

百合脱毒及病毒鉴定的研究进展

赵庆芳, 马平霞

(西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070)

摘要:简述了百合病毒病研究现状, 并对百合的脱毒技术——茎尖培养、珠芽培养、化学处理和热处理, 以及主要病毒鉴定方法——指示植物法、电镜技术、酶联免疫法和分子生物学技术进展等方面进行了系统的介绍。

关键词:百合; 病毒; 脱毒; 鉴定

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2007)03—0077—03

百合(*Lilium* spp.)为百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)多年生宿根植物, 是主要的切花观赏花卉之一。百合的栽培都是通过无性繁殖, 长期的无性繁殖使百合体内逐渐积累大量病毒致使百合患病毒病, 影响百合的产量和质量。目前主要通过茎尖分生组织培养来阻断病毒从母株向后代的传播, 获得脱毒苗成为百合种植的关键所在。

1 百合常见病毒病的研究现状

人们对百合病毒的研究最早为Stewart(1896)描述百合坏死条纹。目前报道过的百合病毒共有21种, 其中发生普遍, 危害严重的病毒有3种: 百合无症病毒

(*Lily symptomless virus*, LSV)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)和百合斑驳病毒(*Lily mottle virus*, LMoV), 其他各种均为局部地区发生, 对百合构不成普遍危害^[1]。

对易感染百合株系病毒的研究主要集中在CMV上, 根据从百合上得到的18个分离物在6个百合品种的鉴别寄主上的症状可将百合株系分为4类, 即重花叶株系, 矮化株系, 轻花叶株系和斑驳株系。其中, 轻花叶株系占的比例最大为7/18, 其次是矮化株系占6/18, 重花叶株系占4/18, 而斑驳株系仅占1/18^[2]。对不同类型百合病毒病进行株系分析结果表明, 兰州百合23个分离物中主要以轻花叶型较多, 其次为矮化型, 而无斑驳株系检出; 亚洲百合25个分离物中主要以轻花叶和矮化株系为主; 东方百合31个分离物中主要以轻花叶和矮花叶株系为主, 斑驳型在所有百合类型中所占比例均不大。

第一作者简介:赵庆芳, 女, 1962年生, 教授, 博士, 主要从事植物生理生态学及生态遗传学研究。
基金项目:甘肃省科技攻关计划项目, 编号: 2GS042—A41—001—11。
收稿日期:2006—10—24

正常环境后, 都表现出回升, 与光合速率变化趋势表现相似。在研究磷肥对于新几内亚凤仙生长、开花和叶绿素荧光的影响时, 发现与已知的研究结果相比, 低浓度的磷肥营养没有影响Fv/Fm, 叶片仍保持较高的光化学反应速率, 从而认为新几内亚凤仙的栽培中可用低浓度的磷肥以延迟生长并提早花期(Nowak J等, 2001)。

3 结语

作为快速、无损伤探究植物光合作用内部变化的“探针”, 叶绿素荧光动力学是植物研究中非常重要的方法之一。但与农作物、林木相比, 叶绿素荧光技术在园林植物研究中的应用还较少, 尤其是国内。主要是研究的广度和深度都不够, 今后的工作应该加强对园林中广泛应用的种类的研究, 并把科研与实际生产、应用中出现的问题结合起来, 最终为园林应用提供理论指导; 扩

大研究的范围, 叶绿素荧光中包含了非常丰富的信息, 可以应用在各方面的研究中, 如育种、病虫害防治等方面。而对于目前的已经有一定研究的方向, 如切花采后生理等, 研究深度还都有待于加强, 从而充分发挥叶绿素荧光动力学的优势, 推动园林植物研究和应用的发展。

参考文献:

[1] 冯建灿, 胡秀丽, 毛训甲. 叶绿素荧光动力学在研究植物逆境生理中的应用[J]. 经济林研究 2002 4: 14-18.
[2] Schreiber U, bilger W, Neubauer G. Ecophysiology of Photosynthesis [M]. (eds Schulze E D and Caldwell M M), Berlin : Springer Verlag, 1994.
[3] 张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论[J]. 植物学通报 1999, 16(4): 444-448.

