

低磷胁迫下马铃薯试管苗生长及生理指标变化研究

赵映琴¹, 刘玉汇², 王 丽^{2,3}, 杨宏羽^{1,2}, 张俊莲^{1,2}, 王 蒂^{1,2}

(1. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070;

3. 甘肃农业大学生命科学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 马铃薯试管苗在全价、60%磷素和 30%磷素的 MS 培养基上培养, 第 20 d、40 d 时测定生理指标。结果表明, 低磷胁迫对马铃薯试管苗新叶和侧根发生以及根生长具有促进作用, 且地上部和地下部鲜重小幅增加。30%低磷培养环境下, 试管苗的细胞膜透性值、可溶性蛋白质和可溶性糖含量均较对照明显增加, 而叶绿素含量则明显降低, 差异达到极显著或显著水平。60%低磷处理下, 这些指标的变化与对照基本相同, 差异不显著, 表明含 60%P 元素的 MS 培养基适宜马铃薯试管苗生长。

关键词: 马铃薯; 试管苗; 低磷胁迫; 生理指标

中图分类号: S311 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2009)05-0183-05

培养基是试管苗生长发育所需营养物质的供体, 决定着离体材料培养的成败。各类培养基中, MS 培养基因其硝酸盐、钾离子和铵离子含量丰富, 微量元素和有机成分全面而被广泛使用, 也是马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 试管苗繁殖所用培养基。为了获得马铃薯试管苗生长发育适宜的培养基, 降低生产成本, 研究者对其成分进行了多种改变, 结果发现, 有机成分缺失^[1~3]、某种微量元素缺失或降低^[3,4]、大量元素降低或添加^[5,6]、1/2MS 培养基^[3,7]等, 对马铃薯试管苗的生长未产生明显影响, 但不同品种所需培养基配方存在一定差异^[3], 表明 MS 培养基并不是马铃薯试管苗低成本大规模生产的最佳配方。

磷是植物细胞或离体器官培养基中必需的大量元素, 其水平的变化不仅影响其它矿质元素的吸收、根的生长并改变其结构, 而且还能诱导或影响某些基因的表达、某些酶活性和蛋白质含量^[8]。马铃薯各器官中磷素浓度、对磷的吸收速率及磷的积累量

均小, 但缺磷会抑制其侧芽生长及叶片伸展, 叶片生长的干物质分配减少, 磷过多则会加速叶片老化^[9]。本试验通过降低 MS 培养基中磷素含量, 探讨马铃薯试管苗对磷素缺乏的生理反应, 分析其对马铃薯试管苗快繁的影响, 为低成本规模化生产提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料及繁殖

供试材料为马铃薯栽培品种“陇薯 3 号”, 由甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室保存。每 20 d 在 MS 培养基上继代繁殖一次, 培养温度 20±2℃、光强 3 000 lx、24 h 连续光照。

1.2 实验方法

1.2.1 实验处理

以 MS 培养基为基础, 降低其中 KH₂PO₄ 用量, 使 P 素用量为 60% 或 30%, 其他盐类平衡离子, 全价为对照, 构成 3 种培养基配方 (表 1)。

表 1 3 种培养基中大量元素用量

Table 1 The dosage table of macro elements in three kinds of medium

实验处理 Experimental treatment	大量元素用量 The dosage of macro elements(mg/L)				
	NH ₄ NO ₃	KNO ₃	MgSO ₄ ·7H ₂ O	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂ ·2H ₂ O
P(CK)	1650	1900	370	170	440
P6	1630	1915	370	102	440
P3	1615	1988	370	51	440

注: P 表示 MS 培养基中 P 素的全价用量; P6 表示含 60% 的 P 素; P3 表示含 30% 的 P 素。

Note: P represents the total dosage of phosphorous in MS medium; P6 represents the 60% dosage of phosphorous; P3 represents the 30% dosage of phosphorous.

