

芜菁高频再生体系的建立及优化

马光, 周波, 李玉花*

(东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 以 3 个芜菁品种的带柄子叶和胚轴为外植体, 采用苯基噻二唑基脲 (thidiazuron, TDZ) 配合 NAA 以及 BA 配合 NAA 两种组合研究了适于芜菁离体再生的外植体类型和植物生长调节剂组合。结果表明, 带柄子叶为外植体, TDZ $7.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的组合对不定芽分化最为有利。以此离体再生体系为基础, 针对 AgNO_3 浓度、苗龄、2, 4-D 预培养时间 3 个因素进行优化。结果表明: 采用 5 d 苗龄的带柄子叶作为外植体, 在含有 2, 4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基上预培养 2 d, 添加 TDZ $7.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + AgNO_3 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基为分化培养基对芜菁离体再生最为有利, 最高分化率可以达到 90% 左右。分化后得到的不定芽在 BA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基上生根达 100%, 移植成活率达 95%。

关键词: 芜菁; *B. rassaica rapa*; TDZ; 硝酸银; 再生

中图分类号: S 631.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 06-0833-08

Establishment and Optimization of a High-frequency Shoot Regeneration System of Turnip (*B. rassaica rapa* L. ssp. *rapifera*)

MA Guang, ZHOU Bo, and LI Yu-hua*

(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: With cotyledonary petiole and hypocotyl explants, the shoot regeneration frequencies of three turnip (*B. rassaica rapa* L. ssp. *rapifera*) cultivars were examined. To achieve a high-frequency regeneration system, the hormone combination of thidiazuron (TDZ) and naphthaleneacetic acid (NAA) was compared with combination of benzyladenine (BA) and NAA on shoot regeneration. The results show that cotyledonary petioles were the best explant and that Murashige and Skoog (MS) medium containing $7.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ and $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA was suitable recipe for getting high-frequency shoot regeneration. Based the recipe, the effects of AgNO_3 concentration, seedling age, pre-culture time of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) were investigated to optimize the shoot regeneration system. The results suggested that petiole cotyledon with seedling age of 5 d cultured in MS medium containing TDZ $7.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + AgNO_3 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ followed by pre-culture with 2, 4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for 2 d can be induced with highest-frequency regeneration. The highest shoot formation rate was about 90%. The rooting percentage of shoots was 100% on MS supplemented with $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ indole-3-butyric acid (BA). The 95% rooted shoots survived in a greenhouse.

Key words: turnip; *B. rassaica rapa*; TDZ; AgNO_3 ; regeneration

芜菁 (*B. rassaica campestris* L. ssp. *rapifera* Sinsk; syn. *B. rapa* L. ssp. *rapifera*, $2n=20$) 由于具有芸薹属中最难进行离体再生的 AA 基因组, 同时又是较难再生的根部膨大类作物, 离体再生非常困

收稿日期: 2008 - 01 - 03; 修回日期: 2008 - 05 - 12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30730078, 30700560); 国家林业局 '948' 项目 (2005-4-35)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: lyhshen@126.com)

难。在茺菁相近物种中有离体再生的报道 (Radke et al, 1992; Kuvshinov et al, 1999; Min et al, 2007), 这些研究均采用 BA 和 NAA 的植物生长调节剂组合, 其再生频率均未超过 50%。

农杆菌介导的转基因手段已经成为基因组研究和植物育种的重要手段之一。高频率再生体系的建立是农杆菌介导的转化体系的前期工作, 也一直是众多研究者开展的工作之一。本研究中利用 TDZ 和 NAA 的组合, 并对 AgNO_3 浓度、苗龄、预培养时间 3 个影响茺菁再生的因素进行优化, 建立了简便、快速的高频率再生体系, 为茺菁的育种和基因功能的研究奠定了前期工作基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料采用东北林业大学花卉生物工程研究所提供的‘津田’、‘赤丸’以及购自日本大和农园(大连)的‘白驹’3个茺菁品种。

1.2 试验方法

取饱满、均一的茺菁种子放到含 20% 的白猫漂水(上海白猫公司生产)和 2~3 滴 Twin-20 的无菌水中摇动 20 min, 用无菌水冲洗 3 遍, 播种于基本培养基中。培养温度 25°C , 光照强度 $48\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光照时间 $16\ \text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。切取 5 d 龄幼苗带柄子叶插入到培养基中, 另切取胚轴, 切成长 0.5 cm 左右, 平放于培养基上。每瓶接种 20 个外植体。

基本培养基 MS_0 : $\text{MS} + 20\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 + 7% 琼脂, pH 5.8。

预培养培养基: $\text{MS}_0 + 2, 4\text{-D}\ 1.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

