

马铃薯茎段高频再生体系的建立

杨明贺^{1,2}, 朱旭², 李楠², 李传龙^{2,3}, 郝东云², 贺红霞^{2*}

(1. 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118; 2. 吉林省农业科学院农业生物技术研究所/吉林省农业生物技术重点实验室, 长春 130033; 3. 吉林师范大学生命科学学院, 吉林 四平 136000)

摘要:以大西洋、春薯3号、春薯5号、吉薯1号马铃薯脱毒试管苗为试验材料,对茎段再生体系进行研究,筛选与优化马铃薯再生体系的条件,以期建立马铃薯高频再生体系。结果表明:大西洋的愈伤组织诱导及分化效果最佳,诱导的愈伤组织呈鲜绿色,诱导出芽用时最短,诱导率和分化率分别为100%和95%。春薯3号、春薯5号、吉薯1号的分化率分别达79.4%、68.75%、85.7%。其中在添加2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D+0.4 mg/L KT的MS培养基中,四个品种马铃薯的茎段均能形成愈伤组织,20 d愈伤组织诱导率均达100%。

关键词:马铃薯;茎段;再生体系

中图分类号:S532

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2019)01-0057-06

Establishment of Stem-Based High-Frequency Regeneration Procedure for Potato

YANG Minghe^{1,2}, ZHU Xu², LI Nan², LI Chuanlong^{2,3}, HAO Dongyun², HE Hongxia^{2*}

(1. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 2. Institute of Agricultural Biotechnology, Jilin Academy of Agricultural Sciences/Jilin Provincial Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Changchun, 130033; 3. College of Life Sciences, Jilin Normal University, Siping 136000, China)

Abstract: The detoxification seedlings of potato cultivars ‘Atlantic’, ‘Chunshu 3’, ‘Chunshu 5’ and ‘Jishu 1’ were used as experimental materials, and the conditions of their stem tissue regeneration were explored and optimized with an aim to establish an efficient regeneration protocol in potato. The results showed that ‘Atlantic’ exhibited advantages over the 4 cultivars tested in terms of callus induction and differentiation. Under our experimental condition, Atlantic’s stem tissue sprout quickly and differentiated into callus of bright green with an induction rate and differentiation rate of 100% and 95%, respectively. The differentiation rates of other 3 cultivars were estimated to be 79.4% for ‘Chunshu 3’, 68.75% for ‘Chunshu 5’ and 85.7% for ‘Jishu 1’. Using the MS medium supplemented with 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.4 mg/L KT, the stem tissue of the 4 potato cultivars may be differentiated completely into callus within 20 days.

Key words: Potato; Stem segments; Regeneration system

马铃薯别名又称山药蛋、洋芋、土豆,是世界第四大粮食作物,也是粮、菜、饲加工兼用的作物^[1-3]。马铃薯栽培种为同源四倍体,遗传背景复杂,依靠传统的育种方法提高马铃薯品质十分困难。近些年来,生物技术的迅速发展为培育马铃薯新品种提供了新的思路。植物组织培养技术已

经成为植物基因工程中改良植物性状、创造新品种的重要手段。高频且稳定的再生体系是进行马铃薯基因工程操作的先决条件和基础^[4-5]。目前,研究者已经对马铃薯叶片^[6-7]、茎段^[8-11]、花药^[12]、块茎^[13-15]、原生质体^[16-17]等进行了大量的研究。但是,马铃薯再生体系的建立仍受到基因型^[18-19]、外植体种类^[9]、激素种类及浓度^[10,13]和培养条件^[20]等因素的影响。据国际食品政策中心(IFPRI)和国际马铃薯中心(CIP)联合研究结果表明,到2020年,马铃薯在世界范围内的需求量会增长到40%,超过水稻、小麦和玉米的增长速度^[21]。因此,迫切需要选育出更抗病、更耐逆、更高产、更优质和专

收稿日期:2018-11-28

基金项目:吉林省农业科技创新工程自由创新项目(CXGC2018JC002、CXGC2018ZY034)

作者简介:杨明贺(1994-),女,在读硕士,主要研究方向:马铃薯基因工程研究。

通讯作者:贺红霞,女,博士,副研究员,E-mail: hehx35@cjaas.com

用的马铃薯新品种。然而,至今马铃薯仍没有一套可以普遍应用的再生体系,以至于在进行马铃薯品种的遗传转化之前都要先建立相应的再生体系。因此,良好再生体系的建立对农杆菌介导的有效遗传操作和获得稳定表达的转基因株系均具有重要的理论和实践意义。

