

马铃薯组培脱毒试管苗繁育技术

赵佐敏, 艾 勇

(贵州省安顺市农科所 562109)

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1672-3635 (2003) 05-301-04

1 前 言

马铃薯通过组织培养途径, 从而建立无病毒生产体系是一种非常有效的高新生物技术实用化措施。发达国家早在上世纪 50 年代就采用多种脱毒途径生产无病毒种薯, 取得巨大成功。70 年代初吉林农业大学进行了马铃薯茎尖组织培养, 以后黑龙江省农科院马铃薯研究所、中国科学院微生物研

究所、植物研究所、内蒙古乌盟农科所也相继开展了这方面的研究工作。目前已有 20 多个省、市、60 多家单位成功利用此项技术, 已获得近百个品种的脱毒种薯。我们从 2001 年开始马铃薯脱毒组培快繁研究, 至今已得到“米拉”、“威芋 3 号”的脱毒试管薯千余粒、微型薯万余粒, 这些脱毒种薯是全面大幅度提高马铃薯产量和质量的可靠保证。

2 马铃薯病毒与检测

主要危害马铃薯的病毒有 PLRV、PVA、PVY、PVM、PVX、PVS、PAMV 七种, 类病毒有 PSTV。一般情况下, 首先采用聚丙烯酰胺凝胶

收稿日期: 2003-10-20

作者简介: 赵佐敏 (1967-), 女, 农艺师, 主要从事园艺及生物技术研究。

- [10] Peteroen M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. *Trends in Biotechnology*, 1997, 15: 173-177.
- [11] 郭三堆. 苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因改造后的杀虫活性研究 [J]. *中国农业科学*, 1993, 26 (5): 77-81.
- [12] Vaeck M A. Transgenic plant protected from insect attack. *Nature*, 1987, 328: 33-37.
- [13] Barton K A. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic nicotian provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol*, 1987, 85: 1103-1109.
- [14] 张智奇, 周音, 王少鸥等. 抗虫基因及其在植物上的应用 [J]. *吉林农业大学学报*, 1996, 18 (1): 91-95.
- [15] 杨虹. 苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因导入水稻和原生质体后获得转基因植株 [J]. *中国农业科学*, 1989, 22 (6): 1-5.
- [16] 谢道听, 范云六. 苏云金芽孢杆菌杀虫基因导入中国栽培水稻品种中花 11 号获得转基因植株. *中国科学 B 辑*, 1991, 21 (8): 830-834.
- [17] 谢道听, 范云六, 黄俊麟等. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得转基因植株 [J]. *中国科学 B 辑*, 1991, 21 (4): 367-373.
- [18] Peteroen M. Progress and prospects for field use of B. t. genes in crops. *Trends in Biotechnology*, 1997, 15: 173-177.
- [19] Mackenzie D. Genes sans frontiers. *New Scientist*, 1997, 153,

2071-2079.

- [20] Gatehouse A M R. Introduction of genes conferring insect in Brighton. *Crop Protection Conference*, 1988, 3: 1245-1254.
- [21] John C Thomasetal. Introduction and expression of an insect proteainase inhibitor in alfafa (*Medicago saliva*). *Plant Cell Reports*, 1994, 14: 31-36.
- [22] 刘春明. 豇豆胰蛋白酶抑制剂抗虫转基因烟草的获得 [J]. *科学通报*, 1992, 37 (18): 1694-1697.
- [23] 王志斌, 李学勇, 郭三堆. 植物凝集素与抗虫基因工程 [J]. *生物技术通报*, 1998 (2): 5-10.
- [24] Boulter D, Edwards G A, and Gatehouse A M R. Additive protective effects of different plant derived insect resistance genes in transgenic tobacco plants. *Crop Prot*, 1990, 9: 351-354.
- [25] Edward G A, Hepher A, and Clerk S P. Pealectin is correctly processed, stable and active in leaves of transgenic potato plants. *Plant Mol Biol*, 1991, 17: 89-100.
- [26] Hilder V A, Powell K S, Gatehouse A M R, et al. Expression of snowdrop lectin in tranegenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Research*, 1995, 4: 18-25.
- [27] Anghard M R Gatehouse, Rachel E Down, Kevins Powell, et al. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1996, 79: 295-307.