收稿日期: 2009-04-06

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BAD21B05); 农业部行业专项(nyhyzx-07-006-3); 甘肃省援藏项目(0708JKCA063)

作者简介: 赵映琴(1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事植物栽培生理研究。

通讯作者: 赵俊莲, E-mail: zhangjunlian99@yahoo.com.cn; 王蒂, E-mail: wangdi@gsau.edu.cn.

1.2.2 材料处理

将生长健壮的马铃薯试管苗单芽茎段接入上述 3 种培养基中, 每瓶接种 5 株, 每个处理 20 瓶, 重复 3 次。培养温度为 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 光强 3 000 lx, 24 h 连续光照。第 20 d 时, 测定相关指标, 并剪取各处理植株的单芽茎段在相同培养基上继代培养。第 40 d 时, 继续进行相关指标的测定。

1.2.3 测定方法

地上和地下部鲜重用称重法; 叶绿素含量用丙酮比色法^[10]; 膜透性相对值采用电导仪法^[10]; 可溶性蛋白质含量采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[10]; 可溶性糖含量采用蒽酮法^[11]。

1.3 统计分析

试验所得数据采用 Microsoft Excel 2003 处理, SPSS13.0 数据分析软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 低磷胁迫对马铃薯试管苗生长的影响

处理第 20 d 时, 低磷胁迫下的马铃薯试管苗新叶发生数都显著 ($P < 0.05$) 高于对照, 特别是 P 素含量为 60% 的处理, 其新叶数最多, 达 6.6 片/株, 且叶片较大, 此时各处理下的植株最长根的长度间无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 2)。但随 P 素含量降低, 植株侧根数却明显增加, 表现为 30% P 素含量

下, 根系毛状根增多。继续延长处理时间至 40 d, 低磷胁迫下的新叶发生数仍然显著 ($P < 0.05$) 高于对照, 且 30% 低磷处理下, 植株最长根的长度显著高于对照和 60% P 素含量处理。表明低磷胁迫对马铃薯试管苗新叶发生能力具有促进作用, 并促使植株根的生长, 增加侧根数量, 从而增加了根部在培养基中的表面积, 扩大根系吸收面, 促进 P 素吸收。

2.2 低磷胁迫对马铃薯试管苗生物量的影响

作物苗期磷营养效率高低常以单位容积内同一磷供应量下植株的生物量或相对生物量的大小来表征^[12]。从表 3 中可以看出, 低磷胁迫至 20 d 时, 试管苗地上部和地下部鲜重均有所增加, 特别是地下部分鲜重, 与对照间差异显著 ($P < 0.05$)。延长胁迫时间至 40 d 时, 地上部分的生物量出现了差异, 表现为 P6 培养基中的植株鲜重显著 ($P < 0.05$) 高于对照和 P3 处理, 但地下部鲜重处理间却无差异显著性 ($P > 0.05$)。表明 60% 的磷素含量下短时间胁迫, 可促进“陇薯 3 号”的生长, 致使其生物量小幅增加, 特别是地下部分鲜重明显增加。如果长时间在 60% 的低磷环境下, 试管苗地上部分的生物量则增加明显, 表现为新叶数多、植株健壮。所以含 60% 磷量的 MS 培养基可能更适宜“陇薯 3 号”品种的生长。

表 2 低磷胁迫对马铃薯试管苗生长的影响

Table 2 The effect of low phosphorus stress on growth of potato plantlets in vitro

实验处理 Experimental treatments	20 d		40 d	
	新叶数(片/株) Number of new leaves(leaves/plant)	最长根(cm/株) Maximum root (cm/plant)	新叶数(片/株) Number of new leaves(leaves/plant)	最长根(cm/株) Maximum root (cm/plant)
	P(CK)	4.58 _c	6.82 _a	4.36 _b
P6	6.60 _a	6.06 _a	6.24 _a	8.68 _b
P3	5.84 _b	6.42 _a	5.96 _a	9.75 _a

