

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2010)05-0266-05

嘧啶醇在马铃薯试管苗长期保存中的作用

谢婷婷, 徐 君, 周 俊, 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, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 为研究植物生长抑制剂嘧啶醇在马铃薯种质资源试管苗长期保存中的作用, 本文对添加嘧啶醇影响试管苗长期保存及其后期存活情况进行了分析。结果表明, 17℃ 保存条件下, 添加 $\geq 15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 嘧啶醇均可显著降低试管苗的株高。恢复生长研究证明, 17℃ 保存条件下添加 $\geq 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 嘧啶醇可以显著提高试管苗的存活率, 保存 12 个月的试管苗可全部存活, 保存 18 个月后 *Solanum chacosense* 和 CE76 品系仍有 70% 以上的试管苗可以存活。

关键词: 马铃薯试管苗; 长期保存; 嘧啶醇

Efficacy of Ancymidol for Long-term Storage of Potato Plantlets in vitro

XIE Tingting, XU Jun, ZHOU Jun, LIU Jun

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

Abstract: Ancymidol, an inhibitor of plant growth, was investigated in this study as a medium supplement for long-term storage of potato plantlets in vitro. The results showed when more than $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ancymidol was added to the medium, the growth of plantlets could be slowed down and the preservation was prolonged in vitro at 17℃. After 12 months conserved in ancymidol media ($\geq 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) at 17℃, all potato plantlets could survive. A total of 70% potato plantlets of *Solanum chacosense* and CE76 could also survive after 18 months conserved under the same condition.

Key Words: potato plantlet; long-term storage; ancymidol

收稿日期: 2010-05-20

基金项目: 国家“948”项目(2005-Q3); 湖北省自然科学基金项目(2009CDB254); 中央高校基本科研业务费专项资金(2009QC019)。

作者简介: 谢婷婷(1982-), 女, 讲师, 博士, 主要从事马铃薯遗传育种研究。

* 通信作者: 柳俊, 教授, 主要从事马铃薯生物技术研究, E-mail: liujun@mail.hzau.edu.cn。

水平及关于其提高马铃薯产量内在的原因, 有待进一步研究。

马铃薯淀粉是重要的工业生产原料, 所以块茎中淀粉含量的高低是马铃薯品质的重要指标之一。食用马铃薯有益于健康与维生素的作用是分不开的。特别是维生素 C 可防止坏血病, 刺激造血功能。可见, 块茎中维生素 C 含量的高低是食用马铃薯品质好坏的一个重要影响因子^[2]。马铃薯块茎还原糖含量的高低受许多因素的影响, 如品种、气候条件和成熟度等都会不同程度地影响还原糖含量。如果还原糖含量太高, 在加工炸薯条、薯

片时, 还原糖在高油温下与 α -氨基酸产生 Maillard 反应, 容易使产品色泽变黑, 味变苦^[3]。但本研究表明滴灌处理对块茎的淀粉、维生素 C 及还原糖含量均没有显著影响。

[参 考 文 献]

- [1] 张春娟. 植物生长物质对马铃薯生长发育及产量品质的影响[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2009.
- [2] 程天庆. 马铃薯栽培技术[M]. 2 版. 北京: 金盾出版社, 1996: 3-5.
- [3] 张凤军, 张永成, 田丰. 不同生态环境下马铃薯还原糖含量分析[J]. 中国马铃薯, 2007, 21(1): 15-18.

试管苗保存是马铃薯种质资源保存的常规方法^[1]。然而,在一般组织培养条件下,试管苗需要每月继代1次,即便采用提高蔗糖浓度的方法减缓试管苗生长,也至少需要2~3个月继代1次。资源试管苗的频繁继代不仅消耗大量人力、物力,而且容易造成种质材料的污染和混杂。降低培养温度是延缓试管苗生长最保险的途径之一,然而,如果要将试管苗延缓到6个月继代1次,必须使培养温度维持在10℃以下,在大量保存中其耗成本显著增加。在培养基中添加渗透调节物质,如甘露醇或者生长调节物质如矮壮素(CCC)、比久(B₉)、多效唑(PP₃₃₃)等以限制植株生长速率已在许多研究中报道^[2-4],然而研究表明,它们常常造成植株生长异常或者后续恢复培养时生活力下降^[3-4],同时亦存在影响资源遗传安全性的潜在危险。嘧啶醇是近年来报道的一种新型的生长延缓剂,由于它是通过抑制植物赤霉素(GA)合成的中间反应,进而减缓植株的生长^[5-6],因此,其遗传安全性高于其它生长抑制剂。但目前尚没有关于添加嘧啶醇对马铃薯试管苗长期保存的抑制效果及后期恢复培养研究的报道。本试验分析了两种温度条件下,各浓度嘧啶醇对3个基因型试管苗生长的抑制情况,并进一步研究了长期保存于不同浓度嘧啶醇培养基中的试管苗后期恢复生长的存活率,为嘧啶醇在马铃薯种质资源长期保存中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试品种为四倍体栽培品种“鄂马铃薯3号(E3)”、二倍体野生种“*Solanum chacosense*(cha)”和四倍体育种中间系“CE76”3个基因型。

