

花椰菜下胚轴培养和高频率芽再生技术的研究^{*}

严慧玲, 巩振辉, 贾庆利

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 以“春秋”花椰菜为试验材料, 研究了影响下胚轴再生的若干因子。结果表明, 6 d 苗龄的下胚轴在附加 $2\sim 3\text{ mg/L}$ 6-BA 和 10 mg/L NAA 的MS培养基上培养, 芽分化率最高, 达93.33%, 平均每个外植体产芽5.71个; AgNO_3 对下胚轴的细胞生长有明显的促进作用; 下胚轴的下端比上端产芽早, 并且较易产生不定芽。

[关键词] 花椰菜; 下胚轴; 离体培养; 植株再生

[中图分类号] S635.303.6; Q813.1⁺3 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2003)04-0087-04

花椰菜(*B. rassaica oleracea* var. *botrytis*)属十字花科芸薹属植物, 世界各地均有种植。但花椰菜生长期病虫害严重, 存在不耐贮、品质差等问题, 困扰着广大菜农与菜商。因此, 对花椰菜品种进行改良势在必行, 而利用常规育种方法已不能满足现代农业对花椰菜品种改良的要求。现代生物技术的发展, 为人们选育和转化重要园艺性状基因的突破性品种提供了可能^[1~3]。然而国内外关于花椰菜遗传转化的技术还很不成熟, 遗传转化率极低^[4], 难以适应花椰菜分子育种的要求。华学军等^[5]将融合GUS基因的B. t杀虫剂基因转入花椰菜, 但只得到表达GUS活性的愈伤组织而未得到转基因的完整植株; 陈晓邦等^[1]将Intron-GUS嵌合基因转入花椰菜, 获得的再生转基因植株频率仅为1%。其原因是适宜农杆菌介导的花椰菜高频率植株再生技术尚未真正解决。本研究以“春秋”菜花品种为材料, 对影响花椰菜下胚轴再生因素进行探讨, 旨在为花椰菜高效遗传转化体系的建立奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料与培养条件

供试花椰菜品种“春秋”菜花种子由天津蔬菜研究所科技开发中心提供。花椰菜种子经体积分数85%酒精浸泡3 s后, 用体积分数2% NaClO (滴加1滴吐温80)表面消毒25 min, 无菌水冲洗3次, 每次3~5 min, 然后播种于不含任何激素的 $1/2\text{ MS}$ 培养基上培养。培养温度 $(24\pm 2)^\circ\text{C}$, 光强为

$1\ 600\sim 2\ 000\text{ lx}$, 光照16 h/d。取萌发5, 6, 7, 8, 9 d的无菌苗下胚轴作为外植体。

1.2 试验处理与芽的诱导

切取苗龄7 d的无菌苗下胚轴(横切成 $0.5\sim 0.7\text{ cm}$ 的切段), 做以下因素试验。

(1) 不同激素组合对芽分化的影响: 分别置于不同激素配比的MS培养基(MS无机盐及维生素, 激素配比见表1, 所有培养基中附加蔗糖30 g/kg, 琼脂粉6 g/kg); (2) 分化培养基中分别附加 AgNO_3 ^[12]0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 mg/L; (3) 下胚轴上部(近芽端)和下部(近根端)切段的芽再生能力的比较: 培养基pH在高压灭菌前调节为5.8, 100 mL三角瓶中分装培养基25 mL, 每瓶接种6个外植体, 瓶在架上随机区组排列。以上所有处理其外植体数目不少于20个。培养条件同1.1。25 d后统计外植体再生芽数, 并按下列公式计算不定芽分化率和平均每个外植体产生的芽数: 不定芽分化率/% = 分化外植体数/接种外植体数 $\times 100$, 平均每个外植体产芽数 = 分化总芽数/接种外植体数。

1.3 诱导生根

从切段产生的芽接种在 $1/2\text{ MS}+0.1\text{ mg/L}$ NAA培养基中诱导生根。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对下胚轴不定芽分化的影响

