

嘧啶醇对马铃薯种质试管苗 保存遗传稳定性的影响

柳寒 谢婷婷 徐君 柳俊

华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室/国家蔬菜改良中心华中分中心, 武汉 430070

摘要 以3个不同基因型马铃薯品系 *Solanum chacosense* (cha)、CE76 和 E3 为试验材料,于基础培养基添加3种浓度(10、15、20 $\mu\text{mol/L}$)的嘧啶醇,探讨不同浓度嘧啶醇对试管苗生长的影响;同时对添加嘧啶醇的培养基中生长的试管苗进行恢复培养后,选用 RAPD 和 ISSR 两种分子标记进行遗传稳定性分析,为嘧啶醇在马铃薯资源保存中的应用提供依据。结果表明:嘧啶醇可显著抑制3个马铃薯品系试管苗的生长($P < 0.01$),且不同浓度的嘧啶醇对不同马铃薯品系试管苗产生的抑制效率不同;恢复生长研究表明嘧啶醇不会导致试管苗的玻璃化或恢复生长缓慢等变异;遗传稳定性研究显示使用嘧啶醇保存的不同品系试管苗在 DNA 水平上均有极少量变异(平均变异率为 0.48%~2.95%)产生,且不同品系变异率有一定差异。不同品系马铃薯试管苗保存应选用各自适合的嘧啶醇浓度。

关键词 试管苗保存; 嘧啶醇; 生长抑制; 遗传稳定性; 马铃薯

中图分类号 S 532.024 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)04-0398-06

马铃薯是典型的无性繁殖作物,种质资源保存通常采用试管苗继代的方法。相比薯块种植保存法,其具有节省空间、防止因田间种植的病毒退化而造成的种质资源流失、避免不可抗拒自然灾害的影响等优势。通过离体培养的方法进行种质保存存在一个普遍性问题就是继代频繁,在通常情况下需要每月继代1次,如果采用高浓度蔗糖(8%)保存,也需每3个月继代1次。频繁的继代不仅消耗大量的人力与物力,同时频繁的操作还可能会增加种质材料混杂的风险。针对这些问题,研究者们采用了一系列的手段与措施来延缓试管苗的生长速度,进而减少继代频率,其中,在培养基中添加一些渗透调节物质或者生长调节物质限制植株生长速率的方法被认为是便于操作且无需额外增加仪器设备的有效方法。在添加渗透调节物质中报道较多的是添加甘露醇,增加培养基的渗透压而降低植株生长速率^[1]。然而,在多个物种的体外保存中发现甘露醇可以诱导体外培养植株发生形态学异常的现象^[2-3]。

在添加生长调节物质的研究中,已被研究的生长抑制剂有矮壮素(CCC)、比久(B9)、多效唑

(PP333)等^[4-5]。这些物质的添加常常造成植株生长异常或者后续恢复培养时生活力下降。嘧啶醇(α -环丙基- α -(4-甲氧基苯)-5-嘧啶甲醇)是一种重要的生长调节物质,它能够通过抑制植物赤霉素(GA)合成的中间反应,最终影响植株的生长^[6]。目前,已有添加嘧啶醇对甘薯、马铃薯等植物试管苗生长影响的报道^[7],但添加嘧啶醇对试管苗后续生长和变异的影响还不清楚。本研究采用3个不同基因型,探讨不同浓度嘧啶醇对试管苗生长状态的影响,并进一步对在添加嘧啶醇培养基中生长的试管苗进行恢复培养后,选用 RAPD 和 ISSR 两种分子标记进行遗传稳定性分析,为嘧啶醇在马铃薯资源保存中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选用3个不同的基因型,四倍体栽培品种鄂马铃薯3号(E3)、马铃薯二倍体野生种 *Solanum chacosense* (cha)和二倍体育种中间材料 CE76。

收稿日期: 2010-09-07

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金、湖北省自然科学基金项目(2009CDB254)和中央高校基本科研业务费专项资金项目(2009QC019)

柳寒,华中农业大学生命科学技术学院2009届本科毕业生,研究方向:马铃薯种质资源保存, E-mail: liuhan@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 柳俊,博士,教授,研究方向:植物细胞工程、马铃薯细胞与分子改良, E-mail: liujun@mail.hzau.edu.cn

