

四个马铃薯品种幼茎段再生技术的研究

李娟,程智慧,张国裕

(西北农林科技大学园艺学院,陕西杨凌 712100)

[摘要] 以4个马铃薯栽培品种为试材,进行了其茎段的离体再生研究。结果表明,东农303、夏波帝、鄂1号茎段愈伤组织最佳诱导培养基为MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L;费乌瑞它为MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,愈伤组织的诱导率均可达100%。费乌瑞它和鄂1号不定芽分化诱导的最佳培养基均为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;东农303为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;夏波帝为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L,其不定芽分化率分别达96.7%、96.7%、83.3%和80.0%。各品种不定芽的诱导生根率均为100%,试管苗移栽成活率为95%。

[关键词] 马铃薯;茎段;愈伤组织;植株再生

[中图分类号] S532.035.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)03-0122-05

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是重要的粮菜兼用作物,在各国普遍栽培。而植物组织和细胞培养技术是马铃薯品种改良和种苗脱毒快繁的重要生物技术,一直深受国内外学者的关注。目前,利用马铃薯幼茎切段^[1,2]、幼芽^[1]、叶肉细胞^[3]、叶片^[1]、块茎盘^[4]、根^[5]、花药^[6]等多种外植体进行了愈伤组织的诱导试验并获得了再生植株,脱毒快繁技术已进入实用化阶段^[7],组织培养技术也正在走向标准化^[8-9],并且已用于倍性育种^[10]。但有关马铃薯茎段愈伤组织诱导及植株再生的研究较少,且报道的诱导分化率均较低。本试验在前人研究的基础上,对4个马铃薯栽培品种幼茎段的离体培养与植株再生技术进行了探讨,以期利用马铃薯茎段进行离体快繁提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的4个马铃薯品种分别为费乌瑞它、东农303、夏波帝和鄂1号,均以其茎段为外植体材料。

1.2 培养基与培养条件

以MS为基本培养基,附加蔗糖30 g/L,琼脂8 g/L。在愈伤组织诱导中,接种的茎段先在黑暗条件下进行暗培养,7 d后转入光照培养,光照强度为3 000 lx,光照时间14 h/d,培养温度为23~25℃;

诱导不定芽分化的光照时间为10 h/d,光照强度为3 000 lx。

1.3 无菌外植体的获得

选取健康的马铃薯幼嫩茎段为外植体。先用毛刷将采集的茎段在自来水下反复轻轻刷洗,然后用体积分数70%乙醇消毒10 s,无菌水冲洗3~4次,再用体积分数0.5%次氯酸钠溶液消毒4~6 min,无菌水冲洗3~5次后备用。接种时将幼茎切成0.2~0.3 cm长的茎段,置于不同处理的培养基上。

1.4 愈伤组织的诱导和继代培养

选取马铃薯的幼嫩茎段作为外植体进行愈伤组织诱导,以不同质量浓度(1.0, 3.0, 5.0 mg/L)的细胞分裂素6-BA与不同质量浓度(0, 0.01, 0.05, 0.1 mg/L)的生长素NAA组合,对茎段愈伤组织进行诱导,将所获得的愈伤组织在其相应的诱导培养基上进行继代培养,每15 d继代1次,观察其生长情况。

1.5 植株再生

不定芽分化诱导培养基采用2因素3水平完全试验设计:2因素为6-BA和NAA,6-BA质量浓度设1.0, 2.0和3.0 mg/L 3个水平,NAA质量浓度设0.1, 0.2和0.3 mg/L 3个水平。分化培养40 d后统计芽长超过0.3 cm的不定芽数、芽长,计算平均值。

[收稿日期] 2005-07-27

[基金项目] 中德政府间合作项目(GH-01/04);中德农业部科技合作项目

[作者简介] 李娟(1978—),女,湖南衡阳人,硕士,主要从事蔬菜生理与生物技术研究。现为中国科学院南京土壤研究所在读博士。

[通讯作者] 程智慧(1958—),男,陕西兴平人,教授,博士生导师,主要从事蔬菜栽培生理和生物技术研究。E-mail:chengzh@nwsuaf.edu.cn

