

携病毒马铃薯茎尖分化成苗与脱毒率检测

冯光惠, 杜虎平, 李夏隆, 亢福仁

(榆林学院 生命科学学院, 陕西榆林 719000)

摘要:以携带病毒的‘夏波蒂’马铃薯无病毒苗为材料, 38 °C/4 h 热处理 4 周, 剥离带 1 个叶原基的茎尖, 接种至不同浓度激素组合的 24 种 MS 固体培养基上, 22 °C/16 h 培养 30 d 后统计茎尖的愈伤组织诱导率和分化成苗率; RT-PCR 检测茎尖再生苗 3 种病毒(PVX、PVY、PLRV)和纺锤块茎类病毒(PSTVd)的脱毒率。结果表明:茎尖分化成苗最适培养基为 MS+1.0 mg/L ZT+0.2 mg/L NAA+2.0 mg/L GA₃, 愈伤组织诱导率为 76.25%, 分化成苗率为 26.25%;再生苗 3 种病毒 PVX、PVY 和 PLRV 的脱毒率分别为 69.4%、91.7% 和 100%, 纺锤块茎类病毒 PSTVd 脱毒率仅为 8.3%, 二次茎尖剥离后脱毒率增加到 20.8%。

关键词:夏波蒂; 茎尖; 分化成苗; RT-PCR

中图分类号: Q813.1⁺2; Q789

文献标志码: A

Meristem Differentiation Seedlings and Detoxification Detection of Potato Bringing Virus

FENG Guanghui, DU Huping, LI Xialong, KANG Furen

(College of Life Science, Yulin University, Yulin, Shaanxi 719000, China)

Abstract: Taking the aseptic seedling of ‘Shepody’ potato which bring virus as materials, 38 °C/4 h heat treatment for 4 weeks, stripping with one leaf primordia of potato meristem, inoculated to 24 kinds of MS solid medium add to different hormone combinations, statistical the callus induction rate of meristem and differentiation seedling rate after culturing 30 days by 22 °C/16 h; RT-PCR detected the virus-free rate of meristem regeneration of three kinds of potato viruses(PVX, PVY, PLRV) and potato spindle tuber viroid (PSTVd). The results showed that the best meristem differentiation medium was MS+1.0 mg/L ZT+0.2 mg/L NAA+2.0 mg/L GA₃, the callus induction rate was 76.25%, differentiation seedling rate was 26.25%; the rate of detoxification of regenerated plantlets three potato virus PVX, PVY and PLRV were 69.4%, 91.7% and 100%, respectively. The virus-free rate of potato spindle tuber viroid was 8.3% and the secondary shoot tip virus-free rate was 20.8%.

Key words: Shepody; meristem; differentiation seedling; RT-PCR

脱除马铃薯病毒和纺锤块茎类病毒(以下简称类病毒)主要采用茎尖组织培养法,并结合热处理^[1]、低温疗法^[2]和病毒唑法^[3]等提高脱毒效果。其中,热处理结合茎尖组织培养法是一种应用较广的马铃薯脱毒方法,在葡萄、草莓和苹果等植物上也

有报道。但是,由于不同植物或同一植物不同品种基因型和生理特性的差异,茎尖分化成苗的难易程度也不一样。笔者以盖琼辉等^[4]、Iqbal H 等^[5]研究的马铃薯茎尖分化成苗培养基作为参考,在同一培养基上对‘克新 1 号’、‘夏波蒂’、‘费乌瑞它’、‘陇薯

收稿日期: 2014-07-14; 修改稿收到日期: 2014-12-14

基金项目: 陕西省教育厅项目(08JK508, 08JK509)