1.2 嘧啶醇处理设置

以 MS 基本培养基附加 8% 的蔗糖和 0.7 g/L 琼脂为基础培养基，添加 3 种浓度 (10、15、20 μmol/L) 的嘧啶醇，灭菌前 pH 值调至 5.8。培养基分装于 20 cm×1.5 cm 的玻璃试管中，每支试管 10 mL 培养基，在 10⁴ kPa、121 °C 下灭菌 15 min。每管接种 1 个带腋芽的无菌试管苗节段，每处理 3 个重复，每重复 5 管。以不添加嘧啶醇处理为对照 (CK)。接种后置于温度 (17±1) °C、光照 16 h/d 条件下培养。每 10 d 记录 1 次试管苗的株高。

1.3 试管苗的恢复生长

将 E3、cha、CE76 在不同嘧啶醇浓度下培养 4 个月后的试管苗转接于无任何附加物质的 MS 培养基中 (4% 蔗糖和 0.7% 琼脂) 进行恢复生长，每管对应 1 盒，25 d 时观察并记录其恢复生长情况及形态学特征。此后，将恢复生长的试管苗进行第 2 次扩

繁，25 d 时观察并记录其恢复生长情况及形态学特征，第 2 次扩繁的试管苗用于基因组 DNA 的提取与后期的遗传稳定性检测。

1.4 试管苗全基因组 DNA 小量抽提

采用 CTAB 的方法提取每盒苗的全基因组 DNA，与所对应试管苗单株编号一致。用紫外分光光度计检测 DNA 的质量和浓度，并稀释至 50 mg/L 用作 PCR 扩增模板。

1.5 RAPD 和 ISSR 的引物筛选与检测

选用 10 个碱基的 RAPD 引物 40 个，16~20 个碱基的 ISSR 引物 81 个，引物均由上海生物工程有 限公司合成。以对照 E3、cha、CE76 的全基因组 DNA 为模板，对 40 个 RAPD 引物和 81 个 ISSR 引物进行单独重复 4 次试验。选择能扩增出产物且带型重复性好的 23 个 RAPD 引物和 27 个 ISSR 引物 (表 1) 用于试管苗遗传稳定性检测。

表 1 23 条 RAPD 引物和 27 条 ISSR 引物

Table 1 List of 23 RAPD primers and 27 ISSR primers

| RAPD | | ISSR | |
|---------|---------------------|---------|---------------------|
| 名称 Name | 序列 Sequence (5'-3') | 名称 Name | 序列 Sequence (5'-3') |
| S30 | GTGATCGCAG | 807 | AGAGAGAGAGAGAGAGT |
| S36 | AGCCAGCGAA | 808 | AGAGAGAGAGAGAGAGC |
| S66 | GAACGGACTC | 809 | AGAGAGAGAGAGAGAGG |
| S67 | GTCCCGACGA | 810 | GAGAGAGAGAGAGAGAT |
| S75 | GACGGATCAG | 811 | GAGAGAGAGAGAGAGAC |
| S76 | CACACTCCAG | 812 | GAGAGAGAGAGAGAGAA |
| S163 | CAGAAGCCCA | 813 | CTCTCTCTCTCTCTT |
| S167 | CAGCGACAAG | 816 | CACACACACACACAT |
| S170 | ACAACGCGAG | 817 | CACACACACACACAA |
| S180 | AAAGTGCGGC | 818 | CACACACACACACAG |
| S223 | CTCCCTGCAA | 819 | GTGTGTGTGTGTGTGTA |
| S227 | GAAGCCAGCC | 821 | GTGTGTGTGTGTGTGTT |
| S232 | ACCCCCACT | 822 | TCTCTCTCTCTCTCA |
| S236 | ACACCCACA | 823 | TCTCTCTCTCTCTCC |
| S347 | CCTCTCGACA | 834 | AGAGAGAGAGAGAGAGYT |
| S362 | GTCTCCGCAA | 841 | GAGAGAGAGAGAGAGAYC |
| S363 | CCAGCTTAGG | 842 | GAGAGAGAGAGAGAGAYG |
| S364 | CCGCCAAAC | 847 | CACACACACACACARC |
| S369 | CCCTACCGAC | 848 | CACACACACACACARG |
| S370 | GTGCAACGTG | 850 | GTGTGTGTGTGTGTGYC |
| S380 | GTGTCGCGAG | 851 | GTGTGTGTGTGTGTGYG |
| S425 | ACTGAACGCC | 855 | ACACACACACACACACYT |
| S429 | TGCCGGCTTG | 859 | TGTGTGTGTGTGTGTGRC |
| | | 864 | ATGATGATGATGATGATG |
| | | 868 | GAAGAAGAAGAAGAAGAA |
| | | 873 | GACAGACAGACAGACA |
| | | 878 | GGATGGATGGATGGAT |

