

· 技术方法 ·

结球甘蓝和青花菜小孢子胚植株再生

袁素霞, 刘玉梅*, 方智远, 杨丽梅, 庄木, 张扬勇, 孙培田

中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081

摘要 结球甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*)和青花菜(*Brassica oleracea* var. *italica*)小孢子胚再生植株频率低是目前影响游离小孢子培养技术有效应用的关键问题之一, 研究其小孢子胚植株再生频率的影响因素, 提高胚再生植株频率, 对促进游离小孢子培养技术在甘蓝类蔬菜育种中更好地应用具有重要意义。该文以结球甘蓝中甘11和青花菜TI-11等基因型为试材, 对影响游离小孢子胚再生植株的固体培养基类型、琼脂浓度、胚的类型及胚在液体培养基中的滞留时间等因素进行了研究。结果表明: 游离小孢子培养25天的子叶胚在琼脂浓度为1%–1.25%的B5培养基上植株再生频率最高。进一步通过8个不同基因型对上述实验结果进行了验证, 结果显示, 游离小孢子培养25天的子叶胚在1%琼脂浓度的B5培养基上植株再生频率达77.8%–97.2%。

关键词 结球甘蓝, 青花菜, 子叶胚, 游离小孢子培养, 植株再生

袁素霞, 刘玉梅, 方智远, 杨丽梅, 庄木, 张扬勇, 孙培田 (2010). 结球甘蓝和青花菜小孢子胚植株再生. 植物学报 45, 226–232.

结球甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*)和青花菜(*Brassica oleracea* var. *italica*)是甘蓝类蔬菜的主要作物, 杂交育种是其主要的育种方式, 但甘蓝和青花菜为异花授粉作物, 在杂交种亲本系的常规选育过程中, 一般至少需要7–8代的连续蕾期自交, 才能育成一个稳定的自交系。然而, 通过游离小孢子培养技术, 可在2年内获得纯合的育种材料, 从而加快选择速率, 大大缩短育种年限。同时, 这一技术也使得隐性性状易于表达, 丰富了育种资源。获得的单倍体经加倍所建立的双单倍体(DH)群体也是分子标记和基因图谱构建的理想材料。因此, 自Lichter(1982)在芸苔属作物甘蓝型油菜(*Brassica napus*)游离小孢子培养上首次取得成功之后, 甘蓝类蔬菜游离小孢子培养技术已成为研究的热点。

国内外学者已在结球甘蓝和青花菜游离小孢子培养技术上取得了一定进展(Duijs et al., 1992; 张德双等, 1998, 1999; Hansen, 2000; Dias, 2001; 陈文辉等, 2006; 方淑桂等, 2006), 但是前人的研究方向

主要聚焦在如何提高小孢子胚胎发生频率方面, 对小孢子胚植株再生频率的研究报道很少, 且缺乏深入系统的研究。方淑桂等(2006)将结球甘蓝子叶期小孢子胚状体转至琼脂浓度为1.2%的MS培养基上, 获得的植株再生频率为20.4%–21.8%。Dias(2003)在实验中发现转接至琼脂浓度为0.9%的固体培养基上的青花菜小孢子胚状体的植株再生频率为27%–68%, 且认为MSS(改良的MS)固体培养基优于B5培养基。而陈文辉等(2006)在甘蓝和青花菜杂交种小孢子培养中, 将获得的子叶胚转至MS分化培养基上只获得了12%的小孢子胚成苗率。前人在进行结球甘蓝和青花菜小孢子胚植株再生时常用的是MS培养基, 且小孢子胚再生植株频率较低, 严重妨碍了游离小孢子培养技术的有效应用。因此, 如何提高结球甘蓝和青花菜游离小孢子胚再生植株的频率是目前亟待解决的问题。

