



时九明,龚璟晖,陈璐,等.马铃薯悬浮细胞培养体系构建的研究进展[J].黑龙江农业科学,2021(3):121-126.

马铃薯悬浮细胞培养体系构建的研究进展

时九明,龚璟晖,陈璐,王馨敏,晏铭英,郭鹏辉
(西北民族大学生命科学与工程学院,甘肃兰州730124)

摘要:马铃薯悬浮细胞培养体系在马铃薯应用研究中尤为重要,是进行马铃薯育种学研究、基因工程研究的基础。其中构建细胞培养体系可大致分为4个过程,即外植体选择、愈伤组织培养、愈伤组织继代、悬浮细胞培养体系构建。本文着重对马铃薯悬浮细胞培养体系建立及其在培育新品种、脱毒薯培育、构建马铃薯种质资源基因库和应用生物转化反应器方面的应用进行阐述分析。

关键词:马铃薯;细胞悬浮培养;组织培养

植物细胞悬浮培养是将植物活体组织或离体组织培养物如愈伤组织、胚状体等转至合适的液体培养基中,置于特定转速的摇床上进行振荡悬浮培养,经过周期的继代培养和筛选后形成稳定均一的悬浮细胞系^[1],由于其为单细胞系及微小细胞团,具有良好的分散性,故被应用于生理学、细胞学、分子生物学的研究等。悬浮细胞系可以用于生产天然的植物成分^[2],可作为单细胞无性系进行无性突变筛选,也可进行原生质体融合与

培养,进行原生质体育种。

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.),属双子叶植物纲,茄科,茄属,马铃薯亚属,一年生草本植物。其栽培历史悠久,最早起源于秘鲁-玻利维亚地区。于16世纪传入中国,距今已有400多年的栽种历史^[3]。马铃薯作为一种喜低温植物^[4],能在8℃时快速生长,21℃为其地上植株部分最适温度。马铃薯不仅是主要的粮食作物,还是大宗蔬菜,牲畜饲料以及重要的加工原料^[5]。到目前为止,世界上大面积种植马铃薯的国家有150多个,2017年全球马铃薯种植总面积达1 901.37万hm²(图1),产量高约达3.84亿t。中国是全球第一大马铃薯生产国,2018年中国马铃薯种植总面积达475.807万hm²,且总产量达1 798.38万t(图2、图3)。

马铃薯为无性繁殖作物,在生产中易染病,遭微生物侵染,如卷叶病、X病毒、纺锤类块茎

收稿日期:2020-11-16

基金项目:西北民族大学本科生科研创新项目(XBMU-BYL20076);西北民族大学中央高校基本科研业务费项目(31920190202-03,31920190019);西北民族大学实验室开放项目(SYSKF-2020101)。

第一作者:时九明(1999-),男,在读学士,专业为生物技术。E-mail:1743045722@qq.com。

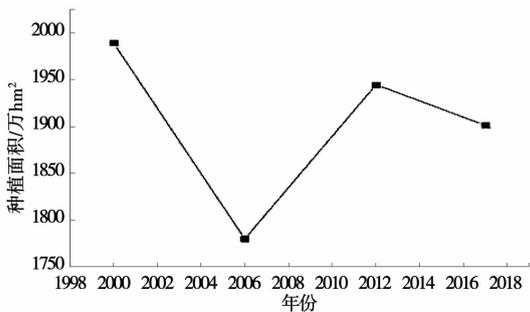
通信作者:郭鹏辉(1982-),男,博士,副教授,从事植物资源开发与利用及动物营养与饲料科学研究。E-mail:xbmusky@163.com。

Study on the Joint Training Mechanism of Professional Postgraduates in Agricultural University

WANG Yu-feng, FU Jian, ZHANG Yi-fei, YU Song, HE Lin, YANG Ke-jun
(College of Agronomy, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

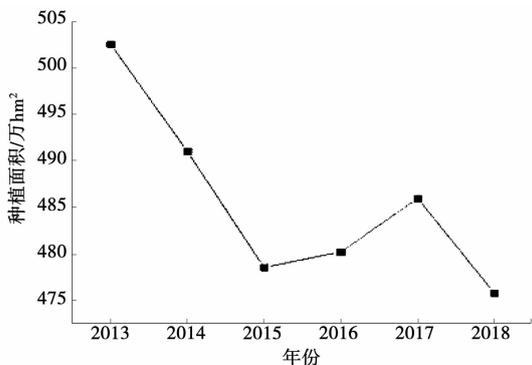
Abstract: In order to improve the quality of professional postgraduates, increase university running level, and promote the establishment of long-term mechanism for enterprise-academics-research joint training. Taking the joint training of professional agronomy postgraduates in Heilongjiang Bayi Agricultural University as an example, this paper discussed the joint training mechanism of production, teaching and research, from the aspects of improving the tutor system, professional curriculum system, establishing long-term cooperation mechanism and so on.

