

doi:10.16104/j.issn.1673-1891.2022.02.001

# 不同脱毒方法下马铃薯脱毒效果的比较研究

黄 莓,唐雪梅,凌思琦,颜 朗,赖先军\*

(西昌学院攀西特色作物研究与利用四川省重点实验室,四川 西昌 615013)

**摘 要:**为探索马铃薯脱毒的最佳方法,提高马铃薯脱毒效率及脱毒苗成苗率,采用超低温疗法+茎尖剥离技术和热处理法+茎尖剥离技术 2 种脱毒方法进行脱毒效果的比较研究。结果表明:相比于超低温疗法,热处理法处理的马铃薯成苗率和脱毒效率更高,其最佳处理方式为 38 ℃ 温度条件下热处理 6 h 后再进行茎尖剥离;同时,在该处理条件下,进一步探索了缩短脱毒苗培养周期的最适激素配比,并发现 MS 培养基中添加 0.50 mg/L GA3+0.50 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA 激素后茎尖成苗率较高,达到 84.62%。

**关键词:**马铃薯;脱毒;超低温疗法;热处理;激素配比

**中图分类号:**S532 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-1891(2022)02-0001-04

## Comparative Study on Potato Detoxification Effects Under Different Detoxification Methods

HUANG Mei, TANG Xuemei, LING Siqi, YAN Lang, LAI Xianjun\*

(Panxi Crops Research and Utilization Key Laboratory of Sichuan Province,  
Xichang University, Xichang, Sichuan 615013, China)

**Abstract:** In order to explore the best method for potato detoxification and improve the potato detoxification efficiency, this study compared two detoxification methods, namely ultra-low temperature therapy with shoot tip stripping technology and heat treatment with shoot tip stripping technology to find the better detoxification effect. The results showed that compared with the ultra-low temperature treatment, the heat treatment method had the higher seedling rate and detoxification efficiency. In addition, we further explored the optimal hormone ratio to shorten the cultivating period of detoxified seedlings and found that MS medium supplemented with 0.50 mg/L GA3+0.50 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA could have the higher shoot tip seedling rate, which was 84.62%.

**Keywords:** potato; detoxification; ultra-low temperature therapy; heat treatment; hormone formula

### 0 引言

马铃薯是世界第 4 大粮食作物,具有适应性强、产量高、营养成分全和产业链长等特点<sup>[1]</sup>。2015 年,我国农业农村部把马铃薯主粮化工作列入重要议程,至此,马铃薯成为我国继小麦、水稻、玉米之后的第 4 大主粮<sup>[2]</sup>。2017 年我国有超过 20 省的马铃薯年产量超过 100 万 t,产量较多的前 9 个省(自治区、直辖市)年产量都在 300 万 t 以上<sup>[3]</sup>。按照 2.25 t/hm<sup>2</sup>的 annual 用种量计算,我国每年的马铃薯种薯需求总量超过 1 000 万 t,占鲜薯总产量的 15%以

上<sup>[4]</sup>。因此,种薯生产质量是马铃薯产业发展的关键和首要因素。

随着马铃薯栽培面积的不断扩大,各种病害问题日益严重和突出,制约马铃薯产业健康发展。其中,马铃薯病毒是影响种薯质量并造成田间减产的重要原因<sup>[5-6]</sup>。马铃薯一旦被病毒侵染就终身带毒,且病毒能在种薯间代代相传不断积累,造成种性退化和严重减产。我国每年因马铃薯病毒造成的减产达到 30%~50%<sup>[7]</sup>。据统计,侵染马铃薯的病毒多达 40 种,其中国内发现的主要有马铃薯 A 病毒(PVA)、M 病毒(PVM)、S 病毒(PVS)、卷叶病

收稿日期:2022-01-13

基金项目:国家自然科学基金项目(32060720);西昌学院高层次人才引进科研启动项目(50190005)。

作者简介:黄莓(1998—),女,四川广元人,本科生,研究方向:分子生物学。\*通信作者:赖先军(1986—),男,四川成都人,副教授,博士,研究方向:生物信息学。

