

影响油菜下胚轴外植体芽高频率再生的因素

卢龙斗¹, 张胜², 段红英¹, 高武军¹, 魏开发¹

(1. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453002; 2. 漯河职业技术学院, 河南漯河 462000)

摘要: 以芥菜型油菜 DB₃ 的下胚轴为外植体, 分析了苗龄、激素、AgNO₃ 对油菜外植体的高频率再生的影响。结果发现, 3~5 d 的苗用于诱导愈伤组织较佳, 6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的组合对下胚轴芽的分化较好, AgNO₃ 可提高下胚轴芽的分化率。

关键词: 油菜; 下胚轴; 不定芽; 影响因素

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2003)03-0240-03

Factors affecting shoot regeneration at high frequency from *in vitro* culture hypocotyl of *Brassica juncea*

LU Long-dou¹, ZHANG Sheng², DUAN Hong-ying¹, GAO Wu-jun¹, Wei Kai-fa¹

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China;

2. College of Vocational Technology Luohe, Luohe 462000, China)

Abstract: We use the hypocotyls of *Brassica juncea* (DB₃) for the explants and analyse the influence of seed age, plant hormone, AgNO₃ on high frequency regeneration. Results show that 3~5 d seedlings are suited to induce callus, 6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L can well differentiate shoot of hypocotyls, AgNO₃ can increase frequency of differentiation of hypocotyls.

Key words: *Brassica juncea*; hypocotyls; shoot; affecting factors

自从1985年Horsch最早获得油菜转基因植株以来,油菜转化的研究在国内外取得了一定的进展。但是由于多种因素的影响,转化率都不高,尤其是外植体的再生率不高,目前国内外关于油菜组织培养方面的研究主要集中在如何提高外植体再生频率这一点上。很多研究发现,激素组配和培养条件是影响油菜外植体再生频率的因素(Jain, 1988; Khehra, 1992),而且许多研究结果存在着很大差异,甚至是相互矛盾的。这就给油菜高频率再生技术提出了更高的要求。本实验研究了一些影响油菜下胚轴不定芽再生的因素,发现苗龄、激素、AgNO₃对下胚轴的芽再生都有不同程度的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究以芥菜型油菜(*Brassica juncea*)的一个品种DB₃(山西省农科院高寒所杨琪研究员提供)为材料。

1.2 培养基

以MS(1962)培养基为基本培养基,附加不同浓度的6-BA(6-Benzylaminopurine, 6-苄基氨基嘌呤)、NAA(Naphthalene acetic acid, 萘乙酸)及AgNO₃。蔗糖浓度为3%、琼脂浓度为0.6%、肌醇浓

收稿日期: 2002-01-25; 修订日期: 2002-06-24

基金项目: 河南省科委攻关项目(0124160310)

作者简介: 卢龙斗(1954-),男,河南宜阳人,教授,硕士生导师,从事植物分子遗传研究。

度为0.01%, pH为5.8,并在121℃、1.1 kg/cm²的压力下灭菌。

1.3 方法

1.3.1 无菌苗的培养 将油菜种子用0.1% HgCl₂浸泡10 min,无菌水冲洗4~6次后接种于1/4 MS+6 g琼脂的无菌苗培养基上,在24℃、16/8 h的光暗周期条件下培养。

1.3.2 材料接种 切取无菌苗下胚轴(约0.5 cm)接

入含有不同浓度的6-BA、NAA及AgNO₃的分化培养基的三角瓶中,在24 h光照、25℃条件下培养,每次接种30个,重复3次。

1.3.3 出愈率和分化率的计算:

$$\text{出愈率} = \frac{\text{形成愈伤组织的外植体数}}{\text{接种的外植体数}} \times 100\%$$

$$\text{分化率} = \frac{\text{分化出芽的愈伤组织数}}{\text{接种的愈伤组织数}} \times 100\%$$

表1 不同时期的外植体愈伤组织形成的情况
Table 1 The callus of explants in different ages

苗龄(d) Seedling ages	接种个数 Inoculation number	初出愈伤的时间 Time of callus formed		出愈个数 Callus number	出愈率(%) Rate of callus	出愈量 Amount of callus
2	90	10	9	11	54	++
3	90	12	10	9	62.89	+++
5	90	11	10	10	67	+++
7	90	13	12	13	56	++

