

研究报告

A Letter

甘薯近缘野生种 *Ipomoea cordatotriloba* 组织及原生质体培养植株再生

关世凯[✉], 杨育峰[✉], 孙亚萍[✉], 翟红[✉], 何绍贞[✉], 刘庆昌[✉]

中国农业大学教育部作物杂种优势研究与利用重点实验室, 北京市作物遗传改良重点实验室, 北京, 100193

✉ 通讯作者: liuqc@cau.edu.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 117 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0117

收稿日期: 2011 年 09 月 23 日

接受日期: 2011 年 10 月 15 日

发表日期: 2011 年 11 月 25 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

关世凯等, 2011, 甘薯近缘野生种 *Ipomoea cordatotriloba* 组织及原生质体培养植株再生, 分子植物育种(online) Vol.9 No.117 pp.1851-1856 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0117)

引用格式(英文):

Guan et al., 2011, Plant regeneration in tissue and protoplast cultures of *Ipomoea cordatotriloba*, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.9 No.117 pp.1851-1856 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0117)

摘要 为通过体细胞杂交法利用甘薯近缘野生种 *Ipomoea cordatotriloba* 中的抗茎线虫病基因, 本研究建立了该野生种有效的原生质体培养植株再生体系。利用含 0.05 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L KT 的 MS 培养基诱导甘薯近缘野生种叶柄组织并形成愈伤组织, 将诱导得到的愈伤组织在 6 种不同分化培养基上进行培养。结果表明, 在含 0.1 mg/L IAA 和 5.0 mg/L BAP 的分化培养基上获得了最高的植株再生率, 达 52.00%。用所建立的 *I. cordatotriloba* 的叶柄组织培养植株再生体系, 培养其原生质体再生植株, 再生率达 50.98%。

关键词 甘薯; *I. cordatotriloba*; 组织培养; 原生质体培养; 植株再生

Plant Regeneration in Tissue and Protoplast Cultures of *Ipomoea cordatotriloba*

Guan Shikai[✉], Yang Yufeng[✉], Sun Yaping[✉], Zhai Hong[✉], He Shaozhen[✉], Liu Qingchang[✉]

Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement; Laboratory of Crop Heterosis and Utilization, Ministry of Education; China Agricultural University, Beijing, 100193, P.R., China

✉ Corresponding author, liuqc@cau.edu.cn; ✉ Authors

Abstract To utilize stem nematode resistance gene of *Ipomoea cordatotriloba*, a wild relative of sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.], through somatic hybridization, an efficient system of plant regeneration from protoplasts of this relative has been established in the present study. Petiole tissues of *I. cordatotriloba* formed calluses on MS medium with 0.05 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L KT. The obtained calluses were cultured on the six regeneration media and the highest regeneration frequency up to 52.00% was achieved on the regeneration medium with 0.1 mg/L IAA and 5.0 mg/L BAP. Petiole protoplasts of *I. cordatotriloba* gave a regeneration frequency up to 50.98% through the use of petiole culture system of this relative.

Keywords Sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.); *I. cordatotriloba*; Tissue culture; Protoplast culture; Plant regeneration

研究背景

甘薯(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)是世界上重要的粮食、饲料、工业原料以及新型能源用块根作物(刘庆昌, 2004)。由于甘薯组内存在严重的种间杂交不亲和性, 使得甘薯近缘野生种的基因资源难以在甘薯育种中直接利用。研究表明, 体细胞杂交法是克服甘薯组植物有性杂交不亲和性的有效途径(Guo et al., 2006; Yang et al., 2009)。

为了用体细胞杂交法克服甘薯栽培种与近缘野生种之间的种间杂交不亲和性, 首先必须建立其

有效的原生质体培养植株再生体系。关于甘薯及其近缘野生种原生质体培养植株再生已经有一些报道。Suga 等(1990)培养 *Ipomoea trifida* (白花野牵牛, 2x)的叶肉原生质体, 获得 20%的植株再生率。Liu 等(1991)对 *Ipomoea triloba* (三裂叶野牵牛, 2x)的叶柄原生质体进行培养, 获得 36.7%的植株再生率。刘庆昌等(1995)改进培养基中植物生长调节剂的种类和浓度, 对 *I. triloba* 和 *Ipomoea lacunosa* (多洼野牵牛, 2x)的叶柄原生质体进行了植株再生研究, 从 *I. lacunosa* 原生质体获得 11 株再生植株; 实现了 *I.*

triloba 原生质体的高频率植株再生, 达 62%。Guo 等(2006)从 *Ipomoea cairica* (槭叶野牵牛, 2x) 的叶肉原生质体实现了 41.3%的植株再生率。

