

马铃薯单倍体培养研究进展

越恋，何凤发

(西南大学农学与生物科技学院，重庆 北碚 400716)

摘要：马铃薯单倍体培养能获得相对稳定的纯系，提高育种效率，创造新的种质。单倍体培养主要有孤雌生殖、小孢子培养和花药培养等方法，但存在诱导率、成苗率低等问题，有待进一步优化和完善。

关键词：马铃薯；单倍体培养；孤雌生殖；孤雄生殖

1 马铃薯单倍体培养的意义

马铃薯普通栽培种为同源四倍体，遗传分离复杂，出现理想组合的几率小，育种效率较低。通过单倍体培养使其倍性降低，再人工加倍有望得到相对稳定的纯系，这样可省去多代自交，短期内获得纯合四倍体，大大提高育种效率^[1]。四倍体马铃薯由于显性基因存在，所需的隐性基因不能表达。利用单倍体可使隐性基因得以表达，提高选择效率。双单倍体容易和二倍体野生种杂交，实现野生种基因向普通栽培种的转育，从而有效利用野生种资源，得到产量及其它性状优异的后代^[2]。

花药培养中双单倍体稳定性和变异性同时存在，花药培养技术不仅可加快育种进程，还可以创造出新的种质^[3]。目前在应用各种选择压进行诱变筛选抗寒、抗盐碱等变异系方面，都有一定的进展。Hamada 等^[4]用离子束处理烟草的花药，然后接种马铃薯 Y 病毒(PVY)，从 472 株花药再生植株中获得 15 株抗病毒植株。双单倍体植株具有遗传上的纯合基因组，是 AFLP, RAPD, SSR 等分子标记和基因图谱的理想材料，可用于遗传变异的估计、连锁群的检测、多基因定位以及分子标记图谱的构建^[5]，可避免二倍体中由于不完全自交，使染

色体上 DNA 碱基的细微差别造成的干扰。

对于马铃薯来说单倍体诱导还有其特殊的含义，通过纯系间或与 2n 配子材料杂交可以获得不分离的杂种一代实生种子，为选育不分离的实生种子提供优良亲本^[6]，使马铃薯杂交种的利用成为可能。

2 马铃薯单倍体培养的方法

2.1 孤雌生殖

最早发现的孤雌生殖多为天然产生的，且发生频率极低。人工诱导孤雌生殖的方法有活体诱导和离体诱导两种。

活体诱导是利用在二倍体中发现的能产生 2n 配子花粉的诱导者，通过种间杂交，诱导四倍体普通栽培种孤雌生殖产生双单倍体。Hougas 和 Peloquin^[7]利用假受精方法首次从四倍体品种 Katahdin 与 Solanum phureja 杂交后代中得到了一株双单倍体。此后 2n 配子优良授粉者的研究和应用使大量获得马铃薯的双单倍体成为可能。

庞万福等^[8]通过 4x-2x 杂交测验，从 S. phureja 后代中筛选出 9 份诱导双单倍体频率和花粉育性高的授粉者。通过两年的试验筛选出配合力好，产生孤雌生殖能力强的四倍体品种中薯 2 号、79-6-19 和 CIP800935，诱导频率为 11.1-33.3 株/100 个浆果，成功实现野生种优良基因向栽培种的导入，缩短了与国外同研究领域的差距^[9]。李先平等^[10]对 I3 个云南马铃薯主要栽培品种进行双单倍体诱导研

收稿日期：2007-12-19

基金项目：“十一五”国家科技支撑计划 2006BAD21B05-2。

作者简介：越恋 1981-)，女，硕士研究生，从事细胞遗传和生物技术等方面研究。

究, 获得 27 株马铃薯双单倍体。

不同研究者都发现由于孤雌生殖诱导双单倍体决定于四倍体母本和二倍体授粉者的相互作用, 诱导频率明显受到杂交双亲的影响, 因此筛选诱导频率高的优良授粉者显得尤其重要, 同时环境条件也极大地影响诱导单倍体的频率^[11]。

离体诱导孤雌生殖主要是未受精子房培养, 这对于阐明果实的形态发生、生理生化等过程提供了一个很好的实验系统。陶自荣等^[12]以 MS 附加一定激素的培养基培养未授粉的四倍体栽培种马铃薯子房, 从“乌盟 601”和“中心 24”两个品种获得了绿色双单倍体小植株。

由于子房培养涉及供体植株基因型、供体植株生理状态、胚囊发育时期、培养基、接种方式、花器附属物、培养条件等因素, 以及以上因素之间复杂的相互作用^[13], 因此马铃薯子房培养离实际应用尚有较大的距离, 有待于从培养技术上进一步深入研究。

