

张桂芳,刘 静,刘 春,等. 白鹤芋花序体细胞胚胎诱导与快繁途径研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):72-74.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.019

白鹤芋花序体细胞胚胎诱导与快繁途径研究

张桂芳¹, 刘 静¹, 刘 春², 张 黎¹

(1. 宁夏大学农学院,宁夏银川 750000; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所,北京 100086)

摘要:以白鹤芋花序为外植体,研究影响白鹤芋花序体细胞胚胎诱导、增殖、萌发和植株再生转化的主要因子。结果表明,体细胞胚胎直接诱导的最适培养基为 MS + 5.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L KT + 0.1 mg/L NAA,体细胞胚胎增殖最适培养基为 MS + 5.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L ZT + 0.2 mg/L NAA,体细胞胚胎萌发最适培养基为 MS + 0.1 mg/L IBA + 0.4 mg/L GA₃ + 30 g/L 蔗糖,植株再生转化最佳激素配方为 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IBA + 0.5 mg/L GA₃。

关键词:白鹤芋;花序;体细胞胚胎;直接诱导;增殖;萌发;植株再生转化;适宜培养基;激素配方;组培快繁
中图分类号: Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0072-02

白鹤芋 (*Spathiphyllum floribundum*) 为天南星科白鹤芋属多年生草本花卉,肉质花序,火焰苞观赏性强,极耐阴性,是重要的室内观叶观花,成为国内观叶植物产业发展的先锋植物。白鹤芋广泛应用于盆栽观赏,是理想的花叶兼赏花卉,常采用种子和分株法繁殖,但繁殖系数低,严重影响了规模化和商品化生产^[1]。采用组织培养技术进行种苗的扩繁,短期内可获得大量优质种苗,满足生产需求。但以白鹤芋叶片和叶柄为外植体,易发生褐变且诱导率低;以植株根茎为外植体,灭菌困难污染率高。选择以白鹤芋花序为外植体,取材方便,灭菌相对较易,且增殖率高。本试验以白鹤芋的花序体为外植体,建立花序体细胞胚胎组培快繁体系,为白鹤芋种苗大量繁殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为白鹤芋“美酒”的肉质花序。

1.2 试验方法

1.2.1 白鹤芋花序体细胞胚诱导 将灭菌后的白鹤芋花序切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块,接种于 MS + 30 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂 + 不同浓度的 6-BA (1.3、5 mg/L)、KT (0.5、1.0、1.5 mg/L)、NAA (0.1、0.3、0.5 mg/L) 的培养基,设 9 个处理,每瓶接 5 个外植体,每瓶记为 1 次重复,每处理重复 10 次 (表 1)。25 ℃ 下黑暗培养 15 d 后转到光暗比为 12 h : 12 h 的条件下培养,50 d 后统计体胚诱导率。

1.2.2 体细胞胚增殖培养基筛选 将供试体细胞胚切成 0.2 ~ 0.3 cm 小块,接种于 MS + 30 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂 + 不同浓度 6-BA、NAA、ZT 的培养基中,设 12 个处理,每瓶接

5 个体胚块,每瓶记为 1 次重复,每个处理重复 10 次。40 d 后统计体胚再生率和增殖倍数。

表 1 激素浓度和种类配比设计

处理号	A:6-BA 浓度 (mg/L)	B:ZT 浓度 (mg/L)	C:NAA 浓度 (mg/L)
A1	3	0.1	0.2
A2	4	0.1	0.2
A3	5	0.1	0.2
A4	6	0.1	0.2
B5	5	0.1	0.2
B6	5	0.3	0.2
B7	5	0.5	0.2
B8	5	0.7	0.2
C9	5	0.1	0.2
C10	5	0.1	0.3
C11	5	0.1	0.4
C12	5	0.1	0.5

1.2.3 白鹤芋体胚萌发 MS + 30 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂为基本培养基,对 IBA (0.1、0.2、0.3 mg/L)、GA₃ (0.2、0.4、0.6 mg/L) 及蔗糖 (10、20、30 g/L) 进行 L₉ (3⁴) 正交试验,共 9 个处理,每瓶接 5 个发育成熟的体胚块,每瓶记 1 次重复,每处理 10 次重复。30 d 后统计体胚的萌发率。

1.2.4 白鹤芋植株的再生转化 MS 为基本培养基,对 6-BA (0.5、1.0 mg/L)、IBA (0.1、0.2、0.3 mg/L) 及 GA₃ (0.3、0.5、0.7 mg/L) 进行 L₉ (3⁴) 的正交试验,共 9 个处理,每瓶接 3 个萌发的成熟体胚块,每瓶记为 1 次重复,每个处理 10 次重复。培养 40 d 后统计再生率。

