

## 马铃薯野生种叶肉原生质体培养及其植株再生 (简报)

何亚文 李耿光 张兰英

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

### MESOPHYLL PROTOPLAST CULTURE AND PLANTLET REGENERATION FROM WILD SPECIES OF POTATO

He Yawen Li Gengguang Zhang Lanying

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

马铃薯是世界上仅次于水稻、小麦和玉米的第四大农作物, 许多国家和地区以它为主食。但是现有马铃薯栽培种由于经历了长期淘汰选择, 非常缺乏各种抗病基因, 因而在其生产过程中许多病害, 如病毒病、细菌性青枯病和真菌性晚疫病都能引起毁灭性损失<sup>[1]</sup>。而在栽培种之外却有着十分丰富的野生资源, 这些野生种带有许多有应用价值的抗病性状。采用原生质体融合技术将这些抗病性状转入栽培种日益受到重视。目前, 在国外已有 40 多个马铃薯栽培种和 10 多个野生种成功地实现了原生质体培养再生植株<sup>[2-9]</sup>, 并且得到一批马铃薯种内、种间和属间体细胞杂种植株<sup>[7-9]</sup>。我国直到 1988 年才由李耿光等<sup>[10]</sup>报道了马铃薯栽培种叶肉原生质体培养再生植株, 而野生种原生质体培养再生尚未见报道。本文报道了四个马铃薯野生种叶肉原生质体培养及部分再生植株, 为马铃薯生物技术改良打下了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

马铃薯野生种 *Solanum brevidens* ( $2n=2x=24$ ), 不结薯, 与栽培种有性杂交不亲和, 抗马铃薯 X 病毒、叶卷病毒和霜冻。 *S. phureja* ( $2n=2x=24$ ), 结薯, 高抗马铃薯青枯病。 *S. bulbocastanum* ( $2n=2x=24$ ), 不结薯, 抗马铃薯早疫病、晚疫病和线虫病。 *S. demissum* ( $2n=6x=72$ ), 高抗马铃薯晚疫病。前三种由美国 Wisconsin 大学植物病理系 Helgeson 教授惠赠, *S. demissum* 来自中国南方马铃薯研究中心。

### 1.2 方法

**无菌苗繁殖** 所有材料都是以试管苗形式获得, *S. brevidens* 茎尖在 MS 附加  $0.05\text{mg L}^{-1}$  BAP 的固体培养基 (简称 B 培养基) 上繁殖, *S. phureja* 茎段在 MS 附加  $4.0\text{mg L}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$  和  $0.1\text{mg L}^{-1}$  NAA 培养基 (简称 A 培养基) 上繁殖长叶, *S. bulbocastanum* 在含有  $0.5\text{mg L}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$  和  $0.5\text{mg L}^{-1}$   $\text{B}_9$  的 MS 培养基 (简称  $\text{B}_9$  培养基) 上繁殖, *S. demissum* 在含  $500\text{mg L}^{-1}$  麦芽糖提取物和高浓度 (5%) 蔗糖的 MTE 培养基上繁殖。每隔 6 周转移一次, 培养条件为  $25\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$  和 14h 光照。

原生质体分离、纯化和培养 见李耿光等<sup>[10]</sup>的方法。

再生愈伤组织的增殖和植株再生 当 *S. phureja* 和 *S. bulbocastanum* 小愈伤组织长至 1–2mm 大小时, 将它们转移至 MS 附加 0.1mg L<sup>-1</sup> IAA 和 0.5mg L<sup>-1</sup> BAP 的固体培养基(简称 MIB)上弱光下增殖, *S. brevidens* 小愈伤组织在 MS 附加 0.1mg L<sup>-1</sup> IAA 和 1.0mg L<sup>-1</sup> ZT 的固体培养基(简称 MIZ)上弱光增殖。当愈伤组织长至直径为 4–5mm 大小时, 脱水处理, 再转移至 MS 附加 0.1mg L<sup>-1</sup> IAA、2mg L<sup>-1</sup> ZT 和 0.01mg L<sup>-1</sup> ABA 的固体培养基(简称 MZA)上分化出芽, 待苗长到 2–3cm 时从基部切下, 在 MS 附加 0.1mg L<sup>-1</sup> NAA 的固体培养基上诱导生根形成完整植株, 6–7 周后取出, 水浸一天, 洗去残留培养基, 移栽于网房中。

