

影响茎用芥菜愈伤组织诱导和植株再生的因素

陈丽萍* 徐春霞 李春顺

浙江大学园艺系, 杭州 310029

提要 茎用芥菜子叶培养在 MS+0.25 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.25 mg·L⁻¹ 2,4-D 培养基上, 可获得较高质量的愈伤组织。愈伤组织培养在 MS+1~2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA 培养基上分化频率为 8.3%, 而在加有羧苄青霉素和头孢霉素的培养基上, 最高分化频率可达 52.4%。将获得的再生植株转移到 1/2MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA 的生根培养基中, 可获得完整植株。
关键词 茎用芥菜; 愈伤组织; 分化; 抗生素; 植株再生

Factors Affecting Callus Induction and Plant Regeneration of Tuber Mustard (*Brassica juncea* Coss. var. *tumida* Tsen et Lee)

CHEN Li-Ping*, XU Chun-Xia, LI Chun-Shun

Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

Abstract When the cotyledons of tuber mustard (*Brassica juncea* Coss. var. *tumida* Tsen et Lee) were cultured on MS medium containing with 0.25 mg·L⁻¹ NAA, 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.25 mg·L⁻¹ 2,4-D, the high quality calli were obtained. The differentiation rate of these calli on MS medium containing 1~2 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.2 mg·L⁻¹ NAA was 8.3%. When the cefotaxime or carbenicillin was added into MS medium containing 1~2 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.2 mg·L⁻¹ NAA, the maximum differentiation rate reached 52.4%. After all the regenerated shoots were transplanted on 1/2MS medium added 0.1 mg·L⁻¹ NAA (rooting medium), the entire plants were obtained.

Key words tuber mustard (*Brassica juncea* Coss. var. *tumida* Tsen et Lee); callus; differentiation; antibiotic; plant regeneration

茎用芥菜(*Brassica juncea* Coss. var. *tumida* Tsen et Lee)是十字花科芸薹属的一类蔬菜,在浙江、四川等省都有大面积栽培。从其获得再生植株体系来说,通过原生质体培养、子叶直接诱导不定芽等建立的再生体系已有所报道^[1~4]。而用组织或器官诱导愈伤组织和再生植株的报道还未见。愈伤组织的诱导、分化和再生植株是作物遗传多样性获得和遗传转化的途径之一,对茎用芥菜种质改良和资源创新也有一定的意义。本文探索几种影响茎用芥菜愈伤组织的诱导、分化和植株再生的因素。

材料与方 法

以茎用芥菜(*Brassica juncea* Coss. var. *tumida* Tsen et Lee)细胞质雄性不育系的无菌苗为材料。无菌苗的培育方法如下所述,挑选籽粒饱满的种子,用自来水反复冲洗后,再用 75% 酒精消毒 1 min,蒸馏水冲洗 3 次,而后在 5% NaClO 水溶

液(加洗洁精 1~2 滴)中灭菌 15 min,无菌水冲洗 4~5 次,在超净工作台内用滤纸吸干种子表面水分,播于 1/2MS^[5]+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA 的培养基中。暗处发芽 24 h 后,在 16 h·d⁻¹ 连续光照下培养。

取播种后 8 d 的无菌苗子叶,切成 0.1~0.2 mm×0.1~0.2 mm 大小,放入表 1 所示的 MS 附加不同浓度 6-BA 和 NAA 的培养基中。每瓶培养基上放 5 个外植体,重复 3 次。诱导至 20 d 时统计愈伤组织的诱导频率及性状。每 20 d 继代 1 次,将经过 2 次继代培养的愈伤组织转到分化培养基中进行分化培养,第 9 天统计出现绿点的愈伤频率,30 d 后统计分化频率。将诱导的芽转入 1/2MS 培养基中进行壮苗 1 周,然后转入生根培养基 1/2MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA 中生根。取出已经生根的

收稿 2005-04-11 修定 2005-07-22

资助 浙江省自然科学基金项目(302340)。

✉-mail: Chenliping@zju.edu.cn, Tel: 0571-86971006

再生小植株, 移栽至基质(蛭石:珍珠岩=1:1)中进行炼苗生长。

以上各培养基中蔗糖含量均为 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂为 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 值为5.8。培养温度 25°C 。除愈伤组织诱导和继代培养需在连续黑暗条件下以外, 其它均在 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 连续光照条件下培养。

实验结果

1 子叶愈伤组织的诱导

据茎用芥菜原生质体培养的实验报道, 原生质体诱导的愈伤组织在增殖过程中易出现毛状根或生根, 从而影响愈伤组织质量和进一步的分化。以一定组合的NAA和2,4-D诱导愈伤组织可取得

