

马铃薯茎尖培养脱毒研究进展

张辅达¹, 孙宪昫²

(1. 辽宁博丰集团菜业公司, 辽阳 111212; 2. 西南农业大学植物保护学院, 重庆 400716)

摘要: 综述了马铃薯茎尖培养脱毒的原理, 影响马铃薯茎尖培养脱毒的因素, 马铃薯试管苗快繁技术与培养条件优化等方面的研究进展, 指出了茎尖培养脱毒中尚存在的一些问题。

关键词: 马铃薯; 茎尖培养脱毒; 脱毒试管苗

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1672-3635 (2004) 01-035-04

马铃薯在我国分布广泛, 栽培面积占世界第二位。但由于病毒侵染引起的马铃薯退化却制约着马铃薯单产水平的提高。目前, 马铃薯茎尖培养脱毒的研究及在生产上的广泛应用取得了巨大的经济效益。近年来, 这方面的研究又取得了不少成果, 现作一综述。

1 马铃薯病毒病及茎尖培养脱毒原理

目前, 在马铃薯作物上已发现了多种病毒、类病毒以及植原体, 已报道的就有 25 种之多, 但仅少数病毒危害严重, 如马铃薯 Y 病毒 (PVY)、马铃薯卷叶病毒 (PLRV)、马铃薯 A 病毒和 X 病毒 (PVA、PVX) 以及马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTVd) 等。在所有的这些病毒和类病毒中, 我国广泛分布的有: PSTVd、PLRV、PVY、PVX 以及苜蓿花叶病毒 (AMV), 而马铃薯 Y 病毒坏死株系 (N 株系)、烟草脆裂病毒 (TRV) 以及番茄黑斑病毒 (TBRV) 只局部发生^[1]。

茎尖培养脱毒的原理是利用病毒在植物体内分布的不均匀性, 即根尖和芽尖的分生组织含病毒量少或不含病毒。尽管导致这一现象的原因还未确定, 但可能是下列之一^[2]: (1) 分生组织旺盛的新陈代谢活动。病毒的复制须利用寄主的代谢过程, 因而无法与分生组织旺盛的代谢活动竞争; (2) 分生组织缺乏真正的维管组织。大多数病毒在

植株内通过韧皮部进行迁移, 或在细胞间通过胞间连丝传输。因为细胞与细胞间的移动速度较慢, 在快速分裂的组织中病毒浓度高峰被推迟; (3) 高浓度的生长素。分生组织的生长素浓度通常很高, 可能影响病毒的复制。也有一些病毒如 PVX, 在人们所有观察的分生组织中都发现有其病毒粒体的存在, 但通过茎尖培养依然可以脱去 PVX, 这说明 PVX 是在培养过程中被脱去的, 培养中脱毒的机制目前尚不清楚。可能是由于分离组织所产生的某种钝化因子或培养基中某种成分对病毒的效应所致, 也可能是由于合生组织与培养基接触的结果。病毒复制时, 需要某些作用于靠近分生组织圆锥体细胞的酶类, 当茎尖被剥成很小时, 它们的生长过程暂时被打乱了, 病毒复制时所需要的酶失去作用, 从而中断了传染性病毒的复制^[3]。一般认为类病毒是无法脱除的, 而据有关报道, Stace Smith 等结合热处理经过重复茎尖培养脱去了 PSTVd, 只是脱毒率太低, 具体机制尚待研究^[4]。

2 影响马铃薯茎尖培养脱毒的因素

2.1 影响茎尖成活的因素

2.1.1 茎尖大小及芽的选择

一般来说离体茎尖越大, 越易成活, 但病毒越难去除。由于对大多数植物来讲, 叶原基是茎尖成活的必要条件, 因此, 在培养中必须保留 1~2 个叶原基。同时, 生长点附近的组织要尽量少, 这样的茎尖大约 0.1~0.3 mm, 既保证了一定的成活率, 又能排除大多数病毒。

