

提高榨菜离体培养植株再生频率

余小林 曹家树* 陈石头 吴剑丙

(浙江大学蔬菜研究所, 农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室, 杭州 310029)

摘要 采用榨菜“浙桐1号”品种为材料, 以MS为基本培养基, 通过对不同植物生长调节剂的组合和不同外植体等主要因素的筛选, 大幅度提高了榨菜离体培养植株再生频率。结果表明, 2 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L 2, 4-D 的组合较为适宜, 其不定芽再生频率可达 50%, 且外植体以下胚轴为好; 而 CPPU 和 2, 4-D 的适宜组合为 1.5 mg/L + 0.2 mg/L, 其不定芽再生频率高达 66.67%, 最适外植体为带柄子叶。同时, 研究结果显示, 添加 0.25~1 mg/L 的 GA₃ 对榨菜已分化的不定芽的伸长有抑制作用; 子叶柄和下胚轴外植体的分化具有极性现象。

关键词 榨菜; 组织培养; 植株再生; 器官发生

芥菜类蔬菜属于十字花科芸薹属芥菜种 (*Brassica juncea* Czern. et Coss) 的一、二年生草本植物栽培变种群, 通常作为蔬菜、油料和调料作物栽培。其中茎瘤芥 (*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee) 为中国特有的资源, 也是世界三大名腌菜之一的“榨菜”的原料, 在我国蔬菜加工生产中占有重要的地位, 对提高农民收入、发展乡镇企业、提供就业机会以及出口创汇等有着重要意义。

虽然目前芥菜的离体培养已经取得了一定的进展^[1-5], 但芥菜类蔬菜尤其是茎瘤芥的再生频率还是偏低, 尚未形成一个高效稳定的离体培养植株再生体系, 从而制约了应用生物技术进行芥菜种质改良的研究进程。本文以榨菜“浙桐1号”品种为材料, 通过不同外植体和不同类型的植物生长调节剂 (plant growth regulator, PGR) 组合的筛选, 改良了榨菜离体培养和植株再生体系, 试验结果为通过遗传转化途径进行芥菜类蔬菜的种质改良打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

榨菜品种“浙桐1号” (*B. juncea* var. *tumida* cv. Zhetong 1) 由本研究所实验圃保存提供。

MS₀: 基本培养基(大量元素+微量元素+Fe盐); MS₁: 发芽培养基(1/2 MS₀ + 8.1 g/L 琼脂粉 + 20 g/L 蔗糖); MS₂: 分化培养基(MS₀ + 有机元素 + 30 g/L 蔗糖 + 8.1 g/L 琼脂粉 + 5 mg/L AgNO₃ + 6-BA/CPPU

+ 2,4-D); MS₃: 伸长培养基[MS₂(2 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L 2, 4-D) + GA₃]; MS₄: 生根培养基(MS₁ + 0.1 mg/L NAA)。其中, CPPU[N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea, N-(2-氯-4-吡啶基)-N'-苯基脲]是一种新型植物生长调节剂。

1.2 无菌苗的获得及外植体的接种方式

种子用 Tween-20 摇洗 5 min, 清水冲净后经 70% 的酒精处理 90 s, 清水冲净后倒入 10% 的次氯酸钠浸泡 10 min, 无菌水摇洗 4~5 次后, 无菌播种于 MS₁, 并在 (25 ± 1) °C 的温度和 16 h 光照 / 8 h 黑暗的光周期下发芽, 光照强度为 35~40 μmol / (m²·s)。培养条件以下同。

取 4~5 天的无菌苗用手术刀片齐生长点切下带子叶柄的子叶(以下简称带柄子叶)、无子叶柄的子叶块(以下简称子叶)、无子叶柄的子叶柄(以下简称子叶柄)及其下胚轴段(以下简称下胚轴)等 4 种外植体, 分别接种到 MS₂ 分化培养基上。对带柄子叶进行插植接种, 即把子叶柄插入培养基中 2~3 mm; 子叶、子叶柄和下胚轴进行平接, 平放于培养基上, 稍稍压入培养基中, 以增大切口与培养基的接触面积。

