

马铃薯脱毒微型薯人工种子 工厂化生产技术研究^{*}

胡赞民 邓向东 陈正华

(遗传与发育生物学研究所 北京 100101)

摘要 简要综述了马铃薯脱毒微型薯人工种子生产技术的概况。研究出一种新的以罐式培养为核心的关键技术。试验结果表明,该技术较常规法生产效率提高 5 倍,生产成本降低 1/2,脱毒种薯较常规种薯增产 40% 以上,有较大的经济和社会效益。

关键词 马铃薯,微型薯,人工种子,罐式培养技术

马铃薯是重要的蔬菜和粮食兼用经济作物,我国是种植面积最大的国家(6 000 万亩),但单位面积平均产量却很低(800 公斤/亩),与发达国家(2 500 公斤/亩)的差距很大。主要原因是许多地区所用种薯是未经脱毒种薯,种薯感染病毒所致。针对种薯病毒感染问题,我国从“六五”开始投入大量人力和资金推广脱毒薯,虽取得了一定成果,但推广面积始终未超过总面积的 20%,其主要原因是脱毒源原种生产技术的发展导致源原种严重短缺,且价格昂贵。同时,由于马铃薯繁殖系数低(1:10),种薯的繁殖占用了大量土地,而且由于气候原因,南方地区每年需从北方调运大量种薯。因此,马铃薯脱毒种薯生产的发展趋势是种薯的微型化,生产的本地化和规模化,降低成本,使绝大多数生产用种为 2—3 代种薯,从而提高产量。

1 脱毒微型薯研究和开发现状

马铃薯脱毒微型薯源原种的生产有两个途径,

一个是微型薯人工种子(也称试管薯,重量在 1 克以下)的生产^[1],另一个是迷你薯(重量约在 5 克以上)的生产^[3]。迷你薯对满足我国脱毒薯的需求发挥了一定作用,也积累了一定经验,但由于不能严格控制病毒的再感染,占用土地多,投资大,受季节限制不能常年生产,而且技术含量不高,许多农民用未经脱毒的薯苗自己生产,造成市场混乱。从长远来看,用组织培养技术,在较小的工业化厂房中大规模连续生产严格脱毒的微型薯人工种子,是未来重要发展方向。

目前国内生产微型薯人工种子的技术是利用常规培养容器(最大 250ml)在光照培养条件下繁殖小苗,更换培养基,并转至黑暗的条件下培养、获得微型薯。这种方法可以严格控制病毒再感染,但是培养容器小,繁殖效率、空间利用率和劳动效率低,生产成本低。专家们普遍认为,只有年产达到 1 000 万粒以上才有利润,而现技术水平年产仅 100 万—200 万粒,且继续扩大规模困难很大^[1, 2]。

^{*} 收稿日期:2001 年 5 月 10 日

国际领先的是韩国 Hi-DEA 公司的微型薯人工种子生产技术^[4]。其采用一次性大培养皿为容器,使薯苗在光照条件下横向生长,然后采用高糖培养基在黑暗条件下生产微型薯。培养皿可以叠层摆放,空间利用率较高,年生产规模突破 300 万粒。但该技术一次性容器的消费大,且劳动效率低,污染控制难,生产设备复杂昂贵,生产成本高。

为进一步提高微型薯人工种子的生产技术水平,国内外学者在改进培养方式和培养容器方面不断地进行探索。如 Akita 等利用具有液面升降控制功能的生物反应器^[5,6,7]、冈一郎等采用底部强制通气的 4 升特制容器^[8]和美国 Madison 微薯公司采用线型生物反应器均成功地生产出微型薯。K. Kurata 等人研制出雾化生物反应器生产马铃薯苗^[9],我国学者郝震龙等人用改进的雾化反应器成功地诱导出微型薯^[10]。但这些生物反应器价格昂贵,使用条件要求严格,尤其是不易满足马铃薯苗和微型薯生长所需的最佳气相液相条件,微型薯人工种子产量低,单粒薯重量轻(多数小于 0.2g),不论从数量、重量和成本上均未达到要求,尚未应用于规模化生产。

