

壳寡糖对不结球白菜子叶离体培养再生体系的影响

黄菊艳, 张京良, 李银平, 臧聚玲, 江晓路*

中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛266003

摘要: 以不结球白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino)子叶为外植体, 考察壳寡糖对不结球白菜子叶离体培养再生体系的影响。在添加外源激素6-BA和NAA的条件下, 比较了不同浓度(0.5、1.0、2.0和10.0 mg·L⁻¹)壳寡糖对不结球白菜子叶形成愈伤组织、再生芽和再生不定根的影响。实验结果表明, 低浓度的壳寡糖能促进子叶形成愈伤组织、再生芽。壳寡糖促进子叶形成愈伤组织和再生芽的最适浓度为0.5 mg·L⁻¹, 与其他浓度壳寡糖处理组相比, 该浓度壳寡糖促进了子叶愈伤组织的形成, 使出愈率达到92%。此外, 该浓度壳寡糖能提高子叶的芽再生频率, 使再生率达到80%, 同时再生芽长度、叶绿素含量及外植体总鲜重达到最大, 均显著高于对照组。然而, 壳寡糖对再生芽生根有抑制作用, 形成的不定根数目、平均根长和最长根长度均小于对照组。

关键词: 壳寡糖; 不结球白菜; 子叶; 愈伤组织; 再生

Effects of Chitosan Oligosaccharide on Non-Heading Chinese Cabbage Cotyledon Regeneration

HUANG Ju-Yan, ZHANG Jing-Liang, LI Yin-Ping, ZANG Ju-Ling, JIANG Xiao-Lu*

College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China

Abstract: The cotyledon of non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino) was used as explants to investigate the effects of chitosan oligosaccharide (COS) on regeneration system. Under the condition of adding 6-BA and NAA, the effects of four different concentrations (0.5, 1.0, 2.0, 10.0 mg L⁻¹) of COS on formation of callus, regenerated shoot and adventitious root were evaluated. The results showed that the formation of callus and regenerated shoot of Chinese cabbage cotyledon was significantly promoted by COS. The effective promotion concentration of COS on formation of callus and regeneration of shoot was 0.5 mg·L⁻¹. Compared with the control, callus induction rate and shoot regeneration rate reached 92% and 80% at 0.5 mg·L⁻¹ COS. Length of regenerated shoot, contents of chlorophyll of shoot and fresh weight of explants were higher evidently than the control. Otherwise, the root formation of regenerated shoot was inhibited by COS, and the amounts of roots, length of root and length of longest root were lower than the control.

Key words: chitosan oligosaccharide (COS); *Brassica campestris*; cotyledon; callus; regeneration

寡糖是由2~20个单糖通过糖苷键连接而成的化合物。Doares等(1990)将具有多种生物活性的寡糖统称为寡糖素(oligosaccharins), 并认为寡糖具有调控植物生长、发育、繁殖和激活植物的防御反应等功能。相对多糖而言, 寡糖不仅溶解性好, 而且表现出较强的生理活性(徐俊光等2007)。壳寡糖是由甲壳素(几丁质)脱乙酰化的产物壳聚糖降解获得的寡糖, 也是天然糖中唯一大量存在的碱性氨基寡糖。壳寡糖是由2~10个氨基葡萄糖以 β -1,4糖苷键连接而成的低聚糖。它具备水溶性好、生物活性高、功能作用大、易被人体吸收等突出特点, 在医药、食品、农业等领域应用广泛(扈学文2007)。已有研究发现壳寡糖能作为植物

生长调节剂调节植物生长, 它对植物生长的促进作用得到了越来越多国内外研究人员的关注(扈学文等2007; Nge等2006)。匡银近(2008)发现壳寡糖在秋海棠离体叶片培养中可起到生长调节剂的作用。此外, 壳寡糖还能促进兰花腋芽再分化形成球茎, 最适促进浓度为15 mg·L⁻¹(Nge等2006)。

