

通过体细胞无性系变异获得马铃薯优良新材料

邹 雪, 肖乔露, 文安东, 胡 芳, 黄雪丽, 王西瑶*

(四川农业大学农学院, 成都 611130)

摘 要: 为建立马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 试管薯切片再生体系并评价其体细胞无性系变异的应用潜力, 以马铃薯品种‘米拉’的试管薯切片为外植体, 通过调节培养基植物生长调节剂配比和蔗糖浓度建立再生体系并获得再生植株; 通过逆境胁迫快速筛选出优良再生株系‘M-13’, 并比较其生长特性及稳定性; 利用 SCOT 和 RAPD 分子标记检测其遗传变异。结果表明: 不添加蔗糖 MS + 2 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.25 mg · L⁻¹ TDZ + 0.1 mg · L⁻¹ 2,4-D 可获得最高芽分化率 65.33%。与母本‘米拉’相比再生植株‘M-13’生长更为健壮, 其试管苗和试管薯质量均约为母本的 2 倍; ‘M-13’的根/冠比和叶绿素含量较母本分别升高了 112%、23.78%, 而叶片可溶性磷含量和过氧化物酶 POD 活性则分别下降了 16.36% 和 30.37%。SCOT 和 RAPD 两种分子标记均能在‘M-13’中检测到新条带或缺失条带, 与母本间的遗传相似系数分别为 0.9323 (SCOT) 和 0.9256 (RAPD), 表明‘M-13’的 DNA 发生变异但仍保持母本的大部分特性。

关键词: 马铃薯; 试管薯; 再生体系; 体细胞无性系变异; 新材料

中图分类号: S 532

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 03-0480-09

An Excellent New Potato Material Obtained by Somaclonal Variation

ZOU Xue, XIAO Qiao-lu, WEN An-dong, HU Fang, HUANG Xue-li, and WANG Xi-yao*

(College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: To evaluate the potential applications of somaclonal variation in potato (*Solanum tuberosum* L.), in this study we established regeneration systems of microtuber slices in Mira by regulating combinations of plant growth regulators and sucrose concentration. The line M-13 with excellent performance was quickly screened out from regenerated plants through stress treatment, and the study on its growth characteristics and phenotype stability was performed. The molecular markers start codon targeted (SCOT) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) were used to analyze the genetic variation of M-13. The results suggested that the bud regeneration rate could reach 65.33% of the highest value in the medium MS + 2 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.25 mg · L⁻¹ TDZ + 0.1 mg · L⁻¹ 2,4-D without sucrose. Both plantlet and microtuber weights of M-13 which grew stronger were about 2-fold compared with the mother plant Mira. The root/shoot ratio and chlorophyll content of M-13 increased by 112%, 23.78%, but the soluble phosphorus content and peroxidase (POD) activity in leaves decreased by 16.36% and 30.37%, respectively. The genetic similarity coefficient between M-13 and Mira analyzed by SCOT and RAPD markers were 0.9323 and 0.9256, which indicated that M-13 remains most features of mother plant Mira but occurred genetic variation.

收稿日期: 2014-11-05; 修回日期: 2015-01-26

基金项目: 现代农业产业技术体系四川薯类创新团队项目 (川农业函[2014]91 号)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wxyrtl@163.com)

Key words: potato; microtuber; regeneration system; somaclonal variation; new material

由于培养环境中激素、光照等的刺激, 离体培养的再生植株中存在遗传变异或表观遗传变异, 称为体细胞无性系变异 (Larkin & Scowcroft, 1981)。这类变异不仅具有普遍性, 而且变异所涉及的性状十分广泛, 包括数量性状和质量性状、染色体数和结构的变异、基因突变、DNA 扩增与丢失、甲基化、转座子的激活等 (Phillips et al., 1994)。体细胞无性系变异具有一些自身的特点: 变异性状广且致死突变率低; 单基因突变多, 变异后代稳定快; 多拷贝重复序列基因扩增活化或失活变异丰富; 变异后代基本保持原品种特性。目前, 通过组织培养中的体细胞无性系变异已选育出了具有优良性状的番茄 (如干物质含量高的变种 DNAP9)、芹菜 (如抗镰刀黄菌的品系 MSU-SHK5)、玉米 (如作粮食和饲料使用的变种伊单 6 号)、马铃薯 (如褐变轻的品种 White Baron) 等新品种, 并已进行水稻、小麦和甘蔗品种的改良 (Jain, 2001; 刁现民 等, 2002)。

