

中图分类号: S532 文献标识码: B 文章编号: 1672-3635(2008)03-0175-03

马铃薯脱毒瓶苗快繁技术

马淑珍, 柳学勤, 谢文斌, 苏敏

(甘肃省庄浪县农业技术推广中心, 甘肃 庄浪 744600)

近年来, 随着庄浪县马铃薯脱毒种薯繁育体系的进一步健全, 脱毒马铃薯的生产规模不断扩大, 生产的各级脱毒种薯也源源不断地向周边县市供应。马铃薯脱毒瓶苗快繁技术进一步得到了补充完善, 新型培养基的应用、全日光培养代替人工培养, 简化了配制程序, 培养的瓶苗更加健壮, 移栽成活率高, 成本低。

1 脱毒瓶苗生产工艺流程

脱毒瓶苗生产工艺流程为: 品种选择→脱毒处理→病毒检测→脱毒瓶苗扩繁→培养→移栽。

1.1 品种选择

一要引进适合当地生产的马铃薯优良品种的脱毒瓶苗; 二要对当地主推的优良品种进行脱毒处理。

1.2 脱毒处理

茎尖分生组织培养是利用病毒在植物组织中分布的不均匀性即愈靠近根、茎顶端病毒愈少的原理, 达到剔除病毒的目的。

(1) 播种: 选择健康的整薯在 37℃ 下处理 10 d,

收稿日期: 2007-06-23

作者简介: 马淑珍 (1966-), 女, 高级农艺师, 主要从事马铃薯脱毒苗生产与研究。

薯在散射光下贮藏较在黑暗条件下保存期可延长 1~3 个月, 尤其贮藏后期设施内气温升高时, 置种薯于散射光下, 在 10~15℃ 室温下较长时间贮藏, 只长成短壮芽。

2.4 化学药剂的使用

化学药剂在种薯贮藏设施的消毒与贮藏病虫害的防治中起着十分重要的作用。种薯贮藏设施除用 40% 福马林 50 倍液喷洒四壁, 40% 福尔马林 40 mL 与高锰酸钾 7 g·m² 熏蒸消毒外, 还可用石灰水、

室内播种, 待芽长至 4~5 cm 长时, 剪取 1~2 cm 长的壮芽。

(2) 外植体消毒: 将芽置于自来水下冲洗 30 min, 用 75% 酒精冲洗 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 在超净台上用 0.1% HgCl₂ 浸泡 12 min, 无菌水冲洗 6 次, 用滤纸吸干水分, 在解剖镜下进行剥离至露出圆滑生长点, 切取带 1~2 个叶原基的茎尖分生组织, 接于 MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹ 的培养基上培养。

(3) 茎尖培养: 光照度 1 000~3 000 lx, 每天光照 16 h, 温度保持 22~26℃, 培养 1 个月, 茎尖转绿后, 转至普通培养基上, 茎尖即可长成小苗。小苗长至 6~7 cm 时, 一个植株编一个号进行转接, 转接一定数量后, 同一编号瓶苗保留一部分, 另一部分进行病毒检测。

1.3 病毒检测

可采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测马铃薯纺锤块茎类病毒 PSTVd, 应用酶联免疫吸附技术, 采用双抗体夹心法, 检测 PVX、PVY、PVS、PVM、PVA、PLPV 病毒。我们用白花刺果蔓陀罗、千日红、番茄幼苗、心叶烟等指示植物作鉴定。方法为: 将指示植物种在花盆中, 置于温室内, 用防虫网罩罩住, 在幼苗期接种。取出瓶内植株, 剪

多菌灵、来苏儿等药剂喷洒处理四壁, 并可用敌敌畏晶体 200~300 倍液喷洒或每立方米用敌敌畏 1 mL 熏蒸, 贮藏过程中用农用链霉素均匀洒于薯块表面和通风兼走道地面并通风晒干, 以防发生霉变, 投放低毒、高效、安全的鼠药消灭鼠害。化学药剂还可用于控制种薯的发芽, 如用大蒜 (蒜头) 与种薯一起贮藏、M-1 (α-萘乙酸甲酯) 处理种薯可抑制种薯提前发芽, 用 0.5% 硫脲、1% 氯乙醇浸种处理种薯促提前萌发。

去根部, 放入研钵中加入适量 1%磷酸氢二钾缓冲液, 研磨至植株组织充分破碎, 用纱布过滤制成接种汁液。用 400~500 目金刚砂作为磨料弹于指示植物嫩叶上, 用棉球棒蘸取接种汁液在叶面上轻轻摩擦, 造成微伤接种, 清水冲洗掉残留金刚砂和汁液。7 d 后观察叶片, 如果出现枯斑, 说明该组瓶苗带有病毒应该剔除, 如果叶面没有病斑出现, 说明该组瓶苗不带病毒, 可以应用于生产了。

1.4 脱毒瓶苗的扩繁

(1) 筛选出适合大规模生产的培养基

通常采用以琼脂为凝固剂的琼脂培养基, 而大批量生产脱毒瓶苗采用琼脂培养基成本较高, 我们通过对新型高效低耗培养基的引进和试验, 选择了河北科技大学生物工程学院研制生产的 MS 全脱水

