

三种基因型羽衣甘蓝筛选 适合叶绿体转化材料

平 璐^{1,2}, 顾德峰¹, 韦正乙², 仲晓芳², 林春晶², 邢少辰²

(1. 吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林省农业科学院 农业生物技术研究, 吉林 长春 130033)

摘 要:以 3 种不同基因型的羽衣甘蓝品种“皱叶红心”、“白鸥”和“红鸥”为试材,以 MS 培养基为基础培养基,分别添加不同质量浓度的 6-BA、NAA、IBA 激素,筛选不同品种真叶叶片不定芽的诱导频率,同时确定不同材料对除草剂双丙氨膦和抗生素壮观霉素的致死临界质量浓度,为羽衣甘蓝的叶绿体转化研究筛选受体材料。结果表明:影响羽衣甘蓝叶片诱导不定芽因素中,激素质量浓度的影响比品种的影响更大;当诱导培养基中的 6-BA 质量浓度为 1.0 mg/L、NAA 质量浓度为 0.1 mg/L 时,诱导效果最佳,是 3 个品种的最适培养基;按照由高到低的顺序排列,3 个品种的不定芽诱导率依次为“红鸥”、“白鸥”和“皱叶红心”,因此择优利用品种“红鸥”作为后续转基因研究的受体材料;分别利用双丙氨膦和壮观霉素的的不同质量浓度梯度进行筛选,研究二者对“红鸥”品种叶片分化的影响,发现双丙氨膦和壮观霉素的最低抑制质量浓度分别为 4 mg/L 和 50 mg/L。该研究结果对今后利用叶绿体遗传转化技术改良羽衣甘蓝品种提供了技术支持。

关键词:羽衣甘蓝;不定芽诱导;叶绿体转化;筛选;高频再生

中图分类号:S 635.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)02-0092-08

观赏羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* var. *acephala*)属十字花科芸薹属,是甘蓝种的园艺变种^[1]。由于近些年培育出多个杂交种,使其形态色彩极为丰富,在我国东北地区,常用于冬季园林植物景观搭配的材料^[2-4]。早在公元前 200 年古希腊时期,羽衣甘蓝就已应用栽培。随后传入荷兰、英国、德国、美国等国家被广泛的应用。在我国的引种时间较短,1995 年,初次报道有关观赏羽衣甘蓝的离体繁殖技术^[5]。东北林业大学花卉生物工程研究所自 2000 年由日本引进观赏花卉羽衣甘蓝原始 F₁ 代品种,经 5 年的自交选育,获得性状优良稳定的新品种“红罗裙”和“白罗裙”^[6];顾卫红等^[7]采用多代蕾期人工自交后代分离的方法,选育出了 7 个优良观赏型羽衣甘蓝新品系;王江等^[8]杂交育成观赏羽衣甘蓝新品种“粉玉”。目前对于羽衣甘蓝的研究主要是游离小孢子培养及再生^[9-12]。

由于羽衣甘蓝在常规的育种中存在育种周期长的

特点,需 2 年才能完成一个有性世代。而通过基因工程培育新品种,可以有效的提高羽衣甘蓝的优良性状,进而缩短育种年限^[13]。因此通过转基因技术培育羽衣甘蓝新品种就显得尤为重要。在基因工程领域羽衣甘蓝作为受体材料主要应用于在细胞核转化方面。CAO 等^[14]通过农杆菌介导法培育出转抗虫基因羽衣甘蓝;李鸿雁等^[15]将拟南芥基因转入羽衣甘蓝中提高羽衣甘蓝耐旱性;XIE 等^[16]通过基因调控羽衣甘蓝花期等。

多年的研究实践证明,传统的细胞核转化是目前最常用的遗传转化方法,虽然取得了令人瞩目的成就,但是仍然存在许多不足之处,例如表达量低、基因沉默等。与此不同,叶绿体转化则具有许多独特的优势,如因拷贝数多而导致的外源基因高表达量,无基因沉默、插入位点已知和绝大多数没有花粉飘移而造成的生态环境风险等,为植物的遗传改良和生物反应器研究开辟了一个新途径^[17]。但是,叶绿体转化也存在明显的限制因素,例如受体材料需要具备较高的不定芽诱导频率和再生频率,以便从中筛选获得完全同质化叶绿体转基因材料^[18]。迄今为止,尚鲜见羽衣甘蓝叶绿体转化的相关报道,且对于叶绿体载体构建上的抗性筛选剂的选择报道较少。该研究首次通过在筛选培养基中添加双丙氨膦和壮观霉素 2 种适合作为叶绿体转化的抗性筛选剂,配

第一作者简介:平璐(1990-),女,吉林长春人,硕士研究生,研究方向为园林植物种质资源创新。E-mail:1241036296@qq.com.

责任作者:邢少辰(1964-),男,博士,研究员,研究方向为叶绿体生物反应器。E-mail:xingsc@cjaas.com.

