

二倍体栽培马铃薯高效遗传转化体系的建立

叶明旺¹, 张春芝², 黄三文^{1,2}

(¹ 云南师范大学生命科学学院/马铃薯科学研究院, 昆明 650500; ² 中国农业科学院深圳农业基因组研究所, 广东深圳 518120)

摘要:【背景】马铃薯是最重要的块茎类粮食作物。栽培马铃薯以四倍体为主, 但四倍体遗传和薯块繁殖增加了马铃薯改良的难度。因此越来越多的科学家呼吁在二倍体水平进行马铃薯的再驯化, 将马铃薯驯化成种子繁殖作物。自然界中存在 4 个二倍体马铃薯原始栽培种, 这些二倍体栽培种中蕴含着丰富的遗传变异, 但是它们的遗传转化体系尚未成熟。【目的】建立高效的二倍体栽培马铃薯遗传转化体系, 为二倍体马铃薯优良等位基因和分子育种提供工具。【方法】以二倍体栽培种马铃薯 (*Solanum phureja*) CIP 703541 为试验材料, 利用绿色荧光蛋白基因 (green fluorescent protein, GFP) 作为报告基因, 对遗传转化体系进行摸索, 主要包括: 预处理培养时间、诱导再生的激素比例、抗生素浓度以及转化效率。另外, 利用同样的激素组合对 17 份不同基因型的二倍体马铃薯原始栽培种进行了测试, 比较各个材料在不同激素浓度条件下的再生效率, 筛选出再生效率较高的激素组合进行大量遗传转化; 对再生苗进行生根筛选、荧光观察和 PCR 鉴定, 统计阳性植株的概率。用流式细胞仪检测阳性植株的倍性, 以分析再生植株发生染色体加倍的频率。【结果】预处理培养时间为 2 d 的外植体浸染效率最高。二倍体材料 CIP 703541 最适合再生出芽的激素配方为 2.0 mg·L⁻¹ 玉米素 (zeatin, ZT) : 0.01 mg·L⁻¹ 奈乙酸 (naphthaleneacetic acid, NAA)。再生阶段抗生素卡那霉素 (kanamycin, Kan) 的最适筛选浓度为 100 mg·L⁻¹, 生根阶段的最适筛选浓度为 50 mg·L⁻¹。通过对不同基因型进行筛选, 获得 3 份再生能力较强的二倍体马铃薯材料 (CIP 703308、CIP 703312 和 CIP 703541)。它们响应的激素配方各不相同, 在添加了 100 mg·L⁻¹ 卡那霉素的再生培养基中, 3 份材料的再生效率分别为 45%、40% 和 52%。通过大规模遗传转化证明, 3 份材料的转化率分别为 2.8%、4.2% 和 5.3%。经流式细胞仪检测, 所获得的马铃薯阳性植株中四倍体的比例较高, CIP 703308、CIP 703312 和 CIP 703541 的阳性转化植株中二倍体的比例分别为 5.26%、10.53% 和 38.46%。【结论】建立了高效的二倍体马铃薯遗传转化体系, 获得了 3 份再生能力较强的二倍体材料。另外, 发现二倍体马铃薯在经过遗传转化之后再生植株中染色体加倍的比例较高。

关键词: 二倍体马铃薯; 遗传转化; 染色体加倍

Construction of High Efficient Genetic Transformation System for Diploid Potatoes

YE MingWang¹, ZHANG ChunZhi², HUANG SanWen^{1,2}

(¹ School of Life Science, Yunnan Normal University/Joint Academy of Potato Sciences, Kunming 650500; ² Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen 518120, Guangdong)

Abstract: 【Background】Potato is the most important tuber crop. Cultivated potatoes are mainly tetraploid, of which the improvement is hampered by tetrasomic genetics and clonal propagation. Thus, more and more scientists are appealing to re-domesticate potato into an inbred line-based crop propagated by seeds at the diploid level. There are four diploid landraces in the nature, which contains abundant genetic variations. But the genetic transformation of diploid landraces is immature. 【Objective】

收稿日期: 2018-04-04; 接受日期: 2018-05-09

基金项目: 云南省科技厅高端人才引进计划 (2013HA025)、国家自然科学基金青年基金 (31601360)

联系方式: 叶明旺, Tel: 18082767849; E-mail: yemingwang0312@foxmail.com。通信作者黄三文, Tel: 010-82109512; E-mail: huangsanwen@caas.cn

