

青花菜离体再生体系研究

符庆功, 吴慧敏, 胡 颖

(浙江农林大学 农业与食品科学学院, 浙江 临安 311300)

摘 要:以“碧冠”、“谊和80”和“幸运”3个青花菜品种带柄子叶与下胚轴为材料,探讨了激素组合、苗龄及 AgNO_3 浓度等因素对外植体不定芽分化再生的影响。结果表明:在 $\text{MS}+\text{NAA } 0.1 \text{ mg/L}+\text{6-BA } 2.0 \text{ mg/L}+\text{AgNO}_3 4.0\sim 6.0 \text{ mg/L}$ 培养基上,“谊禾80”4 d龄无菌苗的下胚轴和6 d龄带柄子叶可以获得较高的分化率(92.5%和85%);3个品种再生芽在 $\text{MS}+\text{IBA } 0.2 \text{ mg/L}$ 生根培养基上生根率达95%以上。

关键词:青花菜;再生体系;下胚轴;带柄子叶

中图分类号: Q 949.784.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)21-0150-03

青花菜(*Brassica oleracea* L. var. *italica*. Planch)是十字花科芸薹属甘蓝类蔬菜,俗称西兰花、绿菜花,以绿色花球为产品,含有丰富的维生素、胡萝卜素和矿物质,营养价值高,具有防癌功能,是一种高档绿色保健蔬菜。生物技术发展为利用单倍体诱导^[1]、突变体筛选^[2]等方法选育和转化外源优良性状基因,改良和创造种质资源,培育优良品种提供了新的途径,植株高效离体再生体系建立是获得成功的基础。目前,青花菜的遗传转化研究已有一些报道^[3-4],但转化率普遍较低。该试验以“碧冠”、“谊和80”和“幸运”3个青花菜品种为材料,以无菌苗带柄子叶和下胚轴为外植体,对影响不定芽分化的一些因素进行探讨,旨在提高分化频率,建立高效的再生体系,为青花菜外源基因转化、单倍体和多倍体诱导等研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

青花菜品种“谊禾80”、“碧冠”、“幸运”均购自杭州市种子公司。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 选取籽粒饱满的青花菜种子,用75%乙醇浸泡30 s,0.1% HgCl_2 溶液表面消毒10 min,无菌水冲洗4~5次,播种于MS基本培养基上,培养适宜苗龄无菌苗备用。

1.2.2 外植体切取及影响不定芽诱导分化因素研究

从无菌苗子叶节上方切取带叶柄1~2 mm的子叶,下胚轴切成0.5~1.0 cm小段,外植体均水平接种于添加不同激素配比的分化培养基上,每个处理40个外植体,观察不定芽诱导分化和植株再生情况,30 d后统计不定芽的分化频率。在 $\text{MS}+\text{NAA } 0.1 \text{ mg/L}+\text{6-BA } 2.0 \text{ mg/L}$ 分化培养基上,以4~10 d无菌苗带柄子叶和下胚轴为试材,比较苗龄对外植体分化率的影响。在此基础上,在上述分化培养基中加入 $\text{AgNO}_3 0\sim 8.0 \text{ mg/L}$,研究 AgNO_3 对带柄子叶和下胚轴分化率的影响。

1.2.3 生根培养及驯化移栽 分离高度大于1.5 cm的不定芽,进行诱导生根,培养基中分别添加IAA、IBA、NAA等不同浓度生长素。形成根系后,开瓶练苗48~72 h,洗净根部附着的培养基,移入蛭石和泥炭为基质的营养钵中,遮荫处理,成活后移栽至大田。

1.2.4 培养条件 以MS培养基为基本培养基,添加不同浓度及种类激素及 AgNO_3 ,进行不定芽诱导分化和植株再生。培养基蔗糖浓度30 g/L,琼脂为7 g/L,灭菌前调整pH 5.8,121℃灭菌15 min。培养温度(25±1)℃,光强为2 500~3 000 lx,光照时间16 h/d。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对子叶和下胚轴不定芽分化率的影响

切取6 d苗龄无菌苗带柄子叶、下胚轴分别接种于分化培养基上进行不定芽诱导分化。由表1可知,3个品种带柄子叶和下胚轴在不同分化培养基上诱导分化率在17.5%~85.0%,相同激素配比条件下不同品种外植体不定芽分化率有较大差异。当NAA为0.1 mg/L时,带柄子叶及下胚轴外植体不定芽分化率分别最高达

第一作者简介: 符庆功(1975-),男,硕士,讲师,现主要从事蔬菜种质资源与遗传育种方向研究工作。E-mail: fuqinggong@163.com。

基金项目: 浙江省教育厅优秀青年教师资助项目(2273000001)。

收稿日期: 2010-07-19

到 85.0%和 75.0%，随着 NAA 质量浓度增加或减小其再生频率均降低。在 NAA 为 0.1 mg/ L、6-BA 为 1.0 mg/ L 时，“幸运”子叶和下胚轴不定芽分化率最高，分别达到 77.5%和 75.0%，“碧冠”下胚轴分化率最高达到 72.5%；在 NAA 为 0.1 mg/ L、6-BA 为 2.0 mg/ L 时，“谊

