

彩色大白菜子叶的不定芽再生

屈会玲^{1,2}, 张鲁刚^{1*}, 范爱丽¹

(1. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 山西省运城市农业局, 山西 运城 044000)

摘要: 以彩色大白菜子叶为外植体, 研究不同激素配比和 AgNO_3 对不定芽再生的影响。结果表明: 单独附加细胞分裂素(6-BA 或 TDZ)的 MS 培养基, 不能诱导子叶不定芽分化; 而同时附加生长素(NAA)和细胞分裂素(6-BA 或 TDZ), 不定芽的再生频率提高, 最高为 15%; AgNO_3 与细胞分裂素及生长素配合使用, 能大幅度提高子叶不定芽的再生频率, 提高率最高达 42.5%。与 6-BA 相比, TDZ 对不定芽再生的效果更好。当 TDZ 浓度为 0.05 mg/L、NAA 为 0.3 mg/L、 AgNO_3 为 8 mg/L 时, 产生丛状芽数目最多, 再生率最高, 达 50%。

关键词: 彩色大白菜; 子叶片; 再生

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)05-0748-07

Shoot regeneration from cotyledon of orange-heading Chinese Cabbage

QU Hui-Ling^{1,2}, ZHANG Lu-Gang^{1*}, FAN Ai-Li¹

(1. College of Horticulture, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China; 2. Agricultural Bureau of Yuncheng City, Yuncheng 044000, China)

Abstract: The effects of hormone combination and AgNO_3 on adventitious shoot regeneration from cotyledon of orange-heading Chinese Cabbage were studied. The results showed that the adventitious shoot could not be induced from the cotyledon in MS medium added with cell division hormone(6-BA or TDZ) only; the regeneration frequency of shoot reached to 15% in MS medium added with cell division hormone(6-BA or TDZ) and growth hormone(NAA) together; the regeneration frequency could increase 42.5% in MS medium added with cell division hormone(TDZ), growth hormone(NAA) and AgNO_3 . Compared with 6-BA, TDZ had more effective in inducing shoot regeneration. The maximum frequency of shoot regeneration(50%) was obtained in MS medium which contained 0.05 mg/L TDZ, 0.3 mg/L NAA and 8 mg/L AgNO_3 .

Key words: *Brassica campestris* ssp. *pekinensis*; cotyledon; regeneration

大白菜(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*)杂种优势明显, 采用自交不亲和系和雄性不育系制种是利用杂种优势的主要途径。与自交不亲和系相比, 利用雄性不育系配制杂交组合, 可以克服人工蕾期授粉繁殖亲本成本高、长期连续自交生活力易衰退、杂交率易受留种环境制约等缺陷, 在简化杂种优势育种上具有重要意义, 被国内外众多育种工作者

所重视。与核不育相比, 胞质型不育具有转育简单、不育性容易保持的优点(王永飞等, 2006)。原生质体融合技术有效地克服了大白菜有性杂交不亲和、性器官败育以及珠心胚干扰等难题, 而且杂种后代不仅可以实现核 DNA 重组, 还可以实现细胞质基因重组。但原生质体融合的前提是原生质体的再生, 而外植体再生又为原生质体再生提供重要的理

收稿日期: 2007-01-08 修回日期: 2006-07-06

基金项目: 国家 863 项目(2003AA207120); 陕西省科技攻关项目(2005K01-G8-01)[Supported by National High Technologies Research and Development Program of China (2003AA207120); Key Technologies Research and Development Program of Shaanxi Province(2005K01-G8-01)]

作者简介: 屈会玲(1981-), 女, 山西运城人, 在读硕士, 主要从事蔬菜生物技术研究。

* 通讯作者(Author for correspondence)

论依据。由于大白菜是具有 AA 基因组的二倍体, 而 A 基因组抑制再生芽的效应较 B、C 基因组都大, 所以它是芸薹属中最难再生的种 (Murata 等, 1987)。大白菜的离体再生培养中, 使用最多的外植体是子叶和下胚轴 (于占东等, 2005; 卢永恩等 2003; 邢德峰等, 2003), 有关子叶的再生, 前人大部分都是采用带 1~2 mm 子叶柄的子叶 (张艳萍等, 2005; 卢永恩等, 2003; 曹家树等, 2000), 而采用子叶片做的还不多, 且受基因型限制很大。

本文首次采用彩色大白菜 04S26 (中晚熟, 结球紧实, 商品性好, 含糖量高, 粗纤维少, 味甜, 口感佳, 营养丰富, 高抗病毒病, 霜霉病和干烧心) 的子叶片为外植体, 研究其最佳的激素种类及配比, 以获得较高的不定芽及植株再生率, 为彩色大白菜的原生质

