

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2008)02-0091-03

研究简报

马铃薯茎尖试管苗及微型试管薯繁育的影响因子研究

丁运华, 李桥文, 陈兆贵

(惠州学院生命科学系, 广东 惠州 516007)

摘要: 以广东省引种的荷兰马铃薯费乌瑞它 (Favorita) 品种为材料, 研究了从茎尖脱毒分化到试管微型薯诱导过程中的一些影响因素。结果表明: $MS+NAA0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+6\text{-BA } 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为诱导愈伤组织的合适培养基; 愈伤组织分化培养时, GA_3 的最适浓度为 $0.1\text{--}0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 壮苗阶段, 液体基本培养基 MS 加矮壮素 CCC $1.0\text{--}1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的效果较好; 弱光照比连续强光照更有利于结薯, 弱光处理 40 d 后黑暗处理一周, 结薯诱导培养的时间为 50 d 左右, 0.1% 的活性炭对诱导结薯有重要的促进作用。

关键词: 马铃薯; 茎尖; 愈伤组织; 试管薯

目前, 国内外马铃薯的栽培面积发展极为迅速。我国马铃薯资源主要分布在东北、华北、西南地区^[1]。然而马铃薯的主要市场却在广东。广东省毗邻东南亚国家和港澳地区, 交通便利, 是我国马铃薯出口的重要口岸。广东马铃薯生产中存在一些急需解决的问题: 一是广东冬种马铃薯种薯都靠北方调种, 北方种薯一般在 9 月份收获, 而广东播种在 9~11 月份, 相隔时间较短, 往往由于种薯休眠期不足, 造成发芽慢、出苗迟, 甚至缺株和断垄, 影响产量; 二是广东马铃薯后期生长处于梅雨季节, 温度高、湿度大, 青枯病、晚疫病发生严重; 三是以引进薯种生产的继代薯种种性易退化, 品质变劣; 加之种薯调运成本高, 很难满足大量用种的需要。因此建立一套适合广东地区的马铃薯无毒苗及脱毒微型薯的生产体系, 具有重要的经济效益和社会效益。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本试验选取的品种为广东省引进种植的品种费乌瑞它。一是选取较小块已萌芽的种薯种植于砂壤

土中, 长成植株后选取健壮的芽切下; 二是直接从惠东县马铃薯种植基地选取健壮植株的芽切下。

1.2 试验方法

1.2.1 茎尖培养

在超净工作台上, 用镊子把已常规消毒的外植体置于解剖镜下, 仔细剥离, 直到显现出圆滑生长点时, 用灭过菌的解剖针切取 $0.1\text{--}0.5\text{ mm}$ 带 1~2 个叶原基的茎尖, 随即接种于培养基上。茎尖培养基配方见表 1。每瓶 2 个, 剥离所得茎尖共 178 个。

表 1 茎尖培养基

编号	培养基配方 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
L-1	MS+6-BA0.5
L-2	MS+6-BA0.5+NAA0.1
L-3	MS+6-BA1.0+NAA0.1
L-4	MS+6-BA1.5+NAA0.1
L-5	MS+6-BA2.0+NAA0.1
L-6	MS+6-BA2.5+NAA0.1
L-7	MS+6-BA0.5+IAA0.1

注: 均为固体培养基, 加蔗糖 3%, 加 0.7%~0.8% 琼脂。

将茎尖培养基置于 25°C , 光照强度 $1000\text{--}3000\text{ lx}$ 、光照时间 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 的条件下培养。

当愈伤组织长至黄豆粒大小时, 挑取状态相近的愈伤组织, 接种于分化培养基上, 见表 2。

1.2.2 茎尖试管苗壮苗

茎尖分化成苗后, 把获得的小苗切成段, 每段

收稿日期: 2007-11-10

基金项目: 广东省科技计划项目 (2006B20301003), 惠州市科技计划项目 (2005P47)。

作者简介: 丁运华 (1966-), 女, 副教授, 从事组织培养和生物化学的教学和研究。

表 2 分化培养

编号	培养基配方 (mg·L ⁻¹)
A-1	MS+6-BA0.05+NAA0.1+GA ₃ 0.1
A-2	MS+6-BA0.05+NAA0.1+GA ₃ 0.2
A-3	MS+6-BA0.05+NAA0.1+GA ₃ 0.3
A-4	MS+6-BA0.05+NAA0.1+GA ₃ 0.4
A-5	MS+NAA0.1+GA ₃ 0.1
A-6	MS+NAA0.1+GA ₃ 0.2