毒(PLRV)、X 病毒(PVX)、Y 病毒(PVY) 6 种<sup>[8]</sup>。目前,国际通用最有效的防治病毒病的方法是推广种植脱毒种薯,通过茎尖组织培养的方法可脱除马铃薯主要病毒,生产出含病毒量很低的脱毒苗并培育成脱毒种薯。脱毒种薯的推广应用使马铃薯的产量和品质得到保障<sup>[9]</sup>。以茎尖分生组织培养为基础的脱毒种薯生产体系不断发展,目前已有超低温疗法、热处理法、化学方法和电疗法等多种辅助方法。其中,超低温疗法依据超低温对细胞的选择性破坏这一原理,结合组织培养技术从而获得无病毒再生植株<sup>[10-11]</sup>。热处理法又称温治疗法,根据高温使病毒蛋白失活的原理,利用寄主植物与病毒耐高温程度不同,对植株进行不同温度及周期的高温处理<sup>[12]</sup>。化学脱毒方法利用化学药剂处理茎尖后通过茎尖培养获得无毒病株<sup>[13]</sup>。电疗法采用电流处理和苗尖培养使植株脱毒<sup>[14]</sup>。虽然不同脱毒方法在马铃薯茎尖脱毒中都曾有实践报道,但并未有研究将其进行比较优选出最佳脱毒方案。

本研究旨在比较超低温疗法+茎尖剥离技术和热处理法+茎尖剥离技术 2 种脱毒方法,以期获得马铃薯优选脱毒方法并在此基础上探索培养最适激素配比以提高其成苗率和缩短其培养周期,为提高马铃薯脱毒苗生产效率奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与仪器设备

#### 1.1.1 材料与试剂

试验以田间长势良好无病症表现的块茎组织为材料,马铃薯品种为四川凉山地区主栽品种“凉薯 14”。

MS 培养基、植物激素 d-萘乙酸 NAA、6-苄基氨基嘌呤 6-BA、赤霉素 GA3、二甲基亚砷购置于北京索莱宝生物科技有限公司,甘油、乙二醇为国产分析纯。

#### 1.1.2 仪器与设备

JA5003L 型电子天平(上海舜宇)、Finnpipette F2 系列微量单通道移液器(美国赛默飞)、FE28 型 pH 计(梅特勒)、G180DWS 型高压灭菌锅(致微仪器)、SW-CF2D 型超净工作台(北京中兴伟业)、RY-7045 型解剖显微镜(上海韧跃)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 马铃薯茎尖组织低温处理及剥离

将切取成 2~3 mm 大小的马铃薯茎尖放置于 0.3 mol/L 蔗糖溶液中预培养 24 h,转移至 MS+30% 甘油+15% 乙二醇+15% 二甲基亚砷(DMSO)+0.4

mol/L 蔗糖的植物玻璃化溶液 PVS2<sup>[15]</sup> 溶液中,锡箔纸包裹茎尖并在 25 ℃ 下处理 20 min,转移至 1.5 mL 离心管中置于液氮中超低温处理。超低温处理时间分别为 30、60、90 min。处理完成后将离心管放置于 25~40 ℃ 的水浴锅中解冻 1~3 min 直至完全解冻。取出茎尖放入含 1.2 mol/L 蔗糖的 MS 培养基中洗涤 3 次,接种到固体恢复培养基(MS+0.1 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L GA3)上培养。培养条件为黑暗处理 7 d,弱光 1klx 下培养 7 d,正常光照 2klx 下培养至分化出根芽。通过解剖镜进行茎尖剥离后,转移至 MS 培养基中,在 24 ℃ 下,16 h 光照/8 h 黑暗培养直至成苗。

