

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2008)03-0137-03

# 愈伤组织再生马铃薯脱毒苗生产体系的建立

杨春, 王桂梅

(山西省农业科学院高寒作物研究所, 山西 大同 037008)

**摘要:** 以马铃薯茎尖、茎段、全叶、半叶为外植体, 进行愈伤组织的诱导、继代、根芽分化和植株再生的研究, 建立马铃薯脱毒再生体系。结果表明: (1) 马铃薯茎尖、茎段、半叶、全叶在 MS+6-BA1.5 mg·L<sup>-1</sup>+NAA1 mg·L<sup>-1</sup>+3%蔗糖+0.6%琼脂培养基中, 愈伤组织诱导率分别达到 97.3%、75.6%、96.8%、97.4%; (2) 在 MS+6-BA1.5mg·L<sup>-1</sup>(或 ZT2.0 mg·L<sup>-1</sup>)+NAA0.5 mg·L<sup>-1</sup>+GA<sub>3</sub> 5 mg·L<sup>-1</sup>+3%蔗糖+0.6%琼脂培养基中不同外植体芽诱导率在 15.4%~67.7%, 根的分化率 21.3%~88.2%。

**关键词:** 马铃薯; 外植体; 愈伤组织; 再生苗

茎尖培养是世界各地生产脱毒马铃薯最主要的方法。利用 0.1 mm 以下生长点, 培养时间长, 成活率低, 目前多用 0.1~0.5 mm 大小生长点培养, 虽然用时缩短, 成活率提高, 但无毒苗出现的几率降低。

愈伤组织细胞分裂快于病毒复制, 从愈伤组织中分裂的细胞有些是无病毒的; 在愈伤组织的培养中发现, 带病毒的愈伤组织生长缓慢, 不带病毒的愈伤组织生长很快<sup>[1]</sup>, 通过 3~5 次有选择继代培养, 愈伤组织中分裂出的细胞, 大部分是无病毒的, 而无病毒细胞再生植株的成株率大于带病毒细胞。因此用愈伤组织诱导马铃薯脱毒苗是更有效的方法之一。

通过 3~5 次继代培养, 能获得很多优质的愈伤组织, 每瓶愈伤组织能诱导一株或一簇再生芽。由于病毒在植物体内主要是通过导管和筛管传播的, 通过细胞壁和胞间连丝传播的很慢。因此同茎尖脱毒相比, 愈伤组织诱导再生马铃薯植株, 具有脱毒效果好、数量多、速度快、成苗率高、成本低等特点。用愈伤组织诱导脱毒苗具有连续性, 即使病毒脱不尽, 还可以继续继代、继续诱导, 而茎尖脱毒如果脱不尽, 只能淘汰, 重新脱毒。

收稿日期: 2007-06-27

基金项目: 山西省农科院青年基金项目。

作者简介: 杨春(1967-), 男, 助理研究员, 从事马铃薯育种与种薯开发。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

从田间选取具有原品种特性的典型植株(紫花白), 剪切顶端部分, 用自来水冲洗干净, 在超净工作台上, 用 70%的乙醇浸泡 10 s, 再在 0.1%的氯化汞中浸泡 10~15 min, 然后用无菌水漂洗 3~5 次, 切取 5~7 mm 不同大小的外植体接种到 MS 培养基上, 附加不同浓度的 6-BA、ZT、NAA、2, 4-D 等, 3%蔗糖, 0.6%琼脂, pH 5.8。置于室内散射光下自然生长。

### 1.2 愈伤组织的诱导

将充分洗净、消毒的供试品种的茎尖、茎段、叶片(半叶、全叶)分别接在 4 种不同的培养基(表 1)上进行愈伤组织的诱导。每处理 3 瓶, 观察并统计出愈时间(d)、出愈率、愈伤组织的状态, 包括颜色、形状、质地、生长速度等, 其中出愈率=形成愈伤组织的外植体数/总接种的外植体数)×100%。

