

芸薹属植物器官离体再生影响因素研究进展

刘乐承 (长江大学园艺园林学院, 湖北 荆州 434025)

白远国 (荆州职业技术学院生物工程系, 湖北 荆州 434023)

[摘要] 组织培养技术对于芸薹属植物育种材料的保存与繁殖以及遗传改良有着十分重要的意义。自 20 世纪 70 年代开始以来, 芸薹属植物组织培养研究取得了长足的进展。就基因型、外植体、接种方法和培养基等影响芸薹属植物器官离体再生因素的研究进展进行了综述。

[关键词] 芸薹属; 组织培养; 器官; 离体; 再生

[中图分类号] Q813.1; S634.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-1409(2006)01-0175-04

植物组织培养的主要目的是建立高频再生体系, 获得最大的繁殖系数。植物组织培养技术对于一些具有重要价值的植物育种材料的保存与繁殖, 发挥着无可取代的作用; 通过组织培养技术转基因导入外源目的基因又是植物遗传改良的一种有效手段。因此高频再生体系的建立具有重要意义。自 20 世纪 70 年代以来, 芸薹属(*Brassica*)植物的组织培养研究取得了长足的进展, 在甘蓝型油菜、芥菜、甘蓝、花椰菜等一系列物种上都建立了较好的再生系统。笔者对影响芸薹属植物器官离体再生因素的研究进展作一综述。

1 基因型

许多研究表明, 不同基因型的植物其再生频率有显著的差异。Yuji 等^[1]研究了 100 个甘蓝型油菜品种子叶外植体对芽再生的影响, 发现其再生频率与基因型密切相关, 不同基因型子叶外植体不定芽再生频率变化为 0% ~ 97%。Zhang 等^[2]对 123 个大白菜品种进行了比较, 除 8 个品种未能得到再生植株外, 其余 115 个品种都能以不定芽发生的方式再生植株, 再生频率为 2.5% ~ 95% 不等。甘蓝及其变种(*B. oleracea*)较白菜(*B. campestris*)容易再生得多^[3~6]。属于白菜类的菜心(*B. campestris* var. *parachinensis*)的芽再生频率低, 易在愈伤组织上先形成根, 而抑制芽的形成^[7]。Murata 等^[4]的研究表明, 调控芽形成的基因可能位于 C 基因组。因此, 具有 C 基因组的甘蓝和花椰菜等容易再生, 而缺少 C 基因组的大白菜等(具 AA 基因组)则困难得多。因此, 目前一般认为基因组类型为 AA 的白菜类蔬菜要比基因组类型为 CC 的甘蓝类蔬菜难于再生。

2 外植体类型

外植体类型对于器官再生频率有直接影响。在芸薹属植物上采用的外植体主要有真叶、生长点、子叶、带柄子叶、下胚轴切断及各种花相关组织等材料^[8~14]。目前芸薹属植物离体培养中常用的外植体有无菌苗的子叶、下胚轴、根段以及大田植株的花茎切段等; 而其中最广泛采用的是无菌种子苗的子叶—子叶柄^[15~17], 利用这一部分组织相对容易获得较高的再生频率, 很可能是由于这一部分外植体包含分化能力较强的原生细胞和子叶块营养^[12]。一般下胚轴的上部再生出芽的能力强, 而下部再生能力弱。埃塞俄比亚芥菜下胚轴上部切段较下部切段早分化芽, 芽再生率为 40.4%, 而下部切段仅为 11.3%。张松等^[6]在大白菜上也得出类似的结论, 叶片的不同部位再生能力不一样, 而无子叶柄的比有子叶柄的子叶再生要

[收稿日期] 2006-02-14

[第一作者简介] 刘乐承(1964-), 男, 湖北洪湖市人, 浙江大学在读博士生, 长江大学园艺园林学院副教授。

困难的多。尽管大白菜子叶和胚轴均能诱导愈伤组织,但胚轴的愈伤组织较小、生长缓慢,诱导频率也低于子叶,真叶不易进行分化和脱分化。虽然子叶等外植体具有简便、快速等优点,但其再生植株易为嵌合体,基因型也可能是杂合的。

