



武小娟, 吴娟, 王沛捷, 聂虎帅, 刘杰, 魏巍, 马艳红. 马铃薯‘华颂66号’遗传转化体系的建立[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(01): 21-30.
WU Xiaojuan, WU Juan, WANG Peijie, NIE Hushuai, LIU Jie, WEI Wei, MA Yanhong. Establishment of genetic transformation system for ‘Huasong 66’[J].
Journal of China Agricultural University, 2024, 29(01): 21-30.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.01.02

马铃薯‘华颂66号’遗传转化体系的建立

武小娟¹ 吴娟¹ 王沛捷¹ 聂虎帅¹ 刘杰² 魏巍³ 马艳红^{1*}

- (1. 内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010019;
2. 内蒙古华颂农业科技有限公司, 内蒙古 赤峰 025150;
3. 内蒙古田颂现代农业有限公司, 呼和浩特 010010)

摘要 为探究马铃薯的最佳遗传转化体系, 以紫色马铃薯‘华颂66号’无菌组培苗茎段为外植体, 用农杆菌介导法将含有植物沉默载体质粒pBWA(V)KS-miR8019转化马铃薯外植体, 测定不同预培养时间、不同激素组合及抗生素对马铃薯愈伤再生转化体系的影响。结果表明: 1) 茎段预培养时间为2 d时, 愈伤组织诱导率最高; 2) 最适的外植体愈伤组织诱导的培养基配方为: MS 干粉式培养基+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2, 4-D, 愈伤组织的诱导率为96.7%。最适愈伤组织分化的培养基为: MS 干粉式培养基+4.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃; 3) 植株再生及生根的抗生素最适筛选浓度为75 mg/L的卡那霉素; 4) 农杆菌抑制剂的最适浓度为300 mg/L的特美汀, 且在愈伤组织诱导、分化及生根阶段都需要加入。综上, 通过对农杆菌介导的愈伤再生转化过程中各个影响因素进行试验, 初步建立了马铃薯‘华颂66号’的遗传转化体系。

关键词 紫色马铃薯; 华颂66号; 农杆菌介导; 遗传转化体系

中图分类号

文章编号 1007-4333(2024)01-0021-10

文献标志码

Establishment of genetic transformation system for ‘Huasong 66’

WU Xiaojuan¹, WU Juan¹, WANG Peijie¹, NIE Hushuai¹, LIU Jie², WEI Wei³, MA Yanhong^{1*}

- (1. Agricultural College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China;
2. Inner Mongolia Huasong Agricultural Technology Co., Ltd., Chifeng 025150, China;
3. Inner Mongolia Tiansong Modern Agriculture Co., Ltd., Hohhot 010010, China)

Abstract In order to explore the optimal genetic transformation system for potatoes, the genetic transformation system of purple potato ‘Huasong 66’, using stem segments of plantlets *in vitro* as explants. Plant silencing vector plasmid pBWA (V) KS-miR8019 was used to investigate the effects of different pre-culture times, plant hormones and their ratios, selection concentrations, and antibiotics using *Agrobacterium tumefaciens* transformation method. The results indicate that: 1) The pre-culture time of stem segments was 2 d, and the callus induction rate was the highest. 2) The optimum callus induction medium was MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2, 4-D and the ratio of callus induction reached 96.7%. The optimum callus differentiation medium was MS +4.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃. 3) The optimum screening pressure for plants regeneration and rooting was 75 mg/L Kan. 4) The optimum concentration of agent for *Agrobacterium* bacteriostatic inhibition was 300 mg/L timentin, and the timentin

收稿日期: 2023-07-03

基金项目: 内蒙古自然科学基金(2022JQ06); 内蒙古农业大学基本科研业务费专项(BR22-11-16); 呼和浩特市科技计划项目(2022-农-10)

第一作者: 武小娟(0009-0001-9976-6107), 博士研究生, E-mail: wxj1017w@126.com

通讯作者: 马艳红(0000-0002-0581-4404), 教授, 主要从事作物遗传育种研究, E-mail: mayanhong80@126.com

was needed in callus induction, differentiation and rooting. In conclusion, the genetic transformation system of ‘Huasong 66’ was preliminarily established through studying the factors at each stage of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation, which would provide the certain basis for the development of potato molecular breeding.

Keywords purple potato; Huasong 66; *Agrobacterium*-mediated transformation; genetic transformation system

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)含有丰富的营养和膳食纤维,是中国乃至世界的主粮作物^[1]。而我国马铃薯品种不足、市场不规范、生产规模不大等因素在一定程度上影响了马铃薯的产量,实现粮食完全自给仍面临着严峻的挑战^[2]。培育优良马铃薯品种是马铃薯产业发展的基础。马铃薯育种技术主要有传统的育种技术和基因工程育种技术^[3]。马铃薯育种技术的提升对马铃薯新品种的选育具有重要意义。

马铃薯栽培种为同源四倍体,大多采用近缘种杂交的方式进行育种,在杂交遗传中性状分离极其复杂,结实率低、育种周期长^[4]。在长期种植情况下,马铃薯亲本材料的基因型存在高度的相似性,导致马铃薯的品质性状很难有突破^[4]。基因工程育种技术是直接 将外源基因导入植物体,可以定向创新改造,使育种目的性更加明确。

