



# 用组培法培养马铃薯一倍体和双单倍体进行染色体加倍的研究

冉毅东 王 蒂 戴朝曦

(甘肃农业大学农学系 730070)

## 摘 要

分别取来自普通栽培种 (*S.tuberosum*) 的两个一倍体品系和两个双单倍体品系的茎段和叶片, 用两步法进行组织培养来加倍其体细胞染色体数目。在以 MS+2.25mg/l BAP+5mg/l NAA 为第一步的培养基上, 从一倍体和双单倍体的茎段和叶片中获得了许多再生植株, 其中约 60% 的加倍成植株 ( $2n=2x=24$  或  $2n=4x=48$ ), 此结果表明此法是把单倍体 (以下简称一倍体) 和双单倍体转化为纯合同源四倍体的有效方法。

## 1 前 言

马铃薯 (*S.tuberosum* L.) 染色体是同源四倍体, 通过自花授粉难以得到纯合的四倍体, 从而限制了杂种优势在马铃薯育种上的应用和不分离实生种子的获得。近年来, 新技术广泛应用于改进马铃薯育种方法, 其中之一称之为分析组培法: 其首先是用孤雌生殖法和花药 (花粉) 培养把同源四倍体染色减倍成双单倍体 ( $2n=2x=24$ ), 再从双单倍体减倍成一倍体 ( $2n=x=12$ )<sup>[1~5]</sup>, 第二步是把此一倍体经 2 次连续加倍成纯合四倍体; 第三步是选择好的纯合四倍体组配杂种以获得不分离的具杂种优势的实生马铃薯栽培品种。

马铃薯染色体加倍可通过秋水仙素处理来获得, 但此法常常既费工又费时, 而且加倍的植株倍性是不稳定的。Hemson (1981) 通过诱导下胚轴和叶柄外植体的愈伤组织, 再分化出不定植株从而使杂种二倍

体马铃薯得到加倍。Angela Karp (1984) 通过培养叶片外植体获得了染色体加倍的双单倍体和纯合四倍体, 因而, 组织培养法是马铃薯加倍的一种较好的方法。但是 Karp 所用的培养基对多数基因型材料并不适应<sup>[1]</sup>。另外, 由于用花药培养和子房培养所得的一倍体和双单倍体常常用组培法加以保存, 其茎秆上的叶片常既少又小, 这样对于用叶片外植体组培加倍并不十分方便。

在本研究中, 我们试采用茎外植体培养从一倍体加倍成双单倍体, 从双单倍体加倍成四倍体, 并且比较了叶片和茎段的效果。同时, 要找到获得不定枝条较好的培养基。

## 2 材料和方法

本试验选择的一倍体品系 83 单 12、83 单 14 ( $2n=x=12$ ) 和双单倍体品系 81-8, 82-94 和 82-50 (*S.tuberosum*) 均

由本课题组诱导产生, 并用组织扦插法保存着。

### 2.1 试验过程

在本试验中用由 Karp 等 (1984) 提出的“两步法”, 并且从已经发表过的论文中<sup>[1,6,7,8]</sup>提出的培养条件中选择最适合的培养条件。将试管培养的一倍体和双单倍体植株切成 0.5~1.0cm 长的不带芽的茎段, 并取 0.5cm<sup>2</sup> 无主脉的叶片切块。本试验所用的基本培养基为 MS 培养基 (Murashige 和 Skoog, 1962)。其培养过程为两步: ①将一倍体和双单倍体的叶片切块分别接种在 MS+2.25mg/l BAP 加 0.2, 0.4, 2.5, 5 和 10mg/l NAA 的培养基上约 2 周, 同样将此两种材料的茎切段接种在与上相同的培养基中培养 18 天; ②将所形成的愈伤组织按材料分别转移到 MS+2.25mg/l BAP+5mg/l GA<sub>3</sub> 中约 30 天。两步培养均置于 25℃ 温度下, 1 000lux 日光灯, 光周期为 16 小时; 最后分别统计各种培养基中从两步法得到的再生植株数, 并把这些植株用组培扦插法加以保存。

