西北农业学报 1993,2(4):43～47
Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica

马铃薯花药培养硝酸银对诱导双单倍体及一单倍体的效果*

冉毅东　戴朝曦
(甘肃农业大学农业生物工程研究所　兰州 730070)

摘要　通过在培养基中加入不同浓度 $AgNO_3$，对离体条件下诱导马铃薯四倍体（S. tuberosum. L.）花药产生双单倍体（dihaploid），双单倍体花药产生一单倍体（monohaploid）的效应进行了研究。在基本诱导培养基中加入50～100 μmol/L $AgNO_3$可显著促进四倍体花药和双单倍体花药产生胚状体，胚状体出现的频率最高可达16%。同时可提高胚状体的分化率。$AgNO_3$还可延缓花药的褐化，从而延长胚状体出现的时间。

关键词　$AgNO_3$；花药培养；双单倍体；一单倍体；马铃薯

栽培马铃薯是同源四倍体，而且是高度杂合体。利用花药培养的单倍体以及单倍体染色体加倍的倍性操作，可大大提高育种效率，使品种得到改良[1]。但由于花药培养产生胚状体数低和分化成苗率低，因此一直没有能在马铃薯育种中广泛应用[2]。实践证明，花药培养中花药褐化后产生的有毒物质常常影响着胚状体等的诱导。据 Mill[3]报道，在头7天中培养花药的褐化程度与胚状体形成的抑制是相关的。这是由于其中酚类物质氧化成醌类物质阻碍植物细胞生长的缘故，而花药培养中所产生的乙烯能促使花药褐化。不同基因型花药褐化的百分率是有差异的。马铃薯花药对乙烯极为敏感，因而褐化速度很迅速。

现已发现植物的组织、细胞及器官在进行离体培养时会产生大量的乙烯，植物的细胞组织和器官在离体培养条件下，生长发育分化都受到乙烯不同程度的影响[4]。已有试验表明，在培养基中加入乙烯的抑制剂能促进玉米愈伤组织的分化[5,6]，能改进马铃薯原生质体的出苗率[7]，能促进油菜子叶和下胚轴分化植株[4]。在花药培养中乙烯影响不同种的小孢子胚胎发生[8,9]，而乙烯抑制剂可明显地在花培中促进胚胎发生。

控制乙烯发生的一种有效方法是在培养基中加入 $AgNO_3$（Beyer，1976）。据 Bidington[10]报道，$AgNO_3$通过抑制乙烯的产生能促进花药中胚状体的形成；Cho（1989）也报道，$AgNO_3$能促进大麦花培中胚状体的产生；Taina[11]研究用 $AgNO_3$等几种乙烯抑制剂在四倍体马铃薯花药培养中的效应发现：$AgNO_3$对品种 Dito 的花药产生胚状体及其分化具有促进作用。但他只研究了一个四倍体品种，对不同基因型的反应未进行过研究。对于 $AgNO_3$诱导一单倍体的作用至今尚无报道。本文报道在培养基中加入乙烯抑制剂 $AgNO_3$对不同品种诱导胚状体的影响，特别是对一倍体的诱导及分化的效益。

---

* 本研究受农业部“八五”生物技术计划及甘肃省青年基金资助
收稿日期　1993－05－03

1 材料和方法

试材选用马铃薯（*Solanum tuberosum* L.）四倍体（2n=4x=48）品种和本研究所培育的杂种无性系：中心24，84－47×M6，T710×RP，T710×NW168－2、Ⅲ－5(T710×NW163－2－1)，Ⅲ－7(T710×NW163－3)以及本研究所用花药培养诱导的普通栽培种双单倍体材料(2n=2x=24)：82－75，82－36，81－15。

基本诱导培养基为：MS+1 mg/L INN+4 mg/L NAA+2 mg/L 2，4－D+1 mg/L 6－BA，高温灭菌后将过滤灭菌后的 $AgNO_3$按0、10、50、100 μmol/L 浓度加入到一定量的培养基中，然后分装到三角瓶中。

取处于单核中、晚期的花药（四倍体花药长5～8 mm，双单倍体为4～6 mm）的花蕾置于冰盒中12～24 h，接种前用10%次氯酸钠浸泡10～15 min，并在70%乙醇中过一下，然后用蒸馏水冲洗3次。在无菌条件下取出花药接种在装有30 ml 培养基的50 ml 三角瓶中。

