

马铃薯脱毒试管苗棉纤维液固相载体 培养技术的研究^①

李 艳 王成华^② 余显蓉

(四川省西昌县农业局 615000)

摘 要

对马铃薯脱毒试管苗快繁技术中培养基的液相, 固相和液—固相培养试验研究, 方法包括试管苗培养、网室栽培、小薯生产、病毒鉴定、规模应用及重要性评价。研究筛选出了棉纤维液—固相载体培养技术, 讨论了该技术的作用机理, 提出了“根系扩展伺服系统”的看法。

关键词 试管苗, 液固相载体, 伺服系统

1 前 言

研究发现, 有 30 多种病毒感染马铃薯, 并引起品种退化。据资料, 茎尖分生组织培养技术能从马铃薯体内脱除 PLRV、PVY 以及 PVA、PAF、PVG、PVM、PVS。加拿大、荷兰、美、日、英、法等种薯生产的先进国家都采用了此技术。能否不断提供品种对路、成本低廉的商品脱毒小薯(minituber), 是该技术用于生产的关键。本试验针对降低成本、简化操作、提高效率、实现“工厂”作业, 从培养基的改进着手, 对脱毒小薯的商品性生产进行了系统研究。

2 材料与方 法

①感谢农业部植检所研究员舒秀珍、凉山州农业局高级农艺师李世才、西昌农科所高级农艺师高慧君的支持以及西昌农科所潘俊峰、曾莉的帮助。

②凉山农业局

2.1 预备试验一

MS 液体培养基 (简称 MSL) 添加植物激素。

2.1.1 处理: (1)MSL+B₉10; (2)MSL+CCC10; (3)MSL+B₉5; (4)MSL, CK。

2.1.2 供试材料: 马铃薯脱毒试管苗, 品种为凉薯 97 号、凉薯 3 号、米拉。用三角瓶分装培养基 20ml/瓶, 每瓶接种切段 10 个。

2.1.3 培养基制作: 接种切段, 培养条件同常规法。

2.2 预备试验二

MSL 加不同固相载体。

2.2.1 处理: (1)MSL+ 洗涤蛭石; (2)MSL+ 未洗涤蛭石; (3)MSL+ 普通棉; (4)MSL+ 脱脂棉; (5)MSL+ 蔗渣; (6)MSL+ 琼脂 (CK₁); (7)MSL (CK₂)。

2.2.2 供试材料、方法: 同试验一。

2.3 脱脂棉载体、琼脂载体和无载体培养比较试验

2.3.1 处理: (1)MSL+ B₉5 (简称 L)(CK₁);

- (2)MSL+ B₉5+琼脂(简称 LA)(CK₂);
- (3)MSL+B₉5+脱脂棉(简称 LC).

2.3.2 供试材料: 无菌室操作, 光培室条件同试验一。

试管苗成苗后转至网室内, 扦插到经灭菌的蛭石基质盘内, 在自然环境下生长, 栽培措施同脱毒小薯生产常规法。蛭石灭菌为常压气相法。

植株干重量采用烘干法测定。

2.3.3 LC 处理的脱毒试管苗病毒(或再染病毒)鉴定: 采用①血清学(ELISA)检测; ②电子显微镜检; ③指示植物鉴定(病毒鉴定在农业部植物检疫实验所完成)。

3 结果分析

3.1 试验一

接种切段后第 20 天, 随机抽取每处理 10 瓶进行测定, 其余继续培养, 成苗后移入网室内栽培, 观察生长情况。从结果(表 1)可看出, 使用植物生长延缓剂后, 试管苗茎高得到明显控制, 有效茎叶节增加, 扦插成活率均有提高, 表明试验中添加的植物激素均有益于培育壮苗。各处理综合评价, 以处理(3)表现出比较效果最为优良。

表 1 MSL 添加植物激素测定结果(1991.3 月接种)

处 理	(1) B ₉ 10	(2) CCC10	(3) B ₉ 5	(4) CK
接种数量(瓶)	46	32	51	38
采样株数(个)	92	90	94	90
茎高(cm)	4.35	6.25	5.25	6.35
有效节数(个)	4.55	4.60	4.55	4.45
单株鲜重(g)	0.143	0.144	0.161	0.155
移栽成活率(%)	89.5	91.0	92.3	88.2
综合评价优劣位次	2	3	1	4

3.2 试验二

接种第 10 天, 处理(1)植株生长纤弱, 较处理(2)稍壮, 不及(4)和(7)

处理。处理(2)生长极不整齐, 一些植株开始褐化死亡, 余者瘦弱。处理(3)全部被细菌所污染, 切段腐烂(原因不明)。处理(4)植株生长健壮整齐, 根系粗壮, 根毛多, 长势超过 CK₁、CK₂。

