

pH 值、灭菌条件和凝固剂对马铃薯组培苗生长的影响

刘芳¹, 陈广侠¹, 孔海明², 马蕾¹, 杨煜¹, 郭晓¹, 杨晓慧¹, 董道峰¹, 杨元军¹

(1. 山东省农业科学院蔬菜花卉研究所/山东省设施蔬菜生物学重点实验室/

国家蔬菜改良中心山东分中心, 山东 济南 250100;

2. 国家马铃薯工程技术研究中心/乐陵希森马铃薯产业集团有限公司, 山东 乐陵 253619)

摘要: 为改善马铃薯组培苗的生长状态, 本试验以 Favorita 组培苗为材料, 研究培养基 pH 值、凝固剂和灭菌条件对马铃薯植株生长的影响。结果表明, 在 120℃ 灭菌 20 min 的培养基上, 植株生长较好。培养基 pH 值为 5.5 时, 植株最高, 叶片数最多。植株在 5.0 g/L 车前子胶的培养基上生长健壮, 干物质积累量最多。车前子胶培养基的渗透压最高, 其凝胶强度仅为琼脂培养基的 36.14%。

关键词: 培养基; 灭菌条件; 车前子胶; 马铃薯组培苗

中图分类号: S532.01 文献标识码: A 文章编号: 1001-4942(2019)03-0053-05

Effects of pH Value, Sterilization Conditions and Jelling Agent Plantasan on Growth of Potato Plantlet

Liu Fang¹, Chen Guangxia¹, Kong Haiming², Ma Lei¹, Yang Yu¹,
Guo Xiao¹, Yang Xiaohui¹, Dong Daofeng¹, Yang Yuanjun¹

(1. Institute of Vegetables and Flowers, Shandong Academy of Agricultural Sciences/Shandong Key Laboratory of Greenhouse Vegetable Biology/Shandong Branch of National Vegetable Improvement Center, Jinan 250100, China;

2. National Engineering Research Center for Potato/Laoling Xisen Potato Industry Group Co., Ltd., Laoling 253619, China)

Abstract In order to improve the growth vigor of potato plantlet, the plantlets of cultivar Favorita were used as materials to investigate the effects of pH value, jelling agents and sterilization conditions on the growth of potato plantlets. The results showed that the plantlets grew better on the medium sterilized at 120℃ for 20 min. The plant height and the number of leaves were higher at pH 5.5. Compared with the agar medium, the plantlets grew more robustly and the dry matter accumulation was higher on the 5.0 g/L plantasan medium. Moreover, the plantasan medium had the highest osmotic pressure, and the gel strength was only 36.14% of that of the agar medium.

Keywords Medium; Sterilization condition; Plantasan; Potato plantlet

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.) 是我国第四大作物, 随着脱毒种薯大面积推广应用, 脱毒组培苗的规模化繁殖与保存也发展迅速。但近年来伴随

马铃薯组培苗繁殖代数的增加, 一些不良症状逐渐显现, 表现在植株退化、生长势减弱、叶片出现生理性愈伤状凸起等。目前解决这些问题的主要

收稿日期: 2018-12-03; 修回日期: 2019-02-22

基金项目: 山东省农业良种工程项目“马铃薯新品种培育与示范”(2016LZGC006); 山东省现代农业产业技术体系薯类产业创新团队(SDAIT-16-05)

作者简介: 刘芳(1979—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为马铃薯育种与种薯脱毒。E-mail: liufangcau@163.com

