

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2021)05-0385-12

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2021.05.001

遗传育种

马铃薯品种‘并薯6号’遗传转化体系的建立

宋倩娜, 梅超, 霍利光, 王慧杰, 冯瑞云*

(山西农业大学农学院/作物遗传与分子改良山西省重点实验室, 山西 太原 030031)

摘要: 以马铃薯品种‘并薯6号’无菌试管苗茎段作为外植体, 通过对遗传转化过程中预培养时间、植物激素的种类及配比、筛选剂浓度和抗生素的种类及浓度进行研究, 初步建立了马铃薯品种‘并薯6号’的愈伤再生转化体系。结果表明, 预培养时间为2 d时, 愈伤组织诱导率、出苗率及转化频率最高。最适外植体愈伤组织诱导的培养基配方为MS + 2.0 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA) + 0.5 mg/L 2,4-二氯苯酚代乙酸(2,4-D) + 0.4 mg/L 激动素(KT), 愈伤组织的诱导率为86.7%, 愈伤组织形态较紧密, 为深绿色, 茎段两端膨大呈哑铃状, 表面的白色须状物和毛状根较少。最适愈伤组织分化的培养基配方为MS + 1 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA) + 1 mg/L 赤霉素(GA₃) + 1 mg/L 玉米素(ZT), 幼苗比较粗壮, 长势良好。最适的植株再生及生根筛选剂为10 mg/L的潮霉素(Hygromycin B, Hyg), 转化频率较高, 为20.3%。农杆菌抑制剂的最适浓度为200 mg/L的特美汀(Timentin, TMT), 且在愈伤组织诱导、分化及生根阶段都需要加入TMT。综上所述, 通过对农杆菌介导的愈伤再生转化过程中各个因素的研究, 初步建立了‘并薯6号’的遗传转化体系, 为马铃薯分子育种发展提供一定的基础。

关键词: 马铃薯; 农杆菌介导的转化; 植物激素; 遗传转化体系

Establishment of Genetic Transformation System for Potato Variety 'Bingshu 6'

SONG Qianna, MEI Chao, HUO Liguang, WANG Huijie, FENG Ruiyun*

(College of Agriculture, Shanxi Agricultural University/Key Laboratory of Crop Genetics and

Molecular Improvement of Shanxi Province, Taiyuan, Shanxi 030031, China)

Abstract: The genetic transformation system of *Solanum tuberosum* cv. 'Bingshu 6', using stem segments of plantlets *in vitro* as explants, was preliminarily established through studying the pre-culture time, plant hormones and their ratios, selection concentrations, and antibiotics and their concentrations. The ratio of callus induction, differentiation and the transformation frequency was the highest when pre-culture time was two days. The most suitable callus induction medium was MS + 2.0 mg/L 6-benzylaminopurine (6-BA) + 0.5 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) + 0.4 mg/L kinetin (KT), on which the ratio of callus induction was 86.7%, and the shape of callus was dumbbell-shaped and color was dark green, meanwhile, white hairs and hairy roots were less on the surface. The most suitable callus differentiation medium was MS + 1 mg/L 6-benzylaminopurine (6-BA) + 1 mg/L gibberellin (GA₃) + 1 mg/L zeatin (ZT), on which the shoots were strong and growing well. The optimum screening pressure for plants regeneration and rooting was 10 mg/L hygromycin B, and the transformation frequency was 20.3%. The optimum concentration of agent for

收稿日期: 2021-11-09

基金项目: 山西省农业科学院作物科学研究所博士基金(ZB1102, ZB1901); 山西农业大学博士基金(2021BQ44); 山西省博士毕业生来晋工作奖励科研项目(SXBYKY2021084); 山西省重点研发计划项目(201903D221076); 山西省农业科学院应用基础研究计划(YGC2019FZ1)。

作者简介: 宋倩娜(1986-), 女, 助理研究员, 主要研究马铃薯基因组编辑、遗传转化及品质改良。

***通信作者(Corresponding author):** 冯瑞云, 博士, 副研究员, 研究方向为马铃薯育种, E-mail: Fengruiyun1920@163.com。

Agrobacterium bacteriostatic inhibition was 200 mg / L timentin, and the timentin was needed in callus induction, differentiation and rooting. In conclusion, the genetic transformation system of 'Bingshu 6' was preliminarily established through studying the factors at each stage of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation, which would provide the certain basis for the development of potato molecular breeding.

Key Words: *Solanum tuberosum*; *Agrobacterium*-mediated transformation; plant hormone; genetic transformation system

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)为茄科茄属一年生同源四倍体草本植株,是中国继小麦、玉米和水稻后的第四大粮食作物^[1]。马铃薯营养丰富、适应性强、产量高、生育期短、经济效益高等特点使其成为重要的粮食作物,也是工业加工各种产品的原料^[2]。近年来,随着粮食问题日益地严峻,马铃薯产业成为了中国粮食安全战略中不可或缺的一部分。马铃薯的产量、品质是影响中国马铃薯产业的最根本问题,只有积极的开展种质资源创新和新品种选育才能逐步解决这些问题^[3]。目前马铃薯品种改良的主要手段包括传统育种和植物基因工程育种。