## 2 结果与讨论

马铃薯野生种在 MS 培养基上普遍生长不好, 主要表现为: ① 无菌苗长势快、茎段细、节间长, 叶片小而稀, 如 *S. phureja* 和 *S. bulbocastanum*。② 发根能力特弱, 生长缓慢, 叶片老且腊质化严重, 如 *S. demissum*。对前一种情况, Perl 等也发现类似现象, 他们认为产生这种现象的根本原因是植物体内乙烯的积累<sup>[11]</sup>。已知乙烯的这种作用可以被 Ag<sup>+</sup> 所抑制<sup>[12]</sup>, 因此我们通过向培养基中加 AgNO<sub>3</sub> 来改善野生种的这种生长特性, 结果表明: ① 不同种对 Ag<sup>+</sup> 敏感性不一样, *S. bulbocastanum* 和 *S. phureja* 在含 Ag<sup>+</sup> 培养基上生长特性大为改善, 而 *S. demissum* 和 *S. brevidens* 却变化不大。② 0.5–8mg L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> 对 *S. phureja* 和 *S. bulbocastanum* 生长特性均有影响, 其中对 *S. phureja* 用 4mg L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> 效果最佳, *S. bulbocastanum* 以 0.5mg L<sup>-1</sup> 效果最佳, 在该浓度下试管苗叶片增多加大, 浓绿脆嫩, 节间缩短, 是叶肉原生质体分离的理想材料。为改善 *S. demissum* 生长状况, 我们采用了 MTE 培养基, 该培养基蔗糖浓度提高至 5%, 维生素含量为 MS 培养基的二倍, 同时含有 500mg L<sup>-1</sup> 麦芽糖提取物。在该培养基上 *S. demissum* 生长迅速, 叶片多且嫩。根据 Nelson 等<sup>[6]</sup> 报道, 我们在 *S. brevidens* 繁殖培养基中加了 0.05mg L<sup>-1</sup> BAP, 不但使原生质体得率提高, 而且原生质体活力也大大提高。

以生长了四周左右无菌苗顶部展叶为分离原生质体材料, 原生质体纯化后计数, *S. brevidens* 得率最高, 每克鲜重可达  $6.7 \times 10^6$  个, *S. bulbocastanum* 次之, *S. demissum* 最低, 为  $1.0 \times 10^4$  g<sup>-1</sup> 鲜重。这个产率普遍比栽培种低<sup>[13]</sup>。原生质体调整好密度后在改良 K<sub>8</sub>P 培养基(简称 0.55 MP<sub>3</sub>G)中进行液体浅层培养。0.55MP<sub>3</sub>G 培养基营养十分丰富, 含 0.5mg L<sup>-1</sup> ZT、0.5mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 和 1.0mg L<sup>-1</sup> NAA, 四个野生种在该培养基中均能膨大变透明进而启动分裂, 但第一次分裂比栽培种迟, 培养 5d 后 *S. brevidens* 才开始第一次分裂, 其它种更迟。*S. demissum* 分裂 2–3 次后便停止分裂, 不能形成小愈伤组织。三周后其它三个野生种植板率可达 3–6%。

在马铃薯野生种原生质体培养过程中原生质体密度很重要, 普遍要求低密度才有利于进一步分裂生长, *S. brevidens* 在  $5 \times 10^4$  ml<sup>-1</sup> 时分裂最好, 高于或低于这个密度均分裂不好。*S. bulbocastanum* 原生质体聚集现象特别严重, 密度稍高就聚集成团阻止进一步分裂, 因而只能采取  $1 \times 10^4$  ml<sup>-1</sup> 较低密度培养。当原生质体完成 2–3 次分裂后需及时依次向培养基中添加新鲜低渗培养基以促使细胞团持续分裂。*S. bulbocastanum* 小细胞团分裂过程中会向培养环境中分泌一种棕色物质, 该物质积累过多会抑制细胞团进一步分裂生长, 因此在添加新鲜低渗培养基之前需

