

烷化剂 EMS 处理对芦笋愈伤组织生长的影响

菅文磊, 卢 钢

(浙江大学 蔬菜研究所, 浙江 杭州 310029)

摘 要:以 3 个芦笋品种‘UC800’、‘冠军’、‘硕丰’为材料,研究了烷化剂甲基磺酸乙酯(EMS)处理对芦笋愈伤组织生长的影响。结果表明:在相同培养条件下不同材料的脱分化率及生长速度不同,‘硕丰’脱分化率最高。0.7% EMS 对愈伤组织的致死率及褐化率显著高于 0.5% EMS,并且相同浓度的 EMS 处理对不同材料的影响有显著差异,对‘冠军’影响极显著。培养的愈伤组织在含有激动素 KT(1 mg/mL)的培养基上分化率最大,达 61.8%;材料‘冠军’的分化率显著高于其它两个材料。该体系可用于芦笋抗性突变体的筛选。

关键词:芦笋;愈伤组织;EMS 处理;突变体诱导

中图分类号:S 644.603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)11-0169-04

近年来,植物组织培养技术与理化诱变技术相结合,诱导有益突变体应用于植物育种,已越来越受到人们的重视。离体培养细胞的自发突变率低,而利用各种诱变剂处理,可以提高培养细胞突变率 10~100 倍^[1]。甲基磺酸乙酯(EMS)是植物最有效的化学诱变剂之一,已成功地用于水稻^[2]、小麦^[3]、油菜^[4]、茄子^[5]等多种作物的诱变育种。

芦笋(*Asparagus officinalis* L.)又名石刁柏,属百合科天门冬属,以嫩茎为食的雌雄异株多年生植物,是出口创汇的一种高档蔬菜。我国是世界上最大的芦笋种植、加工、出口基地,种植面积在 10 万 hm²。但我国多数产区,尤其是南方各省,茎枯病的发生日益严重。芦笋茎枯病是一种世界性分布的毁灭性病害,在中国、日本、美国、巴西、法国等 20 个国家发生危害,一般发病率 50%~100%,病茎枯死率 10%~30%,重者全田毁灭,每年造成巨大的经济损失^[6]。我国芦笋产区常常发生因该病的严重为害而造成基地成片翻耕改种或边种边毁的现象。但国内外均没有高抗茎枯病的种质资源。利用组织培养技术筛选高抗突变体材料,有可能成为一种理想的途径。试验用 EMS 处理芦笋愈伤组织,观察经烷化剂 EMS 处理后愈伤组织存活率以及分化情况,为进一步研究筛选芦笋抗性突变体提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

第一作者简介:菅文磊(1982-),男,河北南宫人,硕士,主要从事植物基因组及分子调控研究。
通讯作者:卢钢。E-mail: glj@zju.edu.cn。
基金项目:浙江省科技厅资助项目(2005c32013)。
收稿日期:2007-06-07

甲基磺酸乙酯(EMS)分析纯,购自 Sigma。芦笋品种‘UC800’购自杭州市种子子公司,‘冠军’和‘硕丰’购自山东潍坊芦笋研究所。

1.2 试验方法

1.2.1 芦笋愈伤组织培养 外植体:剪取 3 个不同品种的芦笋新萌发幼苗嫩茎,先用自来水冲洗 2~3 遍,再取 2~2.5 cm 长的茎尖,在超净工作台上用 70%的酒精浸 5 min,在 0.2%的 HgCl₂ 溶液中消毒 12 min 之后,用无菌水漂洗 4~5 次,最后用无菌滤纸吸干水分。消毒后的芦笋外植体在接种前还须用无菌刀切成 5~7 mm 的小段,以利于脱分化过程中养分的吸收。培养条件:MS 培养基+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂粉+1.5 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L KT^[7]。培养基在 121℃,0.1~0.14 Kpa 下高压灭菌 20 min。将处理好的芦笋外植体接种于不同激素组合的培养基中,在温度(25±2)℃黑暗条件下培养,隔 25 d 继代培养(图 1-A)。继代培养基为 MS 培养基+蔗糖 30 g/L+琼脂粉 8 g/L+0.75 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT。观察记录愈伤组织的生长情况,统计不同品种芦笋的分化率。