Keywords: enterprise-academics-research; joint training; professional postgraduate; training mechanism



注:数据来源于FAO。

图1 2000—2017年全球马铃薯种植面积



注:数据来源于国家统计局。下同。

图2 2013—2018年中国马铃薯总种植面积

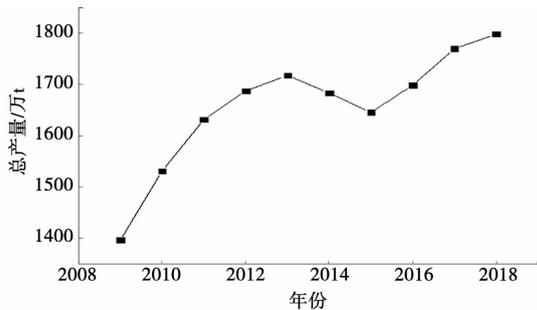


图3 2009—2018年中国马铃薯总产量

病毒等,种类多达40余种。随着马铃薯种植面积的不 断扩大和需求量的提升,每年因其种质未脱毒而减产约20%,造成大量的经济损失。虽然欧洲一些国家自20世纪50年代就开始对马铃薯的脱毒情况进行研究,至60年代末,美英等国先后建立了马铃薯脱毒种薯生产体系。目前,美国、法国、加拿大等国都采用茎尖脱毒培养技术进行脱毒薯培育。相对而言,我国对于马铃薯脱毒方面的研究起步较晚,目前集中在马铃薯脱毒试管苗、马铃薯脱毒微型薯、马铃薯悬浮细胞培养体系等方面的研究(表1)^[6-8]。

表1 不同脱毒方式对比

脱毒方式	优点	缺点
马铃薯试管苗	保证品质、减少环境有害物质影响、维持种薯质量	宏观筛选、依赖原种,种质质量差,商品性低、产量低,无新品种产生
试管薯	实用价值高、繁殖速度快、体积小、便于贮藏、运输、可以周年生产	宏观筛选、依赖原种,种质质量差,商品性低、产量低,无法培育新品种
植物细胞悬浮培养	单细胞及微小细胞团、可进行无性变异系筛选、可进行原生质体育种	对培养环境要求较高如剪切力,光照等、细胞代谢产物尚未全部明确

因此,通过构建马铃薯悬浮细胞培养体系,一方面利用组培快繁技术对其悬浮细胞进行诱导,形成再生植株,同时在此基础上诱导体细胞胚的发生,用以制备人工种子,获得更为优良的品种;另一方面,可作为原生质体进行基础理论研究,原生质体既是研究细胞功能的一种理想的遗传拓展材料,也是外源基因遗传转化的良好受体,在细胞融合、杂交育种等方面更具优势。

故本文详细阐述了马铃薯悬浮细胞培养体系的建立及其在培育新品种、脱毒薯培育、构建马铃

薯种质资源基因库等方面的研究进展,以期为后续研究提供参考。

1 马铃薯细胞悬浮培养

1.1 马铃薯细胞悬浮培养的建立过程

1.1.1 外植体的选择与愈伤组织诱导 马铃薯品种较为广泛,将不同品种的马铃薯作为外植体,会产生不同的影响。我国各地区的马铃薯品质差异较明显,细胞活力差距较大,对培养环境的要求不同,存在基因型差异。故对悬浮细胞培养系的

建立有着较为显著的影响。

以马铃薯茎尖为外植体,因其生长过程中只有根尖和茎尖积累的病毒最少,特别在最尖端的部位,几乎没有病毒的存在。因此,在植物组织培养过程中,如果将尖端组织部位作为外植体的采集点,就有可能达到非常理想的脱毒效果^[9]。通常在显微镜下通过剪切的方式保留1~2 mm茎尖,茎尖保留的长度与其活力直接相关,刘江娜等^[10-11]在研究中指出,剥取1~2个叶原基对脱毒率有较好的保证,且成苗率较高,仅剥取1个叶原基会因成苗率较低而影响脱毒效果。