分化培养基一: MS_0 添加不同浓度的 BA (3.0 、 5.0 、 7.0 、 $9.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 NAA (0.5 、 1.0 、 1.5 、 $2.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 及 $8.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{AgNO}_3$ 。

分化培养基二: MS_0 添加不同浓度的 TDZ (3.0 、 5.0 、 7.0 、 $9.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 NAA (0.5 、 1.0 、 1.5 、 $2.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 及 $8.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{AgNO}_3$ 。

生根培养基: $\text{MS}_0 + \text{BA}\ 0.1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

AgNO_3 在培养基 121 $^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min 冷却到 60°C 左右时加入, 其它添加物均在灭菌前加入。培养条件均为 25°C 、光照强度 $48\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光照时间 $16\ \text{h}\cdot\text{d}^{-1}$, 20 d 后统计不定芽分化情况。每处理接种 100 个外植体, 重复 5 次。

取 5 d 苗龄的带柄子叶, 接种于添加不同浓度 AgNO_3 (0 、 3.0 、 5.0 、 8.0 、 10.0 、 12.0 、 $15.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的分化培养基 ($\text{MS}_0 + \text{TDZ}\ 7.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA}\ 1.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 上, 研究不同 AgNO_3 浓度处理对带柄子叶外植体芽再生的影响, 培养 20 d 后统计芽的再生频率和分化率。

切取不同苗龄 (4、5、6、7、8 d) 的带柄子叶于分化培养基 ($\text{MS}_0 + \text{TDZ}\ 7.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA}\ 1.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{AgNO}_3\ 5.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 上培养, 20 d 后统计芽的再生频率和分化率。

切取 5 d 苗龄的带柄子叶, 接种于含 2, 4-D $1.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MS_0 预培养基中, 分别预培养 0、1、2、3、4、5、6 d 后, 接种于分化培养基 ($\text{MS}_0 + \text{TDZ}\ 7.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA}\ 1.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{AgNO}_3\ 5.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 上, 20 d 后统计芽的再生频率和分化率。

统计不定芽分化情况后, 将分化的外植体转接到同样的培养基中培养 10 d。把分化出的长 1~2 cm 的芽苗切下移至生根培养基中, 20 d 后进行驯化移栽。

1.3 试验结果的记录及统计分析

不定芽再生率 (%) = (再生不定芽外植体数 / 接种外植体数) $\times 100$; 平均再生不定芽数 = 再生不定芽总数 / 能再生的外植体数。

每次数据记录的同时对外植体的生长状态及愈伤组织形态进行拍照。

采用邓肯氏新复极差法进行数据差异显著性检测。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节剂配比和外植体类型对不定芽再生的影响

在采用的植物生长调节剂组合中，除表 1~表 4列出的组合外，其他组合无不定芽出现。由表 1~表 4可知，不同浓度的植物生长调节剂对茼蒿不定芽的分化有重要影响。在组合相同的条件下，品种间不定芽再生率和平均再生不定芽数差异不显著。

分化培养基一中（表 1，表 2），不定芽再生率以 BA 浓度为 $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、NAA 浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 最好，对于同一品种的相同外植体类型，能够产生不定芽的 BA、NAA 组合间平均再生不定芽数的差异程度不如不定芽再生率的差异程度显著。BA 浓度为 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时仅有少量愈伤组织产生，无不定芽出现；BA 浓度为 $9.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 也无不定芽的出现，但是愈伤组织大量出现（表中未列出）。

表 1 BA 和 NAA 组合对茼蒿带柄子叶再生不定芽的影响
Table 1 Effect of BA and NAA on shoot regeneration of turnip petiole cotyledon explants

BA / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	不定芽再生率 / % Shoot formation rate			平均再生不定芽数 Number of shoots per explant		
		津田 Jintian	赤丸 Chiwan	白驹 Baiju	津田 Jintian	赤丸 Chiwan	白驹 Baiju
5.0	1.0	27.7 \pm 1.35a	30.1 \pm 1.57a	29.4 \pm 1.72a	10.34 \pm 0.82a	11.03 \pm 0.41a	10.65 \pm 0.92a
5.0	1.5	19.1 \pm 1.02b	18.3 \pm 1.29b	20.1 \pm 0.96b	10.11 \pm 0.51a	9.99 \pm 0.79b	9.71 \pm 0.91b
5.0	2.0	18.8 \pm 0.86b	17.4 \pm 0.95b	17.3 \pm 0.82b	9.99 \pm 0.46a	9.75 \pm 0.57b	9.05 \pm 0.36c
7.0	1.0	10.0 \pm 0.54c	9.2 \pm 0.83c	9.8 \pm 0.68c	9.29 \pm 0.94b	10.09 \pm 0.43b	9.67 \pm 0.74b
7.0	1.5	7.3 \pm 0.73d	6.8 \pm 0.88d	7.5 \pm 0.45d	9.16 \pm 0.83b	9.82 \pm 0.68b	9.82 \pm 0.55b
7.0	2.0	6.9 \pm 0.66d	5.9 \pm 0.75d	6.2 \pm 0.57d	9.33 \pm 0.74b	9.85 \pm 0.62b	9.16 \pm 0.96c

