

胡新颖,杨迎东,颜津宁,等. 百合种球脱毒技术研究进展[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):6-8.

百合种球脱毒技术研究进展

胡新颖¹, 杨迎东¹, 颜津宁², 颜范悦¹

(1. 辽宁省农业科学院园艺分院, 辽宁沈阳 110161; 2. 辽宁省凌源市蔬菜花卉局, 辽宁凌源 122500)

摘要:对近年来我国百合种球脱毒技术的研究进展情况进行了综述,介绍了百合常见病毒种类及特点,系统阐述了我我国目前常用的百合种球脱毒技术:愈伤组织培养、茎尖培养、热处理、抗病毒药剂应用以及多种方式综合应用等。

关键词:百合;种球;脱毒;研究进展

中图分类号: S682.2⁺65.04 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0006-03

百合(*Lilium* spp.)为百合科百合属多年生球根类草本植物,因其花大、花色丰富、花形优美而深受人们喜爱,是主要的切花观赏花卉之一。商业上用的百合种球主要以扦插繁殖和分球繁殖等无性繁殖为主。长期的无性繁殖使病毒在百合体内积累,引发病毒病,严重影响切花产量和品质。另外,栽培管理不当,导致温度过高,引发蚜虫危害,使病毒在百合植株间传播,种球带毒率日益增加。采取有效措施控制和消除病毒病,生产优质无毒百合种球,是百合种球商品化生产面临的一个重要问题。目前百合脱毒主要集中在茎尖培养、热处理、应用抗病毒药剂及综合脱毒等方法,本文就百合的病毒病种类及脱毒技术做一系统的综述。

收稿日期:2013-08-12

基金项目:辽宁省农村科技特派团项目(编号:2012215008)。

作者简介:胡新颖(1980—),女,河北丰润人,硕士,助理研究员,从事花卉栽培、育种与种球繁育技术研究, E-mail: huxinying2013@163.com。

通信作者:颜范悦,研究员,从事花卉栽培、育种与种球繁育技术研究。 E-mail: wl401983@163.com。

[47] Wang Q Z, He X J, Zhou S D, et al. Phylogenetic inference of the genus *Bupleurum* (Apiaceae) in Hengduan Mountains based on chromosome counts and nuclear ribosomal DNA ITS sequences [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2008, 46(2): 142-154.

[48] 潘胜利, 顺庆生, 柏巧明, 等. 中国药用柴胡原色图志 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2002: 1-3.

[49] 周荣汉. 药用植物化学分类学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988: 295.

[50] 单人骅, 李颖. 中国柴胡属的种类及其分布 [J]. *植物分类学报*, 1974, 12(3): 261-294.

[51] Wang C B, Ma X G, He X J. *Bupleurum candollei* var. *pauciflorans* comb. nov. (Apiaceae) from Guizhou, China; comparison of allied species based on morphology, anatomy and molecular data [J]. *Nordic Journal of Botany*, 2011, 29(4): 424-430.

[52] 宋诚擎. 柴胡的药用植物历史演变 [J]. *中医药信息*, 2007, 24(5): 29-30.

[53] Oskolski A A. Phylogenetic relationships within Apiales: evidence from wood anatomy [J]. *Edinburgh Journal of Botany*, 2001, 58(2): 201-206.

[54] Rani S, Kumar S, Jeelani S M, et al. Impaired male meiosis, mor-

1 百合常见病毒病的种类及特点

自 Stewart (1896) 描述百合的坏死条纹以来, 相继报道了百合的病毒病原 14 种。其中发生普遍, 危害严重的病毒有 5 种, 即百合潜隐病毒 (lily symptomless virus, LSV)、黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV)、郁金香碎花病毒 (tulip breaking virus, TBV)、异名百合斑驳病毒 (lily mottle virus, LMoV) 和百合丛簇病毒 (lily rosette virus, LRV)。其他 9 种病毒均在栽培地区少量发生, 对百合构不成普遍危害^[1]。

近年来, 随着百合引种数量的增加、种植面积的扩大, 以及不规范的种球自繁, 病毒病已开始在我国各百合种植区发生流行, 一般发病率为 40%~50%, 二代种球的带毒率在 90% 以上, 严重制约了我国百合鲜切花的产量和质量。这些病毒在危害百合时有几个突出特点: 多种病毒复合侵染, 病症复杂、危害重, 传播速度快, 病毒在植株内分布不均, 初侵染与二次侵染特点不同等^[2]。病毒病对百合的危害主要有: 植株严重矮化, 脉明, 花叶, 畸形, 坏死斑, 鳞茎变小, 产量下降, 种质明显退化, 开花少且小, 有的甚至盲花, 严重时整株枯死, 影

phology and distribution pattern of different cytotypes of *Bupleurum lanceolatum* Wall. (Apiaceae) from the Western Himalayas [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2013, 299(9): 1801-1807.

