

马铃薯离体再生及人工种子研究^{*}

唐 巍 欧阳藩

(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

郭仲琛

(中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘 要 马铃薯 3 个品种虎头, 克 4 和 Favorita 的茎叶外植体在 MS + 1 mg/L NAA + 1 mg/L BA 培养基上形成愈伤组织。在 MS + 0.2 mg/L NAA + 1 mg/L BA 培养基上, 愈伤组织分化产生不定芽。在 MS + 0.05 mg/L NAA 培养基上, 不定芽生根形成再生完整植株。0.2~0.3 cm 大小的不定芽反复继代可持续增殖。有 3 个以上叶片的不定芽在 MS + 5 mg/L BA + 0.05 mg/L IBA 培养基上和黑暗条件下, 在侧芽或顶芽部位形成微型薯。用 4% 海藻酸钠和 2% 氯化钙溶液包裹 0.2~0.3 cm 大小的不定芽或直径为 0.2~0.3 cm 的微型薯制成微芽人工种子和微薯人工种子。在 4℃ 下贮存 2 个月后, 微芽人工种子和微薯人工种子在有菌腐殖土壤中播种 21 d 的萌发率分别是 15.7% 和 96.2%。

关键词 马铃薯; 离体再生; 人工种子

Studies on *in vitro* regeneration and artificial seeds of potato

Tang Wei Ouyang Fan

(State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, Academia Sinica, Beijing 100080)

Guo Zhongchen

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100093)

Abstract Calli of three genotypes of potato of Hutou, Kesi, and Favorita were induced by culturing their stem and leaf explants on MS medium containing 1 mg/L NAA and 1 mg/L BA. Adventitious buds were induced from calli on MS medium with 0.2 mg/L NAA and 1 mg/L BA. Adventitious shoots rooted to form whole regeneration plants on MS medium supplied with 0.05 mg/L NAA. Proliferation of shoots could be obtained on differentiation medium by subcultured of buds of 0.2~0.3 cm in height. Microtubers were induced from shoots on MS medium containing 5 mg/L BA and 0.05 mg/L IBA in darkness. Artificial seeds were produced by encapsulated both adventitious buds and microtubers of 0.2~0.3 cm in size in 4% sodium alginate and 2% CaCl₂

1997-05-06 收稿

第一作者简介: 唐 巍, 男, 1964 年出生, 博士后, 植物细胞工程专业。

^{*} 国家“863”课题资助 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

. After preservation at 4 °C for two months, the highest germination frequency of bud artificial seeds and micro-tuber artificial seeds were 15. 7% and 96. 2% in the 21th day of germination in soil, respectively.

Key words *Solanum tuberosum* L.; *in vitro* regeneration; artificial seeds

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是世界上最重要的粮食和蔬菜作物之一。马铃薯茎尖培养脱毒技术^[1-2]、原生质体培养植株再生^[3-5]、微型薯的诱导^[6]及抗病毒基因工程研究^[7]等取得了可喜的进展。部分研究成果已在实际生产中推广应用, 获得了巨大的经济和社会效益。然而, 为了满足马铃薯的品质、抗病育种及优良品种的种质保存、离体快速繁殖和工厂化生产的要求, 建立马铃薯的离体培养植株再生体系, 进行马铃薯的微芽和微型薯的人工种子研究, 仍然具有重要的实际意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料来源

马铃薯 3 个品种虎头、克 4 和 Favorita 的实验原始材料脱病毒无菌试管苗由宋艳茹教授提供, 试管苗在 MS + 0.2 mg/L NAA + 1 mg/L BA 培养基上增殖后供进一步实验用。

1.2 愈伤组织的诱导、分化和植株再生

在 MS + 1 mg/L NAA + 1 mg/L BA 培养基上进行虎头、克 4 和 Favorita 茎叶外植体的愈伤组织诱导, 获得足够的愈伤组织后, 在 MS + 0.2 mg/L NAA + 1 mg/L BA 培养基上诱导不定芽。不定芽长至 0.5~1.5 cm 时, 进行生根培养。在愈伤组织诱导培养、分化培养及生根培养各 4 周后统计愈伤组织诱导频率、不定芽分化频率和生根频率。愈伤组织诱导为暗培养、分化培养和生根培养的光照培养, 光照 14 h/d, 光强 1 500 lx。培养温度为 25 ±1 °C, 所有培养基中的蔗糖为 3%, 琼脂 0.7%, pH 5.8, 在 121 °C 下灭菌。植株移栽在 25 °C 的花盆内的腐殖土壤中进行。每一处理的组织块或小苗数为 30~70 个。

