

观赏植物病毒病害及病毒脱除研究现状与发展趋势

王永伟,王慧霞,贺丹,何松林
(河南农业大学林学院园艺学院,郑州 450002)

摘要:观赏植物在长期营养繁殖过程中经常受到各种病毒病害的侵染,严重影响了观赏植物的生长发育,造成经济价值和观赏价值大大降低,因此,观赏植物病毒病害的脱除技术受到世界各国的广泛关注。该文总结了观赏植物的常见病毒病害种类及常规脱毒方法,如热处理法、茎尖分生组织培养法、愈伤组织培养法、茎尖微体嫁接技术等,并展望了观赏植物脱毒技术的发展趋势。为进一步提高观赏植物的品质和观赏价值提供参考。

关键词:观赏植物;组织培养;病毒病害;脱毒

中图分类号:S688.9 **文献标识码:**A

Research Development and Prospect of Disease and Viruse-free on the Ornamental Plant

Wang Yongwei ,Wang Huixia ,He Dan , He Songlin

(College of Forestry and Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: In the long-term nutritional propagation process, ornamental plant was often infected by virus and diseases which had seriously affected the growth and development of ornamental plant and decreased the value of economic and ornamental characteristics, virus-free method gained concern of the countries all over the world. The common virus and diseases and virus-free method such as thermotherapy, tip meristem culture, callus culture, micro-propagation et al. were summarized in this article. And the development trend of virus-free on ornamental plant was also given in order to provide the reference for the improvement of the quality and value on ornamental plants.

Key words: ornamental plant, plant tissue culture, virus disease, virus-free

观赏植物以其千姿百态的风采给人类生活以美的享受,使生活和工作更富有色彩。近年来随着中国观赏植物的种植面积和栽培种类的不断增长,病毒病害的发生也在逐年加重,在同样的环境下栽培管理,有些植物如菊花、仙客来、海棠等经过多代繁殖之后会出现植株矮化,花色黯淡,花朵变小,叶片发黄,卷曲等等现象。另外,观赏植物中有相当一部分种类在采用无性繁殖方法如嫁接、分株、扦插、压条等途径进行繁殖时,病毒会通过营养体传递给后代,使危害加重,从而造成退化。自1952年人们首次获得大丽花无毒植株以来,脱毒技术得到了长足发展。观赏植物经过脱毒后,花的颜色会更艳,花朵更大,叶子更浓绿,植株也更强壮。因此

对观赏植物进行脱毒处理培育无病毒种苗,已成为当前解决观赏植物病毒病害问题的首选。

1 观赏植物病毒病害

观赏植物中有很多种类都带有病毒,严重影响了观赏植物的产量、品质及观赏价值,受侵染的植株有可能表现为花叶、碎色、褪绿、黄花等症状,大大影响了观赏价值,严重者甚至导致某些品种的灭绝,严重制约了观赏植物生产的发展。很多病毒可能不表现任何可见症状,但受害植株长势下降,品质退化,产量、抗逆性下降。特别是对长期应用无性繁殖的观赏植物(如康乃馨、菊花、百合、风信子等)其危害更加严重。由于病毒是通过维管束传导的,因此利用观赏植物的营养器官

基金项目:河南省杰出青年基金资助(0412001900);河南省高校创新人才培养工程。

第一作者简介:王永伟,女,1981年出生,河南新乡人,硕士研究生,研究方向:园林植物组织培养。通信地址:450002 河南农业大学林学院园艺学院 2260信箱, Tel:0371-63554213, E-mail: vivian6666@126.com。

通讯作者:何松林,男,1963年出生,河南周口人,河南农业大学教授,博士生导师。

收稿日期:2008-03-05,修回日期:2008-04-10。

采用嫁接、分株、压条等方法进行繁殖时,病毒会通过营养体及工具、土壤等传递到新的植物个体,加速了病毒病的积累与传播,导致病毒病的危害越来越严重。病毒利用寄主体内结构和化学原料合成更多的病毒微粒体,

