

译文

马铃薯种质的组织培养、快速繁殖、保存和出口

N. Espinoza, R. Estrada, P. Tovar, J. Bryan & J. H. Dodds

(国际马铃薯中心, 秘鲁利马)

可用组织培养的方法来繁殖、保存和交换马铃薯的种质。组织培养可以在短期内快速地无性繁殖大量的小植株, 同时能在节省用地和劳力的情况下, 保持马铃薯的种质。由于离体培养物是无病的, 并在可控条件下能保持马铃薯的种质, 因此极有利于马铃薯种质国际交换。

本文叙述了在马铃薯中心(CIP)应用的组织培养技术的优点、方法和材料情况, 并讨论分生组织剥离、快速繁殖、长期保存和试管种质出口的技术。

1. 组织培养技术的优点

国际马铃薯中心保存收集了无性系马铃薯种质6000个, 为育种工作者在马铃薯改良计划中提供丰富多样的基因资源。收集来的种质资源在田间保存要花费昂贵的成本, 而且会遭受很大的风险, 如病害侵染, 或恶劣气候的影响。在试管中保存这些收集来的种质资源与田间常规方法相比, 有以下几个优点。

- (1) 节省劳力开支;
- (2) 避免田间感染;
- (3) 避开恶劣环境, 如雹和霜;
- (4) 易将材料进行快速繁殖;
- (5) 易除去材料中的病源;
- (6) 材料能终年繁殖和出口。

目前正在进行将马铃薯种质转入试管内(组织培养)的工作。经若干年³将完成此事。

本文将循着如图1所示的思路, 即从分生组织培养、快速繁殖、贮存和最后出口等进行叙述。

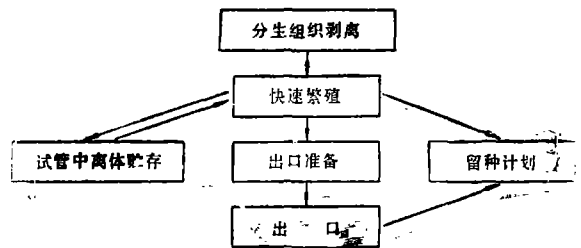


图1. 表示试管苗最终出口前所经过的步骤

2. 分生组织剥离

植物茎尖生长点为分生组织, 是由快速分裂细胞(分生细胞)所组成的小器官, 由于它具有下列三个优点, 所以是马铃薯茎繁殖的理想起始材料。

(1) 离体分生组织在培养中遗传上稳定, 而不像在有些情况下如无分离分生组织结构的愈伤组织那样产生严重的遗传变异。

(2) 离体茎尖能减少组织中病毒侵染

量, 在适当的条件下, 能被用来完全除去病源。

茎尖分生组织部分包括了真正的分生细胞及其周围的叶原基和初生叶片。因为稍有分化的维管组织离分生组织较远, 靠近茎的较老组织。叶原基的维管成分还很年幼, 尚未与茎的维管系统的主干相接触, 所以存在于维管系统的病毒颗粒只有通过从细胞到细胞的移动才能到达茎尖分生组织区。这就是为什么在病毒侵染的植物中, 分生组织随着接近茎尖和腋芽, 病毒浓度逐渐减低的原故。

原则上, 这种情况对所有作物都同样, 所不同的仅是分生组织和叶原基的形状不一样。是不是有其它因子, 如分生组织细胞产生了病毒抑制物质, 或培养基中的激素影响, 在分生组织培养的除去病毒中起作用, 还未得到证实。

分离茎的顶端部位(叫做茎尖分生组织), 无菌条件下在适宜的无菌培养基上培养, 诱导出小植株, 原则上这个发育过程类似在整体植物中的过程, 分生组织细胞分裂和组织继续分化。植株离体部分的营养由人工培养基供给, 这个技术叫做分生组织培养。大约在30年以前被 Morel 和 Martin 在大丽花上首次应用(1952), 它能产生出无病植株。

分生组织的无菌切离是一种精细的操作, 需要若干小时的实践, 切离的程序按以下步骤进行:

把茎切成段, 每段含有一个带有腋芽的节, 小心地去掉叶片, 用70%酒精消毒半分钟, 接着用2.5%的次氯化钙泡15分钟, 用无菌蒸馏水洗4次, 以洗净次氯化钙。

在双筒解剖镜下, 切割和去掉生长点周围的叶片, 直到只剩顶端和少量叶原基。切下生长点和两片叶原基, 接种到A培养基上, 每星期转移1次新鲜培养基。6~8周

后, 把小植株转移到大试管, 有利于以后生长。当植株长到4厘米高时, 便能开始快速繁殖。

3. 快速繁殖

快速繁殖的目的, 是要在一个短周期内得到大量的无性系植株。国际马铃薯中心进行马铃薯快速繁殖采用以下两种方法:

(1) 节切段

从试管小植株切下带叶的1个节, 小心地去掉大叶片, 然后将单个节接种到有琼脂的固体培养基B的表面上, 腋芽将会很快地长出。3~4个星期内, 将有6~7个有效节可供转移。

(2) 振荡培养

把试管内的小植株切割成小段, 每段带有3~4个节, 去掉大的叶片, 然后将这些带有节的切段放到15毫升液体培养基F中, 在瓶中振荡(每分钟80转), 2~3个星期后出现快速生长, 每个瓶中将有60或70个节段。

一旦产生了适当数量的小植株, 就要使其生根, 并移栽到不经灭菌的条件下。

发根并转移到不经灭菌的条件下, 从试管苗切下的单节, 去掉大叶, 将节接种到固体培养基B上诱导生根。当小植株长到3~5厘米高并长出完整的根系时, 就可以用于移栽。将带根植株移栽于装有适宜的混合肥土的花盆或苗床里, 注意不要伤根, 保证使根和土壤接触良好。在移栽后的最初几天, 保持植株有高的相对湿度的环境条件。

