



陈兆贵,向雪梅,李希陶,等. 马铃薯“费乌瑞它”愈伤组织诱导及分化技术[J]. 黑龙江农业科学,2023(7):20-24.

马铃薯“费乌瑞它”愈伤组织诱导及分化技术

陈兆贵,向雪梅,李希陶,林静文,林燕文

(惠州学院 生命科学学院,广东 惠州 516007)

摘要:为建立马铃薯植株的离体再生体系,以“费乌瑞它”为材料,开展了不同激素配比对试管苗的继代、愈伤组织诱导及分化的影响研究。结果表明,试管苗继代培养适宜的激素配比为 6-BA 0.20 mg·L⁻¹+NAA 0.50 mg·L⁻¹+ZT 0.50 mg·L⁻¹,生根率 75%,平均苗高 2.757 cm;茎段愈伤组织最佳诱导激素配比为 NAA 1.50 mg·L⁻¹+2,4-D 1.00 mg·L⁻¹+6-BA 0.50 mg·L⁻¹,诱导率达到 92.00%;使用相同的激素组合诱导茎段和叶片愈伤组织,诱导率分别为 89.66%和 71.44%;愈伤组织分化最优激素配比为 6-BA 1.00 mg·L⁻¹+GA₃ 1.00 mg·L⁻¹+ZT 1.00 mg·L⁻¹,分化率为 33.33%。初步建立的马铃薯“费乌瑞它”植株的离体再生体系可用于后续马铃薯遗传转化及基因编辑研究。

关键词:马铃薯;“费乌瑞它”;愈伤组织;分化

马铃薯为第四大粮食作物,我国是世界上马铃薯种植面积最大的国家,在保障国家粮食安全方面具有重要的作用。培育高产、稳产、优质及抗性好的新品种一直是马铃薯育种界的努力方向,但由于我国马铃薯种质资源的遗传基础比较狭窄,使得利用传统有性杂交等常规育种手段对马铃薯遗传改良的效果有限。随着植物转基因和基因编辑技术的发展,应用基因编辑技术开展马铃薯品种遗传改良已成为马铃薯分子育种的一个主要研究方向^[1-2]。应用基因编辑技术开展马铃薯研究的前提是建立起高效的马铃薯植株离体再生和遗传转化体系。影响马铃薯植株离体再生体系的因素较多,包括材料基因型、外植体种类和生理状态、激素种类及配比、培养条件等^[3-4]。对于同一马铃薯品种,培养基中的激素种类和浓度比例对于愈伤组织诱导及分化具有重要的影响,前人对不同激素比对马铃薯愈伤组织诱导及分化的影响进行了较为深入的研究^[5-8]。牛瑜琦等^[9]研究晋薯 16 号品种植株再生体系时得到诱导愈伤组织率效果最好的激素配比为 6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA+0.5 mg·L⁻¹,愈伤组织诱导率为 88%,且后期没有发生褐化现象;愈伤组织分化率最高的激素配比为 6-BA 1.5 mg·L⁻¹+GA₃ 2.0 mg·L⁻¹+ZT 1.0 mg·L⁻¹,分化率为 32.6%,且分化速度

