

张艺欣,邓雨晴,张清招,等. 江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗的离体保存[J]. 江苏农业科学,2021,49(21):58-66.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.21.009

江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗的离体保存

张艺欣^{1,2,3,4}, 邓雨晴¹, 张清招¹, 曾会英¹, 聂学文¹, 龚寅¹, 陈丽丽¹, 侯莹¹,

陈小波¹, 陆春西¹, 韦宏默¹, 尹明华^{1,2,3,4}

(1. 上饶师范学院生命科学学院,江西上饶 334001; 2. 江西省上饶市药食同源植物资源保护与利用重点实验室,江西上饶 334001;

3. 江西省上饶市薯芋类作物种质保存与利用重点实验室,江西上饶 334001; 4. 上饶农业技术创新研究院,江西上饶 334001)

摘要:以江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗为试验材料,从温度、培养基养分水平、培养基物理状态、渗透压调节剂、生长抑制剂、活性炭等方面对铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗进行离体保存,从 DNA 分子标记、气孔参数、光合参数和叶绿素荧光参数等方面衡量江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后的遗传稳定性,并对江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后相关基因表达水平进行 qRT-PCR 检测。结果表明,5℃低温、1 mg/L 多效唑(PP₃₃₃)、18 g/L 蔗糖、0.6 g/L 琼脂、1/8 MS、2 g/L 活性炭、20 g/L 甘露醇、0.5 mg/L 脱落酸均有利于江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗的离体保存,并且可以显著提高其离体保存过程中蔗糖合成酶、超氧化物歧化酶[Cu-Zn]、过氧化物酶、多胺氧化酶、衰老相关半胱氨酸蛋白酶、L-抗坏血酸氧化酶等基因的表达水平。与常温继代苗对照组相比,江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后复苏苗经 SSR 检测,电泳峰型一致,遗传距离为 0,遗传相似系数为 1,可以聚为一类;铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后复苏苗和常温继代苗对照组的气孔长径、短径、周长、气孔数量、气孔密度、净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、细胞间 CO₂ 浓度(C_i)、蒸腾速率(T_r)、实际光化学效率 Φ_{PSII} 、捕获激发能效率 F_v'/F_m' 、光化学猝灭系数(q_p)、非光化学猝灭系数 NPQ 均无显著差异。由此可见,铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存可以保证其种质遗传稳定性。

关键词:江西铅山红芽芋;脱毒苗;超低温疗法;离体保存

中图分类号:S632.304+.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)21-0058-08

江西铅山红芽芋(*Colocasia esculenta* L. Schoot var. *cormosus* ‘Hongyayu’)属天南星科芋属多子芋类型,其食用部分以地下子芋和孙芋为主,主产于江西铅山,为国家地理标志农产品^[1]。江西铅山红芽芋药食品质兼优,食用具有营养丰富、口感滑糯、肉质细腻等优点^[2],药用则能补脾益肠止泻、增强人体免疫、润肠通便止秘^[3]。江西铅山红芽芋多以子芋、孙芋进行无性繁殖,容易积累芋花叶病毒、黄瓜花叶病毒等病毒,使其种性严重退化,直接影响其产量、品相和品质,从而降低江西铅山红芽芋的

生产效益,给江西铅山芋农创收脱贫造成极大损失^[4]。笔者所在课题组通过超低温疗法和逆转录 PCR(RT-PCR)检测获得了江西铅山红芽芋脱毒苗,并将其应用于大田生产^[5]。结果表明,随着江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗种植年限的延长,芋花叶病毒、黄瓜花叶病毒等病毒会重新侵染,同样会造成其种性再次退化^[6]。由此可见,对江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗种质进行一定条件的无变异保存具有重要的现实意义。

离体保存法作为植物种质资源圃的活体保存替代技术,是保证植物种质资源遗传多样性的一种新兴途径^[7]。1975 年 Henshaw 和 Morel 首次提出植物种质离体保存策略,并指出通过在培养基内添加生长抑制剂、调节渗透性物质、降低培养温度、添加活性炭等方法可以限制无菌苗生长,从而延长继代时间,实现植物种质的中期保存^[8]。离体保存具有占用空间小、操作简便、所需人力物力少、延长继代周期、易于种质交流等特点,现已被应用于多种植物种质资源的离体保存^[9]。为了克服江西铅山红

收稿日期:2021-07-22

基金项目:国家自然科学基金(编号:31960079、32060092);江西省上饶市科技局平台载体建设项目(编号:20201001、20191017);上饶师范学院校级自选课题(编号:202031);2021 年大学生国家级创新创业训练计划(编号:202110416008)。

作者简介:张艺欣(1991—),女,江西上饶人,硕士,助教,主要从事植物生物技术研究。E-mail:474303981@qq.com。

通信作者:尹明华,硕士,教授,主要从事植物生物技术研究。E-mail:yinminghua04@163.com。

芽芋超低温疗法脱毒苗大田种质逐年退化的缺点,保存江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗种质,不断为江西铅山芋农提供优质脱毒苗,开展江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存研究迫在眉睫。

本研究以江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗为试验材料,从温度、培养基养分水平、培养基物理状态、渗透压调节剂、生长抑制剂、活性炭等方面对铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗的离体保存进行研究,从 DNA 分子标记、气孔参数、光合参数和叶绿素荧光参数衡量江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后的遗传稳定性,并对江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后相关基因的表达水平进行 qRT-PCR 检测,以期对江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗的种质离体保存优化、组培产业化及种质创新提供技术和理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

江西铅山红芽芋试管苗,由上饶师范学院生命科学学院提供。

1.2 试验方法

1.2.1 江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗的获得

江西铅山红芽芋超低温疗法参照文献[5]的方法进行处理,江西铅山红芽芋超低温疗法再生苗的脱毒效果也参照文献[5]的方法进行 RT-PCR 检测。

1.2.2 江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗的离体保存

江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗的离体保存采用单因素试验进行设计,试验时间为 2020 年 9 月至 2021 年 5 月。单因素包括多效唑(PP_{333})、脱落酸(ABA)、活性炭(AC)、甘露醇、蔗糖、琼脂、MS 大量元素和温度。多效唑离体保存培养基为 MS + 1.0 mg/L KT + 0.2 mg/L NAA + 0 ~ 2 mg/L PP_{333} + 30 g/L 蔗糖 + 0.6 g/L 琼脂,脱落酸(ABA)离体保

