

结球蔬菜白蓝愈伤组织诱导及增殖的影响因素探讨

卢永奋, 马春梅, 黄锐明, 谢晓凯, 柳江海, 卢海强
(汕头市白沙蔬菜原种研究所, 广东 汕头 515800)

摘要: 研究表明, 结球蔬菜白蓝不同外植体在添加 KT 2.0 mg/L、NAA 0.2 mg/L 的 MS 培养基上可诱导出愈伤组织、不定芽和不定根, 茎尖、茎段、叶片的愈伤组织最高诱导率分别为 76.47%、80.95%、18.18%, 但不同外植体和植物生长调节物质对愈伤组织分化能力有明显的影响。

关键词: 白蓝; 外植体; 组织培养; 影响因素

中图分类号: S635.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-874X(2006)10-0026-03

Investigation on factors influencing the cultural effects of difference explants from *Brassica pekinensis* × *B. oleracea*

LU Yong-fen, MA Chun-mei, HUANG Rui-ming, XIE Xiao-kai, LIU Jiang-hai, LU Hai-qiang
(Shantou Baisha Institute of Vegetable seeds Propagation, Shantou 515800, China)

Abstract: The difference of *Brassica pekinensis* × *B. oleracea* as the explants was cultured in tubes containing MS medium supplemented with KT 2.0 mg/L and NAA 0.2 mg/L. The results indicated that the meristem, stem-segment and leaf could induce callus, adventitious bud and adventitious root. The percentage of callus formation was up to 76.47%, 80.95%, 18.18%. The effect of callus formation was evident in different explants and plant growth regulator.

Key words: *Brassica pekinensis* × *B. oleracea*; explant; cultural; effect

白蓝(*Brassica pekinensis* × *B. oleracea*)是芸薹属蔬菜大白菜和结球甘蓝种间杂交育成的结球性蔬菜,其杂交成功率极低,后代不易结籽,利用大田优良植株

进行组织培养是获取和保存其种质资源的有效途径之一。有关研究证明,建立高效的组织培养再生体系是植物组培技术实用化的首要条件^[1]。赵德培^[2]和崔琪(1978)曾利用远缘杂交通过胚培养拯救技术获得白蓝种间杂种植株。但目前较少有关利用白蓝单株离体培养获得植株的研究报道。为此,我们对影响白蓝茎

收稿日期:2006-07-11

作者简介:卢永奋(1970-),男,农艺师

后的大白菜幼苗内源激素代谢有关。据推测,壳聚糖促进作物生长可能是通过调控内源激素水平,影响植物多种酶的合成及相关生理生化实现的^[9]。在研究过程中发现,壳聚糖的使用表现出与生长素相类似的低浓度促进、高浓度抑制的浓度效应,但壳聚糖种子包衣处理能够提高大白菜幼苗内源生长素和赤霉素含量和作用机理仍有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 骆广生,高春满. 壳聚糖制备及加工工艺的研究[J]. 天然产物研究与开发,1994,6(3):84-89.
- [2] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京:中国环境科学出版社,1999:301-305.
- [3] 马鹏鹏. 甲壳素及其衍生物在农业生产中的应用[J]. 植

物生理学通讯,2001,37(5):475-478.

- [4] 胡文玉,吴娇莲. 壳聚糖的性质、用途及其在农业上的应用前景[J]. 植物生理学通讯,1994,30(4):294-296.
- [5] 国际种子检验协会(ISTA). 国际种子检验规程[M]. 上海:上海科学技术出版社,1993:35.
- [6] 吴颂如,陈婉芬,周燮. 酶联免疫法(ELISA)测定内源植物激素[J]. 植物生理学通讯,1988(5):53-57.
- [7] 郝再彬,苍晶,徐仲. 植物生理实验[M]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2004:86-88.
- [8] 潘瑞炽,李玲. 植物生长发育的化学控制[M]. 广州:广东高等教育出版社,1999:1-14.
- [9] 杨越冬,周永国,齐印阁,等. 壳聚糖对冬小麦种子萌发过程中生理活性的影响[J]. 种子,2002,122(3):3-5.

