

中图分类号: S532 文献标识码: B 文章编号: 1672-3635(2014)01-0014-04

## 利用山梨醇长期保存马铃薯试管苗

吴京姬, 康哲秀, 郎贤波, 许震宇, 玄春吉\*

(延边朝鲜族自治州农业科学院, 吉林 龙井 133400)

**摘要:** 试验以缓慢试管苗生长为策略, 建立合理使用山梨醇保存试管苗慢性生长体系, 通过适宜的培养温度和合理的山梨醇浓度使用, 使试管苗培养周期由原来的2~3个月延长至1年, 为大规模保存马铃薯试管苗提供技术基础。试验结果表明: 添加40 g/L山梨醇的培养基结合10℃培养室温度, 能够使多数马铃薯试管苗保存延长至1年, 从而能有效节省成本, 减少由于频繁转接所引起的污染及品种混杂的发生。

**关键词:** 马铃薯; 试管苗; 保存; 山梨醇

## Long Term Conservation of Potato Plantlets *in vitro* by Using Sorbitol

WU Jingji, KANG Zhexiu, LANG Xianbo, XU Zhenyu, XUAN Chunji\*

(Yanbian Academy of Agricultural Sciences, Longjing, Jilin 133400, China)

**Abstract:** The aim of this research was to establish slow growth system of plantlets *in vitro* by addition of sorbitol to medium based on the strategy of slow growth, and extend the subculture cycle from 2-3 months to 1 year by optimization of sorbitol concentration and culture temperature, thereby providing technique support for preservation of plantlets *in vitro* on large scale. The results indicated that use of medium supplemented with 40 g/L sorbitol, combined with 10℃ culture temperature, could extend the subculture cycle to 1 year for some varieties tested, therefore reducing cost, and avoiding the contamination and mixture due to frequent subculture.

**Key Words:** potato; plantlets *in vitro*; preservation; sorbitol

马铃薯是茄科无性繁殖作物, 传统方法以块茎方式保存, 不仅耗费大量的人力、物力和财力, 也容易造成人为的种质混杂和各种病害的不断侵染以及病毒的积累, 使品种资源优势退化。植物生长调节剂作为马铃薯种质资源保存的添加剂受到广泛的关注, 并且植物生长调节剂在各个领域均取得了不同成功<sup>[1-3]</sup>。尽管生长调节剂的抑制效果明显, 但后作用时间长, 而且容易导致遗传变异的发生。最近几年延边农业科学院选用低浓度的甘露醇来保存试管苗, 但在保存过程中出现很多畸形苗。山梨醇单糖是甘露醇的结构异构体, 其作用与甘露醇相似但副作用较弱, 现已广泛用于医药、食品和化工行

业。Gopal等<sup>[4]</sup>以适量的山梨醇作为培养基添加剂在常温下可保存马铃薯种质资源达12个月之久。本研究以缓慢试管苗生长为策略, 建立合理使用山梨醇保存试管苗慢性生长体系, 通过适宜的培养温度和合理的山梨醇浓度使用, 使试管苗培养周期由原来的2~3个月延长至1年, 为大规模保存马铃薯试管苗提供技术基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 甘露醇与不同山梨醇浓度对马铃薯试管苗抑制作用的比较

为了比较添加甘露醇与添加山梨醇的培养基对

收稿日期: 2013-12-20

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金资助(CARS-10-ES07)。

作者简介: 吴京姬(1981-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事马铃薯组织培养及病毒检测研究。

\*通信作者(Corresponding author): 玄春吉, 研究员, 主要从事马铃薯栽培及种薯生产研究, E-mail: xuanchunji@126.com。

马铃薯试管苗生长的抑制效应,以品种‘延薯4号’(中晚熟)为试管苗的材料,以常规保存培养基为基础,设置20 g/L甘露醇,山梨醇20, 30, 40, 50 g/L 5个处理,以不添加甘露醇和山梨醇的处理为对照(CK)。每个处理接种50个试管(180 mm × 17 mm)时,每一管接种2个带叶芽节段(不含顶芽)。置于温度为20℃,光照16 h/d光照培养室中培养。6个月时随机取5个试管测量试管苗的株高,取平均值。6个月后每个月统计试管苗的整体存活率。