1.3 不定芽的诱导及其成苗

根据文献报道与预试验^[1,6,7], 先确定 6-BA 的添加浓度为 2 mg/L, 生长素 2, 4-D 设 0、0.1、0.2、

收稿日期: 2003-12-31 接受日期: 2004-04-28

浙江省重大科技项目资助 (No.021102536)

* 通讯作者。Tel: 0571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

0.3、0.4、0.5、0.6 或 0.7 mg/L 等 8 个浓度梯度, 以观察各 PGR 组合对不定芽的诱导效果。

随后, 为了比较不同细胞激动素对榨菜离体培养植株再生能力的影响, 在筛选出 2, 4-D 的浓度为 0.2 mg/L 以后, 又添加 7 个不同浓度的 CPPU(0、1、1.5、2、2.5、3 或 5 mg/L), 以观察各 PGR 组合对不定芽的诱导效果。

每 50 mL 三角瓶接种 5 个外植体, 培养条件如前述, 25 天后统计外植体的再生频率。以上每个浓度培养基接种 30 个外植体, 重复 3 次。

待不定芽生长至 1.5~2.0 cm 时, 自基部切下, 移至生根培养基 MS₄, 培养条件同上。不定根诱导成功后按常规方法对再生植株进行移栽。

1.4 赤霉素(GA₃)对不定芽伸长的影响

针对榨菜离体培养植株再生过程中观察到愈伤组织上大部分分化的小芽点并不能进一步伸长的现象, 在筛选出适宜的 6-BA+2, 4-D PGR 组合及其外植体后, 将切除伸长的不定芽所留下的带绿色芽点的愈伤转移到添加 5 个不同浓度(0、0.25、0.5、0.75 或 1.0 mg/L)GA₃ 的培养基中, 观察 GA₃ 对不定芽伸长的影响。

每 50 mL 三角瓶接种 5 个外植体, 培养条件如前述, 25 天后统计外植体的再生频率。以上每个浓度培养基接种 20 个外植体, 重复 3 次。

上述数据均采用 DPS 统计软件进行统计分析^[8]。

2 结果

2.1 6-BA 与 2, 4-D 配合对不定芽分化的影响

在确定 6-BA 的浓度为 2 mg/L 的基础上, 对 2, 4-D 设计 7 个不同的浓度进行试验, 结果表明, 在 2 mg/L 的 6-BA 配合 0.2 mg/L 的 2, 4-D 的 MS₂ 培养

基中, 榨菜愈伤组织诱导频率和不定芽再生频率均为最高(表 1), 同时, 不同外植体在上述适宜培养基中的再生频率差异很大, 其中, 下胚轴的不定芽再生频率为最高, 可达 50%; 其次是子叶柄, 其不定芽再生频率为 34.43%; 第三是带柄子叶的不定芽再生频率, 为 16.67%; 不定芽再生频率最低的外植体是子叶, 仅为 3.333%。但就愈伤组织诱导频率而言, 诱导频率最高的外植体却为子叶柄, 诱导频率可达 96.67%。上述结果显示, 榨菜的愈伤组织诱导频率与不定芽的再生频率并非呈正相关。此外, 观察发现, 该 PGR 组合中子叶和带柄子叶外植体褐化和玻璃化现象较为严重。由于 6-BA 和 2, 4-D 组合的 PGR 组合所直接诱导产生的再生不定芽极少, 故未作统计。

对表 1 中不定芽分化频率作进一步的统计分析, 结果显示, 供试的 4 种外植体、PGR 的组合以及外植体×PGR 之间的不定芽再生频率的 *P* 值分别为 2.28E-05、0.000208 和 0.003472, 均达到极显著的差异水平。其中, 根据外植体的 *F* 值=9.980898 大于 PGR 的 *F* 值=5.330115 可知, 在本试验条件下, 外植体类型对榨菜不定芽再生的影响程度要大于 PGR 的。

