

应用正交设计建立青花菜植株的再生体系

徐晓峰, 黄学林*

(中山大学生命科学学院生物系, 广东广州 510275)

摘要: 通过 $L_{16}(4^5)$ 正交试验, 研究最适合青花菜 2 周龄下胚轴愈伤组织诱导和不定芽发生的植物生长调节物质的种类和浓度组合。结果发现在 NAA、6-BA、TDZ 和 KT 四种激素中, NAA 对下胚轴愈伤组织发生指数、不定芽发生频率的影响作用最大, 确定以 MS+NAA 0.25 mg/L+6-BA 0.25 mg/L+TDZ 0.01 mg/L (琼脂 0.8%, 蔗糖 3%, pH5.8) 作为单因子试验的培养基。NAA、6-BA 和 TDZ 浓度的单因子试验结果表明最适合下胚轴的培养基配方为: MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+TDZ 0.06 mg/L (琼脂 0.8%, 蔗糖 3%, pH5.8)。

关键词: 青花菜; 植株再生; 正交试验

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)06-0513-04

Establishment of broccoli plant regeneration system with orthogonal design

XU Xiao-feng, HUANG Xue-lin*

(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Different kinds and concentrations of 4 plant hormones were tested with orthogonal design- $L_{16}(4^5)$ for their optimal effect on shoot regeneration and callus inducement in broccoli hypocotyls. The results showed that the effect of the four plant hormones to shoot regeneration frequency and callus formation index is in the order of NAA>TDZ>KT>6-BA and NAA>TDZ>KT>6-BA respectively, and the best medium for broccoli hypocotyl culture is MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+TDZ 0.06 mg/L+agar 0.8% containing sugar 3%(pH5.8).

Key words: broccoli; plants regeneration; $L_{16}(4^5)$

前人对青花菜组织培养再生体系已作了一定的研究, 但所采用的品种各不相同, 外植体的种类、大小、生理年龄也不一致, 所用激素种类、组合及浓度也不一样。国外 Anderson 等采用花芽, Jonson 等用叶片、中肋和茎作外植体, 研究了青花菜的植株再生体系建立的可能性^[1,2]; 国内钟仲贤、陈澍堂采用花蕾及各种花器官(花柄、萼片、花瓣、子房、花药), 李曙轩、裘文达采用室外青花菜的叶片、中肋及花序柄, 王怀名采用无菌苗的花蕾、子叶、子叶节、胚根和

下胚轴作为外植体, 分别研究青花菜试管苗无性繁殖的合适条件^[3~5]。近年来, 人们采用种子发芽无菌苗作研究材料, 它能够获得生理状态比较一致的外植体, 有助于人们深入探讨植物生长调节物质对外植体愈伤组织分化和不定芽发生的作用。同时采用正交试验比较各种常用激素组合及配比浓度的优劣, 就能确定最适合外植体愈伤组织诱导以及芽分化的培养基配方, 只有这样才能建立起高效的植株再生体系。

收稿日期: 2001-09-10

作者简介: 徐晓峰(1970-), 男, 浙江衢州人, 博士, 讲师, 植物学专业, 现工作单位: 广东省珠海市前山梅溪双龙山, 农业科学研究中心, 邮编: 519070。* 为通讯作者

1 材料与方 法

1.1 植物材料

“正盐水”322(F₁)青花菜 (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) 种子经常规消毒后,接种在 1/2 MS 培养基上,27±1 °C 下暗培养 2~3 d 后萌发待用。取 2 周龄的无菌苗下胚轴(切成 0.8 cm 左右)作为外植体。

1.2 正交试验 L₁₆(4⁵)设计

表头设计和各因子水平状况见表 1。各处理的培养基均以 MS 作为基本培养基,附加 30 g/L 蔗糖,0.65%琼脂粉,pH 为 5.8。培养基配制表(略)。

表 1 L₁₆(4⁵)正交设计
Table 1 The orthogonal design L₁₆(4⁵)

列号 Arrange	1	2	3	4	5
因子 Factors	NAA	KT	6-BA	TDZ	
水平 Disposals	因子 Factors				
	NAA	KT	6-BA	TDZ	
1	1	1	0	0.02	
2	0.5	0	0.5	0.01	
3	0.25	0.25	1	0	
4	0	0.5	0.25	0.005	

