

观赏羽衣甘蓝的离体繁殖

王怀名 杜广岑 贾翠莹 谭学文 王 贤

(国家蔬菜系统工程技术研究中心, 北京 100081)

摘 要 以花蕾为外植体, 离体繁殖羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *acephala* f. *tricolor* Hort.) 8 个杂种一代材料。培养基为 (mg/L): MS+BA1~2+NAA0.1~0.2+IAA0.5+ (或不加) GA₃0.3+3%蔗糖。平均 18%~67%的接种花蕾产生不定芽; 约有 30%的不定芽发育成完整植物。培养物的严重褐化和再生植物的普遍玻璃质化是影响植株成活的主要因素。培养基中加入活性炭和青霉素, 并给以强光照射, 可提高植株成活率。

关键词 羽衣甘蓝 离体繁殖

观赏羽衣甘蓝以其叶片美观多变的形态和绚丽如花的色彩, 赢得人们喜爱, 在北京地区它可以作为观叶植物。由于其耐低温, 在其他观赏植物已无法在室外栽培的情况下, 仍可供秋冬和早春美化居室和街道绿地及花坛, 具有较大的研究和开发价值。为了给育种工作提供材料和从杂种一代植株直接获得无性系后代, 我们进行了离体繁殖研究。早在 1970 年, Lustinec 和 Horak^[1]用植株的各部分组织, 通过愈伤组织形成, 获得了再生植物; Horak 等^[2]又用茎髓部组织离体培养得到成功; Zee and Hui^[3]从下胚轴和子叶切块, 以及杨乃博等^[4]用花托、花茎和叶片也获得了再生植物。我们用花蕾离体繁殖, 得到一批无性系植物。

1 材料和方法

供试材料是 8 个杂种第一代品种。其编号为: 92—①, 92—②, 92—③, 92—⑥, 92—⑧, 92—⑨, 92—⑩和 92—⑪。其中①, ⑥, ⑧和⑪是紫色品种; ②, ③, ⑨和⑩是绿色品种。

1993 年 2 月下旬开始, 取温室栽种的植株花蕾 (长度 3~4mm), 用 4%过氧乙酸表面消毒 5min, 接种于 7cm 玻璃培养皿内的各种诱导培养基上 (组成见表 1), 石蜡膜封口, 置于 25℃培养室内, 光强 4000lx, 光照 12h 下培养。培养 3 周, 即有不定芽丛在膨大的花托上产生。切下芽丛插入 50ml 三角瓶内的芽生长培养基上 (组成见表 1)。为了克服培养物的褐化, 部分芽生长培养基中加入 0.2%的活性炭。另外, 为了消除再生植物的玻璃质化和提高成活率, 还在部分芽生长培养基中, 分别加入 10 万、20 万和 40 万单位医用青霉素 G 钾, 并对扦插的芽给予不同强度光照处理 (4 000 和 25 000 lx, 12h 光照)。培养 4 周后, 分别观察和记录在含不同浓度青霉素的芽生长培养基上, 不同光强处理下扦插芽的成活率 (表 2)。将各种芽生长培养基上生长和存活下来的植株转入生根培养基上 (表 1), 全部置于 25℃培养箱内、光强 25 000