2.2 CPPU 与 2, 4-D 配合对不定芽分化频率的影响

在确定 2, 4-D 的浓度为 0.2 mg/L 之后, 对 CPPU 设计 7 个不同浓度, 筛选出适宜的愈伤组织诱导和不定芽分化的 CPPU 浓度(表 2)。结果表明, 不论是愈伤组织诱导还是不定芽的分化, CPPU 与 2, 4-D 的 PGR 组合均好于 6-BA 与 2, 4-D 的 PGR 组合。就不定芽的分化而言, 以 1.5 mg/L CPPU + 0.2 mg/L 2, 4-D 的组合较为合适, 其中带柄子叶外植体的

表 1 6-BA 与 2, 4-D 组合对“浙桐 1 号”榨菜愈伤组织诱导和不定芽分化的影响

PGR 组合		外植体			
6-BA 浓度 (mg/L)	2, 4-D 浓度 (mg/L)	带柄子叶 (A/B)	子叶柄 (A/B)	子叶 (A/B)	下胚轴 (A/B)
2.0	0.0	73.33/16.67	0.0/0.0	67.77/14.43	0.0/0.0
2.0	0.2	52.23/16.67	96.67/34.43	60.00/3.333	76.67/50.0
2.0	0.3	35.83/20.00	93.33/37.76	20.00/0.0	83.33/26.67
2.0	0.4	3.333/0.0	90.57/22.77	10.00/0.0	93.33/23.33
2.0	0.5	12.23/2.233	94.43/12.23	3.333/3.333	91.10/10.00
2.0	0.6	12.23/0.0	90.00/12.23	5.567/0.0	86.67/20.00
2.0	0.7	14.43/2.233	80.00/22.23	13.33/4.433	85.56/0.0

表格中的数据 A/B 为 3 次重复的平均值, A 为愈伤诱导频率(%), B 为不定芽再生频率(%). 愈伤诱导频率(%)= 诱导有愈伤的外植体数 / 供试外植体总数 × 100; 不定芽再生频率(%)= 分化有不定芽的外植体数 / 供试外植体总数 × 100。下同。

表2 CPPU与2, 4-D组合对“浙桐1号”榨菜愈伤组织诱导和不定芽分化的影响

PGR组合		外植体			
CPPU浓度 (mg/L)	2, 4-D浓度 (mg/L)	带柄子叶	子叶柄	子叶	下胚轴
0.0	0.2	85.00/0.0	100.0/10.0	96.67/3.333	96.67/8.333
1.0	0.2	93.33/60.00	68.33/15.00	71.67/26.67	91.67/3.333
1.5	0.2	95.00/66.67	71.67/5.000	81.67/36.67	78.33/1.667
2.0	0.2	78.33/28.33	53.33/0.0	78.33/26.67	85.00/8.333
2.5	0.2	70.00/23.33	18.33/0.0	78.33/35.00	41.67/1.667
3.0	0.2	71.66/41.67	35.00/1.667	80.00/38.33	50.00/0.0
5.0	0.2	66.67/16.67	16.67/0.0	61.67/15.00	23.33/0.0

再生频率为最高，达66.67%，子叶、子叶柄和下胚轴在以上组合中的不定芽再生频率分别为36.67%、5%和1.67%。对表2的结果作进一步的分析可见，带柄子叶和子叶的诱导率总体上高于子叶柄和下胚轴，这一现象正好和6-BA与2, 4-D的PGR组合相反。另外，在试验中观察发现，该PGR组合中的外植体也发现有褐化和玻璃化现象，但较上一PGR组合要轻得多。

