热带亚热带植物学报 2000, 8(2):109－112
Journal of Tropical and Subtropical Botany

$AgNO_3$ 对大白菜子叶芽再生的促进作用

杜 虹，庄东红*，黄文华

（汕头大学理学院生物学系，广东 汕头 515063）

摘要：以大白菜"02号杂交早皇白"无菌苗的子叶为材料，用附加BA 2.0 mg L^{-1}、NAA 0.1－1.0 mg L^{-1}的MS培养基培养，能直接诱导分化出芽。最适激素比例为BA 2.0 mg L^{-1}、NAA 0.5 mg L^{-1}，芽的分化率为31.6%。在上述培养基里添加2 mg L^{-1}的$AgNO_3$能使芽的再生频率提高至86.5%。

关键词：大白菜；子叶；离体培养；$AgNO_3$；芽再生

中图分类号：Q945.39 **文献标识码**：A **文章编号**：1005－3395(2000)02－0109－04

STIMULATION EFFECT OF SILVER NITRATE ON SHOOT REGENERATION IN COTYLEDON TISSUE CULTURE OF *BRASSIA CAMPESTRIS*

DU Hong, ZHUANG Dong-hong, HUANG Wen-hua

(*Department of Biology, Science College, Shantou University*, Shantou 515063, China)

Abstract: A tissue culture system for obtaining high frequency shoot regeneration of *Brassica campestris* was studied. Shoots could be induced directly from cotyledons cultured on MS medium supplemented with 2.0 mg L^{-1} BA and 0.5 mg L^{-1} NAA, the shoot regeneration rate being 31.6%. Addition of 2.0 mg L^{-1} $AgNO_3$ in the medium could greatly increase the frequency of shoot regeneration, and the shoot regeneration rate reached to 86.5%.

Key words: *Brassica campestris*; Cotyledon; *In vitro* culture; $AgNO_3$; Shoot regeneration

大白菜(*Brassica campestris*)为十字花科芸苔属植物，是中国特产蔬菜之一，有悠久的种植历史和许多优良品种，在汕头地区也被广泛种植。

组织培养能最大限度地提高外植体的再生频率是将生物技术应用到生产实践的先决条件。芸苔属的蔬菜具有广泛的经济价值，其中油菜、甘蓝等种的组织培养研究有较大进展，但以大白菜为材料进行组织培养，外植体的再生频率一般较低[1－3]，待改进和提高。据报道，白菜类植物的外植体在受到伤害时易产生乙烯，*Brassica campestris*的离体培养物在密闭容器中产生的乙烯是在通风容器中产生的3倍[4]。过多的乙烯能干扰多胺的合成，进而阻止器官发生[5]。而Ag^+存在时，能通过促进多胺的合成提高体细胞胚胎和芽发生的频率。因此添加$AgNO_3$对许多植物的形态发生有促进作用。

收稿日期：1999－08－11

* 通讯作者 Corresponding author

汕头大学生物系99届毕业生陈劲波参加了部分工作，特表谢意。

本文实验了大白菜子叶在不同浓度激素的培养基中添加 $AgNO_3$，探讨提高子叶离体培养植株再生频率的方法，为进一步开展大白菜转基因研究打下基础。

1 材料和方法

材料 供试品种为"02号杂交早皇白"，由汕头市白沙蔬菜原种研究所提供种子。

无菌播种 取大粒饱满的种子，流水冲洗，用75%的乙醇浸泡约20 s后，再用0.1%的 $HgCl_2$ 浸泡10－15 min，无菌水冲洗8次，播种于不含激素的MS培养基上。pH约5.6。培养条件为：温度25±2 ℃，光强1600－2000 lx，每天光照16 h。

外植体及接种方式 种子萌发3－4 d后，子叶已展开，切取不留子叶柄的整片子叶，接种于培养基上。每个处理接种40－50片，每实验重复二次。培养条件同上。

培养基 MS培养基附加不同浓度的BA、NAA和 $AgNO_3$，pH为5.6－5.8，高压灭菌（$1.03－1.37\times 10^5$ Pa的压力，即121－126 ℃，15－20 min）后放置过夜备接种用。接种后定期观察记录培养物生长情况。培养20 d后统计存活外植体数，芽分化率等。以下统计数字均为二次实验的平均值。芽分化率＝(分化出芽的子叶切片数/存活的子叶切片数)× 100%。芽/外植体＝(分化出的芽数/分化出芽的子叶切片数)×100%。

