

以花椰菜花球为外植体的离体再生体系的建立

黄俊轩, 刘艳军, 李建科, 武春霞, 杨静慧, 徐慧洁

(天津农学院 园艺系, 天津 300384)

摘要:以花椰菜花球切片为外植体,在含有不同激素的培养基上进行再生芽的诱导、伸长和生根培养,从中筛选出最适的培养基配方。结果表明:最适的分化培养基为 MS+1.0 mg/L BA+0.5 mg/L IAA;最适的伸长培养基为 MS+0.5 mg/L IAA;最适的生根培养基为 1/2MS+1.0 mg/L IAA。该试验结果为花椰菜基因转化及其进一步组培研究奠定了基础。

关键词:花椰菜;激素;再生;转化

中图分类号:S 635.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)05-0088-03

花椰菜(*Brassica oleracea* var. *botrytis*)属十字花科芸薹属植物,它与人们的日常生活密切相关,并已在农

业生产中占有一定的地位,现今在世界各地均有种植。但花椰菜生长期病虫害严重,存在不耐贮、品质差等问题,困扰着广大菜农与菜商。因此,对花椰菜的品种进行改良势在必行。虽然常规的育种方法在花椰菜育种中已经取得了巨大成就,但由于其局限性,使人们迫切希望的一些育种目标难以实现。随着现代生物技术的飞速发展,人们采用基因转化技术使其获得新型重要的园艺性状成为了可能^[1-3]。而基因转化工作的前提就

第一作者简介:黄俊轩(1973-),男,广东河源人,硕士,副教授,现主要从事园林植物等研究工作。E-mail: huangjunxuan@sina.com.

基金项目:国家农业科技成果转化资助项目(2011GB2A100003);国家星火计划资助项目(2012GA60031)。

收稿日期:2013-11-13

250 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 50 ng 模板 DNA, 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶。采用该体系,随机选取的 4 对引物均可得到清晰明亮、多态性丰富的条带。

参考文献

- [1] 李严,张春庆. 新型分子标记-SRAP 技术体系优化及应用前景分析[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 108-112.
- [2] 王军,杨荣萍,洪明伟,等. 石榴 SRAP-PCR 反应体系的正交设计优化及验证[J]. 云南农业大学学报, 2013, 28(3): 376-379.
- [3] 郭大龙,吴正景,郑玉萍,等. 苦瓜 SRAP 反应体系的建立与优化[J].

安徽农业科学, 2008, 36(18): 7583-7585.

- [4] 王振国,张海英,于广建,等. 黄瓜 SRAP 反应体系的正交设计优化[J]. 华北农学报, 2007, 22(4): 112-115.
- [5] 任羽,王得元,张银东,等. 辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 分子植物育种, 2004, 2(5): 689-693.
- [6] 何正文,刘运生,陈立华,等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 76-77.
- [7] 郝凤,于铁峰,雷银川. 番茄 SRAP-PCR 反应体系建立与优化[J]. 北方园艺, 2012(3): 107-109.
- [8] 琚茜茜,黄如葵,黄玉辉,等. 苦瓜 AFLP 和 SRAP 的 PCR 反应体系优化及应用比较[J]. 南方农业学报, 2013, 44(2): 195-199.

Orthogonal Design-direct Analysis and SSR for SRAP Amplification System in *Momordica charantia*

LIU Meng-ya^{1,2,3}, HUANG Ru-kui^{2,3}, HUANG Yu-hui^{2,3}, HUANG Xiong-juan^{2,3}, CHEN Xiao-feng^{2,3}, FENG Cheng-cheng²

(1. College of Agricultural, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004; 2. Vegetable Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007; 3. The Key Laboratory of Crops Genetic Improvement Biological Technology of Guangxi, Nanning, Guangxi 530007)

Abstract: Taking *Momordica charantia* as test material, using SSR and orthogonal design-direct analysis to optimize the four levels of five factor (dNTP, template DNA, primer, Mg^{2+} , *Taq* DNA polymerase). The results showed that the optimum SRAP-PCR reaction system contains 1 \times PCR buffer, 250 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 50 ng template DNA, 1.2 $\mu\text{mol/L}$ primer, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 1.5 U *Taq* DNA polymerase, in a total volume of 20 μL SRAP-PCR system.

