

网络出版时间:2013-07-18 16:03

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130718.1603.028.html>

不同方法脱除菊花体内 3 种病毒效果的研究

赵 霜, 李 青, 戴思兰

(北京林业大学 园林学院, 北京 100083)

【摘 要】 【目的】探讨脱除菊花体内菊花 B 病毒(CVB)、黄瓜花叶病毒(CMV)及烟草花叶病毒(TMV)3 种病毒的最佳方法。【方法】以菊花品种“墨菊”为材料,采用茎尖培养法、病毒唑结合茎尖培养法及热处理结合茎尖培养法对脱除 CMV、CVB、TMV 的效果进行研究,其中病毒唑结合茎尖培养法采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,对茎尖长度、病毒唑质量浓度及处理时间进行筛选,热处理结合茎尖培养法中热处理采用昼夜变温并逐步升温的方式。【结果】茎尖培养法中以长度为 0.4~0.5 mm 茎尖的脱毒效果最佳,茎尖成活率为 66.7%,CMV、CVB、TMV 3 种病毒的脱毒率分别为 61.9%、63.2%、55.0%;病毒唑结合茎尖培养法中以茎尖长度为 0.4~0.5 mm、病毒唑质量浓度为 10 mg/L、处理时间为 42 d 组合的脱毒效果最佳,茎尖成活率为 53.3%,CMV、CVB、TMV 3 种病毒的脱毒率分别为 88.2%、86.7%、81.3%;热处理结合茎尖培养法中以试管苗热处理 60 d 后,剥取长度为 0.4~0.5 mm 的茎尖进行培养的脱毒效果最佳,茎尖成活率为 56.7%,CMV、CVB、TMV 3 种病毒的脱毒率分别为 100.0%、100.0%、94.1%。【结论】3 种脱除菊花体内病毒的方法中,热处理结合茎尖培养法的脱毒效果最佳。

【关键词】 菊花;病毒;菊花 B 病毒;黄瓜花叶病毒;烟草花叶病毒;脱毒率

【中图分类号】 S682.1⁺1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)08-0168-07

Effects of different methods on elimination of three viruses in *Chrysanthemum morifolium*

ZHAO Shuang, LI Qing, DAI Si-lan

(College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: 【Objective】 The experiment was conducted to discuss the best virus-elimination method to eliminate cucumber mosaic virus (CMV), chrysanthemum virus B (CVB) and tobacco mosaic virus (TMV) in *Chrysanthemum morifolium*. 【Method】 The experiment used *Chrysanthemum morifolium* ‘Moju’ as material. Shoot-tip culture method, shoot-tip culture with virazole treatment method and shoot-tip culture with heat treatment method were adopted to study the virus-elimination effect on CMV, CVB and TMV. An orthogonal experimental design of $L_9(3^4)$ was conducted to screen the best shoot-tip length, virazole concentration, processing time for the second method. For the third method, temperature increased day by day and was set differently in day time and night time. 【Result】 When shoot-tip length was 0.4—0.5 mm, first method obtained the best results with survival rate of 66.7% and the virus-elimination rates of CMV, CVB and TMV were 61.9%, 63.2%, and 55.0%, respectively. The best conditions for method two were shoot-tip length 0.4—0.5 mm, virazole concentration 10 mg/L and processing time 42 days. The survival rate was 53.3%, and the virus-elimination rates of CMV, CVB and TMV were 88.2%, 86.7%, and 81.3%.

* 【收稿日期】 2012-10-25

【基金项目】 林业公益性行业科研专项(200904050)

【作者简介】 赵 霜(1987—),女(满族),吉林九台人,在读硕士,主要从事菊花脱毒和检测技术研究。

E-mail: zhaoshuang.20@163.com

【通信作者】 李 青(1959—),女,北京人,副教授,硕士生导师,主要从事观赏植物组织培养研究。E-mail: wliqing06@sina.com

respectively. The best conditions for method three were shoot-tip length 0.4—0.5 mm and heating time 60 d. The survival rate was 56.7%, and the virus-elimination rates of CMV, CVB and TMV were 100.0%, 100.0%, and 94.1%, respectively. 【Conclusion】 The shoot-tip culture with heat treatment method was the best to eliminate viruses in *Chrysanthemum morifolium*.

