

秦薯 5 号甘薯茎尖分生组织培养脱毒及种苗快繁技术研究

秦静远¹, 朱渭兵²

(1. 杨凌职业技术学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 杨凌金薯种业科技有限公司, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 为获得秦薯 5 号甘薯脱毒苗用于规模化种苗生产, 研究了秦薯 5 号茎尖分生组织培养各阶段的培养基, 适宜的茎尖分生组织芽诱导培养基为 MS+6-BA0.5 mg/L+IAA0.2 mg/L+GA₃ 0.05 mg/L+蔗糖 3%, 适宜的试管苗增殖培养基为 MS+6-BA0.1 mg/L+NAA0.05 mg/L+蔗糖 3%+琼脂 0.6%, 1/2MS+NAA0.01 mg/L+蔗糖 2%+琼脂 0.6% 适宜生根培养, 繁殖倍数可达 5.8。试管苗炼苗后移栽至泥炭与珍珠岩 (2:1) 混合基质中, 成活率可达 98% 以上。

关键词: 甘薯; 秦薯 5 号; 茎尖培养脱毒; 快繁

中图分类号: S531 **文献标识码:** A **文章编号:** 0488-5368(2022)03-0008-03

Studies on Virus-free Meristem Culture and Rapid Propagation of Sweet Potato Qinshu 5

QIN Jingyuan¹, ZHU Weibing²

(1. Yangling Vocational and Technical College, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Yangling Jinshu Seed Industry Technology Co., Ltd. Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to obtain virus-free plantlets of sweet potato Qinshu 5 for large-scale seedling production, the culture medium of meristem culture of Qinshu 5 was studied, the suitable medium for meristem shoots induction was MS + 6-BA0.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L + GA₃ 0.05 mg/L + sucrose 3%, the suitable medium for in vitro plantlet multiplication was MS + 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.05 mg/L + sucrose 3% + agar 0.6%, the suitable medium for rooting was 1/2 MS + NAA 0.01 mg/L + sucrose 2% + agar 0.6%, the multiplication multiple was 5.8. The survival rate of plantlets was over 98% when they were transplanted into the mixed media of peat and perlite (2:1).

Key words: Sweet potato; Qinshu 5; Virus-free in meristem culture; Rapid propagation

甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 属于旋花科甘薯属, 是甘薯属的一个栽培种, 在中国种植分布广泛。进入 21 世纪, 中国甘薯种植面积常年在 5×10^6 hm² 左右, 是我国重要的粮食、饲料作物和工业原料^[1]。秦薯 5 号是宝鸡市农业科学研究院与西北农林科技大学联合选育, 为优质鲜食蒸煮和淀粉加工兼用型甘薯品种。薯块干物率 33.08%, 淀粉含量 69.14% (干基), 粗蛋白 1.11% (鲜薯), 可溶性糖 5.03%。秦薯 5 号在陕西省内常年种植面积约 4 万 hm², 约占全省甘薯种植面积的 50%, 为本省甘薯主栽品种^[2]。甘薯属无性繁殖作物, 主要通过块根、茎蔓、秧苗进行繁殖。在生产中, 甘薯

病毒病是影响甘薯产量和品质的主要因素之一。近年来危害重的病害 SPVD 是由甘薯羽状斑驳病毒 (SPFMV) 和甘薯褪绿矮化病毒 (SPCSV) 双重感染和协同互作引起^[3], 显症植株的产量比健康植株减少 79%~86%, 严重影响产量和经济效益, 对甘薯种苗生产和产业发展危害较大。笔者研究利用茎尖分生组织培养技术繁育秦薯 5 号脱去 SPVD 2 种病毒的脱毒种苗, 以提高甘薯产量和品质。

1 材料与amp;方法

收稿日期: 2021-01-07 修回日期: 2021-02-17

基金项目: 陕西省 2021 年重点研发计划项目 (2021NY-078)。

第一作者简介: 秦静远 (1968-), 男, 陕西蒲城人, 副教授, 主要从事植物组织培养技术教学与研究, 甘薯脱毒技术研究。

1.1 供试品种为秦薯5号甘薯

种薯由杨凌金薯种业科技有限公司甘薯种苗繁育基地提供。挑选特性完全符合秦薯5号的块根,清洗干净,浸蘸0.1%的甲基托布津溶液,种植于经高温灭菌的泥炭与珍珠岩(2:1)混合基质中,设置温度为28℃催芽,出芽后设置温度为38℃16h,27℃8h。处理10d后切取2cm长茎稍,剪去叶片,自来水冲洗30min,经75%酒精浸泡10~15s,有效氯浓度为2%NaClO溶液(150mL加1滴洗洁精)浸泡灭菌20min,无菌水冲洗3次后,浸在无菌水中备用。

