

贺苗苗. 温度预处理对不同品种马铃薯花药愈伤组织诱导率的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 32–33.

# 温度预处理对不同品种马铃薯花药愈伤组织诱导率的影响

贺苗苗

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

**摘要:**以青海省马铃薯主栽品种青薯 2 号、高原 4 号、下寨 65 为材料, 探讨低温和高温热激对马铃薯花药愈伤组织和胚状体诱导率的影响, 结果表明: 单独低温预处理 48 h 下寨 65 诱导率最高, 35 ℃ 热激处理 48 h 下青薯 2 号和高原 4 号诱导率较高, 低温预处理 48 h 和热激处理 48 h 相配合下的马铃薯愈伤诱导率高于单独低温和高温热激处理。

**关键词:**马铃薯; 温度; 愈伤组织; 诱导率

**中图分类号:** S532.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0032-02

马铃薯是世界第三大粮食作物, 我国现有的马铃薯品种遗传基础狭窄, 亲缘关系近, 后代遗传变异停留在近交水平, 四倍体常规杂交育种很难有较大突破。自然界中具有抗病、抗线虫、抗霜冻、早熟、高干物质、低还原糖含量等特性的马铃薯野生种和近缘栽培种中 75% 左右为二倍体<sup>[1]</sup>, 四倍体与二倍体种间杂交不亲和或杂交后产生不育的三倍体, 很难产生后代, 这就限制了马铃薯野生种优良基因在育种中的应用。利用组织培养技术进行马铃薯花药培养, 普通马铃薯通过诱导获得的双单倍体可直接与野生种二倍体杂交, 将优良基因转移到栽培种中, 充分利用野生资源, 丰富遗传基础<sup>[2]</sup>。花药培养被广泛应用于植物遗传育种<sup>[3]</sup>。我国马铃薯花药培养研究始于 20 世纪 80 年代初, 戴朝曦以四倍体普通栽培种为材料, 成功诱导了再生植株<sup>[4]</sup>。Johansson 对马铃薯品种 Maria 进行不同天数低温预处理, 发现预处理 3 d 效果最好<sup>[5]</sup>。冉毅东等对马铃薯双单倍体花药采用 3 种不同温度进行前处理, 也成功获得了再生植株<sup>[6]</sup>。梁彦涛等认为, 马铃薯花药培养对基因型依赖性很大<sup>[7]</sup>。本研究对马铃薯花药进行温度预处理, 探讨低温和高温热激对马铃薯愈伤组织和胚状体诱导率的影响, 旨在为开发利用马铃薯提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2010 年 4 月中旬将青薯 2 号、高原 4 号、下寨 65 等 3 个马铃薯品种分别种植于青海省海东市乐都区、海东市平安县、西宁市湟源县 3 个试验点。

### 1.2 方法

2010 年 6 月 26 日至 9 月 20 日采集花药。通常在 08:00—10:00 采集花药, 将花药置于冰壶内带回实验室, 在 40 倍显微镜下观察小孢子的育性和发育时期。取小孢子处

于单核靠边期或双核初期的花蕾备用。

**1.2.1 低温预处理** 采用低温(4 ℃)预处理方法, 将花蕾包于双层湿纱布中, 放入 4 ℃ 冰箱中分别预处理 0、24、48、72 h, 用流水冲洗花蕾 30 min, 再用蒸馏水冲洗 3 次, 转入超净工作台用无菌水冲洗 3 次, 再用 75% 乙醇灭菌 30 s, 用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡 10~15 min, 用无菌水冲洗 3~5 次, 置于已灭菌的培养皿上, 用镊子剥开花蕾, 取出花药, 去除花丝, 接种到愈伤组织诱导培养基上 (MS 基本培养基 + 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L KT), 每皿接种 25~30 枚花药, 放于光强为 2 500 lx、光照时间为 16 h/d、温度为 22 ℃ 的光照培养箱中培养。

