

二倍体马铃薯原生质体培养与植株再生

刘文萍¹, 刘建新¹, 南相日¹, 张丽娟², 盛万民², 张举梅³

(1. 黑龙江省农业科学院 生物技术研究, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农业科学院 作物育种研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省农业科学院 对俄农业技术合作中心, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:原生质体培养是体细胞杂交的基础,同时也是获得变异材料的重要手段。以引进的4个二倍体马铃薯为材料,研究了渗透浓度、酶液组成、酶解时间及材料预处理对原生质体产量和活力的影响。结果表明:预处理是原生质体成活、分裂及后期发育的重要条件,处理D预处理效果最好,原生质产量和活力最高,且有较多细胞分裂;马铃薯原生质体适宜的渗透浓度为 $0.35\sim 0.40\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$;RH2和RH3酶解时间以4 h为宜,RH1和RH4酶解时间以4.5 h为宜;酶解液为2.0%纤维素酶和0.2%果胶酶的混合液。基因型对原生质体培养影响较大。经过培养,有2个二倍体材料获得了再生植株。

关键词:二倍体马铃薯;原生质体;再生植株

中图分类号:S532 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)01-0006-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.01.0006

马铃薯是黑龙江省五大粮食作物之一,也是产量高、适应性强、营养丰富的粮菜兼用型作物。随着生活水平的提高,对马铃薯育种的要求不仅是高产、优质和抗病虫害,而且要求其能够满足各种加工的特殊需求^[1-2]。马铃薯抗性和特殊基因大多存在于占马铃薯家族74%的野生种中^[3-4],直接与四倍体栽培种杂交很难成功。随着细胞工程技术的不断成熟和完善,通过体细胞杂交,可使不能进行有性杂交的亲本进行遗传物质的重组,从而使二倍体野生种资源得到充分利用。体细胞杂交要以原生质体为基础,尽管马铃薯原生质体培养早在1977年就已获得成功^[5],国内外也陆续有许多报道^[6-8],但在具体应用中仍存在许多问题,不同育种材料原生质体培养的条件存在较大差异。本试验针对引进俄罗斯的4个二倍体亲本材料进行原生质体培养,获得再生植株,为体细胞杂交做试验准备,同时得到变异材料,增加亲本材料的数量和类型。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为引自俄罗斯的二倍体马铃薯材料RH1(S. chacoense)、RH2(IVP48-168)、RH3

(DY17-6)和RH4(S. pinnatisecta)。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗培养 用脱毒试管苗培养马铃薯无菌苗,切茎段在MS培养基上扩大繁殖,光照强度2000 lx,光周期16 h·d⁻¹,温度 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 原生质体游离和纯化 将培养20 d左右的无菌苗叶片直接或预处理后,切成1~2 mm宽的细条,分别加入到过滤灭菌的酶液中酶解,温度 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$,黑暗处理,40~45 r·min⁻¹振荡。酶解后用300目细胞筛过滤,将滤液转入离心管,100 g离心5 min,收集原生质体,稀释、清洗2次,沿管壁缓慢滴入到加装有6~8 mL 23%蔗糖的离心管中悬浮,80 g离心9 min,收集中间界面的原生质体,再洗涤2次,离心收集原生质体。

1.2.3 渗透浓度的确定 将剪过的等量叶片分别放入0.25、0.30、0.35、0.40、0.45和0.50 mol·L⁻¹甘露醇的酶液中酶解4 h,酶解物过滤后,在倒置显微镜下测定完整、破碎和皱缩的原生质体数,计算完整原生质体的百分率。

1.2.4 酶液组成对原生质体的影响 称取不同材料相同质量的叶片,放入不同浓度组成酶液中酶解,附加2% MES,酶液分别为处理1:1.0%纤维素酶+0.1%果胶酶;处理2:1.0%纤维素酶+0.2%果胶酶;处理3:1.5%纤维素酶+0.2%果胶酶;处理4:2.0%纤维素酶+0.1%果胶酶;处理5:2.0%纤维素酶+0.2%果胶酶;处理6:2.5%纤维素酶+0.1%果胶酶;处理7:2.5%纤维素酶+0.2%果胶酶。相同条件下酶解,测定原

收稿日期:2014-07-29

基金项目:科技部国家国际科技合作资助项目(2011DFR30840)

第一作者简介:刘文萍(1963-),女,黑龙江省哈尔滨市人,学士,研究员,从事生物技术研究。E-mail: liuwenping63@163.com。

生质体产量和活力。采用 FDA 法测定原生质体活力,采用血球计数板计数法测定原生质体的密度和产量,下同。

1.2.5 酶解时间对原生质体的影响 称取相同质量叶片,相同条件下分别酶解 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 和 5.0 h。测定原生质体产量和活力。

