

# 新疆恰玛古子叶及下胚轴植株再生体系的建立

地丽热巴·地里夏提, 木合热皮亚·艾尔肯, 张富春, 张霞

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046)

**摘要:**以新疆恰玛古种子萌发 5 d 无菌苗的子叶及下胚轴为外植体, 研究了各种不同激素配比条件下新疆恰玛古的再生体系。结果表明: 培养基 MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.1 mg/L 对愈伤组织诱导效果较好, 子叶、下胚轴的愈伤诱导率分别为 65.4%、95.5%; 再生芽的诱导培养基为 6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+AgNO<sub>3</sub> 5.0 mg/L, 子叶、下胚轴的芽分化率分别为 20.8%、65.0%。将芽转入生根培养基 MS+IBA 0.5 mg/L 中诱导生根。20 d 后, 生根的小植株练苗移入花土中, 成活率达 95%。

**关键词:**恰玛古; 子叶; 下胚轴; 愈伤组织; 再生植株

**中图分类号:**S 631.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0132-04

恰玛古(*Brassica rapa* L.)为种子植物门双子叶植物纲十字花科芸苔属 2 a 生草本植物, 又名芜菁、蔓菁等。新疆的恰玛古, 根茎扁圆, 是芜菁的一个地方品种。以肉质根为食用器官, 营养丰富, 是新疆各族人民普遍食用的一种蔬菜<sup>[1]</sup>, 也是新疆地区的地道药材, 具有开胸顺气、健胃消食、解毒的功效<sup>[2]</sup>。

恰玛古是较难再生的根部膨大类作物, 离体再生非常困难。对恰玛古相近物种离体再生研究其再生频率均未超过 50%<sup>[3-5]</sup>。随着农业生物技术的发展, 恰玛古再生体系的建立和改良, 对于利用植物基因工程技术加速恰玛古育种研究具有重要意义。

目前, 新疆恰玛古高频植株再生方面的研究还少见报道, 该研究以新疆的恰玛古的子叶和下胚轴为材料, 试图初步建立新疆恰玛古外植体组织培养再生体系, 为进一步通过基因转化获得预期优良性状的恰玛古创造了条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料来自于昌吉市亚华种苗有限责任公司, 选取籽粒饱满、均一的恰玛古种子。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 培养基的制备 基本培养基 MS<sub>0</sub>: MS+30 g/L

**第一作者简介:**地丽热巴·地里夏提(1985-), 女, 在读硕士, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: dilraba8588@163.com.

**责任作者:**张霞(1982-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事植物分子生物学研究工作。E-mail: xia, zhangxjkt@gmail.com.

**基金项目:**新疆生物资源基因工程重点实验室开放课题资助项目(XJDX0201-2012-05)。

**收稿日期:**2012-09-03

蔗糖+0.7%琼脂, pH 5.8~6.0。愈伤组织诱导培养基: MS<sub>0</sub> 添加不同浓度的 2,4-D(0.1、0.3、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L)和 KT(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L)。芽分化培养基 1: MS<sub>0</sub> 添加不同浓度的 6-BA(2.0、3.0、4.0、5.0 mg/L)和 NAA(0.1、0.3、0.5、1.0、1.5 mg/L)。芽分化培养基 2: MS<sub>0</sub> 添加不同浓度的 6-BA(2.0、3.0、4.0、5.0 mg/L)和 NAA(0.1、0.3、0.5、1.0、1.5 mg/L)及 5.0 mg/L AgNO<sub>3</sub><sup>[3]</sup>。生根培养基: MS<sub>0</sub>+IBA 0.5 mg/L。AgNO<sub>3</sub> 采用过滤灭菌, 在培养基高温、高压灭菌后冷却到 60℃左右时加入, 其它添加物均在灭菌前加入。

**1.2.2 种子的表面消毒与无菌苗的获得** 恰玛古种子先用 75%酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗 3~4 次后, 0.1%的氯化汞处理 8 min, 无菌水反复洗 8~10 次, 无菌滤纸吸干表面的水分, 然后播种于基本培养基 MS<sub>0</sub> 上, 置 25℃、16 h 光照/8 h 黑暗的光照周期下培养 5 d, 光照强度为 1 600~2 000 lx。取种子萌发 5 d 苗龄的无菌苗子叶、下胚轴为外植体, 进行植株再生的研究。