关于甘薯及其近缘野生种体细胞杂交的研究也有一些报道。刘庆昌等(1994)从甘薯品种高系 14 号与 *I. triloba* 的融合原生质体得到 7 株种间体细胞杂种植株。刘庆昌等(1998)获得了高系 14 号和 *I. lacunosa* 的 2 株体细胞杂种植株。Zhang 等(2002)获得了甘薯品种栗子香和 *I. lacunosa* 的种间体细胞杂种植株。Guo 等(2006)获得了甘薯品种徐薯 18 和 *Ipomoea cairica* 的 46 株种间体细胞杂种植株。Yang 等(2009)获得徐薯 18 与 *I. triloba* 的体细胞杂种植株, 并从中筛选出具有膨大块根的抗旱杂种植株。

研究表明, 甘薯近缘野生种 *Ipomoea cordatotriloba* (2x)具有抗甘薯茎线虫病的特性(曹清河等, 2009), 但由于其与甘薯栽培种杂交不亲和, 其抗茎线虫病基因资源难以直接应用于甘薯育种。但是, 目前尚未见有关 *I. cordatotriloba* 的原生质体培养及体细胞杂交的报道。为通过体细胞杂交法利用 *I. cordatotriloba* 中的抗茎线虫病基因资源, 首先需要建立其有效的原生质体植株再生体系。本研究在建立 *I. cordatotriloba* 叶柄组织培养植株再生体系的基础上, 成功地建立了 *I. cordatotriloba* 的叶柄原生质体植株再生体系, 实现了高频率的原生质体植株再生。

1 结果与分析

1.1 叶柄组织培养及植株再生

将甘薯近缘野生种 *I. cordatotriloba* 的叶柄组织在添加 0.05 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L KT 的固体 MS 培养基上进行培养(图 1A)。培养 4~7 d 后, 叶柄组织开始形成愈伤组织; 培养 3~4 周后, 形成直径约 10 mm 的愈伤组织(图 1B), 愈伤组织诱导率为 100% (表 1)。甘薯近缘野生种 *I. cordatotriloba* 的叶柄组织所形成的愈伤组织较松软, 白色, 与 Liu 等(1990)获得的 *I. triloba* 叶柄组织培养结果相似。

将诱导得到的愈伤组织转移到添加 0、0.1 mg/L IAA 和 1.0、2.0、5.0 mg/L BAP 的 6 种分化培养基上进行培养。培养 7~10 d 后, 愈伤组织开始变成黄绿色; 培养 20 d 后开始形成不定根。在分化培养基上, 只有极少数愈伤组织直接形成不定芽, 大多数愈伤组织仅形成不定根。

培养4~6周后, 将愈伤组织连同不定芽或不定

根一起进一步转移到MS基本培养基上。转移2~3周后, 不定芽进一步发育成完整植株(图1C); 多数愈伤组织陆续在 不定根上再生出植株。在添加 0.1 mg/L IAA 和 5.0 mg/L BAP 的MS固体培养基上培养过的愈伤组织显示了最高的植株再生率达52%, 显著高于其他培养基的培养效果(表1)。表明较高浓度的 BAP有利于甘薯近缘野生种 *I. cordatotriloba* 的愈伤组织植株再生。将再生植株进一步转移到MS基本培养基上, 它们发育成完整的再生植株(图1D)。

1.2 原生质体培养与植株再生

对甘薯近缘野生种 *I. cordatotriloba* 的叶柄组织进行酶解处理后获得大量原生质体(图2A)。这与以前在 *I. triloba* 和 *I. lacunosa* 中分离叶柄原生质体的结果类似(Liu et al., 1991; 刘庆昌等, 1995)。将甘薯近缘野生种 *I. cordatotriloba* 的叶柄原生质体在含有 1/2MS 无机盐(但不含 NH_4NO_3)、MS 维生素类、

