

甘薯脱毒苗培育的研究进展

卢玲, 聂明建, 王学华* (湖南农业大学农学院, 湖南长沙 410128)

摘要 文中综述了近年来甘薯脱毒技术发展的情况及茎尖分生组织培养的标准化生产情况, 并对今后脱毒甘薯的发展和重点进行了简要展望, 为脱毒甘薯的推广提供了重要的理论依据和技术支撑, 对脱毒甘薯的工业化生产具有重要的科学意义。

关键词 脱毒技术; 组织培养

中图分类号 S609 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)04-01456-03

Research Progress of Detoxification about Sweet Potato

LU Ling et al (College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128)

Abstract The development of sweet potato detoxification technology was reviewed, as well as the standardization production of meristem culture. The development of detoxification sweet potato and research focus were forecasted, which provides theoretical basis and technique support of sweet potato detoxification extension, and has significant scientific meaning for industrialization production of sweet potato detoxification.

Key words Detoxification technology; Tissue culture

长期营养繁殖是导致甘薯病毒蔓延、产量质量降低的主要原因。甘薯脱毒苗的培育就是采用甘薯茎尖剥离, 利用茎尖分生组织离体培养而获取无病毒试管苗的一种技术体系^[1-2]。通过维管输导组织传播的病毒在茎尖分生组织中的传播速度很慢。利用甘薯顶端分生组织是无病毒区的原理, 将茎尖分生组织在无菌条件下和合适培养基上离体培养, 诱导再生茎尖苗, 茎尖苗再经严格的病毒检测, 确认不带病毒后在防虫网条件下进行快速繁殖, 最后将这些无病毒的薯苗供给薯农种植, 以达到脱除病毒和提高产量的目的^[3-4]。

1 甘薯脱毒技术现状

20世纪70年代, 世界上许多国家的甘薯主产区都报道了甘薯病毒病的发生及危害^[5]。而茎尖分生组织培养培育脱毒苗是目前防治甘薯病毒病、提高甘薯产量和品质的有效方法。1960年Nielsen最先获得甘薯脱毒苗^[6-8]。甘薯茎尖分生组织培养虽然起步较晚, 但发展迅速, 在国内外已有很多研究报道, 应用前景广泛。20世纪80年代甘薯茎尖组织培养研究获得成功, 姚敦义等通过愈伤组织获得完整植株; 朱兴国通过茎段诱导形成完整植株; 1993年甘薯脱毒苗被应用于农业生产, 1994年大面积示范成功^[9], 从而控制了甘薯因病毒病而造成的危害, 增产效果显著。河南省自1999年起就进行甘薯脱毒技术研究, 在甘薯病毒种类鉴定、病毒检测、脱毒新品种培养及生产应用等方面取得了明显进展^[10]。迄今为止, 甘薯茎尖培养产生试管苗的技术已基本成熟, 主要包括取壮芽、消毒、接种和培养成苗等技术环节。近年来我国的甘薯生产省应用脱毒技术取得了较好的成效。福建省采取统一育苗、统一供苗、统一栽培管理的措施, 并设立大面积的脱毒甘薯综合示范片, 经多次现场验收统计, 发现脱毒甘薯的增产幅度为7.2%~45.3%, 其中脱毒金山57、岩薯5号增产极显著, 龙岩7-3增产显著^[11]。

2 甘薯脱毒技术中的影响因素

2.1 脱毒甘薯品种的选择 甘薯的品种繁多, 不同的甘薯品种一般都具有一定的区域适应性, 在选择脱毒甘薯品种时需充分考虑该地区的气候条件、土壤条件及栽培条件, 因此选择适宜的优良品种, 充分发挥脱毒甘薯的品种优势是获得高产的关键技术措施。冯秋金等选用湘薯75~55、广东竖种、新种花等不同品种的脱毒苗进行试验, 结果表明, 新种花与湘薯脱毒薯苗表现良好, 适应性强, 可在该地区推广栽培^[12]。夏可容等在铜仁市选用美国SL-9、徐薯18、豫薯王、鲁薯8号等不同品种进行脱毒试验, 研究不同品种对产量及品质的影响, 结果表明, 豫薯王产量最高, 增产幅度最大, 淀粉含量最高, 总碳水化合物也最高^[13]。吴立锋和李玉霞研究确定了适合河南陕县生产应用的高产优质脱毒甘薯品种, 其中淀粉加工用薯品种为: 徐薯18、豫薯7号、豫薯12、豫薯13、梅营1号等; 食用或商品用薯品种为: 选用脱毒北京553、苏薯8号、徐薯34等^[14]。

