

贺苗苗. 不同基因型马铃薯的花药培养研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 90–91.

不同基因型马铃薯的花药培养研究

贺苗苗^{1,2}

(1. 青海省农林科学院, 青海西宁 810016; 2. 教育部青藏高原生物技术重点实验室/青海大学, 青海西宁 810016)

摘要:针对青海省马铃薯资源库中的 20 个资源进行花药培养研究, 结果表明: 不同基因型的马铃薯愈伤组织诱导率存在很大差异, 其中, 下寨 65 愈伤组织诱导率最高, 为 25.1%; 其次是青薯 9 号, 为 16.8%, 紫云、红云、冀张薯 12 号没有诱导出愈伤组织; 青薯 2 号、高原 4 号、青 05–12–6 的愈伤组织分别分化出再生植株, 其余品种均未分化出再生植株。

关键词:马铃薯; 花药培养; 基因型

中图分类号: S532.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2014)09–0090–02

马铃薯育种存在遗传基础狭窄、品种间亲缘关系近等问题。马铃薯花药培养是产生单倍体的主要方法, 在马铃薯育种、基础遗传学研究具有重要意义。自然界中可利用的马铃薯野生种及近缘栽培种中大部分为二倍体, 限制了野生马铃薯种质中优良基因的开发利用^[1]。因此, 通过诱导获得马铃薯单倍体是马铃薯育种成功的关键^[2–3]。我国马铃薯花药培养研究始于 20 世纪 80 年代初期, 戴朝曦等以马铃薯四倍体普通栽培种为材料, 附加不同浓度及种类的植物生长调节剂, 成功诱导了再生植株^[4]。朱明凯等^[5]、王蒂等^[6]、冉毅东等^[7–8]、贺苗苗^[9–10]对马铃薯花药培养中高温前处理、培养基中植物生长调节剂的种类及浓度等因素进行了研究。梁彦涛等^[11]、李风云等^[12]发现马铃薯花药培养对基因型依赖性很大。由于花药培养受植物基因型、培养基、花药发育时期、植物激素配比等多种因素的影响, 花药培养存在诱导频率低、植株再生率低的问题, 导致花药培养很少应用于育种实践。本研究针对青海省马铃薯资源库中的 20 个资源进行花药培养研究, 旨在为马铃薯育种提供较多的单倍体材料。

1 材料与方法

1.1 材料

青薯 2 号、高原 4 号、青 05–12–6 等 20 个马铃薯资源由青海省农林科学院生物技术研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 资源种植、花药采集 将供试材料分别种植于青海省海东市乐都区、青海省西宁市湟源县 2 个试验点, 海拔不同, 开花期也不同。6 月中旬至 9 月中旬都可以采集花药。通常 08:00–10:00 采集花药, 将花药置于冰壶中带回实验室, 在 40 倍显微镜下观察小孢子的育性、发育时期, 取小孢子处于

单核中后期的花蕾备用(图 1)。

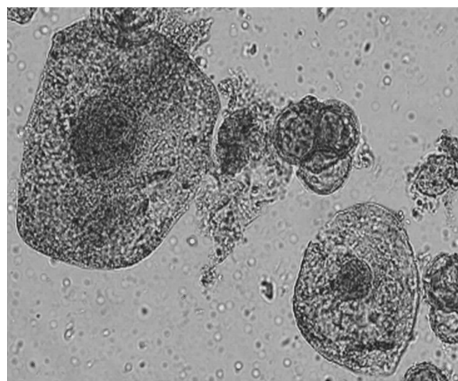


图1 马铃薯花药发育时期(单核中后期)

1.2.2 花药预处理 将花药放在 4 ℃ 冰箱中低温预处理 24~48 h, 接种后放在 35 ℃ 高温培养箱中黑暗条件下热激处理 24~48 h, 之后转入 22~25 ℃ 培养箱中暗培养。

1.2.3 消毒接种 先用流水冲洗花蕾 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, 0.1% HgCl₂ 浸泡 7~10 min, 无菌水洗 3~4 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, 每皿接种 25~30 枚花药。

1.2.4 培养基配方 诱导培养基: MS + 1.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L 2, 4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 10 mg/L AgNO₃ + 1 g/L 活性炭 + 30 g/L 蔗糖 + 0.7% 琼脂, pH 值为 5.8。分化培养基: MS + 2.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L 2, 4-D + 0.5 mg/L KT + 1 g/L 活性炭 + 30 g/L 蔗糖 + 0.7% 琼脂, pH 值为 5.8。

1.2.5 培养条件 接种后的花药经高温热处理后, 转入 22~25 ℃ 培养箱中暗培养, 待诱导出愈伤组织或胚状体后(约 20 d), 转入光照条件下(日光灯光强为 2 500 lx, 光照 16 h/d, 黑暗 8 h/d)温度为 22 ℃ 的光照培养箱中培养, 将愈伤组织或胚状体转入分化培养基中, 待分化成苗后, 转入 MS 培养基中继代繁殖。愈伤组织诱导率、再生植株分化率计算公式如下。

愈伤组织诱导率 = 诱导出愈伤组织的花药数/接种花药数 × 100%; (1)

再生植株分化率 = 分化再生植株数/愈伤组织数 × 100%。 (2)

收稿日期: 2014–05–22

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金(编号: CARS–10); 青海省科学技术厅资助项目(编号: 2011–N–506); 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。Tel: (0971) 5310129; E-mail: hemm0505@126.com。

2 结果与分析

2.1 不同基因型对马铃薯花药培养愈伤组织诱导率的影响

从表 1 可以看出,下寨 65 愈伤组织诱导率最高,达 25.1%(图 2),其次是青薯 9 号,为 16.8%。紫云、红云及冀张薯 12 号可能由于基因型及培养基不太适宜,始终没有诱导出愈伤组织。