1.2.2 EMS 处理对愈伤组织生长和分化的影响 参考 Lee 的方法^[8]进行 EMS 处理,0.5% EMS(或 0.7% EMS)溶液包含:MS 液体培养基+0.5%/0.7%(v/v) EMS+250 mg/L(w/v)柠檬酸+250 mg/L(w/v)抗坏血酸。在无菌条件下分别向每个已培养的芦笋愈伤组织培养皿中加入 5 mL EMS 溶液,在(25±2)℃黑暗条件下缓慢摇动(60 rpm)6 h,后用 MS 液体培养基冲洗 5 次,以不加 EMS 溶液为对照。将处理完的各个材料的愈伤组织转移到新的继代培养基中,在(25±2)℃黑暗条件下恢复生长,观察处理后芦笋愈伤组织生长情况。把处理后的愈伤组织分别在分化培养基(MS 培养基+30 g/L

蔗糖+8 g/L 琼脂粉+1 mg/mL KT)分化培养(图 1-B),并观察记录愈伤组织分化情况。

1.2.3 不同激素对芦笋愈伤组织分化的影响 将经继代培养的胚性愈伤组织,分别在不同激素、不同浓度的培养基中分化(图 1-C),所用激素及其浓度分别为:1、2、3 mg/mL 的 BA 与 0.1 mg/mL NAA 组合,以及1 mg/mL KT^[8](表 1)。培养 50 d 后观察芦笋愈伤分化率以及愈伤组织的生长情况。将分化出的芦笋幼芽移入增殖分化培养基^[8](MS 培养基+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂粉+2.0 mg/L BA+1.0 mg/L NAA)中增殖培养(图 1-D)。

1.2.4 生根培养及移栽 根的诱导:将继代培养成的小苗,剪切成 2~3 cm 的带芽茎段,转入生根培养基(1/2 MS 培养基+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂粉+0.5 mg/L IBA)中进行生根诱导(图 1-E)。练苗及移栽:经过生根培养的芦笋,当根长达到 2 cm,并有少许侧根长出时便可进行移栽(图 1-F),在移栽前要先进行练苗,打开培养瓶,让芦笋苗暴露在空气中,并适当遮荫。练苗 3~5 d后,将组培苗移植到配好且灭菌后的营养土中,并进行适当遮荫、保湿。当根茎部抽生出 1~2 条新茎时,便可移到大田定植(图 1-G)。

2 结果与分析

2.1 芦笋愈伤脱分化情况

将消毒处理的芦笋外植体接种于脱分化培养基中,接种 7 d 后茎段均开始轻度膨大,15 d 后能产生较多绿色愈伤组织,其中材料‘硕丰’脱分化率为 75.2%,高于其它两个材料。25 d 后转入继代培养基中增殖生长,愈伤长成浅绿或黄色,其中材料‘冠军’与‘硕丰’愈伤增殖系数显著高于材料 UC800’,但“冠军”与“硕丰”之间无显著差异(表 1)。从结果可以看出不同基因型的材料脱分化率差异显著,同时愈伤生长速度也有明显差异,说明芦笋不同基因型材料愈伤形成能力有显著差异。

表 1 不同芦笋材料愈伤脱分化及增殖生长情况

材料	外植体数 /块	脱分化愈伤 总数/块	脱分化 率/%	继代增殖后 愈伤总数/块	增殖系数
UC800	213	136	63.8	160	1.18
冠军	120	54	45	190	3.52
硕丰	105	79	75.2	240	3.04

2.2 EMS 处理对芦笋愈伤生长的影响

利用较高浓度的 EMS 溶液处理芦笋愈伤组织,能够显著的增加愈伤组织的死亡率及褐变率,0.7% EMS 溶液对愈伤组织的褐变率、死亡率显著高于 0.5%EMS(表 2)。利用相同浓度(0.5%)的 EMS 处理不同材料的芦笋愈伤组织,结果表明用 0.5% EMS 处理不同材料的愈伤组织产生了不同的影响,其中对材料‘冠军’的影响最大,褐变率与死亡率分别为 15.1%、73.5%。其次是‘硕丰’,对‘UC800’的影响最小。表明随着 EMS 溶液浓度提高愈伤组织存活率明显下降,并且对不同基因型的

材料影响也不相同。

表 2 不同浓度的 EMS 处理对‘硕丰’愈伤组织生长的影响

EMS 浓度 /V · V ⁻¹	愈伤块数 /块	褐变愈伤 /块	褐变率 /%	死亡愈伤 /块	死亡率 /%
0(CK)	30	0	0	0	0
0.5%	93	5	5.4	6	6.5
0.7%	104	20	19.2	15	14.4