表 2 MSL+固相载体试验观察结果(1991.9 月)

处 理	接种 瓶数	污染 瓶数	污染率 (%)	茎高 (cm)
(1)洗涤蛭石	10	0	0	2.5~6.5
(2)未洗蛭石	10	0	0	1.0~6.5
(3)普通棉	10	10	100	—
(4)脱脂棉	10	0	0	2.8~6.2
(5)蔗渣	9	2	22	褐化
(6)CK ₁	10	2	20	1.5~4.5
(7)CK ₂	10	0	0	1.6~4.5

3.3 在试验一、试验二的基础上进行三种不同载体的对比试验

3.3.1 不同载体试管苗生长动态测定

接种切段后, 从第 10 天始, 每隔 5 天测定一次试管苗的株高、茎径粗、有效节数、叶片数、根系数量、平均根长和单株干重指标, 观察试管苗的生长动态情况。

从图 1 可看出, 株高生长 B 值(斜率)的排列顺序为 LC(0.116) > L(0.104) > LA(0.094), 即植株的高度生长速度, 采用棉纤维载体大于液体, 而更大于琼脂载体。茎径粗的生长在各处理间差异不明显。

图 2 表明, 有效节数 LC(0.264) > L(0.264) > LA(0.228), 说明棉纤维载体的有效节数占优势。单株叶片数的生长仍然以棉纤维载体处于领先。

根系数量(图 3), 采用棉纤维载体的生长量逊于液体培养, 但高于琼脂载体处理。平均根长同样表现出上述关系。

试管苗干物质的积累以及积累速度(图 4)为棉纤维载体培养 > 液体培养 > 琼脂载体培养。作 t 测验, 棉纤维载体培养与液体

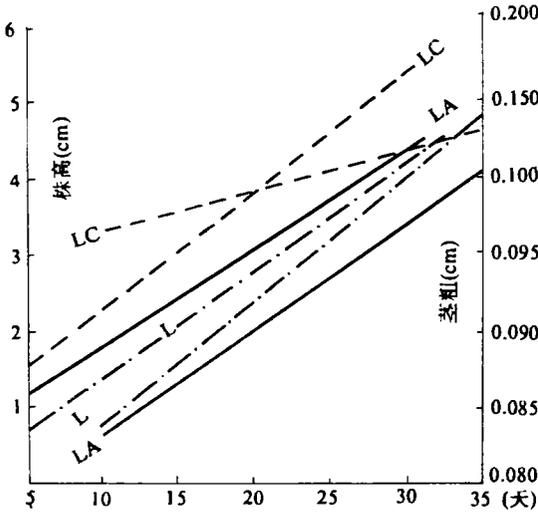


图 1 株高、茎粗与生长时间的关系

株高 $Y_{LA}=1.24+0.094x$ ($r^{**}=0.9699$)
 $Y_A=0.68+0.104x$ ($r^{**}=0.9444$)
 $Y_{LC}=1.6+0.116x$ ($r^{**}=0.9793$)

茎粗 $Y_{LA}=0.07+0.0008x$ ($r=0.7071$)
 $Y_L=0.078+0.0014x$ ($r^{**}=0.970$)
 $Y_{LC}=0.096+0.008x$ ($r=0.7559$)

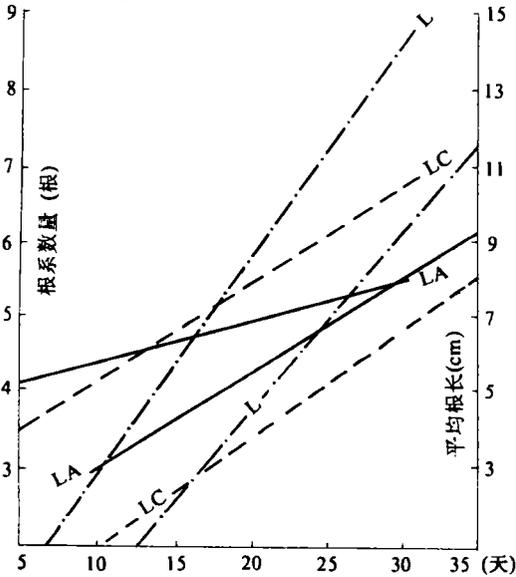


图 3 根系数量、根长与生长时间的关系

根系数量 $Y_{LA}=3.96+0.050x$ ($r^{**}=0.9369$)
 $Y_L=0.30+0.280x$ ($r^{**}=0.9284$)
 $Y_{LC}=2.98+0.124x$ ($r^{**}=0.8507$)

平均根长 $Y_{LA}=0.16+0.260x$ ($r^{**}=0.9697$)
 $Y_L=-2.04+0.388x$ ($r^{**}=0.9946$)
 $Y_{LC}=0.38+0.220x$ ($r^{**}=0.9437$)

