

蒲秀琴. 3 种青海省主栽马铃薯外植体的组织培养和植株再生[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 52–54.

3 种青海省主栽马铃薯外植体的组织培养和植株再生

蒲秀琴

(青海省农林科学院生物技术研究所/教育部青藏高原生物技术重点实验室, 青海西宁 810016)

摘要:以青薯 2 号、青薯 9 号、费乌瑞它等 3 个马铃薯品种的幼芽带节茎段为试验材料, 以不同的氯化汞浓度和不同处理时间为试验条件, 研究在 6 种培养基中马铃薯愈伤组织诱导和再生的最佳处理方案。试验中观察到马铃薯的分化率在不同外植体间的差异较大, 愈伤组织分化率为 16.89% ~ 28.22%, 其中青薯 9 号的分化率最高。

关键词:马铃薯; 外植体处理; 组织培养; 青海省; 植株再生

中图分类号: S532.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0052-02

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.) 属茄科茄属植物, 起源于南美洲安第斯山脉一带, 是世界上仅次于水稻、小麦、玉米的第 4 大作物, 兼有粮菜的特性, 世界年产量达 3 亿 t。国际马铃薯中心(CIP)的研究表明, 世界范围内对马铃薯的需求量到 2020 年将有望增长 20%, 超过水稻、小麦、玉米的增长, 届时发展中国家对马铃薯的需求量将是 2000 年的 2 倍^[1]。由于马铃薯是无性繁殖作物, 依靠薯块维持品种的特性, 并且正是这种特性导致病毒的积累, 因此在培育脱毒马铃薯品种时首先要通过外植体的组培来繁殖脱毒苗。此外, 一些珍贵的马铃薯品种在继代培养时由于各种原因容易被污染, 其中较轻微的污染也可以通过外植体组培来挽救。近几年来, 虽然中外研究人员在马铃薯离体培养及试管苗生根研究方面取得了一定的进展, 但是初接种污染率高、外植体分化较难、离体培养物褐化退化现象严重、增殖系数低等问题一直未能得到很好的解决^[1-5]。本试验以青海省主栽马铃薯品种的当年生带腋芽茎段为材料, 研究了从初培继代增殖到生根各阶段的培养基成分及培养条件, 试图建立一套较完整的马铃薯无菌培养体系, 以期对青海省主栽马铃薯品种的组培工作提供参考^[6-9]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

外植体的采集工作在腋芽萌动到枝条停止生长期均可进行, 采集时间一般以本地 6 月初到 7 月初为宜, 取材不宜过晚, 否则植株在大田中容易染病, 不利于外植体消毒。本试验中的外植体材料取自青海省农林科学院生物技术研究所的试验田, 供试品种为青薯 2 号、青薯 9 号、费乌瑞它。具体的取材时间在晴天中午, 因为此时的枝条暴露在强烈阳光下, 有利于杀菌。选取当年生半木质化的新梢, 特别注意枝上应有饱满的芽; 去掉顶部的嫩枝及枝上的叶片, 因为叶片一方面占据了很大空间, 另一方面容易携带病菌。将枝条剪成 3~4 cm 带芽的茎段后, 先用洗洁精水漂洗 10 min 左右, 再用自来水

冲洗至洗洁精基本清除, 然后泡在无菌水中备用。

1.2 试验方法

在超净工作台上, 先将外植体用 70% 乙醇处理 20 s, 然后分别用浓度为 0.05%、0.075%、0.10% 的氯化汞浸泡 4、6、8 min, 并在小型摇床上摇晃, 使得氯化汞与外植体充分接触浸泡, 最后用无菌水清洗 4~5 次并剪掉一小截茎段下部, 以避免氯化汞渗入而影响营养吸收。试验用基本培养基为 MS 培养基。将处理好的外植体分别接种于 MS 基本培养基中培养 18 d, 观察灭菌效果并统计, 将成活的茎段转接到 6 种添加了不同植物激素的 MS 诱导培养基上。诱导培养基的配方分别为: MS + 3 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA; MS + 4 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA; MS + 2.25 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA; MS + 1 mg/L 6-BA + 1 mg/L ZT + 0.5 mg/L IAA; MS + 1.75 mg/L ZT + 1 mg/L IAA; MS + 2 mg/L ZT + 1 mg/L IAA。

