

娄丽娜,戴 澈,刘根新,等. 萝卜花序轴再生体系的建立[J]. 江苏农业科学,2017,45(21):42-44.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.011

萝卜花序轴再生体系的建立

娄丽娜¹,戴 澈²,刘根新²,乔俊楠¹,季延娣¹,苏小俊¹

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室,江苏南京 210014;
2. 江苏省泰兴市新街镇农业服务中心,江苏泰兴 225474)

摘要:以萝卜雄性不育系的幼嫩花序轴为外植体进行组织培养,可成功诱导出苗。将幼嫩花序轴接种到不同激素配比的愈伤组织诱导培养基上,其中在 MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.6 mg/L 培养基培养效果最好,诱导率高达 92.31%;用 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基诱导成苗,获得 1 株再生苗,成苗率为 3.33%;用 MS + NAA 1.0 mg/L 培养基成功对幼嫩花序轴进行生根培养,并被驯化移栽成活。
关键词:萝卜;花序轴;组织培养;雄性不育系;激素;外植体;诱导率;成苗率;驯化
中图分类号: S631.104⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)21-0042-02

萝卜为异花授粉植物,在萝卜杂交育种中,自交不亲和及雄性不育性状,是杂交制种的 2 个重要应用。研究人员选出的不育系不能立即应用于配制杂种,对这样的材料,采用组织培养的方式进行保存和繁殖就成为必要手段之一。1980 年,祝仲纯等成功从萝卜的下胚轴中诱导植株^[1]。随后,国内外学者采用萝卜的外植体如带柄子叶、子叶、下胚轴、带芽茎段以及顶芽等进行培养,均取得了一定的成果^[2-8]。

然而,与大多数植物相比,萝卜的再生能力较弱,不易通过愈伤组织途径形成再生植株^[9]。在萝卜中,通常是通过种子萌发获得无菌外植体,直接诱导产生不定芽,再分化成完整的植株。在实际的生产实践中,当发现某个材料是雄性不育材料时,往往已经是生殖生长期,无法通过种子途径对材料进行保存,也无法通过其营养体阶段的顶芽进行组织培养保存,根据吴丽艳等的研究,采用花序轴组培快繁青菜萝卜胞质雄性不育系,获得了成功^[10],但在萝卜上能否成功,鲜见报道。本试验利用萝卜雄性不育材料的花序轴为外植体,系统研究其诱导、分化、生根和移栽等步骤,从而建立一套萝卜花序轴组培快繁的技术体系,为萝卜育种材料的保存、繁殖提供参考,为特殊材料的研究和利用奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料

江苏省农业科学院蔬菜研究所提供的萝卜雄性不育材料 R3-654。

1.2 培养基与培养条件

本试验所用的诱导培养基、不定芽分化培养基以及生根

培养基都是在 MS 基本培养基的基础上,添加植物激素组成的,具体配比如表 1 所示。培养基的蔗糖浓度均是 20 g/L,并添加琼脂 0.7%,pH 值为 5.8。接种后置于 25 ℃ 下,光照度为 2 500 lx,光照时间为 12 h/d。

表 1 试验所用培养基的成分

培养基类型	培养基序号	激素浓度 (mg/L)	
		6-BA	NAA
诱导培养基	(1)	3.0	0.4
	(2)	3.0	0.6
	(3)	4.0	0.4
	(4)	4.0	0.6
	(5)	0	0
不定芽分化培养基	(6)	1.0	0.5
	(7)	1.0	0.1
	(8)	0.5	0.1
	(9)	0.5	0.5
生根培养基	(10)	0	1.0

1.3 试验方法

1.3.1 外植体消毒处理 从供试材料植株上取幼嫩花序轴,用洗涤剂洗涤后,自来水流动冲洗 30 min,用 70% 乙醇浸泡 40 s,再放入 10% 次氯酸钠中消毒 5~10 min,在超净工作台上用无菌水冲洗 3~4 次,最后一次浸泡 3~5 min,用无菌滤纸吸干表面水分,将花序轴切成 0.5~1.0 cm 的小段待用^[11]。