2.2 外植体表面消毒方法 目前在甘薯茎尖脱毒培养时常用的消毒方法有升汞消毒法、次氯酸钠消毒法、乙醇消毒法等。植物组织表面消毒的原则即是既要做到既彻底灭菌, 又需保持组织细胞不受损伤, 使外植体成活又不污染, 保证较高的成活率。国内外专家在有关植物表面消毒方面做了大量的研究, 比较了各种消毒剂的使用浓度、消毒时间和消毒效果。赵雨佳等分别使用75%酒精、2.5% NaClO水溶液和0.1%升汞溶液对渝薯2号的顶芽进行表面消毒处理, 结果表明升汞的消毒效果明显优于NaClO水溶液和酒精溶液, 经0.1%升汞消毒后的茎尖污染率最低, 幼苗成活率也达85%^[15]。升汞的杀菌能力很强, 在植物组织培养中使用升汞溶液效果较好, 但升汞消毒也有其缺点, 即升汞对植物茎尖有一定的杀伤力, 即经升汞消毒后的茎尖成活率较低。目前植物组织培养一般采用酒精和NaClO水溶液两步法消毒。孔祥生等^[16]、孟令文^[17]等通过试验得出结论: 经升汞消毒后的甘薯茎尖成活率最低, 而用75%酒精浸泡30s, 再用5% NaClO水溶液消毒10min, 无菌水冲洗3~5次, 幼苗的成活率最高可达96.7%。笔者也采用了酒精和次氯酸钠的结合

作者简介 卢玲(1988-), 女, 湖南永州人, 硕士研究生, 研究方向: 植物淀粉类生物能源开发与应用, E-mail: luling7000@126.com。* 通讯作者, 教授, 从事生物能源研究, E-mail: wxh6011@163.com。

收稿日期 2012-12-25

使用的方法,试验效果良好。

2.3 切取茎尖大小 茎尖的大小是影响植株分化和脱毒效果的主要因素。茎尖越小,脱毒效果越好,但成活率却较低;茎尖越大,脱毒效果会受到影响,但成活率却很高。尚佑芬等研究表明,叶原基越少的茎尖成苗越难,随着茎尖所带的叶原基越多,植株成活率也越高,但其脱毒率却在下降^[18]。颜廷进等通过大量试验表明,切取的茎尖分生组织带2个叶原基,剥取茎尖大小为0.3~0.4 mm最为适宜,不仅能有效去除病毒,其成活率也较高^[19]。笔者在实际操作中发现,外植体应取自苗床或人工控制条件下薯块产生的幼苗,选择健壮的幼苗剥取茎尖,剪取2~3 cm长芽段,进行表面消毒,消毒后剥离带1~2个叶原基(0.2~0.4 mm)的茎尖,接种于培养基上培养。

2.4 甘薯脱毒的培养基成分

2.4.1 MS培养基 MS培养基是植物组织培养中使用最普遍的一种培养基,这是由于它具有较高的无机盐浓度,能保证组织生长所需的矿质元素,并能加速愈伤组织的生长。

2.4.2 糖类种类和浓度对试管苗生长的影响 糖类是植物组织培养培养基中非常重要的营养成分,在甘薯茎尖组织培养的过程中,糖类的种类和浓度对试管苗的生长有一定的影响。周全卢等^[20]研究表明,不同的蔗糖浓度对甘薯脱毒苗的生长有显著不同的影响,在MS下培养甘薯组培苗的最佳蔗糖浓度是30 g/L。这与张华等报道的茎尖分生组织诱导成活率的适宜浓度范围为20~30 g/L一致^[21]。

2.4.3 植物激素对试管苗生长的影响 利用茎尖分生组织生产甘薯脱毒苗的前期试验者是在单一的MS培养基(即不添加任何的植物生长调节剂)上进行组织培养的,后来探索性的发现添加适宜的植物生长调节剂,茎尖分生组织转录快,成苗率高。大量试验表明,植物生长调节剂的配比要求是有差异的,受品种遗传特性和培养基成分配比等因素的影响,各配比处理间和品种间的芽诱导率存在明显差异。

