

# 不结球白菜“苏州青”下胚轴、子叶高频再生技术研究

张国英, 刘美娟

(苏州大学农业科学与技术学院, 215006)

**摘要:** 本试验以“苏州青”种子的无菌苗子叶、下胚轴为外植体, 在 MS 培养基中添加不同浓度、不同配比的 6-BA、NAA, 获得了有分化能力的愈伤组织和正常的再生植株。探讨了激素种类与配比对不定芽分化的影响; 不同叶龄的子叶、下胚轴培养与不定芽分化的关系; 抗生素种类对茎尖生长及分化的影响。结果表明: 对子叶诱导培养时, 以 MS+BA4.0 mg/L+NAA0.1 mg/L(毫克/升)效果最好, 对胚轴诱导培养时以 MS+BA 2.0 mg/L(毫克/升)效果最好; 叶龄为 5 d~9 d(天)的子叶、胚轴最易分化; 3 种抗生素对茎尖生长及分化的影响有较大差异, 抑制作用由强到弱为 Kan> Cab> Cef, Kan 的选择压为 10 mg/L~20 mg/L(毫克/升)。而 Cab、Cef 即使浓度达 800 mg/L(毫克/升)还能生长和分化。

**关键词:** 组织培养; 子叶; 胚轴; 抗生素

**中图分类号:** S634.03.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2004)01-0044-02

## 1 目的材料与方法

不结球白菜(*Brassica Campestris* ssp. *Chinensis* Mlakion)是十字花科(Cruciferae)芸苔属(*Brassica*)白菜类蔬菜, 是南方地区主要的叶类蔬菜。近年来, 东南亚、欧洲及日本、美国等国广泛引种, 已逐渐成为世界性蔬菜, 但其最大的问题是虫害相当严重, 由于不结球白菜类蔬菜抗虫种质资源缺乏, 用常规育种方法开展不结球白菜抗虫育种工作难以奏效, 生产上常采用药剂防治的方法来控制害虫, 不但增加生产成本, 而且造成环境污染, 破坏生态平衡和危及人体健康, 因此培育不结球白菜抗虫品种是育种工作中急需解决的问题。随着现代分子生物学和生物技术的发展, 从 1997 年起对不结球白菜转基因工作开始了探索, 不结球白菜离体再生体系的建立是利用农杆菌介导转化外源基因的前提, 再生体系的稳定性及再生频率的高低直接影响转化的结果。本试验探讨了激素种类与配比对不定芽分化的影响; 不同叶龄的子叶、下胚轴培养与不定芽分化的关系, 抗生素种类对茎尖分化及生长的影响, 为应用农杆菌介导进行转基因育种奠定基础。

### 1.1 “苏州青”无菌苗的获得

苏州青种子经表面清洗后用 0.1% 的氯化汞消毒 15 min(分钟), 最后用无菌水冲洗 7~8 次, 把经过预处理的种子倒在无菌滤纸上, 吸去表面积存水分, 然后挑选饱满的种子播种于培养基上。

### 1.2 外植体的切取与接种

播种后从子叶长出开始, 在试验规定叶龄期挑选健壮幼苗, 切去根部, 然后用切去少量基部的子叶做叶片培养的外植体, 取 1 cm~1.5 cm(厘米)长的下胚轴进行培养。

### 1.3 分化培养和继代培养

外植体在 25℃、12 D/12 L 及光照强度约 3 000 Lx(勒克斯)的条件下培养满 25 d(天)后调查出愈率、子叶大小、胚轴大小、子叶色泽、胚轴色泽、发根率及不定芽分化率。培养 25 d(天)以后进行继代培养, 即把基部的愈伤组织切下, 或切割丛生芽或单芽到继代培养基上进行培养。

### 1.4 培养基及试验分区

#### 1.4.1 播种培养基为 1/2MS 培养基

1.4.2 分化培养基设为 5 种: (1) 6-BA2.0 mg/L(毫克/升); (2) 6-BA4.0 mg/L(毫克/升); (3) 6-BA4.0 mg/L(毫克/升)、NAA0.01; (4) 6-BA4.0 mg/L(毫克/升) NAA0.05 mg/L(毫克/升); (5) 6-BA4.0 mg/L(毫克/升)、NAA0.1 mg/L(毫克/升)。