通讯作者: 杨元军(1969—), 男, 博士, 研究员, 研究方向为马铃薯育种与种薯脱毒。E-mail: yangyuanjun@263.net.cn

措施: 将组培苗移栽至防蚜网棚或温室, 使其恢复生长状态, 在确保无病毒侵染的前提下, 取健壮茎尖组培, 再繁殖茎尖产生的脱毒组培苗; 优化组培苗培养环境, 适当降低温湿度, 红蓝光培养时, 增加 LED 460 nm 蓝光比例; 调整培养基组分。这些措施综合应用, 可有效使马铃薯组培苗复壮。其中调整培养基组分是易于控制和调节的环节。培养基组分除糖和无机盐外, 还有凝固剂。前人在调整培养基矿质元素和碳源种类与浓度方面已有较多研究^[1-3]。常用培养基凝固剂有琼脂、卡拉胶、结冷胶等^[4], 车前子胶作为一种常规凝固剂替代品已逐渐进入研发者视线, 该凝固剂不仅成本低, 而且其凝胶状态具有较低的渗透势, 对培育壮苗有利, 现已用于板蓝根^[5]、姜黄^[6]、烟草^[7]、香蕉^[8]等物种组培中^[9, 10], 但在马铃薯组培中的应用尚未见报道。本试验研究培养基的灭菌条件及琼脂、卡拉胶和车前子胶对组培苗生长的影响, 以期筛选出较优的培养基灭菌条件和培养基凝固剂, 从而为马铃薯组培苗的保存、快繁和壮苗培育提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

生长 20 d 的 Favorita 脱毒组培苗。

1.2 试验设计

以 MS 培养基为基础培养基, 添加不同的凝固剂, 在不同条件下灭菌。具体培养基配制如下:

(1) pH = 5.8, 灭菌时间 20 min, 灭菌温度分别为 110、115、120、125、130℃。

(2) pH = 5.8, 灭菌温度 120℃, 灭菌时间分别为 10、15、20、25、30 min。

(3) 灭菌温度 120℃, 灭菌时间 20 min, pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0。

(4) pH = 5.8, 灭菌温度 120℃, 灭菌时间 20 min, 车前子胶分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 g/L。

(5) pH = 5.8, 灭菌温度 120℃, 灭菌时间 20 min, 琼脂分别为 4.0、5.0、6.0 g/L。

(6) pH = 5.8, 灭菌温度 120℃, 灭菌时间 20 min, 卡拉胶分别为 3.0、4.0、5.0、6.0 g/L。

将灭菌后的培养基充分破碎后, 于 4 000 r/min 离心 10 min, 取 10 μL 上清液, 利用 WES-

COR Vapro 5520 露点渗透压仪(美国)测定渗透压, 每处理重复 3 次。

将灭菌后的培养基置于 SMS TA.XT Plus 质构仪(英国)上, 选择 P0.5 探头进行测试, 测试速率为 0.5 mm/s, 测后速率为 10 mm/s, 记录凝胶破裂时的最大力, 并根据探头截面积得到凝胶强度, 每处理重复 3 次。

选择生长一致的马铃薯组培苗, 去掉顶芽, 切成含有 1 cm 左右的茎段, 每段留一个腋芽、一片叶。将其接种到不同配比的灭菌培养基上, 每瓶接 6 段, 每处理 6 瓶, 重复 5 次, 接种 20 d 后统计各处理生长情况, 测定株高、叶片数(每株)、地上部鲜重和干重(每瓶)、地下部鲜重和干重(每瓶)。

2 结果与分析

2.1 培养基的不同灭菌温度对组培苗生长的影响

组培苗株高、叶片数随着培养基灭菌温度的升高呈先上升后下降的趋势。在 120℃ 时, 株高最高, 达到 8.36 cm, 叶片数最多, 达到 7 片。地上部鲜重也呈上升趋势, 在 120℃ 和 130℃ 时, 地上部鲜重较高(图 1)。马铃薯植株在 120℃ 灭菌的培养基上生长情况最好。