注：数值为 5 次重复的平均值 \pm SD，相同字母表示经邓肯氏新复极差法检测无显著差异（ $P=0.05$ ）。
Note: Values are means \pm SD of 5 repeats, and the same letters indicate no significant difference at $P=0.05$ by Duncan's test

表 2 BA 和 NAA 组合对不同品种茼蒿胚轴再生不定芽的影响
Table 2 Effect of BA and NAA on shoot regeneration of turnip hypocotyl explants

BA / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	不定芽再生率 / % Shoot formation rate			平均再生不定芽数 Number of shoots per explant		
		津田 Jintian	赤丸 Chiwan	白驹 Baiju	津田 Jintian	赤丸 Chiwan	白驹 Baiju
5.0	1.0	5.1 \pm 0.79a	5.5 \pm 0.61a	4.7 \pm 0.92a	7.16 \pm 0.83a	8.02 \pm 0.27a	7.58 \pm 0.72a
5.0	1.5	4.9 \pm 0.65a	5.2 \pm 0.51a	4.4 \pm 0.84a	6.95 \pm 0.77a	7.56 \pm 0.35a	7.06 \pm 0.51a
5.0	2.0	4.7 \pm 0.78a	4.8 \pm 0.67a	4.2 \pm 0.86a	6.98 \pm 0.61a	7.12 \pm 0.44b	6.74 \pm 0.73a
7.0	1.0	2.6 \pm 0.24b	2.0 \pm 0.44b	2.2 \pm 0.37b	7.02 \pm 0.56a	7.86 \pm 0.69a	6.98 \pm 0.67a
7.0	1.5	1.9 \pm 0.13c	1.7 \pm 0.36c	1.8 \pm 0.29c	6.99 \pm 0.74a	7.52 \pm 0.45ab	7.01 \pm 0.59a
7.0	2.0	1.8 \pm 0.36c	1.5 \pm 0.43c	1.6 \pm 0.13c	6.83 \pm 0.87a	7.61 \pm 0.82a	6.75 \pm 0.63a

注：数值为 5 次重复的平均值 \pm SD，相同字母表示经邓肯氏新复极差法检测无显著差异（ $P=0.05$ ）。
Note: Values are means \pm SD of 5 repeats, and the same letters indicate no significant difference at $P=0.05$ by Duncan's test

分化培养基二中（表 3，表 4），不定芽分化率以 TDZ 浓度为 $7.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，NAA 浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 最好，对于同一种品种的相同外植体类型，能够产生不定芽的 BA、NAA 组合间平均再生不定芽数的差异程度不如不定芽再生率的差异程度显著。

TDZ 浓度为 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时愈伤组织的产生数量大于同浓度的 BA，不过也无不定芽出现（表中未列出）。

在两种分化培养基上，NAA 浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时均得到了最好的分化效果。当 NAA 浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时无不定芽的产生，NAA 浓度 $1.0\sim 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，分化效果逐渐下降，当 NAA 浓度为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，白色松散无分化活力的愈伤组织大量产生。

无论不定芽再生率还是平均再生不定芽数，分化培养基二均优于分化培养基一，而且 TDZ 比 BA 能够诱导茺菁产生不定芽的浓度范围大。可见 TDZ 更适于诱导茺菁不定芽的再生。

对于 3 种茺菁品种，无论是不定芽分化率还是平均再生不定芽数，带柄子叶的分化效果均好于胚轴。从同一种外植体的表现来看，不定芽分化率以分化培养基二为好，但是平均再生不定芽数两种分化培养基没有显著差异且品种之间亦无显著差异。

综合上述结果，分化培养基中以 $\text{TDZ } 7.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA } 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为最好。以此为基础，采用带柄子叶为外植体继续优化 AgNO_3 浓度、苗龄和 2, 4-D 预培养时间 3 个因素，探讨最优的分化条件。由于前期的筛选试验结果表明这 3 个因素之间互作不明显（具体数据未给出），故分别采用单因素试验对其优化。

表 3 TDZ 和 NAA 组合对茺菁带柄子叶再生不定芽的影响
Table 3 Effect of TDZ and NAA on shoot regeneration of turnip petiole cotyledon explants

