

# 同源四倍体青花菜离体再生及其倍性鉴定

张丽丽，张蜀宁<sup>\*</sup>，张红梅，侯喜林

(南京农业大学，作物遗传与种质创新国家重点实验室，南京 210095)

**摘要：**以同源四倍体青花菜带柄子叶为外植体，研究其离体再生体系。结果表明：10 d苗龄外植体在 MS + 0.05 mg · L<sup>-1</sup> NAA + 3.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.8% 琼脂 + 3% 蔗糖培养基上不定芽的再生频率最高为 63.3%；继代培养 (MS + 0.04 mg · L<sup>-1</sup> NAA + 4.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.8% 琼脂 + 3% 蔗糖) 增殖系数为 6，诱导 (1/2MS + 0.1 mg · L<sup>-1</sup> NAA + 0.7% 琼脂 + 3% 蔗糖) 生根率 100%，移栽成活率为 90%。流式细胞技术分析及染色体计数鉴定结果表明，再生植株的 DNA 相对含量为二倍体的 2 倍，染色体数为 2n = 4x = 36。

**关键词：**青花菜；同源四倍体；带柄子叶；再生；流式细胞仪

**中图分类号：**S 635    **文献标识码：**A    **文章编号：**0513-353X (2008) 10-1517-04

## Regeneration of Autotetraploid Broccoli in Vitro Culture and Identification of the Ploidy

ZHANG Li-li, ZHANG Shu-ning<sup>\*</sup>, ZHANG Hong-mei, and HOU Xi-lin

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The frequency of shoot regeneration in autotetraploid broccoli was studied. Cotyledons with petiole as explants were cultured on MS medium with different combinations of growth regulator. The effects of growth regulator combinations on induction of shoots were evaluated. The optimal medium for inducing shoots were MS media containing 0.8% agar and 3% sucrose supplemented with 3.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA, 0.05 mg · L<sup>-1</sup> NAA. The shoot induction percentage was 63.3%. Then each shoot was transplanted on the MS medium containing 0.04 mg · L<sup>-1</sup> NAA and 4.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA proliferating about 6 times. The use of 0.1 mg · L<sup>-1</sup> NAA in the rooting medium increased the number of healthy roots per rooted plant (root ratio was 100%). The high-efficient shoot regeneration system of autotetraploid broccoli were established and analyzed the ploidy stability of regenerates using flow cytometry. The result showed that the tetraploid relative DNA content was about two times of control. The identified result of flow cytometry according to the chromosome analysis implied the regeneration plantlets keep the original ploidy.

**Key words:** broccoli; autotetraploid; cotyledons with petiole; *in vitro* culture; flow cytometry machine

青花菜 (*B. rassica oleracea* L. var. *italica* Planch) 再生的研究已有报道 (Takahata & Keller, 1991; 秦耀国等, 2005; Ying et al., 2007)。南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室通过秋水仙素诱导获得了同源四倍体青花菜新种质，其主要品质指标高于二倍体对照 (张杰等, 2006)。但人工诱变的青花菜四倍体早期世代育性低，阻碍了同源四倍体青花菜的研究和利用。离体再生是保存和扩繁新种质的有效途径。研究四倍体青花菜再生体系，为其理论研究和生产应用提供参考。

收稿日期：2008-06-16；修回日期：2008-09-08

基金项目：国家‘863’计划项目 (2003AA207120)

\* 通讯作者 Author for correspondence (Email: shuning@njau.edu.cn, Tel: 025-84395332)

