

海甘蓝愈伤组织再生植株的研究 *

高宏波 王幼平 罗 鹏

(四川联合大学生物系, 成都 610064)

摘 要 海甘蓝种子在附加有 2~5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 的 MS 培养基上, 幼苗生长健壮。幼苗的下胚轴和子叶柄在 MS + 1 mg/L 2, 4-D + 0.5 mg/L 6-BA 的培养基上可以获得较好的愈伤组织。将来源于下胚轴的愈伤组织培养于含有 0.5 mg/L NAA, 2 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上分化出的丛生芽状态最好。最佳生根培养基为 1/2 MS + 0.5 mg/L BA。

关键词 海甘蓝; 愈伤组织; 植株再生

Studies on plantlet regeneration from callus of *Crambe abyssinica*

Gao Hongbo Wang Youping Luo Peng

(Department of Biology, Sichuan Union University, Chendu 610064)

Abstract Robust seedlings of *Crambe abyssinica* were obtained from the seeds cultured on MS basal medium with 2~5 mg/L 6-Benzylaminopurine (6-BA) + 0.1 mg/L naphthalene acetic acid (NAA). Its hypocotyl and petiole of cotyledon were better explants for inducing calli on the MS medium with 1 mg/L 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) + 0.5 mg/L 6-BA. The calli induced from the hypocotyl developed the best shoot clusters when they were cultured on MS + 0.5 mg/L NAA + 2 mg/L 6-BA. Roots were induced on 1/2 MS + 0.5 mg/L indolebutyric acid (IBA).

Key words *Crambe abyssinica*; callus; plantlet regeneration

海甘蓝 (*Crambe abyssinica*) 是从上千种植物中筛选出来的含高芥酸植物^[1]。目前该植物已在成都地区引种成功, 其种子含油量为 34.48%, 芥酸含量为 55%~62.50%, 硫甙的含量为 71.51~82.20 $\mu\text{mol/g}$ ^[2]。由于海甘蓝的染色体倍数水平高 ($2n=90$), 缺乏重要的变异, 因此, 早期对该种质资源进行遗传改良均未取得成功^[3]。因此本文通过用海甘蓝幼苗的不同部位做外植体进行组织培养, 获得了再生植株, 为开发利用该种质资源 and 对其进行遗传改良提供一条较好的途径。

1 材料和方法

1.1 无菌幼苗的获得

海甘蓝种子先用 70% 的乙醇浸泡 3~5 min, 再用 0.1% 的升汞溶液消毒 10 min 左右, 然后用无菌蒸馏水漂洗三次, 接种到含有 0~10 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 的 MS 固体培养基上发芽。20 d 后观察幼苗的萌发情况。

1.2 愈伤组织的诱导

在 MS + 4 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 的培养基上萌发的幼苗长至子叶平展期, 分别取其子叶、子叶柄、下胚轴和幼根作外植体。子叶大小约 0.3 cm × 0.3 cm, 子叶柄、下胚轴和幼根长约 0.5 cm。将上述外植体接种在含有 0~8 mg/L 2, 4-D + 0.5 mg/L 6-BA 的 MS 固体培养基上, 两周后观察各外植体的愈伤组织诱导率及其大小、颜色、质地状况, 并选择最佳脱分化培养基。

1.3 分化培养

将生长状况较为良好的愈伤组织转至含有不同浓度的 6-BA 和 NAA 的培养基上, 4 周后观察不同培养基上愈伤组织的分化出芽情况。

1.4 生根培养

在丛生芽中选取较为健壮的幼芽将其移至附加有 NAA 0~2 mg/L 和 IBA 0~6 mg/L 的培养基上, 3 周后观察生根状况。

在上述步骤中, 各外植体均接种于容量为 120 ml 的三角瓶中, 每瓶 3~4 个外植体, 每处理 3~4 次重复, 培养条件: 温度 20~25 °C, 每日光照 10~12 h, 光照度为 2 500~3 000 lx

2 结果与分析

2.1 6-BA 浓度对海甘蓝种子萌发的影响

海甘蓝种子在不同激素的培养基中均能萌发, 但不同浓度的 6-BA 对海甘蓝种子的萌发率、幼苗的发育状况均有一定程度的影响。从表 1 可看出, 当培养基中没有任何激素时, 幼苗生长纤

表 1 不同浓度的 6-BA 对海甘蓝种子萌发的影响

Table 1 Effect of different concentration of 6-BA on the germination of *Crambe* seed

6-BA 浓度 (mg/L)	发芽率 (%)	畸形苗率 (%)	株高 (cm)	叶片数 (片/株)
0	62.2	13.1	2.5~3.2	1~2
0.5	70.3	10.0	2.0~2.5	1~2
1	72.4	12.3	1.7~2.4	2~3
2	73.3	9.1	1.5~2.0	2~3
5	90.0	11.1	1.5~2.0	2~4
10	77.8	7.1	1.5~2.0	2~4

细、瘦弱, 发根多, 畸形苗率高, 真叶数较少。当 6-BA 为 2~5 mg/L 时, 种子的发芽率较高, 同时畸形苗率较低。当 6-BA 为 10 mg/L 时, 幼苗容易发黄。因此选用含 2~5 mg/L 6-BA 的培养基对种子的萌发和生长更为有利。

2.2 愈伤组织的诱导

激素对形成的愈伤组织的质量有重要影响。较高浓度的 2, 4-D 易使外植体严重褐化而死亡; 使用较低浓度的 2, 4-D 虽可获得疏松的愈伤组织, 但生长缓慢且易褐化。而加入适当的 6-BA 可减轻褐化程度。所以选择出诱导愈伤组织的最佳浓度激素配比为 1 mg/L 2, 4-D + 0.5 mg/L 6-BA。