芽的选择也直接影响离体茎尖的成活率。通常

收稿日期: 2003-09-16

作者简介: 张辅达 (1978-), 男, 助理农艺师, 主要从事蔬菜种植与病虫害防治研究

大田植物顶芽和腋芽以及室内萌芽可适于茎尖培养脱毒, 但为了提高离体茎尖培养的成活率应选择壮芽。研究表明, 如果把薯块放在较低的温度 (约 20 °C), 较强的光照下进行萌发, 并取其壮芽, 就能获得较大的离体茎尖^[2]。此外, 在甘薯茎尖培养脱毒研究中发现, 靠近顶芽的三个腋芽其分生组织培养成芽率高, 距离顶芽越远, 成活率就越低, 而马铃薯是否也具此规律, 值得研究和探讨^[3]。

2.1.2 培养基成分和培养条件

马铃薯茎尖培养常用 Morel、MS、MA、农事和革新等培养基。国内主要采用革新和 MS 培养基。基本培养基中提高铵盐和钾盐浓度, 有利于茎尖成活。一些附加成分, 特别是植物生长调节剂的种类和浓度对于茎尖生长发育的影响很大。少量的细胞分裂素有利于离体茎尖成活和生长, 常用 0.05 μ/L 的 6-BA。0.1 μ/L 以下的 GA₃ 有利于茎尖各部分的生长, 但浓度过高或使用时间过长会产生不利影响。生长素对茎尖生长和发育具有重要作用, 尤其以 NAA 效果显著, 常用来控制茎尖成活和苗分化, 浓度一般在 0.1~1 μ/L。因不同品种对激素反应不同, 所以使用的激素种类和浓度不能一概而论。此外, 在培养过程中, 一般马铃薯茎尖组织有几种生长发育类型, 应根据不同的类型, 改变生长调节剂 (主要是生长素) 的浓度及处理时间, 结合适宜的培养条件才能提高茎尖成活率。

培养基硬度也很重要, 因为琼脂不同, 用量也有差异, 培养基较软有利于茎尖成活。用廉价的卡拉胶培养出的组培苗不仅生长速度快于琼脂培养基的组培苗, 而且降低了成本^[5]。为了得到良好的根系, 也有人建议用液体培养基, 用滤纸桥做支持物, 效果较好, 但比较费事。

2.2 影响病毒去除的因素

2.2.1 茎尖大小和病毒种类

马铃薯茎尖培养脱毒的效果与茎尖大小直接相关。由于病毒浓度在茎尖附近呈递减分布, 因此茎尖越小脱毒效果越理想, 但茎尖就越难成活。此外, 由于不同病毒在茎尖分布不同, 脱毒的效果也与病毒种类有关。各种病毒的脱除从易到难顺序如下: PLRV、PVA、PVY、马铃薯奥古巴花叶病毒 (PAMV)、PVM、PVX、PXS 和 PSTVd。此顺序也不是绝对的, 会因品种、培养条件、病毒株系不同等而有所变化。

2.2.2 化学治疗剂的使用

化学治疗剂能提高培养基中去除病毒的能力。如在培养基中加入碱性孔雀绿、2,4-D 和硫尿嘧啶等病毒抑制剂, 能显著提高产生无病毒植株的百分率。在甘薯茎尖培养脱毒研究中发现, 培养基中添加适量的 TS 制剂 (一种病毒钝化剂) 虽稍微抑制了茎尖的发育, 但可以提高脱毒率, TS 制剂对马铃薯茎尖培养脱毒是否有相同的效果, 值得研究和探讨^[6]。

2.2.3 热处理的使用

热处理也可以提高培养中去除病毒的能力, 但不同病毒对高温预处理的反应不同。PLRV、PVA 和 PVY 不进行高温预处理, 脱毒率也相当高 (可达 80% 左右)。因此如果只是去除这些病毒, 并不必进行热处理。而高温预处理却可以显著提高对 PAMV、PVX 和 PVS 的去除^[4]。

