

石 虎, 杨永智, 周 云, 等. 马铃薯新品种青薯 9 号高效再生体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 14-19.

马铃薯新品种青薯 9 号高效再生体系的建立

石 虎¹, 杨永智^{2,3,4}, 周 云^{2,3,4}, 龚 磊¹, 王 舰^{2,3,4}

(1. 青海大学, 青海西宁 810016; 2. 青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室培育基地, 青海西宁 810016;

3. 青海省农林科学院, 青海西宁 810016; 4. 教育部青藏高原生物技术重点实验室, 青海西宁 810016)

摘要: 为了建立马铃薯新品种青薯 9 号的遗传转化体系, 以青薯 9 号无菌苗为材料, 通过对其茎段和叶片再生体系的筛选, 优化了培养基添加的最佳植物激素配比浓度。试验结果表明: 无菌苗的茎段比较适合诱导愈伤组织并且愈伤组织的诱导需要光照。青薯 9 号马铃薯茎段外植体愈伤组织诱导的最佳基础培养基为: MS 无机成分 + 蔗糖 25 g/L + 琼脂 6 g/L + 肌醇 100 mg/L + 烟酸 2 mg/L + 盐酸吡哆醇 (维生素 B₆) 0.5 mg/L + 盐酸硫胺素 (维生素 B₁) 0.4 mg/L + 叶酸 0.25 mg/L + 生物素 0.05 mg/L。愈伤组织诱导丛生芽分化的最佳基础培养基是: MS 培养基 + 蔗糖 25 g/L + 琼脂 8 g/L + 酪蛋白的酶水解物 1 g/L。最佳愈伤组织诱导培养基激素配比为: 2.0 mg/L NAA + 6.0 mg/L 6-BA; 最佳分化培养基激素配比为: 0.1 mg/L NAA + 3.0 mg/L 6-BA + GA₃ 3.0 mg/L + ZTR 1.0 mg/L。

关键词: 马铃薯; 青薯 9 号; 愈伤组织诱导; 植株再生

中图分类号: S532.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)05-0014-06

马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 是一种重要的粮食作物和蔬菜作物, 目前是产量仅次于水稻和小麦的世界第三大粮食作物。中国的马铃薯种植面积以及产量均居世界首位; 但是, 中国马铃薯的加工利用率低, 工业加工转化率不到 5%, 这一点说明中国马铃薯产业蕴含着巨大的潜力, 是农业产业结构调整 and 农民增收的重要途径^[1]。而影响中国马铃薯产业的最

根本问题是品种、产量和质量问题, 只有积极开展种质资源创建、搜集整理和新品种选育, 才能逐步解决存在的问题^[2]。

当前对马铃薯品种改良的研究主要集中在 2 个方面: 常规育种和基因工程育种。在基因工程育种中应用最多的是农杆菌介导的遗传转化法。农杆菌介导的遗传转化法主要依赖于良好的植物受体系统的建立, 即高效愈伤组织诱导和再生体系的建立。良好的愈伤组织诱导体系和再生体系需要考虑适宜的外植体、适宜的培养基, 不同基因型之间存在较大的差异^[3], 此外, 光照时间、温度等外界环境因素^[4] 也不同程度地影响愈伤组织诱导和愈伤组织再分化。影响马铃薯愈伤组织诱导和再分化的因素众多, 有必要对其进行深入细致的研究, 为马铃薯快繁、转基因研究以及利用马铃薯作为生物反应器生产疫苗的研究奠定基础^[5-10]。

收稿日期: 2012-10-10

基金项目: 现代农业产业技术体系专项 (编号: CARS-10)。

作者简介: 石 虎 (1986—), 男, 河北保定人, 硕士研究生, 主要从事马铃薯遗传育种工作。E-mail: beiqh@126.com。

通信作者: 王 舰, 硕士, 研究员, 主要从事马铃薯资源引进、新品种选育以及新品种推广等工作。Tel: (0971) 5311193; E-mail: wangjian2197@sohu.com。

[33] 黄卫萍, 杨昌鹏, 农志荣, 等. 菊花脑热风干燥工艺的研究[J]. 食品科技, 2007(1): 70-72.

[34] 赵永敢, 石 晓, 刁静雯, 等. 复合保鲜剂对菊花脑保鲜效果的影响[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(9): 128-132.

[35] 钱 骅, 赵伯涛, 黄晓德, 等. 马兰和菊花脑真空预冷保鲜技术研究[J]. 食品科技, 2006(3): 119-122.

[36] 邓昌斌, 赵飞雄, 艾荒原. 菊花脑脱水加工技术[J]. 中国蔬菜, 2006(1): 52.

[37] 赵永敢, 刁静雯, 代建华, 等. 植酸对菊花脑保鲜效果的影响[J]. 食品工业科技, 2008, 29(9): 233-236.

[38] 赵永敢, 邢后银, 章 泳, 等. 贮藏温度和包装方式对菊花脑贮藏期间生理特性的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 497-500.

