

网络出版时间:2018-07-30 17:12

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2019.02.013

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180730.1710.026.html>

甘蓝根系再生植株技术研究

李楠, 张恩慧, 许忠民, 陈丽潇, 姜娇, 曹丽红

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】研究甘蓝根系再生植株技术,为小孢子单胚再生双单倍体(DH)植株当年快速扩繁提供参考。**【方法】**以甘蓝 DH15-1A 的根段为外植体,设置预培养后再进行共培养和直接共培养 2 种培养方式,共培养的培养基为 MS+4.5 mg/L 6-BA+6 mg/L AgNO₃,再向其中添加不同质量浓度(0.045,0.03,0.025,0.018 和 0.015 mg/L)的 NAA,筛选适宜的培养方式和 NAA 质量浓度;选择根龄分别为 15,20 和 25 d 的 DH15-1A 的根段在适宜培养基上培养,比较根龄的诱导效果;以 DH15-1A、DH15-2B 和 DH15-3C 无菌植株苗的须根作为外植体,分析基因型对植株再生的影响。**【结果】**采用直接共培养并选用 MS+0.030 mg/L NAA+4.5 mg/L 6-BA+6 mg/L AgNO₃ 培养基可获得甘蓝根段诱导培养的最佳效果,其中愈伤诱导率、外植体诱导率和不定芽诱导率均最高,分别达 100.0%,90.0% 和 430.0%,培养 3 周后分化芽生长健壮,叶片翠绿;根龄 20 d 外植体的愈伤诱导率最高,达 96.0%,并且愈伤分化芽点多,芽点周围褐化少,外植体诱导率和不定芽诱导率均最高,分别为 84.0% 和 420.0%。DH 植株基因型是决定根系再生植株效果的一个主要因素,3 个供试基因型中,以 DH15-2B 根段的再生效果最好,愈伤诱导率、外植体诱导率和不定芽诱导率分别为 83.3%,76.7% 和 430.0%。**【结论】**选用 DH15-2B 基因型甘蓝 20 d 的根段在 MS+0.03 mg/L NAA+4.5 mg/L 6-BA+6 mg/L AgNO₃ 培养基上培养,最有利于根段再生植株形成,植株再生率高达 100%。

【关键词】 甘蓝根系;组织培养;植株再生;快速繁育

【中图分类号】 S635.036

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)02-0103-09

Plant regeneration technology of *Brassica oleracea* var. *capitata* root

LI Nan, ZHANG Enhui, XU Zhongmin, CHEN Lixiao, JIANG Jiao, CAO Lihong

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

Abstract:【Objective】This study investigated the technology of root regeneration plants in cabbage to create conditions for rapid propagation of DH plants.【Method】The root of Brassica variety DH15-1A was used as explant. Two culture methods including pre-culture combined with co-culture and direct co-culture. The co-culture medium was MS+4.5 mg/L 6-BA+6 mg/L AgNO₃, and then NAA was added with different mass concentrations (0.045, 0.03, 0.025, 0.018 and 0.015 mg/L) to screen suitable culture mode and NAA mass concentration. The root segments at the age of 15, 20 and 25 days were selected for culture in suitable medium, and the induction effect of root age was compared. The fibrous roots of aseptic seedlings of DH15-1A, DH15-2B and DH15-3C were used as explants, and the effects of genotypes on plant regeneration were analyzed.【Result】The best results were obtained by co-culture with MS+0.030 mg/L NAA+4.5 mg/L 6-BA+6 mg/L AgNO₃ as culture basis. The callus induction rate, explant induction rate and adventitious bud induction rate were the highest of 100.0%, 90.0% and 430.0% respectively. After 3

【收稿日期】 2017-11-23

【基金项目】 国家重点研发计划项目(2017YFD0101804);陕西省农业科技创新与攻关项目(2016NY-046)

【作者简介】 李楠(1991—),女,河南巩义人,在读硕士,主要从事甘蓝小孢子体系和分子育种技术研究。
E-mail: linannwsuaf@126.com

【通信作者】 张恩慧(1960—),男,陕西扶风人,教授,硕士生导师,主要从事蔬菜单倍体育种和生物技术研究。
E-mail: Ganlan606@126.com

weeks, the differentiation buds grew robust and leaves were green. The callus induction rate of 20 d root age explants was the highest of 96.0%, and the callus bud points were more with less browning around bud points. The explant induction rate and adventitious bud induction rate were the highest of 84.0% and 420.0%, respectively. The DH plant genotype was a major factor determining the effect of root regeneration plant. In the 3 tested genotypes, the root segment regeneration of DH15-2B was the best. The callus induction rate, explant induction rate and adventitious bud induction rate were 83.3%, 76.7% and 430.0%, respectively. 【Conclusion】 The root segment of DH15-2B genotype cabbage at age of 20 d cultured on MS+0.03 mg/L NAA+4.5 mg/L 6-BA+6 mg/L AgNO₃ was the most beneficial to the formation of root regeneration plant, and the plant regeneration rate was as high as 100%.