由于马铃薯芽苗生根技术已比较成熟,本研究在设置生根试验处理时,只是将获得的不定芽接种在不添加任何激素的空白 MS 培养基上诱导生根,以获得再生植株。

2 结果与分析

2.1 不同质量浓度 6-BA 和 NAA 组合对 4 个马铃薯品种茎段愈伤组织的诱导效果

将茎段接种在愈伤组织诱导培养基上培养,结果见表 1。观察结果表明,接种后 5 d 左右,4 个马铃薯品种的茎段从两端开始膨大变粗,然后向中心扩展,2 周后即可形成增殖膨大的愈伤组织。愈伤组织形状表现为小突起、疏松状、较疏松、致密、较致密、

米粒状等,颜色表现为黄白、淡黄、黄绿、暗绿、绿色等。由表 1 可知,6-BA 与 NAA 的所有组合均能诱导 4 个马铃薯品种的茎段产生愈伤组织,诱导率均在 85% 以上,但不同激素组合的愈伤组织生长状况有明显差异。东农 303、夏波帝和鄂 1 号在 3.0 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA 组合上产生的愈伤组织量较大,呈鲜艳的黄绿色。费乌瑞它在 3.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 组合处理中的愈伤组织质量、生长状况均较好。4 个马铃薯品种的茎段愈伤组织在其他组合中的诱导率虽然也可达 100%,但愈伤组织生长量较少,缺乏光泽,生长缓慢。

表 1 不同质量浓度 6-BA 与 NAA 组合对 4 个马铃薯品种茎段愈伤组织诱导的影响
Table 1 Effect of combinations of 6-BA and NAA on callus induction from stem explants of four potato cultivars

激素/(mg·L ⁻¹) Hormones		费乌瑞它 Favorite				东农 303 Dongnong 303			
6-BA	NAA	接种数 No. of explants	诱导率/% Induction rate	愈伤组织 生长量 Amount of calli	颜色和形状 Color and form	接种数 No. of explants	诱导率/% Induction rate	愈伤组织 生长量 Amount of calli	颜色和形状 Color and form
1.0	0	40	100.0	+	深绿色,小突起 Dark green, in small bulge	35	100.0	+	绿色,小突起 Green, in small bulge
1.0	0.01	40	100.0	+	绿色,米粒状 Green, rice grain shape	35	100.0	+	绿色,米粒状 Green, rice grain shape
1.0	0.05	40	100.0	++	淡黄色,较疏松 Light yellow, softer	35	100.0	+	淡黄色,较疏松 Light yellow, softer
1.0	0.10	33	97.0	++	黄白色,疏松 Yellowish white, soft	35	100.0	+	黄白色,疏松 Yellowish white, soft
3.0	0	40	100.0	++	绿色,较致密 Green, tighter	33	100.0	++	绿色,较致密 Green, tighter
3.0	0.01	40	100.0	++	黄绿色,米粒状 Yellowish green, rice grain shape	35	100.0	++++	黄绿色,米粒状 Yellowish green, rice grain shape
3.0	0.05	40	100.0	+++	黄绿色,较疏松 Yellowish green, softer	35	100.0	+++	黄绿色,较疏松 Yellowish green, softer
3.0	0.10	33	100.0	++++	淡绿色,米粒状 Light green, rice grain shape	34	100.0	++	黄白色,疏松 Yellowish white, soft
5.0	0	40	100.0	+	暗绿色,致密 Dark green, tight	34	100.0	+	暗绿色,致密 Dark green, tight
5.0	0.01	40	92.5	+	暗绿色,致密 Dark green, tight	35	100.0	+	暗绿色,致密 Dark green, tight
5.0	0.05	40	100.0	+	暗绿色,较致密 Dark green, tighter	35	100.0	+	暗绿色,较致密 Dark green, tighter
5.0	0.10	40	100.0	+	绿色,米粒状 Green, rice grain shape	28	100.0	+	绿色,米粒状 Green, rice grain shape

