

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2005)05-0273-03

研究简报

马铃薯耐盐碱愈伤组织筛选及分化研究

张耀辉, 尹江, 马恢, 高永龙

(河北省高寒作物研究所, 河北 张北 076450)

摘要:以马铃薯 12 个主栽品种的茎、叶为外植体进行愈伤组织诱导和耐盐碱愈伤组织的筛选, MS 分化培养上分化及植株再生的研究。结果表明:愈伤组织诱导率高的品种有夏波蒂、大西洋, 诱导率分别为 96.1%、92.9%, 而且愈伤组织质量最好; 筛选出耐盐碱性强的愈伤组织品种有坝薯 10 号、冀张薯 5 号及 1867; 对于芽的分化, 分化率高的品种有坝薯 8 号、坝薯 10 号; 筛选出了抗盐碱性强的再生苗 7 株, 抗性中等的 60 株, 抗性弱的 3 株, 共 70 株。

关键词:马铃薯; 愈伤组织; 耐盐碱筛选; 分化

盐渍化土壤在世界上分布广泛, 约占世界陆地总面积的 7.6%^[1]。我国是世界盐碱地大国之一, 约有盐渍地 0.27 亿 hm^2 ^[2]。如何利用大面积的盐碱地是我国农业生产上的一个重要问题。马铃薯是重要的粮菜饲兼用作物, 具有适应性强、营养丰富、用途广、产值高、经济效益好等特征。为了充分利用大面积盐碱地, 创造出可观的经济效益和社会效益, 因此选育耐盐碱性强的马铃薯新品种是关键。目前针对马铃薯常规育种和改良方法存在的许多困难, 利用组织与诱变技术相结合选育抗盐碱性强的突变体, 可极大地提高耐盐碱育种效率, 获得优良的新种质。

1 材料与方法

1.1 试验材料

费乌瑞它、大西洋、夏波蒂、克新 1 号、中薯

收稿日期: 2005-05-20

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(302479)

作者简介: 张耀辉(1974-), 女, 河北省高寒作物研究所农艺师, 主要从事马铃薯抗病育种研究及病毒检测。

3 号、坝薯 10 号、坝薯 8 号、冀张薯 5 号、V1-1、1533、2191、1867 共 12 个品种脱毒苗。

1.2 试验方法

1.2.1 脱毒苗的扩繁与壮苗

将培养瓶装的 12 个品种的脱毒苗, 均转入到同样装有 MS 培养基的三角瓶内, 在 18~20 °C, 1500 lx 条件下进行光照培养。

1.2.2 愈伤组织的诱导与继代培养

脱毒苗培养 3 周后将苗经 75% 酒精处理 0.5~1.0 min, 0.1% 氯化汞处理 1.5~2.0 min, 无菌水冲洗 3 次后, 将苗的茎剪成 3~4 mm 小段, 叶至叶柄剪下, 作为外植体接种到诱导培养基上, 在 23~25 °C 条件下诱导培养愈伤组织。诱导愈伤组织的培养基为: MS+2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+1% 蔗糖+0.8% 琼脂, 愈伤组织 4 周继代一次, 共继代 2 次, 调查愈伤组织的表现及诱导出愈伤组织的块数, 计算诱导率。

1.2.3 盐碱胁迫培养

将诱导培养基上获得的愈伤组织接种到不同浓

the tissue culture. The optimal medium for callus formation was MS+6-BA 2.25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ +NAA 0.1-0.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the induction rate could reach to 73.17%-76.01%. There were some differences in water soluble proteins for the natural, primary cultured and subcultured potatoes. Three out of fifty-four primers used in the RAPD analysis could amplify polymorphic bands among the three different cultural states. The results suggest that there may be some variations during the establishment of the regeneration of potatoes.

Key Words: potato; tissue culture; genetic analysis

度的盐碱胁迫培养基上, 选用和愈伤组织继代培养相同的培养基, 附加不同浓度的 NaCl 和 NaHCO₃ (NaCl 和 NaHCO₃ 质量按 3:1 比例), 其浓度梯度依次为 0, 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0%; pH 值依次为 5.4, 6.8, 7.5, 8.3, 8.8, 9.3, 共设 6 个处理(见表 1)。每处理接 30~50 块愈伤组织, 在 23~25 °C 条件下培养, 调查其耐盐碱度。

表 1 各处理培养基及 pH 值

处 理	CK					
总盐碱浓度(%)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
pH 值	5.4	6.8	7.5	8.3	8.8	9.3