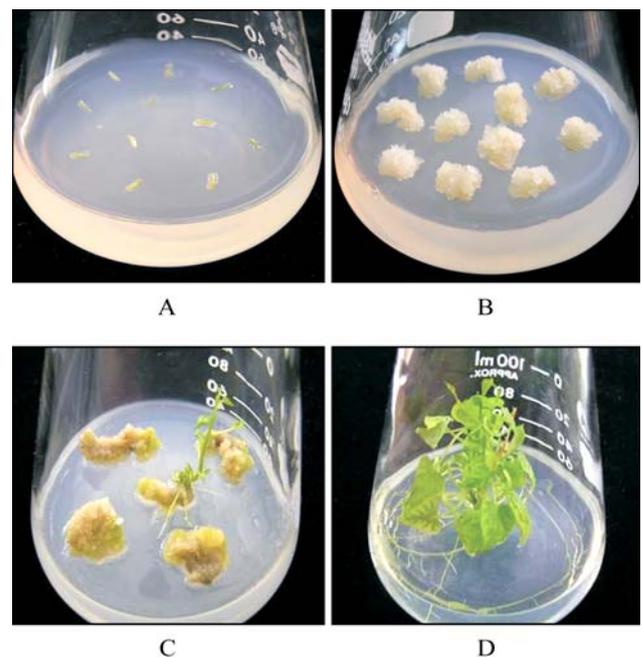


图 1 *I. cordatotriloba* 的叶柄组织培养植株再生

注: A: 接种在含 0.5 mg/L KT 和 0.05 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上的叶柄外植体; B: 由叶柄组织形成的愈伤组织; C: 愈伤组织的植株再生; D: 完整的再生植株

Figure 1 Plant regeneration in petiole tissue cultures of *I. cordatotriloba*

Note: A: Petiole explants inoculated on solid MS medium supplemented with 0.5 mg/L KT and 0.05 mg/L 2,4-D; B: Calluses formed from petiole tissues; C: Plantlet regeneration from a callus; D: Whole regenerated plant

表 1 不同分化培养基对 *I. cordatotriloba* 叶柄愈伤组织植株再生的影响

Table 1 Effects of different regeneration media on plant regeneration in petiole tissue cultures of *I. cordatotriloba*

IAA (mg/L)	BAP (mg/L)	外植体数 No. of explants (A)	形成愈伤 组织数 No. of calluses (B)	愈伤组织形 成率 Frequency of callus B/A(%)	再生植株愈伤 组织数 No. of callus forming plants (C)	再生植株 总数 No. of plants formed (D)	再生率 Frequency of regeneration (C/B(%))	平均再生率 Average frequency of regeneration (%)
0	1.0	50	50	100	12	27	24.00	24.67 ± 3.06a *
		50	50	100	11	19	22.00	
		50	50	100	14	32	28.00	
0	2.0	50	50	100	26	51	52.00	48.00 ± 5.29c
		50	50	100	21	38	42.00	
		50	50	100	25	42	50.00	
0	5.0	50	50	100	17	21	34.00	28.67 ± 5.03ab
		50	50	100	12	18	24.00	
		50	50	100	14	19	28.00	
0.1	1.0	50	50	100	11	19	22.00	22.67 ± 1.15a
		50	50	100	11	21	22.00	
		50	50	100	12	21	24.00	
0.1	2.0	50	50	100	18	28	36.00	35.33 ± 5.03b
		50	50	100	20	33	40.00	
		50	50	100	15	22	30.00	
0.1	5.0	50	50	100	25	48	50.00	52.00 ± 3.46c
		50	50	100	25	50	50.00	
		50	50	100	28	55	56.00	

注: *平均再生率表示为平均值 ± 标准误, 不同字母表示 0.05 水平下差异显著

Note: * Average frequency of regeneration presented as mean ± SE, with different letters indicating significant differences at the 0.05 level

50 mg/L CH、0.6 mol/L D-甘露醇、0.05 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L KT 和 1% 蔗糖的培养基(pH 5.8, P₁ 培养基)中进行培养。培养 1~2 d 后, 大多数原生质体开始形成新的细胞壁。培养 2~3 d 后, 原生质体开始第一次细胞分裂, 之后持续进行分裂形成细胞团。培养 2 周后, 原生质体的植板效率达到 50% 左右。培养 4 周后, 形成肉眼可见的细胞团(图 2B)。

培养 4 周后, 将培养基(P₂ 培养基)的 D-甘露醇浓度降至 0.3 mol/L, 蔗糖浓度增至 2%, 其他条件不变, 继续培养 4 周后, 再培养在含有 0.05 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L KT 和 3% 蔗糖的 MS 培养基(P₃ 培养基)中, 细胞团迅速生长。植板 10~12 周后, 原生质体生长成为直径约 1~3 mm 的小愈伤组织。甘薯近缘野生种 *I. cordatotriloba* 的小愈伤组织为白色、结构松软(图 2C)。

