

用野生型农杆菌菌株 B₆ 转化马铃薯试管苗组织的研究

潘 涛, 马惠萍, 杨全福

(甘肃省定西市临洮农业学校, 甘肃 定西 730500)

摘 要: 用野生型根瘤农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* B₆ 菌株对马铃薯四倍体栽培品种甘农薯 2 号、体细胞杂种 C-1-7、二倍体野生种 *S. tarijense* 和 2n 配子材料 09136.02 的试管苗茎段、完整叶、半叶等组织进行离体浸染。研究发现: 遗传率的大小与供试材料的倍性、组织是否致伤和伤口大小以及外植体的生理状态有关。

关键词: 马铃薯; 根瘤农杆菌; 遗传转化; 转化率

马铃薯是一种重要的粮菜兼用作物, 在农业生产和人民生活中均占有极为重要的地位。目前影响马铃薯生产发展的主要因素是马铃薯普通栽培种基因库贫乏, 缺乏抗病和抗逆性基因^[1], 而常规育种只能产生新的组合而不能创造新基因, 很难有新的突破。利用近年来发展起来的生物工程技术, 能从根本上改变植物遗传性, 解决品种问题。

以往的研究未能将野生型农杆菌作为转化基因的载体^[2], 其主要原因是有致癌基因破坏植物的激素平衡, 毛根难以成活, 但野生型农杆菌可以用无激素培养基进行筛选, 无需引入分解抗生素基因等选择标记基因^[3-4], Ti 质粒的 T-DNA 上含有细胞分裂素基因, 使菌株难以生根, 而 Ri 质粒的 T-DNA 上含有生长素基因有利于生根, 这样将二者结合起来使两类 T-DNA 进行双转化, 才有可能产生正常植株。此外由于农杆菌 T-DNA 在植物染色体上的整合位置不固定, 因此, 野生农杆菌的利用有待于进一步研究。

本研究通过用野生型根瘤农杆菌 B₆ 菌株对联合四倍体材料甘农薯 2 号、体细胞杂种 C-1-7、二倍体野生种 *S. tarijense* 和 2n 配子材料 09136.02 四种供试材料不同组织的浸染, 旨在摸索转化率与材料因素的关系, 以便为今后育种中转化目的基因打下基础。

收稿日期: 2005-11-25

作者简介: 潘涛 (1970-), 男, 讲师, 主要从事农作物的育种和教学工作。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本研究所用材料来源于甘肃省定西市临洮农业学校生物组培室所保存的四倍体栽培品种甘农薯 2 号和体细胞杂种 C-1-7、二倍体野生种 *S. tarijense*、2n 配体材料 09136.02 的试管苗, 用带有两个腋芽的茎切段法繁殖和保存。繁殖培养基为 MS + 0.5 mg·L⁻¹ IAA + 3% 蔗糖 + 0.42% 琼脂 (pH=5.8), 置于 25℃ 左右, 散射光下的培养室中培养和保存, 每隔 30~50 d 继代繁殖一次。

1.2 供试菌株

本实验所用菌株为野生型根瘤农杆菌 B₆ 菌株, 菌株在 4℃ 的冰箱中保存。

1.3 细菌培养和菌液制备

细菌培养: 将根瘤农杆菌 B₆ 菌株在固体培养基 YEM 上进行培养。首先, 将保存的菌种在 YEM 培养基上用接种针进行平板划线接种, 每 24~48 h 一次, 连划 2~3 次, 然后将接种好的菌种置于 25~28℃ 恒温箱内黑暗培养, 连续培养 24 h。

菌液制备: 在超净工作台上, 将培养好的新鲜透明菌落用接种针轻轻挑下, 置于预先制备好的 PBS 培养液中, 直到溶液出现混浊为止, 此时溶液中约含有 (10⁸~10⁹) · mL⁻¹ 个细菌。

所用培养基配方如下:

YEM: 0.2 g·L⁻¹ K₂HPO₄ + 0.2 g·L⁻¹ MgSO₄ + 0.1 g·L⁻¹ NaCl + 10 g·L⁻¹ 甘露醇 + 0.4 g·L⁻¹ 酵母提取物 +

0.8 g·L⁻¹ 琼脂 pH=6.9)
PBS 溶液: 430 mg·L⁻¹ K₂HPO₄+1480 mg·L⁻¹ Na₂HPO₄+720 mg·L⁻¹ NaCl pH=7.2)

