

红菜薹离体再生体系的建立

王晨璐^{1,2}, 陈龙正^{1*} (1.江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏南京 210014; 2.金陵科技学院园艺园林学院, 江苏南京 211169)

摘要 [目的]为建立红菜薹的离体再生体系,提高红菜薹的生物技术育种效率。[方法]以红菜薹带柄子叶为外植体,选用 TDZ、NAA 两种激素,进行离体组织培养。[结果]以带柄子叶在 1/2MS+TDZ 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基上诱导效果最好,诱导率达 9.8%,以 MS+NAA 0.2 mg/L 培养基诱导生根效果最好。[结论]该研究为在生物技术育种层面上的研究奠定基础。

关键词 红菜薹;离体再生;建立

中图分类号 S634 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)34-0030-03

Establishment of *in vitro* Regeneration System of *Brassica campestris*

WANG Chen-lu^{1,2}, CHEN Long-zheng¹ (1. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing, Jiangsu 210014; 2. College of Horticulture, Jinling Institute of Technology, Nanjing, Jiangsu 211169)

Abstract [Objective] To establish the *in vitro* regeneration system of *B. campestris* L., and to improve the efficiency of biotechnology breeding. [Method] Cotyledon with petiole of *B. campestris* L. were used as explants, two kinds of hormones TDZ and NAA were used *in vitro* tissue culture. [Result] The induction rate on the 1/2 MS+TDZ 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L medium was the highest, the induction rate was 9.8%, and the most suitable medium for rooting was MS+NAA 0.2 mg/L. [Conclusion] This research provided basis for the research on biotechnology breeding.

Key words *B. campestris* L.; *in vitro* regeneration; Establishment

菜薹(*Brassica campestris* L.)又名菜心,是芸薹属芸薹种白菜亚种的菜薹变种^[1],原产于我国南部地区,是两广地区及海南、台湾等地主要特菜之一。离体再生体系的建立在作物种质创新中具有重要作用,随着转基因技术、基因编辑技术的日益发展,离体高效率的再生体系显得尤为重要。但是,蔬菜作物的离体再生相对困难,因此建立一套简便实用的离体再生体系对种质创新、生物技术育种具有重要意义。

许多研究者采用菜薹的带柄子叶、原生质体、游离小孢子等进行培养,均取得了一定的成果^[2-4]。张鹏等^[5]研究认为菜薹以子叶-子叶柄为外植体,不定芽诱导率最高。而何晓明等^[6]则认为菜薹再生能力在不同品种间差异很大,Zhang 等^[7]指出大白菜的基因型对它的再生能力影响极大,虽然一些菜薹品种已经可以进行再生,但是由于材料的专一性强,许多未研究过的品种在基因工程技术方面的应用还是会受到限制。因此,笔者以未报道的红菜薹为研究对象,以带柄的子叶为外植体,探讨 TDZ、NAA 等不同激素浓度对再生体系的影响,旨在为其在生物技术育种层面上的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 红菜薹材料为 TKD201701,种子由江苏省农业科学院蔬菜研究所提供。

1.2 无菌苗的获取 将种子放到无菌水中浸泡 15~20 min;取出种子,用 75% 的酒精处理 40 s,无菌水冲洗 3 次;最后放到 30% 双氧水中浸泡 15 min,再用无菌水冲洗 5 次,无菌滤纸吸干表面水分等待播种。将种子接种于 MS 培养基中。25 ℃ 下黑暗中萌发 2 d,然后移至 16 h/d 光照,3 000 lx 光强条件下培养。

1.3 分化培养 以 5 d 苗龄的幼苗为外植体材料。从中挑选健壮的幼苗,切取长 0.5 cm 左右带柄子叶放入培养皿中,每个处理接种 16~20 个外植体。每个处理重复 3 次。接种后放置在 25 ℃、2 500 lx 光照强度、12 h/d 光照时间的环境下进行培养。7 d 后统计各处理的出芽数,计算分化率。

分化培养基:1/2MS 培养基为基本培养基,添加不同浓度的 TDZ、NAA 等植物激素,形成不同的处理条件。T₁~T₉ 处理的激素添加的种类及用量见表 1。

表 1 分化培养基中不同激素浓度处理的比较

Table 1 Comparison of the treatments of different hormone concentrations in differentiated medium mg/L