Key words: *Brassica oleracea* var. *capitata* root; tissue culture; plant regeneration; rapid propagation

甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*)俗称卷心菜、包菜,是十字花科(Cruciferae)芸苔属(*Brassica*)植物,具有适应性广、抗逆性强、栽培容易、产量高、耐运输、耐贮藏等优点。随着甘蓝产业的发展和人们生活水平的不断提高,甘蓝产业种植品种的更换年限极大缩短,来自国内和国外品种的市场竞争力尤为强劲。当今生产上对甘蓝品种要求品质更优、抗病性更强、商品性更好和产量更高,但甘蓝育种者仅靠传统的常规育种方法很难取得突破性进展,多目标的杂种优势品种选育往往滞后于产业发展。甘蓝游离小孢子培养技术的研究和应用,已成为现阶段突破甘蓝强优势多目标育种的瓶颈和加快甘蓝新品种选育的有效途径,该技术在短暂的1~2年就能快速创制出大批聚集优势基因在一起的育种自交系,从而加快育种进程;但该技术中甘蓝游离小孢子大多来自杂种一代或低代自交系,理论上花蕾中每个小孢子的基因型存在极大差异。故此,花蕾小孢子再生植株间基因型具有不一致性,高海娜等^[1-2]、张恩慧等^[3-5]、董韩等^[6]研究报道,每个小孢子只能再生1个胚状体,1个胚状体只能再生1~5个双单倍体(DH)植株,这就易造成当代每个基因型小孢子群体过少,不易对DH植株农艺性状进行科学观察和用于配制新组合。据杨安平^[7-8]、马勇斌^[9]研究报道,甘蓝小孢子试管再生植株根系较发达,次生根系生长旺盛。因而,利用小孢子再生植株根系扩繁DH株群体,就成为加快甘蓝育种进程的重要研究目标。

近年来国内外关于甘蓝离体再生体系建立的研究报道甚多,外植体多以植株地上部分茎叶和花器为主,但很少见到以植株地下部的根系,特别是未见到以DH植株根段为外植体的再生体系研究报道。利用甘蓝植株的子叶^[10-13]、下胚轴^[10-13]、茎^[14]、真叶^[15-16]和花蕾^[5,17-19]等作为外植体成功诱导再生植

株的技术已经较为成熟,利用根系作为外植体^[20]诱导出再生植株的报道较少,且再生成苗率很低。为此,本试验以基因型高度纯合的甘蓝DH植株根段为外植体,研究甘蓝根系再生植株技术,为每个小孢子再生DH植株当年快速扩繁群体创造条件,并为提高DH系利用、加快育种进程奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试甘蓝DH植株是由本项目组配制的3个优良杂种一代组合,用其游离小孢子培养创制的基因型来源于3个不同的胚状体诱导的再生DH植株,即以DH15-1A、DH15-2B和DH15-3C无菌植株苗的须根作为外植体。供试DH植株由西北农林科技大学园艺学院甘蓝育种研究室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 根系外植体培养 待栽培甘蓝3个优良杂种一代组合植株抽薹开花时,选取单核靠边期的花蕾游离小孢子培养诱导再生植株,当胚状体诱导的数个不定芽生长高度达3cm时,于基部切下转接至生根培养基(MS+0.1 mg/L NAA)上培养再生DH植株,待不定芽诱导出的根生长不同时间后,在超净工作台上取出DH植株,无菌水冲洗洗净根部培养基,然后将一定粗度的根切成长度1cm左右的根段作为外植体。

1.2.2 根系再生植株培养方式与MS培养基中NAA适宜质量浓度的筛选 选用DH15-1A的根系为试材,将根系切成长度1cm左右的根段作为外植体。采用二因子系统分组设计,共有2组变量,其一,将供试外植体分设为2组处理:一组处理先进行预培养,3d后转入设有5个NAA质量浓度的共培养基中进行培养;另一组处理直接在设有5个NAA质量浓度的共培养基中培养。其二,将共培养基中

的 NAA 质量浓度设 5 个处理,即 NAA 质量浓度分别为 0.045,0.030,0.025,0.018 和 0.015 mg/L。比较分析 DH 植株根系再生植株的适宜培养方式和最适 NAA 质量浓度。预培养基为 MS+1.0 mg/L 2,4-D+4.5 mg/L 6-BA,共培养基为 MS+NAA+4.5 mg/L 6-BA+6 mg/L AgNO₃。外植体接入三角瓶诱导培养,每处理选用 10 个外植体,3 次重复。培养温度 25℃、光照强度 3 000 lx、光照时数 12 h/d。

1.2.3 根系再生植株适宜根龄的筛选 选用 DH15-1A 根系的须根作为试材,待试管中 DH15-1A 植株长出可见根系时,开始计算根龄。根龄设 15,20,25 d 共 3 个时间段处理,以 1.2.2 节所选根系诱导分化的适宜培养方式和共培养基为培养条件,每处理选用 10 个外植体,3 次重复,比较分析甘蓝 DH15-1A 植株不同根龄再生植株的诱导效果。

1.2.4 不同基因型 DH 植株根系的诱导和植株再生 选用 DH15-1A、DH15-2B、DH15-3C 共 3 种基因型的 DH 植株 20 d 根系为试材,将根系切成长度 1 cm 左右的根段作为外植体。以 1.2.2 节所选根系诱导分化的适宜培养方式和共培养基为培养条件,每处理选用 10 个外植体,3 次重复,比较分析不

同基因型植株的诱导效果。同时待不定芽长至 2~3 cm 时,将芽从基部切下,转至生根培养基(MS+0.1 mg/L NAA)上进行培养,诱导成再生植株。

1.2.5 数据计算与处理 愈伤诱导率、不定芽诱导率、外植体诱导率和植株再生率计算公式如下:

愈伤诱导率=诱导愈伤的外植体数/总外植体数×100%;

不定芽诱导率=出芽外植体数/总外植体数×100%;

外植体诱导率=再生不定芽总数/总外植体数×100%;

