

中图分类号: S532; Q813.1² 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2005)05-0270-03

马铃薯再生体系的建立及其遗传分析*

秦敏¹, 郜刚²

(1. 北京师范大学生命科学院, 北京 100875; 2. 山西师范大学生命科学院, 山西 临汾 041004)

摘要: 以马铃薯品种中薯 2 号为试材, 筛选不同的培养条件建立了较高效马铃薯再生体系, 并对其再生过程进行了蛋白质检测和 RAPD 分析。愈伤组织诱导的最佳培养基为 MS+6-BA 2.25mg·mL⁻¹+NAA 0.1~0.2mg·mL⁻¹, 愈伤组织的诱导率达到 73.17%~76.01%。自然生长、初代培养和继代培养的马铃薯再生体的水溶性蛋白之间存在着一些差异。利用 RAPD 标记技术, 通过对 54 个引物的严格筛选, 获得了 3 个扩增产物略有差异的引物。

关键词: 马铃薯; 组织培养; 遗传分析

随着马铃薯产业的深入发展, 马铃薯育种专家已利用更多的马铃薯变异材料培育出产量高、品质优良、抗病虫和适应性广的品种。所以有必要对马铃薯进行一系列的检测, 并用于指导生产实践。本试验对马铃薯再生体再生过程中的各个阶段的组织进行了一系列的遗传检测^[1], 旨在建立一套灵敏、完整的检测马铃薯的方法。

1 材料与方 法

1.1 马铃薯高效再生体的建立

将冲洗干净的马铃薯茎段和叶片用乙醇消毒 30 s, 用 0.1%升汞溶液消毒 7~8 min, 最后用无菌水漂洗 3 次, 接种在不同的 MS 培养基上(事先灭菌, 122 30 min)。参照李浚明^[2]提出的植物组织无菌培养的一般步骤培养。

1.2 RAPD 检测

1.2.1 提取并检测 DNA

用修改过的 CTAB 法提取马铃薯 DNA 并用紫外分光光度计法和凝胶电泳检测法对 DNA 进行质量检测^[3]。

1.2.2 RAPD 反应

RAPD 反应体系为 20 μL, 含 20 mmol·L⁻¹ Mg²⁺, 200 mmol·L⁻¹ Tris-HCl; 100 mmol·L⁻¹

(NH₄)₂SO₄; 100 mmol·L⁻¹ KCl; 1% TritonX-100; 20 mmol·L⁻¹ MgCl₂; dNTPs 10 mmol·L⁻¹; Taq DNA 聚合酶 2U·μL⁻¹; 引物 1.5 mmol·L⁻¹, 模板 25~50 μg; dd H₂O 补足体积, 反应混合物用 15 μL 的石蜡油覆盖。反应程序为 94 5 min, 94 1 min, 40 1 min, 72 2 min。扩增 39 个循环, 最后 72 2 min, 4 保存^[4]。用 0.8%浓度的琼脂糖凝胶检测扩增产物, 按 8 V·cm⁻¹凝胶电泳 1.5 h, 凝胶成像系统拍照, 并记录结果。

1.3 蛋白质遗传分析

分别提取自然生长的马铃薯, 初代培养和继代培养的马铃薯的水溶性蛋白质, 参照夏其昌的蛋白质提取的方法^[5], 并进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。凝胶成像系统下观察电泳结果并照相。

2 结果与分析

2.1 以茎段和叶片为外植体的马铃薯组织培养体系的建立

在统计过程中发现, 对于 B 培养基, 在暗培养 3 d 后有的就可以长出愈伤组织, 在试验中, B2、B3 培养基的愈伤组织的诱导率比较高, 比较适合诱导马铃薯愈伤组织的培养基是 MS+6-BA 2.25 mg·mL⁻¹+NAA 0.1~0.2 mg·mL⁻¹, 愈伤的诱导率为 73.17%~76.01%, 能够较快长出马铃薯再生体的培养基是 MS+NAA 0.2 mg·mL⁻¹(表 1, 图 1, 图 2)。

收稿日期: 2005-08-12

作者简介: 秦敏(1981-), 女, 硕士研究生, 北京师范大学生命科学院发育生物学专业。

* 基金项目: 山西省自然科学基金(200203)