This study will construct the high efficient genetic transformation system of diploid potato, which is necessary for exploiting the beneficial genes and molecular breeding in diploid potato. 【Method】 In this study, we used GFP (green fluorescent protein) as a reporter gene, and explored the genetic transformation in diploid clones *Solanum phureja* CIP 703541. Different conditions were tested, including pre-culture time, ratio of plant hormones during regeneration, concentration of antibiotics, transformation efficiency. In addition, we tested the screening system in another 17 diploid landraces. The regeneration efficiencies of different genotypes using various hormone concentrations were compared, and the genotypes with high regeneration efficiency were selected for large-scale transformation. Rooting screening and PCR amplification were performed for the regeneration seedlings, to obtain the positive transformants. The ploidy of regenerated seedlings were detected by flow cytometry to calculate the frequency of chromosome doubling. 【Result】 The optimal pre-culture time was 2 days (d). The optimal ratio of hormones for regeneration of CIP 703541 was $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Zeatin (ZT) and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Naphthaleneacetic acid (NAA). The optimal concentrations of kanamycin for regeneration and rooting were $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Three diploid clones (CIP 703308, CIP 703312 and CIP 703541) with high regeneration capacity were obtained, and the optimal ratio of hormones varied among these genotypes, the regeneration rates were 45%, 40% and 52%, respectively, on the regeneration medium with $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin, and their transformation rates were 2.8%, 4.2% and 5.3%, respectively. The frequency of chromosome doubling is high during the genetic transformation of diploid potatoes. The ratio diploid transformants in CIP 703308, CIP 703312 and CIP 703541 were 5.26%, 10.53% and 38.46%, respectively. 【Conclusion】 We constructed the high efficient genetic transformation system in diploid potato, and obtained three diploid clones with high regeneration capacity. In addition, the ratio of regenerated seedlings with chromosome doubling is high in the positive transformants of diploid potatoes.

Key words: diploid potato; genetic transformation; chromosome doubling

0 引言

【研究意义】马铃薯是世界上最重要的块茎类粮食作物,在解决全球粮食危机方面发挥着重要的作用。栽培马铃薯主要为同源四倍体,但四倍体遗传的复杂性和薯块繁殖的缺陷制约了马铃薯的遗传改良。因此,越来越多的科学家呼吁进行马铃薯的再驯化,在二倍体水平将马铃薯驯化成种子繁殖的作物^[1-3]。在自然界中,二倍体马铃薯资源是非常丰富的。马铃薯包含 228 个野生种和 7 个栽培种,其中 70% 的野生种和 4 个栽培种为二倍体 (*Solanum ajanhuiri*、*S. phureja*、*S. stenotomum* subsp. *stenotomum* 和 *S. stenotomum* subsp. *goniocalyx*)^[4]。这些二倍体原始栽培种在品质和抗性方面具有很多优异的等位基因。近年来,不同马铃薯基因组的公布及变异组研究为挖掘这些二倍体栽培种中蕴含的优良等位基因提供了基因组学基础^[5-9]。为了克隆二倍体栽培种中的优良等位基因并将其应用于精准育种,有必要建立高效的二倍体马铃薯遗传转化体系。【前人研究进展】四倍体马铃薯的再生和遗传转化体系比较成熟。早在 1983 年,OOMS 等^[10]就成功建立了四倍体马铃薯品种“Maris Bard”的遗传转化体系。随后的几十年间,四倍体马铃薯的遗传转化体系被不断优化^[11-14],已经广泛应用到马铃薯重要基因的功能研究中^[15-17]。另外,通过遗传转化对四倍体马铃薯进行品质和抗病性的改良也取得了很大的进展^[18-19]。目前,辛

普劳公司已经推出了第二代转基因马铃薯 Innate 2,通过转基因技术对 4 个性状进行了改良:提高了晚疫病抗性、降低了褐化程度、减少了低温储藏过程中产生的还原糖含量以及油炸后丙烯酰胺含量 (<http://www.simplot.com/>)。随着基因组编辑技术的快速发展,利用基因组编辑改良四倍体马铃薯的品质也取得了一系列进展^[20-22]。【本研究切入点】相比之下,二倍体马铃薯遗传转化的研究较少,仅有少数基因型进行了遗传转化体系的摸索^[23-25]。【拟解决的关键问题】本研究通过筛选预处理培养时间、诱导再生的激素比例、抗生素浓度等,建立二倍体原始栽培种的遗传转化体系。利用筛选出的最佳体系对其他基因型进行测试,分析不同基因型对转化效率的影响,并分析再生植株的染色体加倍情况。

1 材料与方法

1.1 试验材料与培养条件

试验所用的二倍体马铃薯原始栽培种均由国际马铃薯中心(International Potato Center, CIP)提供(表 1)。所有的组培苗均于 2016 年 7 月于中国农业科学院蔬菜花卉研究所功能基因课题组组培间培养。采用 MS 培养基($4.43 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MS 粉末、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, pH=5.8)进行培养。培养条件为温度 (19 ± 1) °C,光照强度为 2 000—3 000 lx, 16 h 光照, 8 h 黑暗。