2.2 小孢子的培养 花粉培养)

该项技术由 Nitsch 和 Noreel 创建, 当时只是为去除花药培养时花药壁和绒毡层组织的干扰, 以便直接研究小孢子胚胎发生的机制。由于操作难度大, 70 年代这项技术仅在曼陀罗、矮牵牛和烟草等 3 种茄科模式植物上取得成功^[14]。

高秀云^[15]对马铃薯小孢子的培养发现, 马铃薯小孢子经均等分裂形成愈伤组织或胚状体, 分别用 MS + KT 1 mg·L⁻¹ + 2, 4-D 0.25 mg·L⁻¹ + 蔗糖 3% 和 MS + KT 0.2 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ + 蔗糖 3% 诱导愈伤和胚状体效果好, 发生频率分别为 3.98% 和 0.8%。含有活性炭的培养基, 几乎都能诱导产生胚状体。初步认为低浓度的激素和生长素有利于马铃薯胚状体的诱导。

左秋仙等^[16]采用液体浅层培养法培养四倍体栽培种花粉仅得到愈伤组织, 未获得再生植株。在离体花粉培养中愈伤组织的诱导率与花药预培养的时间密切正相关, 未经预培养的花粉培养 7~10 d 即陆续死亡。认为花粉粒的脱分化启动必须由离体培养的花药提供必要的物质, 脱离不了对药壁组织的依赖。药壁组织对花粉脱分化除了起吸收、贮存、转化等代谢库作用外, 还存在某些调控作用。单细胞分裂过程中有更高的营养要求, 一些补加物, 如丝氨酸和谷氨酰胺, 尤其是高浓度的肌醇有利于花

粉细胞的分裂, 以及补加马铃薯提取液, 可能具有促进花粉增殖的作用。

2.3 花药培养

我国学者在马铃薯花药培养方面进行了广泛的研究, 取得了一些重要的理论与实践成果。一般选取单核中期到单核后期发育阶段的花药, 经过预处理和材料灭菌, 接种到适宜的培养基上进行诱导, 再转移到分化培养基上分化出有正常根茎叶的再生植株。

马铃薯花蕾大小与花粉发育时期具有一定的对应关系, 3 mm 以下的花蕾, 花粉发育基本处在二分体和四分孢子时期, 花蕾 4~5 mm 大小时为花粉发育的单核高峰期^[17]。

戴朝曦等^[18-20]以四倍体普通栽培种为材料, MS 附加 NAA 2 mg·L⁻¹、2, 4-D 1 mg·L⁻¹、KT 0.5 mg·L⁻¹、活性炭 0.3% 和马铃薯块茎提取液 5% 的培养基培养单核期的花药, 在接种的 20720 枚花药中诱导出愈伤组织 204 块, 胚状体 24 个和胚性细胞团 3 块, 总诱导频率达 1.11%, 共分化出 61 株绿色小植株, 小植株的诱导率为 1.35%。实验中观察到加入活性炭 0.3% 和马铃薯块茎提取液 5% 可明显提高诱导效果。

朱明凯等^[21]诱导培养早熟四倍体栽培种花药时, 以胚状体诱导成苗比愈伤组织诱导成苗率高, 添加 IAA 0.5 mg·L⁻¹ 和 6-BA 1 mg·L⁻¹ 有利于分化成苗。从愈伤组织分化出的苗有混倍体(2n = 28, 32)、双单倍体(2n = 24) 和四倍体(2n = 48), 而从胚状体诱导成苗均为双单倍体(2n = 24)。

王蒂等^[22]发现, 花药培养前期 35 高温预培养可明显地提高胚状体数量。在基本诱导培养基中加乙烯抑制剂 AgNO₃ 50~100 μmol·L⁻¹ 也可显著促进四倍体花药和双单倍体花药产生胚状体, 同时延缓花药褐化程度^[23]。戴朝曦等^[24]首次报道用花药培养法由马铃薯一个典型的雄性不育双单倍体“甘花双 7 号”诱导产生出一单倍体, 从接种的 1850 个花药中诱导出 28 个胚状体和 23 块愈伤组织, 并分化出 24 株绿苗。分化出的小植株生活力大部分较弱, 植株之间表现出明显的性状分离, 经鉴定具有典型的一倍体特征。冉毅东等^[25]用三种不同温度前处理对马铃薯双单倍体花药培养, 使诱导产生胚状体及再生植株频率提高到 27.5% 和 8.8%。倍性鉴定表明, 从双单倍体诱导的胚状体分化的植株绝大多数