存培养基为 MS + 1.0 mg/L KT + 0.2 mg/L NAA + 0 ~ 2 mg/L ABA + 30 g/L 蔗糖 + 0.6 g/L 琼脂,活性炭离体保存培养基为 MS + 1.0 mg/L KT + 0.2 mg/L NAA + 0 ~ 2 g/L 活性炭 + 30 g/L 蔗糖 + 0.6 g/L 琼脂,甘露醇离体保存培养基为 MS + 1.0 mg/L KT + 0.2 mg/L NAA + 0 ~ 80 g/L 甘露醇 + 30 g/L 蔗糖 + 0.6 g/L 琼脂,蔗糖离体保存培养基为 MS + 1.0 mg/L KT + 0.2 mg/L NAA + 12 ~ 36 g/L 蔗糖 + 0.6 g/L 琼脂,琼脂离体保存培养基为 MS + 1.0 mg/L KT + 0.2 mg/L NAA + 30 g/L 蔗糖 + 0 ~ 0.6 g/L 琼脂,MS 大量元素离体保存培养基为 1/16 ~ 1 MS + 1.0 mg/L KT + 0.2 mg/L NAA + 30 g/L 蔗糖 + 0.6 g/L 琼脂,温度离体保存培养基均为 MS + 1.0 mg/L KT + 0.2 mg/L NAA + 30 g/L 蔗糖 + 0.6 g/L 琼脂,保存条件设为冰箱(5 ℃)和常温(25 ℃)黑暗 2 种。上述 8 个单因素试验每个处理接种 15 瓶,每瓶接种 3 个长 1.0 ~ 1.5 cm 的江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗单芽,每个处理重复 3 次。培养温度为(25 ± 1) ℃,光照度为 1 500 lx,光照时间为 14 h/d。离体保存时间设计为 6 个月,6 个月后统计上述 8 个单因素试验每个处理的成活率,计算公式:成活率 = 存活数/接种数 × 100%。

1.2.3 江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后相关基因表达的 qRT-PCR 检测 江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存 6 个月后,按照文献[6]的方法对江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后相关基因(蔗糖合成酶、超氧化物歧化酶[Cu-Zn]、过氧化物酶、多胺氧化酶、衰老相关半胱氨酸蛋白酶、L-抗坏血酸氧化酶)在叶片中的表达水平进行 qRT-PCR 检测。引物设计见表 1,每个样品以 GAPDH 为内参。

1.2.4 江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后复苏苗遗传稳定性的检测 在筛选得到

表 1 qRT-PCR 的引物序列

基因	引物序列(5'→3')	目标序列大小 (bp)	熔解温度 (℃)	说明
蔗糖合成酶	F:GCCCCGTCTTATTCATACCCTCG;R:CATGCTTTTCCCATTTTGTCTCA	173	54.6	
超氧化物歧化酶[Cu-Zn]	F:CTGAGGCAACGATTGTGATA;R:CCCGTGCTAAGGCTAAGTTCAT	130	53.2	
过氧化物酶	F:CCAACCTCCCAGACTTCTTCTTCC;R:CTGGCTGGCTAGTGGTGCTTCTT	136	57.9	
多胺氧化酶	F:GAGTAGAAGGTTCCGAGTTTGAG;R:CATCCTGGAGGCGACAGAT	162	55.4	
L-抗坏血酸氧化酶	F:TGTCGGTGACGGCAGAATC;R:GCAACAGGTGAAGGCTGGAG	127	54.7	
衰老相关半胱氨酸蛋白酶	F:GGCTCATGGACTATGCCTTCG;R:GGTTGGTTGGACACTGCCTTCT	193	55.2	
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	F:ATCAAGCCCTCAACAATGCCAAA;R:GCCAAGAAGGTCGTCATCTCAGC	179	54.8	内参 e

“1.2.2”节中 8 个单因素的最优条件后,进行脱毒苗的培养,将培养成活的幼苗转移到 MS + 1.0 mg/L KT + 0.2 mg/L NAA + 30 g/L 蔗糖 + 0.6 g/L 琼脂培养基上进行复苏。复苏培养温度为(25 ± 1)℃,光照度为 1 500 lx,光照时间为 14 h/d。复苏 50 ~ 60 d 后,按照“1.2.2”节的 8 个最佳单因素试验条件得到江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗成活苗的复苏苗(离体保存后重新接种到新培养基上长出的新苗)后,按照文献[10]的方法对其与江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗的常温继代苗(对照组)进行遗传稳定性的 SSR 检测。10 对引物(P10、P11、P18、P23、P24、XP3、XP5、XP7、XP8、XP10)的序列见表 2。PCR 反应体系(共 20 μL):14.8 μL ddH₂O,0.4 μL dNTP,2 μL 缓冲液(500 mmol/L KCl,pH 值 8.3 的 100 mmol/L Tris - HCl,15 mol/L MgCl₂),0.3 μL F(20 μmol/L),0.3 μL R(20 μmol/L),2 μL DNA 模板,0.2 μL Taq DNA 聚合酶。SSR PCR 扩增程序:94℃ 5 min;94℃ 30 s,54℃ 35 s,72℃ 40 s,35 个循环;72℃ 3 min。

表 2 SSR 引物序列

引物代码	引物名称	方向	引物序列(5'→3')
P10	HK34	F	TTACTCCAACGAGGCAAAC
		R	CCTTCAAGATGTTACCAAATGC
P11	HK35	F	TACTAGAACCCCGTCAGTCT
		R	CGTCGATTATCAGTGAGC
P18	uq91 - 262	F	GTCCAGTGTAGAGAAAAACCAG
		R	CACAACCAAAACATACGGAAAC
P23	uq115 - 71	F	CCCCTCTTTTGAATAATCC
		R	GTTTAAATGACTTGTTCTGC
P24	uq132 - 147	F	ACCCCGAAAAAGCCAATG
		R	CTATCACTTGTTCTCCTTCTC
XP3	Xuqtem73	F	ATGCCAATGGAGGATGGCAG
		R	CGTCTAGCTTAGGACAACATGC
XP5	Xuqtem88	F	CACACATACCCACATACACG
		R	CCAGGCTCTAATGATGATGATGATG
XP7	Ce1F12	F	CTTAGCGTTGTTCCCTAC
		R	GATGCCTGTCTTATGTTT
XP8	Ce1H12	F	TAGTTAGCGTGCCCTTTC
		R	CAACAACCTTAATGCTTCAC
XP10	Ce1F04	F	AGGGAATACAATGGCTC
		R	ACGAGGGAAGAGTGTAAA

气孔参数的分析。按照“1.2.2”节的 8 个最佳单因素试验条件得到江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗成活苗的复苏苗后,采用透明胶粘贴法^[11]对