本文以结球甘蓝和青花菜为实验材料, 针对培养基类型、琼脂浓度、小孢子胚状体类型及胚在液体培养基中的滞留时间4种因素对小孢子胚植株再生频率

收稿日期: 2009-04-15; 接受日期: 2009-05-14

基金项目: 国家自然科学基金(No.30871708)、863 计划(No.2007AA10Z174 和 No.2006AA100108)、国家“十一五”科技支撑计划(No.2006BAD01A7 和 No.2006BAD13B06)、农业部园艺作物遗传改良重点开放实验室项目和现代农业产业技术体系建设专项资金

* 通讯作者。E-mail: liuym@mail.caas.net.cn

的影响进行研究, 为进一步提高结球甘蓝和青花菜小孢子培养过程中胚再生植株的频率提供技术支撑和依据。

1 植物材料

结球甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)材料: 中甘11、8398和希望。青花菜(*Brassica oleracea* var. *italica* L.)材料: TI-111、玉冠西兰花、绿秀、绿宇和绿星。

以上均为F₁代杂种。其中, 中甘11和8398由中国农业科学院蔬菜花卉研究所育成; 希望、TI-111和玉冠西兰花来自日本; 绿秀和绿宇来自韩国; 绿星来自美国。供试材料种植于中国农业科学院蔬菜花卉研究所试验基地。于2005年7月初播种, 8月上旬定植于大田, 11月初选大株定植于阳畦。2006年3月下旬至2006年5月下旬进行游离小孢子培养。其中基因型中甘11和TI-111通过严格选取小孢子发育一致性好的花蕾和合适的游离小孢子诱导方式可以获得较高的出胚率且胚状体发育同步性好(图1A), 以得到足够的胚状体用于本实验中对胚再生植株的不同影响因素的研究。其余6个基因型用于对本实验结果的验证研究。

2 培养基成分与培养条件

2.1 小孢子的游离与培养

选取70%以上的小孢子处于单核靠边期, 且约10%的

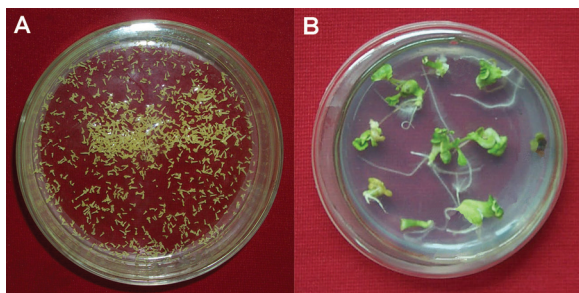


图1 结球甘蓝和青花菜小孢子胚状体及其再生植株

(A) 小孢子胚状体; (B) 萌发胚

Figure 1 Microspore-derived embryos and regenerant plantlets of *Brassica oleracea* var. *capitata* and *Brassica oleracea* var. *italica*

(A) Microspore-derived embryos; (B) Germinant embryos

小孢子处于双核早期的花蕾, 用75%的乙醇消毒30秒, 之后用7%(v/v)次氯酸钠溶液消毒15分钟, 再用无菌水冲洗3次, 每次5分钟。然后将花蕾放入研钵中, 加入少量B5洗涤培养基(Gamborg et al., 1968), 用研棒轻轻挤压, 使小孢子从花药游离到溶液中, 尼龙筛网(45 μm孔径)过滤, 收集滤液, 100×g离心3次, 每次3分钟。最后1次离心后, 用NLN-13(结球甘蓝)或1/2 NLN-13(青花菜)培养基(Lichter, 1982; Dias, 2001)将小孢子密度调为 1×10^5 个·mL⁻¹, 分装于直径为60 mm的无菌玻璃培养皿(每皿2 mL悬浮液)中, 并加入0.1 mL 1%活性炭(Dias, 1999), parafilm封口, 置温度梯度培养箱(32.5°C)中暗培养1天后, 置于25°C下继续暗培养, 3周后统计胚数量。

2.2 小孢子胚植株再生

2.2.1 培养条件

将获得的胚状体(图1A)转至设置不同处理的固体培养基(见2.2.2.1和2.2.2.2)上于培养皿中进行培养, 在光照强度50–100 μmol·m⁻²·s⁻¹(14 h·d⁻¹)、25°C条件下, 2–3周, 胚萌发(图1B)。之后再转入琼脂(日本原产, 凝胶强度1 300 g·cm⁻²)浓度为0.5%的同型培养基(蔗糖浓度为2%, 不含激素)上, 于三角瓶中继续培养1–2周长成幼苗, 对成苗的胚进行统计。每个处理设3次重复, 每个重复统计30个胚。