2 百合脱毒技术的研究进展

百合长期大田种植, 病虫害传播, 感染病毒病使品种严重退化, 失去观赏价值。常用脱毒方法为茎尖分生组织培养、热处理法、化学疗法及互相结合的方法。此外, 花器官等其他器官培养脱毒也是一种有效的脱毒方法。现在离体培育无病毒植株已成为花卉生产的重要环节。

2.1 茎尖分生组织培养和珠芽培养

早在 1943 年 White 就发现植物生长点附近的病毒很少甚至无病毒。1962 年 Phillips 最早进行百合脱毒研究; 1966 年 Mori 和 Hamaya 通过茎尖培养获得了百合无病毒植株; 1993 年赵祥云利用 0.3~0.8 mm 珠芽生长点对淡黄花百合进行离体培养, 培育出的幼苗可成功地脱去烟草环斑病毒^[3]; 2001 年席梦利对宜兴百合脱毒培养得出, 接种 0.3~0.5 mm 的茎尖脱毒效果最好, 对 CMV 的脱毒率达到 40%, 小于 0.3 mm 的茎尖不能培养成活^[4]; 2003 年徐品三等发现脱毒效果因百合品种和病毒种类而有所差异, “卡萨布兰卡”百合中 LSV 容易脱去, 脱毒率达 76%, “魅丽”百合中 CMV 能全部脱去^[5]; 2003 年屈云慧等直接用茎尖脱去 Elle 百合 CMV 病毒, 接种 0.2~0.3 mm 茎尖脱毒率达 43%。

2.2 热处理法

病毒不耐高温, 通过热处理可使其钝化, 使原植物生长点本身所具有的顶端免疫区得以扩大。植株的存活率和脱毒率受温度的高低和持续时间长短的影响。大部分百合病毒在 50℃~65℃之间活性稳定。在热空气处理过程中, 通常温度越高、时间越长, 脱毒效果就越好, 但同时植物的生存率却呈下降趋势。在实践中, 利用较高温度处理时, 缩短处理时间, 温度较低时延长处理时间^[6]。并在热处理期间要保证良好的光照和管理。一般在 35℃~45℃条件下热处理几个小时, 几天甚至几个月。病毒的抗热性也因其种类而异, 例如侵染百合等多种花卉的 CMV, 在温度超过 25℃时就开始受到抑制^[7]。

2.3 化学疗法

对受侵的原种使用抑制病毒的活性化学物质来抑制或干扰病毒的复制, 生产出无病毒植株的技术称植物病毒的化学疗法。抑制植物病毒的物质包括代谢拮抗物质、高等植物生长调节物质等。目前国际上常用的有病毒唑(Ribavirin), 二氢尿嘧啶(DHT)和双乙酰—二氢—5 氮尿嘧啶(DA—DHT)。1994 年 Kim 研究报道了病毒唑对 CMV 有较强的抑制作用效果^[8]。1999 年 Xu 等研究了通过化学处理(病毒唑或二氢尿嘧啶)和 35℃热处理生产脱去鳞茎中带有 LSV 等病毒, 并通过诱导东方百合 Georgia 品种愈伤组织获得脱毒鳞茎^[9]。

2.4 茎尖培养与热处理结合的脱毒法

这 2 种脱毒方法各有利弊, 由于各种病毒钝化的温度不同, 某一温度的热处理不能排除所有病毒。将热处

理和茎尖分生组织培养结合起来就可取更长的茎尖, 这样可大大提高茎尖分生组织培养的成活率, 而对脱毒效果没有太大的影响。2003 年屈云慧等对带有 CMV 的亚洲百合 Elle 在 40℃下处理 5 d 以后, 剥取 0.2~0.3 mm 茎尖组织培养时脱毒率可达 67%, 而成苗率也达到 48%。2001 年席梦利等以宜兴百合为试材, 对 3 种脱毒方法(茎尖培养、热处理结合茎尖培养、花药培养)进行研究, 结果表明, 珠芽经 50±1℃热水处理 40 min, 培养 30 d 后, 切取 0.8~1.0 mm 茎尖培养的脱毒效果最好, 脱毒率达 100%, 38±1℃热空气处理后切取茎尖培养也能提高脱毒效果^[4]。

3 病毒检测方法研究现状

通过脱毒程序得到的植株, 必须经过严格的检测鉴定, 筛选无病毒的植株进行推广应用。而花卉病毒鉴定检测研究, 已从单一的生物学测定逐步发展为生物测定与电镜诊断, 血清学和分子病毒学相结合的快速灵敏可靠的系统测定, 目前普遍采用的方法有指示植物法、血清法和分子检测法。