作者简介: 冯光惠(1977—), 男, 硕士, 副教授, 主要从事植物组织培养与脱毒技术、分子生物学研究。E-mail: fghui.99@126.com

3 号’、‘布尔班克’、‘青薯 9 号’、‘早大白’、‘冀张薯 8 号’等不同品种的茎尖培养后发现,‘夏波蒂’马铃薯的茎尖分化成苗最难,成苗率仅为 5%~10%,茎尖培养 30 d 后仍以形成疏松的愈伤组织为主,成苗所需时间相对其他马铃薯品种也最长。近年来,王娟等^[6]通过组织培养研究了不同茎尖大小、不同浓度和配比的细胞分裂素和生长素对脱毒效果的影响;于仙萍等^[7]研究了采用不同处理方法对 N88 和 D575 马铃薯茎尖分化成苗率的影响;蒋瑜等^[8]筛选了 B13-6 马铃薯茎尖脱毒的最佳培养基及影响因素;Aleksandar 等^[9]、Mutasim 等^[10]分别研究了马铃薯茎尖分化成苗的培养基筛选及脱毒过程。但是,国内外关于‘夏波蒂’马铃薯离体再生成苗的文献报道较少^[11-13],未见‘夏波蒂’马铃薯茎尖分化成苗及病毒检测的报道。本研究针对‘夏波蒂’马铃薯茎尖分化成苗率低,以热处理结合茎尖剥离脱除病毒和类病毒为目标,筛选茎尖分化成苗最适宜的培养基,并通过 RT-PCR 方法检测再生苗病毒和类病毒的脱毒率,为脱毒苗扩繁和种薯繁育奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

采集田间疑似带毒马铃薯植株的块茎,低温休眠后,室温暗处催芽,消毒后接种在 MS 固体培养基上培养,筛选成活苗扩繁,从而建立马铃薯无菌苗体系。用 RT-PCR 方法检测并筛选分别含有 3 种病毒(PVX、PVY、PLRV)和纺锤块茎类病毒(PSTVd)的 2 种材料,由本实验室保存。

根据 GenBank 数据库上 PVX、PVY、PLRV 的 CP 基因序列和 PSTVd 全基因组序列,利用软件 Primer 5 设计 4 对特异引物(表 1)。

1.2 方 法

1.2.1 热处理 取生长至高约 1~2 cm 的马铃薯无菌苗,在植物培养箱内升温 1 ℃/d 驯化 20 d 左

右,然后 38 ℃/4 h、22 ℃/12 h 光照培养,光照强度为 3 000 lx,18 ℃/8 h 暗培养,变温热处理 4 周以钝化病毒。

1.2.2 培养基组成 以 MS 为基本培养基,添加不同质量浓度配比的植物生长调节剂,组成 24 种培养基(表 2),蔗糖 30 g/L,卡拉胶 5 g/L,pH 5.8。培养基及不同植物生长调节剂所含药品,均购自北京

表 2 不同激素组合的培养基

Table 2 The culture media with different hormone combinations

处理 Treatment	激素组合 Hormone combination/(mg/L)				
	6-BA	ZT	NAA	IAA	GA ₃
BN01	1.0	—	0.2	—	0.2
BN02	2.0	—	0.2	—	0.2
BN03	5.0	—	0.2	—	0.2
BN04	1.0	—	0.2	—	2.0
BN05	2.0	—	0.2	—	2.0
BN06	5.0	—	0.2	—	2.0
BI01	1.0	—	—	0.5	0.2
BI02	2.0	—	—	0.5	0.2
BI03	5.0	—	—	0.5	0.2
BI04	1.0	—	—	0.5	2.0
BI05	2.0	—	—	0.5	2.0
BI06	5.0	—	—	0.5	2.0
ZN01	—	1.0	0.2	—	0.2
ZN02	—	2.0	0.2	—	0.2
ZN03	—	5.0	0.2	—	0.2
ZN04	—	1.0	0.2	—	2.0
ZN05	—	2.0	0.2	—	2.0
ZN06	—	5.0	0.2	—	2.0
ZI01	—	1.0	—	0.5	0.2
ZI02	—	2.0	—	0.5	0.2
ZI03	—	5.0	—	0.5	0.2
ZI04	—	1.0	—	0.5	2.0
ZI05	—	2.0	—	0.5	2.0
ZI06	—	5.0	—	0.5	2.0