体融合奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的彩色大白菜品种 04S26 由西北农林科技大学园艺学院蔬菜花卉研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 无菌幼苗的获得 将彩色大白菜种子先用流水冲洗 0.5 h, 再用 70% 酒精处理 1 min, 然后用 0.1% 的 HgCl₂ 表面消毒 5 min, 最后用无菌水冲洗 5 次, 接种于 MS (蔗糖 30 mg/L + 琼脂 7 mg/L, pH 为 5.8) 培养基上。培养室光照强度 40.5 μmol · m⁻² · s⁻¹, 光照时间 16/8 h, 温度 (25 ± 1 °C)。取 5 d 苗龄的

表 1 不同激素组合的设计
Table 1 Combination of different hormones

| 处理号 Treatments | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 6-BA (mg/L) | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| NAA (mg/L) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| 处理号 Treatments | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | | | | | | |
| TDZ (mg/L) | 0.01 | 0.03 | 0.05 | 0.01 | 0.03 | 0.05 | 0.01 | 0.03 | 0.05 | | | | | | |
| NAA (mg/L) | 0 | 0 | 0 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | | | | | | |

表 2 硝酸银和激素组合的设计
Table 2 Combination of AgNO₃ and hormones

| 处理号 Treatments | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 25 | 33 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| 6-BA (mg/L) | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| NAA (mg/L) | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| AgNO ₃ (mg/L) | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| 处理号 Treatments | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | |
| TDZ (mg/L) | 0.01 | 0.03 | 0.05 | 0.01 | 0.03 | 0.05 | 0.01 | 0.03 | 0.05 | |
| NAA (mg/L) | 0 | 0 | 0 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | |
| AgNO ₃ (mg/L) | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | |

无菌苗, 切取子叶片, 接种于分化培养基上进行培养。

1.2.2 不同激素组合的实验设计 不同浓度的 6-BA 和 TDZ 分别与 NAA 进行完全随机组合 (表 1), 基本培养基为 MS (蔗糖 30 mg/L, 琼脂 7 mg/L, pH 为 5.8), 光照和温度条件同 1.2.1。

硝酸银与激素组合的实验设计。从表 1 中筛选出较好的组合再与硝酸银按表 2 设计组合, 硝酸银采用过滤灭菌, 加有硝酸银的培养基在接种 15 d 后, 转到没有硝酸银的培养基上。

上述每个处理各接种 10 瓶, 每瓶接 4 个外植体, 培养 30 d 时统计不定芽分化率以及不定根的产生率。外植体不定芽(根)分化率 = 长芽(根)外植体数/接种成活的外植体数; 芽(根)/外植体 = 总芽

(根)数/出芽(根)的外植体数。

1.2.3 不定芽生根与植株再生 分化培养基中的不定芽长到 2~3 cm 时, 经切分后转入生根培养 MS + NAA 0.2 mg/L 中, 待基部形成大量的毛根后, 打开三角瓶口, 炼苗 4~5 d 后。取出小植株, 洗净根部培养基, 移栽到混合基质 (珍珠岩: 草炭 = 1: 1) 中, 塑料薄膜保湿 7 d, 逐渐揭膜, 10~15 d 即可入土栽培。

2 结果与分析

2.1 激素对子叶不定芽再生的影响

2.1.1 6-BA 和 NAA 对不定芽再生的影响 6-BA

和 NAA 对大白菜子叶不定芽的诱导率较低,其中 NAA 起着关键的作用(表 3)。只含 6-BA 的 MS 培养基,不能诱导不定芽的再生;同时含有 6-BA 和 0.1 mg/L 的 NAA 时,不定芽再生率略有提高,平均不超过 2.5%,每个外植体丛生芽个数也较低。而且随着 6-BA 浓度的增加,不定芽的再生率无明显变化,各处理之间的差异也未达显著水平;同时含有 6-BA 和 0.3 mg/L NAA 时,不定芽的再生率进一步提高。随着 6-BA 浓度的增加,不定芽的再生率先提高,后降低;当 6-BA 浓度为 4 mg/L 时,不定芽(图版 I :A)的再生率最高,达 15%,每个外植体丛生芽的个数也最多,为 2~3 个,而且与 1~10 号处理之间差异达显著水平。当 6-BA 浓度相同时,

不定芽再生率都是随着 NAA 浓度的增大而提高,只有当 6-BA 浓度为 4 mg/L 和 6 mg/L 时,NAA 浓度间的差异达显著水平。

不定根的再生率随着体系中 6-BA/NAA 比值的降低而升高。只含 6-BA 的培养基中没有不定根长出;相同的 6-BA 浓度下,0.3 mg/L NAA 较 0.1 mg/L NAA 的生根率高;当 6-BA 为 2 mg/L、NAA 为 0.3 mg/L 时,不定根的再生率最高,达到 72.5%,每个外植体的根数也最多,而且与其他处理之间达差异显著水平。

