

# 马铃薯茎尖分生组织试管苗再生体系的建立

丁运华, 吴天灵, 陈兆贵

(惠州学院 生命科学系, 广东 惠州 516007)

**摘要:** 文章探讨了如何建立马铃薯茎尖分生组织试管苗的再生体系, 包括外植体的获得、分生组织的切取和培养、茎尖分生组织诱导成苗以及快速繁殖等研究。实验共切取和培养110多个马铃薯茎尖。实验结果表明, (1) 切取的茎尖当直径在0.3-0.6mm之间, 并带有2-4个叶原基时成活率较高。(2) 培养马铃薯茎尖分生组织的适宜培养基为MS+0.5mg/L IAA+0.1mg/L GA+0.04mg/L KT, 茎尖易成活, 也易分化出苗。(3) 茎尖培养在温度为24-26℃, 光照2000-2500 lx, 每天光照12-15h的培养条件下, 将生长得更好。

**关键词:** 马铃薯; 组织培养; 茎尖; 再生体系

**中图分类号:** Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-5934(2006)06-0051-05

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 在生产上长期使用无性繁殖, 生育期内易感染多种病毒病, 造成品种退化, 品质变劣, 品种使用寿命大为缩短。目前, 尚没有有效的药物防治马铃薯病毒病, 而利用茎尖分生组织培养, 结合热处理方法培养脱毒马铃薯, 是提高马铃薯产量和品质的首选方法<sup>[1-2]</sup>。目前法国、美国、英国、荷兰、加拿大、日本等种薯生产较先进的国家都采用茎尖培养生产脱毒种薯。国内李云海等<sup>[1]</sup>、赵佐敏等<sup>[3]</sup>、金辉<sup>[4]</sup>等也对马铃薯茎尖培养生产脱毒种薯进行了研究。近年来惠州地区马铃薯栽培面积不断扩大, 由于当地生产的薯种普遍带有病毒, 因此每年必须从内蒙古等地区引进大量的马铃薯脱毒薯种来满足生产的需要, 而由引进薯种生产的继代薯种种性易退化, 品质变劣, 经济效益和生产效益显著低下。开展马铃薯茎尖培养获得脱毒苗的研究, 逐步建立适合惠州地区生产需要的马铃薯脱毒苗再生体系, 培育并推广适合本地生产需要的马铃薯脱毒薯种有着重要的现实意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

本研究所用马铃薯种薯由惠东县九华农贸公司提供, 品种为粤引85-38。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 由马铃薯种薯获得外植体

方法一:

选择生长健壮、无病虫害的马铃薯块茎种植于育苗盘或花盆中, 待植株长到20cm高时, 即可切取茎尖。

方法二:

选择生长健壮、无病虫害的马铃薯块茎, 沙床催芽15天。待有大量的芽产生时, 将其取出, 用清水清洗干净, 之后将其置于阴暗而不太潮湿的环境中, 1个月后, 薯块的芽将更多和具有更好的潜在长势。待薯块上的芽长到5cm左右的小植株即可用于实验, 摘除顶端的花芽和茎尖, 促进侧芽生长, 以获得更多

收稿日期: 2006-04-03

基金项目: 惠州市科技计划项目(2005947)

作者简介: 丁运华(1966-), 女, 湖南沅江人, 副教授, 主要从事植物组织培养、生物化学的教学和研究工作。

的顶端分生组织。

### 1.2.2 茎尖分生组织的获得和接种

茎段灭菌: 先把茎段置入 75% 酒精的烧杯中浸泡 10 秒, 接着用 0.1% 升汞浸泡 15min、最后用无菌水清洗 3 次, 之后放到有过滤纸的灭菌培养皿中, 吸水待用。

切取茎尖: 通过双筒显微镜目镜观察, 一只手用镊子夹住茎段, 另一只手用解剖刀小心的把包住茎尖的幼叶切掉, 当茎尖裸露时及时并准确的用解剖刀切取带有 2-4 个叶原基的茎尖, 马上进入下一步。在该操作过程中, 要随时按需要调整显微镜的焦距, 这时动作不能过大, 防止染菌。