电泳法对材料进行 PSTV 检测, 若有 PSTV 则应坚决淘汰, 因茎尖脱毒也难脱掉此种类病毒, 故不能作茎尖培养材料。其它病毒用酶联免疫吸附技术、双抗夹心法, 检测未被七种病毒侵染的试管苗, 最后结合指示植物 (如白花刺果蔓陀萝、烟心叶、千日红、番茄幼苗等) 作鉴定, 以获得确证的脱毒试管苗, 方能进行繁殖。根据病毒靠近生长点远近, 其脱毒难易程度为 $PLRV < PVA < PVY < PAMV < PVM < PVX < PVS$ 。在随后无病毒种薯生产体系的各个环节应进行多次复检。现我们已采用了较可靠、有效的酶联免疫吸附法检测病毒, 使检测手段更趋实用化、简便化。

3 马铃薯脱毒原理与方法

3.1 脱毒原理

分生组织顶点培养法已发展成为对几乎所有无性繁殖作物脱除病毒的有效手段。马铃薯植株有突出的发育可塑性, 其游离原生质体、单细胞、愈伤组织和植株任何一部分作外植体都可能再生完整植株。不同病毒在植物体内分部不均, 马铃薯的 X 病毒和类病毒感染分生组织和维管束, 其余病毒却仅存在于维管系统组织。首先, 由于分生组织没有维管系统, 这就使通过维管系统传染的病毒不会感染到分生组织; 其次, 植物分生组织代谢活力最强, 病毒难以在代谢旺盛、细胞生长和分裂快速的分生组织细胞中增殖; 再次植物分生组织中生长素的含量 (或活性) 一般远远高于其它组织, 具有抑制病毒的增殖效果^[1]。

3.2 提高茎尖分生组织脱毒率的措施

病毒可用分生组织结合热处理、化学处理、低温处理等法脱除。热处理可使植物组织中的病毒钝化, 化学处理可抑制病毒的增殖, 低温处理主要针对类病毒。

3.2.1 茎尖分生组织培养结合热处理

热处理方法很早被成功地用于消除感染甘蔗的斐济病毒。热处理 (37 °C) 对消除马铃薯卷叶病毒 (PLRV) 有效果, 并大幅度降低马铃薯 Y 病毒的含量^[1]。在单独通过热疗或茎尖培养法都不易消除 X 和 S 病毒的情况下, 采用茎尖培养与热处理 (35~38 °C 处理 8~18 周) 结合可有效地脱毒, 但时间不能太长, 否则在脱除病毒的同时, 也会钝化寄主组织中的抗病毒因子。两种温度交替使用效果

好, 如采用 40 °C (4 h) + 6~20 °C (20 h) 可脱除马铃薯 PLRV, 因连续高温会危及马铃薯芽眼的活力。

3.2.2 茎尖分生组织结合化学处理

高浓度的生长素如 2, 4-D 或 NAA 可抑制病毒的增殖; 利用高等植物对重金属离子的耐性要高于原核生物病毒的原理, 提高培养基中重金属离子含量, 也可提高脱毒率; 在培养基中加入抑制病毒增殖的病毒唑、硫尿嘧啶、利福平等时有较好的脱毒效果。

