

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2008)03-0140-04

## 不同基因型马铃薯的花药培养

李风云, 盛万民, 田国奎, 李庆全, 王立春, 徐洪岩

( 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所, 黑龙江 克山 161606 )

**摘要:** 马铃薯花药培养在马铃薯育种实践中具有重要的意义。现以杂交圃中 77 份亲本材料为试验材料, 对花药高温前处理、培养基和基因型等因素进行了试验。结果表明: 马铃薯花药培养对基因型有很大依赖性, 不同基因型马铃薯愈伤诱导率范围是 0.16%~9.50%, 胚状体发生率范围是 0.31%~15.63%。克 97G8-4、讷 16 和白俄 3 的植株再生率范围为 12.00%~23.08%, 其余全部没有分化出植株。倍性鉴定表明: 双单倍体的发生率为 93.75%。诱导培养基以  $MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{2,4-D}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}+0.5\%$  活性炭+ $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{AgNO}_3$ , 即 号效果最好, 植株分化培养基以  $MS+4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{GA}_3+2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ZT}+30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖+0.7%琼脂, 即 号效果较好。高温预处理对胚状体的发生有利。

**关键词:** 马铃薯; 花药培养; 双单倍体

目前, 马铃薯育种中存在着遗传基础狭窄和品种间亲缘关系近的问题, 许多重要经济性状难有突破性进展。马铃薯 74% 的资源存在于二倍体野生种和近缘栽培种中, 四倍体与二倍体之间杂交不亲和或杂交后代产生不育的三倍体, 因此限制了野生种中优良基因在马铃薯育种中的利用。通过花药培养产生的双单倍体可直接与野生种杂交, 可将野生种中的高干物质、抗病性、抗虫性等优良基因转移到普通栽培种中<sup>[1-4]</sup>, 从而扩大遗传基础, 提高育种效率, 缩短育种周期, 因此, 花药培养在马铃薯育种实践中具有重要的意义。

马铃薯花药培养在 20 世纪 80 年代已经开始研究, 戴朝曦<sup>[5]</sup>、朱明凯等<sup>[6]</sup>、王蒂等<sup>[7]</sup>和冉毅东等<sup>[8-9]</sup>对马铃薯花药培养中的高温前处理、培养基中植物生长调节剂的种类及浓度和硝酸银的作用等因素进行了研究和报道, 但仍然存在诱导率低和分化成苗率低的问题, 使花药培养至今仍很少应用于育种实践。本试验以马铃薯育种中的亲本材料为研究对象进行花药培养, 试图建立高效的马铃薯花

药培养体系, 应用于育种实践。

### 1 材料与方法

#### 1.1 植物材料

以黑龙江省农业科学院马铃薯研究所杂交圃 77 份育种亲本材料为供试材料。

#### 1.2 试验方法

##### 1.2.1 花药的采集和预处理

选择处于单核靠边期的花药, 花药的大小因材料而异, 一般在 3~5 mm 左右, 呈淡绿色。将精选的花蕾编号, 放在 4℃ 冰箱中冷藏 24~48 h。

##### 1.2.2 消毒接种

将花蕾用自来水冲洗 10 min 左右, 在酒精中蘸一下, 立即取出, 用千分之一的升汞消毒 7~10 min, 无菌水冲洗 3~4 遍, 在超净工作台内将花药取出, 将完整无损的花药接种在 3 种诱导培养基上, 每个培养皿 (Φ 90 mm × 18 mm) 接种 40 枚花药。

##### 1.2.3 培养基

###### (1) 诱导培养基

$MS+2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{2,4-D}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}+0.5\%$  活性炭+ $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{AgNO}_3$ 。

$MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{2,4-D}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}+0.3\%$  活性炭+ $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{AgNO}_3$ 。

$MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{2,4-D}+1.0$

收稿日期: 2007-11-10

基金项目: 黑龙江省农业科学院科研计划项目“多抗高产专用马铃薯种质资源创新技术研究与应用”(HNY2004113)。

作者简介: 李风云 (1972-), 女, 助理研究员, 从事马铃薯试管苗脱毒快繁、马铃薯品质分析和马铃薯生物技术的研发。

mg·L<sup>-1</sup> KT+0.5%活性炭+100 mg·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>。