3 外植体苗龄与极性

3.1 外植体苗龄

以无菌苗的子叶和下胚轴等为外植体时,苗龄显著影响芽再生频率,最常用的苗龄为4~7 d。菜心等发芽迅速,大约在播后第3 d子叶已平展,多用4~5 d龄苗^[14];甘蓝和花椰菜等发芽则慢得多,在第5 d子叶才能充分展开,多采用6~7 d龄苗。卫志明等^[18]以甘蓝为材料发现,尽管苗龄相差非常小,但对下胚轴芽分化频率影响非常大,苗龄为5 d时,再生频率仅18.07%,6 d时则为64.52%。王艳等发现苗龄是影响甘蓝型油菜带柄子叶再生频率的一个因素,选取低龄幼苗的带柄子叶可在一定程度上提高再生频率^[16]。

3.2 外植体极性

研究表明,以下胚轴和花茎为外植体时,极性是影响芽再生的重要因素^[19]。一般认为,近根端容易产生根,远根端容易产生芽。在花椰菜上也发现,下胚轴远根端容易直接产生芽,而且芽的数量多;近根端再生芽则较困难,且多产生在愈伤组织上。但也有不同的结论,如李树贤等^[20]在结球甘蓝上发现,下胚轴不定芽的发生没有明显极性。

4 接种方法

许多研究表明,插植较平放芽再生率要高得多^[5,21]。菜心子叶柄插入培养基2 mm,芽再生率可达89%,而平放仅为46%。插植的方向对芽再生也有显著影响。外植体插植使子叶柄充分接触培养基,有利于芽的再生。而平放的外植体常常因膨大卷曲而不能充分接触培养基,出现玻璃化而逐渐褐化死亡。张松等^[6]在对大白菜的研究中发现,叶片的放置方式对于愈伤组织的诱导影响不大,但对根和芽分化的作用显著。花椰菜下胚轴倒插较正插容易再生芽。

5 培养基

5.1 激素类型及浓度

(1)激素类型 激素是影响植株再生的决定性因素,因而寻求适当的激素配比是提高芽再生频率的重要途径。不同作物类型、品种以及外植体对激素组成的要求有较大差异。在芸薹属植物组织培养中,BA、CPPU、TDZ、NAA、KT和2,4-D等都有应用。BA是芸薹属植物转化中最常用的一种激素,以花椰菜、结球甘蓝等子叶为外植体时,单独使用的质量浓度以4~5 mg·L⁻¹为宜,与其他激素相结合时其质量浓度则应适当减小。对大白菜外植体的分化,不同种类的细胞分裂素的作用有明显差异,6-BA的效果显著优于KT和TDZ^[15]。甘蓝型油菜912品系带柄子叶在含1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D的MS培养基上预培养3 d,可使其分化频率提高30%^[16]。脱落酸(ABA)是组织培养中很少使用的一种激素,但是张鹏等^[5]发现,低浓度的脱落酸与AgNO₃配合有促进菜心不定芽分化的作用。白菜上也有类似报道。ABA的作用需进一步深入研究。

(2)激素配比 在芸薹属植物组织培养中,不同激素的配比及其使用浓度,在不同的报道中并不完全一致。目前报道中使用的最多的组合是BA+NAA,但浓度因基因型的不同而不同^[22~24]。一般认为,BA和NAA结合使用优于单独使用的效果。张鹏等在进行菜心离体植株再生频率研究时发现,培养基中仅含BA或者NAA时,植株再生频率仅为7.8%和5.5%,两者同时使用再生频率提高4倍,且BA 2 mg·L⁻¹+NAA 1 mg·L⁻¹为最佳激素配比^[5]。同时发现,培养基中附加4 mg·L⁻¹ AgNO₃和0.5 mg·L⁻¹ ABA时‘49-19’菜心再生频率高达89%,比单独附加AgNO₃或ABA都要高。相应的组织学

研究表明,这一培养条件下愈伤组织的生长受到抑制,同时促进分生细胞团分裂,直接形成不定芽。王艳等发现 $6\text{-BA } 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导分化培养基中,最有利于甘蓝型油菜 912 品系的芽苗再生,再生频率可达 70%^[16]。

5.2 碳源

糖类作为碳源是组织培养过程中不可缺少的一种营养成分,也是影响组织培养是否成功的关键之一。至今已有 50 多种糖类被用于组织培养中,其中蔗糖是最主要和常用的碳源之一^[25,26]。但由于蔗糖的快速代谢,引起细胞组织缺氧和酒精积累,在一些植物的组织培养中,常用别的糖类来代替蔗糖^[27]。蔗糖的浓度对于组织培养也很重要,适当地浓度对于维持培养基渗透势,提高再生频率具有重要意义。有报道称提高蔗糖浓度还能减少组培中的玻璃化现象^[28]。