#### 1.2.2 马铃薯茎尖热处理及茎尖剥离

切取 2 cm 茎段消毒,将每 10 个茎段放入一个含有基础培养基的瓶中,接种后置于组培室培养。培养条件为 24 ℃,光照 14 h/黑暗 10 h,光照强度 2.2klx。待生根 7 d 后放入人工智能气候箱中进行温度处理,根据张婧颖<sup>[14]</sup>报道的实验条件,将温度梯度拓展为 36、38、40 ℃,并在各个温度梯度下设置每天热处理时间分别为 4、5、6 h,共 9 个处理组,设置温度处理周期为 30 d。上述 9 个处理组,每组处理 9 瓶。热处理完成后进行茎尖剥离,按 1.2.1 相同条件培养直至成苗。

#### 1.2.3 马铃薯脱毒苗病毒检测及脱毒率计算

采用反转录聚合酶链反应 RT-PCR 方法进行病毒检测。首先通过植物总 RNA 提取试剂盒(天根)提取脱毒苗总 RNA,后通过 RNA PCR Kit 试剂盒(Takara)将 RNA 反转录为互补脱氧核糖核酸 cDNA。以 4 种常见马铃薯病毒 PVX、PVY、PVS 和 PVA 参考序列为模板设计引物(表 1),设置阳性对照,通过 PCR 方法检测 4 种病毒是否能够扩增。脱毒率为特定病毒未检出的茎尖个数与检测茎尖个数之比。

表 1 脱毒苗 RT-PCR 检测所用引物

引物	序列(5'-3')	产物大小/bp
PVS-F	CTTGTGGGCATTGTGAGC	657
PVS-R	GGCTCAAGCGAGACATTC	
PVX-F	CTGGCAAGCACAAGGTTT	138
PVX-R	TGGGCAGCATTCATTTCA	
PVA-F	ATTTAGGTACTGCTGGGACT	468
PVA-R	TCAGGTTGCCGTTGAAGAC	
PVY-F	AGAGCAAGGCAGCATCCAGT	369
PVY-R	TGTTTCATCCCCATCCATCAT	

#### 1.2.4 马铃薯脱毒苗生长的激素组合

采用以 MS+NAA+6-BA+GA3 激素配比为马铃

薯脱毒苗生长的培养基。在预实验基础上,设定 NAA 质量浓度为 0.01 mg/L,调整 6-BA 和 GA3 这 2 种激素的质量浓度(表 2)。将脱毒苗茎尖分别接种于 5 个激素质量浓度的培养基上,每个处理接种 15 瓶。接种 2 周后开始统计茎尖成活率和成苗率。判断茎尖成活的依据为茎尖分生组织发育为肉眼可见的绿色小点,茎尖成活率为成活茎尖个数与接种茎尖个数之比。判断茎尖成苗的依据为成活茎尖长出 2 片叶以上的植株,茎尖成苗率为成苗个数与成活茎尖数之比。

表 2 马铃薯脱毒苗生长培养基激素组合

处理组	6-BA/(mg.L <sup>-1</sup> )	GA3/(mg.L <sup>-1</sup> )
T1	0	1
T2	0.5	1
T3	0.3	0.5
T4	0.5	0.5
T5	0.7	0.5

## 2 结果与分析

### 2.1 超低温处理时长对茎尖脱毒效果的影响

将马铃薯茎尖置于液氮中分别超低温处理 30、60、90 min 后统计茎尖成活及其分化成苗情况(表 3)。结果表明,茎尖经液氮处理 30 min 后的成活率和成苗率最高,并随着超低温处理时间的延长逐渐降低。但是,统计病毒脱毒情况后发现,4 种病毒经 30 min 超低温处理后的脱毒率不及处理 60 min 和 90 min 的脱毒率,且随着超低温处理时间的延长脱毒率均有增加,其中 PVX、PVY 和 PVA 的脱毒率在超低温处理 90 min 后达到最高,PVS 脱毒率在处理 60 min 后最高。上述结果表明,采用超低温冷冻茎尖脱毒方法,冷冻处理时间与茎尖成活率、成苗率成反比,但与茎尖脱毒率成正比,随着冷冻时间的延长,茎尖活力逐渐降低,但脱毒效率相对提高。

