

植物组织培养脱毒方法综述

符国芳, 李 青

(北京林业大学, 北京 100083)

摘要: 植物病毒是制约花卉产业发展的重要因素, 通过茎尖处理、茎尖结合热处理、冷处理、化学药剂处理及愈伤组织处理等方法可以去除植物病毒。通过查阅国内外研究文献和资料, 综合阐述了茎尖培养脱毒、热处理脱毒、化学药剂培养脱毒、愈伤组织脱毒、冷处理脱毒等方法。

关键词: 组织培养; 脱毒; 茎尖培养

中图分类号: S432.4⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7351(2007)03-0255-04

Summarization on the methods of virus elimination by plant tissue culture

FU Guo-fang, LI Qing

(Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: Plant virus is the factor that inhibits flower industry development. Plant virus can be eliminated by shoot-tip treatment, shoot-tip and heat treatment, cold treatment, chemical treatment and callus treatment, so on. By searching the research bibliographies home and abroad, this paper describes the methods to eliminate virus by shoot-tip culture, heat treatment, chemical treatment, callus treatment and cold treatment, so on.

Key words: tissue culture; virus elimination; shoot-tip culture

植物病毒分布广、危害大, 对世界花卉产业的发展产生了巨大的冲击。近年来, 随着我国从国外引种花卉的种植面积的扩大以及不规范的繁殖技术, 病毒病开始流行, 严重影响了中国花卉产业的发展。目前国内外多用组织培养脱毒方法来阻止病毒病的继续传播以便提高植物的产量和质量。因此, 本文对当前植物组织培养脱病毒方法作了综述, 以期从中得到启示, 进一步促进植物脱毒方法及应用的相关研究。

植物组织培养脱毒方法有茎尖培养脱毒、热处理脱毒、冷处理脱毒、化学药剂处理脱毒、花药培养脱毒、愈伤组织脱毒、珠心胚培养脱毒、茎尖微体嫁接脱毒等, 其中由于茎尖培养脱毒效果好, 是目前植物无病毒苗培育应用最广泛、最重要的一个途径^[1]。研究表明, 如果将不同的方法结合起来应用效果会更好, 通常将茎尖结合热处理来脱毒。

1 茎尖培养脱毒

茎尖培养脱毒原理: 在染病毒植株体内, 病毒分布并不均匀, 在生长点病毒含量最低。病毒通过维管束和胞间连丝传播, 在分生区内无维管束, 病毒扩散慢, 加之植物细胞不断分裂增生, 所以病毒含量少, 在茎尖生长点几乎检测不出病毒, 因此切取茎尖愈小愈好, 但实际操作中茎尖取太小不易培养成活, 过大又不能去毒^[2]。

1.1 茎尖培养的方法及注意事项

将消毒后的材料放置在 20~40 倍解剖显微镜下, 用解剖刀剥取 0.1~1 mm 的茎尖, 迅速放入培养基中, 如果在空气中暴露时间过长, 就会因失水引起茎尖死亡。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取的方法和最适合脱毒的茎尖大小不同。在菊花的茎尖培养中, 在超净工作台内将消毒后的茎尖中用肉眼能看到的叶柄切除, 在实体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, 迅速将摘出的生长点置于培养基中^[4]。就香石竹而言, 切掉叶柄后,

收稿日期: 2007-01-08; 修回日期: 2007-03-15

作者简介: 符国芳(1982-), 女(土家族), 湖南张家界人, 北京林业大学硕士研究生, 从事园林植物组织培养研究。

生长点是在几重叶原基的包围下,要从外到内逐一切掉外层叶原基,当生长点露出时把包括 1~2 片叶原基在内的生长点切下,迅速移入事先预备好的培养基内,注意生长点的方向及不要把生长点埋在培养基内^[5]。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,接种时只须沾取茎尖置于轻轻划破的培养基表面即可^[6]。洋葱可用 0.5~0.7 mm 茎尖培养,能有效地脱除洋葱中的 O YDV 和 GLV 病毒^[7]。在对白葱的茎尖脱毒研究表明,以带有 1 片叶原基大小为 0.2~0.6 mm 的茎尖外植体较为适宜^[8]。

1.2 茎尖培养可能出现的问题及防治方法

茎尖培养可能出现褐化、玻璃化等现象,这会严重影响植物的成活率,所以必须解决这些问题。褐化是由于外植体在培养过程中分泌的酚、醌类物质妨碍自身的生长,而活性炭可以吸附外植体在培养过程中的有害物质,从而达到防止褐化的目的。在香蕉茎尖培养的培养基中加入活性炭或与维生素 C 配合使用均能改善外植体褐变情况^[9]。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,很难继续用作继代培养和扩繁材料,生根困难,移栽后也很难成活。实验表明,采用强光 10 000~20 000 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^[10]。