马铃薯基因型复杂、自交衰退性等特点导致传统育种周期长和效率低^[4]。而植物基因工程育种手段则可以大大的缩短育种周期、提高育种效率^[5,6]。农杆菌介导的遗传转化是植物基因工程育种中的必要环节。近几年来,人们利用此方法将外源优良基因转入到马铃薯内进行抗性品质的改良并取得了一定的进展^[7]。但是,根癌农杆菌介导的马铃薯遗传转化受到各种因素的影响,如基因型^[8-10]、外植体类型^[11,12]、培养基成分和培养条件^[13]、农杆菌类型及浓度、农杆菌与外植体的共培养时间及农杆菌侵染时间^[14]等。虽然许多马铃薯品种的遗传转化体系已经建立,但是这些体系是相对独立的,不同的体系适合不同的品种。

马铃薯‘并薯6号’是由山西农业大学农学院(山西省农业科学院作物科学研究所)选育而成的品种,其具有生长势强、抗病性强、抗旱性强、产量高等优点,但是也存在芽眼较深等缺点。因此,‘并薯6号’的改良对山西省马铃薯产业发展具有重要的意义。本研究以‘并薯6号’为研究材料,通过对遗传转化和再生过程中的外植体培养、植物激素的种类及配比、抑菌剂的种类及浓度和筛选剂的浓度进行研究,建立‘并薯6号’的

农杆菌介导的遗传转化及再生体系,为马铃薯基因功能的验证和品质改良提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料

试验以马铃薯品种‘并薯6号’的无菌试管苗为材料。无菌试管苗由本研究单位提供,由本课题组植物组织培养间培养并保存。

1.1.2 农杆菌菌株及植物表达载体

农杆菌类型为根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*),菌株为GV3101。农杆菌中含有的植物表达载体为基因过表达载体pMDC85,此载体上携带有潮霉素抗性基因*Hyg*(图1),并由本课题组保存。

1.1.3 培养基及其成分

目前,关于马铃薯愈伤组织诱导及再生所用的激素主要包括生长素类(IAA、NAA和2,4-D)、细胞分裂素类(6-BA和ZT)以及GA₃等^[15,16]。以已发表的研究报道为基础,设计了以下的试验。本试验所用的基本培养基为MS(Murashige & Skoog Medium),各种培养基的命名以及包含的成分见表1。

1.2 试验方法及培养条件

1.2.1 无菌试管苗的扩繁

剪取带有一个或者两个腋芽的‘并薯6号’的茎段作为外植体,将其形态学下端插入到MS固体培养基(4.43 g/L MS粉末、30 g/L蔗糖和7 g/L琼脂,pH 5.8),每个350 mL培养瓶中插入的茎段数为8个。将培养瓶置于组织培养间内进行培养,培养条件为光照强度2 000 lx,温度(25 ± 2)℃,光照周期为16 h/8 h(光照/黑暗)。待苗龄为4周后,按照上述相同的方法和培养条件继续进行扩繁培养。

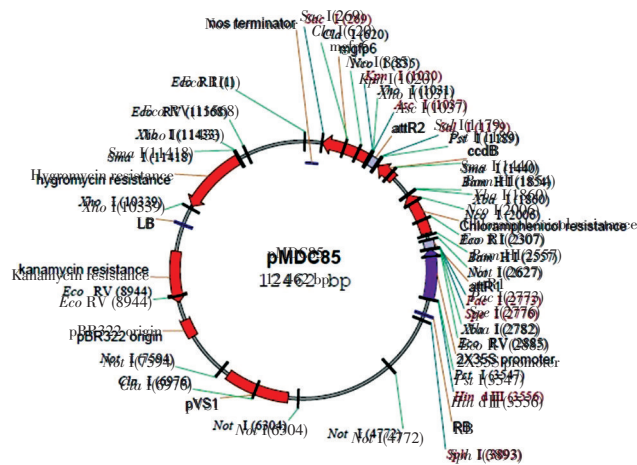


图1 pMDC85载体图
Figure 1 pMDC85 vector

表1 培养基成分
Table 1 Medium components

培养基 Medium	培养基成分 Medium composition	pH
MS固体培养基 Solid MS	4.43 g/L MS粉末 + 30 g/L蔗糖 + 7 g/L琼脂	5.8
MS液体培养基 Liquid MS	4.43 g/L MS粉末 + 30 g/L蔗糖	5.8
LB液体培养基 LB liquid medium	10 g/L胰蛋白胨 + 5 g/L酵母提取物 + 5 g/L氯化钠	7.4
预培养培养基 Pre-culture medium	MS固体培养基 + 1 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-Benzylaminopurine, 6-BA) + 0.1 mg/L 2,4-二氯苯酚代乙酚(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)	5.8
共培养培养基 Co-culture medium	MS固体培养基 + 1 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-Benzylaminopurine, 6-BA) + 0.1 mg/L 2,4-二氯苯酚代乙酚(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D) + 50 μmol 乙酰丁香酮(Acetosyringone, AS)	5.8
愈伤组织诱导培养基 Callus inducing medium (CIM)	CIM + (0, 5, 10, 15, 20, 30和40 mg/L)潮霉素(Hygromycin B, Hyg) + (0, 100, 200和300 mg/L)特美汀(Timentin, TMT)或头孢霉素(Cefotaxime, Cef)	5.8
愈伤组织分化培养基 Shoot inducing medium (SIM)	SIM + (0, 5, 10, 15, 20, 30和40 mg/L)潮霉素(Hygromycin B, Hyg) + (0, 100, 200和300 mg/L)特美汀(Timentin, TMT)或头孢霉素(Cefotaxime, Cef)	5.8
生根培养基 Root inducing medium (RIM)	RIM + (0, 5, 10, 15, 20, 30和40 mg/L)潮霉素(Hygromycin B, Hyg) + (0, 100, 200和300 mg/L)特美汀(Timentin, TMT)或头孢霉素(Cefotaxime, Cef)	5.8

