

学术园地

用组培法诱导试管微型薯的研究

冉毅东 王 蒂 戴朝曦

(甘肃农业大学)

摘 要

用各种不同培养基对马铃薯四倍体、双单倍体栽培种及有结薯习性的野生种进行了试管微型薯诱导。在其它条件不变时,用食用白糖替代蔗糖可以获得同样的诱导效果,能大大降低成本。液体培养较固体培养效果好。BAP的诱导效果随基因型不同而异,但并不一定是必需的。香兰素补加到液体培养基中对提高诱导效果有一定作用。试验表明用MS加10%食用白糖或MS加10%白糖再补加一定浓度香兰素的液体培养基,在黑暗条件下室温于20~28℃培养是高效率生产试管微型薯较好的方法。

1 前 言

马铃薯是无性繁殖作物,尽管它本身通过有性生殖可产生实生种子,但由于其高度杂合分离,既不能作为种质加以保存,也不能直接用于生产。因而在过去种质只用块茎进行保存和繁殖。但是由于块茎积累病毒而导致的品种退化,给马铃薯种质保存和种薯生产带来很大困难,常常会使一些种质因严重退化而丧失。70年代后,随着组织培养技术的出现,人们开始用培养旺盛分裂的分生组织再分化苗的方法以剔除病毒,用无毒苗来保存种质和生产无毒种薯。然而由于试管苗保存时间较短,对培养条件要求较严格,需经常更换培养基,这不仅浪费人力、物力,而且在转移培养过程中常常会因污染而使有些材料丢失。用无毒苗生产无毒种薯又会遇到隔离区难找,而且无毒薯大调大运等

困难,很难在生产上大面积推广应用。80年代初Kim首先报道了用组培法诱导微型薯的方法^[1],为马铃薯种质资源保存、交换及无毒种薯的生产和运输提供了一条便利的途径。现在此法已被普遍采用,国际马铃薯中心已建立了一套用微型薯保存种质的完整体系^[2]。但是目前所用的培养基及方法仍存在一些问题,例如培养基成本高,方法过于复杂等不能满足大量生产无毒微型薯及大量保存种质资源的要求。本试验旨在提高试验微型薯的生产效率,在总结前人经验的基础上,通过比较和改进培养基,比较后发现了香兰素对微型薯诱导的作用,研究了不同培养基的诱导效应及不同基因型对不同培养基的反应。

2 材料和方法

2.1 材料来源

从甘肃农大农学系马铃薯课题组保存的

脱毒试管苗材料中选取部分四倍体、双单倍体及有结薯习性的野生种材料, 如下表所示。

表 1 试验所用的各种材料的类型及基因型

四 倍 体	双单倍体	野 生 种
86007	82-24	<i>S. demissum</i> (6x)
86004	82-32	
86024	82-75	<i>S. bulbocastanum</i> -1 (2x)
552	81-4	<i>S. bulbocastanum</i> -2 (2x)
京丰1号	83-48	
台湾红皮	84-37	
中 心 24	PB(5)4	

2.2 方法和步骤

2.2.1 用单节茎段繁殖壮苗

将取得的试管苗在无菌条件下切成茎段并转移到繁殖培养基(无激素的MS培养基, 3%蔗糖)上。用150 ml的三角瓶培养, 每瓶加50 ml液体培养基, 接5~10个茎段, 在22℃、1 000~3 000 lux的连续光照下培养3周, 培育成5个或10个壮苗。

2.2.2 块茎诱导

将所得壮苗转入不同固体培养基或在原瓶中加入50 ml诱导培养基, 并置于黑暗且室温20~28℃条件下培养, 4周后统计单瓶平均结块茎数, 块茎平均最大直径、结薯早晚等性状指标, 有以下几个试验。

a. 用食用白糖替代蔗糖诱导试验

本试验是在MS基本培养基+10 mg/升BAP^[3]及B₅^[4]+10 mg/升BAP的基础上作了加入10%蔗糖或10%白糖两种处理, 将先前培养的壮苗分别接种在相同浓度的白糖或蔗糖培养基上, 每种接3瓶, 每瓶5个苗, 然后在室温下(25℃左右)进行暗培养, 30天后进行统计。