TDZ/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	不定芽再生率 / % Shoot formation rate			平均再生不定芽数 Number of shoots per explant		
		津田 Jintian	赤丸 Chiwan	白驹 Baiju	津田 Jintian	赤丸 Chiwan	白驹 Baiju
5.0	1.0	40.2 \pm 2.01de	42.3 \pm 1.95de	39.6 \pm 2.23d	10.17 \pm 0.51a	10.69 \pm 0.43a	9.38 \pm 0.78a
5.0	1.5	37.9 \pm 1.43e	36.2 \pm 1.62e	35.2 \pm 1.86e	9.94 \pm 0.23a	9.26 \pm 0.43b	7.89 \pm 0.81b
5.0	2.0	36.4 \pm 1.21e	33.1 \pm 1.93e	33.1 \pm 1.64e	9.07 \pm 0.46b	8.65 \pm 0.62b	8.56 \pm 0.73a
7.0	1.0	70.7 \pm 3.25a	72.3 \pm 3.07a	69.2 \pm 3.58a	10.05 \pm 0.35a	8.76 \pm 0.82b	9.16 \pm 0.56a
7.0	1.5	65.3 \pm 2.68b	64.1 \pm 2.82b	64.6 \pm 2.59b	9.89 \pm 0.22a	8.03 \pm 0.84b	9.44 \pm 0.48a
7.0	2.0	62.7 \pm 2.09b	59.3 \pm 2.30b	61.8 \pm 1.92b	10.51 \pm 0.22a	7.66 \pm 0.93b	8.37 \pm 0.42a
9.0	1.0	51.6 \pm 2.26c	53.4 \pm 1.91c	48.8 \pm 2.41c	9.56 \pm 0.31a	9.37 \pm 0.56b	8.22 \pm 0.83a
9.0	1.5	45.3 \pm 2.04d	48.9 \pm 1.47d	46.4 \pm 1.63d	8.84 \pm 0.26b	8.51 \pm 0.48b	7.63 \pm 0.75b
9.0	2.0	42.1 \pm 1.97d	41.5 \pm 2.01d	40.7 \pm 2.25d	8.66 \pm 0.41b	8.63 \pm 0.51b	7.11 \pm 0.81b

注：数值为 5 次重复的平均值 \pm SD，相同字母表示经邓肯氏新复极差法检测无显著差异（ $P=0.05$ ）。
Note: Values are means \pm SD of 5 repeats, and the same letters indicate no significant difference at $P=0.05$ by Duncan's test

表 4 TDZ 和 NAA 组合对不同品种茺菁胚轴再生不定芽的影响
Table 4 Effect of TDZ and NAA on shoot regeneration of turnip hypocotyl explants

TDZ/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	不定芽再生率 / % Shoot formation rate			平均再生不定芽数 Number of shoots per explant		
		津田 Jintian	赤丸 Chiwan	白驹 Baiju	津田 Jintian	赤丸 Chiwan	白驹 Baiju
5.0	1.0	11.7 \pm 0.51c	12.5 \pm 0.46c	11.6 \pm 0.87c	7.11 \pm 0.63a	8.02 \pm 0.35b	8.56 \pm 0.21b
5.0	1.5	10.6 \pm 0.42d	10.9 \pm 0.33cd	9.2 \pm 0.64d	7.22 \pm 0.52a	7.31 \pm 0.42b	8.01 \pm 0.32bc
5.0	2.0	10.2 \pm 0.36d	10.6 \pm 0.38d	9.0 \pm 0.55d	6.98 \pm 0.87a	7.13 \pm 0.51bc	8.34 \pm 0.26b
7.0	1.0	15.9 \pm 0.63a	16.8 \pm 0.42a	15.1 \pm 0.99a	7.25 \pm 0.76a	8.84 \pm 0.44a	9.22 \pm 0.25a
7.0	1.5	14.2 \pm 0.45b	14.5 \pm 0.33b	13.6 \pm 0.85b	6.97 \pm 0.84a	9.05 \pm 0.35a	8.51 \pm 0.48b
7.0	2.0	13.2 \pm 0.38b	13.2 \pm 0.54bc	12.8 \pm 0.98bc	6.63 \pm 0.79a	7.63 \pm 0.51b	7.84 \pm 0.34c
9.0	1.0	8.3 \pm 0.52e	8.2 \pm 0.45e	7.6 \pm 0.64e	6.86 \pm 0.81a	7.35 \pm 0.58b	7.99 \pm 0.36c
9.0	1.5	7.8 \pm 0.65e	7.7 \pm 0.56e	8.1 \pm 0.35e	7.12 \pm 0.42a	6.82 \pm 0.66c	8.26 \pm 0.25b
9.0	2.0	7.6 \pm 0.33e	7.1 \pm 0.61e	7.3 \pm 0.42e	6.58 \pm 0.73a	6.58 \pm 0.81c	7.50 \pm 0.41c

