

马铃薯晋薯 16 号愈伤组织再生体系的建立

牛瑜琦^{1,2} 孙 蕾² 梅 超² 王慧杰² 宋倩娜² 冯瑞云²

(¹ 山西大学生物工程学院, 太原 030006; ² 山西农业大学农学院, 太原 030031)

摘要:为建立马铃薯品种晋薯 16 号组织再生体系,以晋薯 16 号无菌苗为材料,对外植体类型、外植体表面消毒试剂浓度和根的诱导条件进行筛选,同时优化了愈伤组织诱导和分化的最佳植物激素组合及浓度。结果表明:愈伤组织诱导的最佳外植体为茎段;2% 的次氯酸钠消毒效果较好;根的诱导使用含 50g/L 蔗糖的 MS 培养基较好;愈伤组织诱导培养基以 MS+6-BA 1.5mg/L+NAA 0.5mg/L 为佳;愈伤组织分化培养基以 MS+6-BA 1.5mg/L+GA₃ 2.0mg/L+ZT 1.0mg/L 为佳。

关键词:马铃薯;晋薯 16 号;愈伤组织;再生体系

山西是我国马铃薯的主产区之一,种植区域主要分布在山西北部、西北部的丘陵和山地,商品薯产量高,品质优良。由于种植地区多为贫困地区,在精准扶贫力度持续增加的背景下,贫困适种地区的马铃薯种植面积呈增加态势,马铃薯产业已逐步成为当地红色支柱产业^[1-2]。近年来,随着人民生活水平提高,对马铃薯品质的要求也相应提高,科技人员在马铃薯的品质、产量、抗病性及分子育种方面均取得较大进展^[3]。

晋薯 16 号是山西省农业科学院高寒区作物研究所在 2006 年审定的马铃薯品种,产量高达 2088kg/667m²,抗病性强,在山西北部、内蒙古乌蒙、河北张家口地区推广种植,2009-2011 年累计种植 4 万 hm²,推广前景良好^[4-6]。在推广过程中,发现晋薯 16 号中抗 PVX 和 PVY,重感 B5-1 晚疫病生理小种,为避免产量降低、抗性退化等问题产生,需对品种进一步改良,筛选并导入具有相关抗性如抗 PVX、PVY 病毒基因、抗晚疫病基因等优良基因,打破种间隔离的限制,提高品种抗生物与非生物胁迫的能力,改良品种农艺性状^[7-8]。朱英等^[9]研究表明,高效、稳定的遗传转化系统是转基因马铃薯育种获得突变植株的前提。虽然针对马铃薯遗传转化研究起步较早,但由于不同品种基因型的差异^[10-11],遗传转化体系也不尽相同,因此需要建立

适合晋薯 16 号的遗传转化愈伤组织再生体系。

本研究通过对马铃薯外植体选择、外植体表面消毒试剂浓度选择、根的诱导条件、最佳愈伤组织诱导和分化的植物激素组合及浓度进行研究,初步建立了马铃薯晋薯 16 号再生体系,以期马铃薯遗传转化、品种优化提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 本研究试验材料为马铃薯晋薯 16 号的无菌脱毒苗,由山西农业大学农学院马铃薯分子育种实验室提供。

1.1.2 生化试剂 激素(6-BA、NAA、GA₃等)及 MS 培养基等其他常用的生化试剂购自上海生工生物工程公司。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗繁殖培养基及培养条件 MS 培养基干粉 40g,加蒸馏水定容至 1L,搅拌加热至完全溶解,使用 1mol/L NaOH 调整 pH 值至 5.8~6.0,121℃ 高压灭菌 20min 后冷却备用。

在马铃薯分子实验室培养间进行无菌苗繁殖培养,培养温度 25℃,光周期为光 16h/暗 8h,光照强度 2000~2500lx。白天采用日光灯带与红蓝光灯带同时补光。

