

张超,杨永智,王舰,等. 双单倍体马铃薯 DM 再生体系的构建[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):50-52.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.014

双单倍体马铃薯 DM 再生体系的构建

张超¹, 杨永智², 王舰², 周云²

(1. 青海大学, 青海西宁 810016; 2. 青海省农林科学院/教育部青藏高原生物技术重点实验室, 青海西宁 810016)

摘要:以双单倍体马铃薯 (*Solanum tuberosum*) DM1-3-516-R44 的无菌茎段、叶片作为材料, 构建马铃薯离体再生体系。结果表明, 茎段愈伤组织适宜的诱导培养基 BI 为 MS+0.5 mg/L IAA+2.5 mg/L 6-BA, 叶片愈伤组织适宜的诱导培养基 BN 为 MS+1 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA, 愈伤的平均诱导率均达 95% 以上, 甚至可以全部诱导愈伤形成; 愈伤组织分化不定芽适宜的培养基 BZ 为 MS+3 mg/L 6-BA+0.5 mg/L ZT, 分化率也达到 90% 左右。

关键词:马铃薯; 双单倍体; 愈伤组织诱导; 再生体系

中图分类号: S532.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0050-03

马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 是粮蔬两用的经济作物^[1], 我国对马铃薯的需求量日益增加。马铃薯于 17 世纪传入我国, 并迅速在我国西北地区大面积取代低产的粮食作物, 成为当时西北地区最重要的粮食作物之一^[2]。由于马铃薯通过营养体繁殖, 繁殖数代后会出现高染病率, 从而影响马铃薯的产量、品质^[3]。近年来, 随着细胞培养技术、基因组学的发展, 马铃薯的品质得到极大提高。在我国, 大多数学者以 MS 普通培养基为基本培养基, 添加适量的植物激素, 以马铃薯茎段、叶片、薯块等为材料得到再生植株^[4]。由于不同品种马铃薯的基因型存在差异, 导致马铃薯对植物激素的耐受性也不尽相同, 因而各品种马铃薯的再生体系无法完全套用^[5-11]。本试验所用材料为 2011 年测序成功的马铃薯品种, 探究其再生体系, 旨在为后续马铃薯基因表达、转基因研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以 2011 年 7 月测序成功的双单倍体马铃薯 DM1-3-516-R44 无菌试管苗 (简称 DM) 为材料, 在 MS 基础培养基中扩繁, 培养温度为 (25±2) °C, 光照时间为 14 h/d, 白天采用日光灯补光。由于其长势较弱, 故采用生长近 1 个月的无菌苗作为材料。所用植物激素 IAA、NAA、2,4-D、6-BA、ZT^[12] 以及试剂均为生工生物工程 (上海) 股份有限公司产品。

1.2 方法

结合 DM 本身特性, 利用植物分裂素 IAA、NAA、2,4-D 和植物生长素 6-BA、ZT 不同浓度配比来诱导愈伤组织形成、不定芽分化^[9,13-17]。

1.2.1 茎段、叶片的愈伤组织诱导 选取生长 30 d 左右的 DM 无菌马铃薯试管苗, 分别切下叶片、茎段, 去除叶片边缘。切取长为 0.5 mm 左右的茎段, 不可带生长点。分别将上述材料放入加有植物激素的 MS 培养基中, 培养 25~30 d。

为了得到更加合适的配比, 设定植物分裂素与植物生长素配比从高到低为梯度, 进一步确定诱导茎段、叶片愈伤组织合适的植物激素配比。

1.2.2 愈伤分化不定芽培养基的选择 将愈伤组织放入含有

收稿日期: 2014-09-15

基金项目: 青海省 (应用) 基础研究计划 (编号: 2013-Z-720); 青海省农业科技成果转化与推广计划 (编号: 2012-N-505)。

作者简介: 张超 (1989—), 男, 陕西西安人, 硕士研究生, 主要从事马铃薯基因转化研究。E-mail: carrysimon@163.com。

通信作者: 杨永智, 硕士, 副研究员, 主要从事马铃薯种质资源创新研究。Tel: (0971) 5315270; E-mail: Zhmyyz03@yahoo.com.cn。

[13] 金晶, 朱玲, 高军, 等. 三种 DNA 抽提方法对新鲜血细胞及冻血细胞 DNA 抽提效能的比较[J]. 第二军医大学学报, 2014, 35(1): 101-105.

[14] 李晓晓, 赵焕英, 杨云廷, 等. 三种人全血基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(27): 5221-5225.

[15] 白雪嵩, 赵昶灵, 陈中坚, 等. 5 种提取三七基因组 DNA 方法的比较[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 54-56.

[16] Kennedy N A, Walker A W, Berry S H, et al. The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88982.

