

不同激素对青花菜下胚轴不定芽分化的影响

于 娅, 于 亚 萍, 段 威

(武汉生物工程学院 生物工程系, 湖北 武汉 430415)

摘 要:以“碧绿 2 号”青花菜为试材, 以下胚轴为外植体, 研究了不同浓度的 TDZ、6-BA、ZT 对青花菜下胚轴外植体不定芽分化及下胚轴上部、中部、下部不同部位对不定芽分化的影响。结果表明: 青花菜下胚轴不定芽分化最佳培养基直观组合为 MS+0.2 mg/L NAA+0.5 mg/L ZT+0.2 mg/L TDZ+1.0 mg/L 6-BA+3%蔗糖+0.8%琼脂; 下胚轴的上部不定芽分化率最高, 达 90%。

关键词:青花菜; 下胚轴; 不定芽; 分化

中图分类号:S 635.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)24-0096-04

青花菜(*Brassica oleracea* L. var. *italica*)属十字花科芸薹属甘蓝种中 1、2 a 生草本植物, 又名西兰花、绿菜花、茎椰菜、木立花椰菜、意大利芥蓝等^[1], 以绿色花球为产品。最近的一项研究表明, 苷是青花菜中的一种化合物, 人体摄入苷元素后会产生萝卜硫素, 它可激发人体的自我抗癌机制, 还能促进人体产生对致癌物有排泄作用的酶。萝卜硫素可以启动一种人体基因, 这种基因会提高抗氧化剂的水平, 并阻止可以促进肿瘤生长的一种酶, 这种酶叫做 HDAC^[2]。试验证明青花菜含有丰富的抗癌物质, 能够减少老鼠胸部肿瘤的形成, 阻止致癌物质的活动^[3], 季宇彬等^[4-5]、邹翔等^[6-7]对青花菜中异硫氰酸盐的抗癌机制进行了研究, 也得到了类似的抗癌结果。

青花菜还是含类黄酮最多的食物之一, 类黄酮除了防止感染, 还是最好的血管清理剂, 能阻止胆固醇氧化, 防止血小板凝结, 减少心脏病与中风危险, 具有降低血清胆固醇、抗氧化、降血压、降血脂、抑制脂质过氧化、改善脑循环和抗体微循环等作用, 对高血压、心脏病有调节和预防的功效^[8]。青花菜还有预防糖尿病作用, 含高纤维的西兰花能有效降低肠胃对葡萄糖的吸收, 进而降低血糖, 有效控制糖尿病的病情, 因此, 青花菜堪称糖尿病患者的福音食品^[8]。它还可以帮助老年人保护视力, 青花菜中含有能预防慢性眼疾的有效成分, 帮助人们抵抗氧化物对眼睛的危害, 有保护视觉和明目的作用^[9]。

前人对青花菜组织培养再生体系已做了一定的研究^[10-14], 但所采用的品种各不相同, 外植体的种类、大小、生理年龄也不太一致, 其再生能力也有一定的差异。激

素是影响植株再生的决定性因素, 培养基中植物生长调节剂的种类、浓度和配比的差异, 影响着外植体的再生频率。十字花科芸薹属植株离体再生报道中使用最多是 6-BA 和 NAA 进行组合, 诱导外植体分化再生不定芽^[15-16]。而外源激素 TDZ 和 ZT 的使用鲜有报道, 众所周知, TDZ 是一种具有很强细胞分裂素活性的苯基脲型化合物, 它作为一种特殊的植物生长调节剂广泛用于植物离体培养, 与其它植物生长调节剂相比, 极低浓度的 TDZ 就能使多种植物体系的愈伤组织生长速度增加数十倍, 提高细胞分裂速率, 诱导不定芽发生及提高不定芽数量^[17]。Yu 等^[18]报道, ZT 对青花菜的不定芽分化有一定的影响, 虽然不定芽分化率较高, 但有玻璃化现象发生。

为了比较 TDZ、6-BA 和 ZT 3 种激素对青花菜下胚轴外植体不定芽分化的影响, 该试验以青花菜的下胚轴为外植体, 采用正交实验设计, 筛选出青花菜下胚轴适合发生不定芽的最适培养基配方, 以期青花菜高效再生体系提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试青花菜品种“碧绿 2 号”购自北京京研益农科技发展中心。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的培养 挑选颗粒饱满的种子, 在 75% 的乙醇中浸泡 30 s, 再用升汞灭菌 8 min, 其间不时摇动, 再用无菌水冲洗 4~5 次, 播种于 MS 培养基上。在 (25±2)℃、黑暗条件下培养 2~3 d, 然后转入光照条件下培养, 每天光照时间 10 h, 选择 7 d 苗龄的无菌苗备用。

