影响马铃薯叶肉原生质体褐化的因素及 $AgNO_3$ 对其褐化和分裂的作用

张淑红，王　蒂*，王　清

（甘肃农业大学农学院，兰州　730070）

摘　要：影响马铃薯叶肉原生质体褐化的主要因素是 6—BA 和基因型，还有 NAA 等其它因素。在相同浓度的 6—BA 下，同一材料的原生质体褐化率在 NAA 1.2 mg/L 时最高，在 0.8 和 1.0 mg/L 时相近。在相同 NAA 浓度下，6—BA 浓度越高，同一材料的原生质体越容易褐化。原生质体褐化率与基因型也有关。在相同的 NAA 和 6—BA 浓度配比下，6 个材料的原生质体褐化难易顺序是 CW—2—3>CW—1—4>CW—2—7，A—1>82—75>2—10，二倍体野生种的原生质体比双单倍体品系的更容易发生褐化。$AgNO_3$ 可抑制马铃薯叶肉原生质体的褐化，从而提高细胞分裂频率。在本试验中，0.6 mg/L $AgNO_3$ 抑制效果最好，原生质体分裂频率最高。

关键词：NAA；6—BA；基因型；$AgNO_3$；马铃薯；叶肉原生质体；褐化；细胞分裂

中图分类号：S532　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1672-3635（2004）02-077-05

1　前　言

马铃薯（*Solanum tuberosum* L.）是世界上第四大粮食作物，同时又是原生质体再生植株涉及品种最多的作物[1]。马铃薯原生质体在遗传操作及育种研究中具有重要意义，既是体细胞杂交的基础，又是获得体细胞变异的重要来源。原生质体培养时细胞壁的再生并不困难，在 1 d 内即可完成。遇到的困难主要是许多品种的原生质体在培养后一两天就发生褐化，使得原生质体分裂频率很低。本文旨在研究引起马铃薯叶肉原生质体褐化的部分因素，以及 $AgNO_3$ 对原生质体褐化的抑制作用，从而探索提高马铃薯叶肉原生质体分裂频率的新方法。

收稿日期：2004—01—13

基金项目：国家 863 计划项目（2001AA241132）。

作者简介：张淑红（1977—），女，甘肃农业大学农学院 2001 级硕士研究生，主要从事作物遗传育种方面的研究.

* 通讯作者。E—mail：wangd@public.lz.gs.cn

2　材料与方法

2.1　材料

二倍体野生种 CW—2—3、CW—1—4 和 CW—2—7 的试管苗；由四倍体栽培种 *Solanum tuberosum*.L 经花药培养获得的双单倍体品系 2—10、82—75 和 A—1 的试管苗。以上材料均培养于 25 ℃，光强 3000 lx，光照 16 h 的光照培养箱中。

2.2　方法

2.2.1　原生质体酶解液组分

1.3%纤维素酶 R—10（日本产）＋0.5%离析

08—3&08—4 have definite specifity of amplifying the DNA of *Phytophthora infestans*, and only amplified 257 bp DNA fragment of *P. infestans*. The primer 08—3&08—4 can amplify 257 bp DNA fragment of *P. infestans* extracted from those tissues of sprout eye site of potato tubers, suggesting that the PCR amplification with primer 08—3&08—4 can be used for detection of *Phytophthora infestans* in potato tuber. In this research, 10% of potato tubers of the cultivar Mira were infected by *Phytophthora infestans* according to PCR amplification with primer 08—3&08—4.

KEY WORDS: *Phytophthora infestans*; potato tubers; PCR detection

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

酶 R－10（日本产），2%聚乙烯吡咯烷酮（PVP K30），3 mmol/L 吗啉代乙烷磺酸（MES），0.01%水解酪蛋白（CH），0.3 mol/L 蔗糖，溶于 CPW[2]溶液中。pH 5.6。

2.2.2　原生质体的游离

于超净工作台上剪取培养 20 d 或 21 d 的试管苗上部幼嫩叶片 1 g 左右，放入 60 mm×16 mm 培养皿中剪碎。然后将剪碎的叶片转入 15 ml 抽滤瓶中，倒入 10 ml 过滤灭菌的酶液，用真空抽气泵在 0.05 MPa 下抽气 5 min。将剪碎的叶片连同酶液倒入另一 60 mm×16 mm 培养皿中，用 Parafilm 封口，置于恒温摇床上，于 28 ℃，40 r/min，弱光下轻摇 4 h。

