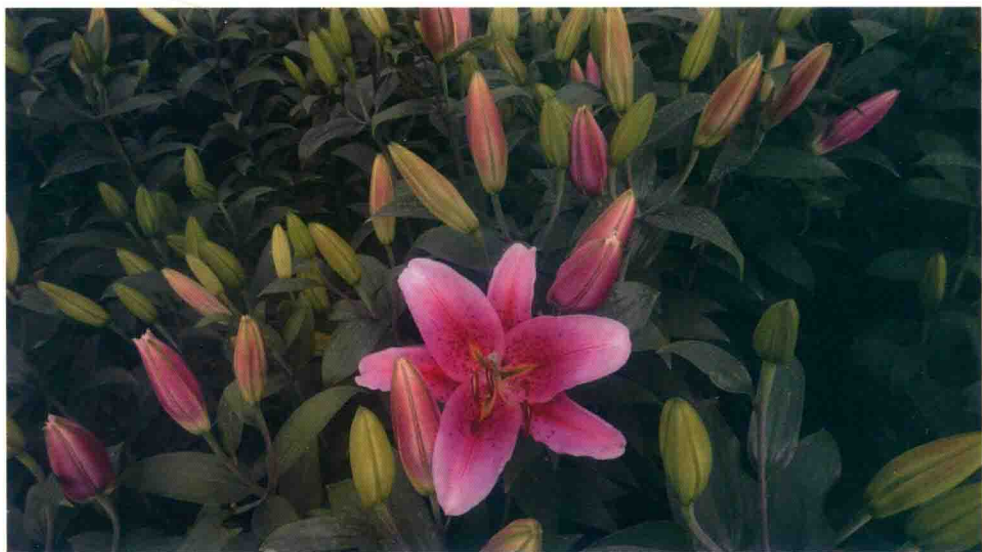




现代生物农业·植物科学

百合抗病细胞 工程育种与实践

张艺萍 王继华 何月秋 主编



非外借



科学出版社

百合抗病细胞工程育种与实践

张艺萍 王继华 何月秋 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

由尖孢镰刀菌百合专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*)引起的百合枯萎病是百合切花种植和种球繁育过程中经常发生的主要病害。目前培育并合理利用抗尖孢镰刀菌百合枯萎病的新优品种是防治该病经济有效的方法。百合由于育种周期长,抗病品种选育进展迟缓,利用细胞无性系变异和将病原菌毒素加入培养基中筛选抗病性种质是选育抗病品种的有效手段,但在花卉上的应用较少,而对其抗病机制的深入研究也鲜见报道。本书以筛选抗病无性系为例,主要是通过培养百合细胞无性系并进行尖孢镰刀菌百合专化型毒素粗提液加压筛选获得东方百合品种‘卡萨布兰卡’(‘Casa Blanca’)的抗病无性系,同时以正常生长的‘Casa Blanca’组培苗即感病无性系为对照,从组织细胞学水平、生理生化水平及分子水平上探讨其抗病机制。

本书可供从事观赏园艺工作的科研工作者、观赏园艺专业的研究生参考。

图书在版编目(CIP)数据

百合抗病细胞工程育种与实践 / 张艺萍, 王继华, 何月秋主编. —北京: 科学出版社, 2019.6

ISBN 978-7-03-061512-1

I. ①百… II. ①张… ②王… ③何… III. ①百合-抗病育种-细胞工程-研究 IV. ①S682.203.6

中国版本图书馆CIP数据核字(2019)第108542号

责任编辑: 李 迪 侯彩霞 / 责任校对: 李 影

责任印制: 吴兆东 / 封面设计: 刘新新

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京虎彩文化传播有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2019年6月第 一 版 开本: 720×1000 1/16

2019年6月第一次印刷 印张: 9 1/4

字数: 176 000

定价: 98.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《百合抗病细胞工程育种与实践》

编委会名单

主 编	张艺萍	王继华	何月秋
副主编	瞿素萍	汤东生	杨秀梅
参编人员	许 凤	王丽花	苏 艳
	张丽芳	邹 凌	唐艺榕
	李慧敏	张 颢	李绅崇
	周旭红	黎 霞	杨 维

前 言

百合是深受人们喜爱的花卉作物之一，可以作为切花、盆花、庭院花卉，还可以作为花海布置的主要花卉之一。百合生产占据世界球根花卉第一位，但病虫害问题成为阻碍百合品质的主要因素，其中由尖孢镰刀菌百合专化型(*Fusarium oxysporum* f.sp. *lilii*)引起的百合枯萎病是百合切花种植和种球繁育过程中经常发生的主要病害。目前最经济有效的防治方法是培育和合理利用抗百合尖孢镰刀菌枯萎病的新优品种。由于百合育种周期长，抗病品种选育进展迟缓，利用细胞无性系变异及将病原菌毒素加入培养基中筛选抗病性种质成为选育抗病品种的有效手段。然而，这一方法在花卉抗病育种方面应用较少，加入毒素胁迫提高抗病性的机制研究也鲜见报道。