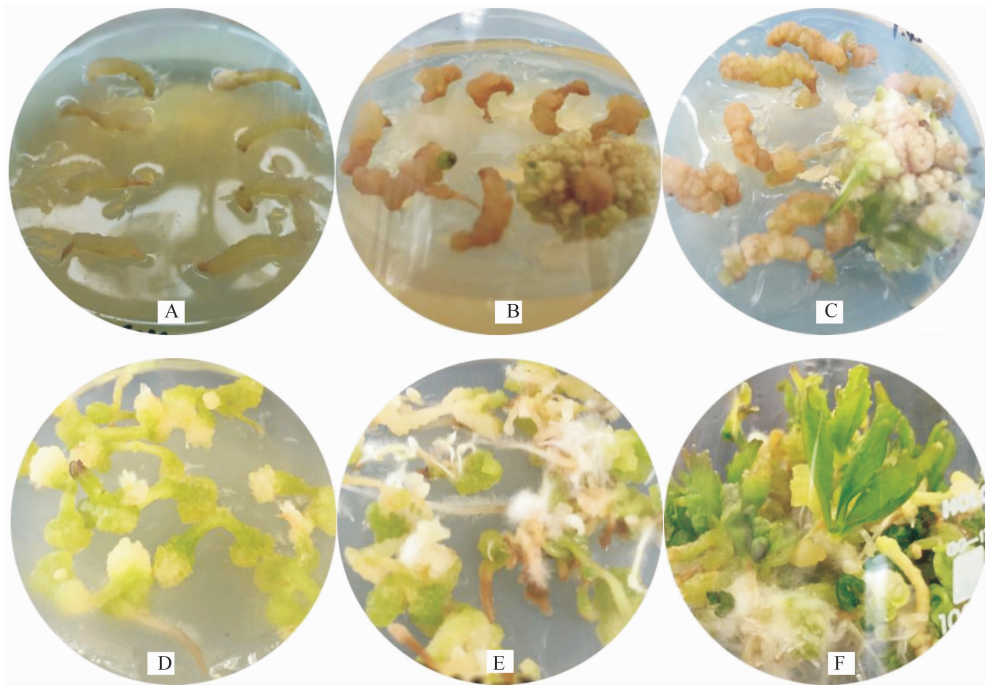
植株再生率=再生植株数/接种总芽数×100%。

所得数据采用 IBM SPSS statistics 20 软件进行差异显著性分析,在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平上进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 甘蓝 DH 植株根段再生愈伤组织的形成

甘蓝根段再生培养诱导的愈伤组织和不定芽的发育表现见图 1。



A. 培养 1 周;B. 培养 10 天;C. 培养 2 周;D. 培养 3 周;E. 培养 4 周;F. 培养 6 周
A. Cultured for 1 weeks;B. Cultured for 10 days;C. Cultured for 2 weeks;D. Cultured for 3 weeks;
E. Cultured for 4 weeks;F. Cultured for 6 weeks

图 1 甘蓝根段再生培养诱导的愈伤组织和不定芽的发育表现

Fig.1 Induction of callus and adventitious bud development by regeneration in Brassica oleracea var. capitata

甘蓝根段外植体接种约 1 周后开始膨大变绿，两端变褐，并在切口处形成少量愈伤组织(图 1-A)。随着进一步培养，愈伤组织逐渐覆盖外植体，供试的外植体愈伤组织形成率均达到 100%(图 1-B)；培养 2 周后部分根段外植体初始愈伤组织结构致密呈绿色，愈伤组织两端呈白色，布满白色凸起，并产生大量绿色或紫色芽点(1-C)；继续培养，部分愈伤组织结构致密呈黄绿色，分化出芽点(1-D)；4 周后芽点增殖变大出现两片叶，主要分布在愈伤组织表面(1-E)；6 周后大部分丛生不定芽生长出 3~5 片叶和大量不定根(1-F)。

表 1 培养方式与培养基中 NAA 质量浓度对甘蓝 DH 植株根段再生培养的影响

Table 1 Effect of NAA concentration in culture medium and co-culture medium on root regeneration of *Brassica oleracea* var. *capitata* DH plant

培养方式 Training methods	NAA 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) NAA concentration	接种外植体数 Explant	愈伤组织数 Callus number	愈伤诱导率/% Callus induction rate	诱导不定芽 外植体数 Sprouting explants	外植体 诱导率/% Explant induction rate	不定芽总数 Adventitious buds	不定芽 诱导率/% Adventitious bud induction rate
预培养+共培养 Pre-culture+ co-culture	0.045	30	19	63.3 bA	11	36.7 cB	25	83.3 eE
	0.030	30	20	66.7 abA	16	53.3 bcAB	47	156.7 dD
	0.025	30	26	86.7 aA	24	80.0 aA	112	373.3 aA
	0.018	30	19	63.3 bA	18	60.0 bAB	61	203.3 cC
	0.015	30	17	56.7 bA	15	50.0 bcB	103	343.3 bB
	平均 Average	30	20.2	67.3	16.8	56.0	69.6	232.0
共培养 Co-culture	0.045	30	21	76.7 bA	19	63.3 aAB	103	343.3 cC
	0.030	30	29	100.0 aA	27	90.0 aA	129	430.0 aA
	0.025	30	25	76.7 bA	23	76.7 aA	98	326.7 dD
	0.018	30	27	93.3 aA	21	70.0 aA	126	420.0 bB
	0.015	30	10	33.3 cB	8	26.7 bB	35	116.7 eE
	平均 Average	30	22.4	74.7	19.6	65.3	98.2	327.3

注：表中数据均为 3 次重复的平均值；同列数据后标不同小写字母表示差异达到显著水平($P<0.05$)，标不同大写字母表示差异达到极显著水平($P<0.01$)。下同。

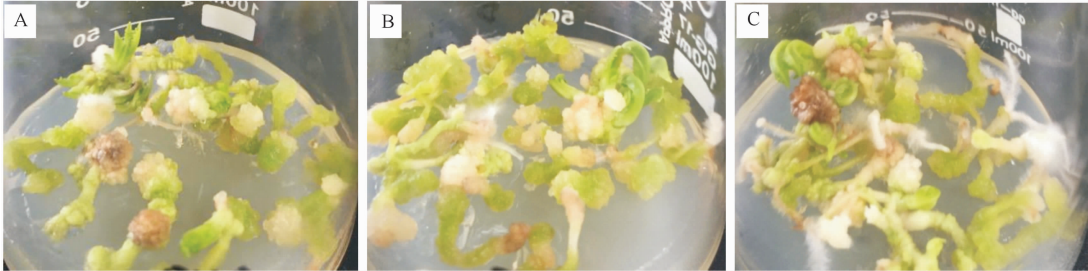
Note: The data are the average of three replicates. Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$), while different up-percase litters indicate very significant difference ($P<0.01$). The same below.