2 结果与分析

2.1 白鹤芋花序体细胞胚诱导

初级体胚诱导过程中,35 d 后处理 1、处理 2、处理 3 大部分花序褐化、死亡,存活的花序生出微小黄绿色颗粒突起。随着 6-BA 浓度的升高,10 d 后处理 4 到处理 9 白色花序均逐渐膨大,并变为绿色;45 d 后,处理 4、处理 5 与处理 6 产生少量的黄绿色体胚;处理 8 花序表面形成大量紧密的簇状体细

收稿日期:2015-06-06
基金项目:宁夏科技支撑计划(编号:2013ZZN05)。
作者简介:张桂芳(1988—),女,山西大同人,硕士研究生,主要从事观赏植物研究。E-mail:544406790@qq.com。
通信作者:张 黎,教授,主要从事观赏园艺研究。E-mail:zhang_li9988@163.com。

胞胚。

由表 2 可知,9 个处理均能诱导初级体胚的形成,但不同处理对初级体胚的诱导存在差异。激素组合为 5.0 mg/L 6-BA +1.0 mg/L KT +0.1 mg/L NAA 的处理 8,为白鹤芋花序初级体细胞胚诱导的最佳培养基,诱导率达 56.67%。各激素对白鹤芋花序初级体胚诱导的能力依次为 6-BA > KT > NAA。

表 2 白鹤芋体胚诱导正交设计结果分析

处理号	A:6-BA (mg/L)	B:KT (mg/L)	C:NAA (mg/L)	初级体胚 诱导率(%)
1	1	0.5	0.1	4.44eD
2	1	1.0	0.3	5.55eD
3	1	1.5	0.5	5.56eD
4	3	0.5	0.3	24.44dC
5	3	1.0	0.5	30.00cdC
6	3	1.5	0.1	33.33cC
7	5	0.5	0.5	44.44bB
8	5	1.0	0.1	56.67aA
9	5	1.5	0.3	47.78bB
k ₁	5.184 4	29.258 9	49.628 9	
k ₂	24.443 3	30.740 0	28.888 9	
k ₃	49.630 0	25.924 4	26.666 7	
R	44.445 6	6.30	5.56	

注:数据采用 DPS 软件进行处理,并采用 Duncan’s 新复极差法进行差异显著性比较;同列不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)、不同大写字母表示处理间差异极显著($P < 0.01$)。下表同。

2.2 体细胞胚增殖最佳培养基筛选

由表 3 可知,激素组合为 5 mg/L 6-BA +0.3 mg/L ZT +0.2 mg/L NAA 的 B6 处理为体胚增殖最佳培养基,增殖倍数达到了 10.50。当 ZT、NAA 浓度不变,6-BA 浓度为 5 mg/L 时,体胚增殖能力最强,但当 6-BA 浓度继续升高时,体胚增殖受到抑制;控制 6-BA、NAA 浓度不变,ZT 浓度为 0.3 mg/L 时,体胚增殖效果最好;当 6-BA、ZT 浓度一定,NAA 浓度为 0.2 mg/L 时,体胚增殖效果显著。

表 3 白鹤芋体胚增殖正交试验结果

处理号	体胚再生数	体胚增殖倍数	体胚增殖量
A1	16.67 ± 1.53cC	5.43 ± 0.61cC	+
A2	19.33 ± 0.58bBC	6.13 ± 0.59cBC	++
A3	24.67 ± 1.53aA	9.43 ± 0.61aA	+++
A4	21.00 ± 1.00bB	7.60 ± 0.76bB	++
B5	17.33 ± 2.08bB	6.83 ± 0.68bB	+
B6	26.67 ± 1.53aA	10.50 ± 0.80aA	++++
B7	19.00 ± 1.73bB	7.03 ± 0.31bB	++
B8	19.33 ± 1.53bB	6.8 ± 1.37bB	+
C9	25.00 ± 1.00aA	9.67 ± 0.78aA	+++
C10	22.00 ± 1.00bB	7.43 ± 0.50bB	++
C11	19.67 ± 0.58cBC	6.67 ± 0.38bCB	+
C12	18.00 ± 1.00cC	6.10 ± 0.20cB	+

注:表中值为“平均值 ± 标准差”,“+”表示体胚增殖生长(0.3 cm × 0.3 cm) ~ (0.5 cm × 0.5 cm);“++”表示体胚增殖生长(0.5 cm × 0.5 cm) ~ (0.7 cm × 0.7 cm);“+++”表示体胚增殖生长(0.7 cm × 0.7 cm) ~ (1.0 cm × 1.0 cm);“++++”表示体胚增殖生长(1.0 cm × 1.0 cm) ~ (1.2 cm × 1.2 cm)。

