

高效甘薯脱毒苗生产及驯化移栽

王鹏, 纪瑞瑞, 孔祥远, 隋炯明, 乔利仙, 郭宝太, 孙世孟, 王晶珊*

青岛农业大学生命科学学院, 山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东青岛266109

摘要: 选用目前主要推广的甘薯品种‘烟薯25’、‘商薯19’和‘徐薯22’为材料, 研究了甘薯脱毒快速繁殖及驯化移栽。结果表明, 秋天刚收获的薯块在36 °C条件下催芽, 10~15 d后芽苗可长到10 cm以上; 剥取带有1~2个叶原基的茎尖进行培养, 3个供试品种植株再生率均达到90%以上; 脱毒试管苗炼苗2~3 d后直接栽植于塑料大棚, 移栽成活率达95%以上; 移栽5~6周后茎蔓可长到30~40 cm以上, 即可剪切茎蔓扦插进行再繁殖。

关键词: 甘薯; 热处理; 茎尖培养; 脱毒苗; 驯化移栽

Production, Acclimatization and Transplantation of Virus-Free Plantlets of Sweet Potato

WANG Peng, JI Rui-Rui, KONG Xiang-Yuan, SUI Jiong-Ming, QIAO Li-Xian, GUO Bao-Tai, SUN Shi-Meng, WANG Jing-Shan*

College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Key Laboratory of Plant Biotechnology in Universities of Shandong, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: The method on production, acclimatization and transplantation of virus-free plantlets was studied by using cultivars ‘Yanshu 25’, ‘Shangshu 19’ and ‘Xushu 22’ of sweet potato (*Ipomoea batatas*). The results indicated that the seedlings could grow more than 10 cm after a germination acceleration at 36 °C for 10–15 d. Then, stem tips with 1–2 leaf primordia were excised and cultured on the induction medium, the plantlet regeneration rates were above 90% in the three cultivars. The virus-free plantlets in tubes were acclimated for 2–3 d and subsequently transferred to soil in plastic greenhouse, and the transplanting survival rates of the three cultivars were over 95%. After having been transplanted for 5–6 weeks, the lateral branches reached 30–40 cm in length, and they can be used for propagation in plastic greenhouse.

Key words: sweet potato; heat treatment; stem tip culture; virus-free plantlet; acclimatization and transplantation

甘薯是我国重要的粮食、饲料和工业原料作物, 由于甘薯营养丰富, 近年来越来越受到人们的青睐(李强等2004, 2008; 李爱贤等2009)。甘薯属于块根作物, 生产过程中利用营养体进行繁殖, 因此容易受到病毒的侵染, 并且随着育成品种栽培年限的延长, 病毒密度越来越高。病毒的侵染导致产量下降, 品质变劣(杜希华等1999), 甚至失去商品价值(王丰2003; 周志林等2013; 苏文瑾等2013)。病毒在植物体内的分布不均匀, 离分生组织越远病毒密度越高, 反之越低, 而分生组织一般没有病毒(康明辉等2010; 赵心爱和薛庆中2002), 因此可利用茎尖培养生产无毒苗。由于只剥取茎尖分生组织进行培养往往不易成活(王关林等2003), 因此, 一般剥取带有1~2个叶原基的茎尖进行培养(唐丽等2008; 何凤发等2002), 但这又降低了脱毒效果(关崇梅等2004; 何新民等2009; 龚一富

和高峰1998; 卢玲等2013)。如何解决两者的矛盾, 既提高再生率又提高脱毒率成为研究的热点。余成章等(2002)采用热空气处理与茎尖培养相结合的方法, 依据病毒对高温敏感, 寄主耐高温, 选择适当的温度和处理时间进行高温处理, 能使寄主体内病毒浓度降低, 传递速度减慢或失去活性, 而寄主细胞仍然存活并加快分裂和生长, 取热处理后的茎尖进行培养, 植株再生率高并且脱毒效果好。