## 1 材料与方法

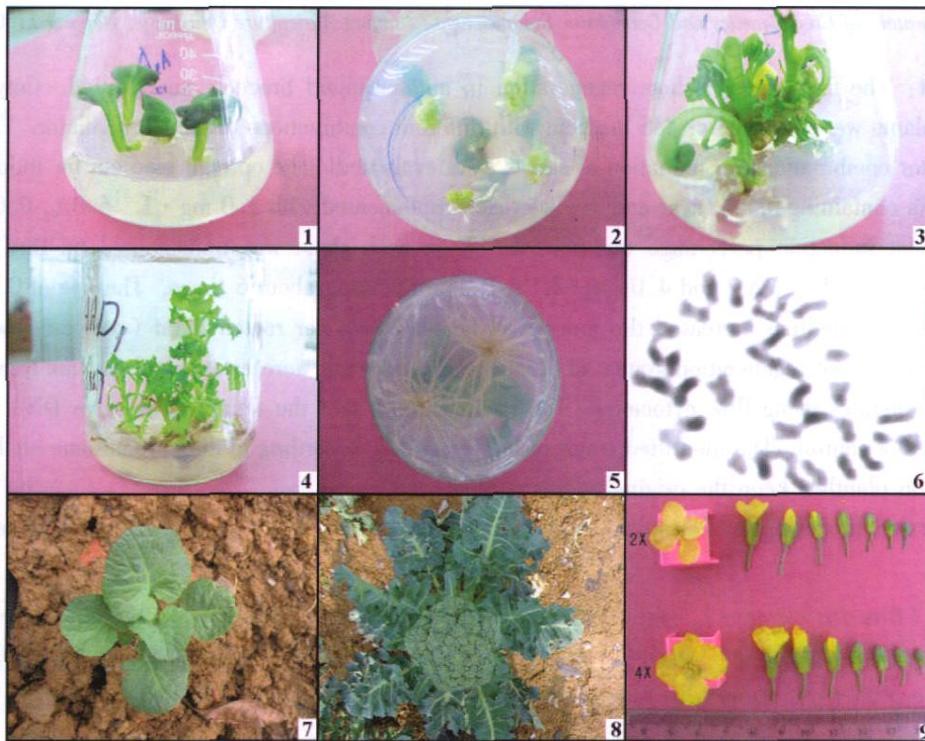
试验于2006年4月—2007年10月在本实验室进行。四倍体青花菜04J-3由南京农业大学园艺学院诱变二倍体青花菜04J-21(‘春绿’)获得。用70%酒精对种子消毒30 s, 0.1%  $\text{HgCl}_2$ 处理20 min, 无菌水冲洗5次, 接入无激素的MS培养基, 25 °C、16 h/8 h、1500~2000 lx光强下培养。取10 d的带柄子叶插植在含不同浓度NAA和6-BA的MS(琼脂0.8%, 蔗糖3%)培养基, 每处理6瓶, 每瓶5个外植体, 重复2次。15 d后统计愈伤组织诱导率, 30 d后统计不定芽再生率, 采用Statistica软件进行方差分析。将获得的不定芽丛切成单芽继代培养( $\text{MS} + 0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA} + 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.8\%$ 琼脂+3%蔗糖), 20~30 d继代一次。继代后诱导生根培养( $1/2 \text{ MS} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA} + 0.7\%$ 琼脂+3%蔗糖), 形成根系后, 开瓶炼苗48~72 h, 移入蛭石 泥炭土 珍珠岩=1:2:1的基质中培养两周, 植株长到4~5片叶后移栽到大田, 至开花结果采收种子。

取组培苗叶片参照张振超等(2007)的方法用流式细胞仪(美国Beckman公司)测定DNA含量。取组培苗1.0~1.5 cm的根尖在 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的8-羟基喹啉中预处理2.5~3.0 h, 卡诺液固定8~24 h,  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{HCl}$ 解离12 min, 改良卡宝品红染色制片, Zeiss Axio Skop 40显微镜观察并拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 NAA和6-BA配比对不定芽再生频率的影响

接种外植体(图版, 1)1周后, 子叶柄基部膨大分化形成愈伤组织(图版, 2), 3周后愈伤分化出不定芽(图版, 3)。



图版说明: 1. 外植体; 2. 愈伤组织形成; 3. 不定芽形成; 4. 继代培养; 5. 诱导生根; 6. 四倍体根尖染色体; 7. 植株驯化移栽; 8. 四倍体再生植株结球; 9. 花器官。

**Explanation of plates:** 1. Explants; 2. Callus formation; 3. Bud regeneration; 4. Multiplication; 5. Shoot induced into roots; 6. Chromosome from the needle of tetraploid root; 7. Domestication and transplantation plantlet of broccoli; 8. Flower head formation in tetraploid; 9. Flower organ.