1.2.2 农杆菌菌液的制备

挑取含有pMDC85质粒的GV3101农杆菌单菌落, 接种于含有50 g/L卡那霉素和50 g/L利福平的LB液体培养基中(10 g/L胰蛋白胨、5 g/L酵母

提取物和5 g/L氯化钠, pH 7.4), 置于摇床内, 28℃, 220 r/min, 黑暗条件下过夜培养至生长对数期。将培养好的农杆菌菌液于3 000 r/min离心10 min, 弃掉上清液。用MS液体培养基(4.43 g/L

MS 粉末和 30 g/L 蔗糖, pH 5.8) 重悬农杆菌沉淀物, 并稀释至浓度为 $OD_{600} = 0.6$, 用于后续外植体的浸染。

1.2.3 外植体的预培养

以生长周期约为 4 周的无菌苗为对象, 剪取不带有腋芽的、长度约为 1 cm 的茎段为外植体, 置于预培养培养基上进行预培养(表 1)。培养条件与上述相同, 预培养时间设置为 0, 1, 2, 3 和 4 d。每组预培养试验的茎段数为 20 个/培养皿, 3 次重复。

1.2.4 外植体的浸染及共培养

收集预培养处理后的茎段外植体, 将其置于提前准备好的农杆菌菌液中浸泡 10 min, 在此期间轻柔的摇晃混匀几次, 使外植体与农杆菌菌液充分接触。浸染结束后, 将外植体转移至多层无

菌滤纸上, 吸干多余农杆菌菌液。将外植体以平铺方式接种到共培养培养基上进行共培养(表 1), 黑暗条件下, 28℃ 共培养 2 d。

1.2.5 外植体愈伤组织诱导培养基的筛选

将共培养后的外植体茎段转移到不同的愈伤组织诱导培养基上。以 MS 培养基为基础培养基, 激素组合有 6-BA、NAA、2,4-D、KT 和 GA_3 。将不同的激素种类及配比进行组合, 共设计了 4 种培养基, 分别为 CIM1、CIM2、CIM3 和 CIM4(表 2)。每组试验的茎段数为 20 个/培养皿, 3 次重复。培养条件同上述的试管苗扩繁, 4 周之后统计愈伤组织形成率。愈伤组织形成率(%) = (愈伤组织形成数/外植体总数) × 100。确定愈伤组织诱导的最佳培养基配方以 CIM 命名。

表 2 5 种激素对比对愈伤组织诱导影响的试验(mg/L)
Table 2 Tests on ratios of five phytohormones for callus induction

培养基 Medium	6-BA 6-Benzylaminopurine	NAA Naphthylacetic acid	2,4-D 2,4 - Dichlorophenoxyacetic acid	KT Kinetin	GA_3 Gibberellin
CIM1	2.5	1.0	0	0	0
CIM2	2.5	0.3	0	0	0
CIM3	2.0	0	0.5	0.4	0
CIM4	2.5	0.5	0.5	0	3

1.2.6 愈伤组织分化培养基的筛选

将上述不同愈伤组织诱导培养基中的茎段再次分别转移到愈伤组织分化培养基上。以 MS 培养基为基础培养基, 激素组合有 6-BA、ZT 和 GA_3 。将不同的激素种类及配比进行组合, 共设

计了 2 种培养基, 分别为 SIM1 和 SIM2(表 3)。每组试验的茎段数为 20 个/培养皿, 3 次重复。培养条件同上述的试管苗扩繁, 6 周之后统计出芽率。出芽率(%) = (再生芽数/愈伤组织总数) × 100。确定愈伤组织分化的最佳培养基配方以 SIM 命名。

表 3 3 种激素对比对愈伤组织分化出芽影响的试验(mg/L)
Table 3 Tests on ratios of three phytohormones for shoot induction

培养基 Medium	6-BA 6-Benzylaminopurine	GA_3 Gibberellin	ZT Zeatin
SIM1	1	1	1
SIM2	2	2	2

1.2.7 愈伤组织诱导和芽分化抗生素的筛选

将共培养2 d后的外植体茎段置于愈伤组织诱导培养基上,待愈伤组织形成后转移至含有不同浓度潮霉素(0, 5, 10, 15, 30和40 mg/L)的SIM1培养基上诱导愈伤组织,每两周更换一次培养基直至出芽,每组试验的茎段数为20个/培养皿,3次重复。培养条件同上述的试管苗扩繁,统计出苗率。出苗率(%)=(再生植株数/愈伤组织总数)×100。

1.2.8 生根培养时抗生素浓度的筛选

将未转化的含有腋芽的马铃薯外植体扦插到含有不同浓度潮霉素(0, 5, 10, 15, 30和40 mg/L)的RIM培养基中进行生根处理,每个培养瓶中放入10株,3次重复。培养条件同上述的试管苗扩繁,大约3周之后统计生根率。生根率(%)=(生根外植体数/外植体总数)×100。

1.2.9 最佳抑菌抗生素种类及浓度的筛选

将共培养2 d后的外植体茎段置于含有不同抗生素种类及浓度的CIM3培养基上进行愈伤组织的诱导。抗生素的种类包括头孢霉素(Cefotaxime, Cef)和特美汀(Timentin, TMT),浓度分别为0, 100, 200和300 mg/L。每组试验的茎段数为20个/培养皿,3次重复。培养条件同上述的试管苗扩繁,15 d后统计观察抑菌情况及愈伤组织生长状态。

