兰州百合脱毒技术研究

刘 芬,王发林*

(甘肃省农业科学院 林果花卉研究所,甘肃 兰州 730070)

摘要:以兰州百合为试材,通过茎尖、鳞片、种子、花丝等外植体培养,花丝培养结合热处理,对百合进行脱毒研究,结果表明,花丝较理想的诱导培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L。花丝诱导出不定芽后,(37±2)℃热处理 28 d,切取(0.9±0.1)mm 茎尖培养,黄瓜花叶病毒(CMV)、百合无症状病毒(LSV)的一次性脱毒率均达 80%以上,效果较好。

关键词:兰州百合;脱毒;组培;热处理;外植体

中图分类号:S644.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-3268(2007)07-0093-03

兰州百合(*Lilium davidii unicolor* Cotton)是食用百合中的优良品种,在国内外享有盛名。但在生产中由于长期采用无性繁殖扩大再生产,以及昆虫传播等因素,使得植株病毒感染很普遍。王发林等^[1]通过病毒检测研究,确定了危害兰州百合的病毒主要有黄瓜花叶病毒(CMV)和百合无症状病毒(LSV),感染率达 100%,且为 2 种病毒复合侵染。病毒感染后表现不同程度的株体矮小、叶色浅黄症状,造成品质下降、减产,严重影响着其经济价值。如何脱除兰州百合主要病毒,恢复其种性,提高产量和品质,成为生产中亟待解决的问题。

对百合脱毒的研究国内外均有报道^[2-6],但有关兰州百合脱毒技术研究及应用至今未见报道。本试验通过种子、茎尖、鳞片、花丝等外植体培养,花丝培养结合热处理,首次对兰州百合进行脱毒研究,以期找到一种适宜的脱毒途径和方法应用于生产。

1 材料和方法

1.1 外植体建立

1.1.1 花丝培养 田间选择 2 年生外观生长正常植株,剪取未开放花蕾(花蕾形成约 12 d),用中性洗涤剂处理后→流水冲洗 20 min→在无菌条件下用 75%的酒精消毒 1 min→再用 0.2%的升汞溶液 15 min 处理灭菌→最后用无菌水冲洗 6~8 次,再用消毒滤纸吸干表面水分,用镊子夹开花瓣,将花丝整段接种于 MS 附加 6-BA, 2,4-D, IBA 及 NAA

等不同浓度激素的培养基上培养。

1.1.2 茎尖培养 田间选择约 8.0 cm 高的外观正常植株,剪取 2.0 cm 茎尖茎段,洗衣粉水浸泡 5 min 后,用自来水冲洗 1 h 后,70%酒精浸泡 30 s,再用 0.1%的 HgCl₂ 溶液 12 min 灭菌处理,最后无菌水冲洗 6 次,解剖镜下切取不同大小茎尖(1.0~1.5 mm, 0.8~1.0 mm, 0.5~0.8 mm, 0.3~0.5 mm, <0.3 mm),分别接种于培养基 A1(MS+6-BA 0.05 mg/L+NAA 0.05 mg/L)上培养。

1.1.3 鳞片培养 选择新鲜、无病斑的鳞茎,除去须根,剥取中层近基端鳞片,用洗衣粉溶液充分洗涤,再用清水冲洗干净,将冲洗净的鳞片用 75%的酒精浸泡 1 min,然后用 0.2%的 HgCl₂ 溶液 14 min 灭菌处理,最后用无菌水冲洗 5 次后,将鳞片切成 5 mm×5 mm 的小块,内面朝上接种于 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基上,每 150 mL 三角瓶接种 8~15 片。

1.1.4 种子培养 挑选饱满种子加入洗涤剂浸泡,流水冲洗 2~3 h,在 75%的酒精浸泡 1 min,再用 0.2%的 HgCl₂ 溶液灭菌处理 12 min,然后用无菌水冲洗 5 次,接种于 1/2MS 培养基上。

1.1.5 花丝诱导不定芽结合热处理 将花丝诱导不定芽,转接于 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2~0.5 mg/L 继代培养基上,置于光照培养箱,32℃下适应 7 d,(37±2)℃热处理 28 d 后,选择生长正常植株,无菌条件下剥取 0.8~1 mm 大小的茎尖,置

收稿日期:2007-01-23

基金项目:甘肃省科学事业费项目(QS022-C31-47)

