

马铃薯无菌苗叶肉原生质体再生植株

李世君 李向辉 孙勇如

(中国科学院遗传研究所, 北京)

商用马铃薯叶肉原生质体, 在不同的液体培养基中浅层培养, 再生细胞分裂, 并获得愈伤组织。将愈伤组织转到固体培养基上诱导分化, 已从克新四号和 68-62 两个马铃薯品种的原生质体得到再生的完整植株。再生细胞的分裂频率受原生质体培养密度的影响。细胞团的生长对液体培养基中的蔗糖浓度敏感。不同的原生质体培养基对愈伤组织的分化频率的影响非常显著。在分化培养基中加入 3% 的甘露醇, 能提高愈伤组织的分化频率, 并缩短分化期。

关键词 马铃薯 (*Solanum tuberosum* L); 原生质体; 形态发生; 植株再生

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L) 是重要的经济作物, 世界产量在作物中占第 4 位。但由于常规育种的局限性, 难以获得理想的马铃薯品系。用生物工程技术探讨品质的改良已引起了广泛的重视。1977 年美国的 Shepard 和 Totten 首次发表了由 *Solanum tuberosum* L CV Russet Burbank 叶肉原生质体再生植株^[1,2]。继而在英、荷、德、苏等国家也采用马铃薯叶肉原生质体进行再生研究^[1,2,4,5,15,16]。

由于技术难以掌握, Vries 和 Bokelmann 又建立了从悬浮细胞获得原生质体植株再生的技术^[14]; Laine 和 Ducreux 报道了马铃薯离体根尖来源的原生质体再生技术^[10]。马铃薯原生质体植株再生是进行其遗传操作的重要基础。但在我国尚未见报道。

本研究采用国内生产中应用的三个马铃薯栽培品种, 建立了无菌苗叶肉原生质体再生体系。该体系有良好的重复性。

材料与 方法

(一) 无菌苗体系的建立

选用多芽点的商用马铃薯 (*Solanum*

tuberosum L) 品种、克新四号、68-62 与京丰的薯块, 在 24℃ 的培养间中萌发出芽。待幼芽 1cm 大小时, 取下用清水洗净。用 70% 酒精浸泡 30 秒后, 用无菌水洗三遍, 然后在 0.1% 升汞 (HgCl₂) 溶液中浸 6—8min, 再用无菌水洗三遍。最后用无菌滤纸将其上的水吸干, 接种到含有 Prop 固体培养基^[6]的培养瓶中, 在不同温度 (28℃、25℃、21℃), 光强为 4000lx 左右, 每天光照 16h 的条件下, 使其发育成无菌苗。剪取有腋芽的茎段, 在 Prop 固体培养基上继代培养。

(二) 原生质体游离

取上述条件下继代了不同时间 (2、3、4、5、6 周) 的无菌苗叶片, 撕去下表皮, 放入酶液中 (1.0% 纤维素酶 Onozuka R-10, 0.2% Macerozyme R-10, 0.45mol/L 甘露醇, 0.7mmol/L KH₂PO₄, 10mmol/L CaCl₂·2H₂O pH 5.6)。置于 50rpm 旋转摇床上, 在暗处, 21℃ 轻摇 3h 左右, 然后大约静止 2h。酶处理后的悬浮液用 400 目镍丝网过滤, 滤液经 500rpm 离心 5min。吸去上清液,

本文于 1987 年 12 月 28 日收到。

实验材料由中国农科院提供, 特此致谢。

用清洗液 (0.45mol/L甘露醇, 10mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.7mmol/L KH_2PO_4 , pH 5.6) 重新悬浮后离心沉淀, 然后依上述方法洗二次, 再用原生质体培养基洗一次。纯化后的原生质体用原生质体培养基 (V-1、V-2、V-3、D-2、D-3) (表1) 制成悬液, 用血球计数板计算其产量, 并用

表1 V-KM和D_{2a}原生质体培养基
Table 1 V-KM and D_{2a} line protoplast culture media

V-KM ^[2]	葡萄糖 Glucose (mol/L)	蔗糖 Sucrose (mmol/L)
V-1	0.49	0.73
V-2	0.38	0.73
V-3	0.35	0.73
V-4	0.25	0.73
V-5	0.10	0.73
V-6	0.04	60.0
D _{2a} ^[9]		
D-2	0.35	50.0
D-3	0.32	50.0

