

中图分类号：S532 文献标识码：B 文章编号：1672-3635 (2012) 05-0307-03

马铃薯愈伤组织再生体系的研究进展

方贯娜，庞淑敏*

(郑州市蔬菜研究所，河南 郑州 450015)

摘 要：马铃薯愈伤组织再生体系的建立是进行马铃薯遗传转化的基础。外植体选择、培养基配方以及培养过程中褐化的控制等都是影响愈伤组织诱导和再生体系建立的关键因素。本文主要从愈伤组织诱导、愈伤组织继代和分化三个阶段进行详细总结，并提出愈伤组织诱导，建立再生体系中存在的问题及今后的研究方向，以期为建立马铃薯愈伤组织再生体系提供理论参考和技术借鉴。

关键词：马铃薯；愈伤组织；再生体系

Research Progress on Callus Regeneration System of Potato

FANG Guanna, PANG Shumin*

(Zhengzhou Vegetable Research Institute, Zhengzhou, Henan 450015, China)

Abstract: Callus regeneration system of potato was established, which was the base for potato genetic transformation. Explant selection, medium formula and browning control of culture process are key factors influencing the callus inducement and the regeneration system establishment. This paper summarized the three phase of callus inducement, subculture and differentiation. It raised some questions and gave future research direction about the callus inducement and establishment of callus regeneration system. It would provide theoretical and technical references for establishing the callus regeneration system of potato.

Key Words: potato; callus; regeneration system

收稿日期：2012-05-14

基金项目：脱毒马铃薯试管薯工厂化繁育技术研究(河南省农业厅专项资金项目，豫财建 2010623 号)。

作者简介：方贯娜(1978-)，女，助理研究员，主要从事马铃薯组织培养工作。

* 通信作者 (Corresponding author)：庞淑敏，研究员，主要从事马铃薯脱毒技术及产业化应用研究，E-mail: psmm9508@126.com。

马铃薯商品率和减少病烂薯率具有很好的效果。

本试验综合品种特性和药剂防治指出，‘荷兰7’，‘黄麻子’、‘荷兰15’和‘尤金’为马铃薯晚疫病易感品种，因此田间管理要提前预防马铃薯晚疫病的发生。‘克新18号’、‘麦肯’、‘克新13号’、‘延薯4号’、‘中兴202’、‘L1-5’、‘夏波蒂’和‘克新1号’对马铃薯晚疫病具有一定抵抗能力，病害发生初期施药可以有效的控制病害扩展。经过多年田间马铃薯晚疫病防治试验发现，本地区现使用的马铃薯晚疫病药剂防治指示品种‘荷兰7’与‘荷兰15’由于这两个品种是马铃薯晚疫病感病品种，田间发病后病害扩展迅速，施药后不能够明显控制病害，并且药剂处理之间病害扩展差异不明显，通过田间调查发现‘克新1号’品种较抗马铃薯晚疫病，并且喷施马铃薯晚疫病防治药剂

后各处理之间病害扩展程度明显，比较适合作为本地区马铃薯晚疫病药剂防治的指示品种。

[参 考 文 献]

- [1] 汤凤兰, 朱长波, 李敏, 等. 寒地马铃薯“宽高密”高产栽培模式示范与应用[J]. 中国马铃薯, 2011, 25(4): 227-228.
- [2] 鲁绍凤, 杨艳丽, 胡先奇, 等. 云南省马铃薯主栽品种对晚疫病的抗性分析[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(5): 586-590.
- [3] 金光辉, 吕文河. 俄罗斯马铃薯资源在黑龙江省的晚疫病田间自然抗性评价[J]. 作物杂志, 2008(1): 79-82.
- [4] 王信, 程亮, 郭青云. 青海省马铃薯品种对晚疫病病菌的抗性分析[J]. 中国马铃薯, 2011, 25(4): 238-241.
- [5] 姚裕琪, 巩秀峰, 高奇华, 等. 马铃薯品种对晚疫病的抗性评价[J]. 福建农业科技, 2001(4): 5-6.
- [6] 葛林钦, 余光海, 龙坤云, 等. 马铃薯晚疫病药剂防治试验研究[J]. 中国马铃薯, 2010, 24(1): 31-33.

