

加拿大的马铃薯组织培养与 病毒鉴定技术

滕雨伟

(黑龙江省农科院马铃薯研究所)

我于1987年7月2日至12月28日赴加拿大进行马铃薯组织培养与病毒鉴定技术研修。接受研修的主要单位是新布伦瑞克省(New Brunswick) (以下简称布省) 省会的弗雷德里克顿(Fredericton) 研究站。这个研究站隶属加拿大农业部, 是全国马铃薯研究中心。根据研修计划的安排, 参观了新布省的马铃薯原种繁育中心, 此外, 还到过阿尔伯达(Alberta) 省埃德蒙顿市(Edmonton) 的阿尔伯达大学、欧兹(Olds) 农学院和诺瓦斯科舍省(Nova Scotia) 哈里法克斯(Halifax) 的Truro农学院等一些单位。组织培养研修期间的导师是Mr. Coleman和Dr. Seabrook, 种薯生产与病毒鉴定技术的导师是Dr. Singh, 研修期间还得到Dr. young、Dr. Lister、Dr. Tai及Perly等的帮助。因此我的研修与学习收获很大。

一、马铃薯组织培养技术

组织培养是当代生物研究中的一项基本技术, 在马铃薯方面已把这项技术应用于4个方面: 1. 种薯生产、培养无病毒的植株和块茎, 实现种薯无毒化; 2. 为育种提供健康的亲本材料; 3. 保存马铃薯种质资源; 4. 加快优良品种的繁育速度。我在实验室

里主要是做培养基的配制、茎尖剥离、试管苗的切段繁殖和病毒鉴定技术。外出考察主要是参观种薯生产程序及学习有关技术。

(一) 培养基的制备和应用

我们通常使用的是M.S. 培养基, 它是1962年由Marashige和Skoog两人创立的, 在一些作物的组织培养上都得到应用。然而培养基的配方也随应用目的不同而发展和变化, 加拿大马铃薯组织培养应用的培养基有不同的配方。一般是茎尖剥离采用液体培养基(表1), 而切段繁殖则是用固体培养基(表2)。

这两种培养基的配方是截然不同的, 是经优化后的结果。例如表2所用的活性碳是经实验后发现大多数品种植株在有活性碳的M.S. 培养基中发育良好, 加碳正是这种优化后的培养基。培养基对pH值要求也很严格, pH值所以在 5.8 ± 0.1 范围内有利于植物对各种元素的吸收, 因此植物生长最佳(见图1)。配制培养基时, 如因缺某物质达不到配方的要求, 可采用相同或相似功能的其它试剂或药物代替。关于培养基的配制方法和步骤是依据一定的顺序, 以固体培养基为例, 其步骤是: (1) 根据需要量的多少按比例计算所需成分重量; (2) 将称好的蔗糖和盐等放入有一定量水的容器中, 再加维生素 B_1 和肌醇; (3) 调节pH为5.7; (4) 定容; (5)

表 1. 茎尖剥离采用的液体培养基配方

成 分	浓 度(毫克/升)
NH ₄ NO ₃	1650.000
KNO ₃	1900.000
CaCl ₂ (无结晶水)	333.000
MgSO ₄ (无结晶水)	181.000
KH ₂ PO ₄	170.000
FeNa EDTA	36.700
H ₃ BO ₃	6.200
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.900
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.600
KI	0.830
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.250
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
·	总计 4303.530
蔗糖	30克/升
动力精	1毫升/升(贮液)
吡啶乙酸	1毫升/升(贮液)
维生素B ₁	1毫升/升(贮液)

* 以上13种盐可混一起, 共计4.3克

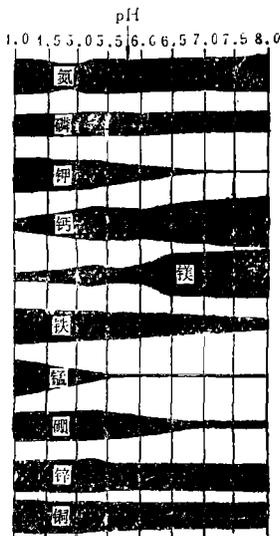


图 1. 在不同pH值范围内植株吸收营养元素的能力

表 2. 切段繁殖采用的固体培养基配方

成 分	浓 度(克/升)
盐*	4.3
蔗糖	30
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.17
维生素B ₁	1毫升/升(贮液)
肌 醇	0.1毫升/升(贮液)
琼 脂	6
活性碳	1.75