1.2.4 分化诱导

将筛选出的耐盐碱愈伤组织预先光照培养 7d 后, 分别接种于分化培养基上进行分化诱导, 分化培养基配方为: MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ GA₃+1%蔗糖+0.8%琼脂。待绿色芽点出现后, 计算出愈伤组织的分化率, 然后将其转入无激素的 MS 培养基上, 于 18~20 °C, 2000 lx, 16 h·d⁻¹ 光照条件下培养, 进行植株再生。

2 结果与分析

2.1 不同品种愈伤组织诱导结果

诱导培养基对 12 个品种愈伤组织诱导率及愈伤组织质量情况具体见表 2。愈伤组织质量最好的品种有夏波蒂、大西洋、冀张薯 5 号, 诱导率分别为 96.1%、92.9%、82.2%; 愈伤组织质量较好的品种有克新 1 号、中薯 3 号、坝薯 10 号, 诱导率分别为 84.2%、77.8%、62.7%; 愈伤组织质量较差的品种有费乌瑞它、坝薯 8 号、1867, 诱导率分别为 67.8%、53.7%、27.9%; 愈伤组织质量最差的品种有 1533、2191、V1-1, 诱导率分别为 41.5%、30.3%、12.8%。总体看, 该激素配比的诱导培养基对愈伤组织的诱导, 诱导率越高的愈伤组织, 质量越好。

2.2 不同品种愈伤组织的耐盐碱性

将继代 2 次后的不同品种愈伤组织接种到不同质量分数的选择培养基上, 由表 3 可知, 含盐碱浓度为 0 和 0.2%处理的愈伤组织长势稳定, 总体较

好, 颜色黄绿, 表面新鲜; 含盐碱浓度为 0.4 % 处理的愈伤组织质量略差, 部分开始出现褐点, 有的已经褐化死亡; 含盐碱浓度为 0.6 %处理的愈伤组织大部分质量差, 有的已经褐化; 在含盐碱浓度为 0.8 %和 1.0%处理的愈伤组织, 大部分黑褐色, 已枯死。研究结果表明, 愈伤组织随含 NaCl 和 NaHCO₃ 量的升高, 生长量逐渐降低, 体积减小, 颜色加深, 由黄绿变至黑褐色, 甚至死亡。由此可知, 鉴定耐盐碱适宜的含量为 0.6 %, 从而可以选出在细胞水平上耐盐碱性较强的品种有坝薯 10 号、冀张薯 5 号及 1867, 最弱的品种为 1533。另外以表 4 处理 2 为标准对各处理愈伤组织死亡率调查进一步表明, 对盐碱抗性强的品种为坝薯 10 号、冀张薯 5 号及 1867, 其中以坝薯 10 号耐盐碱度最高; 抗性中等的品种有 6 个; 抗性弱的有 3 个, 同样以 1533 耐盐碱度最低。

表 2 12 个品种的外植体诱导出愈伤组织块数及形态

材料名称	接入外植体块数	诱导出愈伤组织块数	诱导率 (%)	形成部位	颜色和形态
夏波蒂	128	123	96.1	切口	++++
大西洋	113	105	92.9	切口	++++
克新 1 号	76	64	84.2	切口	+++
冀张薯 5 号	90	74	82.2	切口	++++
中薯号	81	63	77.8	切口	+++
费乌瑞它	59	40	67.8	切口	++
坝薯 10 号	83	52	62.7	切口	+++
坝薯 8 号	67	36	53.7	切口	++
1533	53	22	41.5	切口	+
2191	66	20	30.3	切口	+
1867	43	12	27.9	切口	++
V1-1	39	5	12.8	切口	+

注: “++++”愈伤组织质量最好, 体积大, 新鲜均匀疏松, 黄绿色; “+++”愈伤组织质量较好, 体积较大, 较新鲜疏松, 黄色; “++”愈伤组织质量较差, 体积较小, 发暗较硬, 黄中带褐点; “+”愈伤组织质量最差, 体积小, 致密黄褐色。

表3 12个品种愈伤组织在含盐碱培养基上的形态

材料名称	(NaCl+NaHCO ₃)%					
	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
费乌瑞它	++	++	+, 0	-	--	--
大西洋	++++	+++	++	-	--	--
夏波蒂	++++	+++	+, 0	-	--	--
克新1号	+++	++	+, 0	0, -	--	--
中薯3号	+++	+++	+, 0	--	--	--
坝薯10号	+++	+++	+++	++	+, 0	--
坝薯8号	++	++	+, 0	-	--	--
冀张薯5号	++++	++++	+++	++	--	--
1533	+	-	-	--	--	--
2191	+	+, 0	+, 0	+, 0	--	--
1867	++	++	++	++	-	--
V1-1	+	+, 0	+, 0	--	0, -	--

