

马铃薯脱毒快繁及工厂化生产技术

李东方,张爱萍,陈 英,刘江娜

(新疆兵团农六师农业科学研究所,新疆 五家渠 831300)

摘要:针对新疆马铃薯快繁及工厂化生产技术中的母株材料选择、茎尖脱毒培养、试管苗快繁、试管薯诱导及微型薯繁育等技术全面总结了近5年来的研究成果,并详细描述马铃薯脱毒技术操作及试管苗、试管薯、微型薯工厂化生产各阶段的工艺流程与技术要点。

关键词:马铃薯;脱毒;快繁;工厂化生产

中图分类号:S532

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)07-0027-04

马铃薯是全世界最重要的高产作物,我国马铃薯的种植面积居世界第二位^[1]。病毒病是影响马铃薯产量和品质的主要病害,我国从20世纪70年代初开始研究推广马铃薯茎尖脱毒技术。实践证明选用高质量的脱毒种薯可使马铃薯产量增加30%~50%,尤其针对新疆由于检疫虫害甲虫的原因不能以鲜薯销往内地而只有大力发展加工薯产品来说,此项技术显得尤为重要,是提高加工薯商品产量与品质的重要举措。近几年,随着新疆农业产业结构的不断调整优化,马铃薯种植逐步纳入一些非宜棉区,每年种植面积在2.0万~3.5万hm²,已成为新疆主要的商品加工薯种植基地。目前,在伊犁、昌吉、博乐、塔城等地区均建有一定面积的种薯基地,但因受各方面条件限制,脱毒马铃薯应用面积不足5%,大多数是自留种或从内地调种。从一定意义上来说解决了种薯质量的问题就基本上解决了马铃薯种植生产上一半的问题。为此,建立一套适合新疆马铃薯微型薯脱毒快繁及工厂化生产技术,是实现新疆马铃薯产业化持续健康发展的基础。

1 母株材料选择技术

近年来,新疆兵团农六师生产的微型薯品种主要有大西洋、陇薯3号、夏波蒂、克新1号、费乌瑞它和新大坪7个品种,其脱毒母株材料的田间

株选和薯块选择直接关系到经过脱毒后的材料能否直接应用生产,针对其品种特性主要进行以下选择。

1.1 田间株选

所选择的单株材料必须符合本品种的特征,包括株型、叶形、花色等生物学性状,还需注意所种植品种的区域条件及地块土质需适宜马铃薯的种植,最好是原种田,其品种特性在充分发挥出来的情况下选择植株生长健壮,无明显的病毒病、真菌、细菌性等病害症状,且需适时早收。

1.2 块茎选择

薯块需符合品种特征,包括薯型、芽眼、皮色和肉色等,且无病斑、虫蛀和机械创伤的大薯块,收获后将薯块置于室内14~21d,作为脱毒母株材料使用。

2 茎尖脱毒培养技术

影响茎尖脱毒效果的关键因素主要是病毒的种类与剥离茎尖的大小,不同种类的病毒脱除的难易程度不一,马铃薯病毒脱除的难易顺序为:马铃薯卷叶病毒(PLRV)、马铃薯A病毒(PVA)、马铃薯Y病毒(PVY)、马铃薯M病毒(PVM)、马铃薯X病毒(PVX)、马铃薯S病毒(PVS)和马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTV)。茎尖培养虽然可以脱除马铃薯的病原菌,但脱毒率仍然很低。因此,可根据病毒和植物细胞对热处理温度与时间的反映,结合热处理(37℃)辅助措施,使部分病毒钝化,从而消除块茎中大部分马铃薯卷叶病毒并降低马铃薯Y病毒的含量^[2]。

2.1 催芽及热处理

催芽前须将薯块进行马铃薯纺锤形块茎类病毒检测,将不带有此病毒的打破休眠的薯块放在18~25℃的条件下进行催芽,约30%的露芽后方

收稿日期:2013-02-19

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划重点资助项目(2012BAD41B00)

第一作者简介:李东方(1965-),男,安徽省太和县人,硕士,高级农艺师,从事作物引种选育及栽培技术研究与示范工作。E-mail:xjmelon@126.com。

