

# 马铃薯大西洋品种的茎尖组织培养技术

周云<sup>1,2</sup> 孙海宏<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>青海省农林科学院生物所,青海西宁 810016; <sup>2</sup>教育部青藏高原生物技术重点实验室)

**摘要** 马铃薯品种大西洋是国内外广泛种植的品种,青海省在大西洋品种的组织培养中试管苗出现了生长势减弱、茎叶嫩黄、繁殖系数减小退化等问题,通过对其茎尖剥离、病毒检测及组织培养管理技术总结,为解决生产中的实际问题、生产优质的脱毒组培苗提供参考依据。

**关键词** 马铃薯;茎尖剥离;组织培养

**中图分类号** S532.043 **文献标识码** B **文章编号** 1007-5739(2008)13-0049-01

马铃薯品种大西洋是目前国内外广泛种植的炸片型、加工型品种,但该品种易感晚疫病,适合在我国北方晚疫病发生较轻的地区种植或繁种。青海省由于气候寒冷、隔离条件好、晚疫病和病毒病发生危害轻等优势已成为马铃薯种薯繁育的理想基地。近年来,随着脱毒技术和组织培养技术的应用,青海种植大西洋种薯的规模在不断扩大,但是在大西洋组培快繁过程中,随着继代次数的增加、继代时间的延长和外源生长延缓剂在植物体内的累积,其试管苗也发生了严重退化,表现为苗的生长势减弱、茎叶嫩黄、繁殖系数减小,影响移栽成活率和降低微型薯的生产潜力,甚至产生变异苗,因此每过一段时间就要对其进行茎尖剥离,以达到脱毒复壮及保证脱毒种薯质量的目的。本文对马铃薯大西洋品种的脱毒及组培管理技术进行总结,以期生产优质脱毒苗,保证种薯源头质量提供参考依据。

## 1 茎尖剥离

### 1.1 材料的选择和处理

在大田选择生长健壮、没有病虫害且大西洋品种特性表现典型的植株,小心挖出其薯块后进行常规窖藏;待薯块通过自然休眠期后置于网袋中,在室内进行自然光催芽或用5~8mg/kg的赤霉素浸种0.5~1.0h进行催芽处理;待芽长到4~5cm未充分展开叶时,将芽从薯块取下,剥去外面多层的叶片并将底部剪去2cm左右后进行消毒处理。

### 1.2 外植体消毒及茎尖剥离

剪取的芽用纱布包好放入烧杯中,用自来水流水冲洗20~30min去除表面杂质,在无菌条件下先用无水乙醇浸润3s左右去除表面张力,放入盛有0.1%升汞的无菌培养瓶中灭菌6~8min,期间轻轻晃动培养瓶使灭菌完全,然后用无菌水冲洗4次。解剖镜下在灭过菌的培养皿中进行茎尖剥离,小心剥取带1~2个叶原基的茎尖0.1~0.3mm,迅速接种到分化培养基中,防止茎尖风干死亡。剥离用的手术刀和剥针高温消毒后放置一段时间待其完全冷却后进行茎尖剥离,防止茎尖生长点细胞被烫死。

### 1.3 茎尖的培养

剥离的茎尖迅速接种到预先配制的MS+Kinetin 0.4mg/L+IAA 0.5mg/L+GA<sub>3</sub> 0.1mg/L,并附加3%蔗糖、0.6%琼脂、pH值5.8的培养基中,每个培养瓶放置1个茎尖,编号

后置入培养箱中进行培养,培养温度为25℃,光照强度约2500Lx,每日照射16h。40~60d后即可看到试管中明显伸长的小茎,叶原基形成可见的小叶,此时可将小苗转到无生长调节剂的培养基中,小苗继续生长并形成根系。当试管苗长有5~6片叶时,将其按单节切段进行继代繁殖,每3周继代1次。