通过对吉林省种植作物的效益比较分析得出水稻、玉米和马铃薯位于前三位,马铃薯以其经济效益高在吉林省种植结构中占有不可或缺的地位^[22]。本研究以吉林省主栽的大西洋、春薯3号、春薯5号、吉薯1号马铃薯脱毒试管苗为试验材料,对茎段再生体系进行研究,筛选与优化马铃薯再生体系的条件,以期建立马铃薯高频再生体系。为马铃薯高效基因工程育种、品种改良、基因功能研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为大西洋、春薯3号、春薯5号、吉薯1号马铃薯的脱毒试管苗,由吉林省农业科学院

和吉林省蔬菜花卉科学研究院提供。试验中所用的6-苄基嘌呤(6-BA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、萘乙酸(NAA)、激动素(Kinetine, KT)、赤霉素(GA)和反式玉米素(ZT)均购自Sigma公司。

1.2 方 法

1.2.1 试管苗的扩繁

将2~3 cm长含有一个腋芽的茎段竖插于pH为5.8、附加了30 g/L蔗糖、7 g/L琼脂的MS培养基中。培养条件:温度为26℃,光照强度为2 000 lx,光照时间为16 h/d。3~4周苗龄的试管苗即可用于实验。

1.2.2 愈伤组织诱导培养基的筛选

将培养好的适龄的马铃薯脱毒试管苗剪成0.5~1 cm左右的无腋芽的茎段,接种于附加不同种类、不同浓度激素的MS培养基(表1)上进行愈伤组织诱导。每组试验设2个重复,每个品种接种20个外植体,20 d后根据愈伤组织生长情况统计愈伤组织诱导率(愈伤组织诱导率=诱导愈伤组织的外植体数/外植体总数×100%),确定最佳诱导愈伤组织的激素组合。

表 1 愈伤组织诱导培养基 mg/L

试验编号	6-BA	2,4-D	KT	NAA
C1	1	1	0	0
C2	1	0.5	0.2	0.5
C3	1	0	0.4	1
C4	2	1	0.2	1
C5	2	0.5	0.4	0
C6	2	0	0	0.5
C7	3	1	0.4	0.5
C8	3	0.5	0	1
C9	3	0	0.2	0

1.2.3 愈伤组织分化培养基的筛选

20 d后,将形成愈伤组织的茎段置于不同激素浓度的分化培养基(表2)中分化培养,每组试验设2个重复,每个品种接种20个外植体,每隔10 d观察分化情况,根据分化情况统计分化率(愈

伤组织分化率=分化出芽外植体数/外植体总数×100%),确定最佳激素配比。培养条件:温度为26℃、光照强度为2 000 lx、光照周期为16 h/d。直观分析法参照徐仲安等^[23]的正交实验设计。

表 2 愈伤组织分化培养基 mg/L

试验编号	6-BA	KT	ZT	IAA	GA3	2,4-D
S1	2	0.2	2	0	0	0
S2	2	0	3	0	0.5	0

2 结果与分析

2.1 大西洋马铃薯再生体系的建立

大西洋茎段外植体在 C1、C5、C6、C9 中均有愈伤组织形成,诱导率分别为 25%、100%、37.5%

和 60%(表 3)。在 C1 和 C6 中愈伤组织呈黄色,在 C5 和 C9 中形成的愈伤组织分别为黄绿色(图 1)和鲜绿色(图 2),在 C9 中部分茎段可直接分化出芽(图 2)。

表 3 大西洋茎段愈伤组织诱导结果统计表

试验编号	接种外植体数(个)	出愈外植体数(个)	愈伤组织形态	诱导率(%)
C1	40	10	黄色	25
C2	40	0	黄绿色	0
C3	40	0	黄绿色	0
C4	40	0	黄色	0
C5	40	40	黄绿色	100
C6	40	15	黄色	37.5
C7	40	0	黄绿色	0
C8	40	0	黄绿色	0
C9	40	24	鲜绿色	60

通过直观分析法得出四种激素对大西洋愈伤组织的形成影响作用大小依次为:NAA>6-BA>2,4-D>KT;直观分析法得出的最佳激素组合为:2.0 mg/L 6-BA,0.5 mg/L 2,4-D,0.4 mg/L KT,与本试验结果相一致。