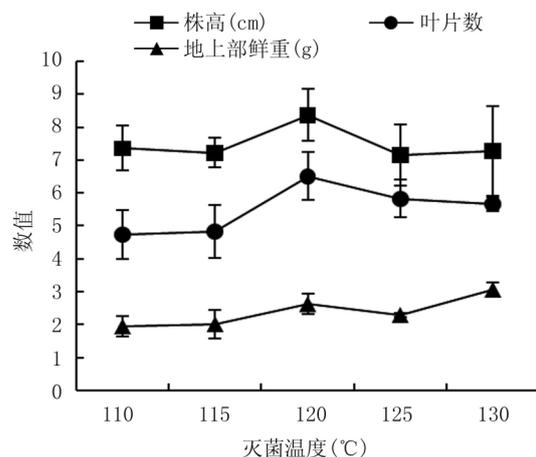


图 1 马铃薯组培苗在不同灭菌温度培养基上的生长情况

2.2 培养基的不同灭菌时间对组培苗生长的影响

由图 2 可以看出, 随着培养基灭菌时间的延长, 组培苗的株高呈上升趋势, 叶片数略微下降, 地上部鲜重变化不明显。在灭菌时间为 20 min 和 25 min 时, 株高超过 10.40 cm。在培养基灭菌

时间为 20 min 时,马铃薯植株生长情况较好。

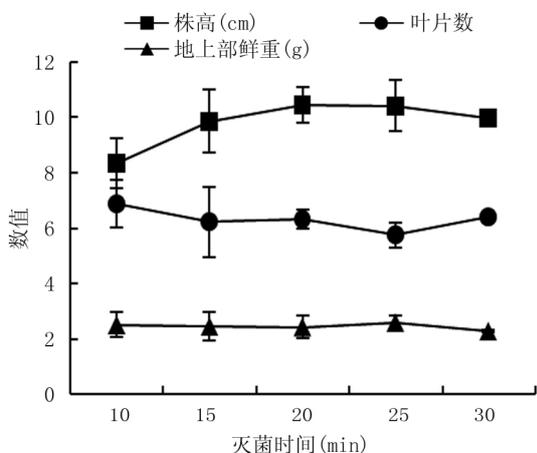


图2 马铃薯组培苗在不同灭菌时间培养基上的生长情况

2.3 培养基的不同 pH 值对组培苗生长的影响

培养基 pH 值为 4.0、4.5 和 5.0 时不能凝固,无法接种组培苗。当 pH 值处于 5.5~7.0 时,组培苗株高随着培养基 pH 值的升高呈先下降后上升的趋势,叶片数呈下降趋势,地上部鲜重变化不明显。在 pH 值达到 6.5 时,植株最矮。在 pH 值为 5.5 和 6.0 时,植株较高,叶片数较多(图 3)。

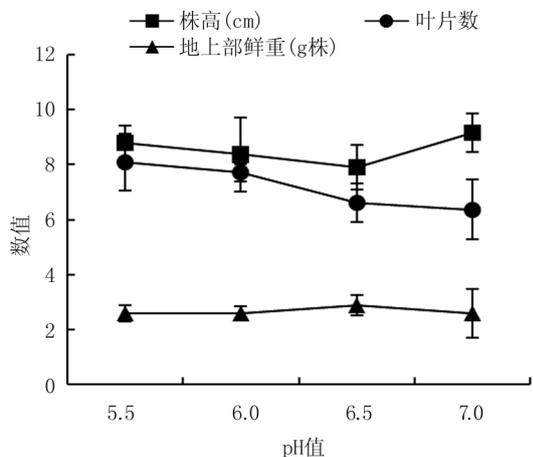


图3 马铃薯组培苗在不同 pH 值培养基上的生长情况

2.4 培养基中的不同凝固剂对组培苗生长的影响

2.4.1 车前子胶含量对组培苗生长的影响

随着培养基中车前子胶含量的升高,组培苗株高和地上部鲜重呈明显的下降趋势。叶片数呈先上升后下降的趋势。由于叶片数变化不明显,所以地上部鲜重的增加源于株高的增加。在培养基中车前子胶含量达到 5.0 g/L 时,植株最高。此时地上部鲜重明显高于其它处理,比 9.0 g/L 和 12.0 g/L 时分别增加 131.69% 和 157.50% (图 4)。

