

# 甘蓝型油菜下胚轴离体培养再生植株研究

刘晓庆<sup>1,2</sup>, 沈源, 蔡小宁<sup>\*</sup>, 浦惠明, 戴其根

(1. 南京晓庄学院生命科学系, 江苏南京 211171; 2. 扬州大学农学院, 江苏扬州 225009; 3. 江苏省农业科学院, 江苏南京 210014)

**摘要** [目的] 为进一步通过基因转化获得预期优良性状的甘蓝型油菜提供借鉴。[方法] 以甘蓝型油菜的下胚轴为外植体, 研究不同苗龄、不同基因型、不同预培养条件以及各种生长调节剂组合对油菜外植体高频率再生的影响。[结果] 试验中, 7 d 苗龄的甘蓝型油菜下胚轴再生频率可达 35.83%; 经 3 d 预培养处理的油菜下胚轴芽再生频率可提高至 57.78%, 油菜品种史力丰下胚轴的芽分化率较高, 达 35.00%, 其次是 N481-1, 而 N870-1 的芽分化率最低; 其最高分化率的激素组合为 6-BA 3.0 ng/L + NAA 0.05 ng/L + TDZ 1.0 ng/L, 达 38.89%。史力丰品种 6~8 d 无菌种子实生苗的下胚轴在预培养基 MS+2,4-D 1.0 ng/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 4.5 g/L 上预培养 3 d, 在最适分化培养基 MS+6-BA 3.0 ng/L + NAA 0.05 ng/L + TDZ 1.0 ng/L + AgNO<sub>3</sub> 5.0 ng/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 4.5 g/L 中培养, 再生频率最高。[结论] 建立了甘蓝型油菜下胚轴离体培养高频率再生植株模式。

**关键词** 甘蓝型油菜; 下胚轴; 离体培养; 再生频率

中图分类号 S336 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)31-13547-02

## Research on the Plant Regeneration from Hypocotyl of *Brassica napus* L.

LIU Xiao-qing et al (Department of Life Sciences, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing, Jiangsu 211171)

**Abstract** [Objective] The breeding method for the elite character of *Brassica napus* L. based on the plant gene transformation was researched in the experiment. [Method] In the experiment, the hypocotyl of *Brassica napus* L. was taken as explants. And the effect of the different seeding ages, different genotypes, different culture conditions and various growth regulator combinations on the rape regeneration with high frequency was analyzed. [Results] The regeneration frequency of plantlet from the hypocotyl of *Brassica napus* L. at 7 day-age reached to 35.83% and the regeneration frequency of plantlet from the hypocotyl of *Brassica napus* L. pre-cultured for 3 days was as high as 57.78%. The ability of rape variety Shilifeng in bud differentiation from the hypocotyl was strong (35.00%); N481-1, the second and N870-1, the lowest. The highest frequency (38.89%) of plantlet regeneration was from the hormone combination: 6-BA 3.0 ng/L + NAA 0.05 ng/L + TDZ 1.0 ng/L. The highest frequency of plant regeneration of variety Shilifeng could be obtained after the hypocotyl of its seedling at 6-8 day-age was pre-cultured on the medium MS+2,4-D 1.0 ng/L + 30 g/L sugar + 4.5 g/L agar for 3 days and then transferred on the differentiation medium with MS+6-BA 3.0 ng/L + NAA 0.05 ng/L + TDZ 1.0 ng/L + AgNO<sub>3</sub> 5.0 ng/L + 30 g/L sugar + 4.5 g/L agar. [Conclusion] The model of high-frequency plantlet regeneration from the hypocotyl of *Brassica napus* L. was established.