1.2 试验方法

1.2.1 材料的培养与处理设置

以MS基本培养基附加8%的蔗糖和0.7 g·L⁻¹琼脂为基础培养基,试验设置5种Ancymidol浓度处理(0、10、15、20、25 μmol·L⁻¹)和2个培养温度(17℃和20℃),培养基灭菌前pH值调至5.8,每10 mL培养基分装于20 cm × 1.5 cm的玻璃试管中,在压力为1.06 kg·cm⁻²、温度为121℃下灭菌15 min。每管接种1个带腋芽的无菌试管苗节段,接种后各处理分别置于17℃和20℃,光照每

天16 h条件下培养,每个月记录试管苗的株高。每处理8管,3次重复。

1.2.2 试管苗恢复培养

将E3、cha、CE76在不同嘧啶醇浓度(10、15、20、25 μmol·L⁻¹)和不同培养温度(17℃和20℃)条件下培养6、12、18个月后的试管苗分别转接于无任何附加物质的常规MS试管苗繁殖培养基中(4%蔗糖和0.7%琼脂)中。试管苗采用带腋芽切段接种,每管对应一盒,接种后置于温度20℃、光照为每天16 h的培养室中培养,观察生长情况,并于培养25 d后记录各处理试管苗的恢复生长及存活情况。

1.2.3 抑制率和存活率的计算及统计分析

存活率以试管苗数为基础进行计算,以存活试管苗总数占接种试管苗总数百分比表示。

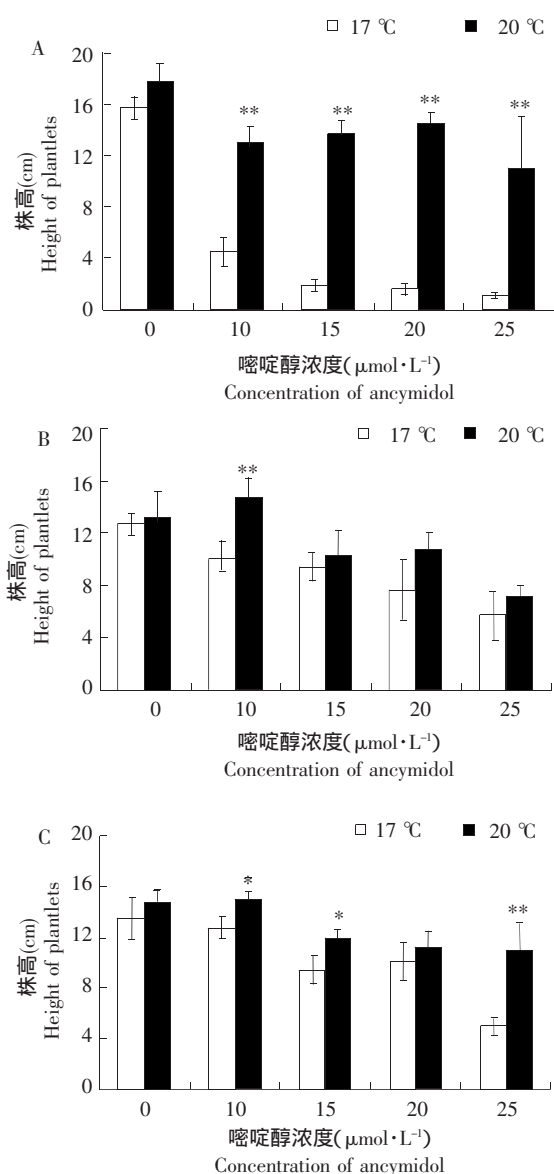
文中数据均采用数据统计软件SPSS进行统计分析。抑制率以株高为基础计算,以不添加嘧啶醇(CK)的株高与添加嘧啶醇的株高之差占CK株高的百分数表示;存活率以长期培养后存活的植株占转苗时的总株数的百分率计算。