2.3 白鹤芋体胚萌发

将白鹤芋花序成熟体胚转接到萌发培养基 10 d 后,胚根

不断延伸,主根出现。出根 15 d 后子叶逐渐膨大,由黄绿色变成绿色,但不生芽。

由表 4 可以看出,各因素对白鹤芋花序体胚萌发影响程度依次为 IBA > GA₃ > 蔗糖。由正交设计试验结果可得,白鹤芋花序体胚萌发最佳的激素和蔗糖的组合为 0.1 mg/L IBA +0.4 mg/L GA₃ + 30g/L 蔗糖,验证性试验体胚的萌发率为 77.58%。

表 4 白鹤芋体胚萌发率正交试验结果

处理号	A:IBA 浓度 (mg/L)	B:GA ₃ 浓度 (mg/L)	C:蔗糖浓度 (g/L)	体胚萌发 率均值(%)
1	0.1	0.2	10	70.06abAB
2	0.1	0.4	20	74.50aA
3	0.1	0.6	30	67.11bcABC
4	0.2	0.2	20	61.55cdeBCDE
5	0.2	0.4	30	63.92cdBCD
6	0.2	0.6	10	53.73fE
7	0.3	0.2	30	56.01eDE
8	0.3	0.4	10	60.23deCDE
9	0.3	0.6	20	62.11cdBCDE
k ₁	70.553 3	59.731 7	59.445 0	
k ₂	62.536 7	66.213 3	60.980 0	
k ₃	61.336 7	66.051 7	62.341 7	
R	11.108 3	5.233 3	4.715 0	

2.4 白鹤芋植株再生转化

由表 5 可看出,0.5 mg/L 6-BA +0.1 mg/L IBA +0.5 mg/L GA₃,为白鹤芋植株再生转化最佳激素组合,植株再生率达 88.56%。各激素对白鹤芋花序体胚植株再生转化率的影响依次为 6-BA > GA₃ > IBA。

表 5 白鹤芋植株再生率正交试验结果

处理号	A:6-BA 浓度 (mg/L)	B:IBA 浓度 (mg/L)	C:GA ₃ 浓度 (mg/L)	植株再生 率均值(%)
1	0	0.1	0.3	73.00cBCD
2	0	0.2	0.5	71.11cdCD
3	0	0.3	0.7	64.33dD
4	0.5	0.1	0.5	88.56aA
5	0.5	0.2	0.7	68.97cdCD
6	0.5	0.3	0.3	81.45aAB
7	1.0	0.1	0.7	69.78cdCD
8	1.0	0.2	0.3	74.87bcBC
9	1.0	0.3	0.5	69.33cdCD
k ₁	69.482 2	79.656 7	71.333 3	
k ₂	77.111 1	71.655 6	71.705 6	
k ₃	76.445 6	76.333 3	67.693 3	
R	10.174 4	5.455 6	8.752 2	

3 结论与讨论

3.1 结论

白鹤芋花序体胚诱导最佳激素配方为 5.0 mg/L 6-BA +1.0 mg/L KT +0.1 mg/L NAA,诱导率达 56.67%,6-BA 的影响作用最大;白鹤芋花序体胚增殖最佳激素组合为 5 mg/L 6-BA +0.3 mg/L ZT +0.2 mg/L NAA,增殖倍数达到 10;白鹤芋花序体胚萌发最佳激素和蔗糖组合为 0.1 mg/L IBA +0.4 mg/L GA₃ + 30 g/L 蔗糖,体胚萌发率为

刘哲,许园园,苏小俊.萝卜抽薹相关 SRAP 分子标记筛选与分析[J].江苏农业科学,2016,44(8):74-76.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.020

萝卜抽薹相关 SRAP 分子标记筛选与分析

刘哲,许园园,苏小俊

(江苏省农业科学院蔬菜研究所,江苏南京 210014)

摘要:利用抽薹性状差异较大的晚抽薹萝卜品种 L2 和早抽薹萝卜品种 E6 配制杂交组合,构建 F₂ 群体。通过田间调查,选用极晚和极早抽薹单株分别构建晚抽池(BSA-1)和早抽池(BSA-2),用 288 对 SRAP 组合对两亲本进行 PCR 分析,共筛选出 166 对 SRAP 引物组合。通过 2 个基因池及基因池中各单株对筛选出的引物进行复筛,获得引物组合 me3+em9,其在晚抽池中可扩增出多态性片段 LB;对 156 株 F₂ 单株进行验证发现,LB 与晚抽薹基因紧密连锁,其遗传距离为 5.7 cM。