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 的离体再生培养技术较为成熟, 但建立的再生体系主要用于基因转化, 而对再生过程中发生的体细胞无性系变异关注较少 (王红梅 等, 2008; 王晓杰 等, 2008; 晁祥健 等, 2009)。马铃薯离体再生过程中确实存在可利用的无性系变异, 如利用感青枯病的马铃薯品种 ‘米拉’ 为试材, 在其叶盘愈伤组织再生苗中接种青枯病菌进行初筛选, 获得了 R-43 和 R-47 两株抗青枯病能力显著高于母本的材料, 其过氧化物酶活性高于母本, 其图谱比母本多了两条带 (孙慧生, 2003)。本试验中以西南地区的马铃薯主栽品种 ‘米拉’ 为材料, 通过逆境胁迫快速从一系列试管薯切片的再生植株中筛选出了新材料 ‘M-13’, 并对其株形、生长特性等作了进一步研究, 同时利用分子标记 SCOT (start codon targeted) 和 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 检测其遗传变异情况, 以期为马铃薯新型种质资源的获得提供一条可行途径。

1 材料与方法

1.1 材料

马铃薯品种 ‘米拉’ (ML) 脱毒试管苗, 由四川农业大学农学院马铃薯研究开发中心提供。

试验于 2010—2014 年在四川农业大学农学院植物生理系和成都市邛崃喜玛高科农业科技有限公司完成。

植物生长调节剂 (plant growth regulator, PGR) 母液过滤灭菌于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用, 培养基灭菌后待温度降至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右加入过滤灭菌的 PGR。

1.2 方法

1.2.1 试管苗扩繁和试管薯诱导

剪取马铃薯 ‘ML’ 带 1~2 个腋芽的茎段接入扩繁培养基 $\text{MS} + 30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $6\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, $\text{pH} 5.9 \sim 6.0$ 。培养条件: 16 h 光/ 8 h 暗, 光强 $60\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $(22 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$, 每隔 20 d 剪接扩繁 1 次。剪取带 1~2 个腋芽的茎段接入诱薯培养基 $\text{MS} + 80\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $6\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂 + $0.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性碳, 8 h 光/ 16 h 暗, 光强 $40\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $(18 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。取诱导 60 d 左右所结薯块用于再生试验。

1.2.2 从试管薯切片诱导植株再生

将直径 $6 \sim 8\text{ mm}$ 的 ‘ML’ 试管薯切成厚 $1 \sim 2\text{ mm}$ 的薄片, 接种在不同植物生长调节剂组合的诱导培养基 (表 2) 上, 重复 4 皿, 每皿 $20 \sim 25$ 片。 16 h 光/ 8 h 暗, $60\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $(20 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$,

7~10 d 后剪去从芽眼长出的芽(为原有的腋芽,非再生芽),以后每 15 d 换 1 次培养基,并观察记录。絮状率(%)=(边缘絮化的切片数/接种的切片数)×100;芽分化率(%)=(再生出芽的切片数/接种的切片数)×100。另将试管薯切片接种在植物生长调节剂组合 8 号但不添加蔗糖的培养基上,标为 8*,以比较蔗糖对芽分化的影响。

1.2.3 抗逆材料的获得及生长特性比较

随机剪取 8*号培养基中再生的植株,共计 30 个株系,扩繁后剪取顶端接于低磷($P\ 0.125\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,调节 KH_2PO_4)MS 培养基,带腋芽的第二节段接入盐胁迫($100\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{NaCl}$)MS 培养基,每盒 9 株,每处理 2 盒。根据长势筛选,将表现最好的株系命名为 M-13。

在 MS 培养基中扩繁 M-13 和其母本 ML(每瓶 12 株),15 d 时测定试管苗的生物量、株高、根长,以瓶为单位统计,各测 3 瓶;同时测定叶绿素和可溶性磷含量、过氧化物酶 POD 活性,各 3 次重复。向培养瓶中添加诱薯液(每瓶 30 mL, $\text{MS} + 80\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $2\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $6\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ B₉), (18 ± 1) °C, 黑暗诱导培养 60 d 后测定试管薯质量。

叶绿素含量采用丙酮—乙醇混合液浸提比色法,磷含量采用磷钼蓝比色法,POD 活性采用愈创木酚法测定(熊庆娥,2003)。

将萌芽的 ML 和 M-13 试管薯种植到大棚中,使用基质为腐熟菌渣,浇灌 1/4MS 矿质营养液,60 d 时对比形态和结薯差异。

试验数据采用 Excel、DPS v3.01 软件分析,用 SSR 法分析处理间的差异。

1.2.4 M-13 的遗传变异检测

剪取 ML 和 M-13 的试管苗叶片约 0.1 g,采用 CTAB 法提取 DNA 并调节浓度约 $50\ \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,从上海生工订购引物 SCOT 12 条(Gorji et al., 2011)和 RAPD 18 条(Ehsanpour et al., 2007; 邸宏等, 2008; Abou-Taleb et al., 2010)(表 1)。PCR 反应体系 25 μL : ddH₂O 17.7 μL , 10× PCR buffer 2.5 μL , 引物($10\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 μL , dNTP Mixture ($2.5\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ each) 2.0 μL , DNA 模板(50 ng) 1.0 μL , Taq 酶($2.5\ \text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.8 μL 。加入 96 孔板中,最后每孔加入 20 μL 石蜡油防挥发。SCOT 的 PCR 反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 49 °C 退火 60 s, 72 °C 延长 120 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。RAPD 的 PCR 反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 37~42 °C 退火 60 s, 72 °C 延长 90 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。