1.2 茎尖剥离与培养

在超净工作台上,用无菌滤纸吸去材料表面水分,置于体视显微镜下,用镊子固定材料,用解剖针小心剥去顶芽外层幼叶,露出茎尖分生组织,用手术刀尖小心切取0.3~0.5mm含有2~3个叶原基的茎尖接种到芽诱导培养基上。培养基以MS+IAA0.2mg/L+GA₃0.05mg/L+蔗糖3.0%为基础,附加6-BA0.1、0.2、0.5、1.0mg/L,pH5.8。每个培养基分15支试管,每管接1个茎尖。培养基为液体状态,以滤纸桥方式培养,外植体放在滤纸上高出培养基液面约5mm处。

在上述培养基上诱导出的芽分别编号,转接至MS+NAA0.01mg/L+蔗糖3.0%+琼脂0.6%,pH5.8的培养基上培养,待长至5~6片叶后,以1节1段转接入相同培养基中继续培养,进行病毒检测和增殖培养基筛选。

各培养阶段的温度设为23±2℃,光照时间14h/d,光强为2000Lx,光源为LED灯管。

1.3 病毒检测

采用NCM-ELISA方法进行SPFMV和SPCSV2种甘薯病毒检测^[3]。取不同株系试管苗的叶片,研磨后将汁液点于硝酸纤维素膜上,按照试剂盒使用说明书上步骤进行操作,肉眼观察病毒检测结果。若样品是阳性,会在膜上形成鲜明的色斑,阴性则没有颜色反应。

1.4 试管苗增殖培养

试管苗以无菌短枝扦插方式繁殖。在无菌条

件下,试管苗以2节1段接种在增殖培养基上。增殖培养基以MS+NAA0.05mg/L+蔗糖3%+琼脂0.6%,pH5.8为基础,附加6-BA0.05、0.1、0.5、1.0、2.0mg/L,以不加6-BA为对照。每个处理20瓶,每瓶接5个材料。28d后测量叶片数,株高,根数,根长,生根率等生长状态指标。

1.5 壮苗生根培养

以1/2MS+蔗糖2%+琼脂0.6%为基础,附加NAA,浓度分别为0.01、0.05、0.1mg/L,以不加NAA为对照。21d测量根长、根数等生长状态指标。

1.6 试管苗炼苗移栽

把长有5~7片叶,根系发达试管苗的培养瓶移至人工气候室中,打开瓶盖,注入少量自来水,瓶中水面高于培养基1mm左右,光照度5000Lx,温度25℃,湿度85%,2d后湿度调整为70%。4d后洗去试管苗粘附的培养基,将试管苗栽植至泥炭与珍珠岩(2:1)混合基质中。基质使用前,按700g·m⁻³的用量加CaCO₃调节pH,将pH由5调至6左右。

2 结果与分析

2.1 不同生长调节剂对甘薯茎尖分生组织芽诱导的影响

接种后的茎尖分生组织,1d后即有部分外植体发褐死亡,其余的继续培养全部形成愈伤组织,没有出现细菌和真菌污染。50d后部分愈伤组织上长出1芽,均无芽丛形成,另一部分愈伤组织无芽形成。茎尖形成的芽在愈伤组织上生长缓慢,转切下入上述MS+NAA0.01mg/L+蔗糖3.0%+琼脂0.6%培养基上能较快生长。

不同生长调节剂组合对茎尖分生组织芽诱导率影响较大,在6-BA浓度在0.1~0.5mg/L范围时,随着浓度提高,芽诱导率也在提高,当6-BA浓度为1.0mg/L时,外植体形成的愈伤组织会较快增大,而芽诱导率下降。MS+6-BA0.5mg/L+IAA0.2mg/L+GA₃0.05mg/L有利于茎尖分生组织诱导成芽(表1)。

表1 不同生长调节剂组合对甘薯茎尖分生组织芽诱导的影响

6-BA (mg/L)	IAA (mg/L)	GA ₃ (mg/L)	接种数	褐化死亡数	分化芽外 植体数	芽诱导率 /%
0.1	0.2	0.05	15	2	4	30.8
0.2	0.2	0.05	15	2	5	38.5
0.5	0.2	0.05	15	3	8	66.7
1.0	0.2	0.05	15	4	5	45.5