2.2.4 影响病毒去除的其它因素

去除病毒的难易还受其它病毒的影响。有人发现, 只有 PVX 存在时, 从茎尖培养产生的 42 株植物中, 有 34 株是无这种病毒的, 但是当植物受 PVX 病毒及其它病毒复合侵染时, 从茎尖培养产生的 34 株植物中只有 2 株是无 PVX 病毒的, 这说明病毒之间存在着干扰作用^[4]。

对于同一种病毒去除的结果有很大的差异, 这与培养条件有密切的关系。通常, 接种的茎尖放在培养室内培养, 温度可在 15~30 °C 范围内以 20 °C 为最适, 光照 1000~3000 lx, 以日光灯为光源, 每天照光 16 h 为宜。应当指出的是, 这只是些经验性的资料, 最优化的培养条件只能依不同的地区、不同的马铃薯品种以及不同的病毒种类等在实践中去摸索。

3 马铃薯试管苗快繁研究与培养条件优化

3.1 马铃薯快繁技术研究

为了满足市场需求, 必须培育出足够多的脱毒试管苗, 因此, 如何在防止再侵染的条件下快速繁殖, 便成为无病毒苗用于生产的关键。目前, 生产上解决这一问题普遍采用的方法是^[3]: (1) 将无病毒小植株切成每个节一个叶原基 (腋芽) 的切段, 平放在没有激素的 MA 培养基上, 约 2 周后长成带有 3~4 片叶的小植株, 这种繁殖方法快速简便, 且不会造成再侵染, 繁殖系数提高近 10 倍,

因此这种方法在生产上应用最广。(2) 将无病毒小植株切段转移到含生根诱导剂和 2% 蔗糖的 MS 培养基中, 在三角瓶中培养 2~3 个月, 可获得 30~50 个休眠无病毒小块茎。这种方法由于不进行无病毒苗的网室移栽工作, 而直接利用无病毒薯块播种, 提高了成活率, 但繁殖系数略低于切段繁殖。

为了进一步提高繁殖倍数, 有人借鉴其他学者诱导菊芋、绿巨入的茎尖产生丛生芽以提高繁殖倍数的成功经验, 研究出了新的马铃薯试管苗快繁技术: 用 6-BA 诱导茎尖产生丛生芽, 丛生芽分割成单芽, 接种到生根培养基中, 让其快速成苗^[7]。试管苗的带芽段接到含有 NAA 的培养基中, 可快速成苗。

3.2 培养条件的优化研究

3.2.1 配制培养基的不同水质

据报道, 只要 pH 调到 5.8 左右, 蒸馏水或自来水代替去离子水对幼苗生长没有什么影响^[4,8], 但各地自来水水质不同, 因此应事先做试验。就雨水(雪水)、自来水(开水)、蒸馏水的对比试验表明, 雨水(雪水)配制的培养基最有利于试管苗的生长^[9]。

3.2.2 碳源及其浓度

食用蔗糖与试剂蔗糖具有相同的效果, 因此, 完全可以用食用蔗糖代替试剂蔗糖作为培养基的碳源^[4,8], 为了朝着敞开培养迈进, 一些研究者在培养基中只加琼脂和大量元素, 在室外自然光照下培养, 幼苗能够成活, 并能生长, 只是比有糖的要差得多。而理论推测, 其自养能力是比较强的, 移栽于土壤中成活率应有所提高。因此较为合理的做法应根据不同的培养条件, 适当降低碳源含量。在这方面, 利用自然光源培养的马铃薯脱毒试管苗, 培养基最适碳源浓度为 12.5 g/L, 较人工灯光培养的最适碳源浓度 20 g/L 减少了 1/3, 移栽成活率提高了 8.91%^[10]。

