

马铃薯未授粉子房离体培养诱导双单体植株初探

张凤军,张永成

(青海省农林科学院/青海省马铃薯育种重点实验室,西宁 810016)

摘要:以MS培养基为基本培养基,添加不同种类和浓度的生长调节剂,离体培养8个马铃薯普通栽培种($2n=4x=48$)品种的未授粉子房,获得了‘青薯168’和‘青薯7号’的双单体小植株。花蕾4℃下预处理24~72 h的愈伤组织诱导率(51.24%~57.08%)比未预处理(9.35%)的明显提高。对‘青薯168’和‘青薯7号’而言,最佳培养基分别为MS+2-4-D 2.0 mg/L+ZT 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L和1/2 MS+GA₃ 0.5 mg/L+2-4-D 0.5 mg/L+KT 2.0 mg/L+BAP 2.0 mg/L+ZT 0.2 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 7 g/L。品种对愈伤组织分化形成小植株的影响比培养基的影响要大。

关键词:马铃薯;未授粉子房培养;离体培养;双单体植株

中图分类号:S532

文献标志码:A

论文编号:2010-1782

Induction of Dihaploid Plantlets of Potato Unpollinated Ovaries *in Vitro*

Zhang Fengjun, Zhang Yongcheng

(Qinghai Academy of Agriculture and Forestry Science/

the Key Laboratory for Potato Breeding of Qinghai Province, Xining 810016)

Abstract: Calluses and dihaploid plantlets were obtained from unpollinated ovaries of ‘Qingshu168’ and ‘Qingshu7’ by the *in vitro* culture. The buds were preprocessed at 4℃ for 24–72 h, and their callus induction rate was remarkably increased, comparing with that of non-pretreatment. The most suitable differentiation medium for ‘Qingshu168’ was MS+2–4–D 2.0 mg/L+ZT 0.1 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 7 g/L, and for ‘Qingshu7’ was 1/2 MS+GA₃ 0.5 mg/L+2–4–D 0.5 mg/L+KT 2.0 mg/L+BAP 2.0 mg/L+ZT 0.2 mg/L+sucrose 20 g/L+agar 7 g/L. It appeared that the plantlet differentiation mainly depended on cultivars.

Key words: potato; unpollinated ovaries culture; culture *in vitro*; dihaploid plantlet

0 引言

在生产上栽培的马铃薯普通栽培种(*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, $2n=4x=48$)为四倍体,遗传行为复杂,而且只占马铃薯种的11.5%^[1],遗传背景窄,基因库贫乏,育种后代变异处于近交水平,选择效率不高。又因倍性不同和杂交亲和性等原因不能直接利用二倍体野生种和近缘栽培种,严重限制了马铃薯育种。马铃薯普通栽培种产生的双单体(dihaploid, $2n=2x=24$)遗传行为与马铃薯二倍体相似,克服了倍性差异造成的不可交配性,且大部分杂交后代健壮,为马铃薯

薯育种利用二倍体资源提供了新途径。产生马铃薯普通栽培种双单体的花药离体培养诱导单雄生殖和二倍体“授粉者”诱导孤雌生殖的研究颇多,但未授粉子房离体培养亦是产生双单体植株的重要途径,虽然水稻^[4]、小麦^[5-6]、烟草^[7-8]、玉米^[9]和大麦^[10]等作物均已获得单倍体植株,并作了胚胎学和细胞学研究,而离体培养马铃薯未授粉子房诱导双单体除了陶自荣^[2-3]的相关研究外,未见其他报道。为克服二倍体“授粉者”诱导孤雌生殖因授粉条件、母本受精率差和雌性不育产生的困难及花药培养诱导孤雌生殖因小植株诱导率低、

基金项目:国家科技支撑“高产优质专用马铃薯育种技术研究及新品种选育”(2006BAD01A06-1-10);青海省重点科技攻关“马铃薯食品加工型新品种选育”(2006-N-129);国家马铃薯产业技术体系西宁综合试验站基金(zhsyz-27)。

第一作者简介:张凤军,男,1977年出生,助研,研究生,研究方向为马铃薯遗传育种。通信地址:810016 青海省西宁市宁大路253号,青海省农林科学院, Tel: 0971-5311170, E-mail: sdzhangfengjun@163.com。