2.2 基因型对花药培养分化再生植株的影响

不同基因型花药培养愈伤组织分化率差异很大,20 份资源中,只有青薯 2 号、高原 4 号、青 05-12-6 分化出了再生植株,其余品种均未分化出再生植株。将下寨 65 愈伤组织转到分化培养基上 20 d 后,一部分慢慢褐化,有根产生,且根生长健壮,随着时间的推移,整个愈伤组织连同根逐步变褐,最后死亡。青薯 9 号(图 3)愈伤组织表面逐渐变绿、变硬、呈菜花状,随着培养时间的延长,愈伤组织不断增大,经过几次继代培养,更换不同的分化培养基,但是均没有分化出根或芽。脱毒 175 愈伤组织转到分化培养基后迅速增大,但愈伤组织较松散,随着培养时间的延长,愈伤组织不断增大,最后变褐死亡。青薯 2 号愈伤组织在分化培养基上表面逐渐呈深绿色、变硬,分化出了再生植株,且植株健壮(图 4)。

表 1 不同基因型对花药愈伤组织诱导的影响

基因型	接种花药数 (枚)	愈伤组织 诱导数(个)	愈伤组织 诱导率(%)
青薯 9 号	800	134	16.8
青薯 2 号	600	97	16.2
青薯 168	800	72	9.0
青 05-12-6	600	49	8.2
脱毒 175	600	57	9.5
下寨 65	1300	326	25.1
高原 4 号	600	53	8.8
克新 1 号	600	51	8.5
克新 20 号	300	6	2.0
青 06-26-7	300	3	1.0
陇薯 3 号	500	18	3.6
陇薯 6 号	430	23	5.3
大西洋	460	8	1.7
夏波蒂	480	19	4.0
乐薯 1 号	200	5	2.5
费乌瑞它	300	14	4.7
冀张薯 8 号	200	3	1.5
冀张薯 12 号	120	0	0
紫云	400	0	0
红云	400	0	0

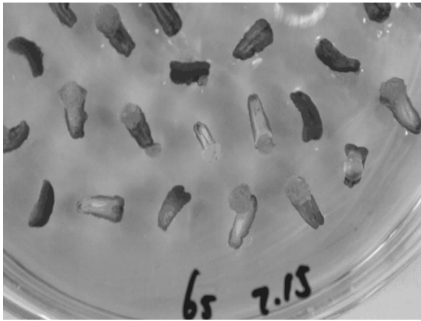


图2 下寨65暗培养下诱导出的愈伤组织

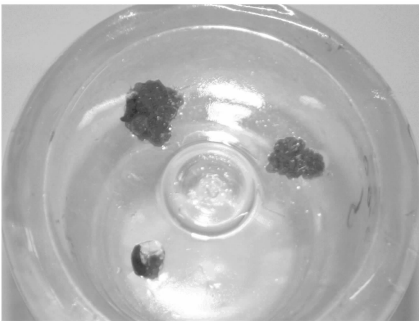


图3 青薯9号的愈伤组织

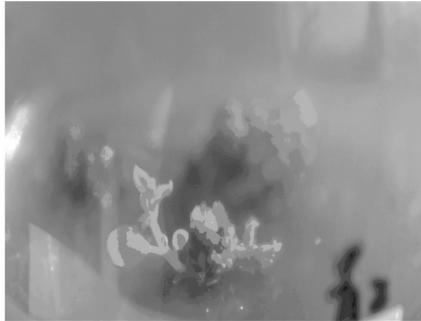


图4 青薯2号分化出再生植株

3 结论与讨论

马铃薯花药培养诱导的双单倍体植株在马铃薯育种中发挥重要的作用,由于马铃薯花药培养愈伤组织的形成受多种因素限制,植物生长调节剂、接种密度、活性炭、热激处理时间等因子都对愈伤率有影响。本研究表明,不同基因型马铃薯花药培养愈伤组织诱导率、分化率存在很大差异,这与前人研究结果^[11]一致,这可能是由于基因组内存在着某种基因,该基因可调控小孢子的发育方向,也可能是因为不同基因型的花粉小孢子对离体培养的敏感度不同。相同基因型马铃薯种植区域及采集时间不同,愈伤组织诱导率也存在明显的差异。因此,在马铃薯育种过程中,可根据育种目标先选定基因型,再根据不同的基因型筛选适宜的培养条件、培养基、添加物,以便获得更多的单倍体植株。

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] 金黎平,屈冬玉,谢开云,等. 我国马铃薯种质资源和育种技术研究进展[J]. 种子,2003(5):98-100.

[3] 李克莱. 马铃薯育种方法研究进展(一)[J]. 内蒙古大学学报:自然科学版,2000,31(3):333-337.

[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] 朱明凯,程天庆,高湘玲,等. 早熟马铃薯四倍体栽培种花药诱导成株[J]. 园艺学报,1985,12(3):177-180,218.

[6] 王 蒂,冉毅东,戴朝曦. 马铃薯花药培养中高温预处理的作用及不同基因型的反应[J]. 中国马铃薯,1990,4(3):139-143.

[7] 冉毅东,戴朝曦. 马铃薯花药培养硝酸银对诱导双单倍体及一单倍体的效果[J]. 西北农业学报,1993,2(4):43-47.

[8] 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.

[9] 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.

[10] 贺苗苗. 培养基中添加硝酸银对马铃薯花药培养的影响[J]. 陕西农业科学,2014,60(1):21-23.

[11] 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.

[12] 李风云,盛万民,田国奎,等. 不同基因型马铃薯的花药培养[J]. 中国马铃薯,2008,22(3):140-143.