

甘薯体细胞培养研究进展

张宝红 丰嵘

(中国农业科学院棉花研究所, 河南安阳 455112)

ADVANCES ON THE STUDIES OF SWEET POTATO SOMATIC CULTURE IN VITRO

Zhang Bao-hong Feng Rong

(Institute of Cotton, Chinese Academy of Agricultural Science, Anyang 455112)

生物技术是当今科学技术研究的热点之一,在许多方面都显示出其巨大潜力。在各种作物的组织培养中,对油菜、水稻、小麦、玉米、大豆、马铃薯等的研究较为深入,并达到了较高的水平,而甘薯的组织培养工作开展较晚。1960年Nielsen^[25]首次报道甘薯茎尖分生组织再生出植株,接着甘薯组织培养工作受到国内外普遍重视。现将国内外甘薯体细胞培养有关方面的研究进展综述如下:

愈伤组织的诱导

除茎尖培养、离体胚胎发生和雄核发育外,大多数甘薯组织培养工作均从愈伤组织诱导开始^[20]。可以诱导愈伤组织的材料很多,如叶片、茎段、块根、茎尖分生组织、花药、子房、胚珠、胚柄、原生质体等均能诱导出愈伤组织^[20],但以茎尖分生组织和块根的应用较多,因为前者本身就具有极性,易于出苗;后者材料丰富,易于消毒,且较易器官分化^[20]。

愈伤组织的形成与否、生长快慢受多种因素制约。Gunckel等^[19]认为愈伤组织的形成取决于外植体的固有极性和接种方向、品种和培养基;薛启汉^[9]认为培养基成分包括基本培养基的种类和用量,生长素和细胞分裂素的浓度及配比对愈伤组织的诱导均有一定影响。

(一) 激素

激素是影响愈伤组织诱导和生长的重要因素。Hozyo^[21]认为2,4-D和KT是甘薯组织培养愈伤组织诱导与生长的重要激素;蔡新声等研究了IAA、2,4-D和KT在花药愈伤组织产生和培养中的作用,最后得出在大多数品种中2,4-D是愈伤组织产生和培养的最佳激素,但当2,4-D与IAA同时使用时,对花药愈伤组织的诱导最为有效^[32];在未授精胚珠培养中,生长素的影响较为明显,尤其是2,4-D的作用最为突出,且随2,4-D浓度的提高,愈伤组织诱导率上升^[9]。在甘薯叶片培养中,单独使用生长素类物质均不能诱导产生愈伤组织;而单独使用KT

却利于愈伤组织的诱导,但是诱导产生的愈伤组织生活力较弱,40天后大都褐化死亡;NAA与BA的配合使用均能诱导产生愈伤组织,但随着NAA与BA比例的增高诱导率减小^[6]。此外,ABA对愈伤组织的诱导率也有促进作用^[32,33]。

激素种类和浓度配比,也影响愈伤组织的生长。Sehgal证明附加5mg/L2,4-D和1mg/LKT的MS培养基可成功地诱导未成熟叶的愈伤组织^[26];附加1.0mg/LIAA和10mg/LBA是诱导甘薯茎、叶和块根愈伤组织的最佳激素组合^[2];而在甘薯单核期花药培养中,形成愈伤组织的最佳培养基为附加IAA、2,4-D和KT各2mg/L或NAA及KT各2mg/L的MS培养基^[33]。

此外,激素种类和浓度对胚性和非胚性愈伤组织的生长和分化也具有一定的影响。胚性和非胚性愈伤组织对激素的反应不同。Chée等在液体继代培养中发现低浓度的2,4-D刺激非胚性愈伤组织的生长,并在1μmol/L2,4-D情况下出现一个高峰;而对胚性愈伤组织的作用则不同,在0—2μmol/L和大于5μmol/L2,4-D浓度时,均限制了胚性愈伤组织的生长,而在2—5μmol/L范围内随着浓度的提高,不仅刺激胚性愈伤组织生长,而且提高了胚性愈伤组织所占的比例。低浓度的BA促进胚性愈伤组织的生长;而当BA浓度大于2μmol/L时,则抑制胚性愈伤组织的生长^[15,16]。