较快,14 d 之后有较多的丛生芽产生。侯丁一等^[10]以不同品种马铃薯块茎建立优化再生体系,其中“费乌瑞它”品种最佳诱导培养基是 IAA 1.0 mg·L⁻¹+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+GA₃ 0.2 mg·L⁻¹+ZT 2.0 mg·L⁻¹,诱导率为 58.33%,愈伤组织分化率最高的培养基配比为 IAA 1.0 mg·L⁻¹+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+GA₃ 0.5 mg·L⁻¹+ZT 2.0 mg·L⁻¹,分化率为 84.12%。而冯光惠等^[11]研究表明“费乌瑞它”的愈伤组织分化率最高的培养基配比为 6-BA 0.075 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹+GA₃ 0.10 mg·L⁻¹,其诱导率为 75%,分化成苗率为 47.5%。张冬梅等^[12]比较了“大西洋”品种的茎段和叶片的愈伤组织诱导效果,茎段在 MS+6-BA 0.25 mg·L⁻¹+NAA 0.40 mg·L⁻¹条件诱导率达到 96.67%,而叶片在 MS+6-BA 5.00 mg·L⁻¹+NAA 0.30 mg·L⁻¹条件下诱导率为 77.04%,在分化阶段茎段和叶片诱导的愈伤组织在 MS+6-BA 5.00 mg·L⁻¹+NAA 0.10 mg·L⁻¹+GA₃ 10.00 mg·L⁻¹条件下,不定芽分化率均可达 40%以上,分化出的芽多且较壮。对于同一马铃薯品种,不同研究者所用外植体材料和培养条件不同,愈伤组织诱导和分化所需的激素配比存在较大的差距,因此有必要在前人的基础上继续探索植株再生各个阶段最合适的激素配比。

马铃薯品种“费乌瑞它”是广东省等南方冬种薯区主要的种植栽培品种,具有早熟、丰产和品质好等优点,但存在抗病性较差的问题,可以进一步应用基因编辑技术对其进行遗传改良。本文以马铃薯“费乌瑞它”品种为研究对象,研究不同的激

收稿日期:2023-03-27

基金项目:惠州市乡村振兴科技专项(2018SC040208);广东省普通高校特色创新类项目(2019KTSCX176)。

第一作者:陈兆贵(1973-),男,博士,教授,从事马铃薯遗传育种研究。E-mail:chenzg1973@126.com。

素组合对其试管苗的继代、茎段诱导愈伤组织及分化的影响,初步建立起高效的马铃薯植株再生体系,为后续开展遗传转化和基因编辑技术提供支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

马铃薯“费乌瑞它”的无菌试管苗,为惠州学院生命科学学院植物组织培养室保存的材料。

1.2 培养基配制

以 MS 为基础培养基,加入蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,根据不同的试验方案采用不同种类激素和浓度进行配比,培养基配制后将 pH 调整为 5.8,分装到不同的培养瓶后,放置在高压蒸汽灭菌锅中灭菌后冷却备用。

1.3 试管苗继代

将生长良好马铃薯试管苗进行继代培养,在超净工作台上将试管苗剪成约 1.5 cm 小段,保留 1~2 个腋芽接种于继代培养基,继代培养基根据不同的激素组合,共设置 6 个处理(表 1)。将接种后的材料放置在温度 $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光照时间为 16 h、光照强度为 $2\ 000\sim 2\ 500 \text{ lx}$ 条件下培养,14 d 后统计出芽时间、植株高度、长势、生根率等指标。

生根率(%) = 生根幼芽数 / 总外植体数 $\times 100$

表 1 不同处理 6-BA、NAA、ZT 配比

处理	激素浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		
	6-BA	NAA	ZT
A1	1.00	0.75	0.50
A2	3.00	1.00	0.75
A3	1.50	0.50	0.75
A4	2.00	0.75	1.00
A5	0.20	0.50	0.50
A6(CK)	0	0	0

1.4 愈伤组织诱导

以 MS 为基本培养基,选用 6-BA、NAA 和 2,4-D 3 种激素,设置 3 种不同的浓度,按正交试验设计,共设计 9 组激素配比组合(表 2)。选取苗龄 20 d 的马铃薯继代苗茎段作为外植体,接种到不同激素配比的培养瓶中,每个处理接种数 90 个以上,在培养室中黑暗培养,7 d 后观察愈伤组织诱导生长情况,统计诱导率。

诱导率(%) = 愈伤化外植体数 / 总外植体数 $\times 100$

表 2 不同处理 6-BA、NAA、2,4-D 配比

处理	激素浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		
	NAA	2,4-D	6-BA
B1	0.50	1.00	0.50
B2	1.00	2.00	2.00
B3	1.50	3.00	1.00
B4	0.50	2.00	0.50
B5	1.00	1.00	1.00
B6	1.50	3.00	2.00
B7	0.50	3.00	2.00
B8	1.00	2.00	1.00
B9	1.50	1.00	0.50