基金项目:吉林省科技发展规划资助项目(20076021;C42070501)。

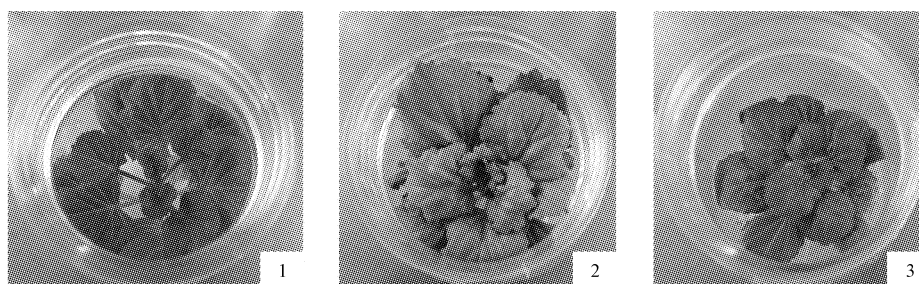
收稿日期:2015-09-24

合 3 种不同质量浓度梯度的激素诱导,开展具有抗性的再生最适筛选培养基参数优化,以期在 3 种羽衣甘蓝品种中筛选获得不定芽诱导表现良好的材料,及最适的转基因羽衣甘蓝材料抗性筛选质量浓度,为今后该物种的叶绿体遗传转化研究奠定材料基础,进而推动羽衣甘蓝重要性状的遗传改良。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用 3 种不同的观赏羽衣甘蓝品种,商品名称分别为“皱叶红心”(购自北京花儿朵朵仙子农业有限公司)、“红鸥”和“白鸥”(购自日本坂田公司 TAKII SEED)(图 1)。



注:1. “皱叶红心”;2. “白鸥”;3. “红鸥”。
Note: 1. ‘Zhouyehongxin’; 2. ‘Bai’ou’; 3. ‘Hong’ou’.

图 1 供试 3 种羽衣甘蓝品种

Fig. 1 Three varieties used in this experiment of *Brassica oleracea* var. *acephala*

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 以 3 个不同羽衣甘蓝品种作为材料,选取 3 种诱导激素(6-BA、NAA、IBA)中的任意 2 种激素,按照不同质量浓度设定为 1 组,共设计 6 组激素配比(表 1),每 1 组设置 5 次重复,每次重复接种 16 个外植体。运用 DPS 软件分析叶片外植体直接诱导不定芽的情况,从中筛选出最优培养基及受体材料。在此基础上,选择 2 种筛选剂,每 1 种筛选剂添加到最优培养基和受体材料组合中,设置 5~8 个质量浓度梯度处理,每组接种 16 个叶片外植体,处理 10 d,每 2 d 统计 1 次外植体黄化或褐化个数,通过筛选效果选出最优筛选剂及筛选的最优质量浓度。

表 1 羽衣甘蓝不定芽诱导培养基中 3 种激素的组合

Table 1 Combination of three hormones added in medium for adventitious bud induction of *Brassica oleracea* var. *acephala*

培养基编号 Medium number	1	2	3	4	5	6
激素浓度 Hormone concentration	6-BA	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	NAA	0.1	0.3	0.5	0.0	0.0
	IBA	0.0	0.0	0.0	0.1	0.3
		0.0	0.0	0.1	0.3	0.5

1.2.2 3 种激素不同质量浓度对不定芽诱导的影响

以 MS 作为羽衣甘蓝不定芽诱导的基础培养基,附加不同质量浓度、不同组合方式的 6-BA、NAA 及 IBA 3 种激素(激素均为过滤灭菌)。培养基的琼脂比例为 0.6%,蔗糖比例为 3%,pH 5.8(表 1)。

1.2.3 品种“红鸥”对 2 种抗性筛选剂的临界质量浓度筛选

由于转基因研究中抗性筛选是必不可少的步骤,

因此确定合适的抗性临界浓度是一个关键环节。抗性筛选培养基包括在最适再生培养基中添加不同质量浓度的除草剂双丙氨膦(Bialaphos-sodium, 缩写为 Bar)和抗生素壮观霉素(Spectinomycin, 缩写为 Spe)(抗性筛选剂均为过滤灭菌)。利用不定芽诱导率高的羽衣甘蓝品种“红鸥”作为受体材料进行抗性筛选。在双丙氨膦浓度的选择上,参照烟草、水稻、玉米等植物的筛选条件^[19-21],在“红鸥”品种最适的再生培养基中,添加 5 种不同质量浓度的 Bar 进行筛选,质量浓度梯度设置为 0、1、2、3、4、5 mg/L。在抗生素壮观霉素的质量浓度选择上,参照甜菜、郎柿、菊苣等植物的筛选标准^[22-24],在“红鸥”品种最适再生培养基中,添加 8 种不同质量浓度的 Spe 进行抗性筛选,质量浓度梯度设置为 0、25、50、75、100、125、150、175、200 mg/L。

1.2.4 羽衣甘蓝再生体系的建立 选取 3 个不同羽衣甘蓝品种作为受体材料,每个品种的种子分别用 10% 的过氧化氢(H₂O₂)杀菌 10 min,再用无菌水冲洗 4~6 次,然后加入无菌水将种子完全淹没,4℃ 条件下过夜。次日,倒掉无菌水,分别加 25% 的次氯酸钠(NaClO),灭菌 30 min。最后用无菌水冲洗 6~8 次,接种到 MS 培养基中,4℃ 条件下暗培养 12 h,次日进行光照培养。培养条件:温度 24℃,湿度 40%,光照强度 2 500 lx,光照培养 18 h/d,暗培养 6 h/d。待种子萌发并长到 10 cm 左右时,利用该幼苗用于再生。选取上述 3 个品种中长势好的无菌苗,剪取中层叶片,去除叶脉后切成大小约 1 cm×1 cm 左右的方形叶块,近轴面朝上平铺在添加了不同质量浓度激素的 MS 培养基上,每个培养基按照 4×4 方式

