

青花菜试管苗玻璃化发生及克服途径的初步研究^{*}

胡开林¹ 杨瑞环²

(1 华南农业大学园艺系, 广州 510642; 2 中国农业大学园艺系)

摘要 比较了青花菜不同外植体对分化不定芽的影响, 结果表明, 在 MS 添加吲哚乙酸(IAA) 1.0 mg/L 和 6-苄基腺嘌呤(BA) 2.0 mg/L 培养基上, 子叶、下胚轴、花序柄及花蕾的不定芽分化率分别为 50%、100%、14% 和 73%; 在各种外植体所分化形成的不定芽中, 除花蕾所分化的不定芽有 74% 表现正常外, 其余的不定芽几乎玻璃化。与此同时, 以下胚轴作为外植体, 探讨玻璃苗抑制途径的初步结果显示, 提高培养基琼脂质量浓度至 11.0~14.0 g/L 以及三角瓶用棉塞和牛皮纸作为封口材料时, 有利于正常不定芽的分化形成; 而提高培养基中蔗糖浓度或培养基的渗透压, 改变培养基的 pH 值以及添加矮壮素对抑制玻璃苗的发生无明显效果。

关键词 青花菜; 离体培养; 玻璃苗

中图分类号 Q785

在植物离体培养及大量快繁过程中, 试管苗玻璃化现象极为普遍, 它是影响不定芽生根以及试管植株移栽成活的主要因素之一。迄今, 大量资料表明, 导致试管苗玻璃化发生的因素很多, 而且不同植物其主要影响因素也存在差异(卜学贤等, 1987)。本试验对青花菜玻璃苗的发生及克服途径进行了初步研究, 旨在建立良好的遗传再生体系以及利用该体系进行外源基因转导。

1 材料与方法

试验于 1994 年冬至 1997 年冬在中国农业大学和华南农业大学进行。供试青花菜品种为‘里绿’。

1.1 外植体种类

分别用子叶、下胚轴、花序柄、花蕾 4 种不同外植体, 其中子叶、下胚轴取自培养 1 周的无菌苗; 花序柄、花蕾取自田间栽培即将收获的花球。种子、花序柄及花蕾均用 $\varphi=70\%$ 酒精浸泡 30 s 后, 用 $\varphi=10\%$ 饱和次氯酸钠溶液浸泡 10 min 进行表面消毒。接种时, 把子叶切成 0.5 cm×0.5 cm 大小, 下胚轴切成 0.5 cm 左右长, 花序柄切成 0.2 cm 左右薄片, 花蕾长度为 0.35~0.40 cm。培养基为 MS 基本培养基添加吲哚乙酸(IAA) 1.0 mg/L、6-苄基腺嘌呤(BA) 2.0 mg/L 和蔗糖 30.0 g/L, 琼脂质量浓度为 8.0 g/L, 培养基 pH 调至 5.8。每个 100 mL 三角瓶中接种 4 个左右外植体。三角瓶用塑料薄膜封口。培养条件为 16 h 光照, 光照度 2 000 lx, 温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 。培养后第 35 d 调查不定芽分化情况。

1.2 培养基添加成分及 pH 值

以下胚轴作为外植体, 培养基中分别添加 5.0~14.0 g/L 的琼脂、5.0~100.0 mg/L 矮壮

素、30.0~90.0 g/L 蔗糖以及 30.0 g/L 蔗糖+18.0~54.0 g/L 甘露醇. 培养基 pH 值用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调至 4.8、5.8 和 6.8. 三角瓶用塑料薄膜封口.

1.3 三角瓶封口材料

以下胚轴作为外植体, 分别用牛皮纸、棉塞、塑料薄膜和铝箔为三角瓶的封口材料.

2 结果与分析

2.1 不同外植体分化不定芽的比较

接种外植体在培养后 20 d 左右开始分化不定芽, 第 35 d 的调查结果(见表 1)表明, 在相同培养条件下, 子叶、下胚轴、花序柄及花蕾的不定芽分化率分别为 50%、100%、14%和 73%. 但前三者所分化形成的不定芽几乎都玻璃化, 只有从花蕾分化形成的不定芽大多数表现正常. 另外, 从不定芽形成的部位来看, 子叶、下胚轴、花序柄均从切口处分化形成, 但花蕾则是从散开的花瓣内侧的花托部位分化形成不定芽, 而与伤口无关. 因此, 如果进行青花菜大量快繁时, 花蕾是较为适宜的外植体, 但它不适用于通过根癌农杆菌侵染伤口转导外源基因.

