

都儿菜组织培养及快速繁殖的研究

宁国男¹ 丁丹¹ 马微娜¹ 杨增美² 姜长阳^{1*}

(1 辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029; 2 辽宁师范大学物理与电子技术学院, 辽宁大连 116029)

摘要: 本试验以都儿菜的嫩茎为材料, 对愈伤组织的诱导、不定芽的分化、不定芽的分化继代培养、试管苗的生根、试管苗移栽所需要的条件进行了研究, 建立起都儿菜嫩茎的愈伤组织培养及快速繁殖技术体系。结果表明: MS + BA0. 5mg. L⁻¹ + 2, 4 - D1. 4mg. L⁻¹ 为诱导都儿菜嫩茎愈伤组织的理想培养基; MS + BA0. 5mg. L⁻¹ 是都儿菜愈伤组织和不定芽分化的理想培养基; 1/2MS + IAA0. 5mg. L⁻¹ 是都儿菜不定芽生根的理想培养基; 与实生苗相比, 定植于田间的试管苗生长旺盛, 肉质茎单位面积产量提高 14%, 单株增产 24%。

关键词: 都儿菜; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 1007-7731(2007)18-80-03

Tissue culture and Rapid propagation of *Brassica oleracea*

Ning Guo - Nan¹ DING Dan¹ MA Wei - Na¹ YANG Zeng - Mei² JIANG Chang - Yang¹ (1 College of Biology Scientific, Liaoning Normal University 2 College of physics and electric technology, Liaoning Normal University Dalian 116029 China)

Abstract: Using the *Brassica oleracea* tender stems as explant, tissue culture and rapid propagation of *Brassica oleracea* were established in order to study the different conditions of callus induction, bud differentiation, rooting, and transplantation of seedlings. The results showed that the medium MS + BA0. 5mg. L⁻¹ + 2, 4 - D1. 4mg. L⁻¹ was the best for inducing callus from stem, medium MS + BA0. 5mg L⁻¹ was the most suitable for bud differentiation, medium 1/2MS + IAA0. 5mg L⁻¹ was the optimum for rooting. The transplanted plantlets in the field grew vigorously by nursling plantlets effectively indoors, and the gain yield per unit area of fleshy stem could be up to 14% and the increment of 24% per plantlets was achieved.

Key words: *Brassica oleracea*; Tissue culture; Rapid propagation

都儿菜 (*Brassica oleracea*) 为十字花科芸薹属榨菜中的优良新品种, 多分布于地中海地区, 在我国华北及其以南地区也有广泛种植, 具有长势旺、耐寒力强、可剪率高、成熟后不抽苔、品质好等特点。都儿菜可作为蔬菜食用, 煮、炒、拌、腌皆可, 其肉白嫩, 质脆, 口感好, 品质佳, 市场销路好。都儿菜因为具有上述特点, 近年来在辽西南部地区也多有引种。但是, 由于气候等环境条件的影响, 在此地种植的都儿菜难以获得种子, 即使获得, 也存在着种子发芽时间较长, 幼苗生长速度慢, 实生苗由于分离作用生长参差不齐等问题。为此, 我们对都儿菜进行了组织培养及快速繁殖的研究。

1 材料与方法

1.1 材料及灭菌 在田间采集生长旺盛的都儿菜植株, 将其嫩茎放到 500ml 的磨口广口瓶中, 自来水洗 5 次, 0. 005% 安利洗涤剂洗涤 10min, 再用自来水冲洗至没有泡沫时, 移至超净工作台上, 用无菌水洗涤 2 次, 倒入 75% 乙醇灭菌约 10s, 再用无菌水洗 2 次, 加入 0. 05% HgCl₂ 溶液振荡灭菌 11min 后, 接着用无菌水洗涤 5 次^[1], 即获得无菌材料。