1.2.2 外植体表面消毒 取生长 4 周的晋薯 16 号无腋芽脱毒苗茎段,用以下方法进行消毒:75% 的酒精浸泡 30s,1.5%、2% 和 2.5% 的次氯酸钠依次浸泡 60s,无菌水清洗 3 遍后用滤纸吸干外植体表面液体,置于 MS 基础培养基中培养,每皿 20 个茎

基金项目:山西省农业科学院应用基础研究计划(YGC2019FZ1, 2019-2021);山西省现代农业产业技术体系建设专项资金(2020-04)

通信作者:冯瑞云

段,共3皿,5d后统计污染数量。

1.2.3 愈伤组织诱导培养基(CIM)及培养条件 MS培养基加不同浓度组合的NAA(萘乙酸)、6-BA(6-苄氨基腺嘌呤)和TMT(特美汀)。NAA设置3个浓度,分别为0.3mg/L、0.5mg/L和1.0mg/L;6-BA设置3个浓度,分别为1.0mg/L、1.5mg/L和2.5mg/L;TMT为200mg/L。培养条件和无菌苗繁殖培养相同。

1.2.4 愈伤组织分化培养基(CDM)及培养条件 MS培养基加不同浓度组合的6-BA、GA₃(赤霉素)、ZT(玉米素)和TMT。6-BA设置3个浓度,分别为1.0mg/L、1.5mg/L和2.5mg/L;GA₃设置5个浓度,分别为0.5mg/L、1.0mg/L、1.5mg/L、2.0mg/L和2.5mg/L;ZT为1.0mg/L;TMT为200mg/L。培养条件和无菌苗繁殖培养相同。

1.2.5 不同外植体的筛选 选择健壮晋薯16号无菌苗,培养基使用激素配比为NAA 0.1mg/L+6-BA 1.0mg/L+TMT 200mg/L的CIM培养基,在马铃薯分子实验室培养间进行愈伤组织诱导,10d后转入激素配比为ZT 1.0mg/L+GA₃ 1.0mg/L+TMT 200mg/L的CDM培养基,每10d更换CDM培养基,随时观察分化情况。培养温度25℃,光周期为光16h/暗8h,光照强度2000~2500lx。

采取不同外植体培养:(1)茎段:取1cm长无腋芽茎段,置于CIM培养基上;(2)叶片:取边长约0.5cm并留部分叶柄的叶片,置于CIM培养基上。

1.2.6 根的诱导 选用1cm左右带腋芽的茎段,分别接入含有30g/L、50g/L和70g/L蔗糖的MS培养基内诱导不定根。每皿20个茎段,每个浓度3皿,分3个重复,培养温度25℃,光周期为光16h/暗8h,光照强度2000~2500lx,随时观察不同培养基上根的生长情况,30d后统计结果。

1.3 数据统计及分析 愈伤组织诱导率、芽分化率、根分化率的计算方法见以下公式。试验数据统计和分析使用Microsoft Excel和SPSS 18完成。

愈伤组织诱导率 = 出现愈伤外植体数 / 外植体总数 × 100%

芽分化率 = 分化出不定芽的外植体数 / 外植体总数 × 100%

根分化率 = 出现不定根的外植体数 / 外植体总数 × 100%

污染率 = 污染的外植体数 / 外植体总数 × 100%

2 结果与分析

2.1 外植体的筛选 理论上任何外植体在合适的条件下均可脱分化形成愈伤组织,但在实践中,外植体不同,愈伤组织诱导及不定芽分化的效果不同。试验选取晋薯16号无菌苗健壮的叶片及无腋芽茎段为外植体,进行愈伤组织和不定芽的诱导。结果表明,愈伤组织诱导阶段,茎段产生较多的愈伤组织,颜色淡绿色,质地紧密;不定芽诱导阶段,茎段产生不定芽比叶片速度快且数量多。茎段和叶片的愈伤组织诱导率分别为60%和25%,因此茎段可作为最佳外植体。