1.2.2 不同激素对不定芽分化的影响 比较不同激素

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:湖北省教育厅科研资助项目(B20104602)。

收稿日期:2013-09-13

对不定芽分化的影响,基础培养基为 MS+0.2 mg/L NAA+3%蔗糖+0.8%琼脂,TDZ、6-BA 和 ZT 进行正交设计 $L_9(3^4)$ (表 1~2),ZT 需要过滤灭菌。将下胚轴切成 0.5~1.0 cm 的小段接种到的不同激素的培养基中,并且保证在各种培养基中接种的下胚轴上、中、下 3 个部位的数量相等。30 d 观察记录不定芽分化率和不定芽个数。不定芽分化率(%)=不定芽分化数/外植体总数 $\times 100\%$ 。增殖系数=不定芽分化个数/不定芽分化外植体数。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验的因素与水平

Table 1 The factors and levels of the orthogonal test $L_9(3^4)$ mg/L

水平	TDZ	因素 6-BA	ZT
1	0	0	0
2	0.1	0.5	0.5
3	0.2	1.0	1.0

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验培养基激素浓度配比

Table 2 The concentration ratio of plant growth regulators of the orthogonal test $L_9(3^4)$

培养基	TDZ /mg \cdot L $^{-1}$	6-BA /mg \cdot L $^{-1}$	ZT /mg \cdot L $^{-1}$
X1	0.0	0.0	0.0
X2	0.0	0.5	0.5
X3	0.0	1.0	1.0
X4	0.1	0.0	0.5
X5	0.1	0.5	1.0
X6	0.1	1.0	0.0
X7	0.2	0.0	1.0
X8	0.2	0.5	0.0
X9	0.2	1.0	0.5

1.2.3 外植体不同部位对不定芽分化率的影响 选择 7 d 苗龄的无菌苗,将下胚轴取为上、中、下部,切取 0.5~1.0 cm 的小段分别按同样的方向接种于不定芽最适培养基上,30 d 观察记录两端不定芽生长情况。

2 结果与分析

2.1 不同激素种类对不定芽分化的影响

在由 TDZ、6-BA 和 ZT 搭配的 MS+0.2 mg/L NAA 培养基上,接种后的下胚轴先膨大和伸长,1 周后两端切口处开始脱分化出愈伤组织。约 20 d 之后便可以看到由外植体上发生单个或者丛生的不定芽,但不同的培养条件下分化率不尽相同。由图 1 可以看出,9 种培养基中的下胚轴都出现愈伤组织,并且都膨大和伸长,X2~X9 中都出现了少量不定芽,而 X1 中没有不定芽发生。X2~X8 都出现了不同程度的玻璃化苗,并且随着 TDZ 浓度的升高,玻璃化的情况越来越严重。X9 处理中不定芽数量最多,而且不定芽比较粗壮,没有玻璃化现象发生。

由表 3 可知,不定芽分化的影响极差 R 大小的顺序为:6-BA>ZT>TDZ,可知 6-BA 对不定芽分化的影响最大,ZT 次之,TDZ 最小;各因素的最优水平为:TDZ 0.2 mg/L,6-BA 1.0 mg/L,ZT 0.5 mg/L。最优培养基直观组合为 X9:0.2 mg/L TDZ+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L ZT。不定芽增殖系数影响极差 R 大小的顺序为:TDZ>6-BA>ZT,即 TDZ 对不定芽增殖系数的影响最大,6-BA 次之,ZT 最小;各因素的最优水平为:TDZ 0.2 mg/L,6-BA 1.0 mg/L,ZT 0.5 mg/L。