对表2的统计分析显示，供试的4种植体、PGR的组合以及外植体×PGR之间的不定芽再生频率的 P 值分别为4.65E-24、1.1E-12和7.12E-13，也均达到极显著的差异。其中，根据外植体的 F 值=116.6019大于PGR的 F 值=20.89352可知，在本试验条件下，外植体类型对榨菜不定芽再生的影响程度要大于PGR的，该结果与前一PGR组合的结果一致。

2.3 赤霉素(GA₃)对不定芽伸长的影响

在榨菜离体培养植株再生过程中观察到，愈伤组织中有许多绿色的小芽点，但每个外植体能伸长的不定芽只有1~2个，大部分已分化的小芽点并不能进一步伸长，所以，在筛选出最适的PGR组合(6-BA+2, 4-D)及其外植体后，将切除伸长的不定芽所留下的带绿色芽点的愈伤转接到添加不同浓度GA₃的培养基中，观察GA₃对不定芽分化诱导的影响，结果表明，添加0.25、0.5、0.75和1.0 mg/L GA₃的不定芽伸长频率分别为6.667%、6.667%、3.333%和5.000%，而不添加的的不定芽伸长频率反而更高，为13.33%，因此添加0.25~1.0 mg/L GA₃对榨菜已分化的不定芽的伸长有抑制作用。试验中观察发现，添加GA₃的第2天，已分化的不定芽就开始伸长，有的真叶柄异常膨大伸长，但之后仅有少数芽点长出芽来。方差分析结果显示，不同浓度的GA₃处理之间并无显著性差异。

3 讨论

建立高频再生体系是进行植物遗传转化的前提。一些芸薹属植物很容易从愈伤组织诱导产生再生植株，但芥菜的第一代的愈伤组织却难以分化^[1,2]。研究认为，这种困难主要受基因型、外植体种类、培养基成分、特别是PGR种类和浓度的限制^[1,5,9]。国内外芥菜的组培报道，研究者采用的细胞分裂素类物质包括6-BA、KT等，生长素类有IAA、NAA、IBA等，其中以6-BA、NAA组合为最多，6-BA的浓度一般为2~2.5 mg/L，NAA一般为0.5~1 mg/L，但离体植株再生频率均在30%~50%^[1,2,5,6]，影响外源基因的导入。因此，本研究以“浙桐1号”榨菜品种为试材，采用6-BA与2, 4-D以及CPPU与2, 4-D两种PGR组合来研究榨菜间接不定芽发生情况，建立了高效的榨菜离体培养再生体系(图1-I~图1-IV)。同时，在本研究中上述两种PGR组合均得到外植体类型对榨菜不定芽再生的影响程度要大于PGR的结果，这与王景雪等认为激素组合对芥菜型油菜不定芽再生的影响程度要大于外植体类型的研究结果恰好相反^[3]，其原因可能与榨菜的种质特性有关。

CPPU是一种苯基脲类的细胞分裂素，作为细胞分裂素类的一种新型植物生长调节剂具有比任何一种嘌呤型细胞分裂素更强的细胞分裂活性，所以CPPU较多地被用于促进座果、果实膨大和诱导单性结实等方面^[10]，而应用于芥菜的组培中还未见报道。本实验采用CPPU和6-BA分别与2, 4-D组合，比较了两种细胞分裂素对榨菜植株再生作用上的差异，结果显示，CPPU的作用效果要比6-BA好，平均愈伤诱导率和不定芽再生频率均有所提高。此外，在CPPU与2, 4-D的PGR组合中，带柄子叶和子叶的诱导率总体上高于子叶柄和下胚轴，这现象正好和6-BA与2,4-D的PGR组合相反。该结