**Key words** *Brassica napus*; Hypocotyl; Culture in vitro; Regeneration frequency

油菜是我国重要的油料作物之一, 随着农业生物技术的发展, 人们越来越重视基因工程技术改良油菜品种。成功的基因转化主要依赖于良好的植物受体系统的建立, 从整体上看, 油菜遗传转化的效率均不是太高, 这主要与油菜低频率的再生有关。因此, 建立高效的再生体系是油菜遗传转化研究的焦点之一。近几年的研究表明, 油菜再生频率与外植体类型、基因型、生长调节剂、外植体生理状态以及 AgNO<sub>3</sub> 有关, 通常的激素组合为生长素类与 6-BA 组合, 未见使用苯基脲类细胞分裂素 苯隆(TDZ) 的研究报道<sup>[1-4]</sup>。自 1974 年 Katha<sup>[5]</sup> 首次从甘蓝型油菜的茎切片诱导出小植株以来, 国内外对甘蓝型油菜的体细胞和组织培养技术相继进行了研究<sup>[6]</sup>。在再生体系的建立中, 已从甘蓝型油菜的不同外植体如幼茎、花茎等诱导产生了植株<sup>[7]</sup>。但这些外植体的再生途径多具有周期长、再生率低, 而且种质易产生变异的特点。在油菜的离体培养试验中发现, 子叶柄、下胚轴就具备再生周期短、再生率高、培养程序简单等特点, 此外, 油菜子叶、下胚轴易被农杆菌感染和转化, 因此一般作为再生和转化体系的首选外植体。笔者在前人研究的基础上, 以甘蓝型油菜的下胚轴为外植体, 通过不同苗龄、不同基因型、不同预培养条件以及各种生长调节剂组合等因素的对比, 对影响甘蓝型油菜再生频率的因素进行研究, 旨在为进一步通过基因转化获得预期优良性状的甘蓝型油菜提供借鉴。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

**1.1.1 外植体。**甘蓝型油菜的不同品系, 包括史力丰、N883-1、N336-3、N870-1、N876-3、N481-1、N526-1 等, 以无菌种子实生苗下胚轴为外植体。

**1.1.2 培养基。**基本培养基 MS<sub>0</sub>: MS + 30 g/L 蔗糖 + 4.5 g/L 琼脂, pH 值 5.8。预培养培养基: MS<sub>0</sub> + 2,4-D 1.0 ng/L; MS<sub>0</sub> + 2,4-D 0.2 ng/L。分化培养基 B<sub>5</sub>N<sub>0.02</sub>: MS<sub>0</sub> + 6-BA 5.0 ng/L + NAA 0.02 ng/L + AgNO<sub>3</sub> 5.0 ng/L; B<sub>2</sub>: MS<sub>0</sub> + 6-BA 2.0 ng/L + AgNO<sub>3</sub> 5.0 ng/L; B<sub>1</sub>N<sub>0.1</sub>: MS<sub>0</sub> + 6-BA 1.0 ng/L + NAA 0.1 ng/L + AgNO<sub>3</sub> 5.0 ng/L; B<sub>3</sub>N<sub>0.05</sub>: MS<sub>0</sub> + 6-BA 3.0 ng/L + NAA 0.05 ng/L + AgNO<sub>3</sub> 5.0 ng/L; B<sub>3</sub>N<sub>0.05</sub>T<sub>1</sub>: MS<sub>0</sub> + 6-BA 3.0 ng/L + NAA 0.05 ng/L + TDZ 1.0 ng/L + AgNO<sub>3</sub> 5.0 ng/L。增殖与壮苗培养基: MS<sub>0</sub> + 6-BA 0.5 ng/L + NAA 0.1 ng/L + AgNO<sub>3</sub> 5.0 ng/L。生根培养基: MS<sub>0</sub> + NAA 0.2 ng/L。

### 1.2 方法

**1.2.1 种子的表面消毒与无菌苗的获得。**选取籽粒饱满、大小均一和无病虫害的油菜种子, 置于 84 消毒液 无菌水 = 1:1 的消毒溶液中浸泡 8 min, 无菌水反复冲洗 5~8 遍, 播种于不含任何激素的 MS<sub>0</sub> 固体培养基上, 置 25℃、14 h 光照/10 h 黑暗的光照周期下培养。

**1.2.2 不同苗龄的外植体分化。**切取不同苗龄 5、6、7、8、9 d 史力丰种子实生苗的下胚轴于分化培养基 B<sub>5</sub>N<sub>0.02</sub> 上培养, 每个培养瓶接种 10 个外植体, 每处理至少接种 30 个外植体, 重复 3 次, 30 d 统计其分化率, 研究苗龄对下胚轴外植体芽再生频率的影响。

**1.2.3 不同预培养处理下的外植体分化。**切取 7 d 苗龄史

基金项目 南京晓庄学院重点项目(2007NXY01); 生态学校级重点学科项目(2005-2008) 资助。

作者简介 刘晓庆(1984-), 女, 江苏扬州人, 硕士研究生, 研究方向: 生态学。\* 通讯作者, 研究员, E-mail: bioxnci@yahoo.com.cn。

收稿日期 2008-08-19

力丰种子实生苗的下胚轴接种于含1.0 ng/L 2,4-D 的MS<sub>0</sub> 预培养基和含0.2 ng/L 2,4-D 的MS<sub>0</sub> 预培养基中,分别预培养3 d 后,接种于分化培养基B<sub>5</sub>N<sub>0.02</sub> 上,30 d 统计其分化率。