3.2.3 低温处理可增加脱除类病毒的机率

对材料进行长时间 (4 个月以上) 的低温 (6~8 °C) 处理, 再进行分生组织剥离和培养, 对于脱除类病毒具有良好的效果^[1]。

4 脱毒苗的繁殖

4.1 接种材料的处理

脱毒处理所用茎尖最好取自生长活跃的芽, 以顶芽的茎尖成活率高。接种茎尖时按照: 流水冲洗块茎芽条 1 h → 吸干水分 → 75% 酒精浸 30 s → 0.1% 升汞处理 5 min → 无菌水洗 5 次, 体视镜下剥取 0.2~0.3 mm 茎尖接种的程序进行。也有用切取热处理芽条流水冲洗 30~60 min → 70% 乙醇浸 20 s → 10% 次氯酸钠液中处理 10 min → 无菌水冲洗 3 次 → 切取含 1 个叶原基的茎尖 0.1~0.2 mm 接种的办法^[2]。还有采取选健康整薯室内催芽, 经 38 °C 热处理 2 周, 无菌条件下剥取带 1~2 个叶原基的生长点接种^[3]。不论何种方法, 所切取茎尖以带 1~2 个叶原基为好, 这是马铃薯茎尖成活的必要条件, 叶原基提供茎尖生长和发育的内源生长素和细胞分裂素, 尤其应注重茎尖大小一般按 0.2~0.5 mm 之间切取, 易脱毒、也易成活。经过愈伤组织阶段所产生的苗, 其植株变异率会增大^[4]。

4.2 茎尖分生组织的诱导与成苗

一是茎尖分生组织培养成苗时间的长短与脱毒率有关, 成苗所需时间长, 脱毒率越高; 二是在分生组织诱导培养基中加入一定量的生长素和细胞分裂素, 实践证明, 6-BA 是诱导茎尖产生丛生芽的主要物质, 将茎尖培养于 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.1 mg/L 的培养基上 (pH 5.8), 在 25 °C ± 1 °C、光照 2500~3000 lux, 每天光照 12 h 下, 其茎尖产生的丛生芽个数多, 速度快, 可提高繁殖倍数 5~

8倍^[5]；三是在诱导丛生芽生根和带芽茎段快速成苗时，用MS+NAA 0.5 mg/L培养基最好，生根速度快、条数多、比率大、小苗生长快，所用NAA范围在0.5~2.0 mg/L之间^[6]。茎尖培养在MS+6-BA 0.05 mg/L+NAA 0.1 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L+3%蔗糖 (pH 5.8)、内加滤纸桥的液体培养基上，在光照度2000 lux，培养温度21~25℃条件下，可培养出试管苗^[3]。当茎尖接种于MS+0.1 mg/L GA+0.5 mg/L BA+0.05~0.1 mg/L NAA培养基上时，成苗虽多，但有少数愈伤组织化^[2]。我们采用MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L+3%蔗糖+0.8%琼脂 (pH 5.9)的培养基，同样可诱导出茎尖试管苗。

4.3 脱毒试管苗继代扩繁

继代扩繁以使试管苗达到一定的基数是提高脱毒种薯生产量的关键。脱毒苗继代快繁在于无菌条件下切取带1~2个叶片和腋芽的节段接种于继代培养基上，待其长满瓶后再切段接种繁殖。其培养可用固体和液体两种培养基。我们采用了简化培养基，即大量元素、微量元素、铁盐、3%食用白糖、琼脂等。液体培养基生产成本低、生根快、茎叶粗壮、根量大、成活率高、移栽时不洗根，但苗顶易焦化。有报道培养容器以普通广口瓶替代三角瓶，一则可增加苗的生长空间、利于壮苗，二则可降低成本^[7]。也有用雨水配制培养基的，它有多种微量元素，利于苗生长，且节约能源^[8]。固体培养基继代扩繁可用魔芋粉代替琼脂，其特点在于生长速度快、茎叶和根的生长量大、苗粗壮浓绿，可缩短培养时间^[9,10]，尤为适于工厂化育苗，是低成本培育壮苗的最佳途径之一。

4.4 壮苗培育

继代扩繁既要有量的扩充，更应注重质的提高，以利提高移栽成活率。在任一培养基中增加钾离子浓度，加入合适浓度的生长延缓剂B₉，利用太阳散射光培育试管壮苗，当所加KH₂PO₄含量在140~155 mg/L、B₉ 10~20 mg/L时，培育的试管苗高度合适、粗壮、叶片大、好移栽，成活率达100%^[11]，也有用B₉和CCC来控制试管苗徒长的报道，浓度30 mg/L的B₉或500 mg/L的CCC可明显增加茎粗，缩短节间长度，增强试管苗长势^[12]。用MS+6-BA 0.5 mg/L+GA 0.4 mg/L+3%白糖+0.2%活性炭作

