

春甘蓝腋芽叶片离体培养及植株再生技术研究

张高翔,张恩慧,许忠民,程永安

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**探索一种能保留春季栽培春甘蓝亲本春性的育种方法。**【方法】**以春季田间栽培的春甘蓝 MP01-11152、GB9266-18136、DT409-05121 3 个亲本自交系为试材,选用其成熟叶腋芽叶片为外植体,首先以 MS 为基础培养基,添加 0,2,3,4,5 mg/L 6-苄基腺嘌呤(6-BA)、0,0.05,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mg/L α -萘乙酸(NAA)对 MP01-11152 亲本自交系进行筛选,筛选出 6-BA 和 NAA 的最佳质量浓度;然后利用已选出的 6-BA 和 NAA 最佳质量浓度,分别对供试 3 个品种进行腋芽叶片离体培养及植株再生研究。**【结果】**以 MP01-11152 为材料进行离体培养,筛选出 6-BA 和 NAA 的最佳质量浓度分别为 2 和 0.4 mg/L。3 个亲本自交系中,GB9266-18136 在 MS+2 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA 中诱导的不定芽分化率最高,为 211%;MP01-11152 次之,为 122%;DT409-05121 最低,为 82%。将诱导出的不定芽在 MS+0.3 mg/L NAA 生根培养基中诱导生根,不定根的诱导频率可达 98%,并锻炼炼生成苗。**【结论】**在 MS 培养基中添加适宜质量浓度的 6-BA 或 NAA 2 种激素,能够有效地提高春甘蓝腋芽叶片不定芽的诱导分化率,基因型对不定芽诱导的分化率有一定影响。

[关键词] 春甘蓝;腋芽;叶片;组织培养;植株再生

[中图分类号] S635

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)05-0166-05

Tissue culture and plantlet regeneration of the axillary bud's leaf on spring cabbages

ZHANG Gao-xiang,ZHANG En-hui,XU Zhong-min,CHENG Yong-an

(College of Horticulture, Northwest A&F University,Yangling, Shaanxi 712100,China)

Abstract: **【Objective】** This passage discusses the method for keeping the springness from the leaf of the axillary buds on spring, to develop and enhance the breeding of spring cabbages. **【Method】** Three parental inbred lines MP01-11152, GB9266-18136, DT409-05121 were cultured in axillary bud's leaves. A study on maximum plants regeneration was done in MS medium complementing to the material of MP01-11152, with MS as media by adding 6-BA with the concentration of 0,2,3,4,5 mg/L, then adding NAA with the concentration of 0,0.05,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mg/L to screen the optimal concentration on this basis. Finally, the obtained optimal concentration of 2 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA was used to research the plant regeneration on the material of MP01-11152, GB9266-18136, DT409-05121. **【Result】** The differentiation of shoot regeneration of MP01-11152 was 92% with 6-BA 2 mg/L and 122% with 2 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA. GB9266-18136, one of the three parental inbred lines, obtained a high differentiation rate of 211%, MP01-11152's differentiation 122%, DT409-05121's differentiation 82%. Medium for root was MS containing 0.3 mg/L NAA and could be cultured and developed into plantlets, the rooting rate as high as 98%. **【Conclusion】** For the leaf in growth period of the axillary buds on spring cabbages, it could improve

* [收稿日期] 2008-07-16

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD01A7-2-04);陕西省 13115 重大科技专项(ZDKG-126);西安市农业科技攻关项目(GG06090)

[作者简介] 张高翔(1982—),女,河南信阳人,在读硕士,主要从事甘蓝育种与生物技术研究。E-mail:red-hill@163.com

[通信作者] 张恩慧(1960—),男,陕西扶风人,教授,硕士生导师,主要从事甘蓝育种与生物技术研究。E-mail:ganlan606@126.com

the differentiation of shoot in MS medium complemented with 6-BA or NAA. The genotypes have certain effects on shoot differentiation rate.

