

## 芥蓝植株再生体系的优化

黄科<sup>1,2</sup>, 余小林<sup>1</sup>, 吴秋云<sup>2</sup>, 沈迎春<sup>1</sup>, 向珣<sup>1</sup>, 曹家树<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310029; <sup>2</sup>福建省农业科学院蔬菜研究中心, 福州 350013)

**摘要:** 采用正交设计方法对影响芥蓝植株再生体系的因素进行了优化研究, 结果表明: 影响芥蓝植株再生的最主要因素是外植体类型, 其次依次为 NAA, BAP, 蔗糖和 AgNO<sub>3</sub>。结果进一步显示, 最利于芥蓝再生植株的培养基条件为: MS+BAP 2 mg/L+NAA 0.03 mg/L+1%蔗糖+AgNO<sub>3</sub> 7.0 mg/L+0.8%琼脂, 最适宜的外植体类型为下胚轴, 植株再生频率高达 97.5%。

**关键词:** 芥蓝; *Brassica oleracea*; 再生体系; 正交设计

**中图分类号:** S635.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)03-313-04

芥蓝 (*Brassica oleracea* L. var. *alboglabra*) 属于十字花科芸薹属甘蓝类蔬菜, 原产我国南方, 栽培历史悠久, 是我国著名的特产蔬菜之一, 在广东、广西、福建等南方地区是一种很受喜爱的家常菜, 更是畅销东南亚及港澳地区的出口蔬菜。芥蓝在栽培过程中会受到病虫害和其他逆境的侵害, 给芥蓝的生产造成很大的损失。近年来, 随着生物技术的发展, 已经有可能采用遗传转化技术对芥蓝的性状进行人工改良, 而植物遗传转化技术的一个重要基础是建立高效的植株再生体系, 但芥蓝植株再生体系的建立一直未能取得很好的效果<sup>[1-5]</sup>, 其主要原因是影响再生的因素如基因型等在很大程度上制约了高效植株再生体系的建立。本文采用正交设计方法<sup>[6-8]</sup>, 系统地将影响植株再生体系建立的因素做最优化组合, 以便提供生产实际中应用性强的植株再生体系。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验材料

芥蓝 3 个品种“早花芥蓝”(*B. oleracea* L. var. *alboglabra* cv. *Zaohua*)、“中花芥蓝”(*B. oleracea* L. var. *alboglabra* cv. *Zhonghua*)、“迟花芥蓝”(*B. oleracea* L. var. *alboglabra* cv. *Chihua*)均购于广东省种子分公司。种子用 70% 的乙醇表面消毒 90 s, 然后用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 12 min, 再播种于发芽培养基 (MS 培养基) 上发芽, 以供外植体的取用。

#### 1.2 培养基组成和培养条件

实验中使用的的基本培养基均为 MS 加入 0.8% 琼

脂, 根据实验设计加入不同浓度的细胞分裂素 6-苄基氨基嘌呤(BAP)和生长素萘乙酸(NAA)等植物生长调节剂, 高压灭菌前 pH 值调至 5.8, 培养基分装于 100 mL 的三角瓶中, 121℃, 1.2~1.3 kg/cm<sup>2</sup> 压力条件下灭菌 20 min, 高压灭菌后添加 AgNO<sub>3</sub>, 然后分装于 11 cm 的培养皿。培养条件为(25±1)℃, 16 h 光照/8 h 黑暗的光周期, 25 μM/(cm<sup>2</sup>·s)的光密度。

#### 1.3 芽诱导和生根培养

用 7 天苗龄的无菌苗切取外植体, 分别取不同类型外植体植于不同的培养基上进行芽的诱导。正交设计水平编码见表 1, 正交设计方案见表 2。

外植体接种至分化培养基上进行不定芽的诱导, 4 周后待不定芽长至 2~3 cm 左右时, 用手术刀片切下转至生根培养基。生根培养基配方设计为 MS+NAA(0, 0.1, 0.2mg/L)+3% 蔗糖 +0.8% 琼脂, 一般经过 2 周不定根的诱导即可进行再生植株的出瓶, 移栽时要小心地洗去生根组培苗上的培养基, 然后将小苗移至含蛭石的培养土中, 按常规管理方法进行栽培管理。