均匀摆放叶块。每组处理 80 个外植体,每皿 16 个,每处理 5 次重复。每 14 d 更换 1 次培养基,直至诱导出不定芽。待不定芽长至 1 cm 左右,统计出芽数。将不定芽移栽到 1/2MS 培养基中进行生根培养。

1.2.5 Bar 与 Spe 对羽衣甘蓝不定芽诱导的影响 取长势较好的无菌苗中层叶片,以筛选得到的不定芽诱导频率最高的羽衣甘蓝品种为材料,按上述的 4×4 叶块摆放方式,分别均匀地平铺在含不同浓度 Bar 和 Spe 的最适培养基上进行梯度筛选,以确定 Bar 和 Spe 对该品种叶片分化的影响。培养基中同时添加 3 种激素,并分别设置不同质量浓度。每种激素处理 16 个外植体叶块,每 2 d 统计 1 次,10 d 后统计外植体不定芽的诱导情况,分别确立 Bar 及 Spe 筛选的最适临界浓度。

1.3 数据分析

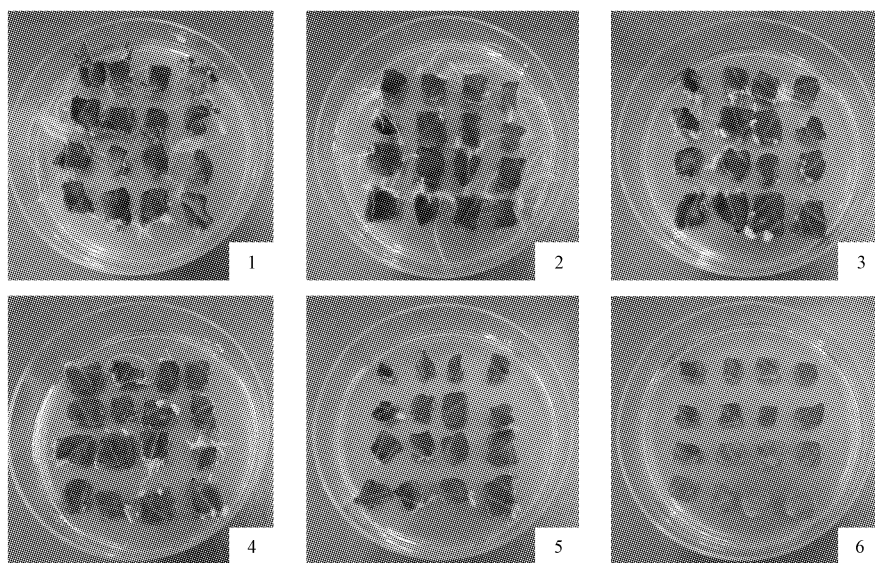
采用 DPS 数据处理系统软件,首先对 6 种激素组合的处理结果进行单因素比较分析,按照不定芽诱导的频率(诱导率(%))=分化不定芽总数/接种外植总数 \times 100,确定 3 个羽衣甘蓝品种的最适培养基。然后进行多重比较,根据不同激素质量浓度与不同品种不定芽诱

导数进行方差分析,选择出适用于叶绿体遗传转化的羽衣甘蓝受体品种,以及利用 Bar 和 Spe 作为筛选剂的抗性筛选培养基。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对羽衣甘蓝不定芽诱导的影响

2.1.1 适合不同品种不定芽诱导的培养基 由图 2 可知,在第 10 天时,1 号培养基,即 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA “红鸥”羽衣甘蓝有明显的诱导不定芽生成效果;2~4 号培养基只促进其叶片外植体生根,并且没有诱导不定芽生成;而 5、6 号培养基没有明显变化。并且根据 1~3 号培养基所用激素为 6-BA、NAA,而 4~6 号培养基所用激素为 6-BA、IBA 对羽衣甘蓝的诱导影响(图 2)分析得出,NAA 对羽衣甘蓝诱导效果要优于 IBA。结合不定芽诱导率比较分析,结果表明,3 个品种羽衣甘蓝在 1 号培养基中不定芽产生个数均最多(表 2),并且与其它培养基存在显著差异,确定 3 个品种的最适培养基为 1 号培养基,即 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA。



注:1~6 号为培养基编号,不同处理激素质量浓度培养基如表 1 所示。

Note:1-6 medium number,hormone concentrations in media was shown in table 1.

图 2 在培养基中诱导 10 d “红鸥”羽衣甘蓝叶片不定芽的诱导情况

Fig. 2 Adventitious buds from leaves of ‘Hong’ou’ *Brassica oleracea* var. *acephala* in media after 10 days induction

2.1.2 不定芽诱导最适品种的筛选 为了从 3 个羽衣甘蓝品种中筛选得到更适合不定芽诱导的品种,分析了培养基中不同激素质量浓度和不同品种不定芽诱导之间的关系(表 2)得出,在 1 号培养基的激素质量浓度中品种“红鸥”的诱导率为 77.50%,而品种“白鸥”的诱导率为 57.50%,品种“皱叶红心”的诱导率为 52.50%,品种“红鸥”不定芽诱导明显高于其它 2 个品种。同时对二者之间的不定芽诱导二因素多重比较结