RAPD-PCR 反应程序: 94 °C 3 min, -38 °C 2 min, -72 °C 2 min, 2 次循环; -94 °C 1 min, -40 °C 1 min, -72 °C 90 s, 40 次循环; -72 °C 10 min, 4 °C 保存。反应体系列于表 2。

ISSR-PCR 反应程序: 94 °C 5 min, 较低温度退火 45 s, -72 °C 90 s, 2 次循环; -94 °C 30 s, 较高温度退火 45 s, -72 °C 1 min 30 s, 35 次循环; -72 °C 10 min, 4 °C 保存。反应体系列于表 2。

运用筛选出的引物对所提取的每份全基因组 DNA 进行 RAPD 和 ISSR 进行 PCR 扩增检测，扩

表 2 PCR 反应体系

Table 2 Reaction system of PCR μL

| 反应成分 Reaction ingredient | RAPD-PCR | ISSR-PCR |
|-------------------------------------|----------|----------|
| ddH ₂ O | 9.28 | 8.80 |
| dNTPs(2 mmol/L) | 1.00 | 1.00 |
| 10×Taq polymerase buffer(10×) | 1.50 | 1.50 |
| MgCl ₂ (25 mmol/L) | 0.90 | 0.90 |
| Primer(10 $\mu\text{mol/L}$) | 1.20 | 1.50 |
| Taq polymerase(5 U/ μL) | 0.12 | 0.10 |
| DNA template(50 mg/L) | 1.00 | 1.00 |
| Glycerol(50%) | 0.00 | 0.20 |
| Total volume | 15.00 | 15.00 |

增完毕后,向产物中加入 3 μL 上样缓冲液,混匀。取 6 μL 于 1.5% 的琼脂糖凝胶(含 500 $\mu\text{g/L}$ EB)上进行电泳,利用凝胶成像系统 UVI photo 观察并拍照记录。

1.6 抑制率和变异率的计算及统计分析

抑制率以株高为基础进行计算,以不添加嘧啶醇的株高与添加嘧啶醇的株高之间的差占不添加嘧啶醇的株高的百分比表示。变异率以扩增出的位点数为基础进行计算,与对照相比的差异位点总数占扩增位点总数百分比表示。平均变异率为 RAPD

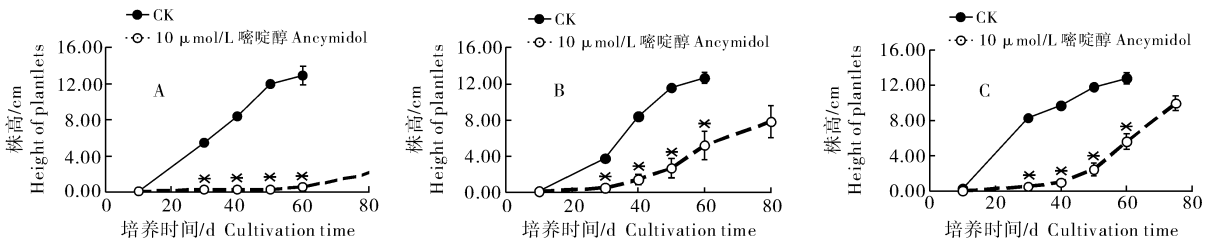
变异率与 ISSR 变异率的平均值。

数据采用 SPSS 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 嘧啶醇对马铃薯试管苗生长速率的影响