结果分析的指标:正交试验 L₁₆(4⁵)中,外植体培养 4 周后,统计各处理的愈伤组织发生指数 CFI

表 2 L₁₆(4⁵)试验结果
Table 2 The experiment result of L₁₆(4⁵)

处理号 Disposals	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13~16
CFI	100	100	100	38.9	86.1	55.6	100	100	100	100	66.7	66.1	0
bf	0	27.8	0	0	0	13.9	0	41.7	66.7	86.1	19.4	0	0

表 3 L₁₆(4⁵)试验结果分析
Table 3 The analysis of L₁₆(4⁵)

列号 Arrange	1	2	3	4	
处理因子 Factors	NAA	KT	6-BA	TDZ	
CFI	X _{1,1}	84.73	71.53	75	66.68
	X _{2,1}	85.43	51.25	63.05	71.53
	X _{3,1}	83.20	66.68	59.73	48.63
	X _{4,1}	0	63.9	55.58	66.53
	R _{j1}	85.43	20.28	19.42	22.90
Bf	X _{1,2}	6.95	16.68	27.1	22.23
	X _{2,2}	13.9	10.43	6.95	21.53
	X _{3,2}	43.05	4.85	21.53	20.15
	X _{4,2}	0	32.45	8.43	0
	R _{j2}	43.05	27.6	20.15	22.23

(Callus formation index)、不定芽发生频率(bf)和平均每块愈伤组织诱导出的不定芽数目(bn)。通过统计分析,挑选出最佳组合;并以此为基础,进行单因子试验:NAA 浓度;6-BA 浓度;TDZ 浓度。以培养 4 周后统计 CFI 和 bf 作为指标,确定愈伤组织诱导和不定芽产生的最佳培养基配方。

$$\text{愈伤组织发生指数(CFI)} = \frac{\text{本次实验发生愈伤组织的外植体数}}{\text{本次实验中接入的外植体总数}} \times 100$$

$$\text{不定芽发生频率(bf)} = \frac{\text{诱导出不定芽的愈伤组织块数}}{\text{发生愈伤组织的总块数}} \times 100\%$$

$$\text{bn} = \frac{\text{出芽总数}}{\text{诱导出不定芽的愈伤组织块数}}$$

2 结 果

2.1 正交试验 L₁₆(4⁵)的结果

愈伤组织诱导的正交试验结果见表 2、3。综合表 1、2、3 可看出,各因素不同水平对愈伤组织发生指数、不定芽发生频率的影响大小分别是:NAA>TDZ>KT>6-BA 和 NAA>KT>TDZ>6-BA。且它们的存在均会提高愈伤组织的发生指数。其中,NAA 是最主要的因素,不加 NAA 就诱导不出愈伤组织。根据对愈伤组织的观察,随着 NAA 浓度的提高,愈伤组织量随之增加。外植体在 0~15 d 内受伤细胞开始脱分化启动,其切口两端逐渐膨大,出现不规则分化、生长迅速的细胞团,呈现哑铃状;第十五天开始,整块愈伤组织的颜色逐渐从绿色变

成无色,并且愈伤组织表面出现了肉眼可见的绿色小点,最后,这些小点分化成了小芽,切割小芽转入生根培养基能长成正常的小苗。

综上所述,确定培养基配方 MS1(MS+NAA 0.25 mg/L+6-BA 0.25 mg/L+TDZ 0.01 mg/L)是该实验中愈伤组织诱导的最佳组合培养基。以下的单因子试验均以 MS1 为基础来进行,除非另有说明。

2.2 单因子试验结果

2.2.1 NAA 对下胚轴不定芽发生的影响 从图 1 可知,NAA 对不定芽的影响较大,当其浓度达到 1.0 mg/L,能诱导外植体愈伤组织产生,继续在原

培养基上培养,经观察发现几乎没有分化出不定芽; NAA 的浓度在 0.01~0.1 mg/L 范围内,不定芽发生频率和平均每块愈伤组织的不定芽数均随 NAA 浓度的提高而增加;当 NAA 的浓度从 0.1 mg/L 逐渐增加到 1.0 mg/L 时,不定芽发生频率和平均每块愈伤组织的不定芽数迅速降低,这说明 NAA 的浓度水平与愈伤组织的不定芽分化有密切关系,极低浓度的 NAA(0.01 mg/L)和较高浓度的 NAA(1.0 mg/L)均不利于愈伤组织的不定芽分化。一般来说,诱导外植体的不定芽分化时在培养基中添加的 NAA 浓度应小于 1.0 mg/L。