2 结果与分析

2.1 $AgNO_3$ 浓度对子叶芽再生的影响

MS培养基添加激素BA 2 mg L^{-1}、NAA 0.1 mg L^{-1}，附加不同浓度的 $AgNO_3$ 能有效地提高大白菜子叶的芽再生率(表1)。芽再生率从无添加 $AgNO_3$ 的28.2%提高到添加2 mg L^{-1} 时的71.7%。随着 $AgNO_3$ 浓度的升高，芽分化率有所降低，但仍比不添加 $AgNO_3$ 的要高。只添加 $AgNO_3$，不加BA、NAA的培养基中，未见有芽分化。实验结果表明，在附加BA、NAA的培养基中添加 $AgNO_3$，以2 mg L^{-1} 的浓度对促进大白菜离体植株的再生较适宜。

表1 $AgNO_3$ 对大白菜子叶芽再生的影响

Table 1 Effect of $AgNO_3$ on shoot regeneration of *B. campestris*

激素 Growth regulator (mg L^{-1})		$AgNO_3$ (mg L^{-1})	存活子叶数 Survival explant No.	分化芽的子叶数 Regenerated shoot No.	芽分化率* Shoot regeneration rate (%)
BA	NAA				
0	0	2	45	0	0
2	0.1	0	46	13	28.2±1.4c
2	0.1	2	46	33	71.7±1.3e
2	0.1	4	45	21	46.7±7.9a
2	0.1	8	44	22	50.0±3.3ab
2	0.1	12	42	23	54.8±3.8b
2	0.1	16	46	18	39.1±9.1d

* 在 p=0.01 水平上做平均数的比较，字母相同的为差异不显著(Ducan多重比较)

Each value represents the mean of 2 indepedent experiments with 2 replicates each. The values followed by the same letter are not significantly different from each other at p 0.01 by Ducan test.

2.2 激素和 $AgNO_3$ 配合对子叶芽再生的影响

BA 2 mg L^{-1} 和不同浓度的 NAA 配合及添加 $AgNO_3$ 对大白菜子叶芽再生的影响结果见表 2。结果表明: 培养基中只含 BA 或只含 NAA 均不能诱导再生芽，培养基中不含激素，只含有 $AgNO_3$ 也不能诱导芽再生。在只含 BA、NAA 的培养基中，子叶在培养 5－6 d 后陆续生根，10 d 后陆续分化出芽。而培养基中添加 $AgNO_3$，芽分化时间稍有提前，7－10 d 后就能陆续分化芽，且子叶分化的平均芽数有所提高。无添加 $AgNO_3$, BA 为 2 mg L^{-1} 时，随着 NAA 浓度的提高，芽再生率有所提高，NAA 0.5 mg L^{-1} 时芽再生率最高，达到 31.6%，在此配比的培养基中添加 2 mg L^{-1} $AgNO_3$ 则分化率可提高到 86.5%，平均芽数也较其他培养基的高。从表 2 可见，在添加 BA 2 mg L^{-1} 和不同浓度 NAA 的培养基中，加入 2 mg L^{-1} $AgNO_3$，均能使芽分化率和平均芽数有较大幅度的提高(比原来均可提高 1 倍左右)，其中最高的仍然为 BA 2 mg L^{-1}、NAA 0.5 mg L^{-1} 的培养基。实验表明，大白菜的子叶培养以含有 BA 2 mg L^{-1}、NAA 0.5 mg L^{-1}、$AgNO_3$ 2 mg L^{-1} 的培养基比较好。

表 2 BA 和 NAA 配合并添加 $AgNO_3$ 对大白菜离体培养芽再生的影响

Table 2 Effects of BA in combination with NAA containing $AgNO_3$ on shoot regeneration of *B. campestris*

激素 Growth ragulator (mg L^{-1})		$AgNO_3$ (0 mg L^{-1})		$AgNO_3$ (2 mg L^{-1})	
BA	NAA	芽分化率 (%) Shoot regeneration rate	芽/外植体(个) No. of shoot per explant	芽分化率 (%) Shoot regeneration rate	芽/外植体(个) No. of shoot per explant
0	0.1	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
2	0.1	25.2±1.0	1.59±0.8	65.0±1.1	2.2±1.4
2	0.2	28.0±1.7	1.12±0.3	75.0±5.5	2.5±1.7
2	0.3	30.0±1.8	1.38±0.5	69.2±3.3	2.6±1.1
2	0.4	30.5±1.0	1.45±0.5	73.0±3.4	3.0±2.1
2	0.5	31.6±1.1	1.23±0.4	86.5±3.0	3.2±1.6
2	0.6	29.7±3.8	1.17±0.4	69.2±11.2	2.4±1.1
2	0.7	30.1±4.2	1.47±0.5	65.4±18.7	2.2±0.8
2	0.8	29.3±0.7	1.16±0.4	63.4±15.1	2.1±0.9