为研究嘧啶醇在常温条件下对马铃薯试管苗生长速率的影响,在马铃薯试管苗保存基本培养基中加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的嘧啶醇。在常温条件下,3 个品系马铃薯试管苗的生长速率与对照相比均显著减缓(图 1, $P < 0.01$)。其中 *S. chacosense* (cha) 的生长受到嘧啶醇影响最大,培养 60 d 后其试管苗的生长速率才明显变快(图 1-A)。此外,相比 *S. chacosense*(cha),CE76 和 E3 对 10 $\mu\text{mol/L}$ 嘧啶醇具有一定的耐受性,2 个品系的试管苗均在 30 d 以后生长速率明显加快,40 d 后植株以相对稳定的速率快速生长(图 1-B、C)。尽管如此,添加 10 $\mu\text{mol/L}$ 嘧啶醇的培养基仍然能够显著抑制试管苗的生长,60 d 时处理组的试管苗高度仍不足对照高度的 50% ($P < 0.01$)。

A: *S. chacosense*; B: CE76; C: E3图 1 3 个基因型马铃薯在添加 10 $\mu\text{mol/L}$ 嘧啶醇的培养基中试管苗生长速度的变化趋势Fig. 1 The growth trends of three genotypes potato plantlets treated by 10 $\mu\text{mol/L}$ ancyamidol

2.2 嘧啶醇对马铃薯试管苗抑制率的影响

为筛选合适的嘧啶醇浓度用于不同品系马铃薯试管苗保存,添加 10、15 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 3 个浓度的嘧啶醇到试管苗基本保存培养基中进行了试验,结果显示:cha 在 3 个处理下的抑制率均在 90% 以上,且这种抑制作用能够维持 30 和 60 d(表 2);而 E3 和 CE76 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 的嘧啶醇处理中虽然 30 d 时生长得到抑制,但持续时间不长。只有在 15 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的嘧啶醇处理下培养 60 d 抑制率能维持在 90% 以上。这表明保存不同基因型的马铃薯试管苗所需的嘧啶醇浓度不同,cha 只需要 10 $\mu\text{mol/L}$,而 CE76 和 E3 则需要 $\geq 15 \mu\text{mol/L}$ 。

2.3 嘧啶醇对试管苗的恢复生长及后期表型的影响

为探讨添加嘧啶醇后是否影响马铃薯试管苗的

表 2 不同浓度嘧啶醇下 3 个马铃薯基因型试管苗生长的抑制率

Table 2 Growth inhibition of three different genotypes potato plantlets treated by ancyamidol %

| 基因型 Genotypes | 10 $\mu\text{mol/L}$ | | 15 $\mu\text{mol/L}$ | | 20 $\mu\text{mol/L}$ | |
|---------------|----------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|
| | 30 d | 60 d | 30 d | 60 d | 30 d | 60 d |
| cha | 94 | 95 | 98 | 99 | 98 | 99 |
| CE76 | 86 | 59 | 93 | 94 | 97 | 94 |
| E3 | 94 | 56 | 97 | 95 | 97 | 98 |

恢复生长和后期表型,不添加嘧啶醇和添加不同浓度嘧啶醇培养基中保存的试管苗保存 4 个月后,分别继代到马铃薯试管苗生长培养基中。不同浓度(0, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$)嘧啶醇处理的试管苗在恢复培养过程中初次继代与对照相比长势一致,且未出现任何表型变异(图 2)。之后,再次继代也均能迅速



图 2 添加咪唑醇的 3 个马铃薯基因型试管苗在常规培养基中恢复生长情况

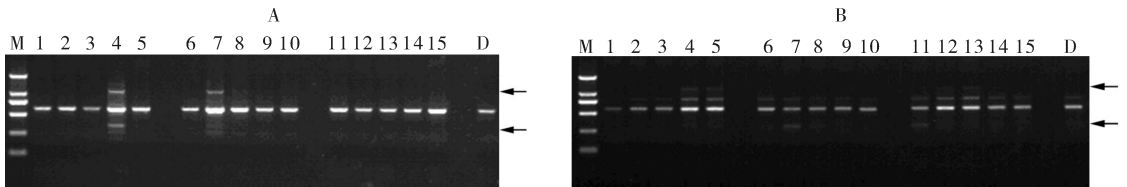
Fig.2 Recovery growth of three genotypes potato plantlets treated by ancymidol in normal medium

