

湖南省农业技术规程

HNZ280-2021

龙牙百合种球脱毒技术操作规程

Technical regulation of virus-free operation for Longya liliu bulb (*Lilium brownii* f.e.brown
var. *viridulum* baker)

湖南省农业农村厅制定

发布日期：2021年2月9日

龙牙百合种球脱毒技术操作规程

为规范龙牙百合毒技种球种苗脱毒，特制订本规程。

1 组培室消毒灭菌

用 84 消毒液稀释至 1000 倍或 75%乙醇喷洒洗涤组培室地面，保持室内清洁。每 30 天用高锰酸钾及次氯酸混合熏蒸，在接种室接种前 15 天用紫外灯照射 30 分钟。超净工作台接种前用紫外灯照射 30 分钟，随后关闭紫外灯通风 20 分钟以上，用湿拖把轻轻打扫超净工作台四周，降低尘埃，接着用 75%乙醇擦拭台面操作区域。

2 外植体选取

选取龙牙百合鳞片为外植体。选择完整无病虫害的龙牙百合种球，剔除外层带病斑的鳞片，由外向内完整地剥取中层鳞片，浸泡于清水中 5 分钟，用流水冲洗鳞片表面泥垢 30 分钟以上，保证鳞片洁净无瑕。

3 外植体消毒灭菌

用 75%乙醇灭菌 20 秒，再用 0.1%的升汞溶液浸泡 15 分钟，每隔 30 秒进行摇动，使鳞片充分与溶液混合，最后用无菌水冲洗 5 次。沿鳞片切除周围 1 毫米的外围部分，然后选取外层下部与鳞茎盘相连的部分为最佳外植体，横切约为 1 厚的小块。

4 培养基配制与处理

4.1 培养基配制

基本培养基为 MS 培养基，初代培养附加糖 80 克/升，其余培养基配方除特殊说明均附加糖 80 克/升，琼脂粉浓度为 7 克/升。

4.2 pH 值的调整

用酸度计或精密 pH 试纸进行调试。pH 值为 5.8。当 pH<5.8 时用 1mol/L 的 NaOH 调节，pH>5.8 时用 1mol/L 的 HCl 调节。

4.3 培养基的分装

配制好的培养基趁热分装，200 毫升组培瓶每瓶装 40 毫升 ~50 毫升，厚度 1 左右，分装后立即封口，做好标记。

4.4 培养基的灭菌与储藏

将装入培养基的组培瓶放入高压灭菌锅内，压力 0.11Mpa，温度 121℃，灭菌 30 分钟，灭菌后取出培养基放置于培养室中冷却待用，放置时间为 3 天，以便观察培养基灭菌情况，无污染后进行接种使用。灭菌后的培养基可在无菌或洁净实验室内储藏不超过 30 天。

5 外植体诱导成球

5.1 愈伤培养

5.1.1 鳞片接种

将准备好的切片底部带伤口面（凹面）向上轻轻按压于诱导愈伤培养基上。

5.1.2 培养条件

将接种好的组培瓶放置于 25℃±2℃培养室中，暗培养 30 天~40 天，鳞片顶部伤口处即形成淡黄色的愈伤。在培养期间，每隔 25 天~30 天更换 1 次培养基。

5.1.3 愈伤培养基配方。

MS+1.0m 克/升 6-BA+1.0m 克/升 2,4-D +蔗糖 80.0 克/升+琼脂 7 克/升，pH5.8。

5.2 小鳞茎培养

5.2.1 愈伤接种

将鳞片上的愈伤取出并切成黄豆粒大小，平放于诱导愈伤培养基上。

5.2.2 培养条件

将接种好的愈伤培养基置于 25℃±2℃培养室中，进行光照与黑暗比例为 16 时/8 时条件下培养，光照强度为 3000Lx~5000Lx，培养 50 天~60 天。培养期间，每隔 25 天~30 天更换一次培养基。