2.2.3　原生质体的纯化

酶解物用 50 目不锈钢网筛过滤，除去大块组织，将滤液转入 2 个特制细颈离心瓶中，并加入 0.4 M 的原生质体培养基 RA[3]至瓶口 0.5 cm 处，于 1000 r/min 离心 10 min。吸取上层原生质体于另外两个带螺旋帽尖底离心管中，用原生质体培养基在 700 r/min，每次 5 min 下漂洗 3 次。

2.2.4　原生质体的培养

将纯化后的原生质体用培养基（RA＋NAA 0.8，1.0，1.2 mg/L＋6－BA 0.2，0.4，0.6 mg/L 或 RA＋6－BA 0.6 mg/L＋NAA 1.2 mg/L＋$AgNO_3$ 0，0.2，0.4，0.6，0.8 mg/L）调整，使其密度为 1×10^6/ml，移入 15 mm×10 mm 的小培养皿中，每皿加 1 ml 左右的培养液。用 Parafilm 封口，在 24 ℃，黑暗条件下静止培养。2 d 后，在倒置显微镜下观察原生质体褐化及分裂情况。每隔两周添加新鲜等渗的培养基少许。

2.2.5　试验设计

原生质体褐化率和分裂频率在 10×20 的放大倍数下进行观察，取 10 个视野的平均值。

3　结果与分析

3.1　引起马铃薯叶肉原生质体褐化的因素

表 1 采用三因素试验的统计分析，经 F 测验结果表明，马铃薯叶肉原生质体的褐化与 NAA，6－BA，基因型，6－BA×基因型，NAA×基因型有关，与 6－BA×NAA 无关。对褐化作用的主次顺序是 6－BA＞基因型＞NAA＞6－BA×基因型＞NAA×基因型（见表 2）。6－BA，NAA，基因型，6－BA×基因型，NAA×基因型的多重比较采用新复极差测验。

表 1　引起马铃薯叶肉原生质体褐化的因素

激素浓度（mg/L）		品种或品系的褐化率（%）					
6－BA	NAA	CW－2－3	CW－2－7	CW－1－4	A－1	82－75	2－10
0.2	0.8	14	10	12	10	7	5
	1.0	13	10	13	9	5	5
	1.2	14	11	12	10	6	6
	0.8	18	14	15	15	11	8
0.4	1.0	19	13	16	13	12	9
	1.2	19	15	15	15	12	10
	0.8	23	17	19	18	14	12
0.6	1.0	22	16	19	17	16	12
	1.2	23	17	18	19	16	14

表 2　方差分析结果

变异来源	DF	SS	MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
6－BA（A）	2	546.26	273.13	738.19**	3.49	5.85
NAA（B）	2	5.14	2.57	6.95**	3.49	5.85
基因型（C）	5	484.98	97.00	262.16**	2.71	4.10
A×B	4	0.97	0.24	0.65	2.87	4.42
A×C	10	14.63	1.46	3.95**	2.35	3.37
B×C	10	9.75	0.98	2.65*	2.35	3.37
误差	20	7.47	0.37			

3.1.1　6－BA 对马铃薯叶肉原生质体褐化的影响

在本试验中，6－BA 是引起马铃薯叶肉原生质体褐化最主要的因素。6 个材料的叶肉原生质体的褐化率均随着 NAA 浓度的升高而增加，并且在三个 6－BA 水平上均达到了显著性差异（见表 3）。因此 6－BA 浓度越高，越容易引起原生质体的褐化。

表 3　NAA 和 6－BA 处理影响马铃薯叶肉原生质体褐化的新复极差测验

6－BA			NAA		
浓度（mg/L）	褐化率均值（%）	5%显著水平	浓度（mg/L）	褐化率均值（%）	5%显著水平
0.2	9.56	c	0.8	13.44	b
0.4	13.83	b	1.0	13.28	b
0.6	17.33	a	1.2	14.00	a

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3.1.2　基因型对马铃薯叶肉原生质体褐化的影响

基因型是本试验中引起马铃薯叶肉原生质体褐化的第二大因素。经新复极差测验，本试验所采用的 6 个材料中，褐化难易顺序是CW－2－3＞CW－1－4＞CW－2－7，A－1＞82－75＞2－10。CW－2－3 最容易褐化，并且所选三个二倍体野生种的原生质体比三个双单倍体品系的更易褐化（见表 4）。