**1.2.3 植株再生过程** 切取 5 d 龄幼苗子叶和下胚轴, 切成长 0.5~1.0 cm 左右, 接入愈伤诱导培养基, 每隔 15~20 d 继代 1 次, 每处理 6 瓶, 每瓶 6~7 块, 3 次重复, 在 25℃、16 h 光照条件下(2 000~3 000 lx)培养, 接种 20 d 后统计愈伤诱导率。继代培养基与诱导培养基成分相同。愈伤诱导率=形成愈伤的种子数/接种种子总数×100%。将诱导的愈伤组织, 转入芽分化培养基, 每 15~20 d 继代 1 次, 每瓶接种 8 个外植体, 每个处理至少接种 30 个外植体, 3 次重复, 在 25℃、16 h 光照条件下(2 000~3 000 lx)培养, 40 d 后统计愈伤分化率。愈伤分化率=分化形成芽的愈伤组织数/接种的总愈伤组织数×100%。继代培养基与诱导培养基成分相同。在

芽分化培养基中培养产生的再生芽长至 3~4 cm 时,切除底部愈伤组织,转入生根培养基生根,15 d 后将已生根的小植株练苗后移入花土中生长。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度 2,4-D 和 KT 对不同外植体愈伤组织诱导率的影响

接入愈伤组织诱导培养基中的恰玛古子叶和下胚轴 20 d 后均可诱导出愈伤组织。子叶接种 6~7 d 后,在切口处及圆片边缘出现白色致密愈伤组织,下胚轴诱导出愈伤的时间较子叶短,下胚轴接种 3~4 d 后,切口处出现白色致密愈伤组织,培养第 10 天,大部分外植体已经完全转化为愈伤,观察到的愈伤组织为粒状,黄白色或白色。从表 1、2 可以看出,不同浓度的 2,4-D 和 KT 水平下愈伤的诱导能力不同。2,4-D 浓度为 2.0 mg/L,KT 浓度为 0.1 mg/L 时,子叶最高诱导率为 65.4%,下胚轴最高诱导率为 95.5%。子叶与下胚轴比较,下胚轴的愈伤生长速度、出愈率均高于子叶。

表 1 不同浓度 2,4-D 和 KT 对恰玛古子叶愈伤组织诱导率的影响

Table 1 Effects of different concentrations of 2,4-D and KT on callus induction frequency of cotyledons of *Brassica rapa* L

2,4-D /mg · L <sup>-1</sup>	愈伤组织诱导率 Induction frequency of callus/ %	KT 0.1 mg/L	KT 0.2 mg/L	KT 0.3 mg/L	KT 0.4 mg/L	KT 0.5 mg/L
0.1	18.4	18.6	12.6	10.5	25.1	
0.3	30.6	34.3	42.7	29.3	20.5	
0.5	38.5	41.5	46.5	44.3	32.1	
1.0	45.6	43.8	33.5	30.7	30.7	
1.5	56.3	47.1	31.3	25.6	25.0	
2.0	65.4	59.7	47.4	53.8	46.7	
2.5	50.3	37.8	35.9	19.1	30.0	
3.0	38.5	42.3	28.7	25.5	20.3	

表 2 不同浓度 2,4-D 与 KT 对恰玛古下胚轴愈伤组织诱导率的影响

Table 2 Effects of different concentrations of 2,4-D and KT on callus induction frequency of cotyledons of *Brassica rapa* L

2,4-D /mg · L <sup>-1</sup>	愈伤组织诱导率 Induction frequency of callus/ %	KT 0.1 mg/L	KT 0.2 mg/L	KT 0.3 mg/L	KT 0.4 mg/L	KT 0.5 mg/L
0.1	38.9	61.2	32.6	30.7	45.3	
0.3	53.6	55.8	64.7	49.3	40.8	
0.5	58.3	61.7	66.7	64.2	52.4	
1.0	84.6	82.2	73.2	60.5	52.4	
1.5	86.7	77.1	62.5	55.1	53.2	
2.0	95.5	88.7	76.3	61.6	53.2	
2.5	80.1	66.5	65.6	48.0	65.4	
3.0	68.6	74.2	58.6	64.3	49.3	

### 2.2 植物生长调节物质对芽诱导的影响

将在 MS<sub>0</sub> + 2,4-D 2 mg/L + KT 0.1 mg/L 中培养 30 d 的恰玛古子叶和下胚轴愈伤组织,接种在不同浓度 6-BA 和 NAA 组合的 MS<sub>0</sub> 培养基中诱导再生芽。子叶

