

中图分类号: S532; S335.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2006)03-0145-05

马铃薯四倍体栽培种茎段组织的 EMS 诱变研究

董颖苹^{1,2}, 连 勇², 何庆才¹

(1. 贵州省农业科学院, 贵州 贵阳 550006; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100084)

摘要: 用 1% 的 EMS 溶液处理“中薯 2 号”试管苗茎段材料, 通过对诱变材料再生过程的观察、再生苗试管培养观察及移栽阶段的生理指标统计分析, 研究了 EMS 对马铃薯四倍体栽培种茎段组织化学诱变的作用。试验结果表明: EMS 能够有效渗入生长点细胞; 经 EMS 处理后试管苗生长量显著小于对照, 再生植株和组织器官发生变异; 试验证实 1% (v/v) 浓度 EMS 处理 4 h 以上具有明显的诱变效应, 可以应用于今后马铃薯诱变育种。

关键词: 马铃薯; 茎段; EMS; 诱变

马铃薯栽培种狭窄的遗传基础和复杂的倍性关系^[1], 一直是妨碍其育种效率的两大难题。诱变育种在植物部分性状的改良上, 通过作用于 DNA 结构的诱变剂 EMS 的使用, 创造或改良品种性状, 无疑是对育种资源不足的一种补充。这种方法在其他作物上已有运用并育成品种^[2], 但对多倍体的诱变效率, 由于其染色体间的复杂互动而受质疑。本研究试图通过高效化学诱变剂 EMS 处理四倍体栽培种的茎段组织, 探讨 EMS 对马铃薯四倍体栽培种诱变的有效性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料: 为中国农业科学院蔬菜花卉研究所马铃薯组提供的品种“中薯 2 号”脱毒试管苗。试验于 2004 年 7 月至 2006 年 2 月, 分别在中国农业科学院蔬菜花卉研究所和贵州省农业科学院生物技术研究所完成。

试管苗扩繁: 取低温保存的“中薯 2 号”试管苗 1 株切成约 1 cm 长、带有 1~2 个腋芽的茎段, 在 150 mL 三角瓶内培养扩繁, 继代 3 次, 待试管苗

扩繁至约 400 株, 苗长至 6~8 片叶时切取茎段用于诱变处理。培养基为 B₅+2%食用白糖+0.8%琼脂, pH=5.8, 培养温度 25℃, 光照 13 h·d⁻¹, 光强 2000 lx^[3]。

愈伤组织诱导: 取无腋芽的试管苗茎段于 B₅+2, 4-D 0.5 mg·L⁻¹+KT 1 mg·L⁻¹+食用白糖 2%+琼脂 0.8%培养基上诱导, pH=5.8。待茎段略微膨胀茎段两端愈伤化时用于诱变处理。

1.2 试验方法

1.2.1 EMS 处理

用 1% (v/v) 的 EMS 溶液处理愈伤化茎段、带顶芽茎段、带侧隐芽茎段和侧腋芽(芽已萌发)茎段各 100 个。以未处理茎段(CK1)和助溶剂水溶液(CK2)为对照。

愈伤化茎段处理: 处理液滴加在已略微膨胀的脱分化的茎段上, 转入 B₅+2, 4-D 0.5 mg·L⁻¹+KT 1 mg·L⁻¹+食用白糖 2%+琼脂 0.8%培养基上诱导植株再生, 观察再生植株变化。

带芽茎段处理: 将带顶芽、侧隐芽和侧腋芽茎段浸泡于处理液 4 h, 用无菌水清洗 3~4 次, 转入 B₅+2%食用白糖+0.8%琼脂培养基上生长观察。

1.2.2 再生苗扩繁移栽

EMS 处理后的再生试管苗, 在 B₅+2%食用白糖+0.8%琼脂培养基上扩繁 4 代, 经炼苗后移栽于 40 目防虫网棚内, 继续观察 2 代。

组培后代棚栽试验: 大棚内苗床基质整平、浇

收稿日期: 2006-04-06

基金项目: 贵州省科技厅资助项目(2005)400109 号; 农业部蔬菜遗传与生理重点开放实验室资助

作者简介: 董颖苹(1975-), 女, 助理研究员, 硕士研究生, 主要从事生物技术诱变育种研究。

* 通讯作者: E-mail: lianyong@mail.caas.net.cn

透水, 将长度约 5 cm 的带根试管苗, 洗净培养基, 移栽至苗床上, 株行距为 5 cm × 10 cm。收取小薯后, 将小薯按大小分级后再次播种在大棚苗床上, 株行距为 10 cm × 12 cm。大棚内水、肥、农药等按常规方法管理。