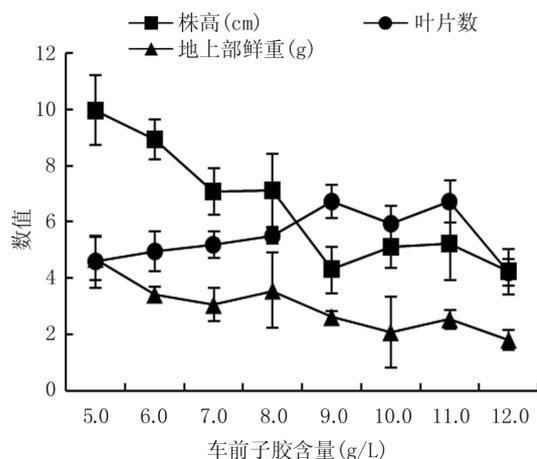


图4 马铃薯组培苗在不同车前子胶含量培养基上的生长情况

2.4.2 培养基的不同琼脂含量对组培苗生长的影响

由图 5 可以看出,在琼脂为 4.0~6.0 g/L 的培养基上,随琼脂含量的升高,组培苗株高和叶片数呈先上升后下降的趋势,地上部鲜重略微上升。在琼脂含量为 5.0 g/L 时,株高和叶片数达到最大值,分别较 6.0 g/L 时增加 13.53%、12.10%。

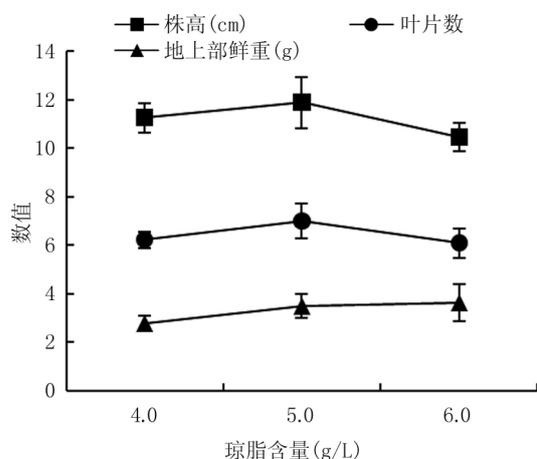


图5 马铃薯组培苗在不同琼脂含量培养基上的生长情况

2.4.3 培养基的不同卡拉胶含量对组培苗生长的影响

在卡拉胶为 3.0~6.0 g/L 的培养基上,随卡拉胶含量的升高,组培苗株高和地上部鲜重呈先上升后下降的趋势。叶片数变化不明显,因而地上部鲜重的增加源于株高的增加(图 6)。

2.4.4 培养基中不同凝固剂对组培苗生长的影响

为研究培养基中不同凝固剂对马铃薯组培苗生长的影响,选取马铃薯生长情况较好的不同凝固剂的培养基,即琼脂含量为 5.0 g/L,卡拉胶含量为 4.0 g/L,车前子胶含量为 5.0 g/L 的培养基,

接种马铃薯茎段,比较植株的生长情况,结果见表 1。在不同凝固剂的培养基上,组培苗的生长情况不同。在含卡拉胶的培养基上植株最高,在含车前子胶的培养基上最矮。在含琼脂培养基上,植株叶片数最多,在含车前子胶培养基上最少。在含车前子胶培养基上马铃薯植株地上部和地下部鲜重最高,在含卡拉胶培养基上次之,在含琼脂培养基上最低。地上部和地下部干重与地上部和地下部鲜重的变化是一致的。

