

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2008)04-0201-04

马铃薯茎尖脱毒效果影响因素的研究

李凤云

(黑龙江省农业科学研究院马铃薯研究所, 黑龙江 克山 161606)

摘要: 以克新 2 号、克新 16 号和克新 17 号等 8 个马铃薯品种为试验材料, 对马铃薯茎尖脱毒效果的影响因素进行了研究。结果表明: 不同种类的植物生长调节剂对茎尖的生长有不同的影响, 茎尖在 1 号培养基 MS+1.0 mg·L⁻¹KT+0.5 mg·L⁻¹IAA+0.5 mg·L⁻¹GA₃ 上可不产生愈伤组织, 直接成苗, 是最适宜的培养基; 6~8 低温预处理和 37 热空气处理对茎尖脱毒有利; 茎尖取材来源对成苗率没有影响, 对脱毒效果影响较大, 但脱毒效果依品种而异; 为避免造成损失, 需在 15 个月内准备出用于更换的基础苗。

关键词: 马铃薯; 茎尖培养; 影响因素

我国马铃薯的栽培面积达 490 多万 hm², 已成为世界上第一大马铃薯生产国, 但由于病毒和类病毒侵染引起的退化, 严重影响了马铃薯的品质和产量。应用茎尖脱毒技术是解决马铃薯退化的主要措施, 国内外学者已对其进行了大量的研究和报道。

我国从 20 世纪 70 年代初开始研究推广这一技术, 并在生产上取得了巨大的经济效益, 但目前马铃薯茎尖培养仍存在着脱毒效率低的问题, 有些好的育种亲本材料因严重退化而不能利用, 且随着国外材料的引进, 可能带入新病毒。连勇^[1]报道长期继代培养的试管苗有可能再次染上病毒, 给薯生产带来巨大损失。因此, 本试验研究了不同植物生长调节剂、温度处理、脱毒继代时间及试种等因素对脱毒效果的影响, 目的在于优化这一重要技术。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试马铃薯材料共有 8 份, 有克新 2 号、克新 15 号、克新 16 号、克新 17 号、克新 19 号、克新 20 号、早大白和扎列娃。

收稿日期: 2008-05-05

基金项目: 黑龙江省农业科学院科研计划项目“多抗高产专用马铃薯种质资源创新技术研究与应用”(HNY2004113)。

作者简介: 李凤云(1972-), 女, 助理研究员, 从事马铃薯试管苗脱毒快繁、马铃薯品质分析和马铃薯生物技术研究。

1.2 试验方法

将马铃薯大田健株的腋芽或块茎芽, 用自来水冲洗干净, 约需 30 min 左右, 在酒精中蘸一下, 立即取出, 用千分之一的升汞消毒 3 min 左右, 无菌水冲洗 3~4 遍, 在超净工作台内, 在 40 倍解剖镜下剥取茎尖, 接种在试管内的茎尖培养基上, 每管接 1 个茎尖, 放于人工气候箱中培养, 23 ℃, 光强 2 500 lx, 每天 16 h, 相对湿度 60%, 直至成苗。

1.3 试验设计

1.3.1 植物生长调节剂对茎尖脱毒效果的影响

各处理培养基成分列于表 1。剥取带二个叶原基的茎尖, 长度 0.30 mm, 接种在试管内的各处理的茎尖培养基上, 培养基中还需加入 30 g·L⁻¹蔗糖和 0.7%琼脂, pH 值 5.8。

表 1 添加不同植物生长调节剂的茎尖培养基

处理	培养基成分
	MS+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L ⁻¹ IAA
	MS+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L ⁻¹ NAA
	MS+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+0.1 mg·L ⁻¹ GA ₃
	MS+0.5 mg·L ⁻¹ KT+1.0 mg·L ⁻¹ IAA
	MS+1.0 mg·L ⁻¹ KT+0.5 mg·L ⁻¹ IAA+0.5 mg·L ⁻¹ GA ₃