表 3 不同处理时长下茎尖成活率、成苗率和脱毒率

处理时长/min	成活率/%	成苗率/%	PVS 脱毒率/%	PVY 脱毒率/%	PVX 脱毒率/%	PVA 脱毒率/%
30	48.3a	62.1a	38.8c	66.7c	38.8c	61.1c
60	35.0b	57.1b	58.3a	83.3b	63.6b	72.7b
90	28.3c	52.9c	55.5b	88.9a	71.4a	77.8a

注:同列不同小写字母表明差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.2 不同热处理温度和时间对茎尖脱毒效果的影响

将马铃薯茎尖在 3 个温度梯度下处理 3 个不同时长后进行茎尖分化。结果表明:茎尖成活率与成苗率均随着热处理温度的增高而降低,在 36 °C 下处理,茎尖成活率能够达到 75.6%~81.1%,成苗率达

到 69.1%~72.2%。其中,处理 4 h 后的茎尖成活率最高,处理 5 h 后的成苗率最高,而处理 6 h 后 2 者都有所下降。从茎尖活力上判断,热处理温度为 36 °C 时,茎尖活力远高于超低温冷处理。

统计不同温度及时长热处理后的脱毒率如表 4 所示,经无重复试验双因素方差分析,结果表明温度变化对于 4 种病毒脱毒率均有显著差异,但处理时间对于其脱毒率并无显著差异(表 5)。PVX 病毒脱毒率随着处理温度和时间增加迅速增高,经 40 °C 处理后达到 80% 以上,其中处理 5 h 后脱毒率最高,为 86.7%。从成苗的植株中进行 RT-PCR 检测结果也表明:36 °C 和 38 °C 处理后均能够扩增出病毒条带,只有 40 °C 处理后未扩增出病毒条带(图 1)。PVY 病毒的脱毒效果与 PVX 类似,在 40 °C 处理 5 h 后脱毒率最高,达到 88.9%。与前 2 个病毒相比,PVS 病毒热处理后脱毒率较低,脱毒率在 30%~43.3%,在热处理温度为 36 °C 时,PVS 脱毒率相对较高,其中热处理 6 h 后达到 43.3%。PVA 病毒在 36 °C 处理下的脱毒效率低于 38 °C 和 40 °C 处理,后 2 个处理温度下的脱毒效果差异不大。

表 4 不同热处理温度和时间下茎尖成活率、成苗率和脱毒率

温度/°C	时长/h	成活率/%	成苗率/%	PVX 脱毒率/%	PVY 脱毒率/%	PVS 脱毒率/%	PVA 脱毒率/%
36	4	81.1	71.2	50.0	73.3	40.9	56.6
	5	80.0	72.2	50.0	73.3	42.3	63.3
	6	75.6	69.1	66.7	76.7	43.3	63.3
38	4	66.6	63.3	63.3	83.3	30.0	75.0
	5	61.1	58.2	67.7	84.6	30.0	77.8
	6	56.7	55.0	69.1	81.8	33.3	73.3
40	4	54.4	53.1	80.0	85.0	35.0	76.7
	5	53.3	50.0	86.7	88.9	33.3	79.2
	6	51.1	45.6	80.0	86.7	33.3	72.7

表 5 温度和时间对茎尖成活率、成苗率和脱毒率影响的双因素方差分析显著性检验的 P 值

影响因素	成活率	成苗率	PVX	PVY	PVS	PVA
温度	0.000	0.000	0.005	0.003	0.003	0.007
时间	0.032	0.044	0.132	0.570	0.799	0.244