诱导出的愈伤组织均在 S1 中分化出芽,从

C1、C5、C6、C9 中转出的茎段从接种到出芽结束时间分别为 42 d、33 d、41 d、40 d,分化率分别为 80%、77.5%、85%和 95%(图 3)。虽然 C5 和 S1 的组合用时最短,但 C9 和 S1 的组合分化率最高,为大西洋最理想的再生体系。

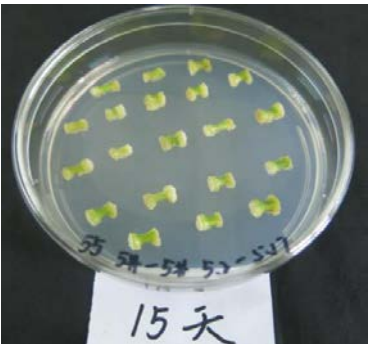


图1 5号培养基愈伤组织诱导

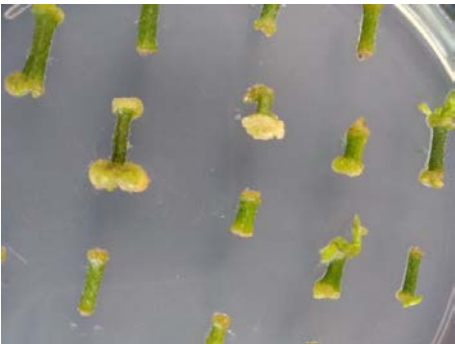


图2 9号培养基愈伤组织诱导



图3 大西洋芽的分化

2.2 春薯3号马铃薯再生体系的建立

春薯3号马铃薯在 C1、C2、C3、C5、C6、C7 中

均有愈伤组织形成,在 C5 中愈伤组织生长状态最好,呈鲜绿色(图 4),诱导率为 100%(表 4)。

表 4 春薯3号茎段愈伤组织诱导结果统计表

试验编号	接种外植体数(个)	出愈外植体数(个)	愈伤组织形态	诱导率(%)
C1	40	20	鲜绿色	50
C2	40	24	黄绿色	60
C3	40	18	黄绿色	45
C4	40	0	黄绿色	0
C5	40	40	鲜绿色	100
C6	40	24	黄绿色	60
C7	40	6	黄绿色	15
C8	40	0	黄绿色	0
C9	40	0	黄绿色	0

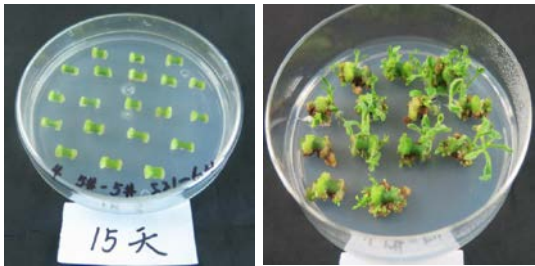


图4 春薯3号愈伤组织的诱导

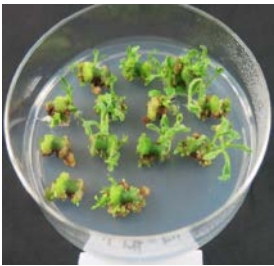


图5 春薯3号芽的分化

通过直观分析法得出四种激素对春薯3号愈伤组织的形成影响效果大小依次为:6-BA>NAA>KT>2,4-D;直观分析法得出的最佳激素组合为:2.0 mg/L 6-BA,0.5 mg/L 2,4-D,0.4 mg/L KT,与本

试验结果相一致。
从C5中转出的愈伤组织在S1中分化出芽,从接种到出芽结束时间为62 d,分化率为79.4%(图5)。从其他诱导培养基中转出的茎段在S1中分化率最高不超过30%。因此,C5和S1的组合分化率最高,为春薯3号最理想的再生体系。

2.3 春薯5号马铃薯再生体系的建立

春薯5号在除C9中均有愈伤组织形成,在C5中愈伤组织生长状态最好,呈鲜绿色(图6),诱导率为100%(表5)。但愈伤组织在分化培养基中大部分呈现黄色或黄绿色,并且后期发生褐化(图7)。

表5 春薯5号茎段愈伤组织诱导结果统计表

试验编号	接种外植体数(个)	出愈外植体数(个)	愈伤组织形态	诱导率(%)
C1	40	26	黄绿色	65
C2	40	23	黄绿色	57.5
C3	40	20	黄绿色	50
C4	40	26	黄色	65
C5	40	40	鲜绿色	100
C6	40	18	黄色	45
C7	40	15	黄色	37.5
C8	40	32	黄绿色	80
C9	40	0	黄绿色	0