表 1 RT-PCR 检测所用引物

Table 1 The primer pairs for detection

马铃薯病毒和类病毒 Potato virus and viroid	引物序列 Primer sequence(5'→3')	序列来源 Sequence source
病毒 Virus X(PVX)	PVX-F:ACAGGCCACAGGGTCAACTAC PVX-R:CATCTAGGCTGGCAAAGTCGT	CP 基因 CP gene
病毒 Virus Y(PVY)	PVY-F:GCCAACTGTGATGAATGGGC PVY-R:TGTACTGATGCCACCGTCCA	CP 基因 CP gene
病毒 Leafroll virus(PLRV)	PLRV-F:CGCGCTAACAGAGTTCAGCC PLRV-R:GCAATGGGGGTCCAACCTCAT	CP 基因 CP gene
纺锤块茎类病毒 Spindle tuber viroid(PSTVd)	PSTVd-F:GATCCCCGGGGAAACCTGGAGC PSTVd-R:GATCCTGAAGCGCTCCTCCGAG	全长基因 Entire genome

康贝斯生物科技有限公司。

1.2.3 茎尖剥离与接种 剪取热处理后长势较好的无菌苗(部分扩繁无菌苗因耐热差而长势弱或死亡),以注射器针代替解剖针,在 40 倍体视显微镜下进行茎尖剥离。因剥离茎尖越大,成活率越高,但脱毒率低,为提高再生苗的脱毒率,试验全部剥离带 1 个叶原基的茎尖,茎尖大小约 0.1~0.2 mm,壮苗茎尖稍大,弱细苗茎尖稍小。培养温度为 22 ℃,光照时间为 16 h/d,光照强度为 3 000 lx。

为降低污染率,每试管只接种 1 个茎尖,每处理培养基接种 80 个茎尖。10 d 后观察并记录茎尖生长情况,30 d 后统计茎尖愈伤组织诱导率和分化成苗率。

愈伤组织诱导率(%)=形成愈伤组织数/接种茎尖个数×100%

分化成苗率(%)=分化成苗数/接种茎尖个数×100%

1.2.4 RT-PCR 检测 为检测马铃薯茎尖剥离再生苗病毒和类病毒的脱除情况,随机挑选热处理前携带 3 种病毒(PVX、PVY、PLRV)且茎尖剥离分化后长势良好的再生苗 36 株,同时挑选热处理前携带类病毒(PSTVd)且茎尖剥离分化后长势良好的再生苗 24 株,扩繁 2 代后分别以 RT-PCR 法进行病毒检测。

Trizol 法提取马铃薯再生苗叶片总 RNA,反转录合成 cDNA,PCR 分别扩增不同病毒和类病毒的目的基因片段,PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。病毒检测的 Trizol 试剂购自 invitrogen 公司,cDNA 合成试剂盒、Taq DNA 聚合酶、dNTP、琼脂糖等购自北京全式金生物科技有限公司。

PCR 反应体系包含模板 DNA 3 μL,正向(F)引物 1 μL,反向(R)引物 1 μL,10×PCR buffer 5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL,Taq DNA 聚合酶 1 μL,加 ddH₂O 至 50 μL。

PCR 反应程序为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,PVX、PSTVd 50 ℃(PVY、PLRV 59 ℃)退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。

预期 PVX、PVY、PLRV 的 CP 基因序列和 PSTVd 全基因组序列的扩增片段大小分别为 620、400、336 和 251 bp。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,用灭菌 TE(pH 8.0)稀释至浓度为 10 μmol/L。