表 1 试验所用 RAPD 和 SCOT 引物序列
Table 1 SCOT and RAPD primer sequences used in this study

引物名称 Primer code	引物序列 Sequence	引物名称 Primer code	引物序列 Sequence
SCOT01	5' CAACAATGGCTACCACCA 3'	SCOT12	5' ACGACATGGCGACCAACG 3'
SCOT02	5' CAACAATGGCTACCACCC 3'	SCOT13	5' ACGACATGGCGACCATCG 3'
SCOT03	5' CAACAATGGCTACCACCG 3'	SCOT14	5' ACGACATGGCGACCACGC 3'
SCOT04	5' CAACAATGGCTACCACCT 3'	SCOT16	5' ACCATGGCTACCACCGAC 3'
SCOT05	5' CAACAATGGCTACCACGA 3'	SCOT33	5' CCATGGCTACCACCGCAG 3'
SCOT11	5' AAGCAATGGCTACCACCA 3'	SCOT36	5' GCAACAATGGCTACCACC 3'
RAPD K09	5' TGGGGGACTC 3'	RAPD C06	5' GAACGGACTC 3'
RAPD K13	5' CTCAGTCGCA 3'	RAPD O03	5' TTAGCGCCCC 3'
RAPD K16	5' CTGAGACGGA 3'	RAPD O18	5' AGGTGACCGT 3'
RAPD K17	5' GGAAGTCGCC 3'	RAPD O20	5' TTGCCTTCGG 3'
RAPD K18	5' TGTAGCTGGG 3'	RAPD F05	5' ACTTGGCGGCCT 3'
RAPD J01	5' CCCGGCATAA 3'	RAPD S89	5' CTGACGTCAC 3'
RAPD J10	5' AAGCCCGAGG 3'	RAPD S105	5' AGTCGTCCCC 3'
RAPD I20	5' AAAGTGC GGG 3'	RAPD S126	5' GGGAATTCCG 3'
RAPD C05	5' GATGACCGCC 3'	RAPD S304	5' CCGCTACCGA 3'

以 Gel Red 为染色剂, 2.5%琼脂糖, PCR 产物上样量 8 μ L, 1 \times TAE 为缓冲液, 120 V 电泳约 40 min 后用凝胶呈像系统 (Bio-Rad, USA) 检测条带。各引物重复 2 次 PCR, 若谱带结果相同, 则开始统计, 若结果不同则再重复 PCR, 直到出现可重复的谱带。谱带按 0/1 系统记录, 只统计清晰的条带, 模糊条带不作统计。

采用 Nei 和 Li (1979) 的方法进行数据分析, 计算遗传相似系数 $GS = 2N_{ab} / (N_a + N_b)$, 其中 N_{ab} 为材料 a 和材料 b 共有的条带数, N_a 和 N_b 分别为材料 a 和材料 b 的条带数。

2 结果与分析

2.1 试管薯切片再生体系建立

2.1.1 植物生长调节剂组合对试管薯切片再生的影响

试管薯切片在培养基上生长约 7 d 后, 去除从芽眼中长出的芽, 因这些植株都不是通过细胞脱分化和再分化形成的, 并且会影响再生。培养约 14 d 后, 一些处理出现从薯皮开始迅速向内扩展的絮化现象, 严重时可将整个切片包裹并且不会形成愈伤组织或芽。如表 2 所示, 培养基中含 IAA 的 1~3 号处理絮化最严重, 而不含 IAA 的处理絮化率很低。由此可见 ‘ML’ 薯块切片离体培养的絮化程度与 IAA 的加入密切相关, 当培养基中无 IAA 时, 其絮化率普遍不高。

培养约 45 d 后, 1~7 号处理均无芽长出, 8~11 号均以直接方式再生 1~2 个芽, 无从生芽形成。从表 2 可以看出, 细胞分裂素/生长素 (C/A) 的比值变化与芽分化率密切相关, 当比值较低时 (1.99~10.04) 基本无芽分化, 而比值达到 22.13 时芽分化率达到最高值, 进一步升高则芽分化率下降。此外, 由处理 10 和 11 的对比可以看出不同种类的细胞分裂素 6-BA 和 TDZ 的互换对 ‘ML’ 芽分化并无明显影响, 而处理 6 和 7 表明若 C/A 不合适即使加入 GA_3 也不能促进芽的分化。

2.1.2 蔗糖对试管薯切片再生的影响

在多种植物生长调节剂组合处理芽分化率普遍不高的情况下, 考虑去除培养基中的蔗糖 (因为薯片中糖含量较高)。结果表明, 8*号培养基 (无蔗糖) 芽分化效率提高到 65.33% (表 2), 切片表面迅速转为嫩绿色, 无任何絮状物, 培养 28 d 后切片大多开始长出绿色芽点和小芽。再培养 14 d 左右芽可长达 2 cm, 生长较为正常。将芽剪下接入无激素 MS 普通培养基中培养 7 d 左右均能正常生根。

