

白菜型油菜高效离体再生体系的建立

裴冬丽^{1,2}

(1. 商丘师范学院 生命科学系 植物与微生物互作重点实验室 河南 商丘 476003; 2. 河南农业大学 农学院, 河南 郑州 450002)

摘 要:以白菜型油菜(*Brassica rapa*)的亚种菜心(*Brassica parachinensis*)的子叶和下胚轴为外植体,研究不同浓度的 NAA 和 6-BA 配比对菜心组织培养的影响。结果表明:菜心子叶和下胚轴组织培养的再生最佳培养基分别是 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+AgNO₃ 5 mg/L 和 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+AgNO₃ 5 mg/L;不定芽生根最佳培养基是 MS+NAA 0.2 mg/L。同时还研究了 AgNO₃ 浓度对菜心组织培养的影响,在培养基中附加 AgNO₃ 能提高菜心芽的诱导频率。

关键词:白菜型油菜;植株再生;组织培养

中图分类号:S 634.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)01-0127-03

芸薹属作物包括许多重要的蔬菜和油料作物,其中有油菜、白菜、甘蓝、芜菁等,它们在人类的生活和农业生产上有着极其重要的作用^[1]。菜心(*Brassica parachinensis*)属白菜型油菜(*Brassica rapa*)的一个亚种,又称菜薹,是我国南方特产蔬菜,栽培历史悠久,也是出口港澳和东南亚国家及欧洲的主要蔬菜。菜心风味独特,质嫩味佳,食用方便,品种繁多,适应性广,生长迅速,并能周年栽培,在蔬菜周年供应上,尤其是淡季供应上占有重要的地位。目前对芸薹属的遗传转化是一个研究热点,利用生物技术进行抗虫或抗病基因导入为病虫害的防治提供了可能,而获得再生率相对高的组织培养体系是进行遗传转化的前提之一。芸薹属中许多种如白菜、芥菜、油菜、甘蓝、芜菁等均已成功获得离体培养再生植株,但白菜型油菜离体培养再生植株的报道较少^[2,3]。该试验通过研究培养基中生长调节物质最适配比以及 AgNO₃ 浓度对菜心组织培养的影响,确立了各因素的最佳水平,建立了较高频率的植株再生体系,以期对白菜型油菜的遗传转化研究奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为菜心。

作者简介:裴冬丽(1971-),女,河南虞城人,在读博士,副教授,研究方向为分子植物病原体互作。E-mail: peidongli@126.com。

基金项目:河南省科技发展计划国际合作资助项目(084300510076);

河南省科技厅基础与前沿技术资助项目(082300430320)。

收稿日期:2010-10-14

1.2 试验方法

1.2.1 种子消毒与无菌苗培养 将菜心种子用 10%次氯酸钠消毒 15 min,然后用无菌水冲洗数次,播种于 1/2 MS 培养基上培养。

1.2.2 子叶、下胚轴接种及培养 将 5~7 d 苗龄的无菌苗的子叶和下胚轴切成适当大小和长度分别接种于分化培养基: MS+6-BA (1.0、1.5、2.0、3.0 mg/L)+NAA (0.2、0.5 mg/L)+AgNO₃ 5 mg/L 琼脂 0.7%,蔗糖 3%,pH 5.8~6.2~3 次重复,每重复 30 个外植体,于 (25±1)℃、16 h 光照/8 h 黑暗培养。30 d 后,统计芽再生频率(芽再生频率=产生再生芽的外植体数/接种的外植体总数×100%),研究不同培养基配比对子叶、下胚轴形成不定芽的影响,并在此基础上进一步研究不同浓度的 AgNO₃ (0~10 mg/L)对子叶、下胚轴形成不定芽的影响。

1.2.3 不定根的诱导 分化的不定芽生长至 2~3 cm 时,将芽基部切下插入 MS+NAA 0.2 mg/L 培养基中诱导生根。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节物质对芽诱导的影响

子叶、下胚轴接种于分化培养基上 5~7 d 后,在切口处出现白色或黄色致密愈伤组织,3~4 周后愈伤组织中出现绿色突起,逐渐出现绿色芽点,然后形成不定芽(图 1)。6-BA 和 NAA 是常用的植物生长调节剂,在 MS 培养基上,添加不同浓度的 2 种激素与 AgNO₃ 5 mg/L 组合,对菜心子叶及下胚轴不定芽分化的影响见表 1。表 1 可知,培养基添加 6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L

时, 子叶的最高诱导频率是 80.3%, 添加 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 时, 下胚轴的最高诱导率是 50.6%。