作者简介:刘 芬(1972-),女,甘肃成县人,助理研究员,硕士,主要从事植物生物技术研究。

通讯作者:王发林(1964-),男,河南南乐人,研究员,博士,主要从事果树育种及栽培方面的研究。

于 A1 培养基上培养 28 d。

将所有培养基在温度 121℃ 下高压灭菌 18 min。培养条件为: 温度 25~28℃, 光强 1500~2000 lx, 光照时间 14 h/d。

1.2 病毒检测

对于茎尖、种子、鳞片、花丝等诱导的不定芽以及花丝诱导不定芽后经热处理后取 0.8~1.0 mm 茎尖, 采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定法(DAS-ELISA)进行 CMV, LSV 病毒检测, 参照古勤生的方法^[7]。病毒试剂: 百合无症状病毒(LSV)及黄瓜花叶病毒(CMV), 包被抗体和酶标抗体, 均为美国 Aagdia 公司产品。

2 结果与分析

2.1 不同激素对比对花丝培养及诱导分化的影响

由表 1 可知, 培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L +2,4-D 0.5~2.0 mg/L 时, 有利于愈伤组织的产生, 愈伤组织的诱导率为 83.33%~93.33%, 但不利于不定芽的分化, 分化率很低, 仅为 0~8.33%,

且出现分化的不定芽颜色淡绿、基部膨大等不正常现象; 采用 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 和 MS+6-BA 1.0 mg/L +NAA 0.5 mg/L 2 种培养基, 尽管愈伤组织诱导率达到 83.33~86.67%, 分化的不定芽长势也较好, 但分化率偏低, 仅为 15%~26.67%; MS+6-BA 1.0 mg/L + IBA 1.0 mg/L 培养基, 愈伤组织诱导率最高, 达 93.33%, 分化率也高, 分化率达到 51.67%, 但分化的不定芽颜色淡绿, 长势弱; MS+6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L 培养基, 愈伤组织诱导率中等, 为 45%, 芽分化率较高, 为 41.67%, 且分化芽色绿, 长势强。

2.2 不同外植体脱毒效果

从表 2 可知, 用种子建立外植体的组培苗, 2 种病毒脱毒率最高, 均为 100%。其次为花丝诱导不定芽经热处理后取 0.8~1.0 mm 茎尖培养, 脱毒率达到 86.49%~89.19%。花丝不定芽的脱毒率居中, 为 43.48%~52.17%。而茎尖脱毒, 随着茎尖的增大, 脱毒率呈下降趋势。茎尖大小在 0.3~0.5 mm 的范围内, LSV 脱毒率可达 52%, CMV 仅

表 1 不同激素对比对花丝培养及诱导分化的影响(63 d)

处理 (mg/L)	接种花丝数 (个)	诱导愈伤组织		不定芽分化数		备注
		诱导数(个)	诱导率(%)	分化数(个)	分化率(%)	
6-BA 0.5+2,4-D 0.5	60	50	83.33	2	3.33	不定芽色淡绿
6-BA 0.5+2,4-D 1.0	60	55	91.67	5	8.33	不定芽基部膨大
6-BA 0.5+2,4-D 2.0	60	56	93.33	0	0.00	愈伤组织上长出气生根
6-BA 0.5+NAA 0.1	60	14	23.33	6	10.00	不定芽长势弱
6-BA 0.5+NAA 0.5	60	50	83.33	9	15.00	不定芽长势正常
6-BA 1.0+NAA 0.5	60	52	86.67	16	26.67	不定芽长势健壮
6-BA 1.0+IBA 0.2	60	22	36.67	15	25.00	不定芽细弱
6-BA 1.0+IBA 0.5	60	27	45.00	25	41.67	不定芽色绿, 长势强
6-BA 1.0+IBA 1.0	60	56	93.33	31	51.67	不定芽色浅绿, 长势纤细

表 2 DAS-ELISA 检测百合不定芽的血清学反应

外植体	样品数(个)	带毒样品数(个)			脱毒率(%)		
		LSV	CMV	LSV+CMV	LSV	CMV	LSV+CMV
茎尖	1.0~1.5 mm	21	21	21	0	0	0
	0.8~1.0 mm	20	1	0	5.0	0	0
	0.5~0.8 mm	26	14	23	46.15	11.53	11.53
	0.3~0.5 mm	25	12	21	52	16	16
鳞片	18	18	18	18	0	0	0
种子	10	0	0	0	100	100	100
花丝	23	11	13	13	52.17	43.48	43.48
花丝诱导结合热处理	37	4	5	5	89.19	86.49	86.49