近年来超低温诱导法越来越被广泛接受,通过超低温使病毒体内的液态物质形成冰晶,刺破病毒,从而达到脱毒效果,又因茎尖分生区的生长点不含液态物质,从而可较好地保证成苗率与脱毒效果^[12]。但超低温疗法受感染病毒的种类和宿主品种的影响,不同宿主的脱毒率不尽相同。但在数据上,超低温疗法的脱毒率显著高于茎尖分离培养法。利用3种超低温疗法,成功脱除PLRV和PVY,得到83%~86%PLRV脱毒率和91%~95%PVY脱毒率,而利用茎尖脱毒培养法,只得到56%PLRV脱毒率和62%PLV脱毒率^[13]。故超低温疗法的脱毒率显著高于茎尖培养法。此外植物生长年龄对愈伤组织的培养效果也存在影响^[14],生长年龄较小的外植体拥有较强的再生能力,且突变率较低。

1.1.2 愈伤组织的培养过程 因植物细胞具有全能性,即一个细胞经分裂和分化后仍具有形成完整有机体的潜能或特性,植物细胞分化出的松散的、不规则细胞团即为愈伤组织。其质量的好坏直接影响着后续试验进行。根据试验观察,普通的马铃薯以茎尖为外植体形成愈伤组织的时长一般为21~28 d,呈深棕色,蓬松状,0.5 cm左右。愈伤组织的培养过程与培养基、环境条件和无菌操作密切相关。

培养基的浓度对愈伤组织培养至关重要,不

同浓度培养基对其生长速度、愈伤组织软硬度等具有影响。常见为1/4MS培养基、1/2MS培养基和MS培养基。史滢滢等^[15]通过对培养基的试验发现,1/4MS培养基所培养的愈伤组织为软愈伤组织,而1/2MS培养基所得愈伤组织都为较硬愈伤组织。并且,根据试验结果来看,相同激素条件下,1/2MS培养基愈伤组织生长速率显著慢于1/4MS培养基。

激素对愈伤组织有着促进作用,主要NAA、6-BA、2-4-D、KT、GA₃等几种植物生长调节剂。其用量的大小直接决定着愈伤组织培养的效果。柴瑞娟等^[16]在试验中指出,较低质量浓度的生长激素对马铃薯愈伤组织有着较显著的促进作用,当NAA与6-BA各达到最大值时,分别有22.22%和41.11%的出愈率。结果显示,在适量的范围内激素对愈伤组织有显著促进作用,但随着激素浓度的增加,此种促进作用效果减弱。

1.1.3 愈伤组织继代次数对细胞悬浮培养物质的影响 愈伤组织培养过程中或一段时间后,需要不断进行继代,因在细胞生长过程中会不断产生代谢废物,这些代谢废物会抑制愈伤组织的生长甚至使其褐化,且培养基的营养物质在一段时间后被消耗量较大,不足以支持愈伤组织的生长。一般为5~7 d继代1次。杨春等^[17]在试验中指出愈伤组织的生长速度和质量与继代次数呈正相关,且其在试验中继代的频率为25~30 d,不同于常用频率,为一般频率的4倍。但其试验结果显示,此频率愈伤组织生长良好,亦可有较为良好的试验结果。

张宁等^[18]研究结果表明,一般经过1~3次继代的细胞团在液体培养基中分散性是最好的,细胞分裂旺盛。镜检表明这些细胞约80%~90%以上形状呈圆形或椭圆形,细胞较小,胞质浓厚。6代以后的愈伤组织建立悬浮培养系已不再适宜,由于多次继代的愈伤组织本身发育为硬质地的板块状或颗粒状,质地不够松散,并出现异质