0.1% 酚藏花红染色, 测定原生质体活力 (存活率), 即未被染色的原生质体总数占统计原生质体总数的百分比。

(三) 原生质体培养

将三种马铃薯的叶肉原生质体悬浮于 V-1、V-2、V-3、D-2、D-3 液体培养基中使之成 1×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 1×10^5 、 3×10^5 、 3.5×10^5 /ml 密度, 各取 3—4ml 分别接种到培养皿 (直径6cm) 中, 用Parafilm封口, 置于24℃、暗处静止培养。接种7天后统计再生细胞分裂频率 (分裂的再生细胞总数占接种原生质体总数的百分比), 并按1:1的比例加入同种培养基进行稀释。待有细胞团出现时, 再用不同降渗的培养基 [V-2→V-3→V-4→V-5 (或V-6)] 定期换液, 补充营养, 直至愈伤组织长到直径约1mm左右。

(四) 植株再生

将直径约1mm大小的愈伤组织, 转到修改过的MS^[11] [奈乙酸 (NAA)

0.2mg/L, 6-苄氨基嘌呤 (6-BA) 1.0mg/L 赤霉素 (GA₃) 0.01mg/L] 上, 放入人工气候箱中培养, 光强 4000lx, 每天光照 16h, 温度24℃。待小愈伤组织增大并变为淡绿色时, 分别转到含有不同植物激素的MS固体培养基 (表5、6) 上诱导分化。将分化的芽 (约1cm大小) 从愈伤组织切下, 移植到盛有Prop固体培养基的培养瓶中诱导根的分化 (条件同无菌苗继代培养)。

结果与讨论

(一) 原生质体的分离

在游离原生质体时, 我们就无菌苗生长环境中的温度因子、无菌苗发育的时间及低温 (4℃) 预处理无菌苗叶片对游离下原生质体质量的影响进行了研究。表2结果表明, 在低温下培养的无菌苗, 有利

表2 无菌苗培养温度对克新四号叶肉原生质体活力的影响

Table 2 The influence of culture temperature of axenic shoot on activity of mesophyll protoplast from Ke Xin 4

温度 (℃)			
Temperature	28	25	21
活力 (%)			
Activity	60.5	71	90.5

于获得高质量的原生质体。

比较不同苗龄的叶肉原生质体。发现从2—3周的叶片中获得的原生质体破碎多; 6周以上则难以游离; 而4周龄游离下的原生质体量多, 完整性好。这表明无菌苗的发育时期也是获得高质量原生质体的一个重要因素。

为了获得更高活力的原生质体, 将25℃下生长4周的无菌苗放到暗处, 4℃下过夜, 然后游离原生质体。游离下原生质体活力可达80%, 较没有预处理的

(71%) 提高了 9%, 这说明 4℃、暗中预处理无茵苗有益于获得更高质量的原生质体。

在上述研究表明的最佳条件下获得了高质量的原生质体(图版 I-1), 其量可达 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ /ml/g 叶片。

(二) 原生质体的游离

1. 原生质体对渗透浓度的反应: 将克新四号叶肉原生质体分别悬浮于 V-1、V-2、V-3 液体培养基中制成密度为 1×10^6 /ml 的悬液, 分别接种到培养皿中, 在 24℃ 暗中静止培养。培养一段时间后, 在不同培养基中的原生质体出现不同的结果。在 V-1 中, 原生质体除部分收缩外, 还有些原生质体产生出芽现象, 最后死

亡。V-2 中的原生质体只有个别的能够分裂, 最终也渐渐死亡。而在 V-3 中的原生质体能正常生长, 分裂频率可达 7.8%, 并能继续发育。这表明原生质体培养基中的渗透浓度是决定培养成功与否的关键因素之一。

2. 原生质体的培养密度对分裂频率的影响: 克新四号叶肉原生质体悬浮于 V-3 中, 制成不同的密度(表 3), 在 24℃、暗中静止培养。3 天后出现第一次再生细胞分裂(图版 I-2); 第 5 天有第二次细胞分裂出现(图版 I-3)。第 7 天统计再生细胞的分裂频率。从表 3 中可以看出克新四号叶肉原生质体的培养密度为 5×10^4 /ml 时, 再生细胞的分裂频率最高

表 3 克新四号叶肉原生质体密度对细胞分裂频率的影响
Table 3 The influence of the density of mesophyll protoplast from Ke Xin 4 on division frequency of cells

密度 ($\times 10^4$ /ml) Density	1	5	6	10	30	35
分裂频率 (%) Division frequency	0.5	12	10	7.8	5.2	5.8