## 2 病毒检测

待苗子繁殖到3~4瓶时即可用ELISA法或其他方法进行病毒检测,若检测发现有病毒则此编号所有繁殖材料全部淘汰,无病毒的材料继续进行组培快繁。

## 3 组培管理

良好的组培管理是保证及时提供优质组培苗的保证。在组培的过程中一是通过各种预防措施将污染源对培养基的污染降到最低点,对于已经出现的污染要及时处理并根据污染表现分析原因以便于采取相应措施。主要的污染源是细菌和真菌,细菌污染在接种1~2d即可出现,常表现为在培养基或材料表面出现黏液状物体、菌落或浑浊的水迹状,有时甚至出现泡沫发酵状。真菌污染其症状出现慢,一般在接种5~10d时才有所表现。真菌污染在初期如针状的雾斑,以后长出菌丝,继而很快出现黑、白、黄、绿等孢子。二是通过调节环境温度及培养基质的成分以防止组培中出现包括玻璃化苗、茎尖枯死苗、多气生根苗及多分枝苗等非正常苗现象。

### 3.1 接种前的准备

组培用的容器清洗晾干,培养基装入高压灭菌锅内灭菌时,待锅内压力升到0.5kg/cm<sup>2</sup>时打开放汽阀将冷空气放尽,否则易造成相对高压低温现象,达不到灭菌的目的。然后再关闭放汽阀使压力稳定在1.1kg/cm<sup>2</sup>,温度在120℃下保持20min灭菌。灭菌后的培养基置于缓冲室内,在常温下放置3~4d剔除被杂菌污染的培养基再接种;缓冲室、无菌接种室及培养室要提前用甲醛熏蒸(将50mL甲醛倒入15g左右高锰酸钾中,使甲醛蒸汽散发出来);工作人员所用衣物器具要保持干净并经常消毒。

### 3.2 接种时的消毒处理

经病毒检测的瓶苗从培养箱取出后仔细观察,确认无污染后用酒精棉(75%乙醇)擦拭瓶子外壁及瓶盖。无菌接种

(下转第51页)

喷、后期少喷”的原则,在第1~3潮菇出土长到黄豆大小时喷1次重水,空气湿度保持在90%~95%,第3潮菇以后轻喷勤喷,减少用水量,保持覆土层松软潮湿,并适当降低菇房的空气湿度。

(2)通风换气。秋菇前期既要加强通风换气降低棚内温度,又要注意保持菇棚内较高的空气相对湿度,使水、气、温都能满足双孢菇的生长,后期减少通风量,提高棚内温度。

(3)挑根补土。及时清除床面上的老根和死菇,整理好床面,第3潮菇后在培养料反面打杆戳洞,排除料内废气,使料内气体得到交换,促其不断出菇。

### 1.8 秋菇后管理

秋菇结束(温度降到5℃以下时),进行反面打杆,剔除老根,整理好床面,适当通风,吹干覆土层表面,并注意保温,菇棚内温度保持在0℃以上。春节以后,气温回升至6℃以上时,用pH值8.0~8.5的石灰清水喷洒发菌水,用量以细土达到潮湿为宜,调节土层酸碱度,使菌丝能正常生长。3月初先用轻水引菇,逐步增加用水量,提高土层湿度,当双孢菇大批出土,用水量与秋菇前期相近。

### 1.9 病虫害防治

预防为主,综合防治,及时认真地清除床面上的病虫、死菇、菇脚及病(虫)源,发生病虫害时,应及时选用无公害药物防治,将损失控制在最小范围。

### 1.10 采收

双孢菇常在出菇后的5~7d采收,气温寒冷时可在现蕾后8~10d采收。秋、春两茬菇共可采收6~8批菇。

## 2 简易大棚双孢菇标准化畦栽技术

### 2.1 简易大棚搭建

选择地势较高、灌溉方便的田地,根据地块的面积,购买大竹竿及铁丝和棚膜(厚0.65mm,宽7~8m),大棚呈龟背形,高约1.8m,宽度和长度依地块而定,每隔60~80cm对扎1根竹竿,扎深地下30cm,一般宽5~6m,栽培利用4~5m,棚膜外用玉米秸秆和麦草遮盖,棚四周挖沟压膜,以利通风。进料前1d用甲醛+敌敌畏混合液喷湿地面,撒一层薄石灰,

(上接第49页)