四倍体青花菜形成愈伤组织的频率均接近 100% (表 1)，出芽途径是先形成愈伤组织再形成不定芽，二倍体外植体少数是直接出芽途径。当 NAA 与 6-BA 配比为  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时，四倍体不定芽再生频率最高为 65.3% 和 63.3%，但前者形成畸形不定芽较多。四倍体最佳培养基配方是 MS +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA +  $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA + 0.8% 琼脂 + 3% 蔗糖。

表 1 同源四倍体青花菜带柄子叶在不同生长调节剂配比下不定芽的分化率

Table 1 Shoots differentiation rate of cotyledons with petiole in different combination of

growth regulators in autotetraploid broccoli

NAA / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	6-BA / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	04J-21 (2x)		04J-20 (4x)		/%
		愈伤组织诱导频率 Rate of callus	不定芽再生频率 Shoot regeneration frequency	愈伤组织诱导频率 Rate of callus	不定芽再生频率 Shoot regeneration frequency	
0.01	0.3	80.0	31.5 ghiGH	86.7 dB	3.3 eB	
	1.5	84.0	21.9 iH	98.3 abA	21.7 cdeAB	
	3.0	90.0	42.2 fghFG	100.0 aA	38.3 abcdAB	
	6.0	100.0	44.0 fghFG	100.0 aA	38.3 abcdAB	
	9.0	100.0	30.9 hiGH	100.0 aA	65.3 aA	
0.05	0.3	52.6	45.8 fgFG	91.7 cdAB	16.7 deAB	
	1.5	100.0	53.3 eEF	100.0 aA	21.7 cdeAB	
	3.0	100.0	60.0 deDEF	100.0 aA	63.3 aA	
	6.0	100.0	93.4 aA	100.0 aA	40.0 abcdAB	
	9.0	100.0	72.0 cdbcDE	100.0 aA	55.7 abA	
0.10	0.3	75.0	70.0 cdCDE	92.0 bcdAB	18.0 deAB	
	1.5	100.0	91.0 abAB	95.0 abcAB	30.0 bcdeAB	
	3.0	100.0	90.2 abABC	100.0 aA	52.1 abcA	
	6.0	100.0	78.5 bcABCD	100.0 aA	49.9 abcdAB	
	9.0	100.0	73.0 cdABCDE	100.0 aA	53.3 abcA	

注：不同大小写字母表示在 0.01 和 0.05 水平上差异显著。

Note: The data with different letters indicate significant difference at 0.05 or 0.01 level

## 2.2 再生植株的生根和移栽

继代培养表明，随着继代次数的增多四倍体增殖系数不断增大，1 次继代后增殖系数为 2.4，2 次后增殖系数为 3，3 次后增殖系数为 6 (图版，4)。诱导生根 2~3 周后，植株基部长出大量白色粗壮的根，生根率达 100% (图版，5)。开瓶炼苗后于 9 月下旬移栽到大田 (图版，7)，获得再生植株，植株成活率达 90%。次年 4 月开花结果 (图版，8、9)，采收种子。

## 2.3 DNA 流式细胞仪倍性分析及染色体鉴定

流式细胞仪倍性分析结果 (图 1) 表明，二倍体 DNA 相对含量在 200 附近，而再生植株 DNA 相

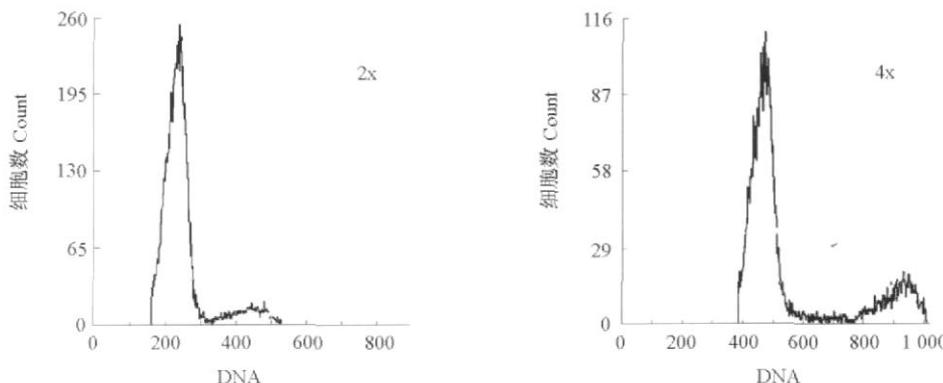


图 1 青花菜二倍体和四倍体组培苗叶片的 DNA 相对含量

Fig. 1 Curves of DNA relative content of leaves of diploid and tetraploid broccoli in vitro plant

对含量在 400附近，二者的比值约为 2，表明再生植株是四倍体。染色体鉴定结果（图版，6）表明：根尖分生组织有丝分裂中期染色体数为  $2n = 4x = 36$ ，证明再生植株是四倍体，与流式细胞仪分析结果一致。