通讯作者:张爱萍(1968-),女,安徽省蒙城县人,学士,研究员,从事作物引种选育及栽培技术研究与示范工作。E-mail:zapxjmelon@126.com。

可放入 35~37℃ 恒温箱中进行热处理,30~40 d 后进行茎尖剥离。

2.2 茎尖组织培养

2.2.1 茎尖剥离 选取茎尖剥离的材料可采用两种方法,一种直接在经热处理后的薯块上取材,一种是从薯块上切取的芽经无菌培养后,繁殖成无菌苗后取其顶芽进行茎尖剥离。两种取材方法各有利弊,可根据具体情况选择使用。

在薯块充足且时间较紧的情况下可直接用热处理后的薯块上芽的茎端进行茎尖剥离。具体方法是用解剖刀从薯块上切取长 1 cm 左右的芽置于自来水上冲洗 30 min,然后置于超净工作台上进行外植体消毒,先用 75% 的酒精浸泡 45 s,再用 0.1% 的升汞灭菌 10 min,最后用无菌水冲洗 3~5 次,然后在 40 倍带冷光源的显微镜下用解剖刀与解剖针剥取带 1 个叶原基(直径约为 0.1~0.2 mm)的茎尖置于培养基中培养;在薯块较少或时间充足的情况下可采用将薯块的芽经上述外植体消毒处理后进行无菌培养繁殖后长出更多的瓶苗,然后再直接取其茎端进行茎尖剥离。两种方法需注意在剥离时速度一定要快,且须将茎端放在无菌潮湿的滤纸上,以防剥离的幼小茎尖失水死亡。

2.2.2 茎尖分生组织培养 从茎尖剥取的分生组织实际上只是刚开始分化的大细胞团,因而培养过程中应更加精心,其培养容器以试管为好,既可保证茎尖分生组织的长期培养所需的营养成分,又可节约空间,便于及时观察记载。茎尖分生组织培养基一般选用 MS+蔗糖 3%,卡拉胶 0.6%,pH5.8,并附加一定浓度 6-BA 和 NAA 进行培养,培养条件要求为白天 24~27℃,夜间 18~22℃,光照 16 h,光强 2 000 lx 以上。试验结果是茎尖的大小与脱毒率成反比关系,茎尖越小,脱毒率越高。以直径大小为 0.1~0.3 mm,带 1~2 个叶原基的茎尖为外植体,其成活率与脱毒率较高,在生产中一般采用带 1 个叶原基的茎尖培养 60~120 d,选取直接成苗且无愈伤组织形成的单株转入 MS 培养基进行继代培养检测。

2.3 脱毒试管苗母株病毒检测

由茎尖分生组织培养获得的试管苗母株,当扩繁到一定量时需进行病毒检测,只有经病毒检测后,确认是不带病毒的试管苗母株系,才能进一步快繁利用,对带有 1~2 个病毒的株系如因材料不足可进行二次茎尖剥离培养后再次进行病毒检

测,确认不带病毒方可利用,如已达到生产需求量即可淘汰。

目前已报道的感染马铃薯的病毒多达 35 种,类病毒 1 种,以马铃薯命名的病毒就有 15 种。其中分布广泛、危害严重的马铃薯病毒有马铃薯 X 病毒(PVX)、马铃薯 Y 病毒(PVY)、马铃薯 S 病毒(PVS)、马铃薯 A 病毒(PVA)、马铃薯卷叶病毒(PLRV)、马铃薯 M 病毒(PvM)等病毒^[3]。因此,在病毒检测时主要也是针对上述几种病毒,特别是马铃薯 X 病毒、马铃薯 Y 病毒。马铃薯病毒检测现生产上多采用酶联免疫检测法(DSA-ELISA),试剂盒相对来说我国黑龙江农业科学院自行研究生产的马铃薯病毒检测试剂盒其性价比较好。茎尖脱毒的统计标准为:对茎尖培养成活的植株,经 DSA-ELISA 检测,马铃薯卷叶病毒、A 病毒、Y 病毒、M 病毒、X 病毒、S 病毒均呈阴性。