3.2.3 固定物的选择

马铃薯组培苗培养中, 过去通常用琼脂作为固定物。近年来, 人们研究发现, 以低廉的卡拉胶、倍力凝作固化剂或 MS 全脱水培养基培育的试管苗健壮、生长快、成本低, 完全可以代替琼脂培养基进行大批量试管苗的生产^[11~13]。用魔芋粉培养的组培苗生长明显快于琼脂、卡拉胶培养基的组培苗, 而且苗壮, 成本低^[11]。为了进一步降低成本,

一些研究者纷纷尝试以营养液培养试管苗。不加琼脂而采用浅液体培养试管苗, 愈伤组织形成早, 生长快, 根系发达, 茎粗壮, 生长速度先慢后快进而超过固体培养的生长速度, 而后由于液体培养基养分消耗殆尽, 苗生长速度趋缓^[5,13]。液体培养优于固体培养, 同时用低廉的普通棉作为支持物, 不仅可以防止淹苗, 而且试管内可以加入足够的营养液以保证试管苗的生长^[14]。液体培养方式虽有很多优点, 但另据报道, 液培试管苗的腋芽抽发新枝少, 且生长参差不齐, 降低了繁殖系数^[13], 因此, 液培还需要进一步深入研究, 目前, 液培主要用于试管苗的复壮。

3.2.4 光照与营养元素

只要气温适宜(10~30℃), 在散射太阳光照下(遮阳)幼苗生长比室内灯光下健壮得多^[4,14~16], 提高移栽的成活率, 此外碳源浓度可以较人工灯光培养降低 1/3, 大大降低了生产成本^[10]。

试验证明, 培养基中除去微量元素也不影响幼苗的生长。至于继代培养, 长期缺乏这种元素, 是否会使得幼苗产生微量元素缺乏症尚无试验证据。而对 K⁺含量的研究表明, KH₂PO₄ 的含量在 140~155 mg/L, 培养的试管苗株高合适、粗壮、叶片大, 利于栽植, 且栽植成活率高。

3.2.5 生长调节物质及抗生素

在马铃薯脱毒试管苗生根培养中, 通常加 BA 作为生根诱导剂。在生产中为了缩短培养时间, 降低生产成本, 可以以低价的生根粉代替 BA, 培育出的试管苗在生根、生长等方面都优于 BA^[17]。在简易 MS 培养基中加入浓度为 10~20 mg/L 的生长延缓剂 B₉ 培育出的试管苗株粗壮、叶片大, 利于栽植, 成活率高^[15]。此外, 在培养基中加入抗生素具有抑菌、杀菌和改善脱毒苗根系生长的作用。如果将氯苄青霉素和硫酸链霉素联合应用, 具有更加明显的抑菌效果^[18]。当然, 生长延缓剂和抗生素的加入与否以及加入量的多少应依具体情况而定。

经过不懈努力, 马铃薯茎尖培养脱毒研究已经取得了长足的发展, 但仍存在不少问题尚待进一步深入研究。茎尖培养脱毒原理、马铃薯各种病毒在各地的分布情况以及各地危害马铃薯的主要病毒与类病毒等都是重要的研究课题。因为这些基础理论

知识搞清了, 才能促进茎尖培养脱毒技术在发展上有本质的突破。此外, 茎尖培养脱毒的效果及品种范围仍需进一步扩大, 而各项技术的完善及综合运用才能更有利于生产实践。