近十年来，笔者一直致力于百合尖孢镰刀菌枯萎病的研究，收集和评价百合花卉资源的抗病性，培养百合细胞无性系，开展尖孢镰刀菌百合专化型粗毒素胁迫筛选抗病无性系，以正常生长的‘卡萨布兰卡’组培苗即感病无性系为对照，从组织细胞学水平、生理生化水平及分子水平上探讨其抗病机制。全书共分为 7 章，即：绪论；百合悬浮细胞系的建立；百合抗尖孢镰刀菌细胞突变系的筛选；百合抗尖孢镰刀菌细胞突变系的组织细胞学抗性；百合抗尖孢镰刀菌细胞突变系的生化抗性；百合抗尖孢镰刀菌细胞突变系的转录组分析；百合抗尖孢镰刀菌细胞突变系的蛋白质组分析。

本书得到了国家自然科学基金项目“百合抗尖孢镰刀菌细胞突变系抗病机制的研究”(31260484)和云南省科技人才和平台计划(2017HB083)的资助和支持，在此特别表示感谢！

在编写过程中，尽管编者已尽最大努力，但限于学术水平及写作水平，不足之处在所难免，敬请读者批评指正并提出宝贵意见，以便今后修正、完善和提高。

著 者

2018 年 11 月

目 录

前言

第 1 章 绪论	1
1.1 百合枯萎病	1
1.1.1 症状和特点	1
1.1.2 病原	2
1.1.3 发病规律	5
1.1.4 综合防治	5
1.2 体细胞无性系诱变筛选抗病种质的相关进展	8
1.2.1 体细胞无性系变异	8
1.2.2 离体筛选的原理、程序和选择方法	8
1.2.3 离体诱变育种	9
1.3 百合组织培养研究进展	14
1.4 植物细胞悬浮培养技术研究进展	15
1.4.1 愈伤组织的诱导	15
1.4.2 影响悬浮细胞系建立的因子	16
1.5 尖孢镰刀菌抗性机制的研究进展	17
1.5.1 尖孢镰刀菌抗性机制的细胞学研究	17
1.5.2 尖孢镰刀菌抗性机制的生理学研究	18
1.5.3 尖孢镰刀菌抗性机制的分子基础研究	19
1.6 尖孢镰刀菌毒素作用机制的研究	22
第 2 章 百合悬浮细胞系的建立	25
2.1 悬浮细胞系的初始建立	25
2.2 继代次数与细胞形态之间的关系	26
2.3 关于百合细胞悬浮培养的讨论	26
第 3 章 百合抗尖孢镰刀菌细胞突变系的筛选	28
3.1 尖孢镰刀菌百合专化型毒素粗提液的活性和筛选压的确定	29
3.1.1 尖孢镰刀菌百合专化型毒素粗提液的活性	29
3.1.2 筛选压的确定	31
3.2 百合抗尖孢镰刀菌枯萎病无性系的筛选	31
3.3 百合抗尖孢镰刀菌枯萎病无性系的抗病性鉴定	32

3.4	关于筛选抗病无性系的讨论	34
3.4.1	真菌毒素及其筛选技术	34
3.4.2	突变体的鉴定技术	34
第4章	百合抗尖孢镰刀菌细胞突变系的组织细胞学抗性	35
4.1	抗病无性系和感病无性系的根部结构	35
4.2	抗病无性系和感病无性系在接种以后根部的细胞超微结构变化	36
4.3	关于抗病无性系组织抗性的讨论	40
第5章	百合抗尖孢镰刀菌细胞突变系的生化抗性	41
5.1	抗病无性系和感病无性系的 POD 活性变化	42
5.2	抗病无性系和感病无性系的 PAL 活性变化	42
5.3	抗病无性系和感病无性系的 PPO 活性变化	43
5.4	抗病无性系和感病无性系的 β -1,3-葡聚糖酶活性变化	44
5.5	抗病无性系和感病无性系的几丁质酶活性变化	44
5.6	关于抗病无性系生理抗性的讨论	45
第6章	百合抗尖孢镰刀菌细胞突变系的转录组分析	46
6.1	样品总 RNA 提取质量分析	46
6.2	测序结果统计分析	47
6.3	组装结果统计和评估	50
6.3.1	组装结果统计	50
6.3.2	组装结果评估	50
6.4	Unigene 的功能注释	52
6.4.1	ORF 预测	52
6.4.2	SSR 分析	52
6.4.3	差异表达基因聚类	52
6.5	SSR 分析	57
6.6	百合抗病无性系和感病无性系及不同接种时间点差异基因分析	57
6.6.1	百合抗病无性系和感病无性系两分组差异基因筛选	57
6.6.2	差异基因功能注释及分类	59
6.7	Q-PCR 验证	64
6.8	关于转录组测序技术的应用	65
6.9	关于 Unigene 的生物信息学的注释	67
6.10	抗病性相关代谢路径及差异基因分析	67
6.10.1	寄主植物激素信号转导途径	67
6.10.2	寄主植物与病原菌互作	68
6.10.3	细胞壁防卫抗病途径	68