性克隆,如部分褐化、老化等,约75%以上的细胞老化,形状变为不规则或长条形或柱状,分裂能力和以后的分化能力严重丧失,难以由此类愈伤组织建立细胞培养系^[19]。

1.2 马铃薯悬浮细胞培养体系的建立

选用色泽新鲜、生长旺盛、质地疏松且增殖率高的淡黄色愈伤组织,以构建悬浮细胞系,因此愈伤组织在悬浮培养中分散程度好,单细胞多,细胞分裂旺盛,细胞体积较小,适于进行悬浮培养。杨帆^[20]在试验中以色泽鲜艳的愈伤组织2g为材料,用镊子夹碎,将分散的小块细胞团置于50 mL三角瓶中,且三角瓶中放置约20 mL液体培养基,其成分为MS+2 mg·L⁻¹ 2,4-D+1.0 mg·L⁻¹ NAA+250 mL CH+3%蔗糖,接种后于120 r·min⁻¹, 24 ℃下摇床上黑暗培养,每5 d继代1次。此后定期继代,即可获得稳定的马铃薯悬浮细胞培养体系。同时房江育^[21]在试验中指出悬浮培养中,初期细胞生长十分缓慢,14~21 d后细胞分裂加快,分散程度增加,周缘细胞的细胞质浓厚,分裂旺盛且生长曲线呈“S”型。

摇床转速也会影响悬浮细胞的培养。一般摇床转速控制在90~120 r·min⁻¹,转速过高会造成细胞破碎,过低会因氧气不足造成愈伤组织的过早死亡。当然也有特殊情况,如草珊瑚悬浮细胞培养的最佳摇床转速为40 r·min⁻¹,在接近100 r·min⁻¹的转速下几乎难以存活^[22]。

2 马铃薯细胞悬浮培养体系的应用

2.1 培育新品种

植物通过离体培养可获得变异的无性细胞系。特别是来源于单个细胞系统的群体更易获得无性细胞变异系。但是,原生质体培养成株的技术比较复杂,通过单细胞的培养,可以在细胞水平上筛选出合乎需要的突变细胞系,然后再生成具备理想特性的植株。为此,首先必须建立细胞悬浮培养系统。魏彩霞^[5]在其试验中,以紫色马铃薯GSAP-H、原始栽培品种NDK47-33等为材

料,探讨了稳定的悬浮细胞原生质体解离、纯化培养及融合体系,通过对培养成功的紫色马铃薯悬浮细胞与原始栽培品种NDK47-33进行分离,得到单细胞,并对其原生质体进行解离,纯化,最后通过聚乙二醇法使二者原生质体融合,成功得到高产的紫色二倍体马铃薯细胞,其成品含大量蛋白质、氨基酸和花青素等,甚至具有抗氧化、抗突变和抗癌作用。通过对此细胞的培养与诱导,便可一定程度上获得新品种马铃薯,进行育种学研究。如将紫色二倍体马铃薯的细胞原生质体与脱毒高产易种植马铃薯原生质体融合,建立紫色高产马铃薯悬浮细胞培养系,获得新马铃薯品种,且其高产的性质会大大提高紫色马铃薯的商品性,对各种地形地貌的高适应性也会大大提高该品种马铃薯的流通性,即可以大面积推广种植,从而得到产量巨大的优质紫色二倍体马铃薯,在一定程度上可以革新马铃薯种植方向。

2.2 脱毒薯培育

以悬浮细胞培养体系为基础还可以进行试管苗的培养,通过对悬浮培养细胞的诱导,可获得马铃薯试管苗,此种试管苗为脱毒苗,无常见的马铃薯X病毒、Y病毒、卷叶病、微生物等感染,可大幅度提高单位面积产量与马铃薯的商品性,对试管苗进行诱导还可以获得微型脱毒马铃薯的种薯,微型马铃薯是近年来的研究产物,较传统马铃薯种薯相比,具有高产、抗病等优势。

2.3 构建马铃薯种质资源基因库

长期以来,基因库贫乏、品种单一以及病毒积累引起的退化直接阻碍着马铃薯生产的发展。体细胞无性变异是除有性杂交和理化诱变之外的又一个变异来源,尤其是将它与理化诱变相结合,可使低频率的突变得以表现和筛选,从而大大提高人工诱变效率,有效拓宽马铃薯基因库通过建立马铃薯细胞悬浮培养体系,可以获得稳定的马铃薯单细胞,并以此为试验平台,在细胞水平上通过诱变剂进行筛选,进而得到有益突变体进行改良。