1.3.2 诱导培养 经处理后的花序轴小段分别接种到(1)、(2)、(3)、(4)、(5)号培养基上,10 d 后观察愈伤组织情况,计算愈伤组织诱导率(%)。

1.3.3 分化培养 将愈伤组织转接到(6)、(7)、(8)、(9)号增殖培养基中继续培养,30 d 后统计出苗数,计算成苗率(%)。

1.3.4 组培苗的生根和移栽 通过继代增殖形成的无根苗长成 3~4 cm 高并带有 2~3 张幼叶时,转入(10)号生根培养基上培养诱导生根^[5]。20~25 d 后,将试管苗的瓶盖打开放到温室内过渡 2~3 d,取出试管苗,洗净根部附着的培养基,栽入到已灭菌的营养土中,放入拱棚后在上面覆盖塑料膜和遮阳

收稿日期:2016-09-20
基金项目:江苏省自然科学基金青年基金(编号:BK20130726);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(16)1012]。
作者简介:娄丽娜(1982—),女,河南濮阳人,博士,副研究员,主要从事蔬菜作物遗传育种研究。Tel:(025) 84391221;E-mail:linabeibei@163.com。
通信作者:苏小俊,博士,研究员,主要从事蔬菜作物遗传育种研究。Tel:(025)84391259;E-mail:xiaojunsu@yahoo.com。

网,每天揭膜若干小时,保持一定的温度(20~28℃)和湿度(85%~90%),10 d 后移栽到大田,20 d 后考察成活情况。

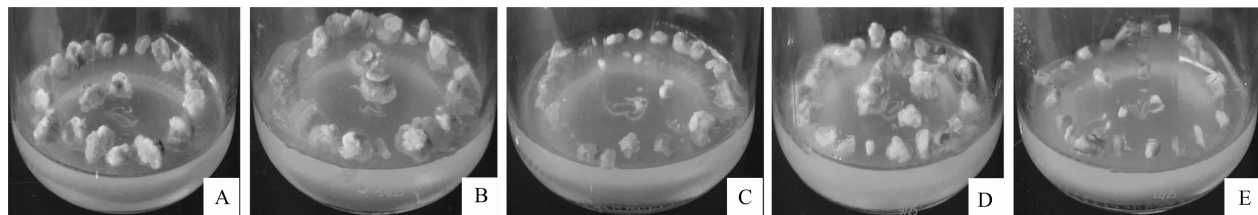
2 结果与分析

2.1 不同激素配比培养基对愈伤组织的诱导效果

在诱导培养基上培养 10 d 后发现,在(1)、(2)、(3)、(4)号诱导培养基中的花序轴小段的切口部位逐渐膨大,并产生淡绿色的愈伤组织。由图 1-A、图 1-B 可知,(1)、(2)号培养基中的愈伤组织与其他组织相比,愈伤组织较大且较多的外植体都产生了淡绿色的愈伤组织。诱导培养基(3)诱导效

果较差,只有少数的外植体膨大,多数外植体发生了褐变和白化现象(图 1-C);(4)号培养基的诱导效果一般,只有部分外植体膨大,产生绿色愈伤组织,部分外植体也出现了褐变现象(图 1-D);作为对照的(5)号诱导培养基,未添加激素,其外植体膨大较少,零星几个膨大,且愈伤组织较小(图 1-E)。

不同激素配比对愈伤组织的诱导率不同。由表 2 可知,(1)、(2)号培养基的诱导率较高,分别为 90.00%、92.31%;其次为(4)号培养基,诱导率为 45.45%;(3)号诱导培养基较差,诱导率仅为 16.67%;作为对照的(5)号培养基最差,诱导率仅为 7.27%。



A、B、C、D、E 分别表示在(1)、(2)、(3)、(4)、(5)号培养基中培养的诱导效果

图1 不同激素配比培养基对愈伤组织的诱导效果

表 2 不同激素配比培养基对愈伤组织的诱导效果

培养基序号	接种数(个)	诱导愈伤组织数(个)	诱导率(%)
(1)	50	45	90.00
(2)	52	48	92.31
(3)	60	10	16.67
(4)	66	30	45.45
(5)	55	4	7.27

2.2 不同激素配比培养基对成苗的诱导效果及生根培养

将诱导出的愈伤组织分别接种到(6)、(7)、(8)、(9)号

培养基上继续培养,7 d 后(7)号培养基上即开始出现绿色的芽点,并逐渐分化成小芽,逐渐发育为小植株(图 2-A)。有的在愈伤组织上,开始有绿色的组织生成,但直到 30 d 后,也未诱导成芽,进而也未发育成苗(图 2-B)。采用(10)号生根培养基对获得的无根苗进行生根诱导,产生了十几条根,较粗壮且平整(图 2-C)。证明武剑等采用的萝卜生根方法,可以有效地应用在本试验中^[5]。经过驯化和移栽,最终成功获得 R3-654 的再生植株。