(二)糖类及有机附加物

糖类及有机附加物在愈伤组织诱导中也起着一定作用。甘薯组织培养中,常用的蔗糖浓度为2%—3%,但花药和未授精胚珠愈伤组织的形成则要求较高的蔗糖浓度^[9,32,33],其适宜浓度分别为6%^[32]、5%^[9],高浓度(>10%)将造成愈伤组织生长的阻滞^[9,32]。吕芝香研究了不同糖源对甘薯块根愈伤组织形成和生长的影响,指出蔗糖优于葡萄糖和果糖,甘露糖效果最差^[1]。辛淑英认为甘氨酸、烟酸、VB₁、VB₆和肌醇对甘薯茎尖培养都是必要的,需要量虽少,但不能相互代替^[3]。另外,豌豆提取汁和酵母提取液对愈伤组织的形成和生长均有一定的促进作用^[31],但甘薯叶片提取液和活性炭却抑制愈伤组织的诱导。

(三)培养基类型

用于甘薯组织培养的基本培养基很多,如MS、Blaydes、White、Gamborg、Knop、LS、Miller、Bonner等十几种。虽各种培养基均能诱导产生愈伤组织,但以MS最好,故在甘薯组织培养中MS及其改良培养基应用较多^[5]。

(四)培养材料

不同基因型,同一类外植体之间,愈伤组织的诱导率往往不同。薛启汉以不同基因型未授精胚珠为外植体诱导愈伤组织,在所试10个基因型中,出愈率在0—49.80%不等,且在质地、颜色等方面也存在着差异^[9]。不同类型的外植体在愈伤组织诱导方面也存在着差异^[4],一般叶片比花药较易诱导愈伤组织;薛启汉比较了不同外植体出愈率的差异,结果表明子叶诱导率最高(70.66%),胚轴次之(21.82%),胚根最差(14.77%)^[8]。

(五)其它因素

外植体的固有极性影响着愈伤组织的诱导、生长和分化^[19],甘薯块根进行培养时其根的固有极性影响着愈伤组织形成的数量,实验表明,取自侧面部位的切段与中心轴相比,形成愈伤组织的多少和器官分化能力,前者均显著大于后者。PH值也影响到愈伤组织的生长,一代培养30天的最适PH值为6.00—6.25,而一代培养60天的最适PH值则应降为5.1—5.3^[31]。

植株再生

甘薯组织培养植株再生的途径有两条：一条是器官分化，另一条是胚胎发生。目前通过这两条途径均有再生植株的成功报道。

(一) 器官分化途径

农作物的器官发生是一个重要的研究领域，此项研究对一些品种和种质资源的快速繁殖，杂种优势固定等方面都有重大意义。甘薯通过器官发生再生植株的报道很多，先后从茎尖分生组织、叶片、未授精胚珠、子房和花药等组织器官培养中获得再生植株^[5]。辛淑英等^[4]认为甘薯组织培养器官发生方式有两种：一是外植体先形成愈伤组织，然后从愈伤组织上分化产生芽；二是形成愈伤组织和根后，从分化根上长出不定芽。前者一般先出现一片肥厚的小叶，接着出现芽；后者只要补充培养基，不定芽就会持续发生。最近我们通过调节培养基中激素浓度及配比，使芽从叶片和茎段外植体上直接分化产生，且成簇出现，最高分化率达 88.9%^[6]。

不少学者认为 ABA 在甘薯组织培养中，对芽分化起着决定性作用^[31,33,34]。他们认为甘薯愈伤组织的内源细胞分裂素水平较高，而 ABA 对内源细胞分裂素有一定的拮抗作用，从而避免了过高细胞分裂素对芽分化的抑制。蔡新声等认为 10—20mg/L 硫酸腺嘌呤在甘薯愈伤组织培养中有利于芽的分化^[32]。张宝红等研究表明，在芽的诱导中，NAA 起着关键性作用，单独使用 0.1mg/L NAA 能显著地提高叶片和茎段外植体的芽分化率，而用其他的生长素类物质则无任何作用；提高 BA 的浓度将抑制芽的诱导；单独使用 KT 也没能诱导出芽的分化^[7]。一般认为，在植物离体培养中，生长素/细胞分裂素的比例高时利于根的发生，低时利于芽的形成，而甘薯的组织培养与之正好相反；对此不同的学者提出了不同的看法，有的人认为这可能是由于内源激素丰富引起的^[34]，有的人则认为甘薯组织培养器官分化具有特殊的调节系统^[7]。