其与江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗的常温继代苗(对照组)进行测定和分析。

光合生理的测定。按照“1.2.2”节的 8 个最佳单因素试验得到江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗成活苗的复苏苗后,用 LI - 6400 便携式光合仪按照文献[12]的方法对其与江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗的常温继代苗(对照组)进行检测。

1.3 数据处理和统计方法

本试验所有数据均表示为“平均值 ± 标准差”,数据用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(one - way ANOVA),再进行最小显著性差异法(LSD)检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同因素对江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后成活率的影响

本研究发现,多效唑、脱落酸、活性炭、甘露醇、蔗糖、琼脂、MS 大量元素和温度对江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后的成活率具有显著影响。从图 1 可以看出,5℃低温、添加 1 mg/L PP₃₃₃、添加 18 g/L 蔗糖、添加 0.6 g/L 琼脂、1/8 MS、添加 2 g/L 活性炭、添加 20 g/L 甘露醇、添加 0.5 mg/L ABA 有利于江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗的离体保存。

2.2 不同因素对江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后相关基因表达水平的影响

从表 3 可以看出,5℃低温、1 mg/L PP₃₃₃、18 g/L 蔗糖、0.6 g/L 琼脂、1/8 MS、2 g/L 活性炭、20 g/L 甘露醇和 0.5 mg/L ABA 均可显著提高江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后蔗糖合成酶、超氧化物歧化酶[Cu - Zn]、过氧化物酶、多胺氧化酶、衰老相关半胱氨酸蛋白酶、L - 抗坏血酸氧化酶在叶片中的表达水平。

2.3 江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后复苏苗的 SSR 检测

江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后,在 8 个单因素的最佳条件下(5℃低温、1 mg/L PP₃₃₃、18 g/L 蔗糖、0.6 g/L 琼脂、1/8 MS、2 g/L 活性炭、20 g/L 甘露醇和 0.5 mg/L ABA)得到的 8 种复苏苗,利用荧光标记毛细管电泳检测复苏苗和 1 个对照组扩增产物的等位基因片段。10 对引物的 9 个样品[8 个最佳单因素处理(5℃低温、1 mg/L PP₃₃₃、18 g/L 蔗糖、0.6 g/L 琼脂、1/8 MS、2 g/L 活性炭、

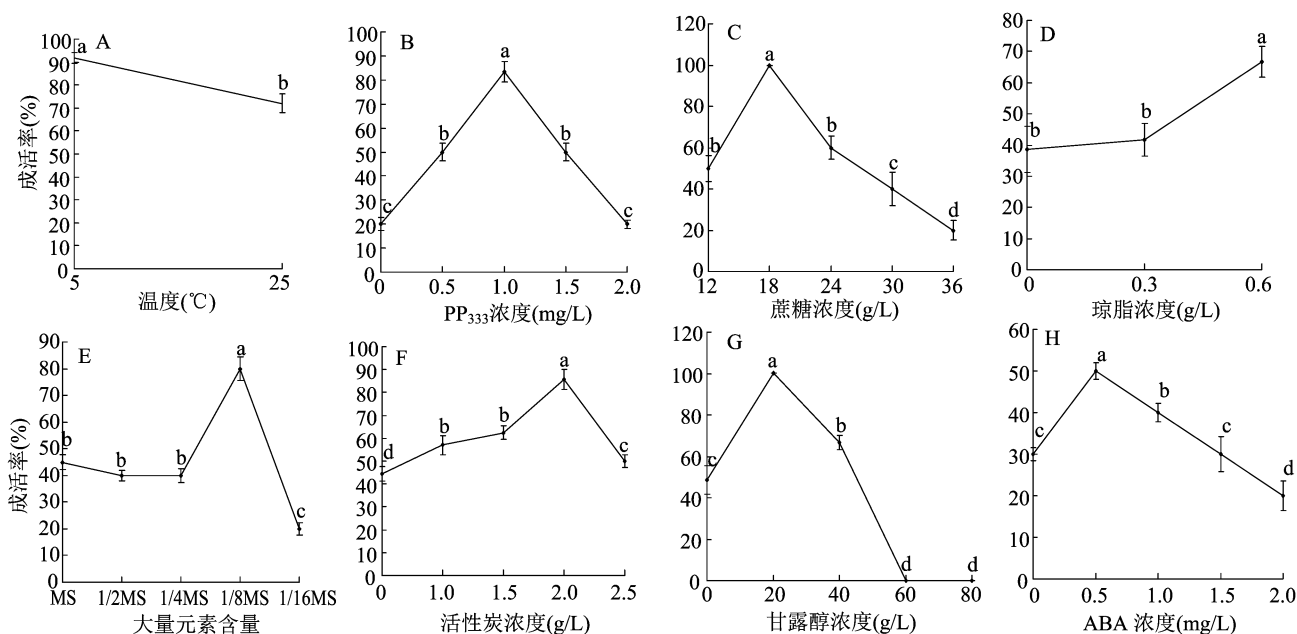


图1 不同因素对江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后成活率的影响

20 g/L 甘露醇和 0.5 mg/L ABA) 得到的复苏苗和 1 个对照组] 的电泳峰形相同。从图 2 可以看出, 9 个样品的电泳峰形一致。经 POPGENE 32 软件和 UPGMA 法分析可知, 9 个样品的遗传距离为 0, 遗传相似系数为 1, 9 个样品聚为一类, 表明 9 个样品无遗传变异, 铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存可以保证其种质的遗传稳定性。

2.4 江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后复苏苗的气孔参数分析

从表 4 可以看出, 在 8 个最佳单因素处理 (5 °C 低温、1 mg/L PP₃₃₃、18 g/L 蔗糖、0.6 g/L 琼脂、1/8 MS、2 g/L 活性炭、20 g/L 甘露醇和 0.5 mg/L ABA) 下, 与对照组相比, 江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后复苏苗的气孔长径、短径、周长、气孔数量和气孔密度均无显著差异, 表明江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后, 其复苏苗在气孔性状方面无显著变化。

2.5 江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后复苏苗的光合生理分析

从表 5 可以看出, 在 8 个最佳处理因素 (5 °C 低温、1 mg/L PP₃₃₃、18 g/L 蔗糖、0.6 g/L 琼脂、1/8 MS、2 g/L 活性炭、20 g/L 甘露醇和 0.5 mg/L ABA) 下, 与对照组相比, 铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后复苏苗的净光合速率 (P_n)、气孔导度 (G_s)、细胞间 CO₂ 浓度 (C_i)、蒸腾速率 (T_r)、实际光化学效率 (Φ_{PSII})、捕获激发能效率 (F_v'/F_m')、光化