本文研究了热空气处理与茎尖培养相结合生产甘薯脱毒苗及其高效驯化移栽的方法, 旨在为甘薯脱毒苗在生产上的广泛应用提供依据。

收稿 2015-02-04 修定 2015-03-23

资助 山东省薯类产业创新团队遗传育种岗位(SDAIT-10-011-03)。

* 通讯作者(E-mail: jswang319@126.com; Tel: 15963291167)。

材料与方法

1 植物材料

选取当前主要推广甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 品种‘烟薯25’、‘商薯19’和‘徐薯22号’为试验材料。

2 培养方法

2.1 催芽

秋天甘薯收获后, 选用无虫蛀、无损伤的薯块, 在太阳底下暴晒2~3 d, 用清水洗净, 放入沙子上, 薯块上覆盖1~2 cm 的沙, 放入36 °C 培养箱中催芽。出芽前黑暗培养, 出芽后13 h·d⁻¹ 光照, 光照强度12.5~25 μmol·m⁻²·s⁻¹。根据沙子的湿度适量喷水。

2.2 茎尖剥取与培养

当芽苗长至10 cm 以上时, 取顶端1~2 cm, 剪去肉眼可见的叶片, 先用清水冲洗, 然后在超净工作台内用70%酒精浸泡10~20 s, 再用0.1%的升汞溶液浸泡5~7 min 进行表面消毒, 最后用无菌水漂洗3~5遍。

在体视解剖镜下剥取带有1~2个叶原基的茎尖, 接种到添加0.2 mg·L⁻¹ NAA和2.0 mg·L⁻¹ BAP的MS培养基上进行培养, 诱导不定芽形成。

当不定芽长到2 cm 以上时, 从基部切下, 转移到不添加生长调节剂的MS培养基上培养, 使其长成完整植株。

ELISA病毒检测试剂盒购自美国Rapidbio (RB) 公司, 检测方法参照试剂盒说明书。以经病毒检测脱除病毒的无毒苗1~2个叶节为一个切段, 扦插入新的MS培养基中, 以扩大繁殖。培养温度为25~27 °C,

13 h·d⁻¹ 光照, 光照强度25~37.5 μmol·m⁻²·s⁻¹。

2.3 脱毒试管苗的驯化和移栽

继代培养1个月的试管苗, 逐渐打开瓶口驯化2~3 d, 直至最后瓶口打开一半。洗去附着在根部的培养基, 分单株直接栽植于塑料大棚的土壤中, 株间距20~25 cm, 在清洗和移栽过程尽量不伤到根。在塑料大棚两头加防虫网, 预防昆虫进入塑料大棚传播病毒而导致脱毒苗再次感染病毒。

脱毒试管苗栽植后, 大水浇透, 以提供小苗需要的水分, 保持塑料大棚中的空气湿度。移栽后的2周, 10:00~15:00 搭遮荫网, 防止太阳直晒; 2周后撤掉遮荫网, 中午放风, 根据土壤墒情浇水; 移栽3周后撒施尿素随即浇水, 促进幼苗生长, 施肥量按6~7.5 g·m⁻²。

实验结果

1 催芽

甘薯薯块在36 °C 培养箱中催芽8~12 d 后开始出芽, 薯苗生长较快, 节间长, 10~15 d 后有的芽苗长已达到10 cm, 即可剥取茎尖。不同品种的出芽时间不同, ‘徐薯22’ 出芽早于‘烟薯25’和‘商薯19’。

2 茎尖培养及植株再生

在体视解剖镜下剥取茎尖发现, 茎尖叶原基节间较长, 茎尖很容易剥取。将带有1~2个叶原基的茎尖接种到添加0.2 mg·L⁻¹ NAA和2.0 mg·L⁻¹ BAP的MS培养基上, 培养1周后开始形成愈伤组织, 4周后开始在愈伤组织上形成不定芽(图1-A), 3个品种茎尖的不定芽形成率均高于90% (表1)。

