

以无菌苗外植体高效诱导球茎甘蓝不定芽再生研究

马 光^{1,2}, 郭继平^{1,3}

(1. 衡水学院 生命科学系 河北 衡水 053000; 2. 东北林业大学 生命科学院

黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘 要:以球茎甘蓝(*Brassica oleracea* L. var. *caulorapa* DC.) 5 d 苗龄的无菌苗带柄子叶和胚轴为外植体, 研究了不同激素组合对其不定芽再生的影响。结果表明: TDZ 同 NAA 配合诱导再生的效果好于 6-BA 同 NAA 的组合; 带柄子叶再生效果好于胚轴。最佳再生培养基为添加 3.5 mg/L TDZ+0.5 mg/L NAA 的含 5.0 mg/L AgNO₃ 的 MS 培养基。

关键词: 球茎甘蓝; 再生; TDZ; 带柄子叶; 胚轴

中图分类号: S 635.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)09-0010-04

球茎甘蓝(*Brassica oleracea* L. var. *caulorapa* DC.) 别名苤蓝、擘蓝、玉蔓菁等, 为十字花科芸薹属甘蓝种中能形成肉质茎的变种, 2 a 生草本植物。虽然甘蓝类植物的离体再生研究很多, 但是国内对球茎甘蓝离体再生的研究极少, 仅有的研究是以球茎甘蓝的子房的花托和花柄为外植体, 以 6-BA 和 2, 4-D 诱导愈伤组织后再采用 6-BA 和 NAA 诱导芽分化, 获得了再生植株。

第一作者简介: 马光(1977-), 男, 山东济宁人, 博士, 讲师, 现从事植物发育生物学方向研究工作。E-mail: maoohan@163.com。

通讯作者: 郭继平(1979-), 女, 山东济南人, 博士, 讲师, 现从事基因工程方向研究工作。E-mail: guojiping888@163.com。

收稿日期: 2009-03-20

但是此种方法受取材时期限制, 且程序较为复杂^[1-2]。

在甘蓝类作物的研究中, 常采用 6-BA 同其他激素配合来诱导不定芽的再生^[3-5]。在采用花托和花柄作为外植体诱导球茎甘蓝再生的研究中, 6-BA 也取得了较好的效果^[1-2]。但是在其他一些芸薹属植物研究中, 6-BA 效果并不总是非常好, 而 TDZ (N-苯基-N'-1, 2, 3-噁二唑) 常作为一种新型的细胞分裂素来代替 6-BA, 且效果较好。类似的结果在其他芸薹属植物的研究中已有报道^[6-7]。同时, 作为乙烯的抑制剂, AgNO₃ 在许多芸薹属作物的离体再生研究中得以应用^[8-9]。

在芸薹属作物的遗传转化, 以及基因功能研究中, 甘蓝类蔬菜是最常采用的试材。该研究获得的简便高效的球茎甘蓝的离体再生系统, 可为发现芸薹属作物中

[19] 蔡蕾, 丁同楼, 王宝山. 外源 GA₃、ABA 和 Ca(NO₃)₂ 缓解盐对小麦种子萌发的抑制作用[J]. 西北植物学报, 2004, 24(4): 583-587.

[20] 张士功, 高吉寅, 宋景芝. 硝酸钙对小麦萌发过程中盐害的缓解作用

[J]. 作物研究, 1998, 12(3): 20-23.

[21] 郑爱珍, 刘传平, 沈振国. 镉处理下青菜和白菜 MDA 含量、POD 和 SOD 活性的变化[J]. 湖北农业科学, 2005(1): 67-69.

Effects of Cu on Seeds Germination and Seedling Early Growth of Cucumber and Corn

ZHENG Ai-zhen, SONG Wei-yi

(Department of Life Sciences, Shangqiu Normal University, Shangqiu Henan 476000 China)

Abstract: This research used the methods called solution cultivating, cucumber and corn as the material, studied the effects of Cu on the seeds germination, seedling growth and the chlorophyll contents and so on. The result indicated: When the concentration of Cu solutions less 50 mg/L, it had certain promotion on the corn and the cucumber seeds germination, but it was bad for the seedling growth, and along with the increase of concentrartion, the inhibition enhanced, when the concentrartion of the Cu solutions achieved 150 mg/L the corn and cucumber's root no longer grew. Furthermore, the excessive Cu can cause the corn and cucumber chlorophyll a and the chlorophyll b content dropped. Compared with the cucumber, the corn of the tolerance of Cu was weaker.