另外, 每种诱导培养基均加入 30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖、50 g·L<sup>-1</sup> 马铃薯块茎提取液和 0.7%琼脂, pH 值5.8。

### (2) 分化培养基

MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> IAA+2.0 mg·L<sup>-1</sup> BAP+2.0 mg·L<sup>-1</sup> KT+30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖+0.7%琼脂, pH 值 5.8。

MS+4.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+2.0 mg·L<sup>-1</sup> ZT+30 mg·L<sup>-1</sup> 蔗糖+0.7%琼脂, pH 值 5.8。

### 1.2.4 培养方式

接种后, 将培养皿放入人工气候箱内, 用 35 高温, 黑暗条件下热激处理 48 h, 然后用 25 暗培养, 待诱导愈伤组织或胚状体后(约 20 d 左右)转入光照培养, 光强 2 500 lx, 每天 16 h。30 d 后将愈伤组织或胚状体转入分化培养基, 待分化成苗后, 转入 MS 培养基继代繁殖。

### 1.3 数据统计和分析

愈伤组织诱导率 = (产生愈伤组织数/接种花药数) × 100%

胚状体发生率 = (产生胚状体数/接种花药数) × 100%

植株分化率 = (分化植株数/愈伤组织数或胚状体数) × 100%

### 1.4 倍性鉴定

采用根尖染色体计数法<sup>[10]</sup>, 在室温下用乙醇冰乙酸 = 3 1 的溶液固定 24 h, 在 60 下用 1 N HCl 溶液水解 10 min, 石炭酸-品红染液染色 3 min, 在 10 × 100 倍光学显微镜下进行染色体计数, 观察和鉴定双单倍体。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因型对花药培养的影响

试验结果表明马铃薯花药培养对基因型有很大的依赖性(表 1)。只有 3 份材料分化成苗, 植株再生率范围为 12.00%~23.08%。其中克 97G8-4 是由胚状体分化成苗的, 白俄 3 是由愈伤组织分化成苗的, 而讷 16 的愈伤组织和胚状体均有再生苗, 是做花药培养试验的优良的试验材料。

试验中克新 16 号产生的愈伤组织质地良好, 直径最大, 但仅分化出几个根系, 没有分化成苗; 愈伤组织诱导率最高的材料是太和, 为 9.50%; 克新 1 号和米拉的愈伤组织也较好; PS-6 是二倍体材料, 也产生较好的愈伤组织; DY4-30 是二倍体

杂种, 其胚状体发生率较高; 两个种间杂种材料 IH01-14 和 IH01-11 只产生胚状体, 且适宜用 号培养基诱导; 两个新型栽培种 NS78-11 和 NS51-5 只有胚状体发生, 且发生率很低, 说明用它们做花药培养试验还需研究。

表 1 不同基因型马铃薯花药培养的植株再生率

编号	材料名称	愈伤组织数(个)	再生植株数(个)	植株再生率(%)
1	克 97G8-4	3	4	13.30
2	讷 16	30	3	23.08
3	白俄 3	13		

编号	材料名称	胚状体数(个)	再生植株数(个)	植株再生率(%)
1	克 97G8-4	15	3	20.00
2	讷 16	50	6	12.00
3	白俄 3	4		

### 2.2 培养基、高温预处理、培养方式等因素对花药培养的影响

本试验用 3 种诱导培养基和 2 种分化培养基进行试验, 77 份试验材料共接种 43200 个, 由于 号分化培养基没有分化成苗, 对其结果暂不做分析, 分化培养基以 号培养基效果较好, 有 3 份材料分化成苗。用 3 种诱导培养基和 号分化培养基进行的花药培养试验的接种数为 13480 个, 试验结果见图 1 和图 2 及表 1 和表 2。有 50 份材料效果较好, 愈伤诱导率范围是 0.16%~9.50%, 胚状体发生率范围是 0.31%~15.63%, 其中有 27 份材料既产生愈伤组织又有胚状体发生, 有 23 份材料只有胚状体发生, 说明 3 种诱导培养基对胚状体的发生有利, 高温预处理也对胚状体的发生有利。