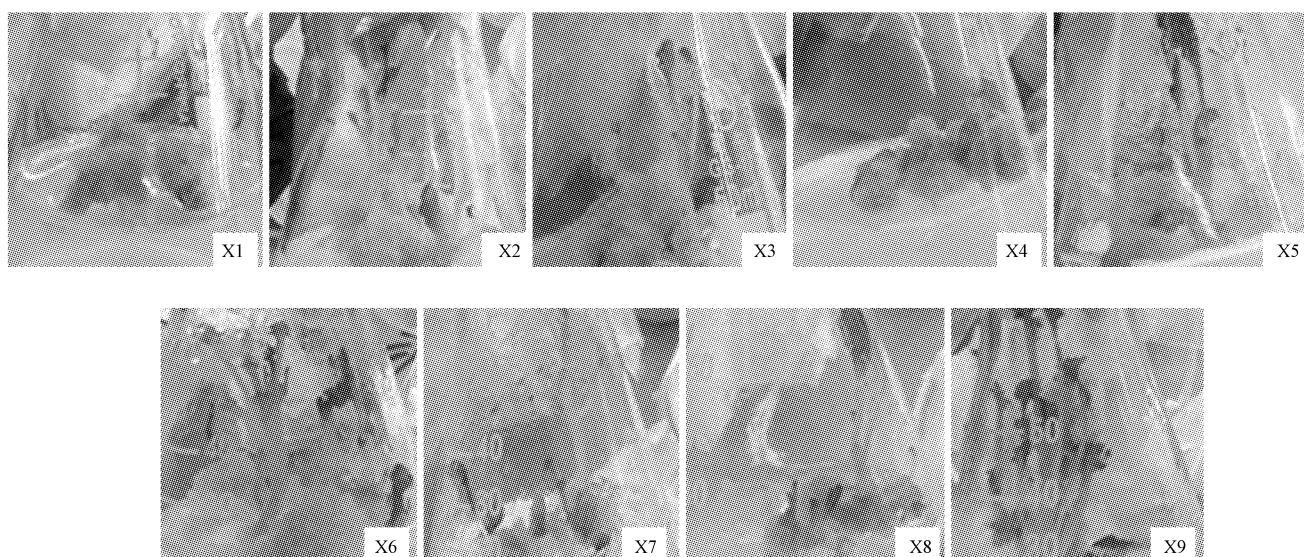


图 1 不同激素种类对下胚轴不定芽分化的影响

Fig. 1 The effects of different plant growth regulators on the shoot induction from hypocotyls

表 3 $L_9(3^4)$ 正交实验不定芽诱导结果分析Table 3 The result of shoot induction of broccoli in the orthogonal test $L_9(3^4)$

培养基	TDZ	6-BA	ZT	分化率/%	增殖系数/个
X1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
X2	0.0	0.5	0.5	75.2	3.1
X3	0.0	1.0	1.0	85.4	2.2
X4	0.1	0.0	0.5	64.3	2.3
X5	0.1	0.5	1.0	67.5	3.2
X6	0.1	1.0	0.0	79.1	5.3
X7	0.2	0.0	1.0	33.3	3.4
X8	0.2	0.5	0.0	78.4	4.2
X9	0.2	1.0	0.5	86.2	7.3
均值 1	53.533	32.533	51.233		
均值 2	70.300	73.333	75.000		
均值 3	65.967	83.567	62.067		
极差 R	16.767	51.034	22.733		
均值 1'	1.767	1.900	3.167		
均值 2'	3.600	3.500	4.233		
均值 3'	4.967	4.933	2.933		
极差 R'	3.200	3.033	1.399		

注:均值 1~3,极差 R 为不定芽分化率的直观分析,均值 1'~3',极差 R'为增殖系数的直观分析。

2.2 外植体不同部位对不定芽分化的影响

从图 2 可以看出,下胚轴的上部分最先有不定芽发生,由表 4 可知,不定芽分化率由高到低依次为:上部>中部>下部,下胚轴上部不定芽分化率达 90%。因此下胚轴的不同部位不定芽发生情况有一定的差异,下胚轴的上部为更易分化不定芽。

表 4 不同下胚轴部位对不定芽分化的影响

Table 4 The effects of different segments on the shoot induction from hypocotyls

外植体	外植体总数/个	分化数/个	不定芽分化率/%
下胚轴上部	30	27	90.0
下胚轴中部	30	25	83.3
下胚轴下部	30	20	66.7

3 讨论与结论

正交设计是多因素分析的有利工具,可以用较少的试验次数得到较多的信息,从而选出主要因素及其最优水平^[19],该试验采用正交实验比较了 TDZ、6-BA 和 ZT 3 种激素浓度及其不同配比对下胚轴不定芽分化的影响,选出了下胚轴最适不定芽分化培养基。

