

15~20 kg 沙土均匀撒施,撒施后应适当浇水以保持土表湿润。

2.9 韭蛆

可采用常规药剂随大水漫灌的方法防治,该法操作简单、用药方便,适用于中小棚种植模式的韭菜,一般用药量为 500~1 000 ml/667 m²。

也可用 48%乐斯本乳油 200~250 ml 对水 200 kg,浇灌韭菜根部;或用 48%乐斯本乳油 200~250 ml,拌干细土 15~20 kg 埋施防治根蛆、蛴螬、金针虫等地下害虫,持效期 2~3 个月。

3 注意事项

①收获前 7 日停止使用。

②瓜类蔬菜,特别是大棚内瓜类蔬菜以及莴苣苗期对乐斯本较敏感,请慎用。防治地下害虫时,应在瓜苗移栽前或瓜蔓长至 1 m 长后用药。在叶菜上最高用药量每次不应超过 75 ml/667 m²。

③不能与碱性农药混用;对蜜蜂和鱼类高毒,使用时要注意避开花期施药;喷雾器用完后要立即冲洗干净。

萝卜组织培养的研究与应用

熊秋芳 张雪清 骆海波 王小红 胡侦华

摘要 对萝卜组织培养的研究与应用进行了综述。萝卜的组织培养的研究主要应用于快速繁殖和遗传育种,萝卜的花药培养和小孢子培养已经获得了再生植株,并展望萝卜组织培养的研究前景。

关键词 萝卜 组织培养 综述

Progress of Tissue Culture in Radish and its Application

Xiong Qiufang, Zhang Xueqing, Luo Haibo, Wang Xiaohong, Hu Zhenhua

Abstract The study and application of radish tissue culture are reviewed. The tissue culture of radish was mainly applied to the high-speed propagation and genetic breeding. The regenerated plant were obtained through anther culture and microspore culture. The prospect is discussed.

Key words Radish, Tissue culture, Review

萝卜的组织培养始于 20 世纪 80 年代,1980 年祝仲纯成功地从萝卜的下胚轴诱导植株。以后,一些国内外学者采用萝卜的带柄子叶、子叶、下胚轴、花药、小孢子等进行培养,均取得了一定的成绩。本文就萝卜组织培养的研究与应用进行简要综述。

1 萝卜组织培养的方法

与大多数植物相比,萝卜的再生能力较弱,不容易通过愈伤组织途径形成再生植株。在萝卜的组织培养中,通常是将外植体直接诱导产生不定芽,再分化成完整的植株。萝卜能诱导产生不定芽的外植体有顶芽、子叶、腋芽、下胚轴、带芽茎段等,用这些外植体进行培养的方法基本相同,即首先在附加

细胞分裂素的培养基上诱导不定芽,然后不定芽伸长,生根形成完整的植株。

1.1 诱导不定芽

萝卜诱导不定芽的程序为:无菌苗的获得→诱导芽分化和增殖→诱导生根→移栽。

①无菌苗的获得 萝卜种子 25℃浸泡 6 h→70%酒精灭菌 30 s→0.1%升汞浸泡 8 min,无菌水洗涤 4~5 次→接种在不含糖的 1/2MS 或无激素的培养基上,在 25℃培养(12 h 光照/12 h 黑暗的光周期,光照强度为 1 600~2 000 lx)。

②诱导芽分化和增殖 将无菌种子苗的下胚轴、顶芽、子叶等接种于诱导培养基上,进行光照培养。光周期、光照强度以及培养温度与种子无菌发芽的相同,诱导的不定芽生长至 1~2 cm 时切下,接种在生根培养基上。

诱导生芽的培养基一般是在 MS 培养基中添加 BA 和 NAA,或者只添加 BA, AgNO₃, 武剑等用萝卜

熊秋芳,武汉市蔬菜科学研究所,430065

张雪清,骆海波,王小红,胡侦华,武汉市蔬菜科学研究所

收稿日期:2005-11-14

带柄子叶作外植体进行培养时,认为 6-BA/NAA 比例较高有利于不定芽的分化,但不同基因型材料所需的最适 6-BA/NAA 不同,不定芽诱导在激素浓度为 4 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA 时可达到 81%。另外,诱导萝卜离体再生时培养基中 AgNO_3 的浓度可达到 9 mg/L。

③诱导生根 芽伸长至 1~2 cm 时,从基部切下来转移到生根培养基上诱导生根,形成完整的萝卜试管苗。武剑等将培养至 1~2 cm 的不定芽转入附加 1.0 mg/L NAA 的 MS 基本培养基的盐类+2 mg/L 肌醇+0.1 mg/L VB_1 +0.5 mg/L VB_6 +0.5 mg/L 烟酸+2%蔗糖+0.7%琼脂的培养基中,崔群香等认为品种和蔗糖浓度是影响外植体生根的最主要因素,其次是 BA 浓度、 AgNO_3 浓度、BA 和 NAA 浓度比。