2 以罐式培养为核心的新型人工种子规模化生产技术

陈正华研究员领导的科研小组“九五”承担了“863”计划的“人工种子研制”项目,对马铃薯微型薯人工种子规模化生产技术进行了研究,研制出一种特制培养容器——培养罐及其高效操作技术,配合专用培养基实现了脱毒苗和微型薯的规模化生产,微型薯单粒薯重增加,整齐度提高,生产周期缩短,形成了以罐式培养为核心的微型薯规模化、集约化、工厂化生产技术体系。

2.1 特制培养罐

培养罐由透明的耐高温高分子材料制成,由一个具有下排液管的罐体和一个具有接种口和空气过滤器的上盖紧密结合形成的隔菌透气的培养容

器^[11,12]。培养室底部上方有一层多孔筛网,培养液面与筛网面相平。该容器以简单的结构实现了防止污染、扩大培养容积和提高培养效果的目的。培养方式是,液体浅层接触式培养,即培养材料(如马铃薯苗单腋芽茎段)接种于筛网上,刚好与培养液面相接触,根从网下的培养液中吸收营养,植株在网上生长,近似于自然的生长状态,避免了传统的液体培养方式中大量培养材料沉于液面之下的过度厌氧呼吸导致发芽率低的现象。而该培养罐具有高透光、高透气的特点,并具备强制通风的功能,为高密度培养各种具有器官形态的植物,尤其是马铃薯等对湿度敏感的植物,提供了适宜的生长条件,使小苗生长速度加快,消除了玻璃化现象,生长一致性高,微型薯重量增加。经过中试阶段的研究,该培养罐已实现工业化定型,其有效容积为 4L,是常规培养容器的 16 倍;全容器透光率 95%,刚性和弹性适度,不易破损,耐 121℃ 灭菌,形状和物理化学特性稳定,使用寿命 100 次以上;具有多重密封结构,部件设计合理,可拆卸和组装,摞叠后体积为容器体积的 1/3;制造成本每个低于 40 元。

2.2 马铃薯脱毒苗的大量繁殖

采用罐式培养快速接种方法,将马铃薯苗单腋芽茎段均匀接种于罐内筛网上,接种量每罐 400 段,在光照强度为 2 000lux,光周期每天 12 小时,温度为 24℃—26℃ 条件下培养,15 天后获得近 400 株健壮的薯苗(见封三)。与瓶式培养相比,罐式培养在不增加污染概率的条件下,生长周期缩短 1/4,单位容器的生产量提高了 27 倍,单位产量的人工消耗减少 70%,成本为每株 0.037 元,是常规培养的 1/5。

2.3 微型薯人工种子的规模化生产

将含有 3 个腋芽的马铃薯苗茎段均匀接种在培养罐的筛网上,接种量每罐 200 段,采用专用诱导培养基在光照条件下培养 15 天,每个茎段长出小薯,采用培养罐快速换液方法排出旧的培养液,加入高糖培养基,进行黑暗培养,每 15 天换液 1 次,连续换 2 次。45 天后收获约 200 个微型薯(见

封三)。与瓶式培养相比,生产周期较短,单位容器的生产量提高了 10 倍,平均薯重提高 25%,达到 0.5g,商品性更好,成本为每粒 0.1 元,是常规培养的 1/2。

2.4 配套的规模化生产技术

为了充分发挥罐式培养的优势,我们开发了与之配套的自然光照节能培养室,减少照明电能消耗;组合式高效培养架,使培养车间的生产容量提高 100%;便携式超小型洁净工作台,减少培养罐换液操作时在培养室和接种室之间的运输过程;接种工具快速消毒器等高效操作工具套件,全面提高操作人员的工作效率。同时建立生产各环节规范化操作程序,包括培养罐使用前的准备程序,培养基配制程序,接种换液程序,生产环境监测与控制程序,采摘、脱水、包装程序,病毒检测和提纯复壮程序及其操作规程,形成一整套安全、简便、高效、符合工厂化生产规范的操作程序及相应的数量化的指标体系。经实验和测算,以罐式培养为核心的规模化生产工艺,适用于各种植物的快速繁殖,生产规模可以突破每年 1 000 万株(粒),生产效率提高 5 倍,成本为现有技术的 1/2。

