

# 大白菜高频再生体系的建立及策略

王 洋 崔继哲\* 李翠玲

(哈尔滨师范大学生物化学与分子生物学实验室, 哈尔滨 150080)

**摘 要:** 就北方大白菜 14 个基因型进行组织培养再生比较, 以筛选出的较高再生率的基因型为试材, 在含不同配比的 6-BA、TDZ、NAA 及  $\text{AgNO}_3$ 、 $\text{GA}_3$ 、ABA 的培养基中进行再生比较, 分别建立了含有 6-BA 和 TDZ 的大白菜组织培养再生最佳培养基: MS + 6-BA 5 mg/L + NAA 0.5 mg/L +  $\text{AgNO}_3$  2 mg/L 和 MS + TDZ 0.1 mg/L + 6-BA 5 mg/L + NAA 0.5 mg/L +  $\text{AgNO}_3$  2 mg/L + ABA 0.25 mg/L, 大白菜再生频率最高可以达到 90.6%, 建立了大白菜高频再生体系, 讨论分析了影响大白菜再生的主导因素并提出建立大白菜高频再生体系的可行策略。

**关键词:** 大白菜; 基因型; 6-BA; TDZ; ABA

**中图分类号:** S 634.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 04-0701-03

## Strategies in Establishing Effective Regeneration System of Chinese Cabbage

Wang Yang, Cui Jizhe\*, and Li Cuiling

(Biochemistry and Molecular Biology Laboratory, Harbin Normal University, Harbin 150080, China)

**Abstract:** This study evaluated shoot organogenic potential of 14 genotypes of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. sp. *pekinensis*), the regeneration frequency varied significantly. The genotype which had maximum shoot regeneration was chosen for investigating the optimum concentration of 6-BA or TDZ on shoot regeneration. The maximum frequency of shoot regeneration was obtained respectively in the mediums: MS + 6-BA 5 mg/L + NAA 0.5 mg/L +  $\text{AgNO}_3$  2 mg/L and MS + TDZ 0.1 mg/L + 6-BA 5 mg/L + NAA 0.5 mg/L +  $\text{AgNO}_3$  2 mg/L + ABA 0.25 mg/L, and the highest frequency of shoot regeneration (90.6%) was achieved on the latter medium. In this research, The determine factors influencing shoot regeneration and strategies to establish efficient regeneration system of Chinese cabbage are discussed.

**Key words:** Chinese cabbage; Genotype; 6-BA; TDZ; ABA

## 1 目的、材料与方法

大白菜 (*Brassica campestris* L. sp. *pekinensis*) 携带 AA 基因组, 是芸薹属中最难脱分化和不易再生的种<sup>[1]</sup>, 目前国内外已有人建立了大白菜高频再生系统<sup>[2,3]</sup>, 但仍然存在基因型的局限性。

作者选用北方大白菜 14 个基因型 (表 1) 进一步试验。将种子消毒清洗, 置于 MS 培养基中培养, 20 粒/瓶。取 4 d 苗龄、带 1~2 mm 子叶柄的子叶 (简称子叶—子叶柄) 接种于分化培养基 (MS + 6-BA 5 mg/L + NAA 0.5 mg/L +  $\text{AgNO}_3$  2 mg/L, 琼脂 1.4%, 蔗糖 3%), 2~3 次重复, 每重复 30 个外植体, 以  $(25 \pm 2)$ 、16 h 光照培养。将再生率最高的基因型在含有不同配比的 6-BA、NAA、 $\text{GA}_3$ 、 $\text{AgNO}_3$ 、TDZ 和 ABA 的 MS 培养基中培养, 30 d 后统计芽再生频率 [芽再生频率 (%) = 形成再生芽的外植体数 / 接种的外植体总数  $\times 100$ ], 数据经反正弦转换后进行方差分析和显著性测验 (SSR 法)。

收稿日期: 2005 - 01 - 17; 修回日期: 2005 - 06 - 07

基金项目: 黑龙江省重大科技攻关项目 (GA0113101-10)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: shiccl@yahoo.com.cn)

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 大白菜基因型再生能力的差异

各基因型大白菜的芽再生频率差异显著 (表 1), 再生芽从子叶柄的基部长出, 而子叶形态学的上端很难形成再生芽。鲁白七号、602、268 和 龙白二号这 4 个品种分化较早, 两周开始陆续出芽, 再生率都在 50% 以上, 而凯丰二号、新世纪、603、601 和 龙协白四号这 5 个品种芽分化晚, 再生率低于 30%, 其他 5 个品种的表现则介于这两种类型之间。

