培养技术的有效利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

以‘四季客家芥’‘上海金丝芥’‘温州芥菜’‘特选九心芥’‘花叶香芥菜’等 5 个叶用芥菜品种为试验材料。2010 年和 2011 年秋季播种，塑料大棚内越冬后于第 2 年春季 3–4 月花期进行小孢子培养。

1.2 花蕾的选择和表面灭菌

临近开花时，选取长度 10 cm 左右的主花序或顶部一级分枝花序于 4 ℃保湿放置 1~3 d，醋酸洋红染色后镜检观测小孢子发育时期，选取单核晚期小孢子所占比例较大的花蕾(直径 2~3 mm)，先用体积分数为 75%的乙醇浸泡 30 s，再用体积分数为 0.1%的氯化汞($HgCl_2$)处理 10 min，无菌水冲洗 5 次。

1.3 小孢子分离及培养

以质量分数为 13%的蔗糖 B_5 液体培养基(含 B_5 大量元素、微量元素、铁盐和有机成分，pH 5.8，高温灭菌)为小孢子收集培养基；以不同蔗糖质量浓度 NLN 培养基为小孢子培养液(含 NLN 大量元素、微量元素、铁盐和有机成分，蔗糖质量浓度为 90.0~170.0 g·L^{-1}，pH 5.8，过滤灭菌)。表面灭菌后的花蕾放入无菌试管中·皿$^{-1}$ (加约 3 mL B_5 培养基)，用无菌玻璃棒挤压花蕾散出小孢子，经 38 μm 滤网过滤，收集滤液至 10 mL 离心管，600 r·min^{-1} 离心 3 min，弃上清，加入 B_5 培养基重新悬浮小孢子，离心重复 3 次。最后加入小孢子培养液，用血球计数器调整小孢子浓度为 $1×10^8$ 个·L^{-1}，分装至 60 mm × 15 mm 培养皿，3 mL·皿$^{-1}$，Parafilm 膜封口，33 ℃高温热激处理 24 h 后，转入 25 ℃静置暗培养，待肉眼可见白色胚状体后，转至 50 r·min^{-1} 的摇床震荡培养。

接种 30 d 后统计胚状体数量及子叶胚比例(将胚状体分为子叶形胚和其他类型 2 种)，用 Duncan’s 新复极差法进行显著差异性分析。

1.4 小孢子发育细胞学与形态观察

小孢子培养期间，用 Nikon 倒置显微镜(TS100-F)观察小孢子细胞发育及形态变化，并拍照记录。

1.5 胚状体分化及植株再生

将子叶胚在光下培养转绿后接种于 B_5+0.5 mg·L^{-1}6-卞基氨基嘌呤(6-BA)+0.1 mg·L^{-1} 萘乙酸(NAA)胚分化培养基上，萌发出芽后再转入 B_5+0.2 mg·L^{-1}NAA 生根培养基上，生根形成完整植株；分化及生根培养基蔗糖质量浓度均为 30.0 g·L^{-1}，琼脂 7.0 g·L^{-1}，pH 5.8，高温灭菌。

1.6 影响小孢子胚胎发生的单因素试验

1.6.1 *低温预处理的影响* 供试材料花序保湿条件下，4 ℃低温预处理 24，48，72 h 后分别进行小孢子游离培养，以不进行低温预处理为对照。

1.6.2 *高温热激处理的影响* 供试材料分离出的游离小孢子在 33，34，35 ℃静置暗培养条件下分别进行24，48，72 h 热激处理，然后转到 25 ℃继续培养，以 25 ℃恒温培养作对照。

1.6.3 *更新及添加培养基的影响* 刚分离的小孢子在不同蔗糖质量浓度 NLN 培养基中 33 ℃热激培养 48 h 后，经过更换或添加等量培养基等不同处理后转到 25 ℃继续培养，以 NLN-13 培养基持续培养为对照。其中 NLN-9，NLN-13，NLN-17 培养基均以 NLN 培养基为基本培养基，蔗糖质量浓度分别为 90.0

g·L⁻¹，130.0 g·L⁻¹ 和 170.0 g·L⁻¹。

1.6.4　秋水仙碱的影响　将质量浓度分别为 1.0，10.0，50.0，100.0 mg·L⁻¹ 的秋水仙碱添加至 NLN-13 小孢子培养基中，悬浮刚分离纯化的小孢子培养 24~48 h 后，转入不含秋水仙碱的 NLN-13 培养基中继续培养，以不含秋水仙碱培养基培养作对照。