大多数植物组织培养的器官分化，若先形成芽，在其基部很容易生根；若先形成根，则往往抑制芽的形成。而在甘薯组织培养中，大多数再生株都是在分化出根后，继续培养一段时间才相继出芽，这说明甘薯组织培养器官发生顺序有一定的特殊性^[6,19]。

基因型及外植体来源也是影响器官分化的重要因素。张宝红等在所试 3 个品种中，在附加 1.0mg/L NAA 的培养基上，宁-331 茎段分化率最高（88.9%），济南红次之（80.0%），千系-682 最低（28.6%）；在同一培养基上同一基因型不同外植体的分化率，一般茎段高于叶片^[6]。

另外，光培养比暗培养易于诱导再生植株。培养基的种类对器官分化也存在着差异，活性炭和 GA 对芽分化影响较少，植株再生的最适 pH 值为 5.2^[13]。

(二) 胚胎发生途径

甘薯外植体诱导产生的愈伤组织往往可分为两类：一类是胚性愈伤组织，一类是非胚性愈伤组织。二者之间存在着很大的差异^[11]：胚性愈伤组织生长慢，比重大，表面有许多瘤状突起，且细胞活性高，富含细胞质，直径很小约 25—50μm；而非胚性愈伤组织生长快、比重小，表面光滑且均质，细胞呈长椭圆形，富含液泡，活性低，但细胞体积大，直径为 75—200μm，胚性愈伤组织将来可发育为体细胞胚，而非胚性愈伤组织则不能分化出体细胞胚。

蔡新声首次获得甘薯体细胞胚，并发育为完整植株^[31]。随着甘薯体细胞胚的研究不断深

入,现已建立了甘薯体细胞胚发生和植株再生的基本培养程序^[11,14-18]:首先为胚性愈伤组织的诱导,将甘薯茎尖分生组织放置于含有 $10\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 的固体培养基上培养,3—4 周后表面就被愈伤组织覆盖,4—8 周后形成胚性愈伤组织;第二阶段为胚性愈伤组织的增殖,取上述培养获得的胚性愈伤组织接种于固体或液体培养基中培养,固体培养添加 $10\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 和 $1\mu\text{mol/L}$ LBA,每 8 周继代一次,液体培养添加 $5\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 和 $1\mu\text{mol/L}$ LBA,每 2 周继代一次,两种培养方式均能到达同样的效果;第三阶段为体细胞胚形成,将胚性愈伤组织移入不含 2,4-D 的培养基上,8 天后就形成体细胞胚;第四阶段为植株形成,将第三阶段形成的成熟体胚放置于含有 $0.1\mu\text{mol/L}$ 或不含 NAA 的固体培养基上,8—14 天发根,14—21 天出芽,进而形成小植株。

利用块根、茎、叶柄、叶片、花药及生长点等器官均能诱导出体细胞胚^[22,24],但诱导的难易不同,其中茎尖分生组织最易诱导成功,故目前大都采用茎尖分生组织诱导甘薯体细胞胚发生^[24]。不同品种间诱导体细胞胚的能力不同,目前仅能从白星、台农新 31 号、PI8491 和 GaTG3 等少数几个品种诱导出体细胞胚并再生出植株,其中以白星最易诱导,成为目前甘薯体细胞胚诱导和再生植株的模式品种,被广泛应用于各项研究。另外,幼嫩组织比老化组织易于诱导,叶缘部分比叶脉部分易于诱导。

激素是影响体细胞胚发生的关键因素。Chée 等的一系列实验表明 2,4-D 在体细胞胚的形成过程中起着关键性作用,它在低浓度时,促进体胚的发生和发育,而在高浓度时则抑制体胚的发生和发育,但却有利于胚性愈伤组织的产生和增殖。在含 2,4-D(0.1 — 3.0mg/L)的培养基中体胚只能发育到球形期或心形期,此时只有转移到不含 2,4-D 的培养基中才能继续发育到鱼雷期和子叶期。因而在体细胞胚的诱导初期往往使用较高浓度的 2,4-D,而在后期则不使用 2,4-D,以促进胚的发育、成熟与萌发^[14-18]。