为壮苗培养基效果也不错。

4.5 脱毒试管薯（或微型薯）的繁殖

当夏季高温高湿不适合于试管苗的移栽与切段扦插时，可把试管苗的培养转为试管薯生产。试管薯可视为“育种家种子”，不仅具有试管苗的所有优点，而且还可脱离培养基以利长期保存和运输及种质交换。微型薯的诱导在黑暗条件下进行，最适温度为22℃。其培养基可用MS+CCC 500 mg/L+6-BA 5.0 mg/L+8%白糖。从降低成本来考虑，可采用廉价的香豆素代替CCC和6-BA。用MS+50~100 mg/L香豆素的液体或固体培养基，同样结薯好。在全黑暗条件下适当低温(19±1℃)有利于试管薯的形成和膨大，对结薯数量和平均鲜薯重有极显著的促进作用；液体培养基诱导试管薯的效果优于固体和固液双层培养基，添加100 mg/L的CCC能促进试管薯形成和显著增加结薯量^[13]。

5 建立良种繁育体系生产脱毒种薯

5.1 生产原原种

马铃薯脱毒原原种的规模生产首先必须保证实验室有足够数量的脱毒试管壮苗，然后经过炼苗、防虫网室内扦插再到繁育原原种种薯等步骤。为降低生产成本，我们对脱毒试管苗的快繁以温网室扦插扩繁为主，其优点有三：一是比实验室扩繁节省投资；二是繁殖速度快；三是方法简单。用少量的脱毒核心种源（试管苗或试管薯），在防虫网室中大量繁殖脱毒种薯（原原种）已成为加速脱毒马铃薯大面积推广种植的技术关键。

5.1.1 基质的选择与处理

脱毒马铃薯试管苗的移栽基质要求疏松、透气性良好、且需经消毒（高温或甲醛、硫磺薰蒸）处理，以防病虫害、杂菌感染、杂草滋生。一般用泥炭土:蛭石1:1作基质，苗成活后浇营养液。有报道认为可用不浇营养液的基质，即蛭石（珍珠岩）17+灰渣2+无土羊（马）粪1+1~2 kg/m³复合肥（N:P:K=15:15:15）^[14,15]。笔者们采用厢底放粗砂5 cm、中层用营养腐熟土（鸡粪+土+K₂O₄+磷肥+尿素）10 cm、表层用菜园土+磷肥+腐熟桔杆，厚度达10 cm，混合基质过筛高温消毒后，栽前1~2 d浇透水，使土壤沉实，保持栽时土壤湿度达60%左右。

5.1.2 试管脱毒苗温、网室内移栽

用作移栽或扦插的试管苗, 苗龄不宜过长, 无菌培养1个月左右即可移栽。移栽或扦插前开瓶炼苗3~5 d, 从培养瓶内取出脱毒苗, 洗净培养基, 分别按2~3个节段剪切, 留2个节以上移栽, 基端用促生根液 IBA (15~30 mg/L) + B₉ (1~10 mg/L) 处理, 不仅可促进生根, 还可控制前期徒长, 最后按株行距4 cm × 5 cm 开行打孔定点, 栽植时苗基部土壤一定要压实, 并及时浇足定根水。

5.1.3 脱毒苗剪切快繁

当扦插苗长到10 cm左右、叶片达7~8片时, 可剪尖扦插, 剪尖可抑制植物的顶端优势, 使腋芽发成侧枝, 当侧枝长到3~5片叶时, 便可再行剪尖扦插^[16]。剪尖扦插时插条应从母株叶腋处带2叶1心或3叶1心的分枝、茎长3~5 cm 处用消毒后的锋利刀片切取, 注意切口整齐茎秆不空心^[17]; 插条叶片下的茎段要长; 切口处不带腋芽, 插深1 cm。插条剪下后在50 mg/L NAA+0.1%链霉素或20 mg/L IBA 等溶液中浸蘸基端后扦插, 随剪随处理随扦插, 以促进生根。试验表明, 顶端节位易成活, 因此节段扦插时, 顶端节位和中、下部节位节段应分开扦插, 以免长势参差不齐, 有利下次苗的剪切扦插。