根癌农杆菌介导法是较常用的方法之一,且转化较稳定^[5],已广泛应用于水稻(*Oryza sativa*)^[6]、大豆(*Glycine max*)^[7]、小麦(*Triticum aestivum*)^[8]、马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)^[9-10]等。应用农杆菌介导法,成功将 *RPP13* 基因转入马铃薯‘民丰红’^[11]。通过根癌农杆菌 LBA4404 的介导,将 *AtNHX1* 基因导入马铃薯‘甘农薯 2 号’试管苗中^[12]。利用农杆菌介导的遗传转化方法,将 35s-StMKK1-pART27-RNAi 载体导入马铃薯‘Desiree’中,得到 7 株沉默的阳性马铃薯转基因植株^[13]。农杆菌介导的马铃薯遗传转化受各种因素的影响,如农杆菌浓度^[14]、外植体类型^[15]、激素配比^[16]、预培养时间^[17]、共培养时间^[18]等。马铃薯品种的遗传转化体系已被建立,但是不同马铃薯品种的遗传转化体系相对独立,如‘中薯 3 号’^[19]、‘东农 303’^[20]、‘并薯 6 号’、‘晋薯 16 号’等。马铃薯‘华颂 66 号’属于中晚熟品种,株型直立,长势强,块茎呈长卵圆型,薯皮薯肉为紫色,富含丰富的花青素。紫色马铃薯‘华颂 66 号’遗传转化体系的建立对彩色马铃薯品种的选育具有重要的意义。在基因工程育种中彩色马铃薯的遗传

转化体系鲜见报道。本研究以紫色马铃薯‘华颂 66 号’为研究材料,通过对遗传转化和再生过程中的外植体培养、植物激素和抑菌剂的种类及浓度、配比进行研究,建立紫色马铃薯‘华颂 66 号’农杆菌介导的遗传转化及再生体系,以期 为开展彩色马铃薯生物育种工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料

以‘华颂 66 号’的无菌组培苗为试验材料。组培苗由内蒙古华颂农业科技有限公司惠赠,由本课题组进行扩繁和保存。

1.1.2 农杆菌菌株和植物沉默载体

农杆菌类型为根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*),菌株为 GV3101。农杆菌中含有植物沉默载体 pBWA(V)KS-miR8019,载体的抗性为卡那霉素(图 1),由本课题组保存。Wu 等^[21]研究发现,miR8019 参与调控彩色马铃薯花青素生物合成。

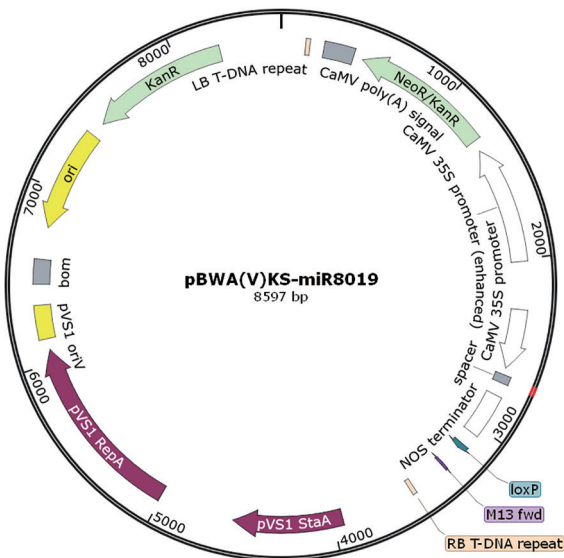


图 1 pBWA(V)KS-miR8019 载体
Fig. 1 pBWA(V)KS-miR8019 vector

1.2 试验方法

1.2.1 马铃薯组培苗的扩繁

剪取带有1个腋芽的无菌脱毒马铃薯‘华颂66号’的茎段(长约1~2 cm)为外植体,将其形态学下端插入到MS固体培养基(pH 5.8),每个培养瓶接30个茎段。将培养瓶置于组织培养间进行培养,培养条件为光照强度1 500 lx,温度25℃,光照周期为16 h/8 h(光照/黑暗)。待苗龄4周后,按照上述相同的方法进行扩繁培养。

1.2.2 农杆菌菌液的制备

取50 μL含有植物沉默载体pBWA(V)KS-miR8019的农杆菌菌液,稀释10倍,在含有50 mg/L卡那霉素(Kan)和20 mg/L利福平(Rif)的LB固体培养基上进行平板划线,28℃暗培养2 d。挑取单菌落,接种于含有50 mg/L(Kan)和20 mg/L(Rif)的液体LB培养基中。28℃,220转/min,过夜暗培

养至生长对数期。将培养好的农杆菌菌液于5 000转/min离心10 min,收集菌体沉淀物,用1/2 MS液体培养基重悬菌体至浓度为 $OD_{600}=0.5$,用于后续外植体的浸染。

1.2.3 外植体的预培养

取生长周期为4周的马铃薯无菌苗,剪取不带腋芽、长度为1 cm的马铃薯茎段,置于预培养培养基(表1),培养条件为光照强度1 500 lx,温度25℃,光照周期为16 h/8 h(光照/黑暗),预培养时间设置为0、1、2、3和4 d。

1.2.4 外植体的浸染和共培养

将预培养后的茎段置于 $OD_{600}=0.5$ 的农杆菌菌液中,28℃、220转/min振荡浸染10 min。浸染完成后,用灭菌滤纸吸干茎段上多余菌液。将茎段平铺于共培养培养基(表1)上,28℃,暗培养2 d。

表1 基本培养基
Table 1 Minimal medium

培养基 Medium	培养基成分 Medium composition	pH
LB 固体 Solid LB	10 g/L 氯化钠+10 g/L 胰蛋白胍+5 g/L 酵母提取物+15 g/L 琼脂	7.4
LB 液体 Liquid LB	10 g/L 氯化钠+10 g/L 胰蛋白胍+5 g/L 酵母提取物	7.4
1/2 MS 液体 1/2 Liquid MS	2.37 g/L MS 粉末 + 30 g/L 蔗糖	5.8
MS 固体 Solid MS	MS 干粉式培养基(购买于北京易生石木生物科技有限公司)	5.8
预培养 Pre-culture	MS 干粉式培养基+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D	5.8
共培养 Co-culture	MS 干粉式培养基+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D+100 μmol AS	5.8

1.2.5 愈伤诱导培养基的筛选

将共培养2 d的茎段转移到A1、A2、A3愈伤诱导培养基中(表2),每种愈伤诱导培养基接9个茎段,10次重复。将培养皿置于25℃,光强1 500 lx,光照/黑暗(16 h/8 h)条件下进行培养,4周后统计愈伤组织形成率。愈伤组织形成率=(愈伤组织形成数/外植体总数)×100%。