[39] 梁称福. 4 种野菜种子的发芽特性及无菌播种培养研究[J]. 广东农业科学, 2008(3): 15-17.

[40] 费建业, 黄文苑, 白 卉, 等. 菊花脑叶片组织培养再生植株的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(17): 7872-7874.

[41] 符运柳, 王永壮, 郭庆辉, 等. 菊花脑的组织培养与快速繁殖[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(24): 13367-13368.

[42] 白 卉, 黄文苑, 贲爱玲, 等. 菊花脑离体培养再生植株研究

[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(15): 7782-7783.

[43] 马月萍, 戴思兰. 高盐沉淀 CTAB 法提取温室菊花基因组 DNA[J]. 生物技术通报, 2009(7): 90-93.

[44] 陈发棣, 蒋甲福, 房伟民. 秋水仙素诱导菊花脑多倍体的研究[J]. 上海农业学报, 2002, 18(1): 46-50.

[45] 纪丽莲. 菊花脑茎叶挥发油的化学成分与抗霉菌活性的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(10): 91-94.

[46] 张莺莺. 菊花脑花 70% 乙醇提取物的抗氧化活性评价[J]. 化工时刊, 2011, 25(12): 31-33.

[47] 翁德宝, 汪海峰, 翁佳颖. 菊花脑茎叶中黄酮类化合物的测定[J]. 药物生物技术, 2001, 8(3): 167-169.

[48] 赵永敢, 石 晓, 刁静雯, 等. 微波辅助提取菊花脑多酚工艺研究[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(5): 212-214.

[49] 黄卫萍, 杨 红, 熊 青. 菊花脑纸蔬菜加工工艺的研制[J]. 粮油加工, 2008(8): 123-125.

[50] 肖 玫, 刘 彪, 赵仁铮. 菊花叶的矿物元素及其饮料配方的研究[J]. 农业工程学报, 2002, 18(6): 151-154.

[51] 黄春秋, 黄卫萍, 苏海圆, 等. 菊花脑固体饮料的研制[J]. 安徽农学通报, 2011, 17(15): 201-203.

目前关于马铃薯的愈伤组织诱导和愈伤组织再生方面的研究报道较多的是利用马铃薯营养器官为外植体,主要为不带腋芽的茎段和叶片、芽及芽眼组织、块茎及原生质体等材料^[11-12],获得了再生植株。所用的激素主要包括生长素类(IAA, NAA 和 2,4-D)、细胞分裂素类(6-BA 和玉米素 ZT)以及 GA₃、多效唑等^[5-10,13-14]。邱初等^[15]以马铃薯品种夏坡蒂和费乌瑞它茎段为外植体,筛选出最佳愈伤组织诱导培养基分别为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L 和 MS + ZT 2.0 mg/L + 0.1 mg/L NAA + GA₃ 0.5 mg/L,愈伤诱导率均达 100%;其不定芽最佳诱导培养基分别为 MS + ZT 2.0 mg/L + 0.1 mg/L NAA + GA₃ 5 mg/L 和 MS + 6-BA 2.0 mg/L + ZT 2.0 mg/L + GA₃ 5 mg/L,诱导率分别为 52.38% 和 53.6%。罗源等^[8]研究结果表明,克新 13 号和克新 12 号的最适愈伤组织诱导培养基为 MS + 30 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂 + 2 mg/L 6-BA + 1 mg/L 2,4-D,东农 303 和早大白的最适愈伤组织诱导培养基为 MS + 30 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂 + 2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2,4-D,4 个品种的愈伤诱导率分别为 100%、100%、100% 和 90%;克新 13 号、克新 12 号、东农 303、早大白的最佳愈伤组织分化培养基分别为 MS + 6-BA 4.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + GA₃ 1.0 mg/L、MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + GA₃ 1.0 mg/L、MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + GA₃ 1.5 mg/L、MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + GA₃ 1.0 mg/L,4 个品种的分化率分别为 80%、90%、100%、76.7%。张之为等^[16]以大西洋、费乌瑞它、夏坡蒂、紫花白、底西瑞和虎头等 6 个品种的叶片为外植体,研究表明,6-BA 和 GA₃ 对马铃薯叶片愈伤组织生长量和不定芽分化率的影响,6 个品种的不定芽分化率最高分别为 18.18%、13.04%、17.86%、15.00%、44.44% 和 47.83%。李莉^[17]以日本马铃薯叶片为外植体,通过试验得出 6-BA 2.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L 的组合处理中愈伤组织诱导率达到 100%,而诱导不定芽分化的最佳培养基为 MS + 6-BA 2.5 mg/L + IAA 0.1 mg/L + GA₃ 1.0 mg/L。李晶^[18]以马铃薯东农 303 的茎段和薯块为外植体,通过试验表明茎段最佳愈伤组织诱导培养基为 MS + 0.1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L BA,薯块最佳愈伤组织诱导及分化培养基均为 MS + 2 mg/L ZT + 1 mg/L IAA。华婧^[19]以中 1、中 2、中 3、中 4 等 4 个不同基因型的马铃薯无菌试管苗为材料,分别以茎尖、茎段、叶片、试管薯为外植体建立高频再生体系。黄雪丽^[20]对马铃薯外植体愈伤组织的根芽分化研究表明,川芋 5 号和川芋早叶片愈伤组织有少量芽的分化,最大分化率分别为 14.6% 和 18.7%,22-2 和凉薯 97 无丛生芽分化现象。贾笑英^[21]以试管苗茎段、叶片作为外植体材料,以 MS 为基本培养基成分,对生长激素的浓度和配比进行优化组合,筛选出有利于受体材料的高效培养基配方,即有利于丛生芽分化的培养基为 MS + 6-BA 2.5 mg/L + IAA 0.25 mg/L + 2,4-D 0.25 mg/L,出芽率可达 65.33%。