### 2 结果与讨论

对影响芥蓝植株再生的因素, 通过正交设计方法优化组合, 并采用 DPS 分析软件进行数据方差分析, 结果表明, 最适于中花芥蓝再生的条件为: MS+NAA 0.03 mg/L+BAP 2 mg/L+1%蔗糖+AgNO<sub>3</sub> 7.0

收稿日期: 2003-09-25; 修回日期: 2003-01-18

浙江省重大科技项目(021102536)资助

\* 通讯作者, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

表1 正交水平编码表

水平代码	NAA(mg/L)	BAP(mg/L)	AgNO <sub>3</sub> (mg/L)	蔗糖浓度(%)	外植体
1	0	0	0	1	子叶
2	0.01	2	3.5	2	带柄子叶
3	0.02	4	7.0	3	子叶柄
4	0.03	6	10.5	4	下胚轴

表2 中花芥蓝再生植株频率结果

编号	NAA	BAP	AgNO <sub>3</sub>	蔗糖浓度(%)	外植体	植株再生频率(%)
1	1(0)	1(0)	1(0)	1(1)	1(子叶)	7.69 EF
2	1(0)	2(2)	2(3.5)	2(2)	2(带柄子叶)	38.89 CD
3	1(0)	3(4)	3(7.0)	3(3)	3(子叶柄)	18.92 DEF
4	1(0)	4(6)	4(10.5)	4(4)	4(下胚轴)	97.30 A
5	2(0.01)	1(0)	2(3.5)	3(3)	4(下胚轴)	68.29 B
6	2(0.01)	2(2)	1(0)	4(4)	3(子叶柄)	20.59 DEF
7	2(0.01)	3(4)	4(10.5)	1(1)	2(带柄子叶)	5.00 EF
8	2(0.01)	4(6)	3(7.0)	2(2)	1(子叶)	0 F
9	3(0.02)	1(0)	3(7.0)	4(4)	2(带柄子叶)	0 F
10	3(0.02)	2(2)	4(10.5)	3(3)	1(子叶)	10.00 EF
11	3(0.02)	3(4)	1(0)	2(2)	4(下胚轴)	28.57 CDE
12	3(0.02)	4(6)	2(3.5)	1(1)	3(子叶柄)	12.82 EF
13	4(0.03)	1(0)	4(10.5)	2(2)	3(子叶柄)	25.58 DE
14	4(0.03)	2(2)	3(7.0)	1(1)	4(下胚轴)	97.50 A
15	4(0.03)	3(4)	2(3.5)	4(4)	1(子叶)	4.76 EF
16	4(0.03)	4(6)	1(0)	3(3)	2(带柄子叶)	48.72 BC

\* 试验所用外植体数均为30个,其中A~F表示 $\alpha=0.01$ 水平上的差异。

mg/L+0.8%琼脂,最适宜的外植体类型为下胚轴,植株再生频率达到97.5%(表2)。培养基的生长调节剂种类和浓度、蔗糖浓度和外植体类型等均对中花芥蓝再生有影响,而AgNO<sub>3</sub>对中花芥蓝再生体系的建立影响无显著影响。采用该条件对另两个不同品种进行了验证实验,发现早花芥蓝再生频率为96.5%,