b. 固体培养和液体培养对比试验 将不同基因型材料分别接种于不同培养基上, 培养成分见表2。

表 2 固体和液体培养基配方

培养基编号	培养基成分
液A	MS+10%白糖+10ml/l BAP
固A	MS+10%白糖+10ml/l BAP+10g/l 琼脂
液B	MS+10%白糖
固B	MS+10%白糖+10g/l 琼脂

c. BAP和香兰素对微型薯诱导效果试验 在MS和B₅加10%白糖的基本培养基(分固体和液体两种)上, 分别加入25、50和100 mg/升的香兰素和10 mg/升BAP, 其后过程及统计方法同试验1。试验结果用方差分析进行统计分析, 以确定不同试验的差异显著性。

3 结 果

3.1 食用白糖替代蔗糖试验

由表3可以看出对绝大多数基因型, 除了82-47在结薯期有明显差异(达5%显著水平)外, 加有白糖和蔗糖的MS或B₅培养基上在观察的3个性状上均无显著差异。

表 3 白糖和蔗糖在MS和B₅基本培养基中的对比*

基 因 型		MS		B ₅	
		10% 白糖	10% 蔗糖	10% 白糖	10% 蔗糖
860(4)	结薯期(天)	6	6	7	8
	块茎均数(个/瓶)	9.3	8.7	7.3	7.3
	平均直径(mm)	6.0	5.4	4.0	4.0
552	结薯期(天)	8	8	8	8
	块茎均数(个/瓶)	6.0	6.3	10.3	8.7
	平均直径(mm)	7.2	7.1	7.0	7.6
82-47	结薯期(天)	16	12	10	11
	块茎均数(个/瓶)	9.0	8.3	7.6	8.3
	平均直径(mm)	4.0	5.3	4.0	4.0

* 培养基中均各加10mg/l BAP

说明大多数基因型试管微型薯的生产对碳源的纯度要求不高, 因而以食用白糖替代蔗糖诱导微型薯是完全可能的。

3.2 固体培养和液体培养的诱导效果

从表4的资料可以看出, 无论是四倍体(京丰1号、中心24), 双单倍体(83-48、82-75), 还是3个野生种, 不同基因型材料在液1和液2两种液体培养基上诱导形成微型薯在块茎均数和块茎平均直径均显著地高于相应成分的固1和固2固体培养基, 说明采用液体培养对于诱导试管微型薯是有利的。

为了试验BAP对微型薯的诱导效应, 本试验只用了1个近年来文献中证明诱导微型薯最适合的浓度 $10\text{mg/l}^{[2,3,5,6,7,8]}$, 但从本试验结果看, 在大部分基因型中, 无论是在固体培养基上或液体培养基上, 加与不加BAP其块茎均数和平均直径的总平均数均无显著差异, 说明BAP不一定是必须的。但就表4中单个基因型而言, 对野生种*S. bulbocastanum*-1和*S. bulbocastanum*-2, BAP对其产生微型薯具有促进作用, 而京丰1号则相反, *S. demissum*在固体培养基上BAP对块茎数的效应也有负作用。

表4 不同培养基对试管微型薯诱导效果的比较

培养基	性状	基 因 型							平均数
		京丰1号	中心24	83-48	82-75	<i>S. demissum</i>	<i>S. bulbocastanum</i> -1	<i>S. bulbocastanum</i> -2	
液1	块茎均数(个/瓶)	9.3	15.2	12.3	15.3	7.7	8.6	8.7	10.9a
	平均直径(mm)	8.2	7.3	6.0	6.6	4.7	4.3	6.3	6.2A
固1	块茎均数(个/瓶)	8.3	3.3	10.0	10.3	4.0	8.3	4.0	6.9b
	平均直径(mm)	5.7	3.7	5.0	4.6	3.5	3.7	4.0	4.3B
液2	块茎均数(个/瓶)	19.7	13.6	9.7	14.0	7.3	5.0	6.3	10.7a
	平均直径(mm)	6.7	6.7	6.3	5.6	6.0	3.0	4.3	5.6A
固2	块茎均数(个/瓶)	15.7	5.0	10.3	7.3	8.0	3.3	3.0	7.5b
	平均直径(mm)	6.3	5.0	4.7	4.0	3.0	3.0	3.0	4.1B
平均数	块茎均数(个/瓶)	13.2a	9.2abc	10.6aL	11.7a	6.8bc	6.3lc	5.5c	
	平均直径(mm)	6.7a	5.7ab	5.5ab	5.2ab	4.3b	3.0b	4.4b	