注：数值为 5 次重复的平均值 \pm SD，相同字母表示经邓肯氏新复极差法检测无显著差异（ $P=0.05$ ）。
Note: Values are means \pm SD of 5 repeats, and the same letters indicate no significant difference at $P=0.05$ by Duncan's test

2.2 AgNO_3 对不定芽再生的影响

不添加 AgNO_3 ，带柄子叶无不定芽产生。在 AgNO_3 浓度为 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，不定芽形成率和平均不定芽数均达到最高。其浓度为 $5.0 \sim 10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间，随着浓度的增加，不定芽形成率缓慢下降，当超过 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后，不定芽形成率下降速率明显加快（表 5）。 AgNO_3 浓度对平均不定芽数也有明显的影响。这种影响的变化趋势同不定芽形成率的变化趋势一致。

2.3 苗龄对不定芽再生的影响

苗龄 4 d和 5 d的外植体具有较高的不定芽形成率和平均不定芽数，且二者差异不显著（表 6）。此结果表明，4 d和 5 d的苗龄生理状态最适于不定芽的发生，鉴于 5 d苗龄的无菌苗切取外植体更方便，选取 5 d苗龄作为最适苗龄。超过 5 d，随着苗龄的增加不定芽形成率和平均不定芽数都逐渐下降，且两者的下降趋势一致。

表 5 AgNO_3 浓度对茺菁带柄子叶不定芽再生的影响

Table 5 Effect of AgNO_3 on shoot regeneration of turnip petiole cotyledon explants

$\text{AgNO}_3 /$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	不定芽形成率 / % Shoots formation rate			平均不定芽数 Number of shoots per explant		
	津田 Jintian	赤丸 Chiwán	白驹 Baiju	津田 Jintian	赤丸 Chiwán	白驹 Baiju
0	0	0	0	0	0	0
3	49.6 \pm 1.13d	52.3 \pm 1.80d	48.8 \pm 2.11cd	6.89 \pm 0.84d	6.73 \pm 0.95d	7.25 \pm 0.88c
5	80.5 \pm 1.33a	78.6 \pm 1.36a	79.3 \pm 1.34a	11.54 \pm 0.58a	12.04 \pm 0.64a	11.82 \pm 1.02a
8	77.3 \pm 2.31ab	75.1 \pm 2.78ab	74.2 \pm 0.56ab	10.02 \pm 0.52ab	9.85 \pm 0.19b	9.64 \pm 0.55b
10	71.2 \pm 2.48b	72.4 \pm 0.96b	71.7 \pm 0.75b	9.21 \pm 0.31bc	9.34 \pm 0.89b	9.06 \pm 0.27b
12	57.4 \pm 2.85c	56.1 \pm 1.47c	55.6 \pm 0.46c	8.63 \pm 0.28c	7.96 \pm 0.67c	7.22 \pm 0.38c
15	46.7 \pm 2.19d	44.4 \pm 0.81e	43.6 \pm 1.57d	6.91 \pm 0.71d	7.11 \pm 0.24c	6.88 \pm 0.63c

注：数值为 5 次重复的平均值 \pm SD，相同字母表示经邓肯氏新复极差法检测无显著差异（ $P=0.05$ ）。

Note: Values are means \pm SD of 5 repeats, and the same letters indicate no significant difference at $P=0.05$ by Duncan's test

表 6 苗龄对茺菁带柄子叶分化的影响

Table 6 Effects of seedling age on shoot regeneration of turnip petiole cotyledon explants

苗龄 / d Seedling age	不定芽形成率 / % Shoots formation rate			平均不定芽数 Number of shoots per explant		
	津田 Jintian	赤丸 Chiwán	白驹 Baiju	津田 Jintian	赤丸 Chiwán	白驹 Baiju
4	80.5 \pm 2.13a	79.22 \pm 0.85a	81.06 \pm 1.52a	11.07 \pm 0.64a	9.45 \pm 0.96b	9.70 \pm 0.87a
5	80.9 \pm 1.56a	80.61 \pm 1.51a	79.84 \pm 1.64ab	11.04 \pm 0.92a	12.00 \pm 0.28a	10.88 \pm 0.51a
6	74.1 \pm 2.32b	75.44 \pm 2.07b	76.18 \pm 1.83b	10.03 \pm 1.05b	9.57 \pm 0.67b	9.13 \pm 0.67a
7	68.4 \pm 0.95c	65.31 \pm 2.61c	66.31 \pm 2.07c	9.26 \pm 0.57c	8.46 \pm 0.58c	8.04 \pm 0.57b
8	59.3 \pm 1.64d	58.12 \pm 1.95d	57.76 \pm 0.67d	9.07 \pm 0.81c	8.65 \pm 0.63c	7.75 \pm 0.14b