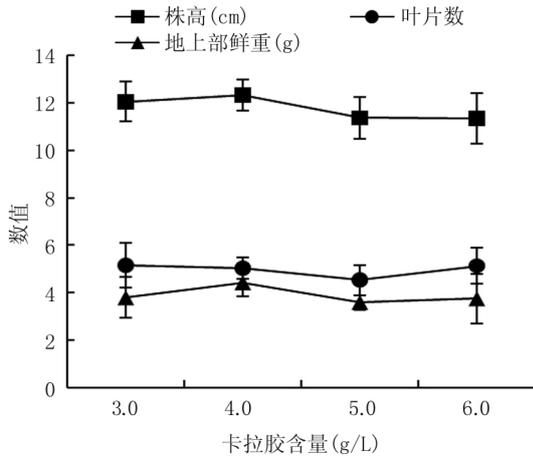


图 6 马铃薯组培苗在不同卡拉胶含量培养基上的生长情况

表 1 马铃薯组培苗在不同凝固剂培养基上的生长情况

凝固剂	株高 (cm)	叶片数	鲜重 (g)		干重	
			地上部	地下部	地上部 (g)	地下部 (mg)
琼脂	11.88±1.06	7.00±0.72	3.52±0.51	0.64±0.14	0.26±0.03	57.00±7.30
卡拉胶	12.33±0.65	5.03±0.46	4.43±0.60	0.79±0.04	0.32±0.03	70.35±4.90
车前子胶	9.95±1.23	4.58±0.97	4.70±0.77	1.14±0.12	0.46±0.06	92.25±11.95

为分析不同凝固剂培养基上植株生长不一致的原因,本试验测定了不同凝固剂培养基的渗透压和凝胶强度。结果表明,不同凝固剂培养基的渗透压和凝胶强度差异明显(表 2)。含车前子胶培养基的渗透压最高,含琼脂培养基渗透压最低,两者相差 104.00 mmol/kg。含车前子胶培养基凝胶强度最小,是含琼脂培养基凝胶强度的 36.14%;

表 2 不同凝固剂培养基的特性

凝固剂	渗透压 (mmol/kg)	凝胶强度 (g/cm ²)	凝胶破裂距离 (mm)
琼脂	166.33±4.73	79.46±5.03	2.06±0.20
卡拉胶	169.33±4.51	23.36±1.94	0.92±0.10
车前子胶	270.33±2.08	28.72±0.41	5.09±0.31

含车前子胶的培养基凝胶破裂距离最大,为 5.09 mm,是含卡拉胶培养基的 5.53 倍、含琼脂培养基的 2.47 倍。

3 讨论与结论

培养基灭菌温度 120℃、灭菌时间 20 min 时,马铃薯植株生长情况较好。灭菌时间和时间会影响培养基的营养,不恰当的灭菌时间和时间甚至会对培养物产生毒害^[11,12]。此试验结果与目前生产中用的参数一致,说明导致组培苗长期继代退化的主要原因与此无关。

培养基 pH 值为 5.5 时,马铃薯组培苗植株较高,叶片数较多,生长状态最佳。pH 值高低会影响组培苗对矿质元素的吸收。同时也会影响培养基的凝固,培养基酸性越强,越不易凝固^[13]。该结果较目前卡拉胶采用 pH = 6.0 的低,可对规模化培养基配制提供参考。

车前子胶对马铃薯组培苗生长影响较大,可明显降低植株高度、减少茎节数、促进根系生长,增加干物质含量积累。这主要与车前子胶的成分有关。车前子胶的主要成分是多糖和部分单糖,含有 D-木糖、L-阿拉伯糖、D-半乳糖醛酸、D-半乳糖、D-甘露糖、海藻糖等^[14-16]。而糖会影响渗透压的变化,改变培养基的渗透压可以调控马铃薯组培苗的生长^[17]。因此,含车前子胶培养基多糖含量高,引起渗透压增加,从而使组培苗株高降低、植株粗壮,进而增加了植株干物质积累量。此外,本研究中含车前子胶培养基凝胶强度低,有利于根的伸长,促进了营养的吸收。