由表1可以看出, 7日龄的下胚轴接种在 $2\sim 3$

^{*} [收稿日期] 2002-09-20

[基金项目] 科技部杨凌生物育种中心基金项目(1999-18); 陕西省自然科学基金(2001SM11); 陕西省农业分子生物学重点实验室基金项目

[作者简介] 严慧玲(1978-), 女, 武汉市人, 在读硕士, 主要从事蔬菜生物技术研究。

[通讯作者] 巩振辉(1957-), 男, 陕西礼泉人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事蔬菜生物技术与种质资源保存和利用研究。

mg/L 6-BA 与 1.0 mg/L NAA 的培养基中, 不定芽分化率和平均每个外植体产芽数较高, 分别为 75.68%, 76.92% 和 2.76, 2.38。由表 1 还可看出, NAA 在适宜质量浓度下对花椰菜下胚轴不定芽的分化有促进作用, 比单独使用 6-BA 效果好。

表 1 不同激素配比对花椰菜下胚轴芽分化的影响

培养基/ (mg · L ⁻¹) Base medium	接种外植体数 No. of hypocotyls cultured	分化外植体数 No. of hypocotyls with shoots	不定芽分化率/% Adventitious bud differentiation frequency	平均每个 外植体产芽数 No. of bud per explant with shoots
6-BA 2.0	36	26	72.22	1.78
6-BA 2.0+ NAA 0.5	50	36	72.00	2.20
6-BA 2.0+ NAA 1.0	37	28	75.68	2.76
6-BA 2.0+ NAA 1.5	42	30	71.43	0.86
6-BA 3.0	60	45	75.00	1.83
6-BA 3.0+ NAA 0.5	46	33	71.74	2.11
6-BA 3.0+ NAA 1.0	39	30	76.92	2.38
6-BA 3.0+ NAA 1.5	46	33	71.74	1.33

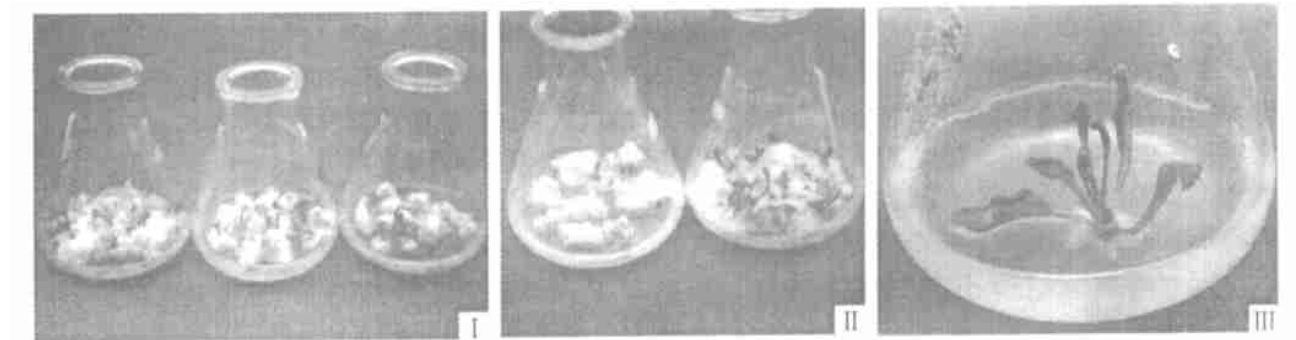
注: 基本培养基为MS。
Note: The base medium is MS.

2.2 AgNO₃ 质量浓度对下胚轴不定芽分化的影响
试验发现, 以下胚轴为外植体, 在培养基中添加不同质量浓度的 AgNO₃, 各处理不定芽分化率均较对照提高 15% 以上。当 AgNO₃ 为 6 mg/L 时, 下胚轴不定芽分化率和平均每个外植体产芽数最高(表 2)。而过高的 AgNO₃ 质量浓度, 虽对不定芽分化率影响不大, 但产生的不定芽数却大大降低(图版 I)。

表 2 AgNO₃ 浓度对花椰菜子叶不定芽分化的影响

Table 2 Effects of different concentration of AgNO ₃ on adventitious bud differentiation frequencies of cotyledon in <i>B. brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>				
AgNO ₃ 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration of AgNO ₃	接种外植体数 No. of hypocotyls cultured	分化外植体数 No. of hypocotyls with shoots	不定芽分化率/% Adventitious bud differentiation frequency	平均每个 外植体产芽数 No. of bud per explant with shoots
0	42	31	73.81	3.83
247	45	95.74	4.13	
4	35	34	97.14	4.51
6	45	44	97.78	4.82
8	43	42	97.67	4.14
10	45	42	93.33	3.98
12	44	40	90.91	2.75

注: 培养基中含 NAA 1.0 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L。
Note: The medium contained NAA 1.0 mg/L, 6-BA 2.0 mg/L.