2.4.3.1 6-BA对脱毒苗生长的影响 6-BA在植物生长调节剂中属细胞分裂素类,对芽的形成、愈伤组织发生有重要促进作用。李强等通过试验发现,不同基因型材料、不同培养方式和不同6-BA浓度,会对甘薯茎尖培养成苗率造成很大差异^[22]。唐丽等采用不同浓度的6-BA进行试验,结果表明在无激素的MS培养基上茎尖组织变成褐色,未见愈伤组织和分化芽苗;而当培养基中6-BA浓度在1.0~1.5 mg/L之间时,诱导分化率在50%~60%,且芽苗生长正常^[23]。关崇梅等通过对甘薯茎尖分生组织培养与快速繁殖技术进行研究,结果表明甘薯茎尖分生组织在MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1~0.2 mg/L+3%蔗糖+琼脂6.0 g/L的培养基中培养,培养温度控制在26~30℃,甘薯的平均脱毒率可达83.7%,同时将脱毒试管苗切段快速增殖,繁殖速度更是以惊人的几何级数增长^[2]。孟德璇、孙周平、何凤发等发现低浓度时6-BA和NAA有促芽和促进愈伤组织形成的双重作用,而高浓度时只有利于愈伤组织形成,对茎尖生长有抑制作用,成苗率先增加后降低^[24-25]。

2.4.3.2 NAA对试管苗生长的影响 NAA在植物生长调节剂中属生长素类,试管苗的生根数、根长、叶片数和株高与NAA的浓度有密切关系。单林娜等以豫薯4号、豫薯5号、豫薯7号、豫薯12号、豫薯14号为材料,以MS为基本培养基进行脱毒组织培养,研究表明继代培养与生根培养用MS+NAA 0.2 mg/L效果较好,培养出来的幼苗脱毒率和成活率比较理想^[26]。何新民等以红姑娘2号甘薯的茎尖为原料,诱导产生了愈伤组织,同时在产生愈伤组织和成芽阶段使用MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L培养基培养的效果较好,茎尖的诱导率最高^[27]。

2.5 培养条件 温度和光照时间是影响甘薯茎尖分生组织培养成苗的主要因素。据中国农业科学院甘薯研究所报道,在15~35℃范围内,温度越高,萌芽数越多,薯苗生长速度也越快。光照在甘薯出苗前作用不明显,在出苗后,如果光照不足则不利于幼苗进行光合作用,影响薯苗的正常生长,只有光照充足才能保证薯苗健康生长。陈明灿通过试验表明,在离体条件下,甘薯茎尖分生组织生长的最适温度为28℃,在此条件下,单株干重、单株叶片数及成苗率最高,同时随着光照时间的延长,幼苗的成活率越高,薯苗的最适宜光照时间应为14~16 h/d^[28]。黄冰艳等探讨了光照在试管苗快繁中的作用,结果表明:光照不仅影响试管苗的器官建成,也影响试管苗的生长,光照时数以不低于16 h/d为宜^[29]。笔者采用温度为26~34℃,光照强度为1 600~4 000 lx,每日光照12~16 h的条件进行培养,幼苗的成活率可达85%以上。此外,甘薯茎尖培养还与培养瓶的换气孔大小有关,王守明等研究认为,换气孔直径为1.0 cm处理的甘薯叶片及根的生长情况均好于1.5和2.5 cm处理,没有换气设置甘薯生长状态也良好,但地上部干物重不及1.0 cm处理^[30]。

2.6 甘薯脱毒苗的快速繁殖技术 利用茎尖分生组织培养获得脱毒苗后,为保证大田生产对脱毒苗的大量需求,快速繁殖技术成为了研究热点。脱毒甘薯茎尖苗的大量繁殖,可采用实验室试管苗快繁和温网棚繁殖方式来实现。实验室内繁殖是在无菌条件下,将脱毒苗一叶一节切段,扦插于不添加任何植物生长调节剂的1/2MS培养基中,培养过程中保持充足的光照和适宜的温度条件,才能提高薯苗的质量和繁殖速度。温网棚繁殖需在幼苗5~7叶时打开瓶口,室温下加光照炼苗5~7 d。移栽前准备适合的基质并消毒,生产上多采用蛭石、珍珠岩、沙土或疏松的土壤等作为基质。消毒药剂多采用甲醛消毒和高锰酸钾消毒,将药剂配成合适的比例用喷雾器均匀地喷洒基质,然后用塑料棚膜覆盖24 h,风干15 d后,便可使用^[31]。为防止因桃蚜、棉蚜等非持久式传播病虫害,应采取适当的隔离措施,采用40目防蚜网覆盖在塑料大棚和500 m内无带毒空间隔离,定期喷洒防治蚜虫的药剂以防止病毒的再次侵染。上述2种快繁方法各有优势。实验室内快繁具有繁殖速度快、避免病毒再次侵染、不受季节、气候及空间的限制、可工厂化生产的优点;温网棚快繁成活率高,但成本较高^[32]。