Key words: spring cabbage; axillary bud; leaf; tissue culture; plant regeneration

结球甘蓝(*Brassica oleracea*. L)是十字花科芸薹属中的一种重要蔬菜,在我国栽培面积较大。据统计,2007 年全国播种面积达 93.73 万 hm^2 ^[1]。结球甘蓝在国内的栽培,基本分为春季、夏季和秋季三大主栽茬口,其中春季栽培面积大。因此,选育适宜春季栽培的早熟结球甘蓝品种,已成为当今甘蓝育种的主要目标。

结球甘蓝为典型的绿体春化型 2 年生作物,只有植株营养体达到一定体积,经过一定低温感应才能春化,因而一年只能完成一个生长时期,这对于适宜春季栽培的早熟杂种一代品种的亲本选育极为不利,并带来了育种障碍。如果对春甘蓝亲本经常进行秋季筛选,则会导致春季栽培品种的春性严重退化。虽然科学家已研究出采用春甘蓝腋芽扦插繁殖保留亲本春性的方法^[2],但腋芽扦插繁殖易受夏季高温影响,不仅使扦插苗成活率很低,并且成本也很高,严重影响春甘蓝的育种进程。因此,探索一种利用春甘蓝腋芽叶片组织培养繁殖的方法,保留春季选育亲本的春性,已成为春甘蓝杂种优势育种的一个研究重点。Isbell 在 1964 年报道,利用结球甘蓝幼苗子叶离体培养得到了再生植株^[3];随后国内外也报道利用大白菜^[4-8]、结球甘蓝^[3,8-11]和羽衣甘蓝^[12-13]等的子叶和下胚轴为外植体,成功培养了再生植株。对于甘蓝而言,前人的研究仅是选用幼苗期的一些器官作为外植体,但这对于春甘蓝在春季结球后的春性选择和保留无意义。因此,本研究选用 3 个不同特性的春甘蓝亲本自交系,待其成熟叶球收获后,以植株继续生长发出的腋芽叶片为外植体,探索腋芽叶片离体培养诱导春甘蓝再生植株的新方法,以便为改进和提高春季春甘蓝品种的选育效果提供一条新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

试材选用西北农林科技大学园艺学院甘蓝育种研究室提供的不同特性的春甘蓝亲本自交系 3 个,分别为亲本自交系 MP01-11152,叶球圆球形,春露地定植至叶球成熟 50 d;亲本自交系 GB9266-18136,叶球鸡心形,春露地定植至叶球成熟 45 d;亲本自交系 DT409-05121,叶球扁平形,春露地定植至

叶球成熟 56 d。

1.2 方法

1.2.1 春甘蓝腋芽的田间培养 在西北农林科技大学园艺学院试验农场进行春甘蓝腋芽田间培养。3 个供试亲本自交系于 2006-12-20 阳畦播种,当幼苗长至 3 片真叶出现时分一次苗,2007-3-25 当幼苗出现 6 片真叶时定植于大田露地,分别在 3 个供试亲本自交系叶球成熟后,收获叶球保留外叶,培养植株以促进腋芽健壮生长。

1.2.2 春甘蓝离体不定芽的诱导与分化 以 MP01-11152、DT409-05121、GB9266-18136 3 个春甘蓝亲本自交系的腋芽叶片为供试材料,用 MS 培养基进行不定芽的诱导。

(1) 不同质量浓度 6-苄基腺嘌呤(6-BA)对春甘蓝腋芽叶片不定芽诱导的影响。以春甘蓝 MP01-11152 腋芽叶片为试验材料,分别用质量浓度 0 (CK),2,3,4,5 mg/L 的 6-BA 进行筛选,筛选出 6-BA 最佳质量浓度。

(2) 最佳质量浓度 6-BA 与不同质量浓度 α -萘乙酸(NAA)配比对春甘蓝腋芽叶片不定芽诱导的影响。以春甘蓝 MP01-11152 腋芽叶片为试验材料,在 1.2.2(1)所选 6-BA 最佳质量浓度的基础上,分别添加质量浓度 0.05,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mg/L 的 NAA,筛选出 6-BA 与 NAA 种激素质量浓度的最佳配比。

(3) 6-BA 和 NAA 的最佳质量浓度配比对不同春甘蓝自交系腋芽叶片不定芽诱导的影响。以春甘蓝 MP01-11152、DT409-05121、GB9266-18136 腋芽叶片为试验材料,研究 1.2.2(2)中所选出的 6-BA 与 NAA 最佳质量浓度配比,对其不定芽诱导的影响。

