

# 五种基因型马铃薯微型薯诱导研究

赵 燕,刘清波,胡清云,任春梅

(湖南农业大学 生物科学技术学院,湖南 长沙 410128)

**摘要:**以 HS-10、鄂 5、F、中 3 和 PBT-20 不同基因型马铃薯为材料,通过不同培养基配方研究离体条件下微型薯诱导的影响因子。结果表明:增加微型薯大薯率,以配方 MS+8%蔗糖+5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1%活性炭(液体培养基)为佳;增加微型薯结薯数量,MS+8%蔗糖+0.45%琼脂+4 mg·L<sup>-1</sup> KT+0.1%活性炭为佳;香豆素对微型薯的诱导有促进作用;不同基因型材料在相同培养条件下微型薯生长状况有差异,相同基因型微型薯在不同培养条件下生长状况也存在差异。

**关键词:**基因型;微型薯;诱导

**中图分类号:**S532

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2012)01-0022-04

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是茄科一年生草本块茎植物,是重要的经济作物之一。20 世纪 80 年代,Kim 首先报道了用组培法诱导微型薯<sup>[1]</sup>,引起了国内外学者普遍重视。其中,在马铃薯基因工程的研究中,微型薯与其它外植体如叶片、茎段和块茎等相比较,具有再生频率更高的优势<sup>[2]</sup>,因此被研究者作为遗传转化研究的首选受体材料。近年来,许多学者对微型薯的形成做了大量研究,得出了一些重要结果。这些研究为马铃薯微型薯诱导应用以及加快脱毒马铃薯的繁殖,缩短种薯生产周期等提供了依据和保障。

现选用 5 种不同基因型的马铃薯 HS-10、鄂 5、F、中 3 和 PBT-20 为材料,研究了离体条件下微型薯形成过程中不同培养条件的影响,为快速大量诱导微型薯、建立马铃薯高效转基因体系与进行转基因改良研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

5 种基因型马铃薯为 HS-10、鄂 5、F、中 3 和 PBT-20,由湖南农业大学生物科学技术学院任春梅教授提供。

### 1.2 方法

1.2.1 5 种基因型马铃薯无菌苗的获得 取供试基因型马铃薯苗,消毒灭菌后分别切取含 1~2

个叶节的茎段接种至 50 mL MS+3%蔗糖+0.7%琼脂,pH 5.8 的培养基上,每瓶 4~6 个茎段,每种基因型接种 6 瓶,在培养室中光照培养 21 d,获得无菌苗。

1.2.2 培养基设置 以 MS 为基本培养基,固体培养基均添加:0.45%琼脂+8%蔗糖+0.1%活性炭,pH 5.8。

固、液培养基对微型薯诱导的影响。MS<sub>1</sub>: MS+5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA;MS<sub>2</sub>: MS+5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA (不添加琼脂)。

生长调节剂对微型薯诱导的影响。MS<sub>3</sub>: MS+4 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA;MS<sub>4</sub>: MS+4 mg·L<sup>-1</sup> KT。

香豆素对微型薯诱导的影响。MS<sub>5</sub>: MS+4 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.02 mg·L<sup>-1</sup> NAA+20 mg·L<sup>-1</sup> 香豆素;MS<sub>6</sub>: MS+4 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.02 mg·L<sup>-1</sup> NAA。

1.2.3 培养条件 各处理培养温度为(25±2)℃,每日光照 10~12 h,光照强度为 1 500~2 000 lx,每培养 20 d 更换 1 次培养基。每瓶接种 6~9 个茎段,每种处理接种 6 瓶。

1.2.4 试验数据统计及分析 各处理培养约 60 d,统计单瓶结薯个数(个·瓶<sup>-1</sup>)(薯块直径大于 2 mm 确认为结薯)、薯块平均直径(mm)、大薯个数(个·瓶<sup>-1</sup>)(直径≥5 mm),计算大薯率(大薯占结薯总数百分数)和成薯指数(每茎段结薯数量)。

## 2 结果与分析

### 2.1 固、液态培养基对 5 种基因型马铃薯微型薯诱导的影响

分别将 5 种基因型马铃薯无菌苗切成带一叶的单茎段,接种至第一种组合的培养基中,外植体先生长成植株约 30 d 后开始结薯,培养 60 d 左右统计结薯结果(见图 1,图 2 和表 1)。

