

马铃薯茎段愈伤组织培养体系的优化

罗 源, 陈耀锋, 李春莲, 余 玲, 任慧莉, 李映梅

(西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 以克新12号、克新13号、东农303和早大白4种马铃薯试管苗茎段为材料, 研究各品种的组织培养体系。结果发现, 克新13号和克新12号的最适愈伤组织诱导培养基为MS+30 g/L蔗糖+8 g/L琼脂+2 mg/L 6-BA+1 mg/L 2,4-D; 东农303为MS+30 g/L蔗糖+8 g/L琼脂+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D; 早大白为MS+30 g/L蔗糖+8 g/L琼脂+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D。用上述最适诱导培养基培养, 各品种的愈伤诱导率分别为100%, 100%, 100%和90%。克新13号愈伤组织分化的最佳培养基为MS+30 g/L蔗糖+8 g/L琼脂+4.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃; 克新12号和早大白为MS+30 g/L蔗糖+8 g/L琼脂+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃; 东农303为MS+30 g/L蔗糖+8 g/L琼脂+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+1.5 mg/L GA₃。用上述最适诱导培养基培养, 各品种的分化率分别为80%, 90%, 100%, 76.7%。

[关键词] 马铃薯; 克新12号; 克新13号; 东农303; 早大白; 愈伤诱导; 愈伤分化

[中图分类号] S532.035.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)09-0159-04

Optimizing for callus tissue culture system for the stem of *Solanum tuberosum*

LUO Yuan, CHEN Yao-feng, LI Chun-lian, YU Ling, REN Hui-li, LI Ying-mei

(College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Four potato cultivars, Kexin No. 12, Kexin No. 13, Dongnong303 and Zaodabai were cultivated in vitro from stem explants. The results showed that the optimal medium of callus for Kexin No. 12 and Kexin No. 13 was MS+30 g/L sucrose+8g/L agar +2 mg/L 6-BA+1 mg/L 2,4-D; Dongnong 303 was MS+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D; the optimal medium of Zaodabai was MS+30 g/L sucrose+8 g/L agar +2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D; the adventitious callus induction rate were 100%, 100%, 100% and 90%, respectively by using these optimal induced medium. The best medium for adventitious bud differentiation from stem callus was MS+30 g/L sucrose+8 g/L agar+4.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃ for Kexin13; MS+30 g/L sucrose+8 g/L agar+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃ for Kexin12; MS+30 g/L sucrose+8 g/L agar+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+1.5 mg/L GA₃ for Dongnong 303; MS+30 g/L sucrose+8 g/L agar+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃ for Zaodabai. Under these optimal induced medium, the rates of adventitious bud differentiation were 80%, 90%, 100%, and 76.7%, respectively.

Key words: potato; Kexin No. 12; Kexin No. 13; Dongnong303; Zaodabai; callus induction; callus differentiation

[收稿日期] 2006-08-13

[作者简介] 罗 源(1984-), 男, 河南信阳人, 在读硕士, 主要从事植物基因工程研究。E-mail: luoyuan3316@yahoo.com.cn

[通讯作者] 陈耀锋(1956-), 男, 陕西岐山人, 教授, 主要从事农业生物技术研究。E-mail: chenyf3828@126.com

马铃薯(*Solanum tuberosum*)为茄科茄属一年生草本双子叶植物,是重要的粮食蔬菜兼用作物。近年来,马铃薯组织和细胞培养技术发展很快。我国学者多以 MS 培养基^[1]为基本培养基,用马铃薯不同部位作为外植体进行离体培养,如中国科学院遗传研究所^[2]以 MS 为培养基培养茎尖;朱明凯等^[3]以 MS 为培养基培养花药;双宝等^[4]以 MS 为培养基培养叶片。通过离体培养和遗传转化进行马铃薯遗传改良,已成为马铃薯分子育种的重要方面^[5-6]。目前,已有通过对块茎^[7]、微型薯^[8-9]、茎段^[10-11]、叶片^[12]进行遗传转化获得转基因植株的报道,但这些研究均存在外植体再生频率低的问题。为了提高马铃薯外植体的再生频率,本试验对 4 个主栽马铃薯品种茎段组织的培养特性进行了研究,以期优化马铃薯主栽品种的离体培养再生技术体系,为马铃薯主栽品种的分子改良奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 马铃薯 供试材料为克新 12 号、克新 13 号、东农 303 和早大白 4 种马铃薯块茎,均由黑龙江省农科院马铃薯研究所国家种质克山马铃薯试管苗库惠赠。