注:“+”代表愈伤组织的多少 Note:“+”represent the amount of callus

2 结果与分析

2.1 苗龄对愈伤组织诱导的影响

将培养2、3、5、7 d的油菜无菌苗的下胚轴,分别接种在含6-BA 3 mg/L、NAA 0.2 mg/L的诱导愈伤组织的培养基上,3 d后,接种的下胚轴均有膨大现象;1周后,3、5 d无菌苗的下胚轴长出愈伤组织,随后,2、7 d的下胚轴也长出愈伤组织;2周后愈伤组织生长情况较好,已经遍布切口处。3周时的统计情况见表1。

从表1可知,培养2 d的无菌苗的下胚轴出愈率不高,且出愈量低;3、5 d的苗形成愈伤组织的时间也不长,而且出愈率高,出愈量多;虽然7 d的苗出愈率不低,且出愈量多但是出愈时间稍长,愈伤组织的长势也不好。总的来说,3~5 d的苗比较健壮,形成愈伤组织的时间较短,且愈伤组织长势比较好。

2.2 植物激素对芽分化的影响

从诱导出的愈伤组织中选择生长良好、质地疏松的作为再分化的材料,以MS为基本培养基,设计5种不同的激素组合,比较它们对芽再分化的影响。在再分化培养过程中,起初愈伤组织无明显变化,1周后,开始有芽状体,15 d后不定芽形成,30 d时,成长为单个植株或丛生苗。实验结果见表2。

由表2可知,整体分化率不低,以6-BA 1.5

mg/L+NAA 0.1 mg/L的组合效果好,其诱导分化效率最高,且形成的多芽体稍多,苗生长也较健壮;虽然6-BA 1 mg/L+NAA 0.05 mg/L的组合诱导分化率高,但是形成的苗较弱,平均出芽数也不多。

表2 激素对不定芽分化的影响
Table 2 The influence of hormone to shoot differentiation

激素 Hormone (mg/L)	接种个数 Inoculation number	出芽个数 Shoot number	分化率(%) Frequency of differentiation
6-BA 2.5	90	0	0
6-BA 2.5+NAA 0.15	90	48	53.3
6-BA 2+NAA 0.15	90	51	56.67
6-BA 1.5+NAA 0.1	90	65	72.2
6-BA 1+NAA 0.05	90	57	63.3

2.3 AgNO₃对芽分化的影响

从诱导出的愈伤组织中选择生长良好、质地疏松的作为再分化的材料,以6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L为分化培养基,加入不同浓度的AgNO₃,比较它们对再分化芽的影响,实验结果见表3。

由表3可知,当没有加入AgNO₃时,芽的分化率也不低(70%),而加入AgNO₃后,芽的分化率明显增加。当加入30 μM/L AgNO₃时,芽的分化率最高,为78.89%。另外,从上表也可以看出芽的分化能力并不随AgNO₃浓度的升高而增加,当AgNO₃为40 μM/L时,芽的分化率反而低,并且在离体培养的过程中发现,下胚轴的褐化现象比较严重。

表3 AgNO₃对芽分化的影响
Table 3 The influence of AgNO₃ to shoot differentiation

AgNO ₃ (μM/L)	接种个数 Inoculation number	出芽个数 Shoot number	分化率(%) Frequency of differentiation
0	90	63	70
10	90	65	72.2
20	90	68	75.56
30	90	71	78.89
40	90	61	67.78