实验中还发现,培养 3 d 子叶开始膨大,5 d 出现浅绿色的愈伤组织和少量的不定根,20 d 开始有芽长出。

表 3 6-BA 和 NAA 对彩色大白菜子叶不定芽再生的影响

Table 3 Effect of 6-BA and NAA on adventitious shoot regeneration from cotyledon of orange-heading Chinese Cabbage

| 处理号 Treatments | 6-BA (mg/L) | NAA (mg/L) | 出芽率(%) Frequency of shoot regeneration | 芽/外植体 ANOSRPE | 生根率(%) Frequency of root regeneration | 根/外植体 ANORRPE |
|-------------------|----------------|---------------|--|------------------|---|------------------|
| 1 | 2 | 0 | 0 b | 0±0 | 0 d | 0±0 |
| 2 | 4 | 0 | 0 b | 0±0 | 0 d | 0±0 |
| 3 | 6 | 0 | 0 b | 0±0 | 0 d | 0±0 |
| 4 | 8 | 0 | 0 b | 0±0 | 0 d | 0±0 |
| 5 | 10 | 0 | 0 b | 0±0 | 0 d | 0±0 |
| 6 | 2 | 0.1 | 2.5 b | 1±0 | 20 cd | 1.6±0.5 |
| 7 | 4 | 0.1 | 2.5 b | 1±0 | 20 cd | 1.7±0.7 |
| 8 | 6 | 0.1 | 2.5 b | 1±0 | 10 d | 2.5±1.1 |
| 9 | 8 | 0.1 | 0 b | 0±0 | 15 cd | 3.5±1.8 |
| 10 | 10 | 0.1 | 2.5 b | 1±0 | 2.5 d | 1.1±0.0 |
| 11 | 2 | 0.3 | 10 ab | 1±0 | 72.5 a | 3.6±3.9 |
| 12 | 4 | 0.3 | 15 a | 2.0±1.4 | 47.5 b | 3.4±2.2 |
| 13 | 6 | 0.3 | 12.5 a | 1±0 | 42.5 b | 2.5±2.2 |
| 14 | 8 | 0.3 | 10 ab | 1±0 | 32.5 bc | 2.3±1.4 |
| 15 | 10 | 0.3 | 10 ab | 1±0 | 30 bc | 3.3±2.2 |

注: (1)基本培养基为 MS; (2)多重比较在 0.05 水平上做差异显著性测验,字母相同者表示差异不显著。下同。

Notes: (1)the basic medium is MS; (2)treatment with the same letter indicated no significant difference at 5% level under Duncan's multiple range tests; (3)ANOSRPE; average number of shoot regeneration per explants; (4)ANORRPE; average number of root regeneration per explants. The same below.

2.1.2 TDZ 和 NAA 配比对不定芽再生的影响

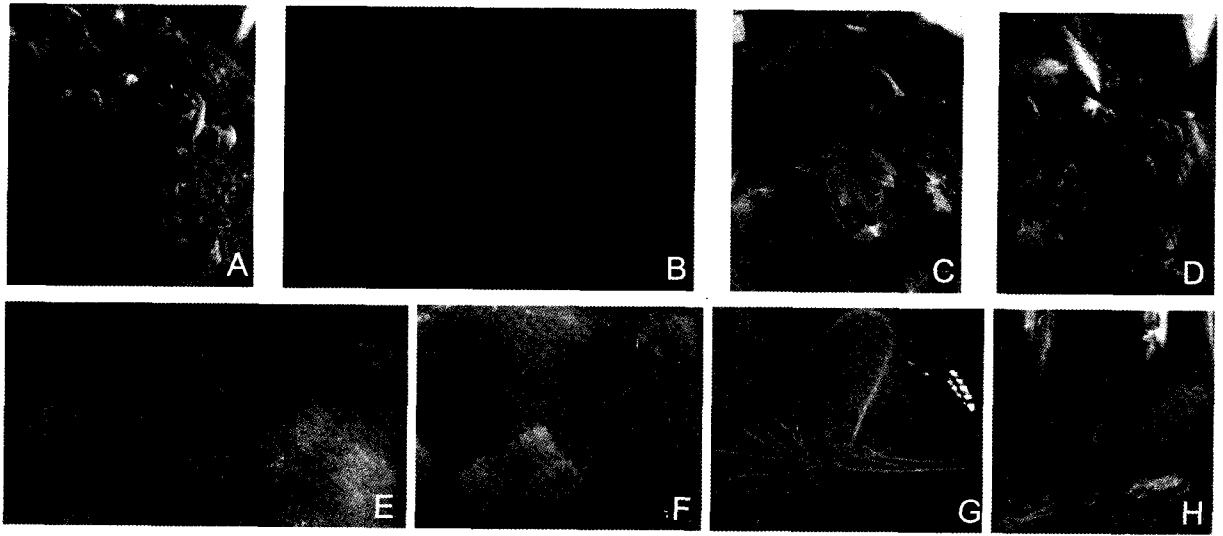
TDZ 和 NAA 对彩色大白菜子叶不定芽的诱导率也很低(表 4)。只含有 TDZ 的 MS 培养基,不能诱导不定芽的再生;同时含有 TDZ 和 NAA,才有少量的不定芽再生;同时含有 TDZ 和 0.3 mg/L NAA 时,不定芽(图版 I :C)再生率略有提高,最高达 7.5%,而且随着 TDZ 浓度的增加不定芽的再生率也提高,但各处理间未达差异显著水平。当 TDZ 浓度相同时,不定芽再生率都是随着 NAA 浓度的增大而提高,但未达差异显著水平。