**1.2.4 不同品种的外植体分化。**取不同品种的油菜种子经消毒后置于MS<sub>0</sub> 培养基上培养,在最适苗龄期观察其生长状况,并分别切取其实生苗的下胚轴于分化培养基B<sub>5</sub>N<sub>0.02</sub> 上培养,30 d 统计其分化率。

**1.2.5 不同分化培养基的外植体分化。**切取最适苗龄史力丰种子实生苗的下胚轴于不同生长调节剂及5.0 ng/L AgNO<sub>3</sub> 的MS<sub>0</sub> 培养基(B<sub>2</sub>、B<sub>1</sub>N<sub>0.1</sub>、B<sub>3</sub>N<sub>0.05</sub>、B<sub>3</sub>N<sub>0.05</sub>T<sub>1</sub>) 上,30 d 统计其分化率。

**1.2.6 芽苗的增殖、扶壮与生根。**芽苗的增殖扶壮是将分化出的芽苗连同愈伤组织一起切下转入继代增殖培养基中,待愈伤组织继续分化,使已分化的芽苗变得粗壮。而生根是将长1~2 cm 的芽苗切下,接种至生根培养基上直接诱导生根。

分化率 = 分化出芽的外植体数 / 接种的外植体数 × 100%。

## 2 结果与分析

**2.1 不同苗龄对下胚轴再生植株的影响** 试验结果表明,以6~8 d 幼苗的下胚轴为外植体有利于芽的分化,可得到较高的再生频率。试验中7 d 苗龄的甘蓝型油菜下胚轴再生频率可达35.83%,当苗龄为5 d 和9 d 时,再生频率明显下降,分别为17.65%和19.17%(表1)。

表1 苗龄对油菜下胚轴分化的影响

Table 1 Effects of seedling age on the hypocotyl differentiation of Brassica napus L.

苗龄 d	出芽外植体数 个	分化率 %
Seedling age	Explant number with shoots	Differentiation rate
5	21	17.65
6	31	25.83
7	43	35.83
8	32	26.67
9	23	19.17

注:接种外植体数均为120个。

Nte: The number of inoculated explants in each treatment is 120.

**2.2 预培养对下胚轴再生植株的影响** 试验结果表明,经3 d 预培养处理的外植体的芽再生频率有较大幅度的提高,下胚轴芽再生频率提高至57.78%,明显高于没有预培养的试验组(35.56%)。且浓度为1.0 ng/L 比浓度为0.2 ng/L 的2,4-D 更有利于提高芽再生频率(表2)。

**2.3 不同基因型对芽分化的影响** 试验结果表明,不同基因型芽苗分化频率不同。在7个基因型中,史力丰下胚轴的芽分化率较高,达35.00%,其次是N481-1,而N370-1的芽分化率最低,仅为13.33%,说明基因型不同,对激素的反应也不同,有些基因型如史力丰、N481-1等,对激素6-BA 和NAA 敏感,从而可以得到较高的芽分化率,而得到较低分化率的N481-1等基因型则对其不太敏感(表3)。

**2.4 不同激素组合对芽分化的影响** 接种后20 d 左右,部分愈伤组织表面开始出现绿色芽点,30 d 统计芽苗分化频率。由表4可知,不同处理间的芽苗分化频率有很大差别。

试验中最高分化率的激素组合为6-BA 3.0 ng/L + NAA 0.05 ng/L + TDZ 1.0 ng/L,达38.89%,说明激素的种类和浓度都对外植体的再生频率有很大影响。

表2 不同预培养条件对芽再生频率的影响

Table 2 Effects of different pre-culture conditions on the regeneration frequency of buds

2,4-D 浓度 ng/L	出芽外植体数 个	分化率 %
2,4-D concentration	Explant number with shoots	Differentiation rate
1.0	52	57.78
0.2	34	37.78
0	32	35.56

注:接种外植体数均为90个。

Nte: The number of inoculated explants in each treatment is 90.

表3 不同基因型对芽分化的影响

Table 3 Effects of different genotypes on the bud differentiation

基因型	出芽外植体数 个	分化率 %
Genotype	Explant number with shoots	Differentiation rate
史力丰 Silifeng	21	35.00
N383-1	15	25.00
N336-3	13	21.67
N370-1	8	13.33
N376-3	13	21.67
N481-1	18	30.00
N526-1	12	20.00

注:接种外植体数均为60个。

Nte: The number of inoculated explants in each treatment is 60.