茎尖接种: 切取的茎尖用解剖刀粘取, 快速小心地接种到培养基中。

### 1.2.3 茎尖分生组织的培养

以 MS 培养基作为基本培养基, 采用的不同激素浓度如表 1 所示:

表 1 培养茎尖分生组织的不同培养基激素浓度

单位: mg/L

培养基	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	IAA (mg/L)	GA	KT
P1	—	—	0.5	0.1	—
P2	0.1	0.1	—	0.05	—
P3	—	—	0.5	0.1	0.04
P4	0.5	—	0.1	0.1	—

将培养茎尖分生组织的培养基置于光照培养箱中, 温度设置在 24-26℃ 之间, 光照 1000-3000 lx, 每天 12-15h。约 2-3 个月可获得马铃薯试管苗。

### 1.2.4 试管苗再生体系的建立

把经过茎尖分生组织培养获得的小苗, 切成带 1-2 个侧芽或顶芽的茎段, 转接于快繁培养基上, 待新的小苗长至 10cm 左右时 (约 2-3 周), 再转接进行下一次扩繁。快繁的固体培养基为: MS + 0.25mg/L GA<sub>3</sub> + 0.1mg/L NAA + 0.5mg/L 6-BA + 3% 蔗糖 (或市售白糖) + 0.7% - 0.8% 琼脂, pH 为 5.8。

### 1.2.5 实验统计方法

茎尖分生组织成活率 = (成活的茎尖个数/接种的茎尖个数) × 100%

茎尖分生组织成苗率 = (分化出苗的茎尖个数/成活的茎尖个数) × 100%

## 2 结果与分析

### 2.1 由马铃薯种薯获得外植体

在由马铃薯种薯获得外植体的实验中, 马铃薯切块很容易被细菌侵染, 平均 5 个切块只有 3 块能最终长出植株, 因此, 若是利用马铃薯切块获取顶端分生组织, 应对土壤进行消毒处理, 同时在切块伤口撒上草木灰, 并放置半天左右, 待伤口干燥愈合后才进行播种。

### 2.2 茎尖分生组织的获得和接种

对马铃薯种薯进行栽培共获得茎尖数约 150 多个 (含腋芽顶端分生组织), 而切取一个茎尖并接种到培养基上的平均时间约为 4min, 由于茎尖切取的操作过程较为精细, 操作时间也较长, 操作中茎尖易被解剖针或解剖刀弄伤, 也易因操作时间过长造成茎尖失活, 而最终成功接种的茎尖数为 110 多个。

### 2.3 不同培养基下茎尖分生组织的成活情况

表2 不同培养基下茎尖分生组织的成活情况

培养基	接种茎尖数	成活数	成活率 (%)
P1	33	13	39.3
P2	8	5	62.5
P3	33	23	69.7
P4	36	19	52.7

P2 和 P3 的培养基茎尖成活率显然较高, P4 较低, 而 P1 最低。对比 P1 和 P3 培养基, P3 比 P1 多添加了 KT 激素, 此外, P3 主要是在光照培养箱中培养, 而 P1 则在一般室内环境中培养, 据此推测, 添加 KT 也许是有利于茎尖成活的。另一方面, P2 和 P3 对茎尖成活都有很好的效果, P2 使用的生长素是萘乙酸 (NAA), P3 则用的是吲哚乙酸 (IAA), P3 培养基还添加了 KT。

#### 2.4 不同大小的茎尖分生组织的成活情况

表3 不同大小的茎尖分生组织的成活情况

茎尖叶原基数 (个)	茎尖平均直径 (mm)	接种茎尖数	成活数	成活率 (%)
0	0.1	1	0	0
1	0.3	11	5	45.5
2	0.4	57	34	59.6
3	0.6	21	16	76.1
≥4	0.7	12	9	75