2.5 技术评价及其应用

这套技术的创造性、先进性在于:(1)改进的培养容器——新型廉价培养罐,可原位通气和换液,容积大、造价低、集约化程度高,适于规模化生产;(2)以罐式培养为核心,结合优化培养基及培养条件、新型培养架、自然光培养室等各项配套技术,综合生产效率提高 5 倍,成本为现有技术的 1/2。该技术在研制开发过程中得到国家高技术发展计划“863”项目的支持,申请了中国专利和 PCT 国际专利各 1 项。经对国内外专利和科学文献的联机检索查新证明,所建立的特制培养罐生产技术的高效繁殖系统,国内外未见同类报道。该技术于 1998 年 7 月通过国家科技部和中国科学院主持的科技成果鉴定。专家组一致认为:“该成果处于国内领先水平,在马铃薯微型薯培养方面达到了国际先进水平。”这套新技术适用范围广,它的推广与应用,

必将变革当前组织培养企业的传统设备和工艺,使植物克隆产业的技术水平大幅度提高,产生深远的社会意义和较大的经济效益。目前该技术已受到企业界的关注,采用授权使用、技术入股等方式在 4 家中小型高技术种苗企业开始应用,涉及马铃薯、杨树、黑核桃等植物品种,生产规模达每年 4 000 余万株(粒)。

参考文献

- 1 李宝庆,郑妙嫦,罗锡金.大规模试管薯生产的一个范例.中国马铃薯和甘薯合作研究进展.北京:中国农业科技出版社,1990,191—195.
- 2 李宝庆,郑妙嫦,罗锡金.广东省马铃薯脱毒微型薯生产的工厂化及种薯生产体系.中国马铃薯种薯生产研讨论文集,呼和浩特:1992,38—41.
- 3 王炳君,王鲁野.马铃薯脱毒微薯种薯的生产方法.发明专利申请公开说明书,中华人民共和国专利局,1990,公开号:CN1048141A.
- 4 郑革,刘长烈,丘廷淑等.大量生产人工种用马铃薯(马铃薯微型块茎)的方法.发明专利申请公开说明书,中华人民共和国专利局,1990,公开号:CN1045906A.
- 5 Akita M, Takayama S. Mass propagation of potato tubers using jar fermentor techniques. *Acta Horticulturae*, 1988, 230: 5561.
- 6 Akita M, Takayama S. Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1994, 36(2): 177—182.
- 7 Akita M, Takayama S. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid surface level control. *Plant Cell Reports*, 1994, 13: 184—187.
- 8 冈一郎, C 施卢伊斯.生产马铃薯微型块茎的方法.发明专利申请公开说明书,中华人民共和国专利局,1994,公开号:CN1109706A.
- 9 Kurata K, Ibaraki Y, Goto E. System for micropropagation by nutrient mist supply. *American Society of Agricultural Engineers*, 1991, 34(2): 621—624.
- 10 Hao Z L, Ouyang F, Gengyuxuan et al. Propagation of potato tubers in a nutrient mist bioreactor, *Biotechnology Tech-*

- niques, 1998(12): 641—643.
- 11 邓向东, 陈正华, 耿玉轩等. 培养容器及使用其大量生产马铃薯微型薯等植物材料的方法. 发明专利申请公开说明书, 中华人民共和国专利局, 1998, 公开号: CN1188589.
- 12 邓向东, 陈正华, 耿玉轩等. 培养容器及使用其大量生产马铃薯微型薯等植物材料的方法. PCT 发明专利申请公开说明书, 国际专利局, 2000, 公开号: WO00/09542.