2.4 田间试种

经病毒检测后确认不带有病毒的试管母株苗在进行大量扩繁前,还需进行田间试种观察,以确保经过脱毒的试管苗能够保持原品种的全部生物学特性及农艺性状,以防因茎尖剥离培养后会产生变异的植株而影响生产。在田间试种观察中除需注重本品种的生物学特性及农艺性状观察记载外,还需针对生产所需选择结薯集中、薯块整齐且产量高的单株系进行扩繁利用。也就是说当年所获得的脱毒试管苗须经过病毒检测、田间试种观察后方可进入生产环节,此过程至少需要 2~3 a 的时间,所以生产上需提前计划做好准备。

3 脱毒试管苗快繁技术

3.1 培养条件

根据这几年的生产快繁经验,综合马铃薯试管苗生长势、繁殖倍数以及培养成本,包括培养基用量、消毒及接种人工费等总结分析,认为选用 250 mL(5.6 cm×6.9 cm×9.1 cm)马铃薯专用培养瓶繁殖瓶苗比较经济适用。用于基础苗的继代培养每瓶苗株数在 45 株左右,利于节约空间和成本;用于下地的继代培养每瓶苗株数在 30 株左右,利于试管苗生长健壮整齐。瓶苗快繁培养基一般选用 MS+蔗糖 3%、卡拉胶 0.5%,pH5.8。培养条件要求为白天 24~27℃,夜间 18~22℃,光照 16 h,光强 2 000 lx 以上。瓶苗在生长过程中,受外界环境条件的影响很大,尤其是光照和温度,与试管苗将来定植成活有直接的关系,马铃薯

试管苗生长与田间植株生长一样,须有一定的昼夜温差有利于瓶苗的健壮生长。

3.2 转接倍数及继代次数

试管苗一般培养周期为 20~30 d,1 周期转接 1 次,转接倍数一般为 3-8 倍,在此基础上转接倍数越高相对来说其综合成本越低,为此在生产上应尽量提高转接倍数,亦可降低继代次数。从理论上推算,1 a 可继代 12 次,每次扩繁按最低繁殖倍数 3 计算,1 株试管苗 1 年后可转接至 531 441 株,可供 1 771 m² (按 300 株·m² 定植计)网室种植,生产微型种薯 70.84 万粒(生产微型种薯按 400 粒·m² 计),可供 7.9 hm² (按 9 万粒·hm² 播量计)原种田生产良种。由此可见试管苗快繁潜力很大,但是由于试验设备、环境条件及技术等原因,在实际生产中难以达到周年生产周期,尤其是在新疆特殊的地域环境中,一般 1 a 只能繁育微型薯一茬,所以需选择在较短的时间内尽量快繁出大量的试管苗,集中供 4~5 月期间在网室种植,这就是目前新疆与内地部分地区生产微型薯的不同及难点问题,主要是瓶苗如下地早,温度低,利用温室加热从生产成本来计不合算,如下地晚,温度高且干燥,成活率较低。

马铃薯试管苗在离体条件下多次继代培养,均有不同程度的病毒和细菌侵染,造成病毒逐渐积累侵染;同时,试管苗因长期在含有激素含量的培养基中,还可能会引起芽变。因此,马铃薯脱毒试管苗组培继代次数最好在 14 代以内,一般 1~2 a 需更换 1 次基础苗,以提高试管苗的质量。为延长脱毒后的试管苗使用寿命,可采取扩繁初期分出一部分苗,一种是转入 MS+甘露醇 4%,蔗糖 3%,卡拉胶 0.6%,pH5.8 的保存用培养基,在 6~10℃ 的光照培养条件下降低瓶苗的生长速度,达到每 6~8 个月转接 1 次,以降低扩繁周期的次数及污染机率,使脱毒试管苗的复壮使用寿命达到 4~6 a;另一种是将脱毒试管苗培育成试管薯,以试管薯的形式进行保存,当需要进行大量扩繁时,只需将试管薯在继代培养基中进行发芽切取茎段扩繁即可,这样更可延长试管苗的复壮使用寿命,经济实惠,其部分研究结果还需进一步探讨。