从而破坏寄主正常的代谢过程,引起植物病毒病害。病毒通常不杀死寄主植株,但常常造成观赏价值下降。

据不完全统计^[1],危害观赏植物花卉的重要病毒有30多种,最常见病毒种类、危害症状详见下表1。

表1 不同观赏植物常见的病毒种类及表现症状

病毒名称	表现症状
香石竹斑驳病毒 (CarMV)	轻度斑驳,植株生活力下降,花朵变小,有时引起花色变异及植株矮化
香石竹蚀环病毒 (CERV)	叶片出现环状或轮纹状坏死斑,常与 CarMV 复合侵染
香石竹潜隐病毒 (CLV)	不产生或仅有轻微症状,与 CaMV 复合侵染,可产生严重花叶症状或畸形
菊花矮化类病毒 (CSV)	造成植株矮小,叶片和花变小,粉红色花和红色花呈透明状,开花提前
香石竹叶脉斑驳病毒 (CVMV)	幼叶表现系统性褪绿斑,叶脉上出现暗绿色斑点,有些品种花上出现杂色
香石竹斑驳病毒 (CarMV)	轻度斑驳,植株生活力下降,花朵变小,有时引起花色变异及植株矮化
菊花 B 病毒 (CBV)	表现青花叶或无病状,有些品种可产生坏死斑
番茄斑萎病毒 (TSWV)	新叶皱缩、畸形,植株矮小,花变小;叶片的叶脉间出现淡白色条纹和圆形病斑,叶片扭曲
烟草脆裂病毒 (TRV)	叶片褪绿斑驳、坏斑、斑点或皱缩、发脆,严重的叶子变小,花朵小,畸形,植株矮缩发脆
烟草坏死病毒 (TNV)	叶片薄厚不均,皱缩扭曲呈畸形,有缺刻,严重时叶尖呈鼠尾状或带状
黄瓜花叶病毒 (CMV)	叶呈花叶状,有时花瓣上产生斑驳或不能正常开花,生长发育受抑制
番茄不育病毒 (TSV)	常无明显症状,重病时叶片扭曲,花色异常,植株矮小
芋花叶病毒 (DMV)	花叶,扭曲及成叶破裂或呈畸形皱缩,叶缘呈波纹状,植株矮小,新生叶不能正常平展
郁金香碎色病毒 (TBV)	叶片出现深绿与浅绿相间的花叶,叶片扭曲,花变形甚至花蕾不开放
菜豆花叶病毒 (BMV)	叶片产生褪绿斑点或条纹,病叶扭曲,植株矮小黄化,形成杂色花
凤仙花坏死斑点病毒 (INSV)	叶面上出现圆形褐色坏死斑或呈同心圆环状坏死,叶柄上的叶脉变褐坏死,有时受害叶产生坏死纹线,造成叶片扭曲,植株矮化
香石竹坏死斑点病毒 (CNFV)	叶片上出现灰白色或浅红棕色坏死斑点或斑纹,植株下部老叶病症更明显,可导致叶片枯黄

由上表可以看出由病毒引起观赏植物外部症状主要有:引起观赏花卉变色,坏死畸形或萎蔫等症状的相关病毒。其中一些只危害观赏花卉如香石竹斑驳病毒、百合隐症病毒等,而有些病毒则有较宽的寄主范围,可危害多种观赏植物,如黄瓜花叶病毒、番茄斑萎病毒等^[1]。

2 脱毒技术研究现状

自上个世纪50年代发现通过植物组织培养可以除去病毒以来,该方法在生产上被广泛应用,并将其纳入常规良种无性繁殖的一个重要程序。组织培养脱毒的原理主要根据观赏植物某些营养器官或组织有不带或少带病毒的特点,分生区域无维管束,病毒只能通过胞间连丝传递,其病毒复制速度赶不上细胞分裂和活跃生长的速度,因此生长点含有病毒的数量极少,几乎检测不出病毒;茎尖分生组织内源生长素含量较高,对病毒有钝化作用。因此,采用植物组织培养技术进行脱毒已成为目前最有效的去除病毒的方法,几乎对所有病毒有效,并且周期短、效率高、污染少、无公害,具有良好的经济效益和社会效益。