1.2.10 转化再生植株的PCR检测

采用CTAB法提取再生马铃薯植株叶片的基因组DNA。以载体上的序列及基因组上的序列为

基础设计引物序列 F: 5'-AGGTGGCTCCTA-CAAATGCCACT-3'; R: 5'-GTGTCACGTAT-GAGAAGCCAAAATGACCTTTC-3', PCR扩增产物的大小为1 000 bp。PCR扩增的反应程序为:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,60℃退火30 s;72℃延伸30 s,35个循环;72℃延伸10 min。PCR产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

2 结果与分析

2.1 最佳预培养时间的确定

为了探究‘并薯6号’的最佳预培养时间,共设置了5个预培养的时间梯度,分别为0, 1, 2, 3和4 d。用OD值为0.6的农杆菌菌液浸染10 min,共培养2 d后置于愈伤组织诱导培养基上,培养5周后观察愈伤组织的生长状态,并统计愈伤组织形成率。然后将上述的愈伤组织转移到愈伤组织分化培养基上,大约7周后统计出苗率及转化频率。结果表明,不同预培养时间对外植体形成愈伤组织存在一定的差异。未经过预培养的外植体易发生白化或褐化最后死亡的现象,很难形成愈伤组织。经过预培养后的外植体都可以形成愈伤组织。其中预培养2 d外植体的愈伤组织形成率、出苗率及转化频率均最高,预培养3和2 d外植体的愈伤组织形成率和出苗率差异不大,转化频率次之。而预培养1和4 d外植体的愈伤组织形成率、出苗率及转化频率较低(表4)。因此,最佳的预培养时间为2 d。

表4 预培养时间对愈伤组织形成和分化的影响
Table 4 Effects of pre-culture time on callus induction and differentiation

预培养时间(d) Pre-culture days	外植体数(No.) Number of explants	愈伤数(No.) Number of callus	愈伤形成率(%) Rate of callus induction	再生芽数(No.) Number of regenerated shoot	出苗率(%) Rate of shoot induction	转化频率(%) Frequency of transformation
0	60	3	5.0	0	0	0
1	60	20	33.3	3	15.0	0
2	60	50	83.3	16	32.0	23.2
3	60	45	75.0	13	28.9	10.6
4	60	10	16.7	1	10.0	0

2.2 不同激素种类及配对外植体愈伤组织形成的影响

将外植体预培养2 d后，用OD值为0.6的农杆菌菌液浸染10 min，共培养2 d后置于愈伤组织诱导培养基CIM1、CIM2、CIM3和CIM4上，培养5周后，观察愈伤组织的状态并统计愈伤组织形成率(表5)。结果表明，CIM3的愈伤组织形成率最高，外植体伤口处膨大形成白色的愈伤组织，

且形态较紧密；外植体表面几乎没有白色须状物和毛状根。CIM4的愈伤组织形成率次之，多数外植体伤口处膨大形成白色的愈伤组织，外植体表面几乎没有白色须状物和毛状根。CIM1和CIM2的愈伤组织形成率较低。CIM1的一些外植体伤口处膨大形成愈伤组织，且表面白色须状物和毛状根较多。CIM2的外植体伤口处膨大，且表面的白色须状物较多(图2)。

表5 不同激素种类及配比对茎段愈伤组织诱导的影响
Table 5 Effects of different hormones and ratios on callus induction

处理 Treatment	外植体数(No.) Number of explant	愈伤数(No.) Number of callus	愈伤形成率(%) Rate of callus induction	愈伤组织形态 Morphology of callus
CIM1	60	35	58.3	白色须状物、毛状根
CIM2	60	30	50.0	白色须状物
CIM3	60	52	86.7	白色、结构紧实
CIM4	60	50	83.3	白色、结构松散

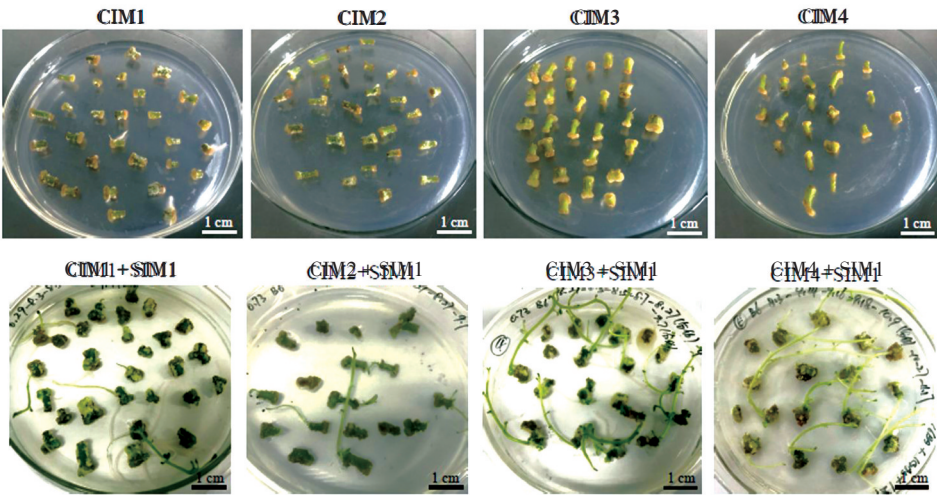


图2 在不同类型培养基上外植体愈伤组织诱导及分化的过程
Figure 2 Callus induction and differentiation processes of explants on different media