禾 80”子叶和下胚轴分化率最高，分别为 85.0%和 75.0%，“碧冠”子叶分化率达 80.0%。当 6-BA 浓度一定，附加 NAA 的培养基不定芽诱导率明显高于附加 IBA 的，此结果表明，生长素 NAA 和 6-BA 组合对于青花菜外植体不定芽分化效果优于 IBA 组合。

表 1

不同激素配比下青花菜带柄子叶和下胚轴不定芽分化率

6-BA/ mg · L ⁻¹	NAA/ mg · L ⁻¹	IBA/ mg · L ⁻¹	带柄子叶不定芽分化率/ %			下胚轴不定芽分化率/ %		
			谊禾 80	碧冠	幸运	谊禾 80	碧冠	幸运
0.5	0.05	—	27.5	20.0	40.0	35.0	17.5	22.5
	0.1	—	37.5	45.0	65.0	45.0	37.5	42.5
	0.3	—	30.0	22.5	42.5	32.5	32.5	35.0
1.0	0.05	—	40.0	30.0	40.0	30.0	47.5	45.0
	0.1	—	60.0	55.0	77.5	47.5	72.5	75.0
	0.3	—	37.5	35.0	57.5	32.5	52.5	50.0
2.0	0.05	—	57.5	52.5	42.5	45.0	37.5	37.5
	0.1	—	85.0	80.0	67.5	75.0	57.5	65.0
	0.3	—	72.5	67.5	52.5	55.0	42.5	50.0
4.0	0.05	—	42.5	40.0	32.5	27.5	30.0	35.0
	0.1	—	70.0	65.0	50.0	40.0	47.5	45.0
	0.3	—	57.5	52.5	40.0	35.0	37.5	30.0
2.0		0.05	22.5	30.0	20.0	42.5	35.0	32.5
		0.1	32.5	47.5	37.5	40.0	60.0	45.0
		0.3	27.5	42.5	40.0	30.0	40.0	52.5

2.2 苗龄对子叶和下胚轴不定芽分化率的影响

分别切取种子萌发后 4~10 d 苗龄的无菌苗带柄子叶和下胚轴接种到分化培养基上。结果表明，苗龄对青花菜外植体不定芽分化率有影响。随着苗龄的增大带柄子叶分化率逐步升高，6 d 苗龄分化率达到最高，后随着苗龄继续增大，分化率逐步降低；下胚轴分化率以 4 d 苗龄最高，后逐渐下降。

表 2

不同苗龄子叶和下胚轴的不定芽分化率

苗龄/ d	带柄子叶分化率/ %			下胚轴分化率/ %		
	谊禾 80	碧冠	幸运	谊禾 80	碧冠	幸运
4	77.5	70.0	65.0	77.5	60.0	67.5
6	85.0	82.5	70.0	72.5	57.5	65.0
8	77.5	80.0	67.5	70.0	55.0	57.5
10	70.0	65.0	62.5	62.5	50.0	52.5

2.3 AgNO₃ 浓度对不定芽的诱导分化的影响

由表 3 可知，AgNO₃ 对青花菜子叶和下胚轴培养诱导不定芽分化有明显促进效果，与对照相比，加入 AgNO₃ 处理的不定芽的分化率最高有 10%的增长。在加入 AgNO₃ 4.0~6.0 mg/ L 时，3 个品种的子叶和下胚轴

表 3

不同 AgNO₃ 浓度条件下外植体不定芽分化率

AgNO ₃ / mg · L ⁻¹	带柄子叶分化率/ %			下胚轴分化率/ %		
	谊禾 80	碧冠	幸运	谊禾 80	碧冠	幸运
0	85.0	80.0	70.0	77.5	60.0	65.0
2	87.5	82.5	72.5	80.0	62.5	67.5
4	92.5	85.0	80.0	82.5	67.5	70.0
6	87.5	80.0	75.0	85.0	62.5	65.0
8	80.0	75.0	67.5	80.0	57.5	62.5

不定芽分化率分别达到最高值，但随着 AgNO₃ 浓度继续增大，外植体不定芽分化率有所下降。在试验中同时观察到 AgNO₃ 浓度增加到 6.0 mg/ L 以上时，形成的不定芽较多玻璃化和畸形，因此认为较为适宜的 AgNO₃ 添加量为 4.0 mg/ L。

2.4 生长素对生根的影响

在生根培养基上，不定芽接种 5~6 d 开始生根，2~3 周后大多数植株长出完整根系。比较 IAA、IBA、NAA 对不定芽生根的影响，由表 4 可知，浓度为 0.2 mg/ L 的 IBA 诱导生根效果较好，3 个品种生根率均达到 95%以上。植株生根后，开瓶练苗 48~72 h，移入蛭石和泥炭为基质的营养钵中，浇灌营养液，盖上薄膜在人工气候室内保湿培养 1 周，然后移栽至大田，大部分植株可成活。