5.1.4 扦插苗的管理

注意保温、保湿、遮荫、防病虫害四个环节; 保持日均温20℃左右; 插后立即浇足水, 前期空气湿度保持在95%以上, 以后逐步降低; 扦插前要搭好遮荫网, 直至下生根、上生长为止; 经常检查插条基部是否有霉烂及虫害, 作好补苗和病虫害防治工作, 可用瑞毒霉、甲霜灵锰锌600~800倍液每7~10 d一次喷雾, 同时用敌敌畏、速灭杀丁、乐果等药交替使用防蚜虫、红蜘蛛等有害。

5.1.5 原原种的生产与扩繁

脱毒苗经温、网室扦插达到一定生长量后, 可繁殖用于生产原原种的扦插苗。此时插条节段基端切口处必须带上腋芽, 扦插深度2 cm以上, 保证埋入基质中1~2个腋芽, 苗长至10 cm左右, 进行培土, 也增加结薯个数, 促进大薯。

5.2 原种生产

原种生产不可能全有温、网棚, 因此, 需要选择适当的地点繁殖原种, 生产基地应当具备的条件是: 海拔或地势较高, 气候凉爽; 蚜虫少; 风大雾

大有翅蚜虫不易飞迁、降落的地方; 天然隔离条件好, 如林中的空地、四周环山的平地等; 无传播病毒和细菌性病害的土地; 种薯田不能和茄科植物连、间、套作等, 且必须远离蔬菜地、油菜地和烟草地等。

5.3 良种生产

良种来自一级原种或二级原种, 为保证种薯的质量, 从脱毒试管苗到良种生产, 植株生长期间应进行喷药防蚜虫、拔除病、杂株、杂草、加强管理等。良种繁育体系一旦建立, 马铃薯生产即可进入良性循环。

参 考 文 献

- [1] 李灿辉, 左祥. 用茎尖分生组织培养方法脱除马铃薯病原菌[J]. 云南农业科技, 2000, (1): 44.
- [2] 罗玉, 冉春玲, 张铁等. 滇东南农家马铃薯品种脱毒植株的获得[J]. 中国马铃薯, 2000, (4): 210.
- [3] 林丛发, 魏泽平, 罗仰奋等. 马铃薯试管苗培育快繁八要点[J]. 福建农业科技, 2001, (1): 37.
- [4] 李灿辉, 杨文洪. 马铃薯无病毒种薯生产体系[J]. 云南农业科技, 2000, (3): 40.
- [5] 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, (2): 82.
- [6] 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, (3): 141-142.
- [7] 李学湛, 吕曲秋, 白艳菊等. 马铃薯脱毒试管苗工厂化生产[J]. 黑龙江农业科学, 2001, (4): 23-24.
- [8] 祁彦丰, 王萃莲, 魏固宁等. 用三种不同水质配制培养基对马铃薯不同试管苗的影响[J]. 中国马铃薯, 2000, (3): 173.
- [9] 吴毅歆, 李云海, 邓纪新等. 用魔芋培养基生产马铃薯脱毒试管苗[J]. 云南农业科技, 1999, (3): 26.
- [10] 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, (1): 21.
- [11] 王巧玲, 李淑芳, 王丽爱等. 马铃薯试管苗壮苗培育初探[J]. 马铃薯杂志, 1999, (3): 156.
- [12] 赵克蓉. 植物生长调节剂控制马铃薯试管苗徒长的作用[J]. 中国马铃薯, 2000, (3): 150.
- [13] 沈清景, 叶贻勋, 凌永胜. 马铃薯试管薯诱导因素研究[J]. 福建农业学报, 2001, (1): 54.
- [14] 杨春, 齐海英, 王秀英等. 马铃薯脱毒小薯无土栽培营养基质的筛选[J]. 中国马铃薯, 2000, (3): 167.
- [15] 杨春, 齐海英, 崔根芳. 提高马铃薯脱毒扦插苗成活率的关键技术[J]. 中国马铃薯, 2001, (3): 173.
- [16] 谢庆华, 吴毅歆, 张勇飞等. 脱毒马铃薯试管苗剪尖扦插无土繁殖研究[J]. 中国马铃薯, 2000, (3): 136-137.
- [17] 田宏先, 孙振, 崔林等. 马铃薯脱毒扦插苗的网棚生产技术[J]. 中国马铃薯, 2001, (2): 99.