

抗晚疫病马铃薯的花药培养研究

陈宝辉, 蒲秀琴, 李 瑛, 王 舰*

(青海大学农林科学院, 青海 西宁 810016)

摘要:对4个品种的抗晚疫病马铃薯进行了花药培养的研究。结果表明:不同培养基对同一品种花药的总诱导数和胚状体诱导数有显著影响;在相同培养基条件下,不同品种的总诱导数差异显著,胚状体诱导数差异不显著;总诱导率最高的诱导培养基是D:MS+2,4-D2 mg/L+BAP2 mg/L+活性炭2 g/L+马铃薯块茎提取液200 g/L;适合S17、T3、KW47诱导胚状体的培养基是B:MS+NAA2 mg/L+BAP2 mg/L+活性炭2 g/L+马铃薯块茎提取液200 g/L。

关键词:马铃薯;晚疫病;花药;组织培养

中图分类号:S532 文献标识码:A 文章编号:1006-8996(2007)05-0035-04

Anther culture of late blight resistant potato

CHEN Bao-hui, PU Xiu-qin, LI Ying, WANG Jian*

(Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract: Anthers of four late blight resistant potato varieties were cultured. The results indicated that various culture medium had significant differences in total inducement and embryo inducement of the same potato, the total inducement was different in the four varieties in the same culture medium, the best medium of inducement was MS+2,4-D2 mg/L+BAP2 mg/L+AC2 g/L+200 g/L with distilled juice of potato tuber, S17, T3 and Kw47 were induced easily to form embryo on MS+NAA2 mg/L+BAP2 mg/L+AC2 g/L+200 g/L with distilled juice of potato tuber.

Key words: potato; late blight; anther; tissue culture

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是茄科双子叶植物,是世界第四大粮食作物。现有马铃薯普通栽培种的遗传基础狭窄,四倍体的常规杂交育种很难有大的突破。利用花药培养产生的双单倍体植株可以与二倍体野生种进行杂交,能够引进二倍体野生种的优良基因,为育种提供新材料。其次,单倍体和双单倍体经加倍,能获得纯合的二倍体和杂合度较小的四倍体,这对于自交几代就表现出生活力下降、自交不亲合的马铃薯来说是获得纯合体的快速、有效方法。另外,表现优良的双单倍体植株可用于与二倍体植株进行体细胞杂交,从而克服种间杂交不育的障碍,加快育种进程。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验选用的材料KW-47, KW-15来源于国际马铃薯中心, S17、T3来源于青海大学农林科学院。这些材料均在实验地种植,它们对晚疫病都表现有明显抗性,倍性鉴定均为四倍体 $2n=4x=48$,花粉活力在80%以上。

1.2 试验方法

从开花早期至盛花期采摘4~6 mm的花蕾(这时有相当数量的花粉处于单核中晚期,花蕾外观颜色

收稿日期:2007-04-05

作者简介:陈宝辉(1979—),男,辽宁朝阳人,青海大学在读硕士研究生。*通讯作者

为淡绿色)。4℃冰箱中预处理 72 h 后,将花蕾在 10% 的 84 消毒液中浸泡 30 min,无菌水冲洗 3 次,70% 酒精中浸泡 30 s,无菌水冲洗 3 次。在十倍解剖镜下拨开花蕾接种花药于不同的诱导培养基上。100 mL 三角瓶装 40 mL 诱导培养基,放 30 个花药,诱导阶段温度 19℃,光照自然光。7~8 周后将长出的胚状体和愈伤组织转移到分化培养基上,分化阶段温度 19℃,日光灯补充照明 16 h。分化培养基上的小植株长到 8~10 cm 后,在 MS 培养基上切段扩繁。茎段生根后,取根尖用卡宝品红压片镜检,进行倍性鉴定。

4 种诱导培养基分别为:

A: MS + BAP2 mg/L + 活性炭 2 g/L。

B: MS + NAA2 mg/L + BAP2 mg/L + 活性炭 2 g/L + 马铃薯块茎提取液 200 g/L。

C: MS + NAA2 mg/L + BAP2 mg/L。

D: MS + 2,4-D2 mg/L + BAP2 mg/L + 活性炭 2 g/L + 马铃薯块茎提取液 200 g/L。

所有诱导培养基均用 7 g/L 琼脂固化,蔗糖浓度为 60 g/L, pH 5.8~6.0。

分化培养基为 MS + BAP2mg/L + NAA0.1 mg/L,蔗糖 30 g/L,琼脂 7 g/L, pH 5.7~5.8。

快繁培养基:MS 基本培养基。

诱导数 = 胚状体数 + 愈伤数

总诱导率 = 胚状体数 + 愈伤数/接种的花药个数 × 100%

胚状体诱导率 = 胚状体数/胚状体数 + 愈伤数 × 100%

2 结果与分析

不同诱导培养基诱导花药的试验结果见表 1。

表 1 不同诱导培养基对花药培养的影响

品种	培养基	花药个数	愈伤个数	胚状体数	诱导数	未诱导数	胚状体诱导率(%)	总诱导率(%)
S17	A	534.00	15.00	0.00	15.00	519.00	0.00	2.81
	B	420.00	24.00	25.00	49.00	371.00	51.02	11.67
	C	506.00	6.00	1.00	7.00	499.00	14.29	1.38
	D	480.00	32.00	6.00	38.00	442.00	15.79	7.92
T3	A	560.00	20.00	0.00	20.00	540.00	0.00	3.57
	B	390.00	19.00	14.00	33.00	357.00	42.42	8.46
	C	456.00	8.00	2.00	10.00	446.00	20.00	2.19
	D	466.00	26.00	2.00	28.00	438.00	7.14	6.01
KW47	A	520.00	6.00	0.00	6.00	514.00	0.00	1.15
	B	484.00	4.00	12.00	16.00	468.00	75.00	3.31
	C	512.00	3.00	0.00	3.00	509.00	0.00	0.59
	D	476.00	12.00	3.00	15.00	461.00	20.00	3.15
KW15	A	490.00	0.00	0.00	0.00	490.00	0.00	0.00
	B	398.00	1.00	0.00	1.00	397.00	0.00	0.25
	C	568.00	0.00	0.00	0.00	568.00	0.00	0.00
	D	502.00	10.00	0.00	10.00	492.00	0.00	1.99

2.1 培养基对总诱导效果的影响

利用 χ^2 测验,分别检验不同培养基对同一品种花药诱导数是否有影响。分析表明,不同培养基对诱导效果有显著影响($p < 0.05$)。在相同品种的条件下,对 4 种培养基的诱导率两两做 t 检验($\alpha = 0.05$)。结果表明,对 S17、T3 和 KW47 而言,B 和 D 的诱导率均显著高于 A 和 B,B 和 D 之间,A 和 C 之间的差异不显著,这说明培养基 B 和 D 有利于这 3 个品种诱导率的提高;对 KW15 而言,D 显著高于其他 3 个处理,其他 3 个处理间无显著差异。

2.2 培养基对胚状体诱导效果的影响

利用 χ^2 测验,分别检验不同培养基对同一品种胚状体数和愈伤数的诱导是否有影响。结果表明,

不同培养基对胚状体数和愈伤数的诱导是有显著影响的($P < 0.05$)。在相同品种的条件下,对 4 种培养基的诱导率两两做 t 检验($\alpha = 0.05$)。结果表明,对 S17 而言,B 显著高于 A 和 D,B 和 C 之间的差异不显著,A 和 C、C 和 D、A 和 D 之间的差异不显著;对 T3 而言,B 显著高于 A 和 D,其他处理间,差异不显著;对 KW47 而言,B 显著高于其他处理,A、C、D 两两之间的差异不显著;对 KW15 而言 A 和 C 的诱导数为 0,B 和 D 之间的差异不显著。以上结果都表明,对 S17、T3、KW47 3 个品种而言,B 是最适合诱导胚状体的培养基;对 KW15 而言,4 种培养基上都没有胚状体被诱导出来。

