

大白菜雄性不育系的组织培养和快速繁殖技术研究

许端祥* 方淑桂 陈文辉

福州市蔬菜科学研究所, 福州 350012

提要 以大白菜雄性不育系 Bm5-3 为材料, 研究其组培快繁技术的结果表明: 腋芽以组培快繁技术保存、扩繁大白菜雄性不育系是可行的。适合其腋芽增殖的培养基是 $MS+2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}6\text{-BA}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}$, 增殖系数为 4.58, 一般通过 4~5 次继代即可脱分化; 适合其生根的培养基是 $B_5+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{IBA}$, 平均每株生根数为 8.5 条, 平均根长 8.18 cm, 这一培养基上生长的根较粗壮。具有 4~5 片叶子且根系发达的试管苗, 移栽成活率高达 95%。田间栽培的试管苗与供体植株的外部形态与生理特性完全一致。

关键词 大白菜; 细胞质雄性不育系; 快繁; 生根

Studies on Tissue Culture and Rapid Propagation of CMS of Chinese Cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*)

XU Duan-Xiang*, FANG Shu-Gui, CHEN Wen-Hui

Fuzhou Institute of Vegetable Science, Fuzhou 350012, China

Abstract Tissue culture and rapid propagation of Chinese cabbage, CMS Bm5-3 were studied. The results showed that the method of taking axillary bud to conservation and enlarged propagation of CMS of Chinese cabbage was feasible. The fit culture medium for axillary bud to proliferate was MS supplemented with $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}6\text{-BA}$ and $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}$. Its proliferation coefficient was 4.58 and the test-tube plant could be dedifferentiated after subculture for 4–5 times. The fit rooting culture medium for axillary bud was B_5 supplemented with $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{IBA}$, means of root quantity was 8.5 per plantlet and length 8.18 cm. The roots of test-tube plant were thicker compared with those in other culture mediums. The survival rate of transplanting test-tube plant with 4–5 leaves and developed root was up to 95%. The results also showed that the test-tube plant was the same as the donor in exterior morphology and physiological characteristics after transplantation in the field.

Key words Chinese cabbage; CMS; rapid propagation; radication

大白菜(*Brassica campestris*L. ssp. *pekinensis*) 在蔬菜周年生产和供应中占有重要地位。目前, 大白菜优良品种的选育主要用杂种优势。对异花授粉和花器比较小的大白菜芸苔属植物来说, 杂种优势的利用首先要获得优良的自交不亲和系或雄性不育系, 以降低制种成本。雄性不育系作为十字花科杂种优势利用的一种手段, 对配制一代杂种提供了诸多便利, 但是不育系自身的繁殖和保存以及配制一代杂种的过程中还都存在问题。细胞质雄性不育(CMS)虽然能保证 100% 的杂种纯度, 但为了保持这种雄性不育性, 需筛选相应的保持系。而在生产中则往往是不育系好选, 保持系难寻。单隐性核基因控制的雄性不育两用系, 不论是亲本自身的繁殖, 还是生产杂交种, 都需在花期区分、标记或是拔除群体中分离出来的

50% 左右的雄性可育株, 这不仅费工耗时, 而且很可能因拔除不及时, 反而会给昆虫传粉提供了机会, 导致杂交种子不纯。由于植物细胞的全能性, 所以无性繁殖便成为固定和繁殖雄性不育亲本材料的理想方法。在初花期鉴定育性的情况下, 标记不育株和可育株, 再取一定的外植体建立无性系, 就可以获得全不育株和全可育株群体。这种育性明确的材料可以直接用来生产一代杂种(李曙轩和裘文达 1983)。但春化植株上取外植体的, 必须考虑外植体的生理状态对再生芽生理状态的影响。前人的研究结果表明, 在以已春

收稿 2005-10-18 修定 2006-04-14

资助 福州市科学技术局项目(2004-42)。

✉-mail: ltxzi@hotmail.com, Tel: 0591-87910442

化材料为外植体所建立的再生体系, 其试管开花频率高(Wellensiek 1964; Metzger 1988)。还有研究表明, 植物细胞一旦获得成花态, 即可以通过有丝分裂的形式传递, 但这种成花状态的间隔如果过长, 即不能表现, 还会减弱甚至消失(Michaels和Amasino 2000)。赵云等(1997)在油菜的花组织再生体系中也观察到, 最初再生的不定芽为生殖芽, 随着继代培养时间的延长, 离体成花趋势即下降。这种生殖生长逆转为营养生长在活体和离体培养过程中都有发生, 但这种成花逆转发生的原因还不清楚。目前, 已取得成功用于再生的外植体有花梗(Eapen和George 1997)、子叶-子叶柄(Chi等1990; Zhang等1998)、下胚轴(Chi等1990; Palmer 1992)和真叶(成细华等2001)等。但Hussey (1978)认为用组织培养繁殖植物, 最好的途径是腋芽增殖, 因为新芽属多细胞起源, 遗传稳定性相对较大。据此本文以开花的大白菜雄性不育系Bm5-3为材料, 对其腋芽组培快繁技术进行了研究, 以期能为大白菜雄性不育系的保存与繁殖探索新的技术途径。

