

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2005)06-0330-05

马铃薯试管苗不同培养方式中添加 抑菌中草药萃取液的作用

田新华, 石 瑛, 陈伊里*

(东北农业大学农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 以马铃薯品种东农 305 的脱毒试管苗为供试材料, 采用固体培养和液体培养两种方式, 在试管苗繁殖培养基 MS+3%白糖+6.5 g·L⁻¹琼脂, pH 约 5.8) 中加入 0.05% 的中草药萃取液, 以常规的试管苗繁殖培养基为对照, 进行试管苗生长状况的比较。试验采用二因素完全随机试验设计, 3 次重复, 接种 1 周后开始取样调查, 每周调查 1 次, 固体培养调查 4 次, 液体培养调查 3 次。调查苗高、茎粗、茎节数、根数和根长, 对所有性状进行方差分析和差异显著性测验 (SSR 法)。试验结果表明: 在试管苗繁殖培养基中添加中草药萃取液, 对试管苗的苗高、茎粗和茎节数的增加均有一定的促进作用, 只是在不同培养方式下的效果存在一定差异。对试管苗根部的作用在于增加根长, 而不是增加根的数量。在本试验中, 固体培养方式下添加中草药萃取液的处理效果最好, 成苗时试管苗的苗高达 7.3 cm, 茎节数达 7.1 个, 繁殖倍数高于其它处理。

关键词: 马铃薯; 脱毒试管苗; 培养方式; 中草药萃取液

常规的马铃薯脱毒试管苗快速繁殖是在无菌条件下进行的, 组织培养的各个环节均需配置相应的设备, 成本较高, 且能源消耗较大。培养基则多是对 MS 培养基进行一定程度的调整, 在保证试管苗正常生长的前提下, 尽量降低生产的成本。主要的培养方式分为固体培养和液体培养两种。

中草药对植物病原菌的抑制作用与防治病害的作用, 近年来已开展了一些研究^[1-4], 但在马铃薯作物的组织培养应用较少。本试验在两种方式下, 把具有抑菌作用的中草药萃取液加入到马铃薯脱毒试管苗繁殖的培养基中, 考察不同培养方式中添加中草药萃取液对试管苗植株上部和根部主要性状的作用效果, 评价该中草药萃取液在马铃薯试管苗快繁中应用的前景, 为简化马铃薯组培程序、降低组培成本和建立有菌组培的新概念提供参考。

收稿日期: 2005-10-12

作者简介: 田新华 (1977-), 女, 硕士研究生, 主要从事作物遗传育种研究。

* 通讯作者: E-mail: potato@neau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料

脱毒试管苗为马铃薯品种东农 305 试管苗, 由东北农业大学马铃薯研究室提供。

中草药萃取液为 9 种中草药成分的萃取液, 由山东省农业厅优质产品开发中心单文修先生提供。

1.2 试验方法

1.2.1 获得一致的基础苗

取一株带有 4~5 个茎节的脱毒试管苗, 在无菌条件下切成单节茎段, 转接到盛有 50 mL 经过高压灭菌的固体繁殖培养基 MS+3%白糖+6.5 g·L⁻¹琼脂, pH 约 5.8) 的 6 cm×6 cm×11 cm 的玻璃方瓶中进行培养。温度为 20~25℃, 每天光照 14 h。待试管苗长至单株约 4~5 个茎节时, 在同样条件下进行扩繁, 为试验提供足够的、来源一致的基础苗。

1.2.2 试验设置

试验采用固体培养和液体培养两种方式进行, 每种培养方式设置培养基加入中草药萃取液 (加药)

和常规培养基 2 个处理。处理编号见表 1。

表 1 试验处理设置

编 号	培养方式 A)	处理 B)
处理 1	液体培养 A1)	加药 B1)
处理 2	液体培养 A1)	常规 B2)
处理 3	固体培养 A2)	加药 B1)
处理 4	固体培养 A2)	常规 B2)

1.2.2.1 加入中草药萃取液试验步骤

试验在紫外灯照射 30 min 后的室内进行。将配制好的培养基 (MS+3%白糖+0.05%中草药萃取液+6.5 g·L⁻¹琼脂(液体培养不加琼脂)) 加热, 混匀, 分装至一次性塑料杯(底直径 4 cm, 上口直径 7 cm, 高 9 cm) 中, 每杯 30 mL。在杯口抹胶, 上盖保鲜膜(10 cm×10 cm)。待培养基冷却后, 接种试管苗。把三角瓶内繁殖的马铃薯基础苗取出, 切成单节茎段, 去除顶端, 取中部节段。转接到固体培养基上或漂浮于液体繁殖培养基表面。固体培养基每杯接种茎段 10 个, 液体培养基每杯接种茎段 15 个。