表 3 0.5% EMS 处理对不同芦笋材料愈伤组织生长的影响

材料	愈伤块数 /块	褐变愈伤 /块	褐变率 /%	死亡愈伤 /块	死亡率 /%
UC800	248	3	1.2	0	0
硕丰	93	5	5.4	6	6.5
冠军	185	28	15.1	136	73.5

2.3 愈伤组织分化及增殖

不同激素对愈伤组织分化有很大的影响,愈伤组织在 1mg/L KT 中分化率最大达到 61.8%,其次是 1 mg/mL BA+0.1 mg/mL NAA,分化率为 31.3%。随着 BA 浓度的增大愈伤组织的分化率减小,并且在含 KT 的培养基中分化的芽数也最多,平均达 3.5 个嫩芽(表 4)。因此,利用含有 1 mg/L KT 的激素的培养基作为分化培养基。

表 4 不同激素对芦笋愈伤组织的分化作用

所用 激素	浓度 /mg · mL ⁻¹	愈伤数 /块	分化愈伤 数/块	分化率 /%	分化 丛芽数	平均 丛芽数
KT	1	34	21	61.8	74	3.5
BA+NAA	1+0.1	32	10	31.3	18	1.8
	2+0.1	30	5	16.7	10	2.0
	3+0.1	31	2	6.4	4	2.0

表 5 不同材料的愈伤组织经 EMS 溶液处理后分化情况

材料	处理 组合	愈伤块 数/块	分化愈伤 /块	分化率 /%	分化丛 芽数	平均分 化丛芽数
UC800	CK	46	28	60.9	42	1.5
	0.5% EMS	318	13	4.1	16	1.2
冠军	CK	56	36	64.3	111	3.1
	0.5% EMS	60	21	35	71	3.4
硕丰	CK	65	34	52.3	45	1.3
	0.5% EMS	154	2	1.3	2	1.0
	0.7% EMS	113	3	2.7	3	1.0

经过 EMS 溶液处理后,不同材料的愈伤组织分化情况各不相同,其中材料‘冠军’分化最早,在愈伤组织接入分化培养基中后 7 d 就开始分化,在 10 d 左右分化速度达到最快,随后分化速度减慢,但仍然继续分化,且产生的丛生芽数要高于其它两个基因型的材料;其次是材料 UC800,在接种后 10 d 开始分化,但分化速度慢;经 EMS 处理后愈伤组织分化率显著低于其对照的愈伤组织分化率;分化最慢的是‘硕丰’,其产生的愈伤组织质地紧密,分化慢,在第 25 天时才开始分化,但经过 EMS 处理后的愈伤组织要比其对照分化早,而利用不同 EMS 溶液浓度处理的愈伤组织分化率没有显著差异(表 5)。

3 讨论

EMS 溶液对愈伤组织的生长以及愈伤分化有显著影响, 并且随着处理浓度的升高, 愈伤组织的存活率及褐化率都明显增加, 0.7%EMS 溶液对愈伤组织的存活率要显著高于较低浓度的 EMS 溶液。同时经 EMS 处理后的愈伤组织分化率显著低于其对照愈伤组织的分化率。而且 EMS 的这种影响存在着基因型的差异。不同基因型的芦笋材料在脱分化过程中存在着差异。经相同浓度 EMS 溶液处理后, 材料 ‘冠军’ 存活率显著低于其他两个材料, EMS 对材料 ‘UC800’ 影响很小, 表明不同的基因型材料与烷化剂之间有不同的反应, 品种 ‘冠军’ 在愈伤生长阶段对 EMS 处理高度敏感。但在愈伤再生不定芽的过程中, 经过 EMS 处理的 ‘冠军’ 的分化率显著高于其它两个材料, 尤其分化愈伤的繁殖系数明显高于另外两个品种。这说明 EMS 处理在愈伤组织生长和分化的不同阶段效应不同。针对不同的基因型建立相应的 EMS 诱变体系是非常重要的。

芦笋愈伤组织在外观上有颜色深浅及疏松程度的

差异。试验开始选择较疏松的愈伤组织进行处理, 但由于有些类型数量少, 加上形态上划分难以把握, 所以后来采用将大愈伤组织切割为 0.5 cm 见方的小块接入培养基中, 以培养的时间选择愈伤组织。这种处理方法简单, 较易掌握。