1.4 浸染方法

在超净工作台上, 将甘薯 2 号等 4 种材料试管苗的叶片取下, 一部分叶片纵向剪开, 形成两半叶; 一部分除去叶缘, 形成伤口; 另外一部分则保持叶面完整。所用试管茎段, 则为不具腋芽 0.5 cm 长的茎段, 分别将上述材料投入预先制好的含菌株 B₆ 的菌液中, 同时不断摇动并浸泡 15~20 min, 以不含菌种的无菌蒸馏水浸泡作为对照。然后依次取出茎段及各类叶片用无菌吸水纸吸干菌液, 再分别接入 I 和 II 两种培养基中, 置于温度 25℃左右散光下的培养室中培养并观察。

所用培养基配方如下:

I: MS 基本培养基 不含蔗糖和激素) +0.5 g·L⁻¹ 羧苄青霉素 pH=5.8)
II: 蒸馏水+5 g·L⁻¹ 琼脂 pH=5.8)

2 结果与分析

2.1 茎 段

用菌株 B₆ 处理过的茎段在 25℃左右培养室内散射光条件下培养 10 d 后, 培养基 I 和 II 上的茎段相继在致伤部位开始出现绿色小突起, 随后发育成绿色且质地致密的瘤组织, 癌瘤组织起先在茎段两端形成, 随后发展成为典型的哑铃形。根瘤农杆菌 B₆ 菌株对不同试管苗茎段诱瘤效果情况的比较见表 1。

表 1 根瘤农杆菌 B₆ 菌株对不同试管苗茎段诱瘤效果的比较

材 料	培养基 类型	处理茎段 数	形成瘤外植体 数	诱瘤率 (%)
甘农薯 2 号	I	56	0	0
	II	59	10	20.4
C-1-7	I	53	0	0
	II	50	11	24.0
09136.02	I	47	1	21
	II	63	21	33.0
S. tarigense	I	51	0	0
	II	48	13	27.0
CK	I	47	0	0
	II	55	0	0

注: ① 处理茎段数为浸染总数, 包括后来在培养基中死去的部分; ② 诱瘤率为浸染 25 d 的统计结果; ③ 对照为用蒸馏水浸染的 4 种混合材料的茎段。

由表 1 可以看出, 菌株 B₆ 对不同材料诱导效果不同, 四倍体的甘农薯 2 号和 C-1-7 癌瘤发生率明显低于二倍体的 S. tarigense 和 2n 配子材料 09136.02。

2.2 叶 片

在被根瘤农杆菌 B₆ 菌株处理过的完全叶、半叶以及除去叶缘的叶片, 培养 15 d 左右, 先在伤口处, 后在叶边缘及其叶表面均发生了转化的瘤组织, 但叶片上产生的瘤组织的量相对减少, 并且叶片上不能产生瘤组织的部分在培养过程中逐渐黄化死亡, 瘤组织为绿色或黄绿色, 形状为球形。根瘤农杆菌 B₆ 菌株对不同叶片诱瘤效果情况的比较见表 2。

表 2 根瘤农杆菌 B₆ 菌株对不同叶片诱瘤效果比较

材 料	叶片类型	处理叶 片数	形成瘤 外植体数	诱瘤率 (%)
甘农薯 2 号	完全叶	22	0	0
	半叶	36	3	8.3
	除去叶缘的叶片	15	2	13.3
C-1-7	完全叶	33	2	6.0
	半叶	42	4	9.5
	除去叶缘的叶片	28	4	14.2
09136.02	完全叶	21	0	0
	半叶	42	6	14.2
	除去叶缘的叶片	25	5	20
S. tarigense	完全叶	27	2	7.4
	半叶	35	4	11.4
	除去叶缘的叶片	23	4	17.3
CK	完全叶	25	0	0
	半叶	38	0	0
	除去叶缘的叶片	24	0	0

注: ① 处理叶片数为浸染总数, 包括后来在培养中死亡的部分; ② 诱瘤率为 30 d 后的统计结果; ③ 对照为蒸馏水浸染 4 种材料的各类叶片; ④ 培养基类型为 II。