注：每种固体培养基均加蔗糖 3%，加琼脂 0.7%~0.8%。

带一个叶片（即一个腋芽），接种于快繁培养基上，见表 3。基本培养基为 MS，加不同浓度的矮壮素。液体培养基用棉花作支持体，固体培养基用琼脂。

表 3 快繁培养基

培养基代号	培养基配方 (mg·L ⁻¹)
Q-1	MS+矮壮素 0.1
Q-2	MS+矮壮素 0.5
Q-3	MS+矮壮素 0.8
Q-4	MS+矮壮素 1.0
Q-5	MS+矮壮素 1.2
Q-6	MS+矮壮素 1.5

注：每种培养基均加蔗糖 3%，固体培养基加琼脂 0.7%~0.8%。

1.2.3 试管微型薯的诱导

选择叶绿健壮的试管苗进行切段培养诱导。采用强光照培养 25，1 000~3 000 lx，连续全光照），弱光培养 22，1 000 lx 以下，14h·d⁻¹）和弱光培养 40 d 后黑暗培养三种处理。培养基见表 4。

表 4 结薯培养基

编号	培养基配方 (mg·L ⁻¹)
S-1	MS+NAA1mg·L ⁻¹ +0.1%活性炭+8%糖
S-2	MS+6-BA3mg·L ⁻¹ +0.1%活性炭+8%糖
S-3	MS+6-BA3mg·L ⁻¹ +8%糖
S-4	MS+NAA0.5mg·L ⁻¹ +8%糖

注：均为液体培养基。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对茎尖愈伤组织形成的影响

培养 40 d 后茎尖愈伤组织生长情况如表 5 所示。

由表 5 可见，愈伤组织的颜色有棕黄色、淡黄色、绿色或淡绿色。L-3 和 L-7 培养基上的出愈率较高。用 IAA 代替 NAA 的 L-7 的培养基上的愈伤组织可直接分化成苗。部分未出苗的愈伤组织底部出现大量白色的不定根。这可能是由于 NAA 的浓度偏高促使生根。

表 5 不同培养基上愈伤组织产生的情况

编号	接种茎尖数 (个)	出愈数 (个)	出愈率 (%)	愈伤组织生长情况		
				颜色	出愈速度	状态
L-1	26	9	34.6	绿色	++	致密
L-2	28	9	32.1	绿色	+++	致密,有绿色突起
L-3	22	13	59.1	淡绿色	+++	疏松,有绿色突起
L-4	24	9	37.5	淡黄色	++	疏松
L-5	24	6	25.0	绿色	+	致密
L-6	24	7	29.1	绿色	+	致密
L-7	16	10	62.5	绿色	++	致密,部分直接成苗

注：+ 很慢；++ 较慢；+++ 较快；++++ 快。

2.2 愈伤组织分化成苗

由表 6 可见，A-1 的分化率最高为 44.4%，出苗速度较快，每个愈伤组织的出苗数也最多；A-4 则无论在分化率还是在出苗速度上都表现最差。由此可知，在 6-BA 为 0.05 mg·L⁻¹、NAA 为 0.1 mg·L⁻¹、GA₃ 为 0.1 mg·L⁻¹ 时愈伤组织分化情况较好。而在没有加 6-BA 时，比较 A-5 和 A-6，发现 GA₃ 为 0.2 mg·L⁻¹ 时 A-6 分化率最高，达 50%。6-BA 并不是诱导愈伤组织分化成苗所必不可少的激素，诱导分化时可不加入 6-BA 或只加少量；当 GA₃ 的浓度为 0.4 mg·L⁻¹ 时，成苗率极低，且分化出苗的速度慢。

表 6 不同培养基愈伤组织分化出苗的情况

编号	愈伤组织接种数(块)	出现分化的愈伤组织数(块)	分化率 (%)	每块愈伤组织出苗数 (株)	分化出苗的速度
A-1	9	4	44.4	3~7	+++
A-2	9	3	33.3	2~5	++
A-3	11	3	27.3	1~3	+++
A-4	9	1	11.1	3	+
A-5	10	2	20.0	2~4	++
A-6	10	5	50.0	3~6	++++

注：+ 慢 50 d 后），++ 较慢 40~50 d），+++ 较快 30~40 d），++++ 快 30 d 内）。

2.3 矮壮素及培养基的类型对壮苗的影响

将诱导分化获得的苗切段于液体/固体培养基上培养 25 d 后, 小苗可长到 8~12 cm, 再剪切转瓶进行扩繁, 以后平均每 20 d 转瓶一次。

从 0.1 到 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养基中的矮壮素浓度越高, 试管苗的高度呈递减趋势, 茎粗呈递增趋势, 但叶片数和颜色无显著变化。液体培养基上的植株总体生长情况比固体培养基上好, 主要体现在: 植株较高, 生长速度较快; 节间较短; 叶片数目较多, 多为绿色到深绿色。固体培养基上的植株则茎较粗壮, 但植株生长速度不如液体培养基上的植株快, 且节间较长, 叶片数量较少。从植株在各培养基上的生长情况来看, 以液体培养基加矮壮素 $1.0 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的效果较好。

