

芥蓝下胚轴离体培养及高频率植株的再生

何亚文 贺红 韩美丽 李燕华 李耿光

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 三个芥蓝品种下胚轴离体植株再生的条件的研究表明: 下胚轴切口处可直接诱导出芽, 诱导“早花尖叶芥蓝”、“中花尖叶芥蓝”和“迟花尖叶芥蓝”直接出芽的最佳激素组合分别为 2.0 mg L^{-1} BA, 0.3 mg L^{-1} NAA + 2.0 mg L^{-1} BA, 0.5 mg L^{-1} NAA + 2.0 mg L^{-1} BA, 其相应的芽发生频率分别为 84.6%, 86.7%, 93.3%。诱导芽发生的最适蔗糖浓度是 1%。培养基中加入 4.0 mg L^{-1} AgNO_3 和 500 mg L^{-1} MES 可显著提高芽再生频率。再生芽在 MS 附加 0.1 mg L^{-1} NAA 的培养基上诱导生根形成完整植株。离体再生苗与种子萌发实生苗田间生长外形差别不大, 但长势稍慢。

关键词 芥蓝; 离体培养; 植株再生

分类号 Q945.39

PLANT REGENERATION *IN VITRO* FROM HYPOCOTYL EXPLANTS OF *BRASSICA ALBOGLABRA*

He Yawen He Hong Han Meili Li Yanhua Li Gengguang

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract Plant regeneration from *in vitro* culture of hypocotyl in three cultivars of *Brassica alboglabra* was studied. The results showed that shoots could be induced directly from both ends of hypocotyl fragments with optimum auxins of 2.0 mg L^{-1} BA for cultivar 'Early Flowering', 0.3 mg L^{-1} NAA + 2.0 mg L^{-1} BA for 'Middle Flowering' and 0.5 mg L^{-1} NAA + 2.0 mg L^{-1} BA for 'Late Flowering', the corresponding shoot-induction frequencies being 84.6%, 86.7% and 93.3%, respectively. The optimum concentration of sucrose for shoot-induction was 1%. Addition of 4.0 mg L^{-1} AgNO_3 and 500 mg L^{-1} MES in the medium could greatly increase the frequency of shoot regeneration. The plant let could well develop after rooting in half strength MS medium supplemented with 0.1 mg L^{-1} NAA. No morphological differences were observed between *in vitro* plants and seedling plants.

Key words *Brassica alboglabra*; *In vitro* culture; Plant regeneration

芥蓝 (*Brassica alboglabra*) 是华南地区主要食用蔬菜之一, 也是出口到香港、澳门等地的

中国科学院华南植物研究所所长基金资助项目

缩写 Abbreviations: BA—苄基腺嘌呤 Benzyladenine; GA_3 —赤霉素 Gibberellic acid; IAA—吲哚乙酸 Indole-3-acetic acid; NAA—萘乙酸 1-naphthylacetic acid; MES—2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid; ZT—玉米素 Zeatin

1997-07-04 收稿; 1998-03-30 修回

重要叶菜^[1]。长期以来,芥蓝栽培过程中的病虫害和采后贮运过程中的腐烂给芥蓝的生产和销售造成很大的损失。随着现代物质生活水平的提高,人们对无公害、无污染新鲜蔬菜需求量日益增加,迫切需要培育耐病耐贮芥蓝新品种。现代生物技术的发展为这一矛盾的解决提供了一条有效的途径。采用遗传转化技术已将几个病虫害抗性基因和提高果蔬耐贮性能的反义基因转入农作物,并取得明显效果。目前芸苔属蔬菜中甘蓝、大白菜、芥蓝的离体再生系统已发展得较为完善,并有多例外源基因转入的报道^[2,3],但芥蓝离体再生和遗传转化方面国内尚未见详细报道。本文以广东地区三个优良芥蓝栽培种为材料,研究其下胚轴离体植株再生的条件,为进一步利用遗传转化技术培育芥蓝新品种打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

采用广东地区推广面积最大的三个优良品种“早花尖叶芥蓝”、“中花尖叶芥蓝”、“迟花尖叶芥蓝”为材料,其种子均由广州市蔬菜研究所提供。种子经70%乙醇消毒20 s,再用0.1% HgCl₂溶液消毒20 min后,无菌水洗涤三次,播种在MS基本培养基上。培养条件为先两天黑暗,初步萌发后转入12 h光照/12 h黑暗光周期,2500 lx光照强度和26±2℃条件下萌发。取萌发7 d后的无菌实生苗下胚轴作为实验材料。