5.3 硝酸银

Chi 等^[29,30]首先发现培养基中添加 AgNO_3 显著促进大白菜、白菜和菜心的子叶再生成芽。张鹏等^[31]报道,添加 $4 \sim 8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AgNO_3 能显著地促进菜心再生芽的分化。唐桂香等^[32]在甘蓝型油菜的再生研究中也得出同样的结果。余小林等^[14]发现 AgNO_3 除了能提高不定芽的诱导率外,还能克服褐化和玻璃化等组织培养中常见问题。于占东等在大白菜子叶离体培养中,采用添加 AgNO_3 的处理,也显著提高了大白菜子叶诱导不定芽发生频率^[15]。 AgNO_3 的作用机制尚未完全清楚。目前一般认为 Ag^+ 是较好的乙烯活性抑制剂,能竞争性地作用于乙烯作用部位,防止外植体产生过多的乙烯对植株再生的抑制。另外一种可能是, Ag^+ 与乙烯及多胺的生物合成代谢有密切关系。与乙烯的抑制作用相反,多胺促进器官的发生,因此很有可能是由于 Ag^+ 的存在,使得乙烯不能干扰多胺的合成,从而促进体细胞胚胎和芽发生的频率^[31]。但 Ag^+ 的浓度过高则又会抑制器官的发生或产生畸形苗,这可能是因为 Ag^+ 是重金属离子,浓度过高对植物体产生了毒害。

5.4 琼脂

琼脂是植物组培中常用的一种中性支撑物。作为培养基的主要凝固剂,琼脂浓度过高,反而会大大降低试管苗的繁殖系数,且生长缓慢^[33]。张凤兰等^[13]采用不同琼脂浓度的培养基处理大白菜子叶外植体,发现琼脂浓度对大白菜不定芽再生的影响很大,琼脂浓度为 1.2% 和 1.6% 的处理,不定芽再生率和不定芽数都高于 0.8% 的处理,并且不定芽的分化早。特别是再生率较低的‘夏宝’品种,在高浓度琼脂的再生培养基上不定芽再生率提高了 2 ~ 3 倍。Peng 等^[34]也曾报道甘蓝型油菜小孢子培养来源的不定胚在再生培养基琼脂浓度较高时表现较高的植株再生率,并认为是由于培养基的水分状况(水势)不同所致。于占东等发现一定范围内提高琼脂浓度,可减少大白菜再生过程中玻璃化苗的形成^[15]。

【参考文献】

- [1] Yuji O, Yoshihito T, Norihiko K. Effects of genotype on shoot regeneration from cytoledonary explants of rapeseed (*Brassica napus* L.)[J]. Plant Cell Rep, 1994, 14:13~17.
- [2] Zhang F L, Takahata Y, Xu J B. Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cytoledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) [J]. Plant Cell Rep, 1998, 17:780~786.
- [3] 石淑稳,周永明,王新发. 影响油菜子叶外植体不定芽高频率再生的因素[J]. 西北植物学报, 1998, 18(1):477~482.
- [4] Murata M, Orton T J. Callus initiation and regeneration capacities in *Brassica* species[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1987, 11:111~123.
- [5] 张 鹏,凌定厚. 提高菜心离体植株再生频率的研究[J]. 植物学报, 1995, 37(11):902~908.
- [6] 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, 32(1):78~80.
- [7] 李开莲,李耿光,张兰英. 菜心愈伤组织的诱导与植株再生[J]. 中国科学院华南植物研究所集刊, 1990, (6):81~86.
- [8] 成细华,戴大鹏. 大白菜真叶的组织培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(4):310~311.
- [9] 廖飞雄,潘瑞帆,何小明. 菜薹茎尖培养中的激素与热激调控[J]. 园艺学报, 2003, 30(2):224~226.
- [10] 侯喜林,曹寿椿. 不结球白菜子叶离体培养再生植株[J]. 南京农业大学学报, 1994, 17(3):60~64.
- [11] 许本波,张学昆,殷家明,等. 培养条件对甘蓝型黄籽油菜下胚轴的再生影响[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(4):23~26.
- [12] 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, 27(6):452~454.
- [13] 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.
- [14] 余小林,曹家树,徐淑英. 改良菜心离体培养植株再生体系的研究[J]. 实验生物学报, 2001, 34(2):158~162.
- [15] 于占东,何启伟,牟晋华,等. 大白菜组织培养与植株再生研究[J]. 吉林农业大学学报, 2005, 27(4):391~395.