在光照强度 2 000 lx、光照时间 16 h、培养温度 25 ℃ 的条件下培养, 将诱导产生的愈伤组织转接到配方为 MS + 0.3 mg/L GA₃ 的分化培养基中, 分别调查愈伤组织的产生情况与芽分化情况。

1.3 数据统计

本研究中相关数据统计的公式为:

无菌率 = 无菌外植体数/接种外植体数 × 100%;

褐化率 = 褐化外植体数/接种外植体数 × 100%;

愈伤诱导率 = 产生愈伤的外植体数/接种外植体数 × 100%;

芽分化率 = 分化芽的愈伤块数/总愈伤块数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 外植体处理

外植体无菌体系的建立对于整个试验过程是非常重要的, 将青海省主栽的 3 个基因型马铃薯外植体茎段进行 9 种处理。由表 1、表 2、表 3 可知, 外植体青薯 2 号用 70% 乙醇处理 30 s、0.100% 的氯化汞处理 8 min 的灭菌效果最佳; 外植体青薯 9 号茎段用 70% 乙醇处理 30 s、0.100% 氯化汞处理 5 min 的灭菌效果最佳; 外植体费乌瑞它茎段用 70% 乙醇处理 30 s、0.125% 氯化汞处理 8 min 的灭菌效果最佳。其中青薯 9 号的灭菌效果最好, 无菌率最高的达到了 81.3%, 0.100% 氯化汞处理 5 min 的褐化率为 25.0%。在研究中发

收稿日期: 2013-08-21

作者简介: 蒲秀琴(1978—), 女, 青海乐都人, 助理研究员, 从事马铃薯脱毒及组培研究。Tel: (0971) 5310507; E-mail: qhpuxiuqin@163.com。

现,有些茎段在处理时即使出现褐化死亡,却仍然有真菌污染,说明在采样时带有真菌孢子,而氯化汞对真菌孢子的消毒效果不好。将消毒灭菌的马铃薯外植体接种到初培培养基上的结果表明,在茎段的腋芽处均能萌发出绿色不定芽,因而有足够的材料用于继代培养,初培试验比较成功。

表 1 不同浓度 HgCl₂ 处理对青薯 2 号马铃薯外植体灭菌效果的影响

HgCl ₂ 浓 度(%)	处理时间 (min)	接种数 (个)	无菌数 (个)	无菌率 (%)	褐化数 (个)	褐化率 (%)
0.075	5	16	7	43.8	3	18.8
	8	16	9	56.3	4	25.0
	10	16	11	68.8	4	25.0
0.100	5	16	10	62.5	5	31.3
	8	16	13	81.3	6	37.5
	10	16	12	75.0	6	37.5
0.125	5	16	8	50.0	4	25.0
	8	16	9	56.3	5	31.3
	10	16	11	68.8	6	37.5

表 2 不同浓度 HgCl₂ 处理对青薯 9 号马铃薯外植体灭菌效果的影响

HgCl ₂ 浓 度(%)	时间 (min)	接种数 (个)	无菌数 (个)	无菌率 (%)	褐化数 (个)	褐化率 (%)
0.075	5	16	8	50.0	3	18.8
	8	16	9	56.3	4	25.0
	10	16	11	68.8	4	25.0
0.100	5	16	13	81.3	4	25.0
	8	16	13	81.3	6	37.5
	10	16	13	81.3	7	43.8
0.125	5	16	9	56.3	4	25.0
	8	16	9	56.3	8	50.0
	10	16	11	68.8	9	56.3

表 4 青薯 2 号、青薯 9 号、费乌瑞它马铃薯茎段外植体在 6 种培养基中的愈伤组织诱导情况

培养基	青薯 2 号		青薯 9 号		费乌瑞它	
	接种数(个)	愈伤率(%)	接种数(个)	愈伤率(%)	接种数(个)	愈伤率(%)
MS + 3 mg/L 6 - BA + 0.01 mg/L NAA	46	91.30	35	94.29	40	87.50
MS + 4 mg/L 6 - BA + 0.01 mg/L NAA	52	86.54	56	91.07	48	93.75
MS + 2.25 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA	53	84.91	49	93.88	50	88.00
MS + 1 mg/L 6 - BA + 1 mg/L ZT + 0.5 mg/L IAA	50	90.00	55	92.73	52	92.31
MS + 1.75 mg/L ZT + 1 mg/L IAA	48	91.67	52	96.15	48	91.67
MS + 2 mg/L ZT + 1 mg/L IAA	51	96.08	52	96.15	49	100.00
均值	50	90.08	50	94.05	48	92.20