1.2 下胚轴离体培养

下胚轴切段在不同激素组合的固体培养基上培养 取萌发7 d后的无菌苗下胚轴,切成0.5–0.7 cm长的切段,水平方式放置接种在含有如下激素组合的MS固体培养基上:① NAA+BA ② NAA+ZT ③ NAA+BA+GA₃ ④ IAA+BA ⑤ IAA+ZT ⑥ IAA+BA+GA₃。NAA的浓度为0.1 mg L⁻¹(单位下同),0.5, 1, 2; BA和ZT的浓度为0.5, 1, 2, 5; GA₃的浓度为0.1, 0.2, 0.5。培养条件为12 h光照/12 h黑暗光周期,2500 lx光照强度和26±2℃。培养后定期观察,初步确定最佳激素组合后,再进一步调整激素浓度继续实验。3周后统计出每一处理发生芽的外植体数和发生丛芽(每个切口5个以上单芽)的外植体数,计算出每一处理全部外植体芽发生频率(出芽的外植体数占总接种的外植体数百分比)和丛芽发生频率(出丛芽外植体数占总接种外植体数百分比)。每一处理外植体数不少于30个,每一结果至少重复两次。

下胚轴切段在含不同浓度组合的AgNO₃、MES培养基上培养 0.5–0.7 cm长的“早花尖叶芥蓝”下胚轴切段,接种在含有2 mg L⁻¹ BA, 0.1%蔗糖和如下AgNO₃、MES组合的MS固体培养基上:① 不加AgNO₃ ② 2 AgNO₃ ③ 4 AgNO₃ ④ 4 AgNO₃+500 MES ⑤ 6 AgNO₃ ⑥ 6 AgNO₃+500 MES。培养条件、结果观察和数据统计同上。

下胚轴切段在含不同浓度蔗糖的培养基上培养 取“早花尖叶芥蓝”下胚轴切段,水平放置方式接种在MS附加4 AgNO₃、500 MES、0.75%琼脂、2 BA和如下浓度蔗糖的培养基上:0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%。培养条件、结果观察和数据统计同上。

1.3 再生芽的生根和移栽

带2–3片幼叶的离体再生芽,分别转入1/2 MS附加0.1, 0.2和0.5 NAA固体培养基上进

行诱导根发生实验。待不定根长至2-3 cm长时,小心取出完整植株,洗去残余培养基,剪去较大叶子,移栽于含有蛭石的砂质土壤中,外套透明塑料袋。完全成活后,去掉塑料袋,移入田间生长,定期观察。

2 结果与讨论

2.1 激素组合对下胚轴切段芽发生的影响

0.5-0.7 cm长的下胚轴切段接种在含不同激素组合的MS培养基上,三星期后统计各组合中全部外植体芽发生频率和丛芽发生频率。结果表明,NAA和BA组合对外植体芽发生最有利,NAA与ZT,IAA与BA配合出芽效果均不如NAA与BA配合效果好,GA₃的加入对出芽有抑制作用(数据未给出)。下胚轴切段接种在NAA与BA组合的培养基上,一星期后下胚轴两端切口稍微膨胀,三星期后可见下胚轴两端或一端直接发芽,每个切口处出芽个数为2-12个不等(图1)。