材料与方 法

我所大白菜课题组提供的大白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*)雄性不育系Bm5-3, 属中晚熟类型, 为细胞质互作型不育系, 于9月上旬播种, 9月下旬定植, 2月下旬抽苔开花。

不育系Bm5-3开花时, 在主茎处用锋利刀片将腋芽切下, 先放在1%的洗衣粉溶液中浸泡片刻, 流水冲洗30 min, 转入75%的乙醇溶液中振荡灭菌30 s, 无菌水荡洗1次, 再转入10%的次氯酸钠溶液中振荡灭菌20 min, 无菌水荡洗3~5次。在无菌滤纸上吸去表面水分, 然后将腋芽切到0.5 cm待用。

腋芽增殖培养基有以下6种配方(各培养基均附加30 g·L⁻¹蔗糖、7 g·L⁻¹琼脂, pH 5.8): (1) MS+6-BA 3 mg·L⁻¹ (单位下同)+NAA 0.01; (2) MS+6-BA 3+NAA 0.1; (3) MS+6-BA 2+NAA 0.01; (4) MS+6-BA 2+NAA 0.1; (5) MS+6-BA 3; (6) MS+6-BA 2。小腋芽分别接入6种培养基中, 每种培养基接10瓶, 每瓶接4个腋芽, 重复3次。放入(25±2)°C、光强60 μmol·m⁻²·s⁻¹、16 h·d⁻¹光照的培养室中培

养, 20 d后分别统计增殖数量, 并进行t测验分析。

增殖的腋芽转入相应的增殖培养基中继代培养, 直至腋芽脱分化。

生根培养基设5种处理(各培养基均附加30 g·L⁻¹蔗糖、7 g·L⁻¹琼脂, pH 5.8): (7) MS; (8) 1/2MS; (9) MS+IBA 0.1; (10) B₅+IBA 0.1; (11) MS+B₉ 20。将脱分化的试管苗, 转入5种生根培养基中培养。每种培养基接10瓶, 每瓶接3株, 重复3次, 于接种培养14 d后调查试管苗的生根率, 28 d后再调查试管苗的生根率及株高, 并对结果进行t测验分析。

生根的试管苗长到2~3 cm高、有5~6片叶子、根系发达时, 进行炼苗。先松开培养瓶盖, 再从瓶中取出试管苗, 洗净根部附着的培养基, 栽种于营养钵的基质(以1:1:1的蛭石:草炭:草木灰混合)中, 用白色塑料膜罩住保湿5~7 d, 在温室中继续培养15~20 d, 然后移出室外炼苗7 d, 选择晴天傍晚种植于大田, 注意防晒保湿。

实验结果

1 腋芽增殖培养基的筛选和继代脱分化

通过试验, 发现在(1)~(6)六种培养基中, 腋芽都有不同程度的增殖。在(1)、(2)、(4)、(5)、(6)五种培养基中, 增殖的腋芽生长良好。只有(3)培养基上的腋芽外植体长势偏慢, 叶片展开很小或不展开, 叶色偏黄, 玻璃化率高, 成苗率低。从增殖培养基筛选试验结果(表1)看, 培养基(1)、(2)、(4)比(3)、(5)、(6)增殖系数高, 其中

表1 生长调节物质对大白菜腋芽增殖的影响
Table 1 Effects of different growth regulators on multiplication of the axillary bud of Chinese cabbage

培养基	增殖后的芽数/个	繁殖系数
(1)	539 ^B	4.49 ^B
(2)	534 ^C	4.45 ^B
(3)	421 ^D	3.51 ^C
(4)	550 ^A	4.58 ^A
(5)	420 ^D	3.50 ^C
(6)	390 ^E	3.25 ^D

各培养基接种芽数均为120个。不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。表2同此。

(4)培养基增殖系数最高,达到4.58,与其它5种培养基相比差异达到极显著水平,认为(4)培养基最适合大白菜腋芽增殖。试验还发现腋芽培养物继代1次的再生植株全部会开花,继代增殖4~5次以后,大部分再生植株已脱分化,且随着继代数的增加,脱分化率越来越高。