注：数值为 5 次重复的平均值 \pm SD，相同字母表示经邓肯氏新复极差法检测无显著差异（ $P=0.05$ ）。

Note: Values are means \pm SD of 5 repeats, and the same letters indicate no significant difference at $P=0.05$ by Duncan's test

2.4 不同预培养时间对不定芽再生的影响

不采用 2, 4-D ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 预培养，在适宜浓度的 TDZ和 NAA 诱导下茺菁也可以表现出较高的不定芽形成率且不定芽的生长状态也均正常（图 1, A）。

从表 7 看出： MS_0 添加 2, 4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 预培养 2 d 后的带柄子叶再转入到分化培养基（ MS_0 + TDZ $7.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + AgNO_3 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ）培养，不定芽形成率和平均不定芽数达到最高；随着培养时间的延长，不定芽再生率和平均再生不定芽数急剧下降，板状根的形成率也逐渐增加，培养 6 d 时外植体布满板状根（图 1, C），无不定芽发生（表 7）。

表 7 分化培养前的预培养时间对芜菁带柄子叶不定芽再生的影响

Table 7 Effects of pre-culture time before shoot regeneration on turnip petiole cotyledon explants

预培养 /d Pre- culture	不定芽形成率 / % Shoots formation rate			平均不定芽数 Number of shoots per explant			板状根形成率 / % Tabular root formation rate		
	津田 Jintian	赤丸 Chiwan	白驹 Baiju	津田 Jintian	赤丸 Chiwan	白驹 Baiju	津田 Jintian	赤丸 Chiwan	白驹 Baiju
0	81.2 ±1.51b	80.8 ±2.19c	76.2 ±0.86b	9.08 ±0.52c	9.26 ±0.66b	8.65 ±0.87b	0	0	0
1	90.8 ±0.57a	85.9 ±1.72b	87.9 ±1.23a	10.65 ±0.86b	10.38 ±0.71b	9.27 ±0.91b	0	0	0
2	92.0 ±0.65a	89.7 ±1.52a	89.3 ±2.54a	12.15 ±1.21a	11.64 ±0.62a	10.83 ±0.44a	0	0	0
3	80.8 ±2.35b	73.8 ±2.51d	77.6 ±2.81b	7.65 ±0.45c	6.88 ±0.83c	6.37 ±0.16c	5.1 ±0.22c	6.3 ±0.57d	5.3 ±0.12d
4	58.4 ±2.81d	61.3 ±1.47e	59.4 ±2.37c	5.21 ±0.33d	5.59 ±0.34c	4.75 ±0.29d	16.3 ±1.24b	18.8 ±0.65c	16.5 ±0.65c
5	25.3 ±1.64e	23.5 ±2.38f	20.0 ±1.26d	2.76 ±0.11e	3.14 ±0.21d	2.51 ±0.13e	20.9 ±1.63b	24.3 ±1.85b	22.1 ±2.61b
6	0	0	0	0	0	0	28.7 ±0.87a	32.1 ±2.37a	35.1 ±2.36a

注：数值为 5 次重复的平均值 ±SD，相同字母表示经邓肯氏新复极差法检测无显著差异（*P* = 0.05）。
Note: Values are means ±SD of 5 repeats, and the same letters indicate no significant difference at *P* = 0.05 by Duncan's test



图 1 芜菁离体再生的不定芽和板状根

A. 未进行 2, 4-D 预培养得到的不定芽； B. 2, 4-D 1.0 mg · L⁻¹预培养 2 d 得到的不定芽；
C. 2, 4-D 1.0 mg · L⁻¹预培养 6 d 形成的板状根。

Fig. 1 Shoots and tabular roots formed by turnips in regeneration

A. Shoots from explants without pre-culture; B. Shoots fomd with 2 d pre-culture by 2, 4-D 1.0 mg · L⁻¹;
C. Tabular roots fomd with pre-culture by 2, 4-D 1.0 mg · L⁻¹ for 6 d

可见通过适当预培养的脱分化过程可以使单个外植体产生更多的具有分化活力的细胞，从而提高分化能力。

2.5 不定芽的生根和移植

在添加 BA 0、0.05、0.10、0.15 mg · L⁻¹的 MS₀培养基中，芜菁不定芽生根率均可达到 100%。相对来讲，在含 BA 0.10 mg · L⁻¹的 MS₀培养基中得到的根更为健壮。生根后的芽苗经驯化后移植到温室即可进行正常的栽培管理，成活率达 95%。

3 讨论

综合各因素, 茺菁带柄子叶不定芽再生的最优条件为: AgNO_3 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5 d 苗龄、经 2, 4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 预培养 2 d、TDZ $7.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基。在此条件下, ‘津田’、‘赤丸’、‘白驹’ 3 个品种的不定芽形成率分别为 92.0%、89.7%、89.3% (表 7)。