表 3 低磷胁迫对马铃薯试管苗生物量的影响

Table 3 The effect of low phosphorus stress on biomass of potato plantlets in vitro

处理 Treatment	20 d				40 d			
	生物量 Biomass		相对生物量 Relative biomass		生物量 Biomass		相对生物量 Relative biomass	
	地上鲜重 (mg/株) Fresh weight of aboveground	地下鲜重 (mg/株) Fresh weight of underground	地上鲜重 Fresh weight of aboveground	地下鲜重 Fresh weight of underground	地上鲜重 (mg/株) Fresh weight of aboveground	地下鲜重 (mg/株) Fresh weight of underground	地上鲜重 Fresh weight of aboveground	地下鲜重 Fresh weight of underground
P(CK)	88.4 _a	20.4 _b	100.0	100	86.8 _b	26.8 _a	100.0	100.0
P6	100.0 _a	30.8 _a	113.1	151	141.2 _a	34.0 _a	162.7	126.9
P3	100.0 _a	30.8 _a	113.1	151	104.0 _b	38.0 _a	119.8	141.8

注: 相对生物量 = (处理生物量 / 对照生物量) × 100%。

Note: relative biomass = (treatment biomass / CK biomass) × 100%。

2.3 低磷胁迫对马铃薯试管苗膜透性的影响

短时间低磷胁迫下,试管苗的膜透性相对值虽有小幅增加,但与对照间差异不显著($P>0.05$)。增加胁迫时间至40 d,发现P3培养条件下试管苗的膜透性相对值大幅增加,较对照增加了94.13%,达极显著($P<0.01$)差异,而对照和P6处理间差异不显著(图1)。表明短时间的缺磷环境对马铃薯试管苗的细胞膜结构没有影响,增加胁迫时间且磷含量较低(P3处理)时,试管苗就受到了逆境环境的胁迫,导致细胞膜结构发生改变,引起内含物外渗。这主要是因为磷素参与了植物细胞膜磷脂的组成,缺磷可引起膜脂过氧化,破坏细胞膜结构^[13]。因此,P6培养条件也是马铃薯试管苗生长适宜的培养基。

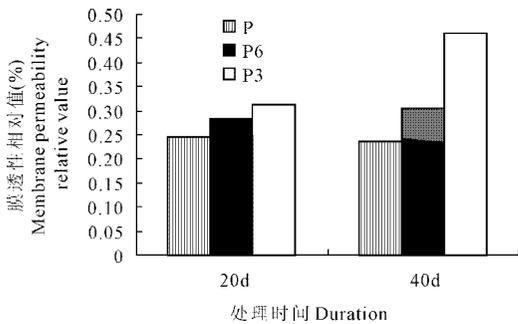


图1 低磷胁迫对马铃薯试管苗膜透性的影响

Fig.1 The effect of low-phosphorus stress on membrane permeability of potato plantlets in vitro

2.5 低磷胁迫对马铃薯试管苗可溶性蛋白质含量的影响

低磷胁迫20 d时,P3培养条件下,马铃薯试管苗的可溶性蛋白质含量显著($P<0.05$)高于对照和P6处理,且对照和P6处理间差异不显著($P>0.05$)。延长胁迫时间至40 d时,各处理下试管苗的可溶性蛋白质含量表现出显著性($P<0.05$)差异,且随胁迫时间延长,低磷环境下,试管苗可溶性蛋白质含量呈显著的上升趋势。表现为胁迫40 d时,P6和P3培养条件下,试管苗的可溶性蛋白质含量分别较胁迫20d时增加了19.31%和11.54%(图3)。表明低磷胁迫下,植物为了有效促进介质中磷素的吸收和利用,特异性地合成了某些酶和蛋白质,表现为磷饥饿诱导的基因表达^[14]。