果,如表 3 所示。由表 2 不定芽诱导率及不定芽长势和表 3 品种与激素间的二因素多重比较结果可以看出,3 个羽衣甘蓝品种诱导不定芽效果,由高到低依次为“红鸥”、“白鸥”和“皱叶红心”。其中,品种“红鸥”与 1 号培养基组合时,与其它组合之间的不定芽诱导率存在极显著差异,而且叶片诱导的不定芽长势最好,因此确定“红鸥”为 3 个羽衣甘蓝品种中最适合不定芽诱导的品种。

表 2 激素质量浓度对 3 种羽衣甘蓝不定芽诱导的影响

Table 2 Impact of hormone concentration on adventitious bud induction from three varieties of *Brassica oleracea* var. *acephala*

品 种 Cultivar	培养基编号	不定芽数 Adventitious bud					不定芽总数	诱导率	不定芽长势
	Medium number	重复 Repeat					The total number of adventitious buds	Induction rate /%	Growth vigor of Adventitious bud
“红鸥” ‘Hong’ou’	1	14	11	13	13	11	62	77.50	++
	2	6	6	7	8	7	34	42.50	++
	3	4	6	6	6	7	29	36.25	+
	4	4	2	3	0	2	11	13.75	+
	5	0	0	0	0	0	0	0.00	—
	6	0	0	0	0	0	0	0.00	—
“白鸥” ‘Bai’ou’	1	9	10	10	9	8	46	57.50	++
	2	7	7	6	7	4	31	38.75	+
	3	4	6	3	3	3	19	23.75	+
	4	0	0	0	0	3	3	3.75	—
	5	0	0	0	0	0	0	0.00	—
	6	0	0	0	0	0	0	0.00	—
“皱叶红心” ‘Zhouyehongxin’	1	9	8	9	9	7	42	52.50	+
	2	5	4	7	6	5	27	33.75	+
	3	3	3	4	2	1	13	16.25	+
	4	0	0	0	0	0	0	0.00	—
	5	0	0	0	0	0	0	0.00	—
	6	0	0	0	0	0	0	0.00	—

注:“+++”表示长势较好;“++”表示长势好;“+”表示长势一般;“—”表示长势不好。

Note:“+++” indicates better,“++” indicates good,“+” indicates common,“—” indicates bad.

表 3 不同激素质量浓度与不同羽衣甘蓝品种不定芽诱导二因素多重比较

Table 3 Multiple comparison of two factors between adventitious buds regenerated from *Brassica oleracea* var. *acephala* and different hormone concentrations

多重比较最优的前 3 组 The best three combinations among multiple comparison	各组 5 次重复之间诱导不定芽数的平均值 Average of adventitious buds counted from five replicates of each combination	5%显著水平 5% Significant level	1%极显著水平 1% Very significant level
“红鸥”×1 号培养基‘Hong’ou’×One medium	12	a	A
“白鸥”×1 号培养基‘Bai’ou’×One medium	9	b	B
“皱叶红心”×1 号培养基‘Zhouyehongxin’×One medium	8	b	B

2.1.3 不同激素质量浓度与不同品种对诱导不定芽影响关系 根据不同激素质量浓度下不同品种羽衣甘蓝不定芽方差分析(表 4),品种间因素概率值小于 0.05 且大于 0.01,而激素质量浓度间的因素概率值、品种与激素质量浓度间互作因素的概率值均小于 0.01,表明激素质量浓度因素极显著影响叶片诱导不定芽再生数量,而

品种间因素显著影响叶片诱导不定芽再生数量。说明激素质量浓度的不同是影响羽衣甘蓝不定芽再生的关键性因素。并且根据图 2 中激素的组合方式对不定芽诱导效果可知,激素 6-BA 与 NAA 的组合对羽衣甘蓝不定芽诱导效果最优。

表 4 不同激素质量浓度下不同羽衣甘蓝品种不定芽诱导的方差分析

Table 4 Variance analysis of adventitious bud regeneration from different varieties of *Brassica oleracea* var. *acephala* under different hormone concentrations

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	概率值 Significance
不同羽衣甘蓝品种因素间 Between the different varieties of kale factors	50.82	2	25.41	6.69	0.014
不同激素浓度因素间 Between different hormone concentration factors	1 208.85	5	241.77	63.66	0.000
不同品种×不同激素浓度 Different varieties and Different hormone concentrations	37.98	10	3.80	4.50	0.000
误差 Error	60.8	72	0.84		
总变异 The total variation	4 534.4	224			

注:0.01<概率值<0.05 为差异显著,概率值<0.01 为差异极显著。

Note:Probability value more than 0.01 and less than 0.05 means significant difference and less than 0.01 means very significant difference.