本研究所采用的供试材料青薯 9 号不仅产量高、适应性强,而且品质优良,推广应用前景好。经过近几年的推广种植发现,青薯 9 号的品种适应性广泛、抗旱性强,适宜在生态气候条件复杂、耕作方式多样的地方种植,且田间植株抗晚疫病,块茎耐贮存,而晚疫病是中国北方马铃薯产区最严重的病

害,晚疫病的流行可使马铃薯减产 70%~80%。青薯 9 号抗病毒病,田间退化缓慢,块茎商品率高,品质指标符合加工要求,可满足多种用途^[22-24]。本研究对愈伤组织诱导和再分化的最佳培养条件、外植体类型、基础培养基及激素添加比例等进行筛选,以期今后青薯 9 号以及其他马铃薯品种的遗传转化及基因工程研究提供技术参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试材料为马铃薯青薯 9 号无菌试管苗,由青海省农林科学院生物技术研究中心提供。马铃薯新品种青薯 9 号是青海省农林科学院生物技术研究所与国际马铃薯中心(CIP)进行资源与技术交流合作,于 2001 年从国际马铃薯中心引进的杂交组合(387521.3XAPHRODITE)实生一代材料 C92.140-05 经温室隔离种植观察,2002 年选出的优良单株 ZT2003 品系,对其形态特征、产量水平、抗性 & 品质进行了综合分析鉴定,2004—2005 年进行了品种比较试验,在西宁、湟源、乐都 3 个试验点均表现突出,品质优良,抗病性好,抗旱性强,产量水平优于其他参试品种,2006 年进入区域 & 生产试验,完成品种审定程序,2006 年 12 月通过青海省农作物品种审定委员会审定,并正式命名为青薯 9 号,2011 年通过国家品种审定。截至 2012 年青薯 9 号的种植区域已推广至陕西、甘肃、宁夏、新疆、重庆、贵州、云南、四川、青海、西藏等多个省、市、自治区^[22-24]。

1.2 方法

1.2.1 培养基和培养方法 (1)愈伤组织诱导培养基(CIM):MS 无机成分 + 蔗糖 25 g/L + 琼脂 6 g/L + 肌醇 100 mg/L + 烟酸 2 mg/L + 盐酸吡哆醇 0.5 mg/L + 盐酸硫胺素 0.4 mg/L + 叶酸 0.25 mg/L + 生物素 0.05 mg/L + 6-BA (1.0、3.0、6.0 mg/L) + NAA (1.0、1.5、2.0 mg/L),pH 值 5.8。选取青薯 9 号的无菌苗茎段为外植体,茎段长度约为 0.5 cm,以平铺方式放在含有不同激素浓度的 CIM 培养基上,约 10 个茎段/培养皿,9 皿(100 个茎段)/水平;无菌苗叶片,保留 0.1~0.3 cm 左右的叶柄,以叶背面贴在含有激素的 CIM 培养基上,6 张叶片/培养皿,10 d 后统计愈伤组织诱导结果。(2)愈伤组织分化培养基(CDM):MS + 加蔗糖 25 g/L + 琼脂 8 g/L + 酪蛋白的酶水解物 1 g/L + 反式玉米素核苷 ZTR (1.5、1.75、2.0 mg/L) + NAA (0.01、0.1、0.5 mg/L) + 6-BA (1.0、3.0、6.0 mg/L) + GA₃ (0.5、1.0、1.5 mg/L)。正交 L₉(3⁴)试验:ZTR 1.0 mg/L, NAA (0.01、0.1、0.5 mg/L), 6-BA (1.0、3.0、6.0 mg/L), GA₃ (1.0、2.0、3.0 mg/L); 6-BA 3.0 mg/L, NAA 0.01 mg/L, GA₃ (0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/L)。约 10 个愈伤/瓶,9~12 瓶/水平,60 d 后统计分化率结果。培养基 pH 值 5.9。