尖、茎段、叶片组培的因素进行研究,现将初步研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 不同消毒时间试验

供试白蓝引自日本,选择大田优良单株的茎尖、茎段(带腋芽)、叶片作组培材料。各种外植体先用 70% 酒精浸泡 15 s,无菌水洗涤,然后放入 0.1% HgCl_2 溶液进行消毒。外植体消毒时间分别设 8、15、20 min 处理,消毒后接种培养,每种外植体接种 15 块,培养 20 天后统计污染外植体数,计算污染率。污染率(%) = 污染数/接种数 $\times$ 100。

1.2 不同诱导培养基试验

试验以 MS 为基本培养基,分别添加不同浓度配比的 6-BA、KT、NAA,共设 10 种诱导培养基处理(表 2)。外植体消毒后用无菌水冲洗 5~6 次,吸干水分,切取茎尖长约 0.5 cm、茎段长约 1 cm、叶片 1 cm^2 大小,分别植入愈伤组织诱导培养基中,各种培养基均加入蔗糖 3%、琼脂 0.8%,pH 值调至 5.8。接种后,置于培养室中培养,培养温度为 $(21 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照强度为 3 000 lx,每天光照 12 h。培养后 35 天统计愈伤组织分化数,计算诱导率。愈伤组织诱导率(%) = 分化数/接种数 $\times$ 100。

1.3 不同继代培养基试验

切取已形成的愈伤组织大小约 1.0 cm $\times$ 1.0 cm,接种于继代培养基中进行继代培养,接种愈伤组织团块数及培养基配方见表 3,每 14 天为一个继代周期。继代培养 14 天后观察不定芽生长情况,并统计增殖芽数和增殖倍数。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对外植体成活的影响

外植体消毒成功与否是组培能否顺利进行的关键步骤之一。由表 1 看出,在 0.1% HgCl_2 溶液中消毒 8、15、20 min,茎尖的污染率分别为 60.00%、53.33%、20.00%,茎段的污染率分别为 80.00%、40.00%、33.33%,叶片的污染率分别为 66.67%、46.67%、40.00%。据观察,消毒时间短(8 min)时,外植体损伤小,但污染率高,未污染外植体接种后无褐化死亡现象;消毒时间长(20 min)时,对外植体的杀伤和抑制作用较大,未污染材料在培养 4 天后水浸状或褐化死亡比例高。对消毒时间超过 15 min 的未污染新鲜叶片进行接种培养,结果外植体在相当长一段时间表现萌动迟钝,甚至不萌动。根据试验结果认为白

表 1 0.1% HgCl_2 浸泡时间对白蓝外植体消毒效果的影响

外植体	浸泡时间 (min)	接种数 (块)	污染数 (块)	污染率 (%)
茎尖	8	15	9	60.00
	15	15	8	53.33
	20	15	3	20.00
茎段	8	15	12	80.00
	15	15	6	40.00
	20	15	5	33.33
叶片	8	15	10	66.67
	15	15	7	46.67
	20	15	6	40.00

蓝外植体消毒时间以茎尖和茎段为 15 min、叶片为 8 min 较适宜。

2.2 不同类型外植体的愈伤组织诱导效果

据观察,白蓝不同外植体在诱导培养基上培养 7 天后,部分外植体切口处明显增厚,开始萌动;培养 30 天后,能产生明显的团块状愈伤组织及少量不定根。

不同外植体产生愈伤组织的快慢及团块大小、颜色、质地有很大的差异。其中茎尖的愈伤组织分化比例最高为 76.47%,带腋芽茎段的愈伤组织诱导率为 80.95%,而叶片的愈伤组织诱导率仅为 18.18%。茎尖、茎段产生的愈伤组织质量较好、形成时间短且伴有少量不定芽生成,尤其是带腋芽的茎段,在产生愈伤组织的同时,多数幼苗由腋芽直接萌生,出苗时间更早;叶片产生的愈伤组织质量差、团块小,容易褐化死亡,成活的愈伤组织需经较长时间继代方能产生不定芽。

2.3 不同生长调节剂对比对愈伤组织诱导的影响

由表 2 可以看出,愈伤组织诱导率随细胞分裂素和生长素浓度的增加而呈明显上升趋势。其中,茎尖、茎段、叶片在 A1 培养基(6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L)中的愈伤组织诱导率分别为 36.36%、35.71% 和 0,在 A5 培养基(6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L)中分别提高到 61.29%、75.51% 和 16.67%,在 A10 培养基(KT 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L)中则分别提高到 76.47%、80.95%、18.18%。

据调查,A1、A6 培养基中形成的愈伤组织团块直径分别在 0.3 cm 以下和 0.3~0.6 cm 之间愈伤组织质地致密,淡绿色,伴有不定根生成;A5、A10 培养基的愈伤组织团块直径分别为 0.7~1.2 cm 和 1.0~2.5 cm,质地中等,淡绿色,不定根少。