3.1 指示植物法

指示植物法虽然简单, 但存在很多不足。在实际鉴定中多为几种病毒复合侵染, 症状表现变化较大, 且不同时期指示植物上的症状表现也有差异, 从而增加了检测难度^[9]; 检测速度慢; 灵敏度较低, 受季节的限制; 维护指示植物园费用也高; 有些百合病毒, 只能由蚜虫传播, 也不适用指示植物法。

3.2 电子显微镜检测法

这种方法简便快捷, 适用于大量样品的检测。随着免疫技术的发展, 人们采用了免疫技术与电镜技术相结合的方法免疫电镜技术(SEM)。且建立的胶体金免疫电镜技术, 把胶体金作为在电镜下示踪的标志, 已成功的快速检测和鉴定了病汁液中线状病毒、棒状病毒以及球状病毒, 并可大幅度提高同源抗血清对病毒的捕获能力^[10]。但由于电镜技术需要较高倍数的电子显微镜, 而且样品的制备费用较高, 所以电子显微镜技术受到一定的限制。

3.3 血清学方法

是以病毒外壳蛋白为基础, 利用抗原抗体的免疫学反应来检测植物是否带病毒的方法。目前主要是采用酶联免疫吸附法(ELISA)和点免疫结合试验(DIBA)^[11,12]。1999 年 Niimi 利用 ELISA 和 DIBA 的方法检测田间样品, 52.4%的样品检测到 LSV 的存在, 检测了 CMV 在 550 个 LiliumX Enchantment 样品中的发生情况, 在 5 个样品中检测到 CMV 的存在, 侵染率达 0.9%^[13]; 2003 年徐品三等用 ELISA 方法对“卡萨布兰卡”(L.X' Casablanca')和“魅力”(L.X' Enchantment')进行不定芽培养脱毒种球脱除 CMV, LSV 和 LMov 3 种病毒效果的检测^[5]。这两种方法都无法检测到纳克水

平以下更低浓度的病毒。而 Elliott 在运用 ELISA 和 DIBA 检测大量样品后认为:不能依据一种血清学方法检测结果来判断样品是否带毒,必须有两种以上方法相互印证后,诊断结果才可靠^[14]。血清学方法虽然样品制备过程简单,检测速度快,检测一个样品只需 30s,较生物学检测法前进了一大步,但其使用仍然受到以下几方面的限制:第一有些植物病毒在某些情况下缺乏外壳蛋白,而类病毒没有外壳蛋白,使该法无效;第二季节性不确定的变化常阻碍阳性与阴性样品的区分;第 3 病毒在感染植株上分布不均匀。

3.4 分子生物学技术

目前常用的分子生物学技术包括核酸分子杂交技术,双链 RNA 电泳技术,反转录 PCR(RT-PCR)技术。多聚酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术,能轻易检测到皮克(pg)数量级的植物病毒,并且可与其他分子生物学方法(如核酸杂交)和免疫学方法(如 ELISA)相结合应用,大大增强其灵敏度和特异性。在植物病毒检测上应用较多的是反转录 PCR(RT-PCR)技术。利用 PCR 和 RT-PCR 方法检测植物病毒具有灵敏、快速、特异性强等优点,其专一性和灵敏性则优于免疫学方法。1994 年 Takarnatsa 描述了 RT-PCR 克隆和序列分析等方法在病毒研究中的应用,表明在进行病毒研究时可省略复杂的过程而利用相对简单的方法快速检测病毒^[15]。1996 年 Joung 利用 RT-PCR 对百合 LSV 进行检测^[16]。1998 年 Lee 利用 RT-PCR 检测东方百合 LSV, CMV, LMoV 的发生情况^[17]。2003 年 Niimi 等用 RT-PCR 和 ELISA 两种方法检测了侵染百合的 LSV,比较两种检测技术的灵敏度,结果显示 RT-PCR 具有较精确的检出率并利用所设计的兼并引物,采用 RT-PCR 方法成功检测了百合 Casablanca, White Aga, Avignon 3 个品种的病毒 CMV, LSV 和 LMoV^[13]。新出的复合 RT-PCR 是在同一 RT-PCR 反映体系中使用几对不同的引物同时检测多个目的片段,节约了时间和试剂。分子生物学技术,特别是 RT-PCR 技术在百合病毒检测方面将会有更广阔的前景。但是百合病毒多为 RNA 病毒, RNA 很容易降解,提取相对困难,只有那些已知序列的病毒才能做 PCR,实验时需要昂贵的试剂和特殊的设备。

