

甘蓝型油菜子叶和下胚轴的组织培养及植株再生研究

邱荣英 李春莲

(西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌, 712100)

摘要: 以 6 个甘蓝型油菜品种的子叶和下胚轴为外植体, 利用组织培养的方法, 研究基本培养基、预培养时间、预培养基中激素配比和分化培养基中激素配比等因素对甘蓝型油菜子叶和下胚轴高效再生的影响。结果表明, 对于甘蓝型油菜子叶和下胚轴的分化, MS 培养基和 MB 培养基对不同基因型的效果不同; 经 3d 预培养处理的子叶和下胚轴芽的分化率达到最大; 预培养基和分化培养基中不同激素对比对甘蓝型油菜子叶和下胚轴的分化有重要影响。

关键词: 甘蓝型油菜; 子叶; 下胚轴; 组织培养; 植株再生

油菜 (*Brassica napus*) 是世界上重要的油料作物之一, 随着农业生物技术的发展, 油菜再生体系的建立和改良, 对于利用植物基因工程技术加速油菜育种研究具有重要的意义。三大类型油菜中, 甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 具有适应性广、抗逆性强、丰产性好、增产潜力大等优点。目前在油菜的再生体系中, 据报道子叶和下胚轴是较好的外植体来源。本试验以 6 个甘蓝型油菜品种的子叶和下胚轴为外植体, 利用组织培养的方法, 研究基本培养基、预培养时间、预培养基中激素配比和分化培养基中激素配比等因素对甘蓝型油菜子叶和下胚轴高效再生的影响, 以建立稳定高效的再生体系, 为进一步通过基因转化获得预期优良性状的甘蓝型油菜创造条件。

1 材料与方法

1.1 供试材料

甘蓝型油菜品种为: A₂、B₂、7、10、16、18, 种子由西北农林科技大学农学院董振生教授提供。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得

选取籽粒饱满、完整的油菜种子, 用清水洗干净, 再用 75% 酒精消毒 2min, 无菌蒸馏水洗去残余酒精。用 0.1% HgCl₂ 处理 20min, 无菌蒸馏水冲洗 5 次。无菌操作下播种于种子萌发培养基上: 1/2MS+1% 蔗糖+0.6% 琼脂粉, PH=5.8。暗培养 3d, 光下 (25±1℃, 光照强度为 2000Lux, 光照周期为 16h/d) 再培养 2d。切取无菌苗的子叶, 保留 1~2mm 的子叶柄; 将下胚轴切成 5~8mm 的段。

1.2.2 基本培养基对不同基因型甘蓝型油菜子叶和下胚轴分化的影响

以上述 6 个基因型的甘蓝型油菜为材料, 将切取的子叶和下胚轴切断接种在两种基本培养基上: MS+3% 蔗糖+0.6% 琼脂粉+3mg/L6-BA+0.1mg/LNAA, PH=5.8; MB+3% 蔗糖+0.6% 琼脂粉+3mg/L6-BA+0.1mg/LNAA, PH=5.8。30d 后统计子叶和下胚轴芽的分化率。

1.2.3 预培养时间对甘蓝型油菜子叶和下胚轴分化的影响

以 B₂ 为材料, 将切取的子叶和下胚轴切断接种在预培养基上: MS+3% 蔗糖+0.6% 琼脂粉+1mg/L6-BA+1mg/L2,4-D, PH=5.8。经过一段时间的预培养, 再转入分化培养基中: MS+3% 蔗糖+0.6% 琼脂粉+3mg/L6-BA+0.05mg/LNAA, PH=5.8。30d 后统计子叶和下胚轴芽的分化率。

1.2.4 预培养基中不同激素对比对甘蓝型油菜子叶和下胚轴分化的影响

以 B₂ 为材料, 将切取的子叶和下胚轴切断接种在预培养基上: MS+3% 蔗糖+0.6% 琼脂粉+不同激素配比, PH=5.8。设 6-BA (0.5、1.0、1.5 和 2.0mg/L) 与 2,4-D (0.5、1.0、1.5 和 2.0mg/L) 组配 16 个处理。经过 3d 的预培养, 再转入分化培养基中: MS+3% 蔗糖+0.6% 琼脂粉+3mg/L6-BA+0.05mg/LNAA, PH=5.8。30d 后统计子叶和下胚轴芽的分化率。

1.2.5 分化培养基中不同激素对比对甘蓝型油菜子叶和下胚轴分化的影响

以 B₂ 为材料, 将在 MS+3% 蔗糖+0.6% 琼脂粉+1mg/L6-BA+1mg/L2,4-D, PH=5.8, 预培养基上

预培养 3d 的子叶和下胚轴切断, 转接到分化培养基上: MS+3%蔗糖+0.6%琼脂粉+不同激素配比, PH=5.8。设 6-BA(0.0、1.5、3.0、4.5 和 6.0mg/L) 与 NAA(0.00、0.02、0.05、0.10 和 0.20mg/L) 组配 25 个处理。30d 后统计子叶和下胚轴芽的分化率。