所用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌

表 1 试验所用的二倍体马铃薯材料

Table 1 The diploid potato clones used in this study

编号	种
Accessions	Species
CIP 703308	富利亚 <i>S. phureja</i>
CIP 703541	富利亚 <i>S. phureja</i>
CIP 703548	富利亚 <i>S. phureja</i>
CIP 703581	富利亚 <i>S. phureja</i>
CIP 703594	富利亚 <i>S. phureja</i>
CIP 703601	富利亚 <i>S. phureja</i>
CIP 702961	角萼薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>goniocalyx</i>
CIP 703287	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>
CIP 703312	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>
CIP 701947	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>
CIP 702588	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>
CIP 702610	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>
CIP 703433	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>
CIP 703446	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>
CIP 703637	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>
CIP 703703	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>
CIP 703783	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>
CIP 704811	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>

株为 EHA 105，内含将 pKSE401 用 *EcoR* I 单酶切插入 35S-GFP-Terminal 片段的 pKSE402 质粒(pKSE401

质粒由中国农业大学陈其军教授提供)，pKSE402 质粒上主要携带了 *GFP* 和卡那霉素抗性基因。

1.2 菌液的制备

挑取含 pKSE402 质粒的单个农杆菌菌落，接种于含有 50 mg·L⁻¹ 利福平和 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素的液体 LB 培养基中，置于摇床 28℃，220 r/min，黑暗条件下，过夜培养至对数生长期。将农杆菌收集到 50 mL 离心管中，4 000 r/min 离心 10 min。弃上清，用液体 MS 培养基（含 40 mg·L⁻¹ 乙酰丁香酮）（表 2）进行重悬，OD₆₀₀ 值调整到 0.6，用于后续浸染。

1.3 预培养

取苗龄为 4 周的无菌苗，切取不带腋芽的茎段，置于 A1 培养基中进行预培养（表 2），预培养时间设置为 0、1、2、3 和 4 d，光照条件同上。每个预培养处理 120 个外植体，共 600 个外植体。

1.4 菌液浸染与共培养

将经过预培养的茎段收集，在提前备好的农杆菌菌液中浸泡 10 min，期间摇晃几次，使农杆菌与茎段充分接触，浸染结束后，用漏勺把菌液沥干，之后将外植体置于三层滤纸上吸干菌液。吸干农杆菌菌液后把外植体转入覆盖了一张无菌滤纸的 A2 培养基（表 2）中于黑暗条件下共培养 2 d，培养温度为 28℃。

1.5 外植体愈伤诱导培养基的筛选

将经过共培养茎段分别置于 CIM1、CIM2、SIM1 和 SIM2 中进行培养（表 2），2 周换一次培养基。培

表 2 遗传转化所用培养基配方

Table 2 Mediums used genetic transformation

培养基	培养基成分
Medium	Medium components
液体 MS	4.43 g·L ⁻¹ MS 粉末+ 30.00 g·L ⁻¹ 蔗糖，pH=5.8
Liquid MS	4.43 g·L ⁻¹ MS powder+ 30.00 g·L ⁻¹ sucrose, pH=5.8
扩繁培养基	4.43 g·L ⁻¹ MS 粉末+ 30.00 g·L ⁻¹ 蔗糖+7.00 g·L ⁻¹ 琼脂，pH=5.8
Propagation medium (BMS)	4.43 g·L ⁻¹ MS powder+ 30.00 g·L ⁻¹ sucrose+7.00 g·L ⁻¹ agar, pH=5.8
预培养基 A1	BMS+1.00 mg·L ⁻¹ 玉米素+2.00 mg·L ⁻¹ 奈乙酸
Pre-culture medium A1	BMS+1.00 mg·L ⁻¹ Zeatin (ZT) +2.00 mg·L ⁻¹ naphthylacetic acid (NAA)
共培养基 A2	BMS+1.00 mg·L ⁻¹ 玉米素+2.00 mg·L ⁻¹ 奈乙酸+40.00 mg·L ⁻¹ 乙酰丁香酮
Co-culture medium A2	BMS+1.00 mg·L ⁻¹ ZT+2.00 mg·L ⁻¹ NAA+40.00 mg·L ⁻¹ Acetosyringone (AS)
愈伤诱导培养基	CIM1: BMS+1.00 mg·L ⁻¹ 玉米素+0.10 mg·L ⁻¹ 奈乙酸+200.00 mg·L ⁻¹ 特美汀
Callus inducing medium (CIM)	CIM1: BMS+1.00 mg·L ⁻¹ ZT+0.10 mg·L ⁻¹ NAA+200.00 mg·L ⁻¹ timentin (TMT)
	CIM2: BMS+2.00 mg·L ⁻¹ 玉米素+0.10 mg·L ⁻¹ 奈乙酸+200.00 mg·L ⁻¹ 特美汀
	CIM2: BMS+2.00 mg·L ⁻¹ ZT+0.10 mg·L ⁻¹ NAA+200.00 mg·L ⁻¹ TMT
分化培养基	SIM1: BMS+1.00 mg·L ⁻¹ 玉米素+0.01mg·L ⁻¹ 奈乙酸+200.00 mg·L ⁻¹ 特美汀
Shoot inducing medium (SIM)	SIM1: BMS+1.00 mg·L ⁻¹ ZT+0.01mg·L ⁻¹ NAA+200.00 mg·L ⁻¹ TMT
	SIM2: BMS+2.00 mg·L ⁻¹ 玉米素+0.01mg·L ⁻¹ 奈乙酸+200.00 mg·L ⁻¹ 特美汀
	SIM2: BMS+2.00 mg·L ⁻¹ ZT+0.01mg·L ⁻¹ NAA+200.00 mg·L ⁻¹ TMT
生根培养基	BMS+200.00 mg·L ⁻¹ 特美汀
Root inducing medium (RIM)	BMS+200.00 mg·L ⁻¹ TMT

