

新疆野生油菜无菌苗的无性繁殖研究

孙慧慧^{1,2}, 闫晓红¹, 王力军¹, 叶永忠^{2*}, 魏文辉^{1*}

(1. 中国农业科学院 油料作物研究所, 农业部油料作物生物学重点开放实验室, 湖北 武汉 430062 2. 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 以新疆野生油菜 18号无菌苗为材料, 研究了其在武汉亚热带季风性湿润气候条件下的快速繁育技术, 提出了以离体培养结合常规栽培技术快速繁殖新疆野生油菜的生产程序。结果表明, 以中上部茎段为材料, 采用无激素的 MS培养基作为无性繁殖基质, 在无菌苗生根后移栽成活容易。对下胚轴愈伤组织的诱导以 MS+3 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+0.1 mg/L GA₃+3%蔗糖+0.6%琼脂培养基效果较好。

关键词: 新疆野生油菜; 无菌苗; 无性繁殖

中图分类号: S65.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)10-0040-03

Studies on the Clonal Propagation of Wild Rape (*Sinapis arvensis* L.) Asepsis Seedling Originate from in Xinjiang

SUN Huìhuì^{1,2}, YAN Xiǎohóng¹, WANG Lìjūn¹, YE Yongzhōng^{2*}, WEI Wénhuī^{1*}

(1. Oil Crops Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences Key Laboratory of Oil Crop Biology of the Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China;

2. College of Life Sciences of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Using the clonal propagation of Xinjiang wild rape No. 18 (*Sinapis arvensis* L.) as sample, rapid breeding technical was studied under subtropical monsoon humid climate condition in Wuhan. A production process which combine in vitro culture and conventional cultivation method were pointed out. The clonal propagation matrix should be MS medium without hormone, and transplanting timing should be after the asepsis seedling taking root in the culture medium. As for the induce of hypocotyl callus, MS+3 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+0.1 mg/L GA₃+3% sucrose+0.6% agar is better.

Key words: Xinjiang wild rape; Asepsis seedling; Clonal reproduction

新疆野生油菜 18号 (2ⁿ=18) 属十字花科植物, 是野芥 (*Sinapis arvensis* L.) 分布在中国新疆的一个野生群体, 是十字花科植物育种的优良种质资源^[1-6]。新疆野生油菜分布在高海拔、年均气温较低、年降水量较少的新疆地区, 在武汉地区 (湿润气候区) 播种时其发芽能力差, 且花期易遭季节性多雨侵袭导致整株涝死, 通过种子繁殖的难度较大。随着利用新疆野生油菜开展其体细胞杂交及构建其基因组 BAC文库等研究的进一步深入^[7-9], 足够的材料供应是开展相关试验的前提。因此, 有必要对

其无性繁殖开展研究。试管苗无性繁殖具有保持亲代特性, 且繁殖快、子代量多的特点^[10-15]。以新疆野生油菜 18号的无菌苗为材料, 通过组织培养, 用剪段生根法进行无性繁殖研究, 以期为该物种的大量快速繁殖及其优良性状的开发利用等创造条件。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为新疆野生油菜 18号的无菌苗, 其种子由中国农业科学院油料作物研究所提供。移栽基

收稿日期: 2010-04-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671312); 湖北省自然科学基金创新群体项目 (2008CDA083)

作者简介: 孙慧慧 (1983-) 女, 河南商丘人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物原生质体融合。

* 通讯作者: 叶永忠 (1957-) 男, 湖北黄梅人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物生理生态学研究。

魏文辉 (1971-) 男, 湖北红安人, 副研究员, 主要从事遗传学、基因组学、分子生物学研究。

质为蛭石、腐殖质、河沙与珍珠岩(蛭石:腐殖土:河沙:珍珠岩=1:2:1:0.5)。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗培养 新疆野生油菜的种子,经70%酒精表面消毒1min再用2%次氯酸钠消毒15min然后无菌水冲洗3次,接种到无激素的MS培养基,在25℃、16h/d室内散射光照条件下萌发。培养10d左右,在无菌苗子叶柄下方1.0~1.5cm处切斜面,然后将顶端部分的形态学下端插入无激素的MS培养基生根。苗高8.5~9.0cm时,用无菌解剖刀将苗中上部切成带有1、2片叶的小段(按部位分为顶端茎段、中部茎段、近根部茎段,每段2.5~3.0cm),接种在含有3%蔗糖及0.8%琼脂的MS培养基(pH=5.8)上,置于23~25℃、2000lx/16h/d条件下培养。接种的茎段生根,并形成7或8片小叶的植株时,这种植株可继续切段繁殖,也可直接移栽至土盆。

1.2.2 无菌苗移栽 将生了根的小苗从无菌的培养瓶中取出,除去培养基,并冲洗干净,然后移栽至事先调配好的移栽基质,浇足水,并用透明塑料杯或烧杯加盖保湿。在18~20℃室温生长1周,保持高湿度,低光照,5~7d植株成活,去盖。随后移至室外炼苗1周左右,移至田间或置于条件可控的玻璃房中。