2.7 茎尖苗脱毒效果的检测 甘薯茎尖分生组织培养获得

的无菌茎尖苗并非就是脱毒苗,必须经过实验室病毒检测才能确定。甘薯病毒的检测有多种方法,如目测法、指示植物法、血清学检测法、电镜观察法及分子生物学方法。目测法是根据甘薯叶和薯块上出现的典型症状进行判断,可初步剔除病株,但对一些潜伏性病毒无法检测;指示植物法即根据指示植物巴西牵牛(*Ipomoea setosa*)是否新生出明脉、斑点、变色等症状,此法简单、成本低,但不能区分病毒种类;血清法为酶联免疫吸附法(ELISA)或在此基础上改进的电结合酶联免疫吸附法(Dot-Blot ELISA)等,是目前使用最广泛和较为可行的方法^[33],其是根据硝酸纤维素膜是否形成有色斑点来判断;电镜法即根据病毒的大小和形态特征,利用电子显微镜分辨率高的特点,对病毒颗粒进行直接观察,由于电镜的使用复杂使该法的推广受到较大制约;分子生物学法是将cDNA 探针和双链 RNA 技术应用在甘薯病毒检测上,由于样品处理复杂,探针分离困难,同位素标记存在安全问题等原因,使其应用范围受到影响^[34]。

3 脱毒甘薯存在的问题及研究展望

我国近年来也在甘薯脱毒苗领域取得了非常大的进步,许多甘薯生产省份开始进入脱毒甘薯苗时代。尽管我国甘薯脱毒苗应用越来越广泛,但在发展过程中依然存在一些问题,如国内许多甘薯种植户对脱毒甘薯苗了解不够,甘薯的增产特性可能会因为病毒的再侵入而逐步散失。因此今后需对甘薯种植户加强甘薯脱毒技术的宣传和培训,同时继续在脱毒甘薯增产方面进行深入研究,为脱毒甘薯的持久性增产提供科学依据。

脱毒甘薯试管苗具有个体小、便于贮运的优势,是其种质资源保存和交换的最佳形式^[35]。由于脱毒苗进入大田后,会受病毒的再侵染而引起再退化,因此只有为生产直接提供无病毒种苗,才能获得甘薯的持续优质高产稳产。而规模化生产脱毒苗的高成本,直接限制了其在生产上的积极应用。脱毒培养基的成分中,固化剂及有机营养的费用较高,若能采用廉价的物质替代,将会大幅度降低其生产成本。关于脱毒种薯的生产程序,需建立一套与脱毒薯相适应的生产管理技术,这样才能更好地发挥脱毒薯的增产潜力。今后需加强组培理论和技术体系的探讨,提高脱毒效果,缩短成苗时间,不断改进繁殖技术,从而提高繁殖系数。甘薯脱毒苗在转基因育种上也展示了广阔的前景。

参考文献

- [1] 王林生,裴全征,孔祥生,等.甘薯脱毒的生物学原理及快繁技术[J]. 杂粮作物,2000,20(4):53-55.
- [2] 关崇梅,秦静远,徐志英,等.甘薯茎尖分生组织培养及快速繁殖技术研究[J]. 农业生物技术科学,2004,20(4):33-35.
- [3] 康明辉,刘德扬,海燕,等.甘薯脱毒技术的原理及方法[J]. 种业导刊,2010(1):14-15.
- [4] 康明辉,刘新涛.甘薯脱毒简介[J]. 河南农学,2001(8):18-19.
- [5] 王林生,马晓玉.甘薯脱毒技术的研究与应用[J]. 种子,2005(10):51-