通讯作者:张永成,男,1953年出生,陕西杨陵人,研究员,主要从事马铃薯遗传育种与栽培研究。

收稿日期:2010-06-10, **修回日期:**2010-07-20。

因环境条件不能开花和雄性不育等造成的障碍,提供马铃薯育种利用二倍体种野生资源、单倍体育种、培育自交系和杂种优势利用的新途径,开展了离体培养未授粉子房再生双单倍体植株的研究。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试四倍体马铃薯普通栽培种为青海省农林科学院育成的‘青薯168’、‘青薯2号’、‘青薯3号’、‘青薯5号’、‘青薯6号’、‘青薯7号’、‘青薯8号’和‘下寨65’等8个品种,除‘青薯168’和‘青薯2号’天然少量结果外,其余6个品种均无天然果^[1]。

1.2 采蕾和低温预处理

早晨8点到9点半从田间采摘6~8 mm长的花蕾,按品种用纱布包扎,用自来水冲洗40 min后置于4℃冰箱中放置0 h、24 h、48 h和72 h。

1.3 培养基

以MS培养基为基本培养基,添加不同种类和不同浓度的生长调节剂构成5种培养基,即A: MS+2-4-D 2.0 mg/L+ZT 0.1 mg/L+蔗糖30 g/L, B: 1/2 MS+GA₃ 0.5 mg/L+2-4-D 0.5 mg/L+KT 2.0 mg/L+BAP 2.0 mg/L+ZT 0.2 mg/L+蔗糖20 g/L, C: MS+GA₃ 3.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+KT 3.0 mg/L+BAP 3.0 mg/L+蔗糖20 g/L, D: MS+TDZ 0.06 mg/L+蔗糖30 g/L, E: MS+TDZ 0.08 mg/L+蔗糖30 g/L。上述培养基均加琼脂7 g/L,用1M HCL将pH调至5.8,分装培养基,每瓶30 mL,高压灭菌后待用。

1.4 接种

无菌条件下将经低温预处理的幼蕾在75%乙醇中浸泡30~60 s,0.1%升汞液中消毒10 min,灭菌水冲洗5次,用灭菌滤纸吸干沾在花蕾外表的水分,用灭菌镊子除去花药,灭菌解剖刀切下子房,接种到培养基上,子房切面接触培养基。每个品种每个预处理每种培养基接50~100瓶(依可用花蕾数量而定),每瓶接种5个未授粉子房。分化培养时则每瓶接种5块愈伤组织。

1.5 培养条件

培养温度为20~25℃,相对湿度为40%~60%(培养室内洒水保湿)。愈伤组织诱导期间光照分为散光和黑暗两种处理,分化期间日光灯光照16 h,光强约2000 lx。

1.6 壮苗和繁殖

待再生小植株长至6~7片叶时,转接到2 MS+NAA 0.1 mg/L+BAP 0.1 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂7 g/L的壮苗培养基上;长至8~10片叶时无菌条件下切成一叶茎段接种至2 MS+NAA 0.05 mg/L+BAP 0.05 mg/L+GA₃ 0.05 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂7 g/L (pH5.8)培养基上,培养温度为20~25℃,光照培养时间是16 h/天(光强2000 lx)。

1.7 染色体观察

选择生有约1 cm长的粗壮小根供染色体观察用。取样前一天将待试小苗置30℃下培养,次日9~10时取根尖置于水中,7℃左右作低温处理一夜,然后用卡诺固定液固定4~13 h,再在10%乙醇中保存。经处理的根用1 M HCl在60℃下水解15~20 min,以卡宝品红染色,压片观察。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

2.1.1 愈伤组织的产生和生长 子房接种后7~15天,在切口见到小米粒大小的愈伤组织,其形成速度因品种而异。黑暗下培养的愈伤组织多为白色,少数为淡褐色,略呈球形,部分则不规则。散光下培养的愈伤组织多为淡紫色,亦有白色和淡褐色。培养30~50天愈伤组织直径长至3~5 mm,其生长速度、颜色和质地均因品种而异。

