

‘洛阳包头’大白菜叶柄高效植株再生体系的建立

杜 丽, 姚 瑶, 李 勇 鹏

(南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473000)

摘 要:以‘洛阳包头’大白菜无菌苗叶柄为外植体,研究了大白菜通过直接器官发生建立植株再生体系的方法。结果表明:不同激素组合对‘洛阳包头’大白菜无菌苗顶芽增殖、大白菜叶柄不定芽的诱导以及再生植株生根的影响不同;配方 MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L 的培养无菌苗顶芽基增殖率最高,达 86.7%;配方 MS+BA 2.5 mg/L+IBA 0.3 mg/L 对大白菜叶柄不定芽的诱导效果较好,诱导率为 76.7%;配方 MS+IBA 1.0 mg/L 诱导再生植株生根率最高,达 90.0%。

关键词:‘洛阳包头’大白菜;叶柄;组织培养;植株再生

中图分类号:S 634.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)04-0086-05

大白菜(*Brassica pekinensis*)属十字花科芸薹属植物,叶宽,形成伸长而淡绿色的紧密头,北方俗称大白菜,南方俗称黄芽菜。大白菜原产于我国,栽培历史悠久,因其味道鲜美,营养丰富,四季有售,故素有“菜中之王”的美誉^[1]。‘洛阳包头’大白菜是中原地区普遍栽培的典型代表品种,其大陆性气候生态型的基本类型属于平头型。但在不同生态型结球大白菜抗寒性的评价中发现,大白菜基本生态型中平头型和卵圆型耐寒性较差^[2]。秋冬大白菜和早春大白菜分别在结球末期和生长初期常遭受冻害,给生产造成损失,为了确保其高产、稳产和优质栽培,探讨大白菜抗寒育种具有十分重要意义。利用转基因技术将冷诱导转录因子 CBF 基因导入植物中,以期改良作物抗寒性状^[3-6],已经成为抗寒育种的重要辅助手段,但研究基础是首先需要建立高效再生频率的再生体系。近年来,国内外学者在白菜类作物组织培养方面取得较大进展,植株再生频率有所提高^[1,7-9],但由于基因型种类、培养基配方、植物激素种类等存在差异,对于特定的材料尚需进行再生体系的优化。

该研究选取品质、抗性和商品性优良的大白菜品种‘洛阳包头’为试材,首先建立其快繁体系,以此为基础,选取无菌苗叶柄为外植体,进行不同激素组合诱导不定芽配方的筛选,再生植株的生根培养对其进行生根配方筛选,旨在建立‘洛阳包头’大白菜叶柄高频再生体系,

从而为其遗传转化改良抗冻性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为河南地方大白菜品种‘洛阳包头’(*Brassica pekinensis* cv. ‘Luoyang baotou’)。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基及培养条件 大白菜无菌苗的培养,快繁体系的建立、叶柄不定芽诱导以及再生植株的生根均采用 MS 作为基本培养基,培养基均添加琼脂粉 8 g/L,蔗糖 30 g/L 以及不同浓度的植物激素,培养基 pH 均调至 6.0,保持 121℃ 灭菌 20 min。培养条件温度为(24±2)℃,每天光照 16 h,光照强度为 2 000 lx 左右。

1.2.2 无菌苗的培养 选取饱满、大小均一的‘洛阳包头’大白菜种子,在无菌条件下,经 70% 酒精浸泡 45 s,再用 0.1% (W/V) HgCl₂ 溶液浸泡 8 min,无菌水冲洗 3~5 次后,用无菌滤纸吸干水分,接种于 MS 培养基中,待种子发芽备用。

