

‘紫罗兰’白菜叶片再生体系的建立

吕星光^{1,2}, 李 敏^{1,2}, 刘维信^{1,2}, 刘倩倩^{1,2}

(1. 青岛农业大学 园艺学院, 山东 青岛 266109; 2. 青岛市园艺植物遗传改良与育种重点实验室, 山东 青岛 266109)

摘 要:以‘紫罗兰’白菜无菌苗叶片为外植体,研究了不同 6-BA 和 NAA 浓度组合对白菜真叶不定芽再生的影响,同时采用不同生根培养基对再生芽进行生根诱导。结果表明:诱导‘紫罗兰’白菜真叶分化的适宜培养基为 MS+2 mg/L 6-BA+1 mg/L NAA+4 mg/L AgNO₃,每个外植体平均再生芽数为 1.42 个;生根培养基以 MS+0.5 mg/L NAA 最佳,平均每个不定芽诱导根数为 16.54 个。该试验结果为‘紫罗兰’白菜材料的快速繁殖提供了理论和技术参考。

关键词:‘紫罗兰’白菜;组织培养;叶片;再生

中图分类号:S 634.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)07-0103-04

‘紫罗兰’白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *Chinensis*)是近年来育成的新型紫色普通白菜品种,在国内市场影响较大。该品种株型直立,叶片亮紫色,叶柄翠绿色,纤维少,品质佳,适于生食^[1]。因其具有独特的紫色,花青素含量较高,故具有很高的营养价值和推广价值^[2-3],同时特殊的叶片颜色也使‘紫罗兰’成为白菜叶色育种中的重要材料^[4]。在育种环节中,通过组织培养建立离体再生体系,可使雄性不育材料及优良珍贵育种材料得到及时保存并能为其快速繁殖提供有效途径。目前,芸薹属蔬菜再生体系中,子叶柄-子叶仍是最主要的外植体,

但该体系每株无菌苗只能获得 2 个外植体,取材数量较叶片再生体系受到一定限制。而以叶片为外植体进行离体培养在白菜再生研究中鲜有报道^[5-10]。因此,建立叶片再生体系对提高‘紫罗兰’白菜材料的扩繁效率具有重要意义。

该研究旨在探讨 6-BA 和 NAA 不同组合对‘紫罗兰’白菜叶片离体再生的影响,以期建立起取材易、成本低、效率高的‘紫罗兰’白菜再生体系,为推动该特色白菜材料的育种研究以及其它白菜类蔬菜的生物技术研究提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试‘紫罗兰’白菜种子由青岛农业大学白菜课题组提供。种子用蒸馏水浸泡 1 h 后在滤纸上吸去多余水分。75%酒精消毒 30 s,升汞消毒 6 min 后,用无菌水洗涤 15 min,期间换水 4~5 次。将种子接种于 MS 培养基上,每个培养瓶的接种量不宜过多,以利于无菌苗叶片充分生长。待 13~14 d,无菌苗长至 4~5 片真叶时,切取叶片接种于分化培养基上,保留无菌幼苗于培养瓶中

第一作者简介:吕星光(1991-),男,山东烟台人,硕士研究生,研究方向为蔬菜栽培生理。E-mail:1335396662@qq.com.

责任作者:刘倩倩(1983-),女,山东青岛人,博士,讲师,现主要从事十字花科生物技术等研究工作。E-mail:liuq124@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31401864);山东省农业生物资源创新利用重大课题资助项目(6621290,66213S3);青岛市公共科技支撑计划资助项目(12-1-3-24-nsh);青岛农业大学高层次人才基金资助项目(6631319);国家级大学生创新创业训练计划资助项目(201310435040)。

收稿日期:2014-11-10

CH (casein acid hydrolysate) and the average induction rate was 96.65%; the optimum medium of cotyledon adventitious buds induction was MS+3.0 mg/L 6-BA+100 mg/L CH(casein acid hydrolysate) and the average induction rate was 100%; the optimum shoot growth medium was MS+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+0.2 mg/L GA₃; the rooting medium was MS+2.0 mg/L IBA with rooting rate 100%. Determination of the phosphinothricin sensitivity showed that compared to hypocotyl, cotyledon was more sensitive to phosphinothricin. At 0.050 mg/L PPT, the fatality rate was 89.0% and 71.5% in cotyledon and hypocotyl respectively. This study established the high frequency regeneration system of *Portulaca oleracea* L. and determined its sensitivity to phosphinothricin. Results from this study would help the research of *Portulaca oleracea* L. in genetic engineering.