1.2.6 分化培养基的筛选

将上述得到的所有愈伤组织平均分布转接到B1、B2分化培养基中(表2),4周后统计愈伤组织分化率。愈伤组织分化率=(分化愈伤组织数/愈伤组织数)×100%。

1.2.7 抑菌抗生素的种类和浓度筛选

将共培养2 d的茎段置于含有不同抗生素种类及浓度的A1愈伤诱导培养基中。抗生素的种类为头孢霉素(Cefotaxime, Cef)和特美汀(Timentin,

表2 愈伤诱导及分化培养基
Table 2 Callus induction and differentiation medium

培养基 Medium	成分 Composition
A1	MS干粉式培养基+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D+0.4 KT ^[18]
A2	MS干粉式培养基+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D ^[22]
A3	MS干粉式培养基+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L GA ₃
B1	MS干粉式培养基+4.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L GA ₃ ^[22]
B2	MS干粉式培养基+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L GA ₃ +1.0 mg/L ZT ^[18]

注:A1、A2、A3为愈伤诱导培养基;B1、B2为分化培养基。
Note: A1, A2 and A3 are callus induction medium; B1 and B2 are differentiation medium.

TMT),浓度分别为100,200和300 mg/L。每组试验的茎段数为9个/培养皿,4次重复。将培养皿置于组培间光照强度1 500 lx,温度25℃,光照周期为16 h/8 h(光照/黑暗)下进行培养,15 d后统计观察抑菌情况。

1.2.8 不同卡那霉素浓度对再生苗生根的影响

为了筛选利于生根的最适卡那霉素(Kan)浓度,将野生型含有腋芽的马铃薯茎段扦插到含有0、50、75和100 mg/L Kan的MS培养基中进行培养,4周后统计生根率。

1.2.9 转基因马铃薯阳性植株的鉴定

使用天根生化科技公司的植物基因组DNA提取试剂盒(DP305)提取再生苗及‘华颂66号’组培苗总DNA。以pBWA(V)KS-miR8019成功转化农杆菌的菌液为阳性对照,‘华颂66号’野生型为阴性对照,ddH₂O为空白对照。PCR检测的特异性引物是35seq:5'-TTCATTTGGAGAGAACACGGGGGAC-3';NOSseq-R:5'-CAAGACCGGCAACAGGATTCAATC-3'。扩增体系为:PCR Mix 10 μL、DNA 1 μL、上游和下游引物各1 μL、ddH₂O 7 μL。反应程序为预变性95℃ 5 min;变性94℃ 30 s,退火59℃ 30 s,延伸72℃ 90 s,循环数为35;72℃ 10 min,4℃保存。反应结束后,用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,用紫外凝胶成像仪进行拍照。

2 结果与分析

2.1 最佳预培养时间的确定

由图2可知,预培养0和1 d的马铃薯‘华颂66号’茎段,易出现白化,导致死亡;预培养2 d的茎段可以较好的形成愈伤组织;预培养3、4 d的茎段,在

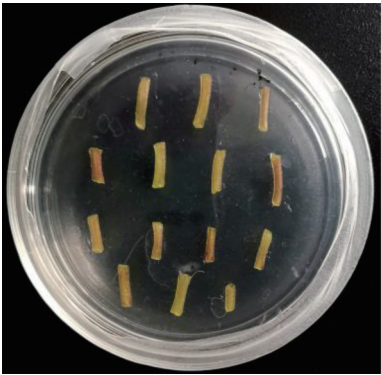


图2 马铃薯茎段的预培养
Fig. 2 Preculture of potato stem

转接到愈伤培养基中,容易受到农杆菌及外来杂菌的污染,不能形成愈伤组织,因此,马铃薯‘华颂66号’茎段的最佳预培养时间为2 d。

2.2 不同激素对愈伤诱导的影响

由图3可知,A1愈伤培养基中,愈伤组织从一端开始膨大分化,表面有紫色颗粒,有些茎段未开始分化愈伤,愈伤组织量较少,部分组织边缘褐变,愈伤组织形成率为72.2%;A2愈伤培养基中,愈伤组织从两端开始膨大分化,表面有紫色颗粒,愈伤组织量较多,组织边缘无褐变,愈伤组织形成率为96.7%;A3愈伤培养基中,愈伤组织从一端开始膨大分化,表面有紫色颗粒,有些茎段未开始分化愈伤,愈伤组织量较少,部分组织边缘褐变,愈伤组织形成率为60%(表3)。

2.3 分化培养基的确定

由图4可知,在B1分化培养基中,4.0 mg/L 6-BA、0.1 mg/L NAA、1.0 mg/L GA₃均可促进愈伤组织的分化,在愈伤组织的芽点处分化出带有叶

