

花椰菜叶片离体再生技术的研究*

黄俊轩¹, 李双跃¹, 李建科¹, 刘艳军¹, 杨静慧¹, 刘林², 刘云红²

(1. 天津农学院 园艺系, 天津 300384; 2. 天津市园林局, 天津 300380)

摘要: 以花椰菜叶片为外植体, 经消毒处理后在不同激素浓度的培养基上进行诱导再生。结果表明: 在附加 3 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L NAA 的 MS 培养基上培养, 芽分化率最高, 达 100%, 平均每块外植体产生 5.71 个芽。

关键词: 花椰菜; 叶片; 组织培养; 离体再生

中图分类号: S635.3

文献标识码: A

Regeneration by Leaf of *Brassica oleracea* var. botrytisHUANG Jun-xuan¹, LI Shuang-yue¹, LI Jian-ke¹, LIU Yan-jun¹,
YANG Jing-hui¹, LIU Lin², LIU Yun-hong²

(1. Department of Horticulture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;

2. Tianjin Garden Bureau, Tianjin 300380, China)

Abstract: The shoots of *Brassica oleracea* var. botrytis were regenerated from the disinfected leaves on MS medium containing different concentrations of hormone. The experimental results suggested that the optimal medium for induction of adventitious buds was MS + 3 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA. The differentiation frequency of adventitious bud was the highest and reached 100%. And the number of buds per explant with shoots was 5.71.

Key words: *Brassica oleracea* var. botrytis; leaf; tissue culture; regeneration

花椰菜(*Brassica oleracea* var. botrytis)属十字花科芸薹属植物, 世界各地均有种植。但花椰菜生长期病虫害严重、不耐贮藏、品质差等问题一直困扰着广大菜农与菜商。因此, 对花椰菜品种进行改良势在必行, 而常规育种方法已不能满足现代农业对花椰菜品种改良的要求。现代生物技术的发展为人们选育和转化具有优良园艺性状基因的突破性品种提供了可能^[1-3]。然而, 国内外关于花椰菜遗传转化的技术还很不成熟, 遗传转化率极低, 难以适应花椰菜分子育种的要求^[4]。华学军等^[5]将融合 GUS 基因的 Bt 杀虫剂基因转入花椰菜, 但只得到表达 GUS 活性的愈伤组织, 而未得到完整的转基因植株。陈晓邦等将 Intron-GUS 嵌合基因转入花椰菜, 获得的再生转基因植株的频率仅为 1%。其原因在于尚未真正解决适宜农杆菌介导的花椰菜高频率植株再生技术。现在, 花椰菜基因转化多以花椰菜种子所发的无菌苗的子叶为外植体进行遗传转化, 但采种难是长期存在的一大难题。利用无性繁殖的方法繁育采种株, 又因多数品种不发生腋芽而难以实现。因此, 利用花椰菜叶片为外植体, 经消毒后培养一段时间, 重新造成伤口, 用农杆菌浸染后对转化苗进行诱导, 这样操作既简便, 又可避免因种子难得所带来的不便。

本研究选用“白灵”菜花品种为材料, 以花椰菜叶片为外植体, 消毒后在添加不同激素浓度的培养基上进行诱导再生, 确定高效的再生条件, 旨在为花椰菜高效遗传转化体系的建立奠定基础。

* 收稿日期: 2006-09-05

基金项目: 天津市自然科学基金项目“转基因抗黄化苹果选育”(023614211), “抗旱抗寒高产油树工程育种”(05YFJMJ14400), 天津市科技发展规划项目“天津市生物技术预见”(05ZLZLT01600), 天津市农业科技成果转化与推广项目“耐盐牧草选育”(0504018), 天津市高等学校科技发展基金项目“名贵花卉——巨型红掌的引种和组培快繁研究”(20050908)

作者简介: 黄俊轩(1973-), 男, 广东河源人, 讲师, 学士, 主要从事园林植物的研究。联系电话: (022) 23781517。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试花椰菜品种“白灵”菜花种子购自蔬菜种子市场。