马铃薯是世界五大粮食作物之一, 属粮菜兼用型作物, 我国种植面积位于世界第一位。马铃薯是植物组织培养和细胞培养的模式作物之一, 其组织和细胞培养技术已经比较完善, 尤其是在脱毒快繁上已经形成产业化并取得了很好的经济效益。目前, 我国在马铃薯细胞和组织培养上已经取得较多成果, 本文对通过利用马铃薯愈伤组织建立再生体系这一方面取得的成绩进行简要总结和评述。

1 愈伤组织诱导

1.1 外植体

愈伤组织中的每个细胞均来自于外植体。从理论上来说, 几乎植物的任何部位都能离体培养而被诱导产生愈伤组织, 但是, 不同植物、同一植物的不同基因型或者同一基因型的不同部位被诱导而产生愈伤组织的能力是不同的, 有时甚至会有显著差异^[1]。材料的基因型对愈伤组织的器官分化具有决定性的作用^[2], 每一个马铃薯品种通过离体培养均能诱导出愈伤组织。张耀辉等^[3]通过对12个不同品种进行愈伤组织诱导表明, 不同品种基因型不同, 形成愈伤组织和芽分化的能力不同, 诱导率越高的愈伤组织, 质量往往越好。但马铃薯作为受体进行遗传转化时, 选择高植株再生率的外植体类型可能比选择基因型更为重要^[4]。目前马铃薯愈伤组织诱导选择的外植体主要有茎段、叶片、块茎、茎尖、根等。前人研究表明, 茎段和叶片在马铃薯愈伤组织诱导中使用最为频繁^[4-7], 其中茎段愈伤组织的发生率普遍高于叶片^[4,8,9]。由于愈伤组织是指在一定条件下从外植体的切口部位生成的脱分化的薄壁细胞团^[10], 因此, 半叶的出愈时间和愈伤组织生长速度与全叶相比大大提前^[9]。

另外, 外植体年龄对愈伤组织诱导也有一定的影响。生理年龄越轻的外植体比年龄老的分化出再生植株的潜力大, 变异率低^[11]。用试管苗作为外植体进行愈伤组织诱导, 随着苗龄的增加, 芽的分化率先呈上升之势, 5~6周龄达到最高, 7周龄逐渐下降^[12]。进行愈伤组织诱导时, 同时也应考虑外植体的大小对诱导率的影响。双宝等^[13]研究认为: 0.5 cm 长的茎、0.5 cm 大的叶盘和块茎盘(厚度为 0.3 cm) 明显比其它大小的外植体的诱导率高。但就不同外

植体而言, 其适于植株再生的大小有差别。因此, 进行愈伤组织诱导时, 茎最佳长度为 0.5 cm, 而块茎最佳大小为 0.25 cm × 0.3 cm, 叶片为 0.5 cm²。如果外植体过小, 易产生褐变, 还会减弱愈伤组织的能力^[14]。

1.2 培养基

培养基不同对同一外植体诱导愈伤组织的效果是有差异的, 培养基主要包括基本培养基类型及各种添加物。马铃薯愈伤组织诱导建立再生植株使用的基本培养基通常为 MS 培养基。培养基中的添加物有很多, 如椰乳、水解酪蛋白等, 但因重复率低并不常用^[15], 因此在培养基中起决定作用的仍然是植物生长激素, 特别是生长素和细胞分裂素的配比^[2]。马铃薯愈伤组织诱导中使用的生长素主要有 NAA、IAA、2,4-D 等^[5,6,16,17], 细胞分裂素主要有 6-BA、KT、ZT 等^[4,18-20], 但以 6-BA 使用最为频繁^[5-7,8,16,20]。研究表明, 高于 2.0 mg/L 的激素浓度会产生体积过大、膨松、褐变的非胚性愈伤组织^[7,18]。同一浓度下 2,4-D 诱导愈伤组织的能力优于 NAA, 且导致细胞染色体加倍的能力强于 NAA, 随二者浓度的增高, 加倍率明显提高, 且混倍想象也明显提高^[21]。同时, 研究还表明, 同一浓度的 NAA 对马铃薯叶片愈伤组织的诱导效果要好于同一浓度的 IAA^[17], 而且 NAA 可以使马铃薯的愈伤组织直接分化成试管薯^[22]。黄雪丽等^[23]研究表明, 在培养基中添加适宜浓度 (0.01~1.0 mg/L) 的 PP₃₃₃, 可以提高马铃薯叶片和茎段愈伤组织的诱导率, 并能改善愈伤组织的质量, 过高浓度抑制愈伤组织的诱导且诱导质量大大降低, 当浓度达到 10 mg/L 时, 愈伤量极少且质量较差。