1.2.2.2 常规试验步骤

在无菌条件下, 把三角瓶内繁殖的马铃薯基础苗取出, 切成单节茎段, 去除顶端, 取中部节段。转接到固体繁殖培养基上或漂浮于液体繁殖培养基表面。固体培养基每瓶接种茎段 12 个, 液体培养基每瓶接种茎段 20 个。

1.2.3 培养条件

每天光照 14 h, 光照强度 2000 lx, 培养温度 20~26 。

1.3 试验数据收集和整理

每个处理 3 次重复, 每个重复接种 10 瓶。第一次取样调查于接种 1 周后进行, 以后每周取样一次, 每个重复取样 2 瓶, 统计苗高(mm)、茎粗(mm)、茎节数(个)、生根数(条)和根长(mm)等指标。液体培养取样调查 3 次, 固体培养取样调查 4 次。

对每次取样获得的数据进行处理, 另外把液体培养与固体培养最后一次取样调查的结果作为成苗的数据进行统计分析。对苗高、茎粗、茎节数、生根数和根长等指标进行方差分析和差异显著性测验(SSR法)^[9]。

2 结果与分析

2.1 不同培养方式下试管苗植株上部的生长状况

对两种培养方式下各处理不同取样时期试管苗上部生长状况的各项指标按二因素完全随机试验有重复观察值的统计分析方法进行方差分析和多重比较, 试验结果见表 2、3、4。

表 2 不同培养方式下各取样时期试管苗植株上部生长状况

性 状	培养方式	1 周	2 周	3 周	成苗
苗高 (cm)	A1	1.7 a	4.4 a	7.8 a	7.8 a
	A2	1.8 a	3.5 b	5.0 b	6.6 b
茎粗 (mm)	A1	0.92 a	1.02 a	1.09 a	1.09 a
	A2	0.73 b	0.79 b	0.85 b	0.94 b
茎节数 (个)	A1	2.1 a	4.4 a	5.9 a	5.9 a
	A2	1.9 a	3.2 b	4.3 b	5.9 a

从表 2 可以看出, 对于试管苗苗高这一性状, 接种 1 周后的调查结果显示, 不同培养方式间的差异不显著, 接种 2 周后, 培养方式不同导致的苗高差异已经达显著水平, 直到试管苗成苗, 最终表现为液体培养方式下试管苗的苗高要显著高于固体培养方式下试管苗的苗高; 对于试管苗的茎粗而言, 接种 1 周后就已经表现出了不同培养方式下的显著差异, 这种差异一直延续到试管苗成苗, 液体培养方式下的试管苗的茎粗显著高于固体培养方式下试管苗的茎粗; 试管苗茎节数在生长早期的趋势与苗高相似, 接种 1 周后培养方式间差异不显著, 2 周后开始表现出显著差异, 到第 3 周液体培养方式成苗时这种差异仍然存在, 但到第 4 周固体培养方式也成苗时, 成苗间则表现出差异不显著。

表 3 不同处理方式下各取样时期试管苗植株上部生长状况

性 状	处理方式	1 周	2 周	3 周	成苗
苗高 (cm)	B1	1.6 b	3.5 b	5.7 b	6.8 b
	B2	2.0 a	4.4 a	7.1 a	7.5 a
茎粗 (mm)	B1	0.85 a	0.91 a	1.02 a	1.09 a
	B2	0.80 a	0.90 a	0.92 b	0.94 b
茎节数 (个)	B1	1.9 a	3.8 a	5.3 a	6.4 a
	B2	2.0 a	3.8 a	5.0 a	5.5 b

从表 3 可见, 在培养基中添加中草药萃取液的处理与常规的处理在试管苗苗高这一性状上表现出了显著差异, 这种差异在试管苗接种 1 周后开始表现, 一直持续到试管苗成苗, 添加中草药萃取液的处理试管苗的苗高显著低于常规处理; 茎粗这一性状在接种 3 周后表现出了处理方式间的显著差异, 添加中草药萃取液的处理试管苗的茎粗显著高于常规处理, 这种差异一直持续到试管苗成苗; 试管苗的茎节数在生长的前期没有表现出处理间的差异,