Keywords: *Portulaca oleracea* L.; high frequency plant regeneration system; phosphinothricin

继续生长。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基的配置 MS 培养基的配置参照李浚明^[11]的操作方法,琼脂浓度为 0.7%,蔗糖浓度为 3%,pH 均为 5.8。分化培养基为在 MS 加入 NAA 和 6-BA,设 9 种浓度组合,具体配比见表 1,分化培养基中均加入 4 mg/L 的 AgNO_3 ,以促进不定芽的分化^[12-13]。生根培养基采用 3 种浓度配方,分别为 MS+0 mg/L NAA、MS+0.2 mg/L NAA、MS+0.5 mg/L NAA。

1.2.2 不定芽的诱导 每个叶片外植体面积约为 1.0 cm×0.5 cm,叶片正面向上置于培养基上。每个处理约 30 个外植体,3 次重复。28 d 后,观察统计结果。愈伤组织诱导率=(形成愈伤组织的外植体个数/接种外植体个数)×100%,不定芽诱导率=(分化出芽的外植体个数/接种外植体个数)×100%,平均每个外植体再生芽数=具有独立生长点的不定芽总数/分化出芽的外植体个数。

1.2.3 不定根的诱导 不定芽长至 2~3 cm 时,将芽从基部切下,分别插入不同的生根培养基上诱导生根。每个处理 10 个不定芽,3 次重复。记录起始生根时间,15 d 后,观察统计结果。生根率=(生根的不定芽个数/接种不定芽个数)×100%,平均每个不定芽生根数=不定根

总数/接种不定芽个数。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 NAA 和 6-BA 对比对‘紫罗兰’白菜叶片分化的影响

将白菜真叶接种于分化培养基上,经过 14 d 左右叶片切口处出现黄色或白色致密的愈伤组织。愈伤组织进一步长出不定根,3 周后愈伤组织的不定根组织基部出现绿色突起,并逐渐出现绿色芽点,形成不定芽(图 1)。

从表 1 可以看出,6-BA 浓度为 2 mg/L,NAA 浓度为 1.0 mg/L 和 1.2 mg/L 时‘紫罗兰’白菜叶片不定芽分化率显著高于其它浓度组合,不定芽诱导率均达到了 50% 以上,差异不显著。但 MS+1.0 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA 培养基再生频率和每个外植体再生芽数均优于 MS+1.2 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA。MS+1.2 mg/L NAA+1 mg/L 6-BA 培养基诱导效果较差,不定芽诱导率仅为 25.27%,平均每个外植体再生芽数仅为 1.13 个。不定芽诱导率随 NAA 浓度的升高先增加后下降,当 NAA 浓度超过 1.0 mg/L 时,不定芽诱导率呈现下降趋势;6-BA 浓度对‘紫罗兰’叶片不定芽再生的影响也呈先升高后下降的趋势,当 6-BA 浓度为 4 mg/L 时,不定芽诱导率降低。

表 1 不同浓度 NAA 和 6-BA 组合对‘紫罗兰’白菜叶片分化的影响

Table 1 Effect of different combinations of NAA and 6-BA on the adventitious bud induction from the leaves of ‘Horti-violet’

处理 Treatment	NAA 浓度 Concentration of NAA /(mg·L ⁻¹)	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA /(mg·L ⁻¹)	愈伤组织诱导率 Callus induction rate /%	不定芽诱导率 Induction rate of adventitious bud /%	平均每个外植体再生芽数 Adventitious buds per explant /个
1	0.5	1	92.47±1.87b	30.16±2.78e	1.21±0.01cd
2	0.5	2	93.40±0.13b	37.35±1.18cd	1.26±0.09bc
3	0.5	4	93.61±0.31b	35.06±1.56d	1.15±0.06d
4	1.0	1	95.77±3.67ab	31.17±1.13e	1.21±0.01cd
5	1.0	2	97.88±1.83a	53.19±1.62a	1.42±0.04a
6	1.0	4	95.70±1.86ab	41.90±1.88b	1.33±0.07ab
7	1.2	1	97.81±1.89a	25.27±1.73f	1.13±0.01d
8	1.2	2	97.88±1.83a	50.51±2.41a	1.40±0.06a
9	1.2	4	93.65±3.07b	40.43±1.62bc	1.29±0.05bc

注:同列数据后不同字母相同者表示在 5% 水平上差异显著。下同。

Note: Different letters show significant difference at 0.05 level. The same below.



注: A 为愈伤组织和不定根; B 为初生不定芽; C 为丛生芽。

Note: A shows the callus and adventitious roots; B shows the primary adventitious buds; C shows multiple shoots.