第 7 章 百合抗尖孢镰刀菌细胞突变系的蛋白质组分析	70
7.1 蛋白质双向电泳技术的建立	71
7.1.1 百合总蛋白质的提取方法	71
7.1.2 蛋白质定量	71
7.1.3 蛋白质质量检测	72
7.1.4 双向电泳	72
7.1.5 染色及图像采集分析	72
7.1.6 百合总蛋白质提取方法的比较	73
7.1.7 百合总蛋白质双向电泳上样量的优化	74
7.1.8 百合总蛋白质除盐时间的优化	75
7.2 百合双向电泳差异蛋白质组分析	76
7.2.1 百合叶片总蛋白质的提取、定量	76
7.2.2 差异蛋白点处理及质谱分析	76
7.2.3 数据库检索	76
7.2.4 百合抗病无性系和感病无性系的双向电泳图谱分析	77
7.2.5 百合抗病无性系和感病无性系的蛋白质功能鉴定及丰度变化分析	83
7.3 iTRAQ 蛋白质组分析	83
7.3.1 蛋白质的提取、浓度测定及检测	83
7.3.2 iTRAQ 标记分析	84
7.3.3 差异蛋白分析	86
7.3.4 GO 功能分类富集分析	87
7.3.5 代谢途径分析	90
7.4 关于百合蛋白质提取及双向电泳技术优化的问题	94
7.5 百合蛋白质双向电泳差异蛋白的抗病性	95
7.5.1 光合作用和能量代谢相关蛋白参与百合的防卫反应	95
7.5.2 防卫反应相关蛋白是抗病的关键因素	96
7.5.3 可能与百合抗病无性系抗病性相关的其他蛋白质	96
7.6 关于 iTRAQ 蛋白质组分析的问题	96
参考文献	98
附表	116

第1章 绪论

据农业部(现农业农村部)种植业管理司公布的 2016 年全国花卉统计数据^①显示,全国花卉生产总面积为 132.91 万 hm^2 , 全国花卉销售总额 1616.49 亿元, 出口额 5.94 亿美元。其中鲜切花栽培面积 6.46 万 hm^2 , 销售额 143.51 亿元, 出口额 2.83 亿美元。鲜切花中的百合销售单价达 2.45 元/支。据云南省农业厅(现农业农村部)统计数据显示, 2016 年全省花卉栽培面积达 132.5 万亩^②, 花卉总产值达 463.7 亿元, 花农的收入达 115 亿元。云南全省鲜切花栽培面积 20.9 万亩、产量 100.6 亿支、产值 68.6 亿元。百合(*Lilium* spp.)是百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)多年生草本植物。百合是切花、盆栽和庭院绿化的名贵花卉。在园林造景中, 适合用于专类园的打造, 利用不同系列、自然花期差异及种与品种间花色的变化, 可以做到自 5 月中下旬至 8 月中下旬的 3 个月里花开不断。因此, 近年来百合的生产和消费呈现逐年增长的趋势。仅 2016 年 1~11 月, 昆明斗南花卉批发市场上, 百合上市量达 1.3 亿支, 均价为 3.97 元/支, 可见百合鲜切花很受消费者的欢迎。

我国百合生产规模虽然不断扩大, 但由于用于切花生产的百合种球质量参差不齐, 加之生产水平和技术落后, 病虫害问题一直是制约切花百合质量提升的重要因素之一。由尖孢镰刀菌百合专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*)引起的百合鳞茎基盘褐化死亡、鳞片腐烂、从基盘散落, 种球品质降低, 引起地上部枯萎, 鲜切花产量下降, 品质降低(潘其云等, 2004)。该病在全球百合种植区域内都有发生和为害的报道(Van Heusden et al., 2002)。尖孢镰刀菌是一种在许多作物上引起枯萎、腐烂症状病害的土传病原真菌, 很难有效控制, 目前筛选抗病性种质是防治尖孢镰刀菌百合枯萎病的有效途径。

1.1 百合枯萎病

1.1.1 症状和特点

百合枯萎病发生时, 尖孢镰刀菌从百合的根部或种球基盘的伤口侵入, 引起百合肉质根和种球基盘褐化、腐烂, 并逐渐向上扩展。鳞片上的病斑呈褐色并凹陷, 而后变成黄褐色并逐渐腐烂。后期鳞片从基盘散开而剥落。由感染尖孢镰刀菌百合枯萎病的种球长出的植株明显矮化, 受害叶片呈牛皮纸样, 植株上的叶片

^① 1 亩 \approx 666.7 m^2

由上而下黄化或变紫，茎秆自下而上逐渐枯萎，最后整个植株枯萎而死(图 1-1)。病株茎秆的维管束变褐。发病严重的则茎基部缢缩易折断。在百合种球贮存及运输的过程中，该病还会持续为害，引起鳞茎腐烂。在湿度大的时候，可在发病部位看到粉红色或粉白色的霉层(边小荣，2016)。

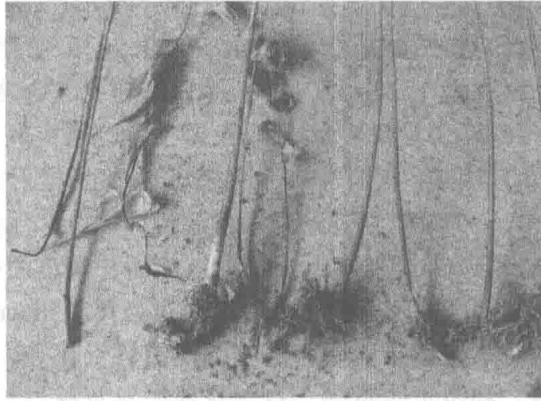


图 1-1 百合枯萎病症状(彩图请扫封底二维码)