生根率的表现与 6-BA 和 NAA 配比的情况相

似,不定根的再生率随着体系 TDZ/NAA 比值的降低而升高。只含有 TDZ 的 MS 培养基中,不能诱导不定根再生。同时含有 TDZ 和 NAA 的培养基中才有不定根的长出。当 NAA 浓度相同时,不定根的再生率随着 TDZ 浓度的增大而降低。当 TDZ 为 0.01 mg/L、NAA 为 0.3 mg/L 时,生根率最高达 35%,而且每个外植体上的根数也最多,并与其他处理之间达差异显著水平。另外 TDZ 和 NAA 组合的生根率普遍较 6-BA 和 NAA 组合的低,说明 TDZ 对根的抑制效应比 6-BA 的大。

子叶愈伤量与出芽率呈负相关,即出芽数越多,

愈伤量越少,反映了子叶分化和脱分化两个过程要求的激素状态不一致。



图版 I A. 6-BA+NAA 组合产生不定芽; B. 6-BA+NAA+AgNO₃ 组合产生的丛状不定芽; C. TDZ+NAA 组合直接产生的不定芽; D. TDZ+NAA+AgNO₃ 组合直接产生的丛状不定芽; E. 6-BA+NAA+AgNO₃ 组合产生的愈伤; F. 6-BA+NAA 组合产生的愈伤; G. MS+NAA 组合产生的不定根; H. 再生的植株。

Plate I A. The adventitious shoot induced by 6-BA and NAA; B. The adventitious shoot clusters induced by 6-BA, NAA and AgNO₃; C. The adventitious shoot induced by TDZ and NAA directly; D. The adventitious shoot clusters induced by TDZ, NAA and AgNO₃ directly; E. The calli induced by 6-BA, NAA and AgNO₃; F. The calli induced by 6-BA and NAA; G. The adventitious root induced by MS added NAA; H. Regenerated plant.

表 4 TDZ 和 NAA 对彩色大白菜子叶不定芽再生的影响

Table 4 Effect of TDZ and NAA on shoot regeneration from cotyledon of orange-heading Chinese Cabbage

| 处理号 Treatments | TDZ (mg/L) | NAA (mg/L) | 出芽率 Frequency of shoot regeneration | 芽/外植体 ANOSRPE | 愈伤量 Quantity calli | 生根率 Frequency of root regeneration | 根/外植体 ANORRPE |
|-------------------|---------------|---------------|---|------------------|-----------------------|--|------------------|
| 16 | 0.01 | 0 | 0 b | 0±0 | ++ | 0 c | 0.0±0.0 |
| 17 | 0.03 | 0 | 0 b | 0±0 | +++ | 0 c | 0.0±0.0 |
| 18 | 0.05 | 0 | 0 b | 0±0 | +++ | 0 c | 0.0±0.0 |
| 19 | 0.01 | 0.1 | 0 b | 0±0 | ++ | 20 b | 1.8±0.4 |
| 20 | 0.03 | 0.1 | 0 b | 0±0 | + | 17.5 b | 1.3±0.5 |
| 21 | 0.05 | 0.1 | 2.5 ab | 0±0 | ++ | 7.5 bc | 1.3±0.5 |
| 22 | 0.01 | 0.3 | 5 ab | 1±0 | + | 35 a | 1.9±0.7 |
| 23 | 0.03 | 0.3 | 5 ab | 1±0 | + | 20 b | 1.4±0.5 |
| 24 | 0.05 | 0.3 | 7.5 a | 1±0 | + | 12.5 bc | 1.6±0.5 |

注: “+”少量; “++”较多; “+++”最多。下同。 Note: “+” a little; “++” more; “+++” the most. The same below.

2.2 AgNO₃ 对子叶不定芽再生的影响

2.2.1 AgNO₃ 与 6-BA 和 NAA 配合对子叶不定芽再生的影响 表 5 可以看出,在 MS 培养基中附加不同配比的 6-BA 和 NAA,再加 8 mg/L 的硝酸银后(25-29 号处理),除 28 和 29 号处理外,不定芽再生率都得到提高,分别较不加硝酸银的提高了 15%,2.5%,2.5%,提高率的不同说明在影响不定芽再生率上 6-BA 和 AgNO₃ 存在互作关系。当 6-

BA 为 2 mg/L, NAA 为 0.3 mg/L 时不定芽(图版 I; B)的再生率最高达 25%,且与 28 和 29 号处理之间达差异显著水平。但是随着不定芽再生率的提高,畸形芽出现。在分化培养基 MS+2 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA 中分别添加 2, 4, 6, 8, 10 mg/L 的 AgNO₃ (30~33 号处理),除 AgNO₃ 为 2 mg/L 外,不定芽再生率都得到提高,较不加硝酸银处理分别提高了 7.5%,5.5%,15%,2.5%。当 AgNO₃ 为