关键词:萝卜;晚抽薹;分子标记;遗传距离

中图分类号: Q943;S631.103 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0074-03

抽薹开花是农业生产上的一个重要现象,不仅对植物生殖器官的形成起关键作用,而且关系到植物的生物产量和产品品质。先期抽薹在十字花科作物栽培上是一个倍受关注的问题,不仅会降低十字花科作物的生物产量,而且会影响到产品的品质,晚抽薹是十字花科作物一个重要的育种目标^[1]。生物技术的发展给作物遗传育种研究带来巨大变化,分子标记技术的应用是其中之一。分子标记具有位点丰富、多态性高、稳定可靠等特点,且检测不受时间和性状表达限制,可鉴别基因型的纯合或杂合。本研究利用与晚抽薹基因紧密连锁

的分子标记可以方便准确识别不同晚抽薹基因的特点,通过群体分离分析法(BSA)筛选出与晚抽薹萝卜基因紧密连锁的分子标记,以实现分子标记辅助育种,减少萝卜选育过程中对表型性状的依赖,从而大大提高萝卜的育种效率。

1 材料与方法

1.1 材料

萝卜晚抽薹品种 L2,为韩国白玉春萝卜第 9 代自交系;早抽薹品种 E6,为短叶 13 萝卜第 10 代自交系,均由江苏省农业科学院蔬菜研究所提供。将晚抽薹与早抽薹亲本进行杂交再自交,形成 F₂ 分离世代群体共计 156 株单株。引物由上海英俊进行合成;dNTPs、TaqDNA 聚合酶等分子生物学试剂,均购于 TaKaRa 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取与检测 试验于 2014 年在江苏省农业科学院园艺研究所高效园艺作物遗传改良重点实验室进行,基因组 DNA 提取采用改良的 CTAB 法。采用 DYY-III-5 型稳压稳流电泳仪,缓冲液为 1.2% TAE,琼脂糖凝胶电泳检测,

收稿日期:2015-06-15

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划(编号:2012BAD02B01);江苏省科技支撑计划(编号:BE2013429);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(12)2006]。

作者简介:刘哲(1987—),男,山东曹县人,硕士,主要从事十字花科蔬菜遗传育种研究。E-mail:641509581@qq.com。

通信作者:苏小俊,博士,研究员,主要从事瓜类和十字花科蔬菜遗传育种研究。Tel:(025)84391259;E-mail:xiaojunsu@yahoo.com。

77.58%;白鹤芋植株再生转化最佳激素组合为 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IBA + 0.5 mg/L GA₃,植株再生率达 88.56%,6-BA 为植株再生转化的主要因素。

3.2 讨论

携带方便、价格便宜的小盆栽花卉颇受消费者的喜爱,市场的销售仍异常火爆^[2]。小盆栽花卉生产在不断扩大,而白鹤芋正是众多小盆栽花卉中最具发展前景的花卉之一。为提高白鹤芋的繁殖速度,直接诱导体细胞胚胎,短期内高速繁殖白鹤芋种苗,是种苗繁育的有效途径。外植体选择对体细胞胚胎的诱导至关重要^[3],外植体的生长状态和细胞分裂程度决定了体细胞胚胎诱导的难易程度^[4],白鹤芋以花丝^[5]和花序为外植体,其体胚的诱导较容易而且诱导率非常高,而以白鹤芋其他部位为外植体来诱导体胚的研究还未见报道。目前白鹤芋体细胞胚胎的研究中,花序细胞诱导发生部分还不是很清楚^[6],这有待进一步地深入研究。

参考文献:

- [1]于丽萍.花叶俱美的室内植物——白掌[J].绿化与生活,2002(2):28.
- [2]郭金凤.小盆栽产销两旺持续向好[N].中国花卉报,2007-10-18(3).
- [3]李一星,石晓峰,王建云,等.紫云英体细胞胚再生体系的建立[J].现代农业科技,2014(2):244-245.
- [4]Maheswaran G, Williams E G. Clonal propagation of *Trifolium pratense*, *T. resupinatum* and *T. subterraneum* by direct somatic embryo-genesis on cultured immature embryos[J]. Plant Cell Report, 1986, 5(3):165-168.
- [5]秦静远.白鹤芋花丝体细胞胚的诱导及快繁技术[J].中国农学通报,2005,21(9):67-69.
- [6]曹静,周丽依,邝哲师,等.白鹤芋花序体细胞胚胎发生及植株再生的研究[J].农业生物技术学报,1995,3(3):81-83.