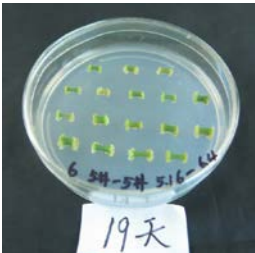


图6 春薯5号愈伤组织的诱导

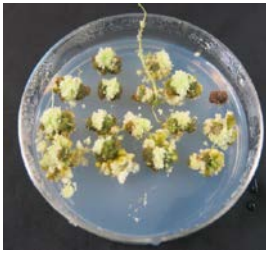


图7 春薯5号芽的分化

通过直观分析法得出四种激素对春薯5号愈伤组织的形成影响作用大小依次为:2,4-D>6-BA>KT>NAA。直观分析法得出的最佳激素组合为:2.0 mg/L 6-BA,0.5 mg/L 2,4-D和1.0 mg/L NAA。与C5相比,两个培养基的差别在于激素NAA和KT的添加。根据本试验结果NAA对春薯5号愈伤组织诱导的影响最小,推断2.0 mg/L 6-BA,0.5 mg/L 2,4-D和0.5 mg/L KT为春薯5号愈伤组织最佳诱导培养基。

表6 吉薯1号茎段愈伤组织诱导结果统计表

试验编号	接种外植体数(个)	出愈外植体数(个)	愈伤组织形态	诱导率(%)
C1	40	10	枯黄	25
C2	40	20	黄色	50
C3	40	0	枯黄	0
C4	40	15	黄色	37.5
C5	40	40	黄绿色	100
C6	40	28	黄色	70
C7	40	20	黄色	50
C8	40	8	黄色	20
C9	40	36	黄绿色	90

在芽诱导阶段,春薯5号在S1中不分化,仅表现出茎段的膨大;从C5中转出的愈伤组织在S2中分化出芽,从接种到出芽结束时间为48 d,分化率为68.75%。

2.4 吉薯1号马铃薯再生体系的建立

吉薯1号马铃薯在除C3中均有愈伤组织形成(表6),但愈伤组织大部分呈现黄色甚至枯黄,在C5中愈伤组织呈黄绿色,结构致密紧实(图8),诱导率为100%。

通过直观分析法得出四种激素对吉薯1号愈伤组织的形成影响作用大小依次为:NAA>6-BA>KT>2,4-D;直观分析法得出的最佳激素组合为:2.0 mg/L 6-BA,0.5 mg/L 2,4-D和0.2 mg/L KT。与C5相比,KT的浓度降低为0.2 mg/L。可以做验证试验在同样达到100%诱导率的情况下,可以降低KT使用量。

从C5中转出的愈伤组织在S1中分化率较低,仅为37.5%;在S2中分化率为85.7%(图9),从接种到出芽结束时间为48 d。

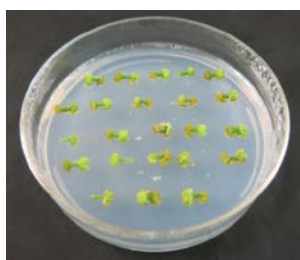


图8 吉薯1号愈伤组织诱导



图9 吉薯1号芽的分化

3 讨论

在本试验中,四个马铃薯品种均成功建立了茎段高频再生体系。培养基不同对同一外植体诱导再生的效果是有差异的^[24]。在C5愈伤组织诱导培养基中的诱导率均能达到100%,愈伤组织为黄绿色或鲜绿色,且结构致密。通过芽诱导试验表明黄绿色和鲜绿色这两种颜色的愈伤组织均能分化出芽且分化率较高,说明这两种颜色且致密的愈伤组织是可诱导分化的组织,这为以后在诱导愈伤组织阶段有效愈伤组织的识别提供了参考依据。

植物激素的种类和浓度是影响马铃薯茎段愈伤组织分化的主要因素,不同基因型的不同再生阶段所需的激素浓度也有所差异,这与同为茄科植物的番茄有相似性^[25]。在分化阶段,大西洋、春薯3号、吉薯1号马铃薯的愈伤组织在S1中分化,

且分化率分别达到95%、79.4%和37.5%;春薯5号在S1中不分化,但在S2中,由于GA3的添加,春薯5号的分化率达68.75%,吉薯1号马铃薯的分化率提高至85.7%,说明GA3对这两个品种愈伤组织的分化起到了重要的作用。