2.3 品种对总诱导效果的影响

利用 χ^2 测验,在相同培养基条件下,检验不同品种对诱导数是否有影响。分析显示对于 4 种培养基而言,不同品种的诱导效果有显著差异($P < 0.05$)。在相同培养基的条件下,对 4 个品种的诱导率两两做 t 检验($\alpha = 0.05$)。结果表明,对于 A 培养基而言,S17 和 KW15,T3 和 KW15,T3 和 KW47 之间存在显著差异。对于 B 培养基而言,除 S17 和 T3 之间的差异不显著外,各品种间差异都显著。对于 C 培养基而言,S17 和 KW15,T3 和 KW15,T3 和 KW47 之间存在显著差异。对于 D 培养基而言,S17 和 KW47,S17 和 KW15,T3 和 KW47 之间差异显著。

2.4 品种对胚状体诱导效果的影响

利用 χ^2 测验,在相同培养基条件下,检测不同品种对胚状体数和愈伤数的诱导是否有显著影响。分析显示对于 4 种培养基而言,不同品种对胚状体的诱导没有显著影响($P > 0.05$)。

2.5 分化的结果

能够分化出苗的愈伤组织为暗绿色且比较紧密,颜色灰白的愈伤组织不能分化植株。S17 分化出 5 株小植株,T3 分化出 4 株小植株,KW47 分化出 1 株小植株(见表 2)。在各种不同来源的小植株中,从花药中直接长出的小植株表现为健壮。在本试验中得到了 2 株缺陷型植株,1 株通体白色,能长出少量的根,1 株只长成了 1cm 多的绿色茎段,没有长出叶子但能生根。

2.6 切段快繁

切段快繁后,茎段在 3 周左右即可长大成苗。快繁苗比切段前的小植株更健壮。

2.7 倍性鉴定的结果

将供体植株和分化植株在 MS 培养基上培养生根,根尖染色体镜检结果表明,供体植株都是四倍体,分化的植株既有二倍体,又有四倍体。

表 2 植株分化和倍性鉴定的结果

品 种	分化植株数	二倍体数	四倍体数
S17	5	5	0
T3	4	3	1
KW47	1	1	0
KW15	0	0	0

3 讨论

对于 4 个品种而言,总诱导率较高的培养基是 D(MS + 2,4 - D2 mg/L + BAP2 mg/L + 活性炭 2 g/L + 马铃薯块茎提取液 200 g/L)。在 S17、T3、KW47 的花药培养中,适合诱导胚状体的培养基是 B(MS + NAA2 mg/L + BAP2 mg/L + 活性炭 2 g/L + 马铃薯块茎提取液 200 g/L)。在总诱导率方面,对 S17、T3、KW47 的而言,B 培养基的效果显著好于 A,这是因为 B 中添加了 2 g/L 活性炭和 200 g/L 马铃薯块茎提取液的缘故,活性炭能吸收有毒物质,马铃薯块茎提取液可调节培养基的硬度和糖浓度,这与戴朝曦^[1],Johansson^[2]的结论一致。对 KW15 的总诱导率而言,D 培养基的效果与 B 好是由于 2,4 - D 比 NAA 更能促进了愈伤组织的诱导。在胚状体的诱导方面,除 KW15 没有胚状体诱导出来外,其他 3 个品种的最适培养基都是 D,D 与 B 相比较,说明 NAA 比 2,4 - D 更适合诱导胚状体,这与 Rihová 等^[3]的结论一致。