表 1 青花菜的外植体种类对分化不定芽的影响

外植体种类	接种数	不定芽分化率/ %	分化不定芽数/ 条	正常不定芽数/ 条
子叶	18	50	12	1
下胚轴	12	100	40	3
花序柄	29	14	4	0
花蕾	11	73	19	14

2.2 培养基添加成分对抑制玻璃苗发生的效果

琼脂浓度对分化不定芽的影响: 比较培养基中的琼脂浓度对青花菜不定芽分化影响的结果显示, 当 $\rho(\text{琼脂})=5.0\text{ g/L}$ 时, 青花菜下胚轴不能分化不定芽; $\rho(\text{琼脂})$ 增加至 8.0 g/L 时, 虽能分化不定芽, 但所分化的不定芽玻璃化程度很高; 当进一步提高 $\rho(\text{琼脂})$ 至 $11.0\sim14.0\text{ g/L}$ 时, 不但提高了下胚轴的不定芽分化率, 同时在一定程度上还抑制了所分化不定芽的玻璃化程度, 提高了正常不定芽形成的比例(见表 2).

表 2 琼脂浓度对抑制青花菜玻璃苗形成的效果

$\rho(\text{琼脂})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	接种数	不定芽分化率/ %	分化不定芽数/ 条	正常不定芽数/ 条
5.0	36	0	0	0
8.0	30	40	25	0
11.0	36	50	33	18
14.0	36	53	33	16

表 3 矮壮素浓度对青花菜下胚轴分化不定芽的影响

$\rho(\text{矮壮素})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	接种数	不定芽分化率/ %	分化不定芽数/ 条	正常不定芽数/ 条
5.0	24	58.3	30	8
20.0	36	66.7	31	4
100.0	36	52.8	32	3

矮壮素对分化不定芽的影响: 在培养基中分别添加矮壮素, 当 $\rho(\text{矮壮素})=5.0、20.0$ 和 100.0 mg/L 时, 对青花菜下胚轴分化不定芽没有产生明显差异(见表 3)。对于大田栽培作物, 矮壮素虽然是常用的一种生长延缓剂, 它能促进植株矮化、健壮生长, 但本试验结果表明, 它却不能有效地抑制试管苗玻璃化的发生。

糖的种类和浓度对分化不定芽的影响: 培养基中添加不同质量浓度的蔗糖和甘露醇的试验结果(见表 4)表明, $\rho(\text{糖})$ 明显影响青花菜下胚轴不定芽的分化。当 $\rho(\text{蔗糖})=30.0\text{ g/L}$ 时, 不定芽分化率最高, 随着 $\rho(\text{蔗糖})$ 的增加以及在 $\rho(\text{蔗糖})=30.0\text{ g/L}$ 的基础上添加不同质量浓度的甘露醇, 均会明显抑制不定芽的分化; 另外, 通过改变培养基中糖的含量以及通过增加甘露醇提高培养基的渗透压, 并不能抑制玻璃苗的发生。

表 4 糖的种类和浓度对分化不定芽的影响

$\rho(\text{糖})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	接种数	不定芽分化率/ %	分化不定芽数/ 条	正常不定芽数/ 条
蔗糖 30.0	36	52.8	49	2
蔗糖 60.0	36	13.9	8	0
蔗糖 90.0	36	0.0	0	0
蔗糖 30.0+甘露醇 18.0	36	16.7	6	0
蔗糖 30.0+甘露醇 36.0	36	0.0	0	0
蔗糖 30.0+甘露醇 54.0	36	0.0	0	0

培养基 pH 值对分化不定芽的影响: 由表 5 的结果可以看出, 培养基 pH 值高于或低于 5.8 时, 均会明显降低不定芽分化率; 同时还表明, 改变培养基 pH 值对抑制青花菜试管苗玻璃化的效果不明显。