2.2 不同浓度次氯酸钠消毒效果 消毒的原则是杀死材料上附着的微生物又不伤害外植体的活细胞。试验使用3种浓度次氯酸钠对外植体表面进行消毒,结果表明,1.5%次氯酸钠不能有效杀灭外植体上的微生物,外植体颜色淡绿,但污染率20%~30%;2%次氯酸钠可杀灭多数微生物,外植体两端有轻微变白现象,并不影响后期愈伤组织诱导及分化;2.5%次氯酸钠可有效杀菌,但因浓度高,外植体细胞受损严重,外植体两端出现白化死亡现象。因此可选择使用2%的次氯酸钠对晋薯16号茎段外部消毒。

2.3 不同激素及浓度组合对愈伤组织诱导率及质量的影响 愈伤组织指在无菌条件下将外植体某一部分置于适宜的培养环境中,加入浓度配比适合的植物激素,经诱导期、分裂期及形成期3个阶段形成的一团不定型组织(由薄壁细胞组成)。因此愈伤组织的诱导率及诱导质量主要受培养条件、植物激素的组合及浓度配比的影响。

晋薯16号茎段接种到含NAA和6-BA的愈伤组织诱导培养基上培养3d左右,茎段两端切口处开始膨大,5d左右出现愈伤组织,愈伤诱导率达70%以上。愈伤组织诱导率及愈伤组织形成质量因2种激素配比浓度不同出现差异。

由表1可知,愈伤组织质量及诱导率受NAA和6-BA影响,6-BA 1.5mg/L+NAA 0.5mg/L、6-BA 1.5mg/L+NAA 1.0mg/L、6-BA 2.5mg/L+NAA 1.0mg/L这3组诱导培养基中,愈伤组织生长旺盛,质地紧密有光泽,愈伤组织量多且颜色呈黄绿色,茎段无白色不定根出现,诱导率可达87%以上。CIM5愈伤组织边缘无褐变,后期在组织分化培养中表现也较好,

CIM7 和 CIM8 愈伤组织后期褐变严重,所以 CIM5 为愈伤诱导最佳培养基。培养 10d 后观察,由于培养基中水分、养分的损耗及代谢时有毒物质的积累,愈伤

组织块生长速度渐缓,两端出现较轻的褐化现象,此时需及时转移到 CDM 培养基中,否则褐化现象将加剧直至茎段死亡。

表 1 MS 添加不同浓度 NAA、6-BA 对晋薯 16 号愈伤组织的影响

培养基	激素 (mg/L)		接种总数	诱导率 (%)	愈伤组织质量
	6-BA	NAA			
CIM1	1.0	0.3	60	80	愈伤组织表面有乳白色颗粒,有些茎段有白色不定根出现,愈伤组织量较多且颜色为黄绿色,部分组织边缘褐变
CIM2	1.5	0.3	60	83	愈伤组织表面有乳白色颗粒,部分茎段有白色不定根出现,愈伤组织量较多且颜色为黄绿色,部分组织边缘褐变
CIM3	2.5	0.3	60	70	愈伤组织表面有乳白色颗粒,部分茎段有白色不定根出现,愈伤组织量较少且颜色为黄绿色,部分组织边缘褐变
CIM4	1.0	0.5	60	85	愈伤组织表面有乳白色颗粒,较少的茎段有白色不定根出现,愈伤组织量较多且颜色为黄绿色,部分组织边缘几乎无褐变
CIM5	1.5	0.5	60	88	愈伤组织表面有乳白色颗粒,茎段无白色不定根出现,愈伤组织量较多且颜色为黄绿色,部分组织边缘无褐变
CIM6	2.5	0.5	60	73	愈伤组织表面有乳白色颗粒,部分茎段有白色不定根出现,愈伤组织量较少且颜色为黄绿色,部分组织边缘褐变
CIM7	1.5	1.0	60	87	愈伤组织表面有乳白色颗粒,茎段无白色不定根出现,愈伤组织量较多且颜色为黄绿色,组织边缘无褐变
CIM8	2.5	1.0	60	90	愈伤组织表面有乳白色颗粒,茎段无白色不定根出现,愈伤组织量较多且颜色为黄绿色,组织边缘无褐变