2 结果与分析

2.1 6-BA 与 NAA 及 IAA 激素组合对马铃薯茎尖分化成苗的影响

在细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA 的组合中(图 1),处理 BN06 的茎尖愈伤组织诱导率最低,为 78.75%,分化成苗率最高,为 11.25%;BN01 茎尖愈伤组织诱导率最高,达 92.5%,但分化成苗率最低,仅 6.25%。当 NAA 和 GA₃ 浓度一定时,6-BA 浓度(1.0~5.0 mg/L)与茎尖分化成苗成正相关,而与愈伤组织诱导成负相关;当 6-BA 和 NAA 浓度一定时,低浓度(0.2 mg/L)、较高浓度(2.0 mg/L) GA₃ 能提高愈伤组织诱导率,而分化成苗率则降低。

在 6-BA 与 IAA 组合的培养基中(图 2),处理 BI06 茎尖愈伤组织诱导率最低,为 71.25%,而分化成苗率最高,为 15%;BI01 茎尖愈伤组织诱导率最高,为 80.0%,而分化成苗率则较低,仅 7.5%。从图 1、2 中发现,在 NAA/IAA 和 GA₃ 浓度一定时,

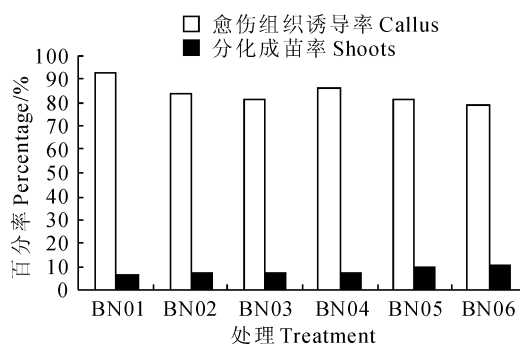


图 1 6-BA 与 NAA 激素组合对马铃薯茎尖分化成苗的影响
Fig. 1 The influence of potato meristem differentiation seedling by 6-BA and NAA hormone combinations

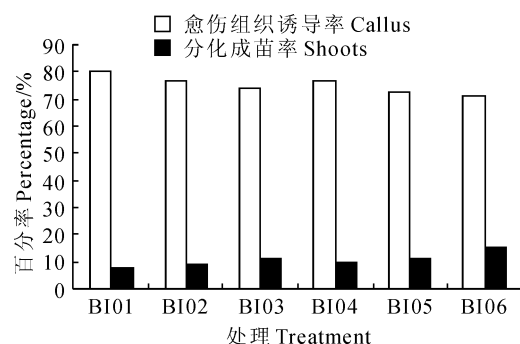


图 2 6-BA 与 IAA 激素组合对马铃薯茎尖分化成苗的影响
Fig. 2 The influence of potato meristem differentiation seedling by 6-BA and IAA hormone combinations

6-BA 浓度(1.0~5.0 mg/L)与茎尖分化成苗成正相关,而与愈伤组织的诱导成负相关;在 6-BA 和 GA₃ 浓度一定时,IAA(0.5 mg/L)较 NAA(0.2 mg/L)组合的培养基,茎尖的愈伤组织诱导率降低,分化成苗率则提高。

2.2 ZT 与 NAA 及 IAA 激素组合对马铃薯茎尖分化成苗的影响

在 ZT 与 NAA 组合的培养基中(图 3),茎尖愈伤组织诱导率最高是 ZN01 处理,最低是 ZN06,分别为 77.5%和 70.0%,二者差异不明显;ZN04 培养基的茎尖分化成苗率最高,为 26.25%,ZN03 分化成苗率最低,为 12.5%。从图 3 可以看出,当 NAA 和 GA₃ 浓度一定时,ZT 浓度(1.0~5.0 mg/L)与愈伤组织的诱导、茎尖分化成苗均成负相关,这与图 1、2 中 6-BA 浓度(1.0~5.0 mg/L)的作用明显不同。表明 ZT 浓度太高会影响茎尖愈伤组织的诱导和茎尖分化成苗。在 ZT 和 NAA 浓度一定时,高浓度(2.0 mg/L)、较低浓度(0.2 mg/L)GA₃ 的作用明显,能显著提高茎尖分化成苗率。