④移栽 将生根的试管苗洗去培养基,移栽到消毒的营养土或蛭石中,温室内培养一段时间后转移至大田中生长。武剑等将生根小植株 20~25 天后移栽到蛭石:泥炭为 1:3 的基质中(未生根的不定苗用 200 mg/L 的 NAA 溶液浸泡 10 h),经过 14 天的炼苗,将再生植株移栽在大田中。

1.2 花药培养

由于单倍体植株对于育种实践以及遗传学、细胞生物学等基础的研究有着十分重要的意义。Guha 和 MAheshwari 发现并建立起来的植物花药培养技术自 20 世纪 60 年代以来取得了迅速的发展。蔬菜花药培养的研究主要集中于十字花科、茄科和葫芦科。十字花科蔬菜中的大白菜、甘蓝、花椰菜等均有报道,梅时勇等(2001 年)用萝卜的花药作外植体进行培养,成功的获得了再生的萝卜花粉植株。

①取材 取小孢子发育处于单核靠边期的花蕾,先用 70%的酒精处理 30 s,再用 0.1% HgCl_2 液消毒 10 min,然后用无菌水洗 3 次,再在无菌纸上剥取花蕾。

②诱导胚状体 将花药接种于改良的 Keller 培养基中,先置 35℃暗培养 24 h,再置 25℃暗培养至出现胚状体。

花药培养在 Keller+10%糖+0.8%琼脂的培养基中产生子叶型胚状体,放置 25℃光照条件下培养。梅时勇等以为不同品种的最适培养基有差异。

③胚状体的分化 梅时勇等将胚状体转绿后转入含有蔗糖 2%及 0.2 mg/L 6-BA 的 MS 培养基中诱导生芽,很快分化出植株,但多数则长成形状

各异的培养物,并逐渐在各不相同的部位形成不定芽,还有少数胚状体在生芽培养基中变黄,或虽然保持绿色但不产生不定芽。不定芽产生后可切下不定芽用生芽培养基继代培养。

④生根 切取无根植株转入 1/2MS+0.2 mg/L NAA 的生根培养基上,一周左右即可生根。梅时勇等用 MS+0.2 mg/L NAA+2%蔗糖培养基。

1.3 游离小孢子培养

自 1989 年 R. Lichter 报道了对萝卜游离小孢子培养的初步研究以来,国内外的一些学者对这方面的研究报道比较少。与其他十字花科蔬菜作物相比,萝卜的胚诱导率和植株再生率低,一些生产上有价值的材料培养难度大,严重阻碍了该技术的研究及其在生产上的应用。Yoshihito Takahara 等(1996 年)对 11 份萝卜材料进行了培养,其中 6 份材料获得了胚状体,部分形成再生植株。张丽(2004 年)以 20 个不同类型的萝卜品种为材料,对萝卜游离小孢子培养技术进行了初步研究,其中一份材料获得了胚状体。

萝卜游离小孢子培养的程序为:取材→灭菌→分离小孢子→植株再生→快繁→移栽。

①取材 用 DAPI 荧光染色法观察花蕾长与发育时期的关系,取单核靠边期的花蕾。

②灭菌 将花蕾先用 70%酒精消毒 30 s,再置于 0.1% HgCl_2 液消毒 10 min,无菌水清洗 3~4 次,每次 4~5 min。

③分离小孢子 将花蕾与 B5 培养基一起研磨、过滤,将滤液离心,下层培养物用 B5 混合,经三次重复,将收集到的小孢子加入 NLN-13, pH 5.8, 35℃暗培养 1~2 天,密度为 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 个/ml,再转入 25℃暗培养。待肉眼可见胚状体,置于摇床上,转速为 55 r/min,在 25℃振荡培养至形成子叶型胚。

④植株的再生 将子叶胚转入固体 B5 或 Ms 培养基培养,发育成正常的小孢子植株,切下顶芽、腋芽、叶片进行快繁。Yoshihito Takahara 和张丽将子叶胚转入 B5-2 固体培养基中生芽生根。

⑤移栽 将无菌苗移置通风处,炼苗 3~5 天,选择阴天或晴天的下午移栽,移栽前洗净根上附着的培养基,移栽后浇少量的定根水。

2 萝卜组织培养的应用

2.1 保存和增殖自交不亲和系

长期以来,萝卜一般采用常规的杂交方法育

种,但萝卜自交不亲和,需要采用劳动强度大的蕾期授粉及其他方法来保存自交不亲和的亲本系。组织培养是一条有效的保存和增殖自交不亲和系的途径。另外在萝卜杂交育种中,雄性不育系的选育是一个主要内容,选出的不育系有时不能立即用于配置杂种,对这样的材料可采用组培的方法进行保存、繁殖。此外,选出雄性不育株后,可通过组培快繁的方法迅速扩大不育株数量,为不育性的转育提供材料。