菊花瘿蚊的综合防治技术

吴仁海^{1,2}, 刘红彦^{1*}, 王飞¹, 鲁传涛¹, 尹新明²

(1. 河南省农业科学院 植物保护研究所, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学 植物保护学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 根据菊花瘿蚊的生活习性, 有针对性地提出了一系列防治措施。冬季培土育苗, 春季提前移栽, 以确保栽种无虫苗木; 苗期摘除虫瘿、适时打顶可在一定程度上减轻下一代虫口数量; 保护寄生蜂越冬、保存和释放越冬寄生蜂是利用有益生物控制瘿蚊发生的良好途径。

关键词: 菊花瘿蚊; 综合治理; 寄生蜂

中图分类号: S435.67 **文献标识码:** B **文章编号:** 1004-3268(2007)07-0095-03

菊花瘿蚊(*Epimigia* sp.)属双翅目瘿蚊科, 对目前大面积栽培的祁菊、怀菊、滁菊、亳菊等药用菊花品种及部分观赏菊花品种危害严重, 在河南、河北、安徽、湖北等地均有发生。菊花瘿蚊以幼虫在菊

花幼嫩部位形成虫瘿危害, 虫瘿为菊花瘿蚊幼虫及蛹提供了良好的庇护场所, 加之其世代重叠严重, 较难防治。为此, 对菊花瘿蚊的生活习性进行了详细的观察, 并探索出一套相应的防治措施。

收稿日期: 2007-02-26

基金项目: 国家科技攻关项目(99-929-03-10); 河南省重大科技攻关项目(0122030900)

作者简介: 吴仁海(1976-), 男, 河南信阳人, 博士, 主要从事害虫综合防治研究。

通讯作者: 刘红彦(1964-), 男, 河南嵩县人, 研究员, 博士, 主要从事中药材无公害防治技术研究。

为16%; 0.5~0.8mm茎尖, 上述2种病毒的脱毒率分别为46.15%和11.53%; 0.8~1.0mm茎尖, 2种病毒的脱毒率分别为5.0%和0.0; 而在1.0~1.5mm时, 2种病毒的脱毒率全为0.0。鳞片2种病毒脱毒率均为0.0。

3 小结与讨论

1) 种子培养试管苗, 脱毒率虽可达100%(这与前人研究的结果, 即大多数植物的种子不带病毒的结论相一致), 但用种子培养的实生苗培育兰州百合, 可能产生变异。而变异的大小和在生产中的应用价值, 有待进一步观察和研究。

2) 仅用花丝培养脱毒, 效果一般。而花丝诱导不定芽热处理结合茎尖培养, 切取长度0.8~1.0mm的茎尖培养, 2种病毒的一次性脱毒率可达到80%以上, 脱毒率较高, 可操作性强, 是一种比较理想的脱毒方法。其结合了花丝培养脱毒和热处理脱毒二者的优点, 可应用于生产。

3) 在剥取大小为0.3~0.8mm进行茎尖培养时, 可脱除部分病毒, 获得一定数量的脱毒不定芽, 但脱毒率低, 况且茎尖培养需依赖解剖镜, 操作难度大, 微小茎尖接种后又难以成活, 此法一般不易使

用。鳞片不定芽未能脱除病毒, 其原因需进一步探讨。

4) 花丝较适宜的诱导培养基为MS+6-BA 1.0mg/L+IBA 0.5mg/L。

参考文献:

- [1] 王发林, 古勤生, 刘芬, 等. 兰州百合病毒病原的 DAS-ELISA 检测[J]. 云南农业大学学报, 2003, 18(4): 106-107.
- [2] 李世润, 黄粤. 园艺植物脱毒研究进展[J]. 农牧情报研究, 1992(2): 36-40.
- [3] 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.
- [4] 董淑英, 位绍文, 孙静, 等. 苹果脱毒方法的比较研究[J]. 莱阳农学院学报, 2002, 19(2): 112-115.
- [5] 赵祥云, 程康, 邢尤美, 等. 百合株芽组培及脱毒研究[J]. 园艺学报, 1993, 20(3): 284-288.
- [6] 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.
- [7] 古勤生, P Roggero, R Lenzi, 等. 北方地区小西葫芦黄花叶病毒的酶联检测和西瓜品种抗病性鉴定[J]. 果树学报, 2002, 19(3): 184-187.