学猝灭系数 (q_p)、非光化学猝灭系数 (NPQ) 均无显著差异, 表明江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后, 其复苏苗在光合生理方面无显著变化。

3 讨论

与保存种质资源所用的传统田间保存技术相比, 离体保存技术具有占用空间小、保存种质多、保存成本少、可免除病虫害和自然灾害侵袭风险等优点, 且长期离体保存后可快速复苏, 从而实现快速繁殖, 已经成为近年来新发展的且较为经济、有效、理想的种质资源保存途径^[13-14]。研究发现, 培养基的物理状态与培养物生长发育和培养物离体保存密切相关^[15], 琼脂浓度越高, 黄独^[16]和香青兰^[17]试管苗的保存时间越长。但也有研究发现, 琼脂浓度对地枫皮丛生芽离体保存的影响不显著^[18]。

活性炭也可用于植物材料的离体保存^[19]。在培养基中加入 0.5 g/L 活性炭后, 铁皮石斛试管苗低温保存 1 年后的成活率达到 100%^[20-21]。本试验结果也表明, 添加一定量的活性炭均可显著延长江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗单芽离体保存的时间, 究其原因, 可能由于活性炭吸附了培养基中的激素和营养成分, 从而抑制了植株生长。MS 培养基的大量元素是试管苗生长发育的物质基础, 适当降低 MS 培养基中的大量元素含量可以抑制培养物的生长, 从而起到离体保存的目的^[22]。研究发现, 短瓣石竹^[8]、地枫皮^[18]和弄岗唇柱苣苔^[23]试管

表 3 不同因素对江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后相关基因表达水平的影响

因素	用量	基因相对表达量					
		蔗糖合成酶	超氧化物歧化酶	过氧化物酶	多胺氧化酶	衰老相关 半胱氨酸蛋白酶	L-抗坏血酸 氧化酶
多效唑	0 mg/L	1.0±0.0d	1.0±0.0c	1.0±0.0e	1.0±0.0b	1.0±0.0d	1.0±0.0d
	0.5 mg/L	2.3±0.3c	2.5±0.1b	4.2±0.2c	1.2±0.1b	4.2±0.4b	5.2±0.2b
	1.0 mg/L	4.6±0.5a	3.3±0.2a	6.3±0.7a	2.3±0.1a	5.2±0.6a	6.8±0.5a
	1.5 mg/L	3.6±0.4b	2.2±0.1b	5.2±0.5b	1.3±0.3b	2.9±0.3c	4.8±0.4b
	2.0 mg/L	2.6±0.4c	2.3±0.3b	3.1±0.6d	1.2±0.2b	2.6±0.2c	3.6±0.1c
脱落酸	0 mg/L	1.0±0.0d	1.0±0.0c	1.0±0.0d	1.0±0.0c	1.0±0.0c	1.0±0.0c
	0.5 mg/L	4.2±0.3a	3.5±0.2a	6.1±0.4a	2.9±0.5a	5.4±0.4a	3.9±0.3a
	1.0 mg/L	3.2±0.2b	2.1±0.5b	4.2±0.4b	1.8±0.1b	4.3±0.2b	2.2±0.3b
	1.5 mg/L	3.0±0.2b	1.2±0.1c	2.3±0.2c	1.6±0.3b	4.2±0.5b	2.1±0.2b
	2.0 mg/L	2.1±0.3c	1.1±0.2c	1.2±0.1d	1.5±0.4b	3.9±0.8b	1.2±0.1c
活性炭	0 g/L	1.0±0.0d	1.0±0.0d	1.0±0.0c	1.0±0.0d	1.0±0.0d	1.0±0.0c
	1.0 g/L	2.9±0.2c	2.6±0.2c	4.8±0.2b	3.1±0.2b	2.4±0.1c	1.9±0.1b
	1.5 g/L	3.8±0.3b	3.5±0.1b	5.1±0.5b	3.3±0.1b	3.6±0.6b	2.1±0.2b
	2.0 g/L	5.2±0.2a	4.2±0.2a	6.2±0.7a	4.5±0.6a	4.9±0.4a	3.8±0.5a
	2.5 g/L	4.1±0.5b	3.4±0.3b	4.6±0.3b	2.1±0.1c	2.5±0.2c	2.0±0.2b
甘露醇	0 g/L	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c
	20 g/L	1.0±0.0a	1.0±0.0a	1.0±0.0a	1.0±0.0a	1.0±0.0a	1.0±0.0a
	40 g/L	0.2±0.1b	0.4±0.1b	0.6±0.2b	0.4±0.2b	0.5±0.1b	0.3±0.2b
	60 g/L	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c
	80 g/L	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c
蔗糖	12 g/L	1.0±0.0d	1.0±0.0e	1.0±0.0d	1.0±0.0d	1.0±0.0c	1.0±0.0d
	18 g/L	4.8±0.3a	6.2±0.8a	7.9±0.8a	5.1±0.2a	3.4±0.2a	4.2±0.2a
	24 g/L	3.2±0.5b	5.2±0.4b	5.9±0.4b	3.8±0.4b	2.4±0.3b	3.1±0.5b
	30 g/L	3.1±0.2b	4.3±0.6c	4.3±0.5c	3.6±0.6b	2.3±0.4b	2.3±0.2c
	36 g/L	2.1±0.4c	2.5±0.3d	4.1±0.5c	2.4±0.2c	1.1±0.1c	1.2±0.3d
琼脂	0 g/L	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c	0.0±0.0c
	0.3 g/L	1.0±0.0b	1.0±0.0b	1.0±0.0b	1.0±0.0b	1.0±0.0b	1.0±0.0b
	0.6 g/L	5.2±0.5a	4.2±0.3a	3.9±0.2a	5.8±0.8a	6.2±0.6a	4.8±0.7a
MS 大量元素	MS	1.0±0.0d	1.0±0.0c	1.0±0.0e	1.0±0.0d	1.0±0.0c	1.0±0.0d
	1/2 MS	2.2±0.3c	1.8±0.1b	2.3±0.2d	3.2±0.4c	2.2±0.1b	4.2±0.5c
	1/4 MS	3.1±0.4b	2.3±0.3b	3.5±0.5c	4.5±0.5b	2.3±0.2b	5.1±0.6b
	1/8 MS	4.9±0.6a	3.8±0.5a	5.8±0.6a	6.1±0.8a	4.3±0.4a	6.1±0.8a
	1/16 MS	2.1±0.2c	2.2±0.1b	4.6±0.3b	4.4±0.3b	2.4±0.2b	4.0±0.2c
温度	5 ℃	1.0±0.0a	1.0±0.0a	1.0±0.0a	1.0±0.0a	1.0±0.0a	1.0±0.0a
	25 ℃	0.4±0.1b	0.3±0.0b	0.4±0.1b	0.2±0.0b	0.3±0.1b	0.2±0.0b