Key words: Cu; Cucumber; Corn; Seed germination; Adult plant growth; Chlorophyll content

与茎部膨大作为营养贮藏器官的相关基因并研究其功能提供前期技术平台。

1 材料和方法

1.1 材料

球莖甘蓝的种子为衡水学院生命科学系实验室保存, 品种为当地品种河间莖蓝, 自交三代后常温贮存于纸袋中。

1.2 方法

1.2.1 种子消毒与播种 选取饱满均一的种子放到添加 2~3 滴 Tween-20 的 20% 的白猫漂水中浸泡 20 min, 期间不停轻轻摇晃。在超净工作台中采用灭过菌的蒸馏水清洗 3 次。然后将种子播种于基本培养基中。基本培养基采用 MS 培养基配方, 每 50 mL 添加 20 g 蔗糖调 pH 为 5.8 后加入 0.7% 的琼脂粉, 在 121℃ 灭菌 15 min 后冷却备用。播种后放置于 26℃ 培养箱中, 暗处 48 h, 然后在 45 μmol·m⁻²·s⁻¹ 光下 48 h。此时无菌

苗子叶已经充分展开, 子叶节清晰可见。

1.2.2 外植体的切取与培养 经过上述培养的无菌苗用来切取带柄子叶和胚轴外植体。带柄子叶从接近无菌苗的子叶节处的上方切取, 注意去除生长点。胚轴从子叶节下部到根部之间切取后截为长度为 0.3~0.5 cm 的小段。带柄子叶垂直放置于不定芽诱导培养基中, 切口稍微插入培养基中。胚轴水平放置于芽诱导培养基中。芽诱导培养基为基本培养基添加不同的激素组合(见图 1~4), 每种培养基均于 121℃ 灭菌 15 min, 冷却至约 50℃ 时添加的过滤除菌的 AgNO₃ 溶液。外植体的在 26℃ 下每天 16 h 45 μmol·m⁻²·s⁻¹ 光照。

1.2.3 数据统计 培养 2 周后, 记录产生不定芽的外植体所占的比率和每个外植体的诱导的不定芽数, 3 次重复。不定芽分化率(%)=分化出芽的外植体数/处理外植体数×100%, 数据用 DPS 数据统计分析软件进行方差分析, 多重比较用 Duncan 法。

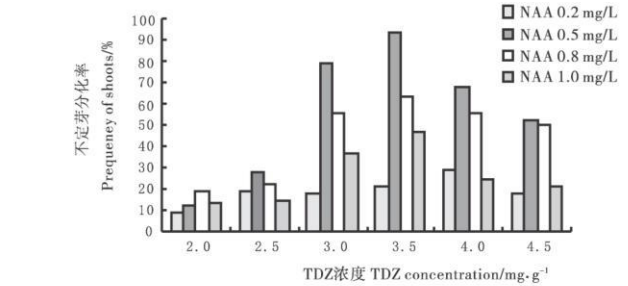


图 1 TDZ 和 NAA 组合对带柄子叶不定芽再生率的诱导效果
Fig. 1 Frequency of shoot regeneration from cotyledonary petiole explants with TDZ and NAA

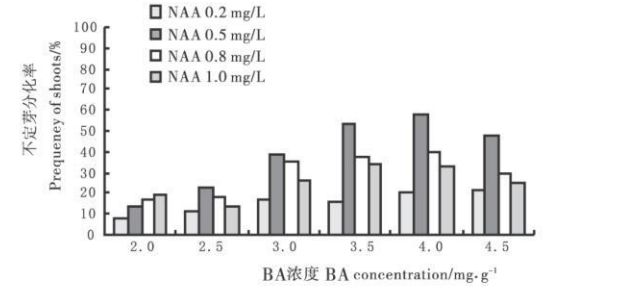


图 2 6-BA 和 NAA 组合对带柄子叶不定芽再生率的诱导效果
Fig. 2 Frequency of shoot regeneration from cotyledonary petiole explants with BA and NAA.