Key words: *Momordica charantia*; orthogonal design-direct analysis; SSR; SRAP

是建立高效的离体再生体系,现在常用的花椰菜转化的再生体系选用的外植体多为其无菌苗的下胚轴^[4-6],虽然此类外植体获得容易,但由于其外植体生长势较弱,伤口细胞数量较少,因此很难获得较高的再生率,从而限制了这一技术在花椰菜上的应用水平。

以花椰菜的花球为外植体,进行离体再生研究不但可以克服因外植体生长势不强而导致转化效率较低的问题,同时花球外植体伤口细胞较多,可以增加转化细胞的数量。现以花椰菜花球为试材,利用花球上小花下方的花梗切片为外植体,在含有不同浓度激素的 MS 培养基上诱导再生芽,研究高效再生的理想条件,旨在为花椰菜高效遗传转化体系的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试花椰菜品种“雪剑”,由天津耕耘种业有限公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒处理 取花椰菜花球,用解剖刀将花球上小花下方的花梗切成 3~5 mm 的小片,经体积分数为 70%酒精浸泡 30 s 后,用蒸馏水冲洗 3 次,再用体积分数为 40%安替福民(滴加 1 滴吐温 80)进行表面消毒 15 min,再用无菌水冲洗 3 次,每次 3~5 min,然后播种于不含任何激素的 1/2MS 培养基上进行培养。培养基中加入硫酸链霉素,使其终浓度为 100 mg/L。培养温度(24±2)℃,光照强度 1 600~2 000 lx,光照时间 16 h/d。

1.2.2 不同激素组合对花椰菜再生芽分化的影响

取培养 5~7 d 的花椰菜花球切片作为外植体。分别置于不同激素配比的 MS 培养基(MS 无机盐及维生素,激素配比见表 1,所有培养基中附加蔗糖 30 g/L,琼脂粉 7 g/L)中进行培养,以不含激素的 MS 培养基为对照(CK)。培养温度(24±2)℃,光照强度 1 600~2 000 lx,光照时间 16 h/d。25 d 后统计外植体再生芽数,并按下列公式计算不定芽再生率和平均每个外植体产生的芽数。不定芽分化率(%)=分化外植体数/接种外植体数×100%,平均每个外植体产芽数=分化总芽数/接种外植体数。

1.2.3 花椰菜再生苗的伸长培养 将从外植体上再生出的花椰菜幼芽用解剖刀切下,分成单个小芽,分别将小芽接种到含有不同激素的伸长培养基上进行芽的伸长培养,以不含激素的 MS 培养基为对照(CK)。培养基配方见表 2。所有培养条件同 1.2.2。20 d 后统计再生芽的伸长高度及芽的生长情况。

1.2.4 花椰菜再生苗的生根培养 将生长高度在 2~3 cm 以上的不定芽自基部切下,并接种在 1/2MS 附加不同浓度生长素的生根培养基中进行诱导生根。培养基配方见表 3。培养温度(24±2)℃,光照强度为

2 000 lx,24 h 光照。10~15 d 后观察生根情况,并统计生根率。然后打开瓶盖练苗 2~3 d,取出小苗并洗净粘附的琼脂,再用 0.2%甲基托布津浸泡 20 min 后,种植在经过消毒的栽培基质中,要求空气湿度为 70%~80%,并满足生长所需的温、光、水、气、肥等条件。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对花椰菜再生芽分化的影响