不结球白菜属于十字花科芸薹属植物, 是人们日常食用的主要蔬菜之一。现国内外已有许多通过大白菜的带柄子叶(Zhang等1998)、下胚轴

收稿 2013-12-11 修定 2013-12-26

资助 国家自然科学基金(41076087)。

* 通讯作者(E-mail: jiangxl@ouc.edu.cn; Tel: 0532-82032290)。

(Hachey等1991)、子叶圆片(何小兰等2001)和真叶(王火旭等2001)形成愈伤组织、再生不定芽和不定根的研究报道。Hirano (1988)报道壳聚糖能促进白菜(*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.)愈伤组织的生长。但是将壳寡糖作为新型的植物生长调节剂应用于不结球白菜子叶离体培养再生植株,国内外文献还未见报道,为此笔者进行了初步探讨。该实验通过壳寡糖在不结球白菜子叶离体培养上的应用,考察其对愈伤组织的形成、再生芽和再生根的影响,为白菜组织培养、壳寡糖功能开发以及在农业生产中合理、有效地使用壳寡糖提供重要的理论依据。

材料与方 法

1 材 料

1.1 不结球白菜

供试材料为不结球白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino), 俗名青菜, 小白菜, 品种为‘夏抗耐热48’, 发芽率98%。

1.2 壳寡糖组分分析

壳寡糖由中国海洋大学食品科学与工程学院应用微生物实验室提供。如图1, 壳寡糖质谱分析采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)。由图1中可知寡糖峰的质核比分别为

328.4、505.8、681.5、857.9, 据此分析, 壳寡糖是聚合度2和3为主的寡糖片段, 主要为二糖至五糖, 含有较低量的四糖, 并含有微量的五糖, 分子量<1 000 Da。

2 方 法

2.1 无菌苗的获得

挑选饱满的不结球白菜种子用75% (V/V)的酒精表面消毒30 s, 然后用无菌水冲洗3次, 再用0.1%的升汞溶液浸泡6 min, 随后用无菌水冲洗3次, 接种于添加2%蔗糖、0.6%琼脂的MS基本培养基上。每个培养瓶接种20粒种子, 置于25 °C恒温、14 h·d⁻¹光照的培养箱中, 进行种子萌发生长。

2.2 不结球白菜子叶诱导愈伤组织和再生芽

待无菌苗长到第4天时, 取生长状态良好且大小基本一致的无菌苗子叶, 用手术刀切下带2 mm子叶柄的子叶, 取带柄子叶作外植体, 将子叶柄插入到以MS为基本培养基, 附加6-BA、NAA、壳寡糖所组成的5种培养基上。其中诱导愈伤组织和再生芽的培养基相同, 均为MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA+壳寡糖(0、0.5、1.0、2.0、10.0 mg·L⁻¹)。对照组为不加壳寡糖的培养基, 处理组为添加不同浓度壳寡糖的培养基。调节培养基pH为5.8, 添加2%蔗糖和0.6%琼脂。每种培养基配制5瓶, 每瓶接种5个外植体。置于每日光照14 h, 温度25 °C的培养箱中。培养20 d后统计愈伤组织形

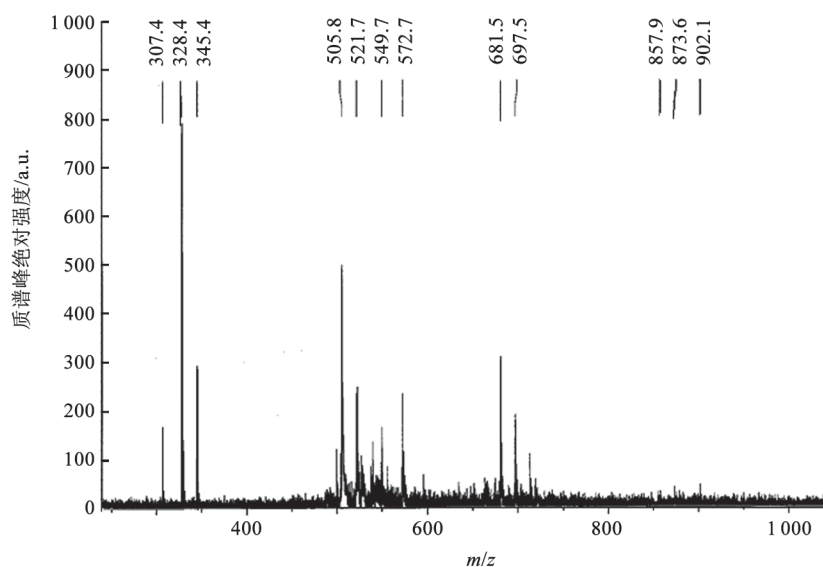


图1 测定壳寡糖的MALDI-TOF-MS

Fig.1 Mass spectrum of COS by MALDI-TOF-MS

成、再生芽生长情况。出愈率=(产生愈伤组织的外植体数/接种的总外植体数) \times 100%。再生率=(再生芽外植体数/接种的总外植体数) \times 100%。