Studies on Industrial Production Techniques of Microtuber Artificial Seeds of Virus-free Potatoes

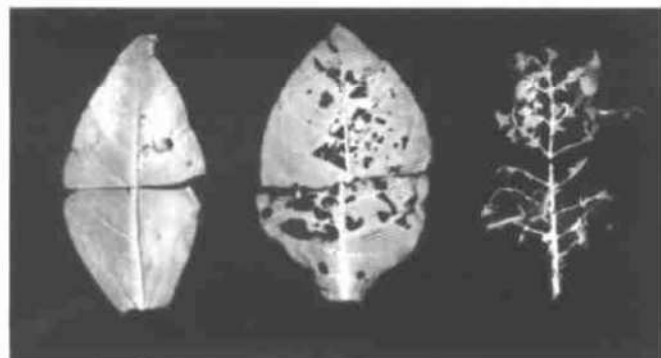
Hu Zanmin Deng Xiangdong Chen Zhenghua

(Institute of Genetics and Developmental Biology, CAS, Beijing 100101)

The outline of the research on microtuber production of virus-free potatoes was briefly reviewed. Developed a new technique for the production of microtuber artificial seeds based on a jar culture system. Experimental results showed that the production efficiency was increased by 5 times and the cost was decreased by 50% using this technique than using usual methods, and the yield was increased by 40% using virus-free potatoes as seeds from this production system than using general potatoes. The application of this technique will make great economical and social achievements.

胡赞民 男, 遗传研究与发育生物学研究所副研究员, 中国植物学会细胞生物学专业委员会委员。1995 年获北京大学博士学位。1995—1997 年在原遗传研究所从事博士后研究, 1998—2000 年在美国犹它州立大学从事博士后研究。主要从事植物分子遗传学和细胞生物学研究工作, 主持和参加了多项国家自然科学基金项目、中国科学院特别支持项目、国家“863”计划项目。发表论文 30 余篇。

遗传与发育生物学研究所 在基因研究等方面取得新进展



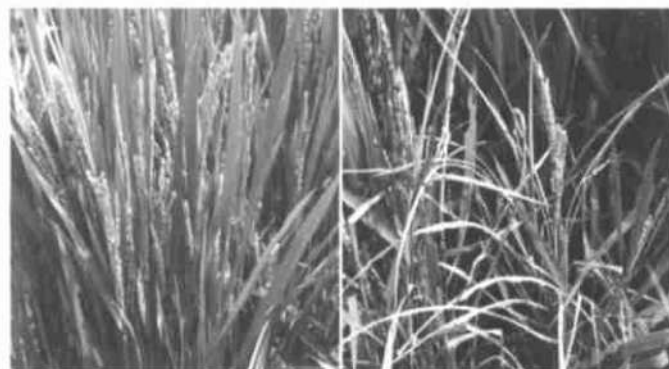
▲转修饰后 CpTI 基因烟草对棉铃虫的抑制情况

转 sck 基因烟草 (左); 转未修饰 cpII 基因烟草 (中); 非转化植株对照 (右)



▲转 sck 基因水稻植株

高抗性转基因植株 (左)、中等抗性转基因植株 (中) 及对照植株 (右) 在大田不施用杀虫剂的情况下受二化螟攻击的状况



▲转 sck 水稻 T₁ 代田间实验



▲转 sck 基因水稻大田环境释放

在完全不施用杀虫剂的情况下, 转基因水稻生长正常 (绿色部分), 对照完全死亡 (外围枯黄部分)



▲培养罐生产马铃薯脱毒苗



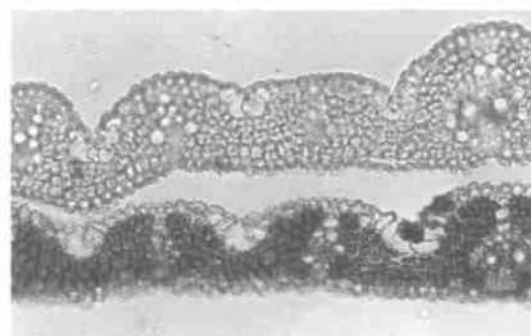
▲培养罐中生产微型薯



▲具有不同细胞特异性表达启动子在转基因水稻中的表达情况
微管组织特异性表达启动子 (左)



叶肉细胞特异性表达启动子 (右)



▲ak 基因开关系统在转基因水稻中的表达情况