表4 不同激素组合对芽分化的影响

Table 4 Effects of different hormone combinations on the bud differentiation

激素组合 ng/L			出芽外植体数 个	分化率 %
Hormone combinations			Explant number with shoots	Differentiation rate
6-BA	NAA	TDZ		
2.0	0	0	13	14.44
1.0	0.10	0	19	25.44
3.0	0.05	0	22	22.44
3.0	0.05	1.0	35	38.89

注:接种外植体数均为90个。

Nte: The number of inoculated explants in each treatment is 90.

**2.5 芽苗生根结果** 分化出的正常芽苗长到2 cm 左右时,切下转移到生根培养基上培养,15 d 左右开始生根,在生根培养基上,80%以上的芽苗能够生根,并正常生长,不同处理之间无明显差异。

## 3 结论与讨论

(1) 研究表明,甘蓝型油菜高效再生体系的建立与生长调节剂、基因型、无菌苗苗龄等因素密切相关。激素在植物的组织培养中起着决定性作用,植物细胞具有全能性,但对于特定的器官或细胞能否表现出全能性则取决于是否具有合适的激素诱导,细胞分裂素与生长素的合理配置才能有较高的诱导频率。在油菜的组织培养中,能分化出再生植株的培养基大多数都是采用6-BA 和NAA 组合<sup>[8]</sup>,未见使用苯基脲类细胞分裂素TDZ 的研究报道,而笔者使用了TDZ 与6-BA 和NAA 组合,取得了较好的结果。试验结果表明,TDZ 对于甘蓝型油菜的组织培养有很好的提高再生频率的效果。该研究中以6-BA 3.0 ng/L、NAA 0.05 ng/L 与TDZ 1.0 ng/L 搭

(下转第13582页)

由表3可见,大肠杆菌组和金黄色葡萄球菌组都在苜蓿提取液中黄酮浓度为5.12 ng/ml 时,血平板上无菌落生长;

绿脓杆菌组和停乳链球菌组分别在苜蓿提取液浓度为1.28和2.56 ng/ml 时,血平板上无菌落生长。

表2 二倍稀释法测定结果

Table 2 The determination results by double dilution method

细菌 Bacteria	苜蓿提取液浓度 Concentration of alfalfa extract ng/ml							
	5.12	2.56	1.28	0.64	0.32	0.16	0	5.12
金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus	+	±	-	-	-	-	-	+
停乳链球菌 Streptococcus dysgalactiae	+	+	±	-	-	-	-	+
绿脓杆菌 Pseudomonas aeruginosa	+	+	+	±	-	-	-	+
大肠杆菌 Escherichia coli	+	±	-	-	-	-	-	+

注: + 表示清亮或无菌环; - 表示有菌环; ± 表示无菌环或轻浊。

Note: + stands for clear or no bacteria ring; - stands for having bacteria ring; ± stands for no bacteria ring or slightly turbid.

表3 血平板鉴定无菌落生长的苜蓿提取液黄酮最低浓度

Table 3 Minimal concentration of flavone from alfalfa extract without bacterial growth by blood plate identification ng/ml

细菌 Bacteria	浓度 Concentration	细菌 Bacteria	浓度 Concentration
金黄色葡萄球菌 S. aureus	5.12	绿脓杆菌 P. aeruginosa	1.28
停乳链球菌 S. dysgalactiae	2.56	大肠杆菌 E. coli	5.12

一定的抑制作用,且抑菌作用随着剂量的增加而增强。武雪芬<sup>[7]</sup>、花蕾<sup>[8]</sup>等研究发现,金银花叶提取物和桑叶水提浸膏都表现出较好的抑菌效果。

笔者以苜蓿提取液中的黄酮浓度作为剂量参考指标,为下一步针对提取液中黄酮及其他成分具体作用的研究奠定了基础。有关苜蓿提取液中与抑菌作用相关的有效成分及具体的抑菌机制有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 赵汝能. 甘肃中草药资源志 M. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2004: 1310 - 1313.
- [2] 甘肃农业大学. 兽医微生物学试验指导 M. 北京: 农业出版社, 1979: 27 - 30.
- [3] 陈晓青, 蒋新宇, 刘佳佳. 中草药成分分离分析技术与方法 M. 北京: 化学工业出版社, 2006: 57 - 62.
- [4] 谢仲权, 牛树琦, 刘凤华. 天然物中草药饲料添加剂研究方法 M. 北京: 中国农业科技出版社, 2001: 85 - 88, 96 - 97.
- [5] 翟爱华, 韩艳慧, 杨健. 麦胚黄酮抑菌活性研究 J. 黑龙江八一农垦大学学报, 2005, 17(5): 69 - 72.
- [6] 井乐刚, 张永忠, 田璐. 大豆异黄酮抑菌活性的研究 J. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2004, 20(1): 79 - 81.
- [7] 武雪芬, 白雁. 金银花叶药用成分的提取及抑菌试验研究 J. 中成药, 2001, 23(6): 448 - 449.
- [8] 花蕾, 张文清, 赵显峰. 桑叶水提浸膏的抑菌作用研究 J. 上海生物医学工程, 2007, 28(1): 16 - 18.