续表 1 Continued Table 1

激素/(mg·L ⁻¹) Hormones		夏波帝 Shepody				鄂 1 号 E No. 1			
6-BA	NAA	接种数 No. of explants	诱导率/% Induction rate	愈伤组织 生长量 Amount of calli	颜色和形状 Color and form	接种数 No. of explants	诱导率/% Induction rate	愈伤组织 生长量 Amount of calli	颜色和形状 Color and form
1.0	0	30	93.3	+	绿色,小突起 Green, in small bulge	28	100.0	+	深绿色,小突起 Dark green, in small bulge
1.0	0.01	30	86.7	+	绿色,米粒状 Green, rice grain shape	35	100.0	+	绿色,米粒状 Green, rice grain shape
1.0	0.05	28	100.0	+	淡黄色,较疏松 Light yellow, softer	35	85.7	+	淡黄色,较疏松 Light yellow, softer
1.0	0.10	30	100.0	+	黄白色,疏松 Yellowish white, soft	35	94.3	+	黄白色,疏松 Yellowish white, soft
3.0	0	30	100.0	+++	绿色,较致密 Green, tighter	35	97.1	++	绿色,较致密 Green, tighter
3.0	0.01	30	100.0	++++	黄绿色,米粒状 Yellowish green, rice grain shape	35	100.0	++++	黄绿色,米粒状 Yellowish green, rice grain shape
3.0	0.05	30	100.0	+++	黄绿色,较疏松 Yellowish green, softer	35	100.0	+++	黄绿色,较疏松 Yellowish green, softer
3.0	0.10	30	96.7	++	黄白色,疏松 Yellowish white, soft	32	100.0	++	淡黄色,较疏松 Light yellow, softer
5.0	0	29	100.0	+	暗绿色,致密 Dark green, tight	35	100.0	+	暗绿色,致密 Dark green, tight
5.0	0.01	30	100.0	+	暗绿色,较致密 Dark green, tighter	35	100.0	+	暗绿色,较致密 Dark green, tighter
5.0	0.05	30	100.0	+	暗绿色,较致密 Dark green, tighter	35	100.0	+	暗绿色,较致密 Dark green, tighter
5.0	0.10	27	100.0	+	绿色,米粒状 Green, rice grain shape	35	91.4	+	绿色,米粒状 Green, rice grain shape

注:“+”越多表示产生愈伤组织的量越多。

Note: More “+” means more calli produced.

2.2 不同质量浓度 6-BA 和 NAA 组合对 4 个马铃薯品种愈伤组织分化和植株再生的影响

2.2.1 6-BA 与 NAA 对茎段愈伤组织不定芽诱导的影响 由表 2 可知,不同马铃薯品种茎段愈伤组织大部分在培养 22~24 d 时开始分化出小芽。4 个品种在 6-BA 与 NAA 所有组合中均能诱导出芽,不同组合中开始出芽的时间、诱导率、平均芽数、平均芽长、芽长势等均不同。4 个品种愈伤组织均在 6-BA 质量浓度为 2.0 mg/L 的组合中分化较好,表现为分化早、芽数多,芽长长和诱导率高,说明茎段愈伤诱导分化的最佳 6-BA 质量浓度为 2.0 mg/L。另外,除费乌瑞它在 6-BA 为 3.0 mg/L 时,芽长随 NAA 质量浓度增加而变短外,其他组合在同一 6-BA 质量浓度下,均随 NAA 质量浓度增加,芽长相应增加,说明 NAA 对芽的伸长生长有一定作用。

从愈伤组织诱导的出芽时间、诱导率和长势综合来看,费乌瑞它和鄂 1 号的最佳分化培养基为 2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA;东农 303 的最佳分化培养基为 2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA;夏波帝的最佳分化培养基为 2.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA。

2.2.2 4 个马铃薯品种芽苗根的诱导与移栽效果

将分化出的不定芽切割下来直接培养在不含任何激素的 MS 培养基中进行根的诱导,7 d 左右即可观察到根的发生,4 个马铃薯品种不定芽诱导生根率均为 100%。当芽苗长出 7~8 条根时,将发育良好的再生苗从培养瓶中取出,冲去附着的培养基并移栽于盛有经消毒处理的蛭石的营养钵里,加盖塑料膜保温保湿,5~7 d 后移栽苗成活,揭去塑料薄膜炼苗。移栽苗生长期间每 7 d 浇 1 次 1/10 MS 营养