### 2.2 细胞学研究

将得到的再生植株接种于 MS+0.05mg/l NAA+20g/l 蔗糖的生根

培养基上得到根尖, 取下后用 0.002M 的 8-羟基喹啉在 0℃ 下前处理 4 个小时, 然后置于卡诺固定液中保存 12 小时。之后, 用 1NHCl 在 60℃ 恒温下解离 10 分钟, 并用蒸馏水冲洗, 用醋酸洋红压片。染色体计数要用 5 个以上完好展开的根尖细胞和两个不同根尖。同时观察叶片保卫细胞的叶绿体数目, 每个植株观察 20 以上保卫细胞数, 并与标准对照对比, 最后统计加倍的一倍体及双单倍体数, 求出百分率。

## 3 结 果

### 3.1 从叶片切块和茎段中分化出再生植株

通过两步法 (在 MS+2.25mg/l BAP+5mg/l GA<sub>3</sub> 加 0.2, 2.5, 5 或 10mg/l NAA 上 2 周, 然后转移到 MS+2.25mg/l BAP+5mg/l GA<sub>3</sub> 5 到 9 周), 可形成许多植株。表 1 列出了单一单倍体和双单倍体叶片外植体及茎段在不同培养基产生再生植株的比例; 结果表明, 对叶片和茎段第一步培养基中最适合的 NAA 浓度范围都为 5~10mg/l。而从叶片外植体中诱导的再生植株要比从茎段中得到的多。

表 1 NAA 对叶片及茎段再生植株的影响

材 料		NAA 浓度(mg/l)			
		2.5	5	10	0.2
叶 块	MN 14	0	8.2	4.0	0
	MN 12	8.0	24.3	28.1	0
	DH 81-8	4.0	10.2	—	0
茎 段	MN 14	1.3	8.0	5.3	0
	MN 12	1.3	5.3	0	1.3
	DH81-8	0	4.3	0	1.3
	DH82-94	2.6	—	0	0
	DH82-50	0	8.0	—	0

注: 基础培养基为: MS+2.25mg/l BAP

### 3.2 一倍体染色体加倍

一倍体 83 单 12 和 83 单 14 品系经鉴定

证明是染色体为 2n = x = 12, 气孔保卫细胞叶绿体数平均每个为 18.4+2.2。表 2 列出了

从诱导培养基中得到的一倍体叶片外植体的抽样染色体计数结果; 其中多数染色体已加倍成二倍体水平 ( $2n = 2x = 24$ )。从形态上这些植株具有比相应一倍体更粗壮的茎秆, 且其叶片保卫细胞的叶绿体数 (每对保卫细胞) 要明显多于 CK ( $2n = x = 12$ ) (表 2)。说明其植株已得到加倍, 少数植株在形态及叶绿体数和染色体上仍保持一倍体。有些再生植株 (83 单 12-3, 82 单 12-6) 既有一倍体根尖, 又有二倍体根尖, 因而证明是属于混倍体的植株。83 单 12-5, 因其染色体数为 48, 因而属于四倍体, 这一定是由于连续两次加倍实现的。

表 2 MN83-12 和 MN83-14 叶片再生植株的染色体数目

植 株	染色体数	保卫细胞叶绿体数
MN83-12-1	24	28.5+3.1
MN83-12-2	12	16.4+0.6
MN83-12-3	12 / 24	17.2+2.4
MN83-12-4	24	27.0+2.1
MN83-12-5	24	28.3+4.2
MN83-14-1	24	26.1+3.9
MN83-14-2	12	19.1+2.5
MN83-14-3	12	19.5+1.9
MN83-14-4	24	28.5+2.2
MN83-14-5	24	32.0+3.0