为 12%。这一研究表明, 合适的原生质体密度将有助于提高细胞的分裂频率。克新四号用 V-3 培养的最佳密度为 5×10^4 /ml。

3. 不同基因型的马铃薯在原生质体水平上的差异: 3 个品种马铃薯的叶肉原生质体制成 5×10^4 /ml 密度, 分别用 V-2、V-3 培养(表 4)。结果表明, 克新四号

的原生质体只有在 V-3 中能得到良好的发育。而 68-62、京丰的叶肉原生质体则需用 V-2 来培养, 但 68-62 的分裂频率(16%)比京丰(3%)高 5 倍多。因此表明不同基因型的马铃薯叶肉原生质体在渗透浓度及其再生能力上都存在差异。

4. 培养基中蔗糖浓度对细胞团生长

表 4 不同基因型的原生质体的分裂频率
Table 4 The division frequency of different genotypic protoplasts

品系 Lines	分 裂 频 率 Division frequency	
	V-2 (葡萄糖 Glucose 0.38mol/L)	V-3 (葡萄糖 Glucose 0.35mol/L)
克新四号 Ke Xin 4	仅有几个细胞分裂 Very few cell divided	12% 仅有几个细胞分裂 Very few cell divided
68-62	16%	
京丰 Jing Feng	3%	0

的影响。在细胞团发育成小愈伤组织的过程中,将细胞团(约几十个细胞)分别放到含有不同蔗糖浓度的 V-5、V-6 培养基中培养。V-5 和 V-6 中的蔗糖浓度分别为 0.73mmol/L 和 60.0mmol/L。细胞团在 V-5 中生长较快,而在 V-6 中褐化,生长趋于停滞。用 V-5 替换 V-6 几天后,细胞团的生长渐渐恢复。这说明较高浓度的蔗糖对再生细胞团的生长是不利的。

在原生质体的培养过程中,随着其发育情况及时补充新鲜培养基,调整培养基的渗透浓度是必要的。克新四号叶肉原生质体经 V-3 培养 7 天后,按 3:1 的比例用 V-3 培养基进行稀释,防止细胞聚集,补充营养,以促进其生长。这时可以观察到发育成 4—7 个细胞组成的小细胞团(图版 I-4)。以后定期用降渗的新鲜培养基 V-4、V-5 换液。5—6 周时,在显微镜下可观察到小愈伤组织(版图 I-5)。约 2 个月后,小愈伤组织可长到肉眼可见的大小(直径约 1mm)。

(三) 形态发生

1. 激素对愈伤组织分化的影响:将直径约 1mm 的小愈伤组织转到修改的 MS

固体培养基上,3 周左右愈伤组织长至直径约 3—4mm,并变成淡绿色,再将其转到含有不同植物激素的固体培养基(表 5)上诱导分化。愈伤组织经 3—4 周的培养后,除 MS₁ 上的愈伤组织外,其余均有部分分化出绿点(图版 I-6),绿点进而发育成芽(图版 I-7)。在 MS₂ 培养基上,克新四号愈伤组织的分化频率达 44.3%,68-62 达 47.1%。这表明将玉米素(Zeatin)浓度提高到 1.0mg/L,能显著地提高愈伤组织的分化频率。当用 1.0mg/L 6-BA 代 1.0mg/L 的玉米素(MS₃ 固体培养基),克新四号愈伤组织分化频率降低到 38.6%,而 68-62 愈伤组织的分化频率则提高到 55.7%。说明不同基因型的愈伤组织对细胞激动素(Zea. BA.) 的反应不同。在 MS₄ 培养基中(含有 Zea、6-BA 各 1.0mg/L, NAA 和 GA₃ 各 0.01mg/L)愈伤组织的分化频率都有相应的提高,克新四号为 65.7%,68-62 的为 74.3%。这可能说明两种激动素配合使用更有利于芽的分化。

2. 固体培养基中的渗透浓度对愈伤组织分化的影响:直径约 1mm 的小愈伤

表 5 激素对愈伤组织分化的影响
Table 5 The influence of hormone on the differentiation of calli

基本培养基 Basic media (mg/L)	品系 Lines	接种愈伤组织总数 Total nos. of plated calli	分化芽的愈伤组织总数 Nos. of calli with shoot	百分率 (%) Percentage
MS ₁ (Zea. 0.2)	克新四号 Ke Xin 4	70	0	0
	68-62	70	0	0
MS ₂ (Zea. 1.0)	克新四号 Ke Xin 4	70	31	44.3
	68-62	70	33	47.1
MS ₃ (BA. 1.0)	克新四号 Ke Xin 4	70	27	38.6
	68-62	70	39	55.7
MS ₄ (Zea. 1.0 + BA. 1.0)	克新四号 Ke Xin 4	70	46	65.7
	68-62	70	52	74.3

