

提高百合茎尖组织培养脱毒效率研究

张艺萍, 屈云慧, 王祥宁, 吴学尉, 熊丽

(云南省农科院花卉研究所, 云南昆明 650205)

摘要:以带有 CMV 病毒的东方百合栽培品种 Siberia 鳞茎为外植体, 常规消毒后在 MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 培养基中培养成苗, 热处理后剥取较大的茎尖(0.4~0.6 mm)进行培养, 待茎尖长成植株后再次剥取较大茎尖进行二次脱毒, 经检测脱毒率可达 80%。研究结果表明, 茎尖二次脱毒培养方法简单, 易于操作, 脱毒率高。

关键词:百合; 茎尖; 组织培养; 脱毒

中图分类号:S682.2⁺9; S604⁺.3 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-874X(2007)-0037-02

Study on improving virus-free rate of Lily plant by culturing shoot tips

ZHANG Yi-ping, QU Yun-hui, WANG Xiang-ning, WU Xue-wei, XIONG Li

(Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China)

Abstract: The bulblets in vitro of Oriental Lily 'Siberia' with cucumber mosaic virus (CMV) were used for apical meristem culture combined with heat treatment. The shoot tips (0.4~0.6 mm) excised again from plantlets induced from shoot tip of 0.4~0.6 mm can improve virus-free rate to 80% after devirus. The technique of eradicating viruses is a simple and efficient way as well as easy to master.

Key words: Lily; shoot tip; tissue culture; devirus

百合(Lily),学名 *Lilium*., 为百合科百合属多年生球根类草本植物。百合繁殖分为有性(种子繁殖)和无性两种方式,商业生产上一般以无性繁殖为主,主要采用扦插和分球等方式繁殖。但长期的无性繁殖会使病毒在百合植株体内积累,引发各种病毒病,对果实的产量和品质以及花、叶等的观赏价值造成严重影响。近年来,随着百合引种数量的增加和种植面积的扩大,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,一般发病率在 40%~50%,二代种球的带毒率在 90%以上,严重地制约了我国百合鲜切花的产量和质量^[1]。在国外,从 20 世纪 60 年代起就开始利用百合茎尖脱毒获得无病毒植株,如 Phillips 于 1962 年利用百合茎尖培养脱毒成功;1966 年 Mori 和 Hamaya 通过茎尖培养获得了百合无病毒植株^[2];Kim 等对带 LSV、CMV、LmoV 病毒的铁炮百合 Georgia 进行茎尖脱毒,经过 4 个月的继代培养后,组培苗的带毒率下降为 0^[3]。在国内,李进采用茎尖脱毒技术生产

出宜兴百合脱毒组培苗^[4]。由于茎尖剥离技术要求高、难度大,脱毒效果不稳定,因此在生产中难以推广应用。云南省农科院花卉研究所从 2002 年开始研究百合的脱毒技术,对百合的茎尖培养脱毒技术进行改进,旨在寻找一种操作简便、易于掌握、脱毒率高且稳定的脱毒方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为经检测带 CMV 病毒的东方百合栽培品种 Siberia 鳞茎。

1.2 试验方法

1.2.1 组培苗的获得 取经检测带 CMV 病毒的东方百合栽培品种 Siberia 的鳞茎为外植体,剥取中部鳞片,用自来水冲洗干净,无菌条件下用 0.1% 升汞溶液浸泡消毒 25~30 min,转入次氯酸钠中消毒 15~20 min,无菌水冲洗 3 次后,用无菌纸吸干鳞片表面的水分。将鳞片切口处 2~3 mm 去掉,然后接入 MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 培养基中培养成苗。

1.2.2 组培苗的脱毒 将无菌分株苗植于 MS + NAA 0.1 mg/L 培养基中,然后放入光照培养箱内,于光照强度 2 000 lx、每天光照 12 h 及温度为(39±1)℃

收稿日期:2006-10-24

基金项目:国家“863”计划项目(2002AA241051)

