马铃薯茎尖剥离脱毒效果的影响因素分析

孙秀梅

(黑龙江省农业科学院马铃薯研究所, 黑龙江 克山 161606)

我国是全球马铃薯生产第一大国, 种植面积占世界马铃薯总面积的25%, 但是单产水平却远远低于欧美等发达国家, 发达国家的平均产量为37500 kg·hm², 我国的马铃薯平均产量仅为15000 kg·hm²。造成马铃薯产量低的原因有多种, 但主要还是病害严重, 其中病毒病是一个很严重的病害, 致使某些品种严重退化甚至灭绝。现在几乎所有生产马铃薯的国家都在应用茎尖脱毒培养与快速繁殖相结合的技术, 为生产上提供脱毒苗。脱毒效果的好坏, 直接影响到种薯的质量。为此, 从2000年秋季开始至今, 本人进行了影响马铃薯茎尖剥离脱毒效果各种因素的系统试验研究, 并取得了一定的效果。下面就外植体的选择、剥离茎尖的大小、培养条件及人为处理、继代频率的影响5个方面来分析如何提高茎尖脱毒率。

1 外植体的选择及处理

由植物体上切取下来用于组织培养的离体材料称为外植体(explant)。外植体的生理发育时期与茎尖培养的脱毒效果有关。实践证明, 同一品种个体之间在产量上或病毒感染程度上都有很大的差异, 因此在进行茎尖组织培养之前, 对准备进行脱毒复壮的马铃薯品种或材料进行田间株选和薯块选择是非常重要的。

1.1 田间株选

选择标准: 选择符合品种的典型特征(株型、叶形、花色及熟期等), 生长健壮, 无明显病害(病毒病、真、细性病害), 单株产量高的植株。

处理: 在田间直接取芽, 将芽剪取后, 剥去外面几层叶片放于烧杯中, 用纱布封口, 放于

自来水下冲洗1 h, 然后于无菌室严格消毒。消毒时, 先在95%酒精中浸2~4 min(同时振荡, 以使酒精对其充分消毒, 除去叶片茸毛的表面张力), 再用无菌水冲洗3~5次。在无菌条件下, 将消过毒的芽置于40×的立体解剖镜下进行茎尖剥离。

1.2 块茎选择

选择标准: 选择符合品种特征(皮色、肉色、薯型、芽眼等), 无病斑、虫蛀、机械伤的大薯块。

处理: 自然度过休眠。把块茎放在室内散射光下, 待其芽长至1~4 cm, 叶片未充分展开时, 切取1 cm左右的茎端, (以下步骤同1.1处理); 如果将薯块放在较低的温度、较强的光照下, 萌发后取其粗壮的顶芽, 就能获得较大的离体茎尖, 提高培养成活率。药物打破休眠。将入选的块茎, 用1%硫脲+5 mg·L⁻¹赤霉素(GA₃)浸泡5 min以打破休眠, 再用湿润砂覆埋, 置于25℃黑暗条件下, 待芽长至2 cm时, 进行第一次茎尖剥离(步骤如1.1处理)。

1.3 外植体的生理状态

茎尖最好从活跃生长的顶芽上切取。在实际工作中, 为了增加脱毒植株的总数也还是要采用腋芽, 这是因为腋芽在每个枝条上有好几个, 而顶芽只有一个。

另外, 取芽的时间也是个重要因素。在所研究过的大多数马铃薯品种中, 春季和初夏采集的茎尖比在较晚季节采集的容易生根。需要注意的是: 尽量少取田间植株上的芽, 因其污染重, 不易消毒。

2 剥离茎尖的大小对脱毒效果的影响

在最适的培养条件下, 外植体的大小可以决定茎尖的存活率。实践证明: 外植体越大, 产生再生

收稿日期: 2005-06-14

作者简介: 孙秀梅(1973-), 女, 助理研究员, 现从事马铃薯脱毒、快繁、保种及病毒检测的研究工作。

植株的机会也就越多。然而,脱毒效率与外植体的大小成负相关。据有关资料记载:马铃薯的S和X病毒离生长点很近,茎尖剥取长度须在0.2 mm以下,Y病毒等离生长点较远,茎尖切取0.3~0.5 mm就可以去掉,一般认为PVX脱去与否是该植株有无病毒的重要标志。