1.1.2 病原

1.1.2.1 病原菌种类

百合枯萎病的主要病原真菌是尖孢镰刀菌百合专化型(*F. oxysporum* f. sp. *lilii*) (图 1-2)，其次还有茄腐皮镰刀菌(*F. solani*)、串珠镰刀菌[*F. moniliforme*, 新命名为拟轮枝镰孢菌(*F. verticilliodes*)]、三线镰刀菌(*F. tricinctum*)、烟草镰刀菌(*F. tabacinum*)、禾谷镰刀菌(*F. graminearum*) (王祥会等, 2005; 杨秀梅等, 2010a; 叶世森等, 2005; 赵彦杰, 2005)。

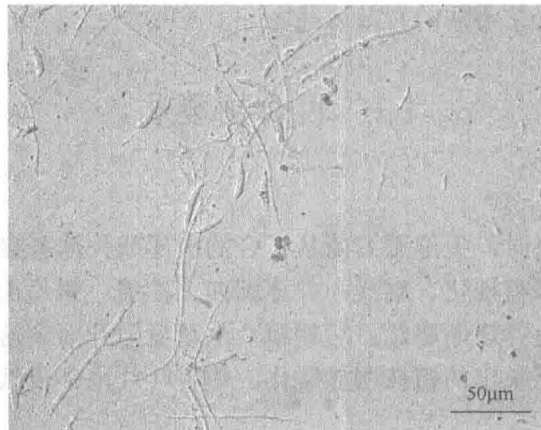


图 1-2 尖孢镰刀菌百合专化型的形态特征

大量研究发现,百合枯萎病的病原真菌是一个致病菌的群体,并且不同区域的病原真菌并不完全相同,然而都会有一个主要的致病菌。有学者报道,兰州百合的枯萎病病原真菌是尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、串珠镰刀菌[*F. moniliforme*, 新命名为拟轮枝镰孢菌(*F. verticilliodes*)]和茄腐皮镰刀菌(*F. solani*),但主要的致病菌是尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*) (李诚等,1996)。还有学者发现龙牙百合枯萎病的病原真菌是尖孢镰刀菌和茄腐皮镰刀菌,但主要的致病菌是尖孢镰刀菌(朱海燕,2012)。还有学者认为多种镰刀菌(*Fusarium* ssp.)真菌都能引起百合枯萎病(毛军需和李有,2007)。

1.1.2.2 病原菌的形态特征

尖孢镰刀菌:菌丝呈绒状,色洁白且丰厚,在马铃薯蔗糖琼脂(potato sucrose agar, PSA)培养基上生长4天的菌落直径为3.1cm,产孢细胞短,单瓶梗,培养物牵牛紫色。小型分生孢子为卵圆形,数量较多,其大小为(4.2~11.1) μm ×(2.5~3.4) μm 。大型分生孢子为月牙形,稍弯,向两端均匀变尖,一般3~5隔,多数3隔,大小为(12.3~37.0) μm ×(3.0~6.0) μm 。厚垣孢子多球形,直径为9.4~13.5 μm 。间生或顶生,未见有性阶段(赵彦杰等,2005)。

茄腐皮镰刀菌:气生菌丝绒状,黄色,菌落繁茂。在PSA培养基上生长4天的菌落直径为3.7cm。产孢细胞长,单瓶梗。小型分生孢子为长椭圆形或长卵圆形,其数量较多,大小为(5.5~12.3) μm ×(2.8~4.0) μm 。大型分生孢子镰刀形,两端较钝,顶胞稍尖,多半为3隔,大小为(13.0~42.3) μm ×(4.0~7.0) μm 。厚垣孢子多为球形,表面粗糙或光滑,直径在7.0~9.2 μm ,顶生或间生,未见有性阶段(赵彦杰等,2005)。

禾谷镰刀菌:病原菌菌落红色,边缘整齐,菌丝白色,棉絮状,大型分生孢子镰刀形,稍弯曲,一般3~5隔,多数为3隔,3隔的大小为(26.7~31.7) μm ×(2.7~4.0) μm 。小型分生孢子椭圆形,0~1隔,大小为(2.8~10.0) μm ×(1.8~3.8) μm 。

三线镰刀菌:病原菌菌落红色边缘整齐,大型分生孢子镰刀形,稍弯曲,一般1~2隔,多数为2隔,分生孢子的大小为(11.8~20.4) μm ×(2.4~4.1) μm 。小型分生孢子椭圆形,大小为(4.1~8.6) μm ×(1.1~3.8) μm 。

烟草镰刀菌:病原菌菌落白色,边缘整齐,棉絮状,大型分生孢子棒状,一般3~5隔,3隔的大小为(10.4~16.3)×(3.1~6.3) μm 。小型分生孢子椭圆形,0隔,大小为(5.9~8.4) μm ×(2.1~4.4) μm 。厚垣孢子多为球形。