注: 1. 培养基中1为MS+10%白糖+10mg/l BAP; 2为不加BAP
2. a、b、c字母不同时表示同一性状在不同培养基上5%水平上差异显著性或不同基因型在同一性状上5%差异显著; A、B字母不同表示平均直径在不同培养基上5%水平的差异显著

3.3 香兰素(Vanillin) 及不同培养基类型对诱导块茎的作用

表5列出了在B₅固体培养基上不同浓度香兰素对诱导微型薯的效应。无论四倍体552、台湾红皮和双单倍体84-37和PB(5)4在每瓶平均块茎数上与对照无显著差异, 而在块茎平均直径总均数上加有香兰素的比对

照显著增大, 且50mg/l以上的效应更好一些。在液体培养基中, 无论是B₅还是MS基本培养基, 对四倍体栽培种基因型在平均结薯数上加香兰素的比不加的对照具显著的增效作用, 而且以50mg/l和100mg/l最为明显(表6)。香兰素对双单倍体在块茎数上作用在液体状态下作用不明显。有些甚至无效应, 如81-4。而在块茎平均大小上香

表 5 在 B₅ 固体培养基上加不同浓度香兰素诱导微型薯效应比较

		552(4x)	台湾红皮(4x)	84-37(2x)	PB(5)4(2)C	平均数
25mg/l	块茎均数(个/瓶)	11.3	5.0	6.7	5.6	7.2a
	平均直径(mm)	4.3	3.0	5.3	5.3	4.5B
50mg/l	块茎均数(个/瓶)	8.7	4.6	5.3	4.0	5.7a
	平均直径(mm)	5.2	4.0	6.7	7.0	5.7A
100mg/l	块茎均数(个/瓶)	12.0	4.3	3.0	4.7	6.6a
	平均直径(mm)	4.7	4.6	6.8	7.8	5.9A
CK(不加)	块茎均数(个/瓶)	12.3	7.0	7.3	2.3	7.2a
	平均直径(mm)	4.3	3.3	5.0	3.0	3.1C
平均薯	块茎均数(个/瓶)	11.1a	5.2b	5.6b	4.2b	
	平均直径(mm)	4.6b	3.7b	6.6a	7.5a	

注: a、b、字母不同表示同一性状块茎均数不同处理间或同一性状不同品系间 5% 水平上差异显著;
A、B、C 字母不同表示平均直径性状在不同培养基上 5% 水平差异显著

表 6 香兰素及 BAP 在液体培养基中对块茎平均数的影响

基 本		基 因 型				
培 养 基	浓 度 (mg/l)	86007 (4x)	86024 (4x)	82-24 (2x)	81-4(2x)	82-3(2x)
B ₅	100	10.3a	12.3a	4.7a	0.1b	2.0
	50	8.3a	12.0a	6.3a	2.3a	2.6
	25	9.7a	10.7b	4.6a	0.1b	1.7
	0(CK)	6.3b	8.3b	5.3a	0.1b	—
	平均数	8.6a	9.3b	4.7a	2.0a	2.3
MS	100	9.0a	11.3b	4.7b	0.1b	7.0
	50	8.3a	12.3a	6.3b	0.1b	5.3
	25	5.7b	11.7b	2.0b	1.3b	4.7
	0(CK)	6.3b	10.7b	9.3a	0.1b	—
	平均数	7.0a	11.3b	6.3b	2.2a	6.6
总 平 均 数		7.9B	11.0A	5.5c	0.8b	

