

菊芋组织培养及继代苗遗传稳定性的 SSR 分析

杨世鹏, 赵孟良, 孙雪梅, 陶丽婷, 李莉

(青海大学 农林科学院, 青海省蔬菜遗传与生理重点实验室, 青海 西宁 810016)

摘要:以“青芋 2 号”茎段为试验材料, 考察了不同培养基对菊芋愈伤组织诱导、丛生芽诱导及生根培养的影响, 并利用已优化的 SSR-PCR 反应体系对不同继代次数的菊芋试管苗进行遗传稳定性分析。结果表明:适宜菊芋离体增殖的培养基植物生长激素调节物质配比为 MS+1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA, 适合菊芋生根培养基最佳配比为 1/2MS+0.1 mg/L IBA。从继代 8 次的组培苗中分析其遗传的变化, 在检测出的 50 个条带中, 个体之间未发生变异, 生物学性状上亦未发现明显差异。试验表明在多次继代培养过程后, 菊芋的遗传物质未发生明显变化, 为今后菊芋快繁及离体保存等提供了技术参考。

关键词:菊芋; 组织培养; SSR-PCR; 遗传稳定性

中图分类号:S 632.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)20-0091-04

菊芋(*Helianthus tuberosus* L.)属菊科向日葵属多年生草本植物, 俗名洋姜、鬼子姜, 抗旱、抗寒、耐贫瘠, 是一种抗逆性极好的植物^[1]。目前, 菊芋大规模工业化生产对苗木繁殖的要求越来越高, 而菊芋的繁殖主要还是依靠块茎自然繁殖, 在引种、繁殖及生产过程中容易造成菊芋病害的积累, 导致菊芋产量、品质下降和种性退化等问题^[2]。在植物组织培养过程中, 植物体细胞易发生无性系变异, 其发生的途径有其遗传学基础, 可从形态学、细胞学、生物化学和分子生物学等多个方面对其进行综合检测和鉴定^[3]。保持原有品种的优良特性和遗传稳定性是避免组培生产损失的关键^[4]。

SSR(Simple Sequence Repeat 简单重复序列)是近

几年来发展迅速的分子标记技术, 具有重复性好、多态性高等优点。目前已有国内外学者利用分子标记技术对多种材料如桉树^[5]、越橘^[6]、木薯^[7]等进行了体细胞无性系变异的研究报道。该试验以菊芋茎段为试验材料, 对菊芋的组织培养技术进行研究。并通过 SSR 分子标记技术对菊芋继代苗进行检测, 进一步验证了组培苗的遗传稳定性, 对菊芋的种质资源保存及研究有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料“青芋 2 号”菊芋为青海省农林科学院菊芋研发中心自主选育审定品种, 取块茎打破休眠之后, 栽种于栽培土与蛭石 1:1 配比的花盆内, 待植株长至约 20~30 cm 时取其地上茎段部分作为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 菊芋外植体的选取与消毒 将“青芋 2 号”地上部分用清水洗净之后, 除去叶片, 然后将茎段剪成约 1~2 cm 无根节间的茎段, 在自来水下反复冲洗后, 放置于超净工作台上, 75%乙醇浸泡 20 s, 无菌水冲洗 2 次, 然

第一作者简介:杨世鹏(1990-), 男, 青海湟源人, 硕士研究生, 研究方向为菊芋生理及分子。E-mail:200806773@qq.com.

责任作者:李莉(1959-), 女, 江苏丰县人, 本科, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为蔬菜栽培与生理。E-mail:yyslili@163.com.

基金项目:青海省科技厅资助项目(2012-H-809)。

收稿日期:2015-05-28

gradient of IPG strip, sample loading, isoelectric focusing conditions and different SDS-PAGE separation gel. The results showed that the protein was dissolved quickly, more pure and in high concentration after extracting by TCA-acetone/phenol method. The system with 17 cm pH 5-8 IPG strips, loading 600 μ g samples, focusing to 80 000 Vh and separating by 11% SDS-PAGE gel showed good two-dimensional electrophoresis maps. The system was also suitable for different grape seed protein.