8 mg/L 时,不定芽再生率最高达 25%,而且与其他处理(30~33号处理)之间达差异显著水平。随着 AgNO₃ 浓度的增大不定芽的再生率先升高,后降

低,说明高浓度的 AgNO₃ 对不定芽的再生有抑制作用,另外实验中还发现高浓度的 AgNO₃ 还容易引起黄化现象。

表 5 AgNO₃ 与 6-BA 和 NAA 配合对彩色大白菜子叶不定芽再生的影响

Table 5 Effects of AgNO₃, 6-BA and NAA on shoot regeneration from cotyledon of orange-heading Chinese Cabbage

| 处理号 Treatments | 6-BA (mg/L) | NAA (mg/L) | AgNO ₃ (mg/L) | 出芽率 Frequency of shoot regeneration | 芽/外植体 ANOSRPE | 生根率 Frequency of root regeneration | 根/外植体 ANORRPE |
|-------------------|----------------|---------------|-----------------------------|---|------------------|--|------------------|
| 25 | 2 | 0.3 | 8 | 25 a | 1.8±0.9 | 52.5 a | 2.8±2.1 |
| 26 | 4 | 0.3 | 8 | 17.5 ab | 1.0±0 | 40 bc | 2.9±1.7 |
| 27 | 6 | 0.3 | 8 | 15 ab | 1.0±0 | 40 bc | 2.9±2.2 |
| 28 | 8 | 0.3 | 8 | 5 b | 1.0±0 | 27 c | 3.0±2.6 |
| 29 | 10 | 0.3 | 8 | 7.5 b | 1.0±0 | 27 c | 3.0±2.0 |
| 30 | 2 | 0.3 | 2 | 5 b | 1±0 | 57.5 a | 3.3±1.9 |
| 31 | 2 | 0.3 | 4 | 17.5 b | 1±0 | 62.5 a | 2.8±2.1 |
| 32 | 2 | 0.3 | 6 | 15.5 b | 1±0 | 47.5 a | 2.1±1.6 |
| 25 | 2 | 0.3 | 8 | 25 a | 1.8±0 | 62.5 a | 2.4±1.6 |
| 33 | 2 | 0.3 | 10 | 12.5 b | 1±0 | 52.5 a | 2.9±1.0 |

表 6 AgNO₃ 与 TDZ 和 NAA 对彩色大白菜子叶不定芽再生的影响

Table 6 Effect of AgNO₃, TDZ and NAA on shoot regeneration from cotyledon of orange-heading Chinese Cabbage

| 处理号 Treatments | TDZ (mg/L) | NAA (mg/L) | AgNO ₃ (mg/L) | 出芽率 Frequency of shoot regeneration | 芽/外植体 ANOSRPE | 愈伤量 Quantity calli | 生根率 Frequency of root regeneration | 根/外植体 ANORRPE |
|-------------------|---------------|---------------|-----------------------------|---|------------------|--------------------------|--|------------------|
| 34 | 0.01 | 0 | 8 | 0 d | 0±0 | +++ | 0 c | 0±0 |
| 35 | 0.03 | 0 | 8 | 0 d | 0±0 | +++ | 0 c | 0±0 |
| 36 | 0.05 | 0 | 8 | 0 d | 0±0 | +++ | 0 c | 0±0 |
| 37 | 0.01 | 0.1 | 8 | 0 d | 0±0 | + | 52.5 ab | 3.0±1.7 |
| 38 | 0.03 | 0.1 | 8 | 10 cd | 1±0 | +++ | 25 bc | 2.6±2.7 |
| 39 | 0.05 | 0.1 | 8 | 15 c | 1±0 | +++ | 30 abc | 1.9±1.3 |
| 40 | 0.01 | 0.3 | 8 | 20 bc | 1.5±0.5 | + | 55 a | 4.1±2.2 |
| 41 | 0.03 | 0.3 | 8 | 30 b | 1.85±0.7 | + | 32.5 abc | 3.6±2.4 |
| 42 | 0.05 | 0.3 | 8 | 50 a | 2.0±0.6 | + | 45 ab | 4.3±2.3 |

25-29号处理的不定根再生率分别由原来不加硝酸银的 72.5%, 47.5%, 42.5%, 32.5%, 30% 降低为 52.5%, 40%, 40%, 27%, 27%, 每个外植体上的根数也减少,在 25 和 30~33 号处理中,生根率与不加硝酸银(11号处理)相比都降低,说明硝酸银在促进不定芽再生的同时,还抑制了不定根的再生。

实验中发现,外植体在加有硝酸银的培养基上,愈伤组织致密呈小的颗粒状(图版 I:E),而在不加硝酸银的培养基上愈伤组织呈疏松的海绵状(图版 I:F)。从硝酸银促进不定芽再生中推测,这种致密呈小颗粒状的愈伤组织有可能是向胚性愈伤过渡的中间阶段。