表 1 不同培养基的浓度配比

序号	基本培养基	6-BA (mg·L <sup>-1</sup> )	NAA (mg·L <sup>-1</sup> )	琼脂 (%)	蔗糖 (%)
1	MS	1.5	0.5	0.6	3
2	MS	1.5	1.0	0.6	3
3	MS	1.0	0.5	0.6	3
4	MS	1.0	1.0	0.6	3

### 1.3 愈伤组织的继代

大约 25~30 d 后, 将诱导出的愈伤组织转移到继代培养基上, 培养基成分为 MS+2, 4-D 0.4 mg·L<sup>-1</sup>+ 6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+GA<sub>3</sub> 0.51 mg·L<sup>-1</sup>+3%蔗糖+0.6%琼脂, pH 值为 5.8。选择生长快, 色泽新鲜不褐化的愈伤组织, 以直径 0.3 cm 左右的团块, 每 20~25 d 继代一次, 共 3 次。在室温自然光下培养。

### 1.4 再生苗的诱导

随着继代培养次数的增加, 愈伤组织生长速度越来越快, 选择色泽好, 生长快的各种愈伤组织, 转移到诱导培养基上, 培养基的组成为 MS+6-BA 1.5 mg·L<sup>-1</sup>(或 ZT 2.0 mg·L<sup>-1</sup>)+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+GA<sub>3</sub> 5 mg·L<sup>-1</sup>+3%蔗糖+0.6%琼脂, pH 值为 5.8。培养在室温下, 补充光 2 000 lx, 16 h·d<sup>-1</sup>。统计分化率。

分化率=(分化出根、芽的愈伤组织块数/总接种的愈伤组织块数)×100%。

对统计结果进行方差分析, 并用新复极差法测验不同处理间的显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

不同的激素配比脱分化情况不同, 脱分化率均超过 67%, 尤以 MS+6-BA 1.5 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 1 mg·L<sup>-1</sup>+3%蔗糖+0.6%琼脂表现最佳, 出愈率分别为茎尖 97.3%、茎段 75.6%、半叶 96.8%、全叶 97.4%。供试的外植体中, 以半叶片的反应最为敏感, 出愈早, 成愈率高, 质地坚实, 绿色颗粒呈堆状<sup>[2]</sup>; 茎尖次之, 但愈伤组织状态佳, 色泽好, 白绿色, 部分愈伤组织外围质地疏松、透明, 增殖快, 表现出旺盛的生长势。茎段一般先膨胀变粗, 再从两端逐渐向中间产生愈伤组织, 最后整个茎段愈伤化, 茎段愈伤组织外围较疏松呈白色絮状, 且整体长势均匀呈块状。全叶与半叶的出愈率基本相同, 但半叶的出愈时间大大提前, 因为植物组织愈伤化大多从破损处发生, 半叶叶缘被人为损伤, 愈伤组织发生也是在沿破损边缘愈伤化。而全叶的反应是整个叶片先膨大, 有的可膨大到原面积的 3~5 倍以上, 再从叶片某个部位发生脱分化位点, 然后开始愈伤组织的增殖。半叶在愈伤组织的诱导过程中, 伴随着愈伤组织的增殖, 叶片也不断生长, 但没有全叶增长得快。

总的出愈时间按从早到晚的顺序为半叶 > 茎

尖 > 茎段 > 全叶(表 2); 愈伤组织生长速度的快慢顺序为茎尖>半叶>茎段>全叶<sup>[2]</sup>。

表 2 不同外植体脱分化情况

外植体	出愈时间 (d)	出愈率 (%)	愈伤组织状态
茎尖	10	97.3	白绿色透明疏松
茎段	16	75.6	黄绿色疏松絮状
叶片	19	96.8	白绿色紧密颗粒
半叶	5	97.4	白绿色紧密颗粒

注: 接种外植体 20 d 观察出愈率和愈伤组织状态, 出愈率是 4 种培养基的平均值。

### 2.2 不同愈伤组织在继代中的表现

试验发现, 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, 表现最佳; 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。在继代过程中发现, 适当浓度的 2, 4-D 有降低愈伤组织褐化的作用<sup>[3]</sup>; 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。