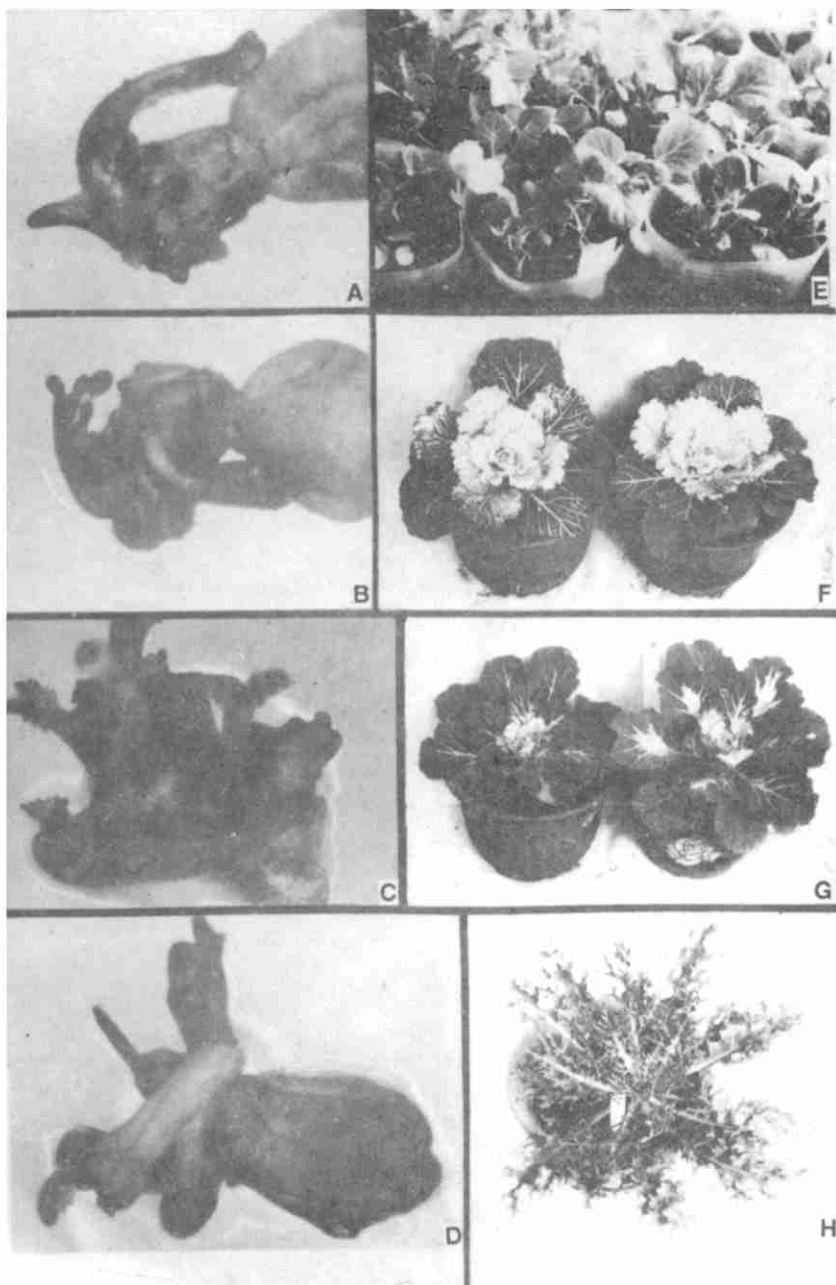


图 1 观赏羽衣甘蓝的高体繁殖

A 花柄膨大结节上的许多不定芽 $\times 25$; B 花柄切割端上的再生新枝 $\times 25$; C 从花蕾内部再生的新枝 $\times 25$; D 花柄上产生的新枝 $\times 30$; E 移入蛭石中的③号品种的再生植物; F 移入盆内的③号品种的再生植物, 中心叶片全部变成白-浅粉色花瓣状; G 移入盆内的⑩号品种的再生植物, 中心叶片及外周叶片的叶脉变为白-浅粉色; H 移入盆内的⑧号品种的再生植物, 叶片是紫色羽毛状。

lx、光照 12 h 下培养。28~35 天后，存活的、根系发育良好的植株，长至 5~7cm 高，洗去根部琼脂，移植于塑料育苗钵内的蛭石中，浇足水分。育苗钵排列在磁盘内，加塑料薄膜覆盖保温，置 15℃培养箱内缓苗（光强 25 000 lx，光照 12h）。7~10 天后撤去薄膜。每周 1~2 次酌量浇以 1/2MS 基本培养基和自来水保持营养和水分。幼苗在培养箱中度夏（图 1 E），直到 8 月中旬。将培养箱温度逐步升高到 20~25℃（光照强度和持续时间不变）。9 月初，苗高可达 15~20 cm，具 20 余片叶，即可移入较大钵内置温室中。10 月中旬移栽于露地上，一些品种的心叶和叶脉开始变色。11 月初移入温室盆栽（图 1 F、G、H）。12 月中下旬即可供观赏。

