

马铃薯主要病毒试管保存技术 及其效果的研究*

刘喜才 李芝芳 张文英 李志刚 张长柱

(黑龙江省农科院马铃薯所) (大庆市农工商)

摘要 我们于1987~1990年进行了马铃薯主要病毒毒源试管封闭保存的研究。研究表明,大茎尖消毒后扦插在试管培养基上培养,因保毒植物种类不同,其成活率57.6~100%,平均为87.1%,进管20~36天生根发育正常。在试管内发育成株时,可进行单节切段更新繁殖,其生长发育比大茎尖初进管时速度快,一般6~12天生根发育正常。并保持试管毒源纯度和含毒量。

关键词 马铃薯病毒 试管保存技术

中图分类号 S532

1 前言

此项研究工作,基于1973~1990年通过调查和病毒分离鉴定研究工作,查明和分离保存了一批马铃薯病毒毒源及部分引进毒源,这批马铃薯病毒毒源对于抗病毒育种用接种体和病毒抗血清制备用的抗原,以及病毒学科研究是极为珍贵的材料。迫切需要选择最佳毒源保存方法和合适的保毒植物。从1987年以来探索试管封闭保存毒源法,目的是:防止多种病毒毒源在裸露条件下保存易接触混杂,节省温室保存毒源的利用面积和冬季取暖能源及人物流和试管毒源携带,利用方便等一系列问题,现已见成效。

2 材料和方法

2.1 病毒毒源及保毒植物

2.1.1 毒源 PVX、PVY⁰、PVY^c、PVA、PVS、PVM、PVG、PLRV-强系、PLRV-中系、PLRV-弱系、AMV、CMV、PSTV-S、PSTV-M、TMV^{K-1}、TMV^{K-2}、TMV⁰、TMV¹等18种。

2.1.2 保毒植物 普通烟草、心叶烟、德伯尼烟、番茄、千日红、洋酸浆、毛蔓陀罗、马铃薯(克新三号、布尔班克、男爵)等8种。

2.2 方法

在无菌条件下,将已消毒过的保毒植物大茎尖0.5~1厘米用解剖针挑入试管培养基上,试管口塞紧棉球包好纸帽,纸帽上记载毒源名称及日期,放在培养架上培养。当试管毒源株高10~15厘米时,需带大叶片单节切段更新试管繁殖。

3 试验结果

3.1 马铃薯病毒不同保毒植物进入试管内培养后的生长特性

1987~1990年先后对马铃薯病毒毒源保毒植物取大茎尖进管培养保存共707管。试验结果证明:各保毒植物扦插在试管培养基上,均能正常生长发育。其中马铃薯大茎尖发育速度快,

成活率 100%，普通烟草、洋酸浆、番茄等植物叶片叶毛多，消毒未净，被杂菌污染影响了一定的成活率，其生长发育速度也较为缓慢。一般进管 18~20 天开始有小根系或小根点，34~36 天后逐渐发育成株。当试管保毒植物发育成株后，将单节带大叶片切段扦插在试管培养基上比大茎尖初进管生长速度快，单节切段比大茎尖初进管培养早生根 11~28 天。

3.2 马铃薯试管毒源保毒植物的病毒含量和病毒纯度

3.2.1 不同保毒植物对不同病毒的含量及纯度的影响 同一病毒由于保毒植物不同，其病毒含量和纯度均有明显差别。如普通烟草对 PVS、RVM 有免疫特性，对某些病毒做为保毒植物，可避免这两种病毒的混杂现象，而一些易感病毒或其本身不净的植物，一旦做为某些病毒毒源的保毒植物，就会造成毒源不纯现象(见表 1)。

表 1 不同保毒植物对不同病毒含量及纯度的影响
用酶联法(ELISA)检测结果

病毒种类	保毒植物 名称	含毒状况				注
		PVX	PVY	PVS	PVM	
PVX	假酸浆	++	+++	+++	+++	含毒量代号： —，无毒 +，有毒 ++，毒量较多 +++，毒量最多
	普通烟草	+++	—	—	—	
PVY ⁰	假酸浆	—	+++	—	—	
	普通烟草	—	+++	—	—	
	马铃薯布尔班克品种	—	+	+	+++	
PVS	马铃薯布尔班克品种	—	—	+	+	
	德伯尼烟草	+	+++	+++	+++	

3.2.2 试管毒源保毒植物普通烟生育年龄对植体内病毒含量的影响 保毒植物普通烟草不同生育阶段植体内病毒含量有明显差别，试管内毒源烟草生育 45 天时植体内病毒含量正常或较高，随着植株生育至衰老阶段 120 天时，其植体内病毒含量明显降低，一般病毒含量消失(见表 2)。

表 2 试管毒源保毒植物普通烟生育年龄不同对植体内病毒含量的影响
(用免疫电泳法鉴定结果)

被鉴定的 试管毒源	试管毒源 保毒植物	单节切段培养基扦插后 不同生长时间植体内病毒量		注
		45d(1)	120d(2)	
V ₁ PVX-9	普通烟草	+	—	(1)8 月 24 日切段培 养基扦插，10 月 9 日 镜检。
V ₂ PVY ⁰ -1	普通烟草	+++	—	
V ₄ PVY ⁰ -6	普通烟草	+	—	
V ₄ PVY ⁰ -4	普通烟草	+	—	(2)8 月 24 日切段培 养基扦插，12 月 24 日镜检。
TMV ⁰	普通烟草	+++	—	
TMV ⁰	普通烟草	+++	—	
TMV ⁰	普通烟草	+++	—	