1.2.2 培养条件 (1)愈伤组织诱导培养:温度(21/23 ± 2)℃,光照 14 h/d,白天采用日光灯补光。(2)愈伤组织分化培养:温度(21/25 ± 2)℃,光照 14 h/d,白天采用日光灯补光。

1.3 计算方法

愈伤组织诱导率 = (出现愈伤组织的外植体数/接种外植体的总数) × 100%;

芽分化率 = (分化出不定芽的愈伤组织块数/愈伤组织

总块数) × 100% ;
根分化率 = (分化出根的愈伤组织块数/愈伤组织总块数) × 100% ;
褐化率 = (褐化死亡的愈伤组织块数/愈伤组织总块数) × 100% 。

1.4 数据分析

文中所有数据采用 Excel 2007 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对愈伤组织诱导率和愈伤组织质量的影响

愈伤组织诱导成败的关键不仅取决于外植体的来源和种类,而且培养条件、植物生长调节剂的种类及浓度也很重要。将外植体接种到愈伤组织诱导培养基时,第 2 天茎段两端便开始有膨大,第 5 天膨大更加明显,并能够形成肉眼可见的愈

伤组织,第 10 天左右基本上便可以转入诱导愈伤组织分化培养基中进行分化诱导。由表 1 可知,在添加 6 - BA 和 NAA 2 种激素的诱导培养基上,所有激素配比组合都能诱导出愈伤组织,并且愈伤诱导率都在 80% 以上,只是愈伤组织形成的质量差别比较大(图 1 和图 2)。图 2 中的愈伤组织是不利于分化出丛生芽的愈伤组织。

由表 1 可见,处理 CIM2、CIM8 和 CIM9 诱导的茎段愈伤组织不仅诱导率高,而且愈伤组织质量也比较好,第 10 天时基本没有长出白色的不定根,愈伤组织表面也看不到乳白色颗粒物,愈伤组织形成量也比较多,愈伤组织诱导率均达到 98% 以上,愈伤组织褐化程度很轻或没有变褐现象,质地比较紧密。这几组培养基诱导的愈伤组织的分化效果也较好。但长时间培养后,6 - BA 含量越高的培养基,愈伤组织越早出现褐化现象,培养 1 个月左右后愈伤组织均褐化死亡,所以第 10 天左右把形成的愈伤组织转移到分化培养基中比较合适。

表 1 6 - BA 和 NAA 对青薯 9 号茎段愈伤组织诱导的影响

处理	激素种类及浓度 (mg/L)		接种数 (个)	诱导率 (%)	愈伤组织质量
	NAA	6 - BA			
CIM1	1.0	1.0	100	98	愈伤表面长出乳白色颗粒,且有些茎段分化出白色不定根,愈伤量较少(++) ,愈伤颜色呈黄绿色,部分愈伤边缘有变褐现象
CIM2	1.0	3.0	100	100	愈伤表面没有乳白色颗粒,只有两段茎段长出白色不定根,愈伤量较多(+++) ,愈伤颜色呈黄绿色,很少几个愈伤边缘有变褐
CIM3	1.0	6.0	100	98	愈伤表面没有乳白色颗粒,只有一段茎段长出白色不定根,愈伤量较多(+++) ,愈伤颜色呈黄绿色部分愈伤边缘有变褐现象
CIM4	1.5	1.0	100	97	部分茎段表面长出乳白色颗粒,部分茎段长出白色不定根,愈伤量较多(+++) ,愈伤颜色呈黄绿色,部分愈伤边缘有变褐现象
CIM5	1.5	3.0	100	82	部分茎段表面长出乳白色颗粒,部分茎段长出白色不定根,愈伤量较多(+++) ,愈伤颜色呈黄绿色,部分愈伤边缘有变褐现象
CIM6	1.5	6.0	100	95	少部分茎段表面长出乳白色颗粒,没有白色毛根长出,愈伤量较多(+++) ,愈伤颜色呈黄绿色,部分愈伤边缘有变褐现象
CIM7	2.0	1.0	100	92	大部分茎段表面有乳白色颗粒,多数有白色不定根长出,愈伤量较少(++) ,愈伤颜色呈黄绿色,部分愈伤边缘有变褐现象
CIM8	2.0	3.0	100	100	少部分表面有乳白色颗粒,没有白色不定根长出,愈伤量较多(+++) ,愈伤颜色呈黄绿色,没有边缘褐化现象
CIM9	2.0	6.0	100	100	茎段表面没有乳白色颗粒,没有白色不定根长出,愈伤量较多(+++) ,愈伤颜色呈黄绿色,没有边缘褐化现象