在共培养方式中，添加不同质量浓度 NAA 处理间诱导结果均存在显著性差异，其中添加 0.030，0.025 和 0.018 mg/L NAA 的愈伤诱导率、外植体诱导率和不定芽诱导率均较高，并在培养 3 周后分

2.2 培养方式与培养基中 NAA 质量浓度对甘蓝 DH 植株根段再生培养的影响

从表 1 可以看出，是否进行预培养对甘蓝根段共培养后的诱导分化结果有较大影响。采用预培养+共培养方式，根段的愈伤诱导率、外植体诱导率和不定芽诱导率平均值分别为 67.3%，56.0 和 232.0%，较直接共培养的诱导率分别减少 7.4%，9.3%和 95.3%；2 种不同培养方式中，NAA 质量浓度为 0.045，0.030 和 0.018 mg/L 时，上述诱导率也表现出前者培养方式低于后者培养方式。

化芽生长健壮，叶片翠绿(图 2)；尤其是 0.030 mg/L NAA 处理外植体的愈伤诱导率、外植体诱导率和不定芽诱导率均达到最高值，分别为 100.0%，90.0%和 430.0%。



A. 添加 0.030 mg/L NAA;B. 添加 0.025 mg/L NAA;C. 添加 0.018 mg/L NAA
A. Added 0.030 mg/L NAA;B. Added 0.025 mg/L NAA;C. Added 0.018 mg/L NAA

图 2 甘蓝 DH 植株根段接种到含不同质量浓度 NAA 的共培养基中培养 3 周后分化的丛生芽
Fig.2 Clump shoot by inoculated *Brassica oleracea* var. *capitata* DH plant root segments to co-culture medium containing NAA with different mass concentrations after 3 weeks

上述结果表明,根段外植体在 MS+1.0 mg/L 2,4-D+4.5 mg/L 6-BA 培养基上预培养 3 d 会抑制愈伤和不定芽形成,不利于根段再生植株培养;而选用 MS+0.030 mg/L NAA+4.5 mg/L 6-BA+6 mg/L AgNO₃ 培养基直接进行共培养,可获得根段诱导培养的最佳效果。

2.3 根龄对甘蓝 DH 植株根段再生培养的影响

根龄对甘蓝 DH 植株根段再生培养的影响如表 2 所示。由表 2 可知,根龄对甘蓝 DH 植株根段的诱导分化具有不同的影响。从诱导愈伤的结果可以看出,3 个不同根龄处理之间存在显著性差异,但不

同根龄根段普遍都能诱导形成健康愈伤,其中根龄 20 d 的外植体愈伤诱导率最高,达 96.0%。从外植体诱导率和不定芽诱导率结果可以看出,不同根龄处理之间也存在显著性差异,2 种诱导率均表现为根龄 20 d 的外植体最高,分别为 84.0%和420.0%,并且愈伤分化芽点多,芽点周围褐化少,芽健壮(图 3);而根龄 25 d 外植体诱导率和不定芽诱导率均最低,分别为 30.0%和 154.0%。由此表明,不需要预培养,直接在 MS+0.030 mg/L NAA+4.5 mg/L 6-BA+6 mg/L AgNO₃ 培养基上选用 20 d 根段培养诱导效果最好。

表 2 根龄对甘蓝 DH 植株根段再生培养的影响

Table 2 Effect of root age on culture regeneration of <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> root segments of DH plants								
根龄/d Root age	接种外植体数 Inoculation of explants	愈伤组织数 The number of callus	愈伤诱导率/% Callus induction rate	诱导不定芽外植体数 Number of explants to induce adventitious buds	外植体诱导率/% Explant induction rate	不定芽总数 No. of adventitious buds	不定芽诱导率/% The induction rate of adventitious buds	植株再生率/% Plant regeneration rate
15	50	43	86.0 bB	19	38.0 bB	132	264.0 bB	100
20	50	48	96.0 aA	42	84.0 aA	210	420.0 aA	100
25	50	39	78.0 cC	15	30.0 cC	77	154.0 cC	100



图 3 甘蓝 DH 植株 20 d 根段诱导培养 40 d 分化的不定芽

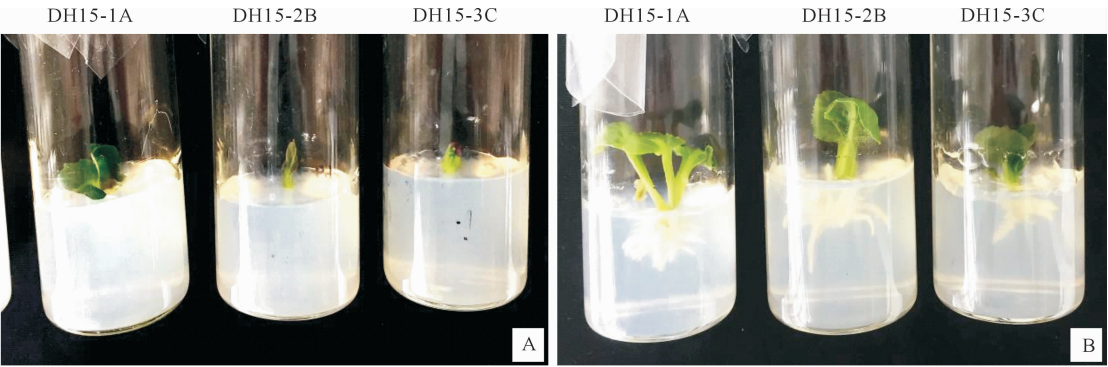
Fig.3 Induced differentiation of adventitious buds of 20 d *Brassica oleracea* var. *capitata* DH plants root segments after 40 d culture