养4周后,CIM1和CIM2都均匀更换为SIM1和SIM2,而最初在SIM1和SIM2上培养的维持不变。每个处理200个外植体,共800个外植体。

1.6 诱导愈伤和分化的抗生素筛选

将共培养2d的外植体置于含有不同浓度卡那霉素(0、50、75、100和150 mg·L⁻¹)的SIM2上诱导愈伤,2周更换一次培养基直至出芽。每个处理100个外植体,共500个外植体。

1.7 生根培养时抗生素浓度的筛选

取未转化的带腋芽的外植体扦插至含有不同浓度卡那霉素(0、50、75、100和150 mg·L⁻¹)的RIM上进行生根处理。每个处理3瓶,每瓶8株。

1.8 筛选适宜遗传转化的基因型

利用筛选好的条件:预培养2d和添加了100 mg·L⁻¹ Kan的筛选再生培养基 CIM1+SIM1、CIM1+SIM2、CIM2+SIM1、CIM2+SIM2、SIM1+SIM1以及SIM2+SIM2对其余17份二倍体马铃薯进行遗传转化,每组处理100个外植体,共600个外植体。

1.9 生根培养

待获得的再生芽长至1—2 cm时,将再生芽切下,扦插至RIM(50 mg·L⁻¹卡那霉素)上进行生根培养。

1.10 转基因植株的PCR检测和倍性检测

设计包含绿色荧光蛋白的外源片段的扩增引物对再生植株进行扩增(引物为F:5'-AAAAGGCCCTGGGAATCTG-3'和R:5'-AATTGAACGCCGAAGAACAG-3'),扩增条带大小为320 bp。PCR体系为10 ng模板cDNA、10 μL 2×GoTaq Colorless Master Mix和正反向引物各0.4 μL(10 μmol·L⁻¹),ddH₂O补充至20 μL。反应程序为94℃ 4 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 45 s,35次循环;72℃ 1 min,4℃保存。

参照施春晖等^[26]方法,利用北京大学凤凰工程高通量流式平台BD Fortessa流式细胞仪检测阳性植株倍性样品。

2 结果

2.1 预培养时间的确定

为了确定最佳的预培养时间,设置5个预培养时间梯度0、1、2、3和4 d。不同预培养时间处理的外植体经过同样的浸染和共培养之后,通过体视荧光显微镜进行荧光采集和统计。当预培养时间在2 d以下时,茎段伤口处荧光团面积会随着预培养时间显著增加,但是随着预培养时间的进一步增加,浸染效率开始减小,直至第4天,只有少数几个外

植体上出现荧光小点(表3)。因此确定最佳的预培养时间为2 d。

表3 预培养时间对转化的影响

Table 3 The effects of pre-culture time on transformation

预培养天数 Pre-culture days (d)	荧光情况 Fluorescence
0	+
1	+++
2	++++
3	+++
4	—

+代表荧光程度;—代表荧光程度极少
+ shows the degree of fluorescence; — shows little fluorescence

2.2 不同激素对比对诱导愈伤组织和再生的影响

外植体经过2d的预培养后用菌液进行浸染,共培养2d后,将外植体分别转移到CIM1、CIM2、SIM1和SIM2中进行培养。培养4周后,观察愈伤组织的状态,SIM2诱导愈伤组织的效率最高,且愈伤组织比较致密,呈深绿色,另外3种培养基诱导的愈伤组织较松散,呈浅绿色(表4)。之后把CIM1和CIM2上的外植体均匀更换至SIM1和SIM2,进行诱芽处理,SIM1和SIM2上的外植体维持原激素比例不变,每2周换一次培养基直至出芽,统计不同激素组合的再生情况(表5)。其中,SIM2+SIM2组合诱导再生芽的能力较强,有些外植体上有多个再生芽,因此,确定SIM2+SIM2为诱导二倍体马铃薯材料CIP 703541的最佳激素配比。