注:“+”越多表明愈伤组织的量愈多。

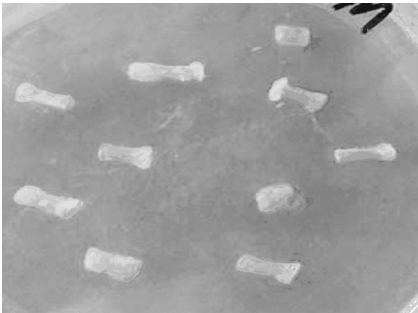


图1 诱导形成的愈伤组织



图2 诱导形成的有不定根和乳白色颗粒的愈伤组织

2.2 不同外植体类型和光照对愈伤组织诱导的影响

表 2 表明茎段形成愈伤组织的效果比较好。光照和黑暗条件下形成的愈伤组织,除光照条件下愈伤组织叶绿素含量较高外,其他形态及特点一般差别不大。由于采用的是瓶中

培养的无菌苗,比较健壮的叶片不容易得到,而茎段容易得到,所以一般采用茎段作为外植体,在正常光照条件下诱导愈伤组织。

表2 不同外植体和光照对青薯9号愈伤组织诱导的影响

外植体	光照条件	愈伤组织诱导率 (%)
叶片	正常光照	95.0
	黑暗	91.7
茎段	正常光照	100
	黑暗	97.0

2.3 愈伤组织分化

2.3.1 反式玉米素核苷 (ZTR) 对愈伤组织分化的影响 在基本分化培养基中添加不同浓度的反式玉米素核苷能够促进愈伤组织的分化(图3和图4),并且能够抑制愈伤组织的褐化,分化出来的丛生芽比较健壮,容易成苗,利于扩繁。单独使用反式玉米素核苷 2.0 mg/L 时分化率为 40% 左右(表3),但试验表明仅添加 ZTR 不能获得理想的分化率,且反式玉米素核苷成本较高,不利于大量使用。



图3 ZTR诱导的分化

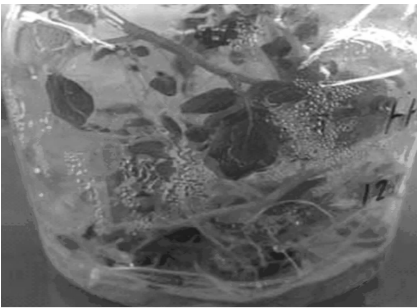


图4 ZTR诱导的分化苗

表3 反式玉米素核苷对青薯9号愈伤组织分化率的影响

外植体	反式玉米素核苷浓度 (mg/L)	分化率 (%)
茎段	1.50	25.0
	1.75	19.4
	2.00	37.5

2.3.2 NAA、6-BA 和 GA₃ 对愈伤组织分化的影响 表4结果说明,NAA、6-BA 和 GA₃ 3种激素一起使用能够使愈伤组织分化出丛生芽,0.01 mg/L NAA + 3.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L GA₃ 分化率最高,为 71%,根的分化率最低,为 3%,褐化率最低,为 10%,这一配比最为合适,但所需分化时间较长,第 30 天左右才出现芽的分化,第 60 天左右才分化出比较多的丛生芽(图5)。0.01 mg/L NAA + 6.0 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L GA₃ 处理的丛生芽分化时间比较短,第 10 天左右便

开始分化出丛生芽,但该培养基的褐化率很高。试验表明当 6-BA 和 GA₃ 浓度比较高的时候褐化率一般比较高,其中当 6-BA 浓度达到 6.0 mg/L 时褐化率一般都很高,在 30% 左右。NAA 浓度达到 0.5 mg/L 时丛生芽的分化很明显被抑制,而根的分化率明显提高,最高达到 59%,说明当生长素类浓度比较高的时候有利于马铃薯青薯9号愈伤组织分化出 不定根,而抑制丛生芽的分化。

表4 NAA、6-BA 和 GA₃ 对青薯9号愈伤组织分化的影响

处理	激素种类及浓度 (mg/L)			愈伤组织数(块)	芽分化率 (%)	根分化率 (%)	褐化率 (%)
	NAA	6-BA	GA ₃				
1	0.01	1.0	0.5	90	31.11	23.33	14.44
2	0.01	3.0	1.0	100	71.00	3.00	10.00
3	0.01	6.0	1.5	90	43.33	4.44	31.11
4	0.1	1.0	1.0	80	15.00	37.5	12.50
5	0.1	3.0	1.5	100	35.00	26.00	11.00
6	0.1	6.0	0.5	100	18.00	6.00	35.00
7	0.5	1.0	1.5	100	0.00	59.00	27.00
8	0.5	3.0	0.5	90	0.00	36.67	14.44
9	0.5	6.0	1.0	90	13.33	15.56	22.22



图5 6-BA、NAA和GA₃诱导的青薯9号愈伤组织再分化

2.3.3 NAA、6-BA、GA₃ 和 ZTR 对青薯9号分化的影响 表5 结果表明,在加入 1.0 mg/L 的 ZTR 之后,愈伤组织的分化率明显提高,其中 0.1 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L GA₃ + 1.0 mg/L ZTR 和 0.1 mg/L NAA + 3.0 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L GA₃ + 1.0 mg/L ZTR 的分化率分别达到 72% 和 75.83%,分化率都比较高,且分化时间也较短,第 10 天左右便有愈伤组织开始分化出丛生芽,根的分化率也不高,0.1 mg/L NAA + 3.0 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L GA₃ + 1.0 mg/L ZTR 处理的褐化率也很低。4 种激素的丛生芽分化率普遍较高,根的分化率普遍比较低,说明 ZTR 对马铃薯愈伤组织分化出丛生芽有很强的诱导作用(图6),对根的分化有很好的抑制作用。综合来看影响褐化的因素比较复杂,难以确定。