由表 3 可看出,最终只在(7)号培养基上,获得 1 个植株,成苗率为 3.33%。

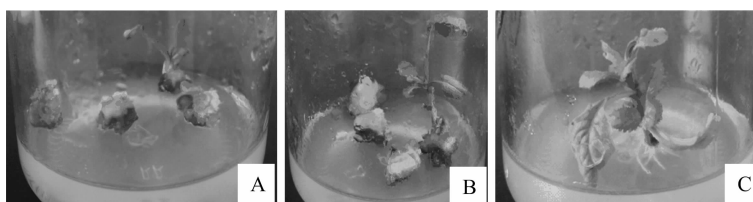


图2 成苗及生根培养

表 3 不同激素对比对成苗的影响

培养基序号	接种愈伤组织数(个)	成苗数(个)	成苗率(%)
(6)	30	0	0
(7)	30	1	3.33
(8)	30	0	0
(9)	30	0	0

3 讨论

在诱导愈伤组织的培养基上,(1)、(2)号培养基的 6-BA 的浓度均为 3.0 mg/L,而浓度为 0.6 mg/L NAA 比浓度为 0.4 mg/L 的诱导率稍高,但二者的诱导率相差不大,且诱导效果较好;对比(3)、(4)号培养基,6-BA 浓度相同,均为 4.0 mg/L,NAA 的浓度分别为 0.4、0.6 mg/L,但诱导率较低,(1)、(2)号培养基低,同样 NAA 的浓度为 0.6 mg/L 比 0.4 mg/L 的诱导率稍高。说明 6-BA 浓度为 3.0 mg/L,

NAA 浓度为 0.6 mg/L 的诱导培养基诱导愈伤组织效果最好,诱导率高达 92.31%。

设置 4 个分化培养基,但只在(7)号培养基上获得 1 株再生苗,说明萝卜的再生能力较弱,不易通过愈伤组织途径形成再生植株,这与熊秋芳等的结论^[9]一致。本试验的诱导成苗率太低,须要对分化培养基的激素种类和配比进行进一步的探索,同时在试验中要降低污染率、提高成苗效率。

采用了武剑等的方法^[5]对再生植株进行生根、驯化及移栽,获得萝卜 R3-654 的再生植株,证明 MS+NAA 1.0 mg/L 对萝卜无根苗的生根的效果很好,在苗数较少的情况下,可以保证再生苗的成活率。

本研究结果表明,虽然萝卜的再生能力较弱,通过愈伤组织途径形成再生植株较困难,但采用花序轴作为外植体对萝卜雄性不育株进行诱导愈伤组织,再生植株的方法是可行的。如果后续研究能提高愈伤组织再生苗的成活率,那么该方法就可被广泛应用于萝卜雄性不育系的种质保存和杂交育种

郭 敏,李祥龙. 不同物种 *TYR* 基因编码蛋白结构及功能的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(21):44-48.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.012

不同物种 *TYR* 基因编码蛋白结构及功能的生物信息学分析

郭 敏,李祥龙

(河北科技师范学院动物科技学院,河北秦皇岛 066004)

摘要:利用生物信息学方法对 13 个物种 *TYR* 基因编码蛋白的理化性质,以及一级、二级、三级结构和亚细胞定位进行预测和分析,同时拟构建 13 个物种 *TYR* 基因的系统发育树。结果表明:*TYR* 基因编码产物为不稳定蛋白(貉子除外),整条多肽链表现出亲水性。二级结构主要为 α 螺旋、 β 折叠, β 转角区域分布少且散,均存在信号肽和跨膜区,可以判断 *TYR* 基因编码蛋白是定位于生物膜上的膜蛋白或分泌蛋白,主要在嘌呤和嘧啶、运输和结合、电压门控离子通道及转录中发挥作用。各物种 *TYR* 基因编码产物主要定位于内质网、高尔基体以及细胞质膜。除原鸡外,其他物种该蛋白均存在跨膜区,貉子有 2 个跨膜区域。各物种系统发育树与动物学进化观点基本一致。