到目前为止, BA 一直是芸薹类植物离体再生最常用的植物生长调节剂 (Kuvshinov et al., 1999; Yoko et al., 2005)。近年来, TDZ 也逐渐开始得到应用 (Christey et al., 1997; 王洋等, 2005)。本研究通过 TDZ 代替芸薹类植物离体再生中经常采用的 BA, 显著提高了离体再生困难的根菜类茺菁的离体再生频率。其高达 90% 以上的再生频率完全可以满足植物转化的要求。在诱导植物再生方面, TDZ 的效率高于 BA 的原因目前还不是很清楚。TDZ 不仅具有细胞分裂素活性而且它可作为一种有效的内源生长素的调控因子。TDZ 的细胞分裂素活性在其诱导木本植物分化中体现的非常清楚, 已经在一些植物中得到应用 (Preece et al., 1991; Huetteman & Preece, 1993)。作为生长素的调控因子, 它可以促进 IAA 及其前体色氨酸的合成 (Murthy et al., 1995)。

外植体类型也是影响茺菁再生的一个重要因素。本研究中无论是何种可以产生不定芽的植物生长调节剂组合, 带柄子叶均得到了比胚轴更好的分化效果, 这和前人的研究结果 (曹家树等, 2000) 一致。推测其原因主要在于带柄子叶的切口更接近生长点, 相对分裂活性较高的细胞较多的缘故; 同时子叶中储存的营养物质也是细胞分化的有利条件。

前人的研究表明, AgNO_3 浓度范围介于 $3.0 \sim 15.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 能够极大的提高芸薹类植物离体再生的能力。在本研究中, 首先采用中间值 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNO_3 取得了一定的分化率, 经过优化得到了 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的最适浓度。不添加 AgNO_3 , 茺菁无法进行离体再生。 AgNO_3 通过抑制乙烯对分化的不利影响起作用, 但对于具体的抑制方式, 研究者的意见还有所分歧。有人认为 AgNO_3 是通过和乙烯竞争膜上的作用位点起作用 (Chraïbi et al., 1991)。而有的研究者则认为 AgNO_3 是通过抑制乙烯使乙烯不能干扰多胺的合成, 间接起到了促进分化的效果 (Yoko et al., 2005)。

适宜的苗龄可以使外植体具有旺盛的生长趋势以及大量高活性的分裂细胞。苗龄过大, 随着营养中心的转移, 子叶中保存的营养物质逐渐消耗殆尽, 不利于带柄子叶产生不定芽。4 d 和 5 d 苗龄的苗健壮, 颜色深绿, 下胚轴短粗, 子叶厚小, 此时的无菌苗生理状态为最佳。超过这个时间苗胚轴细长, 颜色浅绿甚至白色, 子叶薄而大, 颜色变浅, 其生理状态已经不适于离体再生。

前人的研究指出 2, 4-D 预培养可以显著提高不定芽形成率 (Radke et al., 1992)。本试验中预培养对不定芽形成率和平均不定芽数均有显著提高, 而且对平均不定芽数的提高更为明显。这也从一个侧面反映了 TDZ 可以部分代替 2, 4-D 的作用 (徐晓峰和黄学林, 2003)。2, 4-D 通过脱分化过程, 使原来具有分生活性的细胞能够在保持分生活性的前提下继续分裂增殖。但过长时间的预培养也会使分生细胞的器官形成方向发生改变, 产生板状根, 从而不利于茺菁不定芽的形成。

References

- Cao Jia-shu, Yu Xiao-lin, Huang Ai-jun, Xu Shu-ying. 2000. Enhancement of plant regeneration frequency of *in vitro* cultured Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 27 (6): 452 - 454. (in Chinese)
- 曹家树, 余小林, 黄爱军, 徐淑英. 2000. 提高白菜离体培养植株再生频率的研究. *园艺学报*, 27 (6): 452 - 454.
- Chraïbi B KM, Latche A, Roustan J P, Fallot J. 1991. Stimulation of shoot regeneration from cotyledon of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. *Plant Cell Reports*, 10: 204 - 207.
- Christey M C, Sinclair B K, Braun R H, Wyke L. 1997. Regeneration of transgenic vegetable brassicas (*B. oleracea* and *B. campestris*) via R-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, 16 (9): 587 - 593.
- Huetteman C A, Preece J E. 1993. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 33: 105 -

119.