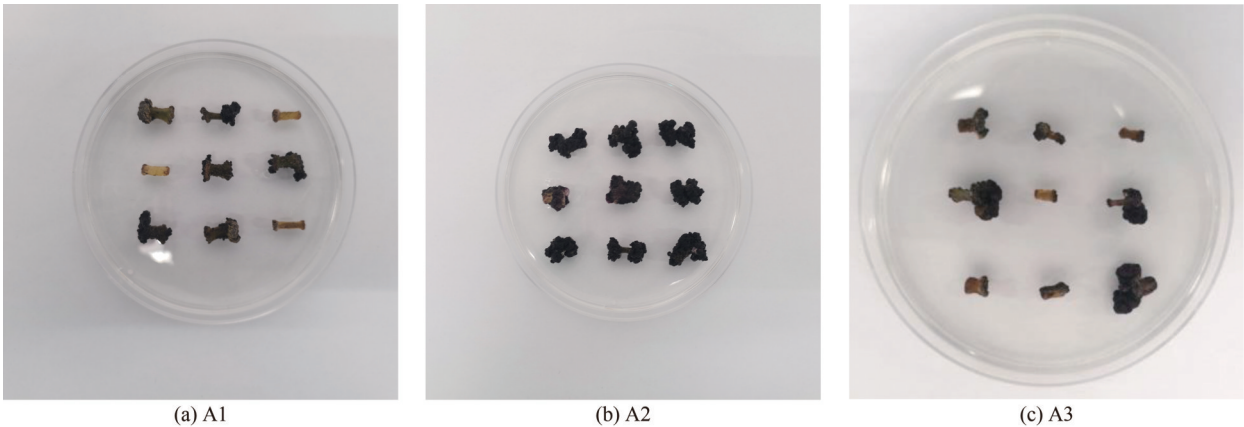


图 3 ‘华颂 66 号’茎段在不同愈伤培养基上的诱导情况

Fig. 3 Induction of stem segments of ‘Huasong 66’ on different callus media

表 3 不同培养基对愈伤组织形成的影响

Table 3 The effect of different media on callus formation

愈伤培养基 Callus medium	外植体数 Explants number	愈伤数 Callus number	诱导率/% Induction rate	愈伤组织形态 Callus morphology
A1	90	65	72.2	愈伤组织从一端开始膨大分化,表面有紫色颗粒,有些茎段未开始分化愈伤,愈伤组织量较少,部分组织边缘褐变
A2	90	87	96.7	愈伤组织从两端开始膨大分化,表面有紫色颗粒,愈伤组织量较多,组织边缘无褐变
A3	90	54	60.0	愈伤组织从一端开始膨大分化,表面有紫色颗粒,有些茎段未开始分化愈伤,愈伤组织量较少,部分组织边缘褐变

子的芽并从底部延伸出来,愈伤组织分化率为 98.9%;B2 分化培养基中,愈伤组织分化率为 84.4%。



图 4 ‘华颂 66’再生苗

Fig. 4 Regenerated seedlings of ‘Huasong 66’

2.4 抗生素的种类及浓度的确定

由图 5 可知,当选用的抑菌剂为头孢霉素

(Cef)时,浓度为 100、200 或 300 mg/L 都无法抑制农杆菌的生长,无法诱导外植体形成愈伤组织。当抑菌剂为 100 和 200 mg/L 特美汀(TMT)时,无法有效地抑制农杆菌的生长且还有其他杂菌污染;当特美汀的浓度为 300 mg/L 时,可以有效地抑制农杆菌的生长,可诱导外植体形成愈伤组织。因此,选用 300 mg/L 的特美汀可以有效抑菌。

2.5 不同卡那霉素浓度对再生苗生根的影响

由图 6 可知,当卡那霉素(Kan)的浓度为 0 和 50 mg/L 时,马铃薯茎、叶均可正常生长,也可以生根。当 75 mg/L Kan 时,马铃薯植株基本无法生根,底部叶片枯黄。当卡那霉素的浓度为 100 mg/L 时,马铃薯无法生根,并趋于死亡。因此,当卡那霉素的浓度为 75 mg/L 时,未转化的再生苗无法生根而死亡,转化的再生苗具有一定的抗性可以正常的生长。所以,75 mg/L 的卡那霉素可作为再生苗生根筛选浓度。

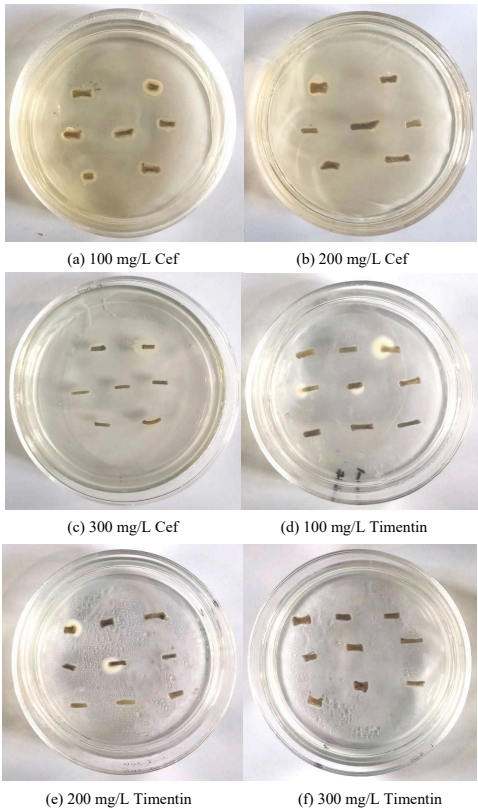


图5 不同浓度头孢霉素(Cef)和特美汀(Timentin)处理的马铃薯茎段的生长状况

Fig. 5 Growth status of potato stem under different concentrations of Cefotaxime and Timentin

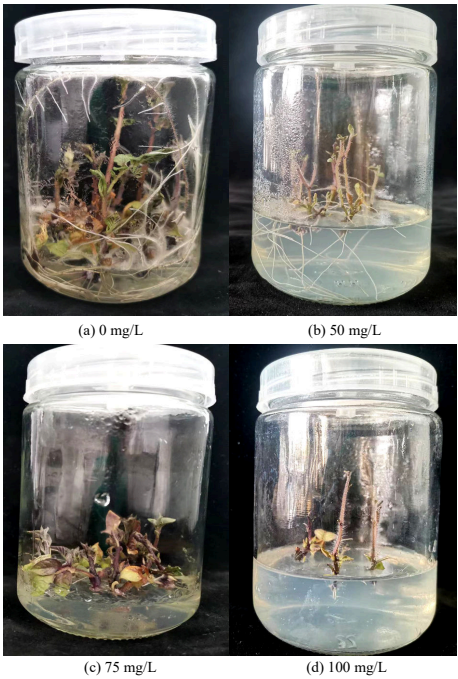
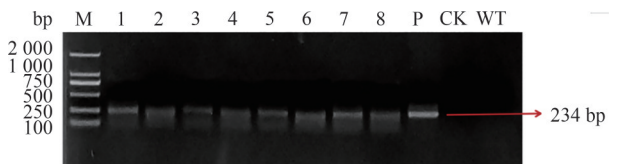