本试验中,含琼脂和卡拉胶的培养基上,组培苗植株较高;在含卡拉胶的培养基上,植株叶片数明显多于含琼脂和车前子胶的培养基。而在含车前子胶的培养基上,植株的物质积累量最高。与琼脂和卡拉胶培养基相比,车前子胶培养基上植株生长健壮,但株高较矮。基于以上研究结果,可以根据生产或试验需要,选择不同的凝固剂,或将车前子胶与琼脂、卡拉胶按不同比例混合,用于组培苗快繁、种质资源试管苗保存、以及需要低渗透势的花药胚状体诱导,或胚性愈伤诱导(用于细胞悬浮培养)。另外,车前子胶价格较低,在繁殖组培苗时替代琼脂可以降低生产成本。

参 考 文 献:

- [1] 刘志文,陈阳,侯英敏. 不同培养基和培养条件对脱毒马铃薯快繁生长的影响[J]. 中国农学通报, 2011, 27(24): 179-182.
- [2] 刘道敏. 不同糖分含量对马铃薯试管苗生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(26): 11275-11276.
- [3] 罗智敏,王炳君,李成彤,等. 卡拉胶和琼脂为固定物对马铃薯脱毒组培苗生长的影响 [J]. 中国马铃薯, 1997, 11(2): 73-75.
- [4] Arregui L M, Veramendi J, Mingo-Castel A M. Effect of gelling agents on *in vitro* tuberization of six potato cultivars [J]. American Journal of Potato Research, 2003, 80(2): 141-144.
- [5] Saglam S, Cifci, C Y. Effects of agar and isubgol on adventitious shoot regeneration of woad (*Isatis tinctoria*) [J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2010, 12(2): 281-285.
- [6] Tyagi R K, Agrawal A, Mahalakshmi C, et al. Low-cost media for *in vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers [J]. In Vitro Cell Development Biology-Plant, 2007, 43(1): 51-58.
- [7] Ozel C A, Khawar K M, Arslan O. A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on *in vitro* shoot regeneration and rooting of variety Samsun of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 2008, 117(2): 174-181.
- [8] Agrawal A, Sanayaima R, Tandon R, et al. Cost-effective *in vitro* conservation of banana using alternatives of gelling agent (isabgol) and carbon source (market sugar) [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2010, 32(4): 703-711.
- [9] Bhattacharya P, Dey S, Bhattacharyya B C. Use of low-cost gelling agents and support matrices for industrial scale plant tissue culture [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1994, 37(1): 15-23.
- [10] Babbar S B, Jain N. 'Isubgol' as an alternative gelling agent in plant tissue culture media [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17(4): 318-322.
- [11] Sawyer H, Hsiao K C. Effects of autoclave-induced carbohydrate hydrolysis on the growth of *Beta vulgaris* cells in suspension [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1992, 31(1): 81-86.
- [12] 梁海曼. 高压灭菌对培养基成分的影响 [J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(5): 389-392.
- [13] 陈云凤,黎世龄,李晓婷. 影响MS培养基凝固效果的几个因素的研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(4): 1338-1339, 1374.
- [14] Kennedy J F, Sandhu J S, Southgate D A T. Structural data for the carbohydrate of ispaghula husk *ex Plantago ovata* forsk [J]. Carbohydrate Research, 1979, 75: 265-274.
- [15] Zhao H, Wang Q, Sun Y, et al. Purification, characterization and immunomodulatory effects of *Plantago depressa* polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 112: 63-72.
- [16] Hesarinejad M A, Jokandan M S, Mohammadifar M A, et al. The effects of concentration and heating-cooling rate on rheological properties of *Plantago lanceolata* seed mucilage [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 115: 1260-1266.
- [17] 杨元军,孙慧生,王培伦,等. 马铃薯脱毒苗离体繁殖液体培养基优化筛选 [C]//中国作物学会马铃薯专业委员会 2002 年年会论文集. 2002: 35-42.