1.2 培养条件 本试验所用的培养基以 MS 和 1/2MS 为基本培养基, 附加不同浓度的生长素和细胞分裂素, 以 MS 为基本培养基时, 加蔗糖 30g. L⁻¹, 以 1/2MS 为基本培养

基时, 加蔗糖 15g. L⁻¹; 培养基中琼脂含量为 5 g. L⁻¹; 陈力强度为 180g/cm²; pH5. 8, 培养温度为 18℃ - 26℃, 光照 12h/d, 光照度 2000lx; 生根培养的温度为 25℃, 光照 12h/d, 光照度 3000lx。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的获得 将无菌嫩茎切成 0. 3cm 左右的块状, 接种到以 MS 培养基为基本培养基, 附加不同浓度的 BA、IAA、NAA 和 2, 4 - D 培养基上, 进行愈伤组织的诱导培养。25d 左右有的材料开始形成愈伤组织, 70d 观察统计发现, 在培养基中不加任何激素、只加入 BA、同时加入 BA 和 IAA, 不能诱导形成愈伤组织; 而不同浓度 BA 与不同浓度 NAA、2, 4 - D 配合使用时, 可以诱导形成愈伤组织, 但激素的浓度与种类不同, 愈伤组织的诱导率与长势不同。其中在 MS + BA0. 5mg. L⁻¹ + 2, 4 - D1. 4mg. L⁻¹ 这一培养基上, 不仅愈伤组织的诱导率达 95%, 而且生长速度快, 并且从外观上看, 在该培养基上诱导的愈伤组织呈浅绿色的颗粒状, 为具有分化能力的愈伤组织^[2,3]。把在这一培养基上所诱导的愈伤组织进行继代培养, 连续培养 6 代, 所培养的愈伤组织长势及形态仍然保持不变。上述说明, MS + BA0. 5mg. L⁻¹ + 2, 4 - D1. 4mg. L⁻¹ 这一培养基为诱导都儿菜嫩茎愈伤组织的理想培养基。

2.2 愈伤组织的分化 将在 MS + BA0. 5mg. L⁻¹ + 2, 4 -

D1. 4mg·L⁻¹这一培养基上诱导培养的浅绿色颗粒状愈伤组织,接种到以MS为基本培养基,附加不同浓度的BA和NAA的培养基上,进行愈伤组织的分化培养,接种后25d可见分化出不定芽点。80d后观察统计。由表2可见,在不加任何激素和只加NAA的培养基上,愈伤组织不分化,而不同浓度的BA单独使用、BA与NAA配合使用时,颗粒状愈伤组织可以分化,其中在MS+BA0.5mg·L⁻¹这一培养基上不仅分化率达98%,平均每个愈伤组织颗粒能分化出3-4个不定芽,而且不定芽长势较好。观察表明把颗粒状愈伤组织接种到这一培养基上培养30d时,大多数颗粒就分化出不定芽点,随后,伴随着不定芽点的不断生长,在首先分化的不定芽点的基部又会分化出一些不定芽,出现了由1个愈伤组织颗粒分化出几个不定芽的现象。当所分化的不定芽长到高1cm左右时,把分化的不定芽从基部切下,继续接种在MS+BA0.5mg·L⁻¹培养基上继代培养,45d左右在接种的每个不定芽基部又会分化5-7个高1cm以上不定芽。连续继代培养6代,分化率和长势保持不变。这说明MS+BA0.5mg·L⁻¹是都儿菜愈伤组织和不定芽分化的理想培养基。

