

西藏马铃薯脱毒技术建立及不同世代繁育苗病毒分析

旦增旺姆

(西藏自治区日喀则市农业科学研究所, 西藏 日喀则 857000)

摘 要: 本文通过马铃薯茎尖脱毒技术、脱毒苗繁育技术和脱毒苗雾培繁育技术阐述西藏已建立的马铃薯脱毒技术体系和相关技术方法, 并通过对两个当地马铃薯脱毒品系的病毒检测, 分析不同世代繁育苗病毒积累情况, 并做检测分析, 以期更好的为西藏马铃薯脱毒种薯生产提供技术支持, 进而指导大田生产。

关键词: 马铃薯; 脱毒技术; 繁育苗; 病毒检测;

中图分类号: S532

文献标识码: A

Establishment of Virus-free Technique for Potato in Tibet and Analysis of Virus Propagation and Seedling Raising in Different Generations

Danzengwangmo

(Institute of Agricultural Sciences, Xigaze City, Tibet Xizhang 857000, China)

Abstract: This paper expounds the established potato virus free technology system and related technical methods through potato stem tip virus free technology, virus free seedling breeding technology and virus free seedling fog culture breeding technology in Tibet. Through virus detection of two local potato virus free lines, the accumulation of virus in different generations of propagation and seedling raising was analyzed, in order to better provide technical support for the production of virus free seed potato in Tibet and then guide the field production.

Key words: Potato; Virus-free technology; Breeding seedling; Virus detection

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是无性繁殖作物, 属于茄科茄属一年生草本植物, 块茎可供食用, 全世界马铃薯栽培种植面积仅位于玉米、小麦、水稻之后, 是世界上第四大粮食作物, 也是我国重要的经济作物之一^[1-2]。西藏马铃薯栽培历史悠久, 其种植分布广, 在海拔 1000 ~ 4600 m 都有种植, 主要分布在拉萨、日喀则、林芝、山南地区, 其种植面积仅次于青稞, 在西藏农业生产上占有重要的地位。西藏日喀则地区是西藏的马铃薯主产区^[3], 种植面积从 20 世纪 90 年代初的 60 hm² 扩大到 2017 年的 7200 hm², 占西藏马铃薯总种植面积的 45 %。马铃薯在生产过程中, 易受多种病毒的侵染。在生产上常见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) 以及马铃薯卷叶病

毒 (PLRV) 等, 如果用带病毒块茎作种薯, 病毒在块茎中积累, 最后使种薯丧失种用价值而大幅度减产。而马铃薯脱毒可恢复其原来的生长发育特性。自 2003 年以来, 西藏开展脱毒马铃薯研究和应用, 但至今西藏马铃薯脱毒技术体系不完善, 本文基于西藏日喀则农科所的多年研究, 拟就该技术体系作一详尽叙述, 同时对不同世代繁育苗病毒积累情况做一简要检测分析, 以期更好的为西藏马铃薯脱毒种薯生产提供技术支持, 进而指导大田生产。

1 材料与方法

1.1 茎尖脱毒技术建立

本试验选用脱毒马铃薯 0901 和 0902 脱毒苗 (备注: 0901、0902 均为脱毒之后进行大田生产再选单株进行茎尖剥离获得组培苗) 用血清学中最常用的酶联免疫法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 进行病毒检测, 通过研究脱毒马铃薯再次感染病毒的机理, 研究不同品种脱毒马铃薯的再

收稿日期: 2019 - 10 - 12

作者简介: 旦增旺姆 (1988 -), 女, 助理研究员, 主要从事马铃薯脱毒、组培技术研究及栽培推广, E-mail: danzengwangmu1988@163.com。

次侵染病毒环节和过程并找出相对的防治措施使之不再侵染。

本试验以西藏日喀则市自治区薯类脱毒中心提供的脱毒马铃薯新品种 0901 和 0902 为试验材料。试验仪器:培养皿、高压灭菌锅、超净工作台、剪刀、接种针、接种刀、酒精灯、75 % 酒精、95 % 酒精、基质床、雾培床、烧杯、吸水纸、记号笔、封口袋、量筒、可调移液枪:1000, 10 ~ 200, 100 μ l; 枪头 (Tip 枪头)、冰箱。

