

利用花序轴组培快繁青花菜萝卜 胞质雄性不育系的研究*

吴丽艳¹, 柏柯帆², 李石开¹, 钟利¹, 林良斌², 和江明^{1**}

(1. 云南省农业科学院园艺研究所, 云南昆明 650205; 2. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南昆明 650201)

摘要:以萝卜胞质不育型青花菜的幼嫩花序轴为外植体进行组织培养, 可成功诱导出苗。将幼嫩花序轴接种到不同激素配比的诱导培养基上, 均有愈伤组织产生, 其中在 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 培养基培养效果最好, 诱导率高达 100%; 用 MS + NAA 0.01 mg/L + KT 0.2 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 分化不定芽时, 不定芽分化效果最好, 芽分化率可达 6.16; 用 1/2 MS + NAA 0.2 mg/L 进行生根培养, 生根率高达 86.7%, 平均根数 13.5 条, 在一定的温度和湿度条件下培养, 移栽成活率可达 85% 以上。

关键词:青花菜; 花序轴; 组培快繁; 萝卜胞质雄性不育系

中图分类号: S 635.3.032 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X (2009) 05-0712-05

Studies on Tissue Culture of Rachides and Consequent Rapid Multiplication of OguCMS Lines in *Brassica oleracea* L. var. *varitalica* Planch

WU Li-yan¹, BAI Ke-fan², LI Shi-kai¹, ZHONG Li, LIN Liang-bin², HE Jiang-ming¹

(1. Horticultural Institute, Yunnan Academy of Agricultural Science, Kunming 650205, China;

2. College of Agricultural Sciences and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Tissue culture of OguCMS *Brassica oleracea* L. var. *varitalica* Planch, which was done with its young rachides as explants, succeeded in seedling. After inoculating the young rachides against the induction medium compounded with different hormones, and it had the uppermost rachis inducing rate of 100% on the induction medium (MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L). Seedlings showed favorable growth after being cultivated consequently on the enrichment medium (MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L) with a proliferation coefficient of 6.16. The rhizogenic rate was 86.7% with 13.5 pieces of roots in average on the rooting medium (1/2MS + NAA 0.2 mg/L). Seedlings' survival rate was up to 85% in certain temperature and humidity condition.

Key words: broccoli; rachis; tissue culture and rapid multiplication; OguCMS lines

青花菜 (*Brassica oleracea* L. var. *varitalica* Planch) 俗称西兰花、绿菜花、嫩茎花、花椰菜等, 属十字花科芸苔属甘蓝种的一个变种, 为一、

二年生草本植物^[1]。青花菜中富含维生素、胡萝卜素和无机盐, 并且以其色泽鲜绿、风味清香、质地柔嫩而受到消费者喜爱, 是一种高档的营养

收稿日期: 2008-11-03 修回日期: 2009-04-27

* 基金项目: 云南省科技攻关计划项目 (2006NG01); 云南省创新技术人才培养计划 (2007PY02-20)。

作者简介: 吴丽艳 (1981-), 女, 河南南阳人, 硕士, 研究实习员, 主要从事十字花科作物生物技术育种方面的工作。

** 通讯作者 Corresponding author: 和江明 (1968-), 男, 云南迪庆人, 副研究员, 主要从事十字花科作物生物技术育种研究。E-mail: hejiangming666@yahoo.com.cn

蔬菜;不但如此,青花菜还具有保健功能,有预防和治疗结肠癌和直肠癌的作用,也可以增强妇婴保健作用,促进矿质元素的吸收等等^[2]。青花菜原产于意大利,近几年在欧美各国、日本发展很快,我国自改革开放在上海、昆明等地引种成功,其适应性广,很快推广到全国各地,成为我国目前主栽的蔬菜品种之一。但由于我国90%左右的青花菜种子都从国外引进,不仅价格昂贵,而且还不能留种,给青花菜的生产带来了一定的困难^[3]。青花菜不育株的利用在青花菜育种上有着重要的应用价值。云南省农业科学院园艺研究所在青花菜育种过程中收集到一些雄性不育系,其中材料B08003不育性彻底,为优良的萝卜胞质雄性不育材料;但由于其遗传背景不甚明了,且尚未找到较好的保持系,而通过青花菜离体快速繁殖,可实现对其保存和扩繁的目的,以满足育种和生产上的需要。