图 1 马铃薯花药培养诱导出的愈伤组织

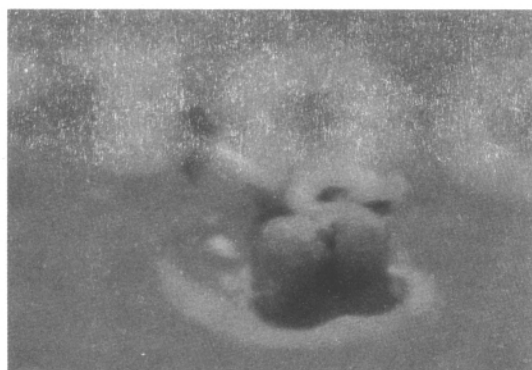


图 2 马铃薯花药培养的再生植株

表 2 中列出每种材料适宜采用的诱导培养基,

号培养基占 12%, 号培养基占 34%, 号培养基占 54%, 说明号培养基的植物生长调节剂的种类和浓度配比适合于多数材料。号培养基褐化现象严重, 产生的愈伤组织或胚状体不易分化, 说明植物生长调节剂的浓度低些较好, 活性炭的浓度低些较好, 硝酸银的浓度高些较好。本试验中的培养方式对花药培养有利, 但还需深入研究。

### 2.3 倍性鉴定结果

采用染色体直接计数法对 16 株再生植株进行鉴定, 其中 15 株为双单倍体, 1 株为四倍体, 双单倍体的发生率为 93.75%。植株在 MS 培养基上发育不够健壮, 需进行壮苗培养。

表 2 不同基因型马铃薯花药培养的愈伤组织诱导率和胚状体发生率

编号	材料名称	接种花药数 (个)	适宜 培养基	胚状体发 生率 (%)	愈伤组织诱 导率 (%)	编号	材料名称	接种花药数 (个)	适宜 培养基	胚状体发生 率 (%)	愈伤组织诱 导率 (%)
1	尤金	240		0.83	0.42	26	Fortuna	280		2.86	3.93
2	大西洋	400		1.25	0.25	27	Andover	200		0.50	1.50
3	克 97G8-4	1160		1.29	0.26	28	克新 17 号	360		0.56	0
4	波 C	520		2.12	1.15	29	IH01-14	160		5.00	0
5	克新 16 号	1000		0.90	0.90	30	IH01-11	160		2.50	0
6	克新 4 号	280		1.43	0.36	31	兹列巴	120		1.67	0
7	FL1533	640		2.03	0.16	32	早大白	120		0.83	0
8	讷 16	320		15.63	9.38	33	克新 19 号	240		0.83	0
9	Shepody	480		0.63	0.21	34	克新 13 号	120		2.50	0
10	DY4-30	160		1.88	0.63	35	Early Rose	320		0.63	0
11	Eramosa	80		1.25	7.50	36	波 BR	480		1.25	0
12	Sebago	160		1.25	1.88	37	拉迪	120		4.17	0
13	Cal white	320		1.56	1.25	38	Denali	320		0.31	0
14	白俄 3	200		2.00	6.50	39	FL1867	80		3.75	0
15	波 S	400		1.00	2.75	40	CIP380854.3	360		2.22	0
16	费乌瑞它	360		2.22	3.61	41	NS78-11	320		0.31	0
17	PS-6	320		1.56	4.06	42	NS51-5	280		0.71	0
18	克新 8 号	120		1.67	1.67	43	克新 12 号	160		0.63	0
19	太和	200		1.50	9.50	44	Dianella	160		1.25	0
20	米拉	120		2.50	5.83	45	克新 15 号	200		1.50	0
21	宁 91-76-5	120		5.00	1.67	46	克新 11 号	120		1.67	0
22	渭薯 1 号	200		1.00	3.00	47	津引 8 号	120		0.83	0
23	日 24	120		1.67	4.17	48	Carola	120		1.67	0
24	克新 2 号	120		2.50	1.67	49	BC110-1	120		4.17	0
25	克新 1 号	80		3.75	6.25	50	Burbank	320		2.50	0

