

# 西伯利亚百合脱毒技术研究

李巧峡, 赵庆芳, 马平霞

(西北师范大学 生命科学学院 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 运用茎尖培养、热处理结合茎尖培养、病毒唑结合茎尖培养、热处理加病毒唑结合茎尖培养 4 种方法, 脱除西伯利亚百合品种 CMV、LSV 和 LMoV 病毒, 分析了 4 种处理后的成苗率和脱毒率。结果表明: 以热处理加病毒唑结合茎尖培养法效果最为明显。

**关键词:** 西伯利亚百合; 病毒病; 脱毒

中图分类号: S 682.2<sup>+</sup> 9; S 603.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2009)04-0192-03

百合 (*Lilium* spp.) 属百合科 (Liliaceae) 多年生草本, 是我国重要的观赏类经济植物。然而病毒病一直危害着百合的切花生产, 导致植株产量下降, 品质劣化, 严重影响了百合产业的经济效益。近年来, 国内外对百合的脱毒及病毒检测进行了若干研究<sup>[1-3]</sup>, 但是有关西伯利

亚 (Siberia) 百合病毒脱除的研究还未见报道。西伯利亚百合是切花百合中的重要品种, 受病毒病的危害较为严重, 因此进行该品种的病毒脱除是十分必要的。该试验以西伯利亚百合为研究材料, 针对该品种的病毒脱除进行研究, 以建立一套合理的技术体系, 为该品种的栽培生产提供科学指导。试验运用茎尖培养、热处理结合茎尖培养、病毒唑结合茎尖培养、热处理加病毒唑结合茎尖培养 4 种方法对该品种的 CMV、LSV 和 LMoV 病毒脱除进行研究报道。

## 1 研究方法

以西伯利亚百合鳞茎的中部鳞片为外植体, 将鳞片清洗干净, 在 70% 酒精中浸泡 30 s, 然后在 0.1% 的升汞中浸泡 10~15 min, 中间加 1~2 滴土温。之后用无菌水冲洗 5~6 次, 将处理好的鳞茎鳞片切成 0.6 cm<sup>2</sup> 的小块, 接种在初代培养基 (MS+0.8 mg/L BA+0.1 mg/L NAA) 上, 25℃ 温度培养, 每天观察其生长状况。

**第一作者简介:** 李巧峡 (1980-), 女, 甘肃秦安人, 硕士, 实验师, 主要从事植物生理生态学研究。E-mail: liqiaoxia8024@163.com。

**通讯作者:** 赵庆芳 (1962-), 女, 山东莱芜市人, 博士, 教授, 主要从事植物生理生态及生态遗传学的研究工作。E-mail: zhaoqingfang2001@yahoo.com.cn。

**基金项目:** 甘肃省科技攻关计划资助项目 (2GS042-A41-001-11); 兰州市科技局资助项目 (06-2-19)。

**收稿日期:** 2008-12-18

采集插穗时, 要搞好采穗母树调查, 晴天上午 10 时前或阴雨天采穗, 采穗、浸泡处理等整个过程最好不要超过 8 h, 做到边采、边运、边插、边浇水, 不插隔夜枝<sup>[3]</sup>。

## 参考文献

[1] 郭维明 毛龙生. 观赏园艺概论 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 8.

354-355.

[2] 林紫玉 李贞霞 齐安国, 等. 火棘采种与播种育苗技术 [J]. 山东林业科技, 2005(1): 61.

[3] 杜月毅 姜义龙. 田应生. 火棘的引种栽培及其在城市园林绿化中的应用研究 [J]. 贵州林业科技, 1996, 24(2): 33-36.

## Effects of *Pyracantha Fortuneana* Cutting Slips Radication at Different Cuttage Matrix

ZHAO Guo-jin

(Biological Engineering Department Binzhou Vocational College, Binzhou, Shandong 256603, China)

**Abstract:** The effect of *Pyracantha fortuneana* cutting slips radication at different cuttage matrix. The results showed that perlite and peaty soil was best, next respectively was peaty soil, coarse sand, loam soil.

**Key words:** *Pyracantha fortuneana*; Cuttage; Matrix

1.1 试管苗茎尖培养法脱除病毒

待百合试管苗生长到 2 cm 左右时, 取其茎尖, 消毒后(方法同上), 切取不同大小的茎尖(0.8~1.0、0.5~0.8、0.3~0.5 mm 及<0.3 mm)接种到芽诱导最佳培养基上(MS+0.01 mg/L BA+0.01 mg/L NAA)。60 d 后统计其成活率和脱毒率。

1.2 试管苗热处理法+茎尖培养法脱除病毒

取高约 2~3 cm 的试管苗, 移入光照培养箱中用热空气变温处理 56 d, 每天经 38℃ 16 h 光照和 25℃ 8 h 黑暗处理, 每日观察, 剥取茎尖, 切取茎尖 0.3~0.5 mm, 接于芽诱导最佳培养基上(MS+0.01 mg/L BA+0.01 mg/L NAA)。