3 讨论

前人研究表明,油菜下胚轴外植体的芽再生频率除受基因型影响外,也受培养基中附加成分的影响(Dale和Ball,1991;Murata和Orton,1987;秦明辉等,1994)。本实验也得出相似的结论,当培养基中不含NAA时,下胚轴没有形成愈伤组织,而且没有膨大、增粗,只在切口处生长出1~3条典型的根。大部分研究表明,培养基中加入6-BA、NAA可以促进油菜下胚轴的芽分化(钟蓉等,1997;Hachy等,1991)。本研究还发现,在再分化过程中以6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L组合时诱导分化芽的效果较好,而过高或过低其促进作用降低。另外,很多研究发现,AgNO₃对于组织培养及转化中芽的再生是有利和必要的,因为Ag⁺是乙烯合成的抑制剂,它可以通过竞争性结合细胞膜上的乙烯受体蛋白从而阻止或降低乙烯的作用;而且对再生频率的影响甚至大于基因型和激素的影响(De Block等,1989;石淑稳等,1998;Deepak等,1993;Chi等,1990),另外,不同的研究所用的浓度差异很大(秦明辉等,1994;程振东等,1994)。本实验以培养不同天数的油菜下胚轴为研究对象,发现下胚轴的分化能力随苗龄的增加而降低,5 d的下胚轴分化能力最强(74.4%),3 d的次之(68.89%),2、7 d的较低(分别为60%、62.2%)。总之,在进行油菜转基因之前,有必要优化组培条件、激素组合浓度以及AgNO₃浓度,以提高不定芽再生频率,进而获得较多的转化植株。

参考文献:

石淑稳,周永明,王新发. 1998. 影响油菜子叶外植体不定芽高频率再生的因素[J]. 西北植物学报, 18(4): 477-482.
秦明辉,李学宝,陈光荣,等. 1994. 芥菜型油菜遗传转化

的研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 28(4): 538-542.

- Cheng ZD(程振东), Wei ZM(卫志明), Xu ZH(许智宏). 1994. Transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants(根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化及转基因植株的再生)[J]. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 36(9): 657-663.
- Chi GL, Barfield DG, Sim GE *et al.* 1990. Effect of AgNO₃ and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes[J]. *Plant Cell Rep*, 9: 195-198.
- Dale P J, Ball L F. 1991. Plant regeneration from cotyledonary explants in a range of *Brassica* species and genotypes [A]. In: the Proceedings of 8th International Rapeseed Congress [C], 4: 1 122-1 127.
- De Block M, Dirk De Brouwer, Paul Tenning. 1989. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants [J]. *Plant Physiol*, (91): 694-701.
- Deepak Pental, Akshayk Pradhan, Yaspal S Sodhi, *et al.* 1993. Variation amongst *Brassica Juncea* cultivars for regeneration from hypocotyls explants and optimization of condition for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation [J]. *Plant Cell Reports*, 12: 462-467.
- Hachy J E, Sharma K K, Molony M M. 1991. Efficient shoot regeneration of *Brassica juncea* using cotyledon explants cultured *in vitro* [J]. *Plant Cell Reports*, 9: 549-554.
- Jain R K, Chowdhury J B, Sharma D R, *et al.* 1988. Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some *Brassica species* [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, (14): 197-206.
- Khehra G S, Mathias R J. 1992. The interaction of genotype, explant and media on the regeneration of shoots from complex explants of *Brassica napus* L. [J]. *Journal of Experimental Botany*, 43(256): 1 413-1 418.
- Murata M, Orton T J. 1987. Callus initiation and regeneration capacities in *Brassica species* [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 11: 111-123.
- Zhong R(钟蓉), Zhu F(朱峰), Liu YL(刘玉乐), *et al.* 1997. Oilseed rape transformation and the establishment of a bromoxynil-resistant transgenic oilseed rape(油菜的遗传转化及抗溴苯腈转基因油菜的获得)[J]. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 39(1): 22-27.