通过分析可知,6-BA在四个品种马铃薯愈伤组织诱导中均起到了重要的作用。6-BA的最适浓度为2.0 mg/L,降低或者升高6-BA的浓度,愈伤组织诱导率均大幅度下降。2,4-D、NAA和KT对不同品种马铃薯的影响重要性不同,再次证明了不同的基因型对植物激素种类及浓度要求不同。

综上,对特定品种、特定材料进行再生条件的筛选,建立并丰富马铃薯的再生体系仍需要不断地尝试和研究。

参考文献:

- [1] 王娟,陈佳宁,王娟,等.根瘤农杆菌介导马铃薯遗传转化的研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(19):10021-10023.
- [2] 陈萌山,王小虎.中国马铃薯主食产业化发展与展望[J].农业经济问题,2015(12):4-11.
- [3] Ren N, Zhang Z W, Yu X C, et al. ROS and salicylic acid (SA) play roles on the resistance establishment of the potato cultivar Zihubai to *Phytophthora infestans*[J]. Journal of Plant Diseases & Protection, 2012, 119(5/6): 191-199.
- [4] 柳蓉.马铃薯的再生及其再生植株遗传稳定性研究[D].长沙:湖南农业大学,2007.
- [5] 李晶.马铃薯再生体系的建立及遗传转化的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2003.
- [6] 李娟,程慧,张国裕.马铃薯叶片高效再生体系的建立[J].西北植物学报,2004(4):610-614.
- [7] 杨琼芬,卢丽丽,潘哲超,等.马铃薯叶片愈伤组织再生体系的建立[J].西南农业学报,2012(3):1001-1004.
- [8] 鲍红春,李小雷,王建平,等.马铃薯品种陇薯5号茎段再生体系的建立[J].内蒙古农业科技,2014(2):31-32.
- [9] 卢翠华,秦昕,武小霞,等.马铃薯极早熟品种东农303再生系统的筛选[J].中国马铃薯,2001(5):280-281.
- [10] 王克秀,何卫,胡建军,等.马铃薯脱毒组培苗繁殖效率分析研究[J].西南农业学报,2010,23(3):660-664.
- [11] 帅正彬,郭江洪,杨斌,等.不同培养条件对马铃薯试管薯诱导的影响[J].西南农业学报,2004(2):212-214.
- [12] 李文霞,宁海龙,张永根,等.二倍体马铃薯花药培养再生体系的优化[J].中国蔬菜,2012(4):68-74.
- [13] Shaw R. Potato tuber callus validation as biochemical tool [J]. Plant Physiol, 1976, 58: 464-467.
- [14] Simmonds N W. Observation on potato callus and adventitious shoot formation[J]. American Potato Journal, 1964, 4: 129-136.
- [15] 李娟,程智慧,张国裕.四个马铃薯品种幼茎段再生技术的研究[J].西北农林科技大学学报,2006,34(3):122-125.
- [16] Radke S, Grun P. Isolation, culture, and regeneration of leaf me-

- sophyll protoplasts of selected clones of *Solanum*[J]. *Potato Research*, 1986, 29: 451-462.
- [17] 周宇波,柳俊,谢从华,等.马铃薯原生质体培养体系改良[J].华中农业大学学报,2001,20(5):469-473.
- [18] 祁新,赵颖君,王艳秋,等.马铃薯悬浮细胞原生质体培养及植株再生[J].吉林农业大学学报,2000,22(1):52-55.
- [19] 丁玉梅,杨正安,吴毅歆,等.用于叶绿体基因组转化的马铃薯高效再生体系的建立[J].西南农业学报,2006,19(增刊):98-102.
- [20] 杨琼芬,隋启君,李世峰,等.马铃薯新品种“云薯201”脱毒种苗生产中的影响因素研究[J].西南农业学报,2006,19(4):679-682.
- [21] 王宪.二倍体马铃薯再生体系建立及耐盐愈伤组织的筛选[D].哈尔滨:东北农业大学,2012.
- [22] 刘峰,王凤,汪洋,等.吉林省马铃薯及主要农作物的比较优势分析[J].吉林农业科学,2009,34(5):46-49.
- [23] 徐仲安,王天保,李常英,等.正交试验设计法简介[J].科技情报开发与经济,2002(5):148-150.
- [24] 方贯娜,庞淑敏.马铃薯愈伤组织再生体系的研究进展[J].中国马铃薯,2012,26(5):307-310.
- [25] 张玉英,韦正乙,王云鹏,等.番茄叶片高频再生体系的建立[J].吉林农业科学,2014,39(2):78-82,86.