关于青花菜的组培国外最先见ANDERSON^[4]和JOHNSON^[5]的报道,而在国内最早见李曙轩^[6]等利用叶片、中肋等外植体的组培,在基本培养基MS内附加一定量的激素配比的条件下已取得了不错的效果,但应用花序轴进行青花菜的组培快繁报道较少。本试验利用青花菜萝卜胞质雄性不育株的花序轴为外植体,系统的研究了其诱导、增殖、生根和移栽等环节,从而掌握了一套青花菜组培快繁的技术体系,为本单位所收集的青花菜不育系的保存、研究和利用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

云南省农业科学院园艺研究所收集的青花菜萝卜胞质雄性不育优良材料B08003。

1.2 培养基及培养条件

设计了5种不同激素配比的诱导培养基,即:(1)MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L(单位下同);(2)MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.2;(3)MS + 6-BA 0.5 + NAA 0.1;(4)MS + 6-BA 0.5 + NAA 0.2;(5)对照MS₀。

同时设计了4种不同激素配比的 不定芽分化培养基,即:(6)MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.5;(7)MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.01;(8)MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.01 + KT 0.2;(9)MS + 6-BA

0.5 + NAA 0.01 + KT 0.2,并以MS₀作为对照。

设计了7种不同激素配比的生根培养基,即:(10)1/2MS + NAA 0.1;(11)1/2MS + NAA 0.2;(12)1/2MS + NAA 0.5;(13)1/2MS + IBA 0.1;(14)1/2MS + IBA 0.2;(15)1/2MS + IBA 0.5;(16)对照1/2MS₀。

以上培养基的糖浓度均是20 g/L,并添加琼脂0.7%,pH 5.8。接种后置于25℃下,光照强度2 500 lx,光照时间为12 h/d。

1.3 方 法

1.3.1 外植体消毒处理

从供试材料植株上取幼嫩花序轴,用洗涤剂洗涤后,自来水流水冲洗30 min,用70%酒精浸泡40 s,再放入10%的次氯酸钠中消毒15 min,在超净工作台上用无菌水冲洗3~4次,最后一次浸泡3~5 min,用无菌滤纸吸干表面水分,将花序轴切成0.5~1 cm左右的小段待用^[7]。

1.3.2 诱导培养

经处理后的花序轴小段分别接种到(1),(2),(3),(4),(5)号培养基上,每种培养基接种10瓶,每瓶接5个花序轴小段,10 d后观察愈伤组织情况,计算愈伤组织诱导率。

1.3.3 不定芽分化培养

将愈伤组织转接到(6),(7),(8),(9)号增殖培养基中继续培养,每号接10瓶,每瓶接5个,30 d后统计出芽数,计算芽分化率。

1.3.4 生根培养

通过继代增殖形成的无根苗长成3~4 cm高并带有2~3片幼叶时,分别转入(10),(11),(12),(13),(14),(15),(16)号生根培养基上培养,每种培养基接种10瓶,每瓶接3株,20 d后观察生根情况,并计算生根率。

1.3.5 试管苗移栽

选生根整齐的试管苗进行炼苗移栽,具体方法如下:将试管苗的瓶盖打开放到温室内过渡2~3 d,取出试管苗,洗净根部附着的培养基,栽入已灭菌的营养土中,放入拱棚后在上面覆盖塑料膜和遮阳网,每天揭膜若干小时,保持一定的温度(20~28℃)和湿度(85%~90%),10 d后移栽到大田,20 d后考察成活情况。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比培养基对愈伤组织的诱导效果
在诱导培养基上培养 3 d 后发现 (1), (2), (3), (4) 号培养基中的花序轴片段基部均不同

程度膨大, 并出现淡绿色愈伤组织, 其中 (1), (2) 号培养基中的愈伤组织 (图 1) 明显比其他号培养基中的大, 7 d 后 (5) 号培养基 (对照 MS₀) 中的外植体也开始出现膨大, 第 10 d 统计愈伤组织的诱导情况见表 1。