表 3 列出了由叶片外植体分化出的再生植株的倍性分配比例。65% 以上的植株其染色体得到加倍。说明用叶片外植体产生愈伤组织分化植株进行加倍是有效的。大约有 26% 的一倍体仍保持其原来倍性水平, 其余两株为四倍体。另外一些为既有二倍体, 又有一倍体染色体的混倍体。表 4 列出了由一倍体茎段外植体诱导的再生植株不同倍性百分率, 整个再生植株中 58.8% 植株加倍成双单倍体 ( $2n = 2x = 24$ )。除了几个为混倍体外, 其它植株级保持分化以前的倍性水平 (表 4), 这表明用茎段外植体诱导加倍也是可行的。

表 3 一倍体和双单倍体叶片切块诱导加倍的不同倍性株数

材料	一倍体植株	双单倍体植株	四倍体植株	混倍体植株
MN 12	2	11	2	1
MN 14	2	4	0	1
总 和	4	15	2	2
%	26.6	65.0	13.0	13.0
DH 81-8	—	2	8	0
%		20	80	

表 4 一倍体和双单倍体诱导加倍的不同倍性株数

材料	一倍体植株	双单倍体植株	四倍体植株	混倍体植株
MN 12	3	4	0	0
MN 14	2	6	0	2
总 和	5	10	0	2
%	29.0	58.8	0	11.7
DH 81-8	—	2	4	0
DH 82-94	—	2	3	0
DH 82-50	—	1	1	0
总 和		5	8	0
%		33	62	0

### 3.3 双单倍体染色体的加倍

81-8, 82-94 和 82-50 经镜检确认是双单倍体。

用前述诱导一倍体加倍方法从这些双单倍体的叶片外植体中也同样诱导到许多再生植株, 而从叶片外植体产生的再生植株数要比从茎段外植体中相对多 (表 2、表 3 和表 4)。除了几株仍保持为二倍体外, 多数植株已加倍成四倍体 (62%), 在再生植株中没有发现混倍体, 这表明在双单倍体再生植株中偶然加倍的双单倍体细胞的频率是很低的。

再生植株用扦插法加以保存。通过对几次重复扦插枝的观察, 倍性没有变化, 表明加倍后的倍性是稳定的。

## 4 讨 论

在不同培养基中诱导产生植株的再生率是不同的。在作为第一步的培养基 MS+2.25mg/l BAP+5mg/l NAA, 第二步为 MS+2.25mg/l BAP+5mg/l GA<sub>3</sub> 基础上诱导出了较多的植株(表 1)。这个结果不同于 Angela Karp 得到的结果 (MS+2.25mg/l BAP+0.186mg/l NAA 为第一步, 第二步 MS+2.25mg/l BAP+5mg/l GA<sub>3</sub>, 1984), 这可能由于每种材料的基因型对不同培养基中有不同反应。从一倍体叶片外植体及茎段诱导产生植株加倍频率是较高的(分别为 65% 和 58.5%)。而从双单倍体的叶茎外植体中产生加倍的四倍体比率为 80% 和 62%。此结果与早期有关从二倍体普通栽培种杂种的托叶和叶柄得到再生植株的结果<sup>[6]</sup>, 与从培养品系茎段诱导加倍<sup>[7]</sup>的结果, 与从培养的叶片小块的诱导加倍<sup>[1,6]</sup>和从一倍体马铃薯品系诱导加倍的报道是一致的。另一方面, 从叶片切片产生再生植株的比率要比从茎段产生植株的比率高(表 1、表 3 和表 4), 但是, 从此两者产生的植株中加倍植株频率是相近的。因为有些以离体培养保存的单倍体基因型在茎秆上具有很少的叶片, 因而对一些基因来说用叶片作为外植体加倍是不方便的。因而, 用叶片外植体与茎段外植体培养诱导再生植株的加倍是有效的方法之一。

用诱导再生植株而不是用秋水仙素处理的优势在于能简单、迅速地获得大量的加倍植株, 并且仅有少数为混倍体。L<sub>1</sub> 和 L<sub>2</sub> 层的细胞学研究没有发现任何嵌合植株, 早期报道也表明嵌合体是不多见的<sup>[1,8]</sup>。这是组织培养加倍的一个重要优点。