MS 为基本培养基,其中除含有表中激素外,还含有 NAA (0.01mg/L), GA₃ (0.01mg/L) MS is basic medium. Besides the hormone included in Table 5, it also contains NAA (0.01mg/L), GA₃ (0.01mg/L)

组织经修改的MS培养基培养后，转到渗透浓度不同的固体培养基上继续培养诱导分化。3—4周后，克新四号愈伤组织在MS₄上的分化频率为57.1%，在MS₂上只有44.3%。前者比后都提高了12.8%。68-62的愈伤组织在这两种培养基上也有同

样的趋势（表6）。在MS₅上的愈伤组织比其在MS₂上能提早分化。这表明增加了渗透浓度的培养基能提高愈伤组织的分化频率，并能缩短分化期。这一作用在水稻、小麦、玉米等禾谷类作物组织培养的形态发生过程中有过研究^{〔3,6-8〕}。

表 6 渗透浓度对愈伤组织分化的影响
Table 6 The influence of osmotic concentration on the differentiation of calli

培养基 Media	附加成分 Supplement	品系 Lines	接种愈伤组织总数 Total nos. of plated calli	分化芽的愈伤组织总数 Nos. of calli with shoot	百分率 (%) Percentage
MS ₂		克新四号 Ke Xin 4	70	31	44.4
		68-62	70	33	47.1
MS ₅	3 %甘露醇 3 %mannitol	克新四号 Ke Xin 4	70	40	57.1
		68-62	70	38	54.3

MS₅ 中除 3 %甘露醇外，其他成分与 MS₂ 相同

*Besides 3 %mannitol, the other component of MS₅ is the same as MS₂

3. 愈伤组织的生长速度对愈伤组织分化的影响：将直径约1mm的愈伤组织，不经修改的MS培养基培养，而直接转到含有MS₁、MS₂、MS₃、MS₄、MS₅固体培养基上诱导分化，其上的愈伤组织生长缓慢，未见分化，有的愈伤组织还出现死亡。修改的MS培养基中的生长素(NAA)浓度(0.2mg/L)是诸分化培养基中NAA浓度(0.01mg/L)的20倍。同样大小的愈伤组织在修改的MS培养基上，3周后可长至3—4mm直径大小。这说明生长素(NAA)浓度的提高能加速愈伤组织的生长。同时也表明，从原生质体获得的小愈伤组织需经一个快速的生长期，增加细胞数量，积累特异的蛋白质、糖等必要物质，以便分化。

4. 原生质体的培养基对愈伤组织分化的影响：同一品系(68-62)在不同的原生质体培养基中获得的小愈伤组织，经修改的MS培养基培养一段时间后，转移到同样的分化培养基(表7)上培养，诱导分化。D-2中获得的愈伤组织在MS₂分化频率为88.6%，而由V-2中获得的愈伤组织在MS₂上的分化频率为47.1%。前者比后者的分化频率提高了41%。在MS₄、MS₅上的分化结果也有同样的趋势(表7)。表明D-2培养基对68-62愈伤组织的分化能力有极其显著的影响。同时也说明原生质体再生植株的能力不仅与基因型有关，而且也与原生质体培养时所处的营养环境有关。

几乎所有关于马铃薯叶肉原生质体再

表 7 原生质体培养基对再生愈伤组织分化频率的影响
Table7 The influence of protoplast culture media on the differentiation frequency of regenerated calli of 68-62

原生质体培养基 Protoplast culture media	MS ₂	MS ₄	MS ₅
D-2	88.6%	94.3%	91.4%
V-2	47.1%	74.1%	54.3%

生的文献都这样认为: 去掉原生质体培养基中的铵态氮源, 可减轻对原生质体的毒害, 提高其分裂频率。但从本实验的结果来看, 68-62叶肉原生质体经D-2 (含有270mg/L NH_4NO_3) 培养基培养, 虽然分裂频率较低(5%), 但能有较高的分化频率, 可达94.3% (表7)。所以要提高分化频率, 也要考虑采用何种原生质体培养基。