表 1 植物生长调节物质对菜心子叶和下胚轴芽再生频率的影响

处理 编号	6-BA /mg · L ⁻¹	NAA /mg · L ⁻¹	芽再生频率/%	
			子叶	下胚轴
1	1.0	0.2	67.6	18.3
2	1.0	0.5	62.3	11.3
3	1.5	0.2	80.3	39.9
4	1.5	0.5	64.7	32.4
5	2.0	0.2	73.8	50.6
6	2.0	0.5	66.9	44.3
7	3.0	0.2	56.6	22.7
8	3.0	0.5	41.1	18.8

2.2 AgNO₃ 对芽诱导的影响

在子叶分化培养基 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 及下胚轴分化培养基 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的基础上, 添加不同浓度的 AgNO₃ (0.2、5、10 mg/L) 观察不定芽的形成, 发现在不添加 AgNO₃ 的基础上, 未见不定芽的形成, 由不同浓度 AgNO₃ 试验可知 5 mg/L AgNO₃ 对子叶及下胚轴分化最有利。

表 2 AgNO₃ 对菜心芽再生能力的影响

处理编号	AgNO ₃ /mg · L ⁻¹	芽再生频率/%	
		子叶	下胚轴
1	0	6.3	4.1
2	2	48.5	40.3
3	5	80.3	50.6
4	10	55.1	37.2

2.3 芽的生根培养

将带顶芽的不定芽从基本切下, 转入 MS+NAA 0.2 mg/L 生根培养基中, 经过 10 d 左右, 可产生大量的不定根(图 1)。

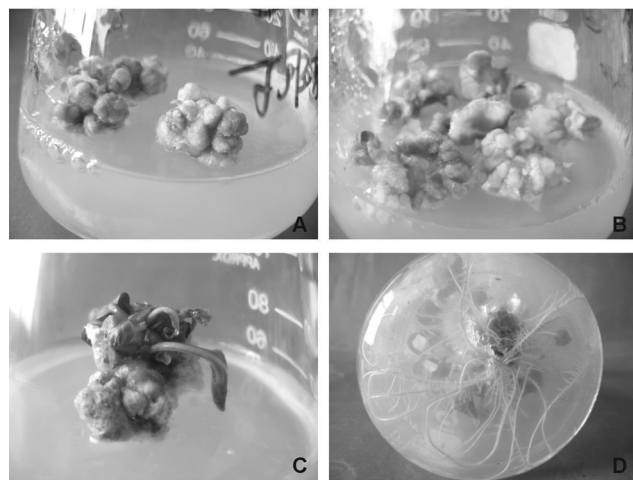


图 1 菜心的离体培养再生

注: A: 菜心下胚轴诱导愈伤组织; B: 菜心子叶诱导愈伤组织; C: 菜心子叶诱导出芽; D: 菜心再生芽诱导生根。

3 结论与讨论

该研究结果表明, 激素组成和 AgNO₃ 的浓度是建立菜心高频再生体系的重要因素。在不同的生长调节物质下芽的诱导分化能力不同, 适宜浓度的 6-BA 和 NAA 配比下菜心子叶和下胚轴诱导不定芽效果显著。这与已往在芸薹属中能分化出再生植株的培养基大多都是采用 6-BA 和 NAA 组合的结果相似^[4,5]。以菜心子叶为外植体, 芽诱导率可高达 80%, 而以下胚轴为外植体芽诱导率为 50%, 说明同种植物的不同部位外植体诱导产生芽的能力是不同的。

该试验发现在不添加 AgNO₃ 的培养基上, 不定芽的再生率低, 不同浓度的 AgNO₃ 试验表明 5 mg/L 对子叶和下胚轴分化最有利。大多数研究认为, AgNO₃ 之所以促进植物培养的再生, 主要是因为其具有乙烯活性抑制剂的作用^[6]。植物组培过程中产生大量乙烯, 影响外植体的分化。Ag⁺ 可以竞争乙烯作用部位而促进器官发生和体细胞胚发生, 使在整个培养过程中生根率很小, 即 Ag⁺ 有抑制生根促进芽的分化作用, 其浓度应控制在 1~10 mg/L, 过高则对芽分化产生抑制作用, 形成畸形芽^[5]。该研究发现最适 Ag⁺ 浓度为 5 mg/L, 这与以前报道的芸薹属大白菜子叶离体培养中的最适 AgNO₃ 浓度一致^[7]。