2.2.2 影响胚植株再生的因素

本实验对影响小孢子胚再生植株的固体培养基类型、固体培养基的琼脂浓度、胚的类型以及胚在液体培养基中的滞留时间共4种因素进行研究。

2.2.2.1 固体培养基类型 以中甘11和TI-111为试材, 将获得的子叶胚分别转接在1%琼脂浓度的B5、MS、MSS(Dias, 2003)培养基(其中B5和MS培养基含2%蔗糖, MSS培养基含1%蔗糖和1%麦芽糖; 均不含任何激素)上于培养皿中进行培养, 直至胚萌发。

2.2.2.2 固体培养基的琼脂浓度 以中甘11和TI-111为试材, 将获得的子叶胚分别转接在琼脂浓度为0.5%、0.75%、1%和1.25%的上述2.2.2.1中最适培养基上于培养皿中进行培养, 直至胚萌发。

2.2.2.3 胚的类型 以TI-111为试材, 将获得的子叶

胚与非子叶胚分别转接在上述2.2.2.1中最适培养基(含有2.2.2.2中的最适琼脂浓度)上,于培养皿中进行培养,直至胚萌发。

2.2.2.4 胚在液体培养基中的滞留时间 在通过上述实验得出最适培养基、最适琼脂浓度和最佳胚状体类型的基础上,以中甘11和TI-111为试材,将中甘11游离小孢子在NLN-13及TI-111游离小孢子在1/2 NLN-13培养基中分别培养20、25、30、35和45天,所得的胚分别转接在2.2.2.1中最适培养基(含有2.2.2.2中的最适琼脂浓度)上于培养皿中进行培养,直至胚萌发。

2.3 不同基因型的小孢子胚再生植株频率

用所有的供试材料对通过上述实验方法得出的结果进行验证,以评价本研究得出的胚再生植株方法的准确性和可靠性。

3 结果与讨论

3.1 固体培养基类型对子叶胚再生成植株频率的影响

从表1可以看出,基因型中甘11和TI-111的子叶胚在B5培养基中的植株再生频率分别为80%和83.3%,均极显著高于其在MS和MSS培养基中的再生频率,而后2种培养基间的差异均不显著。此外,在实验中还观察到,转接在B5培养基上的胚发育良好,而转接在MS和MSS培养基上的胚较易出现褐化和玻璃化,且萌发较晚。因此,B5培养基更适于结球甘蓝和青花

菜小孢子胚培养。

据报道,在甘蓝(包括结球甘蓝和羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* var. *acphala*))和青花菜小孢子胚再生成植株时,通常采用MS培养基进行胚培养(方淑桂等,2005,2006;姜凤英和冯辉,2005;姜凤英等,2006;陈文辉等,2006),但是胚再生植株的频率并不高,低于60%(方淑桂等,2006;姜凤英等,2006;陈文辉等,2006)。而在本实验中,中甘11和TI-111的子叶胚在B5培养基上的成苗率最高,达80%以上。

MSS培养基被认为是改良的MS培养基,其基本元素和配比与MS一样,只是所用的糖成分有所不同。Dias(2003)报道,在进行青花菜游离小孢子胚再生培养时,MSS培养基优于B5培养基。而本实验结果表明B5培养基极显著优于MS和MSS。B5培养基的基本元素及配比不同于MS和MSS。相对MS和MSS,B5培养基的主要特点是含有较低浓度的铵。在本实验中,这一特点也许有利于减少胚状体的褐化和玻璃化,并促进胚萌发。有关铵对胚状体形成的作用机理目前还未见报道,有待今后进一步研究。