2.1 热处理法脱毒

热处理脱毒,是利用病毒和植物细胞对高温忍耐力不同,选择适当的温度处理感病植株^[2],控制病毒扩散和抑制病毒增殖,使植物体内的病毒钝化和失活,而植物细胞本身存活。细胞生长速度加快,超过病毒的扩散速度,得到一小部分不含病毒植物分生组织从而起到脱除病毒的作用^[3]。Kassanis(1957)和 Quak(1977)证实,带毒植株经高温处理后,病毒浓度会降低。热处理脱毒的方法主要有两种:热水浸泡和高温空气处理。热水浸泡处理对休眠芽较好。Bake(1972)研究表明在热水处理中,由于植物组织经过淋洗,在水中长期浸泡常常会窒息死亡,并且这种处理也会打破或延长植物的休眠期。所以现在更常用的方法是将病毒感染的植物用35~38℃热空气处理2~4周或者更长时间进行脱毒^[4]。麝香石竹在38℃下处理两个月可消除节间部位的病毒。百合、郁金香、风信子等球根花卉,用休眠种球进行热处理,可大大降低种球生长点内病毒含量。另外应用热处理的时间长短根据不同的植物应慎重决定。据 Hakkaart 和 Quak 报道,在热处理菊花时,时间由10

d 增加到 30 d, 可使无病毒植株百分数由 9% 增加至 90%, 处理 40 d 或更长时间并不能增加无病毒植株数量, 却会显著降低植株存活率。应用热处理脱毒也有一定的局限性, 主要缺点在于并非所有病毒都对热处理敏感。热处理只对那些球状病毒或线状病毒有效, 而对杆状病毒不起作用。

2.2 茎尖分生组织培养脱毒

随着现代生物技术的发展, 人们发现植物的顶端分生组织不受病毒感染, 采用植物茎尖培养可以得到无病毒植株^[1]。根据病毒在植物体内分布不平衡原理, 剥离茎尖的大小与脱毒效果密切相关。据高尚士研究报告, 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^[2]。为脱除病毒, 剥离的茎尖应尽可能小, 茎尖越小脱毒效果越好。但实践表明茎尖越小, 越难分化又不易成活, 污染率也随之升高。赵军良等人的研究表明, 带有一个叶原基的茎尖, 脱毒效果最好, 成活率最高^[3]。不同的植物材料茎尖剥离的方法和最适合脱毒的茎尖大小不同。韩玉琴在康乃馨的茎尖培养中取带有 1~2 个叶原基、长 0.2~0.3 mm 的茎尖接种到培养基上脱毒效果最好^[4]。唐焕伟在菊花的茎尖培养中, 在解剖镜下用解剖刀剥离顶芽至露出带有 1~2 片叶原基的生长点, 生长点大小约在 0.3~0.5 mm 左右, 大于以上尺寸脱毒率将会下降, 反之成活率将会下降^[5]。邓衍明, 褚芳玲等在对滁菊剥离的长度小于 0.7 mm 的茎尖培养出的试管苗进行脱毒效果鉴定时法均没有检出 rAv、PVX、PVY 和 CMV 这 4 种病毒, 从而得出对滁菊试管苗进行热培养后, 完全可以剥离带 2 个以上叶原基的较大的茎尖 (0.5~0.7 mm) 进行脱毒培养^[6]。席梦利等 (2003) 对宜兴百合脱毒培养得出, 接种 0.3~0.5 mm 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^[11]。李进等也通过茎尖培养获得了宜兴百合脱毒组培苗^[12]。崔月花, 张彪等将大小相近 (0.3~0.5 mm) 的唐菖蒲茎尖接种于含有不同浓度的 BA、NAA、2, 4-D 的培养基中培养一段时间后转至含有不同浓度的 PP3 (多效唑)、BA、NAA、2, 4-D 的分化培养基中, 待苗高 5~6 cm 及花后形成小球茎时, 分别随机取 10 g 汁液摩擦接种于心叶烟、千日红等指示植物上均未发现症状, 经 ELISA 及电镜观察后均无病毒存在^[13]。孙振雷, 魏健等对香石竹进行了茎尖分生组织培养及其影响因素的研究结果表明, 将顶芽、带腋芽的茎节、不带腋芽的茎节或茎段分别为外植体, 在 MS+6-BA0.5 mg/L +NAA0.4 mg/L 上培养的丛芽分化率最高, 达到 8.5%, 光照 12 h/d 对香石竹丛芽生长有