收稿日期:2011-08-16

基金项目:湖南省科技厅资助项目(2010FJ3103)

第一作者简介:赵燕(1964-),女,湖南省湘潭市人,硕士,副教授,从事植物基因工程研究。E-mail: Zhaoyan0585@163.com。

通讯作者:任春梅(1962-),女,湖南省浏阳市人,博士,教授,从事植物基因工程及信号传导研究。E-mail: rencm66@163.com。



图 1 固体培养基 MS<sub>1</sub> 诱导的马铃薯微型薯 F  
Fig. 1 The induction of microtuber F of potato in solid medium MS<sub>1</sub>

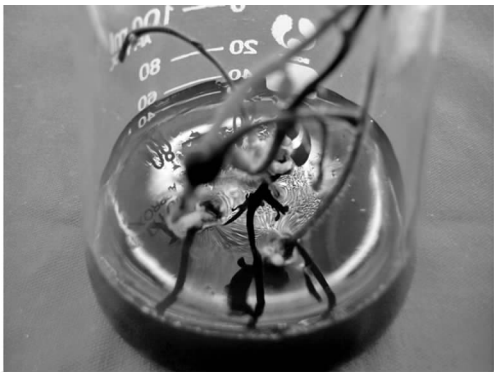


图 2 液体培养基 MS<sub>2</sub> 诱导的马铃薯微型薯 F  
Fig. 2 The induction of microtuber F of potato in liquid medium MS<sub>2</sub>

表 1 MS<sub>1</sub>、MS<sub>2</sub> 培养基对 5 种基因型马铃薯微型薯的诱导

Table 1 The induction of microtuber of five genotype potatoes in MS<sub>1</sub> and MS<sub>2</sub>

基因型 Genotype	开始结薯时间/d Formation time of microtubers		单瓶结薯个数/个·瓶 <sup>-1</sup> No. of microtubers per culture		薯块平均直径/mm Average diameter of tubers		大薯个数/个·瓶 <sup>-1</sup> No. of big tubers		大薯率/% Rate of big tubers		成薯指数/薯数·段 <sup>-1</sup> Index of production	
	MS <sub>1</sub>	MS <sub>2</sub>	MS <sub>1</sub>	MS <sub>2</sub>	MS <sub>1</sub>	MS <sub>2</sub>	MS <sub>1</sub>	MS <sub>2</sub>	MS <sub>1</sub>	MS <sub>2</sub>	MS <sub>1</sub>	MS <sub>2</sub>
鄂 5	30	35	4.75	3.67	2.51	5.10	0.5	0.67	11	40.0	1.19	0.33
中 3	30	30	4.25	3.50	2.60	3.43	0.2	0.33	5	9.0	1.06	0.88
F	30	35	4.00	3.00	2.42	6.20	0	1.12	0	37.5	0.80	0.67
PBT-20	35	35	3.00	2.33	4.56	6.33	1.6	1.90	53	81.0	0.75	0.58
HS-10	35	35	4.27	3.80	2.00	2.80	0	0	0	0	1.07	0.95

由表 1 可知,液体培养基诱导的微型薯在薯块直径、大薯率方面都明显高于固体培养基,其中以基因型 F 最为明显。其薯块平均直径达 6.2 mm,比固体培养基中薯块平均直径增加了 3.78 mm,其大薯率亦由 0 提高到了 37.5%,说明液体培养基比固体培养基更利于微型薯增大。但固体培养基在结薯时间、单瓶结薯个数和成薯指数方面优于液体培养基。这可能是液体培养基更有利于营养物质扩散,便于微型薯的吸收,但却不利于根茎着生;而固体培养基中茎段外植体则比较容易生根长叶,利于快速成薯且数量较多。

## 2.2 生长调节剂对 5 种基因型马铃薯微型薯诱导的影响

按上述方法将外植体接种至第二种组合的培养基中,观察植株生长状态(见图 3,图 4),60 d 左右统计结薯结果(见表 2)。

从表 2 结果可看出,添加 KT 的培养基 MS<sub>4</sub> 诱导形成微型薯的时间短,且在单瓶结薯个数和成薯指数方面都明显高于 MS<sub>3</sub> 培养基。说明生长调节剂 KT 更有利于微型薯结薯数量的增加。但添加 6-BA 的 MS<sub>3</sub> 培养基在薯块平均直径、大薯个数和大薯率等方面则优于添加 KT 的 MS<sub>4</sub> 培