3.2 培养基琼脂浓度对子叶胚再生成植株的影响

琼脂浓度及琼脂的凝胶强度都是影响固体培养基含水量的因素,进而也是影响培养基中植株组织含水量和发育的因素之一。在前人对结球甘蓝和青花菜小孢子胚植株再生的研究中,所用的琼脂浓度分别为1.2%(方淑桂等,2006)和0.9%(Dias,2003),但是没有针对琼脂浓度对胚再生植株频率的影响进行系统的研究。在本研究中通过对B5固体培养基琼脂浓度的进一步实验,结果表明(表2),1%和1.25%的琼脂浓

表1 不同固体培养基上结球甘蓝和青花菜子叶胚再生成植株的频率

Table 1 The frequency of plant regeneration from cotyledonary embryos of *Brassica oleracea* var. *capitata* and *Brassica oleracea* var. *italica* transferred to different solid mediums

Genotype	Medium	Number of cotyledonary embryos	Number of plantlets	Frequency of plant regeneration (Mean±SD) (%)
Zhonggan No. 11	B5	30	24.0	80.0 ± 7.2 aA
	MS	30	12.0	40.0 ± 7.2 bB
	MSS	30	7.3	24.3 ± 6.8 bB
TI-111	B5	30	25.0	83.3 ± 7.2 aA
	MS	30	6.7	22.3 ± 6.2 bB
	MSS	30	7.7	25.7 ± 11.0 bB

邓肯氏多重比较测验;同一列数据后不同小写字母表示差异达到显著水平($P<0.05$),不同大写字母表示差异达到极显著水平($P<0.01$)。

P value of significance was estimated by Duncan's test; the different lowercase and majuscule indicated significant difference at $P<0.05$ and $P<0.01$ level, respectively.

度均较适于基因型中甘11和TI-111的子叶胚的萌发和植株再生, 可使植株再生频率达到80%以上。中甘11的胚再生植株频率, 在1%和1.25%2种琼脂浓度间差异不显著, 但均极显著高于0.75%和0.5%。而TI-111的胚再生植株频率, 在1%和1.25%2种琼脂浓度间差异也不显著, 但1.25%琼脂浓度的胚再生植株频率极显著高于0.75%和0.5%, 1%琼脂浓度的胚再生频率显著高于0.75%, 极显著高于0.5%。在实验中还发现, 转接在1%或1.25%琼脂浓度培养基上的胚在2-4天内由黄色转变为绿色, 并长出白色的根毛, 在10-15天内即可开始从子叶间的生长点抽出小芽, 在20-30天内长成幼苗。而转接在0.5%和0.75%琼脂浓度的培养基上的胚玻璃化现象严重, 尤其是在0.5%琼脂浓度的培养基中, 有的基因型90%以上的胚发生玻璃化, 其中极少部分玻璃化的胚能通过愈伤途径成苗, 绝大部分在玻璃化过程中逐渐褐化而死亡。

Hansen(2000)报道, 对结球甘蓝小孢子胚进行ABA干燥处理可降低胚本身的含水量, 能明显提高胚的再生频率。本实验采用较高琼脂浓度降低培养基和胚状体本身的含水量以提高胚的再生质量。较高琼脂浓度影响培养基的水分状况, 限制胚状体对水分的吸收(其特征是胚的含水量下降), 从而起到提高胚再生植株频率的作用。这2种办法异曲同工, 后者直接在培养基琼脂浓度上进行改进, 可免去后处理的麻烦, 其作用机理有待进一步研究。

