

Tube Seedling of Virus-Free Robust Technology of Potato

Tinghao Qin, Xiaomei Li, Yunjun Huang, Jun Zhang, Cui Yang

Sichuan Province Plant Engineering Research Institute, Zizhong Sichuan
Email: thqin99@sina.com

Received: Nov. 8th, 2015; accepted: Nov. 27th, 2015; published: Dec. 1st, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Based on the modified 1/2 MS medium, different doses of plant growth retardants B9 are added in different stages in rapid propagation of virus-free potato plantlets with lower temperature and light condition, which can significantly change the physiological indices of plantlets. Tests show that at 23°C and above 2200 lx light, B9 (4 - 8 mg·L⁻¹) added in potato rapid propagation phase effectively promotes the increase of virus-free plantlets in stem diameter, the number of stem and root, the thickening of leaves, dark green leaves, and successive cycles down to 14 - 18 d. If B9 (10 - 15 mg·L⁻¹) is added in the medium for virus-free seedlings before transplanting at 21°C and 3000 lx light, the virus-free plantlets have more robust stems, relatively shorter internodes and higher degree of stem wood; the survival rate reaches 97% per cent.

Keywords

Potato, Tube Seedling, Robust Technology

马铃薯脱毒试管苗壮苗技术

秦廷豪, 李晓梅, 黄运军, 张 军, 阳 翠

四川省植物工程研究院, 四川 资中
Email: thqin99@sina.com

收稿日期: 2015年11月8日; 录用日期: 2015年11月27日; 发布日期: 2015年12月1日

摘要

以改良1/2 MS为基础培养基,在马铃薯脱毒试管苗组培快繁不同阶段加入不同剂量的植物生长延缓剂B9,配合较低温度和强光条件培养,能够显著改变试管苗的生理指标。试验表明:在23℃和2200 lx以上光照下,马铃薯快繁阶段添加(4~8 mg·L⁻¹)的B9,有效促进脱毒试管苗茎径、有效茎节数及根数的增加,并且叶片增厚、叶色浓绿,继代周期减到14~18 d,在脱毒苗移栽前的培养基内加入(10~15 mg·L⁻¹)的B9,21℃和3000 lx下培养,脱毒试管苗其茎变得更粗壮、节间较短、茎木质化程度更高,移栽成活率达97%以上。

关键词

马铃薯, 试管苗, 壮苗技术

1. 引言

马铃薯脱毒及种薯生产体系的建立从根本上解决了马铃薯种薯退化的问题,而脱毒试管苗的快繁是整个体系中极其关键的环节之一。采用传统培养基进行马铃薯脱毒试管苗的生产容易出现试管苗生长过旺、苗茎径细小、节间长、叶小、“烧尖”及须根较多等现象,这不仅影响了脱毒苗继代接种、移栽的工作效率更降低了脱毒苗的繁殖系数及移栽成活率,因此开展脱毒试管苗促壮研究,从而培育健壮、优质脱毒试管苗显得尤为重要。

现今有关马铃薯脱毒试管苗增殖、促壮的技术,主要是通过传统培养基中添加植物生长调节剂来实现。植物生长调节剂6-苄氨基嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)、激动素(KT)、比久(B9)、矮壮素及烯效唑及大量元素被证明对马铃薯脱毒试管苗的生长有一定影响作用[1]-[5],其中植物生长延缓剂B9被广泛证明有抑制试管苗徒长,增加试管苗茎粗,提高有效茎节数及扩大光合叶面积等作用[6]-[10]。马铃薯组培过程中,加入植物生长调节剂的浓度需根据组培的目的作相应的调整,单一的培养基配方很难兼顾增殖和壮苗的要求。本研究在现有马铃薯组培技术基础上,通过培养条件(温度和光照强度)的优化,开展精细化的脱毒试管苗促壮技术研究,在马铃薯试管苗不同繁殖期加入不同浓度的B9,在增殖环节,形成易于识别的有效茎节数量,从而提高繁殖系数和工作效率;在出瓶移栽前,形成有效叶片数量的健壮苗,提高移栽成活率,改变一个配方一用到底的情况,旨在为同行进行马铃薯组培时提供借鉴。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 试验材料