晚花芥蓝再生频率为95.5%,芥蓝3个品种的再生频率均在95%以上,这3个品种均属于十字花科中的同一种作物,说明该再生体系(图1)是适用于芥蓝各品种的优化组合。

## 2.1 生长调节剂对芥蓝再生体系的影响

植物生长调节剂的种类和浓度对芥蓝愈伤组织

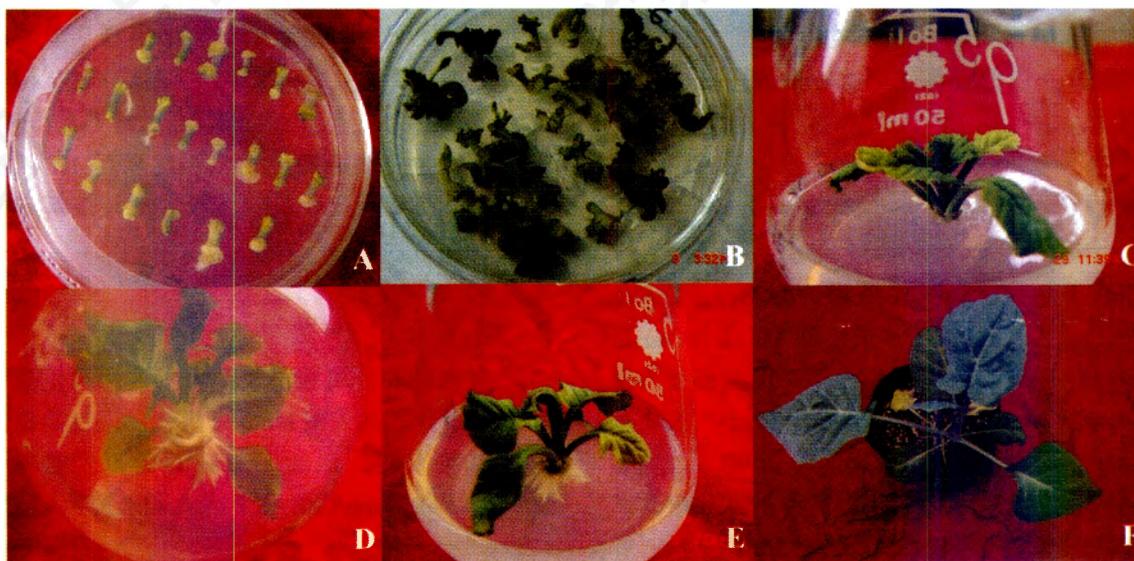


图1 芥蓝再生植株体系的建立

A: 芥蓝愈伤组织的形成; B: 芥蓝不定芽的形成; C: 芥蓝不定芽的生长; D, E: 芥蓝再生苗生根; F: 芥蓝再生苗的移植。

的诱导与分化有较大影响<sup>[1,2]</sup>。研究表明, NAA和BAP各水平分别对芥蓝再生体系的影响达到极显著水平( $F_{\text{NAA}}=35.0485$ ,  $F_{\text{BAP}}=26.7149$ ,  $F_{0.01}=6.23$ ), 说明不同浓度的NAA和BAP水平对芥蓝再生影响很大, 其中0.03 mg/L的NAA浓度和2 mg/L的BAP浓度最利于芥蓝再生。

NAA是一种生长素, 在组织培养中通常被用于诱导细胞的分裂和根的分化。本实验中, NAA水平以0.03 mg/L浓度最利于芥蓝愈伤组织的形成, 并且与其他水平的差异达到极显著水平, 说明较高NAA浓度有利于芥蓝的再生。BAP属于细胞分裂素, 在组织培养中通常起到促进细胞分裂和由愈伤组织上分化不定芽的作用。本实验中, BAP水平以2 mg/L浓度最适于不定芽的形成。通常再生体系建立实验中, NAA和BAP是以一定比例调节植物的不定芽形成, 一般两者的比例大有利于植物不定芽的形成。

## 2.2 AgNO<sub>3</sub>对芥蓝再生体系的影响

AgNO<sub>3</sub>对植物再生体系构建的作用机制尚未完全清楚。目前一般认为, Ag<sup>+</sup>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, 从而抑制乙烯的产生, 防止外植体产生的过多乙烯对植株再生的抑制作用<sup>[9,10]</sup>。但本实验的结果表明, 不同浓度的AgNO<sub>3</sub>对芥蓝再生体系的构建影响无显著差异( $F_{\text{AgNO}_3}=1.83173$ ,  $F_{0.05}=3.63$ )。