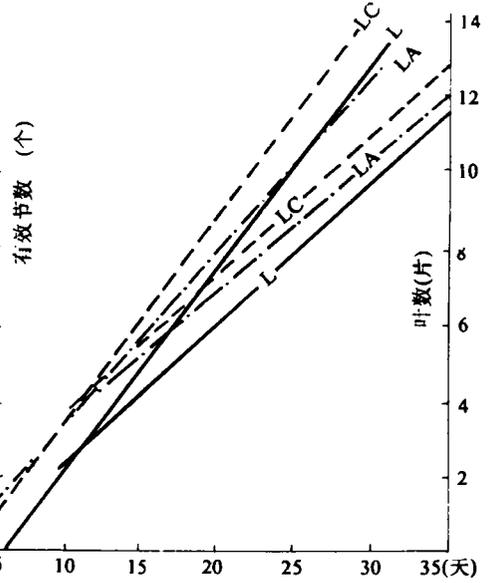


图 2 有效节数、叶数与生长时间的关系

有效节数 $Y_{LA}=0.46+0.228x$ ($r^{**}=0.9779$)
 $Y_L=-0.46+0.262x$ ($r^{**}=0.9889$)
 $Y_{LC}=0.20+0.264x$ ($r^{**}=0.9965$)

叶数 $Y_{LA}=0.90+0.320x$ ($r^{**}=0.9892$)
 $Y_A=-0.12+0.330x$ ($r^{**}=0.9796$)
 $Y_{LC}=0.38+0.350x$ ($r^{**}=0.9993$)

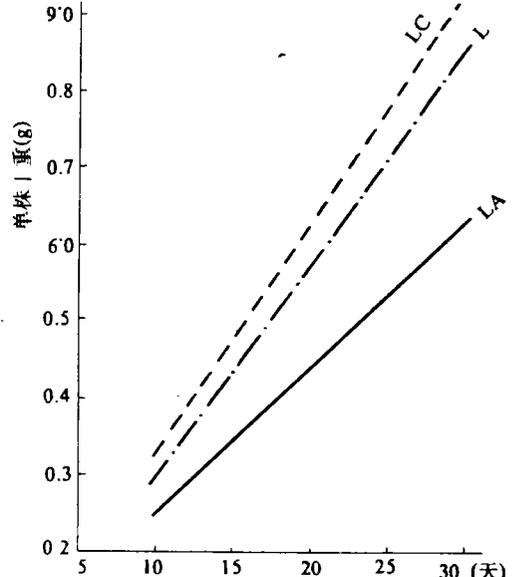


图 4 单株干重与生长时间的关系

平均单株干重 $Y_{LA}=0.074+0.0184x$ ($r^{**}=0.9928$)
 $Y_L=0.036+0.0274x$ ($r^{**}=0.9983$)
 $Y_{LC}=0.046+0.0294x$ ($r^{**}=0.9962$)

培养差异达到显著水平, 与琼脂载体培养差异达到了极显著水平。

3.3.2 三种培养基培养苗的扦插生长势

表 3 试管苗扦插生长势调查结果 (1991.11 月始)

处 理	(1)L	(2)LA	(3)LC
扦插株数	216	216	216
成活率%	81.5	87.2	95.1
扦插 30 天株高(cm)	11.6	10.3	12.0
扦插 60 天株高(cm)	13.6	14.2	15.7

从表 3 可见, 处理 (3) 试管苗扦插的成活率比处理 (1), 处理 (2) 分别高 13.6 和 7.9 个百分点, 从植株生长的高度也可看出, 处理 (3) 扦插后生长快、长势旺。

3.3.3 LC 培养不同品种不同生育期结薯情况

表 4 说明, 随着生产期的增长, 各品种的结薯率、单株薯重、单株结薯个数均逐渐增加, 增加多少因品种不同而表现出差异。

表 4 LC 培养不同品种及生育期小薯收获结果

品 种	生育期 (天)	结薯率 (%)	单株薯重 (g)	单株结薯 (个)	产薯个数比例(%)		
					<0.5g	0.5~2g	>2g
凉薯 97	50	91.3	0.49	0.97	50.23	49.77	0
凉薯 3	50	88.6	0.49	0.95	48.54	50.15	1.31
米拉	50	81.1	0.36	1.00	43.65	51.73	4.62
凉薯 97	61	95.7	0.80	1.10	45.37	51.85	2.78
凉薯 3	61	94.9	0.90	1.20	42.18	50.34	7.48
米拉	61	95.6	1.10	1.30	35.54	55.31	9.09
凉薯 97	71	97.0	1.10	1.20	34.46	48.65	16.89
凉薯 3	71	97.6	1.20	1.20	27.81	52.32	19.87
米拉	71	95.3	1.60	1.30	24.62	46.92	28.46

