第 29 卷 第 3 期
2003 年 5 月 345—348 页

作 物 学 报
ACTA AGRONOMICA SINICA

Vol. 29, No. 3
pp. 345—348 May, 2003

甘薯体细胞胚状体及其在脱毒、扩繁中的应用

王关林 方宏筠 李洪艳*

(辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029)

摘 要 通过甘薯徐薯 18 茎尖体细胞培养诱导胚性愈伤组织和胚状体, 建立了体细胞无性系。胚性愈伤和胚状体诱导培养基为 MS 附加 0.5～2.0 mg/L 2, 4-D、0.5 mg/L NAA、0.1 mg/L BA 及 100 mg/L HL。研究结果表明: 采用茎尖体细胞胚胎发生途径能够同时实现试管苗的深度脱毒及大幅度提高扩繁量, 脱病毒率达 95%, 扩繁量达 382.9 倍。田间种植该脱病毒种苗能使甘薯产量比茎尖培养试管苗提高 50%～100%。

关键词 甘薯; 体细胞胚胎发生; 脱病毒; 快繁
中图分类号: S531 **文献标识码**: A

Somatic Embryogenesis of Sweetpotato and Its Application in Virus-free and Propagation

WANG Guan-Lin FANG Hong-Jun LI Hong-Yan

(*College of Life Science of Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning* 116029, *China*)

Abstract Embryogenic callus and somatic embryogenesis were induced from the apical meristem of sweetpotato cultival Xushu 18 (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) in MS medium supplemented with 0.5—2.0 mg/L 2, 4-D, 0.5 mg/L NAA, 0.1 mg/L BA and 100 mg/L HL. The results showed that the multiplication rate of plantlets from the embryogenesis could reach 382.9 times and the virus-free rate in the plantlets was about 95%. The field experiment indicated that the yield of sweetpotato from embryogenesis plantlets were increased 50%—100% than that directly from shoottip culture.

Key words Sweetpotato; Somatic embryogenesis; Virus-free; Propagation

甘薯 (*Ipomoea batatas* L. Lam) 的主要病害是病毒病。由于甘薯无性繁殖, 带病毒的种苗传播快、发病严重, 使产量、质量急剧下降[1]。茎尖培养是目前防治甘薯病毒病的有效方法。Nielsen[2]最早采用茎尖培养方法脱除了甘薯木栓病毒。我国对甘薯茎尖培养的研究工作开展较晚, 但进展较快, 在 1993 年张慧娟[3]、杨永嘉[4]等分别报道了甘薯茎尖培养和脱毒快繁法及其大幅度增产效应, 并已进入推广应用阶段。但是至今仍然存在着两个尚需深入解决的问题: 一是脱病毒程度差。这主要是茎尖培养中, 要把茎尖剥离成为 0.1mm 以下大小十分困难, 而且成活率低。也有研究表明茎尖培养不能彻底除去病毒, 为此把最初叫无毒苗改为脱毒苗[5]。二是甘薯茎尖培养扩繁量小, 成本高。为此, 国内外学者对甘薯的细胞培养及体细胞胚胎发生进行了研究。迄今已从茎尖、叶片、茎段及块根等外植体培养诱导出体细胞胚[6]。刘庆昌等 (1993)[7]在对甘薯茎尖的组织培养中实现了高频率的体细胞胚胎发生和植株再生。1996 年他们又建立甘薯胚性细胞悬浮培养系, 并植株再生率达到 100%[8]。但是上述研究尚未进行脱毒效果的系统分析及向生产实践转化。本研究着重于以细胞培养及体细胞胚胎发生途径, 同时实现深度脱病毒和大幅度提高扩繁量, 并应用于生产实践。

* 基金项目: 辽宁省科技厅攻关项目 (990805)。
作者简介: 王关林 (1943-), 男, 博士, 教授, 博士生导师。
Received (收稿日期): 2002-03-27, Accepted (接受日期): 2002-07-10.