1.2 方法

1.2.1 外植体的消毒处理

将供试种子播种在温室内，正常管理，生长 30 d 后取花椰菜基生叶片，用体积分数 75% 的酒精浸泡 30 s 后，用体积分数 40% 的安提福民（滴加 1 滴吐温 80）表面消毒 15 min，无菌水冲洗 3 次，每次 3~5 min，然后接种于不含任何激素的 1/2 MS 培养基上培养。培养基中加入硫酸链霉素，使其终浓度为 100 mg/L。培养温度（24±2）℃，光强为 1 600~2 000 lx，光照 16 h/d。

1.2.2 不同激素组合对花椰菜基生叶片芽分化的影响

取培养 5~7 d 的花椰菜基生叶片，在超净台中用剪刀剪成 1~2 cm 的小段作为外植体。分别置于不同激素配比的 MS 培养基（MS 无机盐、维生素及激素配比见表 1，所有培养基中附加蔗糖 30 g/kg、琼脂粉 6 g/kg），培养条件同 1.2.1。25 d 后统计外植体的再生芽数，并按下列公式计算不定芽分化率和平均每个外植体产生的芽数：

不定芽分化率/%=分化外植体数/接种外植体数×100%

平均每个外植体产芽数=分化总芽数/接种外植体数。

表 1 不同激素对比对花椰菜叶片芽分化的影响

培养基/mg·L ⁻¹	接种外植体数/个	分化外植体数/个	不定芽分化率/%	平均每个外植体产芽数/个
6-BA 2.0	20	12	60	3.24
6-BA 2.0+NAA 0.1	20	14	70	4.81
6-BA 2.0+NAA 0.2	20	17	85	4.23
6-BA 2.0+NAA 0.4	20	15	75	3.69
6-BA 3.0	20	16	80	5.11
6-BA 3.0+NAA 0.1	20	17	85	8.26
6-BA 3.0+NAA 0.2	20	19	95	10.34
6-BA 3.0+NAA 0.4	20	13	65	9.21

注：基本培养基为 MS

1.2.3 附加 AgNO₃ 对芽分化的影响

分化培养基中分别附加 0、2、4、6、8、10、12 mg/L 的 AgNO₃，取培养 5~7 d 的花椰菜基生叶片为外植体进行芽分化的诱导，培养条件同 1.2.1。25 d 后统计再生芽数。

1.2.4 诱导生根

将叶片产生的芽接种在 1/2 MS+0.2 mg/L NAA 培养基中诱导生根。培养条件同 1.2.1。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对花椰菜基生叶片芽分化的影响

由表 1 可以看出：经过消毒的叶片接种在 3 mg/L 6-BA 与 0.2 mg/L NAA 的培养基中，不定芽的分化率和平均每个外植体的产芽数较高，分别为 95% 和 10.34。由表 1 还可看出，NAA 在适宜质量浓度下对花椰菜叶片不定芽的分化有促进作用，比单独使用 6-BA 的效果好。

2.2 AgNO₃ 质量浓度对叶片不定芽分化的影响

试验发现，以叶片为外植体在培养基中添加不同质量浓度的 AgNO₃ 后，各处理的不定芽分化率虽较对照有提高，但均不明显，说明 AgNO₃ 对以花椰菜基生叶片为外植体诱导再生芽的效果不显著。当 AgNO₃ 为 6 mg/L 时，叶片不定芽的分化率和平均每个外植体产芽数最高（表 2）。而 AgNO₃ 质量浓度过高，虽对不定芽分化率的影响不大，但产生的不定芽数却有所降低。

表 2 AgNO₃ 浓度对花椰菜叶片不定芽分化的影响

AgNO ₃ 质量浓度/mg · L ⁻¹	接种外植体数/个	分化外植体数/个	不定芽分化率/%	平均每个外植体产芽数/个
0	30	24	80.0	5.9
2	30	25	83.3	7.3
4	30	21	70.0	4.9
6	30	27	90.0	8.3
8	30	26	86.7	7.5
10	30	23	76.7	8.9
12	30	24	80.0	6.3