图版 I. AgNO₃ 浓度对花椰菜下胚轴不定芽分化的影响(由左至右 AgNO₃ 质量浓度分别为 0, 6, 12 mg/L); II. 下胚轴不同切段部位对芽分化的影响(左为上部切段, 右为下部切段); III. 生根培养基上的小苗

Plate I. Effect of AgNO₃ on adventitious bud differentiation of hypocotyls(from left to right, the concentration of AgNO₃ is 0, 6, 12 mg/L respectively); II. Effect of different positions on bud differentiation of hypocotyls(The left is upper segment, the right is lower segment); III. Plant on rooting medium

2 3 不同日龄幼苗的下胚轴对不定芽分化的影响

试验结果(表 3)表明, 不同日龄的幼苗对下胚轴切段芽的分化均有影响。无菌苗以 6 日龄的下胚

轴切段可得到较高的芽分化率和每个外植体产芽数, 分别为 93.33% 和 5.71。

表 3 不同时期花椰菜下胚轴的芽分化频率

Table 3 Bud differentiation frequencies of hypocotyl at different stages in <i>B. rassaica oleracea</i> Var. <i>botrytis</i>				
苗龄/d Time for seedling	接种外植体数 No. of hypocotyls cultured	分化外植体数 No. of hypocotyls with shoots	不定芽分化率/% Adventitious bud differentiation frequency	平均每个外植体产芽数 No. of per explant with shoots
5	47	31	65.96	3.34
6	45	42	93.33	5.71
7	31	25	80.64	3.90
8	45	35	77.78	3.04
9	42	28	66.67	2.05

注: 培养基含 NAA 0.5 mg/L, 6-BA 2.0 mg/L。
Note: The medium contained NAA 0.5 mg/L, 6-BA 2.0 mg/L.

2 4 下胚轴上部和下部切段芽再生能力的比较

将下胚轴的上半部和下半部分别切成 0.5~0.7 cm 的切段平放在分化培养基上。在培养期间, 发现下部切段比上部切段芽分化早。25 d 后下部切段和上部切段芽分化率分别为 100% 和 86.36% (表

4); 而且下部切段比上部切段的芽长得健壮(图版 II)。这一结果表明, 下胚轴的下部细胞再生能力比上部强。这与前人有关下胚轴上部细胞再生能力较强的研究结果相悖^[6~8]。这一结果是否与不同作者所采用的材料不同有关, 尚待进一步研究。

表 4 花椰菜下胚轴上部和下部切段芽再生能力的比较

Table 4 The shoot regeneration capacity of upper and lower segments of hypocotyls in cauliflower				
部位 Positions	接种段数 No. of segments cultured	产芽切段 Segments with shoots		芽/切段 No. of bud per segments
		数量 No.	不定芽分化率/%	
上部 Upper	22	19	86.36	4.36
下部 Lower	23	23	100	7.00

注: 培养基含 0.5 mg/L NAA, 2.0 mg/L 6-BA。
Note: The medium contained NAA 0.5 mg/L, 6-BA 2.0 mg/L.

2 5 诱导生根

将下胚轴上诱导出的 2 cm 以上的不定芽自基部切下, 接种在生根培养基中, 经 10~15 d 培养, 每个不定芽基部均可诱导出大量侧根。移栽试验表明, 花椰菜下胚轴再生植株的移栽成活率达 95%~100% (图版 III)。

3 讨 论

建立高效稳定的植物组织和细胞培养的植株再生系统是利用农杆菌介导转化法进行植物转基因的重要前提。植物材料的不同取材时间, 培养基中激素组成及其质量浓度, 不同取材部位均能影响外植体的芽分化频率。本研究通过对这些因素的探讨, 获得了花椰菜下胚轴离体培养芽的高效再生, 其芽分化率达 93.33%, 比夏小娣等^[9]报道的芽分化率(75.80%)有明显的提高。一般认为, 细胞分裂素有

利于芽的分化, 生长素有利于根的分化和愈伤组织的形成, 细胞分裂素与生长素的比值高有利于芽的分化^[9]。至于同一器官(下胚轴)不同部位(近根端、近芽端)芽诱导率差异的机理尚待进一步研究。