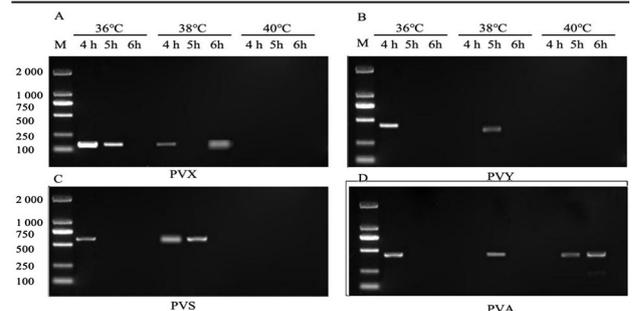


图 1 不同热处理温度和时间下茎尖脱毒 RT-PCR 检测电泳图

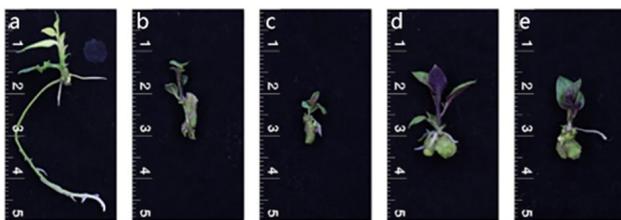
### 2.3 不同激素浓度对马铃薯茎尖分化成苗的影响

为明确马铃薯茎尖脱毒后的最适分化培养基配比,进一步缩短脱毒苗培养周期,研究在 MS+NAA+6-BA+GA<sub>3</sub> 生长培养基基础上调整 6-BA 和 GA<sub>3</sub> 这 2 种激素的质量浓度。结果表明:当 6-BA 质量浓度为 0.5 mg/L 且 GA<sub>3</sub> 质量浓度为 0.5 mg/L 时,脱毒茎尖成苗率最高,如表 6 所示。不同激素质量浓度下的脱毒苗生长情况,如图 2 所示。当培养基中完全缺少 6-BA 激素时,脱毒苗出现叶片发黄、生根异常。当 6-BA 质量浓度为 0.5 mg/L,GA<sub>3</sub> 质量浓度为 1 mg/L 时,脱毒茎尖开始生根,但较为细弱。当降低 GA<sub>3</sub> 质量浓度至 0.5 mg/L 时(图 2c-e),茎尖基部膨大较好,茎尖生长趋于强壮,其中当 6-BA 质量浓度为 0.5 mg/L 时脱毒苗生根和生叶情况最为理想,脱毒苗形态发育正常且较为强壮。因此,从脱毒茎尖成苗率和脱毒苗发育表型 2 方面判断,MS 培养基中添加 0.50 mg/L GA<sub>3</sub>+0.50 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA 激素为脱毒苗生长培养基的最佳激素配比。

表 6 不同激素配比处理茎尖成活率

处理组	接种数/个	成活率/%	成苗率/%
T1	15	93.33a	71.43c
T2	15	73.33c	63.63d
T3	15	66.66d	50.00e
T4	15	86.67b	84.62a
T5	15	93.33a	78.57b

注:同列不同小写字母表明差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。



注:a.T1 激素浓度下脱毒苗的生长表型;b.T2 激素浓度下脱毒苗的生长表型;c.T3 激素浓度下脱毒苗的生长表型;d.T4 激素浓度下脱毒苗的生长表型;e.T5 激素浓度下脱毒苗的生长表型。

图 2 不同激素浓度下脱毒苗的生长表型

### 3 讨论

本研究采用超低温处理和热处理 2 种方法处理马铃薯茎尖后,针对马铃薯 4 种常见病毒 PVX、PVY、PVS 和 PVA 开展脱毒效果研究。研究证实了 PVX、PVY 和 PVA 这 3 种病毒的脱毒以热处理效果