图 1 ‘紫罗兰’白菜叶片不定芽诱导

Fig. 1 Adventitious bud induction from the leaves of ‘Horti-violet’

2.2 不同浓度 NAA 对‘紫罗兰’不定芽生根的影响

将不定芽从基部切下,插入不同的生根培养基中诱导生根。接种不定芽后每天观察,记录不定根形成的起始时间、生根率、每个不定芽再生根数。由表 2 可知,在 3 种生根培养基中,MS+0.5 mg/L NAA 培养基诱导形成不定根的时间最短,生根率最高,达到 100.00%。平

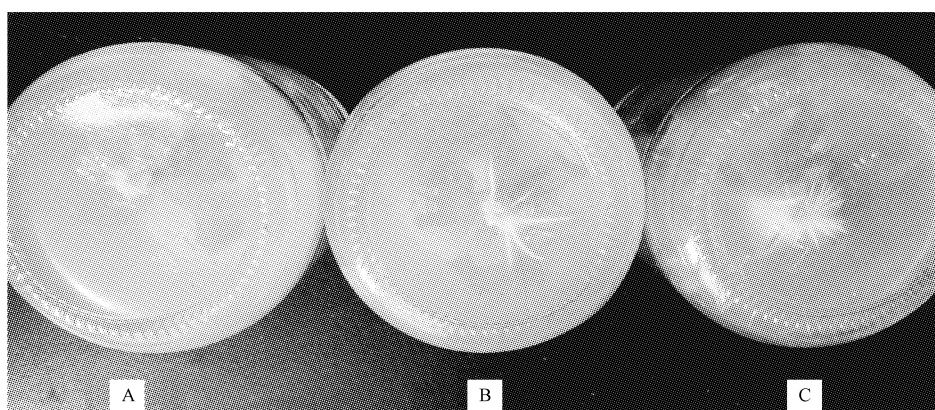
均每个不定芽生根数最高为 16.54 条,诱导生根效果显著优于其它培养基。

通过观察相同时间内再生芽诱导生根情况(图 2),可以看出在 MS+0.5 mg/L NAA 培养基中再生芽诱导出的不定根数目最多,且均短而粗壮。因而 MS+0.5 mg/L NAA 培养基是该试验的理想生根培养基。

表 2 不同浓度 NAA 对‘紫罗兰’白菜不定芽生根的影响

Table 2 Effect of different concentrations of NAA on the induction of adventitious roots

处理 Treatment	NAA 浓度 Concentration of NAA/(mg · L ⁻¹)	起始生根时间 Initial rooting time/d	生根率 Rooting rate/%	平均每个不定芽生根数 Roots per explant/条
1	0	11	74.88±2.10c	4.83±0.29c
2	0.2	8	89.10±4.81b	7.25±0.44b
3	0.5	6	100.00±0.00a	16.54±0.20a



注:A为 0 mg/L NAA 生根培养基;B为 0.2 mg/L NAA 生根培养基;C为 0.5 mg/L NAA 生根培养基。

Note:A shows the rooting culture medium with 0 mg/L NAA;B shows the rooting culture medium with 0.2 mg/L NAA;C shows the rooting culture medium with 0.5 mg/L NAA.

图 2 不同浓度 NAA 对‘紫罗兰’白菜再生植株不定根诱导效果的比较

Fig. 2 Comparison of different concentration NAA on adventitious root induction of ‘Horti-violet’

3 讨论与结论

该试验通过探索不同浓度 6-BA 和 NAA 配比,初步建立了适宜‘紫罗兰’白菜叶片再生的离体再生体系。Saba 等^[10]在 2009 年首次报道了利用生长 2 个月的成株白菜叶片获得再生芽的研究,其研究在采用 TDZ 和 NAA 组合并附加高浓度 AgNO₃ (7.5 mg/L)的分化培养基中成功诱导出丛生芽。此后罕有普通白菜叶片不定芽再生的报道。从再生成本方面考虑,组织培养专用 TDZ 试剂价格较高,因此,利用价格低廉且应用广泛的 6-BA 进行再生体系探索具有更大的应用价值。

该研究中的再生芽分化培养基中较低的 NAA 浓度和较高的 6-BA 浓度有利于‘紫罗兰’白菜不定芽的诱导支持了前人的研究结果^[14-16]。但 NAA 浓度低于 1 mg/L 时再生效果较差,且并非 6-BA/NAA 的浓度比值越高越有利于芽的分化,说明一定浓度的 NAA 对‘紫罗兰’白

菜叶片不定芽诱导具有促进作用。此外,研究中还观察到分化出芽的外植体均在不定芽形成之前先生出不定根。不定根形成 7~10 d 后,根基部的愈伤组织进一步分化形成芽点。而没有不定根形成的愈伤组织则均没有不定芽的分化,这与以往白菜子叶柄-子叶再生体系由愈伤组织直接分化成芽的再生过程有很大不同^[17],也进一步证明白菜叶片组织再生需要较高浓度的 NAA 来促进不定根和不定芽分化。

该研究采用叶片作为外植体,相对于子叶柄、下胚轴等外植体,取材便利,一株无菌苗可获得数量较多的外植体,当初始叶片外植体在激素的作用下体积膨大后,可进一步切分转接到新的分化培养基进行不定芽诱导。在该研究建立的再生体系中不定芽分化率能够达到 50%以上,但后续仍需在激素浓度配比、AgNO₃ 浓度、防止愈伤组织褐化等方面进一步优化。在该研究