2.4 GA₃ 对青薯9号愈伤组织分化的影响

分化培养基中,并不是 GA₃ 的添加量越多越好,试验结果(表6)表明,GA₃ 添加量在 0.5 ~ 2.0 mg/L 范围内较好,GA₃ 为 1.0 mg/L 时分化率最高,为 52.5%,褐化率最低,为 28.33%;GA₃ 在 4 mg/L 以上时不仅分化率低,而且褐化率很高,达到 50% 左右;GA₃ 添加量在 0.5 ~ 2.0 mg/L 范围内,褐化率在 30% 左右,可见高浓度的 GA₃ 使愈伤组织大量褐化死亡,分化出丛生芽所用的时间也普遍较长,30 d 左右才有少量的愈伤组织分化出丛生芽,并且分化出来的丛生芽很弱小,60 d 统计时虽然分化出丛生芽的愈伤组织数量增多,但是每

表 5 NAA、6-BA、GA₃ 和反式玉米素核苷 (ZTR) 对青薯 9 号愈伤组织分化的影响

处理	激素种类及浓度 (mg/L)				愈伤组织数 (块)	芽分化率 (%)	根分化率 (%)	褐化率 (%)
	NAA	6-BA	GA ₃	ZTR				
1	0.01	1.0	1.0	1.0	100	54.00	0.00	30.00
2	0.01	3.0	2.0	1.0	100	31.00	0.00	42.00
3	0.01	6.0	3.0	1.0	80	51.25	0.00	26.25
4	0.1	1.0	2.0	1.0	100	72.00	6.00	18.00
5	0.1	3.0	3.0	1.0	120	75.83	7.50	4.17
6	0.1	6.0	1.0	1.0	70	45.71	5.71	22.86
7	0.5	1.0	3.0	1.0	100	29.00	12.00	3.00
8	0.5	3.0	1.0	1.0	90	36.67	1.00	16.67
9	0.5	6.0	2.0	1.0	110	46.36	10.91	6.36

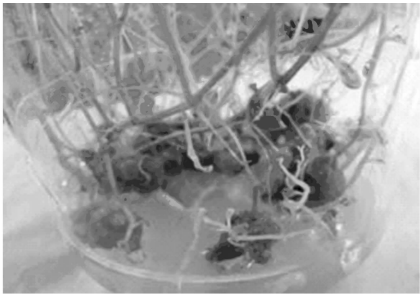


图6 6-BA、NAA、GA₃和ZTR诱导的分化苗

表 6 GA₃ 对青薯 9 号愈伤组织分化的影响

GA ₃ 浓度 (mg/L)	愈伤组织数 (块)	芽分化率 (%)	根分化率 (%)	褐化率 (%)
0.5	120	25.83	6.67	32.50
1.0	120	52.5	5.83	28.33
2.0	120	37.5	1.67	31.67
4.0	120	17.5	1.67	53.33
8.0	120	19.17	6.67	48.33

个愈伤组织分化出的丛生芽不仅数量少,而且很弱小,形成的植株也较弱。

2.5 不同外植体类型诱导的愈伤组织对分化的影响

茎段愈伤组织的丛生芽分化率为 41.9%,叶片愈伤组织的丛生芽分化率为 27.5%,说明马铃薯青薯 9 号茎段诱导的愈伤组织分化效果比较好。

3 讨论

3.1 愈伤组织的诱导

关于马铃薯愈伤组织诱导的研究,目前已经有不少相关的文献报道,在前人的研究中^[6-8,16-19],使用比较多的细胞分裂素类是 6-BA,生长素使用比较多的是 NAA 和 2,4-D,基本培养基一般是 MS,添加的蔗糖浓度一般在 30 g/L 左右,琼脂的使用量一般是 6~8 g/L,所用的外植体也不尽相同,通过无菌苗获得的茎段、茎尖和叶片使用的比较多。马铃薯愈伤组织的诱导需不需要光照也有不同的研究,黄雪丽^[20]用黑暗条件诱导愈伤组织,李莉^[17]采用弱光照(2000~3000 lx)诱导愈伤组织,都得到了比较理想的结果。

虽然关于马铃薯愈伤组织的诱导以及诱导不定芽增殖以获得再生植株的研究目前也比较多^[8,15-16],但是关于马铃薯青薯 9 号的愈伤组织诱导和愈伤组织再分化的研究目前还没