1.3 微型薯的诱导、人工种子的制作、萌发及小植株的生长

分化产生的不定芽每 2 周继代 1 次, 可保持持续增殖。在分化培养基上生长 4~6 周后, 不定芽生长成有 3 个以上叶片的小苗, 将小苗转移到 MS + 5 mg/L BA + 0.05 mg/L IBA + 8% 蔗糖的液体培养基中, 在黑暗 25 ±1 °C 条件培养 6 周, 统计微型薯诱导频率。每一处理的芽数为 30~70 个。

收获分化培养 2 周、大小 0.2~0.3 cm 的不定芽及渡过休眠期的直径 0.2~0.3 cm 的微型薯, 用 4% 海藻酸钠和 2% CaCl₂ 溶液包裹, 并在人工种皮中添加 0.5% 的防腐剂 WH 831-D。包裹时间 15 min。4% 的海藻酸钠用附加 0.5 mg/L BA、0.5 mg/L GA₃ 和 0.5 mg/L IBA 的 MS 液体培养基配制, 碳源为 2% 的麦芽糖。

人工种子在 4 °C 冰箱中保存 2 个月后进行萌发试验, 萌发试验在有菌和无菌条件下分别进行。有菌萌发在腐殖土壤中完成, 无菌萌发在无激素的 MS 固体培养基中 (含 0.7% 琼脂) 完成。并以未经低温保存的人工种子和微型薯作对照。每一处理中所用的微型薯及人工种子数为 50 个。再生的小苗长至 3~5 cm 时移出培养室, 于温室中以观察其生长状况。实验重复 3 次, 实验数据为 3 次重复的平均数。

2 结 果

2.1 愈伤组织的诱导、不定芽的分化和植株再生

虎头、克 4 和 Favorita 的茎和叶外植体在愈伤组织诱导培养基上均可产生愈伤组织, 6 周后, 克 4 和 Favorita 的诱导率达 80% 以上, 虎头的诱导率达 90% 以上。虎头的茎愈伤组织诱导的频率达 100% (图版 I-1)。不同品种愈伤组织的生长速度、质地、生长周期不同。3 个品种中, Favorita 的愈伤组织生长速度较快, 平均达 5~10 mg/d。生长较快的愈伤组织, 质地较松软, 生长周期较短, 容易衰老死亡。生长较慢的愈伤组织质地较密实, 衰老比较缓慢, 分化培养所需的时间长。

取 0.5~1 g 大小的愈伤组织在附加 0.2 mg/L NAA 和 1 mg/L BA 的 MS 分化培养基上诱导不定芽, 6 周后, 3 个品种中, Favorita 叶愈伤组织的不定芽分化频率最高, 达 85% 以上, 且每克愈伤组织上的平均不定芽数也最高, 平均达 5.3 个。虎头和克 4 的不定芽分化频率为 70%~80%, 每克愈伤组织上的平均芽数为 2~4 个。3 个品种的茎叶愈伤组织起始分化所需的时间大小变化是克 4>虎头>Favorita。愈伤组织上所产生的单个粗壮的不定芽见图版 I-2。将不定芽(1~2 个叶节)转移到新鲜分化培养基上, 4~6 周后在叶节处形成多个不定芽(图版 I-3)。

分化产生的不定芽, 长到 0.5~1.5 cm 或有 3 个以上叶片时转移到附加 0.05 mg/L NAA 的 MS 生根培养基上, 7 d 后不定芽基部形成了小根。4 周后, 3 个品种不定芽的生根频率均达 85% 以上, Favorita 的生根频率达 100%。小植株的移栽成活率与炼苗时间有关, 不经炼苗的小植株在培养室内的移栽成活率为 70% 左右。炼苗 3 d 后移栽成活率在 95% 以上, Favorita 达 100%。3 个品种的再生完整植株如图版 I-4。