通常认为, AgNO<sub>3</sub>对芸薹属植物的再生分化有较大的影响, 而且大多数认为适当浓度的AgNO<sub>3</sub>能显著的提高不定芽的分化频率。Murata等<sup>[11]</sup>曾指出, 调控芽形成的基因可能位于C基因组, 大白菜由于缺少C基因组而难于再生, 所以在大白菜中, AgNO<sub>3</sub>是提高再生频率所必需的, 由于芥蓝含有C基因组, AgNO<sub>3</sub>浓度变化对芽再生并没有引起显著性的差异, 因此, 基因型间可能存在着对Ag<sup>+</sup>离子感受性、耐受性和反应的差异, 这说明基因型决定了培养基中最适合的AgNO<sub>3</sub>含量。

## 2.3 蔗糖浓度对芥蓝再生体系的影响

蔗糖浓度对芥蓝再生体系构建有一定的影响, 本实验以1%的蔗糖浓度最利于芥蓝的再生( $F_{\text{蔗糖}}=4.81705$ ,  $F_{0.05}=3.63$ )。

蔗糖浓度对离体培养过程中器官发生或胚胎发生的影响已有许多报道<sup>[1,12,13]</sup>, 不同品种其影响方式也不一样。何亚文等<sup>[1]</sup>对芥蓝离体培养中指出, 蔗糖浓度不仅能影响下胚轴切段不定芽的发生率而且

还能影响丛芽发生频率。

## 2.4 外植体类型对芥蓝再生体系的影响

外植体的取材部位和时间决定外植体的分生能力和内源激素水平, 从而影响其再生频率。本实验取下胚轴、子叶、子叶柄和带柄子叶等4种外植体类型, 各种外植体类型对植株再生影响很大, 最适于芥蓝植株再生的外植体是下胚轴( $F_{\text{外植体}}=137.1994$ ,  $F_{0.01}=6.23$ )。

外植体必须同时具备芽再生频率高、易为农杆菌侵染等特点, 才能成为良好的转化受体。芸薹属作物的离体植株再生一般选用带柄子叶作为外植体, 其原因可能是齐生长点切下的带柄子叶带有部分分化能力强的原分生细胞。而本实验中选用的下胚轴最利于芥蓝的再生, 可能是由于芥蓝下胚轴的分生能力强, 内源激素水平利于芽的分化的缘故。

## 2.5 影响芥蓝生根的因素

芥蓝再生芽置于不同生根培养基上, 结果表明, MS+0.2 mg/L NAA+3%蔗糖+0.8%琼脂的生根培养基最适于芥蓝的生根, 生根率达100%, 且均为丛生根, 其他的NAA浓度上芥蓝再生芽都没有生根, 表明NAA对芥蓝生根的影响达到极显著水平。

## 参 考 文 献

- [1] 何亚文, 贺红, 韩美丽, 等. 芥蓝下胚轴离体培养及高频率植株的再生. *热带亚热带植物学报*, 1998, 6(2): 152-157.
- [2] 黄文华, 庄东红, 郑汉藩, 等. 芥蓝的组织培养和快速繁殖. *植物生理学通讯*, 1999, 35(2): 130.
- [3] 张桂华, 巩振辉. 农杆菌介导的花椰菜遗传转化体系研究. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2001, 29(5): 99-102.
- [4] 张桂华, 巩振辉, 张广辉. 农杆菌介导的芸薹属作物遗传转化研究进展. *西北农业大学学报*, 2000, 28(2): 80-84.
- [5] 史永红, 侯喜林. 芸薹属植物遗传转化研究进展. *长江蔬菜*, 2001, 10: 27-29.
- [6] 孙敏, 伍春莲, 汪洪, 王颖. 多因子正交试验对长春花离体培养条件的筛选. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2002, 27(2): 202-205.
- [7] 赵泓, 姚磊, 刘凡. 大白菜再生体系影响因子的方差分析. *华北农学报*, 2002, 17(3): 59-63.
- [8] 张德炎, 李喜文, 李建民. 正交设计法在白三叶组织培养中的应用. *东北师大学报(自然科学版)*, 1998, 1: 40-452.
- [9] 杨广东, 朱祯, 李燕娥, 等. 大白菜高效遗传转化体系的建立. *农业生物技术学报*, 2002, 2: 127-132.
- [10] CHI G L, BARFIELD D G, SIM G E. Effect of AgNO<sub>3</sub> and amino-ethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seeding explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. *Plant Cell Reports*, 1990, 9: 195.
- [11] MURATA M, ORTON T J. Callus initiation and regenera-

