

滇东南农家马铃薯品种脱毒植株的获得

罗 玉, 冉春玲, 张 铁, 田 洪

(文山师范高等专科学校, 云南文山 663000)

摘 要: 用酶联免疫方法 (DAS、ELISA), 对经过热处理和茎尖培养获得的 5 个品种再生试管苗进行马铃薯 X 病毒、Y 病毒、卷叶病毒的检测。结果 5 个品系都有 3 种病毒都脱净的植株, 邱北乌芋有 6 株, 邱北白花芋 4 株, 广南白洋芋有 9 株, 广南紫洋芋有 7 株, 马塘紫芋 3 株。脱毒率最高的品种为邱北白花芋达 33.3%, 脱毒率最低为广南白洋芋为 12.8%。

关键词: 马铃薯; 茎尖培养; 病毒检测

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2000) 04-0210-02

1 前 言

浸染马铃薯的病毒, 1982 年前发现的有 25 种 (Hooker, 1982) 到 1987 年报道有 30 种 (陶国清, 1987)。而在云南主要产生危害的有以下 5 种: 马铃薯卷叶病毒 (PLRV)、马铃薯 X 病毒 (PVX)、马铃薯 Y 病毒 (PVY)、马铃薯 S 病毒 (PVS)、马铃薯 M 病毒 (PVM)。在这 5 种常见病毒中 X、Y、卷叶病毒危害最为广泛严重。卷叶病毒浸染一般减产 40%~70%。严重的可达 90% (Salazar, 1982)。X 病毒浸染一般减产 10% (Salazar, 1982)。Y 病毒浸染可减产 80% 左右 (CIP, Staff, 1982)。而脱毒植株能比未脱毒植株增产 30% 左右。本实验通过变温热处理及茎尖培养获得 5 个品系的再生植株, 并对这些植株进行了 X、Y、卷叶病毒检测, 以期获得脱毒试管苗, 使品种的种性得到复壮, 产量得到提高。

2 材料与方 法

2.1 茎尖再生试管苗的获得

2.1.1 材料收集

收集供试 5 个品系: 邱北乌芋、邱北白花芋、广南紫洋芋、广南白洋芋、马塘紫芋的薯块。对休眠薯块用 10mg/L GA, 整薯浸种 20min 以打破休眠。薯块放于瓷盘中, 于散射光下促使其长出粗壮芽条。

收稿日期: 2000-03-16

2.1.2 热处理

当芽条长出 1cm 左右长时, 把瓷盘移入光照培养箱中, 培养箱中湿度保持在 80%~90%, 光照强度为 800lx。温度控制在 36℃, 16h/d; 30℃, 8h/d。进行变温热处理 4 周。

2.1.3 茎尖剥离

切取经过热处理之后的芽条, 流水冲洗 30~60min, 70% 乙醇中浸 20s, 10% 次氯酸钠中处理 10min, 无菌条件下用无菌水冲洗 3 次之后, 于双筒体视镜下, 小心剥离分生组织。切取茎尖的长度在 0.1~0.2mm, 一般带有一个叶原基。

2.1.4 茎尖培养

茎尖培养分两步: 第一步, 把剥离的茎尖接种到装有分生组织培养基的试管中培养, 培养基为: ① MS + 0.1GA + 0.5BA + 0.05NAA; ② MS + 0.1GA + 0.5BA + 0.1NAA; ③ MS + 0.1GA + 0.15NAA + 0.5BA。培养条件为温度 25±1℃, 光照时间 12h/d。光照强度为 2000lx。第二步, 转入 MS 生长培养基中培养, 培养条件如上。

2.2 再生试管苗的脱毒检测

检测采用双抗体夹心酶联免疫法 (DAS, ELISA), 试剂盒由内蒙古大学生物系提供。将再生的试管苗转接成平行的两组, 一组苗用于检测, 另一组苗留于检测以后汰除有病毒植株后的扩繁。用样品提取液提取匀浆。每个样品设置二次重复, 每种病毒设置阳性对照 2 个, 空白对照 2 个。

包被 X、Y、卷叶病毒于板上 4℃ 下过夜→倒

空包被液，用 PBST 洗涤 3 次→用脱脂奶粉封板，置 34℃ 下 1h→洗涤 3 次→加入样品匀浆，阳性对照及空白对照 34℃ 下 4h→洗板→加入 Ap-IgG 34℃ 下 4h→洗板→加入底物对硝基苯磷酸盐→结果显示。