1.2.3 诱变后观察

试管苗观察: 各处理分别于处理后 5, 20, 50 d, 观察记载试管苗生长速度、株型、茎、叶等发育的变化特征。

网室栽培苗及薯块观察: 为验证 EMS 在四倍体栽培种上的诱变效应, 网室内对各株系进行株高、茎粗、茎形、茎色、叶形、叶色、薯色等观察记载。

1.2.4 淀粉、还原糖含量及块茎干物重测定

块茎干物重测定: 将鲜薯切薄片称重, 置于 45 温箱内烘干。转至玻璃干燥器中静置 12 h, 再次称重, 差减得到干物质重量, 用于计算干物质含量。

淀粉、还原糖含量测定: 委托贵州大学生命科学院资源与环境实验室测定。采用酒精浸提-砷钼酸比色法和酸水解酮还原碘量法, 滴定测定干薯的还原糖和淀粉含量。

对生长量等连续性性状指标计算平均值并进行差异显著性分析; 对不连续变量进行百分比统计; 对生长量、块茎中淀粉含量、还原糖含量及块茎干物重等进行平均数、变异系数及变异范围的分析。

2 结果与分析

2.1 EMS 的诱变效应

2.1.1 EMS 的处理效果

以 1% (v/v) EMS 浸泡带侧隐芽茎段 4 h 观察处理效果, 结果显示, 经 EMS 处理后继续成活的 50 个茎段呈半透明状态, 腋芽组织内外均表现出均一的白化现象 (图 1), 20 d 调查时有 10 个茎段在叶腋处出现绿点, 50 d 时绿点发育成小芽 (图 2)。说明 1% (v/v) EMS 处理试管苗带芽茎段, 试剂能够渗入芽生长点细胞组织内部, 在芽恢复生长、穿透表层组织的过程中, 生长点会继续接触分散在表层组织中的残余 EMS 分子, 成活下来的腋芽生长点能够再生成植株, 可以达到处理效果。

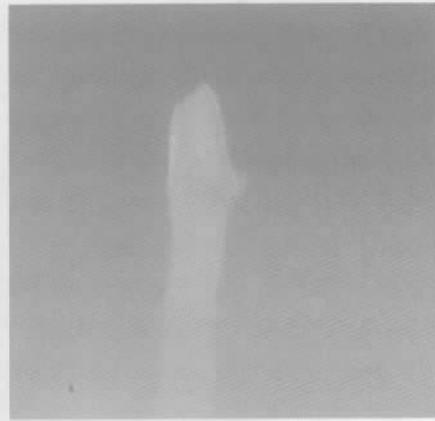


图 1 EMS 诱变处理马铃薯带侧隐芽茎段 5 d 后的茎切段



图 2 EMS 诱变处理马铃薯带侧隐芽茎段 50 d 后的茎切段

2.1.2 不同处理方式的诱变效应

由表 1 可知, 已成形的愈伤组织由于内外吸收溶液不均, 所用诱变剂量不易控制, 因此诱变效果差异很大、重复性差, EMS 溶液造成愈伤组织外部褐变不膨大, 尽管内部胚性组织褐变过程中由于褐变产生的低氧环境能少量形成再生苗, 但这些再生苗的变异与诱变剂作用并无直接相关; 顶芽和侧腋芽中, 包被芽的叶片能吸收较多 EMS 溶液, 造成叶片畸形生长, 生长点吸收到的诱变溶液实际小于标准溶液浓度。数据表明: 顶芽在诱变后 5 d、20 d 和 50 d 的生长量均不同程度地高于侧腋芽, 说明顶芽受 EMS 溶液影响小于侧腋芽; 侧隐芽有肉眼看不见的芽, 其表面也无叶片包被, 生长点上 EMS 溶液渗入均匀可靠效果也更直观、显著。侧隐芽是最好的诱变材料, 其次是侧腋芽。

表 1 1%(v/v) EMS 处理不同组织的诱变效应

组织	白化率 (%)	出芽率 (%)	5 d 生长量 (cm)	20 d 生长量 (cm)	50 d 生长量 (cm)
愈伤化组织	0	5	不膨大	不膨大	褐变死亡
顶芽	部分白化	100	现芽	1.8	7.5
侧隐芽	50	20	少许伸长	出现可见绿色芽点	现芽
侧腋芽	部分白化	100	芽不生长	全部出芽	5.0
CK1	0	100	2.0	7.0	10.0
CK2	0	100	1.5	6.2	9.8

注: CK1 是完全无处理的同源中薯 2 号组培继代苗; CK2 是与用诱变溶液中相同浓度的助溶剂处理的同源中薯 2 号组培苗。

2.2 EMS 处理对试管苗再生植株的影响

经 EMS 处理的再生植株早期表现生长减慢或停止, 恢复生长后部分发生矮化簇生现象。株高普遍小于正常植株。继代数次后陆续观察到茎色变绿、叶形狭长或枫叶形、不定根生长异常等变异现象。进入棚栽阶段仍发生新的性状变异, 如叶形变异、花变异镶嵌体、薯色变异都发生在棚栽 1 代以后。