目前百合病毒病的研究逐渐系统化、清晰化,其脱毒技术也已有较多的研究,但仍存在许多问题,首先已证实病毒是靠输导组织(维管束)来传播的,根尖、茎尖等分生组织部分由于没有分化,病毒无法侵染,可通过调控维管束的生长,使其在茎尖周围的生长减慢,而不带毒的茎尖加长,脱毒苗的成活率和脱毒率升高;其次在百合脱毒的预处理上可采用茎尖培养、热处理、化学处理 3 种方法相结合并且尝试采用更多的病毒抑制

剂和不同的温度进行处理;再次在提取植物中病毒 RNA 时, RNA 很容易降解,需用到 DEPC 和溴化乙锭 EB, DEPC 和 EB 都是很强的蛋白变性剂和致癌物,对人的身体有较大的伤害且价格昂贵,所以应尽量采用其他抑制 RNA 酶的药品来代替,如用 Elasol 代替 DEPC,使用无毒的非致癌物质新型 Gold view 核酸染料代替溴化乙锭 EB。最后可把 RT-PCR 的方法和其他检测方法相结合来检测百合中的病毒,使检测的结果更加准确。

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): 223-226.
- [2] 徐秉良, 梁巧兰, 徐琼. 百合病毒病的发生与症状类型[J]. 植物保护, 2004, 30(5): 62-65.
- [3] 赵祥云, 程谦, 邢尤美, 等. 百合珠芽组培及脱毒研究[J]. 园艺学报, 1993, 20(3): 284-288.
- [4] 席梦利, 王节萍, 章静娟, 等. 宜兴百合脱毒技术[J]. 江苏农业学报, 2001, 17(1): 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): 301-318.
- [6] 洪艳华, 殷广峰, 张立军. 百合脱毒及病毒检测技术进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2003, 34(3): 225-227.
- [7] 高尚士. 花卉病毒病的检疫及其消除方法[J]. 植物检疫, 1994(6): 340-341.
- [8] Kim JY, Lee SY, Choi JK, et al. Effect of virazole on elimination of viruses(LSV and CMV) from infected lily Plant[J]. RDA Journal of Agricultural Science(Korea Republic), 1994, 36: 370-374.
- [9] Xu PS, Niimi Y. Evaluation of virus-free bulb production by antiviral and/or heat treatment in vitro scale cultures of Lilium longiflorum 'Georgia' and 'L. Casablanca' [J]. Journal of the Japanese society for Horticultural Science, 1999, 68: 640-647.
- [10] 陈剑平. 胶体金免疫电泳技术检测和鉴定果汁液件不同形态的植物病毒[J]. 植物病理学报, 1993, 23(2): 169-174.
- [11] Hagita T. Detection of cucumber mosaic virus and lily symptomless virus from bulb scales of Maximowicz's lily by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1989, 55: 344-348.
- [12] Niimi Y, Gondairat, Kutsuwada Y, et al. Detection by ELISA and DIBA tests of lily symptomless virus(LSV), tulip breaking virus—lily (TBV-L) and cucumber mosaic virus(CMV) in Lilium spp. grown in the field[J]. Journal of the Japanese society for Horticultural Science, 1999, 68: 176-183.
- [13] Niimi Y, Dong SH, Shiro M. Detection of cucumber mosaic virus lily symptomless virus and lily mottle virus in Lilium species by RT-PCR technique[J]. Scientia Horticulture, 2003, 97: 57-63.
- [14] Elliott MS. Problems interpretation of serological assays in a virus survey of orchid species from Puerto Rico, Ecuador, and Florida[J]. Plant Disease, 1996, 80(10): 1160-1164.
- [15] Takarnatsus B N, Furuta Lin H, Makara K. RT-PCR mediated cloning and sequence analysis of lily symptomless virus coat Protein gene[J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1994, 60: 487-490.
- [16] Joung YH, Jeon JH, Choi KH, et al. Detection of lily symptomless virus using RT-PCR technique[J]. Korean Journal of Plant Pathology (Korea Republic), 1996, 12: 187-190.
- [17] Lee JS, Nou HS, Hong DK, et al. Detection of viral diseases in Lilium oriental plants using RT-PCR technique[J]. RDA Journal of Crop Protection, 1998, 40: 50-56.