马铃薯脱毒苗“费乌瑞它”、“米拉”由四川省植物工程研究院生物所经块茎脱毒获得。

2.1.2. 基础培养基

为改良1/2 MS:含有950 mg·L⁻¹ KNO₃, 825 mg·L⁻¹ NH₄NO₃, 100 mg·L⁻¹ KH₂PO₄, 185 mg·L⁻¹ MgSO₄, 220 mg·L⁻¹ CaCl₂, 微量元素、维生素和肌醇同MS。大量元素、微量元素等常规试剂为国药集团化学试剂有限公司的分析纯;B9为Bio Basic Inc.产品,纯度>85%。

2.2. 方法

2.2.1. 基础试管苗

马铃薯脱毒苗经过两个周期的MS0培养,保证试管苗外源激素水平为0。试验用培养基均加入30

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, $5.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂粉, 调节培养基 PH 为 5.8, 在 23°C 、 2200 lx 下, 12 h/d 培养。

2.2.2. 培养温度优化

将来源基本一致的试管苗随机接入基础培养基中, 每瓶接入 15 个节茎材料, 分别放置于 21°C 、 23°C 和 25°C 三个不同温度处理, 每个处理 10 瓶, 三次重复, 2200 lx 下培养, 15 d 调查其株高、茎径、有效节茎数等生理指标。

2.2.3. 光照强度优化

将来源基本一致的试管苗随机接入基础培养基中, 每瓶接入 15 个节茎材料, 每个处理 10 瓶, 三次重复, 在 23°C 下分别放置于 1500 lx 、 2200 lx 和 3000 lx 下进行培养, 15 d 调查其株高、茎径、有效节茎数等生理指标。

2.2.4. B9 对生长的影响

将试管苗切成含一个有效节茎的外植体, 正向插入加含有不同浓度($0\sim 25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) B9 的基础培养基内, 为减少试验误差, 来源于同一母瓶的试管苗尽可能的接入不同处理的培养基中, 尽可能保证每个处理含有不同节位的试管苗外植体, 每瓶接入 10 苗, 每个处理 20 瓶, 三次重复, 15 d 后统计脱毒苗茎长、茎径、有效叶片数, 根长、根数等生理指标, 以 MS0 为对照。

有效叶片: 指试管苗叶片大于 2 mm^2 ($2 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$) 的叶片。

有效节茎: 指至少含有一个有效叶片且茎段长度大于 10 mm 的茎节。

2.2.5. 炼苗移栽

将瓶苗从培养室转移到室外(移栽场所)散射光下自然炼苗 5 d, 揭盖炼苗 1 d, 从根部剪掉试管苗根须, 冲洗净培养基, 于 1000 倍 75% 多菌灵中浸泡 10 min 后, 移栽入珍珠岩: 蛭石 = 1:10 的基质中, 每处理移栽 100 苗, 浇足定根水后覆膜, 每天喷施 0.1% 磷酸二氢钾 2 次, 15 天后统计成活率。

2.2.6. 数据处理

有效叶片、有效茎节、根条数用目测计数, 株高、根长和茎径用游标卡尺测量; 调查统计结果用 DPS vision 7.0 软件, Duncan 新复极差法进行分析。

3. 结果与分析

3.1. 培养温度对试管苗生长的影响

温度对马铃薯试管苗生长的作用主要表现在试管苗接入的前期, 较高的温度促进试管苗腋芽萌发并快速生长, 抑制根的形成和叶片产生, 导致形成纤细的试管苗, 试验结果见表 1: 温度对试管苗株高、茎径和有效节茎数的影响三个处理均存在显著或极显著差异, 随温度的升高, 试管苗株高有较大幅度的增加, 茎径和有效节茎数明显减少, 25°C 及以上形成的苗较弱, 不宜进行快繁, 21°C 和 23°C 处理除有效节茎数外都达及显著水平, 23°C 下能得到较多的有效节茎数量, 适合于继代增殖培养, 21°C 下能形成更为健壮的苗, 适合于出瓶移栽前的培养。