2.6 低磷胁迫对马铃薯试管苗可溶性糖含量的影响

从图4中可以看出,P6培养条件下,马铃薯试管苗叶片中的可溶性糖含量与对照基本相同,无差异显著性($P>0.05$)。而P3培养环境下,试管苗叶

2.4 低磷胁迫对马铃薯试管苗叶绿素含量的影响

P3培养环境下胁迫20 d,马铃薯试管苗叶绿素含量明显下降,较对照和P6处理间差异显著($P<0.05$)。延长胁迫时间至40 d,低磷处理下的试管苗叶绿素含量较20 d时均有小幅下降,导致各处理间差异达显著($P<0.05$)水平(图2)。表明短时间60%的低磷环境下,马铃薯试管苗叶绿素含量下降不明显,此时植株生长发育正常,新叶发生数多。尽管延长胁迫时间导致低磷胁迫下试管苗的叶绿素含量显著下降,但P6处理的降幅较低,仅较对照下降了18.2%。此时试管苗叶色与对照间未出现肉眼可见差异,植株叶片较大,生长正常。

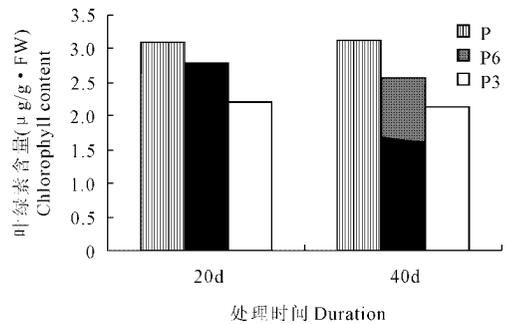


图2 低磷胁迫对马铃薯试管苗叶绿素含量的影响

Fig.2 The effect of low-phosphorus stress on chlorophyll content of potato plantlets in vitro

片中的可溶性糖含量明显上升,与对照和P6处理间差异显著($P<0.05$)。表明磷的过度缺乏,抑制了碳水化合物的转化及向茎和根组织的运输,导致叶片中可溶性糖含量增加,此时植株下部老叶皱缩,发黄。

3 讨论与结论

利用组织培养进行马铃薯脱毒试管苗的繁殖是马铃薯种薯生产的重要环节。为了降低生产成本,研究者对MS培养基或其他类型培养基中的各种成分进行了改变,以期研制出马铃薯不同品种试管苗低成本大量繁殖所适宜的培养基配方^[1~7]。本研究大幅度降低了MS培养基中的P元素含量,结果发现,60%的低磷培养条件对马铃薯试管苗新叶发生能力和根的生长具有促进作用,且侧根发生数量和植株健壮程度与MS全价量间差异不显著,表明含60%P元素的MS培养基是适宜马铃薯试管苗生长的。

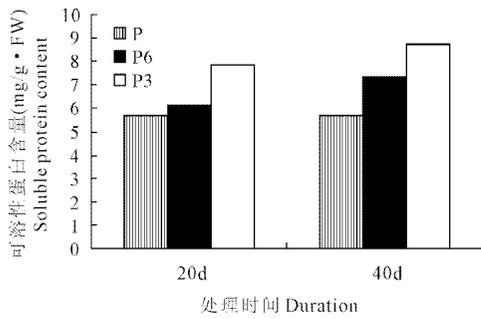


图 3 低磷胁迫对马铃薯试管苗可溶性蛋白含量的影响

Fig. 3 The effect of low-phosphorus stress on soluble protein content of potato plantlets in vitro

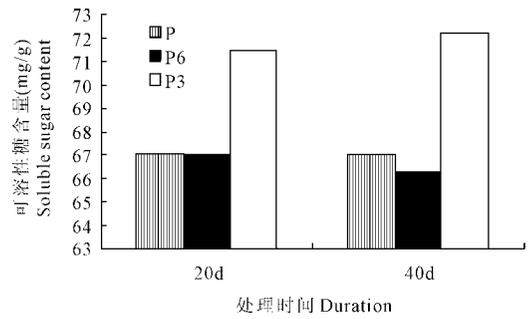


图 4 低磷胁迫对马铃薯试管苗可溶性糖含量的影响

Fig. 4 The effect of low-phosphorus stress on soluble sugar content of potato plantlets in vitro