2 结果与分析

2.1 嘧啶醇浓度和培养温度对试管苗生长速率的影响

为观察嘧啶醇对试管苗生长速度的影响,试验在3个月和6个月期间对3个基因型在不同浓度嘧啶醇中的株高进行了测定。整体结果显示,在不添加嘧啶醇的处理中,3个基因型在20℃下的试管苗均已基本满管,到6个月,两种温度下的试管苗已全部形成多个分支,并卷曲生长在试管中,已无法测定株高。而在添加嘧啶醇的处理中,培养3个月几乎没有腋芽伸长,因此,3个月时嘧啶醇的处理没有能测定株高。培养6个月后,测定不同嘧啶醇处理株高显示,除了E3在10 μmol·L⁻¹ 20℃下的株高比相同温度下3个月的对照略高外,其余所有处理与相同温度下3个月的对照相比,其株高均比对照低,尤以17℃培养条件下表现更为明显(图1)。

不同嘧啶醇浓度比较显示,试管苗株高有随嘧啶醇浓度的升高而下降的趋势,但不同基因型间具有一定差异。3个基因型中*S. chacosense*受嘧啶醇浓度的影响最大,与对照相比,10 μmol·L⁻¹的嘧



注: 图中对照(添加 0 μmol·L⁻¹ 嘧啶醇)的试管苗高度为 3 个月时的测定结果; 其它处理为 6 个月的测定结果。A、B、C 依次为 *S. chacosense*(cha)、E3 和 CE76。* 表示 20℃ 与 17℃ 保存条件下植株高度之间存在显著差异($P < 0.05$), ** 表示 20℃ 与 17℃ 保存条件下植株高度之间存在极显著差异($P < 0.01$)。bar 显示标准误。

Note: The microplant height is tested after 6 months of growth except for CK (0 μmol·L⁻¹ AM), which was tested after 3 months of growth. A, B and C represent *S. chacosense* (cha), E3 and CE76, respectively. * indicates the significant difference ($P < 0.05$) between 20°C and 17°C; ** indicates the highly significant difference ($P < 0.01$) between 20°C and 17°C. Bar showed the standard error.

图 1 不同浓度嘧啶醇在两种温度条件下对 3 个基因型马铃薯试管苗生长高度的影响

Figure 1 Effect of different levels of AM concentration in 20°C and 17°C on microplant height of three potato genotypes

啶醇即可极显著地降低试管苗的株高($P < 0.01$, 图 1 A)。而嘧啶醇对 E3 和 CE76 的效应相对较小, 在添加 10 μmol·L⁻¹ 嘧啶醇时, 其株高与对照没有显著差异(图 1 B, C)。需要较高浓度的嘧啶醇(≥ 15 μmol·L⁻¹)才能显著降低试管苗的株高。从图 1 还可以看出, 培养温度对试管苗的生长速率影响明显, 且嘧啶醇与温度存在显著的互作效应(表 1)。在相同嘧啶醇浓度处理的不同温度间相比, 除 E3 的部分处理外, *S. chacosense* 和 CE76 的各个嘧啶醇处理(CE76 除 20 μmol·L⁻¹)和 E3 的 10 μmol·L⁻¹ 处理其试管苗在相同嘧啶醇浓度的两个温度间的株高差异均达到显著或者极显著水平(图 1), 但在添加嘧啶醇的对照中, 培养 3 个月后两个温度间的株高没有显著差异。进一步分析可以看出, 温度对不同基因型的生长影响存在差异, *S. chacosense* 的试管苗生长对温度较为敏感, 20℃ 下培养时试管苗株高均极显著高于 17℃ 下培养的试管苗($P < 0.01$, 图 1 A)。与 *S. chacosense* 相比, CE 76 则对温度的敏感性较弱, 但在添加 10、15、25 μmol·L⁻¹ 嘧啶醇的处理中, 两种温度培养条件下的试管苗株高差异仍然达到显著水平($P < 0.05$, 图 1 C)。相对于上述两个基因型, E3 试管苗对温度几乎不敏感, 除添加 10 μmol·L⁻¹ 嘧啶醇保存的试管苗外, 其余各处理的试管苗株高在两种温度培养条件下, 均没有显著性差异(图 1 B)。