2.2 双丙氨膦(Bar)对羽衣甘蓝叶片离体培养的影响 根据表 5 中外植体黄化或褐化个数分析,当用 4 mg/L

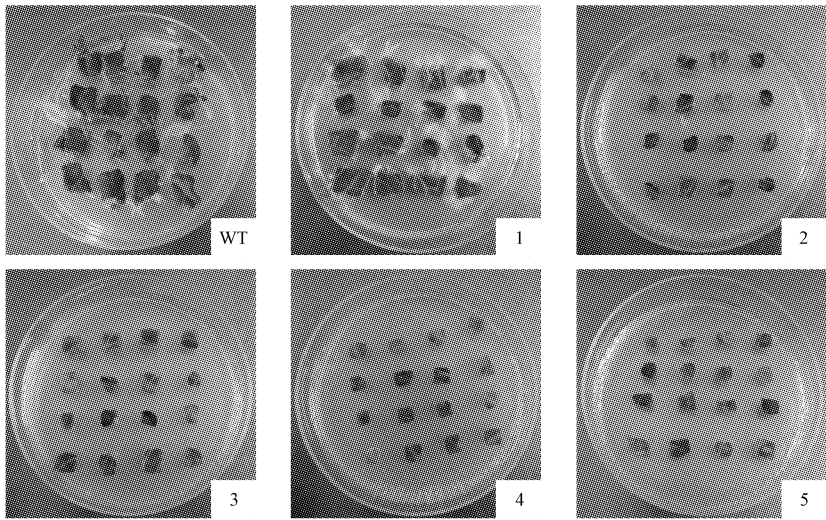
Bar 处理 8 d 时,16 个外植体中有 10 个叶片外植体的分化产生明显的抑制,而当 Bar 质量浓度低于 4 mg/L 时,

其抑制天数增加,且抑制效果不明显;高于 4 mg/L 时,虽然抑制天数缩短,但抑制剂质量浓度过高会对不定芽的分化产生不利影响。因此,选择 Bar 最适筛选质量浓度为 4 mg/L。

在最适品种“红鹇”、最适 1 号培养基条件下,添加不同质量浓度的 Bar 在第 10 天,对于离体叶片分化影响(图 3)。Bar 质量浓度为 4 mg/L 时最为敏感,完全抑制离体叶片分化,叶片几乎全部褐化,并且在 14 d 之内全部死亡。而在低于 4 mg/L 时叶片外植体虽然出现抑制生长,但褐化效果不明显,若作为受体材料,不利于后期阳性植株筛选。高于 4 mg/L 时叶片外植体与 4 mg/L 时效果相同,无明显差别。

表 5 不同质量浓度双丙氨膦对叶片外植体分化的影响

Table 5		The impact of Bar concentration on differentiation of leaf explants				
外植体总个数 Total number of explants	Bar 浓度 Bar concentration /(mg · L ⁻¹)	培养天数 Culture days/d				
		2	4	6	8	10
		外植体黄化或褐化个数 Number of yellow or brown explants				
16	0	0	0	0	0	0
16	1	0	0	0	0	0
16	2	0	1	3	5	10
16	3	0	3	4	8	14
16	4	0	3	5	10	16
16	5	0	3	7	10	16



注:WT 表示 Bar 质量浓度为 0 mg/L;1~5 表示 Bar 的质量浓度依次为 1、2、3、4、5 mg/L。

Note: WT indicates 0 mg/L of Bar concentration; 1~5 indicates that the Bar concentration is 1, 2, 3, 4, 5 mg/L, respectively.

图 3 不同质量浓度双丙氨膦筛选第 10 天对“红鹇”品种叶片外植体分化的影响

Fig. 3 The impact of Bialaphos-sodium concentration on differentiation of ‘Hongou’ leaf explants at 10 days of screening

表 6 不同质量浓度壮观霉素对叶片外植体分化的影响

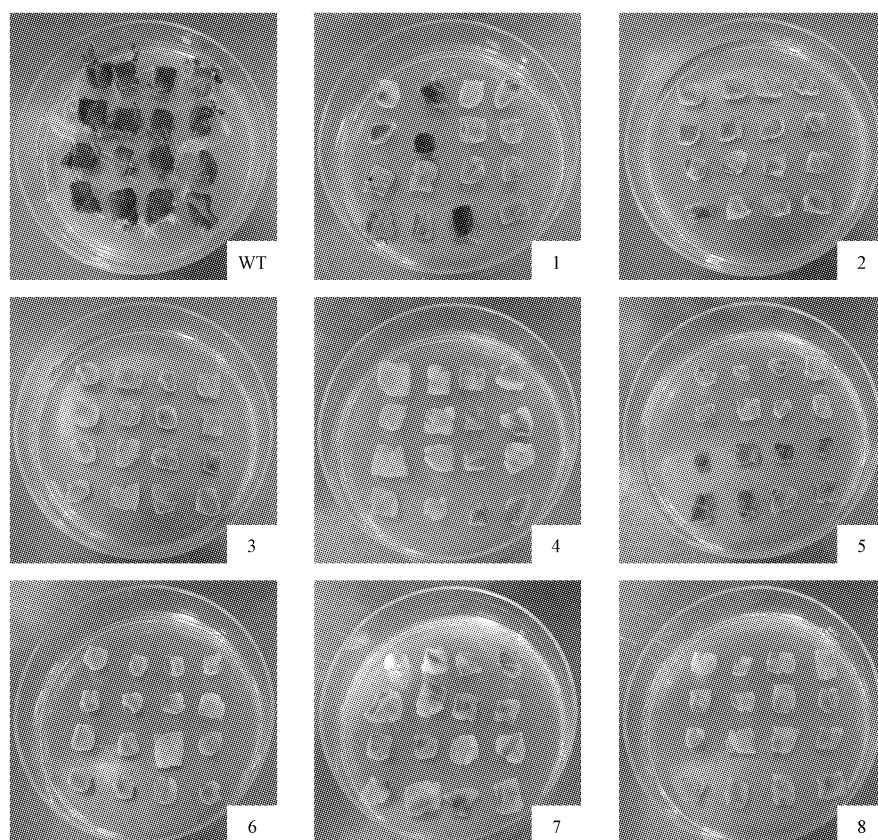
Table 6		The impact of Spe concentration on differentiation of leaf explants				
外植体总个数 Total number of explants	Spe 质量浓度 Spe concentration /(mg · L ⁻¹)	培养天数 Culture days/d				
		2	4	6	8	10
		外植体黄化或褐化个数 Number of yellow or brown explants				
16	0	0	0	0	0	0
16	25	0	3	6	9	13
16	50	0	6	14	15	16
16	75	0	9	14	15	16
16	100	2	9	15	15	16
16	125	3	9	15	16	16
16	150	5	9	10	16	16
16	175	8	10	15	16	16
16	200	8	10	15	16	16