当腋芽叶片长至 5~6 cm 时,选取生长健壮的叶片作为离体培养的外植体。采集叶片带回实验室后,流水冲洗干净,在超净工作台上用体积分数 75%酒精消毒 45~50 s,1 g/L 升汞消毒 8 min,无菌水冲洗 3 次,然后将叶片切成面积为 1 cm^2 方块,接种于分化培养基^[5]上进行离体培养。不定芽诱导基础培养基^[5]选用 MS 培养基,添加 6-BA 和 NAA 的不同质量浓度配比,pH 值调至 5.6~5.8,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养,光强 2 000~

2 500 lx,30 d 后统计不定芽的诱导与分化情况,计算分化率、诱导率和褐化率。

分化率/%=分化的总芽数/总外植体数×100%；
诱导率/%=(分化出愈伤组织的芽数/总外植体数)×100%；
褐化率/%=(褐化的芽数/总外植体数)×100%。

1.2.3 春甘蓝不定芽的生根诱导 待分化的不定芽生长至 1.5~2.5 cm 时,自芽基部切下转入MS+0.3 mg/L NAA 生根培养基中诱导生根,观测不定根生长情况。

1.2.4 春甘蓝再生苗的移栽 当再生苗长出不定根后,开瓶口锻炼 72 h,取出再生苗洗去根部的培养基,栽入含水率为 70%~80%、pH 5.5~6.5 的专用培养土(V(泥炭土):V(珍珠岩)=3:1)中,在温度 20~22 ℃、空气相对湿度为 80%~90%的室内培养 2~3 周,当幼苗有 6~7 片叶、外界气候适宜春甘蓝结球时,移入大田进行正常栽培管理。

表 1 不同质量浓度 6-BA 对春甘蓝腋芽叶片不定芽诱导的影响
Table 1 Effect of 6-BA on shoot differentiation of spring cabbages

6-BA 质量浓度/ (mg·L ⁻¹) 6-BA concentration	外植体数 No. of explant	不定芽诱导分化 Shoot		愈伤组织诱导分化 Callus		褐化率/% Browning reaction of differentiation
		芽数 No.	分化率/% Rate of shoot differentiation	块数 No.	诱导率/% Inducement rate	
0(CK)	30	5(+)	17	4	13	0
2	39	36(++)	92	8	21	3
3	42	37(++)	88	10	24	8
4	37	30(+)	81	4	11	35
5	39	0	0	14	36	51

注:(+)表示诱导芽生长一般,(++)表示诱导芽生长健壮。下表同。
Note: The symbol in the blackest indicates the growth vigor,(+)means good,(++) means better. The following table is the same.

2.2 2 mg/L 6-BA 与不同质量浓度 NAA 对比对春甘蓝腋芽叶片不定芽诱导的影响

表 2 显示,用春甘蓝腋芽叶片作为外植体诱导不定芽时,以 MS 培养基中分别添加 2 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA 和 2 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA 的分化率较高,分别为 122%和 114%,其中前者芽和根的分化率为 91%,褐化率为 6%;后者芽和根的分化率为 53%,褐化率为 45%。因此,MS+2 mg/L 6-BA 中添加 0.4 mg/L NAA 有利于腋芽叶片不定芽的诱导(图 1);而 2 mg/L 6-BA 与相对较低浓度(0.05~0.3 mg/L)NAA 配比,虽对不定芽诱导有一定的促进作用,但诱导结果差异不大;添加较高质量浓度(0.5 mg/L)NAA,即 MS+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,对芽、根和愈伤组织诱导会产生抑制作用,不定芽分化率仅 6%,且引起外植体褐化,其褐化率为 94%,较对照高 91%。

2 结果与分析

2.1 不同质量浓度 6-BA 对春甘蓝腋芽叶片不定芽诱导的影响

由表 1 可知,MS 培养基中添加 2 mg/L 6-BA,对春甘蓝腋芽叶片不定芽诱导效果最好,不定芽分化率为 92%,比对照(CK)提高 75%;当 6-BA 质量浓度分别为 3 和 4 mg/L 时,不定芽的分化率均较高,但褐化率较高,不定芽生长较弱,叶色浅;5 mg/L 6-BA 对不定芽诱导效果最差,不定芽未分化,外植体褐化或形成了愈伤组织,其愈伤组织诱导率和褐化率均较高,分别为 36%,51%。表明 6-BA 在较低质量浓度(2~4 mg/L)时,有利于春甘蓝腋芽叶片不定芽的诱导分化,而高质量浓度(5 mg/L)对腋芽叶片不定芽诱导分化有一定的毒害作用,甚至不能诱导出不定芽。



