

# 结球甘蓝离体培养的研究进展

吕 爽, 王 超

(东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

中图分类号: S635.1; S603.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2004)03-0006-02

随着生产的发展和人们生活水平的提高, 生产上急需品质更优、抗病性更强的新品种, 仅靠常规育种的方法很难取得突破发展。常规方法与离体培养技术相结合, 可以解决常规育种方法不能解决的问题。虽然离体培养技术的蓬勃发展只是近30年来的事情, 并且在开始时也只是一种纯学术性的研究, 但其发展的结果却显示出巨大应用价值, 某些技术已经在农业生产中直接或间接的产生了显著的经济效益, 并且肯定会产生更大的效益。离体培养一方面可以为遗传工程提供理想的受体材料、可用于快繁珍贵材料、临时保存雄性不育材料、获得转基因再生植株、固定杂种优势; 另一方面可以为常规育种的植株遗传改良程序提供一种新的手段, 从而使很多传统方法难以解决的问题迎刃而解, 更多、更快、更好的创造出各种农作物和园艺作物的新品种、新类型和新种质。

## 1 甘蓝组织培养的研究进展

从20世纪60、70年代开始, 许多科研工作者已对甘蓝的组织培养进行了研究, 到如今已经获得了巨大的成功, 从叶片、子叶、下胚轴、根、花器(包括花球、花托、花茎、花茎叶等)及花序梗等都已获得了完整的再生植株, 在培育过程中影响其分化及再生的主要因素也已经逐渐清楚。

目前, 国内外对甘蓝外植体的组织培养研究得较多, 其中以子叶和下胚轴作为外植体的研究为最多, 对甘蓝下胚轴原生质体高效成株系统的建立(薛红卫、卫志明、许智宏)也有报道<sup>[1]</sup>。另外, 对甘蓝的其它生长条件也作了研究, 如继代时间、放置方式、生长空间等也有报道。

早在1964年, Isbell就报道了结球甘蓝叶片离体培养得到再生植株的实验结果; 后来Ghosh(1965年)也获得了甘蓝叶片的再生植株。20世纪70年代, 该领域的研究十分活跃, 能很容易的获得甘蓝再生植株, 使甘蓝离体繁殖技术日趋完善。1977年, Mascarenhas等对甘蓝继代时间的研究证明, 甘蓝有些品种的根、茎、叶继代培养3代后, 形态发生能力逐渐消失。1981年, Dunwell对培养容器的空间大小也作了一定的探讨, 结果表明, 随着空间的增大, 叶片的大小和重量都逐渐增加。1983年, 王纪方等将甘蓝花茎切断进行倒置(生理上端向下)和正置(生理上端向上)培养, 结果发现正置比倒置好, 分化率高、芽数也多。1991年, Chrstey等将甘蓝花茎切段垂直正置和平放于培养基上培养, 结果表明, 垂直正置时, 形成不正常的新梢; 而水平放置的, 分化的新梢正常, 而且每个外植体分化的芽数比垂直正置的多, 以上是对外植体的放置方式的研究。1970年, Kamoga和Hinata最早报道了甘蓝花药培养的结果, 获得了单倍体再生植株。Chiang等(1985)将甘蓝的花药培养技术引入到甘蓝的品质育种之后, 有关甘蓝花药培养的报道不断增加(Lillo等, 1987; Dore等, 1988;

Routnd等, 1990; Dsolnik等, 1993)。近几年甘蓝花药培养也获得了成功(Lichter等, 1989)。

## 2 甘蓝原生质体培养的研究进展

许智宏(1982)和吕德扬(1982)最先获得甘蓝原生质体再生植株。迄今为止, 甘蓝叶片(许智宏, 1982; Bidaey等, 1983; 傅幼英等, 1985)、根(许智宏, 1982; 1984; Lillo等, 1986)、子叶(吕德扬等, 1982)、下胚轴(Glimellas等, 1984; Liuo等, 1986)的游离原生质体都已获得了再生植株, 原生质体培养方法在不断的改进和提高。Bidney DL, JF Shepand, E Kaleilan(1983)对原生质体培养再生能够获得植株报道不少。许智宏(1995)对甘蓝下胚轴原生质体再生植株进行了研究, 结果表明可以得到再生植株<sup>[2]</sup>。

甘蓝(*Brassica oleracea*)原生质体培养的报道较多。制取原生质体的取材器官、部位、试材的营养状态和生长发育阶段的不同, 都影响原生质体的分离数量及活力。不同品种间原生质体培养效果及植株再生能力均有很大差异, 不同研究中分离原生质体所用酶溶液成分、浓度不同, 培养基组成差异较大。前人的研究认为, 酶的浓度低时甘蓝叶肉原生质体分离数量下降, 而且由于原生质体缓慢分离, 常常导致自身融合。而过分增加酶的浓度, 同样会降低原生质体的活力。孙振久在甘蓝原生质体培养愈伤植株再生的研究中, 证实了酶的浓度高于1%时, 原生质体活性显著下降<sup>[4]</sup>。还有不少研究表明, 植物的生长环境、年龄都会对原生质体的分离产生影响, 这些因素是原生质体分离的重要条件。