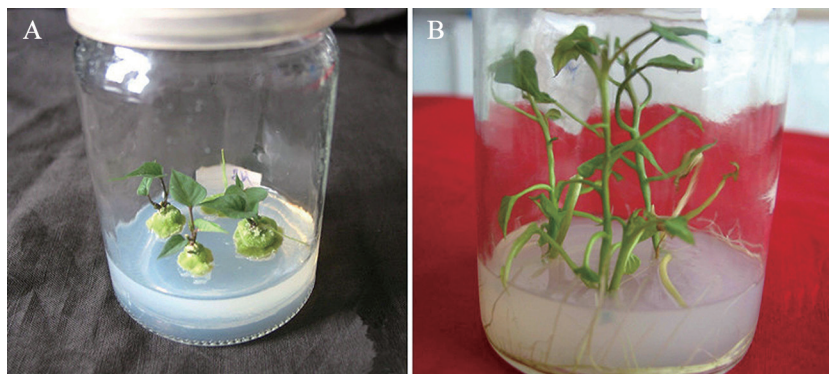


图1 ‘徐薯22’茎尖培养的不定芽分化及植株再生

Fig.1 Adventitious bud formation and plant regeneration in stem apex culture of ‘Xushu 22’

A: 在添加0.2 mg·L⁻¹ NAA和2.0 mg·L⁻¹ BAP的诱导培养基上由愈伤组织形成的不定芽; B: 在MS培养基上由腋芽长成的完整植株。

表1 不同甘薯品种茎尖培养不定芽形成率

Table 1 Adventitious bud formation rates in stem apex culture of different sweet potato cultivars

品种	接种外植体数/个	形成不定芽外植体数/个	不定芽形成率/%
‘徐薯22’	102	97	95.1
‘烟薯25’	53	48	90.6
‘商薯19’	50	48	96.0

在添加 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA和 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP的培养基上培养7周后,当再生小苗长至2 cm以上时,从基部切下,转移至不添加生长调节物质的MS培养基上长成完整植株。

3 脱毒苗的病毒检测及快速繁殖

检测甘薯2种主要病毒——甘薯羽状斑驳病毒和甘薯潜隐病毒的结果表明,3个供试品种脱毒率均达到100%。

脱毒苗采用茎蔓切段方法进行快速繁殖,在

MS培养基上培养1个月后,由腋芽萌发并长成完整植株(图1-B),这样,可在培养瓶内大量繁殖脱毒苗。

4 脱毒试管苗的驯化和移栽

将脱毒试管苗直接移栽于塑料大棚中(图2-A),小苗几乎没有缓苗期;移栽9 d后,小苗叶片已伸展,并已长出新的叶片(图2-B);移栽3周后,主蔓已开始伸长,并且有的植株长出了侧蔓(图2-C);移栽5~6周后茎蔓已长到30~40 cm(图2-D)。3个品种的成活率均在95%以上(表2)。

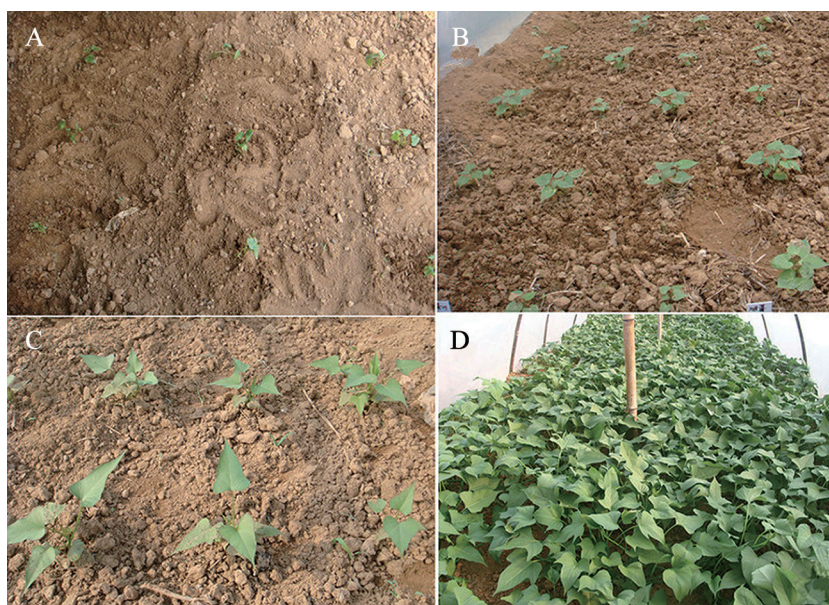


图2 ‘徐薯22’脱毒苗移栽于塑料大棚及其生长状况

Fig.2 Transplantation and growth of virus-free plants of ‘Xushu 22’ in plastic greenhouse