注: a、b、字母相同表示差异不显著, 字母不同表示在 5% 水平上差异显著;
A、B、C、D 字母不同表示基因型在 5% 水平上差异显著

兰素对四倍体和二倍体均无显著作用(表7)。从表 6、表 7 看出, 大多数基因型在块茎均数和块茎直径大小方面, 在 MS 中其平均值

均高于 B₅。在培养过程中也观察到在液体培养基上生长的试管苗叶片颜色比 B₅ 培养基要深绿一些, 而且保存时间也较长。

表 7 香兰素及 BAP 在液体培养基中对块茎直径的影响

基 本 培 养 基	浓 度 (mg/l)	基 因 型				
		86007 (4x)	86024 (4x)	82-21 (2x)	81-4 (2x)	82-3 (2x)
P ₅	100	6.0a	5.7a	4.0a	0 b	4.3
	50	6.0a	5.0b	4.3a	3.0a	3.0
	25	6.3a	5.3b	4.0a	0 b	3.0
	0(CK)	6.3b	7.0a	4.3a	0 b	—
	BAP 10	6.0a	6.3a	4.7a	4.6a	3.0
平 均 数		6.1	5.9	4.3	1.4	
MS	100	6.3a	6.0a	4.0b	0 b	3.0
	50	6.0a	7.3a	3.7b	0 b	4.3
	25	5.7a	6.7a	4.3b	3.0a	3.0
	0(CK)	6.3a	7.0a	6.0a	0 b	—
	BAP 10	5.7a	6.3a	5.0a	4.3a	3.3
平 均 数		6.0	6.7	4.6	1.5	
总 平 均 数		6.1A	6.3A	4.4B	1.4C	

注: a、b 字母不同表示处理间 5% 水平上差异显著;
A、B、C 字母不同表示基因型间 5% 水平上差异显著

不同基因型在诱导的微型薯的表现上是有差异的, 总的看来, 四倍体栽培种产生的微型薯在数量上要比二倍体双单倍体多, 直径上也大(见表 4、表 5、表 6、表 7), 而野生种在数量和大小上比四倍体和双单倍体要少(表 4)。

4 讨 论

在微型薯诱导中目前所用的培养基及其方法中作为碳源的蔗糖用量是相当大的, 一般约在10%左右^[2,3,5,6,7,8], 本试验结果(表 1)表明用等量食用白糖完全可替代昂贵的分析纯的蔗糖, 因而可节省大量经费, 提高微型薯生产的经济效益, 有利于此技术的普及和推广。

液体培养所产生的块茎数目多, 直径大, 有利于微型薯生产; 而固体培养基都有利于更长时间保存, 这与前人 Pilar 等^[6,7]

的许多试验结果是一致的。这可能是由于液体培养基更有利于培养外殖体吸收养料的缘故, 液体培养基还有配制容易、可节省琼脂用量、降低成本以及便于补加培养基等优点, 因而今后以快繁为主的微型薯生产应以液体培养为主, 而保存则以固体为主。

就 BAP 效应而言, 从表 3 看出尽管在总效应上加 BAP 与不加 BAP 无显著差异。由于 BAP 价格较贵, 若采用不加 BAP 的培养基对于多数基因型同样可获得较好效果, 这将对节约成本是有利的。但从单个基因型来讲, 其 BAP 对微型薯诱导除对京丰 1 号有明显抑制作用外, 对 *S. bulbocastanum*-1 和 *S. bulbocastanum*-2(表 4), 86007(表 6) 等结薯有促进作用。另外由表 6 看出, 尽管 BAP 对其它一些基因型无显著效益, 但对于不易结薯的 81-4 而言, 在两种培养基上都促进薯块形成, 说明 BAP 在不同基因型中对块茎的诱导起重要作用, 这

与陈善娜等^[7,8,9]结论是一致的。但其对于个别基因型如京丰1号等对块茎数目抑制作用可能是它所对BAP反应上比较敏感使体内产生的GA₃的水平较一般的种高而抑制块茎形成的缘故。这说明基因型与BAP有一定互作用。