近些年来利用烷化剂 EMS 作为诱变剂, 诱导提高植物细胞突变以获得较高的突变率在很多作物上取得了显著的成果, 杨镇^[10]等利用 EMS 诱变剂对玉米自交系进行改造, 并获得 104 株变异植株; 刘君绍^[5]等利用烷化剂 EMS 诱变茄子愈伤组织, 并获得一株中抗黄萎病的三月茄抗病突变体 142-E; 在油菜^[4]、番茄^[11]、长春花^[12]等园艺作物上也得到了一些突变体植株, 并得到了一些理想基因型的材料, 为遗传育种创造了新材料。试验利用 EMS 作为诱变剂诱导芦笋愈伤, 研究了烷化剂 EMS 对不同基因型的愈伤组织的生长及对愈伤分化的影响, 以期为进一步筛选芦笋抗茎枯病突变体提供试验依据。

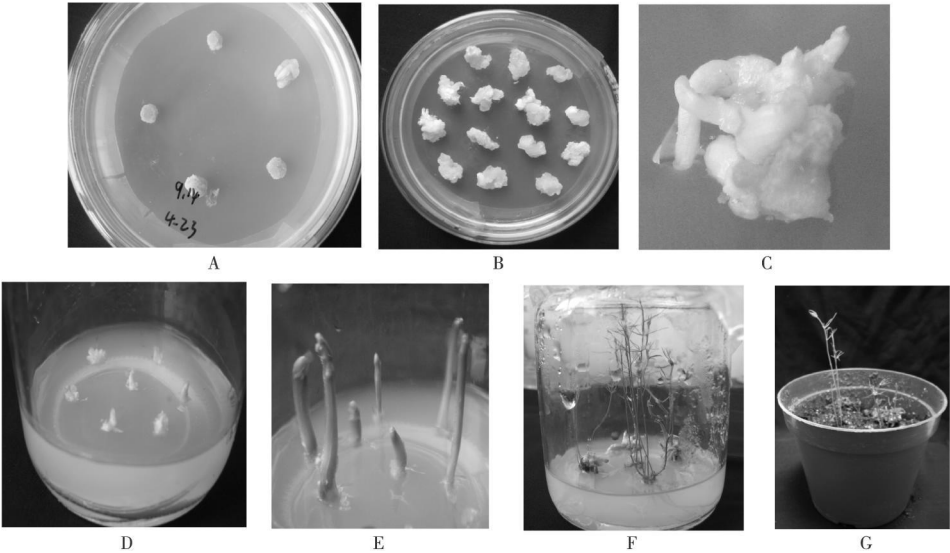


图 1 芦笋茎段愈伤组织分化及再生过程

A: 脱分化出的愈伤组织 B: 分化的愈伤组织 C: 分化出芽的愈伤组织 D: 伸长的芽 E: 未生根的幼苗 F: 生根的幼苗 G: 移栽出的幼苗

参考文献

[1] 张小玲, 林恭松, 王元辉. 烷化剂 EMS 处理水稻愈伤组织诱导突变的方法初探[J]. 安徽农业科学, 1999, 27(6): 528-530.
[2] 顾佳清, 张智奇, 周音, 等. EMS 诱导水稻中花 11 突变体的筛选和鉴定[J]. 上海农业学报, 2005, 21(1): 7-11.
[3] 王谨, 刘桂茹, 杨学举. EMS 诱变小麦愈伤组织选择抗旱突变体的研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(12): 190-193.
[4] 和江明, 王敬乔, 陈薇. 用 EMS 诱变和小孢子培养快速获得甘蓝型油菜高油酸种质材料的研究[J]. 西南农业学报, 2003, 16(2): 34-36.
[5] 刘君绍, 田时, 炳皮伟, 等. 茄子抗黄萎病突变体离体筛选-II[J]. 西南农业学报, 2003, 16(4): 102-106.

[6] 王政逸, 石刁柏茎枯病的研究概况及存在的问题[J]. 中国蔬菜, 1995 (6): 50-54.
[7] Pontaroli AC, Camadro EL. Plant regeneration after long term callus culture in clones of Asparagus officinalis L[J]. Biocell, 2005, 29(3): 313-317.
[8] Lee J H, Lee S Y. Selection of stable mutants from cultured rice anthers treated with ethyl methane sulfonic acid[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 71: 165-171.
[9] 沈火林, 赵娜, 韩清霞, 等. 芦笋离体快速繁殖中嫩茎增殖培养对根分化的影响[J]. 2006, 21(增刊): 46-49.
[10] 杨镇, 刘晓丽, 李刚. EMS 诱变剂对玉米自交系改造效果的研究[J]. 辽宁农业科学, 2006(5): 7-10.