1.2.6 预处理对原生质体的影响 对 RH2 设置 5 种方式的预处理,分别为处理 A(对照):不处理叶片,直接剪成条状,酶解;处理 B:将整瓶试管苗放入 4℃ 黑暗条件下 72 h,然后剪叶片酶解;处理 C:将叶片放入 MS 培养基中,4℃ 黑暗条件下 72 h,然后剪成条状酶解;处理 D:将叶片放入 FM 中 20℃ 黑暗 48 h,然后转入 CM 中 4℃ 24 h,再剪成条状酶解^[9]。酶解后测定原生质体的产量和活力,同时观察浅层培养后的细胞分裂情况。

1.2.7 原生质体培养及植株再生 将纯化好的原生质体密度调整为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,在原生质体液体培养基^[9]上浅层静止培养,7 d 后补充 1/3 新鲜培养基。有细胞团生成时,将其悬液接种在固体培养基上进行固液双层培养,形成小愈伤组织,继续进行增殖分化,直到形成完整植株。

2 结果与分析

2.1 原生质体游离

2.1.1 渗透浓度对原生质体完整率的影响 由图 1 可知,不同基因型的参试材料在不同渗透浓度下游离,所得原生质体的完整率不同。渗透浓度低于 $0.30 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,大多数原生质体处于破碎状态。渗透浓度高于 $0.45 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,超过 30% 原生质体处于皱缩状态,完整率较低。渗透浓度

为 $0.35 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,RH2 和 RH3 原生质体的完整率较高,分别达到 68.8% 和 71.4%;RH4 原生质体渗透浓度为 $0.40 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的完整率最高,为 49.3%。而渗透浓度为 $0.3 \sim 0.40 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,RH1 完整率差异不大,但最高也只有 36.2%。

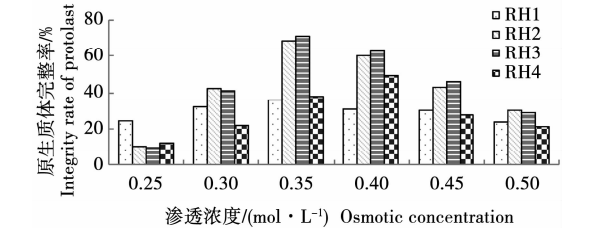
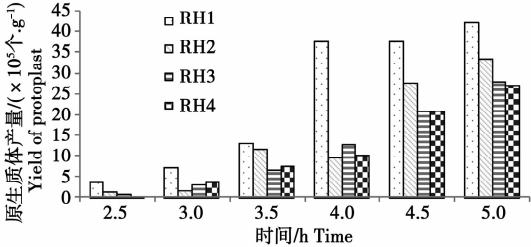


图 1 不同渗透浓度下游离马铃薯原生质体的完整率
Fig. 1 The integrity rate of dissociated potato protoplast in different osmotic concentration

2.1.2 不同酶液组成对原生质体产量和活力的影响 由表 1 可知,在纤维素酶和果胶酶共同作用下,4 个材料都能得到有活力的原生质体。在相同条件下,RH2 酶解效果好,原生质体产量高,活力强。RH3 次之,RH4 酶解效果最差。纤维素酶相同时,配合果胶酶 0.2% 原生质体活力好于 0.1%。当纤维素酶达到或超过 2% 时,各材料原生质体产量和活力都有较大提高。RH2 处理 7 最好,原生质体产量和活力达到最高值,分别为 16.5×10^5 个 $\cdot \text{g}^{-1}$ 和 62.4%,处理 5 略低,分别为 11.4×10^5 个 $\cdot \text{g}^{-1}$ 和 59.1%。而 RH1 处理 5 最好。RH3 和 RH4 原生质体产量处理 7 较高,而原生质体活力处理 5 较强。酶液组成处理 5(2.0% 纤维素酶+0.2% 果胶酶)总体效果较好,有的材料原生质体产量虽然略低,但活力较强,有利于后期的培养。

表 1 不同酶液对原生质体产量和活力的影响								
Table 1 The effect of different enzymatic hydrolysate on yield and vitality of protoplast								
处理 Treatments	原生质体产量/($\times 10^5$ 个 $\cdot \text{g}^{-1}$) Protoplast yield				原生质体活力/% Protoplast vitality			
	RH1	RH2	RH3	RH4	RH1	RH2	RH3	RH4
1	11.0	2.8	0.8	1.0	1.6	8.9	7.3	1.2
2	6.5	2.6	0.2	1.2	12.1	11.7	13.2	5.1
3	8.6	6.0	2.9	2.0	8.5	23.5	21.1	3.6
4	10.9	9.2	6.2	2.3	9.4	49.4	32.0	8.3
5	13.0	11.4	6.5	7.6	19.3	59.1	35.7	10.2
6	12.8	16.5	10.3	9.5	10.8	55.6	32.8	9.6
7	11.7	16.5	11.4	9.9	16.3	62.4	30.6	9.8