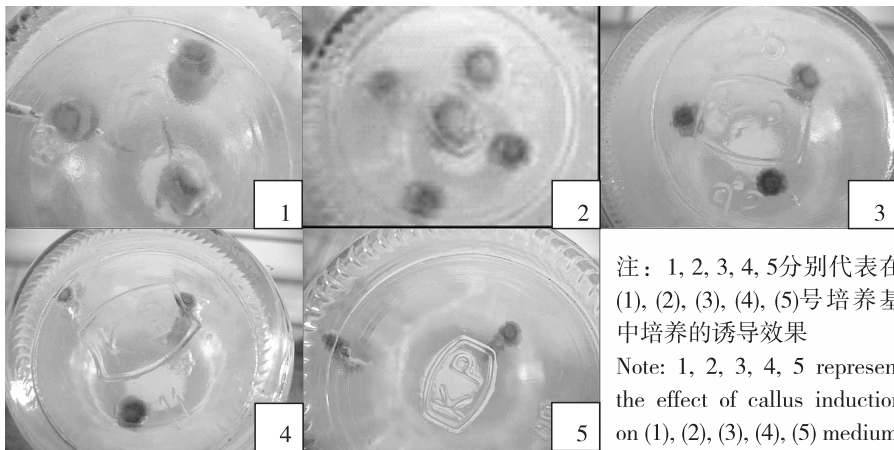
表 1 不同激素配比培养基对愈伤组织的诱导效果

Tab. 1 Effect of callus induction on different hormone combinations

培养基 medium	6-苄氨基嘌呤 /(mg·L ⁻¹) 6-Benzyl Aminopurine (6-BA)	α-萘乙酸/(mg·L ⁻¹) α-Naphthalene acetic acid (NAA)	接种数/个 inoculation number	愈伤组织诱导情况 effect of callus induction			诱导率/% inducement rate
				好 good	一般 general	无 none	
(1)	1.0	0.10	50	38	8	4	92
(2)	1.0	0.20	50	44	6	0	100
(3)	0.5	0.10	50	23	11	16	68
(4)	0.5	0.20	50	30	8	12	76
(5)	0	0	50	3	5	42	16

注 好: 形成大量, 绿色的, 密实的愈伤组织; 一般: 形成少量的, 松散的愈伤组织, 无: 没有形成愈伤组织。

Note Good: a lot of green, compact calli growth; General: a small amount of loose calli growth; None: no callus growth.



注: 1, 2, 3, 4, 5 分别代表在 (1), (2), (3), (4), (5) 号培养基中培养的诱导效果
Note: 1, 2, 3, 4, 5 represent the effect of callus induction on (1), (2), (3), (4), (5) medium

图 1 不同激素配比培养基对愈伤组织的诱导效果

Fig. 1 Effect of callus induction on different hormone combinations

从表 1 和图 1 可以看出, 培养基中加激素的均明显比对照的愈伤组织诱导率高; (2) 号培养基对愈伤组织的诱导效果最好, 诱导率达 100%; 当 6-BA 浓度不变, 只改变 NAA 浓度时, (1) 号培养基和 (2) 号培养基诱导率相差不大, (3) 号培养基和 (4) 号培养基诱导率相差不大; 而当 NAA 浓度不变, 只改变 6-BA 浓度时, (1) 号培养基和 (3) 号培养基诱导率差异大, (2) 号培养基和 (4) 号培养基诱导率差异也大, 说明对愈伤组织的诱导作用 6-BA 比 NAA 更明显。

2.2 不同激素配比培养基对不定芽的分化效果

将诱导出的愈伤组织分别接种到 (6), (7), (8), (9) 号不定芽分化培养基中继续培养, 经观察 (9) 号培养基第 18 d 最先开始形成绿色芽点, 继续培养, 膨大的绿色芽点逐渐分化成小芽。继代培养后, 再经 30 d 左右培养形成芽丛。结果表明, 除 (10) 号培养基 (MS₀) 只诱导出单芽外, 其余培养基均诱导出丛生芽。其中 (9) 号培养基中花序轴膨大的表面芽点多且生长速度快, 芽也较为粗壮。

表 2 不同激素配比培养基对不定芽的分化效果

Tab. 2 Effect of bud proliferation on different hormone combinations

培养基 medium	6-BA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	6- 咪唑氨基嘌呤/ (mg · L ⁻¹) 6-Furfuryl Aminopurine (KT)	接种愈伤数/个 inoculation number	不定芽数/个 seedlings number	芽分化率/% proliferation coefficient
(6)	1.0	0.5	0	50	245	490
(7)	1.0	0.01	0	50	236	472
(8)	1.0	0.01	0.2	50	288	576
(9)	0.5	0.01	0.2	50	308	616
MS ₀	0	0	0	50	168	336