1.3.2 温度处理对茎尖脱毒效果的影响

将马铃薯的块茎在 6~8 低温下预处理 5 个月, 剥取带一个叶原基, 长度 0.15 mm 的茎尖后, 接种于 1 号茎尖培养基上, 用 37 热空气处理,

直到成苗。

1.3.3 茎尖取材来源对茎尖脱毒效果的影响

分别取马铃薯大田健株的腋芽和块茎芽作为试验材料, 剥取带一个叶原基, 长度 0.15 mm 的茎尖后, 接种于 号茎尖培养基上, 直到成苗。

1.3.4 脱毒苗培养 18 个月对脱毒效果的影响

每 3 个月对继代的脱毒苗检测 1 次, 病毒检测采用酶联血清检测, 配合指示植物鉴定, 检测 PVX、PVY、PVS、PVM、PVA、PLRV, 类病毒检测采用双向往返聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 共检测 6 次。

1.3.5 脱毒苗试种对脱毒效果的影响

将脱毒苗在网棚和大地试种, 调查种植年限对脱毒率的影响, 同时观察是否有变异株系。

1.4 数据统计和分析

统计成苗茎尖数, 计算茎尖成苗率 (成苗茎尖与接种茎尖之比)。将试管苗切繁, 检测病毒和类病毒, 统计脱毒茎尖数, 计算脱毒率 (脱毒茎尖与接种茎尖之比)。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节剂对茎尖脱毒效果的影响

植物生长调节剂的作用是促进茎尖分生组织分化成苗。以克新 16 号马铃薯品种的块茎芽为试验材料, 结果见表 2。处理 成苗率最低, 可能是植物生长调节剂的种类搭配不当, 处理 成苗率

最高, 但处理 ~ 均有愈伤组织形成, 芽细根多, 需进行壮苗培养, 处理 和 茎尖成苗率低些, 均无愈伤组织形成, 小苗前期无根, 待长出几个叶片后才有根生成, 苗壮, 可直接切段繁殖, 效率高。处理 无愈伤组织形成可能不会产生遗传变异, 且成苗率较高, 因此是最适宜的茎尖培养基。从表中也可以看出, GA₃ 对茎尖培养有促进作用。

表 2 不同培养基对茎尖脱毒效果的影响

处理	茎尖生长状态	成苗率 (%)
	形成黄绿色愈伤组织, 芽细	45.2
	形成绿色愈伤组织, 芽细, 根多	60.8
	形成大块绿色愈伤组织, 丛生芽, 芽细, 根多	78.1
	无愈伤组织, 成 1 株壮苗, 前期无根, 茎叶向上生长	46.5
	同 , 效果好些, 成苗快些	67.2

2.2 温度处理对茎尖脱毒效果的影响

本试验以克新 17 号马铃薯品种的块茎芽为试验材料, 尝试温度处理对茎尖脱毒效果的影响, 6~8 低温处理是为了脱除类病毒, 高温 37 热空气处理是为了脱除 PVX、PVS 等难脱的病毒。结果见表 3: 与 CK 比较, 温度处理不影响成苗率, 提高了脱毒率, 对脱除 PSTV 的效果显著, 而对脱除 PVY 效果不太好, 这可能与块茎中所含病毒的种类有关, 尚需研究。

表 3 温度处理对茎尖脱毒效果的影响

处 理	接种数 (个)	成苗率 (%)	PSTV 脱毒率 (%)	PVX 脱毒率 (%)	PVY 脱毒率 (%)	PVS 脱毒率 (%)	PLRV 脱毒率 (%)
CK	100	16.6	2.3	70.2	68.0	93.1	90
温度处理	1 000	17.0	33.3	90.0	80.0	95.2	100

2.3 茎尖取材来源对脱毒效果的影响

以克新 2 号、克新 16 号和克新 19 号的块茎芽和大地健株的腋芽为试验材料, 结果见表 4。同一品种茎尖成苗率的差异不明显, 茎尖脱毒率差异较大, 但不同品种脱毒效果不一样。有人认为田间植株上的芽污染重, 不易消毒, 在本试验中无此现象, 用千分之一的升汞消毒效果很好, 且不同品种消毒时间应不同, 克新 16 号的芽消毒时间稍长, 茎尖即变黑死亡。但经试种观察, 克新 2 号有植株健壮而薯形不太好的现象, 克新 16 号从块茎芽成的苗脱毒效果好于大地健株的腋芽的现象, 而克新

19 号则相反, 大地健株的腋芽的脱毒效果好于块茎芽, 原因尚待研究。

表 4 茎尖取材来源对脱毒效果的影响

材料	成苗率 (%)		脱毒率 (%)	
	块茎芽	健株腋芽	块茎芽	健株腋芽
克新 2 号	15.6	16.1	31.8	44.3
克新 16 号	22.0	21.3	65.7	56.3
克新 19 号	19.6	21.5	35.5	86.0