表1 不同浓度激素对愈伤组织诱导的影响

BA (mg·L ⁻¹)	2,4-D (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)	IAA (mg·L ⁻¹)	接种数 (块)	诱导愈伤 组织数 (个)	愈伤组织 诱导率 (%)
0	0	0	0	40	0	0
0.5	0	0	0	40	0	0
0.5	0.7	0	0	40	33	82.5
0.5	1.4	0	0	40	38	95
0.5	0	0.7	0	40	29	72.5
0.5	0	1.4	0	40	26	65
0.5	0	0	0.7	40	0	0
0.5	0	0	1.4	40	0	0
1	0	0	0	40	0	0
1	0.7	0	0	40	31	77.5
1	1.4	0	0	40	32	80
1	0	0.7	0	40	19	47.5
1	0	1.4	0	40	20	50
1	0	0	0.7	40	0	0
1	0	0	1.4	40	0	0
1.5	0	0	0	40	0	0
1.5	0.7	0	0	40	29	72.5
1.5	1.4	0	0	40	33	82.5
1.5	0	0.7	0	40	17	42.5
1.5	0	1.4	0	40	20	50
1.5	0	0	0.7	40	0	0
1.5	0	0	1.4	40	0	0

表2 不同浓度激素对愈伤组织分化的影响

BA (mg/L)	NAA (mg/L)	接种数 (颗粒)	分化数 (个)	分化率 (%)	分化颗粒平 均诱导芽数	长势
0	0	50	0	0	0	
0	0.1	50	0	0	0	
0	0.5	50	0	0	0	
0	1.0	50	0	0	0	
0	1.5	50	0	0	0	
0.1	0	50	4	8	1	++
0.5	0	50	48	98	3.4	++
1.0	0	50	24	48	2.6	++
1.5	0	50	26	52	2.1	+
0.1	0.1	50	13	26	1	+
0.5	0.5	50	3	6	1	+
1.0	1.0	50	0	0	0	+
1.5	1.5	50	0	0	0	+

注:++为长势好;+为长势一般

2.3 生根培养 把上述分化的高1cm以上的不定芽从基部剪下,接种到以1/2MS为基本培养基,附加不同浓度的IAA或NAA的培养基上进行生根培养,培养25d时观察统计。由表3可见,将不定苗接种到未添加任何激素的1/2MS培养基上和加浓度超过NAA0.4mg·L⁻¹的NAA培养基上,不能诱导生根;将不定苗接种到添加浓度在0.1-0.3mg·L⁻¹NAA和0.1-0.5mg·L⁻¹IAA的培养基中,10d左右能够形成可见根原基,随后根系和植株迅速生长,当培养至25d时,整个培养基中布满细长的根系,其中,1/2MS+IAA0.5mg·L⁻¹培养基中的不仅生根率达到了100%、根系长势好,且植株可以长成高约5cm的生根试管苗。把生根试管苗剪成长约1cm、至少具有1个生长点的茎段,在1/2MS+IAA0.5mg·L⁻¹进行生根继代培养,不仅植株生长旺盛、几乎没有无效苗,而且25d的繁殖系数为3.6倍。因此证明,1/2MS+IAA0.5mg·L⁻¹是诱导都儿菜不定苗生根的理想培养基,并且在这一培养基上进行生根继代培养可以达到快速繁殖、建立无性系的目的。

表3 不同浓度生长素对生根的影响

BA (mg/L)	NAA (mg/L)	接种数 (颗粒)	生根株 数(株)	生根率 (%)	平均每株 生根条数 (条)	平均根长 (cm)	长势
0.0	0.0	40	0	0	0	0	
0.1	0.0	40	6	15	2.1	3.5	+
0.2	0.0	40	11	27.5	2.4	4.1	+
0.3	0.0	40	12	30	3.6	6.4	+
0.4	0.0	40	34	85	4.0	6.5	++
0.5	0.0	40	40	100	6.8	7.3	++
0.0	0.1	40	9	22.5	3.0	1.8	+
0.0	0.2	40	11	27.5	1.6	7.4	+
0.0	0.3	40	7	17.5	2.4	6.0	+
0.0	0.4	40	0	0	0	0	
0.0	0.5	40	0	0	0	0	

注:++长势较好;+长势一般;