关键词:物种;酪氨酸酶基因;毛色;蛋白质结构;生物信息学

中图分类号: Q754 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)21-0044-05

动物的毛色、羽色不但可以作为质量性状,也可作为一种经济性状被利用。目前,绿色、环保、优质的毛皮产品已成为广大消费者追求的目标。毛色表型主要受黑色素的影响,是黑色素在毛皮质和髓质中沉淀的种类和数量不同造成的。研究表明,动物毛色的形成主要与黑色素细胞中合成的 2 种色素(真黑色素、褐黑色素)比例有关。真黑色素通常可使皮肤或毛皮表现为褐色、黑色,褐黑色素能使皮肤或毛皮表现为黄

色、红棕色^[1],黑色素沉淀取决于这 2 种色素的相对含量。对于动物黑色素细胞而言,酪氨酸酶(tyrosinase,简称 TYR)作为关键酶参与黑色素的合成^[2],具有加氧酶、脱氢酶双重功能^[3],动物黑色素的形成主要遵循多巴(DOPA)途径,指在动物体内,酪氨酸在 TYR 的催化作用下,经由 DOPA、多巴醌、吲哚醌等形式,最后生成黑色素。酪氨酸酶相关蛋白酶 1(TYRP1)、酪氨酸酶相关蛋白酶 2(TYRP2)与酪氨酸酶(TYR)构成了酪氨酸酶基因家族,TYRP1、TYRP2 各自催化特异的反应参与黑色素的合成,这 3 种成员协同调控黑色素的形成^[4],并且与其他毛色相关基因共同作用调控毛色的形成。引起黑色素代谢紊乱的主要原因是 *TYR* 基因突变或酶的失活,最终将导致机体组织异常表达^[5]。有研究表明,哺乳动物 *TYR* 基因包含 5 个外显子和 4 个内含子,序列长度约为 1.6 kb^[6]。本研究选用 GenBank 中已提交物种的 *TYR* 基因编码蛋白序列,利用生物信息学方法对 *TYR* 基因编码蛋白的结构与功能进行预测和分析,以期研究 *TYR* 基因及其编码

收稿日期:2016-06-01

基金项目:河北省高校创新团队领军人才培养计划(编号:LJRC004);河北省应用基础研究计划重点基础研究项目(编号:15962901D);河北省自然科学基金重点项目(编号:C2016407114)。

作者简介:郭 敏(1991—),女,内蒙古呼和浩特人,硕士研究生,研究方向为功能基因组学。E-mail:1908384796@qq.com。

通信作者:李祥龙,博士,教授,博士生导师,研究方向为动物遗传育种。E-mail:lixianlongen@yahoo.com。

中,具有很好的理论研究和实际应用价值。

参考文献:

- [1]祝仲纯,吴海珊. 从萝卜的下胚轴诱导植株成功[J]. 遗传,1980,2(3):36.
- [2]崔群香,汪隆植,娄 平,等. 从萝卜下胚轴再生完整植株[J]. 南京农专学报,1999,15(4):29-36.
- [3]Jeong W J, Min S R, Liu J R. Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue culture of radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. Plant Cell Reports,1995,14(10):648-651.
- [4]Pua E C, Sim G E, Chi G L, et al. Synergistic effect of ethylene inhibitors and putrescine on shoot regeneration from hypocotyl explants of Chinese radish (*Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus* Bailey) in vitro [J]. Plant Cell Reports,1996,15(9):685-690.
- [5]武 剑,龚义勤,邓 波,等. 萝卜雄性不育组织培养的研究[J]. 贵州农业科学,2003,31(5):8-11.
- [6]武 剑,龚义勤,邓 波,等. 萝卜离体再生的影响因素[J]. 中国蔬菜,2003(6):6-8.
- [7]李海萍,张鲁刚,张 静,等. 萝卜带柄子叶高频再生体系的建立[J]. 植物学报,2011,46(3):331-337.
- [8]毛倩卓. 侵染萝卜的 dsRNA 病毒研究——带病毒萝卜的组织培养、细胞和分子生物学研究[D]. 杭州:浙江理工大学,2011:12-15.
- [9]熊秋芳,张雪清,骆海波,等. 萝卜组织培养的研究与应用[J]. 长江蔬菜,2006(5):36-38.
- [10]吴丽艳,柏柯帆,李石开,等. 利用花序轴组培快繁青花菜萝卜胞质雄性不育系的研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学版),2009,24(5):712-716.
- [11]赖正峰,林加耕,李华东,等. 日本高秆青花菜组织培养初探(简报)[J]. 亚热带植物科学,2005,34(1):64.