上述试验结果表明,细胞分裂素 6-BA、KT 对白蓝愈伤组织分化有直接的促进作用,生长素 NAA 只对愈伤组织分化起辅助作用,但根系生成对低浓度 NAA 敏感,IAA、IBA 的作用与 NAA 类似。在白蓝诱

表2 不同生长调节剂对比对白蓝外植体愈伤组织诱导的影响

培养基	浓度(mg/L)			茎尖			茎段			叶片		
	6-BA	KT	NAA	接种数 (块)	分化数 (块)	诱导率 (%)	接种数 (块)	分化数 (块)	诱导率 (%)	接种数 (块)	分化数 (块)	诱导率 (%)
A1	0.1	0	0.1	33	12	36.36	42	15	35.71	25	0	0
A2	0.2	0	0.1	31	12	38.70	39	15	38.46	22	0	0
A3	0.5	0	0.1	27	15	55.56	43	18	41.86	25	0	0
A4	1.0	0	0.2	30	17	56.67	38	25	65.79	26	3	11.54
A5	2.0	0	0.2	31	19	61.29	49	37	75.51	30	5	16.67
A6	0	0.1	0.1	34	10	29.41	44	8	18.18	22	0	0
A7	0	0.2	0.1	32	13	40.62	40	9	22.50	24	0	0
A8	0	0.5	0.1	34	17	50.00	40	21	52.50	24	0	0
A9	0	1.0	0.2	27	17	62.96	43	21	48.84	24	4	16.67
A10	0	2.0	0.2	34	26	76.47	42	34	80.95	22	4	18.18

导愈伤组织过程中,细胞分裂素和生长素的使用浓度并非越高越好,一般应分别控制在1.0~2.0 mg/L和0.1~0.2 mg/L的范围内。

2.4 不同生长调节剂对比对继代增殖的影响

将愈伤组织切割后接种入继代培养基中,培养14天可获得丛生的不定芽。从表3可以看出,不同生长调节剂对比培养基处理的继代增殖量亦存在差异,其中B1、B4、B5、B8培养基的增殖倍数分别为3.03、

2.05、4.66、2.45倍;在NAA添加浓度为0.1~0.2 mg/L的条件下,随着6-BA、KT浓度的升高,不定芽增殖量呈下降趋势,而不定芽粘连或丛叶状等不良植株比例增加。说明在白蓝愈伤组织继代培养中,适当降低细胞分裂素浓度有利于芽的分化。从本试验结果看,MS+KT 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基(B5)中的不定芽粗壮、浓绿、容易生根,是继代增殖的有效培养基。

表3 不同生长调节剂对比对白蓝继代增殖的影响

培养基	浓度(mg/L)			接种芽数 (块)	培养后14d		不定芽生长状况
	6-BA	KT	NAA		芽数(块)	增殖倍数	
B1	0.1	0	0.1	40	121	3.03	健壮、浓绿
B2	0.2	0	0.1	40	126	3.15	健壮、浓绿
B3	0.5	0	0.1	43	137	3.19	部分发育不良
B4	1.0	0	0.2	40	82	2.05	健壮,部分畸形
B5	0	0.1	0.1	44	205	4.66	健壮、整齐
B6	0	0.2	0.1	40	124	3.10	健壮、浓绿
B7	0	0.5	0.1	40	92	2.30	部分发育不良
B8	0	1.0	0.2	42	103	2.45	部分畸形

3 结语

组织培养是一个复杂的问题,结球蔬菜白蓝的组培效应同样受到许多因素的影响。其中外植体基因型、消毒时间、培养基中的植物生长调节物质种类和配比浓度以及培养条件等都会对白蓝愈伤组织的诱导产生明显影响。本试验结果表明,在培养条件相同的情况下,白蓝不同外植体的愈伤组织分化能力差别很大,诱导能力由大到小依次为茎段、茎尖、叶片。本试验结

果还表明,MS+KT 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L和MS+KT 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L分别是结球蔬菜白蓝愈伤组织诱导及继代增殖的适宜培养基。

参考文献:

- [1] 马国斌,王鸣,郑学勤.西瓜组织培养再生体系的比较研究[J].中国西瓜甜瓜,1998(3):9-11.
- [2] 赵德培.通过幼胚培养获得结球性甘蓝与大白菜的种间杂种[J].中国农业科学,1981(2):46-51.