本研究表明, 1.25%和1%琼脂浓度均能达到80%

以上的胚再生频率, 而且两者间没有显著差异。因此, 从节省成本的角度考虑, 本实验选用1%琼脂浓度的B5培养基用于以下不同类型的胚再生植株频率的研究。

3.3 不同类型的胚再生植株频率的差异

小孢子胚的发育过程类似于合子胚, 从多细胞团结构逐渐发育成球形胚、心形胚、鱼雷胚和子叶胚(Hause et al., 1994)。胚的类型和质量也是影响胚再生植株频率的因素(Dias, 2003; 韩阳等, 2005; 姜凤英等, 2006)。本实验以TI-111为试材, 在1%琼脂浓度的B5培养基上分别接入子叶胚、鱼雷胚及其它胚(包括心形胚、球形胚和畸形胚), 研究不同类型胚的植株再生频率。结果表明(表3), 子叶胚的植株再生频率极显著高于鱼雷胚及其它胚。在实验中还观察到, 子叶胚萌发较早, 一次性成苗率高; 一部分存活的鱼雷胚会先在培养基中发育成子叶胚, 然后再成苗, 另外一部分直接形成愈伤, 经过脱分化再形成植株; 心形胚、球形胚及畸形胚则很少能继续发育成子叶胚, 存活下来的胚大多经愈伤途径形成植株。上述结果显示, 胚的类型也是影响植株再生的重要因素之一。

本研究没有对中甘11进行不同类型胚的成苗实验, 原因是中甘11的胚发育较TI-111小、快且一致, 不易分辨和挑选出鱼雷胚、心形胚和球形胚。从基因型TI-111来看, 子叶胚再生植株的频率极显著高于非子叶胚, 这与前人在大白菜(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)(韩阳等, 2005)和羽衣甘蓝(姜凤英等, 2006)

表2 结球甘蓝和青花菜子叶胚在不同琼脂浓度的B5培养基上的植株再生频率

Table 2 The frequency of plant regeneration from cotyledonary embryos of *Brassica oleracea* var. *capitata* and *Brassica oleracea* var. *italica* transferred to B5 medium with different concentration of agar

Genotype	Concentration of agar (%)	Number of cotyledonary embryos	Number of plantlets	Frequency of plant regeneration (Mean±SD) (%)
Zhonggan No. 11	0.5	30	5.7	19.0 ± 10.3 bB
	0.75	30	11.7	39.0 ± 13.4 bB
	1.0	30	24.3	81.0 ± 6.8 aA
	1.25	30	25.0	83.3 ± 9.8 aA
TI-111	0.5	30	4.0	13.3 ± 4.7 cC
	0.75	30	18.3	61.0 ± 8.7 bB
	1.0	30	25.3	84.3 ± 7.8 aAB
	1.25	30	26.0	86.7 ± 5.4 aA

邓肯氏多重比较测验; 同一列数据后不同小写字母表示差异达到显著水平($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异达到极显著水平($P < 0.01$)。

P value of significance was estimated by Duncan's test; the different lowercase and majuscule indicated significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ level, respectively.

上的研究结果基本一致。因此,在游离小孢子培养时应尽可能选择小孢子发育时期一致的花蕾,这样才有可能提高子叶胚的比率和发育同步性,从而提高胚再生植株的频率。对于如何提高非子叶胚再生植株的频率还有待探索。

3.4 液体培养不同时间的胚再生植株频率的差异

实验结果表明(表4),中甘11和TI-111在游离小孢子培养第20–30天时的子叶胚再生植株的频率较高,随着胚在液体培养基中滞留时间的延长,胚再生植株的频率下降。在实验中观察到,胚在液体培养基中的滞留时间越长,胚发生玻璃化的程度也就越严重。一般在游离小孢子培养2周左右时即可肉眼观察到胚状体,3–4周即可形成大量的子叶胚,虽然培养20天的子叶胚再生植株的频率较高,但其个体较小,在

进行植株再生培养时,较培养25天的胚萌发晚,且一次性成苗率也较25天的胚略低。由此可见,形成的子叶胚不宜在液体培养基中滞留太久,也不宜过早进行植株再生培养,25天左右的胚最有利于植株再生。

胚在液体培养基中的滞留时间越长,胚萌发的频率越低,这说明水分对胚再生植株的影响很大,这与前人在其它作物上的研究结果(刘凡等,1997;韩阳等,2005;姜凤英等,2006)基本一致。胚在液体培养基中滞留较长时间会导致胚状体本身的含水量提高,这可能是引起胚发生玻璃化和褐化的重要原因之一。因此,降低胚状体本身的含水量有利于胚的萌发。