苗在 1/2 MS 培养基上离体保存 160 d 后的成活率均超过 50%,而在 1/4 MS 培养基上离体保存 160 d 后的成活率不足 40%。本试验结果也表明,适当减少 MS 培养基的大量元素更有利于江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗单芽的离体保存。培养温度可以通过改变植物材料的培养条件而延长其离体保存时间^[24]。在颖半夏胚性愈伤^[25]、甜叶菊种质^[26]和姜种质^[27]离体保存的过程中,温度对保存时间的影响占主导作用。本试验结果也表明,在 5 ℃黑暗

保存 180 d,江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗的成活率还可达 90% 以上。通过添加蔗糖、甘露醇等渗透调节剂提高培养基渗透压,抑制培养材料对水分和营养物质的吸收,抑制离体材料生长,可以实现植物种质的离体保存^[28-29]。在离体保存过程中,蔗糖是培养物生长的主要碳源和能源,当蔗糖达到一定浓度时,蔗糖的作用由碳源向渗透物质过渡,通过调节渗透压,造成植株吸水困难,细胞生长受阻,延缓植株生长,从而延长保存时间^[30]。研究发现,

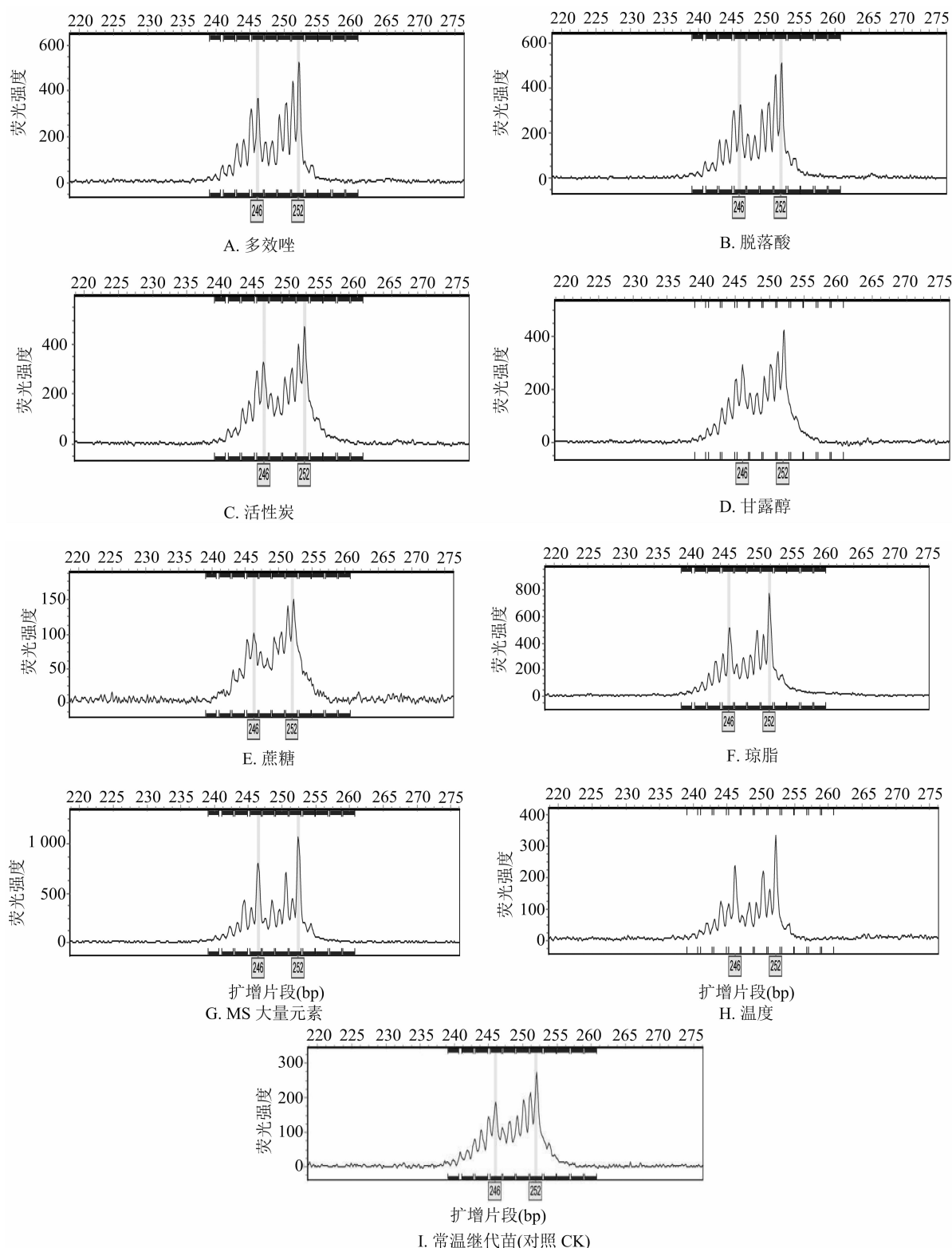


图2 江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后复苏苗的 SSR 检测(引物 P10)

低浓度的蔗糖有助于植物种质离体保存。添加较高浓度的蔗糖,可以显著提高铁皮石斛^[20]、甜叶菊^[26]、花叶金线莲^[31]、南农橙乒乓和小洋菊^[32]及薄荷试管苗^[33]离体保存的成活率。本试验结果与

之一致,江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗用 18 g/L 蔗糖离体保存 180 d 后的成活率最高。甘露醇属惰性物质,不易被外植体吸收,可以降低细胞膨压,提高培养基渗透势负值,造成水分逆境,细胞

表 4 江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后复苏苗的气孔参数分析(10 × ,50 mm ×56 mm 视野)

