

不同组织培养条件对马铃薯试管微型薯的诱导

杨文玉

(中国科学院植物研究所 北京 100044)

摘要

应用四种不同的培养基对两个马铃薯品种的脱毒试管苗进行微型薯的诱导。在其中两种培养诱导条件下, 两品种的诱导效应有明显差异, 但对另外两种的诱导无显著区别。而液体培养对微型薯的诱导效果好于固体培养。在诱导培养成分中, BAP 对于诱导微型薯发生无明显作用, 并非诱导的必需因素。试验表明以 MS 基本培养成分组成的液体培养对于诱导试管微型薯的效果最好。它诱导微型薯形成的最早, 时间短, 诱导结薯率高, 相对成本低, 适用于容器内大量微型薯的诱导形成。

关键词 马铃薯, 品种, 培养基, 微型薯

1 前言

马铃薯试管微型薯 (microtuber) 是在脱毒试管苗之后发展出的保存种质和生产无毒种薯的新形式。Vander Zaag 在 1988 年第一次明确地定义了试管微型薯⁽¹⁾, 即通过组织培养于容器中培养小苗, 通过诱导于叶腋内形成小薯, 直径在 2~10mm 之间。并在此后又得到了进一步的完善。目前试管微型薯已被广泛地应用于种质资源保存、交换、无毒种薯的生产、运输以及在当今马铃薯基因工程研究中基因转移的受体等等。自从七十年代中期首次报道了用组织培养方法诱导微型薯之后, 又发展了许多种培养和诱导微型薯的方法和技术^(2~8), 但是这些方法中仍然存在一些问题, 例如诱导效率低、成本较高、方法设备复杂等等, 不能满足大

量生产无毒微型薯以及大量保存种质资源的要求。本试验目的在于比较几种培养条件对微型薯的诱导效率以及品种对培养条件的反应。

2 材料和方法

2.1 无毒苗的繁殖

马铃薯脱毒试管苗来源于中国科学院植物研究所马铃薯课题组。选用“克 4”和“Desiree”两个品种。将试管苗在无菌条件下切成茎段并转到繁殖培养基上 (MA 培养基)⁽⁹⁾。用 100ml 三角瓶培养, 每瓶 50ml 固体培养基, 接种 10 个茎段, 在 20℃、2000lux 连续光照下培养三周, 形成壮苗。

2.2 固体培养诱导

将所得壮苗按繁殖方式切成茎段并转移

固体培养基 A 上诱导结薯。固体培养基 A 的成分如表 1 中 A。每三角瓶内放十个切段, 内装有 50ml 培养基, 置于黑暗中于 20℃ 条件下培养, 4 周后统计单瓶平均结薯个数、薯块平均直径和结薯时间。

2.3 固体+液体培养诱导

无毒苗在 MA 扩繁生长到 10cm 时, 向三角瓶内倒入 20ml 消毒过的液体诱导培养液 B, 然后放入暗中于 20℃ 下诱导形成微型薯。液体培养基 B 的成分见表 1 中 B。4 周后统计单瓶平均结薯数、薯块平均直径和结薯时间。

2.4 液体培养诱导

将无毒试管苗在 MA 上扩繁后, 待苗在三角瓶内长至 10cm 高时, 取出试管苗, 并将根部切下, 然后放进装有 20ml 消毒过的液体培养基 C1 (不加 BAP) 和 C2 (加 BAP10ml/l) 的 100ml 三角瓶中, 每瓶 10 株, 放入暗处在 20℃ 条件下诱导形成微型薯。液体培养基 C1 和 C2 的成分见表 1。4 周后统计单瓶平均结薯数、薯块平均直径和结薯时间。

表 1 微型薯诱导所用培养基成分

成分	A	B	C1	C2
MS macro	100ml/l	100ml/l	100ml/l	100ml/l
MS micro	10ml/l	10ml/l	10ml/l	10ml/l
EDTA-Fe	5ml/l	5ml/l	5ml/l	5ml/l
Glycine	2mg/l	1mg/l		
Inositol	100mg/l	100mg/l		
B1	0.4mg/l	0.4mg/l	0.4mg/l	0.4mg/l
B6			0.5mg/l	0.5mg/l
B5			0.5mg/l	0.5mg/l
B9		5mg/l		
BAP				10ml/l
Sucrose	80g/l	80g/l	80g/l	80g/l
Agar	7g/l			
pH	5.8	5.8	5.8	5.8

注: B5-nicotinic acid.