表 1 培养基组成

编号	组 成	用 途
4	MS+BA2+IAA0.5+3%蔗糖	诱导不定芽
6	B ₅ +BA2+IAA0.5+3%蔗糖	诱导不定芽
19	1/2MS+BA2+IAA0.5+3%蔗糖	诱导不定芽
20	MS+Kt2+IAA0.5+3%蔗糖	诱导不定芽
28	MS+BA2+IAA0.5+NAA0.1+3%蔗糖	诱导不定芽
29	MS+BA1+IAA0.5+NAA0.1+3%蔗糖	诱导不定芽
21	MS+BA2+IAA0.5+NAA0.2+GA ₃ 0.3+3%蔗糖	诱导不定芽
m ₂	MS+Kt0.2+3%蔗糖	芽生长培养基
m ₂ a	m ₂ +0.2%活性炭	芽生长培养基
m ₂ a-10	m ₂ a+10 万单位医用青霉素 G 钾	芽生长培养基
m ₂ a-20	m ₂ a+20 万单位医用青霉素 G 钾	芽生长培养基
m ₂ a-40	m ₂ a+40 万单位医用青霉素 G 钾	芽生长培养基
30	1/2MS+NAA0.1+0.2%活性炭+1%蔗糖	生根培养基

2 观察结果与讨论

2.1 不定芽的形态发生

和芸薹属一些别的种类一样，羽衣甘蓝的花托也具有较强产生不定芽的能力。接种后 7 天左右，花托及花柄切割端即膨大成结节状。14~21 天之后，从这些膨大结节的各个部位上，产生许多不定芽，其数量不等（图 1 A、B、D）。其中一些芽是突破花被，从子房和雄蕊周围的部位上产生的（图 1 C）。接种后 21 天至 30 天，芽已长到 1~2 cm 高，开始分化成叶片。切下不定芽，扦插到芽生长培养基上，芽继续生长，发育成丛生叶簇。在一些绿色品种中，开始形成明显的枝。在芽生长培养基上经过 14~21 天培养，约有 30%的不定芽发育成幼小植物，部分小植物开始生出根系。大部分不定芽因褐化和玻璃质化不能进一步生长和存活。无根的幼小植物移入生根培养基上，21~28 天内也生出根系，发育成完整植物。

2.2 培养基组成与诱导频率

本实验采用了 B₅，MS 和 1/2MS 3 种基本培养基。使用了 Kt 和 BA 两种细胞分裂素和 IAA，NAA 及 GA₃3 种植物生长素。用⑧号品种材料进行对比实验。在以 MS 为基本培养基的 4 号培养基上，有 67%的接种花蕾产生不定芽；而在以 B₅ 为基本培养基、激素水平相同的 6 号培养基上，产生不定芽的花蕾仅占 49%；由 1/2MS 基本培养基组成的 19 号培养基上，只

有 38% 的花蕾产生不定芽, 表明 MS 基本培养基优于 B₅ 和 1/2MS 培养基。20 号培养基同样是由 MS 基本培养基组成, 但细胞分裂素是 Kt, 在此培养基上, 只有 22% 的花蕾产生不定芽。试验表明在羽衣甘蓝花托不定芽的诱导中, BA 的作用高于 Kt 约 3 倍。