2.4 甘蓝不同基因型 DH 植株根段的诱导分化和植株再生

甘蓝不同基因型 DH 植株根段的诱导分化和植株再生如表 3 所示。由表 3 可知,甘蓝 DH 植株基因型不同,其根系再生诱导分化能力也不同。3 种基因型 DH 植株根系间诱导分化结果存在极显著差异,愈伤诱导率、外植体诱导率和不定芽诱导率均以 DH15-2B 基因型最高,分别达到 83.3%,76.7%和 430.0%;而基因型 DH15-3C 的以上 3 种诱导率均最低,分别为 36.7%,33.3%和 226.7%。可见,甘蓝基因型是影响根系再生植株的一个主要因素。待 3 种基因型甘蓝根段诱导的不定芽生长至 2~3 cm 时,将不定芽从基部切下(图 4-A),转至生根培养基 MS+0.1 mg/L NAA 上培养 2 周后,均可逐渐长出根系形成再生植株(图 4-B)。

表 3 甘蓝不同基因型 DH 植株根段的诱导分化和植株再生

Table 3 Differentiation and plant regeneration of different genotypes of <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> DH plant root segments								
不同基因型 DH 株 DH strains of different genotypes	接种外植体数 No. of inoculated explant material	愈伤组织数 Callus number	愈伤诱导率/% Callus induction rate	诱导不定芽外植体数 No. of explants induced	外植体诱导率/% Explant induction rate	不定芽总数 No. of adventitious buds	不定芽诱导率/% Adventitious bud induction rate	植株再生率/% Plant regeneration rate
DH15-1A	30	17	56.7 bB	15	50.0 bB	103	343.3 bB	100
DH15-2B	30	25	83.3 aA	23	76.7 aA	129	430.0 aA	100
DH15-3C	30	11	36.7 cC	10	33.3 cC	68	226.7 cC	100



A. 培养 0 周;B. 培养 2 周

A. Culture for 0 week;B. Culture for two weeks

图 4 甘蓝 3 种基因型 DH 植株根系再生诱导的植株

Fig. 4 *Brassica oleracea* var. *capitata campestris* plants with 3 genotypes of DH plants induced by root regeneration

3 讨 论

甘蓝根系的形成是由成熟种子萌发促使胚根生长发育而来,或经不定芽扦插和组织培养使其基部细胞分化产生根系。甘蓝根系与其他双子叶植物相同,是由主根和须根两部分组成,每条根均由根尖结构、初生结构和次生结构组成,分生组织的细胞分裂、生长和分化促使了根系的伸长生长。甘蓝根系细胞与茎叶细胞均具有全能性,但对于植株不同部位的器官或细胞能否表现出全能性取决于是否具有适宜的诱导激素等诸多因素。据前人对甘蓝^[21-24]、甘蓝型油菜^[25-26]、番茄^[27]、黄瓜^[28]、小麦^[29]、玉米^[30]等植株再生的研究报道,外植体分化诱导是在一定质量浓度细胞分裂素 6-BA 存在下,再添加适当比例生长素,如 NAA 才能有效诱导分化,两者合理配制才能有较高的诱导率。本试验研究得出,在 4.5 mg/L 6-BA 和 0.030 mg/L NAA 共同作用下,甘蓝根系再生植株的愈伤诱导率可达 100.0%,外植体诱导率、不定芽诱导率分别可达 90.0%和 430.0%,均为最高值,这一结论证明甘蓝根系再生与其他植物一样,激素种类及其含量配比起主导作用。

利用甘蓝根段再生植株的相关研究比较少见,仅有何玉科等^[20]研究得出,利用 MS 培养基培养 14 d 的甘蓝无菌苗根段,在含有 KT 和 NAA 的培养基上培养后根段全部增粗肿大,认为 7.0 μ mol/L KT 配合 0.5 μ mol/L NAA 可促进根段分化,但未见诱导出再生植株。而本试验得出,在一定质量浓度 6-BA 下,适宜的 NAA 含量才是诱发根段出芽的主要因素,在含 4.5 mg/L 6-BA 的 MS 培养基中中添加 0.030 mg/L NAA,更有利于促进根段分化,其外植体诱导率为 90.0%。

甘蓝植株的根龄与苗龄和叶龄一样,对诱导再生植株均有显著影响。黄小云等^[22]研究表明,甘蓝苗龄偏小(7 d)或偏大(12 d),都不适宜甘蓝叶片不定芽再生。刘晓庆等^[25]以甘蓝型油菜的下胚轴为外植体,研究得出 7 d 苗龄的下胚轴再生频率最高,可达 35.83%。王艳等^[26]试验表明,甘蓝型油菜苗龄也是影响芽分化的重要因素之一,以低龄幼苗的下胚轴为外植体更有利于芽的分化,可得到较高的再生频率。本研究认为,甘蓝 DH 植株不同根龄的根段再生植株同样具有显著性差异,根龄 20 d 外植体的诱导率高达 84.0%,显著高于根龄 15 和 25 d 外植体。由此说明,根龄也是影响甘蓝植株再生的一个重要因素,适宜的根龄有助于提高植株再生率。