3 试验结果

表 2 列出了本试验中所用的两个马铃薯

品种在 4 种培养条件下的平均诱导结薯率 (每瓶内所结微型薯个数占诱导切段数或诱导试管苗数的百分比) 和薯块平均直径 (mm。从表中可以得出, 在培养基 A 或 B 的诱导下, 两品种的诱导效果表现很大差异, 在诱导结薯率上“Desiree”明显高于“克 4”品种。在薯块平均直径上, 培养基 A 诱导的“Desiree”品种产生比“克 4”大的薯块, 但在 B 培养条件下两品种的薯块无明显差异。而在 B 培养基上两品种的诱导结薯率都比在 A 条件下的高。说明 B 培养基在诱导结薯和产生薯块大小方面都优于 A。而在 B 诱导条件下两品种的薯块平均直径无明显区别是由于在 B 中具有 B₉ 的缘故, 由此可见 B₉ 对马铃薯微型薯薯块大小的促进作用。

表 2 不同诱导培养基对马铃薯品种“克 4”和“Desiree”诱导效果

品种	指标	A (固体)	B (固+液)	C1 (液-BAP)	C2 (液+BAP)
克 4	诱导结薯率(%)	37.36	50.72	93.66	92.45
	薯块直径 (mm)	2.7	6.0	6.5	6.3
Desiree	诱导结薯率(%)	58.38	65.24	92.00	95.57
	薯块直径 (mm)	3.6	6.2	6.3	6.5

在 C1 和 C2 两种诱导培养条件下, 两品种之间无论在诱导结薯率还是在薯块直径上表现基本一致, 说明在此培养条件下没有基因型造成的诱导效应差别。以 C1 或 C2 诱导培养下的诱导结薯率显著高于 A 或 B, 而薯块直径与在 B 诱导下的无明显差别, 表明 C1 或 C2 的诱导效果优于 B 或 A, 尤其在诱导结薯率上最为明显。由于在 B、C1 和 C2 诱导培养基上两品种具有相同的薯块直径, 表明 B₉ 的作用效应与 B₆+B₅ 的相同。以上结果说明液体培养基 C1 或

C2 比固体培养基 A 或固体+液体 B 更有利于诱导马铃薯微型薯的形成。

为了测定 BAP 对微型薯的诱导效应, 本试验应用了文献中证明的诱导微型薯最适浓度 10mg/l^(4,6,7,10,11), 从表 2 中 C1 和 C2 的数据得出, 在液体培养条件下, 加或不加 BAP 对“克 4”或“Desirec”都没有显著作用效果, 从而使两品种表现出相似的诱导结薯率和薯块直径, 表明 BAP 并非是试管微型薯诱导的必需因素, 至少在本试验所用的两个品种上没有明显的作用效果。

从表 3 可以看出, “Desirec”在 A 或 B 培养基上形成微型薯的最早时间要比“克 4”少 1~2 天, 而在 C1 或 C2 条件下发生时间是相同的, 并且比在 A 或 B 条件下早 2~7 天。综上所述, 由 MS⁽¹²⁾ 基本培养成分组成的液体培养基不加 BAP 对马铃薯微型薯的诱导效应最佳, 无论在诱导结薯率还是在薯块大小以及诱导结薯最早时间上都优于其它培养条件, 并且不表现品种之间的遗传差别。

4 讨 论

本试验结果表明, 液体培养所产生的微型薯数目多, 体积大, 诱导形成微型薯早, 有利于微型薯的生产。尤其是在液体培养条件下, 每 100ml 三角瓶内可以放置 10~20 个试管苗, 这要比固体培养基上放置的切段数要多 1 倍以上, 并且使诱导结薯不受影响。如果选用体积大的容器, 可大量进行试管微型薯的诱导生产, 省略应用 BAP 和琼脂, 可以降低生产成本, 液体培养基还有配制容易、方便和后补加于培养容器内的优点。

对 MA 上生长的试管苗直接倒入液体 B 培养基的诱导效果介于固体 A 与液体 C 之间, 可能是由于存在原三角瓶内的 MA 固体培养基阻碍了试管苗对后加入的液体培