注:污染的外植体未计。

表 5 青薯 2 号、青薯 9 号、费乌瑞它马铃薯茎段外植体在分化培养基中的分化情况

重复	青薯 2 号		青薯 9 号		费乌瑞它	
	接种数(个)	分化率(%)	接种数(个)	分化率(%)	接种数(个)	分化率(%)
1	40	16.50	30	26.67	36	25.00
2	48	21.25	50	32.00	40	22.50
3	43	16.78	46	26.09	44	22.73
4	48	17.50	52	32.31	50	28.00
5	45	13.33	50	30.00	40	15.00
6	50	16.00	45	22.22	41	21.95
均值	45	16.89	40	28.22	42	22.53

3 小结与讨论

马铃薯的初代培养是组织培养中最关键的一步。马铃薯枝条长期暴露在田间,容易孳生各种各样的细菌,有的细菌甚

表 3 不同浓度 HgCl₂ 处理对费乌瑞它马铃薯外植体灭菌效果的影响

HgCl ₂ 浓 度(%)	处理时间 (min)	接种数 (个)	无菌数 (个)	无菌率 (%)	褐化数 (个)	褐化率 (%)
0.075	5	16	6	50.0	3	18.8
	8	16	9	56.3	4	25.0
	10	16	10	62.5	5	31.3
0.100	5	16	9	56.3	5	31.3
	8	16	10	62.5	6	37.5
	10	16	10	62.5	6	37.5
0.125	5	16	9	56.3	4	25.0
	8	16	11	68.8	6	37.5
	10	16	11	68.8	7	43.8

2.2 愈伤组织的诱导

在 6 种培养基中诱导 3 种基因型马铃薯的愈伤组织,表 4 结果表明:青薯 9 号的平均愈伤诱导率最高,达到 94.05%;其次为费乌瑞它。表明如果用作转基因操作中的转化受体,青薯 9 号的效果最佳。从培养基对诱导率的影响看,MS + 3 mg/L 6 - BA + 0.01 mg/L NAA、MS + 1.75 mg/L ZT + 1 mg/L IAA、MS + 2 mg/L ZT + 1 mg/L IAA 对青薯 2 号、青薯 9 号的效果较好;MS + 4 mg/L 6 - BA + 0.01 mg/L NAA、MS + 2 mg/L ZT + 1 mg/L IAA 对费乌瑞它的效果较好;MS + 2.25 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA 的总体效果一般。

2.3 不同愈伤组织的分化

由表 4、表 5 的结果可以看出:与愈伤组织诱导率的顺序一致,芽分化率大小表现为青薯 9 号最高,平均为 28.22%;其后依次为费乌瑞它、青薯 2 号,与青薯 9 号的差异分别达到 5.69、11.33 百分点,说明不同基因型的马铃薯作为受体时需要选择转化率高的。

至能长入组织内部,因此外植体即使经过细致的表面灭菌,仍然会发生污染。此外,马铃薯富含酚类物质,因此克服污染和褐化这两大难题是马铃薯初代培养成功的关键。在整个消毒灭菌过程中,HgCl₂ 的灭菌浓度和时间是最重要的,不同的基

王莹,袁英. 抗除草剂转基因玉米的快速鉴定方法[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):54-56.

抗除草剂转基因玉米的快速鉴定方法

王莹¹,袁英²

(1. 长春职业技术学院食品与生物技术分院, 吉林长春 130033; 2. 吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 吉林长春 130033)

摘要:以含不与除草剂甘膦结合的突变型 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶基因除草剂筛选标记的转基因玉米为材料,通过叶片喷雾和叶片离体平板培养等试验,建立快速非分子生物学抗除草剂转基因玉米的鉴定方法。结果表明:用 5 000 mg/L 草甘膦叶片喷雾和用 70 mg/L 草甘膦叶片离体培养可快速准确地鉴定是否转入除草剂基因。