图6 不同浓度卡那霉素处理的再生苗生根的情况

Fig. 6 Rooting of regenerated seedlings treated with different concentrations of Kan

2.6 转基因马铃薯阳性检测

马铃薯茎段经过2 d的预培养、A2诱导形成愈伤组织和B1诱导愈伤组织分化及含有75 mg/L Kan的生根培养基生长,得到了8株‘华颂66号’的pBWA(V)KS-miR8019转基因再生植株。对再生植株进行PCR检测,PCR检测表明,1、2、5、6、7、8株系出现条带与目标条带234 bp吻合(图7);3、4的株系扩增条带暗淡模糊,可能为假阳性;而WT、CK均无条带,阳性转化率达75%。pBWA(V)KS-miR8019转基因株系与‘华颂66号’野生型相比,转基因株系茎为绿色,野生型茎为紫色。miR8019基因的沉默,使马铃薯植株中花青素的生物合成受到了抑制(图8),进一步说明pBWA(V)KS-miR8019已成功转到‘华颂66号’植株中。



M, D2000 DNA Marker; 1~8, 转基因马铃薯株系; WT, 阴性对照(野生型); CK, 空白对照(ddH₂O); P, 阳性对照(质粒pBWA(V)KS-miR8019)。

M, D2000 DNA Marker; 1-8, transgenic potato lines; WT, negative control (wild type); CK, blank control (ddH₂O); P, positive control (plasmid pBWA(V)KS-miR8019)。

图7 转基因马铃薯株系的PCR检测

Fig. 7 PCR detection of transgenic potato lines

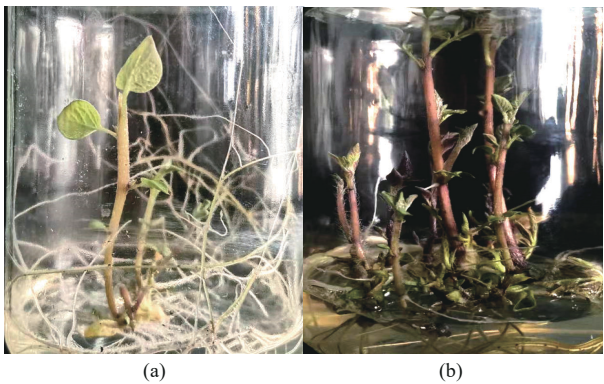


图8 转pBWA(V)KS-miR8019基因阳性植株(a)的与‘华颂66号’野生型(b)植株比较

Fig. 8 Comparison between transformed plant pBWA(V)KS-miR8019 (a) and wild-type plant of ‘Huasong 66’ (b)

3 讨 论

根癌农杆菌介导转化马铃薯具有简单、快速、高效等特点^[23]。影响马铃薯农杆菌介导的因素有很多,如农杆菌浓度、浸染时间及适当的再生体系等,还会受马铃薯品种、预培养时间、愈伤诱导及分化培养中抗生素种类及浓度的影响^[18]。建立紫色马铃薯‘华颂66号’的遗传转化体系,可以使外源基因高效转入,为后续开展彩色马铃薯的转基因工作提供参考。

合适的再生体系是马铃薯遗传转化的基础。常用的再生体系有茎段、叶片、试管薯等。‘Favorita’适合采用茎段转化体系,‘甘农薯2号’和‘Shepody’适合采用试管薯薄片进行转化^[24]。曹贞菊等^[15]研究发现‘黄金薯’微型薯、‘中薯8号’微型薯、‘中薯8号’无菌苗茎段和‘Desiree’无菌苗茎段为外植体,转化效率分别为13.3%、25.0%、15.4%、25.0%,用马铃薯茎段转化比马铃薯微型薯转化效率高,且污染率相对较低。用‘晋薯16号’无菌苗的叶片及无腋芽茎段为外植体进行愈伤组织和不定芽的诱导,结果表明愈伤组织诱导率分别为60%和25%^[25]。不同外植体类型对马铃薯的遗传转化效率有一定的影响,茎段作为外植体转化效率较高,所以本试验以‘华颂66号’无菌苗无腋芽茎段为外植体,进行农杆菌浸染转化。

外植体经过预培养后可以促进细胞分裂,更容易整合外源基因,从而提高外源基因遗传转化的效率^[26]。张西英等^[27]和闫建俊等^[17]研究发现马铃薯茎段最佳转化条件为外植体预培养2 d。马铃薯‘Desiree’的遗传转化体系中以茎段为外植体,预培养2 d后遗传转化率最高^[28]。因此,外植体预培养对马铃薯的遗传转化效率有一定的影响。本试验研究结果表明预培养0和1 d的马铃薯茎段易出现白化或褐化的现象,很难形成愈伤组织;预培养2 d的茎段可以较好地形成愈伤组织;预培养3、4 d的茎段转接到愈伤培养基中,污染率较高;因此,最佳预培养时间为2 d。

细胞分裂素和生长素的不同配比对马铃薯组织诱导分化和再生都有很大影响^[18],马铃薯‘春薯4号’最适愈伤组织诱导的培养基配方为MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+0.3 mg/L 2,4-D,愈伤组织诱导率为98.57%。最适愈伤组织分