将直径达到 1~3 mm 的小愈伤组织转移到增殖培养基上后, 愈伤组织增殖迅速。转移 3 周后, 愈伤组织的直径达到 5~10 mm, 愈伤组织仍为白色, 结构疏松(图 2D)。将增殖得到的愈伤组织转移到分化培养基上 1 周后, 愈伤组织开始变绿, 陆续长出不定根。在分化培养基上培养 4~6 周后, 将愈伤组织转移到 MS 基本培养基上进行培养, 愈伤组织再生出植株。*I. cordatotriloba* 的原生质体再生植株大部分是从愈伤组织分化的粗根上再生出来的(图 2E)。将再生的小植株转移到新鲜的 MS 基本培养基上进行培养, 获得了完整的再生植株(图 2F)。

现将 *I. cordatotriloba* 的原生质体植株再生结果列于表 2 中。从表 2 可以看出, 在添加 0.1 mg/L IAA 和 5.0 mg/L BAP 的分化培养基上实现了高频率的植株再生, 再生率达 50.98%, 说明叶柄是 *I.*

cordatotriloba 原生质体分离和培养的适宜供体。

2 讨论

建立高效的甘薯及其近缘野生种组织培养植株再生体系是利用体细胞杂交法克服甘薯及其近缘野生种之间杂交不亲和性的前提。甘薯及其近缘野生种的原生质体融合需要大量有活力的甘薯品种及近缘野生种的原生质体, 而且还需适合融合原生质体植株再生的培养体系。

前人的研究表明, 甘薯近缘野生种的叶柄和叶肉组织是分离和培养原生质体的理想供体, 并已经由 *I. triloba* 和 *I. lacunosa* 的叶柄原生质体以及 *I. trifida* 和 *I. cairica* 的叶肉原生质体获得了再生植株, 特别是实现了 *I. triloba* 原生质体的高频率植株再生 (Suga et al., 1990; Liu et al., 1991; 刘庆昌等, 1995; Guo et al., 2006)。

甘薯近缘野生种 *I. cordatotriloba* 具有抗甘薯茎线虫病的特性(曹清河等, 2009)。本研究在建立甘薯近缘野生种 *I. cordatotriloba* 叶柄组织培养植株再生体系的基础上, 成功地建立了 *I. cordatotriloba* 的叶柄原生质体植株再生体系, 实现了高频率的原生质体植株再生。这些研究结果为用体细胞杂交法将 *I. cordatotriloba* 的抗茎线虫病基因导入甘薯栽培种奠定了基础。

3 材料与方法

3.1 植物材料

以甘薯近缘野生种 *I. cordatotriloba* ($2n=2x=30$) 的离体培养植株作为实验材料, 离体培养植株的制备方法参照 Liu 等(1990)的方法。 *I. cordatotriloba* 的种子由江苏徐州甘薯研究中心提供。