Keywords: grape; seed; proteomics; Two-dimensional electrophoresis (2-DE)

后用 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 6 min, 无菌水冲洗 5 次后置于无菌滤纸上吸干水分, 备用。

1.2.2 菊芋无菌苗的获得 以 MS 为基本培养基, 将茎段正接接种于不同激素浓度配比的培养基上, 置于光照培养箱中进行光照培养, 培养温度 (23±2)℃, 光照时间 14 h/d, 光照强度 1 500~2 000 lx。观察培养生长情况, 10 d 后统计结果。

1.2.3 不定芽的分化及继代培养 将愈伤组织转接到分化培养基上进行不定芽诱导, 待不定芽长至约 3~4 cm 时, 将其剪下进行继代培养, 选取长势良好、颜色嫩绿的丛生苗进行继代培养, 每瓶接种 4 个带芽茎段。取第 1 代继代苗作为分子鉴别的对照, 其余无菌苗连续继代 8 次, 每次继代时间为 25 d。

1.2.4 生根及移栽 当无菌苗培养至约 5 cm 时, 截取长约 3 cm 的无菌苗植株茎段在生根培养基上培养。30 d 之后, 选取植株健壮, 根系发达的无菌苗至培养钵 (蛭石: 栽培土=1:1), 14 d 后移栽至试验地并观察植物学性状。

1.2.5 继代苗的遗传稳定性分析 选取经过 8 次继代培养的菊芋幼嫩叶片, 采用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒提取样品基因组 DNA 并检测质量。用 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 判断 DNA 分子大小一致性。—20℃ 保存备用。参照任鹏鸿等^[9] 发表的引物序列, 筛选出 3 对能扩增出清晰稳定条带的引物用于该研究, 具体序列信息见表 3。PCR 扩增体系包括 10×PCR 扩

增缓冲液, 2.50 mmol/L Mg²⁺, 0.20 mmol/L dNTPs, 0.30 μmol/L 正反引物, 0.2 U Taq DNA 聚合酶和 50 ng 模板 DNA, 用去离子水补齐至 25 μL。取 5 μL 扩增产物于 1.2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 保存图像。

1.3 数据分析

定期观察无菌苗的生长状况并统计数据。利用筛选出的引物对 2 个菊芋品种进行分子鉴别, 对 SSR 电泳图进行读带, 对扩增条带按有(1)或无(0)进行人工统计。

2 结果与分析

2.1 6-BA 与不同浓度 NAA 对菊芋愈伤组织及不定芽诱导的影响

在接种 15 d 后, 对照和 6 种激素浓度配比处理均产生了愈伤组织, 并且愈伤组织长势较好, 基本呈现一致, 但不同激素浓度对比对不定芽数和苗高的影响存在显著性差异。由表 1 可知, 6 种激素浓度配比处理的不定芽数均比对照多, 并且差异明显; A₁ 与 A₆ 差异不显著, A₂ 和 A₃ 差异不显著, 但均超过对照 1~2 个不定芽数量, 接种后的长势也比对照强, 主要表现为对照处理下的愈伤组织产生的不定芽多数呈玻璃化状, 30 d 左右时均已干枯, 而 A₅ 和 A₆ 处理在 20 d 左右已经开始产生不定芽, 30 d 左右时 A₆ 处理苗高于其它处理, 叶片鲜绿色, 无叶片卷曲、植株萎蔫等现象。因此, 适宜菊芋离体增殖的培养基植物生长激素调节物质配比为 MS+1.00 mg/L 6-BA+0.50 mg/L NAA。

表 1 6-BA 与不同浓度 NAA 对菊芋愈伤组织及不定芽诱导的影响

Table 1 Effect of 6-BA and different proportions NAA on jerusalem artichoke callus induction and adventitious buds

处理 Treatment	产生愈伤 Have callus	不定芽数 Number of adventitious buds/个	苗高 Height/cm	叶片数 Number of leaves/片
CK ₀	是	1.12e	1.33c	5.85a
A ₁ : 1.00 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA	是	3.21b	2.01b	4.21b
A ₂ : 1.00 mg/L 6-BA+0.02 mg/L NAA	是	2.29d	1.46c	4.44b
A ₃ : 1.00 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA	是	2.36d	1.44c	4.01b
A ₄ : 1.00 mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA	是	2.64c	1.58c	4.35b
A ₅ : 1.00 mg/L 6-BA+0.20 mg/L NAA	是	3.55a	1.82b	4.64b
A ₆ : 1.00 mg/L 6-BA+0.50 mg/L NAA	是	3.16b	2.55a	4.58b

注: 同列不同小写字母表示差异显著 (P<0.05)。

Note: The same column lowercase letters mean significant difference (P<0.05).