2.3 不同抗生素浓度对再生和生根的影响

利用筛选出来的最佳培养基组合SIM2+SIM2,对愈伤诱导和芽再生阶段的抗生素浓度进行筛选。外植体通过2d预培养,经浸染和共培养后转移至含有不同卡那霉素浓度的SIM2培养基上,8周后进行对再生芽的数目进行统计(表6)。当卡那霉素浓度在100 mg·L⁻¹以下时,对马铃薯的出芽影响并不是很明显。而当卡那霉素浓度为100 mg·L⁻¹的时候,部分外植体的出芽明显被抑制,而且能够出芽的外植体以单芽为主。当卡那霉素浓度达到150 mg·L⁻¹时,外植体经一段时间的培养后,基本趋于死亡状态,没有获得再生芽。因此,选择浓度为100 mg·L⁻¹的卡那霉素作为筛选二倍体马铃薯材料CIP 703541遗传转化的最适浓度。

野生型马铃薯带腋芽的茎段扦插在添加了不同浓度卡那霉素的RIM培养基中进行生根试验,在卡那霉

表 4 不同激素对比对茎段的愈伤组织诱导情况

Table 4 Effects of different hormone ratios on callus induction

培养基	接种茎段数	愈伤数	愈伤率	愈伤形态特征
Medium	Number of explants	Number of callus	Rate of callus induction (%)	Morphology of callus
CIM1	200	115	57.5	浅绿，组织松散 Light green, loose
CIM2	200	122	61.0	浅绿，组织松散 Light green, loose
SIM1	200	135	67.5	浅绿，组织松散 Light green, loose
SIM2	200	189	94.5	深绿，组织致密成哑铃状 Dark green, compact, dumbbell shape

表 5 不同激素对比对愈伤组织分化的影响

Table 5 Effects of different hormone ratios on callus regeneration

培养基	接种愈伤数	再生植株数	出芽率
Medium	Number of explants with callus	Number of regenerated seedlings	Ratio of regeneration (%)
CIM1 + SIM1	57	1	1.8
CIM1 + SIM2	58	0	0
CIM2 + SIM1	61	3	4.9
CIM2 + SIM2	61	5	8.2
SIM1 + SIM1	135	37	27.4
SIM2 + SIM2	189	213	112.7

表 6 不同卡那霉素浓度对再生的影响

Table 6 Effects of different kanamycin concentrations on regeneration

卡那霉素浓度	外植体数	再生芽数	出芽率
Concentration of kanamycin (mg·L ⁻¹)	Number of explants	Number of regenerated seedlings	Ratio of regeneration (%)
0	100	175	175
50	100	106	106
75	100	93	93
100	100	52	52
150	100	0	0

素达到 50 mg·L⁻¹ 时，所有的马铃薯植株已经不能生根。因此，采用 50 mg·L⁻¹ 作为 CIP 703541 生根阶段的卡那霉素筛选浓度。

2.4 其他二倍体马铃薯材料的遗传转化体系的筛选

根据建立的二倍体马铃薯遗传转化体系的筛选流程，通过对另外 17 份二倍体原始栽培种进行同样的遗传转化筛选试验。其中，有 3 份材料（CIP702961、CIP 703308 和 CIP 703312）能够对设置的激素组合作出响应，但是最适的激素组合不同（表 7）。其中，CIP 703308 和 CIP 703312 诱导再生芽效率较高，分别为 45%和 40%。

2.5 转基因阳性植株的鉴定

通过不用的激素组合筛选，获得 3 份再生率较高的二倍体原始栽培种（CIP 703308、CIP 703312 和 CIP

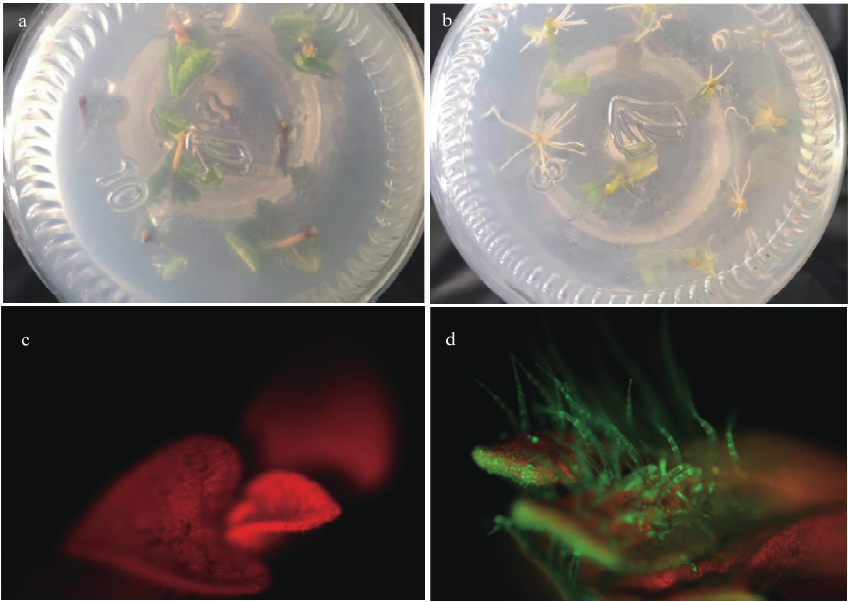
703541），根据每份材料最适的激素组合分别进行大规模的遗传转化，转化的外植体数分别为 1 600、1 300 和 1 800 个。将获得的再生芽在卡那霉素浓度为 50 mg·L⁻¹ 的生根培养基上进行了两轮生根测试(图 1-a 和图 1-b)，每一轮生根测试均淘汰一批不能正常生根的再生苗，最终分别获得 44、55 和 96 株抗筛阳性植株，转化效率分别为 2.8%、4.2%和 5.3%。经 PCR 检测，所有植株均含有外源载体序列。同时利用体视荧光显微镜对阳性植株的 GFP 荧光进行观察，未转化的植株由于叶绿体自发荧光呈现红色，而阳性植株的叶片呈现红绿相间的颜色，表皮毛的绿色比较明显（图 1-c 和图 1-d）。但是由于 GFP 在不同株系的表达情况不同，很难通过 GFP 的颜色准确判断是否是阳性植株，因此，以是否能够经过两轮生根测试作为判断阳性植株的标准。