在生物化学研究中,可以此为平台,进行生物代谢循环途径的研究、遗传操作中的选择标记、基因突变位点的分析和遗传转化系统的建立。在上述遗传变异或诱变过程中,使用高质量的单细胞悬浮培养系,是很理想的试验和实践系统,在一定程度上使马铃薯的育种程序微生物化,可大大提高选择效率,节省时间和试验面积,并且不受季节限制。如上文提到的紫色二倍体马铃薯,其具有抗突变、抗氧化和抗癌变的特性。因此品种特性必然通过萜类物质或某些植物蛋白的分泌起到作用。则可进行人工定向筛选,以不断筛选传代培养、再筛选的方式,获得萜类或蛋白分泌量较高的马铃薯品种,进而获得新的马铃薯基因型,从而达到丰富马铃薯基因库和获得新品种的目的。

2.4 应用生物转化反应器

植物细胞可视作为一种生物催化剂,以其丰富的资源和操作方便的可利用性,近年来引起了生物学家和化学家的广泛注意。最近,许多研究集中在植物细胞悬浮培养进行生物转化的方面。在这些研究中,选择合适的植物细胞和培养基,就能够把充足的、价廉的物质转化为更有用的化合物。龚加顺等^[23]将白花曼陀罗嫩茎形成稳定的悬浮培养细胞后,加入经无菌过滤得乙醇水溶液溶解的对羟基甲醛,在一定的条件下,避光培养15 d,成功地将对羟基苯甲醛转化为天麻素,并得到由对羟基苯甲醛生成天麻素的转化中间体对羟基苯甲醇马铃薯悬浮细胞培养系也可通过类似的方式建立转化反应,马铃薯细胞内含有大量的淀粉,是可为转化反应提供反应底物和能源。

3 展望

随着技术的不断提高,建立马铃薯悬浮细胞培养体系,并以此为基础试验体系进行研究,逐渐成为常用的研究方式。并通过此方式对马铃薯品种进行优化,如马铃薯底西瑞品种^[24]。但马铃薯悬浮细胞培养还存在着一些问题,如不同种类培养基对不同品种马铃薯悬浮细胞培养体系的促生

情况,不同激素和不同激素浓度对不同品种马铃薯悬浮细胞生长的诱导效果,愈伤组织配型甄别,植物细胞培养中普遍存在褐化现象及培养过程中的胚性下降^[25],悬浮细胞培养系中细胞浓度检测技术和马铃薯悬浮细胞培养系建立过程上的技术改良。

故应着重研究以下5个方面,以建立规模化马铃薯悬浮细胞培养系与工业化应用:一是胚性愈伤组织与褐化现象的关系;二是细胞悬浮系的单细胞的分离培养效率尚待提高;三是进行马铃薯单细胞系的大规模诱变与筛选;四是原生质体融合以丰富马铃薯品种;五是探索并掌握植物细胞次生代谢信号调控机制,合理、准确地调控悬浮细胞生长和代谢^[26]。

同时,马铃薯作为重要的粮食经济作物,在贫困地区的脱贫攻坚战略上有着重大的作用,2016年,陕北定边县马铃薯种植面积6.29万hm²,产量12.46万t,分别占到当地粮食作物面积和产量的56.87%和47.75%;2015年,陕南紫阳县马铃薯播种面积1.40万hm²,总产量3.59万t,分别占到当地农作物总面积和粮食总产量的33.08%和32.23%。马铃薯占到贫困县定边和紫阳其他农产品种植面积和产量的1/3以上^[27],是两县脱贫攻坚战的重要经济作物。在马铃薯品种改良上打好脱贫攻坚大有可为。可通过建立细胞悬浮体系的方式,进行品种的选育、改良等工作,并以此为基础,构建当地特色马铃薯脱毒品种繁育体系,并发展其他优良品系的山铃薯,以此达到产业化的马铃薯种植基地,实现地区的脱贫致富。

参考文献:

- [1] 韦虹宇,梁宏伟,张博,等.珍稀濒危植物银鹊树胚性细胞悬浮系的建立和植株再生[J].分子植物育种,2016,14(3):756-759.
- [2] 杨帆,赵君,张之为,等.植物悬浮细胞的研究进展[J].生命科学研究,2010,14(3):257-262.
- [3] 张紫娟.马铃薯高效离体再生体系构建及试管薯遗传转化的优化[D].晋中:山西农业大学,2019.