在相同培养基条件下,不同品种的总诱导率有显著差异,这是由于品种间基因型的不同造成的。

通过对四倍体马铃薯的花药培养获得的植株既有二倍体又有四倍体。来源于愈伤组织的四倍体植株可能是由花药壁体细胞发展来的,也可能是由下小孢子在分裂过程中自然加倍后产生的。缺陷植株可能是由于某些位点的隐性基因纯合造成的,这在已往的马铃薯花药培养的报道中还未见到^[4-6]。缺陷型植株虽然不能用于大田育种,但可作为细胞融合的材料。

参考文献:

- [1] 戴朝曦. 用花药培养法诱导马铃薯产生双单倍体的研究[J]. 科学通报, 1982, 24: 1529 - 1532.
- [2] Johansson L. Improved methods for induction of embryogenesis in anther cultures of *Solanum tuberosum*[J]. Potato Res, 1986, 29: 179 - 190.
- [3] Růhová L, Tupý J. Influence of 2,4 - D and lactose on pollen embryogenesis in anther culture of potato[J]. Plant Cell Tiss, 1996, 45: 269 - 272.
- [4] Sopory S K, Jacobsen E, Wenzel G. Production of monohaploid embryoids and plantlets in cultured anthers of *Solanum tuberosum*[J]. Plant Sci, 1978, 12: 47 - 54.
- [5] Uhrig H, Salamini F. Dihaploid plant production from 4 × genotypes of potato by the use of efficient anther plants producing tetraploid strains(4x EAPP clones) - proposal of a breeding methodology[J]. Plant Breed, 1987, 98: 228 - 235.
- [6] Rokka V M, Pietila L, Pehu E. Enhanced production of dihaploid lines via anther culture of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) clones. Am[J]. Potato J, 1966, 73: 1 - 12.

(责任编辑 杨君丽)

(上接第 34 页)

参考文献:

- [1] 刘学剑. 微量元素锌的生物学功能及其应用进展[J]. 饲料工业, 1995, 16(8): 29 - 31.
- [2] 单安山. 微量元素的生物学功能和鸡对锌的营养需要量[J]. 东北农学院学报, 1987, 18(3): 265 - 271.
- [3] 张 革. 生命元素锌与动物营养[J]. 粮食与饲料工业, 1994, (2): 19 - 23.
- [4] 梁鸿雁, 韩 华, 曲永利. 微量元素的营养研究进展[J]. 吉林畜牧兽医, 2003, (3): 3 - 4.
- [5] 王金法, 周明荣, 王宗元, 等. 铜、锌、锰、硒对肉鸡繁殖性能和生殖激素影响的研究[J]. 中国家禽, 1995, (3): 27 - 28.
- [6] 单安山, 王 安, 许振英. 饲粮锌和钙水平对产蛋鸡生产性能、血液生化指标和组织中锌含量的影响[J]. 畜牧兽医学报, 1990, 21(4): 295 - 301.
- [7] 李发弟, 康立军, 刘国庆, 等. 甘肃畜禽日粮矿物元素地理信息管理系统的研制[J]. 甘肃农业大学学报, 2000, 35(2): 142 - 145.
- [8] 苏 琪, 段玉琴, 刘金旭, 等. 我国畜禽饲料中微量元素锌含量的调查研究[J]. 中国农业科学, 1994, 27(2): 83 - 88.
- [9] 单安山, 王 安, 许振英. 产蛋鸡饲粮锌和钙水平对蛋的品质和蛋中锌含量的影响[J]. 中国动物营养学报, 1989, 1(1): 51 - 56.
- [10] 杨人齐. 不同锌源在产蛋鸡的生物学效价和应用效果比较研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2001.
- [11] 周玉传. 大豆黄酮对绍鸭产蛋性能的影响及其作用的受体机制[D]. 南京: 南京农业大学, 2003.
- [12] Abubakar N, Fu W L, Zhu X T. Effects of supplemental dietary zinc - methionine on the reproductive performance and plasma levels of estrogen and progesterone of Yuehuang broiler breeders[J]. South China Agri Uni(Natural Science Edition), 2003, 24(2): 67 - 72.

(责任编辑 李渝珍)