- tion capacities in *Brassica* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1987, **11**: 111 – 123.
- [12] KANTIA A, KOTHARI S L. High efficiency adventitious shoot bud formation and plant regeneration from leaf explants of *Dianthus chinensis* L. *Scientia Horticulturae*, 2002, **96**: 205 – 212.
- [13] TANG H R, REN Z L, REUSTLE G, *et al.* Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. *Scientia Horticulturae*, 2002, **93**: 235 – 244.

## The Optimization of Plant Regeneration Protocol of Chinese Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *alboglabra*)

HUANG Ke<sup>1,2</sup>, YU Xiao Lin<sup>1</sup>, WU Qiu Yun<sup>2</sup>, SHEN Ying Chun<sup>1</sup>, XIANG Xun<sup>1</sup>, CAO Jia Shu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; <sup>2</sup>Institute of Vegetable Science, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, China)

**Abstract:** By the orthogonality design, the factors which influenced the regeneration of *Brassica oleracea* L. var. *alboglabra* were studied, the results showed that the major factor is the explant, and the next are NAA, BAP, sucrose and AgNO<sub>3</sub>, the best recipe of the culture medium for the regeneration is: MS+NAA 0.03 mg/L+BAP 2 mg/L+1% sucrose+AgNO<sub>3</sub> 7.0 mg/L+0.8% agar. The optimum explant is the hypocotyls with the regeneration frequency 97.5%.

**Key words:** *Brassica oleracea*; Chinese broccoli; regeneration; orthogonality design

This work was supported by Zhejiang Province Key Program of Science and Technology (021102536)

\*Corresponding author, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

### 《细胞生物学杂志》编辑委员会

### The Editorial Board of Chinese Journal of Cell Biology

#### 主 编 Editor-in-Chief

郭礼和 Li-He Guo

#### 副主编 Associate Editors-in-Chief

白永延 Yong-Yan Bai 施渭康 Wei-Kang Shi 朱学良 Xue-Liang Zhu

#### 编 委 Members of the Editorial Board

白永延 Yong-Yan Bai

陈瑞阳 Rui-Yang Chen

陈受宜 Shou-Yi Chen

陈尊器 Zun-Qi Chen

丁明孝 Ming-Xiao Ding

丁小燕 Xiao-Yan Ding

费 俭 Jian Fei

郭礼和 Li-He Guo

黄百渠 Bai-Qu Huang

李逸平 Yi-Ping Li

林圣彩 Sheng-Cai Lin

陆长德 Chang-De Lu

马奎蒙 Kui-Meng Ma

施渭康 Wei-Kang Shi

孙 兵 Bing Sun

吴 乔 Qiao Wu

许政暄 Zheng-Kai Xu

杨弘远 Hong-Yuan Yang

严缘昌 Yuan-Chang Yan

章静波 Jing-Bo Zhang

赵寿元 Shou-Yuan Zhao

郑仲承 Zhong-Cheng Zheng

周光炎 Guang-Yan Zhou

朱德煦 De-Xu Zhu

朱学良 Xue-Liang Zhu

#### 编辑部 Editorial Office

侯向宇 Xiang-Yu Hou 卢建平 Jian-Ping Lu

(姓名先后按汉语拼音字母为序, alphabetically)