

影响甘蓝型油菜下胚轴外植体芽高频再生因素

祁星华, 王 轶, 罗 勤, 李旭锋

(四川大学生命科学院, 成都 610064)

摘要:以优质高产杂交油菜新品种“蜀杂九号”父本 84100-18 (*Brassica napus* L.) 油菜品系的下胚轴为外植体, 分析讨论了预培养、苗龄、激素浓度、 AgNO_3 等因素对下胚轴的再生条件的影响。试验表明: 7 d~9 d(天)的苗龄的外植体出愈率很高; MS+3 mg/L(毫克/升)6-BA 时芽的分化率最高; AgNO_3 可提高下胚轴芽的分化率; 提高琼脂浓度, 降低蔗糖含量可以减少玻璃化现象。

关键词:愈伤组织; 下胚轴; 预培养; 玻璃化; 再生植株

中图分类号: S635.903.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2005)01-0075-02

自 20 世纪 70 年代起对油菜的组织培养已经进行了较多研究, 已用多种外植体获得了再生植株^[1]。进一步进行外源基因转化是以高频率的植株再生为基础, 因此影响植株再生频率的因素具有重要意义。很多研究发现, 激素组合和培养条件是影响油菜外植体再生频率的因素^[2], 而且许多研究结果存在着很大差异甚至是相互矛盾的。这就给油菜高频再生技术提出了更高的要求。本实验便以油菜下胚轴为外植体讨论芽再生的影响因素。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

以甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 的优质高产杂交油菜新品种“蜀杂九号”的父本 84100-18 作为转化的受体材料, 其种子由四川大学赵云、王茂林老师惠赠。

1.2 培养基

以 MS(大量元素+微量元素+有机质+铁盐+3%蔗糖+0.8%琼脂)培养基为基本培养基, 预培养基、诱导愈伤培养基、分化培养基及生根培养基附加不同浓度的 6-BA (6-Benzylaminopurine); NAA(Naphthaleneacetic acid); 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)的激素组合。

1.3 方 法

收稿日期: 2004-10-10

5.1.3 基因枪法 又称微弹射击法, 是一种将载有外源 DNA 的金属(钨或金)经驱动后通过真空小室进入靶组织的一种遗传转化技术。1993 年 Nishihara 等用基因枪法轰击百合的花粉, 获得 CUS 基因的瞬时表达。Watad 等应用 Biolistics PDS1000/He 系统, 对百合愈伤组织进行轰击转化, 选择标记基因是 PAT, 选择剂是 bialaphos。PCR 分析和 southern 杂交证实得到了 3 株含 PAT 基因的百合转基因植株。荷兰的 Leiden 大学正应用基因枪法, 导入病毒的外壳蛋白基因, 以获得抗病毒的百合。

5.2 基因表达调控

启动子是转录所必需的调控序列, 外源基因的导入, 表达载体中启动子的选择是十分重要的。Leede 等采用不同的启动子(CaMV 35S, TR2', Act1, LAT52, chiAPA2)驱动 GUS 基因

1.3.1 无菌苗的获得 将油菜种子用 70% 乙醇浸泡 30 s(秒), 0.1% 的升汞溶液浸泡 10 min(分钟), 无菌水冲洗 5~6 次, 接种于 MS 固体培养基上。置培养室中 26℃~28℃下、光照 16 h/d(小时/天)萌发。

1.3.2 培养方法 切取无菌苗下胚轴(0.5 cm~1 cm(厘米))接入含有不同浓度的 6-BA、2,4-D、NAA 的预培养基, 诱导愈伤培养基和分化培养基中, 选择性加入 6 mg/L(毫克/升) AgNO_3 , 在 16 h/d(小时/天)光照、26℃~28℃条件下培养, 观察结果。

1.4 生根和移栽

将分化培养基中诱导出的芽接种在 1/2MS+0.2 mg/L(毫克/升)NAA 培养基中诱导生根, 观察结果。然后将生根的小植株经过 3 d~5 d(天)的炼苗, 然后小心取出, 洗去根上附着的培养基, 将其移到装有腐殖土的花盆中。