表 4 各处理不同取样时期试管苗植株上部生长状况

性状	处理	1 周	2 周	3 周	成苗
苗高 (cm)	处理 1	1.6 b	3.6 b	6.4 b	6.4 c
	处理 2	1.9 a	5.2 a	9.1 a	9.1 a
	处理 3	1.6 b	3.3 c	5.0 c	7.3 b
	处理 4	2.0 a	3.7 b	5.1 c	5.9 d
茎粗 (mm)	处理 1	0.97 a	1.00 a	1.15 a	1.15 a
	处理 2	0.87 a	1.05 a	1.03 b	1.03 b
	处理 3	0.73 b	0.80 b	0.89 c	1.02 b
	处理 4	0.72 b	0.78 b	0.80 c	0.86 c
茎节数 (个)	处理 1	2.1 a	4.2 b	5.7 b	5.7 c
	处理 2	2.0 a	4.5 a	6.2 a	6.2 b
	处理 3	1.7 a	3.4 c	4.9 c	7.1 a
	处理 4	2.1 a	4.1 c	3.8 d	4.8 d

直到成苗时, 才表现出添加中草药萃取液的处理茎节数显著高于常规处理。

表 4 列出的是所有试验处理在不同取样时期试管苗苗高、茎粗和茎节数的平均值及多重比较结果。对试管苗苗高这一性状而言, 接种 1 周后的结果显示, 处理 2 和处理 4 显著高于处理 1 和处理 3; 接种 2 周后处理 2 显著高于其它处理, 处理 3 显著低于其它处理, 处理 1 和处理 4 间差异不显著; 接种 3 周后, 处理 2 仍表现出显著高于其它处理, 处理 1 其次, 处理 3 和处理 4 显著低于其它处理; 成苗时则表现为所有处理间均达差异显著水平, 试管苗苗高从高到低的处理依次为处理 2、处理 3、处理 1、处理 4。试管苗茎粗表现为接种 1 周后处理 1 和处理 2 显著高于处理 3 和处理 4, 这种趋势持续到接种 2 周后; 接种 3 周后处理 1 显著高于处理 2, 处理 3 和处理 4 显著低于其它处理且处理间差异不显著; 成苗时表现为处理 1 显著高于其它处理, 处理 2 和处理 3 居中且处理间差异不显

著, 处理 4 显著低于其它处理。对试管苗茎节数这一性状, 接种 1 周后处理间未表现出显著差异, 接种 2 周后处理间开始表现出一定的差异, 处理 2 显著高于其它处理, 其次是处理 1, 处理 3 和处理 4 显著低于其它处理但处理间差异不显著; 接种 3 周后仍然是处理 2 显著高于其它处理, 其次依次是处理 1、处理 3、处理 4; 成苗时则表现为处理 3 显著高于其它处理, 其它处理从高到低依次为处理 2、处理 1、处理 4。

为了更直观地观察苗高和茎节数这两个试管苗生长重要指标的动态变化, 将 4 个处理下试管苗不同时期苗高和茎节数的结果绘成图 1 和图 2。结合图 1 和图 2 可以看出, 从接种第 2 周开始, 处理 2 的试管苗苗高就显著高于其它各个处理, 这种趋势一直持续到试管苗成苗, 试管苗的茎节数在 3 周前也表现出同样的趋势, 但处理 3 在第 4 周又有一个增长, 而此时处理 1 已经成苗, 因此到处理 3 最终成苗时, 处理 3 的茎节数已显著高于处理 1。

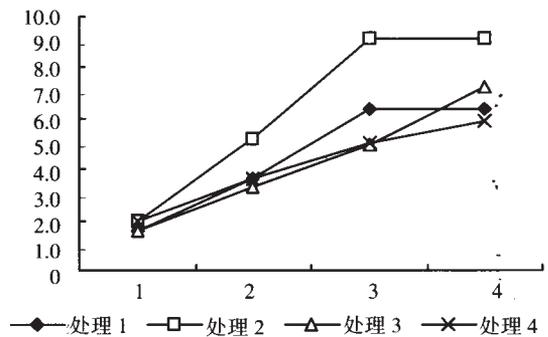


图 1 不同处理下的试管苗苗高

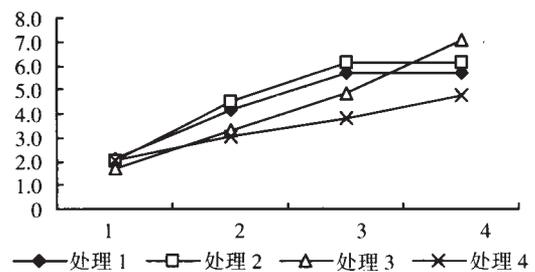


图 2 不同处理下的试管苗茎节数

图中结果显示, 液体培养方式下添加中草药萃取液(处理 1), 试管苗成苗时的苗高和茎节数均表现出不如液体培养方式常规处理(处理 2)和固体培养方式下添加中草药萃取液处理(处理 3), 但要好