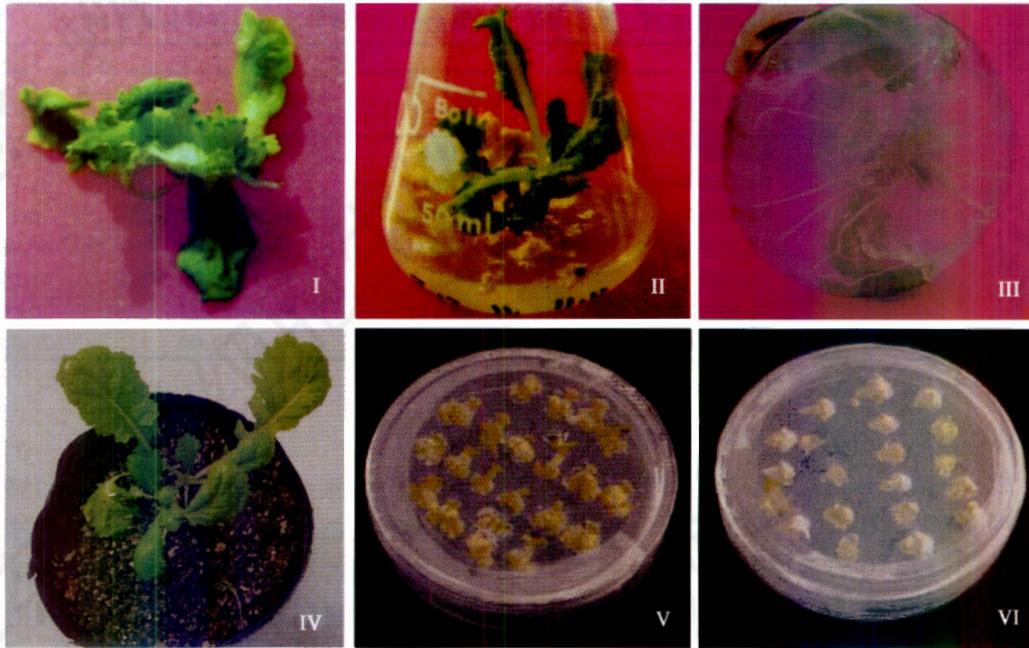


图1 榨菜离体培养再生植株体系的建立及其分化的极性现象

I: 带柄子叶外植体不定芽的分化; II: 不定芽的生长; III: 不定根的诱导; IV: 再生植株的移栽; V: 子叶柄外植体愈伤组织分化的极性现象; VI: 下胚轴外植体愈伤组织分化的极性现象。

果提示, 榨菜的带柄子叶和子叶外植体中细胞分裂素类的植物内源激素相对较为亏缺, 而相反, 子叶柄和下胚轴外植体中生长素类的内源激素却表现出相对不足。

在试验中进一步观察发现, 子叶柄和下胚轴这两种外植体在培养过程中大都只有一端能产生愈伤组织(图 1-V, 图 1-VI), 并继续分化出不定芽。其中, 子叶柄外植体是靠近子叶的一端产生愈伤组织, 而另一端在培养一周左右即开始褐化; 下胚轴外植体是靠近生长点的一端产生愈伤, 另一端也在一周左右就停止生长而开始褐化。上述分化的极性现象曾有文献报道^[11], 但未分析其原因。我们认为, 子叶柄外植体是靠近子叶的一端产生愈伤组织的可能原因是由于在近子叶端所积累的营养物质和内源激素的含量要高于子叶柄的另一端, 从而有利于愈伤组织和不定芽的分化。下胚轴外植体是靠近生长点的一端产生愈伤的可能原因是靠近生长点的

上端其原分生细胞的数目和营养物质要多于分化程度更深的下端, 所以, 更容易获得脱分化的愈伤组织和再生的不定芽。

参考文献 (References)