2.2 不同浓度 IBA 对菊芋生根的影响

将生长健壮的无根试管苗接种在 4 种不同的生根培养基上进行诱导生根, 10 d 之后统计结果, 与对照相比, 附加植物生长激素的处理生根较早。从表 2 可以看出, 处理 B₃: 1/2MS+0.1 mg/L IBA 在接种 10 d 之后生根率高达 100%, 高于添加 NAA 的 80.2% 和 88.3%, 诱导的根数亦以 B₃ 处理为最高, 平均根数为 6.9 个, 远高于 B₁ 和 B₂ 2 个处理, 从根系生长的情况来看, 处理 B₂ 和 B₃ 的根系较细, 但是添加 NAA 的 B₂ 处理在试验移栽过程中表现出根系脆弱, 容易脱落的现象。并且 NAA

表 2 不同浓度 IBA 对菊芋生根的影响

Table 2 Effect of different concentrations of IBA on rooting jerusalem artichoke

处理 Treatment	平均根数 The average number of roots/个	生根率 Rooting rate/%	根系状态 The state of root
CK: 1/2MS	3.4	55.3	根系粗壮分散, 长度约 0.5 cm
B ₁ : 1/2MS+0.1 mg/L NAA	3.1	80.2	根系粗壮, 长度约 0.5 cm
B ₂ : 1/2MS+0.2 mg/L NAA	3.5	88.3	根细, 长度约 0.5 cm
B ₃ : 1/2MS+0.1 mg/L IBA	6.9	100.0	根细且紧凑, 长度约 1.0 cm
B ₄ : 1/2MS+0.2 mg/L IBA	5.5	95.5	根系粗壮, 长度约 1.0 cm

能够促进节间生长,抑制根的伸长,与添加 IBA 的处理相比添加 NAA 的处理根系不长。由此表明,1/2MS+0.1 mg/L IBA 组合更适合菊芋的生根。

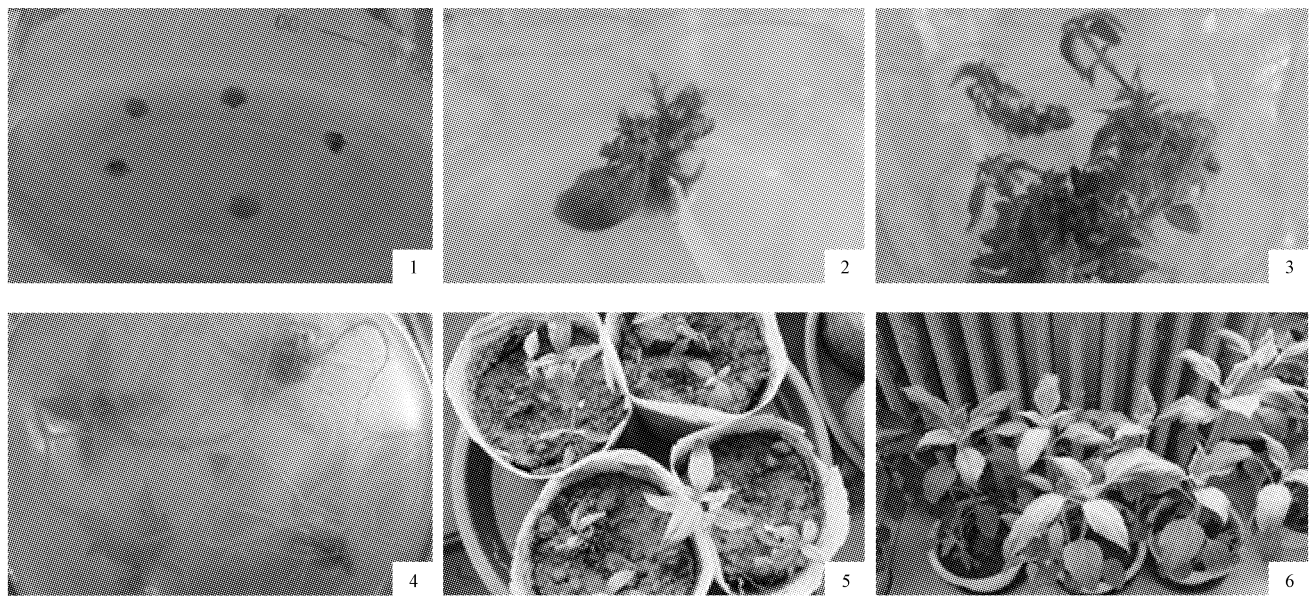
2.3 继代培养过程中菊芋无菌苗外形的变化

菊芋试管苗每 25 d 继代 1 次,在 8 次继代过程中没有发生明显变化,在第 1 次继代过程中,试管苗叶片颜色翠绿,但是在继代过程中发生了玻璃化现象。从第 4 代到第 8 代过程中,组培苗生长速度明显变慢,但颜色、叶形、株高等均没有发生明显变化,将组培苗移栽到花