## 1.2 山梨醇与不同温度对马铃薯试管苗保存生长的影响

以马铃薯早熟品种‘费乌瑞它’为试管苗材料,保存培养基为MS培养基加40 g/L山梨醇,温度分别设为10, 15, 20℃。每个处理分别接种50个试管,光照16 h/d。从接种后第6个月开始每个月统计试管苗的存活率。

## 1.3 山梨醇对不同品种试管苗生长延缓的作用

选择早熟品种‘费乌瑞它’,中早熟品种‘尤金’,中晚熟品种‘延薯4号’为试管苗材料,保存培养基为MS培养基加40 g/L山梨醇,每个品种各接种50管试管苗,接种后置于温度为10℃,光照16 h/d,光照培养室中培养。6个月后每个月统计试管苗的整体存活率。

## 1.4 保存一年后的试管苗恢复生长后形态异常情况鉴定

以添加40 g/L山梨醇培养期为一年的试管苗为材料,按照马铃薯试管苗继代方法,接种于MS扩繁培养基中,培养温度20~25℃,光照16 h/d。

# 2 结果与分析

## 2.1 甘露醇与不同山梨醇浓度对马铃薯试管苗抑制作用的比较

试验以马铃薯品种‘延薯4号’为材料,比较培养基中添加甘露醇与不同浓度山梨醇对试管苗的抑制效应。观察表明,CK试管苗培养1个月左右,主茎就达到株高最大值,接着试管苗开始分枝,分枝绝大部分发生在试管苗上部位,多而纤细。培养2个月左右时分枝长满整个试管,试管苗基部茎和叶片出现枯黄,到第3个月时试管苗几乎枯萎死亡,存活率只有32%。与CK相比,添加20 g/L甘露醇处理比对照生长速度缓慢,但培养时间超过3个月后,试管苗上部节位开始大量出现分枝,4个月开始出现枯死现象,到第6个月时近40%的试管苗死亡。之后枯萎速度更快,到第9个月时,存活率仅有20%。由此可见,20 g/L甘露醇最长能保存6个月左右(图1)。

添加山梨醇的培养基中马铃薯试管苗生长速度均有不同程度的延缓作用(图2)。由图1可以看出40 g/L山梨醇处理的试管苗存活率高于其它处理,培养12个月后存活率能达到80%,并且植株仍较健康。

## 2.2 山梨醇与不同温度对马铃薯试管苗保存生长的影响

培养基中添加20 g/L甘露醇对马铃薯试管苗生长有一定的延缓作用,严格控制温度在17~20℃,最多能保存5~6个月。而添加山梨醇的培养基对

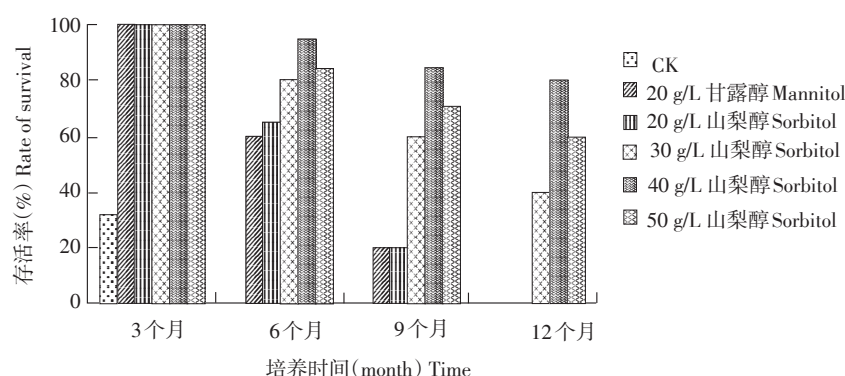


图1 在20 g/L甘露醇与不同山梨醇浓度培养基中各培养时期试管苗的存活率

Figure 1 Survival rate of plantlets *in vitro* cultured on medium supplemented with 20 g/L mannitol and various levels of sorbitol for different times