2 热处理脱毒

热处理的原理是病毒由蛋白质组成,高温可以使蛋白质变性,所以通过高温钝化病毒。热处理的材料可以是母株(已长芽的块茎),也可以是已经剥离的已长到 1 cm 左右的小植株^[11]。高温热处理是在恒温箱内进行,将籽球或小苗放入恒温箱中,起点温度可稍低些,逐渐升至处理温度,一般在 35~54℃ 条件下热处理几小时、几天甚至几个月^[12]。

热处理通常与茎尖培养相结合脱毒,对于单用茎尖或热疗法难以脱除的病毒,可先进行热力处理,使植株茎尖无毒化,再采用茎尖组织培养法,这样可以提高脱毒成功的几率^[13]。赵祝成等人用水仙 0.2~0.3 mm 微茎尖培养、37±1℃ 热力处理 30 d,可以有效脱除水仙病毒^[16]。香石竹置于 38℃ 环境中 60 d,其茎尖中的病毒即可被消除^[10]。在热处理茎尖的过程中,通常温度越高、时间越长、脱毒效果就越好,但是同时植物的生存率却呈下降趋势^[14],所以温度选择应当考虑脱毒效果和植物耐性 2 个方面。洪霓等在梨病毒的脱毒研究中采用 2 种处理,一为恒温处理,温度控制在 37±1℃;二为变温处理,温度为 32℃ 和 38℃ 每隔 8 h 变换 1 次,发现变温处理比恒温处理植株死亡率低,脱毒效率高^[15]。

热处理的缺陷是不能脱除所有病毒。例如在侵染马铃薯的病毒之中,对于 PLRV、PVA 和 PVY 不进行高温预处理,脱毒率也相当高,而高温预处理却可以显著提高对 PAMV、PVX 和 PVS 的去除^[17]。一般而言,对于球状病毒和类似纹状的病毒以及类菌质体所导致的病害才有效,对杆状和线状病毒的作用不大。

3 化学药剂处理脱毒

其原理是抗病毒药剂在三磷酸状态下会阻止病毒 RNA 帽子结构形成^[19]。常用的抗病毒化学药物有三氮唑核苷(病毒唑),5-二氢尿嘧啶(DHT)和双乙酰-二氢-5-氮尿嘧啶(DA-DHT),环己酰胺,放线菌素-D,碱性孔雀绿等^[20]。其中病毒唑是广谱性抗病毒药物,早在 20 世纪 70 年代末和 80 年代初,国外一些科学家就将这种抗动物病毒的药物应用于植物,成功地脱去了马铃薯 X 病毒、黄瓜花叶病毒和苜蓿花叶病毒等^[21]。

化学治疗剂常常加到植株生长的培养基上,能提高培养基中去除病毒的能力,可以显著提高产生无病毒植株的百分率^[21]。目前采用病毒抑制剂与茎尖培养相结合的脱毒方法,可以较容易地脱除多种病毒,而且这种方法对取材要求不严,接种茎尖可大于 1 mm,易于分化出苗,提高存活率^[22]。谢嘉华等人的研究表明,三氮唑核苷对黄瓜花叶病毒、马铃薯 X 病毒、烟草花叶病毒等多种病毒的增殖有抑制作用,用添加三氮唑核苷的培养基培养带毒植株一段时间(2~3 个月)后,取萌发的顶芽移植到不含三氮唑核苷的培养基中继代培养,可增加产生无病毒后代植株的百分率^[23]。根据尚佑芬等人的报道,培养基未加药剂处

理的茎尖苗脱毒率为 33.3%, 添加 1.5% TS 病毒钝化剂处理后脱毒率提高 49.5%^[24]。一些植物生长激素如 NAA、BAP 对降低百合外植体中病毒浓度也有一定效果(Chavdarov 1995)。也有将茎尖培养与热处理、化学药剂处理相结合来脱毒的, 在 MS 培养基上, 附加 5 mg·L⁻¹ 病毒唑培养唐菖蒲, 再经 38~40℃ 热处理, 切取微茎尖 2 次, 去除了危害唐菖蒲的 3 种主要病毒 TMV、CMV 和 TVY^[25]。