2.1.3 不同酶解时间对原生质体产量和活力的影响 酶解时间直接影响原生质体的产量和活力,间接影响细胞壁的形成和后期分裂。由图 2 可知,酶解 2.5~3.0 h,细胞未完全离析,细胞壁也未充分溶解,原生质体产量低,活力也低;酶解 3.5~4.0 h,产量提高,活力也提高;4.5 h 以后,



产量进一步提高,活力却开始下降,表明有些原生质体已经受损,不能继续发育。不同材料之间有一定差异,但总体趋势相同,RH2 和 RH3 原生质体活力较高,酶解时间以 4.0 h 为最佳;RH1 产量虽高,但活力低;而 RH4 产量和活力都较低。RH1 和 RH4 酶解时间以 4.5 h 为宜。

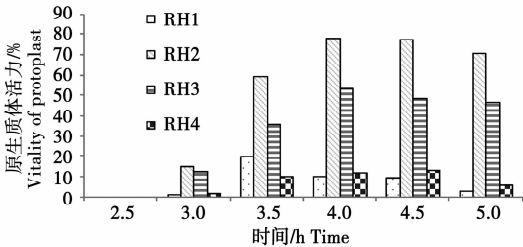


图 2 酶解时间对原生质体产量和活力的影响
Fig. 2 The effect of enzymolysis time on yield and vitality of protoplast

2.1.4 不同预处理对 RH2 原生质体产量和活力以及细胞分裂的影响 试验结果表明,预处理对原生质体培养影响很大。由表 2 可知,对同一品种进行不同的预处理,其原生质体的产量和活力差别明显,而重要的差别在于培养后细胞是否能够持续分裂。不处理(A)和简单处理(B)植株

原生质体的产量和活力较低,后期无细胞分裂。而将叶片剪下放入条件培养基中处理(C 和 D),原生质体的产量和质量都有所提高,细胞壁形成快,有细胞分裂,后期得到分裂的细胞团和愈伤组织。其中,处理 D 原生质产量和活力最高,分别为 17.5×10^5 和 80.9%,且有较多细胞分裂。

表 2 不同预处理方法对 RH2 原生质体活力的影响

Table 2 The effects of pretreatment methods on vitality of RH2 protoplast

预处理方法 Pretreatment methods	原生质体产量/($\times 10^5$ 个 $\cdot g^{-1}$) Protoplast yield	原生质体活力/% Protoplast vitality	细胞分裂情况 Cell division
A(CK)	9.6	12.1	无细胞分裂
B	10.3	33.3	无细胞分裂
C	16.1	78.3	有少量细胞分裂
D	17.5	80.9	有较多细胞分裂

2.2 原生体培养与植株再生

原生质体在液体培养基上培养 3 d 左右,开始形成细胞壁,细胞逐渐由圆球形变为椭球形。5~7 d 时细胞发生第一次分裂,然后持续发生二次分裂和多次分裂,15 d 左右形成多细胞的细胞团。将漂浮的白色细胞团吸到新鲜的固体培养基上,继续培养 20 d 左右,形成肉眼可见的小愈伤组织。将愈伤组织挑出接种到增殖培养基上,在光照 2 000~

3 000 lx,温度 $25 \pm 1^\circ C$ 下培养。待愈伤组织长至 2~3 mm 时,转到分化培养基上,愈伤组织逐渐变绿,结构逐渐致密。培养 50 d 左右,胚性愈伤开始分化出芽。将芽切下,放入 MS 培养基,7 d 左右生根,形成完整植株。RH2 愈伤组织发育快,分化能力强,获得大量再生植株;RH3 愈伤组织增殖过程中有部分褐化,分化能力较低,得到少量再生植株。RH1 和 RH4 在试验中未获得再生植株(见图 3)。