以上各因素试验每个处理培养 30 个花蕾的小孢子，重复 3 次，30 d 后观察胚状体发生情况，统计胚状体总数及子叶胚数量。

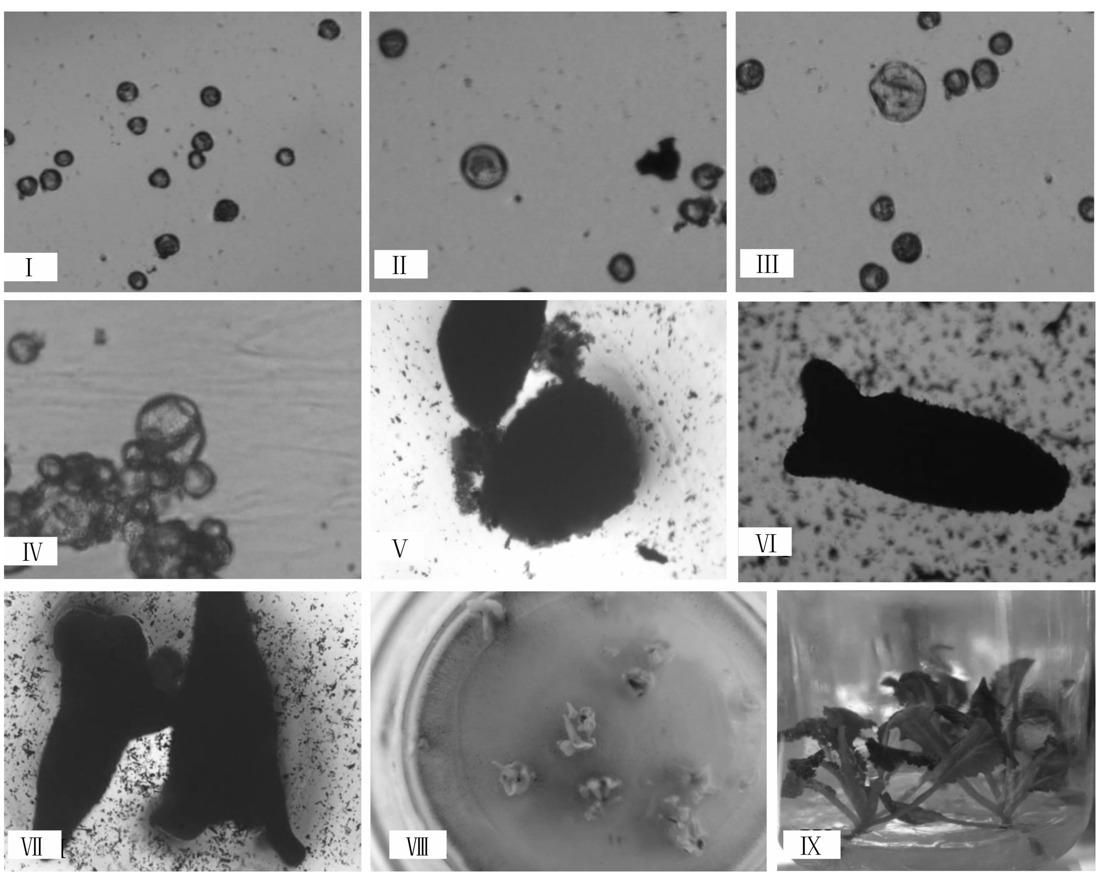
2　结果与分析

2.1　叶用芥菜小孢子胚胎发生及植株再生

小孢子培养过程中，细胞学观察发现，刚游离的小孢子(图 1-Ⅰ)经高温热激处理后部分小孢子先是体积膨大(图 1-Ⅱ)，之后少数膨大小孢子发生 1 次细胞分裂(图 1-Ⅲ)，后经多次细胞分裂(图 1-Ⅳ)，继续发育形成球形胚，心型胚(图 1-Ⅴ)和鱼雷型胚(图 1-Ⅵ)等，将光照条件下培养转绿的子叶型胚(图 1-Ⅶ,1-Ⅷ)转入固体培养基进行胚萌发、分化、生根后获得再生植株(图 1-Ⅸ)。