近年来,国际马铃薯中心(CIP)推广最佳诱导块茎配方为MS^[7,9](液体)+500~700 ppm BAP+8%蔗糖,由于CCC及BAP等较贵,曾有人用廉价的香兰素代替CCC^[7,9]和用香豆素代替(CCC+BAP)^[11],以及用寡聚糖^[9]PP₃₃₃等替代物,推出一些廉价配方,本试验在应用食品香料作为防腐剂时偶然发现用廉价的香兰素[Vanillin]也是有与香豆素相近的效果,而且从结果看(表5、表6、表7)用50~100 mg/l香兰素+MS培养基对移栽四倍体种微型薯诱导具显著效果,说明它对于抑制培养植株中的GA₃水平具一定效应。但对双单倍体诱导效果则不明显,这可能与本试验所用香兰素浓度范围小、基因型数目少有关,这有待于进一步研究。另外对于香兰素作用机理及与BAP等配合使用效果及其在组织培养中的应用等也均有待于进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 Kim YC. *In vitro* tuber formation from proliferated shoots of potato (*Solanum tuberosum*) as a method of aseptical maintenance. Ph D Thesis south korea, 1982
- 2 Pilar Tovar *et al.* Induction and use of *in vitro* potato tuber. Circular 1985, 13(4): 1~5
- 3 Bo-jeu Wang and Ching-yeh Hu. *In vitro* mass tuberization and virus-free seed potato production in Taiwan. Am P J, 1982, 59: 33~37
- 4 Gambory O L, K A miller and K ojirra. Nutrient requirements of suspension cultures of Soybean root cells. Exp Cell Res, 1986, 50: 148~151
- 5 J Nowak and D Colborne. *In vitro* tuberization and tuber protitrants as indicator of heat stress tolerance in potato. Am. P. J. 1989, 66: 33~44
- 6 Rolando Lizarraga *et al.* *In vitro* conservation of potato germplasm at the international potato center. Am P J, 1989, 66: 253~263
- 7 Doelids J H *et al.* Improved methods for *in vitro* tuber induction and use of *in vitro* tubers in seed programs. International potato congress, 1988, 157~158
- 8 胡云海和蒋先明.不同糖类加BAP对马铃薯(*S. Tuberosum*)试验薯影响.马铃薯杂志, 1989, 4: 203~206
- 9 陈善娜等.香豆素和蔗糖素在无病毒马铃薯试管薯诱导及氨基酸分析.全国植物生理第五次会议论文摘要汇编. 1990
- 10 Stephen Kwiatkowski *et al.* Serial microtuber for mation as a longterm conservation method for *in vitro* potato germplasm. Am P J, 1988, 65: 369~375

A STUDY ON INDUCING MICROTUBERS FOR *IN VITRO* POTATO GERMPLASM

Ran Yidong, Wang Di and Dai Chaoli

(Agronomy Department, Gansu Agricultural University)

ABSTRACT

Microtubers were induced from 6 tetraploid cultivars, 7 dihaploids and 3 wild species in different mediums. The same efficiency could be achieved by using sugar in place of sucrose without changing any other contents in the medium.

(下转 208 页)

STUDIES ON THE PATTERNS OF PHOTOSYNTHATE DIURNAL VARIATION IN POTATO HIGH YIELD POPULATION PLANTS

II. NON-REDUCING SUGAR CONTENT AND ITS DIURNAL VARIATION

Men Fanyi, Liu Mengyun and Sun Guoqin

(Inner Mongolia College of Agriculture and Animal Husbandry)

ABSTRACT

The diurnal variations of non-reducing sugar content in leaves and stems of both high yield and common yield population plants show the parabolic change, that is high in daytime and low at night. Both non-reducing sugar content and its diurnal variation range in stems increase with growth. In general, the non-reducing sugar content and its diurnal variation in both population tubers show similar trend, that is high at night and low in daytime.

The content of non-reducing sugar is lowest in both population leaves throughout the growing period. The content of non-reducing sugar is highest in tubers at early-middle stage, but highest in stems at late stage.

(上接198页)

This could greatly reduce the cost of microtuber production. The effect of BAP varied with genotypes of potato germplasm, but it was not essential. Vanillin could improve the effect of microtuber inducing. The result indicated that it was a better method to produce microtuber by using medium consisting of MS, 10% sugar and 50~100 mg/l vanillin in a dark environment at the temperature ranging from 20 to 28℃.