3.2 甘薯近缘野生种 *I. cordatotriloba* 叶柄组织培养及植株再生

取离体培养3周的甘薯近缘野生种 *I. cordatotriloba* 的植株, 切下状态一致的叶柄, 在培

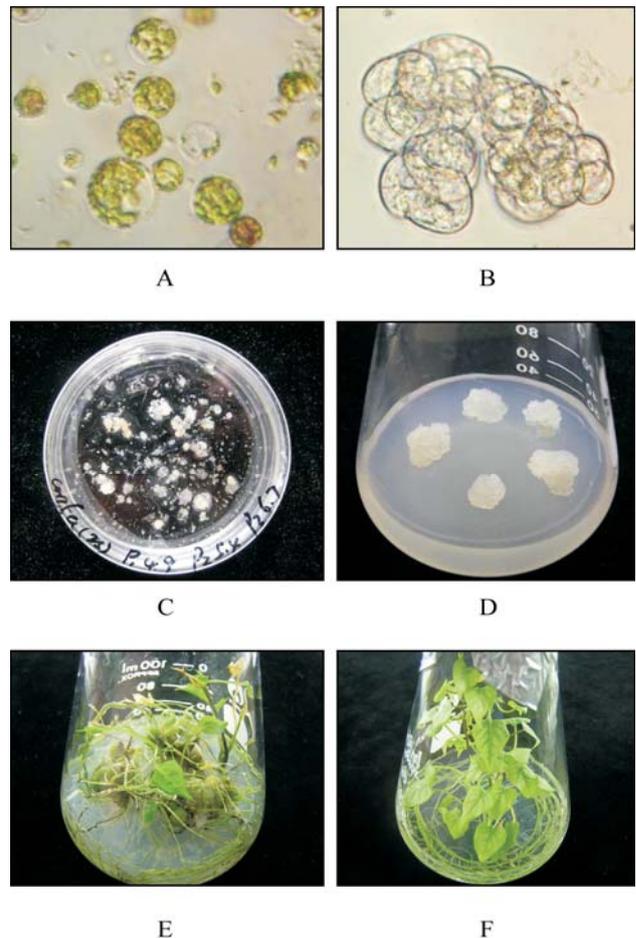


图2 *I. cordatotriloba* 的叶柄原生质体植株再生
注: A: 新鲜分离的原生质体; B: 培养4周后形成的小细胞团; C: 培养10周后形成的小愈伤组织; D: 快速增殖的愈伤组织; E: 从愈伤组织及不定根上再生的小植株; F: 在MS基本培养基上形成的完整植株

Figure 2 Plant regeneration from petiole protoplasts of *I. cordatotriloba*

Note: A: Freshly isolated petiole protoplasts; B: Colonies derived from protoplasts 4 weeks after plating; C: Small calluses derived from protoplasts 10 weeks after plating; D: Rapidly proliferating calluses; E: Plantlets regenerated from protoplast-derived calluses and their adventitious roots; F: Whole plants grown on MS basal medium

表2 不同分化培养基对 *I. cordatotriloba* 原生质体植株再生的影响

Table 2 Effects of different regeneration media on plant regeneration from protoplasts of *I. cordatotriloba*

IAA (mg/L)	BAP (mg/L)	培养愈伤组织数 No. of calluses cultured (A)	再生植株愈伤组织数 No. of calluses forming plants (B)	再生植株总数 No. of plants formed (C)	再生率 Frequency of regeneration A/B (%)
0	2.0	53	14	26	26.42
0.1	2.0	56	14	30	25.00
0.1	5.0	51	26	250	50.98

养皿上切成3~4 mm长的小段,接种在添加0.05 mg/L 2, 4-D 和 0.5 mg/L KT 的 MS 固体培养基上, 在 27±1℃下暗培养, 诱导愈伤组织的形成。

培养 3~4 周后, 将形成的愈伤组织转移到分别添加 0、0.1 mg/L IAA 和 1.0 mg/L、2.0 mg/L、5.0 mg/L BAP 的 6 种分化培养基上(表 1), 在 27±1℃、每日 13 h、3000 lux 光照下进行培养, 以诱导不定器官的分化。每种培养基上转移 50 个愈伤组织, 3 次重复。转移 4~6 周后, 将具有不定器官的愈伤组织进一步转移到 MS 基本培养基上, 在相同条件下培养, 诱导植株再生。用 SPSS 13.0 软件分析不同分化培养基对植株再生的效果。

3.3 甘薯近缘野生种 *I. cordatotriloba* 叶柄原生质体培养及植株再生

3.3.1 原生质体分离

根据 Liu 等(1991)的方法, 从甘薯近缘野生种 *I. cordatotriloba* 离体培养植株的叶柄分离原生质体。

3.3.2 原生质体培养及愈伤组织形成

将 *I. cordatotriloba* 的原生质体悬浮培养在含 2.5 mL 培养基 P₁ 的直径 60 mm 玻璃培养皿中, 原生质体的培养密度为 1~2×10⁴ 原生质体/mL。用 Parafilm 将培养皿密封, 放在 2±1℃的黑暗条件下, 采用液体浅层法进行静置培养。每隔 4 周, 将培养物依次转移到培养基 P₂ 和 P₃ 中, 在相同条件下进行培养, 以诱导原生质体形成细胞团和愈伤组织。

培养 10~12 周后, 将直径达 1~3 mm 的小愈伤组织转移到添加 0.05 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L KT 的 MS 固体培养基上进行培养, 使愈伤组织增殖, 培养条件为 27±1℃、黑暗。