1.1.2.3 生物学特性

尖孢镰刀菌:朱茂山和关天舒(2007)研究了尖孢镰刀菌百合专化型的生物学特性,发现该菌可以在很多种培养基上生长,其中最利于尖孢镰刀菌菌丝生长的

培养基是马铃薯麦芽糖琼脂 (potato maltose agar, PMA) 培养基, 分生孢子在玉米培养基、高氏培养基、马铃薯蔗糖琼脂培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基、察氏培养基及马铃薯麦芽糖液体培养基中萌发较好。最适宜尖孢镰刀菌菌丝生长的温度为 25~30℃, 而适合分生孢子萌发的温度为 20~30℃。黑暗有利于尖孢镰刀菌分生孢子的萌发和菌丝的生长。以相同浓度的碳源、氮源及微量元素进行培养基的筛选, 结果发现蔗糖、果糖、葡萄糖和麦芽糖 4 种碳源更有利于促进尖孢镰刀菌菌丝的生长, 但以麦芽糖和果糖为碳源时, 尖孢镰刀菌分生孢子的萌发率最高; 最有利于菌丝生长的氮源是蛋白胨, 以硝酸钠、蛋白胨、天冬酰胺及尿素为氮源时, 分生孢子的萌发率较高; 微量元素中, 硫酸镁可以很好地促进尖孢镰刀菌菌丝生长, 硫酸锌能更好地促进尖孢镰刀菌分生孢子萌发。在中性条件即 pH 7.0 及略偏碱性条件下, 菌丝的生长和分生孢子的萌发都是最好的。魏志刚(2014)则发现尖孢镰刀菌菌丝的生长、产孢的数量和分生孢子的萌发均在 20~30℃下较好, 特别是在 30℃下最好; 中碱环境下菌丝生长较快, 而酸性环境下较适于产孢和孢子萌发, 其中 pH 6.0 的条件下产孢量最大, pH 4.0 的条件下孢子萌发率最高; 以 2%浓度的不同碳源进行筛选实验, 结果发现利用甘油时菌丝生长最快, 利用可溶性淀粉时产孢量最大, 利用甘露醇时孢子萌发率最高; 以 1%的氮源进行筛选实验, 结果发现有机氮源比无机氮源更有利于尖孢镰刀菌的生长、产孢及孢子的萌发, 其中利用甘氨酸时尖孢镰刀菌的菌丝生长最快, 利用蛋白胨时产孢量最大, 尖孢镰刀菌分生孢子萌发率也最高; 不同光条件处理对病原菌影响不大, 其各项指标皆无显著性差异。边小荣(2016)以相同浓度的不同氮源和碳源筛选最佳的培养基, 结果发现在以硝酸钾为氮源的培养基上尖孢镰刀菌生长最快, 5 天后菌落直径大小为 4.87cm; 以硝酸铵为氮源时, 尖孢镰刀菌的产孢量最多, 7 天后测得产孢量为 0.82×10^6 cfu/mL; 在以蔗糖为碳源的培养基上, 尖孢镰刀菌生长最快, 分生孢子的产孢量最大; pH 为 4~8 时, 菌丝都可以生长, 但尖孢镰刀菌菌丝生长和产孢的最适 pH 为 8.0; 40℃时菌丝停止生长, 菌丝生长和产孢的最适温度都是 30.0℃, 分生孢子的致死温度为 60.0℃下 5min。

茄腐皮镰刀菌: 以相同浓度的不同氮源和碳源筛选茄腐皮镰刀菌最佳的培养基。菌丝生长的最佳氮源是硝酸钾, 其菌落直径为 3.50cm, 在以尿素为氮源时, 茄腐皮镰刀菌分生孢子的产孢量最大, 为 1.82×10^6 cfu/mL; 在以蔗糖为碳源的培养基上, 茄腐皮镰刀菌生长最快, 分生孢子的产孢量最多; 茄腐皮镰刀菌菌丝生长的 pH 是 4~8, 菌丝生长和产孢的最适 pH 均为 8.0; 在 40.0℃时, 茄腐皮镰刀菌停止生长, 而菌丝生长和产孢的最适温度都是 30.0℃(边小荣, 2016)。

禾谷镰刀菌: 以相同浓度的不同氮源和碳源筛选禾谷镰刀菌最佳的培养基。菌丝生长的最佳氮源是硝酸铵, 其菌落直径为 3.31cm, 其次是以硝酸钾为氮源时, 其菌落直径为 2.92cm, 且禾谷镰刀菌的产孢量最大, 为 0.09×10^6 cfu/mL; 禾谷镰

刀菌菌丝生长的 pH 范围是 4~8, 菌丝生长和产孢的最适 pH 都是 8.0; 禾谷镰刀菌 40.0℃ 时停止生长, 菌丝生长的最适温度是 30.0℃ (边小荣, 2016)。

