

## 甘薯 (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) 及其 近缘野生种原生质体的植株再生\*

刘庆昌

(北京农业大学, 北京, 100094)

王晶珊

国分祯二

佐藤宗治

(日本鹿儿岛大学农学部)

**提 要** 对甘薯品种高系 14 号及其近缘野生种 *I. triloba* L. 和 *I. lacunosa* L. 进行原生质体植株再生研究。从离体培养植株的叶柄分离出原生质体, 将其培养在含有 0.05 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L 激动素 (KT) 的 MS 培养基中, 从原生质体获得了高频率的愈伤组织。培养 8-12 周后, 将直径达 2-3 mm 的小愈伤组织转移到添加 0.05 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上。转移 3-6 周后, 将愈伤组织进一步转移到添加吲哚乙酸 (IAA) 和 6-苄基嘌呤 (BAP) 的 MS 培养基上, 一些愈伤组织再生出植株。未再生植株的愈伤组织进一步在 MS 基本培养基上培养, 它们也再生出植株。本研究从 *I. triloba* 原生质体获得高频率的植株再生; 首次从 *I. lacunosa* 原生质体再生出植株; 从高系 14 号原生质体也再生出完整植株。

**关键词** 甘薯; *I. triloba*; *I. lacunosa*; 原生质体培养; 植株再生

甘薯 (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) 是甘薯属的一个重要栽培种, 属于甘薯组 (Section *Batatas*)。Teramura<sup>[8]</sup>根据种间的杂交亲和性将甘薯组的种分为第 I 群和第 II 群。第 I 群诸种同甘薯杂交亲和, 而第 II 群诸种同甘薯杂交不亲和。属于第 I 群的 6 倍体近缘野生种 *I. trifida* 用于甘薯育种, 已选育出高产、高淀粉和抗线虫病的新品种<sup>[2]</sup>。由于第 II 群诸种同甘薯杂交不亲和, 故尚未被用于甘薯育种。近年为了克服这种杂交不亲和性, 体细胞杂交的应用已引起广泛重视。这种方法一旦应用成功, 将为甘薯育种打开广阔的前景。它的成功应用, 关键在于能否由融合原生质体再生出体细胞杂种植株。因此, 研究甘薯及其近缘野生种原生质体的植株再生是非常重要的。

关于甘薯及其近缘野生种原生质体植株再生的报道极少。Murata 等<sup>[6]</sup>及 Sihachakr 和 Ducreux<sup>[7]</sup>首次报道了甘薯原生质体的植株再生, 但再生频率极低。须贺等<sup>[1]</sup>从第 I 群的二倍体近缘野生种 *I. trifida* 原生质体获得了低频率的植株再生。高系 14 号是日本最主要的食用品种, *I. triloba* 和 *I. lacunosa* 属于第 II 群。Liu 等<sup>[4,5]</sup>曾报道过高系 14 号和 *I. triloba* 原生质体的植株再生, 但仅从高系 14 号原生质体获得一株再生植株, *I. triloba* 原生质体的植株再生率也不很高。对 *I. lacunosa* 的原生质体培养, 尚未见报道。本研究实现了 *I. triloba* 原生质体的高频率植株再生; 首次从 *I. lacunosa* 原生质体获得再生植株; 并从高系 14 号原生质体获得 6 株再生植株。

\* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 1993-04-20, 终审完毕日期: 1994-01-11

## 1 材料和方法

**1.1 实验材料** 供试材料为甘薯品种高系 14 号及近缘野生种 *I. triloba* 和 *I. lacunosa*。用其离体培养植株的叶柄分离原生质体。高系 14 号的离体培养植株为由茎尖培养而获得的无病毒植株；*I. triloba* 的离体培养植株为由组织培养而获得的再生植株<sup>[3]</sup>；*I. lacunosa* 的离体培养植株来自无菌种子培养。

**1.2 原生质体分离** 根据 Liu 等<sup>[4]</sup>的方法，从高系 14 号、*I. triloba* 和 *I. lacunosa* 的离体培养植株的叶柄分离得到大量原生质体。

**1.3 原生质体培养与愈伤组织形成** 用含有  $\frac{1}{2}$ MS 无机盐（不加  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ）、MS 维生素类、50.0 mg/L 酪蛋白水解产物、0.6M 甘露醇、0.05 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L KKT 和 1.0% 蔗糖的改良 MS 培养基（pH5.8），培养原生质体。培养条件为 27°C、黑暗。3—4 周后，将培养基的甘露醇浓度降至 0.3 M，蔗糖浓度增至 2.0%，培养条件不变。培养 6—8 周后，将形成的小愈伤组织转入含有 0.05 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L KKT 和 3.0% 蔗糖的 MS 培养基中，在上述条件下继续培养。培养 8—12 周后，将直径达 2—3 mm 的小愈伤组织转移到添加 0.05 mg/L 2,4-D、3.0% 蔗糖和 0.8% 琼脂的 MS 培养基（增殖培养基）上，在 27 ± 1°C、黑暗下培养 3—6 周，使其迅速生长。