表 1 不同激素对比对马铃薯愈伤组织的诱导

序 号	激 素(mg·mL ⁻¹)		接种数	愈伤数	诱导率 (%)
	NAA	6- BA			
A1	0.05	0	7	0	0
A2	0.10	0	5	0	0
A3	0.20	0	7	1	14.29
A4	0.25	0	7	0	0
B1	0.05	2.25	31	11	35.48
B2	0.10	2.25	41	30	73.17
B3	0.20	2.25	46	35	76.01
B4	0.25	2.25	29	9	31.31

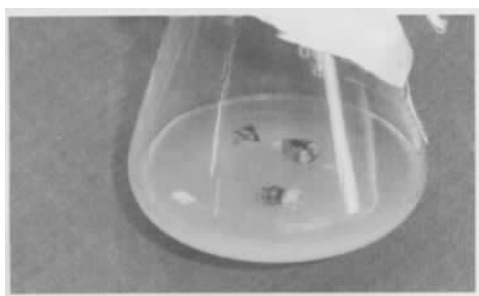


图 1 接种后的愈伤组织

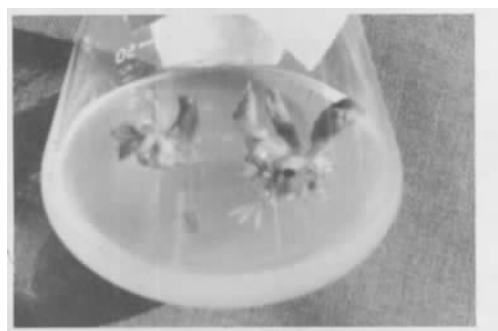


图 2 形成的再生植株

2.2 再生体的RAPD 检测

随机选取 154 个由上海生物有限公司(Operon 公司)生产的 10- 碱基随机序列引物, 对自然生长、初代培养和继代培养的马铃薯 DNA 进行了筛选。其中有 48 个引物可以在马铃薯基因组上引导扩增出一定的产物。平均每个有产物的引物扩增的谱带数为 4, 范围是 1~6 条带, 产物片段大小分布范围是从 200~1000 bp(图 3)。每一个扩增产物可以看作一个遗传位点, 平均每个引物可以检测 4~5 个位点, 则本试验相当于检测了约 180 个位点^[9]。其