不同基因型材料在相同的培养条件下植株再生效率差异很大。李会珍等^[31]以甘蓝型油菜无菌苗子叶为外植体,研究基因型对油菜子叶外植体再生频率的影响,发现基因型对植株再生的影响达极显著水平。刘凡等^[32]以结球白菜的下胚轴为试材,研究发现基因型影响外植体的分化。本试验得出,甘蓝 DH 植株 3 种基因型的根系再生植株同样存在极显著差异,甘蓝 DH 植株基因型主要决定着根系再生植株的效果。以不同基因型甘蓝的带柄子叶、子叶、下胚轴等作为外植体时,不同的培养基激素浓度配比对不定芽诱导效果的影响均有差异^[33]。李贵等^[34]以甘蓝 CMS 系的下胚轴为外植体,所得最高外植体诱导率为 73.8%,远低于本研究的最高外植体诱导率(90.0%);张强^[35]以甘蓝 DH 系子叶-子叶柄为外植体,在不同质量浓度 6-BA 与 NAA 激素组合的 MS 分化培养基上诱导芽苗分化,外植体诱导率最高为 88.89%,与本研究的最高外植体诱导率接近。同时,与甘蓝带柄子叶、子叶、下胚轴的增

殖系数(3.69,4.125和3.45)^[12]相比,本研究中甘蓝根段的不定芽诱导率最高可达430.0%。因此,本研究认为,可将甘蓝根段再生体系广泛应用于DH株系的扩繁中。虽然甘蓝根段培养可显著提高分化率,但较易形成玻璃化苗,且再生率因材料基因型不同而差异较大,后期可继续调整合适的激素配比来适应不同的DH系基因型。

4 结 论

1)甘蓝根段直接采用共培养分化培养基MS+0.030 mg/L NAA+4.5 mg/L 6-BA+6 mg/L AgNO₃进行培养,可达到根段诱导培养的最佳效果。2)根龄对甘蓝DH植株根段的诱导分化效果存在显著差异,在MS+0.030 mg/L NAA+4.5 mg/L 6-BA+6 mg/L AgNO₃培养基上选用20 d根段培养的诱导效果最好。3)供试3种基因型甘蓝DH植株根系间的诱导分化结果存在极显著差异,表明甘蓝基因型是影响根系再生植株的一个主要因素。

[参考文献]

[1] 高海娜,张恩慧,李殿荣,等.甘蓝一代杂种纯度SSR鉴定与田间鉴定的一致性研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2012,40(5):117-122.
Gao H N,Zhang E H,Li D R,et al. Research on SSR molecular marker identification technique of hybrids purity in cabbage [J]. Journal of Northwest A&F University(Nat Sci Ed),2012,40(5):117-122.

[2] 高海娜,王朝阳,张恩慧.甘蓝胚状体诱导成苗因素研究[J].北方园艺,2014(1):97-101.
Gao H N,Wang Z Y,Zhang E H,et al. Screening of callus induction medium of *platycodon grandiflorum* anther [J]. Northern Horticulture,2014(1):97-101.

[3] 张恩慧,杨安平,许忠民,等.甘蓝游离小孢子培养技术体系的研究[J].陕西农业科学,2016,62(10):8-10.
Zhang E H,Yang A P,Xu Z M,et al. Study on the technical system of microspore culture in *Brassica* [J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences,2016,62(10):8-10.

[4] 张恩慧,欧承刚,许忠民,等.甘蓝花药培养胚状体诱导形成影响因子研究[J].西北植物学报,2006(11):2372-2377.
Zhang E H,Ou C G,Xu Z M,et al. Factors effecting embryoid induction and formation of cabbage anthers in culture [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2006(11):2372-2377.

[5] 张恩慧,程芳芳,杨安平,等.株龄、栽培环境及温度对甘蓝小孢子诱导出胚的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(1):120-124.
Zhang E H,Cheng F F,Yang A P,et al. Influence of plant age, cultivation environment and temperature on cabbage embryo

induction by isolated microspore culture [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed),2014,42(1):120-124.

[6] 董韩,张恩慧,许忠民,等.甘蓝DH株自交后代2个变异株群差异性分析[J].西北农业学报,2015,24(5):89-96.
Dong H,Zhang E H,Xu Z M,et al. Difference analysis on two variant group from self-crossed progeny of DH plant in cabbage [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,2015,24(5):89-96.

[7] 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 A P,Zhang E H,Zheng A Q,et al. Effects of colchicine on embryogenesis and development of isolated microspore in *Brassica oleracea* var. *capitata* [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed),2010,38(8):131-137.

[8] 杨安平,张恩慧,王莎莎,等.甘蓝类蔬菜小孢子培养研究进展[J].中国农学通报,2008(7):332-335.
Yang A P,Zhang E H,Wang S S,et al. The advances of studies on microspore culture in cabbage vegetables [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2008(7):332-335.

[9] 马勇斌,张恩慧,李殿荣,等.利用甘蓝游离小孢子不定芽叶片再生DH植株技术研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2011,39(4):111-116.
Ma Y B,Zhang E H,Li D R,et al. Study on plantlet regeneration technique of DH lines with leaf of adventitious buds from isolated microspore culture in cabbage (*Brassica oleracea* L.) [J]. Journal of Northwest A&F University(Nat Sci Ed),2011,39(4):111-116.

[10] 石晓云.结球甘蓝的组织培养与快繁研究[J].安徽农业科学,2010,38(32):18077-18078.
Shi X Y. Study on tissue culture and rapid propagation of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences,2010,38(32):18077-18078.