- [16]王 艳,贺 宾,曾幼玲,等.甘蓝型油菜带柄子叶高频率再生植株的研究[J].中国油料作物学报,2004,26(4):68~90.
- [17]沈 颖,徐 程,张 铭.抱子甘蓝组织培养及人工种子研究[J].中国蔬菜,2005,(7):12~14.
- [18]卫志明,黄健秋,徐淑平,等.甘蓝下胚轴的高效再生和农杆菌介导 Br 基因转化甘蓝[J].上海农业学报,1998,14(2):11~18.
- [19]金 波,王纪方,贾春兰.甘蓝花茎培养的研究[J].园艺学报,1982,9(1):53~57.
- [20]李树贤,陈远英.结球甘蓝离体下胚轴愈伤组织的维管组织及管状分子[J].西北植物学报,1994,14(1):19~23.
- [21]蓝海燕,陈正华.农杆菌介导的芸薹属植物遗传转化技术的研究进展[J].生物技术通报,1999,(3):15~18.
- [22]Jun S I, Kwon S Y, Paek K Y. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of fertile transgenic plants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'spring flavor')[J]. Plant Cell Rep, 1995, 14:620~625.
- [23]Lim H T, You Y S, Park E J, et al. High plant regeneration, genetic stability of regeneration, and genetic transformation of herbicide resistant gene (bar) in Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*)[J]. Acta Hort,1998,459,199~208.
- [24]Xiang Y, Wong W K R, Ma M C. Agrobacterium-mediated transformation of *Brassica campestris* ssp. *parachinensis* with synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1Ab and cry1Ac genes[J]. Plant Cell Rep, 2000, 19:251~256.
- [25]Peterson K, Hansen J, Krogstrup P. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus*[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1999, 58:189~197.
- [26]Fuentes S L, Calheiros M P, Manetti-Filho J, et al. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2000, 60:5~13.
- [27]Ramarosandratana A, Harvengt L, Bouvet A, et al. Effects of carbohydrate sources, polyethylene glycol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos[J]. *In vitro* Cell Dev Biol Plant, 2001, 37:29~34.
- [28]陈国菊,雷建军.芥菜试管苗玻璃化的控制[J].西南农业大学学报,1992,14(3):253~256.
- [29]Chi G L, Barfield D G, Sim G E. Effect of AgNO₃ and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotype[J]. Plant Cell Rep, 1990, 9:195~198.
- [30]Chi G L, Pua E C, Goh C J. Role of ethylene on de novo shoot regeneration from cotyledon explants of *Bassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson *in vitro*[J]. Plant Physiol, 1991, 96:170.
- [31]张 鹏,傅爱根,王爱国. AgNO₃在植物离体培养中的作用及可能的机制[J].植物生理学通讯,1997,33(5):376~379.
- [32]唐桂香,周伟军. AgNO₃对甘蓝型油菜子叶外植体植株再生的影响[J].中国油料作物学报,2001,23(3):9~11.
- [33]丰 峰.试管苗玻璃化现象的研究进展[J].北方园艺,2003(3):71~73.
- [34]Peng S H, Takahata Y, Hara M, et al. Effects of the matrix potential of culture medium on plant regeneration of embryo derived from microspore of *Bassica napus*[J]. J SHITA, 1994, 7:114~150.

(上接第 170 页)

[参考文献]

- [1]谭北平.太湖沙塘鳢生长与摄食习性的初步研究[J].湖北农学院学报,1996,16(1):31~37.
- [2]朱邦科,谢从新.保安湖沙塘鳢的食性、繁殖、年龄及生长的研究[J].水生生物学报,1999, 23(4):316~323.
- [3]杨长根.沙塘鳢人工繁殖与苗种培育实验[J].淡水渔业,2003, 33(3):51~52.
- [4]王洪道,寒鸿身.中国湖泊资源[M].北京:科学出版社,1989. 201.
- [5]孙幅英,郭学彦.太湖河川沙塘鳢的生物学研究[J].水产学报,1996, 20(3):194~201.
- [6]王 波,刘世禄,张锡烈.美国红鱼形态和生长参数的研究[J].海洋水产研究,2002, 23(1):47~53.
- [7]张邦杰.珠江口红拟石首鱼的池养生长与饲养[J].热带海洋,2000. 19(1):90~96.
- [8]郑忠明,倪海儿.东海半滑舌鲷的生长与形态参数研究[J].宁波大学学报(理工版),2006, 13(2):21~24.