1.5 不同外植体愈伤组织诱导对比

取继代后生长 20 d 的继代苗叶片、茎段,接种于含有 6-BA $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 2,4-D $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中诱导愈伤组织,在培养室进行黑暗培养,在 7 d 后观察愈伤组织生长情况,统计诱导率。

1.6 愈伤组织分化

以 MS 为基本培养基,选用 6-BA, GA_3 和 ZT 3 种激素,按正交设计方法共设置 9 组激素组合(表 3),将茎段诱导的愈伤组织接种到不同组合的激素配比的培养基中,接种后将材料置于培养室中进行培养,30 d 后统计出芽情况。

分化率(%) = 分化不定芽数 / 总外植体数 $\times 100$

表 3 不同处理 6-BA、 GA_3 、ZT 配比

处理	激素浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		
	6-BA	GA_3	ZT
C1	1.00	0.50	0.50
C2	2.00	1.00	1.00
C3	3.00	2.00	0.75
C4	1.00	1.00	1.00
C5	2.00	2.00	1.50
C6	3.00	0.50	2.00
C7	1.00	0.50	2.00
C8	2.00	2.00	1.50
C9	3.00	1.00	1.00

1.7 数据分析

采用 Excel 2010 和 DPS 7.05 对数据进行统计和计算分析。

2 结果与分析

2.1 不同激素对比对继代苗生长的影响

由表4可知,A1、A3和A5培养基中生长14d的继代苗平均高度均高于对照A6,其中A5培养基中的继代材料6d开始出芽,生长良好,叶片多

且较大,生根率较高,为75%;A1培养基同样6d开始发芽,培养出的继代苗高度和植株长势都比较良好,但继代苗的生根率较低,仅有10%;而A2培养继代效果最差,出芽时间最晚,8d才开始出芽,不生根且长势差。

表4 不同激素对比对培养14d继代苗生长的影响

处理	接种数/个	出芽时间/d	平均苗高/cm	生根率/%	植株长势
A1	20	6	2.845	10	良好,叶片少较大,有愈伤组织
A2	20	8	2.362	0	较弱,叶片小较少,有愈伤组织
A3	20	6	3.074	15	良好,叶片大较多,有愈伤组织
A4	20	7	2.433	15	较弱,叶片小较多,有愈伤组织
A5	20	6	2.757	75	良好,叶片多较大,有少许愈伤组织
A6(CK)	20	6	2.557	80	良好,叶片多较小,无愈伤组织

2.2 不同激素对比对愈伤组织诱导率的影响

茎段接种培养8d后,两端切口开始膨大变粗出现乳白色,并逐渐向中部扩展。16d左右时,切口处会长出肉眼可见的愈伤组织(图1)。由表5可知,9组激素配比的培养基均能诱导出愈伤组织,其中以B9培养基诱导效果最佳,诱导

率达到92.00%,且愈伤组织个体大,均匀,无褐变情况。其次为B1培养基,诱导率为90.43%,但愈伤组织个体较小,且不均匀,存在褐变情况。而B3和B6处理组愈伤组织诱导率较低,只有77.78%和59.81%,说明高浓度的激素组合并不利于诱导愈伤组织。



图1 生长8d的茎段愈伤组织(左)、生长16d的茎段愈伤组织(右)