2.2.2 AgNO₃ 与 TDZ 和 NAA 配合对子叶不定芽再生的影响 在 MS 中附加不同配比 TDZ 和 NAA 的同时,再加 8 mg/L 的硝酸银后,子叶不定芽再生率显著提高(34~37号处理除外),不定芽的再生率

分别由原来不加硝酸银的 0%, 2.5%, 5%, 5%, 7.5% 提高到 10%, 15%, 20%, 30%, 50%, 丛生芽个数也得到提高。当 TDZ 浓度为 0.05 mg/L, NAA 为 0.3 mg/L, AgNO₃ 为 8 mg/L 时,不定芽(图版 I:D)再生率最高达 50%,且与其他处理之间达差异显著水平。但是随着再生率的提高,畸形芽和玻璃化苗出现。与 AgNO₃、6-BA 和 NAA 配合相比,用 TDZ 诱导的不定芽不经过愈伤过程直接形成,而且培养 13 d 就可看见密集的丛生芽点。

加硝酸银(37~42号培养基)后外植体的生根率和每个外植体上的根数都比不加硝酸银(19~24号培养基)时高,但是各处理之间未达差异显著水平。这与 AgNO₃、6-BA 和 NAA 配合对外植体生根率影响的结果恰好相反,具体原因尚不清楚。

2.3 不定芽的生根与植株再生

由子叶诱导形成的不定芽,经无菌切割,转移到

含 0.2 mg/L NAA 的 MS 培养基上, 20 d 后可形成较多的不定根(图版 I: G), 不定根形成率可达 100%。待基部形成大量的毛根后, 炼苗 4~5 d, 取出小植株, 移栽到混合基质(珍珠岩: 草炭=1: 1) 中, 成活率达 100%(图版 I: H)。

3 讨论

3.1 TDZ 对大白菜离体再生的作用

TDZ(thidiazuron), 是一种人工合成的苯基脲类化合物, 自 1982 年 Mok 等发现 TDZ 有很强的细胞分裂素活性以来, TDZ 被广泛应用于植物组织培养中, 并已有大量的研究报道(Victor 等, 1996; Murthy 等, 1998; 周俊彦等, 1990; 王火旭等, 2001 等; 徐晓峰等, 2003; 樊明琴等, 2005)。许多难于再生植株的植物采用 TDZ 都成功地获得体细胞胚及再生植株, TDZ 对植物体胚发生的作用因植物种类而异, 它对体胚发生有的是促进, 如花生(林荣双等, 2002); 有的则是抑制, 如棉花(张宝红, 1995)、苜蓿(黄学林等, 1994)。本实验的结果表明: 适当浓度的 TDZ 对于彩色大白菜不定芽的诱导起促进作用。

有研究表明, TDZ 与不同激素的配合, 对诱导体胚发生的差异很大。Visser(1992)发现 TDZ 可以代替 IAA 和 6-BA 诱导天竺葵下胚轴的体胚发生, 这说明 TDZ 具有 IAA 和 6-BA 的双重作用。徐晓峰等(2003)还发现 TDZ 能代替生长素和细胞分裂素促进许多植物的体胚发生, 并且比这些植物激素诱导体胚发生的速度更快。但是本实验研究发现, TDZ 必须与 NAA 配合使用才能诱导彩色大白菜不定芽的再生, 可能是 TDZ 可以代替 IAA 和 6-BA, 但却不能代替 NAA 和 6-BA, 或是因为彩色大白菜的内源 NAA 较少的缘故。因此认为 TDZ 对体胚发生的作用与其他生长调节物质有密切关系。但是 TDZ 诱导芽再生成完整植株也存在一些问题, 例如不利于芽生长, 生根困难, 容易产生玻璃化苗和畸形苗等(Huettelman 等, 1993; Lu, 1993)。本实验也发现, 使用高浓度的 TDZ 产生很多畸形苗和玻璃化苗。玻璃苗通过将再生芽转到 MS 培养基中已得到改善, 但是畸形苗却不好减少, 它的比率随着正常芽的增多呈上升趋势, 因此这方面需要再做进一步的研究。