3.5 8个不同基因型的子叶胚在1%琼脂浓度的B5培养基上的植株再生频率

上述实验结果表明:25天的子叶胚在1%琼脂浓度的

表3 1%琼脂浓度的B5培养基上青花菜不同类型胚的植株再生频率

Table 3 The frequency of plant regeneration of *Brassica oleracea* var. *italica* embryoids in different developmental stage on B5 medium with 1% agar

Genotype	Embryoid type	Number of embryos	Number of plantlets	Frequency of plant regeneration (Mean±SD) (%)
TI-111	Cotyledon-stage	30	24.7	82.3 ± 6.8 aA
	Torpedo-stage	30	13.0	43.3 ± 7.2 bB
	Others	30	14.0	46.7 ± 4.7 bB

邓肯氏多重比较测验;同一列数据后不同小写字母表示差异达到显著水平($P<0.05$),不同大写字母表示差异达到极显著水平($P<0.01$)。

P value of significance was estimated by Duncan's test; the different lowercase and majuscule indicated significant difference at $P<0.05$ and $P<0.01$ level, respectively.

表4 NLN-13或1/2 NLN-13培养基中培养不同时间的结球甘蓝和青花菜子叶胚的植株再生频率

Table 4 The frequency of plant regeneration from cotyledonary embryos of *Brassica oleracea* var. *capitata* and *Brassica oleracea* var. *italica* cultured in NLN-13 or 1/2 NLN-13 liquid medium for different time

Genotype	Days of culturing	Number of cotyledonary embryos	Number of plantlets	Frequency of plant regeneration (Mean±SD) (%)
Zhonggan No. 11	20	30	27.7	92.3 ± 3.1 aA
	25	30	24.7	82.2 ± 6.8 bAB
	30	30	22.0	73.3 ± 2.7 bBC
	35	30	18.7	62.3 ± 5.7 cC
	45	30	4.0	13.3 ± 4.7 dD
TI-111	20	30	25.3	84.3 ± 5.7 aA
	25	30	26.3	87.7 ± 1.6 aA
	30	30	25.7	85.6 ± 8.7 aA
	35	30	18.3	61.0 ± 4.2 bB
	45	30	12.0	40.0 ± 7.2 cC

邓肯氏多重比较测验;同一列数据后不同小写字母表示差异达到显著水平($P<0.05$),不同大写字母表示差异达到极显著水平($P<0.01$)。

P value of significance was estimated by Duncan's test; the different lowercase and majuscule indicated significant difference at $P<0.05$ and $P<0.01$ level, respectively.

表5 8个基因型的结球甘蓝和青花菜子叶胚在1%琼脂浓度的B5培养基上的植株再生频率

Table 5 The frequency of plant regeneration from cotyledonary embryos of *Brassica oleracea* var. *capitata* and *Brassica oleracea* var. *italica* of eight genotypes on B5 medium with 1% agar

Genotype	Number of cotyledonary embryos	Number of plantlets	Frequency of plant regeneration (%)
Zhonggan No. 11	90	73	81.1
8398	101	81	80.2
Xiwang	102	84	82.4
TI-111	178	152	85.4
Yuguan	7	6	85.7
Lüxiu	90	70	77.8
Lüyu	142	138	97.2
Lüxing	264	235	89.0

B5培养基上培养,可获得高频率的植株再生。为了检验该结果的可靠性及该方法的应用范围,我们采用8个基因型的甘蓝类蔬菜对这一结果进行验证,结果表明(表5),8个基因型的子叶胚再生植株频率在77.8%—97.2%之间,表明我们得出的结球甘蓝和青花菜胚植株再生方法是可行的。

近3年来,本实验获得的这一胚再生植株的培养体系在本实验室的约100个结球甘蓝和青花菜基因型上得到了有效应用,据统计顺利获得了约7 000份小孢子胚再生植株,包括已建成的6个结球甘蓝和青花菜DH群体(每个群体的DH系均大于100份)。证实我们的这一胚再生植株培养体系基本上解决了结球甘蓝和青花菜小孢子子叶胚再生植株频率低的问题,提高了小孢子培养技术在单倍体育种及相关生物技术研究中的应用效率。

参考文献

陈文辉,方淑桂,曾小玲,朱朝辉,廖晓珍(2006). 甘蓝和青花菜杂种小孢子培养. 热带亚热带植物学报 **14**, 321–326.