2.2 微芽的增殖、微型薯的诱导和人工种子制作

愈伤组织分化培养产生的不定芽长到 0.2~0.3 cm 时, 转移到新鲜分化培养基上, 可保持不定芽的持续增殖, 形成大量可直接用于制造人工种子的微芽。在分化培养基上的培养时间超过 2 周后, 不定芽生长加快, 4~6 周后多数(85% 以上)不定芽有 3 个以上叶片, 可以用于微型薯的诱导。有 3 个以上叶片的不定芽在附加 5 mg/L BA、0.05 mg/L IBA 和 8% 蔗糖的 MS 培养基上, 在黑暗条件下培养 4 周后, 在芽的顶端或侧芽部位形成微型薯(图版 I-5)。6 周后, 微型薯诱导频率达 60% 以上, Favorita 最高, 达 85%。部分小苗上形成了 2 个以上微型薯。用有一个节并除去了顶端的 Favorita 不定芽在附加 5, 7, 9, 11, 13, 15 mg/L BA (图版 I-6 的序号 1~6) 的微型薯诱导培养基上, 6 周后小芽均在叶节处形成了微型薯(图版 I-6), 频率为 50%~70%。在 15 mg/L BA 下, 已形成的微型薯上又形成了微型薯(即二级微型薯)。可见 BA 浓度为 5~15 mg/L 时均可产生微型薯, 高浓度(15 mg/L) BA 可能有利于二级微型薯的形成。

取大小 0.2~0.3 cm 的不定芽或渡过休眠期的直径 0.2~0.3 cm 的虎头、克 4 和 Favorita 微型薯用海藻酸钠(4%)和氯化钙(2%)包裹制成人工种子, 不同包埋时间实验结果表明, 微芽人工种子为 10~12 min 及微薯人工种子为 15 min 时人工种子的贮存性能好, 萌发率也较高。包埋时间太长, 人工种子萌发率降低; 包埋时间太短, 人工种子不耐贮存。在最佳包埋条件下制作的 Favorita 微薯人工种子如图版 I-7, 微芽人工种子如图版 I-8。

2.3 人工种子的萌发和小植株的生长

在 4℃下保存 2 个月的虎头 (H)、克 4 (K) 和 Favorita (F) 的微芽人工种子、微薯人工种子和微型薯在无菌条件下的萌发率低于对照 3%~5%。在有菌的腐殖土壤中, 4℃处理的 H、K 和 F 的微芽人工种子萌发率明显低于对照 (表 1)。3 个品种微芽人工种子萌发率的大小变化是 F>H>K。但是, 4℃处理的 H、K 和 F 的微薯人工种子和微型薯, 在有菌腐殖土壤中的萌发率均高于对照。3 个品种微薯人工种子及微型薯萌发率的大小变化是 F>K>H (表 1)。从播种时间上看, 21 d 的人工种子萌发率已达到或接近最高值。微芽人工种子和微薯人工种子在有菌条件下的最高萌发率分别是 15.7% (Favorita) 和 96.2% (Favorita)。另外, 来自微薯人工种子的植株在株重、叶数及长势上均优于微型薯。

表 1 低温保存对马铃薯人工种子萌发率 (%) 的影响

Table 1 Effect of low temperature treatment on the germination frequency of artificial seeds in potato

播种时间 (d) Time of sowing (days)	4℃处理 Treatment at 4℃									对照 Control								
	微芽人工种子 Bud artificial seeds			微薯人工种子 Microtuber artificial seeds			微型薯 Microtubers			微芽人工种子 Bud artificial seeds			微薯人工种子 Microtuber artificial seeds			微型薯 Microtubers		
	H	K	F	H	K	F	H	K	F	H	K	F	H	K	F	H	K	F
7	2.7	2.1	3.3	7.2	8.9	10.4	6.1	7.2	8.0	4.1	3.2	5.8	5.1	6.3	8.4	4.3	5.2	7.3
14	4.1	3.7	5.6	29.7	31.5	31.6	23.2	29.1	29.2	10.2	9.7	12.6	24.7	28.2	28.5	21.2	24.3	31.2
21	13.6	8.4	15.7	90.7	92.3	96.2	81.7	82.3	89.4	18.7	12.4	19.1	87.1	85.3	89.2	75.1	79.8	85.7
28	14.5	8.8	15.7	92.1	92.3	96.2	81.7	83.1	89.5	18.7	13.5	19.3	88.1	85.6	89.7	76.5	82.4	86.0