4. 贮存和长期保存

只要注意避免污染, 并隔适当时间将其转移到新鲜培养基上去, 离体材料就可以无限期地培养下去, 鉴定的原种就可保存。以备将来需要时用。

短期贮存, 植株可生长在装有B或D培养基的试管内。试管用高压灭菌的塑料盖塞住。棉花塞子容易被真菌侵入而导致堵塞污

染。这种方法虽适于短期保存, 但不宜介绍作中期或长期保存。

小植株生长的速度取决于培养温度、培养基成分和植株的品种。因此, 为了长期保存就要求改进培养基和培养温度。

C和D两种培养基能产生渗透压效应, 降低植株的生长速度并产生短节间。因此, 可在25℃下保存中采用。当保存物需要繁殖时, 大量的节是很有用的。在这些条件下进行保存, 每年只需转管1次。

然而, 使用C培养基, 可将温度降到8℃, 这显著地减慢植株生长速度。在这样的条件下保存, 只需每隔二、三年转管1次。

所以, 在上述条件下保存收集来的种质是可能的。一旦需要出口某种特殊基因型时, 就可从贮存条件下取出来并进行快速繁殖。

5. 试管装运

收集来的经病源鉴定的种质可以试管苗的方式出口到别的国家。从快速繁殖得到许多单节切段, 并接种到装有E培养基的试管中。当试管小植株长到2厘米高, 并具有发育良好的根系时, 装有小植株的试管经小心包装进行空运。用电传或电报将空运单号码通知收件人, 买主就可收到。每一货物上附一纸片(说明收到后如何处理)和一张检疫证。同时, 有一张返回国际马铃薯中心的卡片, 以详细说明到达后的情况。

用这种方法收到的试管苗可以移栽到装有肥土的花盆中, 或进一步进行快速繁殖。

现在试管装运的苗都是2厘米高, 但现在正研究试管块茎来补充或代替这种方法。这些非常小的、无菌的、无病块茎能在培养中诱导产生。收到的国家能较容易处理, 而且更便于运输。试管块茎的诱导及其重要性在另一篇专门技术文献中介绍。

6. 培养基

本试验所用培养基, 都是在MS培养基的基础上的, 一般分无机盐、硫酸镁、铁盐、维生素四部分来准备母液。

(1) 无机盐(10倍浓度的母液) 每份加200毫升蒸馏水

硝酸铵33g;

硝酸钾38g;

氯化钙8.8g;

磷酸二氢钾3.4g;

硼酸0.124g;

硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0.446g

或($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.338g;

硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.172g

或($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.1228g;

碘化钾0.0166g;

钼酸钠0.005g;

硫酸铜0.0005g;

氯化铜0.0005g。

总量=2000ml。

(2) 硫酸镁(100倍浓度的母液)

硫酸镁3.7g在100ml蒸馏水中。

(3) 铁盐(100ml母液)

Na_2EDTA 0.745g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.557g。

把 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶解在20ml蒸馏水中;
 Na_2EDTA 在20ml蒸馏水中加热。再将 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 Na_2EDTA 混合, 冷却, 加水至100ml。

(4) 维生素(100ml母液)

盐酸硫胺素40mg在100ml蒸馏水中。

培养基的制备: 1立升MS基本培养基的制备是用以上的母液按以下的比例混合在一起。

无机盐 100ml;

硫酸镁10ml;

铁盐5ml;

维生素1ml。

加入有关激素和蔗糖类(参看下面)。

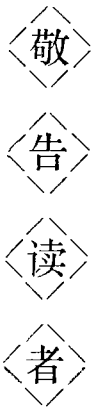
培养基加或不加琼脂。121℃，15磅/时²压力下，高压消毒15分钟。

不同类型的培养基是在 MS 基本培养基上加入以下添加物：

培养基	MS培养基 + 以下添加物	培养基	MS培养基 + 以下添加物
A	0.25ppm 赤霉素	E	0.25ppm 赤霉素
	2.00 ppm 泛酸钙		2.00ppm 泛酸钙
	3%蔗糖		3%蔗糖
	0.6%琼脂		1%琼脂
B	0.25ppm 赤霉素	F	0.40ppm 赤霉素
	2.00ppm 泛酸钙		0.50ppm 卡基喹啉
	3%蔗糖		0.01ppm 萘乙酸
C	0.8%琼脂		2.00ppm 泛酸钙
	4%甘露醇		2%蔗糖
	3%蔗糖		
D	0.8%琼脂		
	4%甘露醇		
	0.5%蔗糖		
	0.8%琼脂		

(译自 Specialized Technology Document 1, CIP 1984)

夏肖仇 译
陶国清 校



本刊是由中国作物学会马铃薯专业委员会、东北农学院、黑龙江农学院和内蒙古农科院联合主办的国内独
国马铃薯专业科学技术刊物。现为限
国内发行，拟于一九八八年下半年开
始向国内外公开发行人。

本刊主要开设如下栏目：

《学术园地》、《研究简报》、《文
献综述》、《经验交流》、《工作研究》、
《纵观世界》、《调查、考察报告》、
《讲座》、《科技信息》、《译文》、《品
种介绍》。请作者按如上栏目内容，
踊跃为本刊撰稿。来稿一经刊用，本
刊即按国家有关规定付酬。

一切来稿，均应书写工整，字迹
易于辨认，图表要设计合理，绘画规
范。文稿中如有照片要用原黑白片，
千万不要用复印件。来稿要写清作者
所在单位，包括详细地址。

来稿请寄：哈尔滨市香坊区东北
农学院马铃薯杂志编辑部。

· 本刊编辑部 ·