表5 不同激素及对比对马铃薯茎段诱导愈伤组织的影响

处理	接种数/个	诱导率/%	愈伤组织质量
B1	94	90.43	白色,愈伤组织较小,不均匀,质地硬,有褐变
B2	95	89.47	白色,愈伤组织较小,均匀,质地硬
B3	90	77.78	浅绿色,愈伤组织小,均匀,质地软
B4	114	89.47	白色,愈伤组织突起膨大,均匀,质地硬
B5	107	86.92	白色,愈伤组织较大,较B9小,不均匀,质地软
B6	107	59.81	浅绿色,愈伤组织小突起,均匀,质地软
B7	111	86.49	白色,愈伤组织较大,较B9小,均匀,质地硬
B8	105	87.62	白色,愈伤组织有大有小,不均匀,质地硬
B9	100	92.00	白色,饱满,愈伤组织突起膨大,质地硬

2.3 不同外植体愈伤组织的诱导效果

分别将58个外植体茎段和59个外植体叶片接

种于NAA 1.50 mg·L⁻¹+2,4-D 1.00 mg·L⁻¹+6-BA 0.50 mg·L⁻¹的诱导培养基中进行黑暗处

理,经过诱导 14 d 后茎段的诱导率为 89.66%,愈伤组织突起膨大,颜色为均匀白色,质地硬;叶片的诱导率为 71.42%,愈伤组织呈米粒状依附于叶片上,颜色为均匀浅绿色,质地硬(表 6,图 2)。

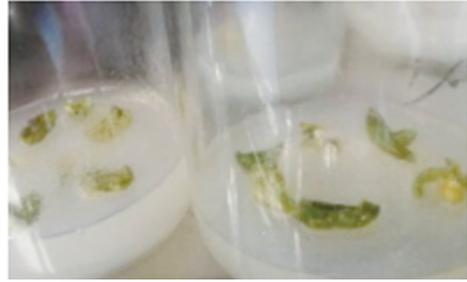
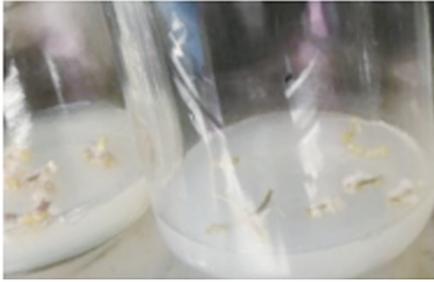


图 2 茎段(左)、叶片(右)暗处理 14 d 诱导的愈伤组织

表 6 茎段和叶片诱导的愈伤组织效果

处理	接种数/个	诱导率/%	愈伤组织质量
茎段	58	89.66	白色均匀、质地硬
叶片	59	71.42	浅绿色均匀、质地硬

2.4 不同激素比对愈伤组织不定芽分化的影响

将茎段愈伤组织转到分化培养基中,光照培养 12 d 以后愈伤组织中部长出嫩绿色小芽,30 d 左右长出肉眼可见的嫩芽(图 3)。由表 7 可知,C4 培养基出芽最早,仅 12 d,C1 和 C7 出芽时间最晚,均为 18 d;C4 分化率最高,为 33.33%,其次是 C9,分化率为 20.00%,第三是 C1,分化率为 17.65%,其他培养基的分化率则较低,长势也较弱。

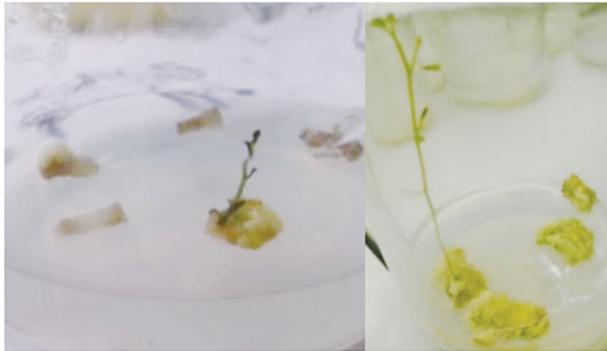


图 3 培养 12 d(左)和 30 d(右)茎段愈伤组织分化情况

表 7 不同激素比对茎段愈伤组织不定芽分化的影响

处理	愈伤组织数/块	芽分化率/%	出芽时间/d
C1	34	17.65	18
C2	30	6.67	14
C3	34	2.94	15
C4	30	33.33	12
C5	27	3.70	14
C6	33	6.06	14
C7	25	12.00	18
C8	36	11.11	16
C9	30	20.00	16

