

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

王 蒂 冉毅东 戴朝曦

(甘肃农业大学农学系)

摘 要

对包括马铃薯四倍体、普通栽培种及其双单倍体和野生二倍体马铃薯在内的15个品种及品系进行了花药培养试验, 其中20个材料分别在3种不同培养基上产生了胚状体。诱导马铃薯产生胚状体的关键在于选择适合的培养基。培养前期35℃高温预培养可明显地提高胚状体数量。“组培能力”基因与外界环境存在着强烈的互作。本试验进一步证明此能力是可遗传的, 可以通过杂交传给后代。这一特性对马铃薯花药培养及马铃薯育种具有重要的理论和实际意义。

1 前 言

花药培养是产生单倍体的主要方法, 在植物育种和基础遗传学研究中具有重要意义。由栽培种双单倍体花药培养产生的一倍体和自然或人工加倍产生的纯合二倍体植株, 能够使自发及诱发隐性突变全部表达, 因而可提高选择效率。这些植株经秋水仙素处理或采用细胞融合技术加倍能够产生纯合四倍体自交系, 它们可作为生产不分离杂交实生籽的优良亲本。花药培养还是快速淘汰无致死基因、克服自交衰退快速获得自交系的一个有效方法。将花药培养技术运用到马铃薯抗病育种工作中已取得令人鼓舞的成果^[1]。

目前, 马铃薯花药培养存在的问题仍然是诱导频率低, 对诱导产生反应的品系少, 不同基因型对同一培养基及培养方法存在着

明显的差异, Wenzel 将其定义为“组培能力”^[2]。Tanaka (1984) 对此能力进行遗传学鉴定, 结论是“组培能力”既不受多基因控制, 也难以用单基因遗传解释。至今为止, 被认为具有组培能力的品系很少, 并且存在着很明显的基因型—环境互作。组培能力基因只能在特定的环境下才能表达, 可能环境条件起的作用更大^[3,4]。

一般花药培养适宜温度为25~30℃。Orkendon (1985) 发现将花药在35℃条件下处理16小时, 接着在30℃下处理24小时, 最后在25℃下进行培养, 可明显提高甘兰花药培养胚状体的数量^[5]。Batty 对马铃薯花药也作了一些高温处理试验, 他们的初步结果表明, 培养前期高温处理对马铃薯花药培养也具有良好的作用^[4]。本试验的目的在于通过对不同培养基及培养条件的筛选, 使尽可能多的马铃薯品种和材料在花药培养过程中产生胚状体, 表现“组培能力”。

2 材料和方法

本研究所取材料的类型及名称代号见表1。

根据前人的研究, 花药颜色及长度均可作为确定花粉发育时期的间接指标。马铃薯花药培养的最适宜花粉发育时期为单核期,

这时的花药一般为黄绿色, 长度为3.5~5 mm。这些指标在不同品系之间有所变动, 但就同一材料而言则相对稳定。因此在第1次接种之前, 要用醋酸地衣红对花粉粒染色并镜检。适宜的幼小花蕾接种之前用95%酒精中浸几秒钟, 再用10%的次氯酸溶液表面灭菌15分钟, 最后用灭菌水冲洗3遍。在无

表1 本试验中所用的品种及品系材料

材 料	倍 性	材 料	倍 性
Red Pontiac (RP)	4x	H ₃ 703 (H ₃)	2x
<i>Neo-tuberosum</i> (NT)	4x	<i>S. stolonifera</i> (Sto)	2x
F ₁₂	4x	<i>S. spegozzinii</i> (Spg)	2x
F ₈ × 武薯1号	4x	83-1	2x
F ₈	4x	IVP ₃₅	2x
86022	4x	M-10	2x
86024	4x	83-35	2x
		81-15	2x

菌条件下将小心取出的花药放置在装有诱导培养基的50ml三角瓶中, 每瓶30个花药。在应试的所有材料的整个开花期选取尽

可能多的花药分别接种在不同培养基上。所选用的不同培养基成份及代号见表2。对花药的诱导培养作了以下几种温度处理。

表2 基本培养基及其附加成分

诱导培养基:

A: MS+3%蔗糖+0.5%活性炭

AN: MS+3%蔗糖+0.5%活性炭+1mg/L 2,4-D+2mg/L NAA+0.5mg/L KT

C: MS+6%蔗糖+0.5%活性炭+1mg/L 2,4-D+2mg/L NAA+0.5mg/L KT

C₂: MS+5%蔗糖+0.5%活性炭+0.5mg/L IAA+2mg/L NAA+0.5mg/L KT+1mg/L 2,4-D

WD: MS+3%蔗糖+0.5%活性炭+2mg/L BAP+2mg/L IAA

WZ: MS+5%蔗糖+0.5%活性炭+2mg/L BAP

分化培养基:

MS+5%蔗糖+0.5%活性炭+1mg/L IAA+2mg/L KT+2mg/L IAA

生根繁殖培养基:

MS+3%蔗糖+0.5%活性炭+1mg/L IAA+0.125mg/L GA₃

a. 接种前将花蕾在4℃下用塑料袋密封保存48小时。

b. 接种后将花药在35℃下黑暗预处理48小时。然后转入正常温度下培养。

以上两处理结束后, 所有培养材料均转移到同一培养室中, 培养室温度为20~25℃, 自然散射光加白色灯2000 lux 昼夜照明。大多数材料在6周后就有肉眼可见的胚状体形成。对胚状体进行计数后即转入分化培养基以产生根茎。待小植株形成后进行茎切段繁殖。

3 结果与讨论

在应试的15个材料中, 6个材料在4~8周后就有胚状体产生并最终成苗, 有些在

花药诱导培养基上直接成苗(表3)。86022, F₈×武1, 86021, 81-8以及RP均有少量胚状体形成, 但最终都没有能够形成根茎。新型栽培种NT在诱导培养基上产生了胚性细胞团, 并有根茎分化, 由于没有及时地转移到新鲜培养基上而导致死亡。

表3的结果表明, 培养前期35℃暗处理效果好于接种前期低温处理以及未处理对照。栽培种双单倍体H₃703是Wenzel(1980)采用轮回选择法筛选出的, 被认为是目前少数几个“组培能力”最好的花药培养材料之一^[2]。以其“组培能力”为基础, 进一步进

表3 前期预处理对马铃薯花药培养的效果

品 系	接种前4℃	培养前35℃	未 处 理
H ₃ 703	4(38)	26(72)	6(50)
SPK	9(43)	21(82)	13(64)
Sto	0(0)	1.3(69)	0.5(52)
81-8	-(-)	2.3(0)	-(-)
83-1	0.25(40)	3(69)	0.83(56)
M-10	-(-)	3.6(71)	-(-)
F-12	-(-)	6.8(78)	-(-)
86022	-(-)	3.5(0)	-(-)
86024	-(-)	0.60(0)	-(-)
NT	-(-)	1.3	-(-)
RP	-(-)	2(0)	-(-)
F ₈ ×武1	-(-)	1.4(0)	-(-)

注: a. 数字为产生胚状体的花药占接种花药的百分率, 下表同;
b. 括号内数字为分化植株占胚状体的百分率%。

行了接种前和培养前的温度处理, 结果仍证明培养前高温处理(35℃)效果明显好于低温处理与未处理对照。无论接种前还是培养前的低温处理(4℃)效果又都比未处理者差(表4)。

Wilson等认为花药培养前的温度处理

能够破坏花粉细胞的正常发育途径, 使其不能发育为花粉粒而分化为胚性细胞。Herbehe-Bors等则认为经温度处理后, 花药壁上的化学、物理变化使其更适合花粉粒向胚性细胞转化。马铃薯花药经35℃的高温处理产生了比4℃明显好的效果, 可能是由

表4 接种前及培养前不同温度处理 H₃703 的花药培养效果

温度处理	接 种 前		培 养 前	
	胚状体(%)	植株分化(%)	胚状体(%)	植株分化(%)
未处理	9.2	50	7.8	—
4℃	3.4	38	4.2	38.8
35℃	12.7	48	26.5	79

于马铃薯起源于安第斯冷凉山区, 高温处理因而比低温处理对其正常分裂产生的作用更为强烈, 从而导致了更多的没有发育完全的细胞向胚性细胞转化的缘故。表3和表4中不经温度处理的花药也产生为比低温处理花药更多的胚状体说明低温处理对马铃薯花药培养无益, 这与 Batty 和 Dunwell(1987)的结果一致。但与戴朝曦等人的研究有矛

盾^[4], 这可能与不同基因对环境的不同反应有关。35℃以上的温度是否还能进一步提高马铃薯胚状体产量, 有待于进一步研究。

除 Spg 和“F₈-武1”可以被两种不同培养基诱导产生胚状体之外, 另9个材料均只在某一种培养基上产生胚状体(表5)。H₃也只能在一种培养基上才能表现其“组培能力”。可见这里存在着强烈的基因型—环境互作。Wenzel 等认为只有那些对激素不太敏

表5 不同培养对胚状体的诱导效果

品 系 材 料	培 养 基					
	A	AN	C	C ₂	WD	WZ
H ₃ 703	0	0	0	0	0	26
Spg	—	—	0	0	21	9.5
Sto	0	—	1.3	0	—	0
st-8	0	0	2.3	—	—	0
F ₈ ×武1	—	—	0.70	0	0	0.67
M-10	—	—	0	0	3.6	—
F-12	—	—	0	0	0	0.8
86022	—	—	—	—	—	3.5
86024	—	—	—	—	—	1.2
NT	—	—	0	0	—	0.60
RP	0	1.3	0	—	—	0
83-1	—	—	—	—	—	4.0