2.3 不同激素种类及配比对愈伤组织分化的影响

将上述处于CIM1、CIM2、CIM3和CIM4培养基上的愈伤组织分别平移于愈伤组织分化培养基SIM1和SIM2上，愈伤组织的体积逐渐的增大。

培养3周后，愈伤组织的底部可见绿色芽点的分化。待培养时间达到7周后，在愈伤组织的芽点处分化出带有叶子的芽并从底部延伸出来。不同激素种类及配比对愈伤组织的分化具有一定的影

响(表6)。与SIM2培养基相比较，SIM1培养基诱导愈伤组织分化的效果最佳，分化出的苗较粗壮，长势良好，且有些外植体上有多个芽的分化。其中CIM3 + SIM1的愈伤组织分化的效率最高(图2)。

表6 不同激素种类及对比对茎段愈伤组织分化出苗的影响
Table 6 Effects of different hormones and ratios on callus differentiation and shoot induction

处理 Treatment	愈伤数(No.) Number of callus	再生芽数(No.) Number of regenerated shoot	出苗率(%) Rate of regenerated shoots
CIM1 + SIM1	18	5	27.7
CIM1 + SIM2	17	4	23.5
CIM2 + SIM1	15	7	46.7
CIM2 + SIM2	15	5	33.3
CIM3 + SIM1	26	20	76.9
CIM3 + SIM2	26	14	53.8
CIM4 + SIM1	25	17	68.0
CIM4 + SIM2	25	12	48.0

2.4 不同潮霉素浓度对植株再生的影响

利用上述筛选出来的最佳愈伤组织诱导及分化的最佳培养基组合 CIM3 + SIM1，对芽分化阶段的最佳抗生素浓度进行筛选。将预培养 2 d 的外植体经过农杆菌浸染及共培养后置于愈伤组织诱导培养基 CIM3 上，生长约 5 周后，诱导形成愈伤组织。将形成的愈伤组织转移到含有不同潮霉素浓度的 SIM1 培养基上，诱导芽的分化，每两周换一次培养基。大约培养 7 周后，统计再生芽的数目并计算出苗率及转化频率(表 7)。当潮霉素的浓度为 0 和 5 mg/L 时，愈伤组织生长正常，对芽的分化也没有太大的影响，无法起到筛选的作用。当潮霉素的浓度为 10 mg/L 时，部分愈伤组织的生长受到抑制，出芽也明显受到抑制(图 3)，潮霉素起到了一定的筛选作用，因此转化频率较高。当潮霉素的浓度达到 15 和 30 mg/L 时，经过一段时间的培养后，大部分的愈伤组织生长受到抑制并逐渐褐化，出苗率很低且再生苗长势较弱甚至畸形，高浓度的潮霉素对外植体起到了毒害作用。当潮霉素的浓度达到 40 mg/L 时，愈伤组

织几乎全部趋于死亡，无法得到再生芽。由此可知，当潮霉素的浓度为 10 mg/L 时，即能保证产生抗性芽，又能保证出苗率及转化频率，是最佳的植株再生筛选的抗生素浓度。

2.5 不同潮霉素浓度对再生苗生根的影响

为了确定最适的再生苗生根的潮霉素浓度，将野生型的含有腋芽的马铃薯茎段扦插到含有不同潮霉素浓度的 RIM 培养基中进行培养，大约 8 周后统计生根率(表 8)。当潮霉素的浓度为 0 和 5 mg/L 时，马铃薯植株都可以生根。当潮霉素的浓度高于或等于 10 mg/L 时，马铃薯植株都无法生根，并最终趋于死亡(图 4)。因此，当潮霉素的浓度为 10 mg/L 时，未转化的再生苗无法生根而死亡，转化的再生苗具有一定的抗性可以正常的生根而生长。所以，10 mg/L 的潮霉素为再生苗生根的最佳筛选浓度。

2.6 不同抑菌剂的种类及浓度对转化的影响

当农杆菌菌液浸染外植体后，后续的试验需要进行抑菌处理。适宜的抑菌剂浓度不仅可以抑制农杆菌的生长，同时也不会毒害植株。将共培

表7 不同潮霉素浓度对再生的影响

Table 7 Effects of different hygromycin B concentrations on regeneration

潮霉素浓度(mg/L)	外植体数(No.)	再生芽数(No.)	出苗率(%)	转化频率(%)
Concentration of hygromycin B	Number of explant	Number of regenerated shoots	Rate of regenerated shoots	Frequency of transformation
0	60	57	95.0	2.5
5	60	58	96.7	3.3
10	60	23	38.3	20.3
15	60	12	20.0	10.0
30	60	8	13.3	8.6
40	60	0	0	0

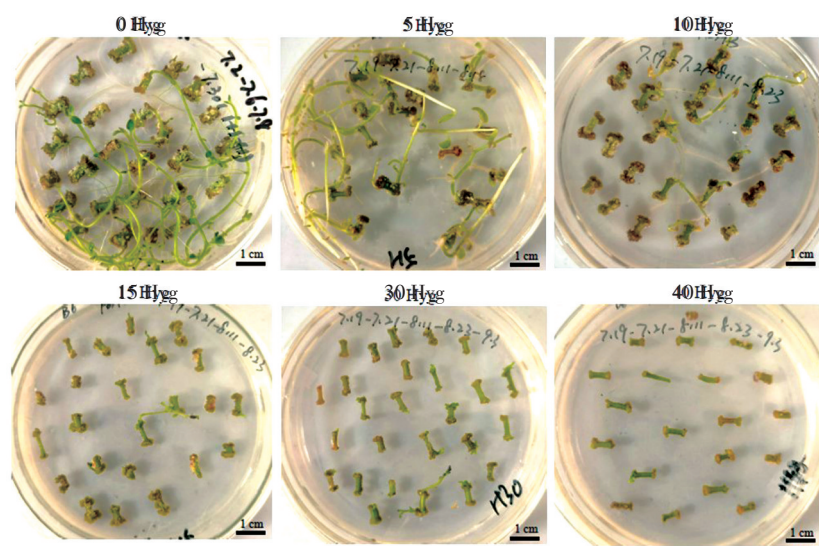


图3 不同潮霉素浓度下再生植株的生长状态

Figure 3 Growth status of regenerated shoots under different hygromycin B concentrations