3.3 试管毒源烟草小植株取出土壤栽植后的生育表现

试管毒源烟草小植株出管土栽后,在室温 15~20℃,光照 1 500~2 000 勒克斯条件下,生长发育正常,并且有病毒典型症状。如试管 PVY 普通烟草小植株出管后,土壤小塑料钵栽植 12~31 天,叶长 6~9 厘米,25~44 天,8~12 厘米,77~96 天 14~15 厘米,株高及叶数也随之增长。试管 PVS 德伯尼烟草小植株出管后 12~31 天,其叶长由 7.5 厘米增长至 9.5 厘米,看出试管内不同保毒植物小植株管外土栽是可行的(见表 3)。

表 3 试管毒源保毒植物出管土栽后植株生长发育及症状表现

被鉴定的 试管毒源	试管毒源 保毒植物	管外土栽 日期 (月、日)	管外土栽后 日数(d)	株高 (cm)	植株生长发育状况 叶长 (cm)	叶宽 (cm)	叶数 (片)	症状
V ₁ PVY ⁰ -1	普通烟草	9、24	77	10.0	14.0	7.0	11.0	明脉
			96	11.0	15.0	7.0	11.0	明脉
V ₁ PVY ⁰ -6	普通烟草	9、24	77	8.0	14.0	4.0	11.0	沿脉绿带,明脉
			96	8.0	15.0	5.8	11.0	沿脉绿带,明脉
V ₂ PVY ⁰ -2	普通烟草	11、15	25	3.0	8.0	4.0	8.0	明脉
			44	6.0	12.0	5.5	8.0	明脉
V ₁ PVY ⁰ -4	普通烟草	11、28	12	2.0	6.0	2.0	4.0	轻花叶
			31	3.0	9.0	3.0	5.0	轻花叶
TMV	普通烟草	9、24	77	4.5	8.0	3.5	11.0	浓绿隐花叶
			96	5.0	8.0	5.0	13.0	浓绿隐花叶
TMV	普通烟草	9、24	77	4.5	8.0	3.5	11.0	浓绿隐花叶
			96	4.5	8.5	4.0	13.0	浓绿隐花叶
TMV	德伯尼烟草	11、28	12	2.0	7.5	3.5	11.0	轻花叶
			31	5.5	9.0	3.5	11.0	轻花叶

试管内同一保毒植物的不同毒源普通烟草小植株,管外土栽后生长发育速度有差别。致病

表 4 试管不同毒源普通烟草小植株出管土栽后的生长速度表现

试管毒源	试管毒源 保毒植物	管外土栽后 日数(d)	株高 (cm)	小植株生长速度		叶数 (片)
				叶长 (cm)	叶宽 (cm)	
PVY ⁰	普通烟草	77	9.0	14.0	5.5	11
TMV	普通烟草	77	4.5	8.0	3.5	11
PVY ⁰	普通烟草	96	9.5	14.0	6.4	11
TMV	普通烟草	96	4.7	8.5	4.5	13

力强的 TMV 保毒普通烟草小植株表现症状重和生长发育缓慢现象。小植株管外土栽 77 天叶

长长度 8 厘米,96 天为 85 厘米,而试管 PVY⁰ 对保毒普通烟小植株致病力较弱,出管后与 TMV 在相同条件下栽植,生长速度较快。77 天叶长 14 厘米,96 天为 15 厘米,比 TMV 毒源叶长 6~6.5 厘米,株高高出 4.5~4.8 厘米,看出不同病毒致病力强弱对植株生长发育有明显的影响。但从中也看出 TMV 毒源普通烟植株虽矮化,其叶片数量却不减少现象(见表 4)。

3.4 利用试管毒源植物汁液接种在主要鉴别寄主上的侵染力表现

取试管毒源小植株叶茎汁液,接种主要鉴别寄主试验证明,试管保毒植物的毒源是有侵染力的。PVX 毒源的保毒马铃薯克新一号品种小植株汁液接种在主要鉴别寄主千日红上,在室温 22~25℃条件下,接种 5~7 天接种叶片出现红环局部病斑,TMV 毒源的保毒普通烟草叶液汁接种在无毒普通烟草上,接种 10 天后,产生系统性的浓绿块斑花叶典型症状。

4 结 论

4.1 通过试验证明:马铃薯不同病毒毒源试管封闭保存是可行而有效的。对深化马铃薯病毒研究工作和直接利用均有良好的价值。同时降低了在裸露条件下毒源繁殖与保存的成本和防止毒源间接触易混杂等一系列问题。

4.2 利用烟草、洋酸浆、千日红、番茄等植物做为马铃薯不同病毒试管保毒植物,其试管小植株还可单节切段繁殖,均能在试管内正常生长发育,小植株管外土栽后生长发育良好,并经病毒检测,不断筛选纯化试管毒源,利用试管毒源接种其它植物均有侵染力,这一保存马铃薯病毒毒源的方法和研究工作,目前国内外尚无报道资料。

Study on Maintenance of Main Potato Viruses Source by Using in Vitro Culture Technique and Its Effect

Liu Xicai Li Zhifang et al.

(Potato Institute, Heilongjiang Academy of Agri. Sci.)

Abstract In this paper, the maintenance of main potato viruses source using in vitro culture technique was conducted in 1987~1990. The results showed that the survival rate ranged from 57.6 to 100 percent depending on host plants. The average rate was 87.1%. The shoot began rooting and growing normally after 20~36 days culture in tubes. Multiplication by cuttings could be started when the plantlets grown up. The cuttings began rooting and growing normally after 6~12days culture, and the purity and content of the viruses could be kept as well.

Key words Potato Viruses, Maintenance in vitro technique