

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2007)04-0200-04

马铃薯茎尖脱毒培养方法优化研究

齐恩芳, 王一航, 张武, 李玉萍

(甘肃省农业科学院马铃薯研究所, 兰州 730070)

摘要: 以甘肃省主栽品种陇薯6号为材料, 研究了茎尖大小及培养基中激素和活性炭对马铃薯茎尖培养成活的影响。结果表明, 叶原基数为2的茎尖脱毒效果最好; MS培养基中加入 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA有助于陇薯6号茎尖分生组织分化; 加入0.05%活性炭, 茎尖成苗时间提前了13 d, 成苗率增加了7.5%。

关键词: 马铃薯; 茎尖培养; 成苗率

马铃薯在种植过程中感染病毒而引起退化, 直接影响了马铃薯的品质及产量, 严重阻碍了马铃薯的生产和利用。应用马铃薯脱毒技术, 是解决马铃薯退化的主要技术措施。自1955年Morel首先用茎尖脱毒方法以马铃薯为材料获得了无病毒植株后, 马铃薯茎尖脱毒技术迅速开展。我国在马铃薯茎尖组织培养方面也取得了研究成果^[1-4], 并在各地建成脱毒种薯繁育体系。马铃薯茎尖组织培养脱毒苗是马铃薯脱毒种薯产业的基础, 优质快速地茎尖培养为以后脱毒苗和脱毒薯的生产赢得了时间和效益。当前脱毒马铃薯茎尖培养效率低, 成苗率和脱毒率达不到预期目的, 因此优化马铃薯茎尖脱毒培养方法非常必要。本文研究了培养基成分和茎尖大小对陇薯6号茎尖培养成活和脱毒效果的影响, 目的在于提高马铃薯茎尖脱毒培养的成功率。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料为甘肃省马铃薯主栽品种陇薯6号, 由甘肃省农业科学院马铃薯研究所提供。

1.2 试验设计

激素对茎尖培养的影响: 以MS+白糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +

卡拉胶 $6.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 为基本培养基, 附加不同种类和不同浓度的激素以研究激素对茎尖分生组织培养的影响, 培养基设计如表1。

活性炭对茎尖培养的影响: 以F培养基为对照, 分别附加0.01%、0.05%、0.1%、0.15%、0.2%的活性炭, 以研究活性炭对茎尖分生组织培养的影响。

茎尖大小对茎尖培养的影响: 取不同大小(不同叶原基数)的茎尖, 用F培养基加以培养, 以研究茎尖大小对茎尖成活的影响。

表1 不同激素处理的茎尖培养基

培养基编号	培养基成分
A	MS+6-BA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +GA ₃ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
B	MS+6-BA $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +GA ₃ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
C	MS+GA ₃ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
D	MS+6-BA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
E	MS+6-BA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +GA ₃ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
F	MS+6-BA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +GA ₃ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

注: 每L培养基附加3%白糖和0.65%卡拉胶。

1.3 茎尖培养方法

马铃薯块茎出芽后, 将芽取下置于烧杯中, 用纱布封口, 在自来水下冲洗2 h, 然后于超净工作台上严格消毒。消毒时先在75%酒精中浸30 s, 再用0.1%升汞浸泡8~10 min, 然后用无菌水冲洗3~4遍后, 接种到快繁培养基上, 待成苗后在40X解剖镜下剥取带两个叶原基的茎尖, 接种在上述不同处理的培养基中, 每瓶接3个茎尖, 每处理

收稿日期: 2007-04-10

基金项目: 国家发改委高技术产业化项目“高淀粉专用马铃薯新品种陇薯6号、陇薯3号产业化示范工程建设”[发改办高技(2005)1899号]

作者简介: 齐恩芳(1974-), 女, 助理研究员, 主要从事马铃薯组织培养、脱毒及遗传育种研究。

10 瓶, 在自然光培养室培养。待单芽分化出两片可见叶、茎明显伸长时, 转入无激素的 MS 培养基上培养, 苗高 4~5 cm 时开始切繁。

1.4 数据统计

接种 75 d 后, 统计茎尖成活率(茎尖分生组织发育为可见的绿点谓之成活)及成苗率(成活茎尖长出带有 2 个以上叶片的小植株谓之成苗), 成活率为成活茎尖个数与接种茎尖个数之比, 成苗率为成苗个数与接种茎尖个数之比