3.2. 光照强度对试管苗生长的影响

从表 2 可以看出, 随光照强度的增加, 试管苗的株高降低, 有效节茎数增多, 茎径变粗, 即试管苗变得更加健壮, 叶色浓绿, 三个处理间除有效节茎外差异达显著, 而 2200 lx 与 3000 lx 之间除株高外差异并不显著, 均可用作增殖和出瓶培养时的光照, 综合能耗因素, 采用 2200 lx 作为马铃薯快繁的光照。

3.3. B9 浓度对脱毒试管苗生长影响

按每个有效茎节为一个外植体正向插入含有不同浓度 B9 的改良 1/2 MS 培养基中, 于 23℃, 2200 lx 光照条件下培养 15 天, 调查脱毒苗茎长、茎粗、有效叶片数, 根长、根数, 在不同 B9 浓度下马铃薯各项生理指标如下表 3、表 4 所示。

从试验结果可以看出(表 3、表 4)B9 的加入改变了脱毒试管苗的生理指标, 随着 B9 浓度的增加, 试管苗的高度缩短, 茎径增大, 有效叶片数增多, 根系发达即根数和根长度均增加。同时可以看出 B9 对不同马铃薯品种试管苗的影响存在差异: B9 对“费乌瑞它”高度的抑制作用非常明显, 各浓度与对照的差异达显著水平, 较低浓度(4~8 mg·L⁻¹)与较高浓度(10~15 mg·L⁻¹)的差异也达显著, 除对照外各浓度 B9 对茎粗、叶片数、根长和根数的影响较小或达显著差异水平。B9 对“米拉”试管苗高度、有效叶片数、根长和根数的影响与费乌瑞它不同, 较低浓度(4~8 mg·L⁻¹)与较高浓度(10~15 mg·L⁻¹)的差异不明显, 而对茎

Table 1. Influence of temperature on the growth of plantlets Favorita 15 d
表 1. 温度对费乌瑞它试管苗生长的影响 15 d

处理(温度℃) Treatment	均株高/mm height	有效茎节数 effective stem	茎径/mm diameter of stem
21	60.5c C	5.4a A	0.98a A
23	75.6b B	5.9a AB	0.86b B
25	90.7a A	4.5b B	0.72c C

Table 2. Effect of illumination intensity on the growth of *in vitro* 15 d
表 2. 光照强度对试管生长影响 15 d

处理(光照lx) Treatment	均株高/mm height	有效茎节数 effective stem	茎径/mm diameter of stem
1500	83.3a A	4.87a A	0.82a A
2200	76.6a AB	5.4a A	0.84b B
3000	57.5b B	5.5a A	0.93b B

注: 1500 lx、2200 lx、3000 lx 分别对应 1 根灯管、2 根灯管和 3 根灯管。

Table 3. Effect of different concentration of B9 on potato “Favorita” virus-free seedling growth 15 d
表 3. 不同 B9 浓度对马铃薯“费乌瑞它”脱毒苗生长的影响 15 d

B9/ mg·L ⁻¹	生理指标/physiological target				
	茎长/mm length of stem	茎径/mm diameter of stem	效叶片数/个 effective leaf	根长/mm length of root	根数/条 quantity of root
0(ck)	78.89a	0.7515c	8.13b	51.3757c	4.0614b
2	69.609b	0.9195b	8.3741b	60.875abc	4.898ab
4	66.4227bc	0.9818a	8.9927b	55.1413bc	5.558a
6	60.0551c	1.0068a	10.2482a	66.6217ab	5.0861ab
8	58.878c	0.9814a	10.0625a	72.6853a	5.042ab
10	46.7209d	0.9738ab	10.45a	61.325abc	5.0317ab
15	39.4528de	0.9639ab	10.4778a	63.475ab	5.401a
20	37.8222e	0.9782ab	10.049a	63.176ab	4.932ab
25	33.45f	0.9983a	9.9532a	62.178abc	4.903ab