[17] Vishnivetskaya T A, Layton A C, Lau M C, et al. Commercial DNA extraction kits impact observed microbial community composition in

permafrost samples[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 87(1): 217-230.

[18] 李进波, 盛婧, 李想, 等. 五种 DNA 提取方法对鱼加工制品 DNA 提取效果的比较[J]. 生物技术通报, 2014(4): 43-49.

[19] 郭妍, 惠长野, 张文, 等. 牛肺基因组 DNA 的提取及其质量分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(5): 712-715.

[20] Palmiter R D, Chen H Y, Messing A, et al. SV40 enhancer and large-T antigen are instrumental in development of choroid plexus tumours in transgenic mice[J]. Nature, 1985, 316(627): 457-460.

[21] 王静华. 哺乳小白鼠在不同泌乳阶段乳铁蛋白 (lactoferrin) 基因表达的差异及铁对其表达影响的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004: 30-31.

不同激素浓度配比的 MS 基础培养基中。目前,学者们大多利用 6-BA、NAA、GA3 作为诱导芽分化的培养基^[6,11,13,18-19]。结合本材料的特性以及前期预试验结果,选用不同浓度 6-BA、ZT、IAA 配比来确定分化诱导不定芽的培养基^[11,20]。

2 结果与分析

2.1 不同激素对比对马铃薯愈伤组织诱导效率的影响

在 6-BA 和 IAA 激素组合中,大多数茎段在培养 25 d 左右时均有愈伤产生,当 6-BA 浓度低于 IAA 时,部分愈伤容易生根;当 6-BA 浓度与 IAA 浓度相差过大时,容易产生绒毛状的致密愈伤,且形成时间较长。在叶片中,大多数叶片出现发黄、死亡现象,有些会出现生根现象。所以由结果可知,IAA 只适合茎段愈伤的形成(表 1)。当 6-BA 浓度过高时,部分叶片发黄、死亡;当 6-BA 或 NAA 浓度过高时,可能会产生细根;当 NAA 与 6-BA 浓度相当时会产生愈伤。茎段则部分不会形成愈伤或者愈伤过于疏松,呈透明膨大状,因此可以推测 NAA 不适宜茎段的愈伤形成(表 2)。表 3 中,6-BA 与 2,4-D 大部分浓度配比会使茎段、叶片产生疏松愈伤并生根;部分配比会产生疏松、透明愈伤,即 6-BA、2,4-D 组合形成的愈伤不适于分化。植物分裂素 IAA 适合双单倍体马铃薯 DM 茎段愈伤组织的诱导,植物分裂素 NAA 更适于双单倍体马铃薯 DM 叶片愈伤组织的诱导。只利用 IAA 或 NAA 时,愈伤诱导率远低于添加 6-BA 的愈伤诱导率。添加高浓度 6-BA 时,茎段、叶片的诱导率也相对较低,甚至出现发黑、发黄的迹象。由表 4、表 5 可知,茎段愈伤组织适宜的诱导培养基 BI 为 MS+0.5 mg/L IAA+2.5 mg/L 6-BA,叶片愈伤组织适宜的诱导培养基 BN 为 MS+1 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA。

表 1 不同浓度 6-BA、IAA 对马铃薯愈伤组织生长的影响								
编号	激素浓度 (mg/L)		接种量		愈伤数		诱导率 (%)	
	6-BA	IAA	茎段 (个)	叶片 (张)	茎段 (个)	叶片 (张)	茎段	叶片
1	0	0.5	45	30	5	0	11.11	0
2	0	1.0	45	30	12	0	26.67	0
3	0	2.0	45	30	17	0	37.78	0
4	1.0	0.5	45	30	8	0	17.78	0
5	1.0	1.0	45	30	23	0	51.11	0
6	1.0	2.0	45	30	27	0	60.00	0
7	1.5	0.5	45	30	32	0	71.11	0
8	1.5	1.0	45	30	30	0	66.67	0
9	1.5	2.0	45	30	33	0	73.33	0
10	2.5	0.5	45	30	45	0	100.00	0
11	2.5	1.0	45	30	35	0	77.78	0
12	2.5	2.0	45	30	29	0	64.44	0
13	3.5	0.5	45	30	33	0	73.33	0
14	3.5	1.0	45	30	40	0	88.89	0
15	3.5	2.0	45	30	35	0	77.78	0
16	4.5	0.5	45	30	3	0	6.67	0
17	4.5	1.0	45	30	8	0	17.78	0
18	4.5	2.0	45	30	12	0	26.67	0