将三角瓶置于室温20℃～28℃和2000 lx 左右的白色日光灯连续光照下。接种4周后开始统计产生的胚状体数，把未直接成苗的胚状体和愈伤组织转移到分化培养基上(MS+1 mg/L IAA+2 mg/L 6－BA+2 mg/L 激动素+0.5%活性炭+5%蔗糖)。而将成苗个体转移到扦插培养基上保存（基本同分化培养基，但将 IAA 降为0.5 mg/L，蔗糖浓度降为3%）。并确定根尖染色体数目。试验重复3次，并对结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 $AgNO_3$对提高四倍体马铃薯产生胚状体的效应

$AgNO_3$对提高四倍体材料的花药产生胚状体的效果是明显的。表1反映了2种不同基因型材料在3种$AgNO_3$浓度下与对照比较诱导胚状体的情况，从中看出，当$AgNO_3$浓度超过50 μmol/L 时，诱导胚状体产生的效果显著高于对照，而10 μmol/L 与对照无明显差异。另外图1列出了5个四倍体杂种材料的花药接种在未加和加有100 μmol/L $AgNO_3$基本培养基上后产生胚状体百分率的结果，从中看出所有材料在有100 μmol/L 的培养基上产生胚状体的百分率都明显高于对照，其中 T710×NW168－2在100 μmol/L $AgNO_3$培养基中产生胚状体的频率达16%，同时由表1看出，加有50～100 μmol/L $AgNO_3$的培养基诱导的胚状体其分化成苗百分率也显著高于对照。

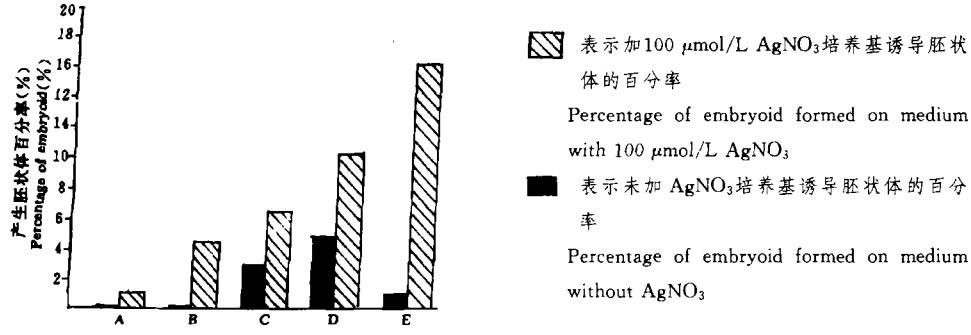
表1 马铃薯四倍体花药培养中 $AgNO_3$对胚状体形成及植株分化的影响

Table 1 The influence of $AgNO_3$ on embryoid formation and plant regeneration in anther cultures of tetraploid potatoes

材料 Material	$AgNO_3$ (μmol/L)	接种花药数 Number of anther plated	产生的胚状体(%) Anthers forming embryoids(%)	愈伤组织(%) Anthers forming callouse(%)	接种花药产生植株(%) Anthers producing plants(%)
中心24 Center 24	0(CK)	220	0.00	0.00	0.00
	10	260	0.39**	0.00	0.00
	50	220	3.60**	0.00	0.45**
	100	220	4.09**	0.00	0.45**
84－47×M6	0(CK)	200	2.00	2.00	0.50
	10	200	1.00	2.00	0.50
	50	200	7.72	2.22	4.55**
	100	200	10.50	3.60*	7.00**

注：** 为不同处理与对照间在0.01水平上的 t 测验差异显著性；* 为 0.05水平的显著性。

Note: Difference between CK and treatment is significant according to t-test at p=0.01** and 0.05*, respectively.