挑选大田生产的脱毒马铃薯 0901、0902 的单株进行茎尖剥离,培养成组培苗。

将种薯芽萌发至 2 ~ 3 cm 时,选取粗壮的芽进行消毒(芽在自来水中冲洗 20 min 去掉泥沙,再用 75 % 酒精泡 30s 去表面张力,用无菌水冲洗 1 次,再用 0.1 % HgCl 泡 15 min,再用无菌水冲洗 3 次)。之后茎尖在超净工作台在解剖镜下用解剖针剥去带一个叶原基的茎尖,将生长点迅速接种在加生长素的 MS 培养基中进行茎尖培养。MS 培养基配方如下。茎尖培养基配制:MS(蔗糖 30 g/L) + NAA(0.02 mg/L) + 6BA(0.5 mg/L)。

1.2 脱毒苗繁育技术建立

1.2.1 组培苗的扩繁技术建立 将茎尖发育成 3 至 4 叶片的小植株时可进行扩繁。挑选无污染、较健壮的组培苗在超净工作台上按单茎切段,每个茎节带一片小叶接种在普通 MS 培养基中,用接种针将每个茎段的下部埋入培养基中。一个培养皿定植 10 ~ 13 根,一共切繁 60 合格无污染瓶(每个代号分别 30 瓶)。组培苗培养条件:温度 20 ~ 25 $^{\circ}$ C,光照强度 2000 ~ 3000 lx,光照时间 16 h/d。培养 15 ~ 20 d,苗长出 5 叶、5 cm 以上即可移栽至温室。

1.2.2 脱毒苗基质繁育技术建立 基质栽苗:基质床苗 底层铺羊粪或草炭,其上铺蛭石与有机肥混合基质。将每个代号组培苗各 20 瓶共 40 瓶拿到基质以 10 cm \times 10 cm 的株行距进行栽培。

试管苗在基质移栽前 2 ~ 3 d 对其的驯化,将其温度和光照逐渐适应室外条件。然后在已消毒完好的基质温室里进行移栽(幼苗按 5 cm \times 8 cm 的株行距,2 cm 的深度将把幼苗根部轻埋在基质里稍作压实。),控制好温室温湿度(湿度控制:移栽初期搭建小拱棚,将把幼苗生长湿度保持在 80 % ~ 90 % 左右,白天每 5 h 进行通风换气一次,约 21 d 后扯掉小拱棚,将室内湿度控制在 60 % 左右,幼苗避免阳光直射。温度控制:幼苗移栽之后将温室内白天温度控制在 23 ~ 26 $^{\circ}$ C,夜间不低于 10 ~ 15 $^{\circ}$ C,另外室外太阳光强时温室需要遮阳,避免室内温度过高出现

烧苗现象。)。另外,在基质苗生长期间提供足够的肥料条件和防治病虫害。

1.2.3 脱毒苗雾培栽培技术建立 雾培栽培:将马铃薯根系在黑暗和无土的条件下,通过借助机械电子设备将营养液定时定量的喷雾,并提供植株所需要的水分和养分。

由于西藏特殊的气候条件,将试管苗在基质栽培 30 ~ 45 d 左右后可以假植到雾培,移栽苗在假植前 2 ~ 3 d 停止浇水,以免植株清脆,起苗时容易折断伤苗。移栽苗假植可以通过整株移栽和茎切扦插两种方式进行移栽,在雾培移栽苗期最适温度白天 20 ~ 28 $^{\circ}$ C,晚上 10 ~ 17 $^{\circ}$ C,温度不能低于 10 $^{\circ}$ C,室内最适湿度要控制在 60 % ~ 80 % 左右。本试验选用整株移栽方式进行假植,每个代号各 100 株共 200 株。