1.3 病毒唑+茎尖培养法脱除病毒

将试管苗切取 0.3~0.5 mm 茎尖接于芽诱导最佳培养基(MS+0.01 mg/L BA+0.01 mg/L NAA)+病毒唑(5、10、20、50 mg/L 4 个梯度)上, 60 d 后统计其成活率和脱毒率。

1.4 试管苗热处理+病毒唑+茎尖培养法脱除病毒

取 2~3 cm 的试管苗放入光照培养箱中变温热处理 42 d, 每天观察其成苗情况。从经过热处理后的试管苗上切取茎尖 0.3~0.5 mm, 接于芽诱导最佳培养基(MS+0.01 mg/L BA+0.01 mg/L NAA)加 10 mg/L 病毒唑上培养, 60 d 后统计其成活率和脱毒率。

1.5 病毒检测

经过上述脱毒处理后, 采用 RT-PCR(逆转录-聚合酶链式反应)技术, 检测 CMV、LSV 和 LMoV 病毒脱除效果。

2 结果与分析

2.1 试管苗茎尖培养法脱除病毒

将不同大小的百合茎尖接入芽诱导最佳培养基, 14 d 后成活的茎尖开始膨大变绿, 28 d 后茎尖再生出小苗, 而未成活的茎尖变褐枯死。从表 1、2 可以看出, 接种长度小于 0.3 mm 的茎尖很难成活; 接种长度为 0.8~2.0 mm 的茎尖成活率较高, 但起不到脱除病毒的作用。只有 0.3~0.5 mm 和 0.5~0.8 mm 两组, 既可以成活又可以获得无病毒母株。从脱毒效果来看, 0.3~0.5 mm 大小的茎尖脱毒率相对较高, 平均脱毒率达到 33.3%(见表 1、2)。

表 1 百合茎尖大小对成活率的影响			
茎尖大小/mm	外植体数量	成活数量	成活率/%
<0.3	50	0	0
0.3~0.5	50	10	20
0.5~0.8	50	28	56
0.8~1.0	50	45	90
1.0~2.0	50	50	100

2.2 试管苗热处理法+茎尖培养法脱除病毒

变温热处理过程中, 在第 28 天后试管苗开始变黄,

成活率开始降低; 56 d 后, 试管苗的成活率为 0(表 3)。从表 3 的茎尖成苗率看, 处理前 14 d 茎尖培养的成苗率和对照相差不大, 成苗率达 50%~55%。随着热处理时间的延长, 茎尖成苗率不断降低; 从脱毒效果来看, 脱毒率提高(表 4)。热处理 42 d 后试管苗的茎尖经过培养, 脱毒效果较好, CMV、LSV、LMoV 的脱除率分别为 40%、40%、30%。

表 2 百合茎尖大小对脱毒率的影响					
病毒名称	茎尖大小/mm				
	<0.3	0.3~0.5	0.5~0.8	0.8~1.0	1.0~1.2
CMV	—	35	25	0	0
LSV	—	30	25	0	0
LMoV	—	30	20	0	0
平均	—	33.3	23.3	0	0

表 3 变温热处理时间对试管苗成活率的影响				
处理时间/d	处理株数	成活率/%	接种茎尖数	成苗率/%
0	20	100.0	20	55
14	20	100.0	20	50
28	20	100.0	20	45
42	20	70	15	30
56	20	0	0	0

表 4 变温热处理时间对试管苗脱毒率的影响					
病毒名称	处理时间/d				
	0	14	28	42	56
CMV	25	25	30	40	—
LSV	20	25	25	40	—
LMoV	20	20	20	30	—

2.3 病毒唑+茎尖培养法脱除病毒

从表 5 可以看出, 茎尖的成活率与病毒唑浓度呈负相关, 当病毒唑浓度升到 50 mg/L 时, 完全抑制茎尖生长, 成活率为 0。表 6 中显示在一定范围内脱毒率与病毒唑浓度呈正相关, 而综合成活率与脱毒率考虑, 10 mg/L 的病毒唑处理效果较好。

表 5 不同浓度病毒唑处理对试管苗成活率的影响			
病毒唑浓度/mg·L <sup>-1</sup>	接种茎尖数	成活茎尖	成活率/%
5	30	28	93.3
10	30	25	83.3
20	30	20	66.7
50	30	0	0

表 6 不同浓度病毒唑处理对试管苗脱毒率的影响			
病毒	病毒唑浓度/mg·L <sup>-1</sup>		
	5	10	20
CMV	30	35	40
LSV	25	35	35
LMoV	25	30	35

2.4 试管苗热处理+病毒唑+茎尖培养法脱除病毒

表 7 表明, 加 10 mg/L 病毒唑的茎尖成活率为 60%。表 8 表明热处理+茎尖培养法+病毒唑处理平均脱毒率可达 60%, 其中对 CMV 的影响较大, 脱毒率达到 70%。

表 7 热处理+茎尖培养法+病毒唑的成活率

病毒唑浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	接种茎尖数	成活茎尖	成活率/%
10	30	18	60