养2 d后的茎段置于愈伤组织诱导培养基上，培养2周后观察抑菌情况和愈伤组织生长情况(表9)。当选用的抑菌剂为头孢霉素时，不论其浓度为100、200或300 mg/L都无法抑制农杆菌的生长，外植体也无法正常的进行愈伤组织的诱导。当选用的抑菌剂为100 mg/L特美汀时，无法有效的抑制农杆菌的生长；当特美汀的浓度达到200 mg/L时，可以有效的抑制农杆菌的生长，并且可以正常的进行愈伤组织诱导及芽的分化；当特美汀的浓度

为300 mg/L时，可以有效的抑制农杆菌的生长，但是抑菌剂浓度过高对愈伤组织诱导及芽的分化有一定的影响(图5)。因此，选用200 mg/L的特美汀为最佳的遗传转化的抑菌剂浓度。

2.7 再生植株的阳性检测

通过上述对预培养时间、愈伤组织诱导及分化阶段不同激素组合的筛选，确定了再生率较高的培养基类型。根据上述试验得到的最适条件进行新的遗传转化，最终共得到了58株再生马铃薯

表8 不同潮霉素浓度对再生苗生根的影响

Table 8 Effects of different hygromycin B concentrations on rooting of regenerated shoots

潮霉素浓度(mg/L) Concentration of hygromycin B	外植体数目(No.) Number of explant	生根外植体数(No.) Number of rooting explants	生根率(%) Rate of rooting
0	60	60	100
5	60	60	100
10	60	0	0
15	60	0	0
30	60	0	0
40	60	0	0

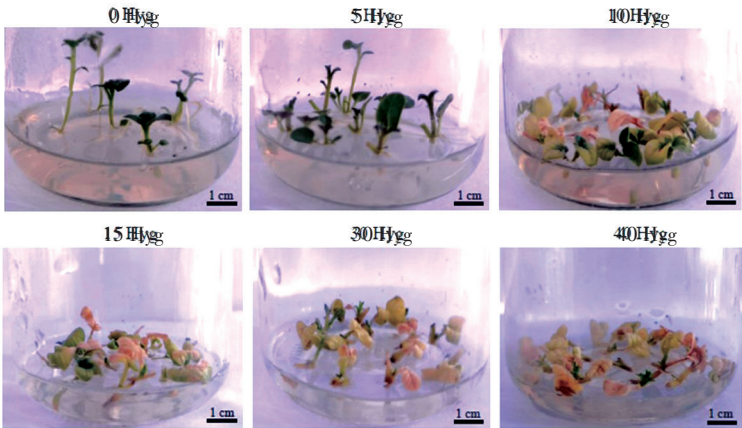


图4 不同潮霉素浓度下再生植株的生根状态

Figure 4 Growth status of rooting of regenerated shoots under different hygromycin B concentrations

表9 不同抑菌抗生素种类及浓度的抑菌试验

Table 9 Results of antimicrobial tests for different antibiotics and concentrations

处理 Treatment	头孢霉素浓度(mg/L) Concentration of cefotaxime	特美汀浓度(mg/L) Concentration of timentin	诱导愈伤培养 Callus induction culture	诱导出芽培养 Shoot induction culture	生根培养 Rooting culture
1	100	0	染菌	染菌	染菌
2	200	0	染菌	染菌	染菌
3	300	0	染菌	染菌	染菌
4	0	100	染菌	染菌	染菌
5	0	200	未染菌	未染菌	未染菌
6	0	300	未染菌	未染菌	未染菌

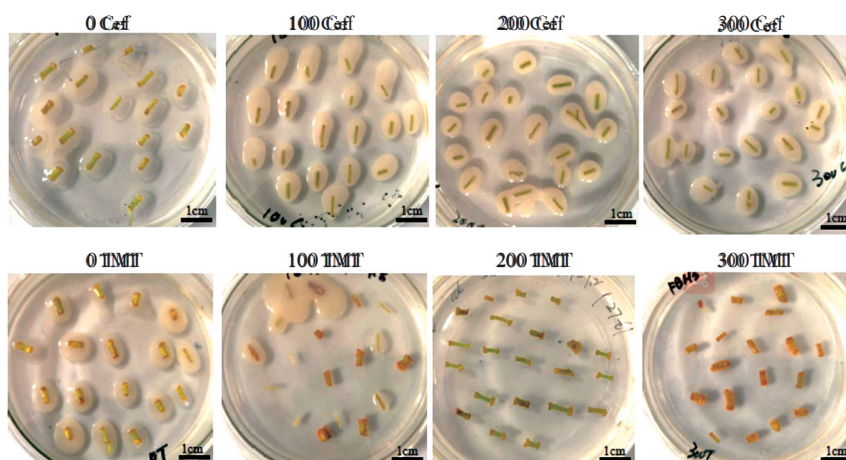


图5 不同抑菌抗生素种类和浓度下愈伤组织的生长状态

Figure 5 Growth status of callus under different antibiotics and concentrations

植株。将获得的再生植株转移到生根培养基上进行筛选后得到了22株抗性植株。提取再生抗性植株的叶片基因组DNA, 经过PCR扩增后, 共有6

株植株的基因组DNA可以扩增出1 000 bp的条带, 与阳性对照扩增条带大小一致。因此, 马铃薯‘并薯6号’的遗传转化效率约为27.3%(图6)。



注: M. 2 000 bp DNA Marker; 1~6. 转化植株; 7. 阳性对照; 8. 阴性对照; 9. 空白对照。

Note: M. 2 000 bp DNA Marker; 1~6. Transformed plants; 7. Positive control; 8. Negative control; 9. Blank control.