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

1 材料与方法

1.1 实验材料

以国内广泛种植的高产品种徐薯 18 为试材, 由辽宁师范大学生物工程研究所实验基地提供。

1.2 方法

1.2.1 甘薯茎尖体细胞培养 甘薯茎尖经常规消毒后在显微镜下剥离到 0.2～0.5mm 大小时, 迅速用解剖刀切取小于 0.1mm 的茎尖分化组织细胞, 接种在胚性细胞诱导培养基中。在暗培养条件下, 待胚性愈伤组织形成后转入胚状体诱导培养基中。形成的胚状体再转入光培养条件下的绿苗再生培养基获得丛生试管苗。胚性愈伤组织诱导培养基为MS 附加 2.0mg/L 2, 4-D、1.0～2.5mg/L NAA、0.1mg/L BA 及 100mg/L HL; 胚状体诱导培养基为 MS 附加 0.5mg/L 2, 4-D、0.5mg/L NAA、0.1mg/L BA 及 100mg/L HL; 绿苗再生培养基为 MS 附加 0.1mg/L BA、0.1mg/L IAA。培养温度 25℃, 光照 3000 lx。

1.2.2 病毒检测 脱毒试管苗筛选: 从试管苗上剪取适量叶片, 加提取液研磨, 离心后取上清液, 采用硝酸纤维素膜斑点酶联免疫检测法(Dot blot-ELISA), 按文献[5]进行筛选检测。

指示植物鉴定法: 通过Dot blot-ELISA 筛选出的脱毒试管苗, 通过嫁接到巴西牵牛(*Ipmoea setosa*), 观察病症鉴定脱毒试管苗。

1.2.3 茎尖培养 茎尖脱毒快繁培养方法按文献[1]进行。以通过Dot blot-ELISA 及指示植物检测的脱病毒试管苗为试材, 并以未脱病毒种苗为对照。茎尖培养基为MS 附加 0.1mg/L BA、0.1mg/L IAA 及 0.1mg/L GA, 生根培养基为 MS 附加 0.1mg/L IBA。

2 实验结果

2.1 甘薯茎尖体细胞培养诱导胚性愈伤组织、胚状体及其无性系建立

小于 0.1mm 的茎尖分生细胞组织, 接种在胚性愈伤组织诱导培养基上, 暗培养 3～5 周后, 可见到 1～5mm 左右大小不等的乳白色致密胚性愈伤组织(图 1)。将其转到胚状体诱导培养基上培养 4～6 周后, 在胚性细胞团的边缘诱导出许多颗粒状结构, 用立体显微镜观察时可辨认出球形胚、鱼雷胚和子叶胚(图 2)。当胚状体细胞团转入相同的培养基中继代培养时可不断扩繁, 从而产生大量的胚状体。这些胚状体细胞团转入绿苗生长培养基中培养 3～4 周可生长发育出许多丛生试管苗(图 3)。再将这些试管苗分离单独进行茎尖扩繁培养, 又可产生许多第二、三、四代(S_2、S_3、S_4)试管苗, 形成一个克隆群体, 从而建立体细胞胚状体无性系。