三线镰刀菌: 以相同浓度的不同氮源和碳源筛选三线镰刀菌最佳的培养基。在以硝酸钾为氮源时, 三线镰刀菌生长得最好, 菌落直径为 3.99cm, 产孢量为 9.73×10^6 cfu/mL; 在以蔗糖为碳源时, 三线镰刀菌的产孢量最多, 为 0.97×10^6 cfu/mL; 三线镰刀菌菌丝生长的 pH 范围是 4~8, 菌丝生长和产孢的最适 pH 都是 8.0; 三线镰刀菌 40.0℃ 时停止生长, 菌丝生长和产孢的最适温度都是 30.0℃ (边小荣, 2016)。

烟草镰刀菌: 以相同浓度的不同氮源和碳源筛选烟草镰刀菌最佳的培养基。烟草镰刀菌在以硝酸钾为氮源的培养基上菌落直径为 1.77cm, 产孢量为 5.13×10^6 cfu/mL; 在以蔗糖和葡萄糖为碳源的培养基上, 产孢量为 0.25×10^6 cfu/mL; 在 pH 为 4~8 的条件下, 烟草镰刀菌的菌丝都可以生长, 但菌丝生长和产孢的最适 pH 都是 8.0; 烟草镰刀菌产孢的最适温度为 25.0℃ (边小荣, 2016)。

1.1.3 发病规律

百合枯萎病的病原真菌尖孢镰刀菌百合专化型, 主要以菌丝体、厚垣孢子、菌核在百合种球内或随着病残体在种植百合的土壤或基质中越冬, 成为翌年主要的初侵染来源(郑思乡等, 2014)。翌年气候条件适合时, 病原菌便开始活动, 一般 5 月中旬左右开始发病, 6 月上旬发病植株的数量逐渐增多, 6 月中旬达到发病高峰, 6 月下旬大量百合植株枯萎死亡。7~8 月该病仍在持续发生, 采收后的百合种球还会继续发病。

百合为耐旱喜光的花卉, 高温、湿度大、排水不好、过多施用氮肥、通风不畅、土壤偏酸等因素都为百合枯萎病的发生创造了有利条件(杨贺和朱茂山, 2013)。

1.1.4 综合防治

1.1.4.1 选育抗尖孢镰刀菌的百合新品种

防治百合尖孢镰刀菌枯萎病较好的措施是选育和合理利用抗病品种。选育抗病品种的首要步骤就是筛选抗病性种质资源。有学者研究发现东方百合的抗病性最弱, 麝香型百合的抗病性次之, 而亚洲型百合的抗病性最强(Straathof and Van Tuyl, 1994)。张丽丽(2013)研究发现不同的百合品种对枯萎病的抗病性存在显著差异。其中, 山丹(*Lilium pumilum* DC.)、‘普瑞头’(‘Purito’)为高抗品种(种); 卷丹(*L. lancifolium*)、‘索邦’(‘Sorbonne’)、‘白色天堂’(‘White heaven’)均为中抗品种(种), ‘西伯利亚’(‘Siberia’)为中感品种(种), 有斑百合(*L. concolor*

var. *buschianum*) 为高感品种(种)。杨秀梅等(2010b, 2012)采取鳞片接种法对 36 个百合栽培种及 5 个百合野生种进行尖孢镰刀菌百合专化型(*F. oxysporum* f. sp. *lilii*) 接种鉴定, 以便筛选抗性优异资源, 其中高抗品种(种)有 12 个, 中抗品种(种)17 个; 中感品种(种)7 个, 高感品种(种)4 个。詹德智(2012)以附加尖孢镰刀菌毒素粗提液的 MS 培养基为筛选平台, 对百合属 20 个品种(种)的百合试管苗进行尖孢镰刀菌枯萎病的抗病性鉴定试验, 筛选出高抗病性种质 5 个, 中抗病性种质 5 个; 中感病性种质 6 个, 高感病性种质 4 个。

在抗尖孢镰刀菌的百合新品种选育研究中, 有学者发现病原菌不能适应抗病性寄主, 因此获得具有持久抗病性的品种是有可能的。毛百合(*L. dauricum* Ker Gawl.)是抗尖孢镰刀菌百合枯萎病的野生种, 以麝香百合(*L. longiflorum* Thunb.)为母本, 毛百合为父本, 杂交后获得的子代中, 有部分个体具有与毛百合相同的抗病性, 由此认为毛百合可以作为抗尖孢镰刀菌百合枯萎病育种的亲本之一。目前仍然没有弄清楚尖孢镰刀菌抗病性在麝香百合基因组中的渐渗现象(Straathof et al., 1996)。岷江百合(*L. regale* Wilson.)的抗病性非常好(Löffler et al., 1996), 很多学者都试图将岷江百合的抗病性引入百合栽培种。饶建(2013)利用抑制消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术和基因芯片(gene chip)技术对岷江百合响应尖孢镰刀菌的分子机制进行了初步研究, 并对其中的一个抗病性相关转录因子进行了克隆和表达特性分析。泸定百合(*L. sargentiae* Wilson.)也具有较好的抗病性, 杨嫦丽等(2014)构建了其试管苗叶片经尖孢镰刀菌诱导后的 SSH 文库, 从中筛选到了尖孢镰刀菌百合枯萎病的抗病性相关基因。