#### 参考文献

- [1] 郑光华. 控制柑橘种子生命力的研究 J. 中国农业科学, 1980(2): 37 - 43.
- [2] 伍晓明, 钱秀珍. 低含水量保存油菜种子遗传稳定性研究 J. 中国油料, 1996(4): 64 - 67.
- [3] VERTUCCI C W, ROOS E E. Theoretical basis of protocols for seeds to rape [J]. Plant Physiology, 1990, 4: 1019 - 1023.
- [4] 唐桂香, 周伟军. AgNO<sub>3</sub> 对甘蓝型油菜子叶柄外植体植株再生的影响 [J]. 中国油料作物学报, 2001, 23(3): 9 - 11.
- [5] KARTHA K K, GAMBORG O L, CONSTABEL F. In vitro plant formation from stem explants of rape ( Brassica napus cv. 'Zephyr' ) [J]. Plant Physiol, 1974, 31: 217 - 220.
- [6] 王艳, 曾幼玲, 张富春, 等. 新疆甘蓝型油菜下胚轴的组织培养和植株再生研究 J. 新疆农业科学, 2005, 42(1): 24 - 28.
- [7] 王景雪, 孙毅. 芸薹属 ( Brassica ) 植物的组织培养和基因转化 [J]. 山西农业大学学报, 1996, 16(3): 9 - 14.
- [8] MIKI B L, HUANG A, CHAREST P J. Transgenic oilseeds and vegetables [C] // KANGS D, WU R. Transgenic plant. Academic Press Inc, 1993: 103 - 127.
- [9] 黄琼华, 杨光伟, 李德谋, 等. 农杆菌介导法将 FPF1 基因导入油菜的研究初报 J. 西南农业大学学报, 2002, 24(2): 124 - 127.
- [10] 石淑稳, 周永明, 孙学成, 等. 甘蓝型油菜遗传转化体系的研究 J. 华中农业大学学报, 1998, 17(3): 205 - 210.

### 3 小结与讨论

从上述二倍稀释法测定和血平板鉴定的结果可知, 苜蓿提取液对绿脓杆菌和停乳链球菌有较好的抑菌效果, MC 分别为 1.28 2.56 ng/ml; 而对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果一般, MC 均是 5.12 ng/ml。从苜蓿提取液作用的菌种类别来看, 对 G<sup>+</sup> 和 G<sup>-</sup> 均有较好的抑菌效果, 表现出广谱抗菌作用。

有关黄酮类化合物抑菌效果的试验研究较多, 翟爱华等<sup>[5]</sup>用二倍稀释法和管碟法测定麦胚黄酮的最低抑菌浓度, 对灰葡萄孢为 1.250 ng/ml, 大肠杆菌为 1.625 ng/ml, 金黄色葡萄球菌为 3.250 ng/ml。井乐刚等<sup>[6]</sup>用纸片法测定大豆异黄酮的抑菌效果, 发现其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都有

(上接第13548页)

配诱导芽苗分化的效果最佳。

(2) 基因型在组织培养中的作用主要表现为对外源激素的反应不同。因此在试验中, 为了获得较高的再生频率, 还需要在基因型之间进行选择, 从试验的结果来看, 芽苗分化诱导率最高的品种是史力丰。

(3) 2,4-D 对芽器官具有很强的诱导作用<sup>[8-9]</sup>, 在含 1.0 ng/L 2,4-D 的 MS 培养基上短时间地预培养, 可明显地提高甘蓝型油菜下胚轴的再生频率, 这与前人的研究结果类似<sup>[7,10]</sup>。

(4) 根据试验, 建立了合适的油菜组织培养程序: 6~8 d 无菌种子实生苗的下胚轴在预培养培养基 MS + 2,4-D 1.0 ng/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 4.5 g/L 上预培养 3 d, 然后转至分化培养基 MS + 6-BA 3.0 ng/L + NAA 0.05 ng/L + TDZ 1.0 ng/L + AgNO<sub>3</sub> 5.0 ng/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 4.5 g/L 中培养, 再生频率较高。