1.3 病毒检测技术建立及不同时代脱毒苗病毒分析

病毒检测技术建立。而马铃薯病毒检测技术有生物试验方法、血清学方法和核酸分子检测技术这三大类^[4]。本研究采用酶联免疫吸附法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 检测不同品种马铃薯的病毒,而酶联免疫法具有特异性强、灵敏度高、操作简便、易于观察等优点,非常适合于大规模检测,是目前最常用的血清学方法之一,该方法普遍应用于病毒检测、病毒血清学关系测定和定量分析等^[5]。在生产上检测马铃薯病毒的方法主要有双抗体夹心酶联免疫吸附法 (double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay, DAS-ELISA), 三抗体夹心酶联免疫吸附法 (Triple Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay, TAS-ELISA) 和硝酸纤维素膜 - 酶联免疫吸附法 (Nitrocellulose Membrane Enzyme Linked Immunosorbent Assay, NCM-ELISA)^[6]。而双抗体夹心酶联免疫吸附法 (DAS-ELISA) 是一种传统的植物检测技术,在马铃薯病毒检测中有其独到的应用^[7]。为了加快反应速度,节省时间,白艳菊等^[8]在常规 DAS-ELISA 方法基础上做了两方面的改进:第一,由常规 ELISA 在一块板上一种酶标记一种抗体改为同块板上几种酶对应标记几种抗体(以 PVX、PVY、PVS、PVM、PLRV 为例);第二,DAS-ELISA 各种反应均在恒温摇床中进行,实现了快速同时检测多种马铃薯病毒。宋吉轩^[9]分别用改进 DAS-ELISA 法和常规 DAS-ELISA 法对马铃薯 4 种主要病毒 PVX、PVY、PVS、PLRV 进行检测,其检测结果完全一致,切灵敏也基本相同。

本试验采用改进 DAS-ELISA 法快速检测 4 种

PVX、PVY、PVS、PLRV 主要病毒。每个处理设 3 个水平,1 个水平 3 次重复。2 个品种代号 0901 和 0902,分别设组培苗 a、基质苗 b、雾培苗 c 3 个繁殖世代水平,每个水平的病毒检测苗子按抽样方式进行 3 次重复。双抗体夹心酶联免疫法(DAS-ELISA)检测马铃薯 PVX、PVY、PVS、PLRV 四种病毒的方法如下:①配制缓冲液和冲洗液。配制 T wash buffer 冲洗缓冲液:用 50 g PBST + 950 mL 无菌水或一包 PBS-Tween (50 mL) + 950 mL 无菌水定容到 1000 mL。配制 EXTRACT buffer 提取缓冲液 GEB:①称取 16.5 g buffer powder 用无菌水溶解,定容到 500 mL。在 GEB 缓冲液里加 10 mL Tween-20,混匀。②每样材料称取 0.15 g,加 1.5 mL 提取缓冲液,研磨。③点样 每孔加入 100 μl 样品提取液,一个样品 3 次重复,留 6 孔(3 个阳性 3 个空白,空白加缓冲液)。4 ℃ 冰箱过夜。④洗板 样品倒出去,用冲洗缓冲液每孔加 200 μl 冲洗 7 次,3 min/次。⑤配制结合酶标抗体溶液(现配现用)。点样 取 100 μl 结合抗体,每孔加 100 μl,装湿盒,室温 2 h。⑥洗板 样品倒出去,用冲洗缓冲液每孔加 200 μl 冲洗 8 次,3 min/次。⑦配制底物溶液(现配现用,避光保存)。点样 每孔加 100 μl 底物溶液,装湿盒,室温 1 h。⑧显色。

2 结果与分析

从表 1 可以看出,脱毒马铃薯 0901 在网室不同世代繁育后再次发现了病毒,且病毒种类和感染程度均不一样。在组培苗扩繁中发现了 PVS 病毒,在基质和雾化栽培种中分别发现了 PVS、PVY 病毒,并且强度较强。说明在脱毒苗继代培养过程中,组培苗扩繁由于操作不当、或环境因素,也会再次感染病毒;在脱毒种薯繁育过程中,不注意病虫害防治,

表 1 马铃薯 0901 品种不同世代繁育苗病毒分析

代号/病毒名称	PVX	PVY	PVS	PLRV
0901a1	-	-	+	-
0901a2	-	-	+	-
0901a3	-	-	+	-
0901b1	-	-	++	-
0901b2	-	-	++	-
0901b3	-	-	++	-
0901c1	-	++	++	-
0901c2	-	++	++	-
0901c3	-	++	++	-