实际操作中,用解剖钳(本人用注射针头,因其具有尖锐的针尖和锋利的斜面)切取1 mm左右的茎尖(通常带1~2个叶原基)进行离体培养,也能达到脱毒的效果,并且能提高组织培养的成功率;只剥取一个茎尖即顶端分生组织的试验结果表明:脱毒率明显提高,但成活率极低,失去了实际应用的价值。

3 培养条件

3.1 培养基的选择

根据前人及本人研究,液体培养基的培养效果要好于固体培养基,但由于培养过程中水分散失得快,得适时转换培养基。在进行液体培养时,须制作一个滤纸桥,把桥的两臂浸入试管内的培养基中,桥面悬于培养基上,外植体放在桥面上^[2]。但是为了操作上的方便,实际工作时人们更愿用固体培养基。

3.2 生长调节物质的应用

有资料表明,茎尖分生区不是生长素的来源,不能自我提供所需的生长素。生长素可能是由第二对幼叶原基形成的。所以在培养基中,加入少量的生长素或细胞分裂素或二者兼有常常是有利的^[3]。

常用的生长素有IAA(吲哚乙酸),NAA(萘乙酸),KT(激动素),6-BA(6-苄基腺嘌呤),GA₃(赤霉素)等。本人采用A MS+NAA 0.5 mg·L⁻¹+6-BA 0.1 mg·L⁻¹+琼脂),B MS+IAA 0.5 mg·L⁻¹+KT 0.04 mg·L⁻¹+琼脂)两种培养基来做试验,结果表明:A类培养基诱导的茎尖愈伤组织大,B类培养基诱导的愈伤组织相对较小,两种培养基都能成苗,效果相同。

3.3 光温的调控

在茎尖培养中,光照的效果比暗培养的好。茎尖剥离初期的最适光照强度是100 lx,4周后应增加到200 lx。实际培养时光照控制在1000~2000 lx,温度在(25±2)仍能达成苗健壮的效果。

4 人为处理

4.1 热疗法的应用

所谓热疗法,就是在固定的光照及一定的温度或变温条件下对所需材料,经过一定时间的处理使病毒钝化而失活所获取脱毒茎尖的方法。更多的时候,也把此法称为热处理。

尽管顶端分生组织常常不带病毒,但不能把它看成一种普遍现象。有些病毒如TMV,CMV,PVX也能侵染正在生长中的茎尖分生区域。为了提高脱毒率,可以把茎尖培养与热处理的方法相结合。

热处理的材料:可以是母株(已长芽的块茎),也可以是已经剥离的已长到1 cm左右的小植株。

处理方法:对不同的病毒采用相应的方法。

恒温处理:把要处理的材料放入光照培养箱中,以每天16 h光照,(36±1)的高温处理6~8周。

变温处理:以马铃薯卷叶病毒为例,即用40处理4 h,再用6~20处理20 h,连续6~8周。

通过以上两种方法,可使病毒钝化而取得预期的脱毒效果。热处理的优点是:从受热处理之后的块茎的芽上,可以切取较大的外植体进行培养,因而能够提高存活并发育成无病毒植株的茎尖百分数。热处理时的温度及处理时间的长短都应慎重选择,时间过长,会杀死芽眼,还可能对植物组织造成不良影响;时间短达不到预期的脱毒效果。

4.2 病毒抑制剂的应用

据报道,一种抗病毒制剂Virazole已知对若干动物DNA和RNA病毒是有效的,在植物中也已证明,使用病毒抑制剂可以消除烟草原生质体再生植株中的PVX;放线菌酮和放线菌素-D也能抑制原生质体中病毒的复制。

5 继代繁殖频率对脱毒效果的影响

在实际生产中会发现:脱毒苗在最初的2、3年种植中,田间肉眼观察植株生长健壮,叶色、株形正常,种植的代数多就会有退化现象逐年加重的趋势。由于病毒在植物体内会随继代而逐渐积累,脱毒不彻底的种苗质量会随扩繁次数增多而下降。因此,马铃薯脱毒种苗组培快繁,需两年更换一次基础苗,以提高脱毒种苗的质量。