1.3 计算方法

分化率=再生芽数/接种外植体数×100%

2 结果与分析

2.1 外植体分化概况

子叶接种3d后明显膨大, 7d左右切口处出现坚实致密的淡绿色愈伤组织, 同时在愈伤组织表面有白色根点出现, 10d左右有明显的白根产生。随着培养时间的延长, 愈伤组织逐渐转绿并产生大量绿色芽点, 30d左右再生出芽苗。

下胚轴接种7d后与培养基接触的部位开始膨大, 接种15d后下胚轴接触培养基的部分长出很多白色愈伤组织, 随着培养时间的延长, 白色愈伤组织变绿, 30d左右分化成芽苗。对于不同的处理, 愈伤组织生长状态不一。在含6-BA, NAA的培养基中, 愈伤组织多为致密型。在含6-BA, 2,4-D的培养基中, 愈伤组织较松散, 但生长旺盛。

2.2 基本培养基对不同基因型甘蓝型油菜子叶和下胚轴分化的影响

甘蓝型油菜子叶的分化中(表 1), 对于 16 号材料, 两种培养基的效果是相同的, 分化率都为 100%; 对于 A₂、B₂、7、10、18 号材料, MS 培养基优于 MB 培养基。其中 10 号材料分化率的差值最大, 为 14.61%; A₂ 号材料分化率的差值最小, 为 4.17%。甘蓝型油菜下胚轴的分化中(表 2), 对于 A₂ 号材料, 两种培养基的效果亦是相同的, 分化率都为 0.00%; 对于 B₂、7、10、16、18 号材料, MS 培养基优于 MB 培养基。其中 10 号材料分化率的差值最大, 为 8.33%; 16 号材料分化率的差值最小, 为 4.00%。

2.3 预培养时间对甘蓝型油菜子叶和下胚轴分化的影响

预培养时间的长短对甘蓝型油菜子叶和下胚轴芽的分化有较大影响, 经3d预培养处理的子叶和下胚轴芽的分化率达到最大(表3)。预培养

时间过短(小于3d), 愈伤组织产生不明显, 分化率呈上升趋势; 而预培养时间过长(大于4d), 会形成松散型的愈伤组织, 这类愈伤组织转到分化培养基中大多褐变死亡, 分化率呈明显的下降趋势。

2.4 预培养基中不同激素对比对甘蓝型油菜子叶和下胚轴分化的影响

不同浓度配比的6-BA和2,4-D对甘蓝型油菜子叶和下胚轴芽的分化有重要影响(表4)。对于子叶而言, 其分化率变化范围在7.41%~57.14%之间, 2,4-D1.0mg/L+6-BA1.0mg/L的激素配比芽的分化率最大, 2,4-D2.0mg/L+6-BA2.0mg/L的激素配比芽的分化率最小。对下胚轴而言, 其分化率变化范围在7.14%~64.52%之间, 2,4-D1.0mg/L+6-BA1.0mg/L的激素配比芽的分化率最大, 2,4-D0.5mg/L+6-BA2.0mg/L的激素配比芽的分化率最小。当2,4-D浓度一定时, 随着6-BA浓度的升高(0.5~1.0mg/L), 分化率也随之增大; 当6-BA浓度为1.0mg/L时, 分化率达最大; 当6-BA浓度高于1.0mg/L时, 分化率开始减少。同时, 当6-BA浓度一定时, 随着2,4-D浓度的升高(0.5~1.0mg/L), 分化率亦随之增大; 当2,4-D浓度为1.0mg/L时, 分化率达最大; 当2,4-D浓度高于1.0mg/L时, 分化率开始减少。

2.5 分化培养基中不同激素对比对甘蓝型油菜子叶和下胚轴分化的影响

不同浓度配比的NAA和6-BA对甘蓝型油菜子叶和下胚轴芽的分化有重要影响(表5)。对于子叶而言, 其分化率变化范围在4.00%~62.96%之间, NAA0.05mg/L+6-BA3.0mg/L的激素配比芽的分化率最大, NAA0.20mg/L+6-BA6.0mg/L的激素配比芽的分化率最小。对下胚轴而言, 其分化率变化范围在7.14%~68.00%之间, NAA0.05mg/L+6-BA3.0mg/L的激素配比芽的分化率最大, NAA0.00mg/L+6-BA6.0mg/L的激素配比芽的分化率最小。当NAA浓度一定时, 随着6-BA浓度的升高(0.0~3.0mg/L), 分化率也随之增大; 当6-BA浓度为3.0mg/L时, 分化率达最大; 当6-BA浓度高于3.0mg/L时, 分化率开始减少。同时, 当6-BA浓度一定时, 随着NAA浓度的升高(0.00~0.05mg/L), 分化率亦随之增大; 当NAA浓度为