图6 再生植株的PCR阳性检测

Figure 6 Positive detection of regenerated plants by PCR

3 讨论

外植体经过预培养后通过调整其生理状态, 减轻胁迫伤害, 促进细胞分裂, 使细胞处于易转化状态, 有利于整合外源基因组, 从而可以提高遗传转化的效率^[16]。熊伟等^[17]和叶明旺等^[18]以马铃薯品种‘PB04’和二倍体马铃薯为材料, 预培养2 d后的外植体抗性愈伤组织诱导率最高。张西英等^[19]研究表明, 预培养2 d的马铃薯外植体分化率和转化率最高。因此, 预培养对外植体的再生及遗传转化具有一定的影响。本研究结果表明, 未经过

预培养的外植体易发生白化或褐化最后死亡的现象, 很难形成愈伤组织。预培养2 d外植体的愈伤组织形成率和出苗率最高, 预培养3和2 d外植体的愈伤组织形成率和出苗率差异不大, 而预培养1和4 d外植体的愈伤组织形成率和出苗率较低。因此, 本试验中, 马铃薯外植体的最佳预培养时间为2 d。未经过预培养的外植体浸染农杆菌后容易死亡, 预培养时间过长导致外植体伤口处的愈伤组织已经形成, 影响农杆菌的浸染, 进而影响遗传转化的效率^[19]。

马铃薯的组织再生受到外植体类型及基因型

的影响,不同的外植体类型及基因型所需的最适再生体系是不同的。罗源^[20]研究表明,以‘克新13号’‘克新12号’‘东农303’和‘早大白’的茎段作为外植体,最适的愈伤组织诱导培养基为MS+30 g/L蔗糖+8 g/L琼脂+2 mg/L 6-BA+1 mg/L 2,4-D和MS+30 g/L蔗糖+8 g/L琼脂+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D;最适愈伤组织分化培养基为MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L,MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L,MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+GA₃ 1.5 mg/L和MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L。邱祁等^[21]研究表明,以‘夏坡蒂’和‘费乌瑞它’的茎段作为外植体,最适的愈伤组织诱导培养基分别为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L和MS+ZT 2.0 mg/L+0.1 mg/L NAA+GA₃ 0.5 mg/L;不定芽诱导最佳培养基分别为MS+ZT 2.0 mg/L+0.1 mg/L NAA+GA₃ 5 mg/L和MS+6-BA 2.0 mg/L+ZT 2.0 mg/L+GA₃ 5 mg/L。张之为等^[22]研究表明,以‘底西瑞’‘费乌瑞它’‘紫花白’‘夏坡蒂’‘大西洋’和‘虎头’6个品种的叶片为外植体,6-BA和GA₃对马铃薯叶片愈伤组织生长量和不定芽分化率有影响。李晶^[23]研究表明,以马铃薯‘东农303’的茎段和薯块为外植体,茎段最佳愈伤组织诱导培养基为MS+0.1 mg/L 2,4-D+1 mg/L BA,薯块最佳愈伤组织诱导及分化培养基均为MS+2 mg/L ZT+1 mg/L IAA。以茎段作为外植体时,相同浓度下,2,4-D诱导愈伤组织的能力优于NAA^[24]。在愈伤组织分化过程中,6-BA起到主要作用,但其浓度过高则会影响芽的分化^[25]。GA₃对马铃薯幼苗的分化和伸长具有明显的促进作用^[26]。另外,在培养基中加入ZT对‘东农303’茎段的芽诱导具有很好的效果^[27]。在本研究中,利用植物激素6-BA、NAA、2,4-D、KT和GA₃对‘并薯6号’愈伤组织诱导研究发现,利用2,4-D有利于愈伤组织的诱导,利用ZT有利于丛生芽的分化。当生长素与细胞分裂素的浓度及比例适合时,愈伤组织的诱导率和分化率较高。

在农杆菌介导的植物遗传转化的各个阶段中,需要向培养基中添加各类抗生素,但是添加的抗生素往往会影响外植体愈伤组织的诱导和分

化,因此抗生素的种类及浓度是植物遗传转化过程中的重要环节。抑制农杆菌生长的抗生素一般都是头孢霉素(Cef)和羧苄青霉素(Carb)。但是由于马铃薯对Carb毒害的忍受力较弱,所以在马铃薯遗传转化过程中最常使用的是Cef^[28]。在本研究中使用的抑菌剂为Cef和特美汀(TMT),通过研究发现,同样浓度下,TMT的抑菌效果优于Cef,并且较低浓度的TMT就可以达到较好的抑菌效果。抑菌剂不仅可以抑制农杆菌的生长,同样也会影响植物的正常生长和分化。选择合适种类的抑菌剂及其浓度在达到抑菌效果的同时又对植物再生影响较小,从而也可以提高植物的遗传转化效率。