待从愈伤组织分化出的芽约1cm时, 将其从愈伤组织切下, 移到盛有Prop培养

基的培养瓶中诱导生根, 使之发育成完整的植株(图版I-9)。有的芽不需转移可直接在原分化培养基上分化出根, 发育成健壮的小苗(版图I-8)。目前已获得1000余株再生苗, 有的较粗壮, 有的较纤细。克新四号的有些再生苗呈丛生生长, 68-62的愈伤组织在 MS_4 上还分化出了几株白苗。就其形态、细胞学及遗传变异进一步的研究还在进行之中。这种高分化频率对进一步进行原生质体融合和基因转移实验是有价值的。

参 考 文 献

- [1] Binding, H. et al.: *Physiol. Plant*, 43:52—54, 1978.
- [2] Bokelmann, G.S. and Roest, S.: *Z. Pflanzenphysiol*, Bd 109:259—265, 1983.
- [3] Foulger, D. and Jones, M.G.K.: *Plant Cell Reports*, 5:72—76, 1986.
- [4] Fadak, G.: *Z. Pflanzenzuchtg*, 94:1—7, 1985.
- [5] Haberlach, G.T. et al.: *Plant Science*, 39:67—74, 1985.
- [6] Jones, M.G.K.: *Nature*, 317:578—580, 1985.
- [7] Kavikishor, P.B. et al.: *J. Plant Physiol.*, 126:49—54, 1986.
- [8] Kavikishor, P.B. et al.: *Plant Science*, 48:189—194, 1987.
- [9] Li Xianghui.: *Thero. Appl. Genet.*, 60:345—347, 1981.
- [10] Lain, E. and Ducreux, G.: *J. Plant Physiol.*, 126:345—354, 1987.
- [11] Murashige, T and Skoog, F.: *Physiol. Plant*, 15:473—497, 1962.
- [12] Shepard, J. F. and Totten, R.E.: *Plant Physiol.*, 60:313—316, 1977.
- [13] Tavazza, R. and Ancora, G.: *Plant Cell Reports*, 5:243—246, 1986.
- [14] Vires, S. E. and Bokelmann, G.S.: *J. Plant Physiol.*, 122:199—203, 1986.
- [15] Gunn, R.E. and Shepard, J.F.: *Plant Sci. Let.*, 22(2):97—101, 1981.
- [16] Thomas, E.: *Plant Sci. Let.*, 23(1): 81—88, 1981.

PLANT REGENERATION OF MESOPHYLL PROTOPLASTS FROM AXENIC SHOOT OF POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM* L.)

Li Shijun Li Xianghui Sun Yongru
(*Institute of Genetics Academia Sinica, Beijing*)

Mesophyll protoplasts of commercial potato were cultured with liquid medium as shallow layer. Regenerated cells divided and the calli were obtained. The

regeneration plants of two potato lines (Ke Xin 4; 68-62) had been obtained from the regenerated calli after transferring onto the solid medium. The division frequency of regenerated cells was influenced by the culture density of protoplasts. The growth of protoplast-derived colony was sensitive to the concentration of sucrose in liquid medium. The protoplast culture medium obviously influenced on the differentiation frequency of protoplast-derived calli (P-calli). After the supplement of 3 % mannitol into the differentiation medium, the differentiation frequency of P-calli was improved and the differentiation period of P-calli was shortened.

Key words

Potato (*Solanum tuberosum* L.); protoplast; morphogenesis; plant regeneration

图版说明 (克新四号)

Explanation of plate (Ke Xin 4)

- 1 从克新四号分离的叶肉原生质体
The mesophyll protoplasts isolated from Ke Xin 4 line (10x40)
- 2 培养 3 天后再生细胞第一次分裂
The first division of regenerated cell after 3 days in culture medium V-3 (10x40)
- 3 培养 5 天后再生细胞第二次分裂
The secondary division of regenerated cell after 5 days in culture medium V-3 (10x40)
- 4 培养 7 天后由原生质体再生的小细胞团
Protoplast-derived colony after 7 days in culture medium V-3 (10x40)
- 5 5—6 周的小愈伤组织
P-calli after 5—6 weeks in culture medium V-4 (10x20)
- 6 从愈伤组织分化出的绿点 (箭头所示)
Differentiated green points from P-calli (showing in arrow 10x20)
- 7 由绿点发育成的芽
Developed shoots from green points in the calli (10x20)
- 8 从愈伤组织上分化出的全苗
Differentiated whole plants from P-calli
- 9 经生根培养基 Prop 的再生植株
Regenerated whole plants through Prop medium