2 结果分析与讨论

2.1 小苗的龄期对愈伤组织诱导的影响

分别取 4 d~11 d(天)龄无菌苗下胚轴, 接种于 MS+1 mg/L(毫克/升) 2,4-D+4 mg/L(毫克/升) 6-BA (激素浓度为本实验室实验数据)培养基上, 4 d(天)左右便有膨大现象; 3 周左右的愈伤情况结果见表 1。

由表可知, 7 d~9 d(天)苗龄的下胚轴出愈率最高, 且愈伤组织长势很好, 形成时间也较为提前。时间过长过短都不

转化百合花粉, 仅 TR2', 在百合花粉中显示活性。Miyoshi 和 Nishihara 等报道了番茄的 LAT52 启动子和玉米的 Zml3 启动子在百合花粉中的表达。Tsuchiya 等构建了 CaMV35S、Act1、Adhl 启动子和蓖麻催化酶基因内含子驱动的 GUS 基因, 转化百合鳞片和未成熟的胚胎, 使用 Act1 启动子和修饰的 CaMV35S 启动子得到了最大的 GUS 基因的瞬时表达。GUS 基因的瞬时表达受胚龄、培养时间和培养条件影响。

综上所述, 利用植物离体培养技术进行百合的脱病毒、快速繁殖和胚胎拯救已有较多的报道, 并建立了相应的技术程序。但分子生物学技术在百合上的应用才刚刚起步, 离实用化阶段仍有一定的距离, 尤其在遗传转化方面。如何从百合中克隆有用的基因, 建立高效、重复性好、无基因型依赖性的转化系统, 今后仍需进行大量深入的研究。

利于愈伤组织的诱导,而且,下胚轴两端很容易褐化,导致死亡。说明7d~9d(天)苗龄的下胚轴的分化能力较强,利于形成愈伤组织。

表1 不同苗龄的下胚轴愈伤诱导的情况

小苗龄期(d)	接种个数	出愈个数	出愈率(%)	出愈情况
4	240	31	12.9	+
5	240	47	19.6	+
6	240	121	50.4	++
7	240	200	83.3	+++
8	240	217	90.4	+++
9	240	212	88.3	+++
10	240	142	59.2	++
11	240	67	27.9	+

2.2 下胚轴的预培养对愈伤诱导的影响

在MS+0.5 mg/L(毫克/升)2,4-D+0.2 mg/L(毫克/升)6-BA(激素浓度为本实验室实验数据)的培养基中对4d,8d,10d(天)的下胚轴进行2d~3d(天)的预培养,发现下胚轴相对没有经过预培养的褐化现象减轻,大大地提高了出愈率(见表2)。

表2 预培养对下胚轴出愈率影响的情况

小苗龄期(d)	接种个数	预培养时间	出愈个数	出愈率(%)	出愈情况
4	240	2	84	35.0	+
8	240	3	238	99.2	+++
10	240	2	206	85.8	+++

2.3 激素对下胚轴再生芽形成的影响

将发育良好,淡绿色,质地较疏松的愈伤组织转入以MS为基本培养基并添加不同浓度的6-BA和NAA的分化培养基中,根据观察结果,发现从1周左右开始,愈伤组织上会出现不同数量的绿色的芽点,2周后便有小芽形成。3~4周生长成独立的苗或者形成丛生芽。

不同浓度的激素浓度配比发现,当6-BA为3 mg/L(毫克/升)时,再生芽出现的最多,并且出现时间较早,生成的再生芽也比较茁壮。添加NAA对再生芽的形成没有太大的作用,反而会在再生芽形成前形成大量根毛,影响再生芽的形成(见表3)。

表3 激素浓度对下胚轴再生芽形成影响的情况

激素浓度	接种愈伤组织数	再生芽数目	分化率%	芽的生长状况
1mg/L 6-BA	200	74	37.0	+
2mg/L 6-BA+0.15mg/L NAA	200	92	56.0	++
3 mg/L 6-BA	200	168	84.0	+++
3 mg/L 6-BA+0.15 mg/L NAA	200	154	77.0	+++
4 mg/L 6-BA	200	86	43.0	+
5 mg/L 6-BA+0.15 mg/L NAA	200	59	29.5	+