农杆菌介导的植物遗传转化是一个复杂的过程。由于不同植物的基因型存在显著差异,因此不同植物对遗传转化过程中的各种因素的敏感度也不同,遗传转化的效率存在很大的差异^[29]。虽然农杆菌介导的马铃薯愈伤再生转化体系已经比较成熟,并且在马铃薯分子育种中也得到了一定应用。但是对于不同基因型马铃薯遗传转化效率问题仍存在很大差异。在马铃薯育种过程中,马铃薯基因型复杂性及自交不亲和性等问题限制了杂交育种的进程。因此通过将优异外源基因导入到马铃薯中来实现品种改良是一种很好的选择,而不同基因型马铃薯遗传转化再生体系的建立是非常必要的^[30]。本研究通过对马铃薯品种‘并薯6号’愈伤再生转化体系建立各个阶段的影响因素进行研究,初步建立该马铃薯品种的农杆菌介导的遗传转化体系,为马铃薯基因功能验证、分子育种和品质改良奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] 谢从华. 马铃薯产业的现状与发展[J]. 华中农业大学学报: 社会科学版, 2012, 97(1): 1-4.
- [2] 陈华宁. 中国马铃薯产业发展现状及对策[J]. 世界农业, 2008, 352(8): 13-15.
- [3] 李勤志. 中国马铃薯生产的经济分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [4] 程永芳, 张丽, 宋玉霞. 马铃薯高效遗传转化受体体系的建立[J]. 西北农业学报, 2016, 25(9): 1350-1357.

- [5] 贺红霞, 李楠, 朱旭, 等. 马铃薯基因组编辑技术的研究进展及应用前景 [C]//屈冬玉, 陈伊里. 马铃薯产业与脱贫攻坚. 哈尔滨: 哈尔滨地图出版社, 2018.
- [6] Nadakuduti S S, Starker C G, Voytas D F, *et al.* Genome editing in potato with CRISPR / Cas9 [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1917: 183–201.
- [7] 张俊莲, 王蒂. 我国马铃薯育种方式的变迁及其转基因育种研究进展 [J]. *中国马铃薯*, 2005, 19(3): 163–167.
- [8] 双宝, 李文芙, 李文滨, 等. 马铃薯优化转化系统的建立 [J]. *马铃薯杂志*, 1996, 10(2): 65–69.
- [9] 贾笑英, 路平, 王蒂. 农杆菌介导的马铃薯茎段遗传转化体系优化研究 [J]. *中国农学通报*, 2006, 22(7): 79–81.
- [10] 张天宇, 张俊莲, 王蒂, 等. 不同品种马铃薯试管薯诱导体系的优化 [J]. *中国农学通报*, 2006, 22(10): 85–88.
- [11] 张宁, 司怀军, 李学才, 等. 根癌农杆菌介导的马铃薯高效遗传转化体系的研究 [J]. *中国马铃薯*, 2004, 18(3): 132–135.
- [12] 王清, 李静文, 戴朝曦, 等. 纯合四倍体马铃薯遗传转化体系优化及转基因块茎的褐化鉴定 [J]. *分子植物育种*, 2006, 4(4): 553–558.
- [13] 李有忠, 刘海英, 张宁, 等. 马铃薯试管薯诱导及其遗传转化体系的优化 [J]. *生物技术*, 2008, 18(3): 65–68.
- [14] 康霞, 徐刚, 王玉萍. 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导的马铃薯高效遗传转化体系筛选及优化 [J]. *中国沙漠*, 2016, 36(1): 225–231.
- [15] Bhaskar P B, Wu L, Busse J S, *et al.* Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato [J]. *Plant Physiology*, 2010, 154(2): 939–948.
- [16] 郑秀芳, 缪为, 李名扬. 根癌农杆菌介导的马铃薯遗传转化体系的研究 [J]. *兰州大学学报*, 2005, 41(3): 41–44.
- [17] 熊伟, 马耀华, 胡碧波, 等. 根癌农杆菌介导的马铃薯转化系统的优化 [J]. *广西农业生物科学*, 2007, 26(1): 1–7.
- [18] 叶明旺, 张春芝, 黄三文. 二倍体栽培马铃薯高效遗传转化体系建立 [J]. *中国农业科学*, 2018, 51(17): 3249–3257.
- [19] 张西英, 张爱萍, 刘江娜. 马铃薯遗传转化体系的优化建立及其主要影响因素 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(7): 3174–3179.
- [20] 罗源. 马铃薯再生体系的建立及 *HALI* 基因遗传转化研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [21] 邱初, 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 王清, 王蒂, 戴朝曦, 等. 奈乙酸、2,4-D 对马铃薯愈伤组织细胞染色体倍性的影响 [J]. *甘肃农业大学学报*, 1997, 12(4): 304–307.
- [25] 罗源, 陈耀峰, 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.
- [26] 杨春, 王杜梅. 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, 22(3): 137–139.
- [27] 王萍, 王罡, 季静. 马铃薯两个基因型不同外植体的组织培养与植株再生 [J]. *中国马铃薯*, 2006, 20(6): 326–328.
- [28] 郑进, 康薇, 洪华珠. 抗生素在农杆菌介导植物转基因中的应用 [J]. *林业科技开发*, 2006, 20(3): 290–293.
- [29] 周连霞, 陈莉, 吴颖, 等. 农杆菌介导仙客来遗传转化体系的建立 [J]. *吉林农业大学学报*, 2009, 31(3): 258–261.
- [30] Amar K. *Agrobacterium*-mediated transformation of potato genotypes [J]. *Agrobacterium Protocols*, 1995, 25(5): 121–128.