有相关的文献报道。由于基因型不同,马铃薯愈伤组织诱导所需的培养基也不尽相同,所以本试验采用的愈伤组织诱导培养基配方与前人研究也有很大不同^[7-12]。本试验采用的培养基是以 MS 无机成分为基本培养基,添加 6 g/L 的琼脂、25 g/L 的蔗糖,有机成分是肌醇 100 mg/L、烟酸 2 mg/L、维生素 B₆ 0.5 mg/L、维生素 B₁ 0.4 mg/L、叶酸 0.25 mg/L、生物素 0.05 mg/L,而且所使用的 NAA 和 6-BA 的浓度比较高,这与前人的研究有比较大的不同^[15-19],试验结果也证明了这种方法对愈伤组织的诱导率比较高。除了培养基之外,本研究同时也对叶片和茎段 2 种外植体、光照等组培条件进行了试验。

本研究中愈伤组织诱导的试验设计采用的是完全试验,所需要工作量较大,如果品种较多,激素组合或者处理水平也较多,不宜采用;但完全试验设计能够更详细地了解各种激素以及激素间的相互作用。

3.2 愈伤组织的分化

再生体系的建立最关键的部分就是愈伤组织分化。关于马铃薯愈伤组织分化的研究已经有相当多的报道,通过对前人^[6-9,15-19]所做的研究结果的比较可以看出,不同基因型的马铃薯的分化有很大的差别,从最高 100% 分化到只有 13.04% 的分化率。同一种基因型,因培养基不同,分化率也有很大差异,如邱弼等得到夏坡蒂和费乌瑞它的分化率为 52.38% 和 53.6%,而张之为等^[16]得到的分化率为 17.86% 和 13.04%。诱导马铃薯愈伤组织丛生芽分化使用比较多的细胞分裂素类物质有 6-BA 和玉米素(ZT),使用生长素类比较多的是 NAA、2,4-D、IAA、IBA 等,此外赤霉素 GA₃ 一般也都有添加,但是 GA₃ 使用的量从 0.1 mg/L 到 5.0 mg/L 不等。

本研究先是在 MS 基础培养基中添加了酪蛋白的酶水解物 and 不同浓度的反式玉米素核苷来诱导愈伤组织的分化,然后在添加酪蛋白的酶水解物的 MS 基础培养基中添加不同浓度的 NAA、6-BA、GA₃,采用三因素三水平的 L₉(3⁴) 正交试验设计来诱导愈伤组织分化丛生芽;其次是以第二种培养基为基础,在主要成分中添加一定量的反式玉米素核苷来诱导愈伤组织分化丛生芽;最后以第二种培养基中的第二个组合为基本培养基,加入不同浓度的 GA₃ 来研究 GA₃ 对愈伤组织分化丛生芽的影响。与前人^[19-21,25]比较,本试验中添加了酪蛋白的酶水解物,它是一种天然物质,经过试验验证它对马铃薯愈伤组织的分化有一定的促进作用,但是作为一种天然添加剂,和椰乳、马铃薯浸液等一样成分复杂,其作用机制不

太清楚。以往报道中应用比较多的是玉米素(ZT)而不是反式玉米素核苷(ZTR),这种激素在本试验中的应用效果比较好,对其他马铃薯品种愈伤组织分化也有很好的参考价值。

有关马铃薯愈伤组织诱导和再分化的研究早在1983年就有了报道^[26],几十年来这方面的研究一直没有停止过,但试验的可重复性不好。建立一个比较稳定的愈伤组织诱导和再分化体系对马铃薯微繁的实际应用有着重要的意义。本研究中,愈伤组织诱导比较简单,MS基本培养基中添加2,4-D、NAA、6-BA等都能诱导愈伤组织发生,虽然诱导率各不相同,愈伤的质量也相差甚多,但是都能通过后期相关的培养进行改良。但愈伤组织的分化则是一个难点,本试验中,只有添加了反式玉米素核苷的各类分化培养基得到的结果相对比较稳定,而其他的培养基则分化不太稳定。今后除了建立青薯9号的遗传转化体系外,同时也将该体系扩大应用到其他不同基因型的马铃薯品种中。

4 结论

本试验选用青薯9号马铃薯为材料,建立了无菌苗茎段通过愈伤组织途径的离体培养再生体系。试验中建立的马铃薯再生体系以细胞分裂素6-BA、生长素NAA诱导愈伤组织的产生,以细胞分裂素6-BA、反式玉米素核苷、生长素NAA和赤霉素GA₃诱导丛生芽的分化。得出以下结论:青薯9号马铃薯的愈伤诱导以无菌苗的茎段为外植体为好。愈伤组织的诱导采用正常的光照条件得到的愈伤组织较好。青薯9号马铃薯的茎段外植体愈伤组织诱导的最佳培养基为:以MS无机成分、蔗糖25 g/L、琼脂6 g/L、肌醇100 mg/L、烟酸2 mg/L、维生素B₆ 0.5 mg/L、维生素B₁ 0.4 mg/L、叶酸0.25 mg/L、生物素0.05 mg/L为基本成分,2.0 mg/L NAA + 3.0 mg/L 6-BA、2.0 mg/L NAA + 6.0 mg/L 6-BA、1.0 mg/L NAA + 3.0 mg/L 6-BA为添加的激素成分。茎段愈伤组织诱导丛生芽分化的最佳培养基为:以MS培养基、添加蔗糖25 g/L、琼脂8 g/L、酶促酪蛋白水解物1 g/L为基本成分,0.1 mg/L NAA + 3.0 mg/L 6-BA + 3.0 mg/L GA₃ + 1.0 mg/L ZTR为添加的激素成分。有利于茎段愈伤组织丛生芽分化的GA₃最佳浓度为1.0 mg/L。