### 2.2 植物生长调节剂种类和外植体类型对大白菜再生的影响

6-BA 和 NAA 是常用的植物生长调节剂组合 (表 2, 处理 12~25), 应用于鲁白七号时以 6-BA 5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/L 是最佳配比 (处理 25), 改变各植物生长调节剂浓度不能使再生频率提高。在本试验中赤霉素 (GA<sub>3</sub>) 不能够改善大白菜再生芽的质量和数量。TDZ 与 ABA 可大幅度提高大白菜的再生频率 (表 2, 处理 1~11), 最高可达 90.6%。与 6-BA 相比, 以很低的 TDZ 浓度 (0.25 mg·L<sup>-1</sup>) 就可使芽再生率达到 72.7% (表 2, 处理 2), TDZ 完全可以作为细胞分裂素来促进芽的分化; 将处理 2 与 3、4, 与 5、6, 与 7 分别比较后, 发现 TDZ 是在低使用浓度下才具有高活性。TDZ 与 6-BA 存在互作, 在得到较高的芽再生率同时可进一步提高每个外植体再生芽的数量和质量, 说明 TDZ 与 6-BA 虽都能促进再生芽的形成, 但作用机制不完全相同。在上述最适培养基中添加 TDZ 和 ABA (处理 7), 再生率最高, 再生状态理想 (图 1), 外植体所产生的再生芽短簇, 对于农杆菌侵染后获得更多的抗性芽有益。

再生率在 1% 显著水平上表现不同的 6 个基因型 (表 3), 在 MS + TDZ 0.1 mg/L + 6-BA 5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/L + ABA 0.25 mg/L 培养基中进行分化培养, 结果表明 TDZ 可进一步提高其中 5 个基因型的芽再生率, 但各基因型再生差异仍十分显著, 鲁白七号和 602 两个基因型再生率达到了 85% 以上, 其它 4 个基因型再生率并没有得到明显提高, 仍不能打破基因型的限制。

表 1 大白菜 14 个品种不定芽的再生情况

Table 1 Regeneration of shoots from 14 cultivars of Chinese cabbage

基因型 Genotypes	芽再生率 Shoot regeneration frequency (%)	开始分化时间 Time on regeneration (d)
鲁白七号 Lubai	68.2 ±9.4A	13
602	59.6 ±9.4AB	13
268	53.8 ±3.3ABC	13
龙白二号 Longbai	51.1 ±3.1ABC	14
潍白六号 Weibai	47.3 ±2.0BCD	17
鲁春白一号 Luchunbai	41.6 ±1.5BCD	13
哈白二号 Habai	34.4 ±1.6CDE	19
牡丹江二号 Mudanjiang	30.0 ±2.7DE	19
173	30.0 ±2.7DE	19
龙协白四号 Longxiebai	27.6 ±2.5DE	19
601	20.8 ±6.1EF	19
新世纪 Xinshiji	19.9 ±4.6EF	28
603	17.5 ±3.5EF	19
凯丰二号 Kaifeng	9.8 ±0.3F	19

注: 数字后不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。下表同。

Note: Means at the same line followed by different capital letters differ extremely significantly at  $P < 0.01$ . Same as below.

表 2 不同浓度 6-BA、NAA、GA<sub>3</sub>、TDZ、ABA 和 AgNO<sub>3</sub> 条件下 ‘鲁白七号’ 的芽再生频率

Table 2 Frequency of shoot regeneration of ‘Lubai’ on media containing various concentrations of 6-BA, NAA, GA<sub>3</sub>, TDZ, ABA and AgNO<sub>3</sub>

处理 号 No	培养基添加成分 The supplemented components in the medium (mg/L)						芽再生频率 Shoot regeneration frequency (%)
	TDZ	6-BA	NAA	AgNO <sub>3</sub>	ABA	GA <sub>3</sub>	
1	0.5		0.1	2			23.3
2	0.25		0.5	2			72.7
3	0.5		0.5	2			44.9
4	0.2	5	0.5	2			60.0
5	0.1	5	0.5	2			74.3
6	0.2	5	0.5	2	0.25		44.0
7	0.1	5	0.5	2	0.25		90.6
8	0.2		2.0	10	0.25		39.7
9	0.5		0.5	2	0.25		65.0
10	0.5		1.0	10	0.25		37.0
11	0.5		2.0	10	0.25		41.0
12		6	0.5	10			33.3
13		6	0.5	2			47.6
14		6	0.5	5			20.0
15		6	0.1	2			0
16		5	0.05	2			0
17		5	0.1	2			16.7
18		5	0.3	2			33.3
19		5	0.5	5			56.7
20		5	0.5	5		0.1	23.3
21		5	0.5	10			30.0
22		6	0.5	10		0.1	33.3
23		6	0.3	2			33.3
24		5	0.0	2			8.3
25		5	0.5	2			73.3