图 1 春甘蓝 MP01-11152 在 MS+2 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA 中诱导出的不定芽
Fig.1 Differentiation shoot induced by MP01- 11152 of spring cabbages after adding mass concentrations of MS+2 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA

表 2 2 mg/L 6-BA 与不同质量浓度 NAA 配比对春甘蓝腋芽叶片不定芽诱导的影响

Table 2 Effect of 2 mg/L of 6-BA and combinations of NAA on shoot differentiation of spring cabbages								
NAA 质量激素 浓度/(mg·L ⁻¹) NAA concentration	外植体数 No. of explant	不定芽诱导分化 Shoot		芽和根诱导分化 root and shoot		愈伤组织诱导分化 callus		褐化率/% Browning reaction of differentiation
		芽数 No.	分化率/% Rate of shoot differentiation	个数 No.	分化率/% Rate of differentiation	块数 No.	诱导率/% Differentiation	
0(CK)	39	36(+)	92	0	0	8	21	3
0.05	43	41(+)	95	0	0	16	37	3
0.1	45	42(+)	93	0	0	18	40	11
0.2	54	46(+)	85	15	27	22	41	38
0.3	57	65(++)	114	30	53	16	28	45
0.4	54	66(++)	122	49	91	46	85	6
0.5	36	2	6	2	6	0	0	94

2.3 6-BA 与 NAA 最佳质量浓度配比对不同春甘蓝自交系腋芽叶片不定芽诱导的影响

由表 3 可知,在 MS 培养基中添加 2 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA 后,以春甘蓝自交系 GB9266-18136 的不定芽诱导分化率最高(211%),DT409-05121 最低(82%),同时 DT409-05121 也表现出较

低的愈伤组织诱导率(13%)和褐化率(8%)。说明 6-BA 和 NAA 2 种激素共同作用,有利于春甘蓝腋芽叶片的不定芽的诱导再生,并在其最佳质量浓度诱导下,外植体上也有不定根的发生,但不影响丛生芽的形成,而且还会抑制外植体产生愈伤组织及褐化。

表 3 2 mg/L 6-BA 与 0.4 mg/L NAA 对春甘蓝 3 个亲本自交系腋芽叶片不定芽诱导的影响

Table 3 Effect of 2 mg/L of 6-BA and combinations of 0.4 mg/L NAA on shoot differentiation						
品种 Variety	外植体数 No. of explant	不定芽诱导分化 Shoot		愈伤组织诱导分化 Callus		褐化率/% Browning reaction of differentiation
		芽数 No.	分化率/% Rate of shoot Differentiation	个数 No.	诱导率/% Differentiation	
MP01-11152	54	66(++)	122	46	85	6
GB9266-18136	54	114(+++)	211	9	17	13
DT409-05121	48	39(+)	82	6	13	8

表 3 还表明,MS+2 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA 对 3 个亲本自交系的诱导结果有差异,GB9266-18136 与 DT409-05121 间不定芽诱导分化率相差 129%,说明亲本基因型对腋芽叶片的定芽诱导有一定作用。

2.4 春甘蓝腋芽叶片不定芽生根的诱导及再生苗的移栽

当分化的不定芽伸长至 1.5~2.5 cm 时切下,移入生根培养基进行不定根诱导,结果表明,小苗移入生根培养基后约 7 d 即可产生不定根,20 d 左右便可出瓶。不定根诱导频率达 98% 以上。

在供诱导生根的小苗中,以 3~5 cm 高的壮苗不定根诱导效果最佳(图 2),出苗的成活率也相对较高。生根的小苗在移栽前需炼苗(图 3),瓶苗移栽到专用营养土时,成活率平均为 95% 以上;最后定植于大田中,生长良好(图 4)。从子叶外植体接种到再生小苗出瓶需 50~55 d,最快 44 d。



图 2 春甘蓝 MP01-11152 再生苗在 MS+2 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA 中的生长状况