在 ZT 与 IAA 组合的培养基中(图 4),处理 ZI03 茎尖的愈伤组织诱导率和分化成苗率均最低,

分别为 61.25%、5%;处理 ZI04 的茎尖愈伤组织诱导率和分化成苗率均最高,分别为 76.25%、23.75%。在 IAA 和 GA₃ 浓度一定时,ZT 浓度(1.0~5.0 mg/L)表现出与图 3 中类似的作用,即与愈伤组织的诱导、茎尖分化成苗均成负相关。高浓度(2.0 mg/L)GA₃ 与前 3 种组合(图 1~3)的作用相同,均能促进茎尖分化成苗率,表明 GA₃(2.0 mg/L)是促进‘夏波蒂’马铃薯茎尖分化成苗较为合适的浓度。由图 3 和图 4 比较后发现,在 ZT 和 GA₃ 的浓度一定时,虽然 IAA(0.5 mg/L)较 NAA(0.2 mg/L)能抑制愈伤组织的诱导,但并没有提高茎尖分化成苗率,反而略有下降,表明 ZT 与 NAA 组合比 ZT 与 IAA 组合的茎尖分化成苗效果好。

由图 1~3 中 6-BA 与 ZT 对‘夏波蒂’马铃薯茎尖分化成苗率的比较后发现,ZT 较 6-BA 对愈伤组织的诱导不利,但更有利于茎尖分化成苗。ZN04 培养基的分化成苗率是 26.25%(图 3),ZI04 培养基的分化成苗率是 23.75%(图 4),而 BN04 培养基的分化成苗率是 7.5%(图 1),BI04 培养基的分化成苗率是 10%(图 2),6-BA 与 ZT 的作用差异明显。所以,在本试验 4 类组合的 24 种培养基中,最适合‘夏波蒂’马铃薯茎尖分化成苗的培养基是处理 ZN04,即 MS+ZT1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+GA₃ 2.0 mg/L。

2.3 马铃薯茎尖分化成苗过程

在 4 类组合 24 种培养基中,从茎尖分化成苗过程来看,10 d 后即能诱导形成浅绿色、米粒大小的愈伤组织,随着培养时间的延长,愈伤组织逐渐增大,30~40 d 达到稳定状态,以后逐渐开始分化芽和根,55~70 d 时可生长为完整的马铃薯再生苗,但不同培养基上生长的再生苗的生长势不同,其中,ZN04(图 5,a)和 ZI04(图 5,b)培养基上生长的再生苗叶色浓绿,根系发达,茎干生长健壮,二者均为正常组培苗;而 BN03(图 5,c)培养基上生长的再生苗尽管叶色正常,但叶片肿胀下垂,形成根系也少,BI03 再生苗(图 5,d)没有形成根系,叶色失绿,愈伤组织偏大,二者均为弱化组培苗。与其他马铃薯品种相比,‘夏波蒂’马铃薯开始分化成苗和形成完整再生苗的时间均晚 15~20 d。

2.4 马铃薯再生苗病毒和类病毒的 RT-PCR 检测

凝胶成像检测发现,马铃薯茎尖剥离脱毒前后 RT-PCR 电泳条带差异明显(图 6),其中,2、4、6、8 泳道为脱毒前的检测结果,均扩增出不同病毒和类病毒的目的条带;3、5、7 泳道和 9 泳道没有扩增出