较好,而 PVS 病毒在超低温处理中脱毒效率更高。从茎尖处理后的成活率和分化成苗率统计数据来看,热处理方法更加有利于茎尖的成活与分化。本研究发现,通过液氮超低温处理进行茎尖脱毒方法在操作上具有一定的局限性,其茎尖成活率低( $<50\%$ )的原因可能由以下几点。第一,由于茎尖本身较小,放置于液氮中超低温处理容易导致茎尖内部细胞过冷死亡,实验中出现液氮处理茎尖后使用高糖溶液洗涤茎尖显绿,但由于组织疲软,培养箱培养 10 d 后,茎尖颜色开始变为褐黄,继而死亡<sup>[16]</sup>。第二,没有对用于茎尖剥离的马铃薯苗进行低温驯化,致使茎尖不能很好地适应超低温环境<sup>[17]</sup>。第三,用于接种培养茎尖的再生培养基成分可能存在不合理,不利于超低温处理的茎尖生长。因此,后续试验中应用超低温法进行马铃薯脱毒种苗生产,需要在前期对马铃薯材料进行低温驯化或者选用本身较为抗冻的品种,以进一步探索适应低温处理后受冻茎尖生长的最适培养基配方。

与超低温脱毒方法相比,热处理法可使茎尖成活率和成苗率大幅度提高,且对于部分病毒而言,脱毒效率也有较大提升。前人研究中,已有报道利用新鲜块茎或者植株作为材料对马铃薯进行热处理脱毒,都有脱毒效果<sup>[18]</sup>。然而,根据杨雪芹等<sup>[19]</sup>的研究,40℃ 热处理茎尖 24 h 后造成块茎芽眼生长点受损,从而对出苗产生较大影响。因此,本实验考虑到茎尖剥离后抗性较低,持续高温将对其造成不同程度的烧苗,故采取高低温交替的变温处理。综合植株生长的耐热性以及 4 种病毒的钝化温度来看,将热处理温度选择在 36~40℃,变温时长控制在 4~6 h 交替处理,得到较好的脱毒效果。另外,本研究中发现 PVX 病毒相较于 PVY 病毒脱毒效率更低,这与张新宁等<sup>[20]</sup>的研究结果一致。

除了脱毒方法的比较以外,为了得到更好的脱毒效果并缩短脱毒苗培养周期,本研究还对生长培养基的激素配比进行了优化。本实验中 6-BA 的添加量对茎尖的成活率以及成苗率有很大影响。增加 6-BA 的含量后茎尖的成活率和成苗率都有所增加。但是,高浓度的 GA<sub>3</sub> 可能导致根系发育出现异常。1 mg/L GA<sub>3</sub>+0.5 mg/g 6-BA 和 0.5 mg/L GA<sub>3</sub>+0.3 mg/g 6-BA 的配比,茎尖分化成苗率都相对较低。由于本试验的 NAA 浓度固定,其对茎尖成活率和成苗率的影响未知,下一步还可以继续探索 NAA 浓度对组培苗生长的影响。

(下转第 12 页)

797-802.

- [17] KARTHIKEYAN B, JOE M M, ISLAM M R, et al. ACC deaminase containing diazotrophic endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Catharanthus roseus* through reduced ethylene levels and induction of antioxidative defense systems [J]. *Symbiosis*, 2012, 56(2): 77-86.
- [18] 代金霞, 王玉炯, 武雪娟, 等. 柠条根瘤内生细菌的抗逆性及遗传多样性[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(2): 519-524.
- [19] 鞠向阳. 胡杨内生细菌的多样性和其中的植物耐盐促生菌[D]. 上海: 华东理工大学, 2014.
- [20] 钮旭光, 韩梅, 宋立超, 等. 翅碱蓬内生细菌鉴定及耐盐促生作用研究[J]. *沈阳农业大学学报*, 2011, 42(6): 698-702.
- [21] NOGUCHI H, UCHINO M, SHIDA O, et al. *Bacillus vietnamensis* sp. nov., a moderately halotolerant, aerobic, endospore-forming bacterium isolated from Vietnamese fish sauce [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54: 2117-2120.
- [22] MALLICK I, BHATTACHARYA C, MUKHERJI S, et al. Effective rhizoinoculation and biofilm formation by arsenic immobilizing halophilic plant growth promoting bacteria (PGPB) isolated from mangrove rhizosphere: a step towards arsenic rhizoremediation [J]. *Sci Total Environ*, 2018, 610-611: 1239-1250.
- [23] ALI S, CHARLES T C, GLICK B R. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2014, 80: 160-167.
- [24] 韩坤, 田曾元, 刘珂, 等. 具有 ACC 脱氨酶活性的海滨锦葵 (*Kosteletzky a pentacarpos*) 内生细菌对小麦耐盐性的影响[J]. *植物生理学报*, 2015, 51(2): 212-220.
- [25] 刘军生, 解修超, 罗阳兰, 等. 抗镉内生细菌阿耶波多氏芽孢杆菌的分离鉴定及生物学特性[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(2): 64-72.