美洲落葵的组织培养及快速繁殖

张云峰¹, 严胜荣¹, 谢庆华¹, 桑林¹, 谢世清²

(1. 云南师范大学 生命科学学院, 昆明 650092; 2. 东南亚薯类作物研究与培训中心 昆明 650201)

摘要:以美洲落葵试管苗的茎段为材料, 通过正交实验设计, 以平均增殖倍数和茎段平均长度为指标, 对美洲落葵的组织快繁培养基进行了筛选。结果表明: $MS+0.08\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{BA}+0.03\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{GA}_3$ 是最佳培养基, 在该培养基中, 5 种材料的平均增殖倍数均在 20 倍以上, 除 U2 外, 茎段平均长度提高均在 7 cm 以上。在添加 $1/2\text{ MS}+0.03\text{ mg/L}$ 的生根培养基中, 7~10 d 开始长根, 15 d 后即可长出 1.0~2.0 cm 的须根 3~6 条, 生根率可达 100%。

关键词: 美洲落葵; 茎段; 平均增殖倍数

中图分类号: S 636.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)11-0172-03

美洲落葵(*Ulluco*, *Ullucus tuberosus*), 作为安地斯地区的四大大块茎作物之一, 在植物学分类上属落葵科(Bassellaceae), 块根落葵(*Ullucus*)属^[1], 国内也有人将其

称为乌卢库薯^[2]。该属在南美地区具有丰富的遗传多样性, 目前发现 70 多个克隆或生态株系, 块根的色泽具有白、黄、绿、红紫色^[3,4]。由于其在安第斯地区的食物组成中占有重要的地位, 尽管没有充足的科学依据, 当地妇女认为食用美洲落葵有助减轻怀孕和分娩中的痛苦^[5]。现代的研究表明, 美洲落葵的含水量一般高于 75%、蛋白质含量为 1%、碳水化合物含量为 10%~14%、氨基酸组分中除缺少色氨酸和缬氨酸外, 其余的含量均较为平衡; 同时由于其叶片含有丰富的钙和类胡萝卜素, 因此是典型的菜食两用型作物^[6]。在原产地,

第一作者简介: 张云峰(1964), 男, 副教授, 主要从事植物遗传及植物资源研究。E-mail: xqinghua@vip.sina.com。

通讯作者: 谢庆华(1958-), 女, 高级农艺师, 主要从事资源评价及植物资源开发。

基金项目: 云南省农业厅国际合作资助项目(YNPG-CIP)。

收稿日期: 2007-06-26

[1] 顾玉成, 吴金平. 利用离体培养技术筛选抗病突变体的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2004(2): 56-58.

[2] 张秀省, 张荣涛, 曹岚等. EMS 诱变的长春花细胞系突变研究[J]. 中草药, 2004, 35(11): 1293-1296.

Effect by EMS Treating *Asparagus officinalis* Callus in Vitro

JIAN Wen-lei, LU Gang

(Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The effect of Ethyl methyl sulfonate(EMS) treating on the proliferation and regeneration of in vitro callus from *Asparagus officinalis* seedling was studied using three varieties, 'UC800', 'Guanjun', 'Shuofeng'. The proliferation rate and growth rate of the callus was found to be significantly different among different genotypes, and the proliferation rate of the variety 'Shuofeng' were highest. The callus was obviously inhibited on the medium containing 0.5% EMS, and more significantly on the higher concentration of 0.7% EMS. The effect was depended on the genotypes, and the callus from 'Guanjun' was most susceptible to EMS treatment among three test varieties. The regeneration rate of the in vitro callus was significantly affected by the combinations of different plant growth regulators in the media and the highest rate with 61.8% was found in percent of bulblet when cultured in the MS media containing with $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}$. When compared with different genotypes, the Guanjun was most easy for induction the stem. The combination of in vitro callus culture and EMS treatment will provide a potential tools for screening the mutant with biotic and abiotic resistance in asparagus breeding program.

Key words: *Asparagus officinalis*; callus; EMS; Mutant induction