2.3 壮观霉素(Spe)最适浓度的筛选

根据表 6 中外植体黄化或褐化个数分析,当用 50 mg/L Spe 处理 6 d 时,16 个外植体中有 14 个叶片

外植体的分化产生明显的抑制,而当 Spe 质量浓度为 25 mg/L 时,其第 6 天的抑制效果不明显,且抑制天数增加;在 50 mg/L 时与 75 mg/L 时抑制效果相同,而高于 75 mg/L 时虽然抑制天数缩短,但抑制剂质量浓度过高会对不定芽的分化产生不利影响。因此,选择 Spe 最适筛选质量浓度为 50 mg/L。

结果表明,在最适品种“红鹇”、最适 1 号培养基条件下,当分别添加不同质量浓度的 Spe 到第 10 天(图 4),在 Spe 质量浓度在 50 mg/L 时,对于离体叶片分化最为敏感,完全抑制离体叶片分化,叶片几乎全部褐化,并且在 14 d 死亡。在高于 50 mg/L 的其它质量浓度筛选培养基中,对于离体叶片分化影响与 50 mg/L 时基本相同,均出现黄化、褐化现象;而在 25 mg/L 时,已经有抑制分化的效果,但各别材料黄化效果不明显,如图 4 所示。为更好提高受体材料的筛选效果,选择 50 mg/L 作为 Spe 筛选质量浓度更为合适。



注:WT表示Spe质量浓度为0 mg/L;1~8表示Spe的质量浓度依次为25、50、75、100、125、150、175、200 mg/L。

Note: WT indicates 0 mg/L of Spe concentration; 1~8 indicate that the Spe concentration is 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 mg/L, respectively.

图4 不同质量浓度壮观霉素筛选第10天对“红鸥”品种叶片外植体分化的影响

Fig. 4 The impact of Spectinomycin concentration on differentiation of 'Hong'ou' leaf explants at tenth day of screening

3 讨论

在植物的遗传转化研究中,受体材料的选择是能否成功的关键步骤,而具有较高的诱导和再生频率往往是其中重要的因素之一,因为如果筛选获得不定芽的高频诱导材料,则十分有利于后期转基因阳性苗的筛选^[25-26]。该研究中,影响羽衣甘蓝叶片不定芽诱导率的关键因素主要是激素质量浓度。通过激素种类与质量浓度之间的不同组合,配制培养基用于诱导3个不同品种的不定芽,通过比较诱导频率的高低,确定“红鸥”品种在质量浓度为1.0 mg/L的6-BA和质量浓度为0.1 mg/L的NAA激素的培养基中,其不定芽的诱导率最高,约为77.50%,适合作为遗传转化的受体材料进行遗传改良。其次,该研究首次利用不定芽诱导频率最高的“红鸥”品种,在最适培养基上分别进行双丙氨膦和壮观霉素对叶片外植体分化的影响,发现双丙氨膦质量浓度为4 mg/L,壮观霉素质量浓度为50 mg/L时,分别对叶片的分化产生明显的抑制作用,为今后的抗性筛选提供了有利支撑。

据文献报道,与带柄子叶相比,羽衣甘蓝叶片不定芽诱导率较低,并且认为基因型是影响羽衣甘蓝不定芽

诱导的重要因素^[27]。而该研究在前人研究的基础上,研究6-BA、NAA以及6-BA与IBA的不同组合对羽衣甘蓝叶片不定芽诱导率,得出NAA对不定芽诱导效果优于IBA。并且该研究结果表明激素质量浓度因素的影响更重要,这与文献报道的结果有所不同。分析其原因,可能主要有2个方面:一是在不定芽诱导的外植体选择上,前人主要通过带柄子叶或下轴胚诱导不定芽,而该试验是利用适合叶绿体转化的叶片作为外植体,而造成诱导率不同;其次是在品种的选择方面,该研究选取的羽衣甘蓝材料与前人报道的品种不同,品种差异可能导致不同结果。

羽衣甘蓝转基因研究中,尤其在叶绿体基因工程受体材料研究中,利用双丙氨膦和壮观霉素作为筛选剂的报道甚少。而在当前研究叶绿体基因工程中,存在叶绿体转基因受体材料转化效率较低、叶绿体同质化植株很难获得、宿主植物种类偏少等问题^[17-18]。该研究借鉴其它植物筛选条件,对2种抗性筛选剂设置不同的质量浓度梯度进行临界值的筛选,发现当利用低质量浓度的Bar筛选时,外植体叶片黄化或褐化效果明显优于高质量浓度的Spe筛选效果,更易于识别,因此在后续的转

基因抗性筛选中, Bar 比 Spe 更适合作为羽衣甘蓝转基因研究的筛选剂。在叶绿体遗传转化当中, 合适的高效筛选剂及筛选材料能够解决转化的受体材料偏少、转化效率较低, 同质化困难等一系列问题^[28-29]。该研究中的“红鸥”品种羽衣甘蓝的不定芽诱导率高, 尤其是在后期不定芽分化方面的优势明显, 更适合叶绿体遗传转化研究。