(上接第 4 页)

## 参考文献:

- [1] 蔡金钻. 脱毒马铃薯覆膜高产栽培技术及经济效益分析[J]. *福建农业科技*, 2008(1): 75-76.
- [2] 佚名. 2015 年种植业工作要点[J]. *中国农业信息*, 2015(2): 3-6.
- [3] 崔永伟, 杜聪慧, 李树君. 中国马铃薯种薯产业发展分析与展望[J]. *农业展望*, 2020, 16(1): 71-76.
- [4] 杨海鹰, 云庭. 浅谈我国马铃薯种薯市场发育现状与发展思路[J]. *中国马铃薯*, 2010, 24(5): 314-315.
- [5] 赵建宗, 申建平. 我国马铃薯种薯质量监督控制体系现状、问题与建议[J]. *种子*, 2017, 36(12): 92-94.
- [6] 黄修梅, 惠霖, 袁春爱, 等. 超低温疗法脱除马铃薯种薯病毒病的研究进展[J]. *种子*, 2015, 34(3): 50-54.
- [7] 郭志乾, 董凤林. 马铃薯病毒性退化与防治技术[J]. *中国马铃薯*, 2004, 18(1): 48-49.
- [8] PALUKAITIS P. Resistance to viruses of potato and their vectors [J]. *Plant Pathology Journal*, 2012, 28(3): 248-258.
- [9] 王彪. 马铃薯茎尖超低温保存及超低温疗法脱毒技术体系的建立[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- [10] NAG K K, STREET H E. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells [J]. *Nature*, 1973, 245(5420): 270-272.
- [11] SAKAI A, ENGELMANN F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review [J]. *Cryoletters*, 2007, 28(3): 151-172.
- [12] 毛彦芝. 马铃薯病毒检测技术的研究概况[J]. *中国蔬菜*, 2009(12): 1-6.
- [13] 施夏明, 齐璐璐, 乔宁宁, 等. 马铃薯脱毒技术研究进展[J]. *园艺与种苗*, 2019, 39(5): 68-71.
- [14] 张婧颖. 马铃薯脱毒方法与多重 RT-PCR 病毒检测技术的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- [15] 王子成, 曲先, 薄涛. 超低温保存脱除两种马铃薯病毒[J]. *河南大学学报(自然科学版)*, 2011, 41(6): 609-614.
- [16] KACZMARCZYK A, ROKKA V M, KELLER E. Potato shoot tip cryopreservation. a review [J]. *Potato Research*, 2011, 54(1): 45-79.
- [17] 邱静, 汤浩茹, 曹会娟, 等. 园艺植物茎尖冷冻疗法脱毒的技术研究[J]. *植物生理学报*, 2014, 50(1): 1-6.
- [18] KASSANIS B. The use of tissue cultures to produce virus-free clones from infected potato varieties [J]. *Annals of Applied Biology*, 2008, 45(3): 422-427.
- [19] 杨雪芹, 向本春, 施磊. 马铃薯脱毒及脱毒苗检测技术的研究进展[J]. *安徽农学通报*, 2007, 13(8): 98-100.
- [20] 张新宁, 沈效东, 王立英, 等. 马铃薯脱毒技术研究[J]. *宁夏科技*, 2001(5): 31-32.