注:芽诱导率=分化芽外植体数/(接种数-褐化死亡数)×100%。

2.2 试管苗病毒检测

采用 NCM—ELISA 方法进行 SPFMV 和 SPCSV 2 种甘薯病毒检测,各株系试管苗 SPFMV,SPCSV 2 种病毒检测结果均为阴性。

2.3 不同生长调节剂组合对试管苗增殖的影响

6-BA 浓度相对较低时促进试管苗生长,随着 6-BA 浓度的提高,在浓度 0.5~2.0 mg/L

时,秦薯 5 号试管苗株高增加缓慢,并在苗基部出现了愈伤组织,在 6-BA 2.0 mg/L 时有玻璃化苗出现。MS+6-BA0.1 mg/L+NAA0.05 mg/L 适合于继代增殖培养(表 2)。在以后的增殖培养中,使用相同培养基,以 2 节 1 段的方式进行无菌短枝扦插,约 30 d 为 1 个周期,增殖系数可达 5.8。

表 2 不同生长调节剂组合对秦薯 5 号试管苗快繁的影响

6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	平均叶片数	平均株高 /cm	平均根数	平均根长 /cm	生根率 /%	生长状况
0	0.05	3.6	4.6	3.0	6.3	100	节间较长,叶色淡绿
0.05	0.05	5.3	6.0	2.3	6.7	100	较健壮,叶色绿
0.1	0.05	6.5	7.3	3.2	8.7	100	健壮,叶色浓绿
0.5	0.05	4.7	4.0	1.7	2.8	70	生长慢,叶色淡绿,下部叶黄化
1.0	0.05	3.3	3.0	0.4	0.8	56	基部有愈伤组织,下部叶黄化
2.0	0.05	1.2	0.6	0	0	0	基部有愈伤组织,下部叶黄化芽有玻璃化

2.4 不同浓度 NAA 对生根的影响

试管苗生根以 NAA0.01 mg/L 为宜,提高 NAA 浓度试管苗生长过快,节间过长,茎叶色淡

绿,试管苗有透明趋势。在 NAA 0.1 mg/L 时,在苗基部出现明显愈伤组织,影响根的生长和生长(表 3)。

表 3 不同 NAA 浓度对秦薯 5 号试管苗生根的影响

NAA (mg · L ⁻¹)	平均生根数	平均根长/cm	苗生长状态
0	0.6	3.3	健壮,苗色深绿,根粗
0.01	2.3	10.7	健壮,苗色深绿,生根早,根较长
0.05	3.7	14.3	节间较长,苗色淡绿,生根早,根较长
0.1	1.3	4.8	节间长,苗色淡绿,苗基部出现愈伤组织

2.5 试管苗炼苗

试管苗炼苗后,洗去粘附的培养基移栽至装有混合基质穴盘中,浇透水后喷施 0.1% 的普力克溶液,保温保湿,试管苗成活率可达 98% 以上。

3 结果与分析

甘薯块根经高温催芽处理后,剥取的秦薯 5 号 0.3~0.5 mm 包含 2~3 个叶原基茎尖组织,在 MS+6-BA0.5 mg/L+IAA0.2 mg/L+GA₃ 0.05 mg/L+蔗糖 3% 液体培养基上具有较高的芽诱导率。剥取的茎尖越小,成活率越低,这与 Q. C. Wang 研究一致^[5]。每个外植体脱分化形成的愈伤组织仅能诱导出 1 芽,没有形成丛生芽,这说明此芽应是外植体原有的茎尖分生组织长大而成,而不是由外植体脱分化形成的愈伤组织经再分化形成的不定芽。

在免疫定位技术的敏感范围内,SPCSV 没有达到甘薯茎尖第 5 叶原基,而 SPFMV 在第 4 叶原基中可以检测到,在更幼嫩的叶原基中不具有维管组织发育的解剖特征^[6]。试验中剥取包含 2~3 个叶原基的茎尖分生组织诱导形成的苗,引起 SPVD 病害的 2 种病毒 SPMMV,SPCSV 检测为阴性,说明这两种病毒没有侵染到茎尖的第 2 至 3 叶原基。但是否会因检测敏感范围的影响,在以后的试管苗扩繁过程中出现病毒再次积累,则需要定期的检测。

在脱毒试管苗增殖培养中,6-BA 浓度在 0.5~2.0 mg/L 时叶黄化现象会升高,这与陆展正在京薯 6 上的研究结果一致^[4]。秦薯 5 号试管苗适宜在 MS+6-BA0.1 mg/L+NAA0.05 mg/L+蔗糖 3%+琼脂 0.6% 培养基上增殖培养,繁殖倍

(下转第 91 页)