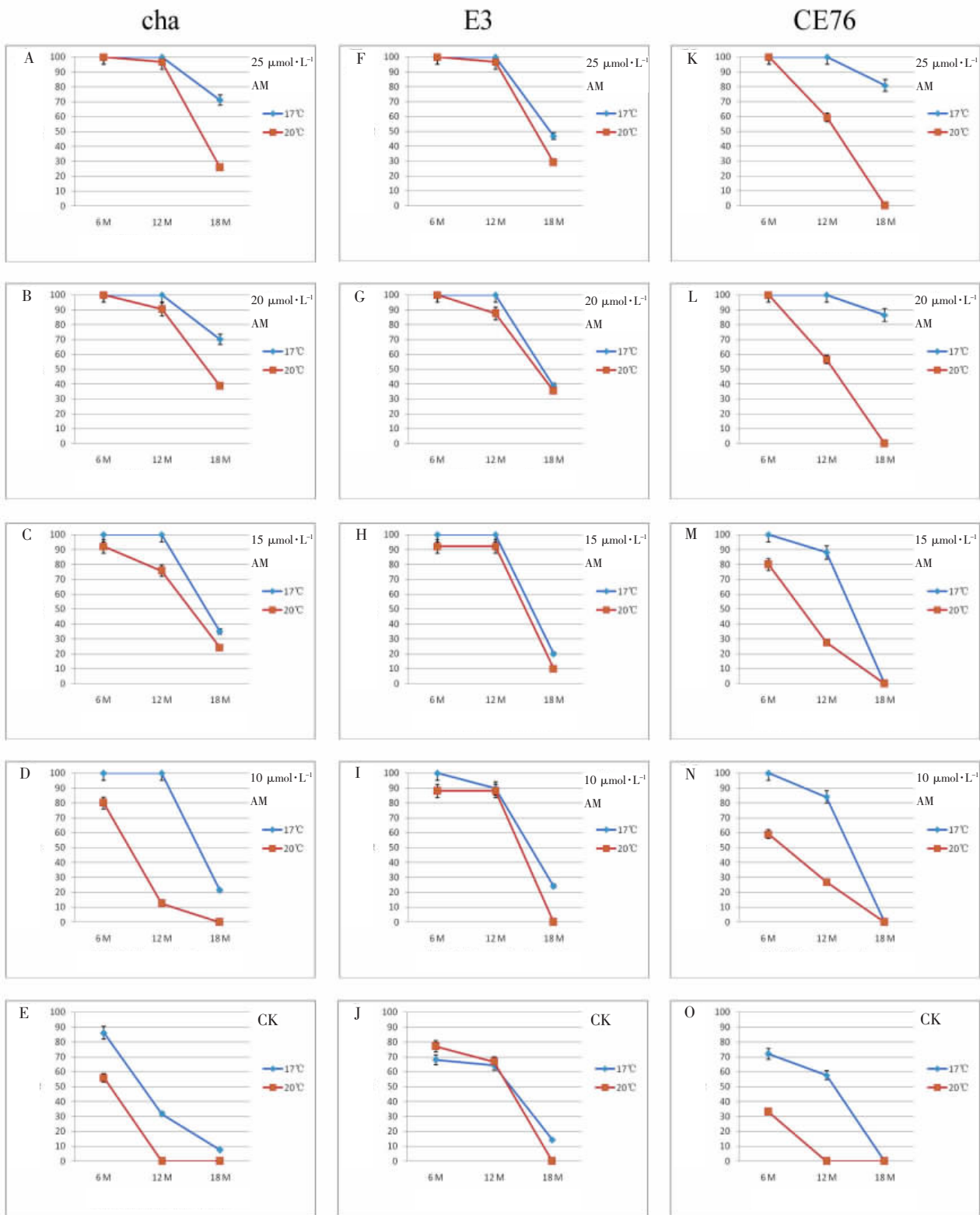
表 1 不同 AM 浓度与同温度培养基中培养 6 个月的试管苗株高方差分析

Table 1 ANOVA of microplant height cultured in different levels of Ancymidol concentration and temperature after 6 months

变异来源	平方和	自由度	均方值	F 值	F _{0.05}	F _{0.01}
Source	SS	DF	MS	F value		
温度 Temperature	630.2	1	630.2	75.0**	3.92	6.85
嘧啶醇 Ancymidol	816.3	4	204.1	24.3**	2.45	3.49
温度 × 嘧啶醇 Temperature × Ancymidol	85.7	4	21.4	2.9*	2.45	21.2
误差 Standard error	924.9	110	8.4			0

注: ** 表示在 $F > 0.01$ 的水平上差异显著; * 表示在 $F > 0.05$ 的水平上差异显著。

Note: ** refers to significance at 0.01 level of probability; * refers to significance at 0.05 level of probability.



注：图中横坐标均表示培养时间(月)，纵坐标表示存活率(%)。

Note: Abscissa means the time of culture (month), ordinate means the percentage of survival (%).