盆中之后亦未见明显变异,与对照苗保持一致。

2.4 继代培养菊芋无菌苗的 SSR 检测结果

由表 3、图 2 可知,利用选出的 3 对能扩增出清晰稳定条带的引物,对“青芋 2 号”不同继代次数的组培苗基因组进行 SSR-PCR 扩增,结果表明,3 种引物总扩增出 50 个条带,其中发生变化的条带数 0 条,变异率为 0%,与对照相比,菊芋在继代 8 次之后,并未发生变异。说明菊芋茎段分化苗继代培养具有较高的遗传稳定性。



注:1,茎段外植体形成的愈伤组织;2,不定芽的生成;3,不定芽增殖;4,生根培养;5,练苗移栽;6,盆栽观察。

Note:1,Callus explants stems formed;2,Adventitious bud generation;3,Adventitious buds;4,Rooting;5,Hardening transplanting;6,Potted observation.

图 1 菊芋组织培养过程中外植体形态的变化

Fig. 1 Change of Jerusalem artichoke tissue culture process morphology of explants

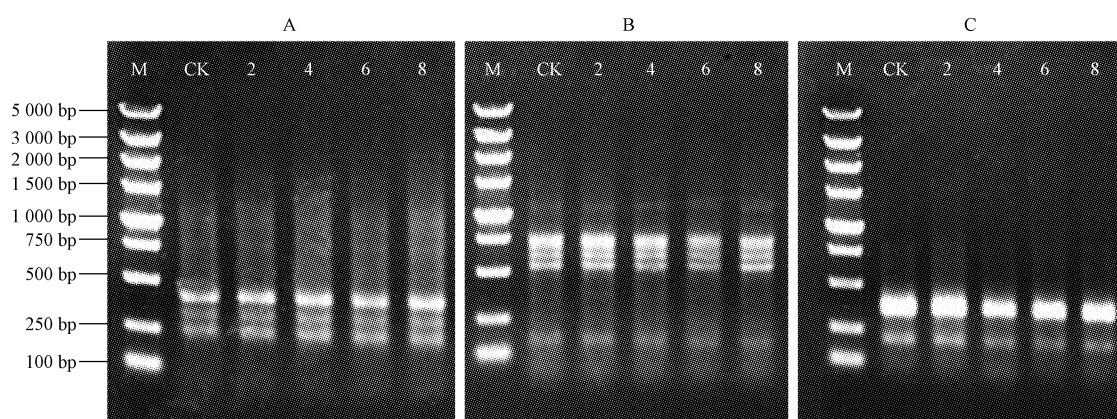
表 3 用于 SSR 检测的引物
Table 3 Primers screened for SSR test

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	记录的条带数 Record number of bands/条	变化的条带数 The changed number of bands/条	退火温度 Annealing temperature/℃
ORS0351	F: TGAAACGTAGTAACCTGCCAAA	15	0	57.2
	R: TTGGACGACCTCGGTATCTT			
ORS0798	F: GCAAATAAACACCCATCTAGGG	25	0	54.2
	R: AGGAATTGATCCGAACGTGT			
ORS0963	F: CCTCCTAGGGTGTGAGGATGAG	10	0	57.2
	R: TCGAACTCTGGCTCTTGTAGTTG			
合计		50	0	

3 讨论

菊芋是植物组织培养的经典植物,但也是公认难以愈伤再生的植物^[10],所以利用组织培养技术进行菊芋种质资源的创新研究存在困难。同时菊芋主要通过无性繁殖形成块茎,其种子结实率很低,严重影响了菊芋的杂交育种。该试验在前人研究的基础上继续对菊芋组织培养体系进行优化,旨在建立一套菊芋高效再生体系。同时在组织培养中产生无性系变异是一种非常普

遍的现象^[11]。随着继代次数的增加,培养材料的遗传稳定研究已经成为人们关注的问题,而近些年来菊芋生产规模的扩大及块茎不易储藏等问题,使得菊芋的组培技术发展已经提上日程,组织培养技术目前已经在蔬菜、花卉等生产上得到了广泛的应用。该研究建立以菊芋品种“青芋 2 号”为初始材料,通过诱导不定芽继代培养,成功建立了一套适合菊芋的组织培养体系。利用 SSR 分子标记技术对菊芋的继代苗基因组 DNA 进行分



注:M,DNA Marker DS™5 000;CK;2~8,不同继代数组培苗。

Note:M,DNA Marker DS™5 000;CK;2-8,the different generation of subculture plantlets.