关键词:转基因玉米;抗除草剂;草甘膦;鉴定方法

中图分类号: S513.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0054-03

随着转基因作物商业化生产的发展,转基因作物种植面积从 1996 年的 170 万 hm^2 增加到 2012 年的 1.7 亿 hm^2 ,增长了 99 倍,这是前所未有的突破,其中抗除草剂作物种植面积最大^[1]。在植物转基因研究过程中,通常采用选择性标记基因提高筛选效率,而除草剂基因是较常用的筛选标记基因,而 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)基因最常用。目前,国际上种植面积最大的抗除草剂转基因玉米是转 EPSPS 基因抗农达除草剂玉米^[2]。近几年,国内对抗除草剂转基因玉米和抗除草剂筛选方法的研究也取得了很大的成功^[3-11]。在转基因研究和安全评价等过程中对转基因植株的鉴定是不可少的环节^[12],传统上初步鉴定转基因的方法是利用聚合酶链反应(PCR)鉴定目的基因 DNA 片段是否存在;但是 PCR

方法步骤繁琐,做大量鉴定运用时有一定的局限性。利用筛选标记基因的农艺性状,建立快速有效的非生物鉴定方法非常必要。本研究以抗除草剂转基因玉米为研究材料,通过叶片喷雾、叶片离体培养方法建立抗除草剂转基因玉米快速的鉴定方法,并探索出可以有效区分转化和非转化植株的筛选剂浓度。本研究建立的 2 种检测方法既可用于转基因植株当代的检测筛选,又可用于转基因后代植株的大规模检测,大大减少了转基因后代培养和进一步鉴定的工作量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 本研究所用的植株材料列于表 1。

1.1.2 试剂 41% 草甘膦异丙胺盐药剂,由美国孟山都公司生产;6-苄氨基嘌呤(6-BA),购于 Sigma 公司;国产琼脂,由上海鼎国生物技术有限公司提供;EPSPS 试纸条购于美国恩沃劳格公司。

1.1.3 筛选培养基(液)的制备 叶片喷雾液:50 mL 灭菌水中加入 1 滴吐温 20,再加入不同浓度的除草剂。离体培养筛选培养基:0.7% 琼脂、1 mg/L 6-BA,煮沸使琼脂溶解,冷却

收稿日期:2013-08-15

基金项目:吉林省财政厅育种项目。

作者简介:王莹(1982—),女,吉林长春人,硕士,讲师,从事生物技术方向研究。Tel:(0431)84602461;E-mail:grammy1981@163.com。

通信作者:袁英,硕士,研究员,从事作物遗传转化研究。Tel:(0431)87063098;E-mail:32854085@qq.com。

因型要选择最佳的处理组合。

植物激素种类和基因型对马铃薯外植体植株的再生有一定的影响,从试验结果可以看出:不同基因型外植体的平均分化率差距很大,变化范围为 16.89%~28.22%,这说明在选择转化受体时应该考虑高再生率的基因型。同一基因型的外植体在不同的激素作用下分化率也有差别,配方为 MS + 1 mg/L 6-BA + 1 mg/L ZT + 0.5 mg/L IAA 的培养基分化诱导率较高,而配方为 MS + 1.75 mg/L ZT + 1 mg/L IAA 的培养基分化诱导率较低。

本试验建立了一套较完整的关于青海省主栽马铃薯品种的组培快繁体系,以期有助于这些品种的大规模推广种植。

参考文献:

- [1] 谢开云,屈冬玉. 中国马铃薯育种进程[C]//中国马铃薯年会论文集. 哈尔滨:哈尔滨工程大学出版社,2002:5-9.
- [2] Cassells A C, Goetz E M, Austin S. Phenotypic variation in plants produced from lateral buds, stem explants and single-cell-derived

callus of potato[J]. Potato Research,1983,26(4):367-372.

- [3] Higgins E S, Hulme J S, Shields R. Early events in transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Science, 1992, 82(1):109-118.

- [4] Dale P J, Hampson K K. An assessment of morphogenic and transformation efficiency in a range of varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Euphytica, 1995, 85(1/3):101-108.

- [5] 王萍,王昱,季静. 马铃薯两个基因型不同外植体的组织培养与植株再生[J]. 中国马铃薯,2006,20(6):326-328.

- [6] 秦敏,邵刚. 马铃薯再生体系的建立及其遗传分析[J]. 中国马铃薯,2005,19(5):270-273.

- [7] 双宝,李文英,李文滨,等. 马铃薯优化再生系统的建立[J]. 马铃薯杂志,1995,9(3):134-138.

- [8] 高华援,王楠,王庆峰,等. 马铃薯组织培养中常见的污染问题及解决办法[J]. 吉林农业科学,2007,32(2):28-30.

- [9] 张永成,张凤军. 马铃薯不同基因型幼芽茎外植体的组织培养[J]. 农业科技通讯,2009(6):44-46.