注: 培养基中含 NAA 1.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L

2.3 移栽试验

将诱导出的生根小苗进行移栽试验。移栽前应先打开瓶盖炼苗 2~3 d, 然后取出小苗洗净粘附的琼脂, 再用 0.2% 甲基托布津浸泡 20 min, 之后种植在经过消毒的不同基质中, 要求空气湿度为 70%~80%, 20 d 后统计小苗成活率。移栽试验表明 (表 3): 在草炭土+蛭石 (1:1) 的栽培基质中, 花椰菜组培苗生长良好, 移栽成活率达 77%, 是较理想的移栽基质。

表 3 不同基质对花椰菜叶片移栽成活的影响

基质	移栽株数/个	成活株数/个	移栽成活率/%
珍珠岩	30	13	43
蛭石	30	16	53
草炭	30	20	67
蛭石+草炭土 (1:1)	30	23	77

3 讨论

建立高效稳定的植物组织和细胞培养的植株再生系统是利用农杆菌介导转化法进行植物转基因的重要前提。植物材料的取材时间、取材部位、培养基中激素组成及其质量浓度均可能影响外植体的芽分化频率。本研究通过对这些因素的探讨, 获得了花椰菜叶片离体培养芽的高效再生法, 使芽分化率达 93.33%。一般认为: 细胞分裂素有利于芽的分化, 生长素有利于根的分化和愈伤组织的形成, 细胞分裂素与生长素的比值高则有利于芽的分化^[6]。植物细胞在离体培养过程中会产生大量乙烯, 尤其是在密闭的培养容器中。乙烯的大量累积会直接影响外植体的生长和芽的分化。AgNO₃ 对许多植物的形态发生有促进作用。Ag⁺作为一种乙烯抑制剂并不是直接抑制乙烯的合成, 而是通过促进多胺的合成来提高体细胞胚胎和芽的发生频率^[7]。据报道, 在用外植体诱导不定芽的培养基中添加适量的 AgNO₃ 可显著提高芸薹属植物离体培养条件下芽的再生频率^[8-9]。本研究结果表明, 添加 6.0 mg/L 的 AgNO₃ 可显著提高花椰菜叶片不定芽的分化率和平均每个外植体的产芽数。

参考文献:

[1] 陈晓邦, 华学军, 黄其满, 等. 农杆菌介导的 intron-Gus 嵌合基因转入花椰菜获得转基因植株[J]. 植物学通报, 1995 (12): 50-52.

[2] 程振东, 卫志明, 许智宏. 根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化及转基因植株的再生[J]. 植物学报, 1994, 36 (9): 657-663.

[3] 蔡小宁, 余建明. 建立青菜农杆菌介导法基因转化体系[J]. 江苏农业学报, 1997, 13 (2): 110-114.

[4] 程振东, 卫志明, 许智宏, 等. 芸薹属作物的遗传转化[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28 (3): 161-164.

[5] 华学军, 陈晓邦, 范云六. Bacillus thuringiensis 杀虫基因在花椰菜愈伤组织中的整合与表达[J]. 中国农业科学, 1992, 25 (4): 82-87.

[6] 夏小婵, 李素文, 张宝珍, 等. 花椰菜组织培养获得再生植株[J]. 天津农业科学, 1995, 1 (2): 22.

[7] 孙月芳, 黄剑华, 陆瑞菊, 等. 叶用莴苣高频再生体系建立[J]. 上海农业学报, 1998, 14 (3): 17-20.

[8] 石淑稳, 周永明, 王新发. 影响油菜子叶外植体不定芽高频再生因素[J]. 西北植物学报, 1998, 18 (4): 477-482.

[9] 张松, 魏疏棠, 温孚江, 等. 利用乙烯抑制剂 AgNO₃ 建立大白菜高频植株再生体系[J]. 园艺学报, 1997, 24 (1): 94-96.