3 讨论

马铃薯植株离体培养时,其再生能力受多种因素影响,对于同一种马铃薯品种,影响愈伤组织的诱导、分化的重要因素是激素配比,高浓度的生长素和细胞分裂素配比有利于愈伤组织的诱导,而低浓度配比则有利于愈伤组织的分化。本研究采用正交试验对 NAA、2,4-D 和 6-BA 3 种激素配比进行比较,结果表明在生长素和细胞分裂素配比比较高时,有利于愈伤组织的诱导,当 NAA $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2,4-D $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的激素组合,“费乌瑞它”品种的茎段诱导率达到 92.00%,效果较好,而当激素组合为 NAA $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2,4-D $4.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,诱导率只有 59.81%,说明过高的生长素浓度反而对茎段诱导率有一定的抑制,这与前人的研究结论相似^[13-14]。

方贯娜等^[15]和江林娟等^[16]的研究表明,在马铃薯离体再生体系中,愈伤组织的分化与细胞分裂素关系较大,对芽的分化促进最大的植物激素是 6-BA,玉米素 ZT 对芽的分化也同样具有重要的促进作用,而 GA_3 对芽的分化和伸长有重要的促进作用。本研究在分化阶段,选用不同浓度的 6-BA、 GA_3 和 ZT 激素组合配比进行比较,9 组不同激素配比中马铃薯分化率为 2.94% ~ 33.33%,这与蒲秀琴^[17]研究同一基因型的外植体在不同的激素作用下分化率存在差别的结论一致。尽管愈伤组织诱导率较高,但分化率偏低,可能与愈伤组织的生理状态有关,有一些愈伤组织在生长过程中容易发生褐变,褐变能抑制外植体、细胞、培养基和多种酶的生长和分化甚至死亡。

6-BA 和 KT 不仅促进酚类化合物合成,而且刺激多酚氧化酶的活性,增加褐变,而生长素类如 NAA 和 2, 4-D 可延缓多酚合成,减轻褐变^[18]。另外,预切 NaCl 处理可减少马铃薯外植体的褐变,预切 NaCl 处理通过影响多酚氧化酶活性和几种游离氨基酸包括谷氨酸、酪氨酸、精氨酸和脯氨酸含量,从而不发生褐变^[19]。

4 结论

本试验对马铃薯“费乌瑞它”品种的试管苗继代、茎段愈伤组织诱导及分化的激素配比进行了研究,继代培养最佳激素配比为 6-BA 0.20 mg·L⁻¹ + NAA 0.50 mg·L⁻¹ + ZT 0.50 mg·L⁻¹, 茎段愈伤组织诱导为 NAA 1.50 mg·L⁻¹ + 2,4-D 1.00 mg·L⁻¹ + 6-BA 0.50 mg·L⁻¹, 愈伤组织分化为 6-BA 1.00 mg·L⁻¹ + GA₃ 1.00 mg·L⁻¹ + ZT 1.00 mg·L⁻¹, 初步建立了马铃薯植株再生体系,为后续开展马铃薯遗传转化和基因编辑提供技术支持。

参考文献:

- [1] 屈聪玲,贺榆婷,王瑞良,等.植物转基因技术的过去、现在和未来[J].山西农业科学,2017,45(8):1376-1380,1383.
- [2] 叶明旺,李灿辉,龚明.基因组编辑技术在马铃薯精准分子育种中的应用及研究展望[J].生物技术通报,2020,36(3):9-17.
- [3] 齐恩芳.马铃薯再生体系建立及农杆菌介导 AcInv 反义基因转化[D].兰州:甘肃农业大学,2006.
- [4] 杨明贺,朱旭,李楠,等.马铃薯茎段高频再生体系的建立[J].东北农业科学,2019,44(1):57-62.
- [5] 闫婷婷,贺媛,高茜,等.马铃薯品种 Favorita 再生体系的优化[J].分子植物育种,2017,15(8):3057-3062.
- [6] 冯璐.植物生长物质对新品种马铃薯试管苗生长及微型薯