2.2 不同激素浓度对马铃薯愈伤组织分化效率的影响

表 6 结果表明,当细胞分裂素浓度较高时,马铃薯愈伤分

表 2 不同浓度 6-BA、NAA 对比对马铃薯愈伤组织生长的影响

编号	激素浓度 (mg/L)		接种量 (个)		愈伤数 (个)		诱导率 (%)	
	6-BA	IAA	茎段	叶片	茎段	叶片	茎段	叶片
1	0	0.5	45	30	0	6	0	20.00
2	0	1.0	45	30	0	8	0	26.67
3	0	2.0	45	30	0	4	0	13.33
4	1.0	0.5	45	30	0	12	0	40.00
5	1.0	1.0	45	30	0	30	0	100.00
6	1.0	2.0	45	30	0	24	0	80.00
7	1.5	0.5	45	30	0	20	0	66.67
8	1.5	1.0	45	30	0	25	0	83.33
9	1.5	2.0	45	30	0	18	0	60.00
10	2.5	0.5	45	30	0	6	0	20.00
11	2.5	1.0	45	30	0	13	0	43.33
12	2.5	2.0	45	30	0	18	0	60.00
13	3.5	0.5	45	30	0	0	0	0
14	3.5	1.0	45	30	0	2	0	6.67
15	3.5	2.0	45	30	0	3	0	10.00
16	4.5	0.5	45	30	0	0	0	0
17	4.5	1.0	45	30	0	0	0	0
18	4.5	2.0	45	30	0	2	0	6.67

表 3 不同浓度 6-BA、2,4-D 对比对马铃薯愈伤组织生长的影响

编号	激素浓度 (mg/L)		接种量 (个)		愈伤数 (个)		诱导率 (%)	
	6-BA	IAA	茎段	叶片	茎段	叶片	茎段	叶片
1	0	0.5	45	30	13	2	28.89	6.67
2	0	1.0	45	30	20	3	44.44	10.00
3	0	2.0	45	30	35	3	77.78	10.00
4	1.0	0.5	45	30	23	4	51.11	13.33
5	1.0	1.0	45	30	24	7	53.33	23.33
6	1.0	2.0	45	30	30	7	66.67	23.33
7	1.5	0.5	45	30	19	8	42.22	26.67
8	1.5	1.0	45	30	23	5	51.11	16.67
9	1.5	2.0	45	30	29	6	64.44	20.00
10	2.5	0.5	45	30	18	0	40.00	0
11	2.5	1.0	45	30	22	3	48.89	10.00
12	2.5	2.0	45	30	38	12	84.44	40.00
13	3.5	0.5	45	30	8	0	17.78	0
14	3.5	1.0	45	30	17	4	37.78	13.33
15	3.5	2.0	45	30	21	3	46.67	10.00
16	4.5	0.5	45	30	3	0	6.67	0
17	4.5	1.0	45	30	9	0	20.00	0
18	4.5	2.0	45	30	16	0	35.56	0

化均较好。当 6-BA 浓度高于 4 mg/L 时,会延长愈伤组织分化所需时间。表 7 结果表明,6-BA 与 ZT 适宜的浓度配比,不仅减少了愈伤组织分化时间,而且同时可作用于叶片、茎段愈伤。由表 6、表 7 可知,影响愈伤组织分化效率最重要的因素是植物生长素浓度。当 6-BA 浓度低于 3 mg/L 时,明显发现愈伤组织分化时间延长,且分化的苗长势较弱;当 6-BA 浓度高于 5 mg/L 时,愈伤组织逐渐发黄,无法形成健康的幼苗。因此比较适宜的愈伤组织分化不定芽培养基 BZ 为 MS+3 mg/L 6-BA+0.5 mg/L ZT。

表 4 调节优化 6-BA、IAA 浓度配比结果

编号	激素浓度 (mg/L)		茎段接 种量 (个)	茎段愈 伤数 (个)	茎段诱 导率 (%)	茎段颜色、形状
	6-BA	IAA				
1	0.5	1.5	45	18	40.00	淡绿色,有细根
2	0.5	1.0	45	20	44.44	淡绿色,突起
3	1.0	1.0	45	22	48.89	淡绿色,突起
4	2.0	1.0	45	35	77.78	鲜绿色,突起紧密
5	2.0	0.5	45	45	100.00	鲜绿色,突起紧密
6	2.5	0.5	45	45	100.00	鲜绿色,突起紧密
7	1.0	0.1	45	27	60.00	淡绿色,突起

表 5 调节优化 6-BA、NAA 浓度配比结果

编号	激素浓度 (mg/L)		叶片接 种量 (张)	叶片愈 伤数 (个)	叶片诱 导率 (%)	叶片颜色、形状
	6-BA	NAA				
1	0.5	1.5	30	20	66.67	淡黄色,有细根
2	0.5	1.0	30	30	100.00	鲜绿色,突起紧密
3	1.0	1.0	30	30	100.00	鲜绿色,突起紧密
4	2.0	1.0	30	27	90.00	鲜绿色,突起紧密
5	2.0	0.5	30	12	40.00	淡黄色,突起
6	2.5	0.5	30	10	33.33	淡黄色,突起
7	1.0	0.1	30	2	6.67	淡黄色,突起