如表 2 所示, 来自不同部位的外植体产生愈伤组织的情况也不一样。子叶柄、下胚轴最易产生疏松、半透明的愈伤组织 (图 1: 1)。子叶叶片产生的愈伤组织生长较慢, 多为白色、质密。而幼根产生的愈伤组织前期生长很快, 而后极易褐化, 呈稀泥状, 无继续培养的价值。

另外, 幼苗的苗龄过长也会使接种的各外植体不易产生愈伤组织。

表 2 不同类型外植体的脱分化差异

Table 2 Difference of dedifferentiation in different types of explants

外植体来源	愈伤率 (%)	愈伤组织直径 (cm)	愈伤组织质地状况
子叶	92	0.60	白色或淡黄绿色, 较硬 有少量根生成
子叶柄	100	0.72	白色或淡黄色、较松软、较松软, 部分为颗粒状
下胚轴	85	0.61	淡黄绿色、松软, 多颗粒状
幼根	100	0.49	黄褐色、稀泥状

2.3 分化培养

从表 3 中可以看出, 不同来源的愈伤组织再生出芽的频率有一定的差别。总的来说, 源自下胚轴愈伤组织分化出芽的频率要高些, 而且这些芽的大小、粗壮程度有不小的差别, 但多数叶色呈深绿色。源自子叶柄的愈伤组织生长很快, 分化出芽的频率要低些, 且大多数较为瘦弱, 叶色为黄绿色。

当愈伤组织转移到分化培养基上约一周后, 多数转为淡黄绿色, 但上面有颜色更深的绿色芽点。这些芽点先是突起, 然后由浅绿色转为深绿色 (图 1: 2), 最后分化成一个芽, 这些芽多呈丛生状 (图 1: 3)。源自子叶的愈伤组织只是有所生长, 并无分化出芽。

6-BA 的浓度对分化出芽的频率有较大影响。当 6-BA 浓度升高时, 愈伤组织再生频率也随之升高, 再

生出的苗也由弱到壮, 且每块愈伤组织出芽数也在增加。这表明, 适当浓度的 6-BA 对愈伤组织分化出芽有明显的促进作用, 但 6-BA 浓度高于 4 mg/L 时, 愈伤组织色白, 生长快, 不易分化。另外, 当适量增加 NAA 浓度时, 分化出芽的速度加快, 且芽的节间变长。

表 3 激素浓度和外植体类型对植株再生的影响

Table 3 Effects of hormone concentration and explant type on plant regeneration

激素浓度		来自不同部位的愈伤组织再生频率	
NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	下胚轴 (%)	子叶柄 (%)
0.2	0	0	0
0.2	0.5	13	0
0.2	1	20	6
0.2	2	40	13
0.2	4	0	0
0.5	0.5	0	0
0.5	1	25	0
0.5	2	45	13
0.5	4	0	0

2.4 生根培养

低浓度的生长素对幼芽的生根有促进作用。在附加有不同浓度生长素的 1/2 MS 培养基中诱导幼芽生根，20 d 后均有白色的根出现。其中不含任何激素的 1/2 MS 培养基分化出的不定根较



图 1 海甘蓝愈伤组织再生植株

1. 下胚轴诱导产生的愈伤组织 2. 正在分化出芽的愈伤组织 3. 愈伤组织分化出丛生芽

Fig 1. Plant regeneration from callus of *Crambe abyssinica*

1. Calli induced from hypocotyl 2. Callus developing shoots 3. Shoot clusters developed from calli

纤细，生根率较低；附加有 0.05 NAA 和 0.5 IBA 培养基生长率较高，不定根较粗壮，根可长达 2~3 cm，并有侧根出现；附加有 0.5 IBA 的效果更好（表 4）。

表 4 不同培养基对生根的影响（20d 后统计）

Table 4 Effects of different kinds of media on root inducing

培养基成分	供试丛芽数	生根丛芽数	生根率 (%)
1/2 MS	20	9	45
1/2 MS + 0.05 NAA	20	15	75
1/2 MS + 0.05 IBA	20	16	80

5 讨论

在组织培养中，外植体的最初来源部位对其能否最终顺利的再生植株很重要。在愈伤组织的诱导过程中，来自根部的外植体产生的愈伤组织极易褐化，呈稀泥状，不能继续培养。在分化培养中，子叶叶片产生的愈伤组织因较为致密、坚硬，所以不易分化出芽；来源于子叶柄的愈伤组织分化频率低，幼芽的状态也差；而源自下胚轴的愈伤组织不仅有较高的分化频率，而且出芽状态也好。因此，不同的外植体其再生能力是有一定差异的。

在分化出芽的过程中，6-BA 起到了关键的作用。6-BA 浓度从 0.5 mg/L 到 2 mg/L，愈伤组织分化出芽的频率、丛生状况以及幼苗的茁壮程度都有明显的提高。但若只用少量或不用 NAA，则分化出芽丛生化较为严重，且不利于其节间的伸长。因此，为了使分化出芽的过程更加顺利，加入适当浓度的 NAA 是有益的。

参考文献

- 1 Prinsen L H. New oilseed crops on the Horizon. *Economic Botany*, 1983, 37 (4): 478~492
- 2 王幼平, 罗鹏, 李旭峰. 海甘蓝的初步研究. *云南植物研究*, 1995, 17 (2): 169~174
- 3 Downey R K. Agricultural and genetic potentials of Cruciferae oilseed crops. *JAOCs*, 1971, 48: 718~722