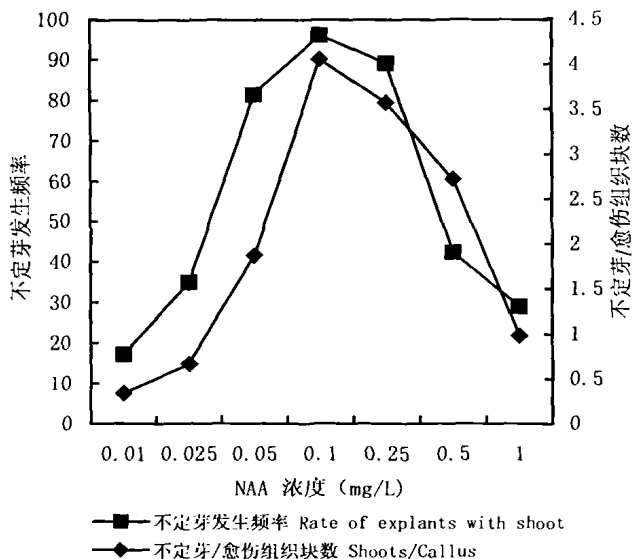


图 1 不同 NAA 浓度对下胚轴不定芽发生的影响
Fig. 1 Effects of NAA concentration on shoots regeneration to hypocotyl

2.2.2 6-BA 对下胚轴不定芽发生的影响 细胞分裂素是诱导愈伤组织培养基中可调节幅度最大的植物生长调节物质之一。从图 2 可知,当只改变 MS1 培养基中的 6-BA 浓度时,低浓度的 6-BA(0.1 mg/L)其诱导的不定芽发生频率最低;随着 6-BA 浓度的提高,不定芽发生频率显著增加,平均每块愈伤组织的不定芽数也随之提高;当 6-BA 的浓度为 1.0 mg/L 时,下胚轴的不定芽发生频率和平均每块愈伤组织的不定芽数达到最大,继续增加 6-BA 的浓度,外植体的不定芽发生频率和平均每块愈伤组织的不定芽数明显减少,并且开始出现畸形不定芽。

2.2.3 TDZ 对下胚轴不定芽发生的影响 从表 4 可知极低浓度的 TDZ(0.005 mg/L)就能诱导不定芽产生,一半左右的外植体能被诱导出不定芽;当 TDZ 浓度达到 0.02 mg/L 时,外植体的不定芽发生

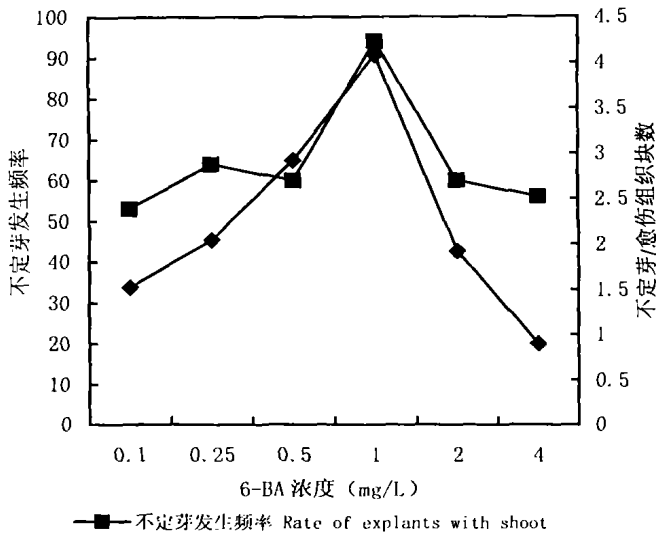


图 2 不同 6-BA 浓度对下胚轴不定芽发生频率和不定芽数影响

Fig. 2 Effects of 6-BA concentration on shoot frequency and shoots to hypocotyl

频率为 100%,随着 TDZ 浓度的继续提高,平均每块愈伤组织的不定芽数显著增加,0.06 mg/L 的 TDZ 平均每块愈伤组织的不定芽数最多(7.8 个/愈伤组织)。