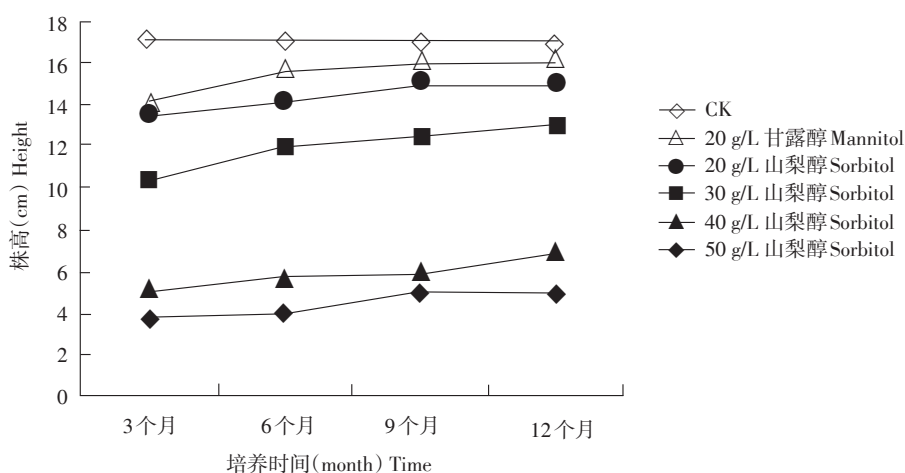


图2 在20 g/L甘露醇与不同山梨醇浓度培养基中各培养时期试管苗的株高

Figure 2 Height of plantlets *in vitro* cultured on medium supplemented with 20 g/L mannitol and various levels of sorbitol for different times

试管苗的延缓作用更明显。为了进一步确定山梨醇的使用浓度和适宜的培养温度,建立试管苗保存培养周期至少为1年的培养体系,在前述研究的基础上,选择40 g/L山梨醇浓度和3个培养温度,进行试管苗保存培养。

结果显示,试管苗在10℃处理中比在15℃和

20℃处理中的生长速度明显要慢。10℃处理时培养1年试管苗的存活率明显高于15℃和20℃处理,存活率达到了70%以上,见图3。

### 2.3 山梨醇对不同熟期品种试管苗生长延缓的作用

为了证明40 g/L山梨醇处理是否适合所有保存的品种,我们选择了3个不同熟期品种做了比较。

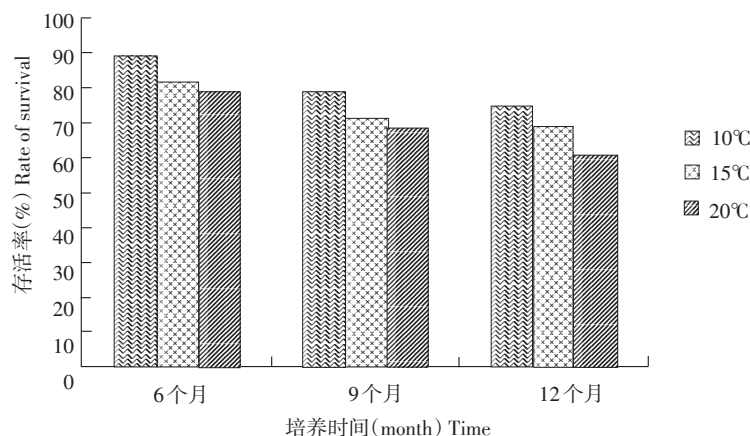


图3 40 g/L山梨醇浓度培养基中不同培养温度条件各培养时期试管苗的存活率

Figure 3 Survival rate of plantlets *in vitro* cultured on medium supplemented with 40 g/L sirbutik at different temperatures for different times