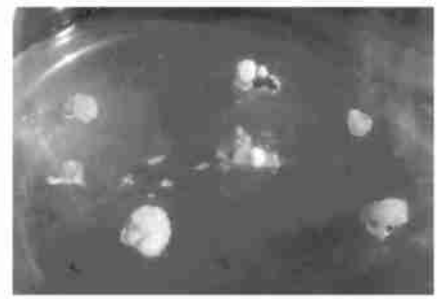

图 1 从茎尖分生组织诱导的胚性愈伤组织
Fig. 1 Embryogenic callus from apical meristem

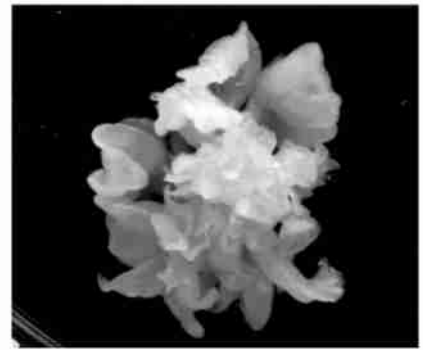

图 2 不同发育时期的体细胞胚
Fig. 2 Somatic embryos at different developmental stages

图 3 从体细胞胚分化丛生试管苗
Fig. 3 Plantlets from somatic embryos

2.2 三种扩繁途径的扩繁量比较

为了观察体细胞胚状体途径的扩繁能力, 以茎尖培养和微型扦插繁殖为对照进行比较实验。分别各接种 20 个茎尖外植体, 微型扦插成活率最高达 90%, 后两者的成活率很低, 茎尖培养成活 6 个, 而胚状体途径成活 5 个。但当扩繁培养 3 代后(S_3), 三者已发生极大的差异, 统计结果列表 1。

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

表 1　胚状体途径、茎尖培养途径及微型扦插途径扩繁量比较

Table 1　Comparison of propagation quantity among 3 propagtion methods: somatic embryogenesis, shoottip culture and microcutting

扩繁途径 Method of propagation	茎尖外植体 No. of explants of shoot			试管绿苗扩繁量(株)及倍数 No. of plantlets and propagation times					总扩繁量(W) Total No. of propagation
	接种数(个) No. planted	成活数(个) No. of survival	诱导率(%) Induced rate	S_0	S_1	S_2	S_3 数量 No.	S_3 倍数 Times	
Microcuttage culture	20	18	90	36	72	216	648	18	m (2^n～3^n)
Shoottip culture	20	6	30	15	54	189	945	63	m (3^n～5^n)
Somatic embryogenesis	20	5	25	58	960	16512	22213	382.9	m (10^n～20^n)

W: 总扩繁量(Total No. of propagation)　　m: S_0 的试管苗数量(No. of S_0)

n: 继代培养次数(Times of subculture)　　扩繁倍数= S_3/S_0 (Propagation times= S_3/S_0)

表 1 说明三代扩繁后, 微型扦插只扩繁了 S_0 的 18 倍, 茎尖培养扩繁了 63 倍, 而胚状体途径扩繁了约 382.9 倍, 微型扦插的扩繁系数为 2～3, 茎尖培养为 3～5, 而胚状体为 10～20, 当扩繁培养 1 年后按 $W = mp^n$ 计算 (n 为 12 代, p 为扩繁系数), 三者的差异十分巨大。由此可见, 产生胚状体是一条理想的扩繁途径。

2.3　三种扩繁途径的脱病毒作用比较

为分析胚状体途径扩繁试管苗的脱病毒作用, 实验中与茎尖脱毒培养进行比较, 并且以微型扦插培养为阳性对照(微型扦插不能脱病毒)。对徐薯 18 的种苗进行了检测, Dot blot-EL ISA 方法和指示植物检测都确认为带病毒植株, 主要病毒为甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)和甘薯潜隐病毒(SPLV)。带病毒苗分别进行了茎尖体细胞诱导胚状体培养、茎尖培养及直接进行试管内微型扦插培养, 获得的 S_1 代的试管苗分别进行 Dot blot-EL ISA 检测及巴西牵牛指示植物鉴定。从图 4 结果明显可见未脱毒徐薯 18 种苗呈阳性反应, 胚状体诱导的试管苗及茎尖培养的试管苗都呈阴性反应, 而微型扦插繁殖的试管苗仍然呈阳性反应。该实验结果进一步证实不能把微型扦插苗作为脱毒苗使用。将阴性反应和阳性反应的植株分别嫁接到指示植物巴西牵牛上, 培养 1 个月后可观察到带病毒试管苗致使牵牛发病而死亡, 而脱毒试管苗未使牵牛发病, 生长健壮(图 5)。这一结果也进一步表明 Dot blot-EL ISA 方法是可靠的。