表 4　基因型影响马铃薯叶肉原生质体褐化的新复极测验

基因型	褐化率均值（%）	5%显著水平
CW－2－3	18.33	a
CW－2－7	13.67	c
CW－1－4	15.44	b
A－1	14.00	c
82－75	11.00	d
2－10	9.00	e

3.1.3　NAA 对马铃薯叶肉原生质体褐化的影响

NAA 也会引起马铃薯叶肉原生质体的褐化。0.8、1.0 mg/L NAA 虽可引起原生质体的褐化，但二者差异性不显著。1.2 mg/L NAA 引起的褐化率最高，比 0.8、1.0 mg/L 的差异性显著（见表 3）。

3.1.4　NAA×6－BA 对马铃薯叶肉原生质体褐化的影响

由表 2 的方差分析表明，NAA×6－BA 互作差异性不显著，即同一浓度的 NAA 与不同浓度的 6－BA 相配比，或同一浓度的 6－BA 与不同浓度的 NAA 相配比，原生质体的褐化能力是几乎相同的。

3.1.5　6－BA×基因型和 NAA×基因型对马铃薯叶肉原生质体褐化的影响

为了达到最低的褐化率，本试验所用的 6 个材料各自所需的 NAA 和 6－BA 最适浓度可能各不相同。经多重比较结果表明，CW－2－3，CW－1－4 和 82－75 三个材料的原生质体褐化率在 NAA 水上无显著性差异；而 CW－2－7 和 A－1 的原生质体在 NAA1.0 mg/L 时褐化率最低，效果最好；2－10 的原生质体在 NAA 0.8、1.0 mg/L 时均可以，而 NAA 1.2 mg/L 时褐化率最高，效果最差。6 个材料的原生质体在 6－BA 水平上随着 6－BA 浓度的升高，褐化率均增加，且三个 6－BA 水平差异均达显著性水平，因此 6 个材料在 6－BA 0.2 mg/L 时褐化率最低，见表 5。

表 5　（NAA、6－BA）×基因型新复极差测验　（%）

水平		CW－2－3		CW－2－7		CW－1－4		A－1		82－75		2－10	
		褐化率均值	差异显著性	褐化率均值	差异显著性	褐化率均值	差异显著性	褐化率均值	差异显著性	褐化率均值	差异显著性	褐化率均值	差异显著性
NAA	0.8	18.33	a	13.67	a	15.33	a	14.33	a	10.67	a	8.33	b
	1.0	18.00	a	13.00	b	16.00	a	13.00	b	11.00	a	8.67	b
	1.2	18.67	a	14.33	a	15.00	a	14.67	a	11.33	a	10.00	a
6－BA	0.2	13.67	c	10.33	c	12.33	c	9.67	c	6.00	c	5.33	c
	0.4	18.67	b	14.00	b	15.33	b	14.33	b	11.67	b	9.00	b
	0.6	22.67	a	16.67	a	18.67	a	18.00	a	15.33	a	12.67	a

3.2　$AgNO_3$ 对马铃薯叶肉原生质体褐化和分裂的作用

表 6 数据表明，CW－2－3 在不加 $AgNO_3$ 时，褐化率过高，使得原生质体不分裂。加入 $AgNO_3$ 后才开始分裂。在一定范围内（0～0.6 mg/L），$AgNO_3$ 浓度越高，6 个材料的原生质体褐化率越低，分裂频率越高。由表 8 的新复极差测验结果显示，$AgNO_3$ 在 0.6，0.8 mg/L 时原生质体的褐化率无显著性差异，但在 0.6 mg/L 时分裂频率最高。添加 0.8 mg/L 的 $AgNO_3$ 虽然原生质体分裂频率比 0.6 mg/L 的低，但仍比不加 $AgNO_3$ 的高。因此添加 $AgNO_3$ 可以使不分裂的原生质体开始分