- Kuvshinov V, Koivu K, Kanerva A, Pehu E. 1999. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of greenhouse-grown *Brassica napus* ssp. *oleifera*. Plant Cell Reports, 18: 773 - 777.
- Min B W, Cho Y N, Song M J, Noh T K, Kim B K, Chae W K, Park Y S, Choi Y D, Ham C H. 2007. Successful genetic transformation of Chinese cabbage using phosphomannose isomerase as a selection marker. Plant Cell Reports, 26: 337 - 334.
- Murthy B N S, Murch S J, Saxena P K. 1995. TDZ-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium hortorum bailey* cv. Ringo rose) cotyledonary cultures. Plant Cell Reports, 15: 423 - 426.
- Preece J E, Huetteman C A, Ashby W C. 1991. Micro- and cutting propagation of silver maple. I. Results with adult and juvenile propagules. Journal of the American Society for Horticultural Science, 116: 142 - 148.
- Radke S E, Tumer J C, Facciotti D. 1992. Transformation and regeneration of *Brassica napus* using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, 11: 499 - 505.
- Wang Yang, Cui Ji-zhe, Li Cui-ling. 2005. Strategies in establishing effective regeneration system of Chinese cabbage. Acta Horticulturae Sinica, 32 (4): 701 - 703. (in Chinese)
- 王 洋, 崔继哲, 李翠玲. 2005. 大白菜高频再生体系的建立及策略. 园艺学报, 32 (4): 701 - 703.
- Xu Xiao-feng, Huang Xue-lin. 2003. TDZ: An efficacious plant growth regulator. Chinese Bulletin of Botany, 20 (2): 227 - 237. (in Chinese)
- 徐晓峰, 黄学林. 2003. TDZ: 一种有效的植物生长调节剂. 植物学通报, 20 (2): 227 - 237.
- Yoko A K, Hidefumi Y, Yoshihito T. 2005. Efficient plant regeneration from leaves of rapeseed (*Brassica napus* L.): The influence of $AgNO_3$ and genotype. Plant Cell Reports, 24 (11): 649 - 654.

中国园艺学会第八届青年学术讨论会暨现代园艺论坛纪要

由中国园艺学会主办, 上海交通大学和上海园艺学会共同承办的“中国园艺学会第八届青年学术讨论会暨现代园艺论坛”于2008年5月23—26日在上海交通大学举行。出席会议的有来自全国20多所高校、科研院所和园艺生产第一线的专家学者近200人。会议收到论文300余篇, 经审稿后入编《园艺学进展》249篇。

会议开幕式由上海交通大学农业与生物学院副院长陈火英教授主持, 上海交通大学张文军副校长致欢迎词, 中国园艺学会副理事长韩振海、上海市农委副主任殷欧、上海园艺学会理事长蔡友铭出席会议并讲话, 农业与生物学院院长唐克轩教授介绍了上海交通大学园艺学科的建设与发展概况。

会议以“依托科技振兴中华园艺产业、园艺学科创新人才培养、支持四川灾后重建”等为主题, 广泛开展了学术交流。华中农业大学校长邓秀新院士、北京林业大学校长尹伟伦院士、日本冈山大学农学部树田正治教授、中国农业科学院蔬菜花卉研究所黄三文研究员、西北农林科技大学王鸣教授等分别就果树产业与果树学科发展前沿、草坪草的精准灌溉、蔬菜环境低负荷栽培模式、黄瓜基因组学、遗传育种学的发展轨迹做了大会报告。

邓秀新院士分别从产业发展趋势和需求, 从基础科学的发展和新进展, 结合国际、国内果树产业的背景和我国的实际情况详细分析了果树学科发展状况, 认为设施栽培条件下的环境和生物体控制、作物轮茬障碍的机理和克服, 低成本、洁净生产的理论与技术、果品的生物保鲜基础与技术、综合利用(深加工)基础与技术是果树学科的前沿。

尹伟伦院士从中国生态环境与水资源危机, 生物节水技术的内涵, 植物抗逆能力定量评价技术以及不同草坪草的水分需求等方面介绍了他所带领的研究团队就草坪草的精准灌溉方面的最新研究进展。

会议围绕园艺作物种质资源、遗传育种与生物技术; 园艺作物有机、无公害及标准化安全生产; 园艺作物栽培及生理、生态; 园艺作物采后处理、贮藏与加工技术; 园艺作物病虫害综合治理; 园艺环境与工程; 设施园艺; 园艺作物种业; 园艺教育; 园艺产品的国内与国际贸易等方面设分会场进行了交流和研讨。

全体代表参观了上海交通大学校园、农生院各相关实验室、上海交通大学现代生物工程训练中心, 下午分两组到上海植物园和上海都市菜园参观访问。

本次大会是园艺界的一次盛会, 既有来自研究园艺作物基因组学的科研人员, 也有来自把论文写在大地上的第一线专家学者。院士和资深教授的报告让人们感受到的更多的是启迪, 博士生、硕士生以及青年学者们的发言让人们看到园艺学发展的未来和希望。通过本次论坛, 在推进园艺产业、园艺科技、园艺学科发展的同时, 也将为我校园艺学科的建设提供更多的经验和帮助。