研究结果发现: 茎尖剥离直径大小以 0.3 - 0.6mm 为宜, 其成活率和成苗率都较高, 同时也为再生体系建立后脱毒苗的获得奠定坚实基础, 茎尖平均直径越小, 成活率越低, 茎尖平均直径越大, 虽然容易成活, 但不能很好的脱去马铃薯病毒。叶原基则以保留 2 到 4 个为宜, 若茎尖的叶原基数少于 2 个, 则成活率明显较低, 也难成苗。相反, 叶原基数多于 4 个时, 虽然容易成活, 但也不能很好的脱去马铃薯病毒。

#### 2.5 不同培养条件下茎尖分生组织的生长

表4 两种不同培养条件下茎尖分生组织的生长

培养条件			培养基	接种茎尖数	成活数	成活率 (%)
温度 (°C)	光强 (lx)	光照时间 (h/d)				
室温	< 2000	10 ~ 12	P1	20	10	50
室温	< 2000	10 ~ 12	P2	4	2	50
室温	< 2000	10 ~ 12	P3	10	7	70
24 ~ 26	2200	12 ~ 15	P1	13	6	46.2
24 ~ 26	2200	12 ~ 15	P2	6	3	50
24 ~ 26	2200	12 ~ 15	P3	30	21	67.7
24 ~ 26	2200	12 ~ 15	P4	36	19	52.7

结果表明: 两种培养条件下, 平均成活率分别为 56.7% 和 54.15%, 两者在茎尖成活方面不存在较大

的差异,然而温度在 24℃ - 26℃,光照 2000 - 2500lx,每天光照 12 - 15h 的培养条件下,茎尖生长良好,表现为叶原基伸长,基部膨大,部分能够分化成苗,而在室温、< 2000lx 的光强和 10 - 12h/d 的培养条件下则生长缓慢,茎尖长时间呈一绿点,例如从直径 0.4mm 长到 1 - 2mm 后,很少有继续生长,时间一长,甚至会褐化死亡。

## 2.6 试管苗的增殖

外植体培养约 3 个月左右, P3 和 P4 有较好的成苗效果, P1 和 P2 的成苗率低。

表 5 不同培养基下茎尖分生组织的成苗率

培养基	成活茎尖数	成苗数	成苗率 (%)
P1	6	0	0
P2	3	0	0
P3	21	2	9.5
P4	19	2	10.5

共从茎尖分生组织中成功诱导出 4 棵苗,并已对其中 2 棵苗成功增殖出 10 棵苗,在增殖过程中,苗被分成 3 个带侧芽的茎段,并分别培养在 MS + 0.25mg/L GA<sub>3</sub> + 0.1mg/L NAA + 0.5mg/L 6-BA 的培养基中,结果表明,在该培养基下,3 个茎段生长良好,尤以带顶端分生组织的茎段生长最快,这可能是由于顶端分生组织生长较快的缘故。



图 1 试管苗快速繁殖一

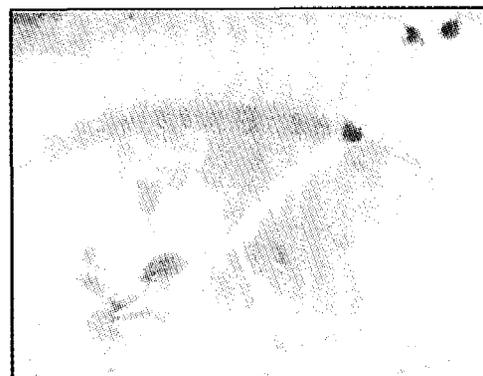


图 2 试管苗快速繁殖二

## 3 讨论

### 3.1 马铃薯种植获得外植体

在马铃薯种植过程中,发现采用方法二可获得更多的茎尖,方法二中对马铃薯切块进行催芽处理在与马铃薯脱毒相关的研究中大多有报道过,然而,在催芽后若继续种植生长,则块茎中的芽生长不旺盛,可能出现徒长的现象,茎干长而不茂盛,可获茎尖就少,方法二中,对已经打破休眠的种薯再进行放置处理,将出现更多和更壮的芽,之后再种植时,植株生长相当旺盛,可获取茎尖也多,而该处理在国内也未见报道过。