化的培养基为MS+3.0 mg/L 6-BA+1.5 mg/L IAA+1.0 mg/L ZT^[29]。‘大西洋’‘春薯3号’‘春薯5号’‘吉薯1号’适合愈伤组织诱导培养基均为:MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D+0.4 mg/L KT,愈伤组织诱导率达100%^[30]。‘并薯6号’外植体愈伤组织诱导的培养基配方为MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D+0.4 mg/L KT,愈伤组织的诱导率为86.7%^[18]。马铃薯‘Favorita’茎段在愈伤培养基MS+1.0 mg/L IAA+0.2 mg/L GA₃+0.5 mg/L 6-BA上分别培养2、4、6 d后,再转入添加不同浓度6-BA+ZTR的芽诱培养基上,均可以100%产生愈伤组织^[31]。‘陇薯11号’的茎段愈伤诱导培养基为MS+7.5 mg/L GA₃+2.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D,愈伤组织诱导率达98.72%,生长状态最好;诱导芽分化的最佳培养基为MS+0.25 mg/L NAA+0.1 mg/L IAA+3.0 mg/L KT,不定芽诱导率为95.83%,分化苗健壮^[32]。‘夏坡蒂’和‘费乌瑞’的茎段最佳愈伤诱导组织培养基分别为MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L GA₃和MS+2.0 mg/L ZT+0.1 mg/L NAA+0.5 mg/L GA₃,愈伤率均可达到100%;‘夏坡蒂’不定芽最佳诱导培养基分别为MS+2.0 mg/L ZT+0.1 mg/L NAA+5.0 mg/L GA₃,诱导率分别为52.38%^[33]。方贯娜等^[34]研究表明愈伤诱导培养基中,2,4-D的诱导率最高,NAA次之,IAA最低;在分化培养基中,6BA+NAA比6BA+GA₃更利于芽的分化。本试验结果表明‘华颂66号’愈伤诱导最佳培养基为MS干粉培养基+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D,最佳分化培养基为MS干粉培养基+4.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃。适宜的抗生素种类和浓度可有效抑制共培养后农杆菌过度污染,保证转化植株正常生长。对农杆菌的抑制情况和转基因苗存活率有着显著影响^[35]。头孢霉素和特美汀是马铃薯转化中应用最多的抑菌剂^[35],潘映雪^[36]研究表明头孢霉素的有效抑菌浓度为150 mg/L,蒋继滨等^[37]研究表明200 mg/L的特美汀,能够有效抑制农杆菌。宋倩娜等^[18]研究表明特美汀的抑菌效果比头孢霉素的抑菌效果好,200 mg/L的特美汀可以有效抑制农杆菌,本试验也表明特美汀的抑菌效果比头孢霉素的抑菌效果好,300 mg/L的特美汀可以有效抑制农杆菌。

农杆菌介导的马铃薯愈伤再生转化体系已经比较成熟,并且在马铃薯分子育种中也得到了应用。但是对于不同基因型马铃薯遗传转化效率仍存在很大差异。不同基因型马铃薯遗传转化再生体系的建立是非常必要的。

4 结 论

本研究通过对紫色马铃薯品种‘华颂66号’遗传转化体系中各个阶段的影响因素进行分析,以马铃薯茎段为外植体,预培养时间为2 d;最适外植体愈伤组织诱导的培养基配方为:MS干粉式培养基+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D+300 mg/L 特美汀+75 mg/L 卡那霉素。最适愈伤组织分化的培养基为:MS干粉式培养基+4.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃+300 mg/L 特美汀+75 mg/L 卡那霉素;马铃薯‘华颂66号’的遗传转化效率约为75%。初步建立适合该马铃薯品种‘华颂66号’的遗传转化体系。

参考文献 References

- [1] 常贵蒋. 国家粮食安全战略转变与广西马铃薯产业发展应对[J]. 农业经济, 2020(5):3-5
Chang G J. The strategic transformation of national food security strategy and response to the development of potato industry in Guangxi [J]. *Agricultural Economy*, 2020(5):3-5 (in Chinese)
- [2] 王志文. 马铃薯育种现状与改良策略[J]. 种子科技, 2019, 37(18): 151-152
Wang Z W. Present situation and improvement strategy of potato breeding [J]. *Seed Science & Technology*, 2019, 37(18): 151-152 (in Chinese)
- [3] 徐建飞, 金黎平. 马铃薯遗传育种研究:现状与展望[J]. 中国农业科学, 2017, 50(6):990-1015
Xu J F, Jin L P. Advances and perspectives in research of potato genetics and breeding [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(6):990-1015 (in Chinese)
- [4] 郭天顺, 赵中梁. 马铃薯杂交育种实生苗高效培育技术[J]. 农业科技通讯, 2022(1):252-253
Guo T S, Zhao Z L. Efficient cultivation techniques of potato hybrid breeding of potato seedlings [J]. *Bulletin of Agricultural Science and Technology*, 2022(1):252-253 (in Chinese)
- [5] 殷丽丽, 邢宝龙, 刘飞, 王桂梅. 马铃薯育种方法及研究进展[J]. 农学学报, 2015, 5(12):9-13
Yin L L, Xing B L, Liu F, Wang G M. Research progress of breeding methods and status of potato [J]. *Journal of Agriculture*, 2015, 5(12):9-13 (in Chinese)
- [6] 陈思, 张从合, 王慧, 吴浩然, 杨力, 黄艳玲, 管昌红. 农杆菌介导水稻遗传转化的影响因素及应用研究进展[J]. 现代农业科技, 2023(5):1-4,8
Chen S, Zhang C H, Wang H, Wu H R, Yang L, Huang Y L, Guan C H. Research progress on influencing factors of Agrobacterium-mediated genetic transformation of rice and its application [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2023(5):1-4,8 (in Chinese)
- [7] 石森, 韩晗, 陈玥, 刘涵玉, 林姝含, 丁晓月, 闵非, 金太成, 杨丽萍. 农杆菌介导大豆遗传转化新技术的建立及优化[J]. 分子植物育种, 2023, 21(16):5295-5300
Shi M, Han H, Chen Y, Liu H Y, Lin S H, Ding X Y, Min F, Jin T C, Yang L P. Establishment and optimization of new technology of Agrobacterium-mediated soybean genetic transformation [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(16):5295-5300 (in Chinese)
- [8] 高荧. 农杆菌介导小麦幼胚愈伤组织转化体系的建立[D]. 泰安:山东农业大学, 2022
Gao Y. Establishment of Agrobacterium-mediated transformation system for wheat embryo callus [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2022 (in Chinese)
- [9] 杨永智. 农杆菌介导法马铃薯遗传转化体系的优化[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(4):738-742
Yang Y Z. Optimization of agrobacterium tumefaciens mediated potato transformation system [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 29(4):738-742 (in Chinese)
- [10] Soliman H I A. Molecular cloning of sucrose isomerase gene and agrobacterium-mediated genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum* L) plants [J]. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2018, 3(3):864-874
- [11] 公鑫, 王业红, 张剑峰, 迟胜起. 马铃薯 RPP13 基因 RNAi 载体的构建及遗传转化[J]. 华北农学报, 2023, 38(1):178-183
Gong X, Wang Y H, Zhang J F, Chi S Q. Construction and genetic transformation of RNAi vector of potato RPP13 gene [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2023, 38(1):178-183 (in Chinese)
- [12] 王丽, 杨宏羽, 张俊莲, 王蒂. 根癌农杆菌介导马铃薯试管薯转化体系的优化及 AtNHX1 基因的导入[J]. 西北植物学报, 2008, 28(6):1088-1094
Wang L, Yang H Y, Zhang J L, Wang D. Optimization of transformation conditions of potato by Agrobacterium tumefaciens and introduction of AtNHX1 Gene [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2008, 28(6):1088-1094 (in Chinese)
- [13] 陈小康, 李芳芳, 王文斌, 单卫星, 杜羽. 马铃薯 StMKK1 基因 RNAi 干扰载体的构建及遗传转化[J]. 西北农业学报, 2020, 29(12):1822-1830
Chen X K, Li F F, Wang W B, Shan W X, Du Y. Construction of RNA interference vector to silence StMKK1 in potato and development of StMKK1-silenced transgenic potato lines [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2020, 29(12):1822-1830 (in Chinese)
- [14] 李颖, 鞠斯羽, 魏健. 农杆菌介导的大豆遗传转化体系研究进展[J]. 农业与技术, 2022, 42(17):27-30
Li Y, Ju S Y, Wei J. Research progress of Agrobacterium-mediated soybean genetic transformation system [J]. *Agriculture and Technology*, 2022, 42(17):27-30 (in Chinese)
- [15] 曹贞菊, 李飞, 陈明俊, 罗小波, 李标, 尹旺. 农杆菌介导几种不同马铃薯外植体转化研究[J]. 种子, 2021, 40(9):52-56
Cao Z J, Li F, Chen M J, Luo X B, Li B, Yin W. Study on Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of several potato