注: a,b,c 分别为组培苗、基质苗、雾培苗。“-”为阴性,“+”为阳性,“++”为强阳性。

表 2 马铃薯 0902 品种不同世代繁育苗病毒分析

代号/病毒名称	PVX	PVY	PVS	PLRV
0902a1	-	-	-	-
0902a2	-	-	-	-
0902a3	-	-	-	-
0902b1	-	-	-	-
0902b2	-	-	-	-
0902b3	-	-	-	-
0902c1	-	-	-	-
0902c2	-	-	-	-
0902c3	-	-	-	-

注: a,b,c 分别为组培苗、基质苗、雾培苗。“-”为阴性,“+”为阳性,“++”为强阳性。

也会再次感染病毒,雾培法生产原原种,由于脱毒苗浸泡在水里,再次感染病毒几率更大。

从表 2 可以看出,马铃薯 0902 在脱完毒之后脱毒苗在各个生产环节没有发现病毒。

通过对不同品种不同世代繁育苗病毒检测结果可以看出,由于不同品种抗病强度不同,脱毒试管苗和种薯生产过程中再次感染病毒的程度也不同。马铃薯 0902 品种的抗病性强于马铃薯 0901。这也为品种抗病性评价提供了另一参考方面。

3 结 语

马铃薯在脱毒完成后进行种植时还会再次感染病毒,不同品种在不同世代繁育时由于品种特性不同,各繁育环节会表现出不同的病毒积累特征和田间表现。如通过组培苗扩繁操作不到位、基质雾培生产过程中隔离不到位、基质槽和雾培槽消毒不干净等因素也可能会再次侵染病毒。大田生产过程中通过土传病害或者蚜虫和空气传播方式也会再次感染病毒;不同品种的马铃薯由于抗病强度不同,在每个环节侵染病毒种类及侵染的深度也不一样。因此,在脱毒马铃薯生产过程中必须选用比较健康、抗病性强的植株进行茎尖脱毒,这在种薯生产体系中尤为关键;脱毒马铃薯在生产过程中也要注意病毒检测,可以随机选取植株进行检测,生产中每年病毒检测不少于 3 次,这样可以确保生产中脱毒马铃薯种薯田脱毒检测和监测到位,提高种薯质量。

参考文献:

[1] Spooner D M. Species delimitations in plants: lessons learned from potato taxonomy by a practicing taxonomist[J]. Journal of Systematics & Evolution, 2016, 54(3):191-203.
[2] 叶玉珍. 不同马铃薯种质资源的遗传多样性分析[J]. 南方农业学报,2017,48(11):1930-1936.
[3] 西藏自治区人民政府. 西藏年鉴[M]. 拉萨:西藏人民出版社,

- 2014;102 – 103.
- [4] 魏广彪. 马铃薯卷叶病毒的分子鉴定与检测技术【D】. 福州:福建农林大学,2005.
- [5] 谷宇. 马铃薯病毒与类病毒检测芯片的制备及应用[D]. 南京:东南大学,2004.
- [6] 吕典秋, 李学湛, 吕文河, 等. NCM-ELISA 检测马铃薯 Y 病毒 (PVY) 技术的研究及应用[J]. 中国马铃薯, 2006, 20(6): 339 – 340.
- [7] 李广存, 王秀丽, 杨元军, 等. 马铃薯病毒检测中 DAS-ELISA 的改进及注意事项[J]. 中国马铃薯, 2001, 15(5): 305 – 307.
- [8] 白艳菊, 李学湛, 吕典秋, 等. 应用 DAS-ELISA 法同时检测多种马铃薯病毒[J]. 中国马铃薯, 2000, 14(3): 143 – 144.
- [9] 宋吉轩, 范士杰, 董颖苹, 等. 应用改进的 DAS-ELISA 法快速检测马铃薯病毒[J]. 贵州农业科学, 2006, 34(5): 69 – 70.