养成分的吸收, 所以造成了诱导效果上 C>B>A 的次序, 因为从根部切下试管苗在全部为液体的 C 培养液中更能充分吸收养分而产生更好的诱导效果。

表 3 在不同诱导培养基上两品种形成微型薯的最早时间(天)

品种	A	B	C1	C2
克 4	14	10	7	7
Desirec	12	9	7	7

通过在 C 培养基中加入 BAP 的处理在诱导效应上与不加无显著差别, 因此在液体培养中可以省略使用 BAP, 由于 BAP 的较贵价格, 这样则降低了生产微型薯的成本。但还有报道 BAP 对个别品种的微型薯诱导具有抑制作用, 而对其它品种具有一定的促进作用, 但促进效应不十分显著^(6,10,13)。近年来有人试用廉价的香兰素或香豆素代替 CCC 或 BAP, 以及用食用白糖代替蔗糖以此来降低生产成本^(4,5,13), 发现香兰素或香豆素+MS 培养基对四倍体种微型薯诱导具有明显效果, 但对双倍体马铃薯品种的诱导效应不明显, 有待于进一步的探讨。

在本试验中所得出的结论是: 采用 MS 基本液体培养基比固体培养对诱导马铃薯微型薯的效应好, 而 BAP 对微型薯的诱导形成无显著效果, 并非必需诱导成分, 在此液体培养条件下, 所用两品种的遗传差别不明显, 此种方法对于大批量容器内高效生产试管微型薯具有重要参考价值。

参 考 文 献

- 1 Vander Zaag D E. Recent trends in development, production and utilization of potato crop in the world. APA Proceedings, 1988, 12~19
- 2 李其文. 台湾在玻璃容器批量繁殖块茎及无毒种薯生产. 马铃薯科学, 1983, 1:67~69
- 3 何静波, 段金玉, 万勇, 王军. 马铃薯试管诱导结薯方法的改进. 云南植物研究, 1988, 10(4):396~402
- 4 肖毅东, 王蒂, 戴胡曦. 用组培法诱导试管微型薯的研究. 马铃薯杂志, 1991, 5(4):193~198

- 5 Akita M and S Takayama. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Rep*, 1994, 13:184~187
- 6 Dodds J H. Improved methods for *in vitro* tuber induction and use of *in vitro* tubers in seed programs. *APA Proceedings*, 1988, 157~158
- 7 Wang P J and C Y Hu. *In vitro* mass tuberization and virus free seed-potato production in Taiwan. *Am P J*, 1982, 59:33~37
- 8 Wattimena G, B McCown and G Weis. Comparative field performance of potatoes from microculture. *Am P J*, 1983, 60(1):27~33
- 9 马铃薯生产协作组. 马铃薯种薯生产的研究 I. 用茎尖培养方法生产马铃薯无病毒原种. *植物学报*, 1976, 18(3):233~238
- 10 胡云海、蒋先明. 不同糖类和 BA 对马铃薯 (*S.tuberosum*) 试管薯的影响. *马铃薯杂志*, 1989, 3(4):203~206
- 11 Nowak J and D Cotborne. *In vitro* tuberization and tuber proteins as indicators of heat stress tolerance in potato. *Am P J*, 1989, 66:35~44
- 12 Murashige T and F Skoog. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15:473~497
- 13 陈善娜. 香豆素和寡糖素对无病毒马铃薯试管薯诱导及氨基酸分析. *中国植物生理学会第五次会议论文摘要汇编*, 1990

IN VITRO TUBERIZATION OF VIRUS-FREE POTATO PLANTLETS WITH DIFFERENT INDUCING MEDIA

Yang Wenyu

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044)

ABSTRACT

Four different tuber inducing media were used in potato microtuber induction. In response to two of the four inducing media applied, the two potato cultivars employed in the experiment, "Kexin 4" and "Desiree", showed different inducing performance, but reacted the same to the other two media. The liquid culture medium clearly resulted in better inducing effect than the solid culture medium. The application of BAP in the tuber inducing medium did not show significant effect on the microtuber induction and was determined as not an essential element in the composition of the inducing culture medium. The results indicated that the efficient tuberization of potato can be obtained by using a liquid inducing medium consisting of basic MS components. This liquid medium takes shorter period to tuberize, produces higher tuberizing rate, costs less and is more suitable for mass production of potato microtubers in large containers.

KEY WORDS: potato, cultivar, medium, microtuber