磷是植物必须的大量营养元素之一,但在土壤中的移动性差,因此扩大根系吸收表面积是植物适应低磷环境的重要机理之一,主要表现为根毛的数量、长度与密度增加,侧根大量发生^[15]。本研究支持这一结论,即马铃薯试管苗在低磷胁迫下表现为根的发生数量和长度明显增加,特别是在 30%低磷条件下,试管苗根系呈多分支,毛状根数量明显增多,根的长度也极显著地高于对照和 60%的低磷胁迫。此外,低磷胁迫下,部分磷还会快速从老叶转运到新叶和根系,以满足根和叶的发生与生长,使该逆境下的马铃薯试管苗新叶发生数和根长都显著高于对照,地上和地下部鲜重小幅增加。根的这种快速生长反应是由于缺磷促进了生长素合成,生长素自冠向根的极性运输提高了根部生长素浓度,生长素触发了根部细胞周期蛋白基因 *cyc1At* 的表达,进而促进了细胞分裂并加速了根的伸展^[16]。

许多逆境条件都能破坏植物细胞膜结构、降低叶绿素含量、引起蛋白和糖代谢发生变化等。磷是植物细胞膜磷脂的组成,参与和调节着线粒体电子传递和氧化磷酸化、叶绿体的能量传递和光合磷酸化过程,并且在一系列酶的调节作用中起重要作用^[17]。低磷胁迫下,植株体内产生大量的超氧阴离子,影响着叶绿体片层的膜体结构,使光系统 II 活性减弱,光合磷酸化解偶联,质膜受到严重伤害^[18],导致 30%低磷含量处理下的马铃薯试管苗的细胞膜相对透性值显著增加,叶绿体含量显著下降。为了在低磷环境下生存,更有效地促进介质中磷素的吸收和利用,抵抗逆境环境对植株的伤害,植物特异性地合成了某些酶和蛋白质,即表现为磷饥饿诱导的基因表达,主要涉及到酸性磷酸酯酶蛋白、磷结合蛋白、磷运转蛋白以及与质膜合成相关蛋白等的大量合成^[14],从而保证马铃薯试管苗的生长发育。另外,磷的过度缺乏,还抑制了碳水化合物的转化及向

茎和根组织的运输,引起叶片中可溶性糖含量增加,这与缺硼会阻碍甘蓝型油菜叶片糖向外输出,导致叶片可溶性糖累积^[19]的结果一致。逆境下叶片中增加的可溶性糖可显著提高细胞溶质,调节细胞渗透势,从而抵御逆境伤害,保证植株生长发育,这是生物应对逆境环境的积极响应。综上所述,含 60% P 元素的 MS 培养基是适宜马铃薯试管苗生长的,但这种试管苗的移栽成活率、抗病力及结薯率等指标的变化尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 董淑英,李梅,孙静,等.马铃薯试管苗低成本快繁方式研究[J].中国马铃薯,2002,16(1):7-10.
- [2] 黄萍,颜谦,何才才,等.培养基成分改变对马铃薯试管苗生长的影响[J].种子,2005,24(4):58-59.
- [3] 赵永秀,郝文胜,李蒙平.几种基本培养基对 Favorita 试管苗生长的影响初报[J].内蒙古农业科技,2005,(S1):46-47.
- [4] 陈永波,赵清华,袁明山,等.微量元素缺乏与过量对脱毒马铃薯苗生长的影响[J].中国马铃薯,2005,19(1):10-12.
- [5] 马伟青,王培伦,黄传红,等.培养基中氮磷钾对马铃薯试管苗生长的影响[J].山东农业科学,1999,(4):36-37.
- [6] 郎贤波,廉美兰,朴炫春,等.无机盐浓度对马铃薯脱毒苗微繁的影响[J].延边大学农学报,2007,29(1):1-4.
- [7] 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.
- [8] 张悦,施和平.培养基磷缺乏对黄瓜毛状根生长、抗氧化酶活性及氮源利用的影响[J].生物工程学报,2008,24(9):1604-1612.
- [9] 高聚林,刘克礼,张宝林,等.马铃薯磷素的吸收、积累和分配规律[J].中国马铃薯,2003,17(4):199-203.
- [10] 高俊凤,孙群,曹翠玲,等.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2006:142-143,208-210.
- [11] 邹琦,赵世杰,王忠,等.植物生理学实验指导[M].北京:中国农业出版社,2000:111-112.
- [12] 李慧明,高志强,张永清,等.不同基因型春小麦根系对低磷胁迫的生物学响应[J].山西农业大学学报,2006,26(2):138-140.