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

裂，使分裂的原生质体分裂频率增加，在 0.6 mg/L 时效果最好。

表 6　$AgNO_3$ 对马铃薯叶肉原生质体褐化率和分裂频率的作用（%）

$AgNO_3$ 浓度 (mg/L)	CW－2－3		CW－2－7		CW－1－4		A－1		82－75		2－10	
	褐化率	分裂频率	褐化率	分裂频率	褐化率	分裂频率	褐化率	分裂频率	褐化率	分裂频率	褐化率	分裂频率
0	23.0	0	17.0	11	18.0	11	19.0	9	16.0	28	14.0	26
0.2	18.0	3	11.5	20	11.0	20	12.5	25	9.5	36	7.0	37
0.4	12.5	9	7.0	27	6.5	30	7.0	30	5.0	43	3.5	47
0.6	7.5	13	2.0	35	2.0	49	2.5	37	1.0	52	0.5	49
0.8	7.5	3	2.0	18	2.0	19	2.5	20	1.0	30	0.5	31

表 7　$AgNO_3$ 影响马铃薯叶肉原生质体褐化率和分裂频率的新复极差测验

$AgNO_3$ 浓度 (mg/L)	褐化率均值 (%)	5% 显著水平	分裂频率均值 (%)	5% 显著水平
0	16.17	a	14.17	e
0.2	11.58	b	23.50	c
0.4	6.92	c	31.00	b
0.6	2.58	d	39.17	a
0.8	2.58	d	20.17	d

3　讨　论

在马铃薯叶肉原生质体培养中，分裂频率低一直是个难题，褐化是一个很重要的原因。通过本试验发现，6－BA 是马铃薯叶肉原生质体褐化最主要的因素。据报道，细胞分裂素 6－BA 不仅能促进酚类化合物的合成[4,5]，而且还能刺激多酚氧化酶的活性[6]。因此 6－BA 浓度越高，原生质体越容易发生褐化。

基因型与马铃薯叶肉原生质体的褐化也有很大的关系。在相同的 NAA 和 6－BA 浓度配比下，本试验所采用的 6 个材料褐化率的高低顺序是 CW－2－3＞CW－1－4＞CW－2－7，A－1＞82－75＞2－10。虽然 6 种材料的染色体数目相同，但二倍体野生种的原生质体比双单倍体品系的更易褐化，其原因可能是由于二倍体野生种自身色素含量[7]，或多酚类物质的含量以及多酚氧化酶的活性比双单倍体品系的高[8]。因此在二倍体野生种的原生质体培养中，原生质体密度的严格控制及时更换新鲜的等渗培养基就更为重要。

在以往的报道中并未见到 NAA 会引起外植体的褐变，但在本试验中，NAA 也会引起马铃薯叶肉原生质体的褐化。这可能是原生质体是在弱光下培养的，使得 NAA 能够作用于原生质体的褐变。据报道[9]，在黑暗条件下，生长调节剂的存在是外植体褐变的主要原因。为了尽可能的降低褐化率，6 个材料各自所需的 NAA 和 6－BA 浓度各不相同。对 CW－2－3，CW－1－4 和 82－75 的叶肉原生质体，可添加相同浓度的 NAA；而 CW－2－7 和 A－1 的原生质体需 1.0 mg/L 的 NAA；2－10 的原生质体在 NAA 0.8，1.0 mg/L 时均可以。6 个材料的原生质体需 0.2 mg/L 的 6－BA，这可能是由于 6－BA 是引起原生质体褐化的最主要的因素，且 6－BA 浓度越高，原生质体越容易褐化。

本研究还发现，在培养基中添加一定浓度的 $AgNO_3$，可以抑制马铃薯叶肉原生质体的褐化，从而提高细胞分裂频率。添加 $AgNO_3$ 可以使不分裂的细胞能够分裂，使能够分裂的细胞分裂频率增加。在本试验中 $AgNO_3$ 浓度在 0.6 mg/L 时的作用效果最好。继续增加 $AgNO_3$ 浓度，则原生质体的褐化率不再发生变化，细胞分裂频率开始降低，不过仍比不添加 $AgNO_3$ 的高。原生质体培养是在密闭或半密闭的容器中进行的。据报道，在这种情况下，植物细胞会产生乙烯，并且乙烯的浓度会逐渐增加。高浓度的乙烯使原生质体的生长分化受到影响。我们在培养原生质体时，经常会遇到这种情况，原生质体再生细胞壁很容易，在 1 d 内即可完成，但是细胞体积增大到一定程度后就不再继续增大，因而细胞就不发生分裂，而是慢慢地逐渐死