2 愈伤组织褐化的控制

在植物愈伤组织及细胞培养过程中常常发生褐变现象, 轻者影响细胞生长和繁殖, 重者导致细胞死亡^[10]。引起组织褐化的根本原因是组织块内的酚类化合物在合适的 pH 值、温度等条件下, 发生氧化反应, 形成有毒的醌类化合物, 切口表面迅速变成褐色或棕色。这些醌类化合物扩散到培养基中, 可以抑制其他酶的活性, 毒害整个外植体, 同时污染培养基, 阻遏组织培养的进程^[24,25]。在马铃薯愈伤组织诱导过程中, 褐化现象也是难以克服的技术难题。目前, 在培养基中加入抗氧化剂(防褐剂)

是减轻褐化的有效手段^[26]。龚晓洁^[27]研究发现,马铃薯愈伤组织诱导过程中在培养基 1/2 MS + 0.3% 琼脂 + 1.5% 蔗糖 + 1.0 mg/L NAA + 2.0 mg/L 2,4-D 中加入 2.0 mg/L 硫代硫酸钠和 8.0 mg/L 柠檬酸的防褐效果较好。而田爱梅和王国强^[28]研究指出, 5.0 mg/L 维生素 C 效果最好, 改良的 DKW 为基本培养基。

植物组织培养褐变现象往往是受多种因素综合作用的结果, 因此, 除了在培养基中加入抗氧化剂可以抑制褐化外, 改善培养条件比如选择合适的外植体、调节培养基配方以及把握好合适的继代时间都会有有效的控制褐化现象的产生。由于温度、光照及转瓶周期等都对试验有影响, 所以开始时将马铃薯置于低温保存, 使其多酚氧化酶活性降到最低, 同时培养时置于黑暗低温中也是这个目的, 使一些受光诱导的多酚氧化酶处于失活状态^[27]。培养基越稀, 越有利于醌类的扩散, 所以应减少糖、盐和凝固剂的含量^[28]。外植体的大小也是一个重要的因素, 外植体越大, 相对创伤面积就越小, 褐类物质的分布密度就越小。在愈伤组织诱导过程中及时转瓶更换新鲜的培养基可以减少酚类物质的含量, 降低褐化现象的发生几率。

3 愈伤组织的继代及再生植株的分化

3.1 愈伤组织继代

愈伤组织随外植体生长一段时间后需要进行继代培养, 以避免代谢产物的积累及水分散失等因素影响其继续生长。继代培养间隔的时间对愈伤组织的生长有一定影响。继代时间过短不利于愈伤组织的诱导分化, 一般控制在 7~10 d。此时, 既可及时清除积累的醌类, 防止外植体因有毒物质的沉积而生长滞慢, 又不会影响外植体的正常生长^[27]。但也有研究发现间隔 20~25 d 左右继代培养, 愈伤组织生长快, 状态佳, 色泽好, 培养基清亮透明^[29]。超过 30 d, 愈伤组织细胞老化, 活力下降, 生长速度降低, 褐化率增高, 影响再生植株的形成^[9]。另外, 愈伤组织继代时, 应挑选生长旺盛、结构疏松的新鲜愈伤组织。同时, 试验还发现, 不同状态的愈伤组织在继代中的表现各异, 茎段愈伤组织成活率高, 生长旺盛, 茎尖愈伤组织疏松部分, 继代不易成活, 褐化率高; 叶片愈伤组织质地坚密, 继代后生长缓慢^[9]。随着继代次数的增加, 愈伤组织生长