因素	气孔参数					
	长径(μm)	短径(μm)	周长(μm)	气孔数量(个)	气孔密度(个/mm ²)	每个气孔叶绿体数量(个)
对照组	8.5 ± 1.1a	6.2 ± 0.5a	29.6 ± 2.3a	31.5 ± 4.2a	18.7 ± 2.5a	11.2 ± 1.5a
多效唑	8.2 ± 2.1a	6.5 ± 0.4a	30.2 ± 3.5a	32.6 ± 3.6a	19.6 ± 2.9a	13.2 ± 1.6a
脱落酸	8.8 ± 1.3a	6.8 ± 0.6a	31.2 ± 4.2a	30.8 ± 5.2a	18.5 ± 5.1a	10.9 ± 2.1a
活性炭	8.6 ± 0.9a	6.1 ± 1.1a	28.6 ± 5.2a	31.9 ± 8.2a	20.4 ± 4.3a	12.5 ± 2.5a
甘露醇	8.3 ± 0.5a	6.5 ± 0.9a	29.4 ± 3.9a	29.8 ± 6.2a	19.8 ± 3.4a	11.8 ± 0.9a
蔗糖	8.7 ± 0.8a	6.7 ± 0.8a	30.5 ± 4.8a	30.4 ± 7.1a	20.3 ± 3.8a	12.4 ± 0.8a
琼脂	8.8 ± 0.7a	6.6 ± 0.4a	32.4 ± 2.8a	31.7 ± 2.6a	21.4 ± 4.6a	13.1 ± 1.5a
大量元素	8.5 ± 1.1a	6.3 ± 0.3a	28.6 ± 3.2a	33.2 ± 5.3a	20.7 ± 6.2a	10.8 ± 0.6a
温度	8.4 ± 2.2a	6.5 ± 0.7a	29.8 ± 2.1a	34.2 ± 4.8a	19.9 ± 2.7a	12.4 ± 1.4a

表 5 江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗离体保存后复苏苗的光合参数和叶绿素荧光参数分析

因素	光合参数和叶绿素荧光参数							
	净光合速率 [μmol/(m ² ·s)]	气孔导度 [mol/(m ² ·s)]	细胞间 CO ₂ 浓度 (μmol/mol)	蒸腾速率 [mmol/(m ² ·s)]	实际 光化学效率	捕获激发 能效率	光化学 猝灭系数	非光化学 猝灭系数
对照组 CK	10.25 ± 2.13a	0.56 ± 0.02a	253.64 ± 22.36a	3.12 ± 0.86a	0.62 ± 0.02a	0.82 ± 0.08a	0.88 ± 0.02a	0.35 ± 0.01a
多效唑	11.34 ± 1.36a	0.62 ± 0.03a	248.66 ± 35.21a	3.36 ± 0.96a	0.74 ± 0.03a	0.79 ± 0.04a	0.79 ± 0.03a	0.41 ± 0.03a
脱落酸	12.14 ± 2.15a	0.71 ± 0.05a	253.41 ± 18.91a	4.12 ± 0.59a	0.72 ± 0.02a	0.83 ± 0.20a	0.76 ± 0.08a	0.32 ± 0.05a
活性炭	11.19 ± 1.58a	0.64 ± 0.05a	246.59 ± 23.24a	3.41 ± 0.42a	0.78 ± 0.05a	0.78 ± 0.09a	0.81 ± 0.05a	0.44 ± 0.02a
甘露醇	12.31 ± 2.45a	0.74 ± 0.02a	256.33 ± 16.52a	4.21 ± 0.36a	0.84 ± 0.04a	0.82 ± 0.04a	0.77 ± 0.04a	0.33 ± 0.05a
蔗糖	10.33 ± 0.96a	0.61 ± 0.08a	256.85 ± 22.11a	3.46 ± 0.74a	0.69 ± 0.05a	0.80 ± 0.06a	0.84 ± 0.06a	0.37 ± 0.07a
琼脂	11.21 ± 1.12a	0.65 ± 0.04a	259.44 ± 30.42a	4.08 ± 0.58a	0.70 ± 0.06a	0.86 ± 0.04a	0.88 ± 0.03a	0.42 ± 0.05a
大量元素	12.05 ± 3.14a	0.63 ± 0.03a	249.55 ± 18.52a	3.52 ± 0.29a	0.71 ± 0.02a	0.85 ± 0.03a	0.81 ± 0.02a	0.38 ± 0.03a
温度	10.65 ± 2.14a	0.57 ± 0.08a	254.68 ± 17.45a	3.62 ± 0.64a	0.66 ± 0.07a	0.89 ± 0.02a	0.85 ± 0.05a	0.39 ± 0.03a

水分与养分吸收困难,新陈代谢减弱,延缓植株生长,从而达到离体保存效果^[34]。甘露醇作为一种渗透性物质,对试管苗的保存效果及适用浓度依作物种类而异^[35]。随着甘露醇浓度的增加,香青兰^[17]、蒙娜丽莎黄和橙安娜^[32]、花叶金线莲^[31]试管苗的成活率逐渐提高,本试验结果与之一致。植物生长抑制剂可抑制细胞生长,延缓植株生长,使用合适浓度的植物生长延缓剂(如 PP₃₃₃、ABA 等)可以保证离体保存的成功实现^[36]。多效唑可调节植物体内的激素平衡,抑制茎枝伸长,促进分蘖和延缓生长。较低浓度的 PP₃₃₃(1.0~2.0 mg/L)可以显著延长短瓣石竹无菌苗^[8]、颖半夏胚性愈伤^[25]、香青兰试管苗^[17]和甜叶菊组培苗^[26]的离体保存时间。本试验结果与上述结果一致,如 1 mg/L PP₃₃₃可促进江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗单芽的离体保存。也有研究发现,较高浓度的 PP₃₃₃有利于有髯鸢尾组培苗的离体保存,例如有髯鸢尾组培苗经 8.0 mg/L PP₃₃₃处理 120 d 后,其株丛成活率为

100%^[7]。脱落酸具有抗赤霉素的作用,可以降低 RNA 聚合酶的活性,抑制 DNA 合成,从而抑制材料生长,起到离体保存的效果^[37]。添加较低浓度的 ABA 对有髯鸢尾组培苗的离体保存效果明显^[7]。研究发现,≥5 mg/L ABA 均不适用于南天竹的离体保存^[38],本试验结果与此相类似,>0.5 mg/L ABA 将对江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗单芽产生毒害,显著降低其离体保存 180 d 的成活率。

离体保存是植物种质资源中短期保存一种方便快捷的手段,但离体保存后必须时刻关注离体保存材料的遗传稳定性。不同保存代数的青钱柳愈伤组织经流式细胞术法和 SSR 分子标记技术检测,细胞倍性恒定,扩增图谱无特异性条带,遗传稳定好^[9]。4 个品种菊花离体保存后的复苏苗经 SSR 分子标记分析,均未出现变异条带,说明离体保存后,4 个品种菊花复苏苗在 DNA 水平上无变化,保持了良好的遗传稳定性^[32]。由颖半夏胚性愈伤离体保存复苏苗^[25]和甜叶菊复苏苗与常温继代苗的形态指