2.4 脱毒苗培养 18 个月对脱毒效果的影响

以克新 2 号、克新 17 号、克新 19 号和克新

15号的脱毒苗为研究对象，结果见表5。

表5 脱毒苗培养18个月对脱毒效果的影响

材料	病株率 (%)					
	3个月	6个月	9个月	12个月	15个月	18个月
克新2号	0	0	0	0	0	10
克新17号	0	0	0	0	0	0
克新19号	0	0	0	0	0	0
克新15号	0	0	0	0	5	15

从表中可以看出大约1年后才开始有退化现象，克新2号可能是由于脱毒不彻底造成的，而克新15号似乎是由于类病毒的弱系或其它病毒引起的退化，尚待研究。脱毒苗使用年限的长短，与病毒有一个延迟的复苏期、脱毒不彻底、病毒浓度低的检测不到、含有检测项目以外的病毒等因素有关，使脱毒苗随继代时间的延长，病毒再现，苗退化，脱毒率下降，因此，一定要做好脱毒苗培养

15个月内的检测工作，保证扩繁基础苗的质量，否则会造成巨大损失。

2.4 脱毒苗试种对脱毒效果的影响

以克新16号、克新17号、克新19号、克新20号、早大白、克新15号和扎列娃的脱毒苗为试材，研究脱毒苗试种对脱毒效果的影响，结果见表6。可以看出脱毒苗的退化速度不同，大田种植的脱毒苗的退化速度快于网棚，但差异不大，对于脱毒效果好的品种可以晚些更换基础苗。克新17号的脱毒效果最好，在网棚和大地都能健壮生长，使用年限最长。而扎列娃则出现在网棚能健壮生长，在大田不能正常生长的情况，可能是该品种不抗类病毒病，或者是病毒的交叉保护现象，脱除原有病毒后，降低对另一种病毒的抵抗能力，以致于在大田不能利用扎列娃这份好材料。另外，在试种时发现克新15号有一株脱毒苗结红皮块茎，克新15号是最初用1号培养基脱毒成苗，是否由于变异引起尚待研究。

表6 脱毒苗继代1~6年试种对脱毒效果的影响

材料	1年		2年		3年		4年		5年		6年	
	网棚	大田										
克新16号	无	无	无	无	无	无	无	有	有	有	有	有
克新17号	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无
克新19号	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	有
克新20号	无	无	无	无	无	无	无	无	无	有	有	有
早大白	无	无	无	无	无	无	无	有	有	有	有	有
克新15号	无	无	无	无	有	有	有	有	有	有	有	有
扎列娃	无	有	无	有	无	有	-	-	-	-	-	-

注：“无”表示无退化，“有”表示有退化。

3 讨论

马铃薯茎尖脱毒效果的影响因素主要有茎尖大小、培养基、培养条件和病毒种类等。本研究表明茎尖切取越小，脱毒率越高，成苗率越低，这与王秀英等^[2]和齐恩芳等^[3]报道的一致，实际组培扩繁只要有1株脱毒彻底的试管苗即可大量扩繁，说明对于提高脱毒率的研究更重要一些。植物生长调节剂6-BA和NAA可产生愈伤组织，这与刘卫平等^[4]的报道一致，绝大多数学者都反对通过愈伤组织途径脱除马铃薯病毒，因为此途径会产生遗传变异^[5]，

本试验中处理和均无愈伤组织形成，适宜用于茎尖分生组织培养。GA₃对茎尖培养有促进作用，这与仲乃琴^[6]的报道一致。有人认为高浓度NAA可抑制病毒的增殖，但浓度过高或长期使用都有引起芽变的可能^[1,7]，本试验中的培养基均采用低浓度的植物生长调节剂。

由于目前没有脱掉类病毒的有效措施，对于大量扩繁的品种，只有从未被饱和侵染的群体中鉴定筛选出未被侵染的块茎，再脱掉其它病毒^[8]，而对于只种少量用作亲本的材料来说，有时无法选出未被侵染的块茎。本试验进行的温度处理，对茎尖脱