H: 虎头; K: 克 4; F: Favorita

3 讨 论

马铃薯离体培养植株再生体系的建立及人工种子研究在马铃薯的遗传转化实验及优良品种在实际生产上的快速推广中有较大的应用价值。我们的实验表明, 在马铃薯的离体再生体系中, 外植体和品种是影响植株再生频率的主要因素, 外植体中以叶的不定芽分化能力最强, 这在马铃薯的原生质体培养中得到证实^[3~4]。所实验的 3 个品种中, Favorita 的植株再生频率最高, 这可能与该品种的遗传组成有关。炼苗时间是影响植株移栽成活率的一个重要因素, 对虎头、克 4 和 Favorita 来说, 炼苗 3 d 后, 可以大大改善小植株对环境的适应能力, 大幅度提高成活率。

马铃薯人工种子具有体积小、运输方便、无病毒及能够保持已有的优良性状等特点^{〔8~9〕}, 在实际生产中有应用价值, 它可以降低生产成本, 提高收益。本文所研制的微芽人工种子, 贮存 2 个月后, 由于供氧及萌发时种皮腐烂等原因, 萌发率明显低于对照组, 不经贮存的微芽人工种子, 在有菌条件下的萌发率也低于 30%, 在实际生产中的应用价值不大。但是本研究中所制成的微薯人工种子, 4℃处理 2 个月后, 其萌发率高于对照, 原因可能是 4℃低温处理不仅可以使人工种皮完好无损甚至加固了种皮, 而且提高了人工种子中微型薯对逆境的适应能力; 另外, 经低温处理的微薯人工种子在室温下萌发时, 其中的微型薯能够更加快速和有效地吸收人工胚乳中的养分和激素, 增强对环境的抵抗力。由于人工种子中胚乳成分可供给微型薯萌发时幼苗生长所需的大量养分, 为幼苗的早期发育提供更好的营养环境, 因此微薯人工种子萌发后产生的小植株在生长状况和生长量等方面均优于微型薯。本研究为马铃薯人工种子的实用化奠定了基础。

参 考 文 献

1 Wang P.J. *In vitro* mass tuberization and virus-free potato production in Taiwan. *Am. Potato J.* 1982, **59**: 33~37
2 王炳君, 刘宗樊. 马铃薯茎尖脱毒与微型薯生产. 北京: 高等教育出版社, 1990. 11
3 李耿光, 张兰英. 马铃薯叶肉原生质体再生植株的研究. 植物学报, 1988, **30** (1): 21~24
4 李世君, 李向辉, 孙勇如. 马铃薯无菌苗叶肉原生质体再生植株. 生物工程学报, 1989, **5** (1): 57~63
5 戴朝曦, 孙顺娣. 马铃薯实生苗子叶及下胚轴原生质体培养研究. 植物学报, 1994, **36** (9): 611~618
6 冉毅东, 王 蒂, 戴朝曦. 用组培法诱导试管微型薯的研究. 马铃薯杂志, 1991, **4** : 193~198
7 崔晓江, 彭学贤, 周雪荣等. 3 价转病毒外壳蛋白基因马铃薯的获得. 科学通报, 1994, **39** (21): 1992~1995
8 Fuili JA, Slade D, Redenbargh K, *et al.* Artificial seeds for plant propagation. *TIB TECH*, 1987, **5**: 335~339
9 Kitto S, Janick S. Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. *J. Am. Soc.* 1985, **110**: 277~282