液。移栽结果表明,各品种移栽成活率均可达 95% 以上。

表 2 不同质量浓度 6-BA 与 NAA 组合对 4 个马铃薯品种茎段愈伤组织不定芽诱导的影响
Table 2 Effect of combination of 6-BA and NAA in different concentrations on shoot induction from stem callus of 4 potato cultivars

激素/(mg·L ⁻¹) Hormones		费乌瑞它 Favorite					东农 303 Dongnong 303				
6-BA	NAA	接种愈伤块数 No. of callus	出芽时间/d Shooting time	芽数 No. of shoots	芽长/cm Shoot length	诱导率/% Induction rate	接种愈伤块数 No. of callus	出芽时间/d Shooting time	芽数 No. of shoots	芽长/cm Shoot length	诱导率/% Induction rate
1.0	0.1	30	30	5.0	0.85	50.0	30	25	4.2	0.71	50.0
1.0	0.2	30	28	4.1	0.91	40.0	30	25	6.0	0.71	33.3
1.0	0.3	30	24	4.6	1.02	33.3	30	27	5.0	0.98	30.0
2.0	0.1	30	20	8.1	1.21	70.0	30	20	5.7	1.03	83.3
2.0	0.2	30	18	10.7	1.23	96.7	30	20	6.0	1.20	76.3
2.0	0.3	30	19	7.2	1.33	70.0	30	20	5.9	1.22	30.0
3.0	0.1	30	18	5.6	0.99	60.0	30	18	7.2	0.44	50.0
3.0	0.2	30	25	5.6	0.67	56.7	30	18	4.8	0.49	76.3
3.0	0.3	30	25	3.2	0.62	20.0	30	20	5.0	0.50	30.0

激素/(mg·L ⁻¹) Hormones		夏波帝 Shepody					鄂 1 号 E No. 1				
6-BA	NAA	接种愈伤块数 No. of callus	出芽时间/d Shooting time	芽数 No. of shoots	芽长/cm Shoot length	诱导率/% Induction rate	接种愈伤块数 No. of callus	出芽时间/d Shooting time	芽数 No. of shoots	芽长/cm Shoot length	诱导率/% Induction rate
1.0	0.1	30	26	6.7	1.04	33.3	30	25	9.9	1.05	76.3
1.0	0.2	30	25	8.5	1.22	40.0	30	25	10.8	1.05	70.0
1.0	0.3	30	25	4.4	1.24	43.3	30	25	10.8	1.13	70.0
2.0	0.1	30	22	10.2	0.99	70.0	30	20	14.5	1.43	83.3
2.0	0.2	30	22	14.3	1.30	76.3	30	20	12.4	1.99	96.7
2.0	0.3	30	23	9.5	1.44	80.0	30	24	13.3	1.99	80.0
3.0	0.1	30	24	11.4	0.66	50.0	30	24	5.6	0.95	46.7
3.0	0.2	30	24	6.2	0.67	43.3	30	24	6.6	0.96	55.3
3.0	0.3	30	24	7.6	0.69	30.0	30	26	3.2	0.99	20.0

注:分化培养 40 d 统计芽长超过 0.3 cm 的芽数、芽长,计算平均值。
Notes: The results were obtained 40 days after culture. Only the shoots over 0.3 cm in length were calculated.

3 讨 论

有关马铃薯茎段愈伤组织诱导及植株再生的研究报道较少^[1-2]。本研究试用前人研究获得的培养基配方^[1,7],但培养效果并不理想,诱导产生的愈伤组织易生根、褐化。本试验在前人研究的基础上对“费乌瑞它”、“东农 303”、“夏波帝”和“鄂 1 号”4 个马铃薯品种的愈伤组织诱导及其不定芽的分化进行了探

讨,结果表明,诱导愈伤组织的最佳培养基配方与韩善华等^[1]、Austin S 等^[2]的研究结果相差很大,而且本试验研究的 4 个马铃薯品种对愈伤组织诱导培养基的要求也不相同,说明马铃薯基因型差异对愈伤组织诱导效果影响很大,用茎段作外植体,最好将其腋芽去掉,否则,因其长出腋芽会影响愈伤组织的生长。