生长,生长速率和表型均与对照无明显差异,表明咪唑醇没有引起马铃薯试管苗的表型变异。

2.4 咪唑醇对保存试管苗的遗传稳定性影响

为研究咪唑醇对马铃薯试管苗遗传稳定性的影响,通过 3 个基因型非处理试管苗扩增筛选出 23 对 RAPD 引物和 27 对 ISSR 引物,利用这些引物对不同浓度咪唑醇处理的试管苗进行 PCR 扩增,结果显示,咪唑醇的添加会造成试管苗在 DNA 水平上的少量变异(图 3,表 3)。

ISSR 结果显示,不同品系试管苗在不同浓度咪唑醇条件下变异率在 0.297%~4.851% 之间;RAPD 结果显示,不同品系试管苗在不同浓度咪唑醇条件下变异率在 0~5.803% 之间;平均变异率变异率在 0.48%~2.95% 之间。对平均变异率的分析显示:cha 在 15 μmol/L 咪唑醇浓度下即可显著抑制生长,同时又具有较好的遗传稳定性,其总体变异频率小于 1/1 000;CE76 的变异率随咪唑醇浓度增高而增高,应尽量选择低浓度的咪唑醇保存试管苗;E3 则在较高浓度(20 μmol/L)咪唑醇条件下,遗传稳定性最强。



A:RAPD 引物 S347 扩增的多态性条带 RAPD ISSR profiles using the RAPD primers S347; B:ISSR 引物 834 扩增的多态性条带 ISSR profiles using the ISSR primers 834; M: 分子标记 DL 2000 marker; 1~15: 试管苗 Regenerated plantlets; D: 母本植株 Mother plant; 箭头指示有变化的条带 The arrows show the band polymorphisms.

图 3 咪唑醇处理植株与其对照的 RAPD 和 ISSR 的特征性位点

Fig.3 RAPD and ISSR profiles of plants treated with/without ancymidol by RAPD and ISSR

表 3 3 个基因型马铃薯试管苗在添加咪唑醇培养后通过 RAPD 和 ISSR 检测的变异频率

Table 3 Aberrant frequency of three genotypes potato plantlets after treated with ancymidol by RAPD and ISSR

| 基因型 Genotypes | 咪唑醇浓度/ (μmol/L) Concentration of ancymidol | ISSR | | | RAPD | | | 平均变异率/% Average aberrant frequency |
|------------------|---|----------------------|-----------------------------|--------------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------------------|---|
| | | 扩增位点数 Total bands | 差异位点数 Different bands | 变异率/% Aberrant frequency | 扩增位点数 Total bands | 差异位点数 Different bands | 变异率/% Aberrant frequency | |
| cha | 10 | 735 | 18 | 2.449 | 1123 | 1 | 0.089 | 1.023 |
| | 15 | 756 | 12 | 1.587 | 1127 | 2 | 0.177 | 0.743 |
| | 20 | 752 | 11 | 1.463 | 1122 | 3 | 0.267 | 0.747 |
| CE76 | 10 | 670 | 2 | 0.299 | 502 | 9 | 1.793 | 0.939 |
| | 15 | 674 | 2 | 0.297 | 508 | 13 | 2.559 | 1.269 |
| | 20 | 668 | 5 | 0.749 | 517 | 30 | 5.803 | 2.954 |
| E3 | 10 | 897 | 27 | 3.010 | 1014 | 9 | 0.888 | 1.883 |
| | 15 | 907 | 44 | 4.851 | 1013 | 10 | 0.987 | 2.813 |
| | 20 | 873 | 9 | 1.031 | 1003 | 0 | 0.000 | 0.480 |