比较满意的结果^[2]。为了获得具有分化能力的愈伤组织, 我们研究了不同种类和浓度植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响。结果(表1)表明, 茎用芥菜子叶培养在MS附加不同浓度NAA和6-BA的培养基上时, 外植体在形成愈伤组织的同时会形成大量的不定根、毛状根及不定芽(图1-a), 不能获得完全脱分化的愈伤组织。而加入2,4-D可抑制根和芽的发生, 2,4-D与NAA和6-BA的不同组合形成不同颜色和质地的愈伤组织。根据我们培养茎用芥菜原生质体的结果^[2], 乳白色、细颗粒状愈伤组织具有较好的分化潜力(图1-b)。因此, 我们即用这类愈伤组织作进一步的分化试验。

表1 不同种类和浓度的植物生长调节剂对茎用芥菜愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of various concentrations and plant growth regulators on callus induction of tuber mustard

培养基(浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	愈伤组织形成的量	愈伤组织的特性
MS	无	无
MS+NAA 1	+	根, 毛状根
MS+NAA 1+6-BA 0.5	+++	根, 毛状根, 不定芽
MS+NAA 0.5+6-BA 0.5	+++	根, 毛状根, 不定芽
MS+NAA 0.25+2,4-D 0.25+6-BA 0.5	++	乳白色, 细颗粒状
MS+2,4-D 0.25+6-BA 0.5	++	奶黄色, 细颗粒状
MS+2,4-D 1+6-BA 0.5	+++	黄色, 较大颗粒状
MS+2,4-D 1	++	白色, 大颗粒状

“+”代表愈伤组织的生长量的相对多少, “+”越多表示相对生长量越大。

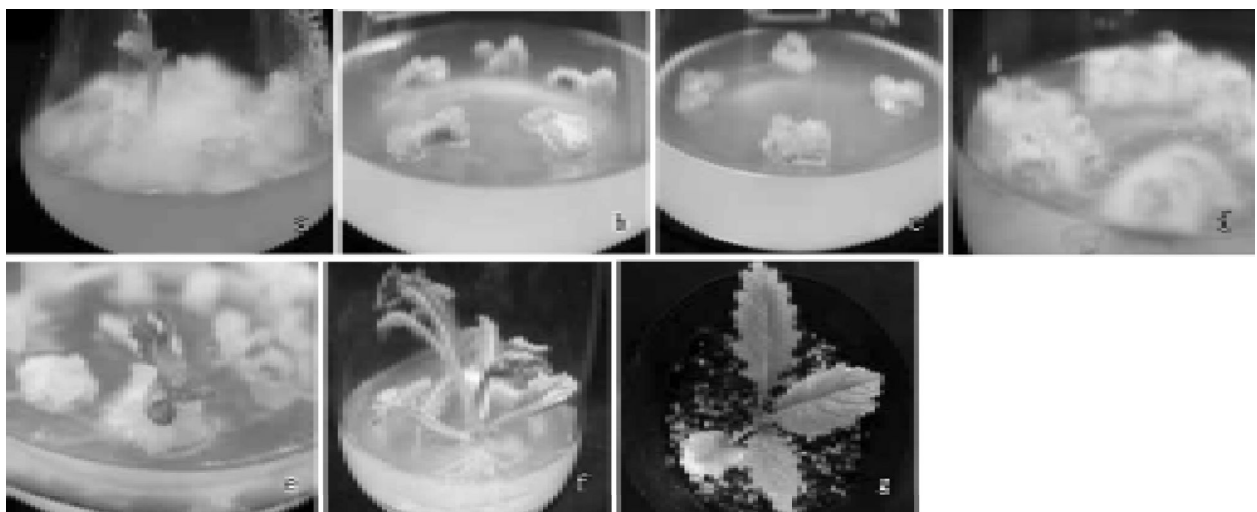


图1 茎用芥菜愈伤组织的诱导和植株再生

Fig. 1 Callus induction and plant regeneration of tuber mustard

a: 根和毛状根的形成; b: 有分化能力的愈伤组织; c: 愈伤组织在分化培养上出现绿点; d: 分化过程中毛状根的形成; e: 不定芽的形成; f: 根的形成; g: 移栽后的再生植株。