2.1.2 低温预处理对诱导愈伤组织的影响 切离子房前对马铃薯8个品种低温预处理明显提高了子房培养愈伤组织诱导率(表1),低温预处理24 h、48 h和72 h的子房愈伤组织平均诱导率分别达到53.08%、51.24%和57.08%,而预处理0 h的子房愈伤组织平均诱导率仅

表1 低温预处理对诱导子房愈伤组织的影响

	青薯 168	青薯 2号	青薯 3号	青薯 5号	青薯 6号	青薯 7号	青薯 8号	下寨 65	平均诱 导率/%
0 h									
接种子房个数	125	180	115	105	195	155	140	110	141.2
具愈伤组织房个数	17	9	10	8	14	27	16	5	13.2
愈伤组织诱导率/%	13.52	5.00	8.69	7.52	7.12	17.24	11.43	4.54	9.35
24 h									
接种子房个数	205	395	175	185	370	160	190	150	228.9
具愈伤组织房个数	123	219	75	94	157	98	119	87	121.5
愈伤组织诱导率/%	60.00	55.99	41.14	50.27	42.44	61.25	62.63	58.00	53.08

续表1

	青薯 168	青薯 2号	青薯 3号	青薯 5号	青薯 6号	青薯 7号	青薯 8号	下寨 65	平均诱 导率/%
48 h									
接种子房个数	210	385	190	200	390	155	200	175	238.1
具愈伤组织房个数	130	223	82	104	179	120	124	96	132.2
愈伤组织诱导率/%	61.00	57.92	43.16	52.00	43.59	77.43	62.00	54.86	51.24
72 h									
接种子房个数	100	195	75	70	120	130	140	95	115.6
具愈伤组织房个数	60	157	24	39	51	72	78	47	66.0
愈伤组织诱导率/%	60.00	75.38	32.00	55.71	42.50	55.46	55.71	49.47	57.08

注:被污染的子房未计入其内(下同)。

为9.35%,故以后试验均低温预处理。

2.1.3 马铃薯品种对诱导愈伤组织的影响 马铃薯品种不同子房培养诱导愈伤组织的能力不同(见表2)。
‘青薯168’、‘青薯2号’、‘青薯7号’和‘青薯8号’等4个品种子房培养愈伤组织诱导率高,分别达51.56%、52.64%、52.83%和50.29%;其次为‘青薯5号’和‘下寨65’,愈伤组织诱导率分别为43.75%和44.34%;‘青薯6号’和‘青薯3号’则较差,愈伤组织诱导率分别为37.3%和34.41%。

2.1.4 培养基对不同品种诱导愈伤组织的影响 5种培养基对子房培养形成愈伤组织的能力不同(表3)。以8个供试品种的愈伤组织平均诱导率而言,培养基E的效果最好,愈伤组织的平均诱导率为62.16%;其次为培养基A(55.04%);虽然培养基D最差(42.28%),但与B(45.04%)和C(43.67%)两种培养基差异不明显。马铃薯不同品种的子房在同一种培养基上形成愈伤组织的能力亦不同(表3)。如‘青薯7号’在培养基E上愈伤组织诱导率最高(61.82%),但‘青薯2号’在该培养

表2 马铃薯不同品种对诱导愈伤组织的影响

	青薯168	青薯2号	青薯3号	青薯5号	青薯6号	青薯7号	青薯8号	下寨65
接种子房个数	640	1155	555	560	1075	600	670	530
具愈伤组织子房个数	330	608	191	245	401	317	337	235
愈伤组织诱导率/%	51.56	52.64	34.41	43.75	37.30	52.83	50.29	44.34