(该文作者还有王云鹏, 单位为吉林省农业科学院农业生物技术研究所。)

参考文献

- [1] 赵秀枢, 李名扬, 张文玲, 等. 观赏羽衣甘蓝高频再生体系的建立[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(1): 141-148.
- [2] 俞奔驰, 黄富宇, 吕平, 等. 观赏羽衣甘蓝的组织培养[J]. 广西热带农业, 2006(5): 34-36.
- [3] 李明银, 黄丽梅. 观赏型羽衣甘蓝组织培养影响因素的研究[J]. 北方园艺, 2009(11): 99-101.
- [4] 李慧斌, 刘石梅, 吕海鹰. 观赏羽衣甘蓝扦插繁殖初步研究[J]. 北方园艺, 2010(10): 89-92.
- [5] 王怀名, 杜永臣, 贾翠莹. 观赏羽衣甘蓝的离体繁殖[J]. 华北农学报, 1995, 10(1): 64-69.
- [6] 解莉楠, 丁兵, 李玉花. 羽衣甘蓝新品种‘红罗裙’和‘白罗裙’[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 1071.
- [7] 顾卫红, 杨红娟, 马坤, 等. 观赏型羽衣甘蓝新种质及其新品种选育[C]//赵尊练. 园艺学进展(第六辑). 西安: 陕西科学技术出版社, 2004: 617-621.
- [8] 王江, 丁兵, 李玉花. 观赏羽衣甘蓝新品种‘粉玉’[J]. 园艺学报, 2014, 41(11): 2369-2370.
- [9] LICHTER R. Efficient yield of embryo by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species[J]. Plant Breed, 1989, 103: 119-123.
- [10] 姜凤英, 冯辉. 羽衣甘蓝游离小孢子培养初报[J]. 园艺学报, 2005, 32(5): 884.
- [11] 冯辉, 郭妹, 冯建云, 等. 菜用羽衣甘蓝的小孢子胚诱导和植株再生[J]. 园艺学报, 2009, 36(4): 587-592.
- [12] 贾文庆, 刘会超, 姚连芳. 矮牡丹子叶节离体再生体系[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(2): 13-15.
- [13] 张文玲, 李凌, 刘凡. 农杆菌介导羽衣甘蓝转化体系的建立[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2010, 32(4): 61-65.
- [14] CAO J, SHELTON A M, EARLE E D. Development of transgenic collards (*Brassica oleracea* L. var *acephala*) expressing a *cryI*Ac or *cryI*C Bt gene for control of the diamondback moth[J]. Crop Protection, 2005(24): 804-813.
- [15] 李鸿雁, 李大红. 转拟南芥 P5CS1 基因增强羽衣甘蓝的耐旱性[J]. 植物生理学报, 2014, 50(7): 1009-1013.
- [16] XIE Q L, CHEN G P, CHEN X Q, et al. Jointly silencing *BoDWARF*, *BoGA20ox* and *BoSP* (SELF-PRUNING) produces a novel miniature ornamental *Brassica oleracea* var. *acephala* f. *tricolor* variety[J]. Molecular Breeding, 2014, 34(25): 99-113.
- [17] WANG Y P, WEI Z Y, ZHANG Y Y, et al. Chloroplast-expressed MSI-99 in tobacco improves disease resistance and displays inhibitory effect against rice blast fungus[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015(16): 4628-4641.
- [18] ZUBKO M K, ZUBKO E I, van ZUILEN K, et al. Stable transformation of petunia plastids[J]. Transgenic Res, 2004, 13(6): 523-530.
- [19] 周锺信, 李明, 王英超, 等. 烟草 *Bar* 基因的转化及其转化体快速检测方法的研制[J]. 天津农学院学报, 2003, 10(4): 5-12.
- [20] 张祥喜, 罗林广. 水稻抗除草剂 *Bar* 基因的遗传研究初报[J]. 江西农业学报, 2003, 15(4): 17-20.
- [21] 刘小红. *Bar* 基因的转化及抗草丁膦除草剂转基因玉米植株的获得[J]. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(1): 25-29.
- [22] 孙璟晗, 李滨胜, 崔杰. 两种抗生素对甜菜离体叶柄分化的影响[J]. 中国甜菜糖业, 2006, 3(9): 18-20.
- [23] 刘永巨. 农杆菌介导的次郎柿 ACC 合成酶与 ACC 氧化酶反义基因遗传转化研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
- [24] 巩智刚. 菊苣叶绿体表达载体的构建及对菊苣和烟草的转化[D]. 西安: 西北大学, 2013.
- [25] ASAKO S, SUGANE H, TORU T, et al. Introduction of transformed chloroplasts from tobacco into petunia by asymmetric cell fusion[J]. Plant Cell Reports, 2009, 11(28): 1633-1640.
- [26] 高婧. 含除草剂标记的水稻叶绿体转化载体的构建及分子鉴定[D]. 长沙: 中南大学, 2013.
- [27] DAI X G, SHI X P, YE Y M, et al. High frequency plant regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of ornamental kale[J]. Biologia Plantarum, 2009, 53(24): 769-773.
- [28] MIKHAILO K Z, ELENA I Z, KAREN V Z, et al. Stable transformation of petunia plastids[J]. Transgenic Research, 2004(13): 523-530.
- [29] 崔柳青, 李一帆, 潘卫东. 叶绿体基因工程研究进展[J]. 生物技术通报, 2012(6): 1-6.