从表 1 可以看出,在不含激素的 MS 培养基上外植体没有诱导出再生芽,说明花椰菜花球再生芽的诱导必须要在一定激素的作用下才能进行;比较 BA 与 KT 对再生芽的影响,BA 明显要好于 KT,不论再生率还是每块外植体产生的芽数均比 KT 高很多,因此采用 BA 作为分裂素来诱导花椰菜再生芽是比较适合的;从不同浓度的 BA 所诱导的结果可以看出,BA 的浓度达到 1.0 mg/L 时获得的再生率与每块外植体产生的芽数均最高(图 1),当其浓度提高到 2.0 mg/L 时,再生率开始下降,说明 1.0 mg/L 的 BA 适合花椰菜再生芽的诱导。从再生芽的生长情况来看,在采用 KT 进行诱导时,再生芽多为畸形芽,芽生长不对称或极为粗壮而无叶片。KT 浓度在 0.5 mg/L 以上时,再生芽多为玻璃化,且在伸长培养基上很难生长,一般生长一段时间后就死亡,这也说明 KT 不适合花椰菜的再生芽诱导。在 BA 上生长的再生芽大部分正常,叶片形状与芽的粗度都与正常花椰菜组育苗相似,只是在较高浓度(2.0 mg/L)时,有玻璃化情况出现,这也说明采用适当的低浓度的 BA 利于花椰菜离体诱导。

表 1 不同激素组合对花椰菜再生芽分化的影响

培养基 /mg·L ⁻¹	外植体数 /块	再生芽外植 体块数/块	再生芽数 /个	再生率 /%	平均每块外植 体产生的芽数
MS(CK)	50	0	0	0	—
MS+0.25 BA+0.5 IAA	50	10	16	20	0.32
MS+0.5 BA+0.5 IAA	50	21	29	42	0.58
MS+1.0 BA+0.5 IAA	50	50	119	100	2.38
MS+2.0 BA+0.5 IAA	50	50	65	100	1.30
MS+0.25 KT+0.5 IAA	50	22	36	44	0.72
MS+0.5 KT+0.5 IAA	50	20	21	40	0.42
MS+1.0 KT+0.5 IAA	50	3	3	6	0.06

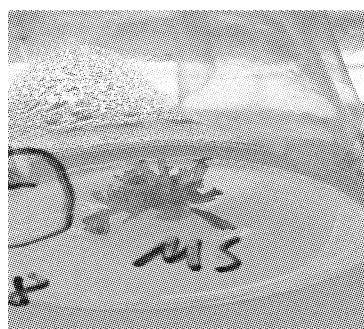


图 1 生长在分化培养基上的花椰菜外植体

2.2 花椰菜再生苗的伸长培养结果

从表2可以看出,在含有BA的培养基上植株的生长高度都明显小于其它培养基,而且再生芽多为畸形,在生长一段时间后就停止生长且黄化、死亡。这说明BA对再生芽的伸长培养不适合。不加激素的再生芽的生长也很好,只是生长速度较慢。从再生芽生长高度来看,在MS+0.5 mg/L IAA上最大,可达3.6 cm,而且苗的生长也很健壮(图2),因此,在花椰菜伸长培养中一定浓度的生长素更利于伸长培养。

表2 花椰菜在伸长培养基上的生长结果

培养基激素组合 /mg·L ⁻¹	接种外植体数 /块	芽生长高度 /cm	芽生长情况
MS(CK)	50	2.3	健壮
MS+0.25 BA+0.25 IAA	50	1.9	一般
MS+0.5 BA+0.5 IAA	50	1.6	畸形
MS+1.0 BA+1.0 IAA	50	1.5	畸形
MS+0.25 IAA	50	2.9	健壮
MS+0.5 IAA	50	3.6	健壮
MS+1.0 IAA	50	2.1	一般