**1.4 植株再生** 将得到的愈伤组织转移到添加 0—0.2 mg/L IAA 和 1.0—3.0 mg/L BAP 的 MS 培养基（再生培养基）上，在 3000 lux、每日 13 h 光照、27 ± 1°C 下培养 6 周。此时，一些愈伤组织再生出植株。将在再生培养基上未再生出植株的愈伤组织转移到 MS 基本培养基上，在同样条件下培养 5—6 周，此时又有愈伤组织再生植株。在高湿条件下，将再生植株移栽到含有蛭石的钵中，使其驯化成熟。

## 2 结果和讨论

**2.1 原生质体培养与愈伤组织形成** 从高系 14 号、*I. triloba* 和 *I. lacunosa* 的离体培养植株的叶柄分离出大量原生质体，并将它们在改良 MS 培养基中培养（图版 I，1）。2—4 天后，原生质体发生第一次细胞分裂（图版 I，2），而后细胞迅速分裂、生长（图版 I，3、4）。培养 2 周后，原生质体植板效率高达 50—60%，此时高系 14 号、*I. triloba* 和 *I. lacunosa* 之间没有显著差异。但在细胞团或小愈伤组织的生长速度上，存在着基因型差异。为获得直径达 2—3 mm 的小愈伤组织（图版 I，5），高系 14 号仅需培养 8 周，而 *I. triloba* 和 *I. lacunosa* 则需培养 12 周左右。从三者的原生质体均培养出高频率的愈伤组织。将直径达 2—3 mm 的小愈伤组织转移到添加 0.05 mg/L 2,4-D 的增殖培养基上，愈伤组织迅速生长（图版 I，6）。高系 14 号的愈伤组织稍硬、淡黄色，6 周后将其转移到再生培养基上；而 *I. triloba* 和 *I. lacunosa* 的愈伤组织松脆、白色，3—4 周后将其转移到再生培养基上。

**2.2 植株再生** 将上述愈伤组织转移到添加 IAA 和 BAP 的再生培养基上，2 周后观察到不定根开始形成。约 4 周后，*I. triloba* 的愈伤组织开始再生不定芽，后发育成植株（表 1）。从高系 14 号和 *I. lacunosa* 的愈伤组织未观察到不定芽的分化或植株再生（表 1）。在所有分化培养基上，高系 14 号、*I. triloba* 和 *I. lacunosa* 的不定根形成率几乎都达到 100%。

将再生培养基上未再生植株的愈伤组织转移到 MS 基本培养基上，不定根继续生长。

转移后约 1 周, *I. triloba* 的愈伤组织即开始再生植株 (图版 II, 9)。转移约 5 周后, 从高系 14 号和 *I. lacunosa* 的愈伤组织上也观察到植株再生 (图版 II, 7、8)。

将本研究中由原生质体再生植株的结果列于表 1。从表 1 可以看出, 基因型不同, 再生能力也不同。在所使用的 3 个基因型中, 以 *I. triloba* 的再生能力最高, 在再生培养基上即由原生质体诱导的愈伤组织再生出较多植株, 将未再生植株的愈伤组织转移到 MS 基本培养基上, 也获得大量再生植株, 总再生率高达 62.0%; 而高系 14 号和 *I. lacunosa* 原生质体诱导的愈伤组织则在再生培养基上根本不能再生植株, 只有在转移到 MS 基本培养基上之后才再生出少量植株, 再生率分别为 6.0% 和 4.5%。

表 1 甘薯及其近缘野生种原生质体诱导的愈伤组织植株再生  
Table 1 Plant regeneration from protoplast-derived callus of sweet potato and its related species

基因型 Genotype	再生培养基 Regeneration medium		转移愈伤组织数 No. of callus transferred	再生植株的愈伤组织数		Callus producing plants		总再生率 Total %
	IAA (mg/L)	BAP (mg/L)		在再生培养基上 On regeneration medium		在基本培养基上 On basal medium		
			No.	%	No.	%		
高系 14 号	0	1.0	35	0	0	1(1)*	2.9	2.9
Kokei 14	0.2	1.0	50	0	0	3(5)	6.0	6.0
	0	3.0	27	0	0	0	0	0
<i>I. triloba</i>	0.2	3.0	50	0	0	0	0	0
	0	1.0	50	7	14.0	3	6.0	20.0
	0.2	1.0	49	3	6.1	21	42.9	49.0
<i>I. lacunosa</i>	0	3.0	50	9	18.0	22	44.0	62.0
	0.2	3.0	48	2	4.2	15	31.3	35.4
	0	1.0	22	0	0	1(1)	4.5	4.5
	0.2	1.0	25	0	0	0	0	0
	0	3.0	56	0	0	2(10)	3.6	3.6
	0.2	3.0	40	0	0	0	0	0

\* 括号中的数字表示再生植株数

\* Figures in parentheses indicate number of regenerated plants.