3 讨论

遗传稳定性是资源保存的基本要求,试管苗离体保存种质资源过程中,人们最为关注的问题就是种质的体细胞变异问题。大量的研究证实了体细胞变异主要受到外源添加植物生长调节剂的类型与浓度的影响。生长调节剂在长期的体外组织培养中充当诱变剂的作用^[8]。这种现象在无性繁殖的植物中尤为明显,因为不能通过常规的有性世代来消除其中的一些表观遗传学变异^[8]。因此,马铃薯资源保存培养基中添加外源生长调节剂必须非常谨慎。目前,嘧啶醇作为外源调节剂是否引起试管苗的变异研究,仅有 Sarkar 等^[7]一例报道,该研究采用马铃薯试管苗在嘧啶醇和低温同时调控的条件下培养 60 d 后,通过 6 对 RAPD 引物进行检测,结果发现在添加不同浓度嘧啶醇的培养基中生长的试管苗均没有任何 RAPD 条带的增减和带型变化。在我们的研究中,经 RAPD 和 ISSR 两种分子标记,共计 50 对引物进行扩增,结果显示嘧啶醇的添加会造成少量遗传位点的变异,这可能是因为本研究使用了更多的 RAPD 引物(23 条)和 ISSR 引物(27 条)进行了筛选,能够筛选更多的遗传学位点,从而更为真实地反应了嘧啶醇对马铃薯试管苗的遗传稳定性的影响。但整体看来,在 DNA 水平上的变异频率在 5% 以下,变异频率与基因型和嘧啶醇浓度有关,低浓度的嘧啶醇变异频率很低。

1997 年,嘧啶醇首次被用于植物种质资源保存, Jarret 等^[9]在甘薯中研究了添加嘧啶醇对体外植株生长的影响,虽然初步确认了嘧啶醇可以用于减缓甘薯的生长速率,但其有效作用时间较短,难以应用于长期的植物种质资源保存。此后, Sarkar 等^[7]在此基础上进一步研究了嘧啶醇用于种质资源保存中的应用价值。对马铃薯试管苗进行为期 16 个月的培养观察后,他们认为嘧啶醇在低温(6℃)及较高浓度蔗糖(60 g/L)存在条件下,能够长期有效地抑制马铃薯试管苗的生长。尽管 Sarker 等^[7]的研究结果能够有效用于马铃薯种质资源保存,但是低温条件对后期恢复生长仍然造成较大的影响。本研究证实了在常温和高浓度蔗糖(80 g/L)条件下,添加 10 μmol/L 嘧啶醇可显著减缓 3 种马铃薯品系试管苗的生长;进一步分析不同浓度嘧啶醇对不同品系马铃薯试管苗的抑制情况,可以发现野生种 cha 品系对嘧啶醇十分敏感,只要在培养基中加

入 10 μmol/L 以上浓度的嘧啶醇,植株在保存 2 个月后生长抑制率仍可高达 90% 以上。而二倍体中间材料 CE76 与四倍体栽培品种 E3 材料在添加 10 μmol/L 嘧啶醇的培养基中抑制率可达 50% 以上,只有当嘧啶醇浓度在 15 μmol/L 以上才能将抑制率提高到 90% 以上,充分说明不同品系对嘧啶醇的敏感性不同,可能野生种的敏感性较强,其他材料对嘧啶醇的敏感性则略弱。

嘧啶醇抑制植株生长的原理是通过抑制植物赤霉素(GA)合成的中间反应来完成的^[6]。本研究发现添加 10 μmol/L 的嘧啶醇可以在一定时间内显著抑制不同品系试管苗的生长速率。然而,当抑制效果丧失后(cha 为 60 d 以后,CE76 和 E3 为 40 d 以后,见图 1),植株则以相对较稳定的生长速率迅速生长。这可能是因为嘧啶醇随保存时间增长而逐步被分解,当其浓度下降到一定程度时,就无法抑制 GA 的合成,一旦少量 GA 被合成则可明显提高植株的生长速率。

马铃薯种质资源试管苗保存常常遇到的组培异常主要包括玻璃化和恢复生长迟缓,特别是在外源添加高渗透压物质如甘露糖等条件下^[10]。Lopez-Delgado 等^[2]观察到 90% 的马铃薯基因型在添加甘露糖的培养基中生长将出现形态异常倾向,资源保存中应尽量避免这些变异,因为这些基因型的植株恢复生长将较为困难,且不利于品种优良性状的保存。此外,在其他物种中也发现体外培养常有形态学异常的现象^[4]。