* 与表 1 相同

加入琼脂和活性碳; (6) 高压灭菌; (7) 用仪器把灭菌的培养基定量地分配在试管中; (8) 再高压灭菌待用。

(二) 茎尖切割和切段繁殖技术

在新布省农业研究站, 茎尖切割组织培养的主要目的是快速繁殖, 是采用无毒、无病块茎切割的, 所以茎尖切割时, 长度0.8~1.5 mm, 其大小比我们所切割的大得多, 我国茎尖切割是以脱毒为主要目的。他们在茎尖切割前, 严格选择块茎, 块茎是事先经各种鉴定技术确定无病毒和无真细菌病害的。在无菌条件下, 将切割的茎尖放入液体培养基的小试管中 (100×15mm), 利用小试管的表面张力, 茎尖悬浮于表面, 然后放在温度为18~20℃的条件下、经1~8周后形成叶锥和和幼根, 之后移入固体培养基试管中 (150×20mm) 培养, 待试管苗长出6个叶片以上可切段繁殖。一棵试管苗可切5~6段或更多, 经繁殖到一定数量可移入温室中栽培, 所得大量的块茎即原原种。原原种供原种1代繁殖。加拿大在组织培养过程中, 对环境条件的控制是比较严格的。在温度方面, 对于茎尖组织和切割繁殖的培养要控制在18~21℃, 而在光强度上, 茎尖组织培养为400~600烛光, 切段繁殖则为1000

烛光, 日照时数均在16小时左右。

二、加拿大的种薯生产

加拿大的种薯生产在世界上享有很高信誉。由于所处地理位置, 其气候冷凉, 有非常好的自然隔离屏障。在种薯生产的生育期能有效地防止蚜虫传播病毒, 再加上有较先进的种薯生产技术, 生产的种薯质量较高, 种薯输出量仅次于荷兰, 居世界第二位, 常年要向15个以上的国家输出种薯。种薯输出已有60多年历史, 形成了种薯生产体系和制度, 现介绍如下:

(一) 加拿大现行的种薯生产体系

我在研修期间, 曾对新布省的种薯生产技术做了考察。新布省是加拿大种薯生产的主要省份。种薯生产共分为6级, 即原原种 (Pre-Elite) → 原种1代 (Elite I) → 原种2代 (Elite II) → 原种3代 (Elite III) → 基础种 (Foundation) → 合格种 (Certification) (见图2)。原原种是由马铃薯繁

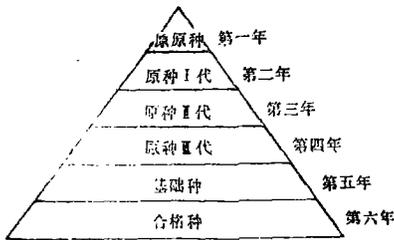


图2. 加拿大种薯生产体系图示

育中心提供大量的无毒试管苗栽培在原种场的温室中获得的块茎。原原种供第二年在田间栽培, 所结的薯块为原种1代, 以下依次类推。第三年和第四年为原种2代和3代, 第五年为基础种, 第六年为合格种。原种场一般经营到原种3代, 而政府指定的专业种薯生产农场主要经营基础种和合格种, 只有少数较好的农场主经政府批准, 有计划地经营

原种2代和3代。新布省大约有400个专业农户从事种薯生产, 其中30~40个个体农场主繁殖原种2代薯, 有80个农户繁殖原种3代和基础种, 其余农户则繁殖合格种, 向国内外市场出售。加拿大的种薯生产就是这样一个体系, 由马铃薯繁育中心每年向原种场提供所需的试管苗, 由原种场繁殖原原种、原种1代和2代并向专业农户提供, 然后由指定的专业农户逐级生产和提供各级种薯。

(二) 种薯生产技术

种薯生产技术主要有以下几个环节:

1. 试管苗的繁殖是在有空调的培养室中进行的。每年连续不断地给原种场提供试管苗, 由原种场繁育原原种 (Pre-Elite)。具体措施是把试管苗栽种到严密的防虫空调室内, 每年使用的盆土和花盆都经消毒, 非工作人员一般不得进入组织培养室和原种场。

2. 原原种、原种和原种1、2、3代的生产采用整薯播种, 在田间设置株、行圃, 加大行距, 合理施肥, 实现燕麦、牧草和马铃薯三年轮作制。田间作业基本上实现机械化。

3. 原原种、原种、基础种和合格种的生产, 每年在生育期间都要经政府检验部门实行田间检验2~3次, 严格执行种薯生产的检验标准, 田间检验以肉眼识别症状和血清学检验鉴定为主, 辅之以实验室内的化学药物与仪器测定。

4. 收获前进行割秧, 贮存和运输应严防机械损伤。贮存多为地上调空库, 温度控制在2~4℃, 实行必要的通风。

三、种薯的检验和病害的

鉴定技术

加拿大在种薯生产过程中, 执行一套完

整的检验制度。在马铃薯生产的生育期间由政府部门检验人员到原种场、专业农户实行现场检验, 其采用的鉴定标准和鉴定技术如下:

(一) 种薯分级检验标准

原原种和原种 1、2 代在生育期间要检验 3 次, 不允许带有任何病害。原种 3 代同样检验 3 次, 病害株率总计不超过 0.25%。对

于基础种和合格种在生育期间检验两次, 其标准如下(见表 3)。加拿大对于种薯生产较严, 不仅对病毒类有严格要求, 而且更严格的是要求种薯不允许带有环腐病, 这已在加拿大形成法律制度, 从国家级研究站、原种场到专业农户都严格执行种薯分级标准和制度, 如有违背即取消繁殖种薯专业户资格。

表 3. 基础种和合格种在生育期间检验的标准

组别	病害	第一次检验	第二次检验	组别	病害	第一次检验	第二次检验
基础种	环腐病	0	0	合格种	环腐病	0	0
	总计所有病毒	0.25%	0.1%		任何一种病毒	1.00%	0.50%
	萎蔫病、黑胫病	0.50%	0.25%		总计所有病毒	2.00%	1.00%
			萎蔫病、黑胫病		3.00%	2.00%	

(二) 病毒鉴定技术

在茎尖剥离、快速繁殖与试薯苗移到温室栽培生长的整个过程共检验鉴定 5 次病害(见图 3)。经过每次鉴定无病害后才能转入下步生产。检验鉴定的病害有 PVX、 δ VM、PVY、PVA、PVS、PLRV; 类病

毒 PSTV, 环腐病(图中简称 PBRR)。检验鉴定的主要方法如下:

1. 病毒检验

病毒检验有几种途径。第一是指示植物, 把待检的样品接种到指示植物上, 经一定时间后, 根据其症状判断所带病毒; 第二

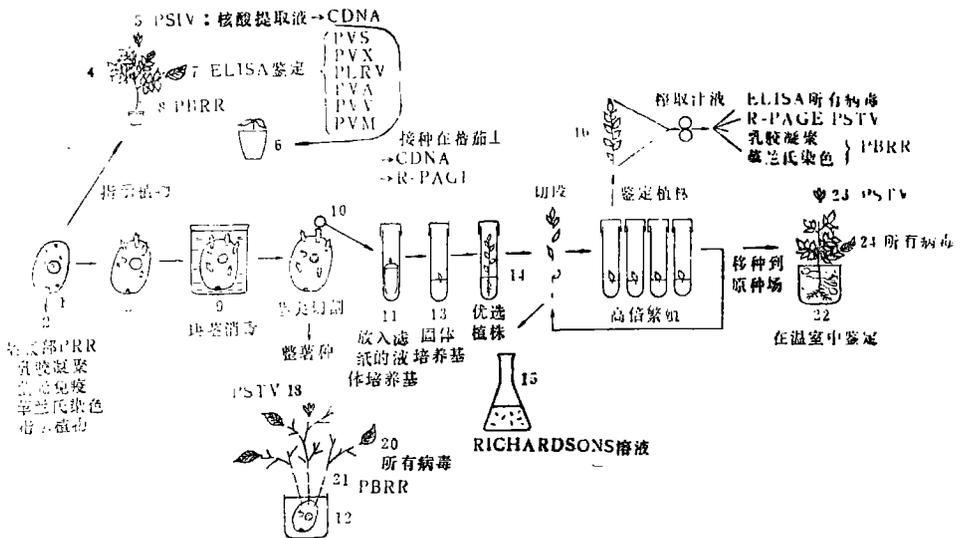


图 3. 病害鉴定与繁殖过程

是血清学鉴定的ELISA法, 利用制备好的蛋白和酶标, 在微量滴定板上与样品间接反应, 产生黄色。此方法灵敏、快速, 用于大批样品的检验和鉴定。

2. 类病毒(PSTV)的鉴定

类病毒除可用指示植物鉴定外, 费雷德里克顿研究站的病毒学家 r. D Singh 研究了一种新方法往复——凝胶电泳法(简称 R-PAGE), 此法是根据类病毒(RNA)分子大小在胶柱上形成特有的带, 从而分辨出强系和弱系。R-PAGE法在目前是较先进的鉴定技术。

3. 环腐病

加拿大出口的种薯对于环腐病要求较严, 无论哪级种薯都不允许带有环腐病。鉴定方法有革兰氏染色法、乳胶凝聚法、免疫荧光和指示植物法。种薯收获后的大量工作是环腐病的鉴定, 若发现专业种植者的种薯中有环腐病, 即根据政府检验制度使他停种3年。

四、体会与建议

我这次赴加拿大研修, 使我体会到加拿大在马铃薯组织培养、种薯生产和病毒及真菌、细菌病害的检验技术方面是先进的, 特

别是设备, 我们与之一确存在着一定差距, 我们应该借鉴和引入, 结合我国的实际情况加以应用。为此我有以下几点建议:

(一) 要建立健全种薯生产体系和完善种薯生产检验制度。我国各地虽已开展了这方面的工作, 尚不够十分健全, 特别是在种薯的鉴定方面。由于缺乏专业人员, 不仅在种薯生产季节检验的次数少, 而且还存在空白区, 出现商品薯和种薯不分的现象, 所以种薯的质量不可能达到国际先进水平。建议我们政府应该加强检验队伍的建设, 并制定与国际相适应的种薯生产体系和分级标准, 以不断提高种薯的生产水平。

(二) 加拿大的马铃薯组织培养是以加快繁殖无病种薯为基本目的。取材是无病、无毒的块茎, 所以茎尖切割较大(0.8~1.5mm)。我们切割较小的目的在于脱毒。建议我们也应该逐步过渡到采用无病、无毒块茎进行组织培养, 也将组织培养作为加快繁育手段。这样做可获得事半功倍的效果。

(三) 马铃薯的组织培养与切段繁殖的培养基配方应在MS培养基的基础上, 根据应用目的的不同, 适当的选择药剂; 降低成本, 这是培养基配方一个值得重视的问题, 所以我们应该加以不断研究。

(上接165页)

特征特性: 茎少粗状, 早期分散状, 叶腋浅紫色; 叶很大, 高度下垂, 深绿色, 稍光滑; 初生小叶大但窄, 叶脉浅; 花序极少, 花白色。块茎长卵圆形, 表皮浅黄色, 光滑, 薯肉浅黄色, 芽眼极浅。块茎芽紫红色, 开始为桶状, 后为柱状, 顶芽较大, 开散状, 绒毛稀少。

品质: 干物质含量低, 质地坚实, 煮后不变色。

抗病性: 茎叶感晚疫病, 块茎稍感晚疫病; 高抗Y^N, 感PLRV, 轻感瘤肿病。

白 雅(B' a)

品种来源: Ari × Belle de Fontenay × Katahdin

特征特性: 茎少粗状, 深紫色, 早期呈高度分散状; 叶大下垂, 深绿色; 初生小叶大且宽, 叶脉色深; 花序小且花数少, 花白色。薯块长形, 略呈肾状, 表皮光滑呈浅黄色, 薯肉浅黄色, 芽眼浅。块茎芽早期呈茎状, 蓝紫色, 接近顶尖开始变绿, 绒毛密、长而软。

(下转192页)