2.2　基因型对小孢子胚状体诱导的影响

由表 1 可知：供试品种游离小孢子经 33 ℃高温处理 24 h，有‘上海金丝芥’‘特选九心芥’‘花叶香芥菜’3 个品种产生胚状体。不同基因型材料间胚状体产量差异显著，同时还发现产胚数量多的材料，子叶胚所占比例也相应较高。‘特选九心芥’出胚总数最多，平均产胚 2.20 个·蕾⁻¹，子叶胚比例也高达 50.0%；‘花叶香芥菜’获得胚状体数量最少，平均产胚 0.22 个·蕾⁻¹，子叶胚比例仅为 34.7%；而‘四季客家芥’‘温州芥菜’未能诱导出胚，经 33 ℃热激培养 4 h 后，显微镜下观察到上述两品种有少量小孢子膨大现象，但之后未见有进一步的细胞分裂。



Ⅰ：刚分离的小孢子；Ⅱ：开始膨大的小孢子；Ⅲ：小孢子的第 1 次分裂；Ⅳ：小孢子多细胞团；Ⅴ：心型胚；Ⅵ 鱼雷型胚；Ⅶ：子叶型胚；Ⅷ：子叶型胚；Ⅸ：再生苗。

图 1　叶用芥菜小孢子离体培养过程中胚的发育及植株再生过程

Figure 1　Development of embryos and plant regeneration during microspores culture in *Brassica juncea* var. *foliosa*

表 1 不同基因型叶用芥菜小孢子胚胎发生的差异

Table 1 Differences of microspore embryogenesis in different genotypes of *Brassica juncea* var. *foliosa*

品种	接种蕾数/个	接种皿数	出胚数/(个·蕾$^{-1}$)	子叶胚比例/%
‘四季客家芥’	30	10	0.00 d	0
‘上海金丝芥’	30	9	0.54 b	40.6
‘温州芥菜’	30	9	0.00 d	0
‘特选九心芥’	30	8	2.20 a	50.0
‘花叶香芥菜’	30	9	0.22 c	34.7

说明：Duncan’s 新复极差测验，不同小写字母为差异表达水平($P<0.05$)。

2.3 低温预处理对胚状体诱导的影响

从表 2 可以看出：低温处理 24~48 h 条件下供试材料产胚数量较高。‘上海金丝芥’最佳低温预处理时间为 48 h，平均出胚 0.88 个·蕾$^{-1}$，为对照的 1.5 倍；‘特选九心芥’经 24~48 h 低温预处理胚状体发生能力明显提高，但随着时间延长至 72 h，出胚数由 2.57 个·蕾$^{-1}$ 减少至 1.59 个·蕾$^{-1}$，产胚能力明显下降；与对照相比，‘花叶香芥菜’低温预处理胚状体数量差异不明显。

表 2 低温预处理对叶用芥菜小孢子胚胎发生的影响

Table 2 Effect of low temperature pretreatment on microspore embryogenesis of *Brassica juncea* var. *foliosa*

t/h	出胚数/(个·蕾$^{-1}$)					子叶胚比例/%				
	‘四季客家芥’	‘上海金丝芥’	‘温州芥菜’	‘特选九心芥’	‘花叶香芥菜’	‘四季客家芥’	‘上海金丝芥’	‘温州芥菜’	‘特选九心芥’	‘花叶香芥菜’
0	0	0.56 b	0	2.12 b	0.22 a	0	39.7	0	49.6	35.4
24	0	0.80 a	0	2.57 a	0.28 a	0	42.9	0	52.4	37.4
48	0	0.88 a	0	2.46 a	0.24 a	0	45.7	0	52.1	33.6
72	0	0.75 a	0	1.59 c	0.18 a	0	39.4	0	48.8	30.6