为纯合二倍体, 可能是胚状体在发育过程中体细胞染色体自发加倍。

花药培养产生的植株可能产生一定的变异。柳俊^[26]培养“乌盟 601”得到的 12 个花药株系在形态上均与原品种存在程度不同的差异, 而且这种差异不仅仅存在于双单倍体植株中, 四倍体株系亦与原品种存在差异者, 这说明在花药培养过程中可能产生一定的变异。

梁彦涛等^[27]研究马铃薯花药培养影响因素时, 发现马铃薯花药培养对基因型依赖性很大。花药接种密度对褐化率影响较大, 40 个·瓶⁻¹的花药接种密度比较合适。培养基添加 AgNO_3 30 mg·L⁻¹、活性炭 200 mg·L⁻¹ 能有效减轻花药褐化程度。植物生长调节剂对愈伤组织诱导影响最大, 基本培养基添加 NAA 0.5 mg·L⁻¹, 2, 4-D 1.0 mg·L⁻¹ 和 KT 0.5 mg·L⁻¹ 有利于多数材料愈伤组织的形成和胚状体的发生, 以麦芽糖代替蔗糖可以提高愈伤组织的诱导率。

3 存在的问题

虽然以上三种方法均可获得单倍体植株, 但都存在一定的问题。孤雌生殖带有一定的偶然性且诱导率低。自孤雌生殖诱导双单倍体技术建立至今, 国际上广泛使用的诱导者仍是 1963 年筛选的 PHU1.22 和 1973 年导入胚斑标记基因的 IVP35 和 IVP48 等^[11], 这些授粉者的双单倍体诱导频率并不尽如人意。如何快速有效地从大量的杂交后代中识别双单倍体仍是困扰研究者的一个难题。

在马铃薯花药培养中一直存在诱导率、成苗率低的问题, 关键是选择合适的培养基和与之配合的基因型, 克服基因型和环境条件对诱导率的影响, 提高单倍体植株的再生频率。针对药壁组织的干扰和混倍现象, 以胚状体直接诱导成苗不仅成苗频率高、速度快, 而且染色体倍性稳定。小孢子培养技术复杂且对所需设备条件要求较高, 同时也存在基因型障碍和诱导频率、再生频率低的问题。

[参考文献]

- [1] Innocatice Sonnino A. Methods of propagating potatoes: Reprots of the 28 planning conference [C]. Lima, Peru, 1984.
- [2] 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- 224.
- [3] 胡含, 王桓立. 植物细胞工程与育种[M]. 北京: 北京工业大学出版社, 1990.
- [4] 刘庆昌, 吴国良. 植物细胞组织培养[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003.
- [5] Ver cni que le fevre, Aaalain Palloix, Carole Caranta, et al. Construction of an intraspecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled - haploid progenies [J]. Genome, 1995, 38: 112- 121.
- [6] 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.
- [7] Hougas R W, Peloquin S J. A haploid plant of the potato variety Katahdin[J]. Nature, 1957: 1 209- 1 210.
- [8] 庞万福, 屈冬玉, 高占旺, 等. 高频率诱导马铃薯双单倍体的研究[J]. 马铃薯杂志, 1996, 10(2): 70- 73.
- [9] 张希近, 庞万福, 高占旺, 等. 孤雌生殖诱导马铃薯双单倍体的遗传操作技术[J]. 杂粮作物, 1997(4): 33- 35.
- [10] 李先平, 李树莲, 隋启君, 等. 云南马铃薯主要栽培品种的孤雌生殖诱导研究[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(3): 293- 296.
- [11] 李先平, 隋启君, 李树莲. 孤雌生殖诱导马铃薯双单倍体研究进展[J]. 中国马铃薯, 2005, 19(2): 93- 96.
- [12] 陶自荣, 刘敏颂, 朱仲纯. 马铃薯未传粉子房培养诱导双单倍体植株[J]. 遗传学报, 1988, 15(5): 329- 34.
- [13] 杨江义, 李旭锋. 植物雌性单倍体的离体诱导[J]. 植物学通报, 2002, 19(5): 552- 559.
- [14] 曹冬孙, 贾士荣. 青椒子叶培养植株再生[J]. 园艺学报, 1993, 20(20): 171- 175.
- [15] 高秀云. 马铃薯雄核发育和花粉植株的形成[J]. 园艺学报, 1988, 15(4): 264- 268.
- [16] 左秋仙, 李淑媛, 林自安, 等. 马铃薯花粉粒的分离培养和愈伤组织的形成[J]. 马铃薯杂志, 1990, 4(1): 19- 22.
- [17] 柳俊. 马铃薯花蕾大小与花粉发育关系的研究[J]. 马铃薯杂志, 1993, 7(4): 202- 205.
- [18] 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): 1 529- 1 532.
- [19] 戴朝曦, 于品华, 王蒂, 等. 用花药培养法培育马铃薯双单倍体植株的研究 . 几个因素对诱导结果的影响[J]. 马铃薯, 1985(1): 15.
- [20] 戴朝曦, 于品华, 王蒂, 等. 用花药培养法培育马铃薯双单倍体植株的研究 . 花药培养中出现的一些特殊现象及双单倍体植株的初步观察[J]. 马铃薯, 1985(2): 3- 7.
- [21] 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- 184.