1.2.3 下胚轴愈伤组织诱导 将下胚轴切成4mm小段,摆放在含有2种激素组合的培养基上培养。组合1(MS+3mg/L 6-BA+0.1mg/L NAA+

0.1mg/L GA₃+3%蔗糖+0.6%琼脂)组合2(MS+3mg/L 6-BA+0.03mg/L NAA+3%蔗糖+0.6%琼脂)。

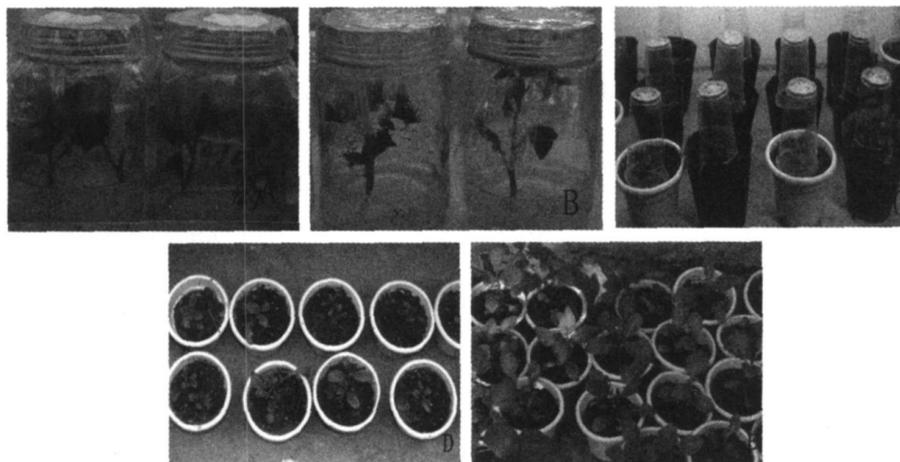
2 结果与分析

2.1 不同部位茎段生根能力

不同部位茎段生根能力不同(表1)。一般顶端茎段分生能力强,培养2周生根率达63.3%,3~4周内最终生根率达100%。中部段生根一般较顶端段晚,2周时生根率约为21.7%,培养3~4周几乎都能生根成苗。但是切段较短(<1.5cm)时难以生根,幼苗生长发育缓慢,难以满足快速繁殖的需要。近根部段一般木质化严重,茎段上保留叶易黄化脱落死亡,一般不生根。朱彦涛^[16]对油菜茎段扩繁研究时发现,切段越长,第1条根产生的时间越早,根数越多,随着茎切段长度减小,生根率有下降趋势,根数也减少。与本试验结果基本一致。因此,仅切中部、顶端茎段进行下步试验(图1B)。

表1 新疆野生油菜18号不同部位茎段培养2周后生根情况

不同部位茎段	试验段数/个	生根段数/个	平均生根条数/条	生根率/%
顶端段	30	19	5.42	63.3
中部段	23	5	3.00	21.7
近根部段	20	0	0	0



A 无菌苗生根; B 大量繁育无菌苗; C 无菌苗移栽,置于温室; D 室外炼苗; E 无菌苗成活后移至玻璃房

图1 新疆野生油菜18号无菌苗的无性繁殖及移栽

2.2 培养基中添加NAA对于茎段生根的影响

培养基中一般加入一定量的生长素来促进生根,但本试验中加入NAA(0.1mg/L)茎段整体膨大、玻璃化,反而不易生根形成植株。培养基不加任

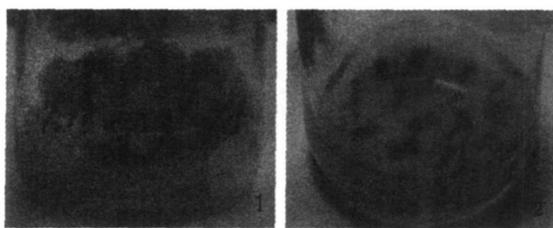
何激素,虽然在1周之内几乎无茎段生根,但在2~3周时逐渐生根成苗(图1A),培养一个月时,所有茎段生根成苗,表明茎段在无NAA条件下表现出较好的生根能力,只是生根稍慢。

2.3 试管苗适宜移栽的形态指标

无菌苗生根,是适宜移栽的形态指标。按照该指标移栽,无菌苗容易成活(图1C图1D)。随后将苗移至玻璃房,生长旺盛(图1E)。若无菌苗在培养基上没有生根,移栽于基质一部分也可成活,但成活率低,多表现为叶黄化脱落,植株最终不能成活。高公泓等^[17]指出,离体培养过程中生长在固体培养基上的试管苗在移栽后有较发达的根系。本研究也印证了新疆野生油菜在固体培养基上进行无菌苗繁殖易移栽成活。