说明：Duncan’s 新复极差测验，不同小写字母为差异表达水平($P<0.05$)。

2.4 高温热激处理对胚状体诱导的影响

由表 3 可知：不同热激处理温度和时间，供试材料小孢子产胚量差异显著。33~34 ℃高温热激处理能显著提高大部分材料胚状体发生频率，35 ℃处理的胚状体的发生数量则明显减少。此外，高温热激处理时间亦对小孢子产胚量有一定影响，33~34 ℃条件下处理 24~48 h 小孢子胚状体诱导率较高；‘特选九心芥’在 33 ℃热激处理 48 h 条件下出胚量最高，平均产胚 2.71 个·蕾$^{-1}$，随着热激处理时间延长至 72 h，产胚量明显下降；‘上海金丝芥’则以 34 ℃处理 24 h 最佳，‘花叶香芥菜’以 34 ℃处理 48 h 效果最佳。对照处理 5 个基因型材料则均未诱导出胚状体。

表 3 高温处理对叶用芥菜小孢子胚胎发生的影响

Table 3 Effect of high temperature on microspore embryogenesis of *Brassica juncea* var. *foliosa*

T/℃	t/h	出胚数/(个·蕾$^{-1}$)					子叶胚比例/%				
		‘四季客家芥’	‘上海金丝芥’	‘温州芥菜’	‘特选九心芥’	‘花叶香芥菜’	‘四季客家芥’	‘上海金丝芥’	‘温州芥菜’	‘特选九心芥’	‘花叶香芥菜’
25	–		0.00 e	0.00	0.00 f	0.00 d	0	0	0	0	0
33	24	0.00	0.79 b	0.00	2.42 b	0.28 bc	0	40.7	0	50.0	35.6
	48	0.00	0.82 b	0.00	2.71 a	0.34 b	0	42.0	0	53.7	38.3
	72	0.00	0.42 cd	0.00	0.71 e	0.00 d	0	32.7	0	41.0	0
34	24	0.00	1.11 a	0.00	2.36 b	0.37 b	0	45.3	0	47.7	36.7
	48	0.00	1.01 a	0.00	1.54 c	0.70 a	0	48.3	0	46.3	41.7
	72	0.00	0.29 d	0.00	0.03 f	0.21 c	0	39.7	0	0	34.3
35	24	0.00	0.74 b	0.00	0.97 d	0.00 d	0	39.3	0	42.7	0
	48	0.00	0.46 c	0.00	0.57 e	0.00 d	0	31.0	0	43.0	0
	72	0.00	0.00 e	0.00	0.00 f	0.00 d	0	0	0	0	0

说明：Duncan’s 新复极差测验，不同小写字母为差异表达水平($P<0.05$)。

2.5 更新及添加培养基对胚状体诱导的影响

从表 4 可以看出：在 6 个处理中，质量浓度为 17%的蔗糖起始培养后添加等量的 90.0 g·L^{-1} 蔗糖培养基培养效果最好。该处理能显著提高‘上海金丝芥’‘特选九心芥’‘花叶香芥菜’胚状体发生频率；170.0 g·L^{-1} 蔗糖培养基培养 48 h，重新离心更换 130.0 g·L^{-1} 蔗糖培养基亦能显著提高‘上海金丝芥’‘花叶香芥菜’产胚能力；而 170.0 g·L^{-1} 蔗糖持续培养则严重抑制小孢子胚状体发育，所有供试材料均无法获得胚状体。130.0 g·L^{-1} 蔗糖起始培养后更新或加液等处理对小孢子胚状体诱导的影响则因材料不同而效果不尽相同。

表 4　更新及加液对叶用芥菜小孢子胚胎发生的影响

Table 4　Effect of adding and replacing medium on microspore embryogenesis of *Brassica juncea* var. *foliosa*