以 4 号培养基为对照, 进一步改变激素配比, 用⑥号品种进行实验。结果表明在 MS+BA 2+IAA 0.5 的 4 号培养基上频率为 62%; 加入 NAA 0.1 (培养基 28); 可以适当提高不定芽的诱导率 (67%), 但进一步增加 NAA 含量 (培养基 21), 只能诱导根及根毛滋生, 对提高出芽率 (60%) 不明显, GA₃ 的作用也不明显。

紫色品种和绿色品种对细胞分裂素的敏感性不同, 绿色品种比紫色品种更敏感些。如③号和⑨号俱为绿色品种, 它们在 28 号培养基上的出芽花蕾频率分别为 40% 和 36%; 而在细胞分裂素含量减少 1/2 的 29 号培养基上, 它们相应地增加到 52% 和 43%。紫色品种如⑥、⑧号则恰恰相反, 在含较高 BA (培养基 4, 28) 的培养基上, 才能保持较高的频率; 在较低 BA 含量的 29 号培养基上, 其诱导频率明显降低。

2.3 不定芽的褐化及其缓解

无论是绿色品种还是紫色品种, 羽衣甘蓝的离体培养花蕾及新生的不定芽, 在诱导培养基上即开始褐化。黑褐色的胶状代谢产物, 凝聚在花蕾和不定芽与培养基接触的部位。此种褐化芽转移到芽生长培养基上, 很快失去生活力腐败而死。降低培养室温度 (20℃) 可稍缓解褐化进程, 但并不能根除此种危害。在植物组织培养研究中, 活性炭常被加入培养基以吸附培养物的有害代谢产物^[5]。最近一些研究者^[6]在柿树外植体培养中, 也应用了包括活性炭在内的几种物质以克服褐化现象。我们在部分芽生长培养基中加入 0.2% 粉状活性炭 (培养基 m₂a), 比较明显地提高芽的扦插存活率。以褐化最严重的①号材料为例, 再生芽转入不含活性炭的 m₂ 芽生长培养基上之后, 100% 全部褐化死亡; 而转入含活性炭的 m₂a 培养基上, 有 9.0% 的芽能存活。③号品种的芽在 m₂ 上仅存活 10%; 在 m₂a 上存活可达 35%。何奕昆等^[7]报告了在百脉根的组织培养中, 随着激素浓度增加, 培养物褐化程度加重; Zt 和 Kt 诱导芽的质量 (比 BA) 较好, 褐化程度较低。我们在实验中也曾观察到类似现象, ⑧号品种在含 Kt 的 20 号培养基上产生的不定芽, 褐化程度较含 BA 的 6 号培养基上的芽低, 扦插成活率相对也高。

2.4 再生植物的玻璃质化及其消除

羽衣甘蓝的不定芽普遍玻璃质化, 表现为枝叶硬脆、肥大和半透明状。将这些芽扦插到芽生长培养基上, 在最初的 7~10 天内尚能正常生长, 但很快便失绿, 变成水浸状而死亡。最近一些作者相继报道了离体繁殖中的玻璃苗现象^[8]。师校欣等^[9]指出, 在苹果苗的离体繁殖中, 多种因素导致玻璃苗的产生。如培养基中较高的氨态氮比例, 较高的 BA 浓度, 培养基的水分状况, 较高培养温度和低强度光照等。胡继金等^[10]使用青霉素消除了香石竹的玻璃苗。在我们的实验中, 曾将部分不定芽转入含 10~40 万单位医用青霉素 G 钾的培养基上, 并置于 25000 lx 强光照射下, 程度不同地提高了扦插芽的存活率 (表 2)。

实验结果表明, 在较弱的光照下 (4 000 lx), 虽然在培养基中加有不同浓度的青霉素, 但扦插芽仍呈黄绿色, 其存活率稍有提高。在 25 000 lx 强光照射下的扦插芽, 在 14~21 天内全都转成深绿色并茁壮生长, 扦插芽的存活率有较大幅度地提高。看来较强的光照可能是提高羽衣甘蓝再生植物成活率的关键因素, 青霉素的作用是第二位的。同时, 还必须指出, 在含