径的影响差异达到显著水平。

根据组培目的不同, 综合而言, 较低浓度(4~8 mg·L⁻¹)的 B9 能够有效抑制试管苗生长, 获得较多的有效叶片数即有效茎节数, 可以用于增殖培养; 而较高浓度(10~15 mg·L⁻¹)的 B9 可以获得更加健壮的试管苗, 可以用于促壮培养。

3.4. B9 浓度对脱毒苗移栽的影响

将不同 B9 浓度处理的两种脱毒马铃薯试管苗按方法 4 进行处理, 15 d 后各马铃薯试管苗成活率如下表 5、表 6 所示: 试管苗的成活率与 B9 浓度呈正相关, 即试管苗越健壮其成活率越高, 考虑到高浓度(>20 mg·L⁻¹)的 B9 所形成的试管苗本身较矮, 同时高浓度的 B9 可能对其后期生长存在的风险, 选择(10~15 mg·L⁻¹)的 B9 浓度作为马铃薯试管苗壮苗培养更为理想, 其成活率能达到 97% 以上。

4. 讨论

(1) 在大量预试试验的基础上筛选出改良 1/2MS 作为基础培养基, 适合于费乌瑞它和米拉的培养, 有利于形成健壮的试管苗。崔翠等[9]的研究表明, 因品种的差异, 可使用 MS 和 1/2MS 作为基本培养基, 较低浓度的大量元素和微量元素利于株高增加, 与本研究存在一致性。

Table 4. Effect of different concentration of B9 on potato “Mira” virus-free seedling growth 15 d
表 4. 不同 B9 浓度对马铃薯“米拉”脱毒苗生长的影响 15 d

B9/mg·L ⁻¹	生理指标/physiological target				
	茎长/mm diameter of length	茎径/mm diameter of stem	有效叶片数/个 effective leaf	根长/mm length of root	根数/条 quantity of root
0 (ck)	76.8a	0.7521c	6.7805c	48.4993b	3.8409c
2	77.8a	0.8204b	7.2586c	64.6397a	4.4479abc
4	70.28ab	0.8319b	8.64b	65.2794a	4.699abc
6	66.6545b	0.8398b	9.41ab	62.4567a	4.7289ab
8	63.1066b	0.8669b	9.828a	68.1a	4.8843a
10	61.4961bc	0.9709a	9.6576ab	67.4383a	4.9174a
15	59.9652bc	0.961a	10.0655a	56.855ab	4.9123a
20	51.7836d	0.9366a	10.2744a	67.146a	4.78ab
25	48.5504d	0.9399a	10.546a	65.37a	4.532bc

Table 5. Effect of different concentration of B9 on the “Favorita” transplanting survival rate
表 5. 不同 B9 浓度对“费乌瑞它”试管苗移栽成活率的影响, 单位%

成活率	B9/mg·L ⁻¹								
	0	2	4	6	8	10	15	20	25
	83	89	92	95	94	100	97	96	100

Table 6. Effect of different concentration of B9 on the “Mira” transplanting survival rate
表 6. 不同 B9 浓度对“米拉”试管苗移栽成活率的影响, 单位%

成活率	B9/mg·L ⁻¹								
	0	2	4	6	8	10	15	20	25
	80	84	89	95	94	97	98	100	100

(2) 光照和温度对马铃薯试管苗的影响比其它植物更为敏感, 低光照(<1500 lx)和较高温度(>25℃)都会导致继代后试管苗腋芽快速萌发抽生, 形成纤细的试管苗, 并抑制叶片生长和根的形成, 本研究在 2200 lx~3000 lx 光照、21℃~23℃下培养, 得到健壮试管苗, 这与[11] [12]形成类似的结果。