3.3.4 LC 培养夏季和秋季产小薯情况

秋季生产小薯产量高于夏季, 在秋季凉薯 97 产量达 2.18kg/m², 较夏季高 81.66%。三个品种在秋季平均产量为 2.0kg/m², 比夏季产量高 43.88% (见表 5)。

品种 5 个共 11 份材料采用电镜鉴定, 均未见病毒体, 又用指示植株物接种反应, 均表现正常。

4 讨 论

表 5 夏季、秋季生产小薯产量结果

季节	品种	生育期日数 (天)	小薯产量 (kg/m ²)
夏季	凉薯 97	71	1.20
	凉薯 3	71	1.31
	米拉	71	1.67
	\bar{x}	71	1.39
秋季	凉薯 97	75	2.18
	凉薯 3	75	2.01
	米拉	75	1.80
	\bar{x}	75	2.0

a. LC 培养基具有液固气三相一体的特征、特性。对热、水、气、养有较强的协调供应能力。棉纤维中空为毛管孔隙, 纤维之间是非毛管孔隙, 两种孔隙配合适当, 总孔隙度也较大。

b. 吸附是表面的一个重要性质, 任何两个相都可以形成表面。当气相或液相中某组分的分子, 在运动中碰到棉纤维 (固相) 表面时, 分子被吸附在表面, 并停留一定时间后解吸离开, 这时棉纤维表面的分子浓度增高。相间吸附作用, 主要受范德华力所致, 其特点为无选择性的全价吸附, 吸附速

3.3.5 脱毒试管苗病毒检测情况

1992 年, 我们对应用 LC 培养的试验
中国知网 <https://www.cnki.net>

度快, 脱附也快, 保持动态平衡, 并供给植株“候选”。棉纤维快速度的全价吸附与解吸, 实质上表现出良好的“保肥、供肥”功能。

c. 棉纤维是一个单细胞, 象一条不规则的扁平长带子, 细度一般为 5~7mg, 阔度 18~24 μ m, 长度 26~50mm。含 90% 的纤维素 $(C_6H_{10}O_5)_n$, 纤维素无色而难溶于水, 有亲水性, 不含有氮元素, 对氧化和加水分解有特殊的抗性, 且不起发酵作用。这特有的形态结构和理化性质, 使其具备较大的表面积, 以及较强的吸附能力、热稳定性和化学稳定性。LC 培养基中, 棉纤维柔软地均匀分布于基液中, 纤维丝的排列呈多维的, 有利于养分在各方向上的输运、交换。

d. 琼脂表现强酸性, 对蛋白质吸附极微, 分辨率高, 对液相组分分子是选择的吸附。固相与液相界面无明显分界, 吸附慢, 脱附也慢, 因而琼脂的表面性质不及棉纤维。

e. 植物细胞主要是吸收离子态的矿质元素, 离子的被动吸收, 是通过扩散、离子

交换、多伦 (Donnan) 平衡、蒸腾作用完成, 离子的主动吸收要求呼吸作用提供能量, 若供氧不足, 离子吸收量减少。LC 的供氧条件优于 L、LA。一根棉纤维本身就是完整的细胞, 被培养植物细胞与棉纤维细胞接合后, 棉纤维细胞便承担了根毛细胞被动吸收养分的部分作用。根毛细胞与棉纤维细胞偶合量愈大, 则棉纤维细胞被动吸收能力就愈强。因而, 有理由把棉纤维视为挂在根毛上的一条链, 该链成为了根毛进行物质交换的通道和“助手”。这种偶联关系, 可以把它假定为试管苗 LC 培养“根系扩展伺服系统”。

1992 年 1~12 月, 我们应用 LC 培养技术, 共成苗 32900 余瓶, 扦插在网室, 总面积为 816.44m², 共收获小薯 1511.97kg。折合单产 1.85kg/m², 单株结薯 1.84g。小薯粒重、单株产量、单位面积产量等均达到了控制技术指标。另外, 应用 LC 培养基的无菌室接种操作 LA 提高工效 42.8%, 并降低培养基药剂成本 26.7%, 节电耗 66.7%。

参考文献 (略)

STUDIES ON CULTURE TECHNOLOGY OF VIRUS-FREE POTATO SEEDLING PRODUCTION

Li Yan, Wang Chenghua and Yu Xianrong

(Xichang Institute of Agricultural Sciences)(Liangshan Autonomons Prefecture, 615000)

ABSTRACT

In this paper, the solid, liquid and solid-liquid media were compared for the production of *in vitro* plantlets. As a result, the culture technique of the liquid-solid carrier using cotton fibers was selected. In the end, the mechanism of extending root-system by the use of cotton fibers was set forth.

KEY WORDS: culture technology, *in vitro* virus-free potato seedling, liquid-solid carrier