于固体培养下的常规处理(处理 4)。因此,我们可以这样认为,在试管苗繁殖培养基中添加中草药萃取液,对试管苗的苗高和茎节数的增加均有一定的促进作用,只是在不同培养方式下作用的效果有一定的差异。在本试验中,固体培养方式下添加中草药萃取液的处理成苗时试管苗的苗高达 7.3 cm,茎节数达 7.1 个,该处理苗高虽不是最高,但茎节数为最多,获得较多的茎节数就意味着可以获得较大的繁殖倍数,而繁殖倍数是马铃薯脱毒试管苗快速繁殖过程中首要考虑的指标。

2.2 不同培养方式下的试管苗根部的生长状况

对于两种培养方式,各处理不同取样时期试管苗根部生长状况的各项指标,按二因素完全随机试验有重复观察值的统计分析方法进行方差分析和多重比较,试验结果见表 5、6、7。

表 5 不同培养方式下各取样时期试管苗根部生长状况

性状	培养方式	1 周	2 周	3 周	成苗
根条 条)	A1	1.3 a	2.0 a	3.0 a	3.0 a
	A2	1.0 a	1.9 a	1.7 b	2.0 b
根长 mm)	A1	0.6 b	2.1 b	2.3 b	2.3 b
	A2	1.0 a	3.1 a	4.6 a	5.6 a

从表 5 可以看出,接种 3 周后,试管苗的根数才表现出在不同培养方式下的显著差异,液体培养方式下试管苗的根数显著多于固体培养方式下试管苗的根数;而根长这一性状,在接种 1 周后就表现出了不同培养方式下的显著差异,即固体培养方式下试管苗的根长显著高于液体培养方式,这种趋势一直持续到试管苗成苗。

表 6 不同处理方式下各取样时期试管苗根部生长状况

性状	处理方式	1 周	2 周	3 周	成苗
根条 条)	B1	1.1 a	1.7 b	2.1 a	2.2 b
	B2	1.2 a	2.3 a	2.6 a	2.8 a
根长 mm)	B1	0.8 a	3.1 a	3.7 a	4.3 a
	B2	0.8 a	2.1 b	3.2 b	3.6 b

表 6 列出的是不同处理方式下试管苗的根数和根长。添加中草药萃取液处理的试管苗根数在接种 2 周后表现出显著低于常规处理,3 周后处理间差异消失,试管苗成苗后又表现出相同趋势;根长则表现出接种 2 周后添加中草药萃取液处理的大于常规处理,这种趋势一直持续到试管苗成苗。

把各处理不同取样时期试管苗的根数和根长结果列表 7。

表 7 各处理不同取样时期试管苗根部生长状况

性状	处理	1 周	2 周	3 周	成苗
根条 条)	处理 1	1.2 a	1.7 b	2.4 b	2.4 b
	处理 2	1.4 a	2.4 a	3.5 a	3.5 a
	处理 3	1.0 a	1.7 b	1.7 b	1.9 b
	处理 4	1.1 a	2.1 ab	1.6 b	2.1 b
根长 mm)	处理 1	0.7 bc	2.4 b	2.6 c	2.6 c
	处理 2	0.6 c	1.8 c	2.1 d	2.1 d
	处理 3	0.9 ab	3.8 a	4.8 a	6.0 a
	处理 4	1.1 a	2.4 b	4.4 b	5.2 b

结果显示,从接种的 2 周后开始,处理 2 的根数明显高于其它处理,这种趋势一直持续到试管苗成苗。而根长的差异从接种 1 周后就已有所表现,处理 4 最高,其它依次为处理 3、处理 1 和处理 2;接种 2 周后表现为处理 3 显著高于其它处理,其次是处理 1 和处理 4,最低的是处理 2;接种 3 周直到成苗,均表现为处理 3 最高,其它处理从高到低依次为处理 4、处理 1 和处理 2。本试验结果表明,液体培养方式下常规处理试管苗的根数显著高于其它处理,固体培养方式下添加中草药萃取液处理试管苗的根长显著高于其它处理。可见,中草药萃取液对试管苗根部的作用在于增加根长,而不是增加根的数量。