从表 1 还可看出, 不同基因型所需植物生长调节物质的最适浓度也不同。在高系 14 号中, 在添加 0—0.2 mg/L IAA 和 1.0 mg/L BAP 的再生培养基上培养过的 4 个愈伤组织共再生出 6 株再生植株; 在 *I. triloba* 中, 在所有再生培养基上培养过的愈伤组织都表现出高的植株再生率, 其中以添加 3.0 mg/L BAP 为最高, 再生率高达 62.0%, 这一再生率不仅在甘薯及其近缘野生种原生质体培养中从未有过, 而且在其他植物的原生质体培养中也极少, 并且, 每个愈伤组织再生植株的数量不等, 少者只有 1—2 株, 多者则达 20 多株, 但以 5—6 株为常见; 在 *I. lacunosa* 中, 从在添加 1.0—3.0 mg/L BAP 的再生培养基上培养过的 3 个愈伤组织共获得 11 株再生植株, 这是 *I. lacunosa* 原生质体植株再生的首次报道。因此, 再生培养基的 IAA 和 BAP 的浓度影响着原生质体的植株再生, 对于 *I. triloba* 和 *I. lacunosa*, 仅添加 3.0 mg/L BAP 最适, 而对于高系 14 号, 以较低的 BAP 浓度为宜。

本研究从 *I. triloba* 原生质体获得了比 Liu 等<sup>[4]</sup>的研究高得多的植株再生率, 我们认为这主要由于增殖培养基中 2,4-D 浓度的影响。在本研究中增殖培养基的 2,4-D 浓度为 0.05 mg/L, 而在 Liu 等<sup>[4]</sup>的研究中则为 0.2 mg/L。另外, 在高系 14 号和 *I. lacunosa* 中, 本研究

除对增殖培养基中 0.05 mg/L 2,4-D 进行试验外,同时对 0.2 mg/L 2,4-D 也进行了试验,在添加 0.2 mg/L 2,4-D 时,仅观察到不定根的形成,未观察到植株再生。因此,认为增殖培养基中 2,4-D 的浓度显著影响植株再生,低浓度的 2,4-D 有利于原生质体的植株再生。

**2.3 再生植株的驯化** 将再生植株移栽到含有蛭石的钵中,在高湿度条件下,它们容易成活并发育成成熟植株(图版 II, 10)。

### 参 考 文 献

- 1 须贺立夫等, 1990, 育种学杂志, 第 40 卷(别 1), 78—79.
- 2 Kobayashi, M., 1978, Trop. Agr. Res. Ser., 11, 1—8.
- 3 Liu, Q.C., et al., 1990, Japan. J. Breed., 40, 321—327.
- 4 Liu, Q.C., et al., 1991, Japan. J. Breed., 41, 103—108.
- 5 Liu, Q.C., et al., 1992, Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ., 28, 47—53.
- 6 Murata, T., et al., 1987, Japan. J. Breed., 37, 291—298.
- 7 Sihachakr, D., G., Ducreux, 1987, Plant Cell Rep., 6, 326—328.
- 8 Teramura, T., 1979, Mem. Cell. Agr. Kyoto Univ., 114, 29—48.

## Plant Regeneration From Petiole Protoplasts of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and Its Related Species

Liu Qingchang

(Beijing Agricultural University, Beijing, 100094)

Wang Jingshan Kokubu Teiji Sato Muneharu

(Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Japan)

**Abstract** Plant regeneration from protoplasts of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cv. Kokei 14 and its related species, *I. triloba* L. and *I. lacunosa* L., was studied. Protoplasts isolated from petioles of in vitro grown plants were cultured in a modified MS medium containing 0.05 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 0.5 mg/L kinetin (KT). High frequency callus formation from protoplasts was achieved. Eight to 12 weeks after plating, protoplast-derived calli up to 2—3 mm in diameter were transferred onto MS medium supplemented with 0.05 mg/L 2,4-D and cultured for 3 to 6 weeks. When the obtained calli were further transferred onto MS medium supplemented with 3-indoleacetic acid (IAA) and 6-benzylaminopurine (BAP), some of them regenerated plants. The remaining non-shoot forming calli were further cultured on MS basal medium and regenerated plants. In this study, *I. triloba* protoplasts gave a very high regeneration frequency. Plant regeneration from *I. lacunosa* protoplasts was reported for the first time. Whole plants were also regenerated directly from Kokei No.14 protoplasts.

**Key words** *Ipomoea batatas*; *I. triloba*; *I. lacunosa*; Protoplast culture; Plant regeneration