表 5 培养基 pH 值对青花菜下胚轴分化不定芽的影响

培养基 pH 值	接种数	不定芽分化率/ %	分化不定芽数/ 条	正常不定芽数/ 条
4.8	36	16.7	12	0
5.8	36	41.7	25	4
6.8	36	16.7	20	5

2.3 三角瓶封口材料对分化不定芽的影响

表 6 的结果表明, 三角瓶用不同的材料封口时, 对青花菜下胚轴分化不定芽有很大影响。使用透气性较差的塑料薄膜和铝箔封口时, 不定芽分化率相对较低, 而且绝大多数为玻璃苗; 而使用透气性较好的牛皮纸和棉塞封口时, 不定芽分化率相对较高, 而且能够较好地抑制玻璃苗的发生。这说明玻璃苗的发生可能与培养容器中相对湿度或空气成分有关。

表 6 三角瓶封口材料对青花菜下胚轴分化不定芽的影响

封口材料	接种数	不定芽分化率/ %	分化不定芽数/ 条	正常不定芽数/ 条
棉塞	36	52.8	45	36
牛皮纸	30	30.0	20	19
铝箔	36	19.4	22	3
塑料薄膜	36	25.0	24	2

3 讨论与结论

近些年来,在植物组织培养过程中,多种类型的植物都有报道存在试管苗玻璃化现象(Phan et al, 1986; Ziv et al, 1983),但对其形成的根本原因还不清楚. 本试验的结果表明,适当提高培养基中的琼脂浓度,增加培养基的衬质势(matric potential),能够降低青花菜玻璃苗发生的比例;但通过增加培养基中的蔗糖浓度或甘露醇浓度,提高培养基的渗透压并不能有效地抑制其玻璃苗的发生. 这与 Debergh 等(1981)以洋蓐为材料的试验结果相一致. 此外,根据三角瓶用透气性较好的牛皮纸和棉塞封口时,能够基本克服玻璃苗的发生这一结果,初步认为,青花菜玻璃苗发生的原因可能是培养基的水势和培养容器中的相对湿度或空气成分共同作用的结果. 其它如植物激素种类(包括矮壮素)、培养基 pH 值均无抑制青花菜玻璃苗发生的效果. 在试验中还观察到,即使用相同的下胚轴作为外植体,但不同的取材时期,其分化不定芽的能力也存在差异. 本研究结果为青花菜进行外源基因的遗传转化奠定了基础.

致谢 本研究在中国农业大学进行期间,承蒙园艺系周维燕教授提供实验条件,特此致谢!

参 考 文 献

- 卜学贤,陈维伦. 1987. 试管植株的玻璃化现象. 植物生理学通讯, 5: 13~18
- Debergh P C, Harbaoui Y, Lemeur R. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol Plant*, 53: 181~187
- Phan C T, Hegedus P. 1986. Possible metabolic basis for the developmental anomaly observed in *in vitro* culture, called "vitreous plant". *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 6: 83~94
- Ziv M, Meir C, Halevy A H. 1983. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2: 55~65

PRELIMINARY STUDIES ON THE OCCURRENCE AND OVERCOMING WAYS OF VITRIFICATION OF REGENERATED BROCCOLI SHOOTS

Hu Kailin¹ Yang Ruihuan²

(1 Dept. of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642;

2 Dept. of Horticulture, China Agric. Univ.)

Abstract

The effect of different explants of broccoli on shoot regeneration was compared. The results showed on the medium of MS containing indol-3-acetic acid 1.0 mg/L and 6-benzyladenine 2.0 mg/L, the frequency of shoot regeneration from cotyledon, hypocotyl, inflorescence stem and flower bud was 50%, 100%, 14% and 73% respectively. All of the shoots regenerated from various explants except that 74% of the shoots from flower bud were normal, were nearly vitrified. Meanwhile, the ways for overcoming vitrification using hypocotyl as explant was studied. The preliminary results showed that the normal shoot regeneration was facilitated by increasing mass concentration of agar to 11.0~14.0 g/L in medium, or covering the flask with cotton plug and kraft paper. But there were no evident effect for inhibiting the occurrence of vitreous shoot by increasing sucrose concentration or osmotic pressure, changing the pH and supplementing chlorocholine chloride (CCC) in medium.

Key words broccoli; *in vitro* culture; vitreous shoot

[责任编辑 柴 焰]