2 愈伤组织的分化

将所选愈伤组织接种在分化培养基 MS+1~2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA 上, 培养 1 周后开始出现绿点(图 1-c), 第 9 天时出现绿点的愈伤组织可达 41.7%。但随着愈伤组织的进一步分化, 也同时长出毛状根(图 1-d), 一些绿点未再继续分化为不定芽, 最后不定芽分化频率仅为 8.3% (图 1-e)。为了建立高效的愈伤组织分化再生体系, 我们研究了不同植物生长调节剂对愈伤组织分化的影响, 但没有获得满意的结果。有研究表明, 分化培养基中加一定的抗生素能促进愈伤组织的生长和分化。如唐巍等^[6]在火炬松的实验观察到, 500 mg·L⁻¹ 羧苄青霉素和 2 mg·L⁻¹ 6-BA、0.5 mg·L⁻¹ IBA 的组合可促进转基因愈伤组织生长和分化, 前者增加 54.2%, 后者增加 45.7%。也有一些实验认为, 抗生素对愈伤组织诱导和分化有抑制作用^[7]。我们研究抗生素影响茎用芥菜愈伤组织分化的结果表明, 培养基中加入不同浓度羧苄青霉素或头孢霉素时, 愈伤组织分化频率明显提高(图 2), 加入 250 mg·L⁻¹ 羧苄青霉素的最高分化频率可达 52.4%。

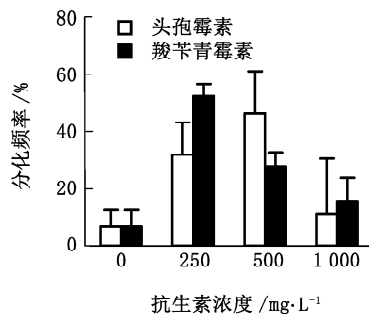


图2 抗生素对茎用芥菜愈伤组织分化的影响

Fig. 2 Effects of antibiotics on callus differentiation of tuber mustard

3 生根培养

通过愈伤组织获得的再生芽都比较弱小, 因此生根前需要在 1/2 MS 培养基中培养 1 周左右再转到生根培养基 1/2MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA 上, 90% 以上可以生根, 长成完整植株(图 1-f、g)。

讨 论

愈伤组织分化是植物再生的重要环节。以往

的研究, 主要是通过选择培养基中适宜的植物生长调节剂和合宜浓度的生长调节剂来提高分化频率。本文在茎用芥菜愈伤组织分化培养基中加入抗生素后的结果表明, 羧苄青霉素和头孢霉素不但没有降低愈伤组织的分化频率, 反而促进分化频率的大幅提高。抗生素提高分化频率的机制是什么, 尚待进一步研究。

茎用芥菜高效再生体系的建立为采用现代生物技术辅助常规育种提供了保障。在茎用芥菜再生体系研究中, 原生质体培养再生体系的建立有其独特的优点, 但其实验技术要求高, 应用于体细胞无性系变异和基因转化还有一定的距离和困难。因此, 我们仍先从组织水平上建立再生体系。有研究表明, 通过愈伤组织获得的再生植株, 可丰富植株的遗传多样性^[8,9]。但用组织培养技术进行基因转化获得的转基因植株, 有时会存在着其他性状不够理想等问题。因此, 获得转基因植株的遗传多样性就显得尤为重要, 而本文结果可能对解决这一问题有所帮助。

参考文献

- 雷建军, 陈世儒, 郭余龙等. 茎用芥菜的原生质体培养和植株再生. 植物学报, 1991, 33(2): 91~97
- 陈利萍, 张明方, 平田豊等. Efficient plant regeneration from cotyledon-derived protoplast of cytoplasmic male-sterile tuber mustard (*Brassica juncea* Coss. var *tumida* Tsen et Lee). 植物生理学报, 2001, 27(5): 437~440
- 陈利萍, 李春顺, 戈加欣. 利用组织培养技术辅助茎用芥菜品种选育研究. 中国蔬菜, 2005, (3): 22~23
- 余小林, 曹家树, 陈石头等. 提高榨菜离体培养植株再生频率. 细胞生物学杂志, 2004, 26: 439~443
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473~497
- 唐巍, 罗晓燕, Samuels V. 植物激素和抗生素调节的转基因火炬松愈伤组织的生长和分化. 遗传学报, 2002, 29(2): 166~174
- 范国强, 赵振利, 曹艳春. 抗生素对悬铃木体外再生植株影响的研究. 河南农业大学学报, 2004, 38(3): 279~284
- Al-Zahim MA, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Rep*, 1999, 18: 473~477
- Salvi ND, George L, Eapen S. Plant regeneration from leaf base callus of turmeric and random amplified polymorphic DNA analysis of regenerated plants. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2001, 66: 113~119