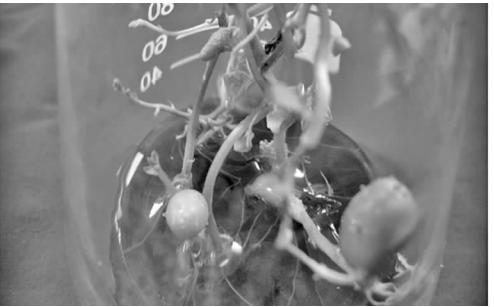


图 3 添加 6-BA 的培养基 MS<sub>3</sub> 诱导的马铃薯微型薯鄂 5  
Fig. 3 The induction of microtuber E5 of potato in the medium MS<sub>3</sub> with 6-BA



图 4 添加 KT 的培养基 MS<sub>4</sub> 诱导的马铃薯微型薯鄂 5  
Fig. 4 The induction of microtuber E5 of potato in the medium MS<sub>4</sub> with KT

表 2 MS<sub>3</sub>、MS<sub>4</sub>培养基对五种基因型马铃薯微型薯的诱导结果  
Table 2 The induction of microtuber of five genotype potatoes in MS<sub>3</sub> and MS<sub>4</sub>

基因型 Genotype	开始结薯时间/d Formation time of microtubers		单瓶结薯个数/个·瓶 <sup>-1</sup> No. of microtubers per culture		薯块平均直径/mm Average diameter of tubers		大薯个数/个·瓶 <sup>-1</sup> No. of big tubers		大薯率/% Rate of big tubers		成薯指数 Index of production	
	MS <sub>3</sub>	MS <sub>4</sub>	MS <sub>3</sub>	MS <sub>4</sub>	MS <sub>3</sub>	MS <sub>4</sub>	MS <sub>3</sub>	MS <sub>4</sub>	MS <sub>3</sub>	MS <sub>4</sub>	MS <sub>3</sub>	MS <sub>4</sub>
鄂 5	30	25	3.27	5.50	2.51	2.34	0.50	0.25	11.0	9.0	0.71	1.06
中 3	30	25	3.42	4.87	3.33	2.71	1.00	0.42	39.2	8.6	0.43	0.61
F	35	30	1.80	2.90	4.89	3.50	0.86	0.73	47.0	25.0	0.23	0.36
PBT-20	30	25	1.52	3.00	5.38	4.58	1.20	0.90	78.0	30.0	0.18	0.38
HS-10	35	35	2.30	2.88	3.14	2.09	0.11	0.03	5.0	2.0	0.28	0.36

培养基。如表 2 中基因型鄂 5 的微型薯在 MS<sub>3</sub> 培养基中成薯指数为 0.71, 而 MS<sub>4</sub> 培养基中其成薯指数为 1.06, 增加了 0.35, 但其大薯率则由 11% 降到了 9%。分析原因可能是 MS<sub>3</sub> 培养基中微型薯数量少, 单个微型薯所获取的营养物质比 MS<sub>4</sub> 培养基多, 因此微型薯更大。在试验中也观察到, 接种在 MS<sub>4</sub> 培养基上的茎段生长较快, 长出的叶也较多。而 MS<sub>3</sub> 培养基中的茎段生长较慢, 部分

茎段甚至不经生长而直接诱导微型薯, 此类微型薯虽然较大, 但是数量却不多。

### 2.3 香豆素对 5 种基因型马铃薯微型薯诱导的影响

按上述方法将外植体接种至第三种组合的培养基中, 观察植株生长状态(见图 5、图 6), 60 d 左右统计结薯结果(见表 3)。

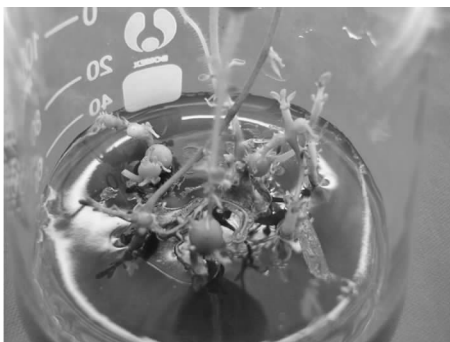


图 5 添加香豆素的培养基 MS<sub>5</sub> 诱导的马铃薯微型薯鄂 5  
Fig. 5 The induction of microtuber E5 of potato in the medium MS<sub>5</sub> with coumarin