- explants[J]. *Seed*, 2021, 40(9):52-56 (in Chinese)
- [16] 杨永智. 农杆菌介导法马铃薯遗传转化体系的优化[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(4):738-742
- Yang Y Z. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens* mediated potato transformation system [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 29(4): 738-742 (in Chinese)
- [17] 闫建俊, 白云凤, 张忠梁, 冯瑞云, 张耀, 张维锋. 根癌农杆菌介导的马铃薯遗传转化的一些影响因素[J]. 山西农业科学, 2013, 41(6):532-534
- Yan J J, Bai Y F, Zhang Z L, Feng R Y, Zhang Y, Zhang W F. Influencing factors to potato transformation mediated by *Agrobacterium* [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2013, 41(6):532-534 (in Chinese)
- [18] 宋倩娜, 梅超, 霍利光, 王慧杰, 冯瑞云. 马铃薯品种‘并薯6号’遗传转化体系的建立[J]. 中国马铃薯, 2021, 35(5):385-396
- Song Q N, Mei C, Huo L G, Wang H J, Feng R Y. Establishment of genetic transformation system for potato variety ‘Bingshu 6’ [J]. *Chinese Potato Journal*, 2021, 35(5):385-396 (in Chinese)
- [19] 崔少彬. 农杆菌介导 ODREB2B 基因转化中薯3号的研究[J]. 作物杂志, 2013(6):46-49, 157
- Cui S B. Studies on *Agrobacterium*-mediated transformation of potato variety zhongshu No. 3 with ODREB2B Gene [J]. *Crops*, 2013(6): 46-49+157 (in Chinese)
- [20] 高亚迪. 农杆菌介导的 P5CS 基因转化东农303马铃薯的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010
- Gao Y D. Transformation of dongnong 303 potato with p5cs gene mediated by *agrobacterium tumefaciens* [D]. Harbing: Northeast Forestry University, 2010 (in Chinese)
- [21] Wu X J, Ma Y H, Wu J, Wang P J, Zhang Z C, Xie R, Liu J, Fan B B, Wei W, Nie L Z, Liu X T. Identification of microRNAs and their target genes related to the accumulation of anthocyanin in purple potato tubers (*Solanum tuberosum*) [J]. *Plant Direct*, 2022, 6(7):1-22
- [22] 罗源, 陈耀锋, 李春莲, 余玲, 任慧莉, 李映梅. 马铃薯茎段愈伤组织培养体系的优化[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(10):159-162
- Luo Y, Chen Y F, Li C L, Yu L, Ren H L, Li Y M. Optimizing for callus tissue culture system for the stem of *Solanum tuberosum* [J]. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2007, 35(10):159-162 (in Chinese)
- [23] 朱英, 刘永翔, 黄永会, 邱初, 刘作易. 根癌农杆菌介导转化马铃薯研究[J]. 种子, 2013, 32(8):42-44
- Zhu Y, Liu Y X, Huang Y H, Qiu R, Liu Z Y. Study on *agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of potato [J]. *Seed*, 2013, 32(8): 42-44 (in Chinese)
- [24] 康霞, 徐刚, 王玉萍. 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的马铃薯高效遗传转化体系筛选及优化[J]. 中国沙漠, 2016, 36(1):225-231
- Kang X, Xu G, Wang Y P. Screening and optimization *Agrobacterium tumefaciens*-mediated potato genetic transformation system [J]. *Journal of Desert Research*, 2016, 36(1):225-231 (in Chinese)
- [25] 牛琦瑜. 马铃薯晋薯16号再生体系建立及遗传转化研究[D]. 太原: 山西大学, 2021
- Niu Y Q. Establishment of regeneration system and genetic transformation of potato Jinshu 16 [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2021 (in Chinese)
- [26] 李猷, 尹蕾, 唐凯悦, 律凤霞. 外植体预培养时间对番茄外源基因转化的影响[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(17):4208-4210
- Li Y, Yin L, Tang K Y, Lu F X. Effects of pre-culture time of explants on the exogenous gene transformation in tomato [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2014, 53(17):4208-4210 (in Chinese)
- [27] 张西英, 张爱萍, 刘江娜. 马铃薯遗传转化体系的优化建立及其主要影响因素[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(7):3174-3179
- Zhang X Y, Zhang A P, Liu J N. Optimization establishment of the genetic transformation system of potato and its main influencing factors [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(7): 3174-3179 (in Chinese)
- [28] 辛翠花, 郭江波, 黄三文, 屈冬玉. 马铃薯 Desiree 遗传转化体系的优化及转基因植株的获得[J]. 中国蔬菜, 2011(6):15-21.
- Xin C H, Guo J B, Huang S W, Qu D Y. Optimization of genetic transformation system for potato variety ‘desireeand’ obtainment of transgenic lines [J]. *China Vegetables*, 2011(6):15-21 (in Chinese)
- [29] 李传龙, 李楠, 朱旭, 郝东云, 贺红霞. 马铃薯地方主栽品种“春薯4号”遗传转化体系的建立[J]. 吉林农业大学学报, 2021, 43(3):289-296
- Li C L, Li N, Zhu X, Hao D Y, He H X. Establishment of genetic transformation system of a main local potato cultivar Chunshu 4 [J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2021, 43(3):289-296 (in Chinese)
- [30] 杨明贺. 吉林省四种马铃薯再生体系和‘春薯3号’遗传转化条件的初探[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019
- Yang M H. Regeneration and biotransformation of 4 Jilin provincially elite potato cultivars [D]. Changchun: Jilin Agriculture University, 2019 (in Chinese)
- [31] 闫婷婷, 贺媛, 高茜, 白颖, 李怡, 赵永秀. 马铃薯品种 Favorita 再生体系的优化[J]. 分子植物育种, 2017, 15(8):3057-3062
- Yan T T, He Y, Gao Q, Bai Y, Li Y, Zhao Y X. Optimization of regeneration system from potato variety favorita [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(8):3057-3062 (in Chinese)
- [32] 陈晓艳, 孟亚雄, 贾小霞, 张武, 刘石, 郭玉美, 齐恩芳. 马铃薯品种‘陇薯11号’再生体系的构建[J]. 中国马铃薯, 2016, 30(2):65-69
- Chen X Y, Meng Y X, Jia X X, Zhang W, Liu S, Guo Y M, Qi E F. Construction of regeneration system for potato variety ‘Longshu 11’ [J]. *Chinese Potato Journal*, 2016, 30(2):65-69 (in Chinese)
- [33] 邱初, 陶刚, 朱英, 黄永会, 程仪琳, 刘作易. 马铃薯品种茎段愈伤组织诱导和植株再生的研究[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(10):11-13
- Qiu R, Tao G, Zhu Y, Huang Y H, Cheng Y L, Liu Z Y. Study on callus induction and plantlet regeneration from stem explants of two potato varieties [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2009, 37(10): 11-13 (in Chinese)
- [34] 方贯娜, 庞淑敏. 马铃薯愈伤组织再生体系的研究进展[J]. 中国马铃薯, 2012, 26(5):307-310
- Fang G N, Pang S M. Research progress on callus regeneration system of potato [J]. *Chinese Potato Journal*, 2012, 26(5):307-310 (in Chinese)
- [35] 张丽, 宋玉霞, 巩樵, 颜瑞霞, 甘晓燕, 石磊, 聂峰杰, 陈虞超, 张国辉. 农杆菌介导的马铃薯转化研究进展[J]. 分子植物育种, 2015, 13(7):1660-1667
- Zhang L, Song Y X, Gong L, Xie R X, Gan X Y, Shi L, Nie F J, Chen Y C, Zhang G H. Progress on genetic transformation of potato mediated