### 2.3 愈伤组织的分化

将茎尖、茎段、全叶、半叶不同外植体愈伤组织的芽分化率做比较, 不同外植体间差异达极显著水平<sup>[4]</sup>。茎尖分化率最高为 67.7%, 茎段次之, 分化率为 46.8%, 叶片最差, 分化率只有 16.2%, 根的分化相反, 叶片高达 86.4%, 茎尖次之 45.1%, 茎段最差仅为 21.3%(表 3)。

表 3 不同愈伤组织分化率比较

外植体	芽分化率 (%)	根分化率 (%)
茎尖	67.7A	45.1B
茎段	46.8B	21.3C
叶片	16.8C	88.2A
半叶	15.4C	84.6A

注: 大写字母为 1%水平。

试验过程中发现, 茎尖愈伤组织有直接形成块茎的现象, 块茎顶端着生 2~3 片小叶; 生长素/细胞分裂素高愈伤组织易形成粗壮的根, 生长素/细胞分裂素低易分化成芽, 细胞分裂素高易形成丛芽, 细胞分裂素低则形成单芽(图 1~3)。



图 1 愈伤组织形成小块茎



图 2 愈伤组织形成粗壮根系



图 3 愈伤组织诱导出丛芽

### 3 讨 论

在本试验中, 所有供试材料的出愈率均较高, 表明愈伤组织的诱导对生长素与细胞分裂素的配比不是特别严格, 有一个较大的配比范围; 芽的分化率较低, 说明诱导培养基配方不是最佳, 也可能由于在试验中采用自然条件培养, 是环境因素所致, 有待以后继续试验。

继代培养间隔的时间对愈伤组织的生长有一定影响。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<sup>[5]</sup>。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。

有些专家反对用愈伤组织进行马铃薯脱毒, 认为在愈伤组织诱导与分化过程中易产生变异; 作者认为, 从事马铃薯研究的专业人员通过田间鉴定,

很容易把变异与否区分开来, 如果把脱毒与育种结合起来, 愈伤组织脱毒将有很大的利用空间。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Wang P J. 从愈伤组织再生无病毒马铃薯植株[M]// 巴尔茨 W, 赖因哈德 E, 岑克 M H. 植物组织培养及其在生物技术上的应用. 北京: 科技出版社, 1983.
- [ 2 ] 王蒂, 张宁. 马铃薯单细胞培养及再生的研究[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.
- [ 3 ] 祁新. 马铃薯悬浮细胞培养[J]. 吉林农业大学学报, 1996, 18 ( 1 ): 21-24.
- [ 4 ] 双宝, 李文英, 李文滨, 等. 马铃薯优化再生系统的建立 [J]. 马铃薯杂志, 1995, ( 3 ): 134-138.
- [ 5 ] 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. 高新技术与马铃薯产业. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2002.

## Establishment of Production System for Regenerated Virus-free Potato Plantlets through Callus Tissue

Yang Chun, Wang Guimei

(Crops Research Institute for Cold Region, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Datong, Shanxi 037008, China)

**Abstract:** Callus induction, subculture, root and bud differentiation and plant regeneration was carried out with stem tip, stem section and leaf blade as explants in order to establish production system for regeneration of virus-free potato plantlets from callus. In the medium MS+6-BA 1.5 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 1 mg·L<sup>-1</sup>+3% sucrose+0.6% agar, induction rate of callus for potato stem tip, stem section, whole leaf and half leaf was 97.3%, 75.6%, 96.8% and 97.4%, respectively. In the medium MS+6-BA1.5 mg·L<sup>-1</sup> (or ZT2.0mg·L<sup>-1</sup>)+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+GA<sub>3</sub> 5 mg·L<sup>-1</sup>+3% sucrose +0.6% agar, bud induction rate of various explants was 15.4%~67.7%, and differentiation rate of root was 21.3%~88.2%.

**Key Words:** potato; explant; callus; Regeneration