处理编号 Treatment code	TDZ	NAA	AgNO ₃
T ₁	1.0	0.01	5.0
T ₂	1.0	0.05	5.0
T ₃	1.0	0.10	5.0
T ₄	2.0	0.01	5.0
T ₅	2.0	0.05	5.0
T ₆	2.0	0.10	5.0
T ₇	3.0	0.01	5.0
T ₈	3.0	0.05	5.0
T ₉	3.0	0.10	5.0
对照(CK)	0	0	0

1.4 组培苗的生根培养 将外植体上分化出的不定芽剪下来,转到 MS 基本培养基上培养。待组培苗生长到 5~6 cm,并且长出 2 到 3 片幼叶时,将其分别转到 0、0.1、0.2 mg/L NAA 浓度的生根培养基中,促不定根萌发。30 d 后取出与 CK(0 mg/L)进行比较,筛选出合适的 NAA 浓度,用于诱导生根。

1.5 组培苗的移栽 组培苗接到生根培养基 30~35 d 后,待组培苗已长出 不定根,用流水冲洗净组培苗根系上的培养基,将其栽入已灭菌的基质中,其上覆盖塑料膜,保持适合其生长的温度、湿度、光照,10 d 左右移栽大田,10 d 后观察其

基金项目 公益性行业(农业)科研专项(201403032)。
作者简介 王晨璐(1995—),女,江苏扬州人,从事蔬菜遗传育种研究。
* 通讯作者,研究员,博士,从事蔬菜遗传育种研究。
收稿日期 2018-06-19

成活与否。

2 结果与分析

2.1 红菜薹在不同激素配比的分化培养基上的诱导效果 将带柄子叶接到 $T_1 \sim T_9$ 处理的分化培养基中,7 d 后分别观察不同处理的幼苗诱导数。观察发现 $T_1 \sim T_5$ 处理只有愈伤产生,并无芽点形成。 $T_6 \sim T_9$ 处理中部分带柄子叶有不定芽产生(图 1)。

T_6 、 T_7 、 T_8 处理尽管可以分化出不定芽,但分化率很低。 T_6 处理分化率为 1.79%、 T_7 处理的分化率为 2%、 T_8 处理的分化率为 3.85%。 T_9 处理分化率可达 9.80%,表明 T_9 处理激素比例是最佳配比(表 2)。

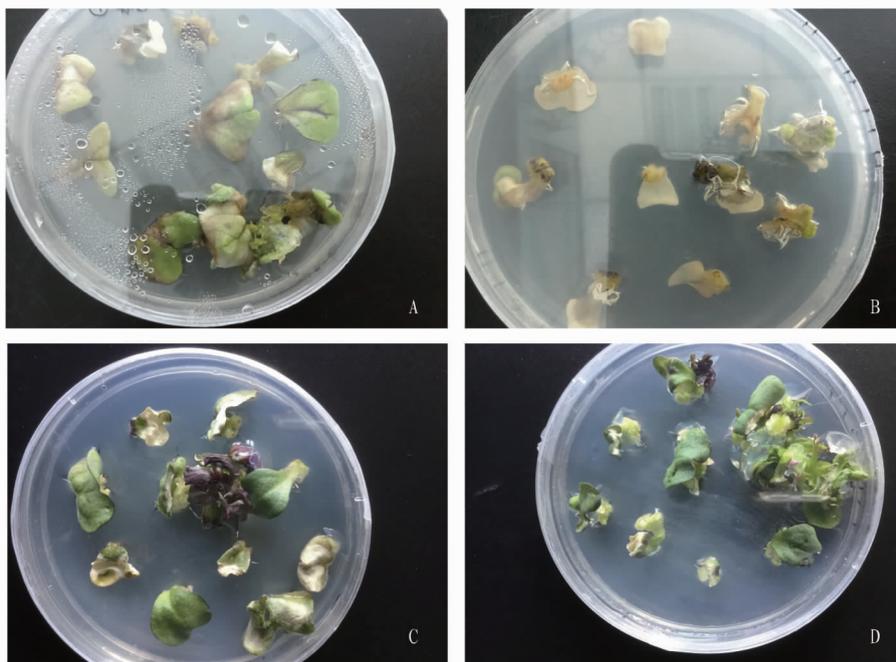
2.2 红菜薹生根培养基的选择 将外植体分化获得的芽接种到 MS 基本培养基上培养(图 2A),10~20 d 后可发育成小植株(图 2B)。获得的无菌苗接到不同 NAA 浓度的培养基中进行生根培养(图 2C)。根据图 2D 可知,含有 0.2 mg/L NAA 的培养基中长出的根数目最多,根细长、粗壮,植株生长