[11] 赵军良,李昌华,李小川,等.结球甘蓝组织培养再生植株及玻璃苗的防治[J].山西大学学报(自然科学版),1995(1):52-58.
Zhao J L,Li C H,Li X C,et al. Tissue culture of *Brassica oleracea* and the prevention and control of glass seedlings [J]. Journal of Shanxi University (Nat Sci Ed),1995(1):52-58.

[12] 邵登魁.早中晚熟结球甘蓝不同部位组织的再生特性[J].西北农业学报,2012,21(12):125-130.
Shao D K. Study of regeneration characteristics about different tissues of different mature type cabbages [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,2012,21(12):125-130.

[13] 金国良,张恒庆.六种甘蓝下胚轴和子叶无性系建立的研究[J].河南大学学报(自然科学版),2006(3):76-79.
Jin G L,Zhang H Q. The research on the clone construction about hypocotyl and cotyledon of six kinds of *Brassica oleracea* [J]. Journal of Henan University(Natural Science),2006(3):76-79.

[14] 蒙大庆,袁代斌,张跃非,等.体细胞组织培养用于甘蓝型油菜核三系保持系绵7MB-1亲本繁殖与F₁制种的研究[J].西南

- 农业学报,2008(3):586-589.
- Meng D Q, Yuan D B, Zhang Y F, et al. Study and application on reoroduction of amale sterility line and F₁ hybrid line with cell tissue culture method in a new rapeseed breeding material Mian7MB-1 (*B. napus* L.) [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2008(3):586-589.
- [15] 何雍琴,迟淑娟,杨正安,等. 不同浓度 6-BA 和 AgNO₃ 对甘蓝叶片不定芽分化的影响 [J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2011, 26(3):345-347, 363.
- He Y Q, Chi S J, Yang Z A, et al. Effect of 6-BA and AgNO₃ on shoot regeneration of cabbage leaf [J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2011, 26(3):345-347, 363.
- [16] 张高翔,张恩慧,许忠民,等. 春甘蓝腋芽叶片离体培养及植株再生技术研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(5):166-170, 177.
- Zhang G X, Zhang E H, Xu Z M, et al. Tissue culture and plantlet regeneration of the axillary bud's leaf on spring cabbages [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2009, 37(5):166-170, 177.
- [17] 刘莹莹,张恩慧,许忠民,等. 甘蓝小孢子胚状体分化不定芽再生植株的研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(8):149-154.
- Liu Y Y, Zhang E H, Xu Z M, et al. Adventitious bud regeneration plant differentiation from cabbage microspore embryoid [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2013, 41(8):149-154.
- [18] 李琳,张雪梅,李旭峰,等. 球茎甘蓝花托花柄组织培养及其植株再生 [J]. 四川大学学报(自然科学版), 1999(2):171-173.
- Li L, Zhang X M, Li X F, et al. Tissue culture and plant regeneration of flower bud of *Brassica* [J]. Journal of Sichuan University (Nat Sci Ed), 1999(2):171-173.
- [19] 孟志卿,徐东生,王继珍. 羽衣甘蓝组织培养研究 [J]. 武汉大学学报(理学版), 2005(S2):273-277.
- Meng Z Q, Xu D S, Wang J Z, et al. Study on tissue culture of *Brassica oleracea* var. *acephala* f. *tricolor* [J]. Journal of Wuhan University (Natural Science Edition), 2005(S2):273-277.
- [20] 何玉科,巩振辉,王飞,等. 用甘蓝和花椰菜幼苗根段诱导再生植株 [J]. 园艺学报, 1992(1):85-86.
- He Y K, Gong Z H, Wang F, et al. Reproductive plants were induced with roots of cabbage and cauliflower seedlings [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1992(1):85-86.
- [21] 李然红,于丽杰,李晓东,等. 甘蓝组织培养中防止外植体褐化的研究 [J]. 北方园艺, 2009(11):96-99.
- Li R H, Yu L J, Li X D, et al. Study on preventing browning of explants in tissue culture of *Brassica oleracea* L. [J]. Northern Horticulture, 2009(11):96-99.
- [22] 黄小云,陶鹏,王五宏,等. 结球甘蓝离体叶片不定芽的再生研究 [J]. 浙江农业科学, 2014(1):34-38.
- Huang X Y, Tao P, Wang W H, et al. Study on regeneration of adventitious buds from leaves of cabbage [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2014(1):34-38.
- [23] 张兆功,邵登魁,李莉,等. NAA、6-BA 对不同熟性甘蓝子叶期愈伤组织诱导的影响及其丛生芽发生 [J]. 西北农业学报, 2011, 20(1):128-132.
- Zhang Z G, Shao D K, Li L, et al. Effects of NAA and 6-BA on callus induction and multiple shoots occurrence from cotyledons of different maturity cabbages [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2011, 20(1):128-132.
- [24] 郝慧玲,方智远,刘玉梅,等. 外源植物激素对甘蓝显性雄性不育材料离体快繁的影响 [J]. 热带农业科学, 2013, 33(8):29-33.
- Yan H L, Fang Z Y, Liu Y M, et al. Effects of exogenous plant hormones on *in vitro* rapid propagation of dominant genic male sterile cabbage [J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2013, 33(8):29-33.
- [25] 刘晓庆,沈源,蔡小宁,等. 甘蓝型油菜下胚轴离体培养再生植株研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(31):13547-13548, 13582.
- Liu X Q, Shen Y, Cai X N, et al. Research of the plant regeneration from hypocotyl of *Brassica napus* L. [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(31):13547-13548, 13582.
- [26] 王艳,曾幼玲,张富春,等. 新疆甘蓝型油菜下胚轴的组织培养和植株再生研究 [J]. 新疆农业科学, 2005, 42(1):24-28.
- Wang Y, Zeng Y L, Zhang F C, et al. Research on tissue culture and plant regeneration of hypocotyl in *Brassica napus* L. of Xinjiang [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2005, 42(1):24-28.
- [27] 曹慧颖,张立军,夏润玺,等. 番茄组织培养研究进展 [J]. 中国蔬菜, 2012(16):10-14.
- Cao H Y, Zhang L J, Xia R X, et al. Research progress on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) tissue culture [J]. China Vegetables, 2012(16):10-14.
- [28] 张承妹,陆家安. 黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 组织培养与诱导四倍体再生植株 [J]. 上海农业学报, 1995, 11(3):31-36.
- Zhang C M, Lu J A. Tissue culture and induction of tetraploid regeneration plants on cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Acta Agriculture Shanghai, 1995, 11(3):31-36.
- [29] 张东武,刘辉,赵惠贤,等. 小麦成熟胚组织培养再生体系的优化及高再生率基因型的筛选 [J]. 麦类作物学报, 2011, 31(5):847-852.
- Zhang D W, Liu H, Zhao H X, et al. Optimization of regeneration system of tissue culture from mature embryos and screening of wheat genotypes with high regeneration frequency [J]. Journal of Triticeae Crops, 2011, 31(5):847-852.
- [30] 林淦,周建平,刘华俊,等. 玉米植物组织培养研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(28):8797-8798.
- Lin G, Zhou J P, Liu H J, et al. Research progress on plant tissue culture of maize [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(28):8797-8798.
- [31] 李会珍,张志军,周伟军,等. 基因型和 AgNO₃ 对甘蓝型油菜