[参考文献]

[1] 韩善华,郑国钊. 马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)幼茎(芽)愈伤组织的诱导和植株再生[J]. 实验生物学报,1982,15(1):111-115.
[2] Sandra A,Cassels A C. Variation between plants regeneration from individual calli produced from separated potato stem callus cells[J]. Plant Science Letters,1983,31:107-114.
[3] 邹育礼. 马铃薯叶肉细胞再生植株研究初报[J]. 遗传,1983,5(2):13-14.
[4] 双 宝,李文美,李文滨,等. 马铃薯优化再生系统的建立[J]. 马铃薯杂志,1995,9(3):134-138.
[5] Montezuma-De-Caryalho J. Isolation of a callus from potato roots[J]. Bot Soc Brot,1976,50:143-163.
[6] Cappadocia M,Cheng D S K,Ludlum S R. Plant regeneration from *in vitro* culture of anther of *Solanum chacoense* Bitt. and inter-specific

- diploid hybrids *S. tuberosum* L., *S. chacoense* Bitt[J]. Theor Appl Gene, 1984, 69: 139-143.
- [7] 庞淑敏, 方贯娜. 马铃薯脱毒苗快繁低成本培养基改良试验[J]. 河南农业科技, 2004(12): 59-61.
- [8] 张智策, 张凤芸. 马铃薯组织培养环境调控初探[J]. 中国马铃薯, 2004, 18(4): 236.
- [9] 李清萍. 马铃薯组织培养苗的标准化培育[J]. 中国马铃薯, 2003, 17(1): 240-241.
- [10] Fleming M L H, Maine M J D E, et al. Ploidy doubling by callus culture of potato dihaploid leaf explants and the variation in regenerated plants[J]. Ann Appl Biol, 1992, 121: 183-188.

Study on *in vitro* regeneration technology from stem explants of four potato cultivars

LI Juan, CHENG Zhi-hui, ZHANG Guo-yu

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Four potato cultivars were regenerated *in vitro* from stem explants. The results showed that the optimal medium for callus induction was found to be MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L for cv. Dongnong 303, cv. Shepody and cv. E No. 1, MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L for cv. Favorite. The callus induction rate on those media reached up to 100%. The optimal medium for adventitious bud differentiation from stem callus was found to be MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L for cv. Favorite and cv. E No. 1, MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L for cv. Dongnong 303, and MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L for cv. Shepody. The adventitious bud differentiation rate reached 96.7%, 96.7%, 83.3% and 80.0% for the four cultivars respectively, and the rooting rate was 100% for all cultivars. The survival rate of tube plantlets after transplantation reached 95%.

Key words: potato; stem section; callus; plant regeneration

(上接第121页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)03-0119-EA

Study of calcium distribution in different organs of apple tree

FAN Hong-zhu, TONG Yan-an

(College of Resources Environment, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The biomass, water content, calcium concentration and uptake in different organs of young fruit Red Fuji apple tree were studied in this paper. The results showed that the biomass of tree was 10.19 kg; Calcium concentration of the above ground part from 5.18 g/kg to 16.66 g/kg, the roots system from 6.60 g/kg to 11.7 g/kg, total calcium uptake 74.29 g, calcium uptake of above ground part and the roots 51.38 g and 22.91 g, respectively. Calcium concentration of spring shoots was the highest. The dry weight of scaffold was the heaviest. In the newborn organs (fruits, leaves and spring shoots) of the tree, the dry weight of the leaves were highest, and calcium uptake was the same. The water content of different organs above ground in young organs was higher than that in old organs. The dry weight of roots reduced along with the diameter in the same soil layer. In the same soil layer the water content of roots increased by the decreasing of the root diameter. In the same root diameter, the water content increased with the depth of the soil. The root in the diameter of 1.0—5.0 cm in the apple tree is the main structure. The calcium mainly stored in the scaffold and the root in 1.0—5.0 cm.

Key words: apple tree; organs; calcium nutrition; distribution