1.1.2 试 剂 以西北农林科技大学农学院遗传工程实验室配制的 MS 培养基为基本培养基,附加 30 g/L 蔗糖和 8 g/L 琼脂作为试验用培养基。植物激素 6-BA、2,4-D、NAA、GA₃ 及其他试剂等均为上海生工生物工程公司产品。

1.3 马铃薯无菌苗的诱导

在上述 4 种材料的块茎表面芽眼周围,用针扎 4~5 个小孔,然后在 0.1 mg/L 的赤霉菌素溶液中浸泡 30 min,埋入湿沙中催芽。待芽长至 1~2 cm 时,选取生长健壮的芽,先用体积分数 75% 乙醇漂洗消毒,再用质量分数为 0.1% 氯化汞溶液消毒 5 min,无菌水冲洗 5 次,剥取茎尖,接种到附加 2 mg/L 6-BA 和 0.3 mg/L NAA 的茎尖分化培养基上,在光照强度 3000 lx、光照时间 24 h/d 的条件下培养。

1.4 马铃薯愈伤组织的诱导与继代

选取苗龄 20 d 的马铃薯无菌试管苗,切成 0.5 cm 长、不带侧芽的茎段,接种于含不同浓度细胞分裂素 6-BA 和生长素 2,4-D 的愈伤诱导培养基上,进行诱导培养。愈伤组织每 2 周继代 1 次。

1.5 马铃薯愈伤组织的分化

选取生长良好的愈伤组织,接种于含有不同浓

度细胞分裂素 6-BA、NAA 和 GA₃ 的愈伤诱导培养基上进行培养。愈伤组织分化培养基的筛选,采用 3 因素 3 水平的 L₉(3⁴) 正交试验,6-BA、NAA 和 GA₃ 为试验的 3 个因子。

2 结果与分析

2.1 不同激素比对马铃薯愈伤组织诱导率的影响

试验结果显示,接种愈伤组织后 2~3 d,茎段两端切口处便明显膨大,7 d 后可见到有愈伤组织出现,其后愈伤组织沿维管束向茎段中间生长,15 d 左右愈伤组织即可长满茎段表面。由表 1 可知,试验所使用的激素组合均能诱导 4 个马铃薯品种的茎段产生愈伤组织,但诱导率差别很大,最高可达 100%,最低仅 66.7%;克新 13 号和克新 12 号在 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+2 mg/L 6-BA+1 mg/L 2,4-D 的处理中愈伤组织量最多,诱导率最高,克新 12 号产生的愈伤组织量大于克新 13 号;东农 303 在 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D 组合处理中愈伤组织量多,诱导率高;早大白在 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D 组合处理中,愈伤组织量和生长状况均较好,早大白在各种激素组合处理中的诱导率均未达到 100%。

2.2 不同激素比对愈伤组织分化率的影响

各品种选取长势良好的愈伤组织 30 块,接入分化培养基。10 d 左右愈伤组织表面形成瘤状突起,约 30 d 即可分化出丛生芽。

由表 2 中的极差 R 可知,影响克新 13 号和克新 12 号愈伤组织分化率的因素依次为 6-BA>GA₃>NAA,而影响东农 303 和早大白愈伤组织分化率的因素依次为 6-BA>NAA>GA₃。因此,对马铃薯愈伤组织分化率影响最大的是 6-BA。

对 4 种马铃薯材料进行比较,只有东农 303 的愈伤组织分化率可达到 100%,其他 3 种材料的分化率均低于 90%,克新 13 号的分化率最低只有 33.3%。由于本试验设计时是假设 3 种因素之间无交互作用,因此,各品种愈伤组织分化的最佳激素配比为诱导率最高时的激素配比。由此可知,克新 13 号愈伤组织分化的最佳培养基为 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+4.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃;克新 12 号和早大白愈伤组织分化的最佳培养基为 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0

mg/L GA₃; 东农 303 愈伤组织分化的最佳培养基 BA + 0.1 mg/L NAA + 1.5 mg/L GA₃。
为 MS + 30 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂 + 2.0 mg/L 6-