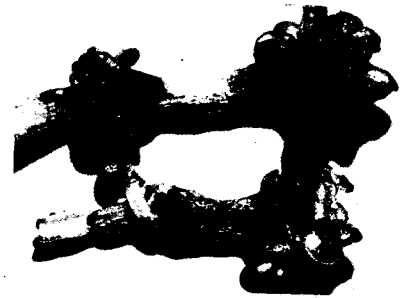


图1 下胚轴切段两端直接芽发生

Fig. 1 Shoot formation directly from both ends of hypocotyls

从表1可看出不同浓度的NAA和BA配合对芽发生的效果:①不同芥蓝品种的最高出芽频率所需要的NAA和BA组合稍有不同,早花尖叶芥蓝和中花尖叶芥蓝均为 1.0 mg L^{-1} NAA+ 2.0 mg L^{-1} BA,而迟花尖叶芥蓝则为 0.5 mg L^{-1} NAA+ 2.0 mg L^{-1} BA。②BA是下胚轴直接发芽所必需的,NAA加入对芽的发生有促进作用,但不是必需的。根据实验观察,加入高浓度的NAA会引起再生芽出现“玻璃化”现象,从而导致再生芽生根困难和再生植株变异频率加大,因此基于后续应用需要,不能为追求高的芽发生频率而盲目提高NAA浓度。③下胚轴最高出芽频率和最高丛芽发生频率所对应的激素组合并不完全同步,早花尖叶芥蓝在只含 2 mg L^{-1} BA的培养基上有最高丛芽发生频率(57.6%),而总的外植体最高芽发生频率(88.5%)却是在MS附加 1.0 mg L^{-1} NAA和 2.0 mg L^{-1} BA的培养基上诱导的。中花尖叶芥蓝同样如此,最高芽发生频率(91.3%)所需激素组合为 1.0 mg L^{-1} NAA+ 2.0 mg L^{-1} BA,最高丛芽发生频率(54%)所需激素组合为 0.3 mg L^{-1} NAA+ 2.0 mg L^{-1} BA。下胚轴两端切口诱导丛生芽直接发生对芥蓝快繁和遗传转化是十分重要的。综合考虑上述各种因素,我们认为三个芥蓝品种的最佳激素组合,早花尖叶芥蓝: 2.0 mg L^{-1} BA,中花尖叶芥蓝: 0.3 mg L^{-1} NAA+ 2.0 mg L^{-1} BA,迟花尖叶芥蓝: 0.5 mg L^{-1} NAA+ 2.0 mg L^{-1} BA。

2.2 AgNO₃和MES配合对芽发生的影响

AgNO₃是植物体内乙烯生物合成的抑制剂,许多报道表明它能有效地促进组织培养过程中外植体芽发生^[4-6]。本研究以早花尖叶芥蓝下胚轴为材料,比较了4种不同浓度Ag⁺与MES配合对芽直接发生的效果。

从表2可见, 4 mg L^{-1} AgNO₃对下胚轴出芽最有利,MES对提高芽的再生频率效果不大,但能提高产生丛生芽的频率。Ag⁺对芽发生的促进作用可能与它抑制了外植体内源乙烯的生物合成有关,详细作用机理不清^[6]。培养基中Ag⁺的加入不可避免地带来了一定的副作用。

表1 不同浓度的 NAA 和 BA 配合对芥蓝下胚轴芽发生的效果
Table 1 Effect of NAA and BA in combination on shoot induction frequency in *Brassica alboglabra* cultivars

品种 Cultivar	浓度 Conc. (mg L ⁻¹)		芽发生频率 (%) Shoot induction frequency	丛芽发生频率 (%) Clustered shoot induction frequency
	NAA	BA		
早花尖叶芥蓝 'Early flowering'		0.5	41.4	21.0
		1.0	60.0	36.0
		2.0	84.6	57.6
	0.5	2.0	85.7	47.0
	1.0	2.0	88.5	32.1
	2.0	2.0	69.5	27.0
中花尖叶芥蓝 'Middle flowering'		0.5	50.0	
		1.0	55.1	33.0
	0.1	2.0	65.5	31.0
	0.2	1.0	65.5	
		2.0	66.7	18.7
	0.3	2.0	86.7	54.0
	0.5	2.0	87.5	25.2
	1.0	2.0	91.3	26.1
迟花尖叶芥蓝 'Late flowering'		1.0	51.9	18.8
		2.0	75.0	12.5
	0.1	2.0	76.7	
	0.3	2.0	85.0	
	0.5	2.0	93.3	37.5
	1.0	2.0	81.3	18.8
	2.0	50.0		

基本培养基为: MS 附加 4.0 mg L⁻¹ AgNO₃, 500 mg L⁻¹ MES, 1% 蔗糖和 0.75% 琼脂
Basic medium was MS medium with 4.0 mg L⁻¹ AgNO₃, 500 mg L⁻¹ MES, 1% sucrose and 0.75% agar. Results are the mean from at least two replications of each experiment using an average of 42 explants per treatment.

用, 具体表现为含 Ag⁺ 的培养基见光后变成淡棕色, 培养的下胚轴切口处表面变褐, 丛芽发生频率降低。造成这一现象的原因可能是培养基中部分 Ag⁺ 与许多阴离子 (如 Cl⁻, Br⁻, I⁻, SO₄²⁻ 等) 发生反应, 一方面打破了原有的离子平衡, 改变了培养基的 pH, 另一方面生成不稳定的物质 (如 AgBr, AgI, AgSO₄)。这些物质经高温高压消毒和见光后极易分解^[7], 分解反应进一步加剧培养基 pH 的改变。因此当下胚轴切段接种在这种离子平衡和 pH 均改变了的培养基上时, 外植体切口表面一层细胞会部分变褐死亡, 影响丛芽发生频率。MES 是一种有机化合物, 它又是一种缓冲剂^[8], 能有效地防止培养基的 pH 改变而引起的细胞死亡, 使切口表面有更多的细胞参与芽的发生, 因此能提高丛芽发生频率。