马铃薯病毒病防治策略

肖 雅¹, 何长征^{1*}, 聂先舟², 熊兴耀¹

(1.湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2.加拿大农业部马铃薯研究中心, 弗雷得瑞克登 E3B8B7)

摘要: 病毒病是马铃薯的重要病害, 当前马铃薯病毒病的防治策略主要是生产脱毒种薯、选育抗病毒品种和利用抗病毒物质。茎尖培养和热处理是脱除马铃薯病毒常用的方法; 蚜虫作为马铃薯病毒最主要的传播媒介, 不同种类的蚜虫传播病毒的能力不一样, 监控蚜虫的发生动态, 施用杀虫剂、矿物油、灭秧都是控制蚜虫的有效方法; 种薯认证体系控制马铃薯病毒病传播是最有效的手段, 在我国还刚刚起步。一些抗马铃薯 X 病毒、马铃薯 Y 病毒和马铃薯 S 病毒的基因已经被标记, 为马铃薯抗病毒品种的选育提供了基础, 采用转基因工程手段培育抗病毒病马铃薯品种也取得了重要进展。通过施用核酸中嘌呤和嘧啶碱基的合成类似物、植物有效成分、水杨酸等物质来抑制马铃薯病毒活性、提高植物对马铃薯病毒病的抗性方面取得了重要成果, 但尚不能满足实际生产的需要。因此, 建立种薯认证体系, 通过加强遗传研究、资源改良, 结合现代生物技术选育抗马铃薯病毒病品种是我国今后防治马铃薯病毒病的重点。

关键词: 马铃薯; 病毒病; 防治

病毒病是马铃薯的主要病害之一, 它可以导致植株生理代谢紊乱、活力降低, 造成大量减产, 严重时可减产 70%~80%, 甚至没有商品产量。随着病毒检测技术的发展, 人们发现几乎所有马铃薯的品种都受到一种或几种病毒的侵染^[1]。其中马铃薯 Y 病毒 (PVY) 和马铃薯卷叶病毒 (PLRV) 是最重要的马铃薯病毒, 其次是马铃薯 A 病毒 (PVA)、马铃薯 X 病毒 (PVX) 和马铃薯纺锤状块茎类病毒 (PSTVd)^[2], 但一些被认为不太重要的病毒在特定

环境条件下也会对马铃薯生产造成明显的威胁, 例如, 马铃薯吊顶病毒 (PMTV) 在南美洲安第斯山脉地区并不普遍, 但在气候较冷凉的北欧却是一种主要病毒^[3]。

目前马铃薯的病毒病防治策略研究主要集中在生产健康马铃薯种薯、培育马铃薯抗病毒品种和利用抗病毒物质三个方面。

1 马铃薯脱毒种薯生产

1.1 茎尖培养或者热处理脱除病毒

要生产出健康的种薯, 首先需要脱除这些病毒以获得无病毒的基础苗。马铃薯脱除病毒的常用方法有茎尖培养和热处理。

- 收稿日期: 2007-12-28
基金项目: 湖南省科技计划项目 06FJ4085。
作者简介: 肖雅 (1982-), 女, 在读硕士研究生。
* 通讯作者: hecz@hotmail.com
- [22] 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(8): 138-143.
[23] 冉毅东, 戴朝曦. 马铃薯花药培养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.
[24] 戴朝曦, 于品华, 冉毅东, 等. 用花药培养法由马铃薯雄性不育双单倍体诱导一单倍体植株的研究[J]. 遗传学报, 1993, 20(2): 141-146.
[25] 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.
[26] 柳俊. 马铃薯花药培养植株的变异[J]. 湖北民族学院学报 (自然科学版), 1993, 11(2): 65-68.
[27] 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.