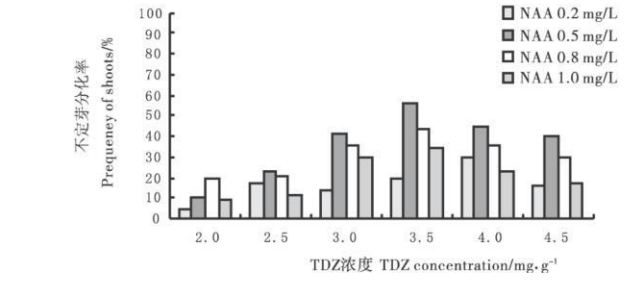


图 3 TDZ 和 NAA 对胚轴不定芽再生率的诱导效果
Fig. 3 Frequency of shoot regeneration from hypocotyl explants with TDZ and NAA.

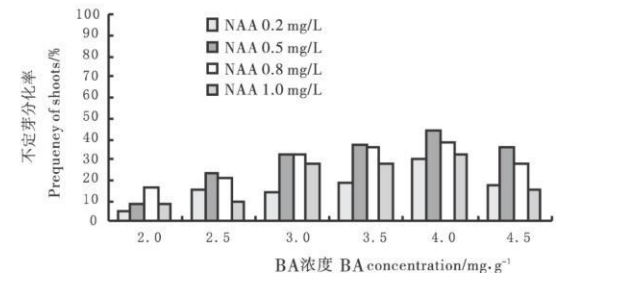


图 4 6-BA 和 NAA 对胚轴不定芽再生率的诱导效果
Fig. 4 Frequency of shoot regeneration from hypocotyl explants with BA and NAA.

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对球莖甘蓝不定芽再生率的影响

无论是采用带柄子叶还是胚轴作为外植体, TDZ 同 NAA 配合的效果均好于 6-BA 同 NAA 配合。当采用带柄子叶作为外植体时, TDZ (3.5 mg/L) 和 NAA (0.5 mg/L) 的激素组合效果最好, 可以诱导的不定芽分化率为 93.89% (图 1); 而效果最好的 6-BA (4.0 mg/L) 同

NAA (0.5 mg/L) 的激素组合可以诱导的不定芽分化率为 58.44% (图 2)。当采用胚轴外植体时, 最高的不定芽分化率 55.63% (图 3)、40.07% (图 4) 也分别产生于 TDZ 3.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 以及 BA 4.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L。由此可知, 外植体的类型不同对不同激素组合的效果有显著的影响。但是激素组合与外植体的互作并不明显, 在同等浓度下无论采用何种激素组

合,带柄子叶的不定芽诱导效果均好于胚轴。与不定芽分化率不同,在不同的激素组合的培养基中,不同外植体的单个外植体的平均不定芽诱导数差异不显著(具体数据为给出),基本维持在 10 个左右。可见不同的外源

植物生长调节剂均是通过调节内源激素的比例影响外植体的器官发生,一旦器官发生方向确定,外源激素的作用就降到了次要地位。

表 1 在激素组合 1 中不同浓度 AgNO₃ 对球茎甘蓝不定芽再生的影响

AgNO ₃ /mg·L ⁻¹	Effect of AgNO ₃ on shoot regeneration of kohlrabi with hormone combination No.1					
	带柄子叶 Cotyledonar petiole			胚轴 Hypocotyl		
	外植体数 Number of explants	分化出芽的外植体数 Number of shooted explants	分化率 Frequency of shoot regeneration/ %	外植体数 Number of explants	分化出芽的外植体数 Number of shooted explants	分化率 Frequency of shoot regeneration/ %
0	100	14	14.00d	98	7	7.14c
2.5	98	30	30.61c	98	19	19.39
5	96	90	93.75a	99	58	58.56a
7.5	100	92	92.00a	91	49	53.85a
10	100	89	89.00a	100	51	51.00a
12.5	97	44	45.36b	99	30	30.30b
15	96	32	33.33bc	95	10	10.53c

从 NAA 的作用来看,无论是同 TDZ 配合还是同 6-BA 配合,在诱导球茎甘蓝带柄子叶或者胚轴不定芽再生方面,在 0.2~1.0 mg/L 的范围内均表现出先上升后下降的趋势,而且均是在 NAA 为 0.5 mg/L 时诱导不定芽再生效果最好。这表明在诱导球茎甘蓝不定芽再生时,NAA 同 TDZ 配合或者同 6-BA 配合时与外植体类型之间互作不明显。