(C)1994-2025 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

亡。其原因可能就是因为培养环境中有高浓度的乙烯。$AgNO_3$ 是一种较好的乙烯活性抑制剂，它通过竞争性结合于细胞膜上的乙烯受体蛋白，从而阻止或降低乙烯的作用[4,10,11]。但是培养基中过量的 Ag^+ 会导致常见的对组织造成的胁迫效应[12]。因此添加 $AgNO_3$ 时浓度必须适宜。

总之，在有关马铃薯叶肉原生质体培养的操作中，为了提高原生质体分裂频率，首先应该尽可能降低培养基中 6—BA 的浓度，其次应该选择容易分裂的材料，还可考虑在培养基中添加一定浓度的 $AgNO_3$ 等褐变抑制剂。

参 考 文 献

[1] 关明阳. 世界马铃薯的生产现状与展望 [J]. 马铃薯杂志，1993，7 (2)：126—128.

[2] 孙勇如，安锡培 . 植物原生质体培养 [M] . 北京，科学出版社 .1991，172—178.

[3] 李浚明 . 植物组织培养教程 [M] . 北京农业大学出版社. 1992，256.

[4] 姚洪军，罗小芳，田砚亭 . 植物组织培养外植体褐变的研究进展 [J] . 北京林业大学学报，1999，21 (3)：78—84.

[5] Zaid A . *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures—A review . Acta Hort，1987，212：561—566.

[6] 裘文达，曹孜义 . 植物组织培养实用技术 [M] . 北京：高等教育出版社，1989，96—98.

[7] Hu C Y，P J Wang . Meristem，shoot tip and bud culures . In：Emvans D A，Sharp W R，Ammirato P V，et al (eds) . Handbook of plant cell culture (Volum Ⅰ) . NewYork：Macmilln Publishing Co . A Division of Macmillan，Inc，1983，177—228.

[8] 崔堂兵，郭勇，张长远 . 植物组织培养中褐变现象的产生机理及克服方法 [J] . 广东农业科学，2001，3：16—18.

[9] Pierik R L M . *In vitro* culture of higher plant . Mattinus Ni jhoff Publishers，1987.

[10] 张鹏，傅爱根，王爱国 . $AgNO_3$ 在植物离体培养中的作用及可能的机制 [J] . 植物生理学通讯，1997，33 (5)：376—379.

[11] Mcyeon T A，S F Yang . Biosythesis and metabolism of ethylene . In Davies P J (ed) . Plant hormones and their role in plant growth and developmnt . Dpdrecht，the Netherlands：Martinus Nijhoff Publ，1987，94.

[12] Veen H，J M H Overbeek . The action of silver thiosulfate in carnation petals . In Clijster H，Deproft M，Marcelle R，et al (eds) . Biochemical and physiological aspects of ethylene production in lower and higher plant . Dordrecht，the Netherland：Kluwer Academic Publ，1989，109.

FACTORS INFLUENCING THE BROWNING OF POTATO MESOPHYLL PROTOPLASTS AND THE EFFECT OF $AgNO_3$ ON THEIR BROWNING AND DIVISION

ZHANG Shu-hong，*WANG Di*，*WANG Qing*

(Agronomy College，Gansu Agricultural University，Lanzhou 730070，China)

ABSTRACT：The major factors influencing the browning of potato mesophyll protoplasts were 6—BA，genotypes and NAA . With the same concentration of 6—BA，the browning rates of potato mesophyll protoplsts showed little difference in the same species or strains with NAA 0.8，1.0 mg/L and were highest with NAA 1.2 mg/L . With the same concentration of NAA，the browning rates became higher in the same species or strains with the increase of 6—BA concentration . $AgNO_3$ could resist the browning of potato mesophyll protoplasts，so it could improve their division frequencies . In this research，0.6 mg/L $AgNO_3$ was the best to resist the browning and to get the highest division frequencies of protoplasts . In the same concentration of NAA and 6—BA，the browning order of genotypes was CW—2—3>CW—1—4>CW—2—7，A—1>82—75>2—10 . It was more difficult to divide for the diploid wild species' protoplasts than for the dihaploids' .

KEY WORDS：NAA；6—BA；genotype；$AgNO_3$；potato；mesophyll protoplast；browning；cell division

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net