1.2.3 大白菜快繁体系的建立 种子接种 7~10 d,大白菜长出 2 片真叶后,切取带真叶的顶芽作为外植体,选择 MS 为基本培养基,附加不同浓度 BA(0.5、1.0、1.5 mg/L)和 IBA(0.15、0.30、0.45 mg/L)共 9 个处理,每个处理至少接种 30 个外植体,4 周后统计增殖率,以确定不同浓度 BA 和 IBA 组合对大白菜无菌苗顶芽增殖的影响,筛选出最佳增殖配方。增殖率=(诱导出增殖的外植体总数/接种外植体总数)×100%。由大白菜顶芽从不同组合的增殖培养基诱导出的增殖苗,切割分离后转到上述试验所得最佳配方,每 4 周转接到同样配方的培养基中继代,以期获得足够的无菌苗供叶柄诱导不定芽试验。

第一作者简介:杜丽(1978-),女,博士,副教授,研究方向为园林植物遗传育种。E-mail:dlldlucky@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31100511);河南省高校青年骨干教师计划资助项目(2010GGJS-161)。

收稿日期:2013-10-23

1.2.4 叶柄不定芽的诱导 将来自同一增殖配方的增殖苗取出,在无菌滤纸上将其叶柄切割成 1.0~1.5 cm 的小段,接种于添加不同浓度 BA 和 IBA 组合的 MS 基本培养基中(BA 2.5 mg/L 分别与 IBA 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L 组合;IBA 0.3 mg/L 分别与 BA 0、1.5、3.5、4.5、5.5 mg/L 组合),共 11 个处理,每个处理至少接种 60 个外植体,4 周后统计不定芽诱导率及平均芽数,以确定不同浓度 BA 和 IBA 组合对大白菜叶柄不定芽诱导的影响。不定芽诱导率=(诱导出不定芽的外植体总数/接种外植体总数)×100%;平均芽数=不定芽总数/诱导出不定芽外植体数。

1.2.5 再生植株的生根培养 大白菜叶柄诱导获得再生植株,经无菌苗增殖配方继代增殖后,转入生根培养基诱导生根。选择 MS 为基本培养基,添加不同浓度 IBA(0.5、1.0、1.5 mg/L)、另外不同浓度 NAA(0.5、1.0、1.5 mg/L)对再生植株生根诱导的影响也一并讨论。每个处理至少接种 30 个无菌苗,4 周后统计生根诱导率。生根诱导率=(诱导生根的外植体总数/接种外植体总数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 BA 和 IBA 组合对无菌苗顶芽增殖的影响

‘洛阳包头’大白菜种子接种 2 d 后,陆续开始萌发,出苗整齐度较好,接种 7~10 d 后,切取带 2 片真叶的大白菜顶芽,转入附加不同浓度 BA 和 IBA 组合的 MS 基本培养基上,光照培养 4 周后,观察外植体是否有芽增殖或者芽丛的形成,统计增殖率。由表 1 可知,试验所有增殖配方均能诱导外植体芽增殖,诱导率在 50.0%~86.7%之间;9 个增殖配方中,配方 P5 的增殖率最高为 86.7%,激素组合为 MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L,每个外植体增殖芽数 1~5 个不等。

大白菜真叶顶芽接种在不同浓度激素组合增殖培养基上,培养 1 周后,可以观察到外植体基部有颗粒状膨大,20 d 后膨大处逐渐形成绿色芽点,4 周后丛生苗形成(图 1A1)。研究中观察发现,在不添加任何激素的 MS 培养基中,大白菜无菌苗能够正常生长,但鲜能观察到有芽增殖(图 1A2)。

根据试验结果,将该次试验最佳增殖配方 P5(MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L)作为大白菜无菌苗增殖继代配方,将增殖苗切割分离后转到该配方,每 4 周转接 1 次,为叶柄不定芽诱导试验提供充足外植体。

2.2 不同浓度 BA 和 IBA 组合对大白菜叶柄不定芽诱导的影响

由表 2 可知,单独使用 BA 或 IBA 的诱导配方的不定芽诱导率仅为 16.7%和 3.3%,相应每个外植体诱导 IBA 0.3 mg/L 获得最高不定芽诱导率 76.7%,平均芽