2.3 再生芽诱导生根

取子叶再生得到的无根幼芽接种到以MS为基本培养基, 附加IAA和壳寡糖所组成的5种生根培养基上。培养基组分为MS+1.0 mg·L⁻¹ IAA+壳寡糖(0、0.5、1.0、2.0、10.0 mg·L⁻¹)。对照组为不加壳寡糖的培养基, 处理组为添加不同浓度壳寡糖的培养基。调节pH为5.8, 添加2%蔗糖和0.6%琼脂, 放置于与2.2节培养条件相同的培养箱中培养。

2.4 测量方法和数据分析

不结球白菜子叶培养20 d后, 观察愈伤组织的形成情况, 计算出愈率, 并统计芽再生率, 测定再生芽叶宽、茎长、茎宽和叶片叶绿素含量以及外植体鲜重。将再生芽转移到生根培养基培养10 d后统计再生根数目, 测定根长, 并用SPSS 17软件对数据进行统计分析, 差异显著性水平为0.05。其中, 叶绿素含量的测定采用比色法。外植体鲜重指1个培养瓶里5个外植体(包括再生芽)的总鲜重。生根数指1株再生芽形成的平均根数。

实验结果

1 不结球白菜无菌苗的获得

消毒的不结球白菜种子在光照条件下培养4 d后, 长成无菌苗(图2-A)。取长势良好、叶片完整的子叶进行愈伤组织、再生芽的诱导。

2 壳寡糖对不结球白菜子叶形成愈伤组织的影响

无菌不结球白菜子叶接种于愈伤组织诱导培养基中培养20 d后形成愈伤组织的情况如表1所示, 5种培养基中的子叶均能在子叶柄切割部位形成黄绿色结构致密的颗粒状愈伤组织(图2-B)。对照组子叶出愈率最低, 只有56%。寡糖组形成的愈伤组织的数量和体积均大于对照组, 且出愈率远高于对照组。可见壳寡糖对子叶愈伤组织的发生起着重要的促进作用, 浓度为0.5 mg·L⁻¹时, 促进效果最好。

3 壳寡糖对不结球白菜子叶再生芽的影响

无菌不结球白菜子叶接种于再生芽培养基中培养4 d后, 子叶逐渐增大、增厚并且卷曲。培养10 d后, 在叶柄切割部位和愈伤组织上, 能观察到有明显的再生芽形成(图2-C), 随后再生芽不断生

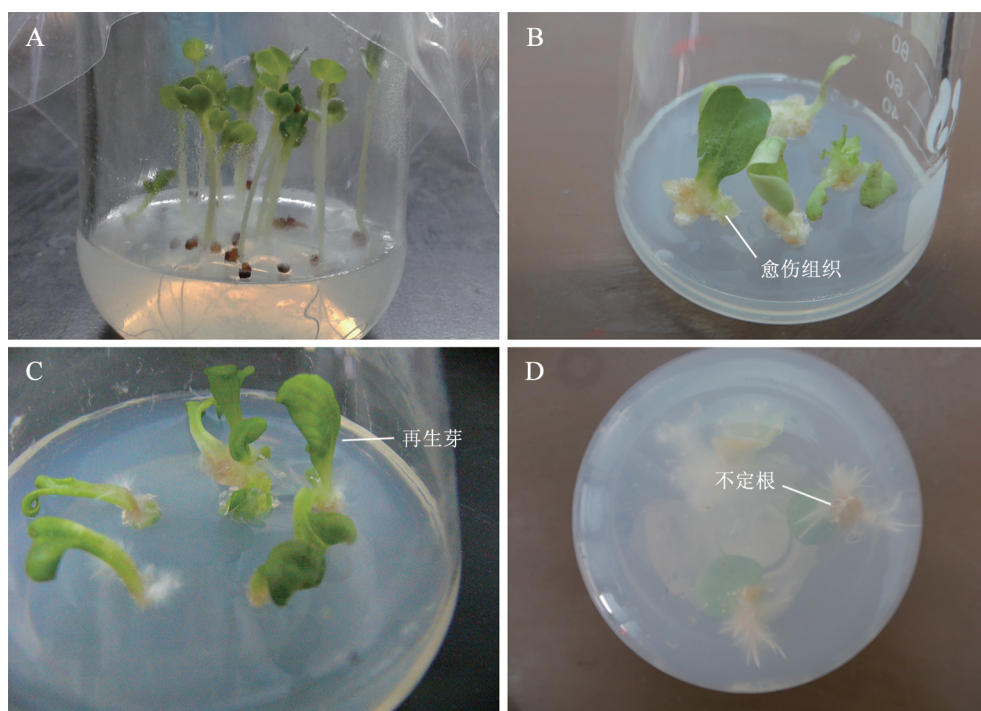


图2 不结球白菜子叶形成愈伤组织、再生芽和不定根

Fig.2 Callus, regenerated shoot and adventitious root from non-heading Chinese cabbage cotyledon