- by agrobacterium [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(7): 1660-1667 (in Chinese)
- [36] 潘映雪. 农杆菌介导BDN1基因转化马铃薯抗旱性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013
- Pan Y X. Study on drought resistance of potato transformed by BDN1 gene mediated by agrobacterium tumefaciens [D]. Haerbin: Northeast Agricultural University, 2013 (in Chinese)
- [37] 蒋继滨, 高冬丽, 朱曦鉴, 李灿辉. 二倍体马铃薯基因编辑载体快速验证体系的建立[J]. 种子, 2019, 38(10): 29-33
- Jiang J B, Gao D L, Zhu X J, Li C H. Establishment of A rapid verification system for diploid potato gene editing vector [J]. *Seed*, 2019, 38(10): 29-33 (in Chinese)

责任编辑: 吕晓梅



第一作者简介: 武小娟, 博士研究生, 现就读于内蒙古农业大学农学院作物学专业。参与课题: 内蒙古自然科学基金(2022JQ06)。在《植物遗传资源学报》《分子植物育种》、*Frontiers in Plant Science* 发表论文3篇。获得2022年内蒙古农业大学博士研究生国家奖学金。



通讯作者简介: 马艳红, 内蒙古农业大学农学院教授, 作物学一级学科作物遗传育种二级学科博士研究生导师。主要研究领域: 作物抗逆、品质性状调控机制研究及新品种选育。先后获内蒙古自治区科技进步一等奖、内蒙古自治区农牧业丰收一等奖、内蒙古自治区教学成果二等奖等, 获内蒙古自治区“草原英才”创新团队带头人、“321”人才、内蒙古自治区优秀指导教师等称号。先后主持多项国家自然科学基金、内蒙古自然科学基金杰出青年基金等各类科研项目, 参加育成作物品种8个, 以通讯作者或第一作者在等国内外专业期刊发表研究论文30余篇, 参编专著3部。