### 3 讨 论

马铃薯单倍体育种是常规育种程序和方法的重大改革, 为新品种的培育开辟了一条新的途径, 但是, 马铃薯花药培养受基因型、热激处理时间、植物生长调节剂等多种因素的限制, 使诱导频率低, 分化成苗率低, 到目前为止, 还没有普遍适用的程序。

本试验采用育种中大量的亲本材料, 参考已报道的试验方法结合自己的试验结果设计本试验。试验结果表明, 基因型是影响花药培养的重要因子, 这与卢翠华等<sup>[1]</sup>、梁彦涛等<sup>[2]</sup>的研究结果一致。但在本试验中克新 13 号和波 C 都没有分化成苗, 这与梁彦涛等<sup>[2]</sup>的研究结果不一致, 本试验中克新 13 号的胚状体发生较高, 波 C 褐化严重, 花药显著膨大而生根, 却都没有分化成苗, 这可能与试验的处理、培养基成分和培养方式等有关。号培养基的植物生长调节剂的种类和浓度配比适合于多数材料, 这与梁彦涛等<sup>[2]</sup>的研究结果相类似, 但针对特殊材料需做相应的调整。总之, 只有提高马铃薯花药培养的诱导频率, 多出分化苗, 才有可能将马铃薯花药培养广泛应用于育种实践。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 卢翠华, 梁彦涛, 石瑛, 等. 四倍体马铃薯的花药培养 [M]//陈伊里, 屈冬玉. 马铃薯产业与东北振兴. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2005.
- [2] 梁彦涛, 邱宏, 卢翠华, 等. 马铃薯花药培养影响因素的研究 [J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(5): 604-609.
- [3] 刘文萍. 马铃薯单倍体诱导及在育种中的应用 [J]. 黑龙江农业科学, 2005, (2): 52-54.
- [4] 金黎平, 杨宏福. 马铃薯双单倍体的产生及其在遗传育种中的应用 [J]. 马铃薯杂志, 1996, 10(3): 180-186.
- [5] 戴朝曦. 用花药培养法诱导马铃薯产生双单倍体植株的研究 [J]. 科学通报, 1982, 27(24): 1529-1532.
- [6] 朱明凯, 程天庆, 高湘铃, 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.
- [7] 王蒂, 冉毅东, 戴朝曦. 马铃薯花药培养中高温前处理的作用及不同基因型的反应 [J]. 马铃薯杂志, 1990, 4(3): 139-147.
- [8] 冉毅东, 戴朝曦. 马铃薯花培硝酸银对诱导双单倍体及一单倍体的效果 [J]. 西北农业学报, 1993, 2(4): 43-47.
- [9] 冉毅东, 王蒂, 戴朝曦. 提高马铃薯双单倍体花药培养产生胚状体及再生植株频率的研究 [J]. 马铃薯杂志, 1996, 10(2): 74-78.
- [10] Liu Chien An, Douches david S. Prouction of haploids of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) and their identification with eletrophoretic analysis [J]. Euphytica, 1993, 70: 113-126.

## Anther Culture of Various Genotypes of Potato

Li Fengyun, Sheng Wanmin, Tian Guokui, Li Qingquan, Wang Lichun, Xu Hongyan

(Potato Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshang, Heilongjiang 161606, China)

**Abstract:** Potato anther culture has an import role to play in potato breeding. In this research, anthers were collected from 77 clones in crossing block, and effects of high temperature pretreatment, medium and genotype on dihaploid induction were studied. The competency of potato anther culture was genotype dependent, with callus and embryoid formation ranging 0.16%- 9.50% and 0.31%- 15.63%, respectively. Regenerated plantlets were got from three clones, Ke97- G8- 4, Ne16 and Belorussia 3, and 93.75% of them were found to be dihaploid. The induction medium MS + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2, 4- D + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> KT + 0.5% active carbon + 100 mg·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> and the differential medium MS + 4.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 2.0 mg·L<sup>-1</sup> ZT + 30 mg·L<sup>-1</sup> sucrose + 0.7% agar were shown to be best among the media tested. Pretreatment of high temperature had a positive effect on embryoid formation.

**Key Words:** potato; anther culture; dihaploid