2.2 单倍体育种

单倍体植物虽然高度不育,生长衰弱,没有多大的价值,但是通过自然加倍或用人工方法使单倍体植物的染色体加倍,即可获得完全纯合的二倍体。

目前杂种一代的利用已成为萝卜育种的重要手段,如果采用传统的育种方法筛选亲本自交系,要经过多年多代自交分离才能获得,使得育种周期长、效率低、选育效果差,而采用花药培养和游离小孢子培养可获得单倍体植株,加倍后能够得到纯合的自交系,不仅大大缩短了育种进程,而且提高了所需基因组合的选择效率,因此,花药培养和小孢子培养技术受到国内外遗传育种学家的高度重视。

2.3 萝卜基因工程、遗传转化的研究

花药培养和游离小孢子培养所得的胚状体可以作为理想的转基因受体,用于植物基因工程外源基因的导入。根癌农杆菌 Ti 质粒介导的遗传转化方法是目前研究最多、技术最成熟、应用最广泛的一种基因转化途径。其转化植物细胞的基本程序:首先是农杆菌附着到植物伤口组织上,通过两者间的相互作用,农杆菌形成纤维小纤丝将其“固定”在植物细胞壁上,同时受伤的植物组织释放的酚类化合物诱导 Ti 质粒 Vir 区基因的表达,然后将 T-DNA 转移到伤口组织的细胞中。

Rs2AFPs 是 Terras 等从萝卜中分离的一类 5.5 KD 富含半胱氨酸的抗真菌蛋白质,邓晓东等将萝卜抗真菌蛋白基因 Rs2AFPs 导入大肠杆菌中表达,以获得具有抑菌活性的表达产物,并通过构建植物表达载体,将 Rs2AFPs 基因导入番茄中,获得抗病番茄材料。王玲平等利用 RT-PCR 和 5'3'RACE 相结合的方法在圆白萝卜中克隆了一个 CYP450 基因的 CDNA 全长序列,并对它进行了序列分析,为 CYP450 基因的分离克隆及其在植物发育代谢中的

功能研究提供一定的信息。

3 展望

植物组织培养过程中会出现体细胞无性系变异,其变异频率远高于自然突变,这些变异给蔬菜品种改良提供了丰富的育种资源,采用单倍体培养的突变能够创造许多抗病、耐盐、抗旱、抗虫的优良种质资源;花药培养和游离小孢子培养建立的双单倍体群体具有遗传上的纯合基因组,是 RFLP、RADP、SSR、SCAR 等分子标记和基因图谱的理想材料。

参考文献

- [1] 王得元,何晓明,王鸣.蔬菜生物技术概论.北京:中国农业出版社,2002
- [2] 祝仲纯,吴海珊.从萝卜的下胚轴诱导植株成功.遗传,1980,2(3):36
- [3] Won J. Somatic embryogenesis and regeneration in tissue cultures of radish(*Raphanus sativus* L.). Plant Cell Report, 1995(4):648-651
- [4] Pua-Engchong. Synergistic effect of ethylene inhibitors and putrescine on shoot regeneration from hypocotyls explants of Chinese radish(*Raphanus sativus* L. var. *longipinnature* Bailey)in vitro. Plant Cell Report, 1996, 15(9): 685-690
- [5] 崔群香.萝卜离体再生体系的建立[学位论文].南京:南京农业大学,1999
- [6] 武剑,龚义勤,邓波,等.萝卜离体再生的影响因素.中国蔬菜,2003(6):6-8
- [7] 崔群香,汪隆植,娄平,等.从萝卜下胚轴再生完整植株.南京农专学报,1999
- [8] 梅时勇,杨保国,姚芳,等.萝卜花药培养实验.中国蔬菜,2002(1):35-36
- [9] 武剑,龚义勤,邓波,等.萝卜雄性不育组织培养的研究.贵州农业科学,2003,31(5):8-11
- [10] 邓小东,费小文,胡新文.萝卜抗真菌蛋白基因 Rs2AFPs 在大肠杆菌中的表达及其转化番茄的研究.园艺学报,2001,28(4):361-363
- [11] 王玲平,曹家树,等.萝卜 RsCYP86MF 基因 CDNA 全序列克隆及结构特征分析.园艺学报,2005,32(1):127-130
- [12] 张丽.萝卜游离小孢子培养技术初探.园艺学报,2004,31(5):676-678
- [13] Liehter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicacege. Plant Breeding, 1989(103):119-123
- [14] 李靖,李焕秀,李敏,等.蔬菜花药培养研究进展.中国蔬菜,2005(6):36-39