百合抗病品种选育需经历一个长达 10 年的周期, 且在杂交子代的筛选和开花种球的繁育过程中还需要反复鉴定其抗病性。自 Imle(1942)描述了尖孢镰刀菌之后, 对百合植株和种球中尖孢镰刀菌的检测方法及抗病性研究就在不断地深入。荷兰瓦格宁根植物育种和繁殖研究中心(现荷兰瓦格宁根植物研究中心, the Center for Plant Breeding and Reproduction Research, CPRO-DLO; Wageningen Plant Research, PRI)的学者最早建立了鳞茎检测法、小珠芽监测法(Smith and Maginnes, 1969; Van Tuyl, 1980), 之后他们又分别对其进行了优化(Löffler and Mouris, 1989; Straathof and Van Tuyl, 1990), 使这两种方法成为尖孢镰刀菌监测的主要技术方法。大量的研究证实不同的百合个体和百合不同的生长时期对尖孢镰刀菌的抗病性差异十分显著。荷兰农科院植物育种研究所已经开发了 1 个随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)分子标记体系, 将尖孢镰刀菌抗病性进行分子标记; 用与镰刀菌水平抗性位点连锁的 RAPD 标记来分析亚洲百合抗性, 将与百合抗尖孢镰刀菌的位点定位到了染色体上。利用这一分子标记可进行早期尖孢镰刀菌百合枯萎病的抗病性鉴定(Ahn et al., 2003; Straathof et al., 1996)。这能缩短选育百合抗病品种的时间和提高定向筛选抗病性的效率。

1.1.4.2 农业防治

地块的选择、排水、灌溉、施肥等农业措施都与百合枯萎病的发生紧密相关。百合尖孢镰刀菌枯萎病的农业防治措施主要有：选择地势平坦的地块种植百合，并注意开沟排水，避免积水。大棚栽培的百合要注意大棚内通风良好并保持百合叶片的干燥。在浇水和施肥时注意不要将水、肥溅到百合的叶片上，避免淋浇。适时适量灌溉，避免过湿或积水。

1.1.4.3 化学防治

化学防治措施主要有土壤消毒、种球消毒等。叶世森和林芳(2007)发现种植百合前先对土壤消毒和种球消毒可有效地预防百合尖孢镰刀菌枯萎病初侵染的发生,采用 10%苯醚甲环唑水分散粒剂 1000 倍液防治百合尖孢镰刀菌枯萎病有较好的效果。梁巧兰等(2004)报道了防治百合枯萎病效果好的药剂有 50%多菌灵可湿性粉剂、70%甲基托布津可湿性粉剂及抗真菌药剂的复配剂等。邹一平等(2006)发现治萎灵含有的水杨酸可加强百合的抗病性,且防治百合枯萎病的效果明显比多菌灵好很多。李润根等(2016)发现广清、绿群、洛菌睛、氟硅唑抑菌效果明显强于其他药剂。安智慧等(2010)发现 40%菌核净可湿性粉剂防治百合枯萎病效果最好。朱茂山等(2010)发现多菌灵、霉灵对尖孢镰刀菌菌丝的生长和分生孢子萌发抑制作用最强。

1.1.4.4 生物防治

生物防治是控制百合尖孢镰刀菌枯萎病较好的防治措施,并且是当下主导的综合防治措施之一。用于尖孢镰刀菌生物防治的种类主要有真菌、植物提取物、放线菌、细菌、抗生素等。

用于生物防治的真菌中研究且应用较多的是淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)、木霉属(*Trichoderma*)真菌、丛枝菌根(*Arbuscular mycorrhize*, AM)真菌等(刘新月等, 2008)。目前已经报道的用于防治尖孢镰刀菌枯萎病的生防真菌主要有绿色木霉(*T. viride*)、哈茨木霉(*T. harzianum*)、拟康氏木霉(*T. pseudokoningii*)等(李宏科, 1998; 柳春燕等, 2005)。

在植物提取物防治尖孢镰刀菌枯萎病的研究方面,有学者发现紫茎泽兰液、沼液及其两者的混合液对百合尖孢镰刀菌枯萎病都有较好的防治效果,但是紫茎泽兰液防治尖孢镰刀菌百合枯萎病的效果比沼液的好。从两者混合液的防治效果来看,紫茎泽兰液可加强沼液对尖孢镰刀菌的抑制(李丽等, 2007)。韩玲等(2010)发现枯草芽孢杆菌能有效抑制尖孢镰刀菌菌丝的生长,减少其孢子的萌发。

1.2 体细胞无性系诱变筛选抗病种质的相关进展

体细胞无性系变异在植物组织培养过程中是广泛发生的,其在作物育种工作中的作用也显得愈发重要。体细胞无性系变异联合诱变育种、分子育种等都称为体细胞无性系变异复合育种技术,其中以联合诱变育种技术,即离体诱变育种的应用最为普遍,并获得了很多好的结果。采取该技术,不但能提高诱变的频率,还能方便快捷地实现诱变(陆柳英等,2007)。该技术手段已被普遍应用于作物育种中,并培育出了许多抗病、抗寒、耐盐等新优品种。