2.3 EMS 处理对植株植物学形态的影响

2.3.1 植株矮化

EMS 处理后植株普遍发生矮化。秋季棚栽中薯 2 号平均株高 30 cm, 3 个诱变株系的株高平均值分别是 7.85, 7.69, 9.37 cm, 诱变株系平均株高 8.30 cm, 仅是对照组株高的 75%, 经 t 测验差异显著。

2.3.2 花器官异常

棚栽 5 代出现 1 株花瓣颜色变异与无花瓣变异的镶嵌体。此植株花瓣紫红色辐射状镶嵌白色, 同株上有 1 朵无花瓣的“花”, 花萼裂开露出雌雄蕊 (图 3)。棚栽 6 代由于气温低、光照差未开花, 无观察结果。



图 3 无花瓣镶嵌体

2.3.3 叶形变异

棚栽诱变处理植株中观察到, 第 4~9 顺序叶的顶叶与紧连的 1~2 片复叶边缘消失, 融合成一片叶的突变群体 (图 4)。



图 4 叶形变异

2.4 EMS 处理对植株生长的影响

2005 年冬季贵阳市气温突然降至 -4℃。突发的低温使许多大棚生长植株出现了冻伤、冻死现象, 75.53% 能正常生长的植株叶面出现了防御性的坏死斑点, 其中 6.19% 的植株因坏死斑点面积过大不能继续生长而死亡。经 EMS 诱变后发生叶片融合突变的植株群体没有出现冻伤、冻死现象, 只有 50% 的植株叶面发生坏死斑点, 28% 仅发生轻微坏死斑点, 未发生坏死斑点引起死亡现象, 表现出较强的抗寒性 (表 2)。

2.5 EMS 处理对块茎形成的影响

2.5.1 块茎皮色变异

EMS 处理后代 E10-1 新收获的薯块中发现一株薯块皮色为酱色的变异。同时发现后代 E10-4 的薯块在贮存后期薯皮色全部变为紫色, 其他株系并无此变化。

表2 经诱变发生叶片融合突变植株与同源无叶突变植株的生物、生化指标对比

处理	平均株高 (cm)	平均茎粗 (cm)	平均结薯数 (个)	叶片红斑状况 (%)					块茎主要成分 (%)		
				0级	1级	2级	3级	4级	淀粉含量	还原糖含量	干物重
MI	8.97	0.54	8.12	50.00	28.00	22.00	0	0	57.55	1.18	20.75
CK	7.66	0.43	6.59	24.47	42.55	20.21	12.77	6.19	56.06	0.80	21.08

注: MI 指叶片突变; CK 指未发生叶片突变的同源植株; 红斑等级: 0级为无斑; 1级为少量红斑; 2级为较多红斑; 3级为极多红斑; 4级为坏死。表中淀粉与还原糖均指占干重的百分含量。

2.5.2 块茎主要成分含量变化

表3所示, 诱变后代的块茎主要成分含量变异情况与对照存在差异。对照块茎中主要成分的含量较为稳定, 淀粉含量、干物重百分比和还原糖变异系数分别为4.99、9.83和4.98。诱变后代淀粉含量和干物重百分比与对照间有一定的差异但相差不

大; 还原糖变异系数高出对照3倍达28.17, 变异范围为0.47~1.59(干重百分比), 也远大于对照的变异范围0.81~0.97。说明EMS的诱变作用引起了还原糖含量比正常情况下出现更大的变异范围, 既出现了还原糖含量锐减, 也出现了含量急增的现象, 有利于从中筛选还原糖有关性状变异的品种。

表3 块茎主要成分含量变化

处理	淀粉含量 (%)			还原糖 (%)			干物重 (%)		
	平均值	变异系数	变异范围	平均值	变异系数	变异范围	平均值	变异系数	变异范围
诱变后代	56.39	3.24	52.78~59.75	0.85	28.17	0.47~1.59	20.67	3.94	19.09~22.74
对照	56.09	4.99	53.10~59.75	0.81	9.83	0.81~0.97	20.14	4.98	19.09~21.08