表 4

不同生长素对不定芽生根的影响

生长素种类	生长素浓度	谊禾 80	碧冠	幸运
	/ mg · L ⁻¹	生根率/ %	生根率/ %	生根率/ %
IAA	0.1	62.5	65.0	67.5
NAA	0.1	70.0	60.0	72.5
IBA	0.1	92.5	87.5	90.0
IBA	0.2	100	95.0	100

3 结论与讨论

激素是影响植株再生的决定性因素，十字花科芸薹属植株离体再生报道中使用最多是 6-BA 和 NAA 进行组合，诱导外植体分化再生不定芽⁵⁻⁸。该试验结果亦表明，6-BA 和 NAA 的激素组合较适宜青花菜外植体离

体再生。目前芸薹属植物离体培养最广泛采用的外植体是无菌苗的带柄子叶和下胚轴, 试验中青花菜带柄子叶分化率高于下胚轴, 与李艳红等的结论一致^[9], 利用带柄子叶相对容易获得较高的分化再生频率, 很可能是由于这部分外植体带有分化能力较强的原分生细胞和子叶块营养^[10]。而苗龄通过影响细胞的生理状态使分化率呈现差异, 原因可能是某一部位的细胞在特定的生长发育周期易于进行脱分化和再分化。

Chi^[11]等首先发现培养基中添加 AgNO_3 显著促进大白菜、白菜及菜心的子叶分化再生。余小林等^[12]发现 AgNO_3 不仅能提高不定芽的诱导率, 还能克服组织培养中常见的褐化和玻璃化等问题。 AgNO_3 的作用机制尚未完全清楚, 目前一般认为 Ag^+ 是较好的乙烯活性抑制剂, 竞争性作用于乙烯作用部位, 防止外植体产生过多的乙烯对植株再生抑制。也有研究者认为, Ag^+ 使得乙烯不能干扰多胺的合成, 从而促进体细胞胚胎和不定芽发生^[13]。该试验在青花菜带柄子叶及下胚轴培养中加入 AgNO_3 4.0~6.0 mg/L 也获得了明显提高青花菜外植体不定芽分化频率的结果。

参考文献

[1] Takahata Y, Keller W A. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L [J]. Plant Sci. 1991, 74: 235-242.

[2] 陆瑞菊, 王亦菲, 孙月芳, 等. 利用青花菜单倍体茎尖筛选耐热变异体[J]. 核农学报, 2006, 20(5): 388-391.

[3] 黄科, 曹家树, 余小林, 等. CYP86MF 反义基因转化获得青花菜雄性不育植株[J]. 中国农业科学, 2005, 38(1): 122-127.

[4] YING Qin, LI Hong-ling, GUO Yang-dong. High-frequency embryogenesis, regeneration of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and analysis of genetic stability by RAPD [J]. Scientia Horticulturae, 2007, 111: 203-208.

[5] 张凤兰, 高田畑羲, 徐家炳. 大白菜子叶离体培养再生植株[J]. 园艺学报, 2002, 29(4): 348-352.

[6] 秦耀国, 雷建军, 曹必好, 等. 青花菜高效离体再生体系的建立[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2005, 27(5): 653-655.

[7] 刘乐承, 白远国. 芸薹属植物器官离体再生影响因素研究进展[J]. 长江大学学报, 2006, 3(1): 175-178.

[8] 张丽丽, 张蜀宁, 吴震, 等. 青花菜高频离体再生体系的研究[J]. 南京农业大学学报, 2008, 31(2): 41-44.

[9] 李艳红, 宋秀珍, 庄木. 青花菜组织培养再生体系的研究[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2001, 22(3): 48-53.

[10] 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.

[11] Chi G L, Barfield D G, Sim G E. Effect of AgNO_3 and aminoethoxyvinylglycine on in vitro shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant Brassica genotype [J]. Plant Cell Rep, 1990(9): 195-198.

[12] 余小林, 曹家树, 徐淑英. 改良菜心离体培养植株再生体系的研究[J]. 试验生物学报, 2001, 34(2): 158-162.

[13] 张鹏, 傅爱根, 王爱国. AgNO_3 在植物离体培养中的作用及可能的机制[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(5): 376-379.

Study on the Regeneration System of Broccoli

FU Qing-gong, WU Hui-min, HU Ying

(School of Agricultural and Food Science, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Linan, Zhejiang 311300)

Abstract: Petiolate cotyledons and hypocotyls of the broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* Planch.) were used as explants in the optimum plant regeneration system. The results showed that the hypocotyls frequency was 92.5% in “YiHe-80”, when the explants were precultured for 4 days and placed on the MS medium supplemented with NAA 0.1 mg/L, 6-BA 2.0 mg/L, AgNO_3 4.0~6.0 mg/L, and the frequency of petiolate cotyledons from 6 day preculture explants was 85% in the same condition. While the root ratio of every variety was beyond 95% on the MS medium with IBA 0.2 mg/L.

Key words: broccoli; regeneration system; hypocotyls; petiolate cotyledons