图2 SSR引物 ORS0351 (A)、ORS0798 (B)、ORS0963(C)对菊芋不同继代数组培苗扩增结果

Fig.2 The amplification results of different generation of subculture plantlets by SSR primers ORS0351 (A),ORS0798 (B),ORS0963 (C)

析,得到的DNA条带无论是带型还是条带的强弱程度均为一致,证明短期继代未对菊芋的碱基序列产生影响,DNA水平上未发生变异,其遗传物质稳定。

参考文献

- [1] 李莉,孙雪梅. 青海高原菊芋产业发展探析[J]. 中国种业,2011(9):22-24.
- [2] 闫海霞,汪卫星,向素琼. 菊芋的组织培养及快繁技术研究[J]. 南方农业,2009(3):58-61.
- [3] 李晓玲,丛娟,于晓明,等. 植物体细胞无性系变异研究进展[J]. 植物学通报,2008,25(1):121-128.
- [4] 刘祖昕,谢光辉. 菊芋作为能源植物的研究进展[J]. 中国农业大学学报,2012,17(6):122-132.
- [5] 覃子海,蓝肖,吴幼媚,等. 利用ISSR检测桉树组培苗遗传稳定性的研究[J]. 热带农业研究,2013,33(4):26-29.
- [6] 李晓艳,张志东,李亚东,等. 越橘组培苗遗传稳定性研究[J]. 吉林农

业大学学报,2009,31(5):521-523.

- [7] 陈志林. 木薯种质超低温保存及其再生植株遗传稳定性的研究[D]. 海口:华南热带农业大学,2007:18-19.
- [8] 于海玲,王发国,李仕裕. 东方百合离体再生前后叶片遗传稳定性的ISSR检测[J]. 亚热带农业研究,2014,10(2):35-40.
- [9] 任鹏鸿,韩睿,马胜超,等. 菊芋 SSR-PCR 反应体系优化及 3 个品种的分子鉴别[J]. 西南农业学报,2013,26(6):2441-2446.
- [10] 陈军. 体外诱变与组织培养在菊芋种质创新中的应用研究[D]. 武汉:华中农业大学,2009:13-27.
- [11] 刘福平. 植物体细胞无性系变异的遗传基础及主要影响因素[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(6):1142-1151.
- [12] 严德凯,刘兆普,隆小华. 菊芋试管苗的初代培养及愈伤组织不定芽诱导[J]. 植物资源与环境学报,2014,23(4):108-110.
- [13] 柴素芬,陈兆贵,赖苏芬. 利用ISSR技术检测梅菜试管苗的遗传稳定性研究[J]. 北方园艺,2010(11):144-147.

Culture of Jerusalem Artichoke *in vitro* and Assessment of Genetic Stability Using SSR

YANG Shipeng,ZHAO Mengliang,SUN Xuemei,TAO Liting,LI Li

(Qinghai Vegetable Genetics and Physiology Laboratory, College of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016)

Abstract: Taking ‘QingYu 2’ stem segment explants as materials, the effect of different media on jerusalem artichoke callus induction, shoot induction and rooting culture was studied. The genetic stability of subculture jerusalem artichoke plantlets with different generation were analyzed using optimized SSR-PCR reaction system. The results showed that suitable media for cultivating jerusalem artichoke plants *in vitro* was: MS+1.00mg/L 6-BA+0.50 mg/L NAA, and 1/2 MS+0.10 mg/L IBA was suitable for rooting. Analysis of genetic variation from the subculture 8 times in tissue culture, no variation between individuals among the 50 detected bands, also no significant differences in the biological traits. The results indicated that genetic material was not significantly changed in jerusalem artichoke, and provided a technology platform for propagation of jerusalem artichoke in future.

Keywords: jerusalem artichoke; tissue culture; SSR-PCR; genetic stability