(3) 研究表明[1]-[12], 马铃薯的组培快繁依靠基础培养基就能完成, 而培育健壮苗则依赖于植物生长调节剂, 而分裂素类(如 6-BA、KT)和生长素类(如 NAA)物质的作用非常有限[3] [9], 被广泛证明能抑制试管苗徒长并对马铃薯后期生长无明显影响的是植物生长延缓剂 B9 [3] [6] [12], 但其使用浓度在 5 mg·L⁻¹~100 mg·L⁻¹, 与本研究 4 mg·L⁻¹~15 mg·L⁻¹的浓度存在很大的差异。虽然上述各研究所提供的 B9 产品的纯度较为接近, 但厂家不同, 针对的马铃薯品种各异, 应该引起研究者的足够重视。

(4) 马铃薯快繁属微扦插方式, 其繁殖系数取决于试管苗所能提供的有效茎节数而非丛芽数, 因此形成健壮的继代苗是快繁的关键, 而现有的研究只注重健壮苗的培育, 缺乏针对性的研究。本研究打破马铃薯组培快繁过程一个培养基使用到底的习惯, 开展针对性的试验, 尤其加强对增殖壮苗过程的试验研究, 通过调节增殖、壮苗阶段生长延缓剂 B9 的用量, 提高试管苗内在质量, 在继代快繁环节, 以提高有效茎节数(株高)为主来提高繁殖系数和效率; 进入出瓶移栽环节, 以增大叶片面积、茎径和适度株高为主, 提高移栽成活率, 促进马铃薯后期生长, 达到提质增效的目的。

(5) 试验证明在“费乌瑞它”和“米拉”两个马铃薯品种的增殖培养阶段加入 4~8 mg·L⁻¹的 B9, 在 23℃ 2200 lx 12 h/d 下培养, 能够有效促进脱毒试管苗茎径、有效茎节数及根数的增加; 在脱毒苗移栽前加入 10 mg·L⁻¹~15 mg·L⁻¹的 B9, 在 21℃ 3000 lx 12 h/d 下培养, 脱毒试管苗茎变得更粗壮、节间较短、茎木质化程度更高, 移栽成活率达 97%以上。该试验结果是否适用于其它马铃薯品种, 有待进一步研究。

基金项目

四川省科研院所成果转化项目 12010123。

参考文献 (References)

- [1] 李云海, 陈丽华, 陶仁艳, 等. 马铃薯试管苗壮苗培养基的筛选[J]. 现代农业科技, 2012(22): 65-66.
- [2] 郑萍, 朱淑婉, 王火旭. 马铃薯试管苗促壮研究[J]. 北方园艺, 2008(1): 186-188.
- [3] 赵光磊, 吴凌娟, 张雅奎, 等. 马铃薯脱毒试管苗壮苗培养体系的优化[J]. 2012, 26(4): 199-205.
- [4] 高军. 几种植物生长调节剂对马铃薯试管苗生长的影响[D]: [硕士学位论文]. 青海: 青海大学, 2008.
- [5] 田新华. 马铃薯新品种试管壮苗培育的研究[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006.
- [6] 许端祥, 陈文辉, 陈庚. B9 对马铃薯试管苗培养的效应研究初报[J]. 福建农业科技, 2004(6): 19.
- [7] 李玉梅, 王强, 李玲. B9 对脱毒马铃薯试管苗的影响[J]. 西北园艺, 2003(1): 7-8.
- [8] 祁彦丰, 王玲. B9 在脱毒马铃薯试管苗上的应用效果[J]. 中国马铃薯, 2006, 20(4): 219-221.
- [9] 崔翠, 王季春, 何凤发, 等. 不同 MS 和 B9 浓度对马铃薯脱毒试管苗生长的研究[J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(5): 414-418.
- [10] 黄萍, 马朝宏, 颜谦. 植物生长延缓剂 B9 对马铃薯试管苗生长的影响[J]. 西南农业学报, 2011, 24(5): 1719-1721.
- [11] 曹君迈, 任贤, 贝鑫临, 等. 光照强度对克新 5 号脱毒试管苗生长的影响[J]. 种子, 2011, 2(30): 104-105.
- [12] 陈凯, 刘颖, 卢月霞. 培养基与光照强度对马铃薯脱毒试管苗组培快繁的影响[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(9): 1628.