表 2 PGR 组合对试管薯切片再生的影响
Table 2 Effect of plant growth regulator on regeneration of microtuber slices

编号 No.	培养基 ($mg \cdot L^{-1}$) Medium						(ZT + 6-BA + TDZ) / (2,4-D + IAA)	絮化率/% Floc rate	芽分化率/% Shoot differentiation rate
	ZT	6-BA	TDZ	2,4-D	IAA	GA_3			
1	2.0	0.5	0	0	1.0	0.2	1.99	100 \pm 0 a	0 d
2	1.0	1.0	0.25	0	0.5	0.2	3.43	85.11 \pm 5.28 b	0 d
3	1.0	1.0	0.25	0	0.2	0.2	8.88	81.33 \pm 4.65 b	0 d
4	1.0	1.0	0.25	0	0	0	-	12.59 \pm 3.01 c	0 d
5	0	2.0	0	0.2	0	0	9.81	10.80 \pm 3.21 c	0 d
6	0	0	1.0	0.1	0	0.2	10.04	5.68 \pm 1.25 cd	0 d
7	0	0	1.0	0.1	0	0	10.04	0 f	0 d
8	0	2.0	0.25	0.1	0	0	22.13	4.98 \pm 9.23 de	20.38 \pm 2.84 b
8*	0	2.0	0.25	0.1	0	0	22.13	0 f	65.33 \pm 2.12 a
9	0	4.0	0.5	0.1	0	0.1	41.76	3.17 \pm 7.28 def	9.68 \pm 0.27 c
10	0	3.0	0.25	0.05	0	0.05	63.89	0 f	10.76 \pm 2.01 c
11	0	1.0	3.0	0.05	0	0.05	79.84	1.67 \pm 7.46 ef	11.27 \pm 2.32 c

注: * 无蔗糖。不同小写字母表示处理间在 0.05 水平上差异显著。
Note: * Without sucrose. Different lowercase letters showed significant difference between treatments at the 0.05 level.

2.2 抗逆株系的筛选和 M-13 的试管苗特性比较

2.2.1 再生优化株系的快速筛选

剪取从 8*号培养基上再生的植株约 30 个, 按株系扩繁后接入低磷和盐胁迫培养基中, 选取形态长势最好的株系, 命名为 M-13。在低磷胁迫下, 对照母本 ML 生长瘦弱, 叶片小, 叶色深绿, 呈现典型的缺磷症状 (图 1, ML, -P); 再生株系 M-13 生长较健壮且叶片大而厚, 叶色也为深绿色, 表明也受到了缺磷胁迫 (图 1, M-13, -P)。在盐胁迫下, ML 的腋芽几乎不能生长, 叶片发黄, 根系生长缓慢 (图 1, ML, +NaCl); M-13 的腋芽大多能长成植株, 叶色基本保持为绿色且根系生长较旺盛 (图 1, M-13, +NaCl)。

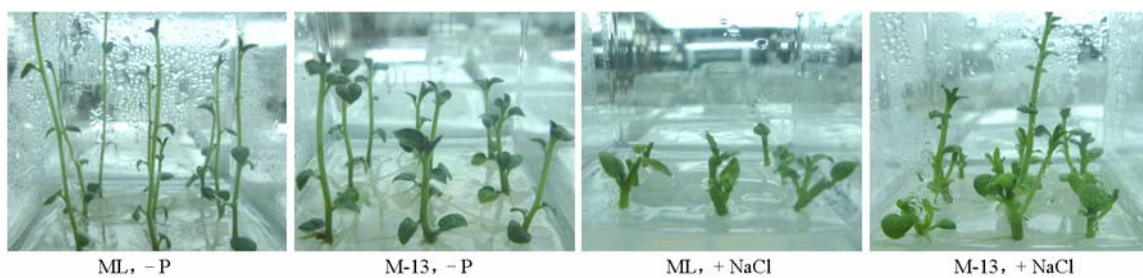


图 1 M-13 及其母本 ML 在低磷 (-P) 和盐 (+NaCl) 胁迫下的生长情况

Fig. 1 The growth of M-13 and ML (mother plant) in low phosphorus (-P) and salt (+NaCl) stress treatment