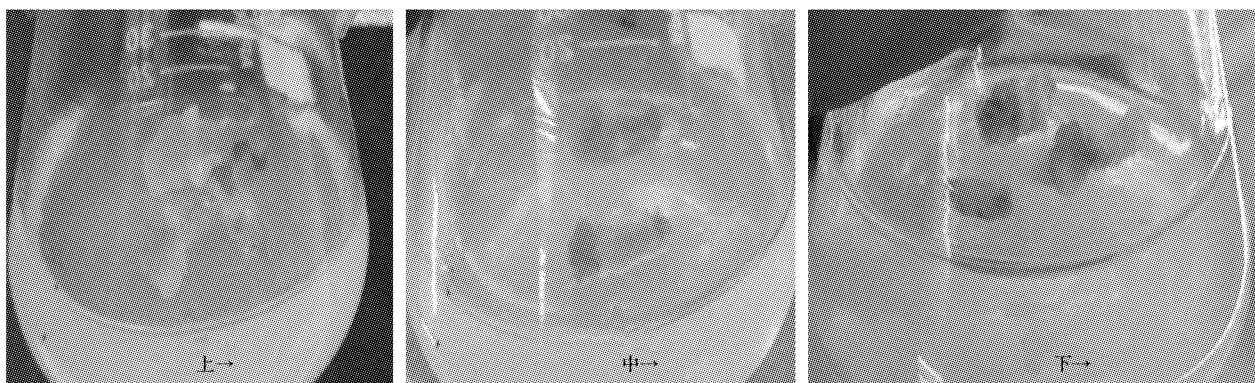


图 2 外植体不同部位对不定芽分化的影响

Fig. 2 The effects of different hypocotyl segments on shoot induction

注:箭头所指方向为植物顶端方向。

青花菜下胚轴的不定芽分化率的影响中,6-BA 最大,ZT 次之,TDZ 最小。不定芽增殖系数的影响中,TDZ 影响最大,6-BA 次之,ZT 最小。适宜的 TDZ 浓度能够促进较多的不定芽发生,这一研究与 Capelle 等^[17]、Murthy 等^[20]、Yu 等^[23]的结果比较一致。ZT 对青花菜下胚轴不定芽分化率和不定芽增殖均贡献不大。TDZ 和 6-BA 是比较适宜青花菜下胚轴分化的外源激素,合适的配比能够产生比较理想的不定芽分化率和增殖系数。

在不定芽诱导过程中,发现有玻璃化现象发生。可能有以下几方面原因:一是 TDZ 的浓度不适宜,估计浓度偏高。研究表明 TDZ 的作用机理比较复杂,其作用

效果与其使用浓度和植物种类密切相关^[20-23];也有研究表明,极低浓度的 TDZ 就可以获得理想的不定芽发生效率,而浓度偏高易导致畸形现象发生^[23]。二是 ZT 浓度不适宜。研究表明,尽管 ZT 能有效的诱导不定芽发生,但是容易发生玻璃化现象^[18,24-25]。三是整体细胞分裂素水平偏高,激素配比存在一定问题。四是不同部位下胚轴对激素浓度要求有不同。五是试验过程中所采用的封口膜不透气,可能导致乙烯积累,从而造成玻璃化现象。下一步将对可能造成不定芽玻璃化现象的具体影响因素进行深入研究。

试验表明,青花菜下胚轴的不同部位不定芽发生情况有一定的差异。产生这种现象产生的原因,认为可能

是不同外植体部位其内源激素不同,在相同外源激素的作用下,内外源激素的综合作用差异将导致不定芽的再生能力的差异。同一下胚轴不同部位不定芽再生能力有所差异的现象在其它作物上也有发现,Nagori 等^[26]对番荔枝的研究表明,下胚轴切段的分化能力和其在幼苗上的位置有关。他们将下胚轴从子叶端开始切为 H1、H2、H3、H4、H5 5 部分,其中 H1 即接近子叶端的下胚轴切段形成的不定芽数量最少,这和上述报道正好相反;远离子叶端,其不定芽数目呈增加的趋势,H4 再生的不定芽最高,H5 又开始下降。

该试验结果表明,下胚轴不定芽分化最佳培养基直观组合为 MS+0.2 mg/L NAA+0.5 mg/L ZT+0.2 mg/L TDZ+1.0 mg/L 6-BA+3%蔗糖+0.8%琼脂;下胚轴的上部不定芽分化率最高,达 90%。