4 愈伤组织脱毒

愈伤组织脱毒已获成功的有草莓、唐菖蒲、老鹳草等^[26]。愈伤组织脱毒的原理是愈伤组织的某些细胞不带病毒, 这是由于病毒的复制速度赶不上细胞的增殖速度, 或者是有些细胞通过突变获得了抗病毒的抗性。方法是通过花卉各种器官或组织诱导产生愈伤组织, 然后从愈伤组织再诱导分化产生芽, 长成小植株, 可以得到无病毒苗。刘文萍等人用唐菖蒲花蕾进行离体培养, 可脱除烟草花叶病毒, 脱毒率为 60%^[27]。枸杞的花药可以诱导出愈伤组织, 从而脱毒^[28]。这种方法的缺陷是植株遗传性不稳定, 可能会产生变异植株, 并且一些植物的愈伤组织尚不能产生再生植株。

5 冷处理脱毒

低温处理脱毒的原理目前还不清楚, 这方面的报道也不多见。菊花植株在 5℃ 条件下经 4~5 个月处理后, 切取茎尖进行培养可除去菊花矮化病毒(CSV)和菊花褪绿斑驳病毒(CCMV)^[18]。从理论上来说可以利用超低温进行脱毒处理, 其原理是易感病毒的大细胞内含水量大, 在超低温处理的过程中易受冻害而死亡, 而不含病毒的小茎尖容易成活, 分化成芽, 长成脱毒苗。但是目前暂时还没有这方面的报道。

6 其他方法脱毒

利用高浓度二氧化碳和高温短期处理的方法脱去病毒, 在葡萄上已初见成效^[29]。微体嫁接的原理将 0.1~0.2 mm 的茎尖作为接穗, 嫁接到由试管中培养出来的无菌实生砧木上, 继续进行试管培养, 愈合成为完整的植株, 这在桃、柑橘、苹果等果树上已获得成功, 并且有的已在生产上应用。日本用柑桔茎尖微嫁接繁殖无病毒柑桔营养系, 美国用此方法使苹果无病毒苗工厂化育苗, 并在全国普遍开展。

7 前景展望

从上述脱毒方法可以看出, 必须从 2 方面来考虑脱毒问题: 一是杀死病毒的方法, 二是植物本身的性质。首先是杀死病毒的方法, 目前应用的有高温、低温、超低温和化学药剂等, 在应用时要考虑植物的临界温度及对化学药剂的抗性。其中, 由于化学药剂的选择范围广, 对不同植物脱毒效果不同, 且目前研究的报道较少, 所以这方面还有待进一步的研究。还有很多杀毒方法可以尝试, 如紫外线、pH, 在研究这些方法时同样要考虑植物性质。其次是植物本身的性质, 在植物体的某些特定部位病毒分布较少甚至没有, 对这些部位进行组织培养可获得无毒植株, 如茎尖脱毒处理和愈伤组织处理。

目前植物脱病毒方面的报道主要集中在茎尖和热处理这 2 个方面, 其他方面的进展报告较少, 本文较为全面地概括了植物脱毒的各种可行方法, 希望能够在在此基础上拓展思维, 采用更多方法来推动植物脱毒技术的发展, 从而阻止植物病毒的扩散, 提高植物的品质, 促进整个花卉产业的繁荣。

参考文献:

- [1]葛胜娟. 植物组织培养中的快繁与脱毒技术及其应用[J]. 中国农学通报, 2005, 5(21): 104-108.
- [2]冷肖荀. 花卉茎尖培养脱毒与检测[J]. 生物学通报, 2003, 38(3): 14.
- [3]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.
- [4]唐焕伟. 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.
- [5]黄宇翔, 李章汀, 张晓耕. 香石竹茎尖试管苗继代培养玻璃化现象的研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(3): 81-83, 171.
- [6]韩玉琴. 康乃馨茎尖培养及微繁殖技术[J]. 北方园艺, 1998(2): 78.