培养基粉剂。

试验以引进的马铃薯品种 *Atlanti* (大西洋) 脱毒瓶苗作为材料, 设 4 个处理: MS 全脱水培养基: 每 1 000 mL 蒸馏水+40 g MS 全脱水培养基粉剂熬制。倍力凝培养基: 简易配方 MS 配方中大量元素+铁盐) +白糖 30 g·1 000 mL⁻¹+倍力凝粉 7 g·1 000 mL⁻¹熬制。琼脂培养基 (CK); 简易配方+白糖 30 g·1 000 mL⁻¹+琼脂 9 g·1 000 mL⁻¹熬制。

液体培养基 不加任何凝固剂); 简易配方+白糖 30 g·1 000 mL⁻¹。各处理制成后分装于三角瓶中, 固体培养基每瓶装 75 mL 左右, 液体培养基每瓶装 20 mL 左右, 待灭菌后, 每处理各取 30 瓶转接 8 段培养, 培养期间观察各处理长势长相, 15 d 后随机抽取 10 瓶, 测量株高、茎粗、根长等, 见表 1。

表 1 4 种培养基培养脱毒瓶苗的植物学性状

处理	株高 (cm)	茎粗 (cm)	根长 (cm)	根数 (条)	叶数 (片)	大叶长 (cm)	大叶宽 (cm)	叶色
MS 全脱水培养基	10.97 ^{aA}	0.13 ^{aA}	4.07 ^{aA}	12.3 ^{aA}	8.4 ^{aA}	0.85 ^{aA}	0.72 ^{aA}	深绿
液体培养基	7.15 ^{bB}	0.13 ^{aA}	4.60 ^{aA}	12.5 ^{aA}	8.2 ^{aA}	0.93 ^{aA}	0.77 ^{aA}	深绿
倍力凝培养基	7.57 ^{bB}	0.11 ^{bB}	1.81 ^{bB}	11.4 ^{aA}	8.1 ^{aA}	0.81 ^{aA}	0.70 ^{aA}	黄绿
琼脂培养基	7.50 ^{bB}	0.10 ^{bB}	1.23 ^{bB}	7.5 ^{bA}	7.1 ^{aA}	0.79 ^{aA}	0.68 ^{aA}	绿

试验结论为: MS 全脱水培养基培养的马铃薯脱毒瓶苗, 其根系发达、茎秆粗壮、叶色深绿、生长快、整齐、健壮、而且成本低易配制, 可以代替琼脂培养基进行大批量马铃薯脱毒瓶苗的生产。液体培养基培养的瓶苗愈伤组织形成早, 生根快, 根系发达, 茎粗壮, 但腋芽抽发新枝少, 且生长参差不齐, 降低了繁殖系数, 只能用于瓶苗的复壮, 其它两种培养基明显差于上述两种培养基。

(2) 培养瓶的选择

在马铃薯脱毒苗生产过程中, 我们选择 150 mL 三角瓶, 加棉塞封口培养基苗, 由于通气性好, 透光性强, 易散热, 培养的瓶苗生长健壮, 污染少, 分枝少, 故基础苗最好在三角瓶内繁殖。而用作温室移栽生产原原种的移栽苗, 一般选用 250~300 mL 容量的培养瓶, 每瓶扦插 30~40 个茎段, 较三角瓶的繁殖量扩大 3 倍, 加快了繁殖速度, 且降低了成本。同时在培养瓶内繁殖的脱毒瓶苗生长空间大, 叶片大, 整齐度高, 瓶苗长势好。移栽成活率高。

(3) 无菌条件下切段扩繁

要繁殖大批量健壮、嫩绿、生活力强的脱毒瓶苗, 就要在快繁过程中防止病毒的再次浸染及其它杂菌污染, 故组培室要建在一个环境较好的区域, 室内的洁净程度要求很高。接种室内要定期喷洒 75% 的酒精进行消毒, 接种前清洁地面, 用 75% 酒精擦拭接种台面和台顶, 脱毒基础苗用 75% 酒精棉擦拭培养瓶后放在台面上, 打开风机开始吹风, 灼烧支架剪刀和镊子等接种工具 10 min, 放在台面上冷却, 打开室内和台上紫外灯照射 30 min 进行室内消毒。工作人员接种前要用肥皂洗手, 用 75% 酒精棉擦拭双手, 在超净台上打开脱毒基础苗瓶盖, 灼烧瓶口, 每节剪一段迅速接种。接种过程中每次接触接种工具之前, 都要在 75% 酒精棉球上擦拭手指, 每接完一瓶基础苗, 就要灼烧接种工具以防交叉感染。工作人员的工作服经常保持干净, 要戴上口罩、卫生帽进行接种, 接种期间严禁讲话、禁止一切出外活动以防带杂菌进入接种室。

