

马铃薯茎尖脱毒种薯技术的改进

裴荣信

(山西省农科院高寒作物研究所)

一、引言

马铃薯是我省太行、吕梁东西两山和塞外高寒地区的主要粮食作物之一, 历年种植严重危害。据我所60年代和近期的调查鉴

面积达400万亩左右。据统计, 雁北主产区13县1971~1979年的平均亩产仅495.5公斤。造成低产的一个重要原因是马铃薯病毒病的定, 我省马铃薯病毒病的类型主要有皱缩花

止。马铃薯无毒瓶苗和微型薯及原原种的保存均以3~5°C为宜。

4. 添加抗菌剂。长期保存杂菌, 污染问题经常出现, 单靠无菌操作是很难奏效的。经试验, 在MA或MS培养基内加入不同浓度的庆大霉素、卡那霉素、链霉素、青霉素、土霉素等, 结果以100ppm的庆大霉素效果最好。

5. 改变通气状况。利用传统的棉塞包纸法易使培养基失水干缩, 久存后杂菌滋生穿透棉塞, 引起污染, 丧失生命。尤其是在较潮湿的环境下更为严重。用硅橡胶膜和石腊纸或硫酸纸包口后液态石腊封闭, 既可解决污染问题, 又不使培养基过早干缩, 还有一定的通透性。特别是硅橡胶膜封口, 还有优异的透气性能和选择渗透作用, 对O₂和CO₂能给予较合适的透气比。

6. 抽气减压。接种后用医用注射器在无菌条件下, 抽去瓶(管)内部分气体, 减低瓶(管)内气压, 也是一项较好的技术。

7. 补充光照。为维持保存材料的生命, 在保存种质过程中, 特别是保存后期, 补充2000勒克斯光照, 能有效地提高种质的成活率。

在减低气压、增高渗压、降温、调气等7种因子试验研究的基础上, 我们又拟制了8

种组合试验方案。结果是: ①培养温度3~5°C; 庆大霉素100ppm; 青鲜素13ppm; 硅橡胶膜封口; 开始生长后补充光照2000勒克斯。②培养温度3~5°C; 庆大霉素100ppm; 青鲜素13ppm, 石腊纸或硫酸纸液态石腊封口; 抽气减压; 开始生长后补充光照2000勒克斯。两种组合效果较好。

十多年的实践证明, 保存材料的质量和保存时间呈正相关关系。只有选用专门生产的优质微型薯或健壮瓶苗作为保存材料, 才能达到预期的目的。

二、砂土保存法

具体的方法是选用含水4%的过筛细砂, 盛入试管或三角瓶内, 15磅高压消毒1.5小时。根据瓶口大小挑选相应的原原种或优质微型种薯, 放入砂土内(原原种要进行表面消毒灭菌后才能放入瓶或管内保存), 用硅橡胶膜或石腊纸包好瓶(管)口, 置于3~5°C下保存, 也可利用薯窖保存。若需扩大繁殖, 从瓶(管)内取出, 最好用由丹麦进口的消毒剂30%进行消毒。或先用75%的酒精消毒2分钟, 无菌水冲洗2~3次, 再用20倍的次氯酸钠水溶液浸15分钟, 无菌水冲洗干净, 再用1%的升汞浸10分钟, 水洗干净后转接在普通培养基内即可扩大繁殖。此法既简便, 又经济, 一般也可保存1年以上。

叶、花叶、卷叶、束顶矮化、矮生、坏死等类型,以皱缩花叶病毒危害为主。据试验和调查结果,五台白、里外黄品种因皱缩花叶病毒危害造成减产35~80%,这两个品种由于病毒危害的结果,基本被生产淘汰。70年代推广晋薯2号、1号、3号、4号等优良品种,具有一定的抗病毒性退化能力,提高了产量。但是,由于马铃薯普遍带有病毒,生产上使用无性繁殖世代,病毒在植株体内增殖积累,世代传递危害,感染病毒株率达到30~80%,致使产量显著下降。按全省400万亩一般减产30~50%计算,因病毒危害一年减产损失鲜薯达6~10亿公斤,价值6千万元到1亿元,是生产亟待研究解决的问题。

