

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2008)03-0158-03

马铃薯品种 Favorita 试管苗培养基的优化筛选

郝文胜¹, 田文锋², 张富荣³, 杨海鹰¹

(1. 内蒙古马铃薯脱毒种薯繁育中心, 内蒙古 呼和浩特 010031; 2. 武川县马铃薯种薯繁育中心, 内蒙古 武川 011700;

3. 内蒙古农业大学职业技术学院, 内蒙古 包头 014100)

摘 要: 为筛选质优、价廉之固化剂以降低马铃薯试管苗生产成本, 在培养基中加入适宜浓度 B_9 以培养健壮试管苗。本文以琼脂为对照对加入卡拉胶适宜尝试和加入 B_9 的适宜尝试进行了研究。结果表明: 以 MS 无机成分+ V_B $10.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +3%食用白糖为基本培养基, 加入 $3.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡拉胶的固体培养基适用于 Favorita 试管苗出苗前的壮苗培养, 加入 $3.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡拉胶的固体培养基适用于 Favorita 试管苗离体快繁; MS 无机成分+ V_B $10.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +3%食用白糖+ $4.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂加入 $5.0\sim 8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} B_9$ 显著抑制根的伸长, 但不影响根的发生, 同时能使试管苗地上部健壮生长尤其是能显著或极显著增加见展叶片数。

关键词: 马铃薯; 离体培养; 培养基; 固化剂; B_9

内蒙古是我国主要的马铃薯生产省区之一, 马铃薯已成为内蒙古仅次于玉米、大豆的主要农作物。而从马铃薯脱毒种薯在内蒙古的推广情况来看, “九五”期间普及率仅为15%; 到目前仍仅为35%^[1]。要想推动内蒙古地区马铃薯种薯脱毒化进程, 提高试管苗生产效率是马铃薯脱毒种薯生产的基础。马铃薯试管苗组培快繁试剂用量很大, 成本相对比较高, 如何降低马铃薯试管苗的生产成本需从以下几方面考虑: (1) 培养基的简化; (2) 选价格低廉又能保证试管苗正常生长的固化剂; (3) 降低化学试剂级别。

另外, 在试管苗快繁过程中, 对加入比久(B_9 , 二甲胺琥珀酰胺酸, 一种植物生长延缓剂) 是否会抑制生根以及在培养基中的加入量在学术界说法不一, 如李明福等^[2]用 MS+ B_9 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养试管苗; 连勇^[3]认为, B_9 $5\sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对试管苗壮苗最有利; 陈芝兰等^[4]和赵克蓉^[5]分别在培养基中加入 B_9 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 来控制试管苗徒长。本试验进行以前, 内蒙古正丰马铃薯种业股份有限公司生物技术部组培室(简称“正丰公司组培室”) 通过试验对文献报道的几种简化培养基进行筛选后认为^[6], S

Kwintkowski 等提出的 MS 无机成分+ V_B $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +3%食用白糖+琼脂 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为适于马铃薯品种 Favorita 试管苗快繁的最优简化培养基。另外, 我室在生产中使用过 MS+ B_9 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养壮苗和 MS+ B_9 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 延缓试管苗生长, 本试验是以此为基础, 对固化剂的种类、用量和 B_9 的加入量进行筛选。

1 材料与方法

1.1 试验材料

Favorita 试管苗, DAS-ELISA 检测 PVX、PVY、PLRV 和 PVS 均为阴性。

1.2 试验方法

试验进行前一直以试管苗单节切段在 MS 全量(固) 上连续继代 $20 \sim 2000 \text{ lx} \cdot 13 \text{ hr} \cdot \text{d}^{-1}$, 试验进行前最后一次是在该条件下培养了 47 d。以此试管苗之单节切段为外植体接种在按表 1 设计的培养基上的 MS 无机成分+ V_B $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +3%食用白糖为基本培养基, 每种培养基接种 10 瓶(以 100 mL 三角瓶为培养容器, 每瓶分装 25 mL 培养基, 经常规高压湿热灭菌), 每瓶接种 15 个单节茎段, 在 $25 \sim 2000 \text{ lx} \cdot 13 \text{ hr} \cdot \text{d}^{-1}$ 条件下培养 5 d 后将温度降低至 $20 \sim 2000 \text{ lx} \cdot 13 \text{ hr} \cdot \text{d}^{-1}$ 条件下培养 14 d, 每种培养基随机取 5 瓶、每瓶随机取 5 株调查。

收稿日期: 2007-06-27

作者简介: 郝文胜(1971-), 男, 硕士, 副研究员, 主要从事马铃薯组织培养及基因工程研究。

表 1 培养基代号及成分

培养基代号	成 分
CK	基本培养基+琼脂 4.6%
	基本培养基+卡拉胶 3.3%
	基本培养基+卡拉胶 3.5%
	基本培养基+卡拉胶 3.7%
	基本培养基+B ₉ 5.0 mg·L ⁻¹
	基本培养基+B ₉ 6.5 mg·L ⁻¹
	基本培养基+B ₉ 8.0 mg·L ⁻¹