速度逐渐加快, 说明在继代过程中, 病毒被逐渐稀释或排除了。

3.2 愈伤组织分化

影响愈伤组织分化的主要因素是激素的种类、浓度。低浓度的生长素和细胞分裂素配比有利于愈伤组织分化, 对马铃薯愈伤组织分化起主要作用的是 6-BA^[30,31], 同一 6-BA 浓度下, 随着 NAA 浓度的增加, 芽长也相应增加, 但其浓度过高不利于芽的分化^[32]。6-BA 与 NAA 的作用效果好于它与 GA₃ 作用的效果, GA₃ 对苗的分化和伸长有明显促进作用。生长素与细胞分裂素比值高, 易形成粗壮的根; 两者比值低, 易分化成芽。细胞分裂素高易形成丛芽; 细胞分裂素低易形成单芽^[9]。王萍在马铃薯愈伤组织诱导中用 ZT, 试验发现, 培养基中添加 ZT 2 mg/L + IAA 1 mg/L 对芽诱导率较低的幼叶与种薯块茎诱导效果较好, 当 6-BA 1 mg/L + IAA 0.5 mg/L 再加 ZT 1 mg/L 时, 对‘东农 303’茎段的芽诱导效果很好, 并且每个茎段上再生苗也多^[4]。在分化培养基中加入 100 mg/L 硫酸腺嘌呤 (Adenine sulfate) 和 100 mg/L 水解乳蛋白, 有利于愈伤组织生长和苗分化^[33]。

不同品种基因型不同, 形成愈伤组织和芽分化的能力显著不同, 愈伤组织诱导高的品种, 分化潜力不一定高^[3]。同一个基因型不同外植体的分化率差别较大, 暗示马铃薯作为受体进行遗传转化时, 选择高植株再生率的外植体类型可能比选择基因型更重要^[4]。

4 培养条件

马铃薯愈伤组织诱导培养条件一般选择光照为 2 000~3 000 lx, 光照时间 12~14 h/d, 温度 23~25℃ 下进行^[34~36]。姚铮等用‘春薯 4 号’进行愈伤诱导发现, 在同一培养基和低温 (19 ± 1℃) 条件下, 光照强度对愈伤组织的诱导有较大的影响。光照强度为 4 000 lx 条件下, 低温 (19 ± 1℃) 有利于试管苗的诱导, 与常温状态下芽的诱导率差异显著^[12]。

5 小 结

近年来, 马铃薯组织和细胞培养技术发展很快。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^[37]。目前, 通过愈伤组织诱导再生植株的研究大部分仍局限于

外植体、基因型以及激素对诱导效果的影响, 有机成分、培养基的物理性质以及培养条件的改善等方面的研究报道较少, 并且外植体再生频率低仍是目前存在的主要问题。今后, 应根据不同的研究目的, 选择不同基因型的马铃薯外植体作材料, 通过最佳培养基配比以及培养条件等的改善, 以期优化各品种的再生技术体系, 最大限度的提高再生频率, 为马铃薯分子育种、生产脱毒苗以及基因工程等技术提供有力的技术保障。

[参 考 文 献]