表 1 不同激素组合对克新 13 号、克新 12 号、东农 303 和早大白茎段愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of different combinations of hormones on callus induction of Kexin

No. 13, Kexin No. 12, Dongnong 303 and Zaodabai

激素/(mg · L ⁻¹)Hormones		克新 13 号 Kexin No. 13				克新 12 号 Kexin No. 12			
6-BA	2,4-D	接种数 No. of explants	愈伤组织数 No. of calli	诱导率/% Induction rate	愈伤量 Amount of calli	接种数 No. of explants	愈伤组织数 No. of calli	诱导率/% Induction rate	愈伤量 Amount of calli
1.0	0	30	24	80.0	+	30	20	66.7	+
1.0	0.5	30	26	86.7	+	30	25	83.3	++
1.0	1.0	30	30	100.0	+++	30	27	90.0	++
2.0	0	30	22	73.3	++	30	23	76.7	+++
2.0	0.5	30	30	100.0	++	30	29	96.7	++
2.0	1.0	30	30	100.0	+++	30	30	100.0	++++
3.0	0	30	20	66.7	+++	30	27	90.0	++
3.0	0.5	30	30	100.0	++	30	30	100.0	+++
3.0	1.0	30	29	96.7	+++	30	29	96.7	++
4.0	0	30	25	83.3	+	30	24	80.0	+
4.0	0.5	30	25	83.3	++	30	26	86.7	++
4.0	1.0	30	27	90.0	++	30	26	86.7	+

激素/(mg · L ⁻¹)Hormones		东农 303 Dongnong 303				早大白 Zaodabai			
6-BA	2,4-D	接种数 No. of explants	愈伤组织数 No. of calli	诱导率/% Induction rate	愈伤量 Amount of calli	接种数 No. of explants	愈伤组织数 No. of calli	诱导率/% Induction rate	愈伤量 Amount of calli
1.0	0	30	22	73.3	+	30	20	66.7	++
1.0	0.5	30	28	93.3	++	30	23	76.7	++
1.0	1.0	30	29	96.7	+++	30	24	80.0	+++
2.0	0	30	23	76.7	+++	30	28	93.3	++
2.0	0.5	30	30	100.0	++++	30	27	90.0	+++
2.0	1.0	30	30	100.0	+++	30	27	90.0	++
3.0	0	30	21	70.0	+++	30	26	86.7	++
3.0	0.5	30	29	96.7	++++	30	23	76.7	+++
3.0	1.0	30	30	100.0	+++	30	26	86.7	+++
4.0	0	30	22	73.3	+++	30	21	70.0	++
4.0	0.5	30	27	90.0	++	30	25	83.3	+++
4.0	1.0	30	24	80.0	++	30	24	80.0	+

注：“+”越多表示愈伤组织量越多。

Note: More “+” means more calli produced

表 2 不同激素组合对马铃薯茎段愈伤组织分化的影响

Table 2 Effect of different combinations of hormones on differentiation

序号 Sequence	激素/(mg · L ⁻¹)Hormones			分化率/%Induction rate			
	6-BA	NAA	GA ₃	克新 13 号 Kexin No. 13	克新 12 号 Kexin No. 12	东农 303 Dongnong 303	早大白 Zaodabai
1	1.0	0.1	0.5	33.3	50.0	66.7	40.0
2	1.0	0.5	1.0	43.3	66.7	83.3	53.3
3	1.0	1.0	1.5	50.0	36.7	83.3	66.7
4	2.0	0.1	1.5	63.3	86.7	100.0	66.7
5	2.0	0.5	1.0	66.7	90.0	96.7	76.7
6	2.0	1.0	0.5	56.7	76.7	80.0	66.7
7	4.0	0.1	1.0	80.0	60.0	46.7	50.0
8	4.0	0.5	1.5	76.7	76.7	53.3	63.3
9	4.0	1.0	0.5	66.7	80.0	46.7	53.3
极差 Variance	32.267 33.334 49.233 17.000	4.433 13.333 6.967 12.000	10.000 15.567 4.434 8.000	R	R	R	R