标、生理生化指标(叶绿素、可溶性蛋白、过氧化物酶、超氧化物歧化酶)、POD 同工酶酶谱及 SRAP 分子标记扩增条带看出,离体保存不会造成材料的遗传变异^[26],本试验结果与此相似。与常温继代苗相比,江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗单芽离体保存复苏苗在气孔参数、光合生理指标以及 SSR 分子标记扩增条带方面均无显著变化,表明本试验建立的离体保存技术体系可以保证江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗的遗传稳定性。离体保存是一种人为营造的生态因素逆境抑制培养物生长的方法,在离体保存过程中肯定造成一些基因的上调和下调。研究发现,多酚氧化酶基因(*PPO*)在橄榄试管苗不同离体保存阶段都有表达,*PPO* 基因在离体保存 1、2、3、4、5 个月时的变化趋势不显著,当离体保存时间到 6、7、8 个月时,*PPO* 基因显著上调^[39]。在本试验中,江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗单芽离体保存 180 d 后,蔗糖合成酶、超氧化物歧化酶[Cu-Zn]、过氧化物酶、多胺氧化酶、衰老相关半胱氨酸蛋白酶、L-抗坏血酸氧化酶等基因在各种离体保存因素处理中均表现上调,表明在江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗单芽离体保存的逆境中,蔗糖合成酶、超氧化物歧化酶[Cu-Zn]、过氧化物酶、多胺氧化酶、衰老相关半胱氨酸蛋白酶、L-抗坏血酸氧化酶等基因起到了重要的抗逆作用。

参考文献:

- [1] Hong S R, Yin M H. A simple cryopreservation protocol for *in vitro* - grown shoot tips of Chinese genuine red bud taro (*Colocasia esculenta* L. Schott var. *cormosus* cv. Hongyayu) by encapsulation - dehydration[J]. *Scientia Horticulturae*, 2013, 162: 226 - 233.
- [2] 李 云, 牛丽亚, 涂 瑾, 等. 亲水胶体对红芽芋全粉理化特性和消化特性的影响[J]. *中国粮油学报*, 2020, 35(2): 12 - 17.
- [3] 周庆红, 刘星月, 王葡萄, 等. 脱毒红芽芋不同世代生长特性及产量分析[J]. *种子*, 2020, 39(2): 96 - 98.
- [4] 邓接楼, 曹昊玮, 李 玲, 等. 脱毒红芽芋试管芽盆栽种植的农艺性状分析[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(22): 7500 - 7506.
- [5] 洪森荣, 李远芳, 郁雪婷, 等. 红芽芋茎尖低温疗法脱毒的 RT-PCR 检测[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(14): 4678 - 4684.
- [6] 尹明华, 张艺欣, 邓雨晴, 等. 江西铅山红芽芋超低温疗法脱毒苗的转录组分析[J]. *福建农业学报*, 2020, 35(10): 1050 - 1062.
- [7] 张全锋, 尹新彦, 庞 曼, 等. 有髯鸢尾种质离体保存研究[J]. *河南农业科学*, 2018, 47(12): 116 - 120, 131.
- [8] 韦 莹, 黄 浩, 黄宝优, 等. 植物生长抑制剂对短瓣石竹离体保存的影响[J]. *中药材*, 2020, 43(1): 24 - 27.
- [9] 冯 莹, 林庆良, 潘东明. 青钱柳愈伤组织的离体保存[J]. *林业科学*, 2020, 56(9): 58 - 66.
- [10] 尹明华, 刘 燕, 叶思雨, 等. 江西铅山红芽芋低温疗法脱毒苗遗传稳定性的 SSR 检测[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(11): 3580 - 3587.
- [11] 陈佰鸿, 李新生, 曹孜义, 等. 一种用透明胶带粘取叶片表皮观察气孔的方法[J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(2): 215 - 218.
- [12] 洪森荣, 尹明华. 红芽芋驯化苗对盐胁迫的光合及生理响应[J]. *西北植物学报*, 2013, 33(12): 2499 - 2506.
- [13] Rodrigues P H V, Arruda F, Forti V A. Slow - grown *in vitro* conservation of *Heliconia champneiana* cv. Splash under different light spectra[J]. *Scientia Agricola*, 2018, 75(2): 163 - 166.
- [14] Silva S S D S, Souza E H, Souza F V, et al. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), an endemic and endangered species of the Brazilian Atlantic Forest[J]. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 2020, 42: e52940.
- [15] Sedlak J, Zidova P, Paprstein F. Slow growth *in vitro* conservation of fruit crops[J]. *Acta Horticulturae*, 2019, 1234: 119 - 124.
- [16] 洪森荣, 陈子敏. 糖类和琼脂对黄独生长发育和离体保存的影响[J]. *黑龙江农业科学*, 2011(8): 23 - 24.
- [17] 兰 伟, 徐培培, 许树成. 香青兰的离体保存研究[J]. *热带作物学报*, 2013, 34(4): 675 - 680.
- [18] 张 乐, 李林轩, 韦坤华, 等. 珍稀濒危药用植物地枫皮离体保存研究[J]. *北方园艺*, 2015(18): 168 - 171.
- [19] Malarie B, Trouslot M F, Berthaud J, et al. Medium - term and long - term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1998, 1(3): 1 - 15.
- [20] 史永忠, 潘瑞炽, 王小菁, 等. 铁皮石斛种质资源的低温离体保存[J]. *应用与环境生物学报*, 2000, 6(4): 326 - 330.
- [21] 史永忠, 潘瑞炽, 王小菁, 等. 铁皮石斛种质室温离体保存[J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 1999(4): 73 - 77.
- [22] Cheruyathur M K, Najeel N, Thomas T D. *In vitro* propagation and conservation of Indian sarsaparilla, *Hemidesmus indicus* L. R. Br. through somatic embryogenesis and synthetic seed production[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35(3): 771 - 779.
- [23] 张占江, 李 翠, 韦 莹, 等. 珍稀濒危药用植物弄岗唇柱苣苔离体保存研究[J]. *北方园艺*, 2014(4): 136 - 138.
- [24] Garcia R O, Pacheco G, Vianna M G, et al. *In vitro* conservation of *Passiflora suberosa* L.: slow growth and cryopreservation[J]. *Cryo Letters*, 2011, 32(5): 377 - 388.
- [25] 刘修树, 黄和平. 道地中药颖半夏种质胚性愈伤的离体保存[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(17): 5752 - 5756.
- [26] 何克勤, 李刘东, 吕 磊, 等. 甜叶菊离体保存技术研究[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(6): 1929 - 1935.
- [27] 韦坤华, 李林轩, 缪剑华, 等. 姜种质资源离体保存技术研究[J]. *北方园艺*, 2013(8): 112 - 116.
- [28] Gomes F, Clemente M, Figueiredo P, et al. *Castanea* spp. hybrid clones *in vitro* conservation: synthetic seeds vs. slow growth storage[J]. *Acta Horticulturae*, 2017, 1155: 37 - 44.
- [29] Vettorazzi R G, Carvalho V S, Sudre C, et al. Developing an *in vitro* optimized protocol to sweet potato landraces conservation[J]. *Acta Scientiarum Agronomy*, 2017, 39(3): 359 - 367.