- [1] 元英进, 葛志强. 植物细胞培养工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 36-41.
- [2] 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990: 190-201.
- [3] 张耀辉, 尹江, 马恢, 等. 马铃薯耐盐碱愈伤组织筛选及分化研究[J]. 中国马铃薯, 2005, 19(5): 273-275.
- [4] 王萍, 王罡, 季静. 马铃薯两个基因型不同外植体的组织培养与植株再生[J]. 中国马铃薯, 2006, 20(6): 326-328.
- [5] 邱祜, 陶刚, 朱英, 等. 马铃薯品种茎段愈伤组织诱导和植株再生的研究[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(10): 11-13.
- [6] 柳蓉. 马铃薯的再生及再生植株遗传稳定性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007.
- [7] 卢翠华, 秦昕, 武小霞, 等. 马铃薯极早熟品种东农 303 再生系统的筛选[J]. 中国马铃薯, 2001, 15(4): 280-281.
- [8] 李娟. 马铃薯愈伤组织培养和耐盐突变体的离体筛选[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003.
- [9] 杨春, 王桂梅. 愈伤组织再生马铃薯脱毒苗生产体系的建立[J]. 中国马铃薯, 2008, 22(3): 137-139.
- [10] 郭勇, 崔堂兵, 谢秀祯. 植物细胞培养技术与应用[M]. 北京: 北京工业出版社, 2004: 21-24.
- [11] 张东方. 植物组织培养技术[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2004: 70-71.
- [12] 嫣铮, 郭德章. 马铃薯叶片植株再生系统的建立[J]. 广西农业科学, 2005, 36(3): 199-200.
- [13] 双宝, 李文芙, 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.
- [14] 齐恩芳. 再生体系建立及农杆菌介导 AcInv 反义基因转化[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2006: 25-26.
- [15] 刘青林, 马祎, 郑玉梅. 花卉组织培养[M]. 北京: 农业出版社, 2003: 23-24.
- [16] 李晶. 马铃薯再生体系的建立及遗传转化的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2003.
- [17] 姜国勇, 薛静, 张玉娜. 马铃薯转化体系中愈伤组织的诱导效应[J]. 莱阳农学院学报, 1998(3): 22-24.
- [18] 董颖苹, 黄萍, 颜谦, 等. 几个马铃薯栽培种的茎段愈伤组织诱导[J]. 贵州农业科学, 2005, 33(5): 24-26.
- [19] 张永祥, 华静月, 何礼远, 等. 马铃薯叶盘愈伤组织再生苗抗青枯病变异株的筛选[J]. 马铃薯杂志, 1993, 7(1): 22-26.
- [20] 华婧. 马铃薯高频再生体系建立及离体茎尖诱变筛选耐盐突变体的研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2008.
- [21] 王清, 王蒂, 戴朝曦, 等. 蔡乙酸、2,4-D 对马铃薯愈伤组织细胞染色体倍性的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 1997, 32(4): 304-307.
- [22] 栾时雨, 徐品三, 夏秀英, 等. 适于马铃薯茎段再生的植物激素配比选择[J]. 中国马铃薯, 2004, 18(3): 143-144.
- [23] 黄雪丽, 潘庆明, 倪苏, 等. PP₃₃₃ 对马铃薯试管叶片与茎段愈伤组织诱导与分化的影响[J]. 中国马铃薯, 2009, 23(2): 87-89.
- [24] 周俊辉, 周家, 曾浩森, 等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J]. 园艺学报, 2000, 27(S1): 481-486.
- [25] 张淑红, 王蒂, 王清. 影响马铃薯叶肉原生质体褐化的因素及 AgNO₃ 对其褐化和分裂的作用[J]. 中国马铃薯, 2004, 18(2): 77-81.
- [26] 何松林, 陈笑蕾, 陈莉, 等. 牡丹叶柄离体培养中褐化防止的初步研究[J]. 河南科学, 2005, 23(1): 47-50.
- [27] 龚晓洁. 几种防褐剂对马铃薯愈伤组织培养褐化现象的抑制效应[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(22): 10-12.
- [28] 田爱梅, 王国强. 实生核桃茎段的组织培养及影响因子的研究[J]. 三峡大学学报: 自然科学版, 2002(4): 375-378.
- [29] 卢翠华, 陈伊里, 石瑛, 等. 马铃薯不同品种再生系统的筛选初报[M]//陈伊里, 屈冬玉. 高新技术与马铃薯产业. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2002.
- [30] 罗源, 陈耀锋, 李春莲, 等. 马铃薯茎段愈伤组织培养体系的优化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(10): 159-162.
- [31] 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.
- [32] 张玲. 马铃薯组织培养技术研究[J]. 西南科技大学学报, 2004, 19(1): 88-89.
- [33] 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, 14(4): 220-223.
- [34] 贺学勤, 蒙美莲, 李巧玲. 马铃薯品种大西洋试管苗愈伤诱导研究[J]. 北方园艺, 2009(2): 101-103.
- [35] 李凤云, 盛万民, 于天峰, 等. 马铃薯不同品种茎段再生系统的筛选[J]. 中国农学通报, 2005, 21(8): 99-100.
- [36] 陈爱芹, 艾辛. 紫外线辐照对马铃薯茎段愈伤组织及其再生植株的影响[J]. 长江蔬菜(学术版), 2010, 22: 12-16.
- [37] 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.