3.3 污染控制

真细菌污染是植物组织培养过程中,普遍发生的问题,控制不好很容易造成毁灭性的灾难,特别是春夏季实验室温度高,其污染难以控制。为

此,实验室的综合控制就显得十分重要,需做到:一是早防早控,要严格按组培室管理规程作业,定期进行彻底灭菌,杜绝闲杂人员入内,尽可能减少人为污染;二是做好接种准备工作,要充分利用超净工作台的优势,将每次所需接种用的基础苗、转接瓶及器具等全部放入工作台,并结合二氧化氯及紫外灯进行灭菌处理;三是严格执行接种程序,要求接种人员须做好自身卫生,在接种过程中始终保持“空对空”的操作,严格执行规定程序,接种室每 3 d 用苍术薰蒸,杜绝人为污染;四是及时彻底处理污染瓶,接种后要在 4~5 d 内及时挑除 1 次污染,尤其是细菌污染,然后隔 10 d 再挑 1 次,对污染瓶要高压灭菌后再用 0.1% 高锰酸钾溶液浸泡处理后方可进行清洗;五是一旦发生严重污染时,要彻底清除全部污染源,必要时可采用高锰酸钾加甲醛密封薰蒸 2 d 后再打开组培接种室通风换气,7 d 后方可进行接种。

3.4 降低成本

进行马铃薯试管苗组培快繁时培养基试剂用量大,人工接种等费用相对较高,如何能降低成本,是关系到推广马铃薯良种繁育三级体系的关键举措。

3.4.1 简化培养基 瓶苗快繁过程中培养基是基础,且试剂用量大,根据近几年的生产经验,主要做法是:一是改固体培养为液体培养,用棉花替代卡拉胶作支撑物,其它试剂的用量为固培的 50%,可节约培养基成本 60% 以上,且植株生长健壮,周期较常规固培缩短 5~10 d,因其清洗容易,是适宜培养下地苗的首选培养基。但容易发生细菌污染且传播快,在选用此法时需注重基础苗的质量,杜绝细菌污染苗进入接种室;二是用白砂糖代替蔗糖,软化白开水代替蒸留水,这在生产上已大量应用,效果很好;三是用于快繁下地苗时的培养基,可完全去除其中的肌醇和有机成分,对下地苗生长及成活影响不大,生产上已在推广应用;四是在固培中应尽量减少琼脂或卡拉胶的用量,只需用到其凝固点的量即可,制作培养基时对每一批次的用量要做试验且需充分搅拌均匀找到最小用量。

3.4.2 降低人工成本 人工成本在组培快繁中可占到 80% 以上,主要是人工接种费,如何提高工效,一直是探讨的热点问题。接种需针对本地的生产条件及用工成本,制定出科学合理的瓶苗转接管理办法,尤其是操作环节,减少污染和提

高接种速度是首选举措,在生产过程中也可在扩繁基础苗时加大每瓶苗的株数,最大限度地提高转接倍数。

4 试管薯诱导技术

马铃薯试管薯诱导工作现开展的较多,但在生产上还未普遍应用,针对新疆气候干燥,试管苗定植适期较短而影响成活率的问题,应用试管薯比试管苗更易在生产上推广。

4.1 培育壮苗

培育健壮的试管苗是试管薯诱导成败的关键,只有在诱导结薯前一个阶段中培养出根系发达、茎秆粗壮、叶色浓绿的试管苗,才能获得高产、优质的试管薯。

4.1.1 壮苗培养基选择 作为诱导前培育壮苗的培养基一般采用液培法,可用棉花作支撑物,一般选用培养基为 MS+蔗糖 3%+活性碳 0.15%, pH 5.8,将带有 1~2 个茎节的试管苗,去掉顶芽及根部的根系,接种在液体培养基上浅层静置培养 10~15 d,茎段发育成 5~7 个节的健壮苗,换成诱导结薯培养基,3~4 d 后试管内开始有试管薯形成。