杨长琴, 张国伟, 李 凯, 等. 大豆“症青”植株生物量与养分累积及分配特征[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(21): 66–72.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.21.010

大豆“症青”植株生物量与养分累积及分配特征

杨长琴¹, 张国伟¹, 李 凯², 王晓婧¹, 束红梅¹, 郭建秋³, 刘瑞显¹

(1. 江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏南京 210014; 2. 南京农业大学大豆研究所/国家大豆改良中心/

农业农村部大豆生物学与遗传育种重点实验室/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏南京 210095; 3. 洛阳市农林科学院, 河南洛阳 471023)

摘要:通过在大田中取样“症青”植株和设置防虫网室内接虫和减莢试验验证, 研究大豆“症青”植株生物量与养分累积及分配特征。结果表明, 与正常植株相比, “症青”植株营养器官生物量增加 31.2% ~ 328.1%, 而生殖器官生物量降低 33.3% ~ 73.5%。营养器官中碳含量降低 3.8% ~ 8.0%, 而氮、磷等营养元素含量增加, 其中氮含量增加 64.3% ~ 843.5%; 生殖器官中碳、氮含量分别降低 3.5% ~ 22.9% 和 4.0% ~ 38.5%, 而钙、镁、铁、锌含量呈增加变化。相关分析表明, 正常植株中碳含量与钙含量、氮镁含量与锌含量及磷与镁含量显著正相关, 而“症青”植株中相关不显著; 正常植株中氮磷钾镁与钙含量、碳钾与锌含量相关不显著, 而“症青”植株中相关显著。“症青”植株营养器官中碳、氮、磷、钾等累积量均显著增加而生殖器官中显著降低, 营养器官中碳、氮累积量分别增加了 0.2 ~ 3.1 倍和 1.8 ~ 31.5 倍, 而生殖器官中分别降低了 35.4% ~ 77.9% 和 36.3% ~ 79.7%, 养分经济系数均显著降低。综上, 养分平衡关系和分配改变, 增加了营养器官中养分累积而降低了生殖器官中的养分累积, 是大豆“症青”植株营养器官生物量增加而生殖器官生物量降低的生理原因。

关键词:大豆; “症青”; 生物量累积与分配; 养分累积与分配

中图分类号: S565.101

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2021)21-0066-07

大豆“症青”是大豆茎叶持绿现象的俗称, 表现为植株正常生育期结束时大豆仍然叶绿枝青、无

莢、少莢或莢而不实^[1-2]。近年来, 黄淮海地区大豆“症青”呈逐年加重趋势, 严重影响大豆产量, 已成为大豆生产上亟待解决的重要问题^[1-3]。

已有研究表明, 点蜂缘蝽等在大豆结莢和鼓粒期为害是“症青”发生的直接诱因, 可引起果莢发育停滞或脱落, 导致源库关系失衡, “源”器官合成的光合产物不能正常外运^[4-7], 影响植株生物量累积并改变其分配。植物生物量的形成以养分吸收为基础, 碳(C)、氮(N)、磷(P)、钾(K)、钙(Ca)、镁

收稿日期: 2021-04-25

基金项目: 国家重点研发计划(编号: 2018YFD0201000); 国家现代农业产业技术体系建设专项(编号: CARS-04)。

作者简介: 杨长琴(1972—), 女, 江苏仪征人, 博士, 副研究员, 主要从事作物栽培生理研究。E-mail: ychq2003@qq.com。

通信作者: 刘瑞显, 博士, 副研究员, 主要从事作物生理生态学研究。E-mail: liuruixian2008@163.com。

[30] Chauhan R, Keshavkant S, Jadhav S K, et al. *In vitro* slow-growth storage of *Chlorophytum borivilianum* Sant. et Fernand: a critically endangered herb[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 2016, 52(3): 315–321.

[31] 陈艺芝, 樊荣辉, 叶秀仙. 花叶金线莲离体保存技术研究[J]. 福建农业科技, 2019(6): 21–24.

[32] 王小乐, 迟天华, 刘颖鑫, 等. 甘露醇和蔗糖对菊花低温离体保存的影响[J]. 核农学报, 2019, 33(1): 60–68.

[33] 慈惠婷, 汪 阳, 周玉丽. 薄荷试管苗的离体保存[J]. 安徽科技学院学报, 2017, 31(4): 39–44.

[34] Roussos P A. Growth and biochemical responses of *jojoba* [*Simmondsia chinensis* (Link) Schneid] explants cultured under mannitol-simulated drought stress *in vitro*[J]. *Plant Biosystems*, 2013, 147(2): 272–284.

[35] Thakur S, Tiwari K L, Jadhav S K. *In vitro* approaches for conservation of *Asparagus racemosus* Willd[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 2015, 51(6): 619–625.

[36] Withers L A, Wheelans S K, Williams J T. *In vitro* conservation of crop germplasm and the IBPGR databases[J]. *Euphytica*, 1990, 45(1): 9–22.

[37] Gopal J, Chamail A, Sarkar D. Slow-growth *in vitro* conservation of potato germplasm at normal propagation temperature[J]. *Potato Research*, 2002, 45(2/3/4): 203–213.

[38] 蔡 鹏, 吴婵榕, 刘华英, 等. ABA 与 CCC 对南天竹离体保存的影响[J]. 中国现代中药, 2016, 18(9): 1180–1184.

[39] 荣 霞, 赖钟雄, 林玉玲, 等. 橄榄多酚氧化酶基因(*PPO*)克隆及其试管苗离体保存过程中的表达分析[J]. 热带作物学报, 2014, 35(4): 738–745.