表 7 另外 17 份二倍体马铃薯原始栽培种的遗传转化体系筛选

Table 7 Screening of optimal genetic transformation system for another 17 diploid landraces

编号	种	适宜再生培养基	出芽率
Accession	Species	Optimal medium	Ratio of regenerated seedlings (%)
CIP 703308	富利亚 <i>S. phureja</i>	CIM2+SIM2	45
CIP 703548	富利亚 <i>S. phureja</i>	/	0
CIP 703581	富利亚 <i>S. phureja</i>	/	0
CIP 703594	富利亚 <i>S. phureja</i>	/	0
CIP 703601	富利亚 <i>S. phureja</i>	/	0
CIP 702961	角萼薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>goniocalyx</i>	SIM2+SIM2	3
CIP 703287	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>	/	0
CIP 703312	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>	CIM1+SIM1	40
CIP 701947	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>	/	0
CIP 702588	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>	/	0
CIP 702610	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>	/	0
CIP 703433	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>	/	0
CIP 703446	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>	/	0
CIP 703637	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>	/	0
CIP 703703	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>	/	0
CIP 703783	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>	/	0
CIP 704811	窄刀薯 <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>	/	0

/表示无适宜培养基
/ shows there's no optimal medium



a、c: 野生型；b、d: 阳性植株
a, c: Wild type; b, d: Positive seedlings

图 1 转基因阳性植株的检测

Fig. 1 Assays of the positive regenerated seedlings

2.6 转基因阳性植株的倍性鉴定

马铃薯在经过遗传转化之后容易发生染色体加倍的现象。从转化率较高的 3 份材料中（CIP 703308、CIP 703312 和 CIP 703541），分别选择部分阳性转化株进行染色体倍性的检测。结果显示，大多数阳性植株为四倍体，其中 CIP 703541 的阳性植株中二倍体植株的比例最高，为 38.46%（表 8）。

表 8 阳性植株的倍性检测
Table 8 Ploidy of positive transformants

编号	检测植株数	二倍体植株数	二倍体植株比例
Accessions	Number of tested seedlings	Number of diploid seedlings	Ratio of diploid seedlings (%)
CIP 703308	19	1	5.26
CIP 703312	38	4	10.53
CIP 703541	13	5	38.46

不同二倍体基因型的再生能力差异很大，而且再生能力强的基因型所响应的激素组合也不同。本研究获得 3 份再生和遗传转化效率较高的二倍体资源。但是，其余大部分二倍体材料对 6 种激素组合均不响应，因此，有必要对更多的二倍体基因型进行激素配方筛选，然后通过全基因组关联分析或者构建分离群体的方法挖掘马铃薯中控制再生的遗传位点，将有效解决基因型对再生和遗传转化的影响。

无性系变异是植物组织培养中的一个常见现象^[28-29]，它能在离体培养的细胞、愈伤或组织中发生，从而引起再生植株遗传或者表现遗传的变异。本研究发现二倍体马铃薯经遗传转化得到的再生苗里面染色体加倍的情况比较严重。在检测的 3 份材料里，四倍体的概率均高于二倍体，其中 CIP 703308 的阳性转化株中二倍体的概率仅为 5.26%。这意味着需要进行大规模的遗传转化才能得到一定数目的二倍体阳性株。因此，在今后的研究中有必要筛选染色体加倍比例较低的二倍体。

二倍体马铃薯原始栽培种在南美洲已经经历了几千年的驯化和改良，除了在外观、产量和适应性方面与现在的四倍体栽培种还存在一些差距，其他很多性状已经接近现在的四倍体栽培种，因此，这些资源可以作为二倍体马铃薯育种的原始材料。通过对外观、产量和适应性等性状进行遗传分析，挖掘控制这些性状的遗传位点，可以对二倍体原始栽培种进行定向改良。本研究建立的高效转化体系将为验证重要基因的功能以及利用生物技术对二倍体原始栽培种进行遗传改良提供有力工具。