2.2.2 M-13 生长特性比较

在正常 MS 培养基中, 接种培养 7 d 后, M-13 叶片和茎秆均比其母本 ML 生长更健壮, 根系也更为发达, 但株高差异不明显 (图 2, A、B)。

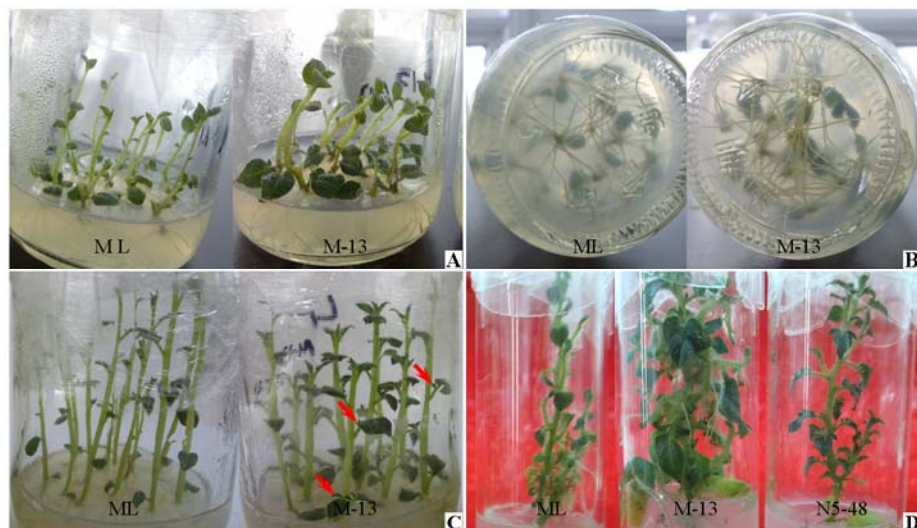


图 2 M-13 与其母本 ML 试管苗形态比较

A: 生长 7 d 试管苗地上部; B: 生长 7 d 试管苗根系; C: 生长 15 d, 箭头示复叶; D: 在含 3%甘露醇的培养基中保存 80 d, N5-48 是与 M-13、ML 无关的另一材料, 作对比。

Fig. 2 Morphological comparison of plantlets between M-13 and ML (mother plant)

A: Aerial part of seedling in test tube growth 7 d; B: Root of seedling in test tube growth 7 d; C: Growth 15 d, arrows indicated compound leaves. D: Growth 80 d in the medium with 3% mannitol to save materials, as another contrast, N5-48 has not any relationship with M-13 and ML.

培养约 15 d 时是试管苗生长最为健壮时期, 此时 M-13 的鲜质量约为 ML 的 2 倍, 根系长度比 ML 高出 33.20% (表 3), 叶片大且有些长出了复叶 (图 2, C), 试管薯产量比 ML 提高了 69.78%, 薯块数也显著提高 (表 3)。

在保存 M-13 试管苗时, 发现添加 3%甘露醇 (10 ± 2) °C 下培养, 80 d 后比大多数同时保存的其它材料更为健壮 (图 2, D)。一般保存时由于设置温度较低且添加了甘露醇所以大多材料的生长会受到抑制, 较正常培养时差, 但 M-13 在表型上似乎没有受到明显影响, 表现为叶片大且伸展, 表皮毛明显, 茎秆粗壮。

M-13 的根系发达, 其根/冠比达到 0.53, 而 ML 只有 0.25 (图 3)。同时 M-13 的叶绿素 a (Chl. a)、叶绿素 b (Chl. b) 含量分别比 ML 升高了 23.31%、24.44%, Chl. a/Chl. b 比例基本不变。磷是重要的细胞成分膜脂、核酸等的构成物质, ML 根和叶中的可溶性磷含量均高于 M-13 (表 3), 说明 ML 对可溶性磷的利用还不够充分。较低的可溶性磷含量对应更高的干物质量, 这与对水稻籽粒的研究结果较为相似, 即水稻胚乳中可溶性磷与籽粒质量存在负相关, 可溶性磷含量高不利于籽粒质量增加 (匡逢春 等, 2005)。

M-13 的 POD 活性只有 ML 的 69.30% (表 3)。POD 可氧化生长素 IAA 侧链从而控制活性 IAA 的含量, 所以 M-13 POD 活性低于 ML, 其 IAA 含量可能高于 ML, 因此叶片生长势明显强于 ML。

表 3 M-13 与其母本 ML 试管苗和试管薯比较
Table 3 Comparison of plantlet and microtuber between M-13 and ML (mother plant)

株系 Lines	鲜质量/g Fresh weight	株高/cm Height	根长/cm Root length	结薯数 Number of tuber	薯块质量/g Weight of tuber	Chl./ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)		POD/ ($0.01\Delta\text{OD}_{470}$ $\text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)
						Chl. a	Chl. b	
ML	$1.38 \pm 0.13 \text{ b}$	$8.13 \pm 1.17 \text{ a}$	$9.94 \pm 1.40 \text{ b}$	$13.83 \pm 0.98 \text{ b}$	$1.46 \pm 0.10 \text{ b}$	$3.26 \pm 0.24 \text{ b}$	$0.90 \pm 0.09 \text{ a}$	$823.84 \pm 30.34 \text{ a}$
M-13	$2.62 \pm 0.17 \text{ a}$	$6.85 \pm 1.08 \text{ a}$	$13.24 \pm 1.27 \text{ a}$	$15.67 \pm 1.51 \text{ a}$	$2.47 \pm 0.16 \text{ a}$	$4.02 \pm 0.29 \text{ a}$	$1.12 \pm 0.02 \text{ a}$	$570.88 \pm 39.66 \text{ b}$

注: 以每瓶 12 株苗统计。
Note: With 12 plants per bottle statistics.