图2 生长在伸长培养基上的花椰菜苗

2.3 花椰菜再生苗的生根培养

从表3可以看出,在所有培养基上都能生根,只是生根的数量与质量不同,从生根质量来看。在所有NAA的培养基上所生的根基本为粗短的肉质根,这种根一般移栽不能成活,且从数量上也比其它的培养基低,因此,NAA不适合诱导花椰菜再生苗生根。在IAA与无激素的1/2MS培养基上诱导出的根都很正常,适合于移栽。但从生根数量来看,在1/2MS+1.0 mg/L IAA上诱导的根最多,且生长良好,所以该培养基配方可以

表3 花椰菜在生根培养基上的培养结果

培养基激素组合 /mg·L ⁻¹	接种外植体数 /块	生根外植体 块数/块	生根率 /%	每块外植体 生根数/根	根的生 长情况
1/2MS(CK)	50	50	100	2.3	正常
1/2MS+0.5 IAA	50	50	100	3.9	正常
1/2MS+1.0 IAA	50	50	100	5.8	正常
1/2MS+2.0 IAA	50	50	100	2.3	正常
1/2MS+0.25 NAA	50	50	100	2.2	畸形
1/2MS+0.5 NAA	50	50	100	2.8	畸形
1/2MS+1.0 NAA	50	50	100	1.1	畸形

作为花椰菜离体诱导生根培养的最佳培养基配方。

3 结论

该试验结果表明,利用花椰菜花球为外植体进行离体再生繁殖时,取花椰菜花球,用解剖刀将花球上小花下方的花梗切成3~5 mm的小片,消毒后接种到不含任何激素的1/2MS培养基上进行培养;取培养1周后的花椰菜外植体接种到增殖培养基MS+1.0 mg/L BA+0.5 mg/L IAA上进行再生芽的诱导;将从外植体上再生出的花椰菜幼芽用解剖刀切下,分成单个的小芽,分别将小芽接种到伸长培养基MS+0.5 mg/L IAA上进行伸长培养;将生长高度在2~3 cm以上的不定芽自基部切下,并接种在生根培养基1/2MS+1.0 mg/L IAA中进行诱导生根。以上培养条件均为培养温度(24±2)℃,光照强度1 600~2 000 lx,光照16~24 h/d。该试验结果为花椰菜基因转化及其进一步组培研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 陈晓邦,华学军,黄其满,等.农杆菌介导的intron-Gus嵌合基因转入花椰菜获得转基因植株[J].植物学通报,1995(12):50-52.
- [2] 程振东,卫志明,许智宏,等.芸薹属作物的遗传转化[J].植物生理学通讯,1992,28(3):161-164.
- [3] 华学军,陈晓邦,范云六.杀虫剂基因在花椰菜愈伤组织的整合与表达[J].中国农业科学,1992,25(4):82-87.
- [4] 彭非,王凤翔.菘蓝子叶和下胚轴组织再生植株的研究[J].湖南农学院学报,1994,20(5):450-456.
- [5] 石淑稳,周永明.甘蓝型油菜下胚轴培养和高频率芽再生技术研究[J].中国油料作物学报,1998,20(2):1-6.
- [6] 夏小娣,李素文,张宝珍,等.花椰菜组织培养获得再生植株[J].天津农业科学,1995,1(2):22.

Regeneration of Cauliflower by *in vitro* Flower Bulb

HUANG Jun-xuan, LIU Yan-jun, LI Jian-ke, WU Chun-xia, YANG Jing-hui, XU Hui-jie

(Department of Horticulture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

Abstract: Taking cauliflower slices as explants to filter out the most suitable culture medium on medium containing different hormones to induce regeneration buds, elongation and rooting. The results showed that the optimal differentiation medium was MS+1.0 mg/L BA+0.5 mg/L IAA; optimal elongation medium was MS+0.5 mg/L IAA; optimum rooting medium was 1/2MS+1.0 mg/L IAA. The regeneration system may be used for gene transformation and tissue culture research of cauliflower further.

Key words: cauliflower; hormone; regeneration; transformation