表 1 不同浓度激素组合对
大白菜顶芽增殖率的影响

Table 1 Effects of plant hormones combinations on
the frequency of terminal bud with a pair of true leaf of
Brassica pekinensis cv. ‘Luoyang baotou’ propagation

配方号 No. of medium	BA /mg · L ⁻¹	IBA /mg · L ⁻¹	外植体数 No. of explants/个	增殖率 Propagation rate/%	长势 Growth
P1	0.5	0.15	30	53.3	+
P2	1.0	0.15	30	56.7	++
P3	1.5	0.15	30	63.3	+
P4	0.5	0.30	30	50.0	++
P5	1.0	0.30	30	86.7	+++
P6	1.5	0.30	30	83.3	+
P7	0.5	0.45	30	33.3	+
P8	1.0	0.45	30	60.0	++
P9	1.5	0.45	30	53.3	+

注:+,生长一般;++,生长适中;+++;生长较好,下同。

Note:+,refer to worse growth; ++,refer to common growth; +++;refer to better growth,the same as below.

数为 2.5 个。

当单独使用 BA 或 IBA 的诱导配方的平均芽数为 1.3 个和 1.0 个时,配方 MS+BA 2.5 mg/L+大白菜叶柄接种在不定芽诱导培养基,7 d 左右可观察到外植体切口处膨大,少量外植体上有愈伤组织形成,但未见愈伤组织增殖。继续培养可以在外植体上观察到不定芽的形成(图 1A3),2~3 周后不定芽就可长大(图 1A4)。在不定芽发生的同时,有的配方上培养的外植体有少量不定根的发生,但不能形成有效的主根侧根(图 1A4),因而无论大白菜无菌苗还是再生植株的生根培养步骤不能删减。

叶柄诱导所得不定芽,进一步生长后可形成正常无根苗,切下再生植株采用增殖配方 P5(MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L)培养可以获得同样增殖效果。

表 2 不同浓度激素组合对
大白菜叶柄不定芽诱导率的影响

Table 2 Effects of plant hormones combinations on
the induction frequency of adventitious bud from petiole

配方号 No. of medium	BA /mg · L ⁻¹	IBA /mg · L ⁻¹	外植体数 No. of explants/个	不定芽诱导率 Induction rate of adventitious bud/%	平均芽数 No. of average buds/个
I1	2.5	0	60	16.7	1.3
I2	2.5	0.1	60	41.7	1.1
I3	2.5	0.2	60	56.7	1.7
I4	2.5	0.3	60	76.7	2.5
I5	2.5	0.4	60	60.0	2.1
I6	2.5	0.5	60	55.0	1.9
I7	0	0.3	60	3.3	1.0
I8	1.5	0.3	60	53.3	1.5
I9	3.5	0.3	60	61.7	2.0
II0	4.5	0.3	60	46.7	2.5
II1	5.5	0.3	60	31.7	2.7

2.3 不同浓度及种类生长素对无菌苗生根诱导的影响

大白菜叶柄再生植株增殖到一定群体后,切割分离转入不同浓度不同类型生长素生根配方。7~10 d,无菌苗基部开始有不定根形成,能够形成明显主根侧根(图1A5、A6),最终形成大白菜完整植株。所有的配方均能诱导无菌苗生根。但添加 NAA 的生根配方生根率低于添加 IBA 的配方,且生根苗生长状况也较为孱弱。因此针对‘洛阳包头’大白菜无菌苗的生根最适配方是 MS+IBA 1.0 mg/L,生根率可达 90.0%。

表 3 不同浓度及种类生长素对无菌苗生根率的影响

Table 3 Effects of different concentrations and types of auxins on the rooting frequency of regenerated plantlet

配方号 No. of medium	IBA /mg · L ⁻¹	NAA /mg · L ⁻¹	外植体数 No. of explants	生根率 Rooting rate/ %	长势 Growth situation
R1	0.5	0	30	63.3	++
R2	1.0	0	30	90.0	+++
R3	1.5	0	30	76.7	++
R4	0	0.5	30	53.3	+
R5	0	1.0	30	66.7	++
R6	0	1.5	30	63.3	+