利, 可有效去除病毒, 增加繁殖数, 确保遗传性状的稳定, 进而提高切花质量^[14]。茎尖培养可能出现褐化、玻璃化等现象, 严重影响了植物的成活率。玻璃化是植物组织培养过程中特有的一种生理失调或生理病变。吴廷军等在实验中采用强光 10000~20000 lx, 在培养中提高糖和琼脂的浓度, 降低细胞分裂素的用量, 对克服香石竹茎尖培养玻璃化有明显效果^[15]。

2.3 热处理与茎尖分生组织培养相结合脱毒

生产上通常采用热处理结合茎尖培养的脱毒方式, 既可以减少热处理时间, 增加成活率, 采用较大茎尖材料, 提高培养成活率的同时获得较高脱毒率。王丽花、苏艳、杨秀梅等 (2005) 采用热处理结合生长点组织培养极大地提高了香石竹病毒脱除效率, 病毒脱除较为彻底。李文安 (1998) 指出康乃馨茎尖经 38℃ 热处理 2 个月, 可使其病毒完全失活。周正来 (1994) 研究表明, 矮牵牛变温热处理 16d 后再剥取 0.3~0.5 mm 茎尖的脱毒方式优于直接剥取 0.15~0.25 mm 茎尖培养。邓衍明, 褚芳玲等 (2007) 在滁菊茎段诱导培养中, 采用“改良热处理结合茎尖分生组织培养”的方法, 提高了茎尖培养的成活率 (>83%) 和脱毒率 (>42%)^[10]。张艺萍, 屈云慧采用热处理结合茎尖培养的方法, 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+NAA0.5 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%, 取得了较好的脱毒效果。研究表明, 茎尖二次脱毒培养方法简单, 易于操作, 脱毒率高^[16]。席梦利等分别用热空气处理结合茎尖培养和热水处理结合茎尖培养对百合脱毒, 从脱毒效果看, 随着热空气处理或热水处理时间的延长, 脱毒率提高。切取长度 (0.8~1.0 mm) 的茎尖培养, 热空气处理 42 d 后, 脱毒率可达 40%。热水处理 40 min 珠芽再生的试管苗, 脱毒率可达 100%^[11]。有报道, 将直径约 1.5 cm 的风信子种球置于 38℃ 恒温箱内经 50 d 钝化病毒后, 再进行茎尖培养, 可以有效获得风信子无病毒或少毒苗。Espinoza (1991) 将 3cm 高, 已长根的组培苗置于半固体培养基中进行 1 个月的热处理, 然后取茎尖进行培养较好脱除了病毒。

2.4 茎尖微体嫁接脱毒

茎尖微芽嫁接是利用组织培养与嫁接方法相结合的脱毒方式, 其方法是将植株的茎尖作为接穗与离体培养的实生砧木嫁接获得无病毒苗木^[17], 原理与茎尖分生组织培养获得脱毒苗木的原理相同。微芽嫁接法脱毒可以说是茎尖培养脱毒的一种改良方法, 主要

传稳定性及组培苗田间表现等方面进行了研究,已经向规范化、标准化和产业化迈进,相比之下,中国观赏植物脱毒快繁研究无论从广度还是深度上都还存在着较大的差距,快繁技术还缺乏进一步深层次的研究,缺乏系统性。

通过不同脱毒途径获得的无病毒植株还必须经过严格的病毒鉴定和检测手段证明确实是无病毒良种种源,还要采取严密的防病毒重复污染的措施才能取得预期效果。从目前发展趋势来看,观赏植物脱毒仍应以培育无毒苗木、原种为主,而植物组织培养脱毒技术的不断改进和提高以适应大规模的生产已势在必行^[32]。对无毒种质资源的保存技术也有待于进一步改进和提高,建立大规模的无毒苗繁育基地,为生产提供无毒良种种苗,在生产上将会发挥重要作用并取得显著的经济效益^[33]。