结果表明早熟品种‘费乌瑞它’生长速度快于其他两个品种,培养一个月的试管苗几乎已经满瓶。‘延薯4号’生长速度慢于‘费乌瑞它’和‘尤金’。3个品种培养12个月以后存活率都达到了60%以上。由此表明,40 g/L山梨醇处理对不同时期马铃薯试管苗都

有一定的延缓作用且存活率都比较高(图4)。

### 2.4 试管苗恢复生长后形态异常情况鉴定

试管苗培养一周后新芽很快长出,一个月以后植株生长旺盛健康,根部生长正常,未出现明显的生理抑制现象(图5)。

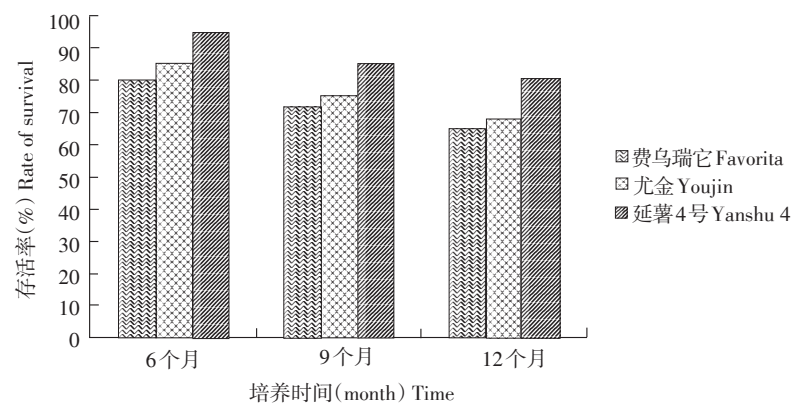


图4 不同品种在添加40 g/L山梨醇培养基中各培养时期的存活率

Figure 4 Survival rate of plantlets *in vitro* of different varieties cultured on medium supplemented with 40% sorbitol for deferent times



图5 试管苗恢复生长1个月后情况

Figure 5 Growth of preserved plantlets *in vitro* one month after recovery

3 讨 论

试管苗保存(或离体保存)是目前马铃薯资源保存中应用最普遍的方式。缓慢生长保存是通过调节培养环境条件以及培养基物质组成,使试管苗慢性生长或停止生长,以达到长期保存的目的,而在需要利用时可迅速恢复正常生长。缓慢生长保存方式可以减少继代次数,节约大量人力和物力,减少因频繁操作导致的机械混杂或污染退化等问题。

甘露醇是一种不易被植物吸收的蔗糖醇,有报道显示,马铃薯试管苗在添加甘露醇的培养基长期保存后,超过90%基因型会产生不同程度的变异。本试验的早期研究发现,低浓度的效果不明显,超过3%的浓度对植株生长有严重抑制作用,表现为试管苗顶部膨大结薯,大部分出现畸形苗。

在培养基中添加山梨醇可以降低培养基的水势,从而造成不同程度的水分胁迫,进而影响马铃薯试管苗的地上部茎段、叶片以及根系的生长和发育。试验中我们发现,长期保存的试管苗的存活率

与植株的生长速率有关联,只有延缓试管苗的生长速度,才有可能使长期保存的试管苗得到较高的成活率。

本试验研究发现,添加40 g/L山梨醇的培养基结合10℃的培养室温度,能够使多数马铃薯试管苗保存延长至1年,从而能有效节省成本,减少由于频繁转接所引起的污染及品种混杂现象的发生。

[参 考 文 献]

[1] 华婧,王关林,王静,等. 缩节胺在脱毒马铃薯组培快繁中的应用[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(6): 1113-1114.

[2] 艾辛,夏志兰,刘明月,等. 植物生长调节剂对马铃薯试管苗生长和保存的影响[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2005, 31(5): 514-517.

[3] 阮龙,王钰,严平,等. 多效唑在马铃薯试管苗上的应用研究[J]. 杂粮作物, 2005, 25(1): 32-34.

[4] Gopal J, Chamail A, Sarkar D. Slow-growth *in vitro* of potato germplasm at normal propagation temperature[J]. Potato Research, 2002, 45:203-213.