**1.2.2 高温热激处理** 将消毒过的花蕾 (消毒方法同“1.2.1”) 接种到诱导培养基上, 置于 35 ℃ 黑暗条件下分别预培养 0、24、48、72 h, 然后转入光强为 2 500 lx、光照时间为 16 h/d、温度为 22 ℃ 的光照培养箱中培养。

**1.2.3 高温与低温预处理组合** 本研究设计 3 个处理, 处理 I: 将花蕾置于 4 ℃ 下低温预处理 24 h, 接种后置于 35 ℃ 黑暗条件下预培养 24 h, 然后转入光强为 2 500 lx、光照时间为 16 h/d、温度为 22 ℃ 的光照培养箱中培养; 处理 II: 将花蕾置于 4 ℃ 下低温预处理 48 h, 接种后置于 35 ℃ 黑暗条件下预培养 48 h, 然后转入光强为 2 500 lx、光照时间为 16 h/d、温度为 22 ℃ 的光照培养箱中培养; 处理 III: 将花蕾置于 4 ℃ 下低温预处理 36 h, 接种后置于 35 ℃ 黑暗条件下预培养 36 h, 然后转入光强为 2 500 lx、光照时间为 16 h/d、温度为 22 ℃ 的光照培养箱中培养。

**1.2.4 愈伤组织诱导率的计算** 将经过处理的花药在愈伤组织诱导培养基上培养 30 d, 统计愈伤组织数量。愈伤组织诱导率计算方法见公式(1):

愈伤组织诱导率 = 诱导出愈伤组织的花药数 / 接种花药数 × 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温预处理对马铃薯花药愈伤组织诱导率的影响

从表 1 可以看出, 经 24、48、72 h 低温预处理后不同品种马铃薯花药愈伤组织诱导率均明显高于对照。青薯 2 号预处

收稿日期: 2013-05-23

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (编号: CARS-10);

青海省农林科学院创新基金 (编号: 2010-NKY-05)。

作者简介: 贺苗苗 (1983—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事马铃薯遗传育种研究。E-mail: hemm0505@126.com。

理 72 h 效果较好,诱导率达 13.4%。高原 4 号预处理 48 h 效果较好,诱导率为 15.7%。下寨 65 预处理 48 h 诱导率高达 25.5%。

表 1 低温预处理对不同品种马铃薯花药愈伤组织诱导率的影响				
品种	低温预处理时间(h)	接种花药(枚)	愈伤组织(个)	诱导率(%)
青薯 2 号	0(CK)	524	18	3.4
	24	632	65	10.3
	48	583	71	12.2
	72	612	82	13.4
高原 4 号	0(CK)	521	19	3.6
	24	654	62	9.5
	48	578	91	15.7
	72	715	105	14.7
下寨 65	0(CK)	478	21	4.4
	24	658	147	22.3
	48	597	152	25.5
	72	596	118	19.8

2.2 热激处理对马铃薯花药愈伤组织诱导率的影响

从表 2 可看出,适当的热激处理有利于提高马铃薯花药愈伤组织的诱导率。24~48 h 内随着热激处理时间的增加,诱导率逐步增高,但当处理时间为 72 h 时,诱导率反而有所降低。青薯 2 号和高原 4 号以 48 h 处理效果最好,诱导率分别达 17.8% 和 17.0%,下寨 65 热激处理 24 h 效果最好,为 17.5%。

表 2 热激预处理对不同品种马铃薯花药愈伤组织诱导率的影响				
品种	热激预处理时间(h)	接种花药(枚)	愈伤组织(个)	诱导率(%)
青薯 2 号	0(CK)	458	16	3.5
	24	542	85	15.7
	48	623	111	17.8
	72	598	96	16.1
高原 4 号	0(CK)	463	18	3.9
	24	598	86	14.4
	48	625	106	17.0
	72	569	75	13.2
下寨 65	0(CK)	425	20	4.7
	24	536	94	17.5
	48	612	102	16.7
	72	589	95	16.1