根据我们多年来的实践证明,单纯依靠新品种选育工作培育抗病毒品种来解决马铃薯病毒病在生产上的危害是比较困难的。目前,不少国家已在生产上采用马铃薯茎尖脱毒的办法,种薯在海拔高、气候冷凉、隔离条件好、无蚜、无带病毒的马铃薯、茄科、烟草和桃树的地区种植。近年来,用脱毒马铃薯作种薯已成为解决马铃薯病毒性退化、实现高产稳产的有效办法。因此,如何使这项技术简单化、实用化、群众化,便是我们课题组的研究任务。以脱毒苗组织培养快速繁殖为重点:(1)采用简化培养基繁殖脱毒苗;(2)利用剩余培养基添加简化培养液继续进行组织培养;(3)培养室利用大玻璃窗自然光照代替灯管照明培养脱毒苗;(4)露地畦畦盖沙直接假植技术等几个方面的改进和简化,从而降低了成本,提高了经济效益,改进了实验室复杂的操作技术规程。

二、材料与方法

(一)马铃薯茎尖脱毒苗快速繁殖的培养基改进

供试品种有晋薯2号、1号、5号、里

外黄、紫花白、克新1号等6个。采用茎尖生长点剥离0.2毫米,带有1~2个叶原基,接种在装有MS培养基的试管里进行培养。室内培养获得马铃薯小植株,分两份,用组织培养的快繁一次,拿一份搞血清鉴定和指示植物鉴定,获得脱毒植株。在继代切段脱毒苗使用的培养基上减少了微量元素及有机成分等十几种试剂,只用KCl、KNO₃、KH₂PO₄、(NH₄)₂SO₄、MgSO₄、Co(NO₃)₂、柠檬酸铁等大量元素和琼脂、白糖、pH 5.8的固体培养基上接带有一个小叶片的切段。每株系接种30瓶,以MS培养基接种为对照,培养室培养,温度18~24℃,光照是采用大玻璃窗自然光照进行培养。

(二)剩余培养基留根茬,增添简化培养液繁殖脱毒苗

在简化培养基生长脱毒苗后,再在剩余培养基上留根茬,添加4~7毫升简化培养液,其大量元素是:KCl、KNO₃、KH₂PO₄、MgSO₄、Co(NO₃)₂、(NH₄)₂SO₄、柠檬酸铁、白糖(甜菜糖),pH 5.8。经灭菌的培养液进行马铃薯脱毒苗培养,以新做的简化培养基接种切段作对照,在培养室内进行培养比较。

(三)自然光照培养

马铃薯脱毒苗组织培养快速繁殖,利用大窗玻璃的房间做培养室。将培养架放在在1.80×1.80米大窗户附近1米处的地方,测定在培养上的光照强度平均在2000勒克斯以上,中午能达5000勒克斯。在培养架上以100瓦日光灯的人工光照、距光源25厘米地方培养,对照进行培养比较。

(四)假植技术

马铃薯脱毒试管苗要逐步适应自然环境条件在土壤中生根,吸收养分进行光合作用,由供养性生长转变成自生长的转折点,由于试管苗细小,植株适应大自然环境的中间过渡环节——假植苗阶段,要求较高

的培养和精细的管理。

利用露地作阳畦, 浇足底水, 划沟栽试管小植株。栽前打开试管塞, 倒入少量水, 轻轻取出管内小植株, 放入经过预晒水或凉水兑点温水的水盆里, 冲洗干净根上的培养基, 栽入1寸深的小沟内。在脱毒植株根基覆土、盖沙, 用橡皮管浇透水, 防止小苗冲倒。钢筋棍作弓棚, 用塑料布覆盖严密, 保温保湿, 第三、四天打开塑料布, 在脱毒小植株根基作铺盖细沙和不盖沙处理做比较。

三、试验结果

(一) 茎尖脱毒苗的病毒鉴定

1. 抗血清鉴定: 用 x 、 y 血清(内蒙古大学制)微量凝聚反应鉴定和乳胶致敏反应鉴定。 x 、 y 血清各滴4点, 每个鉴定材料取上中部叶片用劲研磨碎挤压出汁液, 用0.1~0.2毫米的小玻璃棒沾四分之一滴汁液分别滴到 x 、 y 血清点上, 并以 x 、 y 毒源滴点对照, 经4~6小时后, 轻微振动半分钟, 用25~40倍解剖镜在暗光箱的光源下观察, 呈现阴性反应, 不产生云状物沉淀说明不带病毒, 呈阳性反应, 血清滴上产生云状物沉淀, 证明是带有病毒没有脱除。

2. 指示植物鉴定: 经过血清鉴定呈阴性反应的幼苗材料, 再用千日红、白花曼陀罗、普通烟和洋酸浆指示植物接种鉴定。先喷水, 再使用喉头喷雾机喷400目的金刚砂为接种磨料, 将鉴定材料的汁液接种到指示植物的叶片上浇水冲洗, 在20~25℃温室内或防虫的网室使之发病, 例如在千日红叶面上出现紫红色枯死斑, 证明有马铃薯 x 病毒存在, 如果没有 x 病毒, 则不表现症状, 所以, 指示植物鉴定灵敏度高, 结果准确、可靠。