扩增产物基本是一致的。筛选获得了 3 个引物对于自然生长、初代培养和继代培养的马铃薯 DNA 的扩增产物有差异(图 3, 图 4)。

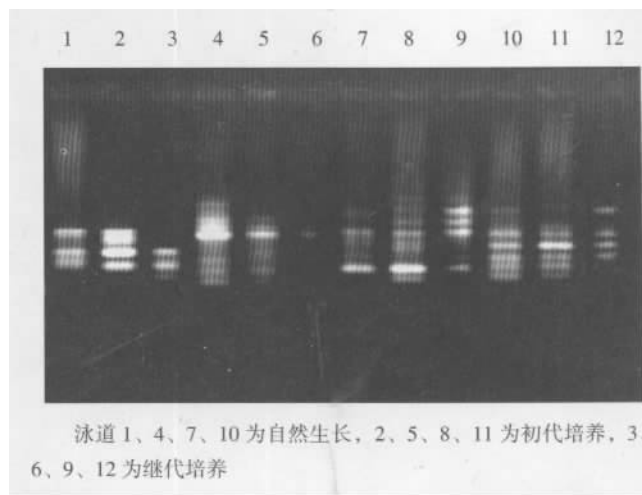


图 3 引物 BA0181 BA0132 BA0192 BA0066 在三种 DNA 之间的扩增结果

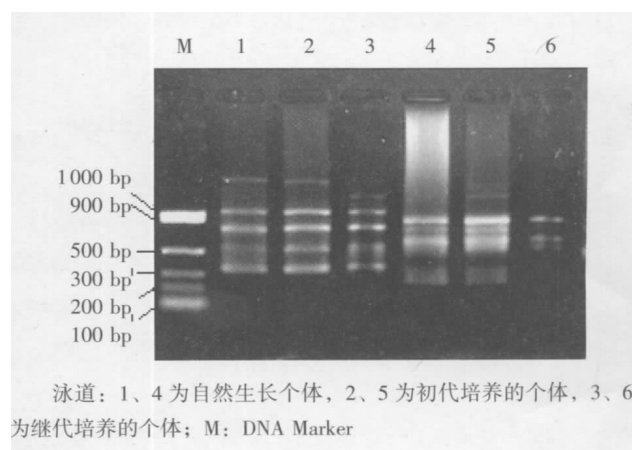


图 4 引物 BA0132 BA0029 在 3 种 DNA 之间扩增的结果

2.3 蛋白质检测结果

比较了初代培养和继代培养的愈伤组织的水溶性蛋白, 从图 5 可以观察到, 3 条主带主要集中在 97 KD、53 KD 和 36 KD 3 个分子量的蛋白, 即 Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase、Glutamic dehydrogenase 和 Phosphorylase 3 个蛋白附近。其中 53 KD 和 24 KD 的 3 种状态的蛋白质的表达量都比较大, 97 KD 的蛋白质表达量略低。在大于 97KD 处自然生长的马铃薯有蛋白质条带, 而组培的马铃薯没有检测到有蛋白表达, 而且在水溶性蛋白表达量方面, 自然生长的马铃薯要明显高于组织培养的马铃薯。

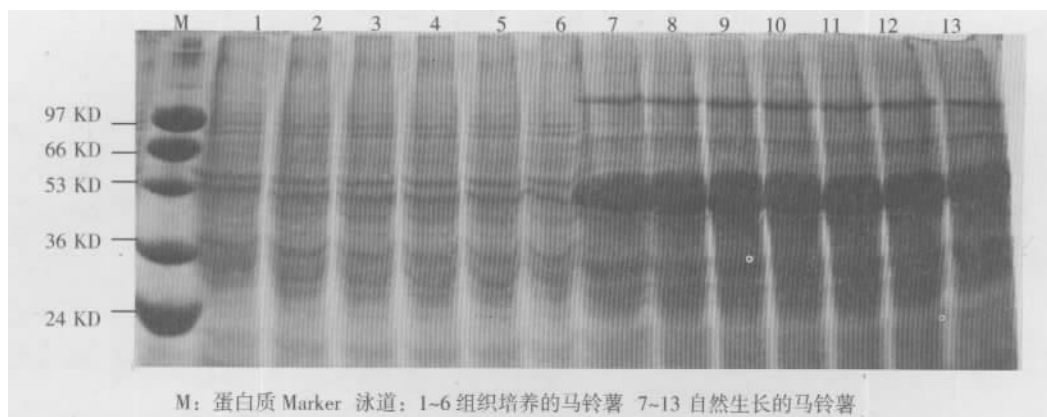


图5 自然、组织培养的马铃薯水溶性蛋白

3 结论与讨论

植物组培过程中除会遇到污染、褐变和体细胞染色体变异等问题,同时也存在着DNA变异等情况。而且培养的代数越多,发生变异的几率就越大。

从电泳结果检测到它们有一条差异带,可能是蛋白表达量出现了差异或是发生了变异。培养后的马铃薯的水溶性蛋白的表达量减小,最终SDS凝胶电泳检测不到,可能是由于它们的生长条件在培养基中加有不同的激素,对组培的马铃薯激素本身就是一种刺激,而且在组培过程中温度和光照时间恒定与自然生长的条件有差异,为变异提供了可能。

在用RAPD进行DNA的检测时,扩增结果出现了微小差异。产生差异有两种可能,一种是DNA变异,另一种是由于RAPD本身的局限性即重复性低造成的,而RAPD的重复性问题可能是产生微小差异的主要原因。RAPD最主要的缺点就是它的重复性低,在实验过程中虽然已经严格控制DNA的浓度,但是在实际操作中由于污染等问

题其重复性还不是很,所以会出现一些微小的差异^[7,8]。DNA是遗传物质,是比较稳定的,是否在经过初代培养和第一次继代培养这么短的时间内发生变异需要认真思考并继续进行研究。

[参 考 文 献]

- [1] 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.
- [2] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1991, 1-8.
- [3] 易金鑫,侯喜林,冷月祥. 茄子基因组DNA提取及RAPD-PCR体系的优化[J]. 江苏农业科学, 2004, (3): 50-52.
- [4] 邱宏,金黎平,陈伊里,等. 马铃薯新型栽培种资源遗传多样性的RAPD分析[J]. 园艺学报, 2004, 31(3):384-386.
- [5] 夏其昌. 蛋白质化学研究技术与进展[M]. 北京: 科学出版社, 1997, 99.
- [6] 白晶,张月学,杨冬鹤,等. 几种重要的分子标记原理及RAPD应用[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2004, 20(5): 89-91.
- [7] 李娟,江昌俊. RAPD标记技术及其在茶树种质资源研究中的应用[J]. 茶业通报, 2004, 26(3): 110-111.
- [8] 李锡香,朱德蔚,杜永臣,等. 黄瓜种质资源遗传多样性的RAPD鉴定与分类研究[J]. 植物遗传资源学报, 2004,5(2):147-152.