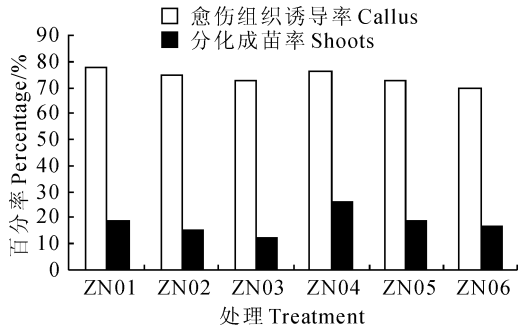


图 3 ZT 与 NAA 激素组合对马铃薯茎尖分化成苗的影响

Fig. 3 The influence of potato meristem differentiation seedling by ZT and NAA hormone combinations

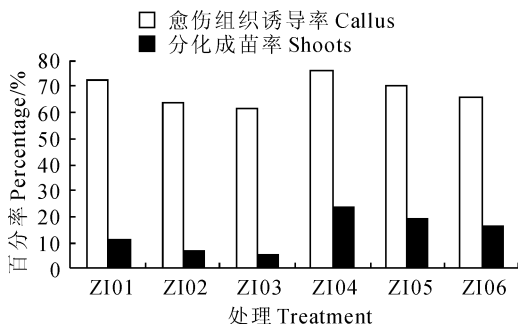


图 4 ZT 与 IAA 激素组合对马铃薯茎尖分化成苗的影响

Fig. 4 The influence of potato meristem differentiation seedling by ZT and IAA hormone combinations

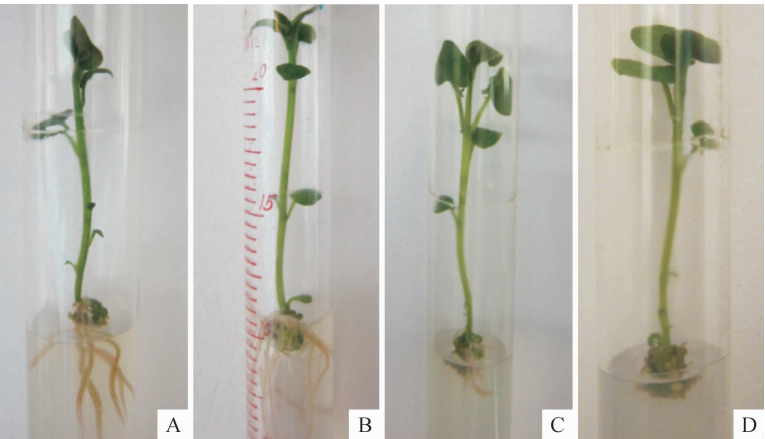


图5 不同激素组合培养基中的茎尖分化再生苗
a、b. 正常组培苗;c、d. 弱化组培苗

Fig. 5 The differentiation seedling of potato by different hormone combinations
a, b. Normal seedlings; c, d. Weak seedlings

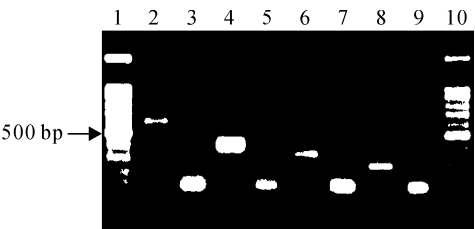


图6 马铃薯病毒和类病毒的 RT-PCR 检测
1、10. DL 1500; 2、4、6、8 与 3、5、7、9 分别为
茎尖剥离前后 PVX、PVY、PLRV 和 PSTVd

Fig. 6 The RT-PCR detection of potato virus and viroid
1 and 10. DL1500; The detection of PVX, PVY, PLRV
and PSTVd before stripping meristem in lane
2, 4, 6, 8 and after in lane 3, 5, 7, 9

表3 再生苗病毒和类病毒的检测结果

Table 3 The detecting result of viruses and
viroid of regenerated plantlets

项目 Items	检测个数 Detecting number	脱毒个数 Virus-free number	脱毒率 Virus-free rate/%
PVX	36	25	69.4
PVY	36	33	91.7
PLRV	36	36	100
PSTVd	24	2	8.3