图 6 未添加香豆素的培养基 MS<sub>5</sub> 诱导的马铃薯微型薯鄂 5  
Fig. 6 The induction of microtuber E5 of potato in the medium MS<sub>5</sub> without coumarin

表 3 MS<sub>5</sub>、MS<sub>6</sub>培养基对 5 种基因型马铃薯微型薯的诱导结果  
Table 3 The induction of microtuber of five genotype potatoes in MS<sub>5</sub> and MS<sub>6</sub>

基因型 Genotype	开始结薯时间/d Formation time of microtubers		单瓶结薯个数/个·瓶 <sup>-1</sup> No. of microtubers per culture		薯块平均直径/mm Average diameter of tubers		大薯个数/个·瓶 <sup>-1</sup> No. of big tubers		大薯率/% Rate of big tubers		成薯指数 Index of production	
	MS <sub>5</sub>	MS <sub>6</sub>	MS <sub>5</sub>	MS <sub>6</sub>	MS <sub>5</sub>	MS <sub>6</sub>	MS <sub>5</sub>	MS <sub>6</sub>	MS <sub>5</sub>	MS <sub>6</sub>	MS <sub>5</sub>	MS <sub>6</sub>
鄂 5	35	35	4.0	3.00	4.08	1.89	2.00	0.33	83.0	66.7	0.50	0.38
中 3	30	30	5.5	3.00	3.33	3.18	0.5	0.33	11.1	9.0	0.69	0.38
F	39	39	3.8	3.50	6.75	2.43	1.50	0	75.0	0	0.44	0.42
PBT-20	30	30	5.0	3.33	6.42	5.75	1.80	2.33	90.0	70.0	0.25	0.25
HS-10	39	39	4.9	4.00	3.00	2.00	0.33	0	7.0	0	0.48	0.50

从表 3 中看出, 在培养基中加入 20 mg·L<sup>-1</sup> 香豆素后, 总体上各项指标都有所增长, 其中大薯率和薯块平均直径的增加比较明显, 单瓶薯数和成薯指数的增长趋势则不明显。如基因型 F 微型薯在培养基 MS<sub>6</sub> 的诱导下, 大薯率为 0, 成薯指数为 0.42, 而在添加香豆素的培养基 MS<sub>5</sub> 的诱导

下, 大薯率为 75%, 成薯指数为 0.44, 大薯率的增长十分明显, 而成薯指数的增长则不明显。表 3 中基因型 PBT-20 微型薯, 在培养基 MS<sub>5</sub> 的诱导下, 成薯指数并未增加, 大薯率增加了 20 个百分点, 说明香豆素对微型薯大薯率的增加和结薯数量都有明显的促进作用。

### 3 结论与讨论

有人预测,马铃薯生产将会由于微型薯的应用而产生一场彻底变革。一些发达国家已经将马铃薯微型薯的研究与开发作为其农业的重大高新技术,以期取代常规种薯直接用于生产。但微型薯的形成和发育受多种因素影响<sup>[3-4]</sup>。

该试验研究主要从 3 个方面探讨了马铃薯微型薯离体条件下诱导的情况。

#### 3.1 基因型的影响

该试验选取了 5 种不同基因型的马铃薯 HS-10、鄂 5、F、中 3 和 PBT-20,从试验的结果可以看出,不同基因型材料在相同的培养条件下微型薯形成及发育有明显差异。同一种基因型在不同的培养条件下生长状态也存在差异,这与赵晓玲<sup>[5]</sup>等报道结果一致。分析原因可能是马铃薯不同基因组调控其内在的代谢体系,使得各种基因型的马铃薯微型薯生长状况有所不同。试验中还发现,同一基因型尽管培养条件不同但其性状特征仍受自身基因控制,如 PBT-20 在 6 种培养条件下其大薯率都是最高的,而鄂 5 在成薯指数上占有优势。因此,在具体的试验研究中,要针对具体材料品种进行试验,选择不同试剂、不同浓度处理针对每一个品种都很重要。