1984年对茎尖脱毒苗70份材料进行鉴定的结果: 用抗血清鉴定, 脱除 x 病毒有29份, 脱毒率41.43%; 脱除 y 病毒36份; 使用

指示植物鉴定, 脱除 x 、 y 、 S 、 A 4种主要病毒有1-129、1-142、1-140、1-145、1-146、2-17、2-45、2-11、2-43等10份材料, 脱毒率为14.29%。

1986年5月请内蒙古大学生物系、内蒙古马铃薯研究中心病毒室张鹤龄副教授, 采用微量凝聚和乳胶致敏法反应以及指示植物接种方法, 结果说明: 脱除和性花叶(PVX)、重花叶(PVY)、轻花花叶(PVA)、潜花叶(PVS)、副皱缩(PVM)5种主要病毒的脱毒率达到100%; 在脱除苜蓿花叶(AMV)、烟草花叶(TMV)、烟草坏死(TNV)3种病毒的22份材料中, 仅有381株带有烟草花叶病毒没有脱除。

(二) 组织培养繁殖脱毒苗

1. 简化培养基切段繁殖脱毒苗

3年来, 采用大量元素简化培养基进行组织培养快速繁殖脱毒苗与MS完全培养基所繁殖的脱毒苗效果基本相同。简化培养基组织培养快速繁殖的脱毒苗从带有1个小叶的切段, 到长成4~6厘米高, 3~5片叶子的健壮植株, 只需要25天左右的时间。

简化培养基不仅达到时间短、速度快、降低成本的效果, 还可以解决MS培养基一些试剂不易购买的困难。

2. 旧培养基留茬加简化培养液

再繁殖脱毒苗的培养, 即在剩余培养基里留带有1个小叶的根茬加简化培养基液4~7毫升和新培养基放切段进行培养的试验研究, 经过13天的培养结果, 旧培养基留茬加简化培养液, 从留茬带有小叶的叶腋间生长出来的植株, 比新培养基放切段从叶腋间生长的植株, 不仅生长快、发育好, 而且实现了降低成本、提高旧培养基利用率的理想效果。

3. 自然光照培养脱毒苗

利用大窗户的房间作培养室, 培养架放在大窗户附近0.3~1米面向窗户的试验。在

培养架上的自然光照强度平均在2000勒克斯以上, 中午能达5000勒克斯, 超过用日光灯人工光照的强度。

由于利用阳光的照射, 使茎尖脱毒苗进行光合作用时, 能够满足试管秧苗吸收所需要的光源, 增强了对自然环境条件的适应性, 所以在温度合适的条件下, 比人工光照下培养的试管苗, 不仅苗肥、苗壮、好成活, 而且适应性强。

采用自然光照培养马铃薯茎尖脱毒苗具有节省电、用工少、投资少、成本低、方法简单、容易掌握的优点。同时, 由于在不使用空调设备的条件下进行马铃薯脱毒苗的培养和繁殖, 温度变化较大, 白天温度高, 晚上温度低和光照强度变化相一致, 这样, 白天光合作用强, 积累多, 晚上呼吸作用低, 消耗少, 特别有利于试管苗的生长发育。

4. 假植栽培技术

利用组织培养繁殖的大量试管小苗必须通过假植才能定植网棚生产脱毒种薯。由试管里的供养生长转变成适应外界环境条件的自养生长, 需要精细管理和较高的栽培条件。在假植过程中, 往往造成大量死苗。其原因是假植在阳畦覆盖塑料棚里弱小的脱毒苗, 由于在高温、高湿条件下, 引起地表大量绿霉菌严重发生危害、侵染小苗茎基腐烂死亡。通过两年来在假植小苗后地表铺盖干净细黄沙与不铺砂的试验, 经观察和调查结果, 无论是低温的春天或炎热高温的夏天, 铺砂的假植脱毒苗成活率达到81.3~92%, 比不铺砂成活率37.6~66%提高26~43.7%, 充分证实了铺砂能控制地表绿霉菌发生造成小苗肉质茎基腐烂死亡。

(三) 脱毒薯的经济效益

1. 增产效果: 大量的生产实践证明, 采用脱毒种薯是当前防止马铃薯病毒性退化, 实现高产稳产的有效措施。1982~1986年在所内和所外进行了大量的布点试验示

范, 证明了一般脱毒种薯比未脱毒的增产50~80%, 有的甚至增产1倍以上。

2. 增收效益: 1985年, 浑源县一农场脱毒种薯繁殖基地上种植网棚培育的原原种20亩, 生产原种1.5万公斤, 平均亩产750公斤。1986年利用原原种生产原种、原种生产良种, 全省选择了3个条件比较好的繁殖基地, 种植脱毒种薯原原种48.7亩, 实现了亩产1500公斤的好收成, 经济效益十分显著。