表 8 热处理+茎尖培养法+病毒唑的脱毒率

病毒名称	检测株数	带毒株数	脱毒率/%
CMV	10	3	70
LSV	10	4	60
LMoV	10	5	50
平均	30	12	60

3 讨论

3.1 茎尖培养

茎尖培养的优点是不需要复杂的设备和试验条件,在普通的植物组织培养实验室就可以进行,有较高的成活率,是所有植物脱病毒方法中最常用的一种。从病毒检测的结果看出,单纯的茎尖培养脱毒效果不佳,单独用茎尖培养法很难脱除 CMV、LSV 和 LMoV 这 3 种病毒,这在徐品三等<sup>[1]</sup>、席梦利等<sup>[4]</sup>的研究中也有报道。影响茎尖培养脱毒效果的主要因素是茎尖的大小,在适宜的培养条件下,茎尖的大小与茎尖的存活率呈正相关,而与脱毒率呈负相关。因此茎尖的大小要求小到足以能根除病毒,大到足以能发育成一个完整的植株。该研究表明,小于 0.3 mm 的茎尖很难成活,0.8~2.0 mm 的茎尖成活率很高,但起不到脱除病毒的作用,0.3~0.5 mm 大小的茎尖脱毒率相对较高,平均脱毒率达到 33.3%。

3.2 热处理结合茎尖培养

热处理结合茎尖培养是目前植物脱毒方面应用最广的方法,该方法具有脱毒率高,操作难度较低,所用设备简单,成活率较高的优点。魏梅生等<sup>[5]</sup>、覃兰英等<sup>[6]</sup>研究结果表明,变温处理后试管苗的成活率及脱毒率均要高于恒温处理。该试验表明随着变温处理时间的延长,茎尖成苗率不断降低,脱毒率提高。处理 42 d 后试管苗的茎尖经过培养,其成苗率和脱毒率都较高。

3.3 病毒唑结合茎尖培养

有研究表明,培养基中附加病毒唑能完全脱除苹果

的褪绿叶斑病毒<sup>[7]</sup>,并且病毒唑对百合植物的 CMV 病毒有较强的抑制作用<sup>[8]</sup>。该研究把病毒唑加入培养基中结合茎尖培养法培养,结果表明,病毒唑浓度过高会阻碍茎尖生长,成活率降低;浓度过低又起不到阻碍病毒的作用,其浓度在 10 mg/L 时效果较好。这一结果同 Kim 研究报道相符<sup>[8]</sup>。

3.4 热处理加病毒唑结合茎尖培养

单一的脱毒处理技术或难以完全脱除病毒,或需要较长的时间,2 种或 3 种脱毒技术的结合逐渐成为生产无毒百合种苗的首选。Xu P S 也曾运用综合处理的方法<sup>[9]</sup>,他将鳞片在 35℃下处理 4 周,然后在含 5 mg/L 病毒唑培养基中诱导珠芽,最终 70%的“Casablanca”珠芽病毒检测呈阴性。该研究采用茎尖培养,热处理和病毒唑 3 种脱毒方法的结合,其脱毒率较高,平均脱毒率可达 60%,并对 CMV 的影响较大,脱毒率达到 70%,LSV 次之,LMoV 脱毒率最低。

参考文献

[1] 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): 301-308.  
[2] 王继华, 王丽花, 丁元明, 等. 应用多重 RT-PCR 检测百合无症病毒和百合斑驳病毒[J]. 园艺学报, 2005, 32(2): 284-288.  
[3] 沈淑琳. 百合病毒病及其检验[J]. 植物检疫, 1996, 10(4): 223-226.  
[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] 魏梅生. 植物无性种质材料中病毒的检测与治疗[J]. 世界农业, 1995(10): 30-31.  
[6] 覃兰英, 李青. 核果类病毒识别鉴定及脱毒技术[J]. 北京农业科学, 1997(10): 23-28.  
[7] 陈超, 王桂兰. 中西药剂在苹果褪绿叶斑病毒脱除中的应用[J]. 落叶果树, 1995(1): 1-2.  
[8] Kim J Y, Lee S Y, Choi J K, 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 P S, Niiimi Y. Evaluation of virus-free bulblet production by antiviral and/or heat treatment in in vitro scale cultures of Lilium longiflorum Georgia and L X Casablanca[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Sciences, 1999, 68: 640-647.

Study on Elimination of Viruses on Siberia Lily

LI Qiao-xia, ZHAO Qing-fang, MA Ping-xia

(College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

**Abstract:** As important ornamental economic plants, Siberia lily were affected by kinds of plant virus diseases for a long time. Accordingly, it is very significant to make research about the virus elimination of this lily. In this paper, 4 methods i.e. stem point culture, stem point culture combined with heat treatment, stem point culture combined with ribavirin, stem point culture combined with ribavirin and heat treatment were employed. After these treatments, CMV, LSV and LmoV were eliminated to different extent. The result showed that the method of stem point culture combined with ribavirin and heat treatment was the best effect.

**Key words:** Siberia lily; Virus diseases; Virus elimination