植物细胞在离体培养过程中会产生大量乙烯, 尤其是在密闭的培养容器中, 乙烯的大量累积会直接影响外植体生长和芽分化。AgNO₃ 对许多植物的形态发生有促进作用^[10, 11]。一般认为, Ag⁺ 作为一种乙烯抑制剂并非抑制乙烯的合成, 而是通过促进多胺的合成来提高体细胞胚胎和芽的发生频率^[12]。据报道, 在用外植体诱导不定芽的培养基中添加适量 AgNO₃, 可显著提高芸薹属植物离体培养条件下芽的再生频率^[13~15]。本研究结果表明, 添加 6.0 mg/L 的 AgNO₃ 可显著提高花椰菜下胚轴不定芽分化率和平均每个外植体产芽数。

[参考文献]

- [1] 陈晓邦, 华学军, 黄其满, 等. 农杆菌介导的 intron-Gus 嵌合基因转入花椰菜获得转基因植株[J]. 植物学通报, 1995, 12: 50- 52
- [2] 程振东, 卫志明, 许智宏. 根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化及转基因植株的再生[J]. 植物学报, 1994, 36(9): 657- 663
- [3] 蔡小宁, 余建明. 建立青菜农杆菌介导法基因转化体系[J]. 江苏农业学报, 1997, 13(2): 110- 114
- [4] 程振东, 卫志明, 许智宏, 等. 芸薹属作物的遗传转化[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(3): 161- 164
- [5] 华学军, 陈晓邦, 范云六. *Bacillus thuringiensis* 杀虫剂基因在花椰菜愈伤组织的整合与表达[J]. 中国农业科学, 1992, 25(4): 82- 87
- [6] 彭 菲, 王凤翔. 菘蓝子叶和下胚轴组织再生植株的研究[J]. 湖南农学院学报, 1994, 20(5): 450- 456
- [7] 石淑稳, 周永明. 甘蓝型油菜下胚轴培养和高频率芽再生技术的研究[J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(2): 1- 6
- [8] Yang Meizhu, Jia Shirong, Pua Eng-chang. High frequency of plant regeneration from hypocotyl explants of *B. brassica carinata* A + B plant cell[J]. Tissue and Organ Culture, 1991, 24: 79- 82
- [9] 夏小娣, 李素文, 张宝珍, 等. 花椰菜组织培养获得再生植株[J]. 天津农业科学, 1995, 1(2): 22
- [10] Purahauser L, Medgyesy M, Czeko P J, et al. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana glauca* in vitro tissue culture using the ethylene inhibitors of AgNO₃[J]. Plant Cell Rep, 1987, 6: 1- 4
- [11] Chraïbi K M, Latche A, Roustan J P, et al. Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors silver and cobalt[J]. Plant Cell Rep, 1991, 10: 204- 207
- [12] 孙月芳, 黄剑华, 陆瑞菊, 等. 叶用莴苣高频再生体系建立[J]. 上海农业学报, 1998, 14(3): 17- 20
- [15] 张 松, 魏疏棠, 温学江, 等. 利用乙烯抑制剂 AgNO₃ 建立大白菜高频植株再生体系[J]. 园艺学报, 1997, 24(1): 94- 96
- [13] 石淑稳, 周永明, 王新发. 影响油菜子叶外植体不定芽高频再生的因素[J]. 西北植物学报, 1998, 18(4): 477- 482
- [14] Chi G L, Pua E C, Sim G E, et al. Effect of AgNO₃ and aminooxyvinylglycine on in vitro shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *B. brassica* genotypes[J]. Plant Cell Rep, 1990, 9: 195- 198

High frequency of shoot regeneration from hypocotyls explants in *B. brassica oleracea* var. *botrytis*

YAN Huí-ling, GONG Zhen-hui, JIA Qíng-li

(College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The hypocotyls explants from “Chunqiu” cauliflower were cultured and some factors affecting shoot regeneration were also studied. The results showed the highest frequency of shoot regeneration of hypocotyls explants from 6-d-old *in vitro* grown seedling was 93.33% and No. of bud per explant with shoots was 5.71, using the MS media containing the hormone combinations of 6-BA 2-3 mg/L and NAA 0.5 mg/L. It was also found AgNO₃ (6 mg/L) was advantageous to the shoot formation; the lower segments of hypocotyls produced shoot earlier and easier than the upper segments.

Key words: cauliflower; hypocotyls; *in vitro*; plant regeneration