

花椰菜雄性不育系组培快繁及无糖培养技术

吴丽芳, 蒋亚莲, 张艺萍, 崔光芬

(云南省农业科学院 花卉研究所, 云南 昆明 650205)

摘要:以花椰菜雄性不育亲本的花球为外植体, 进行组培快繁及无糖生产技术的研 究。结 果表明: 在 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L 的培养基上诱导, 25 d 时不定芽的分化率达到 96%, 继代增殖在 MS+BA 0.6 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的培养基效果最好, 增殖率可达 4.25 倍。 无糖组织培养的培养基为 MS 无机成分+NAA 0.1, 光照 4 000 lx, CO₂ 浓度 1 000 mL/L, 11 d 可 大量生根。通过上述方法, 1 个花球, 在 4 个月可生产上万株组培苗, 是一种高效快速的方法。

关键词: 花椰菜; 雄性不育系; 不定芽; 继代增殖; 无糖组织培养

中图分类号: S 635.303.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)06-0057-02

花椰菜的杂交育种, 主要通过选育自交不亲和系和 雄性不育系来实现, 但通过选育自交不亲和系育种存在 繁殖亲本费工、制种成本高且后代退化严重的问题。采 用培育雄性不育系的方法配制杂种一代, 能很好的解决 上述问题, 该方法已在大白菜、萝卜、甘蓝、油菜等十字 花科蔬菜成功的应用^[1]。组培快繁技术具有保持亲代 特性且繁殖快、子代量多的特点, 已在多种植物的种苗 快繁中广泛应用^[2]。植物无糖组织培养技术, 是指在植 物组织培养中改变植株生长所需的碳源, 使用不含糖的 培养基, 通过控制组培苗的生长环境主要是 CO₂ 浓度和 光照强度、采用透气性好的基质制作无糖培养基、促进 植株进行光合作用, 使试管苗由兼养型转变为自养型, 培育壮苗的组织培养新技术, 此技术可减少污染, 降低 成本^[3]。无糖组培技术在灯盏花和彩色马蹄莲上已有 应用并获得较好的效果^[4,5], 但在蔬菜方面应用较少, 特 别是在花椰菜上还未见有报道。该研究结果不仅可用于 自交不亲和系和雄性系的繁殖, 而且可用于其它作物 良种的组培快繁。

1 材料和方法

试验材料由云南省农业科学院热带经济研究所提 供。取 5~7 cm 的花球为外植体。

1.1 外植体的灭菌

将花球切成 1 cm×1 cm 左右的小块, 在 0.1% 的 HgCl₂ 溶液消毒 12 min, 再在 2% 的次氯酸钠溶液中消

毒 10 min, 用无菌水充分漂洗 2~3 次, 接种在诱导培养 基中。

1.2 培养基配方

以 MS 为基本培养基, 有糖培养糖浓度为 3.0%, 琼 脂为 6 g/L, 激素单位为 mg/L。

1.2.1 诱导培养基 (1)BA 1.0+ NAA 0.3; (2)BA 2.0+NAA 0.3; (3)BA 1.0+ NAA 0.3+2, 4-D 0.5; (4) BA 2.0+NAA 0.3+2, 4-D 0.5。

1.2.2 继代增殖培养基 (1)BA 0.3+NAA 0.1; (2) BA 0.6+NAA 0.1; (3)BA 1.2+NAA 0.1。

1.2.3 生根培养 (1)NAA 0.1; (2)NAA 0.3+IAA 0.2。对上述 2 组生根配方分别进行常规的以琼脂为凝 固剂的有糖生根培养和以蛭石为基质不用添加糖而是 增加光照强度和 CO₂ 浓度的无糖生根培养(无糖培养时 MS 养分和激素与蛭石按 1:2 混合)。

1.3 培养条件

温度在 25~27 ℃, 有糖培养光照为 2 000 lx, 无糖培 养的光照强度为 4 000 lx, CO₂ 浓度为 1 000 mL/L, 培养 的前 5 d 内不通气, 5 d 后的气体流量为 2 L/min。

2 结果与分析

2.1 从花椰菜的花序诱导不定丛芽

在诱导培养基中培养 1 周后, 开始从小花序基部分 化出叶片, 再继续培养 2~3 周, 很多的花序直接转化为 丛状不定芽。在 4 种诱导培养基上的诱导结果详见表 1。 由表 1 可知, 分化率和变异率随 BA 浓度的增加而增加, 添加 2, 4-D 会降低分化率, 增加变异率。在培养基(1)上 的诱导率为 92%, 变异率最低, 只为 1.08%, 而且出芽的 时间相对较短; 在培养基(2)、(3)、(4)上, 也有较高的不 定丛芽分化率, 但变异率较高, 表现为分化出的叶、芽形 态异常, 部分无叶柄或茎秆扁平畸形。在添加了 2, 4-D 的 2 组培养基中, 有愈伤组织的产生, 诱导率相对降低, 且

第一作者简介: 吴丽芳(1966-), 女, 云南建水县人, 硕士, 副研究 员, 现主要从事园艺作物的育种及快繁技术研究工作。E-mail: wllf6601@163.com。

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(2007BAD45B0 2); 云南省 人才引资助项目(2006PY04)。

收稿日期: 2008-12-20

变异率增加。从增殖率、变异率、诱导时间、出芽率等各个方面综合来看,培养基(1)BA 1.0+NAA 0.3 是最佳的诱导培养基。

表 1 花椰菜在不同培养基中的诱导效果

培养基	接种外植体数/个	初始出芽时间/d	60%分化时间/d	分化率/%	平均每块出芽数/个	形态变异率/%
(1)	25	10	16.8	92	7.4	1.08
(2)	25	11	17.4	96	7.6	4.10
(3)	25	11	16.5	85	6.3	4.39
(4)	25	13	16.2	82	5.9	6.96