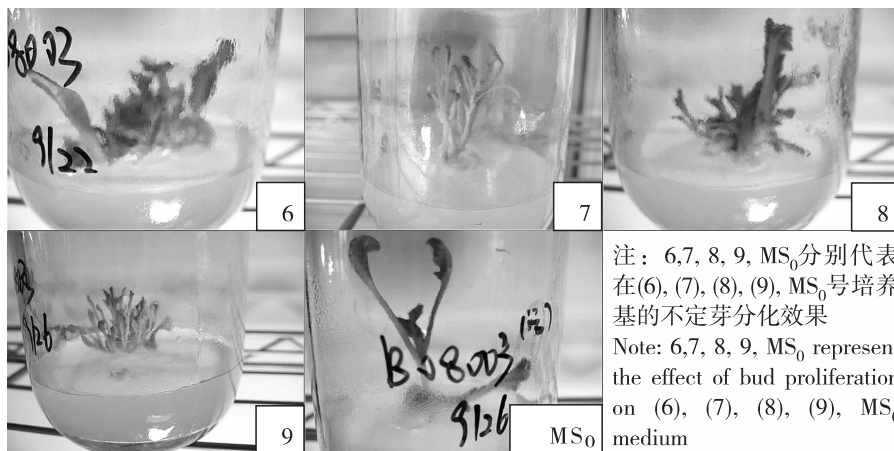


图 2 不同激素配比培养基对不定芽的分化效果

Fig. 2 Effect of bud proliferation on different hormone combinations

从表 2 和图 2 可以看出, 培养基中不加激素时芽分化率最小, 明显低于其它几种培养基的芽分化率; 培养基中加入 KT 时芽分化率明显高于不加 KT, 当 KT 为 0.5 mg/L, NAA 为 0.01 mg/L 时芽分化率高达 6.16, 且芽长势良好。

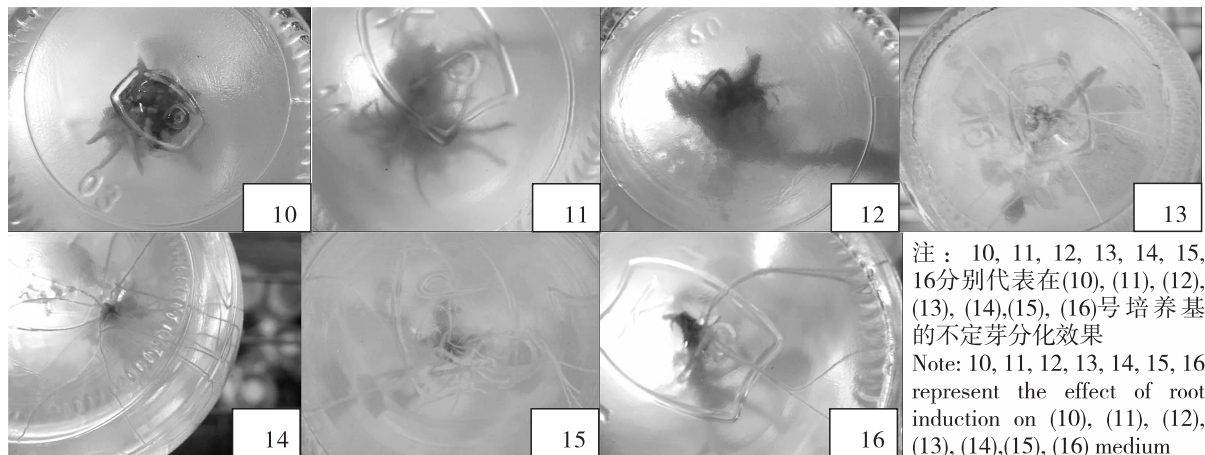
2.3 不同激素配比培养基的生根效果

将继代增殖形成的较整齐无根苗转接到生根培养基中, 结果如表 3 所示。其中 (15) 号培养基 14 d 后最先开始生根, 随即其它培养基也生长出根。20 d 后观察发现 (11) 号培养基中的试管苗根粗且较整齐, 平均生根数可达 13.5 条, 平均根长 2.6 cm, 生根率高达 86.7% (图 3)。