表 4 不同 TDZ 浓度对下胚轴不定芽发生的影响

Table 4 The effect of TDZ concentration on the shoot regeneration from hypocotyl

TDZ (mg/L)	不定芽发生频率 Shoot formation frequency (%)	不定芽数/愈伤组织块数 Shoot numbers/Callus numbers
0.005	56	0.96
0.01	84	2.1
0.02	100	4.02
0.04	100	7.52
0.06	100	7.8
0.08	100	7.6

3 讨论

正交设计是多因素分析的有利工具,可以用较少的实验次数得到较多的信息,从而选出主要因素及其最优水平^[6]。本实验通过正交设计确定了 NAA、6-BA、TDZ 和 KT 四种激素对愈伤组织发生频率和不定芽发生的影响作用大小,并结合单因子试验选出了最佳培养基配方。

生长素可以影响植物的多种生理功能,目前已经鉴定出一些生长素诱导的特异基因表达的变化。

人工合成的 NAA 在高温高压下比较稳定,不易被破坏、分解,而且它诱导器官发生的活性比 IAA 强数倍,所以在植物组织培养中使用十分广泛。细胞分裂素(CK)是腺嘌呤的衍生物,它对细胞的分裂和分化有明显效果,并与生长素共同调控细胞的伸长和分裂。

近些年来 TDZ 作为一种特殊的植物生长调节剂广泛用于植物离体培养,是一种具有很强细胞分裂素活性的苯基脲型化合物。深入了解 TDZ 对植物组织培养的生理反应影响有助于人们更好地理解植物本身的形态发生过程。目前 TDZ 对离体植物形态反应的调节机制仍然不清楚^[7]。TDZ 能非常有效地引起一系列的生理反应。在植物离体培养时,与别的植物生长调节剂相比,极低浓度的 TDZ 就能使多种植物体系的愈伤组织生长速度增加数十倍,提高细胞分裂速率,诱导不定芽发生及提高不定芽数量^[8]。另外,人们还发现在许多植物种类上 TDZ 能够代替生长素和细胞分裂素的共同作用,诱导体细胞胚胎发生,并且比其它植物激素的诱导速度更快^[7,9~11]。

参考文献:

- [1] Anderson W C. Tissue culture propagation of broccoli (*Brassica oleracea* Italica group) for use in F1 hybrid seed production[J]. *J. Avenor. society Horticulture. Science.*, 1977, **102**(1): 69-73.
- [2] Johnson B B. In vitro propagation of broccoli from stem, leaf and leaf rib explant [J]. *Hortscience*, 1978, **13**(3): 246-247.
- [3] 钟仲贤, 陈澍棠. 茎椰菜试管苗繁殖的初步研究[J]. *植物生理学通讯*. 1981, (6): 40-42.
- [4] 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.
- [5] 王怀名. 青花菜的离体繁殖和形态发生[J]. *园艺学报*, 1988, (11): 252-258.
- [6] 杜荣骞. 生物统计学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1985.
- [7] Murthy B N S, Murch S J, Saxena P K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis[J]. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant.*, 1998, **34**: 267-275.
- [8] Capelle S C, Mok D W S, Kirchner S C, *et al.* Effects of TDZ on cytokinin autonomy and the metabolism of N6-(DELTA2-isopentenyl)[8-14C]adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L[J]. *Plant Physiol.*, 1983, **73**: 796-802.
- [9] Saxena P K, Malik K A, Gill R. Induction by TDZ of somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut [J]. *Planta*, 1992, **187**: 421-424.
- [10] Murthy B N S, Murch S J, Saxena P K. TDZ-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons[J]. *Physiol. Plant.*, 1995, **94**: 268-276.
- [11] Murthy B N S, Singh R P, Saxena P K. Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium X hortorum* Bailey cv. Ringo Rose) cotyledonary cultures[J]. *Plant Cell Rep.*, 1996a, **15**: 423-426.