各种浓度青霉素的培养基上,绿色植物的基部常常形成结节,不产生根系,因此必须及时将存活的植物转移到生根培养基上,才能得到具有根系的完整存活植株。

表2 强光照和青霉素对提高扦插芽存活率(%)的作用

品 种	4000 lx				25000 lx				
	m ₂	m ₂ a	m ₂ a-20	m ₂ a-40	m ₂	m ₂ a	m ₂ a-10	m ₂ a-20	m ₂ a-40
1	0	9	10	0	0	21	23	26	0
2	3	15	17	5	7	50	49	50	24
6	7	17	15	18	12	38	64	60	23
9	3	14	21	13	11	29	58	40	32

注:扦插后30天统计

3 讨论

用花蕾作外植体,通过诱导不定芽的途径,可能是一种离体繁殖羽衣甘蓝杂种一代无性系植物的可行手段。培养物的严重褐化和普遍玻璃质化导致成活率低下,影响了离体繁殖的规模效益。进一步的研究目标是克服这些不利因素,提高再生植物成活率。

参 考 文 献

- 1 Lustinec J. and Horak J Induced regeneration of plant in tissue cultures of *Brassica oleracea*. *Experientia*, 1970, 26; 919
- 2 Horak J et al. Regeneration of diploid and polyploid plant from the stem pith explants of diploid marrow stem Kale (*Brassica oleracea* L.). *Ann Bot (London)*, 1975, 39; 571
- 3 Zee SY and Hui LH. *In vitro* plant regeneration from hypocoty and cotyledons of Chinese kale (*Brassica alboglabra* Bailey). *Z Pflanzenphysiol.* 1977, 82; 440
- 4 杨乃博等. 用组织培养方法繁殖十种植物的试验. *植物生理学报*, 1979, 5 (4); 369~377
- 5 王玉英等. 辣椒和甜椒花药培养的新进展. *园艺学报*, 1981, 8 (2)
- 6 孔祥生等. 柿树试管繁殖的研究. *植物学通报*, 1992, 9 (增刊); 11 (全国植物组织和细胞培养学术讨论会论文摘要专辑)
- 7 何奕昆等. 百脉根的组织培养和体细胞胚胎发生的细胞组织学观察. *植物学通报*, 1992.9 (增刊); 79
- 8 张朝成等. 甘薯茎尖培养的研究. *植物学通报*, 1992, 9 (增刊); 3
- 9 师校欣等. 植物离体培养中玻璃苗的发生及防治. *植物学通报*, 1992, 9 (增刊); 20
- 10 胡继金等. 青霉素消除香石竹玻璃苗作用的研究. *植物学通报*, 1992, 9 (增刊); 13

***In vitro* Propagation of Ornamental Kale**
(*Brassica oleracea* var. *acephala* f. *tricolor* Hort.)

Wang Huaiming Du Guangchen Jia Cuiying

Tan Xuewen Wang Xian

(National Engineering Research Centre for Vegetable Beijing, 100081)

Abstract Flower buds of eight F_1 cultivars of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala* f. *tricolor* Hort.) were *in vitro* propagated as explants. The medium containing MS+BA 1—2 mg/L+IAA 0.5mg/L+NAA 0.1—0.2mg/L+GA₃ 0.3mg/L (or free)+3% sucrose was used for the induction of adventitious buds. The adventitious buds were induced at the rate of 18—67% of the cultured flower buds. At the rate of 30%, the regenerated adventitious buds developed into complete plantlets. The browning of cultures and the glassy of regenerated plantlets severely affected the survival rate of the plants. Addition of active carbon and penicillin (Gpotassium) into the medium under strong lighting (25000 Lux) could raise the survival rate of the plantlets.

Key words: Ornamental kale; *In vitro* propagation