室在每次接种前,用紫外线灯光照射杀菌30min。超净工作台台面、台壁均用酒精棉擦拭消毒。剪刀及镊子用电子消毒器或酒精灯消毒,冷却后接种,每接1瓶所用工具消毒1次。接种后的瓶苗置于培养室培养,温度为25℃左右,光照强度约2500Lx,每日照射16h。

### 3.3 接种后的管理

接种后根据组培苗的生长情况及时采取应对措施,组培苗在生长过程中经常会出现各种各样非正常苗的情况,不良的环境条件是导致这些情况发生的主要原因,如培养架上部温度过高导致苗子茎尖枯死、培养瓶覆盖物透气性差导致多气生根苗出现、培养室温度过高及继代时间过长导致多分枝苗出现等等,可通过增加培养架高度、严格控制培养室温度及合理控制继代时间等措施解决这些问题。

杀虫消毒后备用。

### 2.2 配方、建堆、翻堆

方法同1.5。

### 2.3 播种

培养料趁热进棚,堆成小垛,封闷大棚两端,促进增温发汗。次日摊料,抖松,使粪草混合均匀,铺成畦形,共三大畦。靠边2畦,中间1畦,畦宽分别为1.0~1.2m、2.0~2.4m、1.0~1.2m,料厚约18cm。将瓶里麦粒菌种搞散勾出,均匀撒在料面上,每平方米约2瓶,轻轻拍平,再覆盖1cm厚的碎培养料。播种后留好通风口,若棚内温度超过30℃,中午需往棚外顶喷水降温,棚两端薄膜随气温高低而上下移动通风降温。

### 2.4 覆土及管理

播种后14~16d,即菌丝深入料中2/3时开始覆土,覆土前检查料面,发现病虫害及时根治后覆土,土料可就地取材,利用走道挖土,按每50kg土加石灰0.3kg标准,拌匀土粒,调节含水量,使土黏成团,抖能开,一次性覆好料面,厚度3~4cm。塑料大棚地面返潮快,一般不需再喷水,只在大棚两端通风处少量喷水保湿,直至出菇。

### 2.5 出菇管理

覆土后18~20d,双孢菇子实体陆续出现,土层菌丝发白,棚内气温降至22℃以下,利用早晚温差刺激,喷水催菇,塑料大棚地面种植双孢菇一般只在头2~3茬时调水,以后就得停水,直至越冬。每次喷水以靠近大棚两端通风处为主,中间少喷,湿处不喷,注意不宜喷水过量而毁坏菌丝。

### 2.6 越冬管理

塑料大棚栽培双孢菇,秋季地面返潮快,棚内湿度大,越冬应以保养菌丝为主,秋菇后期最怕水大,进入12月份后出菇稀少,应及早停水,保持土粒发白,达到安全越冬。来春调水应在3月10~15日,正常水温管理。

### 2.7 采收

当菇帽直径长至2~4cm,一般在4月上旬即可采收,分级后出售。

培养室要经常进行消毒和控制人员进出以防止瓶菌的大面积污染,培养室每隔2~3d用甲醛溶液或百菌清洒地消毒1次,每隔5~7d用甲醛熏蒸,同时结合75%酒精除尘处理(喷雾)。严禁吸烟和非工作人员出入培养室,工作人员入内必须穿清洁工作服并套鞋套,控制外界杂菌传入。及时挑除培养室被污的瓶苗,对染污苗用高压锅灭菌后远距离销毁,坚决消灭再侵染源。

## 4 参考文献

- [1] 郭正昆. 马铃薯茎尖剥离与试管苗培养技术[J]. 农业科技与信息, 2008(9): 5-6.
- [2] 陈智博. 马铃薯茎尖优势及其应用的研究[J]. 高师理科学刊, 2002(3): 66-69.
- [3] 齐恩芳, 王一航, 张武, 等. 马铃薯茎尖脱毒培养方法优化研究[J]. 中国马铃薯, 2007(4): 200-203.
- [4] 郝文胜, 赵秀秀, 赵青辉, 等. 我国马铃薯茎尖培养和脱毒试管苗微繁殖研究进展[J]. 内蒙古农业科技, 2001(S1): 27-33, 75.