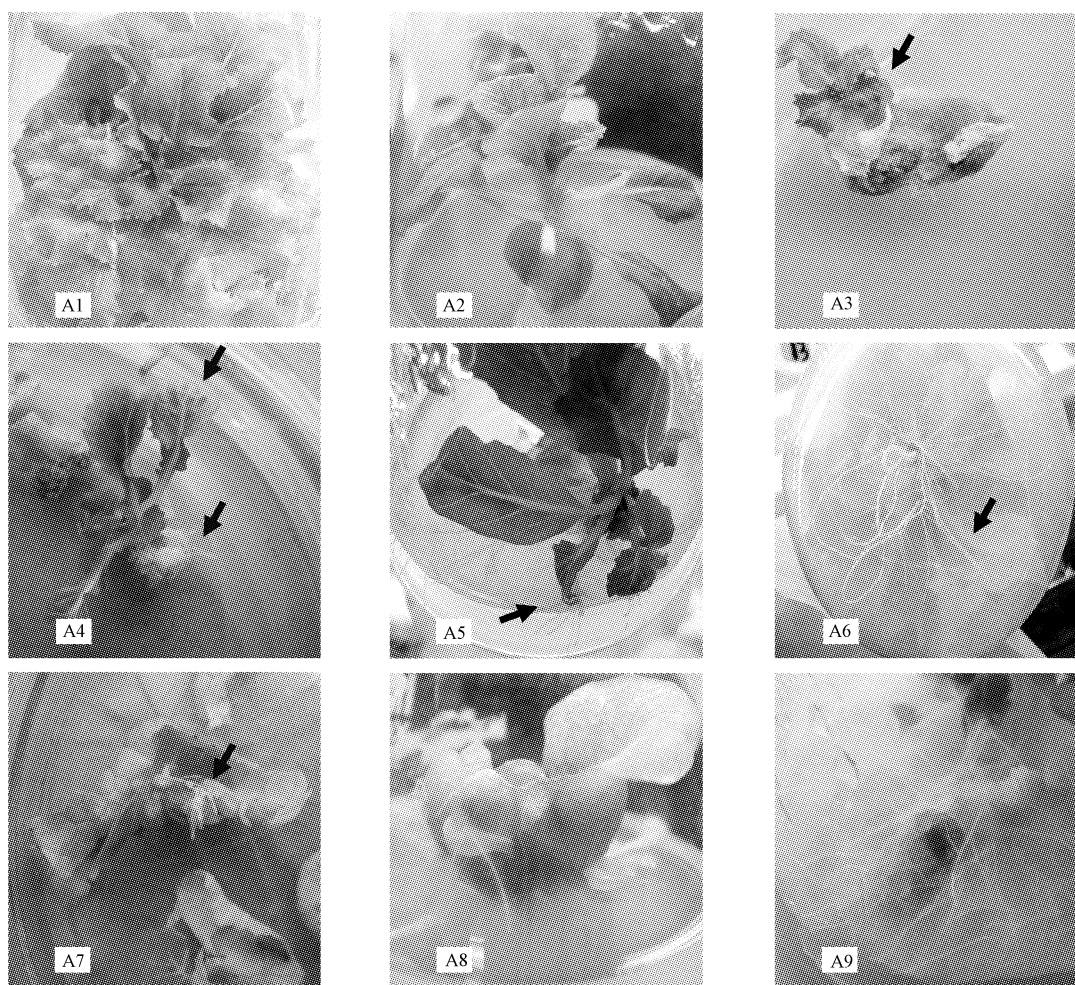


图 1 ‘洛阳包头’大白菜叶柄高效植株再生体系的建立

注: A1 大白菜无菌苗增殖培养; A2 大白菜无菌苗; A3 外植体叶柄不定芽的诱导; A4 外植体叶柄不定芽与不定根分化; A5 再生植株诱导生根; A6 完整植株不定根特写; A7 外植体叶片培养中不定根的分化; A8 外植体玻璃化现象; A9 不定根过度生长。