感, 对激素平衡要求不高的基因型才能产生更多的胚状体⁽¹⁾。本试验中另5个应试材料没有能够产生胚状体, 可能不仅仅是无组培能力, 而是因为没有找到适合它们产生胚状体的培养基。另外也可能是由于取材群体太小, 花粉发育时期不适合, 或者前处理不理想。只要在这几方面进一步试验, 应当有更多的材料表现其组培能力。

尽管对组培能力是受单基因还是多基因控制的问题, 目前仍有争论, 但组培能力能够遗传给后代这一点已有试验证明⁽³⁾。本试验过程中曾将F₂的花粉分别接种在不同的4种培养基上, 未产生胚状体。这表明F₂在这4种培养基上未表现出组织培养能力(表6)。

而武薯1号曾被接种在C培养基上, 并产生了0.84%的胚状体⁽⁴⁾, 本试验中用以上两种材料的杂种后代“F₂×武1”在C和WZ培养基上分别产生了胚状体, 这可能与武薯1号在C培养基上的组培能力遗传给了杂种后代有关。如果组培能力可以通过杂交方式传递给杂种后代, 则可以通过有性杂交的方式将组培能力转移给无此能力的品系, 从而使不能产生胚状体的品系也可以通过花药培养产生自交系, 这将对马铃薯杂交育种产生深远的影响, 为马铃薯杂交育种开拓新的途径。由此可见, 对组培能力的遗传性进行深入的研究, 对于马铃薯花药培养和马铃薯育种都具有重要的理论和实践意义。

表6 花药培养产生胚状体的效果 (%)

品种及材料	培养基			
	A	AN	C	WZ
F ₂	0	0	0	0
武1	—	—	0.84*	—
F ₂ ×武1	0	0	0.76	0.67

4 结 论

诱导马铃薯花药产生胚状体的关键在于选择适合的培养基和与之配合的基因型。

“组培能力”可以通过杂交的方式传递给无此能力的品系, 使原来在某一特定培养基上不能产生胚状体的品系可以产生胚状体。接种后进行高温预培养有效地提高马铃薯花药胚状体的数量。

参 考 文 献

1 Wenzel G et al. Combined application of classical and unconventional techniques. G J Jellis and D E

Rochardson, 1987.

2 Wenzel G. Recent progress in microspore culture of crop plants. (The plant genome) D R Davies and D A Hopwood, 1980

3 Uhring H. Genetic selection and liquid medium conditions improve the yield of androgenetic plants from diploid potatoes. Theor Appl Genet, 1985, 71 : 455~460

4 Battw N P. The production of potato haploids by anther culture. 1985

5 Ockendon D J. Anther culture in brussels sprouts (Brassica oleracea var. gemmifera) I. Embryo yields and plant regeneration. Ann Appl Biol, 1984, 105 : 285~291

6 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. 科学通报, 1982, 24 : 1529~1532

7 Wenzel G and Uhring H. Breeding for nematode and virus resistance in potato via anther culture. Theor Appl Genet, 1981, 59 : 333~340

(下ABSTRACT转138页)

bination between PSTV strains and potato cultivars.

When Kexin No. 1 was inoculated with locally mild strain of PSTV, it developed most severe symptoms of PSTV and produced less marketable yield, it was as little as 21% of the uninoculated control. The relative concentration of PSTV during current year of infection was evaluated by Return-polyacrylamide gel electrophoresis. The PSTV was detected as early as 1 week after emergence in samples taken from middle leaves of sprouts inoculation methods and early as 2 weeks after inoculation in leaves taken from leaves inoculation methods. Thereafter the PSTV concentration increased rapidly in middle leaves and reached a peak 7 weeks after emergence for sprouts inoculation methods, and 5 weeks after inoculation for leaves inoculation methods, and then declined sharply. 10 weeks after emergence, the PSTV concentration in middle leaves reached a lowest level sometimes it was not detected by R-PAGE. The PSTV was readily detected by R-PAGE after tuber initiation. While the tubers are increasing with weights, the concentration of PSTV in tubers was rised, and reached a highest level, when potato plants came to maturity.

The nucleic propagating materials free from viroid were planted two year by a elite seed farm, some tubers of the nucleic propagating materials were sampled and detected viroid by R PAGE this year. The potato spindle tuber viroid was not detected in these samples.

(上接143页)

THE EFFECT OF HIGH TEMPERATURE PREINCUBATION AND THE RESPONSE OF DIFFERENT GENOTYPE IN POTATO ANTHER CULTURE

Wang Di, Ran Yidong and Dai Chaoxi

(Department of Agronomy, Gansu Agricultural University)

ABSTRACT

Anther culture was performed to 15 tetraploid and diploid species and accessions, 12 produced embryos on three media respectively. A suitable medium selection is considered very important for a successful pollen embryogenesis. High temperature preincubation could increase the number of embryos, while the low temperature is harmful. There was a strong interaction between "tissue culture ability" (TCA) gene and intra environment (medium). However, the attempt to transfer TCA gene from TCA clone into the non TCA clone was proved to be easy and may be useful in the potato haploid breeding.