2.4 不同激素及浓度组合对愈伤组织分化率影响

由表 2 可知,激素 6-BA、GA₃ 和 ZT 的组合有利于晋薯 16 号不定芽的产生,组合 6-BA 2.5mg/L+GA₃ 1.5mg/L+ZT 1.0mg/L、6-BA 1.0mg/L+GA₃ 1.0mg/L+ZT 1.0mg/L 和 6-BA 1.5mg/L+GA₃ 2.0mg/L+ZT 1.0mg/L 芽分化率普遍比较高,可达 23% 以上,CDM5 的芽分化率最高,达 32.6%,分化速度较快,两周左右可

以观察到较多丛生芽。随着 GA₃ 浓度提高褐化率也提高,添加 ZT 对褐化情况有一定抑制作用,愈伤组织量多且质地紧密,分化的速度快。本组实验中培育出的丛生芽质量好、数量多、容易扩繁,扩繁后的试管苗也比较健壮,说明反式玉米素核苷对马铃薯愈伤组织诱导丛生芽有促进作用。

表 2 MS 添加不同激素组合及浓度对晋薯 16 号愈伤组织分化的影响

培养基	激素 (mg/L)			接种总数	芽分化率 (%)
	6-BA	GA ₃	ZT		
CDM1	1.0	0.5	1.0	60	10.3
CDM2	1.5	1.0	1.0	60	13.6
CDM3	2.5	1.5	1.0	60	23.4
CDM4	1.0	1.0	1.0	60	30.6
CDM5	1.5	2.0	1.0	60	32.6
CDM6	2.5	2.5	1.0	60	15.8

2.5 蔗糖对晋薯 16 号生根的影响 使用马铃薯晋薯 16 号带腋芽的茎段为外植体,在添加了 30g/L、50g/L 和 70g/L 蔗糖的根诱导培养基上培育 5~6 周后,观察生根情况。由图 1 可知,随着蔗糖浓度的增

加,生根率呈先增加后降低的趋势;蔗糖浓度为 50g/L 时,生根率最高,为 81.3%;蔗糖浓度继续增加,生根率下降。因此,蔗糖浓度为 50g/L 为晋薯 16 号生根最适宜的浓度。

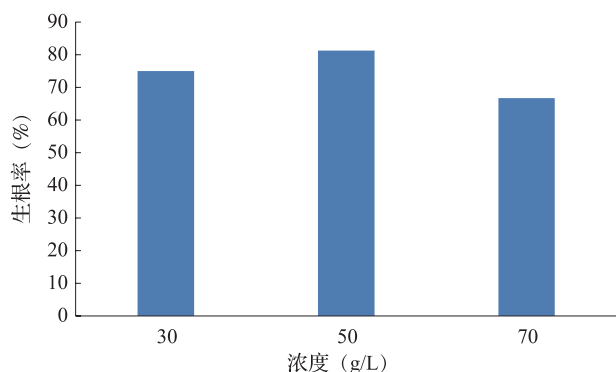


图1 蔗糖浓度对晋薯16号根诱导的影响

3 讨论与结论

在马铃薯再生体系外植体的选择上,马铃薯茎段、叶片及茎尖通过组织诱导及分化形成再生植株的再生率较高^[6,12],被认为是经过诱导得到再生植株很好的材料。不同基因型外植体对不同的诱导剂敏感程度不同,对于马铃薯来说,常用的生长素是NAA和2,4-D,细胞分裂素是6-BA,基础培养基为MS^[13-15]。

本试验以马铃薯品种晋薯16号为外植体,建立了无菌外植体通过愈伤组织诱导及分化途径的植物离体组织培养体系。愈伤组织诱导通过激素6-BA和NAA的组合产生,诱导愈伤组织分化丛生芽通过激素6-BA、GA₃和ZT的组合产生,得出晋薯16号外植体茎段使用浓度为2%的次氯酸钠消毒效果较好,愈伤诱导外植体选择茎段较好,晋薯16号愈伤组织诱导培养基以MS+6-BA 1.5mg/L+NAA 0.5mg/L为佳,愈伤组织分化培养基以组合MS+6-BA 1.5mg/L+GA₃ 2.0mg/L+ZT 1.0mg/L为佳,根的诱导使用50g/L蔗糖。