3 讨论

芸苔属的蔬菜主要有三个基本种，具有不同的基因组: 白菜或白菜型油菜(*B. campestris*)，基因组为 AA；黑芥 (*B. nigra*)，基因组为 BB；甘蓝(*B. oleracea*)，基因组为 CC。还有三个复合种: 埃塞俄比亚芥(*B. carinata*)，基因组为 BBCC；芥菜或芥菜型油菜(*B. juncea*)，基因组为 AABB；甘蓝型油菜(*B. napus*)，基因组为 AACC。用以上各个种的子叶为材料比较其离体培养再生率时发现，基因组为 AA 的再生率最低，而且基因组带有 A 的其再生率也很低，这表明大白菜离体培养的低再生频率与基因组有关[5,6]。本研究用 BA 2 mg L^{-1}、NAA 0.5 mg L^{-1}、$AgNO_3$ 2 mg L^{-1} 的培养基培养“02 号早皇白”子叶，获得较高的芽再生率，表明这是一种适合

大白菜离体培养的培养基，但是否适用于其它的种需要进一步的研究。

大白菜组织培养的有关研究中，以子叶或真叶为材料得到再生芽一般都需经愈伤组织诱导和芽分化两阶段[2,3]，在本实验中能够用一种培养基直接分化出芽，仅需要十余天，缩短了实验周期，另外在降低成本和节省劳力上都有好处。

$AgNO_3$ 在组织培养中的作用已在很多植物上得到证实[5,7-9]，大多数人认为 $AgNO_3$ 能竞争性地作用于乙烯作用部位，从而抑制乙烯活性，促进植物器官发生和体细胞胚胎发生。例如，在番茄子叶的组织培养中发现，外植体释放乙烯越少其鲜重增加越多，乙烯合成量与芽分化能力呈负相关；乙烯不但抑制外植体芽分化的作用，也抑制了再生苗的生长[10]。再如，白菜(*B. campestris* ssp. *chinensis*)的子叶在有 Ag^+ 存在的条件下，再生芽率能从原来的 20%－30% 提高到 70%－80%[5]。本实验的结果也证明了在培养基中添加 $AgNO_3$ 能大大促进大白菜子叶切片的芽再生，这可能是由于 Ag^+ 的存在使乙烯不能干扰多胺的合成，$AgNO_3$ 通过促进多胺的合成提高体细胞胚胎和芽发生的频率[11]。但是，$AgNO_3$ 浓度的增高反而降低了再生率(表 1)，在芥蓝、菜心等植物的组织培养中都有报道[12,13]。可见添加过量的 $AgNO_3$ 会带来一定的副影响，这可能是由于 Ag^+ 与培养基中的阴离子发生反应，打破了离子平衡，改变了培养基的 pH 值；Ag^+ 是重金属，对植物体有毒害作用，因此培养基中不能含有过高浓度的 Ag^+。

参考文献:

[1] 李曙轩，裘文达．大白菜的腋芽组织培养繁殖种子 [J]．园艺学报，1983, 10(1):41－43.

[2] 杨红燕，安利民．大白菜愈伤组织的诱导和植株再生 [J]．陕西农业科学，1992, (3):14－15.

[3] 刘维塘．植物组织培养简报摘编 [J]．植物生理学通讯，1995, 31(5):360.

[4] Lentini Z, Mussell H, Muschlier M A, et al. Ethylen regeneration and reversal of ethylene effects during development *in vitro* of rapid-cycling *Brassica campestris* [J]. Plant Science, 1988, 54:75－81.

[5] CHI Gek-lan, PUA Eng-chong. Ethylene inhibitors enhanced *de novo* shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* (Chinese cabbage) *in vitro* [J]. Plant Science, 1989, 64:243－250.

[6] 贾士荣，杨美珠．芸苔属作物的原生质体培养和细胞融合 [J]．植物生理学通讯，1988, (5):7－12.

[7] Khalid M, Chraibi B, Alain Latche, et al. Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Hellianthus annuus* by the etylene inhibitors, silver and cobalt [J]. Plant Cell Reports, 1991, 10:204－207.

[8] Purnhauser László, Medgyesy Péter, Czakó Mihály, et al. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor $AgNO_3$ [J]. Plant Cell Reports, 1987, 6:1－4.

[9] Yang W Y, Bai Y Y, Yu Z H. Stimulation of shoot regeneration in leaf tissue culture of *Solamun tuberosum* by silver nitrate [J]. Acta Phytophysiologica Sinica, 1988, 24(1):86－90.

[10] 汤福强，刘愚，施教耐．番茄子叶外植体芽的分化过程与乙烯释放的关系 [J]．植物生理学报，1996, 22:152－156.

[11] 张鹏，傅爱根，王爱国．$AgNO_3$ 在植物离体培养中的作用及可能的机制 [J]．植物生理学通讯，1997, 33(5):376－379.

[12] 何亚文，贺红，韩美丽．芥蓝下胚轴离体培养及高频率植株的再生 [J]．热带亚热带植物学报，1998, 6(2):152－157.

[13] 张鹏，凌定厚．提高菜心离体植株再生频率的研究 [J]．植物学报，1995, 37(11):902－908.