

## 甘蓝雄性不育系组培快繁技术研究

许端祥 方淑桂 陈文辉  
(福州市蔬菜科学研究所 福州 350012)

**摘要:** 以甘蓝雄性不育系腋芽为材料研究其组培快繁技术, 结果表明: 适合腋芽增殖的培养基是 MS+2mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA, 增殖系数可以达到 5 以上, 且组培苗经一次继代就可脱分化; 适合生根、壮苗培养基是 MS+0.1 mg/L IBA, 平均每株生根数是 6.6 条, 平均根长 6.91 cm。试管苗移栽成活率高达 95%。组培苗经过试种, 与大田实生母株相比性状一致。

**关键词:** 甘蓝 雄性不育系 快繁 生根

**中图分类号:** Q943.1;S635 **文献标识码:** A

**文章编号:** 1006—2327—(2007) 01—0015—03

甘蓝是一种重要的蔬菜, 具有明显的杂种优势。杂交制种的途径一般是利用自交不亲和系或雄性不育系, 自交不亲和系自身繁殖困难, 要通过蕾期人工授粉才能获得种子, 且多代自交性状容易退化, 杂种纯度不可能达到 100%。雄性不育系能克服自交不亲和系的诸多缺点, 且不容易退化, 制种杂交率可达 100%, 但不育系也存在一些问题。单隐性核基因控制的雄性不育两用系, 繁殖亲本比较容易, 但制种过程中要拔除一半的可育株, 不仅费工耗时, 而且如果没有及时拔除, 将严重影响杂交率。细胞质雄性不育(CMS)可保证杂交纯度, 但筛选优良的保持系, 具有相当的难度。许多育种工作者都将工作的重点转移到如何用快繁的方法保持雄性不育系。关于甘蓝的组培研究, 是从 20 世纪 60、70 年代开始, 现已获得了较大的成功, 从叶片、子叶、下胚轴、根、花器(包括花球、花托、花茎、花茎叶等)及花序梗等都获得了完整的再生植株<sup>[1-5]</sup>。但甘蓝腋芽繁殖在国内少见报道, 本项目对甘蓝雄性不育系的腋芽繁殖技术进行探讨, 并研究其子代的性状, 以期为甘蓝的快速繁育和种性保持寻求新的有效途径。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

以本所甘蓝课题组提供的甘蓝细胞质雄性不育系 CMS16, 于 6 月下旬播种, 7 月下旬定植, 翌年 3 月上旬抽苔腋芽供试验。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 腋芽外植体的获取

甘蓝雄性不育系开花时, 在主茎处用锋利刀片将腋芽切下, 先放在 1% 的洗衣粉溶液中浸泡片刻, 流水冲洗 30min, 转入 75% 的乙醇溶液中振荡灭菌

30s, 无菌水荡洗 1 次, 再转入 10% 的次氯酸钠溶液中振荡灭菌 20min, 无菌水荡洗 3-5 次。在无菌滤纸上吸去表面水分, 切取 0.5cm 长的腋芽待用。

#### 1.2.2 腋芽增殖培养基的筛选和继代

腋芽增殖培养基设六个处理, 各培养基均附加 30g/L 蔗糖、7g/L 琼脂、pH5.8。(1)MS+3mg/L 6-BA+0.01mg/LNAA; (2)MS+3mg/L6-BA+0.1mg/LNAA; (3)MS+2mg/L 6-BA+0.01mg/L NAA; (4)MS+2mg/L6-BA+0.1mg/LNAA; (5)MS+3mg/L6-BA; (6)MS+2mg/L6-BA。

将小腋芽分别接入六种培养基中, 每种培养基接 10 瓶, 每瓶接 4 个腋芽, 重复 3 次。然后放入 25±2℃、光照强度 3000Lx, 16 h·d<sup>-1</sup> 光照的培养室中培养, 20d 后分别统计增殖数量, 并进行 *t* 测验分析。

增殖的腋芽, 转入相应的增殖培养基中继代培养。

#### 1.2.3 试管苗的生根、壮苗培养

生根培养基作五种处理, 各培养基均附加 30g/L 蔗糖、7g/L 琼脂、pH5.8。(A)MS; (B)1/2MS; (C)MS+0.1mg/LIBA; (D)B5+0.1mg/LIBA; (E)MS+20 mg/LB9。

将增殖的试管苗转入 5 种生根培养基中培养。每种培养基接 10 瓶, 每瓶接 3 株, 重复 3 次, 分别于接种培养 7d、14d 后调查试管苗的生根率, 25 d 后调查株高、生根数及根长, 并对结果进行 *t* 测验分析。

#### 1.2.4 试管苗炼苗、移栽、定植

当试管苗长到 5-6cm 高、根系发达时, 进行炼苗。首先松开培养瓶盖, 再从瓶中小心取出试管苗, 洗净根部附着的培养基, 栽种于营养钵的基质(以

1:1:1 的蛭石:草炭:草木灰混合)中,用白色塑料膜罩住保湿 5-7d,在温室中继续培养 15-20d,然后移出室外炼苗 7d,选择晴天傍晚种植于大田,注意防晒保湿。