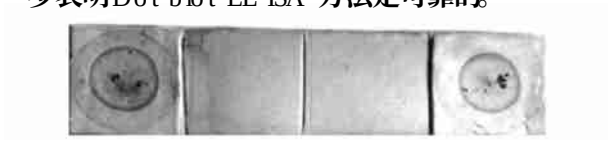

图 4　Dot blot-EL ISA 病毒检测结果

Fig. 4　The results of virus detection by dt blot-EL ISA

1. 带病毒甘薯苗　　1. Plant with virus
2. 胚状体途径的试管苗　　2. Plantlets from embryoid
3. 茎尖培养的试管苗　　3. Plantets from shoottip culture
4. 微型扦插的试管苗　　4. Plantlet from microcutting

图 5　指示植物巴西牵牛病毒检测结果

Fig. 5　The results of virus detection on the *Ipomoea setosa* plants

为了定量比较体细胞胚发生途径与茎尖培养途径脱病毒的效果, 分别取 100 株第三代的试管苗(S_3)进行了 Dot blot-EL ISA 病毒检测, 统计结果列表 2。

表 2　茎尖培养和胚状体培养的脱病毒率比较

Table 2　Comparison of virus-free rates between shoottip and embryogenesis cultures

扩繁途径 Propagation methods	检测苗数 No. of plants tested	阴性苗数 No. of negative plants	阳性苗数 No. of positive plants	中性苗数 No. of neutral plants	脱病毒率(%)* Virus-free rate (Means±SD)
Shoottip culture	100	62	21	17	62±0.4
Embryo-genesis	100	95	0	5	95±0.5

* 3 次重复检测结果　Means from 3 replicates

从表 2 可见胚状体途径的脱病毒率可达 95%。茎尖培养脱病毒率为 62%。茎尖培养的脱病毒效果与茎尖剥离大小有关, 剥离越小, 脱毒效果越好。

2.4　三种扩繁途径生产的试管苗的增产效应比较

本研究自 1998 年以来在相同的栽培和管理条件下, 连续 3 年对胚状体途径生产的脱病毒试管苗

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

进行了田间栽培实验, 并以茎尖培养途径、微型扦插繁殖的试管苗及非脱毒试管苗(常规种苗)进行对比实验。每年实验材料均为原种苗, 种植面积不断扩大, 1999 年 3.33hm^2, 2000 年 20.7hm^2, 2001 年 36.7hm^2。非脱毒试管苗对照组每年 0.67hm^2。其产量统计结果如图 6 所示。

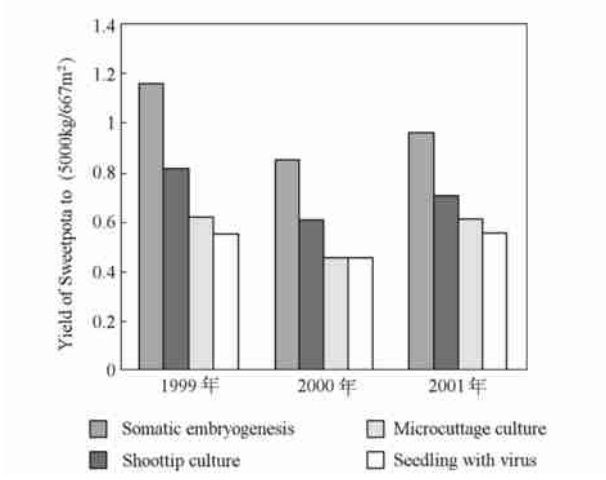

图 6 不同扩繁途径甘薯试管苗的增产效应比较

Fig. 6 Comparison of yield among various propagation methods

在 3 年实验中 2000 年大连地区干旱, 3 种扩繁途径的试管苗的产量都明显下降, 但 3 年平均, 徐薯 18 的茎尖培养脱毒苗平均 667m^2 产 3500kg, 比未脱毒苗增产 36%, 此结果与邢继英等(1993)[9]报道相似。胚状体途径扩繁的试管苗 667m^2 产达到约 5000kg, 增产 88.46%。最高产量达约 6000kg, 增产 126.49%。微型扦插扩繁的试管苗平均 667m^2 产 2800kg, 增产 0.07%。由此可见胚状体快繁途径具很大增产潜力, 如果全部采用该途径生产脱毒试管苗, 可使甘薯产量在现有水平上再上一个台阶。