Fig. 1 Establishment of efficient plantlet regeneration system from petiole explants for *Brassica pekinensis* ‘Luoyang baotou’

Note: A1 Propagation of sterilized seedlings of *Brassica pekinensis* ‘Luoyang baotou’; A2 Sterilized seedling cultured in the MS medium without plant hormones; A3 Adventitious bud induced from petiole; A4 Adventitious root differentiated in the adventitious bud induction of petiole; A5 Adventitious root induction of regenerated plant; A6 The entire regenerated plantlet; A7 Adventitious root differentiated from leaf; A8 Vitrification of explant; A9 Excess growth of adventitious root.

3 讨论

外植体的类型是影响植株再生的一个重要因素,目

前外植体的类型很多,如下胚轴^[10]、子叶^[11]、叶片^[12-15]、叶柄^[15-16]等,都获得了比较高的植株再生诱导频率。白

菜植株再生研究主要集中在选择带柄子叶^[1,7,17-18]、下胚轴^[18]、真叶^[12,17]等为外植体,采用各种植物激素组合诱导不定芽的形成。吴玲玲等^[1]2012年以大白菜‘津育75’带柄子叶为外植体,在BA 2 mg/L和NAA 0.3 mg/L附加AgNO₃ 7 mg/L的培养基上,植株再生频率最高达76.92%。大白菜品种‘北京80号’带柄子叶的不定芽诱导率达83.6%^[7];大白菜‘早熟5号’带柄子叶的不定芽诱导率达86.41%^[18]。可见芸薹属作物的离体植株再生选用带柄子叶作为外植体具有一定优势。在该试验中‘洛阳包头’大白菜叶柄在不定芽诱导培养基中最高诱导率达76.7%,平均芽数为2.5个。说明在适宜的诱导条件下,该品种叶柄的植株再生能力较强,可以充当未来遗传转化中的受体材料。

有研究表明,由于白菜具有AA基因组,与同为芸薹属的黑芥BB基因组和甘蓝CC基因组以及其它融合杂种相比,其外植体离体培养再生能力最低^[7,17]。但随着国内学者的深入研究,白菜类的植株再生频率有了很大的提高,但不同基因型间植株再生率仍有很大差别。刘学成等^[12]2011年分别选取大白菜品种‘06J28’、‘92S105’、‘06J30’、‘06J31’的真叶为外植体,研究发现不同基因型的大白菜真叶不定芽诱导频率不同,差别较大,在52.9%~87.63%之间,不同基因型对大白菜真叶不定芽再生的诱导存在影响,这与该研究结果一致,在进行大白菜‘洛阳包头’叶柄不定芽诱导试验同时,选取大白菜无菌苗的真叶作为外植体进行培养,结果发现,大白菜真叶在培养基上只是长大,继而变黄,丧失培养价值;在某些配方上真叶有少量不定根的形成(图1A7),但最终未能使该品种大白菜真叶诱导出不定芽,这可能与该品种基因型有关;也可能该品种再生能力受到外植体类型影响;但也不排除没有筛选出诱导大白菜真叶再生的最适培养基配方。

激素是影响大白菜植株再生的另一个重要因素。就该试验而言,在较低BA浓度范围(0.5~1.5 mg/L)附加适当IBA就能使大白菜真叶顶芽获得较好的增殖效果,当BA浓度提高至2.5~3.5 mg/L时,大白菜叶柄才获得了较高不定芽诱导率。这说明BA对大白菜不定芽诱导较为重要。适宜的培养基能够使外植体获得较好的培养效果,但是过高浓度的激素也会使外植体出现异常现象,长时间在含有高浓度BA的培养基上处理的外植体,观察到玻璃化的现象的发生(图1A8),外植体不能继续增殖,生长状况不良。同样含有不适宜的IBA浓度的培养基也会使外植体的不定根疯长,影响不定芽的生长(图1A9)。因而,适宜的激素种类和浓度配比的筛选是进行大白菜植株再生的一项重要研究。