3.2 AgNO₃ 对大白菜离体再生的作用

大白菜离体再生的过程中有大量的乙烯产生

(Lentini 等, 1981)。高浓度的乙烯抑制 *B. campestris* 离体组织培养芽的再生和导致芽的畸形(Pua 等, 1993; Chi 等, 1991; Pua 等, 1996; Chi, 1989)。AgNO₃ 对芸苔属作物离体不定芽再生的作用已有较多报道(Palmer, 1992; 张松等, 1997; 杜虹等, 2000)。大多数研究者认为 Ag⁺ 通过竞争乙烯的作用部位, 使乙烯与受体无法正常结合, 从而抑制了乙烯的作用, 促进了不定芽和体细胞胚胎的发生。本试验的结果也表明: AgNO₃ 对促进大白菜子叶不定芽再生效果显著, 不定芽的诱导率最多可提高 42.5%。张鹏等(1995)将 6-BA、NAA 与 AgNO₃ 配合使用发现: AgNO₃ 可使大白菜子叶柄维管薄壁细胞参与芽原基的形成, 抑制不定根和愈伤组织的形成, 促使不定芽直接形成。但是本实验发现: 6-BA、NAA 和 AgNO₃ 配合使用, 不定芽再生还是要经过愈伤阶段。而对于 TDZ 和 NAA, 添加 AgNO₃ 后不定芽不经过愈伤直接形成, 这可能是所选材料或是外植体的不同引起的差异。另外实验中还发现随 AgNO₃ 浓度的升高, 畸形芽的比率先升高, 后降低, 而樊明琴等(2005)的研究结果表明: 畸形芽的比率随着 AgNO₃ 浓度的升高而提高, 具体原因尚不清楚, 可能是所设的 AgNO₃ 浓度范围不同, 或是不同材料对 AgNO₃ 的反应不同。

大白菜不同基因型的不定芽再生应答反应不同。王火旭等(2001)得出: 11 个基因型的子叶在不同再生培养基上的再生频率为 15.8%~93.3%。于洪欣等(1998)得到的子叶最高分化率为 27.8%。杜虹等(2000)报道大白菜“02 杂交早皇白”子叶片的再生率为 68.7%。本实验首次采用彩色大白菜 04S26 的子叶片为外植体, 获得最高再生频率为 50%, 且不定芽不经过愈伤阶段直接形成, 可避免由于经过愈伤组织而引起的体细胞无性系变异, 为彩色大白菜的原生质体再生及融合创造了条件。

参考文献:

- 于洪欣, 柳建军, 冯兆礼. 1998. 大白菜外植体分化诱导及植株再生的研究[J]. 山东农业科学, 5: 27-29
- Cao JS(曹家树), Yu XL(余小林), Huang AJ(黄爱军), et al. 2000. Enhancement of plant regeneration frequency of *in vitro* cultured Chinese Cabbage(提高白菜离体培养植株再生频率的研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 27(6): 452-454
- Chengalayan K, Mhaske VB, Hazra S. 1997. High-frequency conversion of abnormal peanut somatic embryos[J], *Plant Cell Rep*, 16: 783-786
- Chi G L, Pua E C, Goh C J. 1991. Role of ethylene on de novo shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica campestris* ssp. *pe-*