本研究对山西主要种植品种晋薯16号高效再生体系进行了建立优化,为后续农杆菌介导的愈伤转化体系的创建提供重要的基础和指导,对晋薯16号的品种改良具有重要意义。

参考文献

- [1] 王笑,任路路,白鹏,延晓倩. 山西省脱毒马铃薯种薯产业发展现状、优势、存在的问题和建议. 中国种业, 2019 (10): 22-24
- [2] 冯铸. 山西马铃薯发展现状、问题及对策. 农业科技通讯, 2018 (6): 10-13
- [3] 耿淑娟. 晋北地区主栽马铃薯品种比较及配方施肥研究. 太原: 山西农业大学, 2019

- [4] 姜超. 马铃薯新品种晋薯16号选育与推广. 太原: 山西农业大学, 2014
- [5] 鲁喜荣,王玉春,王娟. 晋薯16号马铃薯高产高效栽培技术. 中国马铃薯, 2010, 24 (5): 296-297
- [6] 王玉春,王娟,陈云,张翔宇. 马铃薯新品种晋薯16号选育. 中国马铃薯, 2008 (3): 191
- [7] 苗耿志,王笑,张东红,刘政斌,胡明彦. 岚县王狮乡石桥村马铃薯产业发展调查研究. 中国种业, 2020 (1): 34-35
- [8] 戴朝曦. 基因工程技术在马铃薯遗传育种研究中的应用. 生物技术通报, 1992 (9): 1-3
- [9] 朱英,刘永翔,黄永会,邱初,刘作易. 根癌农杆菌介导转化马铃薯研究. 种子, 2013, 32 (8): 42-44
- [10] Tang L, Tang H, Kwak S S, Lee H S, Wang S Y, Yang X L. Improving potato plants oxidative stress and salt tolerance by gene transfer both of Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase. China Biotechnology, 2008, 28 (3): 25-31
- [11] 吴青,姚新灵. 马铃薯茎段再生及成苗技术. 天津农业科学, 2010, 16 (2): 39-43
- [12] 彭昕琴,胡家金,霍妙娟. 马铃薯品种“大西洋”高效再生体系的建立. 湖南农业科学, 2008 (2): 26-28
- [13] 李娟,程智慧,张国裕. 马铃薯叶片高效再生体系的建立. 西北植物学报, 2004, 24 (4): 610-614
- [14] 杨春. 生长素和细胞分裂素在马铃薯愈伤组织分化中的作用. 山西农业科学, 2008, 36 (7): 40-42
- [15] 侯丁一,张之为,田再民,康立茹,赵君. 马铃薯不同品种块茎再生体系的建立和优化. 中国农学通报, 2018, 34 (16): 22-28

(修回日期: 2020-12-09)

书讯

《漫话农作物》总论了四大类型农作物(粮食作物、经济作物、饲料作物和绿肥作物),分述了41种农作物,重点从每种作物的起源分布、特征特性和经济价值三方面内容进行介绍,并配有相关图片以便于读者对照识别。此外,根据每种农作物的特色赋诗一首,并由专业人员朗诵,扫描二维码即可欣赏声情并茂的配乐诗朗诵,增加了本书的可读性和趣味性。适合广大农业科学技术人员阅读参考和对照学习,特别是对不同农作物辨别不清晰的读者,可以作为随身携带的参考读物。

本书是由中国农科院作物科学研究所赵广才研究员和王艳杰博士主编,中国农业科学技术出版社出版(书号113421)。定价39元,现特价优惠29.9元,欢迎订购。

联系人: 逯锐老师

电话: 010-82105795 15510281796

邮箱: 274483337@qq.com