1.2.1 体细胞无性系变异

Larkin 和 Scowcroft 等(1981)将体细胞无性系(somaclone)定义为任何形式的细胞培养所获得的再生植株,并提出了体细胞无性系变异(somaclonal variation)这一概念,即通过无性繁殖方式产生的子代群体中发生的变异。体细胞无性系变异在植物组织培养过程中是广泛发生的,且它的发生没有植物的种属特异性,几乎所有的植物都能发生且已广泛应用,如在辣椒(黄炜等,2007)、葡萄(马兵刚等,2001)、欧美杂杨(詹亚光等,2006)、小黑麦(王小军和鲍文奎,1998)、大麦(Devaux and Steven, 1993)等作物的育种中都已应用,主要涉及形态方面(如根、茎、叶、花、果实等)、生理方面(如成熟期、抗病性、作物生长势、抗逆性等)、品质方面(如主要营养成分含量、外观等)的生物性状(朱晋云等,2006;韩晓光等,2005;Sint et al., 1997;刘艳妮和王飞,2010)。随着研究的深入,体细胞无性系变异及在作物育种中的应用取得了更大的进展,成为继大、小孢子培养之后植物种质创新及新品种培育的一种新手段。

1.2.2 离体筛选的原理、程序和选择方法

离体筛选就是在离体培养条件下,利用微生物学的研究方法,以植物细胞为对象,在特定的条件下分离突变体(Amato, 1985; Phillips et al., 1994)。与常规育种方法相比,离体筛选具有以下优点:①可以获得广泛的变异类型,甚至产生自然界尚未发现的突变,为抗病选择提供遗传基础;②可以在较小空间内培养和处理大量细胞;③在细胞水平上直接诱发与筛选突变体,是高等植物抗性育种微生物化的一种尝试,易于从单倍体细胞选出隐性突变,经加倍成二倍体或多倍体,较快地得到纯合稳定的抗病材料;④在人工控制条件下体外定向选择,易于进行同位素示踪、半微量分析等试验,不受地区与季节限制;⑤可以从细胞、组织及整株水平上进行生化、遗传及抗病机制的研究(李晓玲等,2008;丰先红等,2010)。

据报道,高水平筛选压可诱发抗性变异,培养的细胞对培养环境条件很敏感,

也易发生多种变异(平文丽和杨铁钊, 2005)。离体培养中的这些变异即为抗性突变体变异的基础。将培养物置于含致病毒素的选择培养基上, 对相应毒素有抗性的细胞或细胞团就会生存下来, 而敏感者则死亡。当毒素浓度较低时, 毒素也可能作用于那些不具有抗性的细胞或细胞团, 使其向着所需要的表型和基因型漂变, 经多代选择培养后就可能获得抗病细胞系(周嘉华, 1983)。

利用毒素进行突变体选择需以下程序: ①建立无性系: 诱导外植体产生愈伤组织或者游离原生质体, 为进行离体培养建立起无性系。至于用何种外植体, 用固体培养或悬浮培养体系应视不同植物, 不同基因型的材料而定。②创造变异体系: 细胞培养物在继代培养过程中本身会积累变异, 利用理化诱变剂处理外植体或培养物, 以提高突变效率。③突变体的选择: 突变体的选择应在愈伤组织或细胞水平上进行。

目前, 突变体选择的方法有两种: ①正选择法; ②负选择法。所谓正选择法是指在培养基中加入对正常细胞有毒害的化合物, 使正常细胞不能生长而只有突变体才能生长, 从而筛选出细胞突变体。相反, 所谓负选择法则是在某种培养基中只有正常细胞才能生长而突变体不能生长。正选择法更为常用, 用正选择法筛选抗性突变体时, 不同类型的突变体可采用不同的方法: 一步筛选法与多步筛选法。一步筛选法是指只需要一次选择就可以筛选出突变体, 这种方法所选出的突变体一般是单基因突变。多步筛选法是指需要多次选择才能筛选出突变体, 所选出的突变体一般是多基因突变。

1.2.3 离体诱变育种

随着植物组织培养技术的不断发展, 诱变育种技术的应用越来越受到研究者的重视。很多研究工作者都选择体细胞无性系变异联合诱变育种技术, 简称为离体诱变育种。离体诱变育种技术是研究者利用化学诱变剂或物理诱变因素使植株发生可以遗传的变异, 再经过多代培育, 而后选择出有利用价值突变体的一种育种技术(徐冠仁, 1996), 它与体细胞无性系变异联合应用, 不仅扩大了变异的范围和提高了变异的概率, 而且还可在培养基中加入特定的筛选压进行离体筛选, 这样就弥补了体细胞无性系变异在非定向诱变上的不足, 从而提高选择效率(刘进平和郑成木, 2006)。此外离体诱变育种技术还具有诱变材料小、容易吸收物理诱变剂和化学诱变剂、不局限于环境条件、可大大降低常规诱变技术中产生嵌合体的概率等优点。该技术手段已经在作物育种工作中发挥了非常重要的作用。

1.2.3.1 离体诱变

(1) 体细胞无性系变异联合物理诱变技术

体细胞无性系(愈伤组织培养、细胞悬浮培养、原生质体培养、花药培养、茎