起始培养基	更换培养基	添加培养基	出胚数/(个·蕾$^{-1}$)					子叶胚比例/%				
			‘四季客家芥’	‘上海金丝芥’	‘温州芥菜	‘特选九心芥’	‘花叶香芥菜’	‘四季客家芥’	‘上海金丝芥’	‘温州芥菜’	‘特选九心芥’	‘花叶香芥菜’
NLN-13	–	–		0.81 b	0.00	2.69 b	0.29 d	0	38.3	0	49.2	35.8
NLN-13	–	NLN-13	0.00	0.92 b	0.00	2.72 b	0.54 c	0	41.5	0	50.1	40.4
NLN-13	NLN-13	–	0.00	0.93 b	0.00	2.46 c	0.49 c	0	39.9	0	49.3	38.5
NLN-17	–	–	0.00	0.00 c	0.00	0.00 d	0.00 e	0	0.00	0	0.00	0.00
NLN-17	–	NLN-9	0.00	1.21 a	0.00	2.96 a	0.94 a	0	43.9	0	51.5	42.5
NLN-17	NLN-13	–	0.00	1.17 a	0.00	2.74 bc	0.71 b	0	44.7	0	50.3	42.0

说明：Duncan’s 新复极差测验，不同小写字母为差异表达水平($P<0.05$)。

2.6 秋水仙碱对胚状体诱导的影响

由表 5 结果可以看出：适宜的秋水仙碱质量浓度及其时间处理能够有效促进小孢子胚胎发生。试验中，1.0~10.0 mg·L^{-1} 低质量浓度秋水仙碱处理能显著提高大部分材料产胚量，随着质量浓度提高，100.0 mg·L^{-1} 秋水仙碱处理则明显抑制胚状体的产生。1.0 mg·L^{-1} 秋水仙碱处理 24~48 h，能显著提高‘特选九心芥’出胚量，最高达 3.16 个·蕾$^{-1}$；10.0 mg·L^{-1} 秋水仙碱处理 24~48 h，则显著提高‘花叶香芥菜’胚产量；10.0 mg·L^{-1} 秋水仙碱处理 48 h 比 24 h 不仅显著增加胚产量，子叶胚比例亦提高 5.7%。‘上海金丝芥’最佳处理条件为 50.0 mg·L^{-1} 处理 24 h，出胚量最高达 1.68 个·蕾$^{-1}$，处理时间延长为 48 h，出胚量则迅速降低仅为 0.99 个·蕾$^{-1}$。可见较低质量浓度秋水仙碱及适宜时间组合有助于促进胚状体产生，高质量浓度秋水仙碱及长时间处理则会造成毒害。

表 5　秋水仙碱处理对叶用芥菜小孢子胚胎发生的影响

Table 5　Effect of colchicine treatment on microspore embryogenesis of *Brassica juncea* var. *foliosa*

ρ/(mg·L^{-1})	t/h	出胚数/(个·蕾$^{-1}$)					子叶胚比例/%				
		‘四季客家芥’	‘上海金丝芥’	‘温州芥菜’	‘特选九心芥’	‘花叶香芥菜’	‘四季客家芥’	‘上海金丝芥’	‘温州芥菜’	‘特选九心芥’	‘花叶香芥菜’
0.0	24	0.00	0.78 d	0.00 e	2.40 b	0.26 e	0.0	41.3	0.0	50.5	36.6
	48	0.00	0.79 d	0.00 e	2.48 b	0.41 d	0.0	40.7	0.0	52.2	43.5
1.0	24	0.00	0.81 d	0.00 e	3.03 a	0.41 d	0.0	43.7	0.0	54.2	43.3
	48	0.00	0.89 cd	0.17 d	3.16 a	0.63 c	0.0	43.9	38.7	50.7	45.5
10.0	24	0.00	1.12 b	0.44 b	2.52 b	1.02 a	0.0	44.7	39.5	46.8	47.8
	48	0.00	1.60 a	0.73 a	1.62 c	0.93 b	0.0	46.4	45.2	45.0	46.3
50.0	24	0.00	1.68 a	0.31 c	0.38 d	0.36 d	0.0	42.9	38.8	43.2	43.3
	48	0.00	0.99 c	0.00 e	0.00 e	0.18 e	0.0	39.2	0.0	0.0	39.5
100.0	24	0.00	0.38 e	0.00 e	0.00 e	0.00 f	0.0	37.8	0.0	0.0	0.0
	48	0.00	0.00 f	0.00 e	0.00 e	0.00 f	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