2.5 茎尖体细胞胚状体发生途径试管苗的无性系变异初步分析

微型扦插和茎尖培养一般不会发生无性系变异, 遗传稳定性好。在茎尖体细胞培养诱导胚性细胞及胚状体的过程中, 细胞经历了脱分化和再分化过程, 因此可能发生变异。实验中选择两个比较稳定的性状薯皮颜色和薯肉颜色进行观察。连续 3 年都未观察到薯皮颜色变异株。薯肉颜色在 1 万余植株中仅发现 1 株从白色变成黄色。茎尖培养和微型扦插繁殖的试管苗则未观察到变异。

3 讨论

茎尖分生细胞是分化未决定细胞, 顶芽和花芽都由其分化发育而成, 因此茎尖分生细胞列入种质细胞[10]。从理论上看, 通过茎尖分生细胞培养诱导胚性细胞团和胚状体是一条理想的快繁途径, 可获得大量的胚状体及再生植株。本研究表明该途径具有如下特点: (1) 试管苗扩繁增殖量大, 比茎尖快繁增加很多倍。(2) 脱毒效果好, 能较彻底的去除原品种的内源病毒。其原因可能是 0.1mm 以下的茎尖分生细胞即可诱导胚性细胞, 或在细胞的脱分化和再分化过程中再次脱病毒, 或胚状体是单细胞起源, 而不是多细胞起源, 脱病毒较彻底。(3) 嵌合体少, 生产的试管苗整齐。(4) 高产稳定, 用该途径生产的种苗可提高产量 50%～100%。(5) 无性系变异不明显。所以茎尖体细胞培养诱导胚性细胞和胚状体途径能同时解决甘薯目前试管苗生产中存在的脱病毒率低及扩繁量小两大难题, 使甘薯从组织器官快繁水平提高到细胞水平。该途径在甘蔗的脱毒试管苗生产中已得到应用[11]。

References

[1] Zhu D-W (朱德蔚). Plant Tissue Culture and Virus-free Propagation (植物组织培养与脱毒快繁技术). Beijing: Science and Technology Press, 2001, 252—264

[2] Nielsen LW. Elimination of internal cork virus by culture apical meristem of infected sweet potatoes. *Phytopathology*, 1960, 50: 840—841

[3] Zhang H-J (张慧娟). Apical meristem culture of sweetpotato. *Shandong Normal University Acta* (山东师范大学学报), 1993, 8(2): 60

[4] Yang Y-J (杨永嘉), Discussion of virus-free of sweetpotato production system. *Chinese Sweetpotato* (中国甘薯). 1993, (5-6): 29

[5] Cao Z-Y (曹孜义), Luo G-M (刘国民). Textbook of practical Techniques on Plant Tissue (实用植物组织培养技术教程). Lanzhou: Ganshou Sci Tech Press, 1999. 295—301

[6] Lu S-Y (陆漱韵), Liu Q-C (刘庆昌), Li W-J (李惟基), Sweetpotato Breeding (甘薯育种学). Beijing: Agriculture Press, 1998. 366—375 (in Chinese)

[7] Liu Q-C (刘庆昌), Luo J-Q (罗建钦), Zhou H-Y (周海鹰) *et al*. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 1993, 1(1): 84—89

[8] Liu Q-C (刘庆昌), Lu D-H (鲁迪慧), Ma B (马彪) *et al*. Cell suspension cultures and efficient plant regeneration in sweet potato. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 1996, 4(3): 238—242

[9] Xing J-Y (邢继英), Yang Y-J (杨永嘉), Wu J-Y (邬景禹) *et al*. Studied on virus-free of sweetpotato production. *Chinese Sweetpotato* (中国甘薯), 1993, 5—6: 33—39

[10] Voisey C R, White D W R, Dudes B. Agrobactorum mediated transformation of white clover using direct shoot organogenesis. *Plant Cell Rep*, 1994, 13: 309—314

[11] He X-M (何新民). Studied on rapid propagation of sugarcane improved varieties. *Sugarcane* (甘蔗), 1994, 1(4): 3—5

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.