[55] Zhao C, Ma X G, Liang Q L, et al. Phylogeography of an alpine plant (*Bupleurum smithii*, Apiaceae) endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent regions inferred from chloroplast DNA sequence variation [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2013, 51(4): 382-395.

[56] Zhao C, Wang C B, Ma X G, et al. Phylogeographic analysis of a temperate-deciduous forest restricted plant (*Bupleurum longiradiatum* Turcz.) reveals two refuge areas in China with subsequent refugial isolation promoting speciation [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, 68(3): 628-643.

[57] Bhellum B L. Taxonomic status of *Bupleurum* (Apiaceae) in outer hills of Kashmir Himalayas, India [J]. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 2012, 2(2): B63-B69.

[58] Ashour M L, Wink M. Genus *bupleurum*: a review of its phytochemistry, pharmacology and modes of action [J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2011, 63(3): 305-321.

响百合的药用、食用和观赏价值。

2 百合脱毒技术研究现状

2.1 愈伤组织培养脱毒技术

利用百合鳞片、茎尖等外植体诱导愈伤组织,进而诱导分化无毒试管苗或鳞茎,是脱除百合植株体内病毒的一种途径。据郑丽娜研究表明,百合鳞片通过诱导出愈伤组织,再分化成带叶的小鳞茎,经检测,脱毒率总体偏低,在 31.7%~46.7% 之间,此途径暂不能成为百合脱毒的有效途径^[3]。此外,愈伤组织在长期无性培养过程中,由于培养基中激素、生长素物质的刺激影响,通常会发生体细胞无性系变异,这种变异的范围和方向都是不定的,因此对于无性繁殖作物而言,为了保持优良性状,一般不采用此法^[4]。但是,这种脱毒方式有其自身的优点,比如,实验室可行性强、分化率控制性强、周期较短、一次性成苗数量多等,在马铃薯、天竺葵、大蒜、草莓等植物上应用已先后获得成功,在百合上应用此种脱毒方法有进一步研究的价值和空间。

2.2 茎尖培养脱毒技术

茎尖培养脱毒是利用病毒在较老的器官和组织内含量较高,在茎尖等幼嫩的或未成熟的组织和器官中含量较低的原理,剥取茎尖组织培养,脱除植株体内病毒。早在 1962 年,Phillips 就利用茎尖培养成功脱除百合病毒。1966 年 Mori 和 Hamaya 通过茎尖培养获得了百合无病毒植株。从此,茎尖培养被广泛应用于生产无毒百合种苗。

通过茎尖培养获得无病毒植株的难易程度与品种和感染病毒的种类有直接关系。徐品三等利用不同百合品种的不定芽培养证明了这一点,各品种的再生子球中,“香华丽”百合的 LSV 和 TBV 检出率较高,分别是 50% 和 59%,“卡萨布兰卡”百合中的 LSV 容易脱去,脱毒率达 76%,“魅丽”百合中的 CMV 能全部脱去。其原因可能是它们生长点附近病毒的浓度、维管束分化程度以及细胞代谢活性不同的缘故^[5]。

采用茎尖培养时切取茎尖的大小是研究人员一直在探索的问题。切取茎尖太大,成活率高,但脱毒效果差;切取茎尖太小,脱毒率虽高,但操作不方便。因此,选择适当的茎尖大小,兼顾成活率和脱毒率 2 个因素,是成功利用茎尖培养获得脱毒原种球的关键。邵增龙等认为剥取 0.2~0.3 mm 的茎尖分生组织进行培养的脱毒效果较好且易成活^[6]。张文珠等研究表明,直接剥取 0.2~0.5 mm 的茎尖,脱毒率达 38%^[7]。朱旭东等先用鳞片诱导分化不定芽,再利用无菌不定芽剥取 0.5 mm 以下茎尖进行培养,降低了污染率,提高了成活率且节省了材料,但脱毒效果一般^[8]。钟海丰等认为新鲜百合种球经 4℃ 冷藏处理 1 个月后剥取 0.2 mm 茎尖培养的脱毒方法,既提高出芽率,也达到了较理想的脱毒率,是百合脱毒的较好方法^[9]。综上所述,茎尖培养切取茎尖的最适大小为 0.2~0.5 mm。操作需在解剖镜下进行。