A: 刚移栽; B: 移栽9 d; C: 移栽3周; D: 移栽6周。

表2 不同甘薯品种脱毒苗移栽成活率

Table 2 Transplanting survival rates of virus-free plants of different sweet potato cultivars

品种	移栽苗数/个	成活苗数/个	成活率/%
‘徐薯22’	240	231	96.3
‘烟薯25’	226	220	97.3
‘商薯19’	222	213	96.0

讨 论

脱毒苗的生产可明显提高甘薯的产量和商品率(张立明等2005),利用甘薯茎尖培养生产脱毒苗已有报道,但以往的研究多在大田或温室栽培的甘薯茎蔓上取材料剥取茎尖(刘永康等2013;周志林等2011;Wang等1995,1998);也有的报道取无菌

试管苗的茎尖为脱毒培养材料(肖关丽等2012); 王林生和马晓玉(2005)用薯块催芽剥取薯苗茎尖进行培养, 但一般是在正常温度条件下催芽, 茎尖再生植株率和脱毒率均较低(唐君2004)。本文采用热处理与茎尖培养相结合, 3个品种的植株再生率均达90%以上, 脱毒率达100%。

驯化移栽是脱毒试管苗成功用于生产实践的关键之一(蒋明权2004; 唐丽等2008), 一般选用草炭土、蛭石、珍珠岩等作为移栽基质(方香子2007; 吴瑞刚等2013; 肖关丽等2012; 赵建平2009), 在驯化室中进行驯化培养成活后再移栽塑料大棚或温室, 需经过2次移栽, 操作繁琐, 试管苗驯化培养需空间大, 耗费大量人力、物力、财力。而本研究将脱毒试管苗直接移栽于塑料大棚中, 减少了操作程序, 不需要经过驯化室驯化的过程, 降低脱毒苗的生产成本。因为土壤中的微生物处于平衡状态, 有益菌能抑制有害菌的繁衍(何铁柱等2009), 3个品种的移栽成活率均达95%以上。另外, 小苗直接栽植于土壤, 根系伸展空间大, 根系发达, 根深叶茂, 促使地上部分生长快而健壮。