图2 马铃薯试管苗在不同啉啉醇浓度和温度下培养期间的存活率(bar 为标准误)

Figure 2 The survival rate of microplant cultured in different levels of AM concentration and temperature (bar represents standard error)

2.2 嘧啶醇对长期保存试管苗存活率的影响

从培养第6个月起, 对各处理试管苗进行恢复培养, 进而详细统计试管苗的存活率。结果显示, 长期保存的试管苗存活率, 同时受培养温度和添加的嘧啶醇浓度的影响, 且不同基因型具有一定差异。

S. chacosense 试管苗添加嘧啶醇的处理6个月和12个月后, 其存活率与培养温度有较大关系。17℃条件下, *S. chacosense* 保存试管苗除对照(不添加嘧啶醇, 图2 E)外, 其存活率均在100%(图2 A~D)。但20℃条件下, 试管苗存活率相比17℃则有一定下降, 特别是当嘧啶醇浓度低于15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 试管苗存活率均显著下降($p < 0.05$)。

E3 试管苗在培养6个月和12个月后, 其存活率受培养温度的影响相对较小, 除对照(图2 J)外, 两种温度培养条件下各嘧啶醇处理试管苗的存活率均在80%以上(图2 F~I)。

培养6个月和12个月后, CE76品系的试管苗存活率受培养温度和嘧啶醇浓度的影响均较大。17℃条件下培养6个月和12个月后, 除对照(图2 O)外, 试管苗的存活率可分别达到95%和80%以上(图2 K~N)。20℃条件下培养6个月和12个月后, 试管苗的存活率受嘧啶醇浓度影响而不同, 当嘧啶醇浓度 $\geq 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 试管苗存活率分别为95%和50%以上, 而当嘧啶醇浓度 $\leq 15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 试管苗存活率分别迅速下降至60%和30%以下(图2 K~N)。各品系试管苗保存18个月后, 其存活率相比保存12个月的试管苗存活率都有极显著下降($P < 0.01$, 图2)。

S. chacosense 和 CE76 只有在17℃条件下添加 $\geq 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的嘧啶醇才能够将保存18个月的试管苗存活率提高到70%以上(图2 A, B, K, L), E3 品系在17℃条件下添加25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的嘧啶醇也仅能将保存18个月的试管苗存活率维持在46.7%(图2 F)。20℃条件下保存18个月的试管苗存活率均低于40%(图2), 许多试管苗甚至全部死亡(图2 D, E, 图 I~O)。

3 讨 论

种质资源是进行育种和遗传研究的基础材料, 由于马铃薯的无性繁殖特性, 其资源的自然种植保

存和块茎长期贮藏都几乎不可能, 自上个世纪70年代以后, 试管苗保存已成为马铃薯资源保存的常规技术。为了降低保存成本、提高保存质量, 延缓试管苗生长速率一直是资源保存所追求的目标。本研究结果表明, 嘧啶醇对试管苗的生长速率具有较显著的抑制作用, 可能成为具有潜在利用价值的生长延缓剂。从本研究3个基因型在两种温度下的不同嘧啶醇浓度试验结果看, 培养12个月以后, 嘧啶醇浓度在20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下的处理间具有明显差异, 而20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 间差异不显著, 因此, 嘧啶醇的使用浓度以20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为宜。结果还显示, 嘧啶醇浓度与培养温度间存在明显的互作效应, 尽管品种间对温度的敏感程度不一致, 但在添加嘧啶醇的处理中, 17℃下培养的处理比20℃下培养仍然具有生长延缓程度大、后期成活率高的趋势。

本研究只用了3个基因型, 但仍然可以明显看出, 在对温度和嘧啶醇浓度的反应中, 基因型之间存在很大差异, 这一现象与采用35个基因型的试验中反应更为明显^[6], 因此, 在大量保存资源的情况下, 应该对资源进行分类, 根据不同类型的资源设置合适的保存条件, 以利于节约保存成本。如在本研究中, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 嘧啶醇17℃条件下培养, *S. chacosense* 和 CE76 在保存培养18个月后仍然有很高的存活率, 证明其继代时间还可以延长, 而 E3 在相同条件下, 存活率只有40%, 这类基因型应在18个月之前进行继代。

[参 考 文 献]

- [1] Dodds J H, Huaman Z, Lizarraga R. Potato germplasm conservation [M]//Dodds J H. In vitro methods for conservation of plant genetic resources. London: Chapman and Hall, 1991: 93-109.
- [2] Westcott R J. Tissue culture storage of potato germplasm. I. Minimal growth storage[J]. Potato Res, 1981, 24: 331-342.
- [3] Sarkar D, Naik P S. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants in vitro[J]. Euphytica, 1998, 102: 275-280.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 徐君, 杨文杰, 蔡兴奎, 等. 嘧啶醇对马铃薯试管苗生长的影响[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(1): 28-31.