3 讨论

马铃薯的再生和遗传转化效率受基因型的影响较大。HEERES 等^[27]对 16 份四倍体材料进行了遗传转化，发现不同基因型对激素的响应不同，诱导再生芽的效率差异也比较大。本研究利用 6 个激素组合对 18 份二倍体原始栽培种进行了筛选，也获得相同的结论。

4 结论

通过对 18 份二倍体马铃薯栽培种进行了遗传转化体系的摸索，成功建立了其中 3 份材料的高效遗传转化体系。证实了二倍体马铃薯的再生能力和遗传转化效率也受基因型的较大影响，此外其再生植株很容易发生染色体加倍的情况。

References

[1] LINDHOUT P, MEIJER D, SCHOTTE T, RCB H, RGF V, VAN ECK H J. Towards F₁ hybrid seed potato breeding. *Potato Research*, 2011, 54(4): 301-312.

[2] 李颖, 李广存, 李灿辉, 屈冬玉, 黄三文. 二倍体杂种优势马铃薯育种的展望. *中国马铃薯*, 2013(2): 96-99.

LI Y, LI G C, LI C H, QU D Y, HUANG S W. Prospects of diploid hybrid breeding in potato. *Chinese Potato Journal*, 2013(2): 96-99. (in Chinese)

[3] JANSKY S H, CHARKOWSKI A O, DOUCHES D S, GUSMINI G, RICHAEEL C, BETHKE P C, SPOONER D M, NOVY R G, JONG H D, DE JONG W S, BAMBERG J B, THOMPSON A L, BIZIMUNGU B, HOLM D J, BROWN C R, HAYNES K G, SATHUVALLI V R, VEILLEUX R E, CREIGHTON M J, JR, BRADEEN J M, JIANG J M. Reinventing potato as a diploid inbred line-based crop. *Crop Science*, 2016, 56(4): 1-11.

[4] HAWKES J G, PRESS B. *The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources*. London: Smithsonian Institution Press, 1990: 733-735.