### 3 讨论

在培养基 MS + 0.05 mg · L<sup>-1</sup> NAA + 3.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.7% 琼脂 + 3% 蔗糖上同源四倍体青花菜不定芽的再生频率为 63.3%，而二倍体 04J-21 的再生频率为 60.0%，二倍体在 NAA 0.05 mg · L<sup>-1</sup> + 6-BA 6.0 mg · L<sup>-1</sup> 不定芽再生率最高为 93.4%，而四倍体再生频率只有 40.0%。可见，四倍体不定芽再生对激素浓度要求较低，高浓度的外源激素可能会抑制四倍体不定芽再生。孙敏红和张蜀宁（2006）研究二倍体、四倍体白菜再生能力与内源激素的关系发现四倍体白菜内源激素 ZR<sub>s</sub> 和 IAA 含量高于其相应二倍体白菜。关于青花菜二、四倍体再生能力与内源激素的关系有待于进一步研究。

自然多倍体是漫长自然进化中形成的，育性正常、结实率高；而人工多倍体选育和驯化世代有限，育性低、结籽率低，阻碍了人工多倍体在生产上的应用。通过组织培养的途径可以保存多倍体，使其利用成为可能。范适等（2005）通过对茄子体细胞融合杂种异源四倍体叶片离体培养，保存了具野生种优良性状的体细胞杂种。四倍体随着继代次数增多继代系数显著提高。这可能是由于继代培养增加了无性繁殖世代、育壮了再生植株，使其生理生化反应逐步协调，从而改善植株的生长和繁殖状态，为结实率的提高奠定了基础，其内部调控机理有待于进一步研究。

### References

- Fan Shi, Lian Yong, Liu Zhimin 2005. *In vitro* culture of tetraploid eggplant leaves and establish of the plant regeneration system. China Vegetable, (9): 19 - 20. (in Chinese)
- 范适, 连勇, 刘志敏. 2005. 四倍体茄子叶片离体培养和植株再生体系的建立. 中国蔬菜, (9): 19 - 20.
- Qin Yao-guo, Lei Jian-jun, Cao Bi-hao 2005. Establishment of a highly efficient *in vitro* regeneration system for broccoli. Journal of Southwest Agricultural University: Natural Science, 27 (5): 653 - 656. (in Chinese)
- 秦耀国, 雷建军, 曹必好. 2005. 青花菜高效离体再生体系的建立. 西南农业大学学报: 自然科学版, 27 (5): 653 - 656.
- Sun Min-hong, Zhang Shu-ning 2006. The regeneration capacity of cotyledons of autotetraploid and diploid non-heading Chinese cabbage and its relation to the endogenous hormones. Journal of Nanjing Agricultural University, 29 (2): 25 - 28. (in Chinese)
- 孙敏红, 张蜀宁. 2006. 二、四倍体不结球白菜子叶再生能力及其内源激素的关系. 南京农业大学学报, 29 (2): 25 - 28.
- Takahata Y, Keller W A. 1991. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *B. rassica oleracea* L. Plant Sci, 74: 235 - 242.
- Wang M, Famham M W, Nannes J S P. 1999. Ploidy of broccoli regenerated from microspore culture versus anther culture. Plant Breeding, 118: 249 - 252.
- Ying Qin, Li Hong-ling, Guo Yang-dong 2007. High-frequency embryogenesis, regeneration of broccoli (*B. rassica oleracea* var *italica*) and analysis of genetic stability by RAPD. Scientia Horticulture, 111: 203 - 208.
- Zhang Jie, Zhang Shu-ning, Xu Wei-yu 2006. Correlation and path analysis between photosynthetic rate and its factor of diploid and tetraploid broccoli. Scientia Agriculture Jiangsu, (6): 220 - 223. (in Chinese)
- 张杰, 张蜀宁, 徐伟钰. 2006. 二、四倍体青花菜净光合速率日变化及其影响因子的相关和通径分析. 江苏农业科学, (6): 220 - 223.
- Zhang Zhen-chao, Zhang Shu-ning, Zhang Wei 2007. Induction of tetraploidy of non-heading Chinese cabbage with late-bolting and identification of chromosome configuration. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 27 (1): 28 - 32. (in Chinese)
- 张振超, 张蜀宁, 张伟. 2007. 四倍体不结球白菜的诱导及染色体倍性鉴定. 西北植物学报, 27 (1): 28 - 32.