A: 培养4 d后的无菌苗; B: 培养20 d产生的愈伤组织; C: 培养20 d产生的再生芽; D: 再生芽培养10 d产生的不定根。

表1 壳寡糖对愈伤组织和再生芽形成的影响

Table 1 Effects of COS on callus and regenerated shoot formation

壳寡糖浓度/mg·L ⁻¹	出愈率/%	叶宽/mm	茎长/mm	茎宽/mm	芽再生率/%	叶绿素a含量/mg·g ⁻¹	叶绿素b含量/mg·g ⁻¹
0	56%	18.9±1.48 ^b	10.1±1.09 ^b	5.5±0.87 ^c	52	0.049±0.01 ^c	0.033±0.02 ^c
0.5	92%	20.1±0.60 ^a	12.4±0.46 ^a	7.8±1.15 ^a	80	0.086±0.01 ^a	0.047±0.01 ^a
1.0	84%	17.4±1.24 ^c	10.5±0.63 ^b	7.6±0.83 ^b	64	0.079±0.01 ^{ab}	0.038±0.01 ^{ab}
2.0	80%	15.4±0.83 ^d	10.3±0.88 ^b	6.9±1.77 ^{ab}	68	0.076±0.02 ^b	0.037±0.02 ^b
10.0	72%	14.8±1.32 ^d	10.1±0.92 ^b	6.7±1.23 ^b	56	0.072±0.01 ^b	0.033±0.02 ^c

同列数字旁不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 表2同。

长。培养20 d后, 统计再生频率, 测定再生芽的叶宽、茎长、茎宽、叶片叶绿素含量及外植体鲜重, 结果如表1和图3所示。从表1可看出培养基中添加壳寡糖能提高子叶的芽再生频率, 但壳寡糖浓度不同, 对再生频率的影响不同。壳寡糖浓度为0.5 mg·L⁻¹时, 再生率达到了80%, 随着壳寡糖浓度提高, 再生率下降, 当浓度为10 mg·L⁻¹时, 再生率只有56%。综合比较表1中再生芽的叶宽、茎长和茎宽, 发现壳寡糖能促进再生芽的生长, 当壳寡糖浓度为0.5 mg·L⁻¹时, 促进效果最好。叶片的叶绿素含量也如表1所示, 从表1中可看出, 壳寡糖能显著促进叶绿

素的合成, 且浓度为0.5 mg·L⁻¹时, 叶绿素含量最高, 和对照相比, 叶绿素a含量提高了75.51%, 叶绿素b含量提高了42.42%。图3所示为每个培养瓶中外植体总鲜重, 从该图可看出, 培养基中添加壳寡糖有利于外植体总鲜重的增加。壳寡糖浓度为0.5 mg·L⁻¹时, 外植体总鲜重与对照相比提高了13.24%, 与其他浓度的壳寡糖处理相比具有更明显的增加趋势。综合上述分析可得知壳寡糖能促进再生芽的生长, 促进作用的最适浓度为0.5 mg·L⁻¹。

4 壳寡糖对再生芽生根的影响

将不结球白菜子叶形成的再生芽转移到生根培养基中, 培养10 d后测定再生根的数目和长度, 结果如表2所示。对照组和壳寡糖处理组再生芽底部均形成了白色的不定根(图2-D), 但不定根数目和长度有较大差别。各组形成的不定根数对照组显著高于壳寡糖处理组(壳寡糖浓度为2.0 mg·L⁻¹的除外)。对照组中, 不定根较粗壮、数目较多; 而壳寡糖处理组中再生芽虽能形成不定根, 但不定根较细弱、数目较少。壳寡糖组中, 壳寡糖浓度不同, 再生根的数目差异不显著。从不定根的长度上看, 对照组也显著大于壳寡糖处理组, 说明壳寡糖不能促进不定根的形成, 对根的伸长也没有促进作用。以上分析表明壳寡糖在一定程度上抑制了再生芽生根。