注: 表中淀粉与还原糖均指占干重的百分含量。

3 讨论

化学诱变近年来由于其操作方便, 危险性小得到了较多的运用, 取材主要以种子和花粉为主, 也有人用原生质体等进行诱变。少有对马铃薯栽培种特别是四倍体栽培种直接进行诱变的研究。本试验以四倍体马铃薯为试材, 进行诱变研究。初步结论是: 诱变剂EMS能够有效渗入生长点细胞。诱变剂的处理使试管苗生长量显著小于对照。经诱变处理的苗在20~50d内逐步恢复生长, 或较大程度恢复生长量。本试验在无其他胁迫处理下, 观察到马铃薯品种中薯2号经浓度为1%的EMS诱变引起了肉眼可以观察到的变异和可以分析的变异: 包括矮化、器官变异、块茎中还原糖含量变异。器官变异中, 叶形变异在繁殖第六代出现稳定趋势, 且观察数据表明, 叶形变异植株叶片发生寒冷引起的红色斑点明显数量少, 受害程度轻。EMS诱变剂的痕量残余作用在每一代都可能引起新的性状。大量有效的扩繁可以帮助细胞中被诱变的非生

长点细胞数量增加, 有助于嵌合体的纯化。

助溶剂对试管苗的生长有轻微的减缓作用, 这一影响在早期能较明显地观察到, 但生长20d以后与空白对照间生长量的差异越来越小, 50d后可忽略不计。排除助溶剂影响后, 可以认为EMS是引起生长量减小的直接原因。在4种用于诱变的组织中, 生长量受到诱变剂EMS影响由大到小的次序是: 愈伤组织, 侧隐芽, 侧腋芽, 顶芽。

突变体筛选中, 叶色在试管苗阶段与棚栽中表现不一致, 较难判断是否出现了可遗传的变异; 株高变异在诱变苗与对照间虽然差异极显著, 但经统计分析株高受种薯大小的影响大于诱变造成的影响, 因此叶色和株高都不适于作为筛选突变的指示性状。

在同样的生长条件、生长势和结薯数差异不大的情况下, 叶形变异的植株上发生叶片红斑症状明显轻于同组对照。叶突变群体块茎中干物重降低、淀粉含量增高, 平均还原糖含量比对照高50%。这种变化可能暗示块茎或植株中的代谢途径发生改

变。近年来研究表明,一类与饥饿基因相对的富足基因,如 ADP-葡萄糖磷酸酶、淀粉合酶、分支酶基因等在糖类富集时,表达量增加^[4]。这类“富足基因”表达量的增加,或许引起了相关代谢途径的变化最终导致了对寒冷的抵抗能力增强。

本试验初步证实,EMS 诱变结合茎段组培是一条可以使马铃薯四倍体栽培种产生变异的诱变途径。随着对育种对象的生理生化知识的深入了解,利用试剂诱变结合简便高效的组织培养扩繁平台,将能更高效地产生和利用对育种有更直接意义的突变株系和品种。

[参 考 文 献]

- [1] 孙慧生. 马铃薯育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 538-539.
- [2] Van Harten A M. Mutation breeding [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.
- [3] 连勇. 马铃薯脱毒种薯生产技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [4] 布坎南 B B, 格鲁依森姆 W, 琼斯 R L. 植物生物化学与分子生物学 [M]. 瞿礼嘉, 顾红雅, 白书农, 等, 译. 北京: 科学出版社, 2004.

EMS Induction Mutation of Stem Segments in Tetraploid Potato

Dong Yingping^{1,2}, Lian Yong², He Qingcai¹

(1. Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang, Guizhou 550006, China;

2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100084, China)

Abstract: The stem segments of potato cultivar Zhongshu 2 were treated with 1% (v/v) EMS solution, and mutation effects of EMS on tetraploid potato were studied through investigation of plant regeneration process and morphology of the regenerated plantlets in vitro, and physiological index of the plants grown in plastic tunnel as well. The EMS could penetrate into the cells of growing point. Growth increment of plantlets in vitro derived from the stem segments treated with EMS was significantly lower than that of controls, and variations of the regenerated plants and their organs were observed. The experimental data indicated that EMS treatment of stem segments in 1% (v/v) solution for 4 h could produce obvious mutations, suggesting that this technique can be used in mutation breeding of tetraploid potato.

Key Words: potato; stem segment; EMS; mutation



《中国马铃薯》编辑部尚有部分由陈伊里教授等主编、哈尔滨工程大学出版社出版的马铃薯产业与开发方面的图书, 供读者选购:

- 1 2000年出版的《面向21世纪的中国马铃薯产业》, 定价50元/本;
- 2 2002年出版的《高新技术与马铃薯产业》, 定价50元/本;
- 3 2003年出版的《中国马铃薯研究与产业开发》, 定价60元/本;
- 4 2005年出版的《马铃薯产业与东北振兴》, 定价60元/本。

另外, 2001、2002、2003、2004年《中国马铃薯》杂志精装本, 定价60元/本。有欲求购的单位或个人请另寄10%邮费, 款到即寄。

联系电话: 0451-55190003

联系人: 张立菲