2.2 不定芽的继代增殖

在诱导培养基中获得的不定丛生芽,分切后分别转接到不同的继代增殖培养基上进行增殖培养,经过2~3次转接继代,各培养基中增殖率、苗高、丛生变异(表现基部扁平呈“扫把状”连体、叶不对生、畸形等)的表现情况,详见表2。在培养基(1)中,芽生长快,但增殖率较低,为2.34,苗的形态正常,并有无定根的产生;在培养基(2)中,不定芽的增殖率为4.25,苗高2.4 cm,丛生变异率为2.62%,在(3)培养基中,不定芽的增殖率高,苗高为1.54 cm,丛生变异率高达8.59%。从优质高效的角度讲,培养基(2)是适宜进行增殖继代的培养基,后期

在此培养基上进行了半年的继代,苗的增殖,长势均保持良好。

表 2 继代培养基筛选结果

培养基	增殖率/倍	丛生变异率/%	苗高/cm	备注
(1)	2.34	1.21	3.12	多数苗长根
(2)	4.25	2.62	2.40	约25%的苗长根
(3)	4.69	8.59	1.54	长根苗少,变异多

2.3 生根培养及过渡

将在继代培养中获得的高2.0~2.5 cm的小苗进行有糖和无糖的生根培养,结果见表3。在有糖培养中,12 d后才开始生根,且生根率较低,根量及整个根系状况均不如无糖培养,植株叶色稍黄。使用无糖培养时在2组生根培养基中均表现为生根率高,植株健壮,叶片浓绿,根系发达,在生根培养8 d时就开始生根,而且叶面积较大,在无糖培养中,2种培养基都可以用于无糖生根培养,但总体表现培养基(2)较(1)稍好。在过渡移栽时,要特别注意前期遮荫和保湿,需加盖2~3层遮荫网,并隔2~3 h进行喷雾加湿,10 d后只在中午光照强时盖1层遮荫网。无糖苗过渡移栽平均成活率可达94.4%,而有糖培养平均只有74.9%,提高了19.5%。

表 3 不同培养基及培养方法对花椰菜生根及移栽成活率的影响

培养基	基质	生根率/%	>0.5 cm 叶片数/个	主根/条	>0.5 cm 须根数/条	移栽成活率/%	备注
NAA 0.1+3%糖	琼脂	58.7	无	2.9	4.7	72.3	苗高,叶色稍黄
NAA 0.3+IAA 0.2+3%糖	琼脂	73.4	0.6	3.1	5.1	77.5	苗高,叶色稍黄
MS+NAA 0.1(无糖)	蛭石	95.4	2.2	4.2	12.2	94.1	叶色浓绿,苗健壮,根系发达
MS+NAA 0.3+IAA 0.2(无糖)	蛭石	98.7	2.4	4.8	13.4	94.7	叶色浓绿,苗健壮,根系发达

3 分析与讨论

在组培生产中激素种类和浓度是关键,在花椰菜的诱导中,不需要愈伤组织诱导的过程可直接产生不定芽。组培中添加2,4-D会增加变异,在花椰菜和其它作物组培时应慎重。研究采用国际先进、国内领先的无糖组织培养新技术,通过增加CO₂浓度和提高光照强度,缩短生根时间4 d、提高了移栽成活率19.5%,提高组培苗的质量。这在国内还是首次报导。

试验以花椰菜雄性不育系的花球为材料,在短时间内生产出大量的种性一致的种苗用于制种,这一方法不仅可为选育种工作中获得优良单株的快速繁殖提供有

力的手段,而且可对单倍体培养获得纯化原种进行快繁,可以加快新品种的选育和推广进程。

参考文献

[1] 陶兴林,胡立敏.花椰菜雄性不育材料的鉴定和繁殖[J].农业科技通讯,2008(2):54-55.
[2] 李俊明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业出版社,1992.
[3] 赵江雷,李显石.植物无糖组织培养技术[J].吉林蔬菜,2007(6):14-15.
[4] 杨凯,王荔,杨艳琼,等.灯盏花不定芽无糖生根培养的微环境调控技术研究[J].云南农业大学学报,2007,22(3):319-322.
[5] 屈云慧,熊丽,张素芳.彩色马蹄莲组培苗无糖组培生根培养的环境控制[J].植物资源遗传学报,2004,5(2):166-169.

Rapid Propagation and Sugar-free Tissue Culture for Male-sterile Line Cauliflower

WU Li-fang, JIANG Ya-lian, ZHANG Yi-ping, CUI Guang-fen

(Flower Research Institute of Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650205 China)

Abstract: Used flower ball of Male-sterile line cauliflower as the explants for tissue culture and sugar-free technological research. The results showed that; when Induced 25 d differentiation rate of adventitious bud in the MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L was 96%. The best medium of subculture was MS+BA 0.6 mg/L+NAA 0.1 mg/L. The proliferation rate was 4.25 times. The medium of sugar-free tissue culture was MS inorganic component +NAA 0.1. At light 4 000 lx and CO₂ concentrations 1 000 mL/L, 11 d could be substantial root. Through this method, a flower ball, in the 4 months can produce more than 10 000 plantlets, this was a highly effective method.

Key words: Male-sterile line cauliflower; Adventitious buds; Subculture proliferation; Sugar-free tissue culture