2.4 试管苗的移栽 打开生根试管苗培养基的瓶塞,置于5000lx左右的光照下炼苗3d后,把试管苗从培养瓶中取出,洗净基部的培养基,将试管苗移栽到上面铺有5cm厚炉灰渣,河沙、园土及其1:1的混合基质温室苗床上,然后弥雾浇透水,保持湿度90%以上、温度在18℃-25℃、并防止直射光照的条件,10d后可见成活生长,25d时观察统计。由表4可见,在园土上移栽不能成活;在园土与河沙和炉灰渣的1:1配合基质上,移栽的成活率也较低;而在河沙、炉灰渣及二者1:1的混合基质上,试管苗不仅成活率较高,而且长势较好。这说明河沙、炉灰渣和二者1:1的混合基质是都儿菜试管苗移栽的理想基质。把在温室中移栽成活的试管苗移植到露地田间。小批量的田间证明,与同期播种的都儿菜实生苗相比,试管苗长势旺盛,尤其是生长后期,试管苗明显地出现了叶色绿、植株大、根系相当于实生苗约2倍的特点。肉质茎单位面积产量提高14%,单株增产24%。

3 讨论与结论

目前虽然国内外已多有十字花科芸薹属栽培植物组织培养的报道^[4-9], 并且也有榨菜组织培养及无性系建立的报道^[10,11], 但迄今未见都儿菜组织培养和快速繁殖的报道。本研究以都儿菜的嫩茎为材料, 不仅诱导形成愈伤组织、分化出不定芽, 而且完成了试管苗的生根及田间移植的研究, 建立起都儿菜的无性系。采用生根继代的方法对都儿菜的试管苗进行快速繁殖, 25 d 增殖 3.6 倍, 按照这个繁殖速度, 都儿菜的年增殖率为 3.614, 一年就能繁殖出上千万株试管苗, 完全可以达到快速繁殖的目的, 可满足人们对都儿菜种苗的需求。

表 4 不同栽培基质对移栽成活的影响

移栽基质	移栽株数 (株)	成活数 (株)	成活率 (%)	长势
河沙	30	27	90	++
炉灰渣	30	28	93	++
园土	30	0	0	
河沙 1: 炉灰渣 1	30	28	93	++
园土 1: 炉灰渣 1	30	3	10	+
园土 1: 河沙 1	30	5	17	+

注: ++ 为移栽苗长势良好, 植株健壮; + 为移栽苗长势一般

小批量的田间证明, 与同期播种的都儿菜实生苗相比, 试管苗形成了长势旺盛、肉质茎单位面积产量提高 14%、单株增重 24% 等特点, 一方面与选择了田间生长非常旺盛植株为材料有关; 另一方面与在培养中使用的生长素、定植后仍在发挥着一定的后效作用有关。

(上接 227 页) 地反映蚕茧质量, 茧级差也能拉得开 (实际上目前的仪评法考虑的是丝量多少, 丝质因素考虑较少)。但售茧高潮时, 农户多, 而仪评手续多, 速度慢, 蚕农待售时间长, 并要求蚕农先投售蚕茧后评定价格, 蚕农心中无数, 且评茧员在执行中易产生人情茧, 许多蚕农有看法。

3 对策

3.1 整顿蚕茧收购市场, 严肃国家蚕茧价格政策 切实做到优茧优价, 拉开优质茧与草笼茧的差价, 用经济杠杆鼓励优质茧生产。

3.2 实行标准化生产, 努力实现蚕桑生产规模化、集约化

制定一整套标准化生产和管理模式, 实行优质茧生产技术标准化, 操作方法标准化, 生产环境标准化, 从而达到蚕茧质量标准化, 开展试验示范, 取得成效加以推广普及, 逐步实现蚕桑产业由传统农业向现代农业的转变。以现有的蚕业协会为契机, 试验组合售茧, 为今后组合售茧摸索经验; 并为申报“太湖牌”优质蚕茧奠定基础。