中,随着 NAA 浓度的增加,不定芽的生根率逐渐增加,当培养基中的 NAA 浓度达到 0.5 mg/L 时,生根率达到 100%,每个再生芽生根数平均为 16.54 条,再生不定根效果较好。考虑到避免激素的浪费,该试验没有继续研究 NAA 浓度超过 0.5 mg/L 时对不定芽生根的作用。

建立叶片离体再生体系,可为白菜雄性不育材料及优良珍贵材料的保存和扩繁提供更有效的途径,且采用叶片作为外植体简易、快速、繁殖系数高,也为以后的市场化育苗奠定了理论和技术基础。

参考文献

- [1] 李正德,辛学锐,丛培军,等. 紫色小白菜-好地紫罗兰[J]. 中国蔬菜, 2011(11):35.
- [2] 徐春明,庞高阳,李婷. 花青素的生理活性研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2013(3):205-210.
- [3] Milbury P E, Vita J A, Blumberg J B. Anthocyanins are bio-available in humans following an acute dose of cranberry juice [J]. The Journal of Nutrition, 2010,140(6):1099-1104.
- [4] 张德双,张凤兰,余阳俊,等. 紫色大白菜育种思路初探[J]. 长江蔬菜, 2008(11):14-17.
- [5] 裴冬丽. 白菜型油菜高效离体再生体系的建立[J]. 北方园艺, 2011(1):127-129.
- [6] 樊明琴,朱月林,朱茂英,等. 白菜类蔬菜作物离体再生研究进展[J]. 中国蔬菜, 2010(14):8-12.
- [7] 杨精华,刘曦,张乐,等. 崖白菜的愈伤组织诱导及植株再生[J]. 植物

生理学报, 2012(7):664-668.

- [8] 刘任源,于拴仓,魏佑营,等. 白菜类作物子叶高频再生体系的建立[J]. 西北农业学报, 2012(6):118-123.
- [9] 杨慧莹,王鸣刚,武丽娜,等. 结球白菜带柄子叶外植体不定芽离体再生能力的遗传分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010,29(2):332-338.
- [10] Saba A M, Hou X L, Zhu B, et al. High-frequency adventitious shoots regeneration from leaf of non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*) cultured *in vitro* [J]. Acta Physiol Plant, 2009, 31: 1191-1196.
- [11] 李俊明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002:24.
- [12] 吕艳艳,王桂萍,沈振国,等. 不结球白菜亮白叶再生体系的优化[J]. 中国农学通报, 2010,26(23):93-96.
- [13] 高红亮,李英,宋玉萍,等. 不结球白菜离体培养与植株再生体系研究[J]. 西北植物学报, 2008,28(5):963-968.
- [14] 张鹏,凌定厚. 分化培养基和抗生素对甘蓝型黄小油菜转化效率的影响[J]. 湖北农业科学, 2007,46(4):500-503.
- [15] 于占东,何启伟,牟晋华. 白菜组织培养与植株再生研究[J]. 吉林农业大学学报, 2005,7(4):391-395.
- [16] 杨长友,袁忠厚,郑小敏,等. 甘蓝型油菜高效再生体系的建立[J]. 生物技术通报, 2013,49(5):112-116.
- [17] Vanjildorj E, Song S Y, Yang Z H, et al. Enhancement of tolerance to soft rot disease in the transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) inbred line, Kenshin [J]. Plant Cell Reports, 2009,28(10):1581-1591.

Establishment of the Regeneration System from the Leaves of Chinese Non-heading Cabbage ‘Horti-violet’

LYU Xing-guang^{1,2}, LI Min^{1,2}, LIU Wei-xin^{1,2}, LIU Qian-qian^{1,2}

(1. College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109; 2. Qingdao Key Laboratory of Genetic Improvement and Breeding in Horticultural Plants, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract: The leaves from aseptic seedling of Chinese non-heading cabbage ‘Horti-Violet’ were used as explants in this experiment. The effect of different concentrations of NAA/6-BA on the adventitious shoot regeneration were studied. The results showed that MS medium containing 2 mg/L 6-BA+1 mg/L NAA+4 mg/L AgNO₃ was the suitable medium for leaf regeneration of ‘Horti-violet’, and there were 1.42 shoots with independent growing point per explants. The optimal rooting medium was MS medium containing 0.5 mg/L NAA, the average adventitious roots were 16.54. The study provided the theoretical and technical reference to the rapid propagation of Chinese non-heading cabbage ‘Horti-violet’.

Keywords: Chinese non-heading cabbage ‘Horti-violet’; tissue culture; leaf; regeneration