势最好。因此,红菜薹无菌苗以 0.2 mg/L NAA 培养基诱导,最利于红菜薹生根,并最终生长成苗(图 2E)。

表 2 不同处理对不定芽分化的影响

Table 2 Effects of different concentrations of hormones on the differentiation

处理编号 Treatment code	接种个数 Inoculated number	出现不定芽 的外植体数 Number of explants with adventitious buds	分化率 Differentiation rate %
T_1	50	0	0
T_2	59	0	0
T_3	53	0	0
T_4	50	0	0
T_5	50	0	0
T_6	56	1	1.79
T_7	50	1	2.00
T_8	52	2	3.85
T_9	51	5	9.80
对照(CK)	0	0	0



注:A: T_6 ;B: T_7 ;C: T_8 ;D: T_9

图 1 不同激素浓度对分化的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of hormones on the differentiation

3 结论与讨论

许会会等^[4]对麻叶薹菜研究发现,最适培养基为 MS+BA 5 mg/L+ZT 2 mg/L+NAA 0.7 mg/L,分化率为 67.8%。在此基础上,笔者尝试了十几种在菜薹、菜心、不结球白菜、大白菜上已经报道的配方,这些配方在红菜薹 TKD201701 上均未得到再生芽(数据未发表),推测这个红菜薹基因型可能属于顽拗型基因型。尽管比较难再生,但在该研究中,在培养基 1/2MS+TDZ 3.0 mg/L +NAA 0.1 mg/L 上,红菜薹仍然得到 9.8%的分化率。在分化率统计上,许多研究利用再生的芽数/外植体数来计算,这样比例很高。该研究利用试验中能够再生不定芽的外植体数/总外植体数来计算,客观的反应一个基因

型的难易程度。虽然,该研究中红菜薹分化率不高,但是仍然是红菜薹在基因工程方面的后续研究奠定了基础。

在诱导菜薹不定芽分化的培养基上,尽管 T_1 处理与 T_7 处理、 T_2 与 T_8 处理、 T_3 与 T_9 处理的培养基都添加了等量的硝酸银与萘乙酸,但是 T_1 、 T_2 、 T_3 生理培养基上却没有芽再生,由此可见 TDZ 在芽的再生上起较大的作用。而随着 TDZ 浓度的升高,再生率也变高,这同样验证了 TDZ 的重要性。低浓度的 TDZ 培养基中,不同浓度的 NAA 并不能起到提高再生率的作用。但是在高浓度 TDZ 培养基上,随着 NAA 浓度的提高,其芽再生率也在变高。由此可见 TDZ、NAA 在诱导菜薹带柄子叶的再生上都起到了一定的作用,但是 TDZ 的

作用更关键。



注:A.再生芽;B.再生植株;C.生根的再生植株;D.不同浓度 NAA 生根效果;E.驯化植株

Note: A.Regenerated bud;B.Regenerated plant;C.Rooting of regenerated bud;D.Rooting effect of different concentrations of NAA;E.Domesticated plantlet

图2 不同激素浓度对组培苗生根的影响

Fig.2 Effects of different hormone concentrations on rooting

参考文献

- [1] 李曙轩,李树德,蒋先明,等.中国农业百科全书·蔬菜卷[M].北京:农业出版社,1990:33-34.
- [2] 叶志彪,李汉霞.红菜薹原生质体培养植株再生[J].园艺学报,1993,20(4):405-406.
- [3] 王涛涛,李汉霞,张继红,等.红菜薹游离小孢子培养与植株再生[J].武汉植物学研究,2004,22(6):569-571.
- [4] 许会会,赵美爱,铃泰琳,等.薹菜再生体系的建立[J].西北农业学报.