- [4] 吴玥琳,凌永胜,林金秀. 马铃薯脱毒试管苗组织培养技术概述[J]. 农业科技通讯,2017(8):238-241.
- [5] 魏彩霞. 马铃薯“GSAP-H”悬浮细胞原生质体培养与融合研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2015.
- [6] 彭霞,赵佐敏,张慧,等. 马铃薯脱毒试管苗快繁技术[J]. 农业与技术,2019(20):42-43.
- [7] 庞淑敏,方贯娜,张新岭. 马铃薯脱毒种薯的应用及发展思考[J]. 科学种养,2018(12):17-19.
- [8] 陈月华,朱艳,张翔,等. 植物细胞悬浮培养中次生代谢产物积累的研究进展[J]. 中国野生植物资源,2016,35(3):41-47,57.
- [9] 颜克如,毛碧增. 植物病毒脱毒技术进展与展望[J]. 分子植物育种,2019,17(23):7861-7870.
- [10] 刘江娜,李东方,张爱萍,等. 不同品种马铃薯茎尖脱毒培养方法优化技术研究[J]. 新疆农业科学,2014,51(2):284-290.
- [11] 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.
- [12] 李经纬. 马铃薯茎尖与病毒超低温保存技术的研究及超低温疗法脱毒试管苗的耐盐性评价[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2019.
- [13] 康俊,刘海英. 超低温冷冻技术在马铃薯脱毒中应用的研究进展[J]. 天津农业科学,2016,22(8):10-15.
- [14] 张东方. 植物组织培养技术[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社,2004.
- [15] 史滢灏,杨静慧,刘婷,等. 马铃薯松散型胚性愈伤组织的诱导[J]. 天津农业科学,2016,22(12):20-23.
- [16] 柴瑞娟,殷红飞. 激素质量浓度及不同培养方式对马铃薯愈伤组织的诱导[J]. 安徽工程大学学报,2011,26(4):1-4.
- [17] 杨春,王桂梅. 愈伤组织再生马铃薯脱毒苗生产体系的建立[J]. 中国马铃薯,2008(3):137-139.
- [18] 张宁,戴朝曦. 建立高质量马铃薯细胞悬浮培养物的研究[J]. 中国马铃薯,2000(4):195-198.
- [19] 房江育. 马铃薯试管苗愈伤组织的悬浮细胞培养[J]. 甘肃农业大学学报,2000(1):59-62.
- [20] 杨帆. 马铃薯悬浮细胞系的建立及小G蛋白 AtRop1, St-Rac1的亚细胞定位[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2011.
- [21] 房江育. 马铃薯块茎无性悬浮培养系的建立[J]. 甘肃农业科技,2000(4):16-17.
- [22] 涂艺声,江洪如,王碧琴. 草珊瑚细胞悬浮培养之研究[J]. 江西科学,1994(3):162-163.
- [23] 龚加顺,杨兆祥. 白花曼陀罗悬浮培养细胞生长和生物碱活性成分合成[J]. 中草药,2004(8):100-103.
- [24] 杨帆,赵君. 马铃薯品种底西瑞(Desiree)悬浮细胞系的建立和培养条件的优化[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版),2011,32(4):128-131.
- [25] 戴雪梅,华玉伟,李哲,等. 植物悬浮细胞培养的关键技术及存在问题[J]. 热带生物学报,2013,4(4):381-385.
- [26] 李鑫,李炎林,李清明,等. 块根块茎类植物细胞悬浮培养技术与应用[J]. 现代园艺,2017(19):70-73.
- [27] 方玉川,常勇,黑登照. 陕西省马铃薯产业发展与脱贫攻坚[C]//屈东玉,陈伊里. 2018年中国马铃薯大会,哈尔滨:哈尔滨地图出版社,2018.

Research Progress on Establishment of Potato Suspension Cell Culture System

SHI Jiu-ming, GONG Jing-hui, CHEN Lu, WANG Xin-min, YAN Ming-ying, GUO Peng-hui

(Life Science and Engineering College of Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730124, China)

Abstract: Potato suspension cell culture system is particularly important in potato application research, which is the basis of potato breeding research and genetic engineering research. The construction of cell culture system can be roughly divided into four processes, namely, explant selection, callus culture, callus subculture, and suspension cell culture system construction. This paper focused on the establishment of potato suspension cell culture system and its application in the cultivation of new varieties, virus-free potato cultivation, the construction of potato germplasm gene bank and the application of biotransformation reactor.

Keywords: potato; cell suspension culture; tissue culture