### 3.2 培养条件对茎尖分生组织生长的影响

在马铃薯茎尖分生组织的培养过程中,发现茎尖的生长对培养条件要求较高,在温度为 24℃ - 26℃,光照 2000 - 2500lx,每天光照 12 - 15h 的条件下,茎尖生长良好,表现为叶原基伸长,基部膨大,部分能

够分化成苗, 该结论与林蓉等<sup>[4]</sup>的研究及国内大多相关报道结论一致。

### 3.3 影响茎尖分生组织诱导成苗的因素

通过实验, 发现影响茎尖分生组织诱导成苗的因素很多。首先, 在茎尖大小方面, 适宜取平均直径在 0.2–0.6mm 之间, 带有 2 至 4 个叶原基的茎尖, 太小的茎尖难成活, 即使成活也不易分化, 太大虽然易成活, 但难于去除病毒。该结论与林蓉等和李云海, 何云昆等的研究结论一致, 其次, 培养条件对茎尖分生组织诱导成苗有较大的影响。另外, 培养基中的激动素 KT 与吲哚乙酸 IAA 和赤霉素 GA 的配合有助于提高茎尖成活率和成苗率, KT 的存在可能有利于茎尖细胞的分裂, 从而使茎尖更易成活。在祝红艺等<sup>[5]</sup>研究的 KT 与 NAA 对马铃薯组培苗生长的影响中, 提及到 KT 对马铃薯组培苗生长的影响, 但 KT 对马铃薯茎尖成活的影响国内未见报道。

#### 参考文献:

- [1] 李云海, 何云昆, 张仲凯, 等. 通过茎尖分生组织离体培养获得马铃薯脱毒试管苗 [J]. 西南农业学报, 1994, 7 (2): 28–31
- [2] 林蓉, 谢春梅, 谢世清. 马铃薯茎尖脱毒培养关键因子分析 [J]. 中国农学通报, 2005, 21 (7): 338–340
- [3] 赵佐敏, 艾勇. 马铃薯组培脱毒试管苗繁育技术 [J]. 中国马铃薯, 2003, 17 (5): 301–304
- [4] 金辉. 马铃薯脱毒试管苗组培快繁及脱毒种薯的生产技术 [J]. 贵州农业科学, 2002, 30 (2): 29–31
- [5] 祝红艺, 柴岩, 刘小凤, 等. KT 与 NAA 对马铃薯组培苗生长的影响 [J]. 河北农业科学, 2000, 4 (2): 7–9

【责任编辑: 王国莉】

## The Establishment of Regeneration System of Potato Plantlets In Vitro from Potato Stem – Apex Meristem

DING Yun-hua , WU Tian-ling, CHEN Zhao-gui

(Life Science Department , Huizhou University , Huizhou 516007 , Guangdong China)

**Abstract:** In this paper, how to establish the regeneration system in vitro from potato tip meristem is studied, including the planting method, tip meristem isolation and culture, seedlings induction and rapid propagation. In the experiment, more than 110 potato Stem – apex were isolated and cultured. The results showed that, (1) When the size of the Stem – apex is between 0.3 mm and 0.6 mm and carry 2–4 leaf primordiums, the survival rate of Stem – apex is higher. (2) The suitable culture medium for stem – apex is MS + 0.5mg/L IAA + 0.1mg/L GA + 0.04mg/L KT, which enables Stem – apex to have comparative higher survival rate and differentiate well (3) Cultured in 24℃ ~ 26℃, 2000 ~ 2500 lx, and 12 ~ 15 h per day, the Stem – apex will grow better.

**Key words:** potato (*Solanum tuberosum* L); tissue culture; stem – apex; regeneration system