3.3 创造性地开展蚕桑实用技术推广工作 推广部门和技术人员要以优质茧生产为己任, 深入蚕区农户, 了解存在问题, 分析原因, 并就地解决。发现好的典型, 应认真总结, 及时推广。普及省力化养蚕技术、方格簇营茧、自动上簇等实用技术, 节本增效; 让蚕农了解桑蚕的生理知识, 小

在本研究中, 利用嫩茎诱导的颗粒状愈伤组织可以分化出大量的不定芽, 这一技术也将为都儿菜基因转导、细胞遗传等相关研究提供重要的技术。

参考文献

- [1] 肖尊安主编. 植物生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社. 2005: 32-33
- [2] 安利佳, 姜长阳. 植物组织培养导论[M]. 大连: 辽宁师范大学出版社, 1996: 67-72
- [3] 胡尚连, 王丹. 植物生物技术[M]. 西安: 西安交通大学出版社, 2004: 35-40
- [4] 李明军, 陈明霞, 原连生, 原让龙. 大白菜的组织培养和植株再生[J]. 上海: 植物生理学通讯. 2001, 37(2): 137
- [5] 高翔, 罗鸿源. 芸苔丛生芽诱导和快速繁殖[J]. 上海: 植物生理学通讯. 1995, 31(6): 429
- [6] 李曙轩, 袁文达. 花椰菜组织培养形成植株[J]. 北京: 园艺学报. 1981, 8(3): 33-35
- [7] 吕德扬, 王超, 陈正华, 李文彬, 陈英. 芥菜型油菜原生质体植株的再生[J]. 北京: 植物学报. 1986, 28(5): 477-479
- [8] 张鹏, 陵定原. 提高菜心离体植株再生频率的研究[J]. 北京: 植物学报. 1995, 37(11): 902-908
- [9] 贾士荣, 杨美珠. 芸薹属作物组织培养与细胞融合[J]. 上海: 植物生理学通讯. 1988, 24(5): 7-22
- [10] 陈石头, 余小林, 曹家树, 吴剑丙. 榨菜子叶和带柄子叶再生植株的研究[J]. 杭州: 浙江农业大学学报. 2005, 17(1): 27-30
- [11] 余小林, 曹家树, 陈石头, 吴剑丙. 提高榨菜离体培养植株再生频率[J]. 上海: 细胞生物学杂志. 2004, 26(4): 39-443

(张琪琪编, 李小丽校)

蚕期贯彻桑叶保鲜保温保湿的三保技术, 推广防干纸育或塑料薄膜覆盖育。同时要注意大蚕期的通风换气排湿, 及时淘汰迟眠蚕、病蚕和发育迟缓的蚕。加强簇中温湿度管理, 适时开窗通风, 改善营茧环境。还要重视推广农民自己的成功经验, 让现身说法发挥作用, 加速方格簇营茧技术的推广。

3.4 减少行政干预, 充分发挥技术人员的聪明才智 遵循推广规律, 扎扎实实地搞好优质茧生产。

3.5 抓好新乡乡的蚕业生产协会的试点工作, 认真总结经验, 在全区主要蚕茧产区推广 在农民自觉自愿的基础上积极组建蚕业生产合作社, 形成经济利益共同体, 组织蚕农互相学习, 共同进步, 提高蚕桑生产技术水平。与此同时, 形成技术力量, 和势力较为强大的厂商博弈, 共同维护蚕农合法权益。积极扶持养蚕大户, 使其发挥科技示范带动作用, 从而提高蚕桑生产的规模化和集约化水平。

参考文献

- [1] 《养蚕学》. 上海科学技术出版社 1991 年版, 629-651
- [2] 郭光等. 《蚕业科技进步的迫切性与发展方向》《中国蚕业》2006(1): 690-62
- [3] 《中国蚕丝大全》. 四川科学技术出版社. 1996, 639-670
- [4] 方林儿等. 《实施桑蚕标准化生产技术成效显著》《中国蚕业》, 2006, (1): 60-62

(张琪琪编)