毒效果有效, 但脱除病毒难易与已报道的顺序不太一致 按由易到难的排序为 PLRV、PVA、PVY、PAMV、PVM、PVX、PVS、PSTV^[9], 这可能与块茎所含病毒的种类, 以及病毒与类病毒的复合侵染程度有关。据报道, 当只有 PVX 存在时, 42 株有 34 株可脱去这种病毒, 但当有其它病毒复合侵染时, 仅有 2 株是无 PVX 的^[7]。许多研究都表明温度处理对脱除病毒有效^[2,10], Lizarrage 等^[11]认为低温 6~8℃, 处理 3 个月, 脱除 PSTVd 的百分率为 53%。本试验也表明低温预处理对脱除 PSTVd 有利, 同时也表明切取分生组织越小, 脱除 PSTVd 的效率越高, 但为避免基因型的改变及易于再生出小植株, 以剥取带 1 个叶原基的茎尖为好, 且这样进行温度处理不伤害芽, 可作为茎尖脱毒的辅助手段。

所谓的脱毒苗仅指脱除能够鉴定出的已知病毒或者不妨碍大田扩繁的主要病毒, 或者是病毒浓度低到现有检测手段和方法无法检测到^[12], 而目前在马铃薯上已发现了多种病毒、类病毒以及支原体, 已报道的就有 25 种之多^[7], 对于新病毒的研究工作有待加强, 尤其是病毒检测技术需要提高, 对于亲本材料的检测项目应增加, 使材料能充分利用。

总之, 茎尖脱毒是一项长期、艰巨、工作量大的研究工作, 尚有许多方面需要研究, 而各项技术的完善及综合推广应用, 才能更有利于马铃薯的育种实践。

[参 考 文 献]

- [1] 连勇. 马铃薯脱毒快繁及工厂化生产技术 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2001, 264- 269.
- [2] 王秀英, 郭尚. 马铃薯茎尖培养脱毒率的影响因素试验 [J]. 山西农业科学, 2007, 35(1): 39- 41.
- [3] 齐恩芳, 王一航, 张武, 等. 马铃薯茎尖脱毒培养方法优化研究 [J]. 中国马铃薯, 2007, 21(4): 200- 202.
- [4] 刘卫平, 李玉华, 孙秀梅, 等. 马铃薯离体茎尖生长点对几种培养因子的生长反应 [J]. 中国马铃薯, 2001, 15(2): 81- 82.
- [5] 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.
- [6] 仲乃琴. 植物生长调节剂对不同马铃薯品种茎尖分生组织离体培养的影响 [J]. 甘肃农业大学学报, 1999, 34(3): 296- 299.
- [7] 张辅达, 孙宪昀. 马铃薯茎尖培养脱毒研究进展 [J]. 中国马铃薯, 2004, 18(1): 35- 38.
- [8] 崔荣昌, 李芝芳, 李晓龙, 等. 马铃薯块茎类病毒的检测和防治 [J]. 植物保护学报, 1992(3): 263- 269.
- [9] 王炳君, 刘宗樊. 马铃薯茎尖脱毒与微型薯生产 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 44- 62.
- [10] 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.
- [11] Lizarrage R E, Salazar L F, Roca W H, et al. Elimination of potato spindle tuber viroid by low temperature and meristem culture [J]. Phytopathology, 1980, 70: 754- 755.
- [12] 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所. 中国马铃薯栽培学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 131- 287.

Factors Influencing Potato Meristem Culture for Elimination of Viruses

Li Fengyun

(Potato Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan, Heilongjiang 161606, China)

Abstract: The eight potato varieties, such as Kexin 2, Kexin 16, and Kexin 17, were used to study the factors influencing potato meristem culture of potato for elimination of viruses. Growth hormone had an important role to play in shoot formation. Meristem cultured on the medium MS+1.0 mg·L⁻¹ KT+0.5 mg·L⁻¹ IAA+0.5 mg·L⁻¹ GA₃ produced plantlets directly without callus formation, and therefore it was considered the best medium for shoot induction. Pre-treatment at 6- 8℃ and then 37℃ helped eliminate viruses. The source of meristem had no influence on survival rate, but it had some influence on the percentage of plantlets free of viruses. The efficacy of virus elimination was depending on the variety used. Plantlets free of virus had to be replaced by new ones in 15 months.

Key Words: potato; meristem culture; factors