- [1] 曾广文主编。现代蔬菜科学论文集, 上海: 上海科学技术出版社, 1997, 55
- [2] 陈国菊等。西南农业大学学报, 2000, 22: 237
- [3] 王景雪等。作物学报, 1997, 23: 376
- [4] Chen LP *et al.* *Acta Phytophysiolog Sin*, 2001, 27: 437
- [5] Rout GR *et al.* *Plant Sci*, 1999, 146: 89
- [6] Barfield DG *et al.* *Plant Cell Rep*, 1991, 10: 308
- [7] Gaur A *et al.* *Cruciferae Newsletter*, 1996, 18: 28
- [8] 唐启义等主编。实用统计分析及其DPS数据处理系统, 北京: 科学出版社, 2002, 55
- [9] Lionneton E *et al.* *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 126
- [10] 李英等。植物生理学报, 2001, 27: 167
- [11] 李浚明编译。植物组织培养教程, 北京: 中国农业大学出版社, 1992, 83

Improvement of Plant Regeneration from Mustard (*Brassica juncea* var. *tumida*) Cultured *in vitro*

Xiao-Lin Yu, Jia-Shu Cao*, Shi-Tou Chen, Jian-Bing Wu

(Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, The State Agriculture Ministry Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development & Biotechnology, Hangzhou 310029, China)

Abstract An efficient regeneration system of mustard (*Brassica juncea* Czern. et Coss. var. *tumida* Tsen et Lee cv. Zhetong No. 1) was developed in this study. The results showed that regeneration ratio was fifty percent, when supplemented with 2 mg/L 6-BA and 0.2 mg/L 2,4-D on Murashige and Skoog (MS) medium and hypocotyl as explant; while the regeneration ratio was sixty seven percent, when supplemented with 1.5 mg/L CPPU and 0.2 mg/L 2,4-D on MS medium, and the optimal explant was cotyledon with petiole. Moreover, the result indicated that CPPU were more effective in callus induction and shoot regeneration. Interestingly, the elongation of regenerated buds was inhibited when supplemented with 0.25–1 mg/L GA₃, and the phenomenon of polarity was observed in regeneration of cotyledon petiole and hypocotyl explants. This may help in the gene transformation to improve agronomic characters in mustard for breeding programmes.

Key words mustard (*Brassica juncea* var. *tumida*); tissue culture; plant regeneration; organogenesis

Received: December 31, 2003 Accepted: April 28, 2004

This work was supported by the Key Sci-technology Project of Zhejiang Province (No. 021102536)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

细胞生物学杂志

双月刊 1979年创刊

第26卷 第4期 2004年8月

Chinese Journal of Cell Biology

Bimonthly Established in 1979

Vol. 26 No. 4 August 2004

主 办 中国科学院上海生命科学研究院
生物化学与细胞生物学研究所
中国细胞生物学学会

协 办 厦门大学生命科学学院
赛达生物技术研究中心

编 辑 《细胞生物学杂志》编辑委员会
上海岳阳路320号 邮政编码: 200031
电 话: 021-54920950
传 真: 021-54921011
电子信箱: cjcb@sibs.ac.cn
网 址: www.cjcb.org

主 编 郭 礼 和

出 版 上海科学技术出版社
上海瑞金二路450号 邮政编码: 200020

印 刷 上海图字印刷有限公司

发 行 上海市报刊发行局

订 阅 全国各地邮局

广告代理 上海高精广告有限公司
广告经营许可证: 沪工商广字3101031000061

Sponsored by Institute of Biochemistry and Cell Biology
Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Chinese Academy of Sciences

Chinese Society for Cell Biology

Joint-sponsored by School of Life Sciences, Xiamen University
Celstar Center of Bio-Tech Research

Edited by Editorial Board of Chinese Journal of Cell Biology
320 Yue-Yang Road, Shanghai 200031, China
Tel: 86-21-54920950

Fax: 86-21-54921011

E-mail: cjcb@sibs.ac.cn

Http: //www.cjcb.org

Editor-in-Chief Li-He Guo

Published by Shanghai Scientific and Technical Publishers
450 Rui-Jin Er Road, Shanghai 200020, China

Distributed by Shanghai Bureau for Distribution of
Newspapers and Journals

Subscribed by Domestic Local Post Offices