2.4 下胚轴愈伤组织的诱导

培养基激素配比对于能否诱导出愈伤组织很关键。尽管2种激素组合条件下都能诱导出下胚轴愈伤组织,但组合1愈伤状态明显不佳,色泽不亮,愈伤疏松。组合2愈伤淡绿色,愈伤致密(图2)。此外,研究了叶片愈伤组织的诱导,将完全展开的叶片用高压灭菌打孔器打直径3mm 5mm的圆片,但叶片在2种激素组合培养基上均不能诱导出愈伤组织,多出现营养缺失死亡。



1. 组合1条件下愈伤疏松; 2. 组合2条件下愈伤致密

图2 2种激素组合条件下诱导的新疆野生油菜18号愈伤组织

3 讨论

目前无性繁殖技术应用广泛,但至今国内还未见通过嫩茎扦插培养无菌苗的途径繁殖新疆野生油菜的报道。本研究提供了新疆野生油菜的一种无性繁殖技术,所需药品少且价格便宜,操作简单,为新疆野生油菜种质资源的保存打下基础。

新疆野生油菜种子在武汉直接播种发芽能力差,可能是由于武汉地区湿度较大,与其本身生长环境差别大有关。在武汉直播时,大田花期油菜遭受多雨侵袭,一方面造成结实率降低,另一方面造成籽粒不饱满,翌年播种时出芽率降低,进入不良循环。采用生根苗剪段生根法进行无性繁殖,尽管繁殖系数稍低(1个月内1株无菌苗可繁殖出7株完整小植株),但其苗长势旺,有效苗多,易得到大量试管苗小植株。植株移栽后置于温室,避开了雨水侵袭,

对于该物种资源的保存和繁衍有利。

试验中剪取插穗时,应从叶柄下方0.5 cm处平剪或斜剪下来,此部位的形成层较活跃,养分积累多,易于生根。叶片的多少、大小和质量对生根快慢影响很大。因此,选择插穗时,要尽可能保留较多的叶片。

离体培养阶段,幼苗在玻璃瓶中生长的时间越长,繁殖效率就越低。但如果幼苗在瓶中生长的时间不足,就表现为不生根,影响移栽成活率、移栽后的生长和繁殖效率。因而,选择试管苗的适宜移栽形态指标就至为重要。

参考文献:

- [1] 王国槐,官春云.新疆野生油菜与野芥品质性状的比较研究[J].作物品种资源,1999(1):37-38
- [2] 陈玉卿,徐希龙.新疆、云南野生油菜病毒病菌核病的抗性鉴定[J].中国油料,1988 10(专辑):49-52
- [3] 张洁夫,陈玉卿,伍貽美.油菜种质资源抗(耐)菌核病性筛选与鉴定[J].江苏农业科学,1994(2):26-28
- [4] 梅德圣,李云昌,胡琼.甘蓝型油菜属体细胞杂种雄性不育材料的研究[J].中国油料作物学报,2003 25(1):72-75
- [5] 胡琼,李云昌.体细胞杂交在油菜细胞质雄性不育创建和改良中的应用[J].作物学报,2006 32(1):138-143
- [6] 焦清亮,王兆木.新疆野生油菜不育材料的发现与研究初报[J].新疆农业科学,2001 38(1):39-40
- [7] Hu Q Andersen S B Dixelius C et al Production of fertile intergeneric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Sinapis arvensis* for the enrichment of the rapeseed gene pool[J]. Plant Cell Reports 2002 21: 147-152
- [8] Wei W H Li Y C Wang L J et al Development of a novel *Sinapis arvensis* disomic addition line in *Brassica napus* containing the restorer gene for Nsa(CMS) and improved resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Pod. shat. ternq* [J]. Theoretical and Applied Genetics 2010 120(6): 1089-1097
- [9] 薄存沛,闫晓红,徐有明,等.新疆野生油菜 BAC文库的构建[J].中国油料作物学报,2010 32(1):14-19
- [10] 赵云,王茂林,郑洪武,等.细胞核雄性不育油菜无性繁殖研究[J].中国油料,1997 19(1):1-5
- [11] 哈梅娟,张生清.香石竹无性繁殖技术研究[J].中国农学通报,2002 18(2):56-57
- [12] 宁淑香,张明宇,张洪英,等.羽衣甘蓝无性系的建立[J].辽宁大学学报,2002 29(4):375-381
- [13] 孙慧慧,闫晓红,叶永忠,等.甘蓝型油菜子叶原生质体培养及植株再生研究[J].河南农业科学,2010(6):35-39
- [14] 吴安平,殷少华,熊飞,等.甘蓝型油菜小孢子加倍培养技术[J].现代农业科技,2010(3):91
- [15] 马宗仁,何国强.野生豆科植物三点金的无性繁殖研究[J].草业科学,2009 26(7):147-151
- [16] 朱彦涛.油菜扩繁中茎段长度对腋芽生长发育的影响[J].西北农业学报,2001 10(3):108-109
- [17] 高公泓,马洪民,李宗芬,等.草莓离体无性繁殖的研究:II.试管苗移栽和田间表现[J].西北植物学报,1989 9(3):162-169