在甘薯体细胞胚的诱导中也有应用细胞分裂素如 BA、KT、Ade 等的报道^[24]。在天然提取液中椰乳的效果也很明显^[15,16],这可能与椰乳中所含的细胞分裂素等天然活性物质有关。细胞分裂素与生长素的配合使用往往能解决体细胞胚诱导中的棘手问题^[10]。为了选择性增殖胚性愈伤组织,Chée 等研究了 BA 和 2,4-D 的浓度组合对胚性和非胚性愈伤组织生长量的影响,找出了胚性愈伤组织增殖的最佳固体培养基为 MS+ 10mg/L 2,4-D+ 1mg/L BA,最佳液体培养基为 MS+ 5mg/L 2,4-D+ 1mg/L BA,在这些培养基中胚性愈伤组织的增殖均大于非胚性愈伤组织的增殖^[16]。

ABA 的添加促进了体胚的发生。蔡新声等曾报道台农新 31 号花药愈伤组织在含 0.1 — 1.0mg/L ABA 的 MS 培养基上可形成体细胞胚,将这些体细胞胚培养于 1mg/L IAA 和 4mg/L KT 的 MS 培养基上可形成完整的植株^[32]。

另外,固体培养有利于胚的成熟^[17],这是因为甘薯球形胚向心形胚、鱼雷胚的转化需要一定的极性,没有外界的支撑,球形胚大多停滞发育。故在液体培养形成球形胚后,应及时地转入固体培养基中,以满足其产生生理极性的需要,进而发育成小植株。

甘薯体细胞胚的发育和合子胚的发育相似,均经过原胚期、球形期、心形期、鱼雷期和子叶期 5 个阶段;但两者之间也存在着差别,表现在培养中的体细胞胚可以停滞在所有的发育阶段,而且仅鱼雷后期以后的体细胞胚才能发育成植株^[14],故从鱼雷后期胚通称为成熟胚,在条件合适的情况下即可萌发成苗。体细胞胚的萌发和植株再生除了与体胚的发育时期有关外,还

受外界环境条件的影响。Chée 等^[18]和 Schultheis 等^[28]观察到在胚的各个发育时期均能生根，但在许多时期不能形成芽，由此可见芽的分化是甘薯体细胞胚再生植株的限制因子。但是，利用激素和蔗糖可调控芽的分化和植株再生。在改良 MS 培养基中加入 $0.1\mu\text{mol/L}$ NAA，可使芽的分化率由 17% 增加到 41%，植株再生率由 3% 增加到 38%；蔗糖浓度由常规用量 3.2% 降到 1.6% 时，芽分化率可由 20% 增加到 32%，植株再生率由 15% 增加到 32%^[18]。

展 望

研究生物技术是为了应用于育种和生产实践，仅从甘薯组织培养的角度出发，今后有关方面的研究可能涉及以下几个方面。

1. 抗性突变体筛选 利用物理方法或化学方法诱导甘薯体细胞变异，这些变异可以是抗寒、抗旱、抗病、抗盐碱、抗除草剂等的突变体。利用细胞诱变具有群体大、效率高，可控程度高等优点，能有目的地培育出抗性植株。目前人们已得到抗盐细胞系。

2. 基因工程 甘薯组织培养与基因工程结合起来，有目的地将外源基因导入到甘薯体细胞并培育成转基因植株，从而达到改良甘薯的目的。目前人们虽已将高产基因导入到甘薯体细胞，但蛋白质基因、抗病基因的导入更是诱人。

3. 人工种子的制作 目前美国已开发出甘薯人工种子，我国华南师大和中科院植物所合作也成功地制作出甘薯人工种子，但仍有许多问题如萌发成苗等急待解决。只有解决了这些问题，才有可能在大田中应用。

4. 微型薯的诱导 马铃薯微型块茎的诱导，使生产上大面积增产。同样甘薯微型块根的诱导和利用，也会大幅度提高单位面积的产量。目前亚洲蔬菜研究中心已能诱导出微型薯，我们在离体诱导中也观察到有一根膨大的迹象，但增粗到 2 毫米左右就停滞了生长。因而仍需要寻找一定培养基和培养条件，才有可能解决目前存在的问题。