对于茎尖大小处理试验, 待苗分化至高 4~5 cm 时切繁, 并用 DAS-ELISA 方法检测 PVX, PVY、PLRV、PVS 的脱毒率。

2 结果与分析

2.1 激素对提高茎尖脱毒培养效率的影响

该试验以 MS+0.65%卡拉胶+30%白糖为基础培养基, 附加不同浓度和种类配比的 6-BA, NAA, GA₃, 制成 6 种培养基, 观察其生长情况, 结果如表 2 所示。

表 2 不同培养基对茎尖分生组织生长的影响

处理	茎尖成活率 (%)	成苗率 (%)	成苗率 (%)
A	50.0	5.0	部分为淡黄绿色愈伤, 部分茎尖淡绿色
B	76.5	0	形成淡黄绿色愈伤, 无分化
C	40.0	0	茎尖淡黄或白, 无芽形成
D	62.5	35.0	茎尖变绿, 有芽生长
E	77.5	62.5	茎尖绿色, 有芽, 芽生长细弱
F	80.0	70.0	茎尖绿色, 有芽, 芽生长快

在几种培养基中, B 和 C 都没有诱导茎尖分化。A 诱导的茎尖一半死亡, 存活的茎尖部分变绿, 90 d 后有芽形成, 部分形成愈伤, 没有分化成苗。D、E、F 都得到了较高的分化率, 诱导茎尖成苗率最高的是 F, 说明 6-BA、NAA、GA₃ 的合适配比, 能显著提高诱导效果。

2.2 活性炭对茎尖培养效率的影响

为选择在马铃薯茎尖培养中的最佳活性炭浓度, 该试验设计了 5 种浓度以研究活性炭对马铃薯茎尖培养的影响效果, 结果表明(表 3), 活性炭浓度在 0.01%~0.10% 时均可降低株高 2.5 cm 所用时间, 提高成苗率, 以 0.05% 的浓度效果最明显, 其

株高 2.5 cm 时间比对照减少了 13 d, 成苗率增加了 7.5%; 在浓度为 0.15% 和 0.20% 时, 已产生抑制作用, 株高到 2.5 cm 的时间分别比对照增加 8 d 和 7 d, 成苗率减少 20% 和 17.5%; 在浓度为 0.2% 时, 死亡率高达 35%, 已严重阻碍了茎尖的生长发育。

表 3 不同浓度活性炭对茎尖培养的影响

活性炭浓度 (%)	株高到 2.5 cm 的时间(d)	成苗率 (%)	死亡率 (%)	感染率 (%)
0	112	77.5	15.0	7.5
0.01	102	80.0	12.5	7.5
0.05	99	85.0	10.0	5.0
0.10	109	80.0	15.0	5.0
0.15	120	57.5	12.5	5.0
0.20	119	60.0	35.0	7.5

2.3 茎尖大小对茎尖分化与脱毒效果的影响

分别以带有 1, 2, 3 个叶原基的茎尖做比较试验, 其成苗率及 PVX、PVY、PVS、PLRV 病毒的脱毒率见表 4。叶原基数为 0 时, 茎尖难以成活, 叶原基数为 3 时, 成苗率为 90% 以上, 但各病毒脱除率极低。综合各结果, 叶原基数为 1 时, 估算可获得 6.18% 的去毒株, 叶原基数在 2 时, 可获得 11.17% 的去毒株。因此, 取叶原基数为 2 的茎尖脱毒效果为好。

表 4 不同茎尖大小对茎尖培养的影响

叶原基数 (个)	茎尖长度 (mm)	叶原基数 (个)	成苗率 (%)	PVX 去除率 (%)	PVY 去除率 (%)	PVS 去除率 (%)	PLRV 去除率 (%)
0	0.05~0.08	2.5					
1	0.12~0.15	17.5	16.5	100	67.5	92.5	60
2	0.29~0.34	80.0	72.5	80	40.0	87.5	55
3	0.52~0.59	100.0	92.5	0	5	30	0

3 讨论

影响马铃薯茎尖培养产生无病毒植株的因素主要有茎尖大小、培养基、培养条件和病毒种类^[5]。我国学者培养马铃薯主要采用革新培养基和 MS 培养^[6-7]。在利用基本培养基基础上改变培养方法和培养条件, 对茎尖成苗率、茎尖脱毒率、成苗时间