注：“++++”愈伤组织质量最好，体积大，新鲜均匀疏松，黄绿色；“+++”愈伤组织质量较好，体积较大，较新鲜疏松，黄色；“++”愈伤组织质量较差，体积较小，发暗较硬，黄中带褐点；“+”愈伤组织质量最差，体积小，致密黄褐色；“0”愈伤组织质量差，体积小，褐色；“-”愈伤组织褐色，死亡。“--”愈伤组织黑褐色，已枯死。

表4 盐碱胁迫下各处理愈伤组织死亡率(%)

材料名称	CK						抗性
	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	
冀张薯5号	0	0	0	0	100	100	强
1867	0	0	0	45.2	100	100	强
坝薯10号	0	0	0	0	71.4	100	强
费乌瑞它	0	16.0	53.7	100	100	100	中
大西洋	0	0	35.5	78.3	100	100	中
夏波蒂	0	11.7	47.3	100	100	100	中
克新1号	0	0	43.8	88.6	95	100	中
中薯3号	0	0	31.3	100	100	100	中
坝薯8号	0	8.2	46.8	100	100	100	中
1533	0	100	100	100	100	100	弱
2191	0	77.1	100	65.8	100	100	弱
V1-1	0	34.2	59.8	100	93.3	100	弱

注明：(1)以处理 0 为标准，愈伤组织死亡率小于 30%为强抗；(2)愈伤组织死亡率在(30%~59%)定为中等抗性；(3)愈伤组织死亡率大于 60%为弱抗。

2.3 不同品种愈伤组织分化结果

由表 5 可知，12 个品种愈伤组织芽的分化率为 0~33.3%，植株再生率为 0~28.6%。对于芽的分化，除 1533 外，其它品种都能分化出芽，但是坝薯 8 号和坝薯 10 号芽的分化率较高，分别为 28.6%、18.5%，而愈伤组织的诱导率并不是很高

的，分别为 53.7%、62.7%。可见，愈伤组织诱导率高的品种，分化潜力不一定高。

表5 盐碱胁迫下存活的愈伤组织分化结果及再生率

材料名称	接入愈伤组织块数	开成芽及芽点块数	芽分化率(%)	开成植株块数	植株再生率(%)
坝薯8号	21	7	33.3	6	28.6
坝薯10号	27	6	22.2	5	18.5
夏波蒂	125	24	19.2	20	16.0
大西洋	120	21	17.5	17	14.2
中薯3号	45	7	15.6	5	11.1
克新1号	101	10	9.9	9	8.9
V1-1	12	1	8.3	1	8.3
2191	35	2	5.7	2	5.7
费乌瑞它	67	3	4.5	3	4.5
1867	23	1	4.3	1	4.3
冀张薯5号	28	1	3.6	1	3.6
1533	26	0	0	0	0

3 讨论

a. 本试验筛选出了耐盐碱性强的再生苗 7 株，抗性中等的再生苗 60 株，抗性弱的再生苗 3 株，共 70 株。这些耐盐碱再生苗是否产生了变异，而且在大田相同盐碱梯度下是否具有相同的耐盐碱度，还需要进一步鉴定。

b. 夏波蒂、大西洋、冀张薯 5 号的愈伤组织质量最好，诱导率也较高，分别为 96.1%、92.9%、82.2%，而芽的分化率却依次为 19.2%、17.5%、3.6%，并不是很高。对于坝薯 10 号、坝薯 8 号两个品种的愈伤组织的诱导率分别为 62.7%、53.7%，并不高，而芽的分化率却很高，依次为 22.2%、33.3%。因而可知，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，愈伤组织诱导率高的品种，分化潜力不一定高。

c. 愈伤组织诱导培养基及分化培养基，针对每一品种并不都是最佳的，因而对于每一品种寻求最佳的诱导及分化培养基配方是关键，发挥出最高的诱导及分化潜力，从而提高变异植株的再生率。这些是今后试验需要进一步做的。

[参 考 文 献]

- [1] 刘友良, 汪良驹. 植物对盐胁迫的反应及耐盐性 [A]. 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物[C].北京: 科学技术出版社, 1998,752- 769.
- [2] 巴逢辰, 赵翠. 中国海涂土壤资源[J]. 土壤学报, 1997, 28(2): 49- 51.