Establishment and Genetic Analysis of Regeneration System of Potato

QIN Min¹, GAO Gang²

(1.Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 2.Shanxi Teacher University, Linfen 041004, Shanxi, China)

Abstract: The potato cultivar Zhongshu No.2 was used as a plant material to establish the efficient regeneration system by choosing different mediums. The protein test and RAPD analysis were carried out during

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2005)05-0273-03

研究简报

马铃薯耐盐碱愈伤组织筛选及分化研究

张耀辉, 尹江, 马恢, 高永龙

(河北省高寒作物研究所, 河北 张北 076450)

摘要:以马铃薯 12 个主栽品种的茎、叶为外植体进行愈伤组织诱导和耐盐碱愈伤组织的筛选, MS 分化培养上分化及植株再生的研究。结果表明:愈伤组织诱导率高的品种有夏波蒂、大西洋, 诱导率分别为 96.1%、92.9%, 而且愈伤组织质量最好; 筛选出耐盐碱性强的愈伤组织品种有坝薯 10 号、冀张薯 5 号及 1867; 对于芽的分化, 分化率高的品种有坝薯 8 号、坝薯 10 号; 筛选出了抗盐碱性强的再生苗 7 株, 抗性中等的 60 株, 抗性弱的 3 株, 共 70 株。

关键词:马铃薯; 愈伤组织; 耐盐碱筛选; 分化

盐渍化土壤在世界上分布广泛, 约占世界陆地总面积的 7.6%^[1]。我国是世界盐碱地大国之一, 约有盐渍地 0.27 亿 hm^2 ^[2]。如何利用大面积的盐碱地是我国农业生产上的一个重要问题。马铃薯是重要的粮菜饲兼用作物, 具有适应性强、营养丰富、用途广、产值高、经济效益好等特征。为了充分利用大面积盐碱地, 创造出可观的经济效益和社会效益, 因此选育耐盐碱性强的马铃薯新品种是关键。目前针对马铃薯常规育种和改良方法存在的许多困难, 利用组织与诱变技术相结合选育抗盐碱性强的突变体, 可极大地提高耐盐碱育种效率, 获得优良的新种质。

1 材料与方法

1.1 试验材料

费乌瑞它、大西洋、夏波蒂、克新 1 号、中薯

收稿日期: 2005-05-20

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(302479)

作者简介: 张耀辉(1974-), 女, 河北省高寒作物研究所农艺师, 主要从事马铃薯抗病育种研究及病毒检测。

3 号、坝薯 10 号、坝薯 8 号、冀张薯 5 号、V1-1、1533、2191、1867 共 12 个品种脱毒苗。

1.2 试验方法

1.2.1 脱毒苗的扩繁与壮苗

将培养瓶装的 12 个品种的脱毒苗, 均转入到同样装有 MS 培养基的三角瓶内, 在 18~20 $^{\circ}\text{C}$, 1500 lx 条件下进行光照培养。

1.2.2 愈伤组织的诱导与继代培养

脱毒苗培养 3 周后将苗经 75%酒精处理 0.5~1.0 min, 0.1%氯化汞处理 1.5~2.0 min, 无菌水冲洗 3 次后, 将苗的茎剪成 3~4 mm 小段, 叶至叶柄剪下, 作为外植体接种到诱导培养基上, 在 23~25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下诱导培养愈伤组织。诱导愈伤组织的培养基为: MS+2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+1%蔗糖+0.8%琼脂, 愈伤组织 4 周继代一次, 共继代 2 次, 调查愈伤组织的表现及诱导出愈伤组织的块数, 计算诱导率。

1.2.3 盐碱胁迫培养

将诱导培养基上获得的愈伤组织接种到不同浓

the tissue culture. The optimal medium for callus formation was MS+6-BA 2.25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ +NAA 0.1-0.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the induction rate could reach to 73.17%-76.01%. There were some differences in water soluble proteins for the natural, primary cultured and subcultured potatoes. Three out of fifty-four primers used in the RAPD analysis could amplify polymorphic bands among the three different cultural states. The results suggest that there may be some variations during the establishment of the regeneration of potatoes.

Key Words: potato; tissue culture; genetic analysis