3.3.3 植株再生

将增殖得到的愈伤组织转移到分别添加 2.0 mg/L BAP、0.1 mg/L IAA 和 2.0 mg/L BAP、0.1 mg/L IAA 和 5.0 mg/L BAP 的 3 种分化培养基上, 在 27±1℃、每日 13 h、3000 lux 光照下培养, 诱导愈伤组织的分化。在分化培养基上培养 4~6 周后, 将愈伤组织进一步转移到 MS 基本培养基上, 在相同条件下培养以诱导植株再生。用 SPSS 13.0 软件分析不同分化培养基对原生质体植株再生的效果。

作者贡献

关世凯是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 杨育峰和孙亚萍是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 翟红和何绍贞参与实验设计, 试验结果分析; 刘庆昌是论文的构

思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家甘薯产业技术体系(CARS-11)资助。

参考文献

- Cao Q.H., Zhang A., Li P., Li H.M., Xie Y.P., Li X.Y., Wang X and Ma D.F., 2009, Identification of the wild elite resistant resources and breeding of novel interspecies hybrids, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources)*, 10 (2): 224-229 (曹清河, 张安, 李鹏, 李洪民, 谢逸萍, 李秀英, 王欣, 马大夫, 2009, 甘薯近缘野生种的抗病性鉴定与新型种间杂种的获得, 植物遗传资源学报, 10 (2): 224-229)
- Guo J.M., Liu Q.C., Zhai H. and Wang Y.P., 2006, Regeneration of plants from *Ipomoea cairica* L. protoplasts and production of somatic hybrids between *I. cairica* L. and sweetpotato, *I. batatas* (L.) Lam., *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 87(3): 321-327
- Liu Q.C., 2004, Importance of sweetpotato in the security of food and energy in China, *Keji Daobao (Science & Technology Review)*, 9: 21-22 (刘庆昌, 2004, 甘薯在我国粮食和能源安全中的重要作用, 科技导报, 9: 21-22)
- Liu Q.C., Kokubu T., and Sato M., 1990, Plant regeneration in stem, petiole and leaf explant cultures of *Ipomoea triloba* L., *Japanese Journal of Breeding*, 40(3): 321-327
- Liu Q.C., Kokubu T., and Sato M., 1991, Plant regeneration from *Ipomoea triloba* L. protoplasts, *Japanese Journal of Breeding*, 41(1): 103-108
- Liu Q.C., Mi K.X., Zhou H.Y. Ma B. and Zhai H., 1998, Regeneration and identification of interspecific somatic hybrid plants between sweetpotato and *Ipomoea lacunosa*, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 24(5): 529-535 (刘庆昌, 米凯霞, 周海鹰, 马彪, 翟红, 1998, 甘薯和 *Ipomoea lacunosa* 的种间体细胞杂种植株再生及鉴定, 作物学报, 24(5): 529-535)
- Liu Q.C., Wang J.S., Kokubu T. and Sato M., 1995, Plant regeneration from petiole protoplasts of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its related species, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 21(1): 25-28 (刘庆昌, 王晶珊, 国分祯二, 佐藤宗治, 1995, 甘薯 (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) 及其近缘野生种原生质体的植株再生, 作物学报, 21(1): 25-28)
- Liu Q.C., Wang J.X., Li W.J. and Zhou H.Y., 1994, Protoplast fusion and regeneration of interspecific somatic hybrid plants between sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its related species, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao*

(Journal of Agricultural Biotechnology), 2(1): 85-90 (刘庆昌, 王家旭, 李惟基, 周海鹰, 1994, 甘薯及其近缘野生种的原生质体融合和种间体细胞杂种植株再生, 农业生物技术学报, 2(1): 85-90)

Suga R., Takagi Y. and Okutsu Y., 1990, Protoplast culture of sweetpotato and its related wild species-plant regeneration from leaf protoplasts-derived callus of *Ipomoea trifida*, Japan. J. Breed., 40 (Suppl.1): 78-79

Yang Y.F., Guan S.K., Zhai H., He S.Z., Liu Q.C., 2009, Development and evaluation of a storage root-bearing sweetpotato somatic hybrid between *Ipomoea batatas* (L.) Lam. and *I. triloba* L., Plant Cell Tissue Organ Cult., 99: 83-89

Zhang B.Y., Liu Q.C., Zhai H., Wang Y., and Zhang D.P., 2002, Production of fertile interspecific somatic hybrid plants between sweetpotato and its wild relative, *Ipomoea lacunosa*, Acta Horticulturae, 583: 81-85



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>