2.2 不同浓度 AgNO₃ 对球茎甘蓝不定芽分化率影响

在前期的试验中,发现 AgNO₃ 与外植体类型、激素组合之间互作效应不显著。表 1 显示了胚轴和带柄子叶在分化效果最好的 TDZ 和 NAA 组合(组合 1: TDZ

3.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L)以及分化效果最好的6-BA 和 NAA 组合(组合 2: 6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L)中的不定芽分化情况(表 1、2)。从表 1 可看出,不添加 AgNO₃ 时球茎甘蓝的不定芽分化率极低。在 AgNO₃ 浓度从 0~5 mg/L 的范围,不定芽分化率急剧上升,虽然基本 5 mg/L 分化率最高,但是 5~10 mg/L 之间不定芽分化率差异不显著。当 AgNO₃ 浓度超过 10 mg/L 时,不定芽分化率又有显著下降。在该研究中发现当 AgNO₃ 浓度超过 5 mg/L 时,畸形芽的数量增加不利于不定芽的分离生根,所以综合分化效果和芽的正常程度选择 AgNO₃ 浓度以 5 mg/L 为好。

表 2 在激素组合 2 中不同浓度 AgNO₃ 对球茎甘蓝不定芽再生的影响

AgNO ₃ /mg·L ⁻¹	Effect of AgNO ₃ on shoot regeneration of kohlrabi with hormone combination No.2					
	带柄子叶 Cotyledonar petiole			胚轴 Hypocotyl		
	外植体数 Number of explants	分化出芽的外植体数 Number of shooted explants	分化率 Frequency of shoot regeneration/ %	外植体数 Number of explants	分化出芽的外植体数 Number of shooted explants	分化率 Frequency of shoot regeneration/ %
0	100	8	8.00e	100	3	3.00d
2.5	100	21	21.00d	100	10	10.00b
5	95	53	55.95a	93	38	40.86a
7.5	99	54	54.55ab	94	39	41.49a
10	94	47	50.00b	95	38	40.00a
12.5	100	32	32.00c	98	13	13.27b
15	96	18	18.75d	100	6	6.00c

3 问题与讨论

许多已有的研究^[10,12]结果表明,在诱导离体再生时 TDZ 表现出比 6-BA 更好的效果,不过其具体原因还有待研究。TDZ 作为一种人工合成的苯基脲衍生物在许多物种的组织培养中表现出了高效的诱导愈伤组织形成、体细胞胚胎发生等效应。在诱导不定芽再生时,浓度非常低的 TDZ 的诱导效果就可以同其他高浓度的细胞分裂素的相当^[12]。TDZ 可以诱导木本植物的离体再生,而 6-BA 需要非常高的浓度才可以^[10,11],甚至根本无法诱导^[13]。有研究表明^[14],在诱导植物离体再生时,TDZ 和 6-BA 的受体是相同的;有的研究指出在和受体

结合时,TDZ 和受体形成的复合物比 6-BA 与受体形成的复合物更加稳定^[15]。

在许多芸薹属植物的离体再生研究中,添加AgNO₃ 可以有效提高不定芽的再生率,有时甚至不添加 AgNO₃ 就无法完成离体再生^[16]。该研究在诱导芽分化的培养基中添加 AgNO₃对球茎甘蓝无菌苗外植体的离体再生是非常必要的。一些研究表明 Ag⁺ 可以作为一种乙烯的抑制剂而减少了有活性的乙烯的含量,但是其并不抑制乙烯的合成^[17]。另一方面,Ag⁺ 的存在可以使乙烯无法干扰多胺的合成,而多胺的存在有利于体细胞胚胎发生和芽的再生^[18]。但是也有一些研究指出 Ag⁺ 是通过