2.4 光照、6-BA 和活性炭与试管微型薯的形成

从光照的影响来看: 连续弱光培养, S-1 和 S-2 上的试管苗长势良好, 基部膨大呈球状; S-3 和 S-4 的苗长势很弱, 腋芽基本无伸长。连续强光培养, S-1 和 S-2 苗较粗壮, S-1 基部膨大; S-3 和 S-4 苗长势很弱, 不能结薯。弱光培养 40 d, 再全黑暗处理一周, S-1 和 S-2 苗基部形成淡黄色小薯, 呈椭圆形, S-1 的试管薯比 S-2 的大; S-3 和 S-4 长势仍较弱, 不能结薯。本试验表明, 光照强弱对诱导试管苗结薯有明显的影响, 弱光照比连续强光照更有利于试管苗结薯, 黑暗处理能诱导试管苗结薯, 可能是提高结薯速度、结薯率和鲜薯重量的关键。

从培养基配方来看, S-1 培养基只含 NAA) 和 S-2 培养基只含 6-BA) 均能诱导结薯, 两者出薯时间差不多, 但在相同时间内后者所结的薯体积较大。说明 6-BA 并非诱导结薯所必不可少的激素, 但 6-BA 可能促使试管薯增重。S-2 和 S-3 基本成分相同, 其差别只在于 S-3 没有加活性炭, 但是生长情况却有极大不同, S-2 长势良好, 根、茎、叶的情况都比 S-3 好。而 S-3 生长势弱, 腋芽基本无伸长, 不能结薯。可见 0.1% 的活性炭对诱导结薯有重要的促进作用, 其原因可能是活性炭吸附了试管苗因代谢速度快而产生的大量有害代谢物质所致。

在本试验中发现, 含糖 3% 的液体和固体培养基 MS + 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA₃ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (22~25 °C, 1000~3000 lx, 14 h·d⁻¹) 也

能诱导结薯, 小薯为椭圆形, 重量较轻, 绿色或淡绿色, 表面光滑。

3 讨论

马铃薯茎尖培养中, 加入一定量的 GA₃ 能抑制愈伤组织的形成, 有助于更好的生长和分化。然而高浓度的 GA₃ 对茎尖分化的成苗率有抑制效应^[2]。本研究结果发现, GA₃ 的合适浓度与其他生长调节剂有关。

在培养基中加入 PP₃₃₃ 或 B₉ 或矮壮素 CCC 壮苗是通行的做法。笔者发现, 矮壮素的浓度为 $1.0 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 可获得较多的试管苗, 然后有目的地增加矮壮素的用量可控制苗的长势, 减少继代次数, 可获得健壮的试管苗。

光照是诱导试管苗结薯的重要因素。孙慧生等^[3]指出, 黑暗是诱导微型薯和增加结薯数的必要条件。刘梦芸等^[4]研究发现, 长时间的暗处理使块茎形成显著提早, 但结薯数少。鄢铮等^[5]的研究认为, 应该在诱导期间进行阶段性的光处理, 使植株恢复低强度的光合作用。Simmon 等^[6]试验表明, 黑暗虽然能诱导结薯, 但却导致试管苗的黄化, 而不利于提高试管薯的产量。本试验结薯数量比文献资料记载的少, 重量也相对较轻。弱光培养多长时间后进入黑暗培养对结薯最有利, 尚有待于进一步试验研究。

[参 考 文 献]

- [1] 汲河. 我国马铃薯产业化存在的问题及应对政策[J]. 沈阳农业大学学报(社会科学版). 2006, 8(2): 202-204.
- [2] 盖琼辉, 王季春. 马铃薯茎尖分化成苗的培养基优化研究[J]. 西南农业大学学报(自然科学版). 2005, 3: 370-373.
- [3] 孙慧生, 张振洪, 石卓文, 等. 马铃薯试管薯的诱导与利用研究[J]. 山东农业科学, 1993, 2: 10-12.
- [4] 刘梦芸, 蒙美莲, 门福义, 等. 光周期对马铃薯块茎形成的影响及对激素的调节[J]. 马铃薯杂志, 1994, 8(4): 193-197.
- [5] 鄢铮, 郭德章. 马铃薯试管苗组织培养及微型薯诱导技术的研究[J]. 中国马铃薯, 2004, 18(5): 270-271.
- [6] Simmon T V, Sonza M, Coffin R. The effect of light on in vitro microtuberization of potato cultivars[J]. American Potato Journal, 1989, 66: 843-847.