由表 2 可知, 二倍体材料 S. tarigense 和 2n 配子材料 09136.02 的诱瘤率均明显高于四倍体的甘农薯 2 号和 C-1-7, 并且二倍体材料诱变成瘤的速度也高于四倍体材料。同时发现叶片的诱瘤率 and 出现瘤组织的速度均匀: 除去叶缘的叶片 > 半叶 > 完全叶; 同材料的叶片转化率均低于茎段转化率; 生长旺盛的组织转化率高于生长慢的组织。

3 结 论

由上述研究分析可知: 转化率与倍性有关, 倍性越高, 转化率则越低, 反之, 倍性越低, 转化率越

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2006)03-0156-04

玉溪市山区马铃薯引种试验示范研究

李明福

(云南省玉溪农业职业技术学院, 云南 玉溪 653100)

摘要: 通过对马铃薯品种性状、种植密度、种植方式进行同田对比试验。经统计分析结果表明: 马铃薯新品种中甸红每 667 m² 种植 6665 株、13330 块茎 25 cm×40 cm 的产量和质量最高, 显著优于当地主栽品种米拉。为本地区马铃薯品种升级换代和完善栽培技术提供科学依据。

关键词: 马铃薯; 引种; 试验

玉溪市华宁县宁州镇火头村主要种植马铃薯, 马铃薯是该村的一大支柱产业。全村常年种植面积近 227 hm², 居全县首位。长期以来, 由于品种单一, 种质退化, 耕作粗放, 栽培技术落后等原因, 2001 年(历史最高年)平均单产仅为 1175 kg(鲜薯), 远远低于发达国家的 3000 kg 的水平。因此, 解决该村马铃薯品种退化, 进行脱毒良种的试验示范, 使其增产增值, 增加农民收入, 成为该村乃至全县马铃薯种植区急待解决的问题。2004 年农业科技人员从海拔 2043 m 的玉溪市江川县农业局农技站繁种基地引进新品种中甸红, 进行试验示范, 通过品种比较试验、种植密度对产量产值的影响、马铃薯起垄与常规打塘的种植方式同田对比试验, 均表现出明显的效益。为该地区乃至全县马铃薯品种升级换代和完善栽培技术提供科学依据, 加快当地种植业结构调整, 推进农业产业化进程, 促进马铃薯种植区农民增收、农业增效、农村发展。

收稿日期: 2005-10-12

作者简介: 李明福(1964-), 男, 讲师, 硕士, 主要从事作物栽培、教学和科研工作。

高, 二倍体材料 09136.02、*S. tarigense* 转化率明显高于四倍体的 C-1-7 及甘农薯 2 号。4 种材料转化率表现为: 09136.02>*S. tarigense*>甘农薯 2 号>C-1-7。

[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.

1 材料与方法

1.1 试验地点的基本情况

研究地点位于华宁县城东北山区宁州镇火头村, 距离县城 40 km, 属北温带气候区, 海拔 2030 m, 年平均气温 10℃, 最冷月平均气温 5℃, 最热月平均气温 19℃, 极端最低气温 -5℃, 有霜冻, 年总积温 5000℃, 年降雨量 1800 mm, 年均日照 2230 h, 土壤为轻质壤土。

1.2 试验材料

试验材料用引进脱毒马铃薯: 中甸红(三级种)和当地的马铃薯当家品种米拉。中甸红系迪庆州农业科学研究所 20 世纪 80 年代中期从红宣品种的大田中优选出单株, 经多年系统选育, 于 1991 年育成。2001 年经专家鉴定会议审定, 并经云南省农科院生物所脱毒。该品种植株形状直立, 株高 0.76 m, 叶色浓绿, 茎绿色, 花冠白色, 天然结实性好, 生长势强。块茎椭圆形, 表皮光滑, 芽眼微红色且多, 皮淡黄色, 肉白色。休眠期中等, 耐贮藏, 生育期 97 d, 耐旱耐寒性强。抗青枯病, 耐

[2] 司怀军, 王蒂, 戴朝曦, 等. 我国马铃薯组织培养和细胞培养研究进展[J]. 中国马铃薯, 2000, 14(4): 220-224.

[3] 周思军, 李希臣, 刘昭军, 等. 通过农杆菌介导将菜豆几丁质酶基因导入马铃薯[J]. 中国马铃薯, 2000, 14(2): 70-72.

[4] 张俊莲, 王蒂. 我国马铃薯育种方式的变迁及其转基因育种研究进展[J]. 中国马铃薯, 2005, 19(3): 163-168.