接种于分化培养基上 15~20 d 后愈伤组织中出现绿色突起,逐渐出现绿色芽点,然后形成不定芽,下胚轴的白色致密愈伤组织则转为黄绿色疏松胚性愈伤组织后分化出不定芽。第 40 天时统计子叶和下胚轴的愈伤分化率见表 3。由表 3 可知,不同浓度的生长调节剂对恰玛古芽的分化有重要影响。分化率以 6-BA 浓度为 3.0 mg/L, NAA 浓度为 0.5 mg/L 时较好,分别为 9.3% 和 23.2%,且每个外植体再生芽数为 3~4 个。

表 3 分化培养基 1 对芽苗分化率的影响

Table 3 Effect of regeneration media 1 on adventitious shoot regeneration frequency

激素浓度 Hormone concentrations/ mg · L <sup>-1</sup>		不定芽分化率 Regeneration frequency of adventitious shoots/ %	
6-BA	NAA	子叶 Cotyledons	下胚轴 Hypocotyls
2.0	0.1	7.7	11.8
3.0	0.1	5.8	7.7
4.0	0.1	7.0	10.4
5.0	0.1	5.5	6.7
2.0	0.3	5.8	7.7
3.0	0.3	8.0	11.3
4.0	0.3	8.2	13.4
5.0	0.3	7.9	12.4
2.0	0.5	8.5	14.5
3.0	0.5	9.3	23.2
4.0	0.5	8.2	13.1
5.0	0.5	8.0	12.2
2.0	1.0	6.2	8.5
3.0	1.0	5.6	7.4
4.0	1.0	6.3	8.6
5.0	1.0	5.2	6.3
2.0	1.5	6.4	10.8
3.0	1.5	5.8	9.5
4.0	1.5	6.1	9.4
5.0	1.5	5.0	7.1

AgNO<sub>3</sub> 作为乙烯抑制剂对芽诱导作用显著,能有效地防止不定根的产生,从而提高芽的诱导率,增加不定芽数,促进植株的再生<sup>[4]</sup>。接种在附加 5.0 mg/L AgNO<sub>3</sub> 的芽分化培养基中的愈伤组织,10~15 d 左右可见明显的绿色芽点。由表 4 可以看出,在含有 5.0 mg/L AgNO<sub>3</sub> 的培养基上,子叶和下胚轴的分化率分别高达 20.8% 和 65.0%,同时产生的不定芽数可达 6~7 个,表明 AgNO<sub>3</sub> 的处理促进了芽苗的分化。在同种培养基中愈伤组织的芽分化能力,下胚轴高于子叶。当 NAA 浓度超过 0.5 mg/L,子叶和下胚轴所形成的愈伤分化中产生了大量的毛状根,其愈伤的分化率也会显著下降,可能由于 NAA 在组织培养中分化根的能力强,从而抑制了不定芽的形成。可见,在恰玛古子叶和下胚轴的组织培养中,不定芽分化率的高低与激素种类、浓度比例有关。综合上述结果,芽分化培养基中以 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 5.0 mg/L 为最好,并且生长健壮。

表4 分化培养基2对芽苗分化率的影响

Table 4 Effect of regeneration media 2 on adventitious shoot regeneration frequency

激素浓度 Hormone concentrations/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			不定芽分化率 Regeneration frequency of adventitious shoots/%	
6-BA	NAA	$\text{AgNO}_3$	子叶 Cotyledons	下胚轴 Hypocotyls
2.0	0.1	5.0	17.6	33.9
3.0	0.1	5.0	15.9	29.6
4.0	0.1	5.0	17.0	32.7
5.0	0.1	5.0	17.2	28.9
2.0	0.3	5.0	17.5	29.3
3.0	0.3	5.0	17.7	39.6
4.0	0.3	5.0	19.2	43.6
5.0	0.3	5.0	18.5	41.7
2.0	0.5	5.0	19.4	45.6
3.0	0.5	5.0	20.8	65.0
4.0	0.5	5.0	18.9	44.0
5.0	0.5	5.0	18.5	42.2
2.0	1.0	5.0	16.3	30.6
3.0	1.0	5.0	15.3	29.3
4.0	1.0	5.0	16.8	30.6
5.0	1.0	5.0	14.8	28.3
2.0	1.5	5.0	16.1	30.6
3.0	1.5	5.0	17.0	28.5
4.0	1.5	5.0	15.0	29.4
5.0	1.5	5.0	14.6	27.2