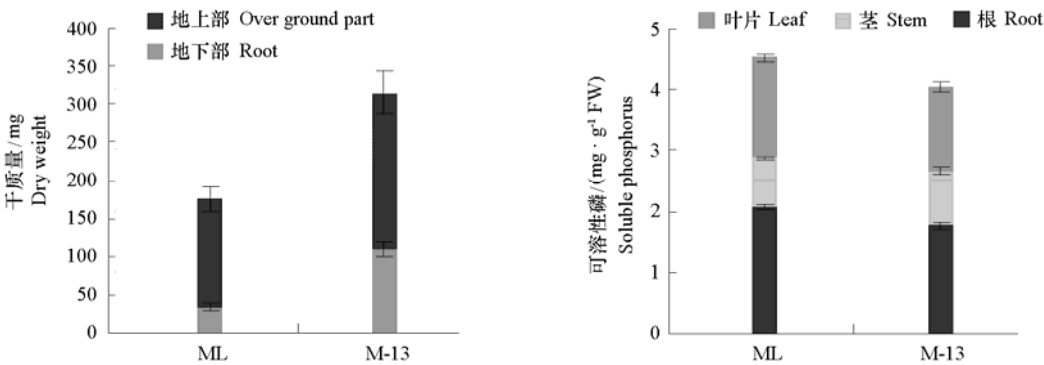


图 3 干质量和可溶性磷含量分析
Fig. 3 Analysis on dry weight and soluble phosphorus content

在大棚中种植 ML 和 M-13 的试管薯, 60 d 后观察发现材料都呈矮化状态且根系稀少, 但也能结薯和生长, 可能基质中的菌渣含有对马铃薯生长起抑制作用的物质。虽然生长受抑, 但总体看来 M-13 的长势仍然明显强于母本 ML, 表现在叶片宽大, 表皮毛浓密, 所结薯块相对更大 (图 4)。



图 4 腐熟菌渣基质栽培下的 M-13 与其母本 ML 植株形态比较

Fig. 4 Morphological comparison of plants between M-13 and ML (mother plant) cultured in decomposed fungi residue substrate

2.3 M-13 遗传变异检测

通过约 2 年的试管苗扩繁及保苗复壮观察,在确认 M-13 性状稳定的基础上,选用 RAPD 和 SCOT 两种分子标记作进一步检测。18 条 RAPD 引物共扩增出 61 条清晰可重复条带, M-13 和 ML 的遗传相似系数为 0.9256; 12 条 SCOT 引物共扩增出 68 条条带, M-13 和 ML 的遗传相似系数为 0.9323。以上说明 M-13 仍然保持母本的大部分特性,但其遗传物质确实发生了改变。如图 5 所示, RAPD 引物 S304 和 K16 的 PCR 扩增显示 M-13 分别在 2 000 bp 和 800 bp 的位置出现新条带,同时引物 S304 还显示 M-13 缺失了一条 200 bp 左右的条带。引物 SCOT03 在 M-13 中出现 900 bp 和 700 bp 左右的新条带,而引物 SCOT16 扩增出的条带中, M-13 在 2 000 bp 左右的条带明显比 ML 亮。

试验同时表明 SCOT 标记的重复性优于 RAPD 标记,前者的多数引物在两次重复扩增中的谱带均相同,后者的一些引物则需要再作 1 ~ 3 次重复才能最终确认谱带,花费时间更多;而且 SCOT 标记扩增出的条带辨识度也优于 RAPD 标记。

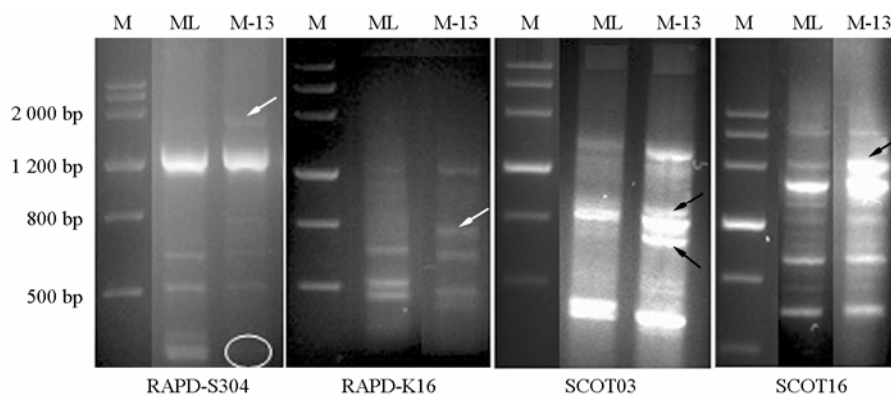


图 5 两种分子标记显示的差异条带

箭头示 M-13 多出的条带,圆圈示 M-13 缺失的条带。

Fig. 5 Different bands amplified by two kinds of molecular makers

Arrows point to the new bands in line M-13, circles point to the absent bands in line M-13.