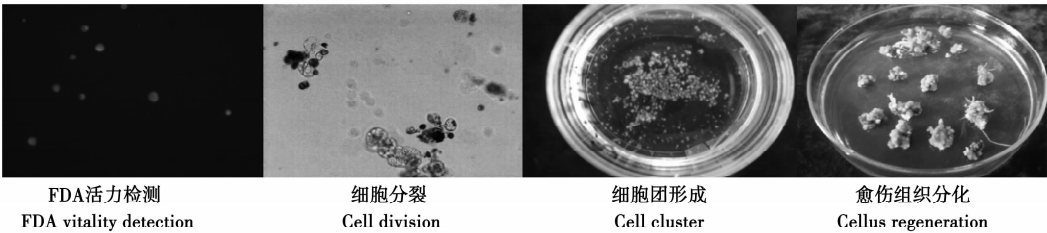


图 3 马铃薯原生质体培养过程
Fig. 3 The process of protoplast culture

3 结论与讨论

原生质体培养是体细胞杂交的基础,同时也是获得变异材料的重要手段。对 4 个二倍体马铃薯原生质体培养结果表明:基因型对原生质体培养影响较大,试验中只有 2 个二倍体材料获得再生植株;预处理是原生质体成活、分裂及后期发育的重要条件,将叶片放入 FM 中 20℃ 黑暗 48 h,然后转 CM4℃ 培养 24 h,再剪成条状酶解的预处理效果最好,原生质体产量和活力最高,且有较多细胞分裂;马铃薯原生质体适宜的渗透浓度为 0.35~0.40 mol·L⁻¹;RH2 和 RH3 酶解时间以 4 h 为宜,RH1 和 RH4 酶解时间以 4.5 h 为宜,酶解液最好为 2% 纤维素酶和 0.2% 果胶酶的混合液。原生质体在适宜培养基上培养 60 d 左右形成完整植株,每株均为单个细胞发育的不同个体。

不同基因型的马铃薯酶解后原生质体状态不同。试验的 4 个基因型中,RH2 和 RH3 原生质体大小适中,正常的圆球形占多数,内容物较少,分散在细胞中,成活的原生质体多。而 RH1 和 RH4 的叶片较大,颜色较深,叶绿素含量高,原生质体形态不规则,圆球形所占比例小,内容物多且呈规则排列,试验各种预培养及酶解方法,仍然得不到高质量成活的原生质体。原生质体的状态除了与基因型有关外,可能还与试管苗叶片形成时期及条件密切相关。本试验中,当 RH2 试管苗

叶片稍薄且略微黄化时,原生质体质量最好,成活率达到 95% 以上;而当其叶片肥厚浓绿时,原生质体内容物多,成活率下降。如何使叶片达到所需的状态,不同基因型培养条件是否相同,这对于原生质体的成活及后期发育都非常重要,有必要进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] 张武. 马铃薯品质育种的材料选择[J]. 甘肃农业科技, 2004(9):18-20.
- [2] 盛万民,王凤义,牛志敏,等. 马铃薯二倍体栽培种 *S. phureja* 与普通栽培种的四倍体杂种品质性状育种价值的研究[J]. 中国马铃薯, 2001(2):72-77.
- [3] 金黎平,杨宏福. 马铃薯遗传工程的研究[J]. 马铃薯杂志, 1990(1):23-28.
- [4] 金黎平,杨宏福. 马铃薯遗传育种中的倍性操作[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(1):70-74.
- [5] Shepard J F, Totten R E. Mesophyll cell protoplasts of potato isolation, proliferation and plant regeneration[J]. Plant Physiology, 1977, 60: 313-316.
- [6] 李耿光,张兰英. 马铃薯叶肉原生质体再生植株研究[J]. 植物学报, 1988, 30(1):21-24.
- [7] 吴旺泽,王蒂,王清,等. 马铃薯原生质体游离与培养体系的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2004, 4(2):146-149.
- [8] 李韬,戴朝曦. 提高马铃薯原生质体细胞分裂频率的研究[J]. 作物学报, 2000, 26(6):953-958.
- [9] 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.

Culture and Plantlets Regeneration from Protoplast of Diploid Potato

LIU Wen-ping¹, LIU Jian-xin¹, NAN Xiang-ri¹, ZHANG Li-juan², SHENG Wan-min², ZHANG Ju-mei³

(1. Biotechnology Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Crop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 3. Sino-Russian Agriculture Scientific and Technological Cooperation Center of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Protoplast culture is the foundation of somatic hybridization and an important method to acquire mutant material. Taking four introduced diploid potato as materials, the effect of osmotic concentration, enzymolysis conduction, enzymolysis time and pretreatment on yield and vitality of protoplast were studied. The results indicated that pretreatment was a key factor for surviving, division and development of protoplast. The protoplast yield and vitality of treatment D were the best. The osmotic concentration suitable for protoplast was 0.35~0.40 mol·L⁻¹. The suitable enzymolysis time for RH2 and RH3 was 4 h, RH1 and RH4 was 4.5 h. Enzymatic hydrolysate was 2.0% Cellulase RS Onozuka and 0.2% Pectolyase Y-23. The protoplast culture was greatly influenced by genotypes. Regeneration plantlets of two diploid potato materials were successfully gained.

Keywords: diploid potato; protoplast; regeneration plantlets