2 试管苗的生根培养

脱分化后的试管苗转入生根培养基中,14 d后大部分试管苗逐渐长出新根。其中(10)培养基最好,14 d生根率达到85.5%,28 d生根数为8.5条,平均根长8.18 cm,与其它4种培养基的差异达到极显著水平,其次是(9)培养基。由于(10)培养基主成分为B₅添加0.1 mg·L⁻¹吲哚丁酸(IBA),(9)培养基主成分为MS添加同样量的IBA,说明B₅培养基比MS更有利于白菜试管苗的生根。但生根培养到28 d以后,(7)~(11)五种培养基的生根率差别并不显著(表2)。从试管苗的株高来看,(7)培养基的最高,为2.83 cm;(11)培养基的最低,为2.25 cm,相差0.59 cm。5种培养基之间的差异均达到极显著水平。(7)培养基的主成分为MS培养基(不添加任何激素),(11)培养基主成分为MS添加20 mg·L⁻¹的生长延缓剂B₉。(11)培养基的14 d生根率、28 d平均根长都比不添加任何激素的(7)和(8)培养基的高,而株高比(7)和(8)培养基的矮,差异都达到极显著水平,说明生长延缓剂B₉对大白菜试管苗有生根、壮苗

作用。

表2 生长调节物质对大白菜试管苗生根和株高的影响
Table 2 Effects of different growth regulators on rooting and plant height of test-tube plant of Chinese cabbage

培养基	生根率/%		生根数/ 条 ⁻¹	根长/ cm ⁻¹	株高/ cm ⁻¹
	14 d	28 d			
7	45.8 ^C	90.3 ^A	7.83 ^B	4.59 ^D	2.83 ^A
8	32.0 ^D	90.2 ^A	6.75 ^D	4.10 ^E	2.36 ^D
9	75.1 ^B	90.6 ^A	7.86 ^B	7.08 ^B	2.64 ^B
10	85.5 ^A	90.5 ^A	8.50 ^A	8.18 ^A	2.50 ^C
11	50.0 ^C	90.3 ^A	6.83 ^C	6.55 ^C	2.25 ^E

生根数、根长和株高为28 d测定值。

3 试管苗炼苗、移栽、定植

试管苗在炼苗、移栽中,经过反复试验发现(7)~(11)五种培养基的试管苗移栽成活率差别并不大,主要与移栽时的温度、湿度有关,管理好的成活率都可以达到95%以上。组培再生试管苗经过试种,与大田实生母株相比,无论从植株性状,还是从育性表现来看都完全一致(表3)。植株叶色都为浅绿色,叶帮白色,球形拧抱、炮弹形,花枝分枝性强,花蕾长三角形、花药短、无花粉。说明组培再生苗能很好地保持原品种的特性,用其配制的杂种后代与以实生母株配制的基本上没有区别。

表3 大白菜组培苗与实生母株的比较

Table 3 The comparison on the seedlings from tissue culture and the donor

	株高/cm	株幅/cm	不育率/%	不育度/%	开花后的株高/cm	开花后的株幅/cm
组培苗	44.6	55.0	100	100	97.5	85.1
实生母株	45.0	54.8	100	100	98.1	85.3

讨 论

从试验结果来看,取腋芽通过组培快繁技术来保存、扩繁大白菜雄性不育系看来是可行的。根据本文的研究结果,如果大白菜试管苗增殖系数为4.5株·月⁻¹·苗⁻¹,一年按转接11代计算,理论上可以增殖1500万株以上,生根率和移栽成活率分别按90%和95%计算,一年大约可以获得

1300万株再生植株。按6万株·hm⁻²计算,可用于216 hm²杂交大白菜所需的母本植株,能提高制种产量和经济效益。更为重要的是,它完全保持了母株的特性,杂交种子的纯度有保证,这对不育系的选育及制种是重要的。

参考文献

成细华,戴大鹏,刘凡,姚磊(2001).大白菜真叶的组织培养及植

- 株再生. 植物生理学通讯, 37: 310
- 李曙轩, 裘文达(1983). 大白菜的腋芽组织培养繁殖种子. 园艺学报, 10 (1): 41~44
- 赵云, 王茂林, 郑洪武, 潘涛, 张帆(1997). 细胞核雄性不育油菜无性繁殖研究. I. 细胞核不育油菜试管繁殖. 中国油料, 19 (1): 1~5
- Chi GL, Barfield DG, Sim GE, Pua EC (1990). Effect of AgNO₃ and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. Plant Cell Rep, 9: 195~198
- Eapen S, George L (1997). Plant regeneration from peduncle segments of oil seed *Brassica* species: influence of silver nitrate and silver thiosulfate. Plant Cell Tiss Org Cult, 51: 229~232
- Hussey G (1978). The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. Sci Prog, 65: 185~208
- Metzger JD (1988). Localization of the site of perception of thermoinductive temperatures in *Thlaspi arvense* L. Plant Physiol, 88 (2): 424~428
- Michaels SD, Amasino RM (2000). Memories of winter: vernalization and the competence to flower. Plant Cell Environ, 23: 1145~1153
- Palmer CE (1992). Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. Plant Cell Rep, 11: 541~545
- Wellensiek SJ (1964). Dividing cell as the prerequisite for vernalization. Plant Physiol, 39: 832~835
- Zhang FL, Takahata Y, Xu JB (1998). Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). Plant Cell Rep, 17: 780~786