3 讨论

马铃薯块茎再生体系的研究已取得了较好的效果,但诱导切片产生不定芽多数都离不开玉米素 ZT 的使用 (Si et al., 2003; 李有忠 等, 2008)。本研究中用 6-BA 和 TDZ 配合使用来替代 ZT 也能

诱导芽再生, 这与 Eana-Ashari 和 Villiers (1998) 用 6-BA 诱导马铃薯品种 Desiree 块茎切片形成再生芽的结果相似。本试验中薯块切片在含 IAA 的培养基 ($0.2 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 中发生絮化, 浓度越高越严重, 这与其它品种的薯块切片再生中, 用 $1 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 可获得高效的再生率 (Si et al., 2003; 王晓杰 等, 2008) 不同。可见不同基因型材料对细胞分裂素和生长素的响应存在较大差异。一些研究表明低蔗糖水平利于芽分化和生长, 降低蔗糖浓度可促进 108 杨的芽分化 (纪纯阳 等, 2007)。也有研究表明较高的蔗糖水平对蝴蝶兰愈伤生长和芽的分化有明显的促进作用 (Jheng et al., 2006)。本试验表明培养基中不添加蔗糖明显促进马铃薯芽分化, 与添加蔗糖处理相比芽分化率提高了约 3 倍, 这可能与选用块茎作外植体有关。马铃薯块茎上的芽开始萌发时, 块茎中的淀粉会水解为蔗糖、葡萄糖等小分子糖类, 同时内源生长素、细胞分裂素的含量会上升以促进芽的萌发和生长。推测试管薯切片在不含外源碳水化合物的条件下培养, 会促进薯片中的淀粉向蔗糖转化, 这与块茎芽萌发的状态相似, 这种状态可能会改变切片内源激素的含量从而促进芽的分化。

无性系变异具有后代稳定快、能基本保持原品种的优良特性、利于潜在隐性性状和显性性状的活化、绿苗得率高、效率高等特点 (王蒂, 2004; 平文丽和杨铁钊, 2005)。Biswas 等 (2009) 通过离体培养草莓叶片诱导植株再生, 从再生的植株中获得了一系列遗传变异且园艺性状得到优化的新材料。本试验获得的无性系变异材料 M-13 从株形、生物量、耐逆性到叶绿素含量、可溶性磷含量、POD 活性等都较母本 ML 有所改善。

M-13 的株型较母本 ML 健壮, 植株和薯块的重量都将近 ML 的 2 倍, 推测这与 M-13 发达的根系和较高的叶绿素含量密切相关。含有甘露醇的保苗培养基可形成较高的渗透势, 减缓根系对营养物的吸收, 使植株生长缓慢, 但 M-13 在这种条件下仍然生长健壮, 说明其根系不仅发达而且吸收能力强, 并没有受到高渗环境的干扰。M-13 强于 ML 的生长势, 推测与 M-13 较低的 POD 活性导致 IAA 含量高相关, 但具体的 IAA 含量还有待测定。试验利用分子标记鉴定到一些 M-13 特有的条带, 但测序结果表明 SCOT 标记所扩出的差异带不是单一片段, 这对于要鉴定出具体的变异基因序列带来困难, 因此还需要借助于其它方法找到与 M-13 性状变化相关的基因。

References

- Abou-Taleb E M, Aboshosha S M, El-Sherif E M, El-Komy M H. 2010. Genetic diversity among late blight resistant and susceptible potato genotypes. *Saudi Journal of Biological Science*, 17: 133 - 138.
- Biswas M K, Dutt M, Roy U K, Islam R, Hossain M. 2009. Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. *Scientia Horticulturae*, 122: 409 - 416.
- Chao Xiang-jian, Yang Yu, Jin Li-ping, Zhang Yu, Liu Sheng-xiang, Ding Han-feng, Qu Dong-yu, Li Guang-cun. 2009. Construction of high regeneration systems for diploid potato. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (1): 109 - 114. (in Chinese)
- 晁祥健, 杨煜, 金黎平, 张煜, 刘生祥, 丁汉凤, 屈冬玉, 李广存. 2009. 二倍体马铃薯高效再生体系的建立. *园艺学报*, 36 (1): 109 - 114.
- Di Hong, Chen Yi-li, Lu Cui-hua. 2008. Genetic diversity analysis of Chinese mainly cultivated potato varieties by RAPD makers. *Journal of Northeast Agricultural University*, 39 (7): 1 - 4. (in Chinese)
- 邸宏, 陈伊里, 卢翠华. 2008. 中国马铃薯部分品种资源遗传多样性的 RAPD 分析. *东北农业大学学报*, 39 (7): 1 - 4.
- Diao Xian-min, Wang Peng, Zhi Hui, Chen Zhen-ling, Duan Sheng-jun, Sun Jing-san. 2002. Somaclonal variation of foxtail millet and its application in breeding. *Acta Agronomica Sinica*, 28 (4): 480 - 485. (in Chinese)
- 刁现民, 王鹏, 智慧, 陈振玲, 段胜军, 孙敬三. 2002. 谷子体细胞无性系变异及其在育种上的应用. *作物学报*, 28 (4): 480 - 485.
- Eana-Ashari M, Villiers T A. 1998. Plant regeneration from tuber discs of potato (*Solanum tuberosum* L.) using 6-benzylaminopurine (6-BA). *Potato Research*, 41: 371 - 382.