## 2 试验结果

### 2.1 腋芽增殖培养基的筛选和继代

通过试验,发现腋芽在六种培养基中,都有不同程度的增殖,增殖的腋芽生长良好。但增殖系数相差显著,从表 1 可看出,3 号培养基增殖系数最高,达到 5.76;其次为 2 号培养基,增殖系数为 5.34,通过统计分析二者差异并不显著,但极显著高于其它培养基,我们认为 2 号、3 号培养基都适合甘蓝腋芽增殖。试验还发现组培快繁的腋芽继代一次就能脱分化,没有发现花蕾。

表 1 不同培养基对甘蓝腋芽增殖的影响

培养基代号	增殖后的芽数(个)	增殖系数
1	373 E	3.73 CD
2	534 B	5.34 AB
3	576 A	5.76 A
4	431 C	4.31 BC
5	309 F	3.09 D
6	382 D	3.82 CD

注:各培养基接种芽数均为 100 个。同列数字后的大写字母表示在 0.01 水平上差异,下同。

### 2.2 试管苗的生根、壮苗培养

脱分化后的试管苗转入生根培养基中,7d 后大部分试管苗开始长出新根(表 2)。其中 D 培养基生根最快,7d 生根率就达到 38.24%,但培养 14 d 后调查结果不如 C 培养基,C 培养基生根率最高,可达 89.54%,极显著差异于其它培养基。而且 C 培养基的试管苗株高为 5.09 cm,比 D 培养基矮但比其它培养基高,相对较矮壮。虽然其生根数只有 6.6 条、根长只有 6.91cm,但根系粗壮有利于移栽成活。因此认为 C 培养基作为甘蓝试管苗的生根培养基最适宜。

### 2.3 试管苗炼苗、移栽、定植

试管苗在炼苗、移栽中,经过反复试验发现五种培养基上培养的试管苗移栽成活率差别并不大,主要跟移栽时的温度、湿度有关,管理得好成活率

都可以达到 95%以上,矮壮的试管苗相对缓苗更快。

表 2 不同培养基对甘蓝试管苗生根、株高的影响

培养基	生根率%		株高	生根数	根长
	7d	14d			
A	28.15 C	82.22 B	4.03 B	7.52 BC	5.94 BC
B	6.63 E	62.38 D	3.90 B	7.37 BC	3.56 C
C	36.66 B	89.54 A	5.09 AB	6.60 C	6.91 B
D	38.24 A	72.81 C	6.28 A	8.56 B	11.89 A
E	9.58 D	46.11 E	4.73 B	11.23 A	7.31 B

注:以上数据除特殊说明均取自试管苗培养 25 d 的结果。

### 2.4 组培苗与母株实生苗比较

组培再生试管苗经过试种,与大田实生母株相比,无论从植株性状,还是从育性表现来看都完全一致,说明组培再生苗能很好地保持原品种的特性(表 3),用其配制的杂种后代与以实生母株配制的没有区别。

## 3 总结与讨论

甘蓝雄性不育系可通过腋芽组培快繁技术保存和扩繁,这与 Hussey<sup>[6]</sup>的结论基本一致。Hussey 认为借组织培养繁殖植物,最好的途径是腋芽增殖,因为新芽属多细胞起源,遗传稳定性相对较大。而从叶片、子叶、下胚轴、根、花器(包括花球、花托、花茎、花茎叶等)及花序梗等再生,大多需经过愈伤组织阶段,再由愈伤组织诱导生芽。而愈伤组织产生的再生芽,容易发生变异。相比较,腋芽增殖步骤简单的多,省去了愈伤组织阶段,减少了产生变异的环节,更好地保持了母株特性。腋芽的增殖培养基以 MS+2mg/L 6-BA+0.01mg/L NAA 为最好,增殖系数达到 5 以上,且经一次继代就可脱分化,不同于白菜组培要经过 5-6 代才能部分脱分化<sup>[7,8]</sup>。用 MS+0.1mg/L IBA 作生根培养基可培养出根系发达、粗壮的再生苗,移栽成活率在 95%以上。研究结果显示,甘蓝雄性不育系腋芽培养物,一年只要扩繁 9 代,一个腋芽理论上一年可以扩繁约 697 万株,可以满足 150hm<sup>2</sup>的制种用苗需求,完全可以达到应用的要求,为甘蓝的快速繁育和种性保持找到一条新的有效途径。(下转第 29 页)

表 3 甘蓝组培苗与实生母株的比较

苗类	开展度(cm)	植株外叶 (片)	叶色	紧实度	球形	球茎 (cm)	球高 (cm)	中心柱 (cm)	球重 (kg)	不育率 (%)	不育度 (%)
组培苗	5.0 A	11.9 A	深绿色	紧实	扁平	16.6 A	11.4 A	5.6 A	1.57 A	100	100
实生母株	5.0 A	12.2 A	深绿色	紧实	扁平	16.9 A	11.6 A	5.6 A	1.61 A	100	100