参考文献

- [1] 熊丽,吴丽芳.观赏花卉的组织培养与大规模生产[M].北京:化学工业出版社,2003:193-201.
- [2] 张玉清,罗晓芳,田砚亭.葡萄微茎尖培养和葡萄扇叶病毒的ELISA和探针检测[J].北京林业大学学报,1998,20(4):54-58.
- [3] 朱至清.植物细胞工程[M].北京:化学工业出版社,2003:5.
- [4] 朱德蔚.组织培养与脱毒快繁技术[M].北京:国科学技术出版社,2001.
- [5] 王蒂,李友勇.应用生物技术[M].北京:中国农业科技出版社,1997:76-86.
- [6] 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.
- [7] 赵军良.植物茎尖培养与无毒种苗生产[J].北方园艺,1995,(6):10-11.
- [8] 韩玉琴,康乃馨茎尖培养及微繁殖技术[J].北方园艺,1998,(2):78.
- [9] 唐焕伟,张兴等.运用茎尖培养技术进行花卉品质改良[J].北方园艺,2004,(2):62-63.
- [10] 邓衍明,褚芳玲,华如枝.滁菊组织培养脱病毒技术研究[J].安徽农业科学,2007,35(14):4130,4158.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 崔月花,张彪,高红明,等.唐菖蒲茎尖培养脱病毒的研究[J].江苏农业研究,2000,21(4):88-99.
- [14] 孙振雷,魏健,李秀岩.香石竹茎尖分生组织培养的研究[J].安徽农业科学,2006,34(23):6126-6127.
- [15] 吴廷军,周惠民.香石竹茎尖脱毒技术[J].西南园艺,2003,(1):58-61.
- [16] 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.
- [17] 覃兰英,李青,邓世秀,等.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.
- [18] 建德锋,刘洋,孙铭.山定子组培脱毒技术[J].北方园艺,2007,(3):184-18.
- [19] Sanjeev Sharma, Balwinder Singh, et al. In vitro production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV) free kinnow plants employing phytotherapy coupled with shoot tip grafting[J]. Plant Columbia, 2007,43(3):254-256.
- [20] 刘文萍,于世选,韩玉琴,等.唐菖蒲组织培养脱除病毒研究[J].北方园艺,1992,86(6):41-42.
- [21] Thomson A J, et al. The evaluation of potato somaclones. In: Semal J ed. Somaclonal Variations and Crop Improvement. Martnus Nijhoff Publishers, Dordrecht.1986:236-243,
- [22] 高遐红,李梅.提高草莓茎尖组织培养脱毒效果研究[J].中国果树,1994,(2):5-6.
- [23] 周厚成,何水涛.草莓病毒病研究进展[J].果树学报,2003,(5):421-426.
- [24] 高庆玉,李光裕,周恩.关于草莓脱毒技术的研究[J].东北农学院学报,1993,(3):231-23.
- [25] Niimi-Y, Han-Dong Sheng, Fujisaki- M et al. Production of virus-free plantlets by anther culture of Liliun X Enchantment[J]. Scientia-Horticulturae, 2001,90:325-334.
- [26] 李文安.业生物工程[M].北京:化学工业出版社,1998:4.
- [27] 孙琦,张春庆.物脱毒与检测研究进展[J].山东农业大学学报:自然科学版,2003,34(2):307-310.
- [28] 谢嘉华,袁建军.中国水仙(Narcissustazetta var.chinese)的组织培养[J].生物学杂志,2002,19(3):30.
- [29] Engelmann F. Plant cryopreservation: progress and prospects[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 2004,40:427-433.
- [30] Helliot B, Panis B, Poumay Y, et al. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (Musa spp.) [J]. Plant Cell Rep, 2002,20:1117-1122.
- [31] 蔡汉权,李粉玲,林珊珊.花卉脱毒快繁技术研究进展[J].江西科技,2006,(2):15-17.
- [32] 陈泽雄.园艺植物病毒脱毒技术研究进展[J].北方园艺,2007,(3):184-185
- [33] 钟宇,张健,罗承德,等.观赏植物快繁技术研究概况[J].四川农业大学学报,2002,20(3):295-298.