甘蓝(*Brassica oleracea*)是一种在世界和中国均普遍栽培的重要蔬菜品种, 其原生质体培养自80年代初期由D. Y. Lu等以子叶为材料游离原生质体进行培养首次获得成功以后, 到如今已取得了很大的进展, 已陆续以甘蓝的子叶、根、叶片<sup>[5]</sup>和下胚轴<sup>[6,7]</sup>等外植体为材料游离原生质体并获得了再生植株, 这为对甘蓝进行遗传转化, 从而选育优良的抗病抗虫品种带来了很大的便利。但到目前为止, 所报道的培养方法大都存在分裂频率和植板率较低、再生周期慢的问题。

薛红卫、卫志明、许修宏通过对甘蓝下胚轴原生质体进行分离、培养过程中的一些因素和问题的研究, 建立了由甘蓝无菌苗下胚轴游离原生质体进行培养, 并再生成株的高效再生体系, 同时探讨了影响甘蓝原生质体培养和再生过程的各种因素, 为以甘蓝下胚轴原生质体作为受体系统进行遗传操作奠定了基础<sup>[1]</sup>。

## 3 甘蓝下胚轴培养的研究进展

周禾(1995)利用甘蓝下胚轴进行离体培养, 诱导分化成苗, 但在诱导过程中, 激素种类和配比对芽的分化、生长有很大影响。在本试验周禾通过对激素最佳配比的筛选, 最终探索一条适合甘蓝优良品种的决策和优质资源保存的应用技术

收稿日期: 2004-01-10

途径;蔡小宁等在遗传转化研究中,外植体通过不定芽诱导途径再生植株有利于保存原有品种或材料的优良农艺性状,再转移进某一目的基因控制的特定性状即可达到品种改良的目的。虽然已有从结球甘蓝种子无菌苗子叶切口和下胚轴切段诱导不定芽的报道(1988. Horeau Netal)(1987. Kwon OC and Maeda E),但不定芽的诱导频率仅为4%左右。

结球甘蓝离体下胚轴培养的形态学发生情况,近切口的中柱薄壁细胞首先启动分生,中柱外的内皮层、皮层、表皮细胞随后也启动分生。随着愈伤组织的生长和愈伤形成层的建立,维管组织与分生组织产生。组织培养中出现的多倍性细胞团和单倍性细胞,不会引起原二倍体物种的遗传性变异和性状变化。在愈伤组织中,芽多为外起源,由原体原始细胞和原套原始细胞发育成芽原基,进一步形成不定芽。另外,不定芽还可由外植体内皮层薄壁细胞直接产生。不定根为内起源,来源于维管组织结节的单向极性分生,根原基在转移培养之前就已形成,转移培养后约10 d(天),由不定芽基部产生不定根,植株再生。另有一些如ZeeSY(1987)和张大力(1989年)已获得甘蓝下胚轴培养的植株的报道;赵军良(1992年)在结球甘蓝的组织培养中,有性器官直接再生植株;宋明(1994)对红球甘蓝进行离体培养和快繁,将获得的小植株移栽到土壤中成活率达90%;李琳(1999)研究了球茎甘蓝花托及花柄切口直接出芽,结果显示出球茎甘蓝具有较强的再生能力,这一点与其近缘植物结球甘蓝、花椰菜等一样,极易再生。

#### 4 甘蓝小孢子培养的研究进展

Florenoe chart, Claie Dore(1990)进行了花药或小孢子培养得到再生植株<sup>[2]</sup>;张凤兰(1994)利用小孢子培养获得单倍体或自然加倍而成的二倍体,可迅速得到纯化自交系,大大加速甘蓝杂交育种工作的进程。

近年来,单倍体育种逐渐得到发展。游离小孢子培养是产生单倍体的较好途径。汤青林、宋明、张钟灵以广为种植的甘蓝类蔬菜游离小孢子为实验材料,从材料的选取、小孢子的分离、培养以及提高产胚率等培养技术进行了阐述,分析了甘蓝类蔬菜小孢子培养的优势、潜力和当前存在的问题。小孢子培养可获得单倍体植株,加倍后能够得到纯合亲本,不仅缩短了育种进程,而且提高了所需基因组合的选择效率。甘蓝类蔬菜小孢子培养中能产生单倍体胚,并且在需要结合很多显性等位基因的育种工作中加以利用。同时,利用单倍体培养物的突变能够产生抗病、抗盐、抗旱、抗虫的高产植株。小孢子培养还可以用于研究内外因素对雄核发育的影响。小孢子培养形成的植株后代,一般表现整齐,生活力具有稳定性。因此,小孢子培养技术,无论在今后的育种工作还是基础研究中,都有广泛的应用前景。