茎尖二次脱毒是对茎尖培养方法的改进,具有简便、易掌握、速度快、分化率高、脱毒率高、污染率低等特点。郑丽娜等一次剥取茎尖 0.2~0.4 mm,培养成苗后,剥取无根苗的茎尖(0.4~0.6 mm)进行二次脱毒培养,脱毒率都在 75% 以上^[3]。侯娜研究表明,2~3 mm 组培苗茎尖经过 1 次茎尖培养+4 次继代脱毒处理后,CMV 和 LSV 的脱毒率都能达到 100%^[10]。

靳慧洁报道的茎尖超低温脱毒技术^[11]是一条新的脱毒途径。试验表明,继代后 20 d 的百合组培苗,经超低温处理,在 40℃ 水浴化冻后,切取 0.5~0.8 mm 的茎尖,脱毒率、成活率较高,生长较快,整个操作简单易行,可达到大规模实际生产的需求。

2.3 热处理与茎尖培养结合的脱毒技术

热处理是根据病毒在高温下出现钝化,其复制明显减弱或停止,植物在高温培养期间生长的嫩稍不带病毒,取其嫩梢进行培养从而达到脱毒的目的。热处理脱毒法已应用多年,被世界多个国家利用。该项技术要求的设备条件比较简单,脱毒操作也较容易。主要缺点是脱毒时间长,脱毒不完全,若温度过高或处理时间太长,又会降低植株的成活率。此外,由于温度难以控制以及各病毒对温度的敏感范围不一样,很难获得理想的控制效果。因此,目前百合脱毒技术研究中,热处理多与茎尖培养脱毒结合应用,能达到较好的脱毒效果。

热处理与茎尖培养相结合的方式基本有 2 种:一是先对鳞茎或试管苗进行热处理,然后切取茎尖检测脱毒效果,相关报道较多。徐品三等以“铁炮”百合感病种球为材料,对其进行 37℃ 热处理 20 d 后再进行组织培养,子球再生率仅为 40% 左右,但 LSV 脱毒率达 95% 以上^[12]。陈剑勇以“索蚌”小鳞茎为外植体,采用 50℃ 热水处理 30 min 结合茎尖培养,脱毒率可达 80%,直接茎尖培养的脱毒率仅为 30%^[13]。吴斌等将带 LSV、CMV、LMOV 的百合子球放入恒温箱中,35℃ 左右培养 4 周后病毒含量明显降低。剥取 0.4~0.6 mm 茎尖 2 次脱毒,4 个月后组培苗带毒率降为 0%^[14]。周晓波等以带 LSV 的“卷丹珠”芽为材料,36℃ 处理 10 d 后,剥取 0.2 mm 大小的茎尖进行培养,脱毒率达 100%^[15]。刘芬等研究表明,花丝培养结合 37±2℃ 热处理 28 d 后,切取 0.8~1.0 mm 的茎尖再生芽脱毒效果最好,脱毒率达 80% 以上^[16-17]。江洪如等将“龙牙”百合鳞茎在 58℃ 处理 10~20 min,再在 38℃ 温度下热处理 72 h,结合 0.2~0.4 mm 茎尖培养,可完全脱去 LSV、CMV 和 LMOV^[18]。罗丽萍等以“龙牙”百合组培小鳞茎为试材,白天 40~42℃、夜晚 35℃ 热处理 60 d 后,剥取 0.2~0.3 mm 的茎尖进行培养,成活率和脱毒率都较高^[19]。陈丽等将“卷丹”鳞茎经 28~30℃ 高温催芽后,剥取小于 0.2 mm 的微生长点进行培养,脱毒率达 100%^[20]。不同的百合品种经热处理后脱毒效果是有差异的。姜春华对东方系百合的不同品种进行 2 次递进热处理和茎尖脱毒。结果表明,高温处理的最理想温度是 40~45℃,热处理后剥取 0.2~0.6 mm 的茎尖进行脱毒培养,“西伯利亚”的脱毒率为 100%,吸光度值低,脱毒彻底;“凝星”的脱毒率为 100%,但吸光度值高,脱毒不彻底,效果一般^[21]。