5.2.3 培养基配方

MS+1m 克/升 6-BA+80 克/升蔗糖+7 克/升琼脂，pH5.8。

6 小鳞茎增大培养

6.1 小鳞茎接种

将分化的小鳞茎接种到鳞茎增大培养基上进行培养。

6.2 培养条件

将接种的鳞茎，置于 25℃±2℃条件下，暗培养 50 天~60 天即可长成直径大于 0.5 以上的鳞茎。在培养期间，每隔 20 天更换一次培养基。

HNZ280-2021

6.3 培养基配方

MS+1.0 毫升/克 IBA+蔗糖 80.0 克/升+7 克/升琼脂, pH5.8。

6.4 打破休眠

将长成的组培鳞茎, 整瓶转至 4℃暗培养的冷藏室内, 培养 50~60 天打破休眠。

6.5 热处理

将解除休眠的百合鳞茎, 整瓶置于人工气候箱中, 45℃恒温培养箱中进行 7 天。

7 茎尖培养成鳞茎

7.1 茎尖接种

把热处理过的百合组培鳞茎, 在 40 倍的解剖镜下, 用解剖刀剥除外部鳞片漏出生长点, 用解剖针挑取 0.6 毫米~0.8 毫米大小的茎尖生长点接种到诱导愈伤培养基上。

7.2 培养条件

将接种的茎尖至于 25℃条件下, 遮光暗箱培养 60 天~80 天, 每 25 天~30 天更换一次培养基。

7.3 培养基配方

MS+2.5m 克/升 Picloram (氨基吡啶酸) +6~8 毫克/升病毒唑+80 克/升糖+7 克/升琼脂, pH 为 5.8。

7.4 愈伤诱导成球

按 5.2 与 6.3 的步骤进行百合籽球的培养。

8 病毒检测

将通过茎尖最终诱导成球的百合组培鳞茎, 采用多重 RT-PCR 法进行百合主要病毒检测, 如百合潜隐病毒(Lily symptomless virus, LSV)、异名百合斑驳病毒 (Lily mottle virus, LM0V)、黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaicvirus, CIVIV)、百合无症状病毒(Lily symptommless virus, tsv)、郁金香碎花病毒(Tulip breaking virus, TBV)、和百合丛簇病毒(Lily rosette virus, LRV)等主要病毒检测按《切花百合脱毒种球》(NY/T 1744) 执行。

9 档案管理

详细记载龙牙百合脱毒技术中各个组培阶段的培养基配方与培养环境条件。参见附录 B。

10 技术术语

10.1 龙牙百合

鳞茎球形，横径 2 厘米~2.4 厘米，鳞片披针形，鳞片披针形，无节，白色，地上茎高约 100 厘米，叶散生，倒披针形，花乳白色有香气，能结实产生种子。营养丰富，味淡不苦，为药用百合之一。