表3 不同培养基对子房形成愈伤组织的影响

	青薯168	青薯2号	青薯3号	青薯5号	青薯6号	青薯7号	青薯8号	下寨65	平均诱 导率/%
培养基E									
接种子房个数	215	230	200	155	235	220	145	120	190.0
具愈伤组织子房个数	137	149	178	82	123	136	71	69	118.1
诱导率/%	63.72	30.00	89.00	52.90	52.34	61.82	48.47	57.50	62.16
培养基A									
接种子房个数	185	180	195	135	200	170	155	100	165.0
具愈伤组织子房个数	121	101	99	74	111	93	81	64	95.5
诱导率/%	65.41	56.11	50.77	54.81	55.50	54.71	52.26	64.00	55.04
培养基B									
接种子房个数	170	195	180	165	190	205	130	135	171.2
具愈伤组织子房个数	79	87	77	73	81	107	55	58	77.1
诱导率/%	46.47	44.62	42.78	44.21	42.63	52.19	42.31	42.96	45.04
培养基C									
接种子房个数	195	200	180	185	170	190	125	120	170.6
具愈伤组织子房个数	84	91	73	65	76	88	51	68	74.5
诱导率/%	43.07	45.50	40.56	35.45	44.76	46.32	40.80	56.67	43.67
培养基D									
接种子房个数	190	210	170	120	175	170	140	110	160.6
具愈伤组织子房个数	98	93	80	55	69	56	67	51	71.1
诱导率/%	51.57	44.28	47.06	45.83	39.42	32.94	47.87	46.36	42.28

基上愈伤组织诱导率却最低(30.00%);而‘青薯168’和‘青薯6号’在培养基A上愈伤组织诱导率最高(分别为6.41%和55.50%),但前者在培养基C上愈伤组织诱导率最低(43.07%),而后者则在培养基D上最低(39.42%)。

2.1.5 光照对子房培养诱导愈伤组织的影响 根据多数供试品种在培养基E或A上愈伤组织诱导率最高,故不同光照试验则用这两种培养基,结果见表4。由表4可知,7个供试品种在这两种培养基上于黑暗和散光2种条件下愈伤组织诱导率无明显差异,只有‘青薯6号’

在培养基A上黑暗培养(66.00%)显著优于散光培养(50.27%)。

2.2 愈伤组织的分化

愈伤组织直径长至3 mm以上时转接于5种新鲜的培养基上培养,2~4周后绝大部分变褐死亡(表5),只有‘青薯168’愈伤组织在培养基B上和‘青薯7号’愈伤组织在培养基A上各分化出2株小植株,分化率分别为0.62%和0.86%。小植株生长缓慢,生长势弱,经纤细,叶少而小,根少,瘦而短,生长2个月后‘青薯7号’未授粉子房的1株小植株死亡,存活

表4 光照对子房培养形成愈伤组织的影响

		青薯168	青薯2号	青薯3号	青薯5号	青薯6号	青薯7号	青薯8号	下寨65	平均诱导率/%	
黑 暗	培养基E	接种子房个数	180	165	135	120	190	120	145	110	145.6
		具愈伤组织子房个数	70	54	76	68	97	67	74	56	70.8
		诱导率/%	41.11	32.61	56.29	56.67	51.05	55.83	51.03	50.91	47.99
	培养基A	接种子房个数	170	175	115	100	200	90	95	105	127.2
		具愈伤组织子房个数	81	89	60	49	132	50	49	69	72.7
		诱导率/%	47.65	50.85	52.17	49.00	66.00	55.56	51.58	65.71	57.15
散 光	培养基E	接种子房个数	185	190	195	130	185	85	80	100	141.3
		具愈伤组织子房个数	82	67	93	69	88	43	41	53	67.0
		诱导率/%	44.32	35.26	47.75	53.04	53.33	50.58	51.25	53.00	47.42
	培养基A	接种子房个数	155	160	105	115	185	95	110	120	119.4
		具愈伤组织子房个数	77	83	59	56	93	48	62	74	68.3
		诱导率/%	45.16	51.88	56.19	48.69	50.27	50.52	56.36	61.67	57.04

表5 不同品种愈伤组织在不同培养基上的分化率

		青薯168	青薯2号	青薯3号	青薯5号	青薯6号	青薯7号	青薯8号	下寨65
培养基E	接种愈伤组织块数	297	511	264	173	265	221	177	164
	具愈伤组织分化块数	0	0	0	0	0	0	0	0
	分化率/%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
培养基A	接种愈伤组织块数	312	406	272	194	217	234	185	178
	具愈伤组织分化块数	0	0	0	0	0	2	0	0
	分化率/%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.86	0.00	0.00
培养基B	接种愈伤组织块数	325	424	276	156	304	223	197	153
	具愈伤组织分化块数	2	0	0	0	0	0	0	0
	分化率/%	0.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.86	0.00	0.00
培养基C	接种愈伤组织块数	299	197	304	166	274	198	169	181
	具愈伤组织分化块数	0	0	0	0	0	2	0	0
	分化率/%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.86	0.00	0.00
培养基D	接种愈伤组织块数	254	342	270	147	217	197	159	132
	具愈伤组织分化块数	0	0	0	0	0	2	0	0
	分化率/%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.86	0.00	0.00