#### 3.2 培养方式的影响

许多研究者报道,液体培养体系比固体培养体系更有利于微型薯的诱导,产生的微型薯质量好,数量多<sup>[6-8]</sup>,该试验结果与其观点基本一致。但试验中液体培养基诱导的微型薯数量较固体培养基的数量少,分析原因可能是试验操作不当造成,即马铃薯的茎段没有很好地放置在培养基内,部分茎段被液体培养基淹没,造成淹苗现象。该现象产生原因还有待反复研究。

#### 3.3 生长调节剂的影响

该试验中,添加 KT 的培养基诱导的马铃薯

微型薯成薯指数明显高于添加 6-BA 的培养基,但在微型薯大薯率方面反之。这与金建钧研究结果相悖<sup>[9]</sup>。在试验过程中亦观察到,在添加 KT 的培养基中,马铃薯的茎段和根的生长速度很快,形成的芽点多,所以结薯数量多;而添加 6-BA 的培养基中,马铃薯茎段生长较慢或者不生长,虽然其诱导的微型薯较大,但数量不多。这可能是因为 KT 和 6-BA 两种生长调节剂促进结薯数量的最佳浓度不同,该试验浓度均为  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,对 KT 更适合。因此,在实际应用中,应根据具体需要筛选植物生长调节剂及相应浓度。

#### 3.4 香豆素的影响

已有研究表明,香豆素是一种植物生长抑制剂,通过抑制生长和促进衰老而使得营养物质的运输和转化加强。在该试验中香豆素的浓度为  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,与未添加香豆素的对照培养基相比明显提高了大薯率,质量也好。这与鄢铮<sup>[7]</sup>研究结果一致。但其使用最佳浓度因试验材料不同而异,建议先进行浓度梯度的试验筛选。

#### 参考文献:

- [1] Kim Y. *In vitro* tuber formation from potato[M]. Seoul:Seoul Univ Pub,1982.
- [2] 陈峥,金红,罗智敏,等.提高马铃薯遗传转化体系再生频率的研究[J].天津农业科学,2002,8(4):4-6.
- [3] 安颖蔚,孟令文,张辉究.马铃薯脱毒及微型薯繁育技术体系的研究与应用[J].杂粮作物,2006,26(3):197-199.
- [4] 陈兆贵,殷芳,钟志铭.马铃薯微型薯诱导因素的研究[J].黑龙江农业科学,2009(5):10-13.
- [5] 赵晓玲.马铃薯不同品种试管苗诱导试管薯能力研究[J].甘肃农业科技,2010(1):23-25.
- [6] 张延丽,扎西普赤.马铃薯离体培养诱导试管薯研究[J].西藏农业科技,2010,32(增刊):31-33.
- [7] 鄢铮,郭德章.马铃薯试管苗组织培养及微型薯诱导技术的研究[J].中国马铃薯,2004,18(5):270-271.
- [8] 彭晓莉,王蓓,张金文,等.激素诱导下不同培养方式对马铃薯微型薯的诱导效应[J].甘肃农业大学学报,2006,41(1):16-19.
- [9] 金建钧,刘志文.植物激素对马铃薯试管苗的影响及微型薯高效形成条件分析[J].作物杂志,2011(2):20-25.

## Study on the Induction of Microtuber of Five Genotype Patatoes

ZHAO Yan, LIU Qing-bo, HU Qing-yun, REN Chun-mei

(Biosafety Science and Technology College of Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128)

**Abstract:** Through adding different mass fraction of plant growth regulator to optimize the medium which is used to induce the microtuber of five genotype potatoes of HS-10, E5, F, Zhong3, PBT-20. The result showed that the suitable medium to increase the rate of big microtuber was MS with 8% sucrose and  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA and 0.1% activated(liquid medium), MS with 8% sucrose and 0.45% agar and  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  KT and 0.1% activated-carbon was the best medium to increase the number of microtuber. Coumarin could promote the induction of microtuber. Different genotype microtubers induced by the same medium had difference in their growth status and so did the same genotype microtubers induced by different medium.

**Key words:** genotype; microtuber; induction