## 2.3 再生芽的生根与移栽

将在芽分化培养基上培养 60 d 左右,长 3~4 cm 的芽苗,从芽基部切下,移至生根培养基中,15 d 后长出 10~15 条次生根,根系粗大,生根率达 100%。20 d 后驯化移栽,打开封口膜,培养室敞口 3 d 后取出再生植株,用无菌水洗去根部附着的培养基,移栽到花土中保证湿度,控制温度和光照,成活率为 95%,植株再生过程见图 1。

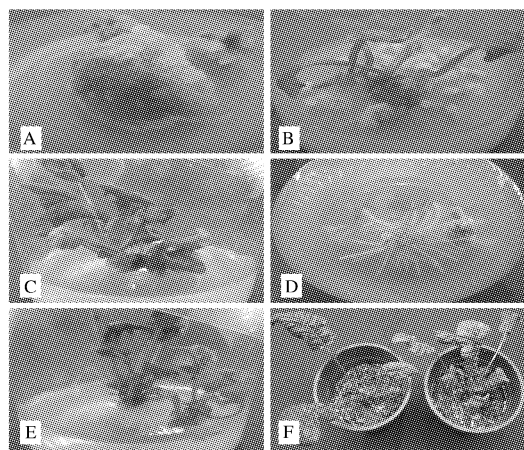


图1 新疆恰玛古再生体系建立

注:A:外植体形成愈伤组织;B:愈伤分化出不定芽;C:芽苗的扶壮;D:诱导生根;E:恰玛古的再生植株;F:移栽成活的再生植株。

Fig. 1 Establishment of regeneration system of *Brassica rapa* L

Note: A: The callus of explants; B: Inducing adventitious shoot from callus; C: The tonicity of shoot; D: Rooting of adventitious shoots; E: Plant regeneration of *Brassica rapa* L; F: Transplant seedling of *Brassica rapa* L

## 3 结论与讨论

该试验研究表明,恰玛古再生体系的建立与生长调节剂、 $\text{Ag}^+$  等因素密切相关。不同浓度的 2,4-D 和 KT 水平下愈伤的诱导能力和生长状态不同,2,4-D 浓度为 2.0 mg/L、KT 浓度为 0.1 mg/L 时,子叶,下胚轴最高诱导率分别为 65.4%、95.5%。

外植体类型的选择影响芜菁再生过程。已有研究表明,带柄子叶是芜菁离体培养的最佳外植体<sup>[4-5]</sup>。而该研究结果表明,以恰玛古子叶和下胚轴作为的外植体接入愈伤组织诱导培养基中,均可诱导出愈伤组织,但下胚轴的出愈时间较子叶短,出愈率高于子叶,说明恰玛古愈伤组织的诱导对外植体的选择喜好偏向于下胚轴。而在不定芽诱导中,恰玛古下胚轴不定芽的分化效果也优于子叶。

植物生长调节剂是影响芽分化的一个重要因素,在芸苔属的组织培养中分化出再生植株的培养基大多都是采用 6-BA 和 NAA 的激素组合<sup>[6-8]</sup>。而该研究中,6-BA 和 NAA 的激素组合也获得了不定芽的诱导,但是分化率较低。在培养基 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 中,恰玛古子叶和下胚轴分化率分别为 9.3%、23.2%。

在植物离体培养中经常有大量乙烯产生,乙烯在外植体的培养过程中抑制生长素的作用,影响器官和体细胞胚发生,而在植物的离体培养中加入乙烯抑制剂(如  $\text{AgNO}_3$ )能有效地抑制不定根的产生,增加外植体产生不定芽的数目,提高离体培养再生频率<sup>[4]</sup>。但对于  $\text{AgNO}_3$  的使用浓度各报道之间差异较大,其范围介于 3.0~15.0 mg/L 之间<sup>[4]</sup>。马光等<sup>[3]</sup> 经过优化得出,采用 5.0 mg/L  $\text{AgNO}_3$  能够取得较好的分化率。该研究发现所选取  $\text{AgNO}_3$  的浓度为 5.0 mg/L 时,子叶和下胚轴的分化率分别高达 20.8%和 65.0%。

此外,苗龄也是影响恰玛古再生频率的一个因素,选取低龄幼苗的下胚轴可在一定程度上提高芽苗的再生频率。4 d 和 5 d 苗龄的苗健壮,下胚轴粗,子叶厚小,此时的无菌苗生理状态为最佳<sup>[4]</sup>。该研究中所选取外植体的苗龄为 5 d。恰玛古再生体系的建立和改良,对于利用植物基因工程技术加速恰玛古育种,药性研究及其实际应用具有重要意义。

## 参考文献

- [1] 毛居代,帕热德姑丽·托合提,布海力木·伊米提. 芜菁种子中总黄酮提取工艺研究[J]. 种子,2011,30(1):39-41.
- [2] 肖春霞,张洪亮. 恰玛古膏影响中晚期大肠癌化疗相关指标的临床观察[J]. 亚太传统医药,2010,6(12):30-31.
- [3] 马光,周波,李玉花. 芜菁高频率再生体系的建立及优化[J]. 园艺学报,2008,35(6):833-840.