表 3 不同激素配比培养基的生根效果

Tab. 3 Effect of root induction on different hormone combinations

培养基 medium	NAA/ (mg · L ⁻¹)	吲哚丁酸/ (mg · L ⁻¹) indolyl propionic acid (IBA)	接种芽数/个 inoculation number	生根芽/个 root-induced number	生根率/% rhizogenic rate	平均生根/条 average root number	平均根/cm average root length
(10)	0.1	0	30	20	66.7	10.6	1.5
(11)	0.2	0	30	30	100	13.5	2.6
(12)	0.5	0	30	21	70	11.1	1.7
(13)	0	0.1	30	18	60	8.2	3.8
(14)	0	0.2	30	30	100	10.3	4.2
(15)	0	0.5	30	30	100	9.7	4.8
(16)	0	0	30	11	36.7	2.3	3.5



注：10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 分别代表在(10), (11), (12), (13), (14), (15), (16)号培养基的不定芽分化效果
Note: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 represent the effect of root induction on (10), (11), (12), (13), (14), (15), (16) medium

图 3 不同激素配比培养基的生根效果

Fig. 3 Effect of root induction on different hormone combinations

从表 3 和图 3 可以看出, 加 IBA 的 (13), (14), (15) 号培养基中的试管苗的平均根长均比加 NAA 的 (10), (11), (12) 号培养基中的长, 且生根率较高, 但观察发现加 IBA 的培养基中试管苗长出的根呈畸形, 根细长弱小, 平均根数有 5~9 条, 根长度可达 4~5 cm。加 NAA 的培养基中试管苗生根较整齐, 根粗壮, 根长 2~3 cm, 平均根数 10~13 条, 其中当 NAA 浓度为 0.2 mg/L 时, 生根率可达 86.7%, 平均根数 13.5 条, 即 (11) 号培养基生根效果最好。

2.4 炼苗和移栽

试管苗经炼苗移栽后在大田中生长 20 d 统计成活率, 其平均成活率可达 85% 以上。

3 讨论

试验结果表明, 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 的培养基诱导愈伤组织效果最好, 诱导率可高达 100%; 愈伤组织继代培养时加 KT 的不定芽分化效果明显比不加 KT 的好, 其中 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L + KT 0.2 mg/L 的培养基芽分化效果最好, 芽分化系数可达 6.16, 因本试验只采用了一种浓度的 KT, 故添加 KT 的最佳浓度有待进一步探讨; 而在试管苗的生根试验中, 加 NAA 的培养基生根效果均比 IBA 好, 表明 NAA 更适合青花菜试管苗的生根, 用 1/2MS + NAA 0.2 mg/L 进行生根培养, 生根率可高达 86.7%; 最终试管苗的成活率达到 85% 左右, 成活率并不高, 需要对炼苗、移栽方法进行摸索和研究。

本研究表明, 以花序轴作为外植体对青花菜雄性不育株进行组培快繁不仅可行且效果较好。利用青花菜的花序轴组织培养青花菜, 具有方法简便, 繁殖速度快, 不受季节影响等优点, 本实验所建立的组培快繁体系速度快且效果好, 可为云南省农业科学院园艺研究所收集的青花菜不育系的保存、研究和利用奠定基础, 并有望应用于实际生产中。

[参考文献]

- [1] 唐征, 张小玲, 刘庆, 等. 利用花托与花序轴组培快繁青花菜雄性不育株的研究 [J]. 江西农业学报, 2007, 19 (3): 54-56.
- [2] 丁云花, 简元才. 具有保健作用的营养蔬菜—青花菜 [J]. 中国食物与营养, 2003, (9): 47-49.
- [3] 李艳红, 宋秀珍, 庄木. 青花菜组织培养再生体系的研究 [J]. 首都师范大学学报: 自然科学版, 2001, 22 (3): 48-53.
- [4] ANDERSON W C, CARSTENS J B. Tissue culture propagation of broccoli (*Brassica oleracea italica* group) for use in F₁ hybrid seed production [J]. Journal of the American Society of Horticultural Science, 1977, 102 (1): 69-73.
- [5] JOHNSON B B. Invitro propagation of broccoli from stem, leaf and leaf ribex plant [J]. HortScience, 1978, 13 (3): 246-247.
- [6] 李曙轩, 裘文达. 青花菜叶片、中肋及花序柄的组织培养 [J]. 浙江农业大学学报, 1983, 9 (4): 299-306.
- [7] 赖正峰, 林加耕, 李华东, 等. 日本高干青花菜组织培养初探 [J]. 亚热带植物科学, 2005, 34 (1): 64.