家养花卉病虫害的防治

第一保持花卉栽培地的环境卫生,可减少危害。第二,保护植株,不要破皮,受损伤,谨防病菌侵入。第三,培养预先消毒,可杀死病菌和害虫。第四,加强日常管理,保持水肥适当,空气畅通,温度适宜,采光适量,使植株生长健壮,控制病虫害的滋生和蔓延。第五,室外越冬的花卉,落叶后喷或涂石硫合剂,早春和花芽发芽前喷1~3次波尔多液,以防病虫害。

立枯病:播种幼苗。近地表最初出现烫伤状,而后变软倒地而死。盆土表面撒草木灰或浇灌代森铵溶液可杀菌保苗。

锈病:香石竹及蔷薇科花卉。初期叶面出现桔红色或黄褐色斑点,后期叶背,布满黄粉,叶片焦枯。

2.4 AgNO₃对芽再生的影响

选取最佳的一组激素浓度组合(选取8d(天)苗龄的小苗,经过3d(天)的预培养,在MS+4 mg/L(毫克/升)6-BA+1 mg/L(毫克/升)2,4-D中诱导愈伤2周后,转入3 mg/L(毫克/升)的分化培养基中),在其中分别加入0 mg/L(毫克/升)AgNO₃, 3 mg/L(毫克/升)AgNO₃, 6 mg/L AgNO₃, 9 mg/L AgNO₃,发现当AgNO₃为6 mg/L(毫克/升)时,对芽的分化效率的提高最明显,但是当AgNO₃为9 mg/L(毫克/升)时,反而会影响芽的分化(见表4)。

这种影响表明AgNO₃对于组织培养及转化中芽的再生是有利的,因为Ag⁺是乙烯合成的抑制剂,它可以通过竞争性结合细胞膜上的乙烯受体蛋白从而阻止或降低乙烯的作用^[3]。

表4 AgNO₃对芽再生的影响

AgNO ₃ 浓度(mg/L)	接种个数	出芽数量	出芽率%	出芽状况
0	240	202	84.2	++
3	240	206	85.8	+++
6	240	218	90.8	+++
9	240	183	76.3	++

2.5 玻璃化现象

再生芽的诱导过程中,出现大量的再生苗有玻璃化的现象,这是植株在组培时生理活动失调引起的现象^[4],芽透明或半透明,生长迟缓,严重的影响了再生频率。在实验的过程中,我们将玻璃化的苗移入改良的分化培养基中(琼脂量从0.8%提高到1.6%,蔗糖含量从3%降低到1%)培养2~3周,然后再将其移入1/2MS+0.2 mg/L(毫克/升)培养基中诱导生根,生根率同样可以达到98%以上,这样大大降低了玻璃化苗的数量,提高了分化频率。因此高浓度的琼脂可以克服玻璃化现象。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Jain R K, Chowdhury J B, Sharma D R, et al. 1988 Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some Brassica species. Plant Cell Tissue and Organ Culture, (14): 197~206.
- [3] De Block M, Dirk De Brouwer, Paul Tenning. 1989 Transformation of Brassica napus and Brassica oleracea using Agrobacterium tumefaciens and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants. Plant Physiol, (91): 694~701.
- [4] V. Cardoza and C. N. Stewart Jr 2003 Increased transformation and rooting efficiencies in canola(Brassica napus L.)from hypocotyl segment explants. Plant Cell Rep, (21): 599~604.

炭疽病:观果花卉。果盛衰前果皮出现褐色斑点,逐渐扩大,果盛衰后硬化,花谢后喷1~3次或石硫合剂或多菌灵。

白粉病:蔷薇科及菊科花卉。叶子两面出现白粉,降低湿度,喷代森铵或多菌灵溶液喷波尔多液预防。

软腐病:草本花卉。叶面、叶柄花茎上出现水浸状斑,然后萎蔫下垂。喷波尔多液。

煤烟病:多年生常绿花卉。叶面出现暗褐色煤污,以后逐渐扩大形成黑色煤烟状霉层。喷波尔多液,或用5%的酒精把煤污去掉。

褐纹病:兰科花卉。叶面出现褐色凹陷斑点叶片干焦。注意荫蔽和提高空气湿度,等量波尔多液。

黑锈病:菊科花卉。早期顺面出现黄绿色斑,破裂后飞黄粉,最后变黑色斑块,加强排水,充分日照,加强通风,喷波尔多液。(苏巨 江苏省宝应县隅园巷4-6C号雨露兰阁)