Screening of High Frequency Regeneration Materials Suitable for Chloroplast Transformation From Three Cultivars of *Brassica oleracea* var. *acephala*

PING Lu^{1,2}, GU Defeng¹, WEI Zhengyi², ZHONG Xiaofang², LIN Chunjing², XING Shaochen², WANG Yunpeng²

(1. College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130033)

Abstract: Taking three *Brassica oleracea* var. *acephala* cultivars with different color, ‘Zhouyehongxin’, ‘Bai’ou’ and ‘Hong’ou’ as materials, the frequency of adventitious bud induction were studied and so as to provide explants for subsequent chloroplast transformation. The MS medium was served as basic medium added with different concentrations of 6-BA, NAA and IBA, respectively, with the addition of bialaphos sodium and spectinomycin. The results showed that the impact of cultivar on induction of hormone from leaves of *Brassica oleracea* var. *acephala* was more visible than that of

麦草畏、水杨酸对西洋参成熟种胚体细胞胚发生的影响

刘 政, 杨 国 鹏, 曹 小 勇, 秦 公 伟, 胡 选 萍

(陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723000)

摘 要:以西洋参成熟种胚为试材,以不加激素和添加 0.5 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基为对照,研究了不同浓度(0.05~2.00 mg/L)麦草畏、水杨酸对西洋参体胚发生的影响。结果表明:未添加激素的空白培养基没有愈伤和体胚发生;在附加 2,4-D 的培养基中愈伤和体胚发生率为 100%;5 个浓度的麦草畏和水杨酸均能诱导出体胚,其中 1.00 mg/L 麦草畏的效果最佳,体胚发生率为 56.60%,水杨酸处理下体胚发生率最高为 7.50%;在各种浓度的水杨酸中种胚生长量比对照小且褐化严重。说明麦草畏、水杨酸均可诱导西洋参成熟种胚体细胞胚发生,诱导能力 2,4-D>麦草畏>水杨酸;水杨酸对种胚生长有抑制作用。

关键词:西洋参;成熟种胚;麦草畏;水杨酸;体胚发生

中图分类号:S 567.5⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)02-0099-04

西洋参(*Panax quinquefolium*)属五加科人参属多年生草本植物,又名花旗参、美国参,原产于美国和加拿大。西洋参生长缓慢,对生长环境要求严格,栽培技术复杂,存在种胚后熟现象,在自然状态下需要长达 20~22 个月才能打破休眠^[1]。到目前为止人们在西洋参的组织培养及体细胞胚胎发生方面已经做了较为深入和系统的研究,但至今尚未确立稳定的西洋参快速繁殖体系^[2]。如果与常规育种方法相结合,通过离体培养技术,建立体细胞胚胎发生的无性繁殖系,就可以缩短育

种年限,加快育种进程^[3]。

麦草畏(dicamba)是一种除草剂,其结构和作用类似于 2,4-D,在提高愈伤组织诱导率和胚性愈伤组织诱导率方面具有一定作用^[4]。WANG^[5]以西洋参根,TIRAJOH 等^[6]以西洋参根、叶和上胚轴为外植体研究了麦草畏在诱导愈伤和体胚上的作用。水杨酸(salicylic acid,SA)是一类由植物产生的酚类物^[7],是植物体内普遍存在的内源信号分子之一,已被确认是一种植物激素^[8]。大量研究发现,外源水杨酸能影响植物多种生理过程,如蒸腾作用、气孔关闭、种子萌发、果实成熟、开花、植物产热、植物抗病等^[9-12]。HAMIDOU 等^[13],BEHZAD 等^[14]对水杨酸在诱导愈伤和体胚方面做了一些研究。麦草畏和水杨酸能否诱导西洋参成熟种胚体胚发生尚鲜见报道。现利用添加不同浓度麦草畏和水杨酸的 MS 培养基对西洋参成熟种胚进行离体培养,观察愈伤组织及胚状体的发生,了解麦草畏和水杨酸的作用,为西洋

第一作者简介:刘政(1986-),男,河南确山人,硕士研究生,研究方向为植物生物技术。E-mail:690008831@qq.com.

责任作者:曹小勇(1964-),男,硕士,教授,现主要从事植物资源保护与功能成分等研究工作。E-mail:caoxiyong@163.com.

基金项目:陕西省重点实验室科研资助项目(13JS020);陕西省重点学科专项建设经费资助项目。

收稿日期:2015-07-24

adventitious buds. The induction frequency of adventitious buds would be highest when the media were added with concentration of 1.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA for the cultivars of three *Brassica oleracea* var. *acephala* and so-called optimal medium for the three cultivars. According to the order from high to low, the ranking of frequencies of adventitious bud induction for three cultivars was 'Hong'ou', 'Bai'ou' and 'Zhouyehongxin'. Cultivar 'Hong'ou', therefore, was considered to be the suitable explant for the genetic transformation. The minimum inhibitory concentration of bialaphos-sodium and spectinomycin in induction medium for 'Hong'ou' cultivar was 4 mg/L and 50 mg/L separately. These results provided technical support for chloroplast transformation of *Brassica oleracea* var. *acephala* to implement genetic improvement.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *acephala*; adventitious bud induction; chloroplast transformation; selection; high frequency regeneration