虽然具有原分生组织的顶芽在诱导细胞全能性时更具优势,但进行遗传转化时,外源基因导入外植体上

分生组织细胞和其它细胞的概率相同,都以极低频率发生。低频的转化效率要求尽可能多的细胞能够再生植株,才有可能获得转基因材料。因而各种类型外植体,各种细胞的植株再生的诱导是有必要进行研究的。

‘洛阳包头’大白菜的植株再生体系研究结果表明,叶柄作为外植体是建立大白菜的植株再生体系较为理想的材料。无菌苗顶芽增殖最适配方为MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L;大白菜叶柄最适不定芽的诱导配方为MS+BA 2.5 mg/L+IBA 0.3 mg/L;最佳生根配方为MS+IBA 1.0 mg/L生根率最高,达90.0%。

参考文献

- [1] 吴玲玲,王一娟,董刚,等. 大白菜再生体系的正交设计优化[J]. 山西大学学报(自然科学版),2012(4):712-716.
- [2] 孟凡珍,张振贤,于贤昌. 不同生态型结球大白菜抗寒性的评价[J]. 中国农业大学学报,2004(4):35-39.
- [3] Jaglo K R, Klef S, Amundsen K L, et al. Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other species[J]. Plant Physiol, 2001,127:910-917.
- [4] Hsieh T H, Lee J T, Yang P T, et al. Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene elevated tolerance to chilling and oxidative stresses transgenic tomato[J]. Plant Physiol, 2002,129:1086-1094.
- [5] Hsieh T H, Lee J T, Chang Y Y, et al. Tomato plants ectopically expression *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress[J]. Plant Physiol, 2002,130:618-626.
- [6] 孟平红,万发香,王永清,等. 冷诱导转录因子CBF3转化茄子的初步研究[J]. 中国蔬菜,2013(10):36-43.
- [7] 刘任源,于拴仓,魏佑营,等. 白菜类作物子叶高频再生体系的建立[J]. 西北农业学报,2012(6):118-123.
- [8] 王洋,崔继哲,李翠. 大白菜高频再生体系的建立及策略[J]. 园艺学报,2005,32(4):701-703.
- [9] 张松,温孚江,魏毓棠. 外植体处理及接种方式对大白菜植株再生的影响[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2001(1):78-80.
- [10] 郝晓云,沈海涛,李鸿彬. 甘蓝型油菜下胚轴和带柄子叶再生体系研究[J]. 生物技术通报,2013(4):69-74.
- [11] 杨长友,袁中厚,郑小敏,等. 甘蓝型油菜高效离体再生体系的建立[J]. 生物技术通报,2013(1):111-115.
- [12] 刘学成,张鲁刚,茹磊,等. 大白菜真叶高频再生体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2011(11):146-152.
- [13] 郭艳超,张倩,田传卫,等. 香水月季类原球茎(PLBs)途径再生植株的研究[J]. 中国农业大学学报,2008(5):29-34.
- [14] 田琳琳,赵梁军,张睿,等. 无刺桅杆槐和无刺槐再生体系的研究[J]. 中国农业大学学报,2010(4):39-44.
- [15] 徐茜,乐正碧,徐燕,等. 甘薯叶片和叶柄组织诱导培养及植株再生研究[J]. 中国农学通报,2011(15):102-105.
- [16] 张朝军,范术丽,武芝霞,等. 棉花大田植株叶柄组织培养体系的建立[J]. 西北植物学报,2011(6):1257-1263.
- [17] 曹家树,余小林,黄爱军,等. 提高白菜离体培养植株再生频率的研究[J]. 园艺学报,2000(6):452-454.
- [18] 史超,王银娟,杜丽,等. 大白菜“早熟5号”不定芽再生体系的优化[J]. 江苏农业科学,2011(5):71-73.