2.3 低温预处理与热激处理相配合对马铃薯花药愈伤组织诱导率的影响

从表 3 可以看出,低温预处理和热激处理相配合有利于提高马铃薯花药愈伤组织诱导率。青薯 2 号和高原 4 号处理Ⅱ诱导率最高,分别为 19.7% 和 17.5%,下寨 65 处理Ⅰ的诱导率最高,为 19.6%。

3 结论与讨论

低温预处理有利于马铃薯花药愈伤组织的形成,这可能是由于低温预处理能显著延长花药壁退化的时间,在花药壁中积累了大量淀粉,为花粉的生长发育提供了物质基础<sup>[8]</sup>。

表 3 低温和高温热激处理相配合对不同品种马铃薯花药愈伤组织诱导率的影响				
品种	处理	接种花药(枚)	愈伤组织(个)	诱导率(%)
青薯 2 号	CK	538	19	3.5
	处理Ⅰ	579	113	19.5
	处理Ⅱ	563	111	19.7
	处理Ⅲ	604	112	18.5
高原 4 号	CK	565	23	4.1
	处理Ⅰ	654	114	17.4
	处理Ⅱ	657	115	17.5
	处理Ⅲ	679	110	16.2
下寨 65	CK	435	24	5.5
	处理Ⅰ	496	97	19.6
	处理Ⅱ	598	115	19.2
	处理Ⅲ	612	111	18.1

刘公社等认为,热激处理对诱导小孢子细胞分裂和胚胎发生具有决定性影响<sup>[9]</sup>。本研究表明,低温和热激预处理均能够提高马铃薯花药愈伤诱导率。庄军平等认为,单独热激处理的效果优于单独低温预处理<sup>[10]</sup>。本研究表明,单独低温预处理 48 h 下寨 65 诱导率最高,35℃热激处理 48 h 青薯 2 号和高原 4 号愈伤诱导率较高,青薯 2 号和高原 4 号处理Ⅱ诱导率最高,分别为 19.7% 和 17.5%,这与姜丽静等的研究结果<sup>[11]</sup>一致。花药培养不仅和品种、温度预处理有关,还和培养条件、培养基添加物等多种因素有关,应当从马铃薯基因型筛选、培养基成分、预处理条件优化等方面进一步研究。

参考文献:

[1] 吕文河,梁吉利. 马铃薯 4x×2x 杂种无性一代产量及产量性状的表现[J]. 中国马铃薯,1997,11(3):11-16.

[2] 司怀军,王 蒂,戴朝曦,等. 我国马铃薯组织和细胞培养研究进展[J]. 中国马铃薯,2000,14(4):220-224.

[3] 金黎平,杨宏福. 马铃薯双单倍体的产生及其在遗传育种中的应用[J]. 马铃薯杂志,1996(3):180-186.

[4] 戴朝曦. 用花药培养法诱导马铃薯产生双单倍体植株的研究[J]. 科学通报,1982,27(24):1529-1532.

[5] Johansson L. Improved methods for induction of embryogenesis in anther culture of *Solanum tuberosum* [J]. Potato Res, 1986, 29: 179-190.

[6] 冉毅东,王 蒂,戴朝曦. 提高马铃薯双单倍体花药培养产生胚状体及再生植株频率的研究[J]. 马铃薯杂志,1996,10(2):74-78.

[7] 梁彦涛,邸 宏,卢翠华,等. 马铃薯花药培养影响因素的研究[J]. 东北农业大学学报,2006,37(5):604-609.

[8] 孙慧生. 马铃薯育种[M]. 北京:中国农业出版社,2003.

[9] 刘公社,李 岩,刘 凡,等. 高温对大白菜小孢子培养的影响[J]. 植物学报,1995,37(2):140-146.

[10] 庄军平,巩振辉,苏 菁. 温度对辣椒花药愈伤组织形成的影响[J]. 西北农业学报,2001,10(2):49-51.

[11] 姜丽静,卢翠华,石 瑛,等. 温度对马铃薯花药愈伤诱导率的影响[J]. 中国马铃薯,2008,22(2):88-90.