3 讨 论

不同的组织培养方式对培养基中有效成分利用有显著影响。大量研究结果表明,液体培养方式下试管苗的上部鲜重、叶片数、有效茎节数及株高等指标均显著优于固体培养。同时液体培养的成苗时间可以比固体培养缩短 7 d 左右^[6]。由于液体培养有利于植株吸收营养,植株的生长速度快,对于短期内快速繁殖及壮苗是有着重要意义。但是液体培养也具有其难以克服的缺点,那就是培养基一旦污染,整瓶的苗很快就会死亡。且液体培养的试管苗不是每个叶腋都能抽出枝条,扩繁倍数也没有固体培养高。因此,生产者可以根据自己的实际情况来选择合适的培养方式。

本试验在马铃薯试管苗快速繁殖中采用液体培

养和固体培养两种方式, 在培养基中添加中草药萃取液以评价其对马铃薯脱毒试管苗生长状况的影响。试验结果表明, 在试管苗繁殖培养基中添加中草药萃取液, 对试管苗的苗高、茎粗和茎节数的增加均有一定的促进作用, 只是在不同培养方式下的作用效果存在一定差异。对试管苗根部的作用在于增加根长, 而不是增加根的数量。在本试验中, 在固体培养和液体培养的培养基中加入同一浓度中草药萃取液, 脱毒试管苗的生长状况整体表现为固体培养方式好于液体培养方式, 表明添加中草药萃取液的浓度适合于固体培养方式下的试管苗繁殖, 我们可以继续进行中草药萃取液的浓度筛选试验, 选择更加适宜的浓度, 以使脱毒试管苗生长获得更好的效果。

把中草药萃取液添加到马铃薯脱毒试管苗繁殖培养基中, 利用其对植物病原菌的抑制作用, 把常规无菌条件下的马铃薯脱毒试管苗继代过程, 置于有菌的条件下进行, 简化了程序、节约了能源、降低了成本。本试验仅进行了中草药萃取液对特定马

铃薯品种脱毒试管苗生长状况影响的测定, 至于中草药抑菌作用的机理以及中草药萃取液对马铃薯试管苗的后续作用如何, 尚有待于进一步试验。

[参 考 文 献]

- [1] 何昆, 罗宽. 中草药萃取液对植物病原真菌、细菌的抑制作用 [J]. 湖南农业科学, 2003, (1): 43-45.
- [2] 孟昭礼, 吴献忠, 高庆宵. 银杏提取液对四种植物病原菌的抑制作用 [J]. 植物病原学报, 1995, 25(4): 357-360.
- [3] 朱振东, 周茂繁, 卫扬斗. 黄连生物碱对植物病原菌的抑制作用及应用初步研究 [J]. 华中农业大学学报, 1991, 10(4): 342-346.
- [4] 胡建军, 刘利林, 黄金奎, 等. 植物提取物体外抑菌试验的研究 [J]. 塔里木农垦大学学报, 2004, 16(2), 5-8.
- [5] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [6] 郝文胜, 赵永秀, 赵青辉, 等. 我国马铃薯茎尖培养脱毒和脱毒试管苗微繁研究进展 [J]. 内蒙古农业科技, 2001, 内蒙古农业职业教育专辑: 27-33.

The Effect of Plant Liquid Extract on the Growth of in vitro Potato Plantlets in Different Types of Culture

TIAN Xin-hua, SHI Ying, CHEN Yi-li

(Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: The growth of plantlets in vitro of the cultivar Dongnong 305 growing in different types of medium (MS+3% sugar+6.5 g·L⁻¹ agar (solid), pH 5.8), added with or without 0.05% plant liquid extract, was compared. The experiment was laid out in a two-factor complete randomized design with three replications. Data were recorded one week after inoculation at an interval of one week. Totally, four investigations were made for solid culture, and for liquid culture three investigations. The items investigated included plant height, stem diameter, node number, root number and root length. All data were statistically analyzed using analysis of variance and mean separations were made using the SSR method. Promotion effects were noted for the traits, plant height, stem diameter, and node number for plantlets which were cultured on the medium supplemented with plant liquid extract, but the effects varied with cultural types. The plant liquid extract promoted the growth of root length, not root number. In this research, the solid medium supplemented with plant liquid extract showed best results. After four week culture, the plant height reached up to 7.3 cm, node number 7.1, and the propagation coefficient was highest among all treatments.

Key Word: potato; virus-free plantlet in vitro; culture type; plant liquid extract