A 为Ⅱ－5、B 为Ⅱ－7、C 为 T710×RP、D 为84－47×M6、E 为 T710×NW168－2（每组合接种花药平均数在200个以上。）
A　Ⅱ－5、B　Ⅱ－7、C　T710×RP、D　84－47×M6、E　T710×NW168－2〔(More the 200 mean number) Anthers were placed for each genotype〕

图1　不同基因型四倍体在加有100 μmol/L $AgNO_3$和未加 $AgNO_3$ 诱导培养基中胚状体出现的百分率

Fig 1　Percentages of embryoid rormed on inducing medium with 100 μmol/L $AgNO_3$ and on medium without $AgNO_3$ (CK)

2.2　$AgNO_3$对诱导双单倍体花药产生胚状体的效应

$AgNO_3$对诱导双单倍体产生胚状体效果试验是在4种 $AgNO_3$浓度条件下进行的，试验中的3个品系在100 μmol/L 条件下都诱导出了胚状体，且其频率都显著地高于对照，82－75和81－15在50 μmol/L $AgNO_3$下也比对照具有显著的诱导效应（表2）。而且在同样的浓度下，所产生的胚状体的分化成苗率也显著高于对照，这说明 $AgNO_3$对诱导马铃薯一单倍体具有显著的促进作用。

表2　马铃薯双单倍体花药培养中 $AgNO_3$对胚状体形成及植株分化的影响

Table 2　The influence of $AgNO_3$ on embryoid formation and plant regeneration in anther cultures of dihaploid potatoes

材　料 Material	$AgNO_3$ (μmol/L)	接种花药数 Number of anther plated	产生的胚状体(%) Anthers forming embryoids(%)	接种花药产生植株(%) Anthers producing plants(%)
82－75	0	100	2.00	0.00
	10	200	5.50**	3.00
	50	200	6.50**	2.50**
	100	200	14.00**	5.00**
82－36	0	100	0.00	0.00
	10	100	0.00	0.00
	50	100	0.00	0.00
	100	100	3.00**	1.00**
82－15	0	80	2.50	0.00
	50	60	3.30**	0.00
	100	80	5.00**	2.00**

注：**为不同处理与对照间在0.01水平上的 t 测验差异显著性
Note: Difference between CK and treatment is significant according to t-test at p=0.01**

2.3　$AgNO_3$对提早花药产生胚状体的时间和延长花药产生胚状体期限的效应

从表3看出：①加有 $AgNO_3$培养基的花药除81－15外，大多数基因型都能提早产生胚状体，且比对照提前约1周。②胚状体产生的期限可因加入 $AgNO_3$而延长。除81－15外，其余基因

型加入50～100 μmol/L $AgNO_3$可使胚状体形成的期限延长13～20天。

表3 不同基因型材料在不同浓度 $AgNO_3$培养基中产生胚状体的时间

Table 3 The date of embryoid formation on inducing medium with 0～100 μmol/L $AgNO_3$ in different genotype of potatoes

组 合 Genotype	$AgNO_3$ (μmol/L)	接种期 (d/M) Plating date	最初出现胚状体时期 (d/M) The emergence date of the first embryoid	最后一个胚状体(d/M) The emergence date of the last embryoid	期限(d) The periokd of embryoid emergence
82－75	0	24/7	1/9	1/9	0
	10	24/7	19/8	6/9	18
	50	24/7	19/8	3/9	15
	100	24/7	19/8	10/9	22
81－15	0	2/8	5/9	5/9	0
	10	2/8	5/9	5/9	0
	50	2/8	5/9	5/9	0
	100	2/8	5/9	5/9	0
84－47 x M6	0	24/7	21/8	26/8	5
	10	24/7	21/8	21/8	0
	50	24/7	13/8	26/8	13
	100	24/7	12/8	26/8	14
中心24 Center 24	0	29/6	12/8	19/8	5
	10	29/6	7/8	25/8	18
	50	29/6	2/8	22/8	20
	100	29/6	2/8	22/8	20
T710xRP	0	25/6	30/7	30/7	0
	100	25/6	30/7	12/8	13
T710x NW168－2	0	3/7	5/8	5/8	0
	100	3/7	5/8	24/8	19