在本研究中用茎段诱导产生再生植株的时间较长, 接种到第二步培养基上的约 40 天以上才能出现分化植株, 而用叶片仅需 28 天, 因而这方面的关键所在还有待进一步研究。

为了把一倍体基因型完整转变为纯合四倍体水平, 现可以利用几种新技术如原生质体自体融合和 2n 配子等, 但这些方法仍然没用于实践, 因而用组培加倍是一个有效的方法。

## 参 考 文 献

- 1 Angela Karp et al. Chromosome doubling in monohaploid and dihaploid potatoes by regeneration from cultured leaf explants. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1984, 3: 363~373
- 2 Chass S S. Analytic breeding in *S.tuberosum*L.—Scheme utilizing parthenotes and other dihaploid stocks. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 1963, 5:339~363
- 3 Dai C X. Inducing dihaploid from tetraploid potatoes (*S. tuberosum*L.) by another culture. *Science bulletin*, 1982, 24: 1529~1532
- 4 Maine M J DE. Shoot structure and morphology of dihaploid potatoes, their chromosome-doubled derivatives and parthenogenetic tetraploid parent. *Potato Research*, 1985, 28: 403~413
- 5 Van Breukelen EWML, Ramanna Ms and Hermesen JG Th. Monohaploids(2n = x = 12) from autotetraploid *Solanum tuberosum*(2n = 4x = 48) through two successive cycles of female parthenogenesis. *Euphytica*, 1979, 24:507~574
- 6 De Maine M J and J A Fanter. The results of in vitro treatment of dihaploids and their implication regarding efficiency doubling and potato histogeny. *Potato Res.*, 1983, 26:289~294
- 7 Hermesen J G Th et al. Chromosome doubling through adventitious shoot formation on *in vitro* cultivated leaf explants from diploid interspecific potato hybrids. *Euphytica*, 1981, 30:239~246
- 8 Sonnino A et al. Chromosome number doubling of 2x potato lines with diverse genetic background through tissue culture. *Potato Research*, 1988, 31:627~631

# CHROMOSOME DOUBLING IN MONOHAPLOID AND DIHAPLOID POTATOES BY REGENERATION IN VITRO FROM CULTURED LEAF AND STEM SEGMENTS

Ran Yidong, Wang Di and Dai Chaoxi

(Department of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou, China, 730070)

## ABSTRACT

Two monohaploid clones and two dihaploid clones derived from *Solanum tuberosum* were tested for doubling of their chromosome number by placing leaf pieces and stem segments on media in two steps. More regenerated plants were produced from both monohaploid and dihaploid leaf and stem segments on medium containing MS+2.25 mg/l BAP+5 mg/l NAA in first step. The percentage of doubled plants ( $2n=2x=24$  or  $2n=4x=48$ ) was about 60% in both monohaploid and dihaploid regeneration plants. This result suggests that it is a useful method to convert monohaploid and dihaploid into homozygous tetraploid potatoes.

## 欢迎订阅 1993 年《马铃薯杂志》

《马铃薯杂志》是由东北农学院、中国作物学会马铃薯专业委员会、黑龙江省农科院、内蒙古农科院联合主办的, 是国内唯一的马铃薯专业科技期刊。它以繁荣我国马铃薯事业为办刊宗旨, 报道我国马铃薯方面的科研成果、科技动态, 介绍本专业的实用技术和科学知识并报道国外马铃薯方面的科技信息。该刊设有: 学术园地、研究简报、知识介绍、经验交流、综述、国外考察、国外动态、新品种介绍等栏目。本刊国内外发行, 季刊, 16开本, 64页。每册定价: 1.80元, 全年7.20元。哈尔滨市邮局发行, 全国各地邮局订阅。邮发代号: 14—167, 邮政编码: 150030。

《马铃薯杂志》编辑部