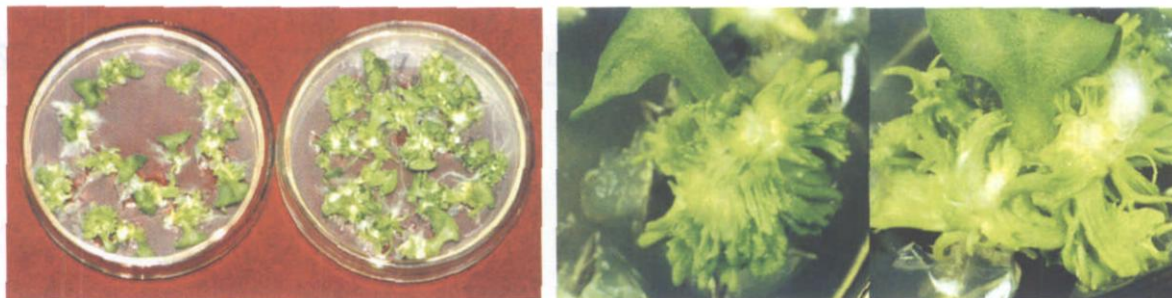


图 1 ‘鲁白七号’在含 TDZ 的最适培养基中

Fig 1 ‘Lubai 7’ on the optimum medium containing TDZ

4~5 d 苗龄的子叶—子叶柄的再生能力大大高于其它类型的外植体, 在不同的 TDZ、BA、NAA、ABA、GA<sub>3</sub> 配比条件下, 下胚轴再生率仅能达到 29%。子叶很难得到再生, 但一定面积的子叶对于子叶柄基部的芽再生是必要的, 且子叶柄留取太短不利于芽再生。本试验所确定的外植体最佳类型和苗龄与文献<sup>[3,4]</sup>报道的基本一致。虽然各基因型大白菜再生的最适培养基并不是一致的, 但在一个最适培养基中, 再生率相对较高 (本试验结果为 50% 以上) 的基因型可以被确定是具有高频再生潜力的, 通过改善培养基完全可以建立高频再生系统 (本研究结果再生率在 80% 以上), 而在一定再生率 (本试验结果为 30% 左右) 以下的基因型通过改善培养基不能打破基因型的限制, 不能建立高频再生系统。因此大白菜每一个品种的最适培养基或许都可以用来筛选基因型。Bi 等<sup>[5]</sup>也发现芽再生率低于 80% 且每外植体再生芽的个数在 5 以下的烟草材料, 很难通过改变培养基中的添加成分来显著提高芽再生率, 而再生率高于 80% 的品种可以通过改变培养基的添加成分来大幅度提高再生率。所以建立大白菜高频再生系统时首先进行基因型筛选是完全必要的。

表 3 不同基因型在含 TDZ 培养基中的再生率

Table 3 Shoot regeneration of various genotypes on

基因型 Genotype	media containing TDZ (%)	
	培养基添加成分 The supplemented components in the medium (mg/L)	
	TDZ 0.1 + 6-BA 5 + NAA 0.5 + AgNO <sub>3</sub> 2 + ABA 0.25	6-BA 5 + NAA 0.5 + AgNO <sub>3</sub> 2
鲁白七号 Lubai 602	90.6A	68.2
鲁春白一号 Luchunbai	85.0A	59.6
牡丹江二号 Mudanjiang	62.2B	41.6
哈白二号 Habai	41.7C	30.0
凯丰二号 Kaifeng	31.7C	34.4
	16.7D	9.8

## 参考文献:

- Palmer C E. Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. *Plant Cell Reports*, 1992, 11: 541~549
- Zhang F L, Takahata Y, Xu J B. Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Reports*, 1998, 17: 780~786
- 王火旭, 王关林, 王晓岩, 方宏筠, 贾士荣, 唐益雄, 魏毓棠. 大白菜 AB-81 高频再生体系的建立及 *gus A* 基因瞬时表达的研究. *园艺学报*, 2001, 28 (1): 74~76  
Wang H X, Wang G L, Wang X Y, Fang H J, Jia S R, Tang Y X, Wei Y T. 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. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28 (1): 74~76 (in Chinese)
- 张 松, 魏毓棠, 温孚江, 傅连海. 利用乙烯抑制剂 AgNO<sub>3</sub> 建立大白菜高频植株再生体系. *园艺学报*, 1997, 24 (1): 94~96  
Zhang S, Wei Y T, Wen F J, Fu L H. Establishment of efficient plant regeneration system of Chinese cabbage using medium containing ethylene inhibitor AgNO<sub>3</sub>. *Acta Horticulturae Sinica*, 1997, 24 (1): 94~96 (in Chinese)
- Bi L, Huang W, Bass T. Shoot production per responsive leaf explant increases exponentially with explant organogenic potential in *Nicotiana* species. *Plant Cell Report*, 2003, 22: 231~238