1.4.3 继代培养基中添加细胞分裂素 4.0 mg/L(毫克/升)及混合添加细胞分裂素和生长素 NAA 两种处理, 所有培养基均含 3% 蔗糖和 0.85% 的琼脂粉, 调节 pH 值至 5.6 在 120℃~125℃下灭菌 15 min(分钟)冷却后接种外植体。

### 1.5 主要试剂

6-苄基嘌呤(6-BA)、 $\alpha$ -萘乙酸(NAA)、琼脂粉、蔗糖、卡那霉素(Can)、头孢霉素(Cef)、羧苄青霉素(Cab)。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同叶龄的子叶、下胚轴对愈伤组织形成及不定芽诱导的影响

以 1/2MS 培养基为播种培养基, 种子播种 2 d(天)后突破种皮, 伸出胚轴及子叶, 以 MS+BA4.0 mg/L(毫克/升)+NAA0.05 mg/L(毫克/升)为子叶分化培养基, 子叶长出后, 分别进行 5 d、7 d、9 d、11 d、13 d、15 d(天)不同叶龄的子叶接种对比试验, 培养 25 d(天)后调查发现 5 d、7 d、9 d(天)的叶片均能分化出愈伤组织、不定芽、不定根, 见表 1。

叶龄为 5 d(天)的出愈率最小, 为 78%, 而发根率及不定芽分化率都大于其它处理区, 而且从表 1 结果看: 不定芽分化率、发根率随叶龄的增加而递减, 说明老叶不易诱导分化。以 MS+BA2.0 mg/L(毫克/升)为胚轴的分化培养基, 分别进行



**第一作者简介:** 张国英, 女, 1967 年生, 江苏省苏州市人, 1989 年参加工作, 讲师, 在读研究生, 现从事植物组织培养及分子生物学研究。

收稿日期: 2003-09-23

5 d、7 d、9 d、11 d、13 d、15 d(天)不同叶龄的下胚轴诱导分化试验,结果见表2。

表 1 不同叶龄子叶分化情况调查						
叶龄 (d)	外植体数	出愈率 (%)	子叶大小	子叶色泽绿色率 (%)	发根率 (%)	不定芽分化率 (%)
5	24	78	+	100	61.1	20.83
7	24	100	+	100	55.6	16.7
9	24	100	++	100	22.2	12.5
11	24	100	++	100	16.7	0
13	24	100	++	91.67	0	0
15	24	100	++	83.33	0	0

表 2 不同叶龄下胚轴分化情况调查						
叶龄	外植体数	出愈率 (%)	胚轴大小	胚轴色泽绿色率 (%)	发根率 (%)	不定芽分化率 (%)
5	24	41.6	+	100	0	37.5
7	24	75.0	++	100	0	37.5
9	24	62.5	++	100	0	25.0
11	24	58.3	+	100	0	12.5
13	24	79.2	+	100	0	0
15	24	79.2	+	100	0	0

从表2可见:叶龄越小出愈率越低,而不定芽分化率则高,这与不同叶龄的子叶分化情况相同,培养基中不加NAA时,则不能诱导生根,7 d、9 d(天)叶龄的胚轴切段在分化培养基中长得比其它处理区大,分化率也高。

2.2 不同激素配比对子叶、下胚轴分化的影响。

播种培养基为1/2MS培养基,叶龄为9 d(天)时切取子叶做叶片培养,切取长约1 cm(厘米)的胚轴(中上部)进行培养,培养20 d(天)进行调查,见表3、表4。