注:污染的愈伤组织未计算在内。

3株小植株根尖细胞学观察为双单体($2n=2x=24$)。

2.3 壮苗和繁殖

小植株在分化培养基上生长缓慢,待长至6~7片叶时切成带一叶的茎段,转接到壮苗培养基上,培养4~5周即长成8~10片叶健壮且根系发达的小苗,切段繁殖小苗生长快且粗壮。小苗成功栽培于温室花盆蛭石中生产了小薯,单株结薯为1~2个。

3 讨论

马铃薯不同品种未授粉子房离体培养愈伤组织诱导率不同,不论花蕾是否低温预处理或处理时间长短,均比陶自荣的结果^[2]小的多,且陶自荣的结果亦表明品种内愈伤组织诱导率差异很大。8个马铃薯品种的花蕾低温预处理均使子房愈伤组织诱导率提高5倍以上,而24~72 h的3个不同预处理间差异不大,与花药离体培养报道一致^[12],而愈伤组织诱导期间在两种最佳诱导培养基上黑暗或散光处理间差异亦不明显,故认为接种前对花蕾进行低温预处理是一项提高子房离体培养诱导愈伤组织的有效措施。

培养基不同愈伤组织诱导率明显不同,而且不同品种对不同培养基的反应亦不尽相同,最佳培养基似因品种而异。不同品种的子房愈伤组织在不同培养基上分化小植株,表明培养基中生长调节剂种类及浓度对促进不同品种愈伤组织分化小植株的效果不同,能否分化小植株似与品种的可育性无关,虽然陶自荣报道分化成苗的品种‘乌蒙601’和‘中心24’的天然结实性很强,但本试验分化成苗的品种‘青薯168’和‘青薯7号’很少自然结果或不结果,故认为未授粉子房离体培养为获得因环境条件不能开花或雄性不育品种的双单体植株提供了一种有效途径。

参考文献

- [1] 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所.中国马铃薯栽培学[M].北京:中国农业出版社,1994.
- [2] 陶自荣,刘敏颂,祝仲纯.马铃薯未授粉子房离体培养诱导双单体植株[J].遗传学报,1988,15(5):329-334.
- [3] 陶自荣,刘敏颂,祝仲纯.从马铃薯未授粉子房培养获得单倍体植株[J].遗传,1985,6(5):26.
- [4] 张祎颖,洪汝科,张锦文,等.花药培养获得优质抗稻瘟病水稻[J].西南农业学报,2008,28(1):75-79.
- [5] 刘洪梅,王和乐.小麦孤雌生殖的诱导及其在遗传育种上的应用[J].河南农业科学,2008,(3):8-11.
- [6] 张素芳,张召铎,刘植义,等.从小麦雄性不育系的未授粉子房诱导单倍体植株[J].遗传,1993,15(1):20-23.
- [7] 吴伯骥,郑国昌.从未授粉烟草子房诱导单倍体植株的细胞学和胚胎学研究[J].植物学报,1982,24(2):125-129.
- [8] 潘莉,郑奇君.烟草未授粉子房单倍体诱导及影响因素的研究[J].河南农业大学学报,1999,33(1):1.
- [9] 付迎军,任海祥,白艳凤,等.玉米未授粉子房离体培养及植株再生[J].玉米科学,2005,13(1):33-38.
- [10] 黄群飞,杨弘远,周嫦.大麦未授粉子房培养的胚胎学观察[J].植物学报,1982,24(4):295-300.
- [11] 青海省种子站编.青海省农作物品种标准汇编[M].西宁,2007:671-772.
- [12] 王玉娟,王敏生,王克兰.马铃薯花药培养简报[J].遗传,1982,2:14-19.