方淑桂,陈文辉,曾小玲,朱朝辉,廖晓珍,郑学立(2006). 结球甘蓝游离小孢子培养及植株再生. 园艺学报 **33**, 158–160.

方淑桂,曾小玲,朱朝辉,林碧英,陈文辉,廖晓珍(2005). 结球甘蓝游离小孢子胚胎发生. 武汉植物学研究 **23**,

530–534.

韩阳,叶雪凌,冯辉(2005). 提高大白菜小孢子植株获得率的研究. 园艺学报 **32**, 1092–1094.

姜凤英,冯辉(2005). 羽衣甘蓝游离小孢子培养初报. 园艺学报 **32**, 884–884.

姜凤英,冯辉,王超楠,冯建云,李雁雁(2006). 几种影响羽衣甘蓝小孢子胚状体成苗的因素. 植物生理学通讯 **42**, 58–60.

刘凡,李岩,姚磊,曹鸣庆(1997). 培养基水分状况对大白菜小孢子胚成苗的影响. 农业生物技术学报 **5**(2), 131–136.

张德双,曹鸣庆,秦智伟(1998). 绿菜花游离小孢子培养、胚胎发生和植株再生. 华北农学报 **13**(3), 102–106.

张德双,曹鸣庆,秦智伟(1999). 影响绿菜花游离小孢子培养的因素. 华北农学报 **14**, 68–72.

Dias JS (1999). Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis. *Euphytica* **108**, 65–69.

Dias JS (2001). Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. *Euphytica* **119**, 389–394.

Dias JS (2003). Protocol for broccoli microspore culture. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster B, Szarejko I, eds. Doubled Haploid Production in Crop Plants. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 195–204.

Duijs JG, Voorrips RE, Visser DL, Custers JBM (1992). Microspore culture is successful in most types of *Brassica oleracea* L. *Euphytica* **60**, 45–55.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**, 151–158.

Hansen M (2000). ABA treatment and desiccation of microspore-derived embryos of cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata* L.) improves plant development. *J Plant Physiol* **156**, 164–167.

Hause B, van Veenendaal WL, Hause G, van Lammeren AA (1994). Expression of polarity during early development of microspore-derived and zygotic embryos of *Brassica napus* L. 'Topas'. *Bot Acta* **107**, 407–415.

Lichter R (1982). Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* L. *Z Pflanzenphysiol* **105**, 427–434.

Plant Regeneration from Microspore-derived Embryos in Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) and Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)

Suxia Yuan, Yumei Liu^{*}, Zhiyuan Fang, Limei Yang, Mu Zhuang, Yangyong Zhang, Peitian Sun

Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract The application of microspore culture still produces low frequency of plant regeneration from microspore-derived embryos in many cabbage and broccoli genotypes. To improve the frequency of plant regeneration, we studied the effect of medium, agar concentration, embryoid type and days of culture of microspores on plant regeneration in hybrid F₁ generations of a cabbage, 'Zhonggan 11', and a broccoli, 'T1-111'. B5 medium with 1%–1.25% agar was optimal for germination and regeneration of embryos, and the frequency of plant regeneration from cotyledonary embryos was significantly higher than that from other embryos, especially cotyledonary embryos from the 25-day-cultured microspores. The frequency of plant regeneration for cotyledonary embryos from 25-day-cultured microspores in 8 cultivars of cabbage and broccoli transferred to B5 medium with 1% agar ranged from 77.8% to 97.2%.

Key words *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Brassica oleracea* var. *italica*, cotyledonary embryos, isolated-microspore culture, plant regeneration

Yuan SX, Liu YM, Fang ZY, Yang LM, Zhuang M, Zhang YY, Sun PT (2010). Plant regeneration from microspore-derived embryos in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) and broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Chin Bull Bot* **45**, 226–232.

* Author for correspondence. E-mail: liuym@mail.caas.net.cn