3. 不同马铃薯品种脱毒增产效果

1985年对马铃薯生产上主干品种晋薯2号、5号、虎头、里外黄、东北白(克新1号)等5个优种, 在产量水平基本相近的前提下, 进行了茎尖脱毒, 种植在浑源县下韩村, 采用随机排列, 重复3次, 进行对比试验。结果看出, 晋薯2号脱毒薯亩产2350公斤, 比对照种克新1克脱毒薯增产59.02%, 里外黄脱毒薯亩产2277.8公斤, 增产54.13%, 虎头脱毒薯亩产2227.8公斤, 增产50.75%。说明以上3个脱毒品种的增产效果是十分显著的, 其余晋薯5号, 克新1号两个品种脱毒的增产效果不太明显。

(四) 种植脱毒薯的隔离条件与再感染病害关系

1. 脱毒薯不隔离

晋薯2号脱毒第一年种植在不隔离马铃薯毒源条件下, 具有旺盛的生命力, 生长健壮, 病毒性退化很轻。同时, 重新感染病害的机会也少, 对产量影响小, 亩产2060公斤。第二年重新感染病毒株率由0.9%上升到8.4%, 病毒指数由0.4提高到6.2%, 亩产降低5.7%。第三年皱缩花叶和卷叶病毒达5到8.8%, 指数49.2%, 亩产1204公斤, 比第一年减产41.3%, 完全丧失了脱毒薯的作用。

2. 脱毒薯隔离与不隔离条件下病毒感染

1986年, 在所内进行了脱毒后连续6年隔离条件种薯和不隔离连续种植5年与茎尖脱毒苗网室原种作种的对比试验。

由田间发生病毒的调查结果看, 脱毒苗网棚生产出来的原原种无性第一年, 不隔离就感染皱缩花叶和叶脉, 坏死株率3%, 指数0.8%, 脱毒后在毛、皂原种基地种植6年, 周围无毒源, 不采用任何措施的隔离条件, 病毒病重新感染速度比较慢, 病株率20%, 指数

15%。将脱毒后种植在不隔离条件(所内杂种优势利用试验田)连续种植5年, 病毒株率达54%, 发病指数46%, 失去生产力。保持脱毒显著的增产效果, 延长使用年限, 提高增产效益, 关键是建立和健全一套留种、保种体系, 严格控制病毒病的再感染所造成的损失, 实现脱毒马铃薯持续高产更高产的目的。

(上接221页)

- roll viurs. Ann. Phytopath. Soc. Japan 1964, 29:279.
- [16] Murayma, D. et al.: Antigenicity of potato leafroll virus. Proc. Japan Acad. 1974, 50: 322—327.
- [17] Natti, J.J.: Host range of potato leafroll virus. Am. Potato J. 1953, 30: 55—64.
- [18] Peters, D.: The purification of viruslike particles from the aphid *Myzus persicae*. Virol. 1965, 26: 159—161.
- [19] Peters, D.: The purification of potato leafroll virus from its vector *Myzus persicae*. Virol. 1967, 31: 46—54.
- [20] Rochow, W.F.: Purification and antigenicity of three isolates of barley yellow dwarf virus. Virol. 1971, 46: 117—126.
- [21] Rowhani, A. et al.: Purification and characterization of potato leafroll virus. Virol. 1979, 98:45—54.
- [22] Takanami, Y. et al.: Enzyme-assisted purification of two phloem-limited plant viruses: tobacco necrotic dwarf and potato leafroll. J. Gen. Virol. 1979, 44: 153—159.

IDENTIFICATION AND PURIFICATION OF POTATO LEAFROLL VIRUS

Wang Renyuan and Lu Wenqing

(Northeast Agricultural College, Harbin)

ABSTRACT

All 14 virus samples bearing leafroll symptom isolated from potato plants in potato breeding experimental fields in Northeast Agricultural College belong to PLRV according to bioassays, particle shape, transmission character by aphids and serological reaction. The isolate 85-1 was propagated on *Datura stramonium* and purified by PEG precipitation, two cycles of differential centrifugation and sucrose density gradient centrifugation. The virus yield was 0.1 mg/kg of fresh plant material. In our experiments the best material for purification was *Datura stramonium* inoculated 4-6 weeks before purification.