参考文献

- 杜希华, 张慧娟, 徐庆玉, 王庆成, 牛玉贞, 蔚承祥(1999). 脱病毒对甘薯某些生理特性的影响. 植物生理学通讯, 35 (3): 185~187
- 方香子(2007). 甘薯脱毒苗快繁技术及应用研究[学位论文]. 吉林: 延边大学
- 龚一富, 高峰(1998). 甘薯茎尖脱毒技术及其应用. 江苏农业科学, (3): 28~30
- 关崇梅, 秦静远, 徐志英, 刘玉佩, 张西丽, 龙金娟(2004). 甘薯茎尖分生组织培养与快速繁殖技术研究. 中国农业通报, 20 (4): 33~35
- 何凤发, 王季春, 张启堂, 黄远新, 唐道彬, 崔翠(2002). 甘薯茎尖脱毒与快速繁殖技术研究. 西南农业大学学报, 24 (6): 509~528
- 何铁柱, 何铁锁, 乔艳站, 吕学英, 李玉梅(2009). 用调节土壤微生物平衡的理念诠释温室秸秆反应堆的使用效果. 农业科技通讯, (7): 97~98
- 何新民, 蒋菁, 唐洲萍, 唐家文, 刘颂东, 刘义明(2009). 甘薯茎尖培养与脱毒技术研究. 广西农业科学, 40 (8): 964~968
- 蒋明权(2004). 甘薯茎尖脱毒、快繁技术及其脱毒苗增产机理的研究[学位论文]. 合肥: 安徽农业大学
- 康明辉, 刘德畅, 海燕, 崔海玲, 卢海玲(2010). 甘薯脱毒技术的原理及方法. 种业导刊, (1): 14~15
- 李爱贤, 刘庆昌, 王庆美, 张海燕, 侯夫云(2009). 我国甘薯育种研究现状及展望. 山东农业科学, (1): 38~42
- 李强, 李鹏, 刘庆昌, 马代夫, 李秀英, 王欣, 曹清河, 翟红(2008). 东亚甘薯品种AFLP标记遗传差异研究. 分子植物育种, 6 (5): 905~911
- 李强, 刘庆昌, 马代(2004). 甘薯原生质体培养研究进展. 杂粮学报, 24 (5): 271~274
- 刘永康, 徐艳霞, 张会丽, 邓如海(2013). 甘薯茎尖脱毒及高产栽培技术研究. 农业科技通讯, (3): 187~189
- 卢玲, 聂明建, 王学华(2013). 甘薯脱毒苗培育的研究进展. 安徽农业科学, 41 (4): 1456~1458
- 苏文瑾, 周争明, 黄平, 宋晶, 雷剑, 王连军, 柴莎莎, 熊本江, 杨新笋(2013). 甘薯济黑1号茎尖脱毒与快繁技术研究. 湖北农业科学, 52 (23): 5887~5897
- 唐君, 赵冬兰, 刘亚菊(2004). 外植体对甘薯茎尖培养与植株再生的影响. 中国农学通报, 20 (4): 121~122, 131
- 唐丽, 邹永祥, 涂雅珍, 肖瑛, 赵阳礼(2008). 植物组培脱毒技术在甘薯上的应用研究. 西南农业学报, 21 (3): 882~884
- 王丰(2003). 甘薯病毒病脱毒技术及检测. 植物检疫, 17 (5): 295~298
- 王关林, 方宏筠, 李洪艳(2003). 甘薯体细胞胚状体及其在脱毒、扩繁中的应用. 作物学报, 29 (3): 345~348
- 王林生, 马晓玉(2005). 甘薯脱毒技术的研究与应用. 种子, 24 (10): 51~53
- 吴瑞刚, 杨洪强, 沙广利, 杨萍萍, 毕润霞(2013). 苹果砧木‘青砧一号’离体高效再生体系的建立. 植物生理学报, 49 (10): 1053~1056
- 肖关丽, 王贵淇, 郭华春(2012). 甘薯脱毒苗驯化培养及大田光合效率研究. 西南农业学报, 25 (2): 416~419
- 余成章, 黄青峰, 黄瑞方(2002). 自然光温下甘薯试管苗的脱毒与快繁. 植物生理学通讯, 38 (2): 143~146
- 张立明, 王庆美, 马代夫, 王毅(2005). 甘薯主要病毒病及脱毒对块根产量和品质的影响. 西北植物学报, 25 (2): 316~320
- 赵建平, 蒋小曼, 柏新富, 张萍, 勇金萍(2009). 影响芋茎尖培养中脱毒和快速繁殖的几个生理因素. 植物生理学通讯, 45 (2): 133~136
- 赵心爱, 薛庆中(2002). 检测大蒜病毒和产生脱毒蒜的方法. 植物生理学通讯, 38 (6): 603~606
- 周志林, 唐君, 曹清河, 赵冬兰(2011). 若干甘薯优良品种脱毒培养研究初报. 江西农业学报, 23 (10): 34~35
- 周志林, 唐君, 曹清河, 赵冬兰, 张安, 项彩云, 孙书军, 李昂, 李元元(2013). 菜用甘薯新品种‘徐菜薯1号’的提纯复壮及茎尖产量分析. 西南农业学报, 26 (5): 1779~1782
- Wang JS, Sato M, Taura S, Kokubu T (1998). Efficient embryogenic callus formation and plant regeneration in shoot tip cultures of sweet potato. Mem Fac Agr, Kagoshima Univ, 34: 61~64
- Wang JS, Taura S, Sato M, Kokubu T (1995). Efficient embryogenic callus formation and plant regeneration in shoot tip cultures of sweet potato cultivars, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Proceedings of the 1st Chinese-Japanese Symposium on Sweetpotato and Potato, 361~364