作者简介:张艺萍(1977-),女,硕士,助理研究员

通讯作者:熊丽(1953-),女,研究员

的条件下进行热处理培养,5天后剥取0.2~0.4 mm和0.4~0.6 mm两种不同大小的茎尖,分别接种于MS+NAA 1.0 mg/L培养基中培养,每种茎尖接种43个;待0.4~0.6 mm茎尖长成小植株后,再次剥取0.4~0.6 mm茎尖进行二次脱毒培养,共接种茎尖43个。每次接种后均置于温度为(25±1)℃、光照强度为2 000 lx、每天光照12 h的条件下培养。

1.3 检测方法

将培养过程中分化形成的小植株编号后,取叶片组织进行病毒检测。病毒检测方法采用血清学病毒检测方法—双抗体夹心酶联免疫吸附法(DAS—

ELISA),并依照中国农业部花卉产品质量监督检验测试中心(昆明)制定的标准进行调查。

2 结果与分析

2.1 不同大小茎尖的脱毒效果

百合经热处理后剥取茎尖并接种于培养基中进行培养,结果显示,不同大小茎尖的成苗率、污染率和脱毒效果有明显差异。从表1可以看出,0.2~0.4 mm茎尖的污染率为27%、成苗率为60%、脱毒率为62%,而0.4~0.6 mm茎尖的污染率为20%、成苗率为72%、脱毒率为45%。

表1 不同茎尖大小和二次脱毒培养的脱毒效果比较

茎尖大小 (mm)	接种 次数	接种茎尖数 (个)	污染茎尖数 (个)	分化苗数 (株)	脱毒苗数 (株)	污染率 (%)	成苗率 (%)	脱毒率 (%)
0.2~0.4	1	43	12	26	17	27	60	62
0.4~0.6	1	43	9	31	14	20	72	45
0.4~0.6	2	43	5	36	29	11	83	80

2.2 二次脱毒茎尖的脱毒效果

据调查观察,二次脱毒的0.4~0.6 mm茎尖在接种培养后15天内开始萌动,基部稍增大并形成少量愈伤组织,茎尖颜色逐渐变绿并逐渐伸长,叶原基发育成可见小叶,进而形成带正常叶的小苗;而0.2~0.4 mm茎尖则需培养20天才开始萌动。从表1还可以看出,经二次脱毒培养的0.4~0.6 mm茎尖的成苗率高达83%,污染率则只有11%。

病毒检测结果显示,热处理结合茎尖培养的百合小苗脱毒率为62%,而二次脱毒处理后的小苗脱毒率为80%。说明在百合茎尖组培繁殖中,较大的茎尖容易分化成苗,二次脱毒处理后污染率低,且脱毒率也能达到生产要求。

3 结语

百合组培繁殖在以小鳞茎或珠芽为外植体进行茎尖培养的过程中,茎尖分生组织消毒困难、容易污染,且操作繁琐。本研究以百合感病毒植株鳞茎的中部鳞片为外植体,经常规消毒后,在MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L培养基中培养成苗并作为茎尖剥取对象,避免了茎尖直接消毒困难的问题。这一方法与李进等^[4]直接采用灭菌的珠芽剥取茎尖有所不同。

据高尚士研究报道,茎尖脱毒比率主要取决于茎尖的大小,一般采用0.2~0.4 mm茎尖分生组织最为有效^[5]。但实践表明茎尖越小,越难分化,且组培苗长期暴露在外,污染率也随之升高。本研究采用热处理结合茎尖培养的方法,剥取较大的百合茎尖(0.4~0.6 mm),进行二次脱毒培养,取得了较好的脱毒效果。本研究结果表明,百合茎尖二次脱毒培养方法具有简便、易掌握、速度快、茎尖分化率高、脱毒率高、污染率低等特点。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Bhojwani S S, Randsn M K. Plant tissue culture: theory and practice[M]. New York: Elsevier Science Publishing Company INC, 1983:287-313.
- [3] Kim Jaeyong, Lee Suyoung, Kim H, et al. Survey on virus diseases of *Lilium* spp. and their indexing by tissue and dot immunobinding assays[J]. Acta Horticulturae, 1996, 414: 189-194.
- [4] 李进,顾绘,胡桂华,等.宜兴百合脱毒组培苗培养技术[J].蔬菜,2000(1):27.
- [5] 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.