4.1.2 培养条件控制 对大西洋、陇薯 3 号 2 个品种的壮苗试验结果表明:白天 23~25℃,夜间 16~18℃,光照强度 3 000~4 000 lx,光照 16 h·d⁻¹ 的条件下培养 15~18 d,有利于试管苗的健壮生长,培养瓶最好选用透气性好的封口物,以利气体交换,促进壮苗的形成。

4.2 试管薯诱导

4.2.1 诱导培养基选择 试管薯诱导培养基一般选用 MS+6-苄胺基嘌呤 5 mg·L⁻¹+矮壮素 500 mg·L⁻¹,蔗糖 8%,pH 5.8。在更换诱导培养基时,最好将培养瓶内原有的壮苗培养基倒干净,再将诱导培养基倒入有利于试管薯形成。

4.2.2 培养条件控制 根据我们近 3 a 的试验结果表明:当加入诱导培养基后继续在 16 h 光照条件下培养 3 d 后再转入暗培养,培养温度 18℃,若用密封式人工培养箱暗培养,每天要开 1 次培养箱的门更换培养箱内空气,利于块茎的发育。

4.3 生长周期

试管薯诱导周期一般为 45~60 d,即试管苗茎段接种到壮苗形成为 15~20 d,诱导培养开始到收获 30~40 d。采用 320 mL 培养瓶每瓶 10 个茎段,一般可收试管薯 15~25 粒,多者可达 40 粒以上。

试管薯收获后要用清水完全冲洗干净其上的培养成分,用纱布迅速吸去表皮的水,稍微风干后置于 4℃ 冰箱保存,待其自然通过休眠后或用赤霉素催芽后种。由于试管薯体积小,水分含量较大,在储存过程中应注意保水分。

5 微型薯繁育技术

目前,微型薯生产上需在温室或冷棚中采用 60 目的防虫网进行人工隔离条件下生产,主要有 2 种繁育方法。

5.1 瓶苗繁殖

5.1.1 炼苗 继代培养的瓶苗当长成带 4~5 片叶、3~4 条小根、株高 6~8 cm,在种植条件适合时,即可转移到炼苗棚去掉瓶盖,锻炼 2 d,即可移栽;如在日光温室里进行瓶苗培养,其生长条件和移栽棚条件相近,可不炼苗直接进行定植,这样还可降低瓶苗外移的污染,在温、湿度条件合适时定植成活率可达 90% 以上。

5.1.2 基质处理 用 40 目的防虫网将基质与土壤分隔开,在新疆由于冬季温度低,且微型薯 1 a 只生产 1 茬,相对来说,土壤菌传播和存留较少,大多是接土生长,如连作时间长,需用隔层将基质与土壤完全分开,以保证微型薯的质量。基质一般以蛭石为主,亦可选用蛭石:草炭 = 1:1,基质中可加入 1~2 kg·m⁻³ 磷酸二铵作基肥,平铺厚度为 6~7 cm,在移栽前需彻底浇透水,以手握刚出水为准。一般 2~3 a 更换 1 次,但每年再利用时需进行消毒处理后再参入一些新的蛭石。

5.1.3 定植管理 定植密度为 300 株·m⁻²,初期应覆盖塑料薄膜及遮荫网以保持湿度及防止强光直射。散射光利于缓苗,7 d 后幼苗长出新根,可逐渐通风,10~15 d 待幼苗完全长出新根成活后方可去掉薄膜,30 d 可根据棚外环境逐渐去掉遮荫网。幼苗长至 10 片叶以上时,需覆 1 次基质,厚度 2~3 cm,以利结薯。在整个生长周期中一般每 7~10 d 结合喷水需喷肥和打药 1 次,肥料前期以尿素为主,中后期以磷酸二氢钾为主,浓度为 0.3%~0.5%。防病虫主要是防蚜虫和晚疫病等,冰同药剂需交替使用。后期若有徒长现象,根据植株生长势可喷施 150~250 mL·L⁻¹ 矮壮素,以抑制生长,促进块茎膨大。定植后 70~80 d 可收获,每株结薯 1~3 个,可收获 400~500 粒·m⁻²。

5.2 扦插繁殖

5.2.1 扦插基础苗培养 用作扦插的基础苗一般用育苗盘种植,来源主要有两种:一种是以瓶苗