竞争性与细胞膜上的乙烯受体蛋白结合从而阻止或降低乙烯的作用^[9]。因此,关于 AgNO₃ 促进植物离体再生的真正原因还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 李琳,张雪梅,李旭锋,等.球茎甘蓝花托花柄组织培养及其植株再生[J].四川大学学报(自然科学版),1999(2):171-173.
- [2] 李琳,张雪梅,李旭锋,等.球茎甘蓝花托及花柄切口直接出芽的研究[J].西北植物学报,1999(3):86-89.
- [3] Cogan N, Harvey E, Robinson H, et al. The effects of anther culture and plant genetic background on *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of commercial cultivars and derived doubled-haploid *Brassica oleracea* [J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20: 755-762.
- [4] Tang G X, Zhou W J, Li H Z, et al. Medium, Explant and Genotype Factors influencing shoot regeneration in oilseed Brassica spp. [J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2003, 189(5): 351-358.
- [5] Sparrow P A G, Townsend T M, Morgan C L, et al. Genetic analysis of in vitro shoot regeneration from cotyledonary petioles of *Brassica oleracea* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 1249-1255.
- [6] Christey M G, Sinclair B K, Braun R H, et al. Regeneration of transgenic vegetable Brassicas (*Brassica oleracea* and *B. campestris*) via Ri-mediated transformation [J]. *Plant Cell Report*, 1997, 16: 587-593.
- [7] Jonoubi P, Mousavi A, Majid A, et al. Efficient regeneration of *Brassica napus* L. hypocotyls and genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Biologia Plantarum*, 2005, 49(2): 175-180.
- [8] Akasaka Y, Yoshida H, Takahata Y. Efficient plant regeneration from leaves of rapeseed (*Brassica napus* L.): The influence of AgNO₃ and genotype [J]. *Plant Cell Report*, 2005, 24: 649-654.
- [9] Min B W, Cho Y N, Song M J, et al. Successful genetic transformation of Chinese cabbage using phosphomannose isomerase as a selection marker [J]. *Plant Cell Report*, 2007, 26: 337-344.

- [10] Preece J E, Huetteman C A, Ashby W G, et al. Micro-and cutting propagation of silver maple. II. Genotype and provenance affect performance [J]. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*, 1991, 116: 149-155.
- [11] Baker B C, Bhatia S K. Factors affecting adventitious shoot regeneration from leaf explants of quince (*Cydonia oblonga*) [J]. *Plant cell, tissue and organ culture*, 1993, 35: 273-277.
- [12] Murthy B N S, Murch S J, Saxena P K. Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. In vitro cellular & developmental biology [J]. *Plant*, 1998, 34: 267-275.
- [13] Mundhara R, Rashid A. Stimulation of shoot-bud regeneration on hypocotyl of Linum seedlings on a transient withdrawal of calcium: effect of calcium, cytokinin and thidiazuron [J]. *Plant Science*, 2002, 162: 211-214.
- [14] Iwamura H, Fujita T, Koyama S. Quantitative structure activity relationship of cytokinin active adenine and urea derivatives [J]. *Phytochemistry*, 1980, 19: 1309-1309.
- [15] Nagata R, Kawachi E, Hashimoto Y. Cytokinin-specific binding protein in etiolated mung bean seedlings [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, 198: 543-549.
- [16] Chi G L, Pua E C. Ethylene inhibitors enhanced de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* spp. Chinensis (Chinese cabbage) *in vitro* [J]. *Plant Science*, 1989, 64: 243-250.
- [17] 张志军,李会珍,何云,等.硝酸银处理对马铃薯离体苗生长与结薯的影响[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2006,32(1):36-40.
- [18] 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.
- [19] Chraïbi B K M, Latche A, et al. Stimulation of shoot regeneration from cotyledon of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and coltalt [J]. *Plant Cell Report*, 1991, 10: 204-207.

Efficient Shoot Regeneration of *Brassica caulorapa* Using Seed Explants Cultured *in Vitro*

MA Guang^{1,2}, GOU Ji-ping^{1,3}

(1. Department of Life Sciences, Hengshui College, Hengshui, Hebei 053000, China; 2. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China; 3. College of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090, China)

Abstract: The shoot regeneration of kohlrabi (*Brassica oleracea* L. var. *caulorapa* DC.) *in vitro* from cotyledonary petiole and hypocotyl explants was studied. The effects of the combination and concentration of plant growth regulators were investigated on shoot regeneration of kohlrabi. The results showed that combination of thidiazuron (TDZ) and NAA was better than combination of 6-BA and NAA and cotyledonary petiole was better than hypocotyl for regeneration. The most suitable recipe for getting high shoot regeneration was MS medium containing 3.5 mg/L TDZ, 0.5 mg/L NAA and 5.0 mg/L AgNO₃.

Key words: *Brassica oleracea*; Regeneration; TDZ; Cotyledonary petiole; Hypocotyl