参考文献

- [1] 秦耀国,雷建军,曹必好. 青花菜遗传育种与生物技术应用研究进展[J]. 北方园艺,2004(2):11-13.
- [2] 朱晓霞,杨磊,王昊飞,等. HDAC1 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 实用医学杂志,2010,26(15):2720-2722.
- [3] Fowke J H, Longcope C, Hebe J R. Brass and a vegetable consumption shifts estrogen metabolism in healthy postmenopausal women[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2000(9):773-779.
- [4] 季宇彬,池文杰,邹翔,等. 西兰花中萝卜硫素提取、分离与抗癌活性研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2005,21(3):270-273.
- [5] 季宇彬,池文杰,邹翔,等. 西兰花中异硫氰酸盐诱导人体肝癌细胞中国中药杂志,2007,32(7):612-615.
- [6] 邹翔,郎朗,武晓丹,等. 西兰花中葡萄糖异硫氰酸盐诱导人胃腺癌 SGC-7901 细胞凋亡的初步研究[J]. 中草药,2007,38(2):228-231.
- [7] 邹翔,池文杰,郎朗. 西兰花中异硫氰酸盐诱导 HepG-2 凋亡的研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2006,22(6):1-4.
- [8] 于康. 天赐良药—花椰菜[J]. 药物与人,2005(11):34.
- [9] 喻炜. 吃西兰花可帮助老年人保护视力[J]. 中国食品学报,2006,6(5):143-144.
- [10] 吕金浮,王然,秦斐斐,等. 青花菜高频再生体系建立及芽再生机理的研究[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版),2009,1(4):25.
- [11] 赖正峰,林加耕,李华东,等. 日本高秆青花菜组织培养初探(简报)[J]. 亚热带植物科学,2005,34(1):64.
- [12] 秦耀国,雷建军,曹必好,等. 青花菜高效离体再生体系的建立[J]. 西南农业大学学报(自然科学版),2005,27(5):653-655.
- [13] 徐晓峰,黄学林. 应用正交设计建立青花菜植株的再生体系[J]. 广西植物,2002,22(6):513-516.
- [14] 张丽丽,张蜀宁,吴震,等. 青花菜高频离体再生体系的研究[J]. 南京农业大学学报,2008,31(2):41-44.
- [15] 张凤兰,高田畑,徐家炳. 大白菜子叶离体培养再生植株[J]. 园艺学报,2002,29(4):348-352.
- [16] 刘永承,白远国. 芸薹属植物器官离体再生影响因素研究进展[J]. 长江大学学报,2006,3(1):175-178.
- [17] Capelle S C, Mok D W S, Kirchner S C, et al. Effects of TDZ on cytokinin autonomy and the metabolism of N6 adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L[J]. Plant Physiol,1983,73:796-802.
- [18] Yu Y, Zhao Y Q, Zhao B, et al. Influencing factors and structural characterization of hyperhydricity of *in vitro* regeneration in *Brassica oleracea* var. *italica*[J]. Can J Plant Sci,2011,91:159-165.
- [19] 杜荣骞. 生物统计学[M]. 北京:高等教育出版社,1985.
- [20] Murthy B N S, Murch S J, Saxena P K. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis[J]. *in Vitro Cell and Dev Biol-Plant*,1998,34(4):267-275.
- [21] Yu Y, Liu L S, Zhao B, et al. A highly efficient *in vitro* plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica oleracea* var. *botrytis*[J]. New Zeal J Crop Hort,2010,38(4):235-245.
- [22] Murthy B N S, Murch S J, Saxena P K. TDZ induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons[J]. *Physiol Plant*,1995,94(2):268-276.
- [23] Saxena P K, Malik K A, Gill R. Induction by TDZ of somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut[J]. *Planta*,1992,187:421-424.
- [24] 欧阳波,李汉霞,叶志彪. 玉米素和 IAA 对番茄子叶再生的影响[J]. 植物生理学通讯,2003(3):217-218.
- [25] 姜燕琴,於虹,邓桂秀,等. ZT 和 2iP 对 3 个南方高丛蓝莓果优选系丛生枝增殖及生长的影响[J]. 植物资源与环境学报,2009,18(4):23-27.
- [26] Nagori R, Purohit S D. *In vitro* plant regeneration in *Annona squamosa* through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments[J]. Sci Hortic,2004,99:89-98.

Influence of Different Hormones on Broccoli Hypocotyl Adventitious Bud Differentiation

YU Ya, YU Ya-ping, DUAN Wei

(Department of bioengineering, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415)

Abstract: With broccoli variety 'Bilv No. 2' as material, taking the hypocotyl as explants, the influence of TDZ, 6-BA, ZT and different concentrations of plant growth regulators on its adventitious buds of hypocotyls, and the effects of different explants of upper middle and lower parts on adventitious buds differences were studied. The results showed that the best medium was MS+0.2 mg/L NAA+0.5 mg/L ZT+0.2 mg/L TDZ+1 mg/L 6-BA+3% sucrose+0.8% agar; upper parts of hypocotyls had highest rate, it was 90%.

Key words: broccoli; adventitious bud; hypocotyls; differentiation