- Ehsanpour A A, Madani S, Hoseini M. 2007. Detection of somaclonal variation in potato callus induced by UV-C radiation using RAPD-PCR. *Gene Application Plant Physiology*, 33: 3 - 11.
- Gorji A M, Poczai P, Polgar Z, Taller J E. 2011. Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCOT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *American Journal of Potato Research*, 88: 226 - 237.
- Jain S M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118: 153 - 166.
- Jheng F Y, Do Y Y, Liauh Y W, Chung J P, Huang P L. 2006. Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium* 'Gower Ramsey' by adjusting carbohydrate sources. *Plant Science*, 170: 1133 - 1140.
- Ji Chun-yang, Bai Bing, Yang Zhan-xu, Zhao Ji-hai, Cong Jing-xin. 2007. Effects of pH and sucrose content on regeneration of Poplar 108. *Liaoning Forestry Science and Technology*, (5): 39 - 40, 48. (in Chinese)
- 纪纯阳, 白冰, 杨占旭, 赵继海, 丛敬心. 2007. pH 值与蔗糖浓度对 108 杨离体再生的影响. *辽宁林业科技*, (5): 39 - 40, 48.
- Kuang Feng-chun, Li He-song, Zeng Ke, Wang Shao-xian, Lin Wan-huang, Xiao Lang-tao. 2005. Studies on relationship between grain weight and content of soluble phosphorus & potassium in endosperm of two-line hybrid rice. *Hunan Agricultural Science*, (6): 8 - 9, 12. (in Chinese)
- 匡逢春, 李合松, 曾可, 王少先, 蔺万煌, 萧浪涛. 2005. 两系法杂交水稻胚乳磷钾含量与粒质量关系研究. *湖南农业科学*, (6): 8 - 9, 12.
- Larkin P J, Scowcroft W R. 1981. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60: 197 - 214.
- Li You-zhong, Liu Hai-ying, Zhang Ning, Si Huai-jun, Wang Di. 2008. Optimization of potato microtuber induction and its genetic transformation system. *Biotechnology*, 18 (3): 65 - 68. (in Chinese)
- 李有忠, 刘海英, 张宁, 司怀军, 王蒂. 2008. 马铃薯试管薯诱导及其遗传转化体系的优化. *生物技术*, 18 (3): 65 - 68.
- Nei M, Li M H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 5269.
- Phillips R L, Kaeppler S M, Olhoft P. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 5222.
- Ping Wen-li, Yang Tie-zhao. 2005. Somaclonal variation and its application in crop breeding. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 14 (5): 23 - 31. (in Chinese)
- 平文丽, 杨铁钊. 2005. 体细胞无性系变异及其在作物育种中的应用. *西北农业学报*, 14 (5): 23 - 31.
- Si H J, Xie C H, Liu J. 2003. An efficient protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation with microtuber and the introduction of an antisense class I patatin gene into potato. *Acta Agronomica Sinica*, 29 (6): 801 - 805.
- Sun Hui-sheng. 2003. Potato breeding. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 孙慧生. 2003. 马铃薯育种学. 北京: 中国农业出版社.
- Wang Di. 2004. Plant tissue culture. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 王蒂. 2004. 植物组织培养. 北京: 中国农业出版社.
- Wang Hong-mei, Li Shu-jie, Zhang Zheng-ying, Zhang Jin-wen. 2008. Induction and regeneration of microtuber of different genotype potatoes. *Journal of Gansu Agricultural University*, 43 (5): 55 - 58. (in Chinese)
- 王红梅, 李淑洁, 张正英, 张金文. 2008. 不同基因型马铃薯试管薯的诱导及其再生研究. *甘肃农业大学学报*, 43 (5): 55 - 58.
- Wang Xiao-jie, Qiao Li-xian, Zhang Min-feng, Li Cui-qin, Guo Bao-tai. 2008. Regeneration of minituber disc explants in potato. *Journal of Qingdao Agricultural University: Natural Science*, 25 (2): 120 - 122. (in Chinese)
- 王晓杰, 乔利仙, 张敏凤, 李翠芹, 郭宝太. 2008. 马铃薯微型薯切块离体再生的研究. *青岛农业大学学报: 自然科学版*, 25 (2): 120 - 122.
- Xiong Qing-e. 2003. Experimental tutorial for plant physiology. Chengdu: Sichuan Publish House of Science & Technology. (in Chinese)
- 熊庆娥. 2003. 植物生理学实验教程. 成都: 四川科学技术出版社.