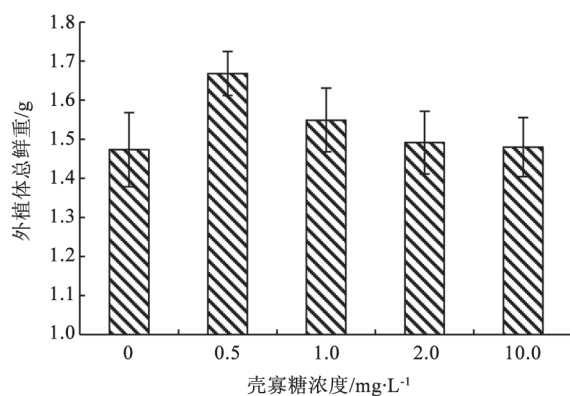


图3 每个培养瓶中外植体总鲜重

Fig.3 Total fresh weight of explants per glass jar

表2 壳寡糖对再生芽生根的影响

Table 2 Effects of COS on regeneration of adventitious roots

壳寡糖浓度/mg·L ⁻¹	每株幼苗生根数/条	平均根长/mm	最长根长/mm	根的生长情况
0	16.4±2.07 ^a	8.3±1.71 ^a	10.0	较多, 较粗壮
0.5	12.4±1.52 ^b	6.0±0.82 ^{ab}	7.0	较少, 较细弱
1.0	13.4±1.67 ^b	4.3±1.26 ^b	6.0	较少, 较细弱
2.0	14.0±1.87 ^{ab}	5.3±0.96 ^b	6.0	较少, 较细弱
10.0	12.8±1.92 ^b	5.8±0.95 ^b	7.0	较少, 较细弱

讨 论

植物的子叶、子叶柄、下胚轴、茎段等经常被用于植株再生(Jun等1995),其中子叶是小白菜离体再生中采用最多的外植体(范正琪等2002)。带柄子叶与单纯子叶块、子叶柄或真叶相比,又具有较高的植株再生能力(王凌健等1999;苏军等2002)。为获得较高的再生频率,本实验采用带柄子叶作外植体。另外,植物生长调节剂中的生长素和细胞分裂素对植物离体培养再生起着至关重要的作用。在白菜类的组织培养中,常用的植物生长调节剂有6-BA、KT、TDZ、NAA等。高比例的细胞分裂素和低比例的生长素配合,有利于不定芽的诱导。秦新民等(1997)发现采用 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA和 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA的配合,不结球白菜具有较高分化频率。因此本试验采用 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA和 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA两种植物生长调节剂,建立不结球白菜子叶离体直接再生体系,这样不仅越过愈伤组织阶段直接获得再生芽,提高了再生频率,同时也降低了培养物在离体培养过程中发生遗传变异的可能性。

壳寡糖能对植物的生长起到促进作用,可以作为一种植物生长调节剂,这已经被许多学者的研究所证明(扈学文等2007;Nge等2006)。壳寡糖能否促进不结球白菜子叶再生还未见报道,本实验首次将壳寡糖应用于不结球白菜子叶再生植株。实验结果表明低浓度壳寡糖处理可以促进不结球白菜子叶形成愈伤组织和再生芽,提高出愈率和芽再生频率,并且促进愈伤组织和再生芽的生长。壳寡糖对形成愈伤组织和再生芽的最适作用浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,随着壳寡糖浓度升高,促进作用减弱。这一现象与其他植物生长调节剂的调节作用相类似,低浓度时,对植物具有较好的促生长作用,浓度升高,促进作用减弱,因此在应用壳寡糖时精确掌握用量极为重要。

壳寡糖对愈伤组织和再生芽诱导的促进作用可能通过多种途径实现。已有研究表明褐藻寡糖单独作用于新接种的烟草愈伤组织时,一定浓度的褐藻寡糖可以提高体内IAA和GA的含量,促进愈伤组织生长(刘瑞志2009)。此外,壳寡糖浸种可提高大麦种子活力,促进幼苗生长,提高种子淀粉酶活性和叶片叶绿素含量(王婷婷等2011)。因此,

壳寡糖对不结球白菜子叶愈伤组织的诱导率和芽再生率的提高,也可能是通过内源激素、酶活性变化来作用的,相关研究正在进行中。

叶绿素是植物进行光合作用的色素,叶绿素含量在一定程度上反映了植物光合作用的水平,是衡量植物叶片功能强弱的重要指标(Srivastava等1995)。本实验结果表明,添加适量浓度的壳寡糖,能显著增加白菜叶片的叶绿素含量,增强叶片的光能利用能力,促进光合产物的运输,这对于促进再生芽叶片生长,提高再生植株的品质是非常有利的。