# 除虫菊高效再生体系的建立

于 娅, 屈 玲

(武汉生物工程学院 生物工程系, 湖北 武汉 430415)

**摘 要:**以除虫菊为试材,以带柄叶片为外植体,对除虫菊不定芽的诱导、丛生芽的增殖以及生根诱导进行了系统的研究。结果表明:升汞对除虫菊种子的毒害作用太大,次氯酸钠对种子的消毒效果比较好。叶片消毒选择次氯酸钠 8 min 为宜,成活率高达 95%;不定芽诱导的最适培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L,诱导率最高可达 83.3%,不定芽个数为 8.15;丛生芽增殖的最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L,增倍数达 9.16;生根的最适培养基为不加激素的 MS,生根率为 80%。

**关键词:**除虫菊;不定芽;褐化

**中图分类号:**S 682.1<sup>+1</sup> **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0135-05

除虫菊(*Pyrethrum cinerariaefolium* Trev.)为菊科小菊属多年生宿根草本植物,原产欧洲<sup>[1]</sup>,具有较高的经济价值及观赏价值,其根、茎、叶、花都含有毒虫物质,是用来配制各种杀虫剂的较好原料,常以花或全

草入药<sup>[2]</sup>。对除虫菊的研究和利用已有近百年历史,它是目前世界上唯一集约化种植的杀虫植物<sup>[3]</sup>。20 世纪初除虫菊在世界各地广泛栽培,20 世纪 40 年代起曾在我国华东、新疆、贵州和云南等省区引种,从其花头中提取的总除虫菊酯含除虫菊酯 I、II,瓜菊酯 I、II,茉莉菊酯 I、II 共 6 种有效杀虫成分<sup>[4]</sup>。是迄今为止发现的不污染环境、对人畜等哺乳动物安全无毒、对害虫迅速击倒而不易产生抗药性、在植物和土壤中无残留的高效天然杀虫

**第一作者简介:**于娅(1976-),女,博士,讲师,研究方向为植物遗传育种与基因工程。E-mail:yuy1025@163.com.

**基金项目:**湖北省教育厅指导资助项目(B20104602)。

**收稿日期:**2012-08-31

[4] 赵巧阳,赖钟雄. 硝酸银在离体培养和转化中的作用及其机理[J]. 亚热带农业研究, 2008, 4(1): 62-66.

[5] MA G, GUO J P. Effects of thidiazuron and N6-benzylaminopurine on endogenous hormone levels during regeneration of *Brassica campestris* ssp. *Rapifera*[J]. Journal of Zhejiang University, 2010, 36(3): 237-245.

[6] 邢德峰,李新玲,王全伟,等. 影响大白菜高效离体培养再生的因素

[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(5): 420-424.

[7] 黄俊轩,李双跃,李建科,等. 花椰菜叶片离体再生技术的研究[J]. 天津农学院学报, 2006, 13(4): 21-23.

[8] 李艳红,宋秀珍,庄木. 青花菜组织培养再生体系的研究[J]. 首都师范大学学报, 2001, 22(3): 48-53.

## Regeneration Plants of Cotyledon and Hypocotyl of Xinjiang *Brassica rapa* L.

Dilraba · DILXAT, Muhrapia · ARKIN, ZHANG Fu-chun, ZHANG Xia

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

**Abstract:** The regeneration system of tissue culture of Xinjiang *Brassica rapa* L. was discussed by using cotyledon and hypocotyl of 5 day-old seedling of Xinjiang *Brassica rapa* L. as the explant. The results showed that MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.1 mg/L medium was effective for callus induced, the averaging callus frequencies were 65.4%, 95.5% for cotyledon, hypocotyl; shoots were induced with 6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+AgNO<sub>3</sub> 5.0 mg/L, the averaging regeneration shoots frequency was 20.8%, 65.0% for cotyledon, hypocotyl; shoots was transferred into medium of MS+IBA 0.5 mg/L to root; after 20 days, regeneration plants were transferred into flower-soil and its survivable rate was more than 95%.

**Key words:** *Brassica rapa* L.; cotyledon; hypocotyl; callus; regeneration plants