说明：Duncan’s 新复极差测验，不同小写字母为差异表达水平($P<0.05$)。

3 讨论

材料的遗传背景对小孢子胚状体发生有较大影响，相同条件下，不同基因型材料小孢子培养效果存在显著差异。刘冬等[8]利用 7 种基因型芥菜进行小孢子培养试验，6 种基因型获得了小孢子胚，3 种基因型得到了再生植株；本试验以 5 个叶用芥菜品种为材料，最终有 4 个基因型材料成功诱导胚状体，胚产量最高为 3.16 个·蕾$^{-1}$，而有的材料未能出胚或产量较低，供试基因型之间小孢子胚状体发生能力差异很大，这与前人结论一致。

适宜的温度和时间处理可以改善小孢子代谢，利于小孢子适应离体后培养环境，促进其正常生长。王亦菲等[14]研究表明：4 ℃低温预处理油菜 1~2 d 有利于提高胚胎发生。但耿建峰等[7]报道接种前低温预处理花蕾对白菜小孢子胚诱导率影响差异不大，超过 5 d 反而下降。本试验中不同基因型叶用芥菜对低温预处理反应不同，有些品种低温预处理 24~48 h 能显著提高胚状体的产量，有些则与对照无明显差异，因而，实践应用中应根据具体材料做相应探索与研究。

高温热激对于启动小孢子分裂和改变小孢子定向发育具有重要作用，广泛应用于芸薹属作物花药培养和游离小孢子培养。刘冬等[8]报道对芥菜小孢子采用 25，30，33，35 ℃热激处理 3 d，只有 33 ℃处理出胚。本试验表明 33~34 ℃高温热激处理叶用芥菜小孢子 24~48 h 对胚状体诱导效果较好，72 h 培养明显降低胚状体的发生频率。

蔗糖是小孢子培养过程中主要碳源和渗透压调节剂，糖质量浓度对维持小孢子活力及胚状体的发生有重要影响。采用更新或加液培养能显著提高胚产量，在芸薹属其他作物游离小孢子培养中已有报道[15-17]。本试验采用质量浓度为170.0 g·L^{-1} 的蔗糖培养基培养 48 h 后添加等量的 90.0 g·L^{-1} 蔗糖培养基，使终质量浓度为 130.0 g·L^{-1}，显著提高了叶用芥菜小孢子产胚数量。试验中，添加培养基处理胚状体诱导率显著好于培养基更新处理，可能与低质量浓度蔗糖培养基等量添加既可以补充营养物质、降低培养液中不利代谢产物浓度，又可以避免培养基更新时重新离心对小孢子造成的伤害有关。

秋水仙碱直接处理游离小孢子提高出胚率及成苗率，在油菜等小孢子培养中有较多应用[17-19]，但秋水仙碱对叶用芥菜的影响，目前，还未见报道。本试验结果表明：较低质量浓度秋水仙碱处理可以显著提高 4 个品种胚状体产量；对于难出胚品种‘温州芥菜’，适宜质量浓度的秋水仙碱处理后明显促进胚状体发生。

本试验在比较遗传背景、低温预处理、高温热击等因素对叶用芥菜小孢子胚状体发生影响的基础上，进一步研究了培养液更新及添加、秋水仙碱处理条件下叶用芥菜小孢子胚状体出胚及发育的影响，初步建立了部分叶用芥菜品种的游离小孢子培养体系。但由于影响小孢子胚状体诱导分化的因素极为复杂，目前，叶用芥菜小孢子培养技术体系相关探索与研究也比较少，相比芸薹属其他种蔬菜，现有研究小孢子胚状体诱导率仍然偏低。因此，育种实践中，结合不同育种材料，进一步深入研究、完善叶用芥菜小孢子培养技术，建立稳定、高效的小孢子再生植株获得体系，才能有效加强小孢子培养技术与传统育种技术的结合，提高叶用芥菜的育种效率。