参 考 文 献

- [1] 吕芝香等, 1981, 植物生理学报, 7(2): 105—107。
- [2] 朱国兴等, 1978, 植物生理学通讯, (4): 23—24。
- [3] 辛淑英, 1987, 作物品种资源, (2): 34—36。
- [4] 辛淑英、张祖珍, 1987, 植物学报, 29(1): 114—115。
- [5] 张宝红、丰嵘, 1991, 植物生理学通讯, 27(3): 237—240。
- [6] 张宝红、丰嵘, 1993, 科学通报, 38(1): 72—75。
- [7] 张宝红、丰嵘, 1993, 遗传, 15(3): 1—5。
- [8] 薛启汉, 1987, 江苏农业学报, 3(3): 23—30。
- [9] 薛启汉, 1988, 江苏农业学报, 4(增刊): 56—62。
- [10] 谈锋、李坤培, 1992, 植物生理学通讯, 28(1): 67—71。
- [11] 小卷克己等, 1989, 农业技术(日), (5): 204—208。
- [12] Bidney D. L. et al., 1980, *Plant Sci. Lett.*, 18: 335—342.
- [13] Carswell G. K. et al., 1984, *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 3: 229—236.
- [14] Chée R. P. et al., 1988, *In Vitro*, 24(9): 955—958.
- [15] Chée R. P. et al., 1989, *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 15: 149—159.

- [16] Ch  e R. P. et al., 1989, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, **17**:39—52.
- [17] Ch  e R. P. et al., 1989, *In Vitro*, **25**(8):757—760.
- [18] Ch  e R. P. et al., 1990, *Hort Sciences*, **25** (7)795—796.
- [19] Gunkel J. E. et al., 1972, *Bot. Gaz.*, **3**:254—262.
- [20] Henderson J. H. M. et al., 1984, In: Sharg W. R. et al. (ed), *Handbook of Plant Cell Tissue Culture* Vol12, Macmillan, New York, London, PP302—306.
- [21] Hozyo Y., 1973, *Tokyo Nat. Inst. Agr. Sci. Bull. Ser. D.*, **24**:1—33.
- [22] Jarret R. L. et al., 1984, *Hort Science*, **17**:397—398.
- [23] Kokubu T. and M. Sato, 1988, *Men. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **24**:83—89.
- [24] Liu J. R. et al., 1984, *Plant Cell Reports*, **3**:112—115.
- [25] Nielsen L. W., 1960, *Phytopathology*, **50**:840—841.
- [26] Sehgal C. B., 1975, *Bioch. Physiol. Pflanz.*, **51**:57.
- [27] Sihachaky D. et al., 1987, *Plant Cell Reports*, **6**:326.
- [28] Schultheis J. R. et al., 1986, *Hort Science*, **21**:762.
- [29] Tatuoro Murata et al., 1987, *Japan J. Breed.*, **37**:291—298.
- [30] Tsay H. S. et al., 1973, *J. Agric. Assoc. China*, **81**:12—19.
- [31] Tsay H. S. et al., 1979, *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **20**:117—122.
- [32] Tsay H. S. et al., 1982, *J. Agric. Res., China*, **31**(2):123—126.
- [33] Tsay H. S. et al., 1982, *J. Agric. Res., China*, **31**(3):191—197.
- [34] Yamaguchi T., 1978, *Bull. Ser. B Agric. Biol.*, **30**:55—58.

(上接 16 页)

- [77] Toriyama K et al., 1987, *Planta*, **170**:308—313.
- [78] Toriyama K et al., 1991, *Theor Appl Genet*, **81**:769—776.
- [79] Vasty B and S, Bhaskarran 1981, *Plant Soil Lett*, **23**:277—282.
- [80] Walters TW and ED, Earle 1990, *Plant Cell Rep.*, **9**:316—319.
- [81] Weber G et al., 1988, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **12**:219.
- [82] Wobor G et al., 1989, *Europian Journal of Clll Biology*, **49**:73.
- [83] Xu ZH(许智宏)et al., 1982, *Plant Sci. Lett.*, **24**:117—121.
- [84] Yang ZN(杨仲南)et al., 1994, *Plane Cell, Tissue and Organ Cult.*, **36**:191 195.
- [85] Yamashita Y and K, Shimamoto 1989, *Bioteohnology in Agrioulture and Forestry*, pp:193—205.
- [86] Yamanaka H et al., 1992, *Japanesc J. Breed.*, **42**:329—339.
- [87] Zee SY and LH, Hui 1977, *Z. Pflanzenphysiol.*, **82**:440—445.