0.05mg/L时,分化率达最大;当NAA浓度高于0.05mg/L时,分化率开始减少。

2.3 讨论

本试验研究表明,甘蓝型油菜子叶和下胚轴外植体的预培养时间不宜过长或过短,经3d预培养处理的子叶和下胚轴芽的分化率达到最大。这与何云等在甘蓝型油菜下胚轴的培养试验中得到的结论是一致的。王艳等也认为甘蓝型油菜的带柄子叶在诱导分化前经过3d的预培养可明显提高芽的再生频率。

2,4-D对愈伤组织的形成具有很强的促进作用。随着2,4-D浓度的升高(大于1.0mg/L),愈伤组织产生旺盛,但分化率下降。石淑稳等认为2,4-D对甘蓝型油菜下胚轴芽器官具有很强的启动和诱导作用。2,4-D对形态发生的诱导作用在农杆菌介导的基因转化研究中也有报道。Radke等在白菜型和甘蓝型油菜下胚轴的转化试验中,受体在被农杆菌感染之前和之后用2,4-D进行预培养,以促使愈伤的形成,使一些基因型产生高频率的转化。

再生芽的诱导过程中,出现大量的再生苗有玻璃化现象,这是植株在组织培养时生理活动失调引起的现象,芽透明或半透明,生长迟缓,严重的影响了分化率。甘蓝型油菜子叶和下胚轴在不定芽的诱导分化过程中极易产生玻璃化现象。培养基中6-BA的浓度对玻璃化现象有明显影响,随着其浓度的升高,玻璃化现象愈加明显。当6-BA达4.5mg/L时,玻化现象严重;达6.0mg/L时,几乎完全玻璃化。低浓度6-BA对甘蓝型油菜子叶和下胚轴不定芽的分化和生长有促进作用,但浓度过高时,其对不定芽的分化和生长则表现为抑制作用。程振东等和Zhang等认为6-BA对甘蓝型油菜的分化具有较强地促芽能力,且其随浓度的升高玻璃化及畸形苗比例增大。何小兰等在甘蓝型油菜带柄子叶外植体不定芽的培养试验中得到一致的结论:当6-BA浓度过高时会对不定芽的分化和生长产生抑制,表现出一定的毒害性。故用于甘蓝型油菜子叶和下胚轴芽分化的培养基中6-BA的浓度不宜太高,以1.0~3.0mg/L为宜。

在试验中还发现,不同浓度的NAA对甘蓝型

油菜芽的分化有重要影响。当NAA浓度为0mg/L时,生根严重,芽分化慢,整个培养基被根覆盖,因此子叶和下胚轴愈伤及不定芽的诱导,必须添加一定浓度的NAA。但其浓度不宜太高,当NAA浓度超过0.1mg/L时,子叶和下胚轴所形成的愈伤组织在最初的器官分化中产生了大量的毛状根,芽的分化速度变慢,达0.2mg/L时更慢。且随着NAA浓度的升高,玻璃化现象愈加严重。这与黄琼华等人的报道一致,可能由于NAA在油菜组织培养中分化根的能力特别强,浓度过高时抑制了不定芽的形成。

激素对甘蓝型油菜子叶和下胚轴的分化有着重要作用。植物细胞具有全能性,特定的器官或细胞能否分化并产生新的个体取决于合适的激素配比及浓度。在植物离体培养过程中,外植体的内源激素水平不断变化,生长素类物质存在极性运输现象,由此导致了其体内分布的特异性改变,这一变化与器官发生和愈伤组织的形成密切相关。培养基中加入不同配比、不同浓度的激素可以改变和影响外植体的内源激素水平,同时激素之间也可能相互影响。

基因型对分化率有一定影响。不同品系再生难易程度不同,容易再生的基因型对培养基中生长调节因子的要求不太严格,较大范围内变动激素配比及浓度均可获得较好的再生效果。再生难度大的基因型往往要求严格的激素配比及浓度。因此,在实际工作中为了获得较高的再生频率,除了要选择合适的品种基因型外,对于不同的材料还必须进行适当的激素浓度调整,才可能获得高频率再生效果。

芸薹属种的再生取决于遗传和环境两因素。在遗传背景和培养环境一定的条件下不同外殖体的分化频率表现出明显的不同。说明外殖体的内环境在很大程度上也影响其离体再生,可能是不同物种的不同个体、不同器官,不同发育时期外殖体内携带不同水平的激素量所致。因此要获得高频率再生体系,除了考虑适当的激素配比、易再生材料的选择外,对外殖体的植株类型、不同器官及其发育时期、生理状态的筛选具有重要意义。

参考文献(略)