3 讨 论

在植物组织培养过程中,基因型不同是影响试验结果的一个重要因素。本研究曾参考前人研究获得的培养基配方^[8-9]进行试验,但是效果很不理想,几乎没有愈伤组织形成,且形成的愈伤组织量少,特别是愈伤组织诱导再生不定芽,将形成的愈伤组织接种到愈伤组织分化培养基上时,愈伤组织易生根死亡。本试验对克新 12 号、克新 13 号、东农 303 和早大白 4 个马铃薯品种的愈伤组织诱导及其不定芽分化的培养基进行了探讨,结果表明,克新 12 号和克新 13 号的愈伤组织诱导培养基配方为 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+2 mg/L 6-BA+1 mg/L 2,4-D,东农 303 为 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D,早大白为 MS+30g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D;克新 13 号愈伤组织分化的最佳培养基为 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+4.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃,克新 12 号和早大白为 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃,东农 303 为 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+1.5 mg/L GA₃。本试验结果与前人的研究结果^[8-9]差异很大,其原因是由于试验过程中使用了不同基因型的马铃薯。另外,本试验还发现,不同的实验材料,其最适培养基亦不相同,其中东农 303 的愈伤组织诱导率、愈伤组织量、愈伤分化率均高于其他 3 个马铃薯品种,这与东农 303 被广泛地用于马铃薯组织培养和转基因研究^[10,13]的情况相符。

在离体条件下,植物激素对马铃薯茎段愈伤组织的诱导、继代和分化起着重要作用。高浓度的生长素和细胞分裂素配比有利于愈伤组织的诱导,而低浓度的生长素和细胞分裂素配比则有利于愈伤组

织的分化。本试验结果表明,对马铃薯愈伤组织分化起主要作用的是 6-BA,这与李娟等^[14]的报道一致。

[参考文献]

- [1] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15: 473-497.
- [2] 中国科学院遗传研究所组织培养室三室五组. 离体培养马铃薯茎顶端(或腋芽)生长点的初步研究[J]. *遗传学报*, 1976, 3(1): 51-55.
- [3] 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.
- [4] 双宝, 李文美, 李文滨, 等. 马铃薯优化再生系统的建立[J]. *马铃薯杂志*, 1995, 9(3): 134-138.
- [5] 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, 4: 220-224.
- [6] 王永锋, 栾雨时. 马铃薯转基因研究进展[J]. *中国马铃薯*, 2004, 4: 227-231.
- [7] 杨美珠, 潘乃穰, 陈章良. 高效马铃薯遗传转化体系的建立及甜蛋白基因的导入[J]. *植物学报*, 1992, 34: 31-36.
- [8] 宋艳茹, 李 枳, 侯林林, 等. 双价外壳蛋白基因植物表达载体的构建及马铃薯转基因植株的鉴定[J]. *植物学报*, 1994, 11: 842-848.
- [9] 崔晓江, 彭学贤, 周雪荣, 等. 3 价转病毒外壳蛋白基因马铃薯的获得[J]. *科学通报*, 1994, 21.
- [10] 吴建祥, 周继勇, 周雪平. 转禽冠状病毒免疫源基因马铃薯及其对小鼠的免疫原性[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2003, 11: 1011-1015.
- [11] Hyun S K, Joung W E, Mi S K, et al. Expression of human β -amyloid peptide in transgenic potato[J]. *Plant Science*, 2003, 165: 1445-1451.
- [12] 周壮志, 周永刚, 何朝族, 等. Cry3A 和 vhb 基因在转基因马铃薯种的表达[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2004, 8: 741-745.
- [13] 于凤丽, 卢翠华, 李文斌, 等. 利用农杆菌介导法将 PVA-CP 基因导入马铃薯品种东农 303 的研究[J]. *中国马铃薯*, 2005, 2: 77-81.
- [14] 李 娟, 程智慧, 张国裕. 马铃薯叶片高效再生体系的建立[J]. *西北植物学报*, 2004, 24: 610-614.