本研究中虽然使用了更高的渗透压(80 g/L 蔗糖),但是在试管苗保存和后期的恢复生长中均没有发现任何形态学异常现象,这可能说明了导致体外培养组织玻璃化等形态异常现象的主要原因是额外添加甘露糖。虽然 Jarret^[9]发现高浓度的嘧啶醇添加到培养基中,可以导致甘薯体外培养的外植体在生长发育过程中发生叶片和茎秆的形态学异常。但是本研究中并未发现类似异常,因为本研究所使用的嘧啶醇浓度最高为 20 μmol/L,远低于 Jarret 使用的 100 μmol/L,证实了 Han 等^[11]的研究结果,他们报道了嘧啶醇在重瓣满天星植物的组织培养中并不会造成玻璃化。我们的研究显示,嘧啶醇不会在马铃薯试管苗培养中产生玻璃化,且恢复生长速度快,恢复生长后的植株表型没有异常现象。

参 考 文 献

- [1] SARKAR D, NAIK P S. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro* [J]. *Euphytica*, 1998, 102:275-280.
- [2] LOPEZ-DELGAD O, JIMENEZ-CASAS H M, SCOTT I M. Storage of potato microplants *in vitro* in the presence of acetylsalicylic acid [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1998, 54:145-152.
- [3] BESSEMBINDER J J E, STARITSKY G, ZANDVOORT E A. Longterm *in vitro* storage of *Colocasia esculenta* under minimal growth conditions [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1993, 33:121-127.
- [4] HARDING K. Stability assessments of conserved plant germplasm [G]// BENSON E E. *Plant conservation biotechnology*. London: Taylor & Francis Ltd., 1999:97-107.
- [5] 李方, 陈昆松, 夏宜平, 等. B9 和 PP333 对马铃薯试管苗生长的影响 [J]. *浙江农业大学学报*, 2001, 13(2):67-71.
- [6] PIMENTA M J, LANGE T. Gibberellin biosynthesis and the regulation of plant development [J]. *Plant Biol*, 2006, 8:281-290.
- [7] SARKAR D, CHAKRABARTI S K, NAIK P S. Slow-growth conservation of potato microplants: efficacy of ancymidol for long-term storage *in vitro* [J]. *Euphytica*, 2001, 117:133-142.
- [8] LYNCH P T. *Tissue culture techniques in vitro plant conservation* [G]// BENSON E E. *Plant conservation biotechnology*. London: Taylor & Francis Ltd., 1999:41-62.
- [9] JARRET R L. Effects of chemical growth retardants on growth and development of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) *in vitro* [J]. *J Plant Growth Regul*, 1997, 16:227-231.
- [10] SARKAR D, KAUSHIK S K, NAIK P S. Minimal growth conservation of potato microplants: silver thiosulfate reduces ethylene-induced growth abnormalities during prolonged storage *in vitro* [J]. *Plant Cell Rep*, 1999, 18:897-903.
- [11] HAN B H, PAEK K Y, CHOI J K. Prevention of vitrification of *Gypsophila paniculata* regenerated *in vitro* [J]. *J Korean Soc Hortic Sci*, 1991, 32:518-524.

Effects of ancymidol on long-term storage and genetic stability of potato plantlets *in vitro*

LIU Han XIE Ting-ting XU Jun LIU Jun

Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education/National Center for Vegetable Improvement (Central China), Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Ancymidol was investigated as a medium supplement for long-term storage of potato plantlets *in vitro*. Different concentrations of ancymidol (0, 10, 15, and 20 $\mu\text{mol/L}$) were evaluated in growth media based on MS medium with 80 g/L sucrose. The cultures of three genotype *Solanum chacosense* (cha), CE76 and E3 were preserved under a 16 h photoperiod at $(17 \pm 1)^\circ\text{C}$. The results showed that ancymidol had an active effect on culture viability to prolong preservation *in vitro*. Different concentrations of ancymidol had diverse growth-inhibiting effects. After conserved in ancymidol media, potato plantlets did not show evident abnormal shapes like vitrification and flaccidity in the following subculture, which are very frequently observed under mannitol stress. Genetic stability of potato plantlets conserved in ancymidol media was analyzed with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) fingerprints. Ancymidol resulted in 0.48%-2.95% genetic variations in genomic DNA of different genotypes, which will motivate us to find out better concentrations of ancymidol supplied for long-term storage of different genotypes.

Key words storage of plantlets; ancymidol; growth-inhibiting; genetic stability; potato