影响很大^[8-9]。因此, 本部分试验采用不同培养基成分、不同茎尖大小、添加活性炭等措施, 改变茎尖培养方法和条件, 据此确定马铃薯茎尖培养优质、高效的方法, 并为马铃薯茎尖分出组织培养提供理论依据。

细胞分裂素、生长素、赤霉素对调节马铃薯茎尖分生组织在培养基中的生长起着重要作用。在研究激素对茎尖培养的影响时采用6种培养基进行培养比较。筛选出了适合陇薯6号茎尖生长的激素配比。其中6-BA对马铃薯茎尖培养成苗率影响较大, 6-BA对植物最明显作用是诱导细胞分裂并调节分化, 单独使用细胞分裂素, 只有芽的分化, 不利于茎的伸长, 在一定浓度范围内单独使用, 只对苗的增高有作用, 不利于芽的分化和增殖; 生长素和细胞分裂素只有适当的浓度配比, 才能使分化和生长达到最佳点。本试验中不含6-BA的培养基不能诱导茎尖分化; $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的6-BA可启动茎尖分化, 与 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃配合处理时分化成苗率较低, 部分只形成愈伤, 与 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA配合处理时, 显著促进了茎尖的分化, 而浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时宜形成愈伤组织。Miller^[10]报道, GA₃能显著增加许多品种的试管苗的株高, 在培养基上生长矮小的试管苗对培养基中GA₃浓度具有明显的数量反应。本研究中GA₃可促进茎尖的生长, 但浓度过高则芽生长过于纤细。以 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃配合使用, 茎尖成苗率较高, 而且芽生长较快。由此说明, 茎尖分生组织诱导既与植物生长调节剂的绝对浓度有关, 又与不同种类植物生长调节剂的配比有关, 应进一步对不同品种的茎尖在不同激素配比培养基中的诱导影响进行研究。

在植物组织培养中, 常在培养基中加入适量活性炭以吸附有害物质, 但过量的活性炭对生长调节物质也有吸附作用而抑制了分生组织的生长和分化。活性炭具有较强的吸附特性, 在植株组织培养中常用来吸附并排除培养过程中的有害物质, 诸如培养物产生的乙烯、酚、醌类物质、碳源在高温灭菌过程分解所产生的5-羟甲糠醛以及琼脂中的杂质等。但是, 它也吸附培养基中的生长调节物质以及Te-EDTA、维生素B₆、烟酸等物质^[11]。为了确定马铃薯茎尖培养中活性炭是否可以加速茎尖分生组织生长分化及活性炭的最适宜浓度, 本试验研究

结果表明, 活性炭在0.01%~0.10%时均可缩短株高到2.5 cm时所用的时间, 以0.05%的浓度效果最为明显, 在浓度为0.2%时影响了茎尖的分化。因此, 活性炭在茎尖培养方法优化中的作用不可忽视, 且使用时一定要注意恰当的浓度。

茎尖的大小影响着茎尖分生组织的成活率, 一般来说茎尖越大越容易成活, 但茎尖太大严重影响脱毒率。因此, 选取合适大小的茎尖对茎尖分生组织培养非常重要。在茎尖培养中, 茎尖越小越难成活, 但脱毒效率较高, 过大的茎尖基本无脱毒效果^[12]。从本试验所获结果看, 以带2片叶原基的茎尖脱毒效果较理想, 表现在有足够的成苗率和脱毒率。为了保证脱毒效果, 对于茎尖较大的品种, 可采用剥离只带一个叶原基的茎尖。

[参 考 文 献]