植株生长指标分别为目测健壮度(叶片大小、叶色深浅、茎色、茎粗)、见展叶片数(叶发育至达到其下一节位完全展开叶的 1/2 即计作见展叶)、有效茎节数(除试管苗头部为三叶一心计作一节外,至少带有一个叶片、长 0.8 cm 以上、方便操作可以作为切段接种的计为一节)、植株高度、植株地上部重、根数、根长。

试验数据采用 DPS 数据处理系统进行方差分析。

3 结果与分析

3.1 不同固化剂及用量对试管苗生长的影响

由表 2 可见,在培养基 和 上培养的试管苗与 CK 相比,叶片更大、茎更粗、茎色更深, 上的试管苗叶色比 CK 深,而 上的与 CK 一致;结

合表 3 的指标看, 和 上的试管苗的多数生长指标与 CK 无显著差异, 上的试管苗仅根长显著长于 CK, 上的试管苗仅地上部重显著高于 CK。 上的试管苗的叶片大小及茎色与 CK 一致,而叶色和茎粗均次于 CK;从表 3 的生长指标看, 上试管苗的根长显著长于 CK,其他生长指标与 CK 相比差异不显著。 、 、 之间各项生长指标差异不显著。

总的来看,培养基 上的试管苗由于目测健壮度各指标优于 CK 且根长显著长于 CK,故适于出苗前的壮苗培养。而 上的试管苗目测健壮度各指标与 CK 一致或优于 CK,而地上部重高于 CK,是试管苗快繁过程中的较优的培养基。

表 2 7 种培养基上试管苗目测健壮度

培养基代号	叶片大小	叶色	茎粗	茎色
CK	较大	绿色略偏淡绿	中等偏较粗	淡绿略带淡紫
	大	绿色偏浓绿	较粗	淡紫
	大	绿色略偏淡绿	较粗	淡紫
	较大	淡绿	中等	淡绿略带淡紫
	大	浓绿偏绿色	较粗	淡紫
	大	介于浓绿和绿色之间	粗壮	绿色略带淡紫
	大	绿色偏浓绿	较粗偏粗壮	淡紫

表 3 Favorita 试管苗在不同种类和用量的固化剂培养基上生长状况的 Duncan's 新复极差测验结果

培养基代号	根 部		地上部			
	根数	根长 (cm)	地上部重 (g)	株高 (cm)	见展叶片数	有效茎节数
CK	5.7 ^{Aa}	4.2 ^{Ab}	0.0443 ^{Ab}	7.0 ^{Aa}	6.0 ^{Aa}	4.1 ^{Aa}
	6.6 ^{Aa}	6.6 ^{Aa}	0.0466 ^{Aab}	7.5 ^{Aa}	6.6 ^{Aa}	4.0 ^{Aa}
	7.3 ^{Aa}	5.3 ^{Ab}	0.0652 ^{Aa}	7.5 ^{Aa}	7.1 ^{Aa}	4.9 ^{Aa}
	6.5 ^{Aa}	6.3 ^{Aa}	0.0518 ^{Aab}	7.4 ^{Aa}	6.6 ^{Aa}	4.9 ^{Aa}

注:大写字母表示 1%显著水平,小写字母代表5%显著水平。下同。

3.2 B₉ 浓度对试管苗生长的影响

由表 2 可见, 、 、 上培养的试管苗目测健壮度各指标均优于 CK。

而从表 4 看,生长于 、 、 上的试管苗,其根数、地上部重、株高、见展叶片数和有效茎节数与生长于 CK 上的试管苗相比均差异不显著; 和

上的试管苗的根长显著短于 CK,见展叶片数极显著多于 CK, 上生长的试管苗的根长则极显著短于

CK;见展叶片数显著多于 CK。 、 、 间各项生长状况指标差异不显著。

总体来看,加入 B₉ 后,试管苗地上部生长趋于健壮,见展叶片数显著或极显著地增多有利于试管苗移栽到温室后由异养向自养过度,地下部根的发生未受抑制,但根的伸长明显被抑制,因而加入 5.0~8.0 mg·L⁻¹B₉ 的培养基仅在以剪掉根的试管苗移栽到温网室的情况下适用。

表 4 Favorita 试管苗在不同 B₉ 用量的培养基上生长状况的 Duncan's 新复极差测验结果

培养基 代号	根 部		地上部			
	根数	根长 (cm)	地上部重 (g)	株高 (cm)	见展叶片数	有效茎节数
CK	5.7 ^{Aa}	4.2 ^{Aa}	0.0457 ^{Aa}	7.0 ^{Aa}	5.8 ^{Bb}	4.1 ^{Aa}
	6.4 ^{Aa}	3.1 ^{ABb}	0.0587 ^{Aa}	6.3 ^{Aa}	7.6 ^{Aa}	4.7 ^{Aa}
	5.7 ^{Aa}	2.7 ^{Bb}	0.0490 ^{Aa}	6.4 ^{Aa}	7.1 ^{ABa}	4.1 ^{Aa}
	7.0 ^{Aa}	3.1 ^{ABb}	0.0514 ^{Aa}	6.4 ^{Aa}	7.7 ^{Aa}	4.6 ^{Aa}