2.3 蔗糖浓度对芽发生的影响

蔗糖或其它碳水化合物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, 不同品种其影响方式也不一样^[9,10]。下胚轴切段分别培养在含有 0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.0%, 5.0% 蔗糖的 MS 培养基上, 三星期后, 观察的结果表明, 蔗糖浓度不仅能影响下胚轴切段芽发生频

率, 而且还能影响丛芽发生频率, 在含1%蔗糖的培养基上芽发生频率和丛芽发生频率均为最高, 分别为87.6%和47.0%。这与一般的培养基中3%的蔗糖浓度不同^[11](表3)。造成这种现象的一个很重要的原因可能与渗透压有关。蔗糖的最基本作用是作为渗透压调节剂和碳源。只有当培养基的渗透压与外植体切口处细胞本身的渗透压保持一致或维持某个量的关系时才最有利于细胞的分裂、生长和分化。

表2 AgNO₃与MES配合对“早花尖叶芥蓝”直接芽发生的效果

Table 2 Effect of AgNO₃ and MES on shoot induction frequency in *Brassica alboglabra* 'Early Flowering'

AgNO ₃ (mg L ⁻¹)	MES (mg L ⁻¹)	芽发生频率(%) Shoot induction frequency	丛芽发生频率(%) Clustered shoot induction frequency
0	0	52.4	
1.0	0	37.0	
2.0	0	64.9	11.0
4.0	0	80.0	37.1
4.0	500	83.5	59.0
6.0	0	63.7	
6.0	500	72.0	

基本培养基为: MS 附加 2 mg L⁻¹ BA, 1% 蔗糖和 0.75% 琼脂

Basic medium was MS medium with 2 mg L⁻¹ BA, 1% sucrose and 0.75% agar. Results are the mean from two replications of each experiment using no less than 30 explants per treatment.

表3 蔗糖浓度对“早花尖叶芥蓝”下胚轴芽发生的影响

Table 3 Effect of sucrose concentrations on shoot induction frequency in *Brassica alboglabra* 'Early Flowering'

蔗糖浓度(%) Sucrose concentration	芽发生频率(%) Shoot induction frequency	丛芽发生频率(%) Clustered shoot induction frequency
5	35.0	17.0
3	46.7	35.0
2	68.0	37.0
1	87.6	47.0
0.5	47.8	15.3

基本培养基为: MS 附加 2 mg L⁻¹ BA, 4 mg L⁻¹ AgNO₃, 500 mg L⁻¹ MES 和 0.75% 琼脂

Basic medium was MS medium with 2 mg L⁻¹ BA, 4.0 mg L⁻¹ AgNO₃, 500 mg L⁻¹ MES and 0.75% agar. Results are the mean from two replications of each experiment using an average of 61 explants per treatment.

2.4 再生芽的生根和移栽

带2-3片幼叶的离体再生芽, 转入MS附加0.1 mg L⁻¹ NAA的固体培养基上, 不定根诱导效果最好。不定根长至2-3 cm长时可进行移栽, 3周后平均成活率可达60%。移栽成活植株与种子萌发苗田间观察表明外部形态差别不大, 长势稍慢(图2)。



图2 再生苗移栽成活

Fig. 2 A regenerated plantlet transplanted in the pot

参考文献

- 1 张兰英, 李耿光, 李开莲等. 芸苔属八种蔬菜芽尖微型快速繁殖, 中国科学院华南植物研究所集刊, 第四集. 北京: 科学出版社, 1989, 177-181
- 2 Radke S E, Turner J C, Facciotti D. Transformation and regeneration of *Brassica rapa* using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, 1992, 11:499-505
- 3 Xuebao Li, Zhihong Xu. Transgenic plants of rutabaga (*Brassica napobrassica*) tolerant to pest insects. Plant Cell Reports, 1995, 15:97-101
- 4 Chi G-L, Barfield D G, Sim G-E et al. Effect of AgNO₃ and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. Plant Cell Reports, 1990, 9(4):195-198
- 5 Chi G-L, Pua E C. Ethylene inhibitors enhances *de novo* shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris*

- ssp. *chinesis in vitro*. *Plant Sci*, 1989, 64:243-250
- 6 张鹏, 凌定厚. 提高菜心离体植株再生频率的研究. *植物学报*, 1995, 37(11):902-908
 - 7 王晓锋. 植物遗传转化技术手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1994, 54-63
 - 8 Bade J B, Damm B. *Gene Transfer to Plants*, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1995, 30-38
 - 9 Lou H. Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explants. *J Horti Sci*, 1996, 71(3):497-502
 - 10 Meijer E G M, Brown D C W. Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1987, 10:11-19
 - 11 Murashige T, Skoog F. A revised media for rapid growth and biosassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15:473-497