另一种热处理方式是先剥取茎尖,再对试管苗进行高温培养,也能达到较好的脱毒效果。张文珠等以带毒的 Tiber 为试材,茎尖培养结合热处理,脱毒率达 60%^[7]。刘博剥取带有 LSV 病毒的 Tiber 商品球的茎尖约 2 mm,结合白天 38℃ 10 h,夜间 32℃ 14 h 全暗培养,脱毒率达 100%^[22]。高慧卿等以品种 Tiber 初代培养的无菌苗为材料,切取 0.2~0.5 mm 的茎尖结合 65℃ 热处理 30 min 再进行脱毒培养,LSV 的脱毒效果优于茎尖培养^[23]。张艺萍等将带有 CMV 的 Siberia 组培苗经(39±1)℃ 热处理后,2 次剥取 0.4~0.6 mm 的茎尖培养,脱毒率可达 80%^[24]。

热处理与茎尖培养相结合之所以能够提高脱毒效果,是由于热处理可使植物生长本身所具有的顶端免疫区得以扩大,有利于切取较大的茎尖,从而提高组织培养的成活率^[3]。先对鳞茎进行热处理再茎尖脱毒的方式,在切取茎尖大小相同的情况下,更有利于提高试管苗的成活率,更适合大规模脱毒原种球的生产。

2.4 热处理 + 茎尖培养 + 抗病毒药剂综合脱毒技术

化学疗法即抗病毒药剂处理,是一种新的脱毒方法,在外植体培养时添加抑制植物病毒活性的化学物质,如病毒唑(virazole)或硫尿嘧啶(2-thiouracil)等,以达到减轻病毒危害的目的。其作用原理是:抗病毒药剂在三磷酸状态下会阻止病毒 RNA 帽子结构形成,抑制病毒增殖或移动。徐品三等研究表明,将检测出 LSV 的“卡萨布兰卡”鳞片组培形成的不定芽,移植在添加 DHT 的液体培养基上培养,2 周后转接到固体培养基中,经检测脱毒率达到 100%^[5]。

单独应用抗病毒药剂脱除百合病毒也较少见,一般都是与茎尖培养、热处理相结合应用,脱毒效果较好。徐榕雪试验表明,病毒唑处理浓度为 4 mg/L,茎尖大小为 0.5~0.7 mm,能保证较高的成活率和脱毒率,且操作简便、成苗快^[25]。王超等研究表明,种球 38℃ 光照处理 16 h,25℃ 黑暗处理 8 h,待地上部分长出 10 cm 左右高时,切取 0.5~0.8 mm 茎尖,接种于含病毒唑 10 mg/L 的培养基中,脱毒效果最好^[26]。郑丽娜等对种球做相同热处理,再剥取 0.8~1.2 mm 茎尖,置于含 6 mg/mL 病毒唑的培养基中培养 15 d,脱毒效果最佳,一次性脱毒率可达 80% 以上^[27]。张惠华等以 2~4℃ 冷库休眠 84 d,15℃ 室内 7 d 催芽处理后的“索蚌”种球为试材,在 39℃ (±1℃) 恒温处理 15 d,剥取茎尖大小为 0.4~0.5 mm,病毒唑处理浓度为 10 mg/L 时,脱除病毒效果最好^[28]。马平霞研究表明,2~3 cm 的试管苗放入 38℃ 16 h 光照和 25℃ 8 h 黑暗的培养箱中热处理 42 d 后,切取茎尖 0.3~0.5 mm,接种于含 5 mg/L 病毒唑的分化培养基上,脱毒率最高达 67.5%^[29]。

综上所述,单一的脱毒处理技术难以完全脱除病毒,或需要较长的时间,热处理 + 茎尖培养 + 抗病毒药剂的综合脱毒技术是目前生产无毒百合种球最佳的途径。

3 问题与展望

从以上对我国 10 年来百合种球脱毒研究技术的综述可见,我国的百合脱毒技术仍处于试验研究阶段,尚未在生产中得到广泛性的应用。各研究人员对脱毒技术研究中由于侧重点不同,研究的结论也不尽相同,无法作为指导百合脱毒原种球标准化、规模化生产的依据。因此,针对我国切花百合生产常用品种,制定相应的脱毒原种球生产技术规程,实现高效、快速繁殖,是解决我国百合种球国产化瓶颈的首要问题。