商品肥应有农业部的登记注册。人畜粪便等有机肥必须经过高温发酵处理,充分腐熟方能施用,禁止使用城市垃圾,污泥和未经无害化处理的有机肥。

### 2.3.2 施肥方法

幼龄龙眼树薄肥勤施,要求“一梢二肥”,在新梢萌动时和新梢展叶转绿时各施一次,挖环沟施肥。

结果树每年施肥 3-4 次。年产 100kg 鲜果的龙眼树施 N1.0-1.2kg/年·株,务求有机氮 $\geq 40\%$ , N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O:CaO:MgO=1.0:0.6:1.1:0.8:0.4。其中二月中下旬的壮花肥占全年施肥量 20%-25%,旺树控制氮肥用量;6 月份幼果施肥占全年 40%;采果前一个月的壮果肥占全年 35%-40%,挂果多的及树势弱的树注重氮肥施用;采果后施肥的以有机肥和热性肥料为主,树势弱的再增补氮肥。

## 2.4 树体管理

### 2.4.1 修剪及控晚冬梢

以采果后修剪为主,剪除干枯枝、病虫枝、过密枝、重叠枝、细弱枝及下垂枝。11 月下旬果园全面深翻断根,控制晚冬梢抽生。

### 2.4.2 疏花疏果及果实套袋

疏花掌握在清明至谷雨季节。依树势、树龄而定,以树定产、以产定穗决定留花量。株产 50kg 的树留 100 穗,余者皆疏除。

疏果 6 月中旬进行,以留中果穗为主,剪除病虫穗,空穗及过大的果穗,每穗留果粒 40-70 粒,多者剪除。

果实套袋可减少喷洒农药治虫次数,有利无公害龙眼果品的生产,并节约成本,增加收入。套袋务必在 6 月下旬初完成,首先剪除病虫果、畸形果,而后根据病虫发生情况全园喷药,待药液干后二天内再用 80 目尼龙网袋套袋。

## 2.5 病虫害防治

病虫害防治是无公害龙眼生产的重点。应贯彻“以防为主,综合防治”的植保方针,在严格执行国家规定的植物检疫制度和病虫预报基础上,综合采用农业防治、生物防治、物理防治和化学防治等措施,防止病虫发生。

### 2.5.1 农业防治

种植无毒良种壮苗,合理修剪,加强培育管理,健壮树势,创造有利于龙眼生长,不利病虫发生的环境条件。加强冬季清园及清除果园枯枝、落叶、落果及杂草,并集中烧毁或深埋,以减少越冬病虫。

### 2.5.2 生物防治

保护和利用天敌、发挥生物防治作用,扩大以虫治虫,以菌治虫的应用。推广平腹小蜂,阿维菌素、苏云金杆菌、定虫隆、灭幼脉等生物农药防治,推行果园放养家鸡,减少害虫数量和增加有机质,提高生态效益和经济效益,营造适合天敌生存的果园生态环境,使用对天敌低毒或无毒的药剂,选择对天敌影响小的施药时间和方法。

### 2.5.3 物理治疗

利用诱虫灯诱杀害虫,网袋套果穗,人工捕杀荔枝蜡象、金龟子等到害虫。

### 2.5.4 化学防治

必须使用农药防治时,应选择高效、低毒、低残留的农药,做到适时,合理用药。严格执行 GB4285 和 GB/T8321 标准。掌握农药用量和安全间隔期,合理混用,轮换交替使用不同作用机制和延迟病虫害抗性发生和发展的农药。

## 参考文献

- 1、陈清火.凤梨穗龙眼及其栽培技术要点.福建果树,2004(2):35
- 2、农业部颁布的行业标准.NY/T5176——2002 龙眼生产技术规范

## (上接第 16 页)参考文献

- 1、吕爽,王超.结球甘蓝离体培养的研究进展.北方园艺,2004(3):6-7
- 2、裘文达.园艺植物组织培养.上海:上海科学技术出版社,1986.155-161
- 3、程振东,卫志明,许智宏.甘蓝型油菜下胚轴原生质体培养的研究[J].生物工程学报,1994,10(1):30-33
- 4、薛红卫,卫志明,许智宏.甘蓝下胚轴原生质体高效成株系统的建立[J].实验生物学报,1994,27(2):259-269

- 5、Hansen L.N. et al. Regeneration of Plants from Protoplasts of Rapid Cycling Brassica oleracea L. Plant Cell Reports, 1994.13:335-339
- 6、Hussey G. The Application of Tissue Culture to the Vegetative Propagation of Plants. Sci prog, 1978,65:185-208.
- 7、赵云,王茂林,郑洪武,等.细胞核雄性不育油菜无性繁殖研究 I.细胞核不育油菜试管繁殖.中国油料,1997,19(1):1-5
- 8、许端祥,方淑桂,陈文辉.大白菜雄性不育系的组织培养和快速繁殖技术研究.植物生理学通讯,2006(3):445-448