及时将含有浅棕色物质的培养基部分吸去。

当细胞团发育至直径为1-2mm的小愈伤组织时需及时将它们转入增殖培养基上弱光下增殖。实验结果表明：不同种其愈伤组织增殖所需激素条件不同，*S. brevidens*在MIZ增殖培养基上黑暗条件下小愈伤组织体积迅速增大，灰白色，比较疏松，带水渍状。而*S. phureja*和*S. bulbocastanum*小愈伤组织在MIZ增殖培养基上增殖效果却很差，不久即褐化死亡，但在MIB培养基上却增殖良好。当愈伤组织直径达4mm左右时即可转入强光下分化出芽。*S. brevidens*和*S. bulbocastanum*愈伤组织在MZA分化培养基上经继代一次七周后即出现芽的分化。*S. phureja*愈伤组织在MZA分化培养基上能进一步生长和变淡绿，但不能分化出芽，芽的分化实验仍在进行中。

实验结果还表明，在愈伤组织分化出芽过程中脱水处理不但能缩短分化出芽所需时间，还能提高芽分化频率。我们详细比较了*S. brevidens*愈伤组织在超净台上用干滤纸吸水4、8、12、24h后，再回接到MZA培养基上的分化情况，结果以脱水12h最好，此时愈伤组织平均重量减少23%，五周(对照至少要七周)后即出现芽的分化，且芽分化频率提高27.2%。

芽长至1-2cm时，切下转入含0.1mg/L NAA固体MS培养基上诱导生根，6-7周后移栽于含有草木灰和有机肥的砂质土壤中，*S. brevidens*成活率几达100%，*S. bulbocastanum*为30%左右。

#### 参考文献

- 1 Bajaj Y P S, Spory S K. Biotechnology in agriculture and forestry. Spinger-Verlag Berlin heidelberg, 1986, 430
- 2 Haberlach G T, Cohen B A, Reichert N A et al. Isolation, culture and regeneration of protoplast from potato and several related *Solanum* species. Plant Sci, 1985, 39:67-74
- 3 Gunn R E, Shepard J F. Regeneration of plants from mesophyll-derived protoplasts of British potato cultivars. Plant Sci Lett, 1981, 22:97-101
- 4 Xu Y S et al. Plant regeneration from protoplasts of *Solanum* species with potential agricultural value (*S. hjertingii*, *S. polyadenium*, *S. capsibaccatum*). Plant Cell Rep, 1991, 9:520-522
- 5 Schumann U et al. Plant recovery from long-term callus cultures and from culture suspension culture derived from protoplasts of *Solanum phureja*. Physiol Pflanzen, 1980, 175:670-675
- 6 Nelson R S et al. Plant regeneration from protoplasts of *Solanum brevidens*. Plant Sci Lett, 1985, 30:355-362
- 7 Austin S et al. Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. Plant Sci, 1985, 39:75-82
- 8 Puité K J et al. Somatic hybrid potato plants after electrofusion of diploid *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. Plant Cell Rep, 1986, 5:262-265
- 9 Fish N et al. Production of somatic hybrids by electrofusion in *Solanum*. Theor Appl Genet, 1988, 76:260-266
- 10 李耿光, 张兰英. 马铃薯叶肉原生质体再生植株的研究. 植物学报, 1988, 30:21-24
- 11 Kao K N, Michayluk M R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta, 1975, 126:105-110
- 12 Perl A et al. Ethylene and *in vitro* culture of potato: suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, planting efficiency and transient expression of an alien gene. Plant Cell Rep, 1986, 5:72-76
- 13 Beyer E M. A potential inhibitor of ethylene action in plants. Plant Physiol, 1986, 58:268-271
- 14 Foulger D, Jones M G K. Improved efficiency of genotype-dependent regeneration from protoplasts of important potato cultivars. Plant Cell Rep, 1986, 5:72-76