参考文献:

- [1] 沈淑琳. 百合病毒病及其检验[J]. 植物检疫, 1996, 10(4): 32-35.
- [2] 王继华, 唐开学, 张仲凯, 等. 百合病毒及脱毒检测进展[J]. 北方园艺, 2004(6): 73-75.
- [3] 郑丽娜. 百合种球病毒检测与脱除技术研究[D]. 北京: 北京林

业大学, 2009.

- [4] 胡琳. 植物脱毒技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 49-51.
- [5] 徐品三, 栾雨时, 刘纪文, 等. 百合不定芽培养脱毒种球生产的研究[J]. 植物学通报, 2003, 20(3): 313-318.
- [6] 邵增龙, 高山林, 黄和平, 等. 百合的脱病毒、快速繁殖技术的研究[J]. 药物生物技术, 2010, 17(3): 240-243.
- [7] 张文珠, 郑国华, 明艳林. 百合脱毒组培技术研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35(S1): 133-134.
- [8] 朱旭东, 田青松, 成海钟, 等. 东方百合茎尖组培技术研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(5): 1922-1923, 1962.
- [9] 钟海丰, 黄宇翔, 邓朝生, 等. 东方百合快繁培养基优化与脱毒技术研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(17): 168-173.
- [10] 侯娜. 东方百合脱毒技术的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [11] 靳慧洁. 东方百合病毒检测与茎尖超低温脱毒研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [12] 徐品三, 刘华夏. 无病毒百合组培种球快速繁殖体系的建立[J]. 中国农学通报, 2009, 25(9): 174-178.
- [13] 陈剑勇. “索邦”百合茎尖培养及植株再生的研究[J]. 武夷科学, 2009, 25(12): 88-92.
- [14] 吴斌, 肇慧君, 刘霞, 等. 进境百合脱毒处理及健康评测技术研究[C]//中国植物病理学会 2010 年学术年会论文集, 2010: 589.
- [15] 周晓波, 吴艺飞, 丁苗莼. 卷丹百合脱毒快繁技术研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(31): 201-205.
- [16] 刘芬. 兰州百合病毒检测及脱毒种球培育技术研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2005.
- [17] 刘芬, 王发林. 兰州百合脱毒技术研究[J]. 河南农业科学, 2007(7): 93-95.
- [18] 江洪如, 余发新, 朱祺, 等. 龙牙百合茎尖脱毒快繁及种球培育技术[J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(6): 953-956.
- [19] 罗丽萍, 杨柏云, 蔡奇英, 等. 龙牙百合热处理及茎尖培养技术研究[J]. 江苏农业科学, 2005(1): 72-73, 104.
- [20] 陈丽, 唐寅, 张承妹, 等. 食用百合脱毒快繁技术研究[J]. 上海农业学报, 2009, 25(2): 25-28.
- [21] 姜春华. 百合组织培养及递进热处理脱毒法的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2006.
- [22] 刘博. 百合、水仙病毒分子检测及脱毒技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- [23] 高慧卿, 樊兰瑛, 王秀红, 等. 茎尖培养及热处理技术在百合脱毒中的应用研究[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2010, 30(6): 528-532.
- [24] 张艺萍, 屈云慧, 王祥宁, 等. 提高百合茎尖组织培养脱毒效率研究[J]. 广东农业科学, 2007(1): 37-38.
- [25] 徐榕雪. 百合主要病毒的分子检测及脱毒技术研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2007.
- [26] 王超, 王文和, 赵祥云, 等. 百合病毒脱除技术研究[J]. 北京农学院学报, 2012, 27(4): 25-28.
- [27] 郑丽娜, 刁义维, 吴沙沙, 等. 百合无毒化种球繁育关键技术[J]. 分子植物育种, 2009, 7(6): 1245-1253.
- [28] 张惠华, 刘晓荣, 颜悦悦, 等. 东方百合综合脱毒技术研究[J]. 辽宁农业科学, 2009(6): 17-19.
- [29] 马平霞. 西伯利亚百合脱毒及病毒检测[D]. 兰州: 西北师范大学, 2007.