Fig. 2 Growth of shoots elongation,MP01-11152 of spring cabbages in the medium of MS+2 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA



图 3 移栽前的春甘蓝 MP01-11152 再生植株
Fig. 3 Regenerated plants transferred to the pot of MP01-11152 of spring cabbages

3 讨论

影响植物再生频率的主要因素是培养基中的激素含量,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含量的比值高则有利于芽的分化^[14]。在大白菜离体再生培养中,影响外植体再生频率的主要因素是培养基中的激素含量^[7,11]。本试验在 MS 培养基中添加一定质量浓度的 6-BA,能较好地诱导春甘蓝腋芽叶片正常分化,其中较低质量浓度(2~4 mg/L)6-BA 有利于提高不定芽的分化,不定芽分化率最高可达 92%,并且可使不定芽生长健壮,但过高质量浓度(5 mg/L)的 6-BA,对不定芽的分化具有抑制作用。在 MS 培养基中同时添加细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA,对甘蓝腋芽叶片不定芽的诱导效果更明显。本研究结果表明,2 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA 能够更好地分化出不定芽并使其正常生长,其中不定芽分化率最高可达 122%,其诱导效果与白菜子叶^[4]、甘蓝下胚轴^[3]等作为外植体诱导不定芽的效果一致。

选用子叶离体培养进行十字花科作物大白菜植株再生时,大白菜的基因型起着决定性作用^[6]。本试验对春甘蓝 3 个亲本腋芽叶片不定芽的诱导结果表明,三者间不定芽的分化率差别很大,其中 GB9266-18136 最高,为 211%;DT409-05121 最低,为 82%。这表明在春甘蓝腋芽叶片诱导植株再生中,基因型对不定芽的形成具有一定作用。说明建立甘蓝腋芽叶片高频再生体系时,首先进行基因型筛选是必要的。

本试验中,春甘蓝腋芽叶片作为外植体,能直接



图 4 定植于大田中的春甘蓝 MP01-11152 再生植株
Fig. 4 Regenerated plants transferred to the field of MP01-11152 of spring cabbages

诱导出不定芽,不需经过愈伤组织阶段,且成苗速度快、芽苗健壮,其中春甘蓝亲本 GB9266-18136 获的不定芽诱导分化率高达 211%,极大地提高了春甘蓝亲本的数量,是一种保持春甘蓝亲本春性的有效方法。

[参考文献]

- [1] 许忠民,张恩慧,程永安,等. 抗病优质甘蓝新品种绿球 66 选育及其栽培特性 [J]. 北方园艺, 2007(6): 1-3.
Xu Z M, Zhang E H, Cheng Y A, et al. Breeding of new variety lvqiu 66 and its planting characteristic [J]. North Horticulture, 2007(6): 1-3. (in Chinese)
- [2] 王久兴,刘华丽,张慎好,等. 甘蓝腋芽扦插育苗研究 [J]. 种子, 2003, 128(2): 32-25.
Wang J X, Liu H L, Zhang S H, et al. Study on axil bud cutting of cabbage [J]. Seed, 2003, 128(2): 32-25. (in Chinese)
- [3] 吕爽,王超. 结球甘蓝离体培养的研究进展 [J]. 北方园艺 2004(3): 6-7.
Lv S, Wang C. Advances of cabbage *in vitro* culture [J]. North Horticulture 2004(3): 6-7. (in Chinese)
- [4] 刘凡,赵泓,秦帆. 结球白菜下胚轴原生质体培养及其体细胞胚植株再生 [J]. 植物学通报, 2006, 23(3): 275-280.
Liu F, Zhao H, Qin F. The protoplast culture of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* and plant regeneration via somatic embryogenesis [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2006, 23(3): 275-280. (in Chinese)
- [5] 曹家树,余小林,黄爱军,等. 提高白菜离体培养植株再生频率的研究 [J]. 园艺学报, 2000, 27(6): 452-454.
Cao J S, Yu X L, Huang A J, et al. Enhancement of plant regeneration frequency of *in vitro* cultured Chinese cabbage [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2000, 27(6): 452-454. (in Chinese)
- [6] Chi G L, Pua E C. Ethylene inhibitors enhances de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* (Chinese cabbage) *in vitro* [J]. Plant Sci, 1989, 64(2): 243-250.

(下转第 177 页)