植物组织培养中,植物的生根大多数是用生长素单独实现的。在不定根的形成过程中,不同浓度的生长素对根的形成影响也不同,较高浓度的生长素对不定根形成有促进作用,但浓度过高时,生根会受到抑制。本实验采用 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA作为生长调节剂,研究不同浓度的壳寡糖对再生芽生根的影响。实验结果表明,壳寡糖对不结球白菜再生芽不定根的形成有抑制作用,添加不同浓度壳寡糖后,不定根数目和长度均低于对照组。

从本实验结果可知,壳寡糖可以影响不结球白菜再生体系的某些过程。但是因为植物生长过程的复杂性及参与因素的多样性,到目前为止,壳寡糖具体参与哪个过程,是否影响了某些内源激素的合成还有待于进一步研究。

参考文献

- 范正琪,崔海瑞,王忠华,夏英武(2002). 农杆菌介导的白菜遗传转化影响因子研究进展. 金华职业技术学院学报, 21 (3): 10~13
- 何小兰,吴敬音,朱卫民(2001). 6-BA和 AgNO_3 对甘蓝型油菜带柄子叶外植体不定芽再生的影响. 江苏农业学报, 17 (4): 211~214
- 扈学文,许秋瑾,金相灿,刘景辉,李立军,郭俊秀,欧阳坤(2007). 不同分子量壳寡糖对黑麦草种子萌发和幼苗抗病酶活性影响的研究. 中国农学通报, 23 (2): 221~225
- 匡银近,覃彩芹,孟志卿(2008). 壳寡糖对秋海棠叶片离体培养的影响. 安徽农业科学, 36 (16): 6657~6659
- 刘瑞志(2009). 褐藻寡糖促进植物生长与抗逆效应机理研究[博士学位论文]. 山东青岛: 中国海洋大学, 87~88
- 秦新民,高成伟,王任翔,李春瑶(1997). 小白菜子叶离体培养再生系统的建立. 广西师范大学学报(自然科学版), 15 (4): 90~93
- 苏军,段榕琦,胡昌泉,李永平,王锋(2002). 小白菜再生和农杆菌介导转化体系的建立. 福建农业学报, 17 (4): 241~243
- 王火旭,王关林,王晓岩,方宏筠,贾士荣,唐益雄,魏毓棠(2001). 大白菜AB-81高频再生系统的建立及gus A基因瞬时表达的研究. 园艺学报, 28 (1): 74~76

- 王凌健, 倪迪安, 王光远, 夏镇澳, 许政皓(1999). 青菜组织培养和转化系统的初步建立. 实验生物学报, 32 (1): 93~95
- 王婷婷, 赵丽, 夏萱, 王鹏, 江晓路(2011). 2种海洋寡糖对大麦种子萌发和生理特性的影响. 中国海洋大学学报, 41 (11): 61~66
- 徐俊光, 赵小明, 白雪芳, 李曙光, 杜昱光(2002). 两种海洋寡糖对植物病原真菌的抑制作用. 大连水产学院学报, 22 (2): 153~155
- Doares SH, Bucheli P, Albersheim P, Darvill AG (1990). Host-pathogen interactions XXXIV. A heat-labile activity secreted by a fungal phytopathogen releases fragments of plant cell walls that kill plant cells. Mol Plant-Microbe Interac, 2 (6): 346~353
- Hachey JE, Sharma KK, Moloney MM (1991). Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured *in vitro*. Plant Cell Rep, 9 (10): 549~554
- Hirano S (1988). The activation of plant cells and their self-defense function against pathogens in connection with chitosan. J Agr Chem Soc Jpn, 62: 293~295
- Jun SI, Kwon SY, Paek KY, Paek KH (1995). *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of fertile transgenic plants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'spring flavor'). Plant Cell Rep, 14: 620~625
- Nge KL, Nwe N, Chandkrachang S, Stevens WF (2006). Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. Plant Sci, 170: 1185~1190
- Srivastava A, Strasser RJ, Govindjee (1995). Differential effects of dimethylbenzoquinone and dichlorobenzoquinone on chlorophyll fluorescence transient in spinach thylakoids. J Photochem Photobiol B: Biol, 31: 163~169
- 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