参 考 文 献

- [1] 姚文国, 崔茂森. 马铃薯有害生物及其检疫 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001, 133—134.
- [2] Luis F Salazar. 马铃薯病毒及其防治 [M]. 阎文昭, 张勇飞, 等译. 北京: 中国农业科技出版社, 2001, 183—184.
- [3] 胡琳. 植物脱毒技术 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000, 111—112.
- [4] 陈维伦, 陶国清. 植物生物技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1987, 36—37.
- [5] 罗智敏, 王炳君, 李戊彤, 等. 卡拉胶和琼脂为固定物对马铃薯脱毒组培苗生长的影响 [J]. 马铃薯杂志, 1997, 11 (2): 73—74.
- [6] 尚佑芬, 杨崇良, 赵玖华, 等. 应用茎尖培养技术防治甘薯病毒病的研究 [A]. 刘仪. 植物病毒与病毒防治研究 [C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997, 244—249.
- [7] 刘卫平. 马铃薯试管苗新的快速繁殖方法研究 [J]. 中国马铃薯, 2000, 14 (3): 141—142.
- [8] 牛爱国, 侯丽娟, 包永信, 等. 马铃薯组培苗液体静置培养微繁殖技术研究 [J]. 马铃薯杂志, 1999, 13 (2): 35—38.
- [9] 补彦丰, 王萃莲, 魏固宁, 等. 用三种不同水质配制培养基对马铃薯脱毒试管苗的影响 [J]. 中国马铃薯, 2000, 14 (3): 173.
- [10] 仲乃琴, 王一航, 齐恩芳. 碳源浓度对不同光源培养的马铃薯脱毒试管苗生长的影响 [J]. 中国马铃薯, 2000, 14 (2): 73—75.
- [11] 谢庆华, 吴毅歆, 张勇飞. 固定物对马铃薯脱毒试管苗生长的影响 [J]. 中国马铃薯, 2001, 15 (1): 20—21.
- [12] 滕伟丽, 杨琦. 倍力凝在马铃薯脱毒试管苗生产中的应用研究 [J]. 马铃薯杂志, 1999, 13 (4): 202—204.
- [13] 马淑珍. MS 全脱水培养基培养马铃薯脱毒试管苗效果初报. [J] 马铃薯杂志, 1999, 13 (4): 219—220.
- [14] 孔繁春, 李文刚, 姚裕琪, 等. 不同培养方式和光照对马铃薯脱毒试管苗微繁的影响 [J]. 马铃薯杂志, 1999, 13 (1): 20—22.
- [15] 王巧玲, 李淑芳, 王丽爱, 等. 马铃薯脱毒试管苗壮苗培育初探 [J]. 马铃薯杂志, 1999, 13 (3): 155—156.
- [16] 高慧君, 陈涛. 马铃薯脱毒试管苗自然光照培养研究 [J]. 马铃薯杂志, 1996, 10 (1): 29—31.
- [17] 唐子永, 王延玲, 程淑云. 生根粉剂诱导马铃薯脱毒试管苗生根研究 [J]. 中国马铃薯, 2000, 14 (1): 13—14.
- [18] 方志明. 加入抗生素培养基对马铃薯试管苗的影响 [J]. 中国马铃薯, 2001, 15 (2): 92.

欢迎订阅 2004 年《中国马铃薯》杂志

《中国马铃薯》是由中国作物学会马铃薯专业委员会主办, 东北农业大学承办的国内唯一马铃薯专业科技期刊。它以繁荣我国马铃薯事业为办刊宗旨, 报道我国有关马铃薯的学术研究、科研成果, 介绍本专业的实用技术及最新进展。该刊设有学术园地、研究简报、经验交流、综述、薯类加工、病害防治、知识介绍、新品种介绍等栏目。

本刊国内外公开发行人, 双月刊, 大 16 开本, 彩色封面, 每期定价 5.00 元, 全年 30.00 元, 哈尔滨市邮局发行, 全国各地邮局订阅, 邮发代号: 14—167。为了减少中间环节, 请读者直接汇款至编辑部。本刊承揽广告业务, 欢迎各界广为利用。

另外, 我部尚有下列有关马铃薯的书籍。

2000 年: 面向 21 世纪的中国马铃薯产业, 定价 50 元; 2001 年: 马铃薯产业与西部开发, 定价 50 元; 2002 年: 高新技术与马铃薯产业, 定价 50 元; 2003 年: 中国马铃薯研究与产业开发, 定价 60 元。

有求购的单位或个人请另加 10% 邮费, 款到即寄。

通讯地址: 哈尔滨市东北农业大学《中国马铃薯》编辑部 邮 编: 150030

电 话: 0451—55190739 55190370