- 诱导的影响[D].太原:山西农业大学,2017.
- [7] 彭昕琴,胡家金,霍妙娟.马铃薯品种“大西洋”高效再生体系的建立[J].湖南农业科学,2008(2):26-28.
- [8] 李凤云,盛万民,于天峰,等.马铃薯不同品种茎段再生系统的筛选[J].中国农业通报,2005,21(8):99-113.
- [9] 牛瑜琦,孙蕾,梅超,等.马铃薯晋薯 16 号愈伤组织再生体系的建立[J].中国种业,2021(2):70-73.
- [10] 侯丁一,张之为,田再民,等.马铃薯不同品种块茎再生体系的建立和优化[J].中国农学通报,2018,34(16):22-28.
- [11] 冯光惠,杜虎平,李夏隆,等.费乌瑞它马铃薯茎尖分化成苗的培养基筛选与病毒的 RT-PCR 检测[J].湖北农业科学,2014,53(20):4988-4991.
- [12] 张冬梅,修志君,冯亚艳,等.马铃薯茎段和叶片再生体系建立[J].内蒙古民族大学学报(自然科学版),2021,36(5):402-408.
- [13] 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):31-33.
- [14] 李娟,程智慧,张国裕.马铃薯叶片高效再生体系的建立[J].西北植物学报,2004,24(4):610-614.
- [15] 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(5):307-310.
- [16] 江林娟,邹雪,黄雪丽,等.响应面法优化马铃薯茎段高效再生体系[J].浙江农业学报,2018,30(6):918-925.
- [17] 蒲秀琴.3种青海省主栽马铃薯外植体的组织培养和植株再生[J].江苏农业科学,2014,42(4):52-54.
- [18] DONG T, CAO Y, JIANG C Z. Cysteine protease inhibitors reduce enzymatic browning of potato by lowering the accumulation of free amino acids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(8):2467-2476.
- [19] MA Y R, WANG H Y, YAN H. Pre-cut NaCl solution treatment effectively inhibited the browning of fresh-cut potato by influencing polyphenol oxidase activity and several free amino acids contents[J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 178:111543.

Callus Induction and Differentiation Technology of Potato "Favorita"

CHEN Zhaogui, XIANG Xuemei, LI Xitao, LIN Jingwen, LIN Yanwen

(College of Life Sciences, Huizhou University, Huizhou 516007, China)

Abstract: In order to establish the ex vivo regeneration system of potato plants, the effects of different hormone ratios on the succession, callus induction and differentiation of test tube seedlings were studied using "Favorita" as the material. The results showed that the suitable hormone ratio for IVF seedling subculture was 6-BA 0.20 mg·L⁻¹ + NAA 0.50 mg·L⁻¹ + ZT 0.50 mg·L⁻¹, rooting rate was 75%, and the average seedling height was 2.757 cm. The optimal induction hormone ratio of stem callus was NAA 1.50 mg·L⁻¹ + 2,4-D 1.00 mg·L⁻¹ + 6-BA 0.50 mg·L⁻¹, and the induction rate reached 92.00%. The same hormone combination was used to induce callus of stem segment and leaf, and the induction rates were 89.66% and 71.44%, respectively. The optimal hormone ratio for callus differentiation was 6-BA 1.00 mg·L⁻¹ + GA₃ 1.00 mg·L⁻¹ + ZT 1.00 mg·L⁻¹, and the differentiation rate was 33.33%. The preliminary established *in vitro* regeneration system of potato "Favorita" plants can be used for subsequent potato genetic transformation and gene editing research.

Keywords: potato; "Favorita"; callus; differentiation