参考文献：

[1] 邹瑞昌，万正杰，徐跃进，等. 新型叶用芥菜细胞质雄性不育系 0912A 的花药发育特征[J]. 华中农业大学学报，2012，**31**(1)：44 – 49.
ZOU Ruichang, WAN Zhengjie, XU Yuejin, *et al*. Anther development of 0912A as a novel cytoplasmic male sterile line of leaf mustard [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 2012，**31**(1)：44 – 49.

[2] 杨培新，郑钢勇，谢桂勉，等. 小孢子培养技术的芥菜育种应用研究进展[J]. 海南师范大学学报: 自然科学版, 2011, **24**(1): 77 – 80.
YANG Peixin, ZHENG Gangyong, XIE Guimian, *et al*. Research progress of microspore culture in mustard (*Brassica juncea*) breeding[*J*]. *J Hainan Norm Univ Nat Sci*, 2011, **24**(1)：77 – 80.

[3] ROBERT L. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*[J]. *Z Pflanzenphysiol*, 1982, **105**: 427 – 434.

[4] SATO T, NISHIO T, HIRAI M. Plant regeneration from isolated microspore cultures of Chinese cabbage (*Brassica campestris* spp. *pekinenisis*) [J]. *Plant Cell Rep*, 1989, **8**：486 – 488.

[5] 张德双, 曹鸣庆, 秦智伟. 绿菜花双核期小孢子比例对游离小孢子培养的影响[J]. 园艺学报, 1998, **25**(2): 201 – 202.
ZHANG Deshuang, CAO Mingqing, QIN Zhiwei. Effect of binucleate pollen ratio on embryogenesis in isolated microspore culture of broccoli [J]. *Acta Hortic Sin*, 1998, **25**(2): 201 – 202.

[6] 方淑桂, 陈文辉, 曾小玲, 等. 结球甘蓝游离小孢子培养及植株再生[J]. 园艺学报, 2006, **31**(1): 158 – 160.
FANG Shugui, CHEN Wenhui, ZENG Xiaoling, *et al*. Isolated-microspore culture and plantlet regeneration in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.)[J]. *Acta Hortic Sin*, 2006, **31**(1): 158 – 160.

[7] 耿建峰, 候喜林, 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)：111 – 116.
GENG Jianfeng, HOU Xilin, ZHANG Xiaowei, *et al*. Isolated microspore culture in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* [J]. *Acta Hortic Sin*, 2007, **34**(1)： 111 – 116.

[8] 刘冬, 郭平仲, 刘凡, 等. 芥菜(*Brassica juncea* L.)小孢子胚发生和植株再生[J]. 首都师范大学学报：自然科学版, 1997, **18**(1): 76 – 80.
LIU Dong, GUO Pingzhong, LIU Fan, *et al*. Embryogenesis and plant regeneration via isolated microspore culture in *Brassica juncea* L.[J]. *J Capkal Norm Univ Nat Sci Ed*, 1997, **18**(1): 76 – 80.

[9] 陈玉萍, 田志宏, 陈爱武, 等. 包心芥菜游离小孢子培养的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 1998, **17**(1): 93 – 95.
CHEN Yuping, TIAN Zhihong, CHEN Aiwu, *et al*. Studies on microspore culture of *Brassica juncer* var. *czerniak*[J]. *J Huazhong Agric Univ*, 1998, **17**(1): 93 – 95.

[10] 虞慧芳, 钟新民, 顾宏辉, 等. 航天搭载雪里蕻小孢子培养获得再生植株[J]. 浙江农业学报, 2007, **19**(5): 356 – 359.
YU Huifang, ZHONG Xinmin, GU Honghui, *et al*. Obtaining microspore-cultured plants in potherb mustard, *Brassica juncea* var. *multiceps*, by space-breeding satellite[J]. *Acta Agric Zhejiang*, 2007, **19**(5): 356 – 359.