[5] CONSORTIUM T P G S. Genome sequence and analysis of the tuber

- crop potato. *Nature*, 2011, 475(7355): 189-195.
- [6] AVERSANO R, CONTALDI F, ERCOLANO M R, GROSSO V, LORIZZO M, TATINO F, XUMERLE L, MOLIN A D, AVANZATO C, FERRARINI A, DELLEDONNE M, SANSEVERINO W, CIGLIANO R A, CAPELLAGUTIERREZ S, GABALDÓN T, FRUSCIANTE T, BRADEEN J M, CARPUTO D. The *Solanum commersonii* genome sequence provides insights into adaptation to stress conditions and genome evolution of wild potato relatives. *The Plant Cell*, 2015, 27(4): 954-968.
 - [7] KOENIG D, JIMÉNEZGÓMEZ J M, KIMURA S, FULOP D, CHITWOOD D H, HEADLAND L R, KUMAR R, COVINGTON M F, DEVISETTY U K, TAT A V, TOHGE T, BOLGER A, SCHNEEBERGER K, OSSOWSKI S, LANZ C, XIONG G Y, TAYLOR-TEEPLES M, BRADY S M, PAULY M, WEIGEL D, USADEL B, FERNIE A R, PENG J, SINHA N R, MALOOF J N. Comparative transcriptomics reveals patterns of selection in domesticated and wild tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(28): E2655-E2662.
 - [8] HARDIGAN M A, FPE L, NEWTON L, CRISOVAN E, HAMILTON J P, VAILLANCOURT B, WIEGERT-RININGER K, WOOD J C, DOUCHES D S, FARRÉ E M, VEILLEUX R E, ROBIN BUELL C. Genome diversity of tuber-bearing *Solanum* uncovers complex evolutionary history and targets of domestication in the cultivated potato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(46): E9999-E10008.
 - [9] LI Y, COLLEONI C, ZHANG J, LIANG Q, HU Y, RUESS H, SIMON R, LIU Y, LIU H, YU G, SCHMIITT E, PONITZKI C, LIU G, HUANG H, ZHAN F, CHEN L, HUANG Y, SPOONER D, HUANG B. Genomic analyses yield markers for identifying agronomically important genes in potato. *Molecular Plant*, 2018, 11(3): 473-484.
 - [10] OOMS G, KARP A, ROBERTS J. From tumour to tuber; tumour cell characteristics and chromosome numbers of crown gall-derived tetraploid potato plants (*Solanum tuberosum* cv. 'Maris Bard'). *Theoretical & Applied Genetics*, 1983, 66(2): 169-172.
 - [11] DE B M. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theoretical & Applied Genetics*, 1988, 76(5): 767-774.
 - [12] 王丹, 朱常香, 郑成超, 温孚江. 根癌农杆菌介导的马铃薯遗传转化条件的优化. 山东农业大学学报(自然科学版), 2002, 33(1): 23-27.
WANG D, ZHU C X, ZHENG C C, WEN F J. Optimization of factors affecting genetic transformation of potato via *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)*, 2002, 33(1): 23-27. (in Chinese)
 - [13] TRUJILLO C, RODRÍGUEZ-ARANGO E, JARAMILLO S, HOYOS R, ORDUZ S, ARANGO R. One-step transformation of two Andean potato cultivars(*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena*). *Plant Cell Reports*, 2001, 20(7): 637-641.
 - [14] GUSTAFSON V, MALLUBHOTLA S, MACDONNELL J, SANYAL-BAGCHI M, CHAKRAVARTY B, WANG-PRUSKI G, ROTHWELL C, AUDY P, DEKOEYER D, SIAHBAZI M, FLINN B, REGAN S. Transformation and plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum*, L. cv. 'Shepody'. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2006, 85(3): 361-366.
 - [15] KLOOSTERMAN B, NAVARRO C, BIJSTERBOSCH G, LANGE T, PRAT S, VISSER R G F, BACHEM C W M. StGA2ox1 is induced prior to stolon swelling and controls GA levels during potato tuber development. *The Plant Journal*, 2007, 52(2): 362-373.
 - [16] PASARE S A, DUCREUX L J, MORRIS W L, CAMPBELL R, SHARMA S K, ROUMELIOTIS E, KOHLEN W, KROL S, BRAMLEY P M, ROBERTS A G, FRASER P D, TAYLOR M A. The role of the potato (*Solanum tuberosum*) CCD8 gene in stolon and tuber development. *New Phytologist*, 2013, 198(4): 1108-1120.
 - [17] NICOLAS M, RODRÍGUEZ-BUEY M L, FRANCO-ZORRILLA J M, CUBAS P. A recently evolved alternative splice site in the branched1a gene controls potato plant architecture. *Current Biology*, 2015, 25(14): 1799-1809.
 - [18] ZHU S, LI Y, VOSSEN J H, VISSER R G F, JACOBSEN E. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans*, in potato. *Transgenic Research*, 2012, 21(1): 89-99.
 - [19] SUN K, WOLTERS A M A, LOONEN A E H M, HUIBERS R P, VLUGT R, GOVERSE A, JACOBSEN E, VISSER R G F, BAI Y. Down-regulation of *Arabidopsis* DND1 orthologs in potato and tomato leads to broad-spectrum resistance to late blight and powdery mildew. *Transgenic Research*, 2016, 25(2): 123-138.
 - [20] CLASEN B M, STODDARD T J, LUO S, DEMOREST Z L, LI J, CEDRONE F, TIBEBU R, DAVISON S, RAY E E, DAULHAC A, COFFMAN A, YABANDITH A, RETTERATH A, HAUN W, BALTES N J, MATHIS L, VOYTAS D F, ZHANG F. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 14(1): 169-176.
 - [21] NICOLIA A, PROUX-WÉRA E, ÅHMAN I, ONKOKESUNG N, ANDERSSON M, ANDREASSON E, ZHU L H. Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts. *Journal of Biotechnology*, 2015, 204: 17-24.
 - [22] BUTLER N M, ATKINS P A, VOYTAS D F, DOUCHES D S.

- Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) using the CRISPR/Cas system. *PLoS ONE*, 2015, 10(12): e0144591.
- [23] DUCREUX L J M, MORRIS W L, TAYLOR M A, MILLAM S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Solanum phureja*. *Plant Cell Reports*, 2005, 24(1): 10-14.
- [24] VISSER R G, JACOBSEN E, HESSELINGMEINDERS A, SCHANS M J, WITHOLT B, FEENSTRA W J. Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. *Plant Molecular Biology*, 1989, 12(3): 329-337.
- [25] ISHIZAKI T, KATO A. Introduction of the tobacco retrotransposon Tto1 into diploid potato. *Plant Cell Reports*, 2005, 24(1): 52-58.
- [26] 施春晖, 徐兰兰, 王晓庆, 骆军. 流式细胞仪鉴定猕猴桃倍性技术研究. *植物研究*, 2014, 34(6): 845-849.
- SHI C H, LAN-LAN X U, WANG X Q, LUO J. Identification of kiwifruit ploidy using flow cytometry. *Bulletin of Botanical Research*, 2014, 34(6): 845-849. (in Chinese)
- [27] HEERES P, SCHIPPERSROZENBOOM M, JACOBSEN E, VISSER R G F. Transformation of a large number of potato varieties: Genotype-dependent variation in efficiency and somaclonal variability. *Euphytica*, 2002, 124(1): 13-22.
- [28] KARP A, JONES M G K, FOULGER D, FISH N, BRIGHT S W J. Variability in potato tissue culture. *American Potato Journal*, 1989, 66(10): 669-684.
- [29] BEAUJEAN A, SANGWAN R S, LECARDONNELA, SANGWANNORREEL B S. *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: An efficient protocol of transformation. *Journal of Experimental Botany*, 1998, 49(326): 1589-1595.
- (责任编辑 李莉)