图 版 说 明

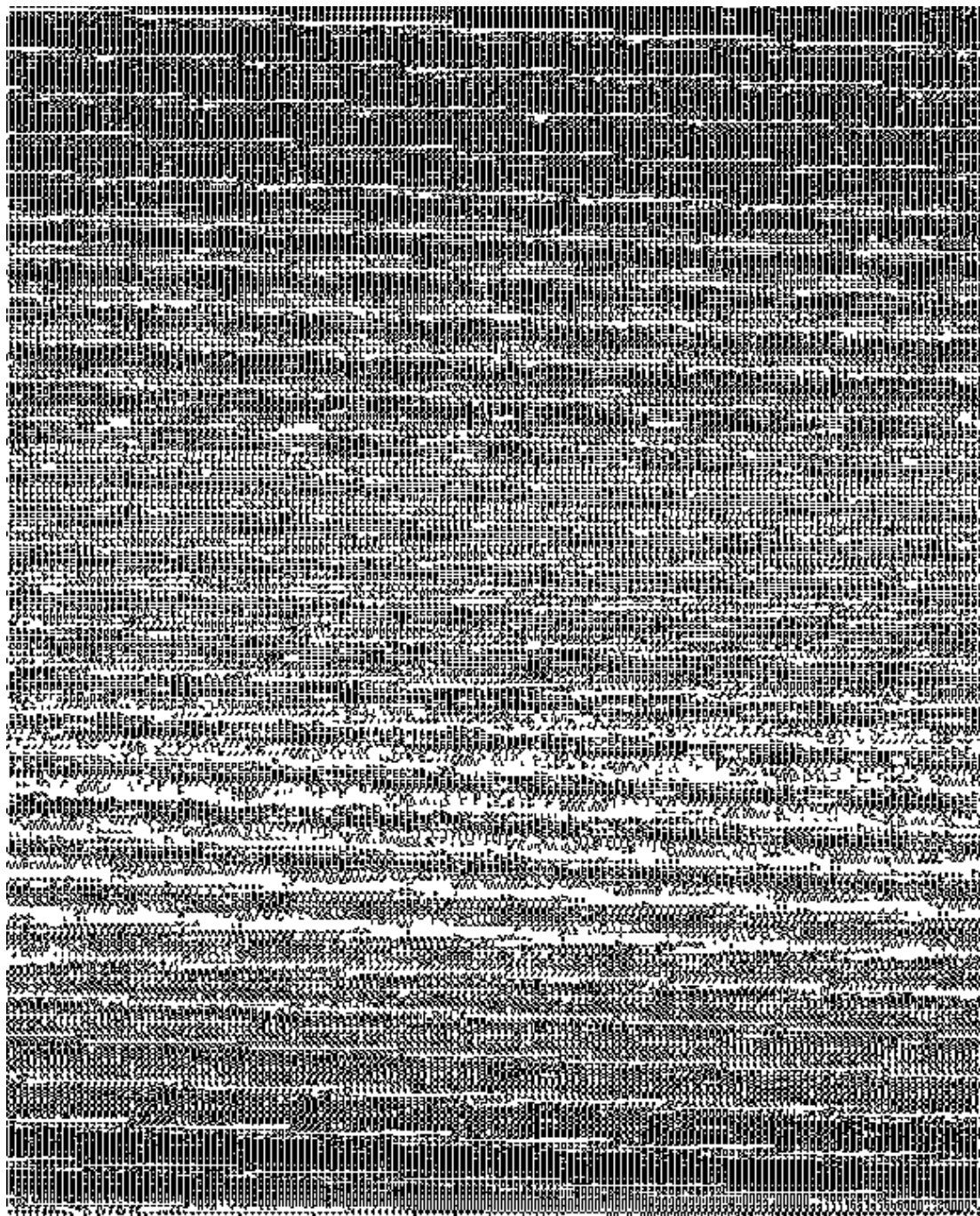
图版 I

1. 愈伤组织 × 5; 2. 不定芽 × 5; 3. 腋芽增殖 × 5; 4. 再生完整植株 × 5; 5. 顶芽及侧芽微型薯 × 5;
6. Favorita 侧芽微型薯 × 5; 7. 微薯人工种子 × 3; 8. 微芽人工种子 × 15。

Explanation of Plate

Plate I

Fig. 1 Calli × 5; Fig. 2 Adventitious buds × 5; Fig. 3 Cluster of buds × 5; Fig. 4 Whole regeneration plants × 5;
Fig. 5 Microtubers derived from apical buds and axillary buds × 5; Fig. 6 Microtubers derived from Favorita axillary buds
× 5; Fig. 7 Microtuber artificial seeds × 3; Fig. 8 Bud artificial seeds × 15.



See explanation at the end of text