2010,19(8):198-201.

- [5] 张鹏,凌定厚.提高菜心离体植株再生频率的研究[J].植物学报,1995,37(11):902-908.
- [6] 何晓明,潘瑞焱.薹菜组织培养和植株再生研究[J].上海农业学报,2001,17(2):34-40.
- [7] ZHANG F L,TAKAHATA Y,XU J B.Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.ssp.pekinensis) [J].Plant Cell Rep,1998,17(10):780-786.

(上接第29页)

3 结论

密度、施氮、施磷、施钾4个因素对产量产生一定影响,且产量随各因素的提高呈开口朝下的抛物线,存在产量最高点,各抛物线的顶点就是各单因子的最高产量,对应的是各因子的最优投入量。在试验设计范围内,当密度为123 750株/hm²时,产量为2 153.5kg/hm²;施N为52.5 kg/hm²时,产量为2 159.2 kg/hm²;施P₂O₅为52.5 kg/hm²时,产量为2 155.1 kg/hm²;施K₂O为58.5 kg/hm²时,产量为2 163.7 kg/hm²。

试验地区豇豆获得1 875 kg/hm²的产量,种植密度、氮肥、磷肥和钾肥的最优取值范围为:种植密度为120 465~128 295株/hm²,施N 40.49~54.66 kg/hm²,施P₂O₅ 42.92~56.24 kg/hm²,施K₂O 57.91~65.93 kg/hm²。

参考文献

- [1] 山西省统计局.山西统计年鉴-2014[EB/OL].[2018-06-05].http://www.statssx.gov.cn/tjsj/tjnj/nj2014/html/njcx.htm.
- [2] 李安林,熊双丽.豇豆籽蛋白的氨基酸含量与营养价值评价[J].食品研究与开发,2008,29(6):147-150.

- [3] 郑燕文.豇豆CAT活性的研究[J].安徽农业科学,2010,28(5):2036-2037,2366.
- [4] 王卫平,薛智勇,朱凤香,等.豇豆对营养元素的吸收积累与分配规律研究[J].水土保持学报,2013,27(6):158-161,171.
- [5] 梁银丽,熊亚梅,吴燕,等.日光温室豇豆产量和品质对水分和氮素水平的响应[J].水土保持学报,2008,22(5):142-145.
- [6] 徐胜光,廖新荣,蓝佩玲,等.两种不同土壤上镁和微肥对豇豆营养品质和产量的影响[J].南京农业大学学报,2005,28(2):59-63.
- [7] 祖艳侠,郭军,顾训峰,等.播期、密度对红豇豆的产量及部分产量性状的影响[J].江苏农业科学,2010(6):252-253.
- [8] 姜春霞,刘恩科,张伟,等.山西旱地豇豆品种鉴定比较[J].安徽农业科学,2017,45(23):32-34.
- [9] 王桂那,邢宝龙.晋北豇豆新品种鉴定筛选与评价[J].现代农业科技,2016(20):71-72.
- [10] 王洪皓,徐敏,赵秋.果园间作粒用豇豆播期与密度试验研究[J].农学报,2017,7(10):45-50.
- [11] KOWALSKI J.Optimal estimation in rotation patterns[J].J Statist Plan Infer,2009,139(4):1405-1420.
- [12] 谷叶,杨克军,林清河.肥密因子对寒地玉米产量效应分析[J].黑龙江八一农垦大学学报,2017,29(1):22-27,37.
- [13] 曲威,刘作新,张法升,等.水肥耦合对玉米籽粒全氮含量的影响[J].生态学杂志,2010,29(9):1749-1753.
- [14] 杨艳君,郭平毅,曹玉凤,等.施肥水平和种植密度对张杂谷5号产量及其构成要素的影响[J].作物学报,2012,38(12):2278-2285.
- [15] 杨洪宾,张建立,徐成忠,等.垄作小麦产量与氮磷钾肥三因子数学模型的优化解析[J].山东农业科学,2006(4):32-34.