- kinensis(Lour) Olesson *in vitro*[J]. *Plant Physiol*, **96**:178—183
- Chi G L, Pua E C. 1989. Ethylene inhibitors enhance de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* (Chinese cabbage) *in vitro*[J]. *Plant Sci*, **64**:243—250
- Du H(杜虹), Zhuang DH(庄东红), Huang WH(黄文华), *et al.* 2000. Stimulation effect of silver nitrate on shoot regeneration in cotyledon tissue culture of *Brassica campestris* (AgNO₃ 对大白菜子叶芽再生的促进作用)[J]. *J Trop Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报), **8**(3):109—112
- Fan MQ(樊明琴), Zhu YL(朱月林), Zhu LH(朱丽华). 2005. Studies on high efficient *in vitro* shoot regeneration from cotyledon of Chinese Cabbage(结球白菜高效离体子叶不定芽再生的研究)[J]. *J Nanjing Agric Univ*(南京农业大学学报), **28**(1):20—23
- Gill R, Saxena P K. 1993. Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L.; induction by TDZ of direct embryo differentiation from cultured leaf discs[J]. *plant cell rep*, **12**:154—15
- Huang XL(黄学林), Li XJ(李筱菊), Fu JR(傅家瑞), *et al.* 1994. Effect of thidiazuron on ethylene production and somatic embryo genesis in callus of alfalfa(*Medicago sativa* L.)(Thidiazuron对苜蓿愈伤组织的乙烯生成及其体细胞胚胎发生的影响)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), **20**:367—372
- Huetteman C A, Preece J E. 1993. TDZ: a potent cytokinin for woody plant tissue culture[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, **33**:105—119
- Iantcheva A, Vlahova M, Bakalova E, *et al.* 1999. Regeneration of diploid annual medics via direct somatic embryo genesis promoted by thidiazuron and benzylaminopurine[J]. *Plant Cell Rep*, **18**:904—910
- Lentini Z, Mussel H, Mutschler MA, *et al.* 1981. Ethylene generation and reversal of ethylene effects during development *in vitro* rapid-cycling *Brassica campestris* ssp. L[J]. *Plant Sci*, **54**:75
- Liang LK(梁丽琨), Lin RS(林荣双), Xiao XH(肖显华), *et al.* 2002. TDZ Promote differentiation and gene transformation of peanut(*Arachis hypogaea*)(TDZ促进花生外植体分化及基因转化)[J]. *J Yantai Univ*(烟台大学学报), **15**(3):189—194
- Lu CY. 1993. The use of TDZ in tissue culture[J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, **29**:92—96
- Lu YE(卢永恩), Li HX(李汉霞), Ye ZB(叶志彪). 2003a. Shoot regeneration from hypocotyl explants of Chinese Cabbage enhanced by TDZ(激素 TDZ对促进白菜下胚轴不定芽再生的效应分析)[J]. *J Huazhong Agric Univ*(华中农业大学学报), **22**(6):591—594
- Lu YE(卢永恩), Li HX(李汉霞), Ye ZB(叶志彪). 2003b. Effects of two kinds of cytokinins on shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese Cabbage(两种细胞分裂素对大白菜子叶再生的影响)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **21**(4):361—364
- Murata M, Orton T. 1987. Callus initiation and regeneration capacities in *Brassica species*[J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, **11**:111—123
- Murthy BNS, Saxena PK. 1998. Somatic embryo genesis and plant regeneration of neem (*Azadirachta indica* A. Juss)[J]. *Plant Cell Rep*, **17**:469—475
- Palmer C E. 1992. Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate[J]. *Plant Cell Reports*, **11**:541—545
- Pua E C, Chi GL. 1993. De novo shoot morphogenesis and plant growth of mustard(*Brassica juncea*) *in vitro* in relation to ethylene [J]. *Physiol Plant*, **88**:467—474
- Pua E C, Sim G E, Chi GL, *et al.* 1996. Synergistic effect of ethylene inhibitors and putresine on shoot regeneration from hypocotyl explants of Chinese radish (*Raphanus sativus* L. var. *Longipinnatus* Bailey) *in vitro*[J]. *Plant Cell Reports*, **15**:685—690
- Victor JMR, Murthy BNS, Murch SJ, *et al.* 1996. Role of endogenous purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryo genesis of peanut(*Arachis hypogaea* L.)[J]. *Plant Growth Regul*, **28**:41—47
- Visser C, Quresni JA, Gill R, Saxena PK. 1992. Morphoregulatory role of TDZ. Substitution of auxin and cytokin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyls cultures [J]. *Plant Physiol*, **99**:1704—1707
- Wang HX(王火旭), Wang GL(王关林), Wang XY(王晓岩), *et al.* 2001. Establishment of efficient shoot regeneration system of Chinese Cabbage(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) Inbred Line 'AB 81' and studies of transient expression of *gus A* Gene(大白菜 AB-81 高频再生系统的建立及 *gus A* 基因瞬时表达的研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **28**(1):74—76
- Wang YF(王永飞), Ma SM(马三梅), Zhang LG(张鲁刚). 2006. Cloning and sequencing of a specific amplified DNA fragment from cytoplasmic male sterility maintainer line 3411-7 of Chinese Cabbage(大白菜细胞质雄性不育保持系 3411-7——RAPD 特异扩增片段的克隆测序)[J]. *Guihaia*(广西植物), **26**(3):300—303
- Xing DF(邢德峰), Li XL(李新玲), Wang QW(王全伟), *et al.* 2003. Factors influencing on high frequency plantlet regeneration of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis in vitro*(影响大白菜高效离体培养再生的因素)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **39**(5):420—424
- Xu XF(徐晓峰), Huang XL(黄学林). 2003. TDZ: An efficacious plant growth regulator(TDZ: 一种有效的植物生长调节剂)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), **20**:227—237
- Yu ZD(于占东), He QW(何启伟), Mu JH(牟晋华), *et al.* 2005. Study on the tissue culture and plant regeneration of Chinese Cabbage(白菜组织培养与植株再生研究)[J]. *J Jilin Agric Univ*(吉林农业大学学报), **7**(4):391—395
- Zhang P(张鹏), Ling DH(凌定厚). 1995. Enhancement of plant regeneration rate of *Brassica parachinensis* cultured *in vitro*(提高菜心离体植株再生频率的研究)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **37**(11):902—908
- Zhang S(张松), Wei YT(魏毓棠), Wen FJ(温孚江), *et al.* 1997. Establishment of efficient plant regeneration system of Chinese Cabbage using medium containing ethylene inhibitor AgNO₃(利用乙烯抑制剂 AgNO₃ 建立大白菜高频植株再生体系)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **24**(1):94—96
- Zhang BH(张宝红), Li XL(李秀兰). 1995. Effects of TDZ on cotton tissue culture(TDZ(thidiazuron)在棉花组织培养中的效应)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), **21**:253—258
- Zhang YP(张艳萍), Chen YL(陈玉梁), Zhang ZY(张正英). 2005. Study on isolated culture of Chinese Cabbage's cotyledon(大白菜子叶离体培养再生植株的研究)[J]. *Gansu Agric Sci Tech*(甘肃农业科技), **3**:28—30
- Zhou JY(周俊彦), Guo FX(郭扶兴). 1990. Cytokinin activity of phenyl urea derivatives(苯基脲衍生物的细胞分裂素活性)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯)[J], **4**:7—13