该试验建立了菜心子叶、下胚轴的高频再生系统, 从接种到再生植株的获得需 60 d 左右, 为芸薹属白菜型油菜的遗传转化研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 罗静, 陈伟, 庄木, 等. 芸薹属作物遗传转化研究的现状及在育种上的应用前景[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2007, 28(4): 35-41.
- [2] 王洋, 崔继哲, 李翠玲. 大白菜高频再生体系的建立及策略[J]. 园艺学报, 2005, 32(4): 701-703.
- [3] 王景雪, 孙毅, 崔贵梅, 等. 在油菜组织培养中激素及基因型对下胚轴分化的影响[J]. 中国油料作物学报, 2000, 22(1): 11-13.
- [4] 王景雪, 孙毅. 芸薹属(*Brassica*)植物的组织培养和基因转化[J]. 山西农业大学学报, 1996, 16(3)增刊: 9-14.
- [5] 杨葵, 徐碧玉, 金志强. 芸薹属蔬菜作物的遗传转化研究进展[J]. 华南热带农业大学学报, 2003, 9(1): 13-18.
- [6] 张鹏, 傅爱根, 王爱国. AgNO₃ 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.
- [7] 邢德峰, 李新玲, 王全伟, 等. 影响大白菜高效离体培养再生的因素. 植物生理学通讯, 2003, 39(5): 420-424.

杂交兰种间及杂交后代同工酶活性和蛋白质电泳测定与分析

朱庆松¹, 张景华², 王广东³, 赵海英⁴

(1. 信阳农业高等专科学校 河南 信阳 464000; 2. 确山县农业局, 河南 驻马店 463200;

3. 南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095; 4. 信阳市农业科学研究所, 河南 信阳 464000)

摘要: 试验测定了杂交兰亲本及其杂交 F₁ 代的 POD、SOD、CAT 的酶活性, 并分析了 EST 和蛋白质的电泳图谱。结果表明: 亲本及杂交 F₁ 代 POD、SOD、CAT 同工酶活性, 母本的酶活性低于父本; F₁ 代株系中 POD、CAT 的差异比较明显, SOD 的差异较小。由 EST 电泳酶谱可知母本有 3 条明显的酶带, 父本有 2 条酶带, F₁ 代出现了丰富的变异, 具有亲本酶带特征的 F₁ 代株系约占 33.3%。通过亲本及杂交 F₁ 代蛋白质 SDS-PAGE 电泳表明, 父本比母本多 6 条较弱的酶带, F₁ 代中比母本多 2 条较弱谱带的占 15.8%; 其余的与母本相同。

关键词: 杂交兰; 杂交 F₁ 代; 同工酶活性; 酶带

中图分类号: S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)01-0129-04

现兰花育种技术已日益成熟, 通过杂交育种、诱变育种、体细胞杂交、基因工程育种、转基因等方法获得了许多品种。英国权威的“散氏兰花杂种登记目录”(Sander's List of Orchids Hybrids)正式登记的人工杂交选育新种已达 50 000 个以上, 且每年都以 1 000 种以上的数目在增加^[1]。但是国内外很少有关于兰科植物杂交后

代生理生化特征研究的报道。在植物形态建成过程中其生理生化特征出现明显变化, 如蛋白质的组分、酶的活性及成分等, 同时这些指标与植物的遗传性密切相关, 通过杂交育种, 其亲本与杂交后代之间存在明显的差异, 而且这些指标与植物的抗逆性有着紧密的联系, 通过对这些指标的研究, 可其后代中选出具有育种目标所要求的具有较强抗逆性的株系, 从而为新品种的选育奠定基础。

在植物生理生化的这些指标中, 同工酶是基因表达产物, 其功能相同但结构及组成存在差异, 间接地反映

第一作者简介: 朱庆松(1976-), 男, 河南信阳人, 硕士, 讲师, 现主要从事园艺植物的露地栽培和设施栽培研究工作。

收稿日期: 2010-10-11

Establishment of Effective Regeneration System of *Brassica rapa* in vitro

PEI Dong-li^{1, 2}

(1. Key Laboratory of Plant-Microbe Interactions Department of Life Science Shangqiu Normal University, Shangqiu, Henan 476000; 2. College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract: Cotyledons and hypocotyls of *Brassica parachinensis* subspecies of *Brassica rapa* were used as explants to study the effect of different concentration ratio of NAA and 6-BA on *Brassica parachinensis* tissue culture. The results showed that the best regeneration medium for cotyledons and hypocotyls of *Brassica parachinensis* were MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+AgNO₃ 5 mg/L and MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+AgNO₃ 5 mg/L respectively. The best root medium of adventitious buds was MS+NAA 0.2 mg/L. It was also discussed the influence of the concentration of AgNO₃ on *Brassica parachinensis* tissue culture. The high inducement frequency of shoot regeneration was gained by addition of AgNO₃ in the medium.

Key words: *Brassica rapa*; plant regeneration; tissue culture