10.2 外植体

从百合活植物体上切取下来以进行组织培养的器官、组织或细胞、原生质体。

10.3 愈伤

从百合外植体上诱导出具有产生胚状体的能力。

10.4 茎尖

剥离鳞茎外层鳞片的顶端分生组织及其周缘部分。

10.5 脱毒

利用剥茎尖、胚性愈伤、热处理等脱毒技术，脱去危害百合的病毒病及类病毒病。

10.6 类病毒病

由病毒侵入百合植株引起的呈现叶脉退绿、花叶、黄斑、叶或花畸形等症状，造成植株生活力减弱、长势低下等现象的病害。

11 引用和参考资料

GB5749 2018 生活饮用水卫生标准

NY/T 1744 切花百合脱毒种球

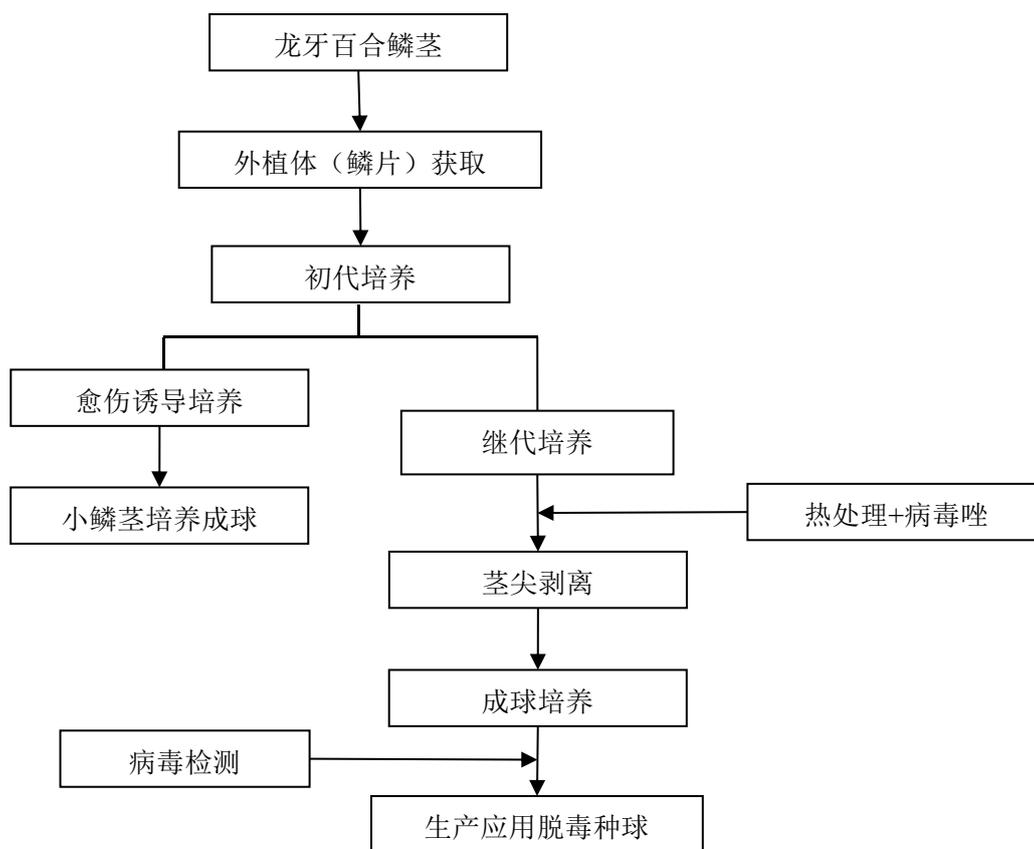
DB32T 3372-2018 东方百合脱毒技术规程

DB62T4068-2019 食用百合脱毒技术规程

编写单位：湖南省棉花科学研究所，湖南应用技术学院

编写人员：马杰，刘芳，王永波，傅淋，贺璐，李庠，曾潜，赵瑞元

附录 A：脱毒技术流程



附录 B: B-1 组培档案记载

编号: _____ 记录人: _____ 日期: _____

序号	组培时期	组培地点	组培环境	成活率	备注
1					
2					
3					
4					
.....					

B-2 培养基配方

组培时期	培养基配方	PH 值
愈伤培养	Ms, 1.0 毫克/升 6-BA, 1.0m 克/升 2,4-D, 蔗糖 80.0 克/升, 琼脂 7 克/升	5.8
小鳞茎培养	MS, 1 毫克/升 6-BA, 80 克/升蔗糖, 7 克/升琼脂	5.8
增大培养	MS, 1.0 毫升/gIBA, 80.0 克/升蔗糖, 7 克/升琼脂	5.8
茎尖诱导愈伤培养基	MS, 2.5 毫克/升 Picloram, 80 克/升糖, 6-8 毫克/升病毒唑, 7 克/升琼脂	5.8