- [13] 刘厚诚, 邝炎华, 陈日远. 缺磷胁迫下长豇豆幼苗膜脂过氧化及保护酶活性的变化[J]. 园艺学报, 2003, 30(2): 215—217.
- [14] Goldstein A H, Mayfield S D, McDaniel R G, et al. Phosphate starvation inducible metabolism in *L. Esculeutum*. III. Protein secretion by suspension cultured cells[J]. *Plant Physiol*, 1989, 91: 175—182.
- [15] 陈声奇, 陈爱珠, 周 畅. 植物忍耐低磷胁迫机理的研究进展[J]. 湖南农业科学, 2007, (2): 43—45, 46.
- [16] 孙海国, 张福锁, 杨军芳. 缺磷胁迫对小麦根细胞周期蛋白基因 *cyc1At* 表达的影响[J]. 植物生理学报, 2000, 26(5): 441—445.
- [17] 潘晓华, 刘水英, 李 锋, 等. 低磷胁迫对不同水稻品种叶片膜脂过氧化及保护酶活性的影响[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(1): 57—60.
- [18] 李志刚, 董丽杰, 宋书宏, 等. 磷素和干旱胁迫对大豆叶片活性氧和保护酶系统的影响[J]. 作物杂志, 2007, (6): 35—37.
- [19] 年夫照, 胡承孝, 徐芳森, 等. 硼对不同硼效率甘蓝型油菜叶片6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性和可溶性糖含量的影响[J]. 云南农业大学学报, 2008, 23(1): 47—51.

Study on the growth and changes of several physiological indexes of potato plantlets in vitro under low phosphorus stress

ZHAO Ying-qin¹, LIU Yu-hui², WANG Li^{2,3}, YANG Hong-yu^{1,2}, ZHANG Jun-lian^{1,2}, WANG Di^{1,2*}

(1. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. Gansu Key Laboratory of Crop Genetic & Germplasm Enhancement, Lanzhou, Gansu 730070, China;

3. College of Life Sciences and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Potato plantlets in vitro were cultured on MS medium with full phosphorus level, 60% phosphorus level and 30% phosphorus level. Physiological indexes on 20 d and 40 d were determined and the results showed that the ability of new leaves and lateral root generation was promoted under low-p stress, which could also improve the root growth, increase the fresh weight of aboveground and underground slightly. Under the culture environment with 30% phosphorus, the relative permeability of cell membrane, soluble protein content and soluble sugar content increased and chlorophyll content decreased significantly compared with the control, and the significant difference was at the level of 5% or 1%. Under the treatment with 60% phosphorus, the changes of physiological indexes were the same as the control, and there was no obvious difference. The results demonstrated that it is suitable for potato plantlets in vitro growth on MS medium with 60% phosphorus.

Keywords: potato; plantlet in Vitro; low-phosphorus stress; physiological index