3 讨论

研究结果表明 $AgNO_3$能够促进马铃薯四倍体、二倍体花药胚状体的产生。这与前人的研究结果是相符的。例如，据 Bidington 等[10]的报道，$AgNO_3$能促进甘兰型油菜 *Brassica oleracea Var. gemmifera* 花药胚状体的产生。Taina[11]在加有0.05mmol/L和0.059mmol/L $AgNO_3$的培养基中培养1个马铃薯四倍体材料的花药，证明在较高浓度下能促进胚状体产生。本试验再次证明，$AgNO_3$能促进四倍体花药产生胚状体。此外，本试验还首次证明了 $AgNO_3$能显著地促进马铃薯双单倍体花药产生胚状体。到目前为止，用栽培种马铃薯（*S. tuberosum* 和 *S. Andigena*）花药培养诱导一单倍体的工作进展缓慢，除了用 *S. phreja* 作为授粉者诱导产生一单倍体的工作外[12]，对于用花药培养法诱导一单倍体也有一些报道[2]，本研究所戴朝曦等[13]也曾报道由一个雄性不育双单倍体品系用花药培养法诱导出了一些一单倍体植株。但是，所有这些研究，一单倍体的诱导频率都很低，而且能诱导出胚状体的基因型范围也较窄。本试验表明所参试3种材料中都诱导出了较多的胚状体，而未加 $AgNO_3$的对照出现的很少，甚至不出现胚状体。同时，胚状体的分化率也因加入 $AgNO_3$而显著提高。

组织培养基中加入 $AgNO_3$能促进胚状体产生的原因主要是因为 $AgNO_3$能抑制乙烯的产生，延缓了花药组织的褐化衰变所致。D. D Sanystad[6]在研究未成熟胚诱导愈伤组织时，曾研究过未成熟胚在培养过程中在一定时间范围内培养容器中乙烯的含量随培养天数增加而增加。马铃薯花药体积较大，在培养中将会产生大量乙烯，乙烯是促使花药组织衰老，褐化死亡的主要因素。本试验表明加入乙烯抑制剂 $AgNO_3$后，显著地推迟了花药变褐死亡的时间，因而

有利于胚状体的形成和发育。

本试验还发现不同基因型材料对相同浓度 $AgNO_3$的反应是不一样的（表1、2，图1）。说明不同材料产生乙烯的程度可能是不同的，这在马铃薯花培的报道中不多见。

参 考 文 献

1 Powell, Uring W. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1987, (11); 13～24

2 Johansson L. Potato Research. 1986, (29): 179～190

3 Mill M. Z. Pflanzenphysiol. 1976, (80): 206～214

4 Chi G. L etc. Plant Cell Rep. 1990, (9): 195～198

5 Vain. P etc. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1989, (18): 143～151

6 Songstad. D. D etc Plant Cell Rep. 1991. 699～702

7 Perl A etc. Plant Cell Rep. 1988 (7): 403～406

8 Babber S B and Gupta SC. Phsical Plant. 1986, (68): 141～144

9 Dunwell J M. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1979, (18): 143～151

10 Bidington N L etc. Ann. Bot. 1988, (62): 181～185

11 Taina Tiainen. Plant Cell Rep. 1992, (10): 604～607

12 Van Breaklen E W M etc. Euphytica. 1978, (24): 567～574

13 Dai C X. Symposium of Asian Potato Asociation. 1991. 103～105

14 Iwanaga and Peloquin S J. Theor. Appl. Genet. 1982, (61): 161～169

STUDYING ON THE EFFECTION OF $AgNO_3$ ON INDUCING DIHAPLOID AND MONOPLOID IN VITRO BY ANTHER CULTURE IN CULTIVATED POTATO

Ran Yidong & Dai Chaoxi

(Agriculture institute of biotechnology, Gansu agricultural university, Lanzhou 730070)

ABSTRACT

The effection of inducing dihaploid from tetraploid and monoploid from dihaploid in potato (*Solanum tuberosum* L.) in vitro by adding $AgNO_3$ in anther culture medium was studied. Embryoids produced from the anthers of tetraploid and dihaploid were significantly promoted by plusing 50～100 μmol/L $AgNO_3$ in general induce medium, the highest frequency of embryoiods is up to 16%. The Percentage of differentiation of the embryoiods was also arised, $AgNO_3$ could delay anthers turning brown and prolong the emergence period of embryoiods

Key words $AgNO_3$; Anther culture; Potato; Dihaploid; Monoploid