目的条带,表明被检测再生苗分别不含病毒 PVX、PVY、PLRV 和类病毒 PSTVd;部分再生苗的 RT-PCR 产物检测出目的条带,表明未脱除相应的病毒或类病毒。

再生苗 3 种病毒 PVX、PVY 和 PLRV 的检测结果(表 3)发现:36 株全部不携带 PLRV,33 株不携带 PVY,25 株不携带 PVX。3 株携带 PVY 的再生苗同时携带 PVX,表明 X 病毒较难脱除,Y 病毒次

之,卷叶病毒容易脱除,且 3 种病毒 PVX、PVY 和 PLRV 的脱毒率分别为 69.4%、91.7%和 100%。

再生苗类病毒 PSTVd 的检测结果(表 3)发现:茎尖剥离脱毒后,24 株再生苗中仅有 2 株脱除了类病毒,脱毒率仅为 8.3%,表明热处理结合茎尖剥离脱毒法也很难脱除 PSTVd。对再生苗中未脱除 PSTVd 的 22 株再生苗进行二次茎尖剥离,成苗后经过 RT-PCR 检测,又有 3 株脱除了 PSTVd,二次脱毒率升高为 20.8%,表明通过二次茎尖剥离可以提高 PSTVd 的脱毒率。

3 讨论

热处理结合茎尖组织培养法是国内外普遍应用的马铃薯脱毒技术,能有效脱除危害马铃薯生长的常见病毒和类病毒,如 PVX、PVY、PLRV、PVS、PVA、PVM 和 PSTVd 等。但是,不同病毒脱除难易差别较大,对一般马铃薯品种而言,通常 PVS、PVX 较难脱除,PLRV 容易脱除,本研究的试验结果和国外一些学者^[14-16]研究的结论是一致的。对于 PVS、PVX 等较难脱除的病毒,主要采用是热处理、低温疗法和病毒唑法等结合茎尖组织培养法。而脱除 PSTVd 目前仍没有理想的方法,主要以筛选田间抗类病毒植株的块茎为主。本试验以二次茎尖剥离法脱除类病毒,提高了类病毒的脱毒率。并在检测无体细胞变异的情况下,尝试以多次茎尖剥离法来提高类病毒的脱毒效果。在试验中还发现,在脱除病毒或类病毒的过程中,提高无菌试管苗扩繁时的环境温度到 25~27℃,有利于提高试管苗的生长速度,快速剥取生长旺盛的茎尖分生组织,能一定程

度提高脱毒率。

茎尖组织培养法是剥离茎尖生长点的分生组织,剥离茎尖大小与脱毒有直接关系,剥离茎尖大,不易脱毒,剥离茎尖小,病毒易脱除但不易成活。本试验为获得脱毒效果更好的再生苗,以带 1 个叶原基的茎尖为剥离对象,同时相对降低了茎尖分化成苗率,与国内多数学者剥离带 1~2 或 2~3 个叶原基的试验区别较大。

不同品种的马铃薯由于基因型和生理特性的不同,需要不同的培养基环境。不同浓度激素的筛选

及浓度配比尤为重要,按一定浓度激素配比来促进马铃薯茎尖分生组织愈伤组织的诱导和分化成苗。本试验中的 ZT 与 6-BA 相比,能明显提高‘夏波蒂’马铃薯的茎尖分化成苗率;高浓度的 GA_3 也能提高茎尖分化成苗率。试验同时发现,当 ZT 的浓度为 1.0 mg/L, NAA 的浓度为 0.2 mg/L 与 IAA 的浓度为 0.5 mg/L 时,茎尖分化成苗率差异不大,所以,在 ZT 和 GA_3 浓度一定时,有待进一步试验降低 NAA 或者提高 IAA 的浓度,可能会筛选出茎尖分化成苗率更高的培养基。

参考文献:

- [1] MACDONALD D M. Heat treatment and meristem culture as a means of freeing potato varieties from viruses X and S[J]. *Potato Research*, 1973, **16**(4): 263—269.
- [2] WANG Q C, LIU Y, XIE Y. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of potato leaf roll virus(PLRV) and potato virus Y(PVY)[J]. *Potato Research*, 2006, **49**(2): 116—129.
- [3] Danci O, ERDE L, VIDACS LIVID. Influence of ribavirin on potato plants regeneration and virus eradication[J]. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 2009, **12**: 421—425.
- [4] GAI Q H(盖琼辉), WANG J CH(王季春). Study on optimization of themedium for meristem tip differerntiating into potato[J]. *Journal of Southwest Agricultural University*(Nat. Sci. Edi.)(西南农业大学学报·自然科学版), 2005, **27**(3): 370—373(in Chinese).
- [5] IQBAL H, AISH M, ZUBEDA C. Morphogenic potential of three potato(*Solanum tuberosum*) cultivars from diverse explants, a prerequisite in genetic manipulation[J]. *Peking Journal Botany*, 2005, **37**(4): 889—898.
- [6] WANG J(王 娟), WANG ZH M(汪仲敏), WANG R Y(王瑞英), et al. Influencing factors of potato meristem culture for virus elimination[J]. *China Potato*(中国马铃薯), 2010, **24**(3): 172—175(in Chinese).
- [7] YU X P(于仙萍), CHEN W(陈 炜), JIN L P(金黎平), et al. Influence of various treatments on plantlet regeneration percentage of shoot tip culture[J]. *China Potato*(中国马铃薯), 2010, **24**(4): 196—198(in Chinese).
- [8] JIANG Y(蒋 瑜), ZHANG L F(张丽芳), ZHU W X(朱维贤), et al. Analysis of selection and influencing factors of medium culture in potato stem apex detoxication[J]. *Journal of Changjiang Vegetable*(长江蔬菜), 2010, (4): 11—13(in Chinese).
- [9] ALEKSANDAR C, BRANKA V, DRAGAN V, et al. Agrobacterium-mediated transformation of two Serbian potato cultivars[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, **9**(30): 4 644—4 650.
- [10] MUTASIM M K, KHADIGA G A, RASHEID S M. Callus formation and organogenesis of potato(*Solanum tuberosum* L.) cultivar Almera[J]. *Journal of Phytology*, 2010, **2**(5): 40—46.
- [11] LI J(李 娟), CHENG ZH H(程智慧), ZHANG G Y(张国裕). Establishment of efficient regeneration system from leaf explants of potato[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2004, **24**(4): 610—614(in Chinese).
- [12] LI J(李 娟), CHENG ZH H(程智慧), ZHANG G Y(张国裕). Study on vitro regeneration technology from stem explants of four potato cultivars[J]. *Journal of Northwest Sci-Tech Univ. of Agri. and For.*(Nat. Sci. Edi.)(西北农林科技大学学报·自然科学版), 2006, **34**(3): 122—126(in Chinese).
- [13] GUSTAFSON V, MALLUBHOTLA S, MACDONNELL J. Transformation and plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. cv. ‘Shepody’[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2006, (85): 361—366.
- [14] BIPASHA CHAKRAVARTY, GEFU WANG-PRUSKI. Rapid regeneration of stable transformants in cultures of potato by improving factors influenceing *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2010, (1): 409—416.
- [15] HALTERMAN D, CHARKOWSKI A, VERCHOT J. Potato, viruses, and seed certification in the USA to provide healthy propagated tubers[J]. *Pest Technology*, 2012, (S1): 1—14.
- [16] MAMIDALA P, SWAMY NANNA R. Efficient *in vitro* plant regeneration, flowering and fruiting of drawf tomato cv. Micro-Msk[J]. *Plant Omics Journal*, 2009, **2**(3): 98—102.

(编辑:宋亚珍)