- [1] 张树丛, 张东霖. 马铃薯退化及解决途径 [J]. 宁夏科技, 1996 (3): 30-33.
- [2] 罗玉, 冉春玲, 张铁, 等. 滇东南农家马铃薯品种脱毒植株的获得 [J]. 中国马铃薯, 2000, 14(4): 210.
- [3] 林丛发, 魏泽平, 罗仰奋, 等. 马铃薯试管苗培育快繁八要点 [J]. 福建农业科技, 2001(1): 37.
- [4] 刘卫平, 李玉华, 孙秀梅, 等. 马铃薯离体茎尖生长点对几种培养因子的生长反应 [J]. 中国马铃薯, 2001, 15(2): 82.
- [5] 司怀军, 王蒂. 我国马铃薯组织和细胞培养研究进展 [J]. 中国马铃薯, 2000, 14(4): 220-223.
- [6] 田波, 张广学, 张鹤龄, 等. 马铃薯无病毒种薯生产的原理和技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [7] 王炳君, 刘宗. 马铃薯茎尖脱毒与微型薯生产 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [8] 高永伟. 地被菊组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 1997(6): 440-441.
- [9] 林长春, 腾丽伟. 不同形态和种类培养基对马铃薯茎尖生育的影响 [J]. 马铃薯杂志, 1990, 4(3): 153-154.
- [10] Miller P R. The use of plant growth regulation in micropropagation of slow-growing potato cultivars [J]. Potato Research, 1985, 28(2): 479-486.
- [11] 丁世萍. 陆地棉和海岛棉茎尖培养及其生化基础研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2000, 1(4-5): 63.
- [12] Mellor F C, Stace-Smith. In applied and fundamental aspects of plant cell [G]/Reinert J, Bajaj Y P S. Tissue and organ culture. New York: Springer-Valag Beidelberg, 1977, 616-635.

中图分类号: S532; S436.412.1*2 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2007)04-0203-03

马铃薯晚疫病菌培养条件的研究

李惠霞^{1,2}, 刘永刚³, 王 蒂¹, 杨富银²

(1. 甘肃农业大学作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070;

2. 甘肃农业大学草业学院植物病理系, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃农业科学院植物保护研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 通过对马铃薯晚疫病菌在7种不同培养基上及不同温度下的菌落生长和产孢情况的比较观察, 对马铃薯晚疫病菌的培养条件进行筛选。结果表明, 马铃薯晚疫病菌在黑麦培养基上的生长速度最快, 产孢量最大, 燕麦培养基次之, V₈培养基和PDA最差。在5~25℃温度范围内, 马铃薯晚疫病菌均能产生孢子囊, 但以20℃产生孢子囊数目最多且孢子囊较大。

关键词: 马铃薯; 晚疫病菌; 培养基; 温度

马铃薯是我国重要的粮菜兼用作物, 马铃薯晚疫病是由 *Phytophthora infestans* (Montagne) de Bary 引起的世界性的毁灭性病害之一, 对农业生产危害极大。对该病害进行研究具有重要的意义, 但无论是进行植物病原菌研究还是寄主抗病性研究, 首先要解决病原菌的菌种问题。马铃薯晚疫病是

寄生性较强的病原真菌, 分离纯化相当困难。在其生长过程中对氮源、碳源、维生素辅助生长素以及其他营养环境均有其独特的需求, 对温度也有特殊的要求^[1], 很难有效的分离培养得到纯菌株。缺乏病原菌纯菌种是目前国内困扰许多植物病理工作者和育种工作者顺利进行研究工作的难题。研究中确定适宜的培养基是关键的一环, 适宜的温度也是病原菌生长的重要条件。本试验通过对7种培养基上马铃薯晚疫病菌生长测定, 以期找出适宜的培养基, 并对病菌适宜的生长温度和产孢温度进行了测定。

收稿日期: 2007-03-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2001AA241132)资助。

作者简介: 李惠霞(1972-), 女, 博士研究生, 讲师, 主要从事植物真菌病害研究。

Optimization of Meristem Culture for Elimination of Viruses in Potato

Qi Enfang, Wang Yihang, Zhang Wu, Li Yuping

(Potato Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Potato cultivar, Longshu No.6, was used in this experiment to study the effects on survival rate of meristem size, hormones and activated charcoal in meristem culture. The meristem with 2 primordia was optimal explant in vitro. Supplementation of 6-BA 0.5 mg·L⁻¹, GA₃ 0.1 mg·L⁻¹ or NAA 0.1 mg·L⁻¹ to MS promoted the differentiation of Longshu No.6 meristem tip. By supplementation of 0.05% activated charcoal to MS, the time of plant formation was advanced by 13 days and sprouting percentage was increased by 7.5%.

Key Words: potato; meristem tip culture; sprouting percentage