大量的重复试验结果表明,诱导培养基中激素配比为2.0 mg/L NAA + 6.0 mg/L 6-BA、分化培养基中激素配比为0.1 mg/L NAA + 3.0 mg/L 6-BA + GA₃ 3.0 mg/L + 1.0 mg/L ZTR时,不仅愈伤组织分化率高,而且褐化率也低。

参考文献:

- [1] 马晓东,钟 浩. 马铃薯淀粉的研究及在工业中的应用[J]. 农产品加工学刊,2008(2):59-61.
- [2] 李勤志. 中国马铃薯生产的经济分析[D]. 武汉:华中农业大学,2008:1-126.
- [3] 丁玉梅,杨正安,吴毅歆,等. 用于叶绿体基因组转化的马铃薯高效再生体系的建立[J]. 西南农业学报,2006,19(增刊):98-102.
- [4] 杨琼芬,隋启君,李世峰,等. 马铃薯新品种“云薯201”脱毒种苗生产中的影响因素研究[J]. 西南农业学报,2006,19(4):679-682.

- [5] 晁祥健,杨 煜,金黎平,等. 二倍体马铃薯高效再生体系的建立[J]. 园艺学报,2009,36(1):109-114.
- [6] 李凤云,盛万民,于天峰,等. 马铃薯不同品种茎段再生系统的筛选[J]. 中国农学通报,2005,21(8):99-103.
- [7] 李 娟,程智慧,张国裕. 四个马铃薯品种幼茎段再生技术的研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(3):122-126.
- [8] 罗 源,陈耀锋,李春莲,等. 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.
- [9] Hakan T. Callus induction and growth in transgenic potato genotypes[J]. African Journal of Biotechnology,2004,3(8):375-378.
- [10] Bhaskar P B, Wu L, Busse J S, et al. Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato[J]. Plant Physiology,2010,154:939-948.
- [11] 李 娟,程智慧,张国裕. 马铃薯叶片高效再生体系的建立[J]. 西北植物学报,2004,24(4):610-614.
- [12] 彭昕琴,胡家金,霍妙娟. 马铃薯品种“大西洋”高效再生体系的建立[J]. 湖南农业科学,2008(2):26-28.
- [13] Arif M, Thomas P E, Crosslin J M, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of potato using *PLRV-REP*, and *PVY-CP* genes and assessment of replicase mediated resistance against natural infection of PLRV[J]. Pak J Bot,2009,41(3):1477-1488.
- [14] Xu J, Wang Y Z, Yin H X, et al. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Malus zumi* (Matsumura) Rehd using leaf explant regeneration system[J]. Electronic Journal of Biotechnology,2009,12(1):1-8.
- [15] 邱 初,陶 刚,朱 英,等. 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.
- [16] 张之为,赵 君,樊明寿,等. 马铃薯不同品种叶片再生体系的建立[J]. 四川农业大学学报,2011,29(1):61-68.
- [17] 李莉. 日本马铃薯叶片再生体系的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2010:1-23.
- [18] 李 晶. 马铃薯再生体系的建立及遗传转化的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2003:1-43.
- [19] 华 婧. 马铃薯高频再生体系建立及离体茎尖诱变筛选耐盐突变体的应用[D]. 大连:辽宁师范大学,2008:1-51.
- [20] 黄雪丽. 马铃薯茎尖脱毒、愈伤组织诱导及分化技术优化研究[D]. 雅安:四川农业大学,2009:1-34.
- [21] 贾笑英. 利用转基因技术培育马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)高淀粉及抗病新品[D]. 兰州:甘肃农业大学,2006:1-91.
- [22] 张艳萍. 马铃薯青薯9号的特征特性及推广应用前景探析[J]. 现代农业科技,2008(17):120-124.
- [23] 全永成. 马铃薯青薯9号的特征特性及推广应用前景[J]. 现代农业科技,2009(16):99-101.
- [24] 蒋福祯,王 舰,张艳萍,等. 高产稳产抗旱抗病毒马铃薯新品种青薯9号[J]. 作物杂志,2008(1):89.
- [25] 罗 源. 马铃薯再生体系的建立及HAL1基因遗传转化研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2007:1-35.
- [26] 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.) 'Mrs Bard' [J]. Theor Appl Genet,1983(66):169-172.