- [7] Sako I, Takam I T. Mass propagation of virus free seedless Welsh onion (cv. Bozush irazu) by meristem tip culture[J]. Nihon SakyuGakkaishi, 1994, 41 (1): 13-20.
- [8] 杜永芹, 朱建忠, 沈卫平. 嘉定白蒜茎尖脱毒技术研究[J]. 上海农业学报, 2004, 20(1): 9-12.
- [9] 黄霞, 黄学林. 防止香蕉茎尖培养中外植体褐变的研究(简报)[J]. 广西植物, 1999, 19(1): 78-80.
- [10] 吴延军, 周惠民. 香石竹茎尖脱毒技术[J]. 西南园艺, 2003(1): 58-61.
- [11] 孙秀梅. 马铃薯茎尖剥离脱毒效果的影响因素分析[J]. 中国马铃薯, 2005(4): 42-45.
- [12] 黄子锋. 球根花卉病毒病及脱毒的研究进展[J]. 广西农业生物科学, 2001(3): 215-219.
- [13] 谢嘉华, 袁建军. 花卉脱毒培养与优质种苗生产[J]. 生物学杂志, 2001, 18(5): 37-38.
- [14] 王凤兰, 周厚高, 宁云芬, 等. 球根花卉病毒病及脱毒的研究进展[J]. 广西农业生物科学, 2001, 20(3): 215-220.
- [15] 洪宽, 王国平, 张尊平, 等. 梨病毒脱除技术研究[J]. 中国果树, 1995(4): 5-7.
- [16] 赵祝成, 陈燕贤. 中国水仙脱毒种苗培育研究取得重大突破[J]. 中国花卉园艺, 2003(1): 33.
- [17] 张辅达, 孙宪昀. 马铃薯茎尖培养脱毒研究进展[J]. 中国马铃薯, 2004, 18(1): 35-38.
- [18] 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.
- [19] Dawson W O, Lozoya - Saldama H. Examination of the mode of ribavirin against tobacco mosaic virus[J]. Intervirology, 1984, 22: 77-84.
- [20] Lizarraga C, Fernandez - Northcote E N. Detection of potato viruses X and Y in sap extracts by a modified indirect enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes(NCM-ELISA) [J]. Plant Disease, 1989, 73: 11-14.
- [21] 刘卫平, 李玉华, 孙秀梅. 马铃薯离体茎尖生长点对几种培养因子的生长反应[J]. 中国马铃薯, 2001(2): 82.
- [22] 孙琦, 张春庆. 植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.
- [23] 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.
- [24] 李昌禹, 郭太君, 焦培娟, 等. 唐菖蒲组培脱毒技术研究[J]. 园艺学报, 2003, 3(30): 358-360.
- [25] 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): 33-36.
- [26] 许智宏. 植物生物技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 69-79, 244-264, 348-361.
- [27] 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.
- [28] 曹有龙, 唐琳, 颜飏, 等. 枸杞脱毒苗的诱导及光合特性的分析研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2001, 38(4): 550-553.
- [29] 杨俊玲, 侯义龙, 李雄. 果树脱毒及病毒检测技术的研究进展[J]. 中国水土保持, 2004(3): 17-19.

2008年《林业科技开发》杂志征订启事

《林业科技开发》杂志是由南京林业大学与国家林业局科技司等联合主办的国家级林业技术期刊, 是国家林业局重点扶持期刊, 她以实用性强、信息量大的特点而深受广大林业科技工作者喜爱。该刊已被列入“中国科技核心期刊”和“中国林业核心期刊”等, 并已被《中国科技期刊全文数据库》、《中国科技期刊电子版》、《中文科技期刊数据库》、《中国科学引文数据库来源期刊》、《中国学术期刊综合评价数据库》等收录。本刊自2001年起, 连续两次被评为江苏省一级期刊。

本刊于1987年3月由国家林业局科技司与南京林业大学创办, 坚持以“面向全国、注重开发、推广成果、服务生产”为办刊宗旨, 并逐步形成综合性广、实用性强、信息量大的编辑特色。报道内容包括: 经济林、用材林、防护林、园林绿化以及木竹材加工、人造板制造方面的最新成果与经验, 同时提供各种信息服务, 如最新专利的介绍、科技鉴定消息、林木种苗信息等。主要栏目有: 专论综述、应用研究、技术开发、生产经验、地方林业、风景园林、经营管理、专利介绍、信息快递、种苗商情等。

本刊适合于从事林业科研、技术开发、生产经营、行政管理等各类人员阅读参考, 同时对木材加工企业、林业院校的师生有很强的指导作用。

本刊目前为双月刊, 大16K, 120页, 公开发行, 国内刊号CN32-1160/S, 国际刊号: ISSN1000-8101, 邮局发行代号28-103, 单价: 10元/册, 全年60元, 逢单月25日出版。

欢迎各位读者到当地邮局(所)订阅, 若订阅不便或错过征订期, 亦可直接向本刊发行部订阅。

本刊地址: 南京市龙蟠路159号南京林业大学内

邮编: 210037; 电话: (025)85427227, 85427298(传真)

E-mail: lkkf@vip.163.com

网址: lkkf.chinajournal.net.cn www.lkkf.cn