表 3 不同激素配比对子叶分化的影响							
区号	附加激素		外植体数	出愈率	子叶大小	发根率 (%)	不定芽分化率 (%)
	BA	NAA					
1	2.0	0	24	70.8	++	0	0
2	4.0	0	24	87.5	++++	0	0
3	4.0	0.01	24	66.7	++++	8.3	0
4	4.0	0.05	24	100	++++	16.7	0
5	4.0	0.1	24	100	++	37.5	12.5

从表3可见:对子叶诱导培养时,以上各处理区均能诱导愈伤组织,3区和4区子叶长得较大,1区和2区只有BA存在时,子叶不能诱导不定根、不定芽。3区、4区、5区BA和NAA共同存在时能诱导不定芽或不定根。

表 4 不同激素对比对下胚轴分化的影响							
区号	附加激素		外植体数	出愈率 (%)	胚轴大小	发根率 (%)	不定芽分化率 (%)
	BA	NAA					
1	2.0	0	24	62.5	++	0	27.1
2	4.0	0	24	20.8	++	0	25.0
3	4.0	0.01	24	87.5	++	8.3	20.8
4	4.0	0.05	24	100	+++	33.3	0
5	4.0	0.10	24	100	+++	62.5	0

从表4结果来看:1区最能诱导不定芽,5区最能诱导不定根,4区、5区出愈率高于其它区,而且胚轴长得大,发根率高,且对胚轴培养来说只有BA存在时不定芽分化率最高,这与子叶分化情况不同。

2.3 抗生素种类对不结球白菜茎尖分化的影响

以1/2MS为播种培养基,叶龄为7 d(天)后切取茎尖接种于含不同种类不同浓度抗生素的培养基上,以MS+BA 2 mg/L(毫升/升)为基本培养基。接种30 d(天)后调查,结果如表5。

表 5 Kan Cef 和 Cab 对茎尖分化的影响						
处理	接种数	成活数	成活率	分化数	分化率	生长情况
对照	24	24	100	16	66.7	绿色苗
Kan(mg/L)	10	24	24	100	0	部分白化
	15	24	2	8.33	0	大部分白化
	20	24	0	0	0	白化
	30	24	0	0	0	白化
	40	24	0	0	0	白化
Cef(mg/L)	100	24	24	100	13	绿色苗
	200	24	24	100	11	绿色苗
	400	24	24	100	12	绿色苗
	600	24	24	100	10	黄绿苗
	800	24	22	91.7	8	黄绿苗
Cab(mg/L)	200	24	24	100	12	绿色苗
	400	24	24	100	12	绿色苗
	500	24	24	100	11	绿色苗
	600	24	24	100	9	绿色苗
	800	24	24	100	9	黄绿苗

从表5可知,三种抗生素对茎尖生长的影响有较大差异。10 mg/L(毫克/升)的Kan已对茎尖生长有抑制作用。当Kan浓度在20 mg/L(毫克/升)时,幼苗全部白化了。从而确定了筛选培养基的卡那霉素浓度为15 mg/L(毫克/升)。Cef、Cab对茎尖生长的影响较小,在低浓度时对茎尖生长影响较小,而浓度高达800 mg/L(毫克/升)时,茎尖开始黄化,生长受抑制。因此选择含Kan(15 mg/L(毫克/升))的培养基为筛选培养基是比较合适的。

参考文献:

[1] 秦新民,高成伟等.小白菜子叶离体培养再生系统的建立[J].广西师范大学学报,1997,15(4):90~91.  
[2] 张智奇,周音等.小白菜子叶诱导不定芽再生植株[J].上海农业学报,1998,14(2):25~28.  
[3] 蔡小宁,余建民等.不结球下胚轴和子叶离体培养再生植株[J].江苏农业学报,1995,11(4):51~54.  
[4] 谢建坤,崔海瑞等.青菜子叶离体再生系统的建立[J].浙江大学学报,2000,26(6):588~592.  
[5] 曹家树,余小林等.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.  
[6] 张鹏,凌定厚.提高菜心离体植株再生频率的研究[J].植物学报,1995,37(11):902~908.  
[7] 王凌健,王光远等.青菜组织培养和转化系统的初步建立[J].实验生物学报,1999,32(1):93~99.