表 6 不同浓度配比 6-BA 与 IAA 对马铃薯愈伤组织分化影响

编号	激素浓度(mg/L)		接种量 (个)	出芽数 (个)	诱导率 (%)
	6-BA	IAA			
1	1	0	30	6	20.00
2	2	0	30	15	50.00
3	3	0	30	23	76.67
4	5	0	30	4	13.33
5	1	0.1	30	9	30.00
6	2	0.1	30	14	46.67
7	3	0.1	30	22	73.33
8	5	0.1	30	5	16.67
9	1	0.5	30	2	6.67
10	2	0.5	30	18	60.00
11	3	0.5	30	25	83.33
12	5	0.5	30	7	23.33
13	1	1.0	30	3	10.00
14	2	1.0	30	11	36.67
15	3	1.0	30	22	73.33
16	5	1.0	30	8	26.67

注:分化 20 d 后统计出芽数。表 7 同。

表 7 不同浓度配比 6-BA、ZT 对马铃薯愈伤组织分化影响

编号	激素浓度(mg/L)		接种量 (个)	出芽数 (个)	诱导率 (%)
	6-BA	ZT			
1	2	0	30	16	53.33
2	3	0	30	23	76.67
3	4	0	30	15	50.00
4	2	0.5	30	21	70.00
5	3	0.5	30	28	93.33
6	4	0.5	30	26	86.67
7	2	1.0	30	22	73.33
8	3	1.0	30	25	83.33
9	4	1.0	30	16	53.33

3 结论

由于各种植物的基因存在差异,因此植物对激素的耐受性也存在很大区别。本试验经过大量筛选,初步筛选出茎段愈伤组织适宜的诱导培养基 BI 为 MS + IAA 0.5 mg/L + 6-BA 2.5 mg/L,叶片愈伤组织适宜的诱导培养基 BN 为 MS + 1 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA,愈伤组织分化不定芽适宜的培养基 BZ 为 MS + 3 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L ZT,这与前人研究结果^[8-10,21]一致。

参考文献:

[1]曲明,宋雅秋.粮蔬两用作物——马铃薯[J].吉林农业,2010(7):74.

[2]张绍文,孙中伟.马铃薯史话[J].中国瓜菜,2008,21(4):58-59.

[3]李彩霞.脱毒马铃薯种性退化对品种性状的影响[J].河南农业科学,2012,41(8):49-51.

[4]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.

[5]肖关丽,郭华春.马铃薯内源激素研究进展[J].云南农业大学学报:自然科学版,2007,22(3):431-434.

[6]罗源,陈耀锋,李春莲,等.马铃薯茎段愈伤组织培养体系的优化[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(10):159-162.

[7]李云,卢其能,赵昶灵.影响马铃薯再生体系建立的主要因素[J].安徽农业科学,2010,38(28):15487-15489,15494.

[8]秦敏,邵刚.马铃薯再生体系的建立及其遗传分析[J].中国马铃薯,2005,19(5):270-273.

[9]齐恩芳,张金文,王一航.马铃薯茎段再生的植物激素配比优化[J].甘肃农业大学学报,2006,41(6):14-17.

[10]张之为,赵君,樊明寿,等.马铃薯不同品种叶片再生体系的建立[J].四川农业大学学报,2011,29(1):61-68.

[11]邱弼,陶刚,朱英,等.马铃薯品种茎段愈伤组织诱导和植株再生的研究[J].贵州农业科学,2009,37(10):11-13.

[12]杨立军.植物生长物质及其在马铃薯生长发育研究中的应用[J].黑龙江农业科学,2005(1):49-52.

[13]李云,卢其能,赵昶灵,等.二倍体马铃薯野生种高效再生体系的建立[J].江苏农业科学,2011(1):62-64.

[14]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.

[15]晁祥健,杨煜,金黎平,等.二倍体马铃薯高效再生体系的建立[J].园艺学报,2009,36(1):109-114.

[16]杨春.生长素和细胞分裂素在马铃薯愈伤组织分化中的作用[J].山西农业科学,2008,36(7):40-42.

[17]石虎,杨永智,周云,等.马铃薯新品种青薯9号高效再生体系的建立[J].江苏农业科学,2013,41(5):14-19.

[18]栾雨时,徐品三,夏秀英,等.适于马铃薯茎段再生的植物激素配比选择[J].中国马铃薯,2004,18(3):143-144.

[19]黄雪丽.马铃薯茎尖脱毒、愈伤组织诱导及分化技术优化研究[D].雅安:四川农业大学,2009.

[20]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.

[21]姜国勇,薛静,张玉娜,等.马铃薯转化体系中愈伤组织的诱导效应[J].莱阳农学院学报,1998,15(3):7-10.