1.5 马铃薯脱毒瓶苗全日光培养

(1) 全日光培养提供的光照条件

强光照有利于马铃薯脱毒瓶苗的生长, 在一定

光照强度范围内,光照愈强,瓶苗生长愈健壮,移栽或扦插成活率愈高。日光培养温室内平均光照强度在夏季晴天中午可达到4.8万lx左右,冬季晴天中午可达到1.4万lx左右。在夏季高温期,需在培养室顶覆盖遮阳网来遮阳降温,最好安装便于拉动操作的遮阳网,以便于在阴雨天气拉开,以增加光照,而在秋、冬、春季,培养室顶不必再用遮阳网,其室内光照度晴天通常在1.2~4.2万lx左右,完全可以满足瓶苗对光照的需求。

(2) 全日光培养提供的温度条件

由于温室效应,日光温室内的温度远远高于人工光照培养室,春秋季节比较适合瓶苗生长;夏季温度过高,培养瓶内高温高湿造成瓶内植株气生根大量生长,瓶苗过早老化,培养基过早变干,影响瓶苗的质量,因此需要进行人工调节。我们在日光温室南侧(入口的一侧)安装了大型换气扇,北侧安装了湿帘,用其产生的雾气来降温,这些设备的启动大大缓冲了室内高温;在冬季寒冷季节需要加温,通过人工调节可以满足脱毒瓶苗生长对温度的要求。

(3) 全日光培养的优点

由于日光温室昼夜温差显著大于人工光照培养室,非常有利于脱毒苗光合产物的积累,瓶苗茎秆增粗,叶片肥厚、叶色深绿,植株单株鲜重显著增加。全日光培养脱毒苗单株有效节间数显著增加,大大提高了瓶苗的繁殖系数,加快了繁殖速度。

全日光培养接近自然培养,植株株高显著降低,生长健壮,移栽成活率高。全日光培养安全、低耗、高效,更加适合于规模化、工厂化、商业性生产,推动马铃薯脱毒种薯的产业化发展。

2 脱毒苗快繁技术要点

2.1 选择健壮的脱毒瓶苗作为基础苗

马铃薯脱毒瓶苗的健壮程度直接影响着移栽苗的质量,生长健壮的瓶苗适应能力强,恢复生长快,繁殖效率高。据观察,生长健壮的瓶苗转接后与生长细弱的瓶苗转接后相比,前者正常生长的时间比后者提前2~3d,而且植株生长健壮、整齐。

2.2 固体培养和液体培养相结合

瓶苗一般采用固体培养基,因为其培养的瓶苗叶腋抽枝率几乎为100%,且固体培养的瓶苗整齐程度较好。对于温度过高、光照不充分等因素造成

的纤弱苗,最好采用液体培养法加以复壮,然后再用固体培养基扩繁。

3 马铃薯脱毒瓶苗生产中应注意的问题

3.1 瓶苗污染率的控制

在脱毒瓶苗的生产过程中,常因种种原因会出现杂菌污染,处理不当往往会造成较大的经济损失。我们在生产中除严格操作规程,如保证容器清洗干净、用清洁的食用水制备培养基、分装培养基时杜绝瓶口和瓶壁粘上培养基、严格灭菌、严格接种等外,专人每天要检查培养室,剔除污染严重的瓶苗远距离销毁,防止交叉感染。对于比较稀缺、需要挽救的瓶苗,在污染初期就要及时处理,方法为:如果培养基污染,污染点较小且离植株较远,可将植株头部剪下(切记剪段不能落入瓶内),迅速接种到新的培养基上;如果污染接近植株,就要进行消毒处理,即取出植株剪去根部,用75%酒精冲洗30s,无菌水冲洗3次,在超净台上用0.1%HgCl₂浸泡7min,无菌水冲洗6次,用滤纸吸干水分,剪段接入新的培养基,多转接几次就可以使用了。

污染分为:细菌类和真菌类污染,针对不同的污染,我们采用不同的处理方法。

细菌污染通常用抗生素来处理,高浓度青霉素可杀灭活跃分裂期细菌,链霉素可抑制静止期细菌,氨苄青霉素比青霉素钠盐更耐高温,故将氨苄青霉素与硫酸链霉素联合应用,效果明显。

真菌污染在生产中可按照不同的品种,配制不同浓度代森锰锌或多菌灵等杀菌剂加入培养基中来控制。高温季节繁殖瓶苗时,也可以在培养基中加入抗生素和杀菌剂来预防污染。扩繁两年以上的瓶苗,有可能再次浸染病毒,只有经过再次提纯才能复壮更新,所以应定期更新脱毒苗,每年通过剥离茎尖分生组织的办法培养新鲜无病毒瓶苗,确保脱毒苗的质量。

3.2 瓶苗生长量的控制

在瓶苗生产过程中,有时需要控制瓶苗数量及生长量,可根据情况降低温度,还可以在培养剂中加植物生长抑制剂,如每升培养基加15mg脱落酸能明显抑制马铃薯瓶苗的生长速度。另外,瓶苗需要长时间保存时,除降低培养温度外,还可加入甘露醇抑止瓶苗生长。