[11] ALI M M, KHALEQUE MIAN M A, CUSTERS J B M, *et al*. Microspore culture and the performance of microspore derived doubled haploid in *Brassica juncea* (L.) [J]. *Bangladesh J Agric Res*， 2008, **33**(3): 571 – 578.

[12] 吴康云, 陶莲, 李正丽, 等. 叶用芥菜游离小孢子的培养及其植株再生[J]. 贵州农业科学, 2011, **39**(8): 9 – 10.
WU Kangyun, TAO Lian, LI Zhengli, *et al*. Microspore culture and plantlet regeneration in leaf mustard (*Brassica juncea*)[J]. *Guizhou Agric Sci*, 2011, **39**(8): 9 – 10.

[13] 王长龙, 杨培新, 郑奕雄. 结球芥菜游离小孢子培养的胚状体发生[J]. 江西农业学报, 2011, **23**(11): 31 – 33.
WANG Changlong, YANG Peixin, ZHENG Yixiong. Embryogenesis in culture of isolated microspores of *Brassica juncea* var. *capitata* [J] . *Acta Agric Jiangxi*, 2011, **23**(11): 31 – 33.

[14] 王亦菲, 陆瑞菊, 孙月芳, 等. 大田油菜游离小孢子培养高频胚状体诱导及植株再生[J]. 中国农学通报, 2002, **18**(1): 20 – 23.
WANG Yifei, LU Ruiju, SUN Yuefang, *et al*. The high frequency embryos induction and plant regeneration derived from microspores for rapes grown in field [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2002, **18**(1): 20 – 23.

[15] 陈军, 陈正华, 刘澄清, 等. 甘蓝型油菜游离小孢子培养的胚胎发生[J]. 作物研究, 1995, **9**(增刊)：33 – 38.
CHEN Jun, CHEN Zhenghua, LIU Chengqing, *et al*. Embryogenesis of isolated microspore culture in *Brassica napus* L. [J]. *Crop Res*, 1995, **9**(supp): 33 – 38.

[16] 方淑桂, 曾小玲, 朱朝辉, 等. 结球甘蓝游离小孢子胚胎发生[J]. 武汉植物学研究, 2005, **23**(6): 530 – 534.
FANG Shugui, ZENG Xiaoling, ZHU Chaohui, *et al*. Embryogenesis of isolated-microspore in cabbage(*Brassica oleracea* var. *capitata*) .[J] *J Wuhan Bot Res*, 2005, **23**(6): 530 – 534.

[17] 顾宏辉, 张冬青, 周伟军. 换培养液和秋水仙碱处理对白菜型油菜小孢子胚胎发生的影响[J]. 作物学报, 2004, **30**(1): 78 – 81.
GU Honghui, ZHANG Dongqing, ZHOU Weijun. Effects of medium renovation and colchicine treatment on embryogenesis of isolated microspores in *Brassica rapa* ssp. *chinensis*[J]. *Acta Agron Sin*, 2004, **30**(1): 78 – 81.

[18] 陆瑞菊, 王亦菲, 孙月芳, 等. 提高青花菜游离小孢子培养反应的研究[J]. 上海农业学报, 2006, **22**(2): 1 – 4.
LU Ruiju, WANG Yifei, SUN Yuefang, *et al*. Study on improving responses of isolated microspores culture in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) [J]. *Acta Agric Shanghai*, 2006, **22**(2): 1 – 4.

[19] 杨安平, 张恩慧, 郑爱泉, 等. 秋水仙碱对甘蓝游离小孢子胚胎发生及发育的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, **38**(8): 131 – 137.
YANG Anping, ZHANG Enhui, ZHENG Aiquan, *et al*. Effects of colchicine on embryogenesis and development of isolated microspore in *Brasscia oleracea* var. *capitata* [J] *J Northwest A & F Univ Nat Sci Ed*, 2010, **38**(8)：131 – 137.