- 53.
- [6] CALI B B,MOYER J W. Purification,serology and particle morphology of two russet cracks strains of sweetpotato feathery mottle virus [J]. Photopathol,1981,71:302-305.
- [7] CHUNG M L. Virus disease of sweet potato in Taiwan[M]//Plant Virus diseases of Horticultural Crops in Tropics and Subtropics. Taiwan. Republic of China:FFTC Book Series, No. 33. Food and Foreign Center for the Asian and Pacific Regions,1986:84-90.
- [8] 丁海兵,宋吉轩,颜谦,等.甘薯脱毒种薯(苗)生产技术[J]. 贵州农业科学,2011,39(5):84-86.
- [9] 张兆干.脱毒甘薯增产机理及应用[J]. 农业科技通讯,2000(1):9.
- [10] 张振臣.河南省甘薯脱毒技术研究现状及展望[J]. 河南农业科学,2009(9):64-67.
- [11] 卢春生,杨立明,郭其茂,等.福建省脱毒甘薯的应用研究[J]. 安徽农业科学,2001,29(5):578-580.
- [12] 冯秋金,张炳铃.不同品种甘薯脱毒苗试验初报[J]. 福建农业科技,2002(5):31-32.
- [13] 夏可容,黄文美,蒋国琴,等.不同高淀粉脱毒甘薯品种产量及品质分析初报[J]. 耕作与栽培,2008(3):28-32.
- [14] 吴立锋,李玉霞.脱毒甘薯高产栽培技术[J]. 河南农业,2012(3):37.
- [15] 赵雨佳,黄振霖,欧建龙,等.高淀粉甘薯茎尖脱毒与组培技术研究[J]. 南方农业,2012,6(4):82-84.
- [16] 孔祥生,张妙霞,郭秀璞,等.甘薯茎尖分生组织培养及快速繁殖技术研究[J]. 河南农业大学学报,1998,32(2):133-137.
- [17] 孟令文.甘薯茎尖脱毒及快繁技术研究[J]. 杂粮作物,2010,30(6):414-415.
- [18] 尚佑芬,杨崇良,辛相启,等.影响甘薯茎尖培养有关因素的研究[J]. 山东农业科学,1995(6):20-23.
- [19] 颜廷进,王庆美,张立明.提高甘薯茎尖分生组织培养诱导率的研究[J]. 山东农业科学,1997(2):18-20.
- [20] 周全卢,王季春,宋朝建.不同甘薯脱毒苗对蔗糖浓度的特异性反应分析[J]. 耕作与栽培,2007(2):3-5.
- [21] 张华,唐君,张允刚.培养基中蔗糖浓度对甘薯茎尖诱导成苗的影响[J]. 安徽农业科学,2000,28(5):564-576.
- [22] 李强.6-BA 对不同基因型甘薯茎尖培养的影响[J]. 杂粮作物,2001,21(5):21-23.
- [23] 唐丽,邹永祥,涂雅珍,等.植物组培脱毒技术在甘薯上的应用研究[J]. 西南农业学报,2008(3):882-884.
- [24] 孟德璇,孙周平.6-BA 和 NAA 对不同甘薯品种茎尖培养的影响[J]. 杂粮作物,2010,30(4):286-287.
- [25] 何凤发,王季春,张启堂,等.甘薯茎尖脱毒与快速繁殖技术研究[J]. 西南农业大学学报,2002,26(4):509-511.
- [26] 单林娜,孙廷,孙天洲,等.豫薯品种茎尖组织培养脱毒技术研究[J]. 河南科技学院学报,2005,33(2):7-10.
- [27] 何新民,蒋菁,唐洲萍,等.甘薯近尖培养与脱毒技术研究[J]. 广西农业科学,2009,40(8):964-967.
- [28] 陈明灿.甘薯组培快繁及优化栽培技术研究[D]. 南京:南京农业大学,2006.
- [29] 黄冰艳,刘新涛,刘文轩,等.培养基有机成分及光照时数对甘薯脱毒苗试管快繁的影响[J]. 华北农学报,1999,14(3):79-81.
- [30] 王守明,朱虎烈,廉美兰,等.换气孔大小和培养瓶种类对甘薯脱毒苗生长的影响[J]. 延边大学学报,2007,29(2):83-86.
- [31] 郑文静,王建忠.甘薯脱毒种苗及种薯的繁育程序[J]. 杂粮作物,2001,21(2):51-52.
- [32] 王裕利,肖利贞.甘薯产业化经营[M]. 北京:金盾出版社,2008:17-94.
- [33] 张振臣,马淮琴,张桂兰.甘薯病毒病研究进展[J]. 河南农业科学,2000(9):19-21.
- [34] 马丽,张春庆,周玉亮.甘薯病毒病检测技术研究进展[J]. 中国农学通报,2005,21(2):88-91.
- [35] ZHANG L,XU H X,QIN B F, et al. Plant Regeneration of Sweet Potato via Somatic Embryogenesis from Different Explants[J]. Agricultural Science & Technology,2012,13(7):1403-1405,1421.