但是,小孢子培养本身有一些机制还不明了。诱导频率不高是目前实际应用工作中的大障碍。小孢子发育成完整植株的诱发机理怎么样?如何通过内外因素调节,提高胚产量?如何控制花粉植株的染色体倍性以及诱发同质二倍体纯系?如何找出细胞选择方法以获得遗传上的诱发突变等?这些都有待进一步研究。

#### 5 激素配比在甘蓝组织培养中的作用

植物外植体的离体培养,建立高频率的植株再生体系是基因转化技术中基础性的关键环节。为了缩短育种年限,加速外源基因的转化。以甘蓝的下胚轴和子叶为试材,研究了

不同基因型的5个自交系、3个基因性和4种激素与其培养再生的关系,建立起一套高频率的植株再生体系。而且可以明显看出不添加任何激素的处理中,不能得到愈伤组织,单独使用2,4-D的各个处理中,虽然能够得到愈伤组织,但色泽随浓度增高,白色加重,而后逐渐变褐而枯死。但在低浓度的2,4-D处理中,虽然颜色呈白黄色,但很快会在愈伤组织的表面布满白色茸毛,难以再分化。

单独使用6-BA的各个处理中,得到的愈伤组织均是“玻璃化”,浓度越高外植体膨大速度越快;在浓度低的处理中,外植体膨大速度慢,很快由底部开始变褐直至枯死。在单独使用NAA的处理中,外植体稍有膨大,而后很快变褐枯死。只有在2,4-D、6-BA和NAA混合使用的处理区中,得到了理想的愈伤组织形态,在不含NAA只有2,4-D和6-BA的处理区中,虽然得到理想的愈伤组织,但质地坚硬并有表面着生白色茸毛的现象。

#### 6 生物全息律在甘蓝幼苗组培中的应用

山东大学张颖清创立的全息生物学认为,生物体中含有整体全部信息的相对独立的部分称为一个全息胚,它上面的各个部位都分别在整体或其它全息胚上有各自对应的部位;全息胚的一个部位相对于该全息胚的其它部位,与整体或其它全息胚上其所对应的部位生物学特性相似程度较大;各部位在一个全息胚上的分布规律与各对应部位在整体上或其它全息胚上的分布规律相同。全息生物学(ICIWO biology)是研究生物体部分与整体或部分与部分之间在生物学特性上全息相关性规律以及这些规律的应用的一门新的交叉学科。

通过以甘蓝整块子叶或下胚轴为实验材料的研究方式,而以甘蓝幼苗子叶的不同切块和下胚轴1/3切块为材料探讨这些不同级全息胚之间以及同级全息胚之间的全息相关性,以期对甘蓝现代育种的组培取材、无菌苗体系建立等基础研究起一定的指导作用,进而减少工作盲目性,通过增加器官的诱导频率来提高工作效率。

夏勇、赵冬梅以甘蓝幼苗的不同部位的切块为外植体,用不同浓度的激素处理进行芽器官诱导实验,发现甘蓝幼苗不同部位的切块在离体培养时存在着全息现象,不定芽发生部位、数量、频率的梯度变化均遵循生物全息律。激素浓度不同、外植体大小的不同都不改变全息律在甘蓝幼苗组培中发生作用。

因此,组织培养技术不仅成为甘蓝常规育种以及其它蔬菜常规育种所需的重要辅助技术之一,而且也是细胞育种和分子育种的必要技术之一。

#### 参考文献:

- [1] 薛红卫,卫志明,许智宏.甘蓝下胚轴原生质体高效成株系统的建立[J].实验生物学报,1994,27(2):259~269.
- [2] 陈振光.园艺植物离体培养学[M].中国农业出版社,1995,166.
- [3] 西贞夫.野菜的组织、细胞培养与育种[M].东京:农业图书株式会社,1990:185~187.
- [4] 孙振久.甘蓝子叶原生质体培养与植株再生的研究[J].西北农业大学学报,1993,21(1):100~102.
- [5] 卫志明,许修宏.花椰菜叶肉原生质体培养再生植株[J].园艺学报,1992,12(3):171~175.
- [6] 程振东,卫志明,许智宏.甘蓝型油菜下胚轴原生质体培养的研究[J].生物工程学报,1994,10(1):30~33.
- [7] 卫志明,许智宏.影响花椰菜下胚轴原生质体培养和植株再生的因素[J].植物生理学报,1990,16(4):394~400.