4 讨 论

曾有学者提出以液体培养方式代替固体培养, 但生产中发现液体培养的试管苗与固体培养相比较虽然繁殖周期短、试管苗也较健壮, 但具有繁殖系数低, 污染相对较重, 试管苗易因沉入培养液中窒息而死等缺点, 不利于大规模工厂化快繁, 因此目前仍从降低固化剂成本入手研究。

常规固体培养基是以琼脂为固化剂, 琼脂价格较高(120 元·kg⁻¹), 一般报道单位培养基中加入量为 4.6~7.0 g·L⁻¹。而食品工业上常用的卡拉胶的透明度、凝胶热可逆性及抗酸性方面都优于琼脂, 其市场价格为 90~95 元·kg⁻¹, 厂家推荐单位体积培养基用量为 3.7~4.0 g·L⁻¹, 如果能用卡拉胶代替琼脂, 必然使生产成本降低许多。罗智敏等^[7]曾以琼脂为对照, 对卡拉胶应用于马铃薯试管苗生产做了研究, 但其所报道数据只是平均数, 未做方差分析, 且在其报道中在卡拉胶的用量为 5 g·L⁻¹的前提下, 固体培养基具有很强的弹性, 接种时单节茎段不能象在琼脂培养基中那样插入到培养基中, 由此会影响接种后 12 d 内试管苗根系的发育。正丰公司组培室在收到厂家(山东)的样品后按 3.7 g·L⁻¹的用量进行了小规模试用, 发现: (1) 在 3.7 g·L⁻¹的用量下, 单节茎段能很容易地插入培养基。(2) 在培养 20 d 后二者培养的试管苗没有差异(当时未调查数据, 仅为目测)。(3) 用卡拉胶做固化剂配置的培养基的透明度方面确有优势, 即卡拉胶培养基是全透明的, 而琼脂培养基为半透明, 这对于及时剔除试管苗培养过程中污染瓶非常重要。(4) 国内其他学者报道过, 在试用中也发现用卡拉胶配制培养基比之于琼脂做固化剂省去了熬煮固化剂这一过程, 既节省了用于熬煮的能源, 降低了这一环节的生产成本, 又能加快节奏, 满足工厂化生产的需要。

鉴于培养基中固化剂的加入量是以“能够凝固

但又能保证培养基在培养瓶内不滑动为宜”为原则, 而一般随固化剂加入量的减少其硬度降低, 而硬度越小的固体培养基越有利于试管苗生根, 同时固化剂用量越小生产成本可进一步降低, 而在卡拉胶用量为 3.7 g·L⁻¹时培养基凝固的很好, 藉此, 我们以 3.7 g·L⁻¹为基础设置了第一部分试验。发现将卡拉胶的使用量由 3.7 g·L⁻¹渐次减至 3.3 g·L⁻¹, 培养基逐渐变软, 而加入卡拉胶 3.3 mg·L⁻¹和加入 3.5 mg·L⁻¹与以琼脂为固化剂相比还具有细微的差别。

在出苗前壮苗培养(最后一次室内培养)时, 是否会由于 B₉ 的加入而影响试管苗移栽后的生根这一问题, 在试管苗生产者和以试管苗为基础在温网室生产原原种的人员之间诸多争论, 但国内对此还为未见详尽的报道, 我们的试验结果表明: B₉ 的加入只影响试管苗根的伸长而不影响根的发生, 但却显著促进了试管苗地上部的生长。

[参 考 文 献]

- [1] 杨海鹰, 云庭, 杨慧民. 内蒙古马铃薯产业发展现状、趋势及对策研究 [M]// 陈伊里, 屈冬玉. 马铃薯产业与现代农业. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2007.
- [2] 李明福, 李宪章, 宋燕茹. 用作遗传种质和马铃薯健康检验及其无毒苗的再生[J]. 植物检疫, 1997(1): 6.
- [3] 连勇. 生长调节剂对试管苗生长有何影响[EB/OL]. <http://www.lingjian.com.cn/wxs/sztjj.htm>, 2002-02-22.
- [4] 陈芝兰, 栾运芳, 次柏, 等. 西藏地质马铃薯茎尖脱毒快繁及试管薯生产技术 [J]. 马铃薯杂志, 1999, 13(1): 34-38.
- [5] 赵克蓉. 植物生长调节剂控制马铃薯试管苗徒长的作用 [J]. 中国马铃薯, 2000, 14(3): 150-152.
- [6] 赵永秀, 郝文胜, 李蒙平. 几种基本培养基对 Favorita 试管苗生长影响初报 [J]. 内蒙古农业科技, 2005, (S1): 46-47, 51.
- [7] 罗智敏, 王炳君, 李成彤, 等. 卡拉胶和琼脂为固定物对马铃薯脱毒组培苗生长的影响 [J]. 铃薯杂志, 1997, 11(2): 73-74.