- 子叶外植体植株再生的影响 [J]. 中国油料作物学报, 2003 (4): 22-24.
- Li H Z, Zhang Z J, Zhou W J, et al. Effects of genotype and AgNO₃ on plant regeneration from cotyledon explants of *Brassica napus* [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2003(4): 22-24.
- [32] 刘凡, 赵泓, 秦帆, 等. 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(3): 275-280.
- Liu F, Zhao H, Qin F, et al. The protoplast culture of *Brassica campestris* ssp. *pekinensia* and plant regeneration via somatic embryo genesis [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2006 (3): 275-280.
- [33] 赵秀枢, 李名扬, 张文玲, 等. 观赏羽衣甘蓝高频再生体系的建立 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(1): 141-148.
- Zhao X S, Li M Y, Zhang W L, et al. Establishment of high adventitious shoot regeneration system of *Ornamental kale* [J]. Genomics and Applied Biology, 2009, 28(1): 141-148.
- [34] 李贵, 陶鹏, 李必元, 等. 结球甘蓝离体下胚轴不定芽再生研究 [J]. 浙江农业科学, 2012(12): 1644-1647, 1652.
- Li G, Tao P, Li B Y, et al. Study on adventitious bud regeneration of hypocotyl in cabbage [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2012(12): 1644-1647, 1652.
- [35] 张强. 8398 甘蓝 DH 系组织培养和植株再生体系的初步研究 [C]// 河南省植物生理学会. 河南省植物生理学会三十周年庆典暨学术研讨会论文集. 郑州: 河南省植物生理学会, 2010: 5.
- Zhang Q. The Preliminary study on tissue culture and plant regeneration of cabbage “8398” DH line [C]// Henan Society for Plant Physiology. The 30th anniversary ceremony and symposium Henan Institute of Plant Physiology. Zhengzhou: Henan Institute of Plant Physiology, 2010: 5.
-
- (上接第 102 页)
- [17] 乔永旭. 黄瓜和黑籽南瓜幼苗根系边缘细胞对肉桂酸胁迫的应答差异 [J]. 园艺学报, 2015, 42(5): 890-896.
- Qiao Y X. Studies on different response of cinnamic acid to root border cells in cucumber and figleaf gourd seedlings [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42(5): 890-896.
- [18] 李小方, 张志良. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2016: 28-31.
- Li X F, Zhang Z L. Experimental guidance in plant physiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2016: 28-31.
- [19] Pan J W, Ye D, Wang L L, et al. Root border cell development is a temperature-insensitive and Al-sensitive process in barley [J]. Plant and Cell Physiology, 2004, 45(6): 751-760.
- [20] Qiao Y X, Zhang Y P, Zhang H X, et al. Developmental characteristics and cinnamic acid resistance of root border cells in cucumber and figleaf gourd seedlings [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2013, 12(11): 2065-2073.
- [21] 刘婷婷, 李锋, 张曦, 等. 铜离子胁迫下玉米根边缘细胞数量及存活率 [J]. 植物生理学报, 2012, 48(7): 669-675.
- Liu T T, Li F, Zhang X, et al. The number and survival rate of corn root border cells under the stress of copper ions [J]. Plant Physiology Journal, 2012, 48(7): 669-675.
- [22] 冯英明, 喻敏, 温海祥, 等. 铝对豌豆根边缘细胞存活率和粘胶层厚度的影响 [J]. 生态环境, 2005, 14(5): 695-699.
- Feng Y M, Yu M, Wen H X, et al. Influence of Al on cell viability and mucilage of root border cells of pea (*Pisum sativum*) [J]. Ecology and Environment, 2005, 14(5): 695-699.
- [23] 胡忠良, 王亚男, 马丹炜, 等. 玉米根边缘细胞 exDNA 和胞外蛋白对土荆芥化感胁迫的缓解效应 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(10): 1962-1970.
- Hu H L, Wang Y N, Ma D W, et al. The alleviate effect of extracellular DNA and protein in maize root border cells on the allelochemical stress from *Chenopodium ambrosioides* L. [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(10): 1962-1970.
- [24] Drirouich A, Follet-Gueye M L, Vitré-Gibouin M, et al. Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2013, 16(4): 489-495.