3 结果与讨论

剥离的分生组织接种到分生组织培养基上之后能慢慢地增大，变绿，成为紧密、光滑、圆形的一团组织，转移到生长培养基上能继续生长，有的带有叶原基的分生组织，叶原基伸长，绿色，在增大的分生组织团顶可见绿色芽点，芽点伸长成为芽。芽伸出之后逐渐可见基部长出根，从而使分生组织分化成一株完整植株。剥离的茎尖一般培养 3 个月 后逐渐分化成苗。分化成苗与外植体有关，芽条粗壮的芽剥离分生组织时易于操作，剥下的茎尖分生组织团也大，易于分化成苗。侧芽的分生组织团比顶芽小，小的分生组织团培养时易愈伤组织化。顶芽的分生组织较侧芽易成苗，成苗早。这可能是由于顶端优势的存在，顶芽分生组织较大，并且内源激素含量高，生长势强。在三种茎尖培养基中，0.1NAA 和 0.05NAA 的培养基中成苗较多，这两种培养基上培养的都有愈伤组织化的情况，0.05NAA 中的更多一点。侧芽分生组织较顶芽易愈伤组织化，愈伤组织化的细胞团增大较快，颜色浅绿，外表不光滑，细胞团较为疏松。这些大块的愈伤组织也能分化成苗，只是分化所需时间较长，并且一团分生组织不止形成一株，可以同时分化出 3~5 苗，这些苗比较细小，颜色黄绿。一旦转移到新的培养基伤之后，与正常分化成的植株无明显差异。有的分生组织分化的过程中会先分化出根，这些根会长出许多侧根，形成较大的根系，但不见分化出芽。先形成根系的分生组织很难再分化成完整植株。不同品种获得再生苗的情况有差异。广南白洋芋共获再生苗 70 株，广南紫洋芋共 27 株，邱北乌芋 21 株，邱北白洋芋 12 株，马塘紫芋 12 株。几个品种中邱北白花芋不耐热处理，变温热处理时死亡的芽条较多，这可能是该品种耐热性差，热处理前薯块带细菌量大，高温高湿下利于细菌大量繁殖，耗尽薯块所带养料，薯块变烂，芽条生长点枯死。几个品种中广南白洋芋成苗早，成苗率高。该

品种的试管苗长势强。切段诱导试管结薯表现为结薯早，薯块大，茎叶干枯也早，生育期短，这些在培养室中表现出的生育期短，长势强的品种特点与茎尖培养植株再生成苗能力正相关。这与长势强的顶芽易成苗表现一致。

经过病毒检测，5 个品种都有 3 种病毒都已脱去的植株，广南白洋芋 9 株，广南紫洋芋 7 株，邱北乌芋 6 株，邱北白花芋 4 株，马塘紫芋 3 株。脱毒结果统计于表 1。

表 1 5 品种 3 种病毒脱毒情况

品 种	再生植 株 数	脱除 X 病 毒株数	脱除 Y 病 毒株数	脱除卷叶 病毒株数	三种都脱 净的株数	脱毒率 (%)
广南白洋芋	70	23	31	34	9	12.8
广南紫洋芋	27	8	20	26	7	25.0
邱北白花芋	12	5	9	12	4	33.3
邱北乌芋	21	10	10	20	6	28.5
马塘紫芋	12	3	8	9	3	25.0

从表中可以看出，广南白洋芋虽然茎尖分生组织生长势强，再生出的植株多，且成苗早，但 3 种病毒都已脱去的植株比率不高，只占再生植株的 12.8%。几个品种中邱北白花芋脱毒率最高。梁远发认为茎尖分生组织培养成苗时间的长短与脱毒率有一定的相关性，成苗所需时间越长，其脱毒率也越高。我们的实验结果也与此一致。从表中可看出，几个品种中 3 种病毒，不带 X 病毒的植株最少，不带卷叶病毒的植株最多，这也从侧面说明了 3 种病毒中 X 病毒最难于脱除，而卷叶病毒易于脱除。在茎尖剥离培养之前还对这几个品种的薯块抽样进行卷叶病毒的检测，检测结果为几个品种的薯块都不带卷叶病毒。这说明地处滇东南地区的文山卷叶病毒对马铃薯的感染很少。加上热处理方法是一种很有效的脱除卷叶病毒的方法，所以再生植株不带卷叶病毒的几率很高。

3 种病毒都脱去的植株，可作为种质资源保存起来。也可在大田中与未脱毒植株对比种植，看品种的遗传特性是否变化，产量是否增加，如增产效果好，可用组织培养快速繁殖无毒健康的种薯替代就地留种。