Key words: *Chrysanthemum morifolium*; viruses; CVB; CMV; TMV; virus-elimination rate

菊花(*Chrysanthemum morifolium*)是我国的传统名花,其种类繁多,现主要应用于切花、盆栽、地被等。在花卉产业中菊花的经济效益占有相当大的比例。近年来,菊花感染病毒较严重,其感染病毒种类已有 20 余种^[1],其中菊花 B 病毒(CVB)、黄瓜花叶病毒(CMV)及烟草花叶病毒(TMV)等花叶类病毒,在各地关于菊花感染病毒的调查中最为常见^[2]。感染花叶类病毒的菊花,其叶片表现出黄绿相间,并逐渐出现斑驳状,严重的呈现出深褐色的坏死斑。这极大地影响了菊花的观赏价值,同时也给菊花的生产和销售带来了巨大的经济损失。此类病毒可通过汁液摩擦传播,菊花传统的扦插繁殖易造成病毒积累,久而久之,造成了菊花品种整体品质下降、种性退化等严重后果。因此,急需采取一定的手段脱除菊花体内的病毒,以保证菊花的经济效益。

在 2002 年以前,对菊花脱毒方法的研究主要集中在茎尖处理法和简单的热处理法方面;在 2002 年以后,主要集中在对菊花病毒检测技术的研究方面,应用最多的是利用反转录多聚酶链式反应(RT-PCR)方法检测菊花体内不同种类的病毒。热处理结合茎尖培养法在马铃薯、草莓的脱毒研究中应用最多^[3-4],且处理方式多样,取得了很好的脱毒效果。而在观赏植物上,热处理在百合的脱毒研究中应用最多^[5],对菊花的应用很少,而且处理方式比较单一,还未进行过系统研究。病毒唑结合茎尖培养法在少量的观赏植物如大花蕙兰^[6]等脱毒研究中应用过,且取得了很好的脱毒效果,而将该法应用于菊花的脱毒研究尚未见报道。本试验以茎尖培养法为基础,结合病毒唑处理、改良的热处理等方法,系统地研究了不同方法对菊花病毒脱除效果的影响,探索脱除菊花体内病毒的最佳途径,以期为菊花的产业化生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

田间选取表现花叶症状的菊花品种“墨菊”,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA),检测菊花 B 病毒(CVB)、黄瓜花叶病毒(CMV)及烟草花叶病毒

(TMV)3 种病毒。选取经检验呈阳性的母株为试验材料,采取其顶芽及带芽茎段为外植体。

1.2 方法

1.2.1 脱毒材料的准备 将外植体用洗洁精水清洗干净,在流水下冲洗 30 min 后,置于超净台。先用体积分数为 75%的酒精灭菌 1 min,然后用无菌水涮洗 3 遍,每遍 3 min,再用添加了 2 滴吐温的质量分数 0.1%的升汞灭菌 8~10 min,最后用无菌水涮洗 5 遍,每遍 3 min。灭菌后将外植体转入 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基中进行启动培养。28 d 后可转入培养基 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 中进行继代培养。继代的试管苗供茎尖处理、病毒唑处理及热处理等使用。培养条件:温度(24±1)℃,光照时间 14 h/d,光照强度 1 500~2 000 lx。

1.2.2 脱除病毒的方法 (1)茎尖培养法。取 1.2.1 中试管苗的顶芽和侧芽,借助于解剖镜,剥取茎尖长度分别为 0.9~1.0,0.6~0.8,0.4~0.5,0.2~0.3 mm 4 个水平的茎尖,接种于培养基 MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.04 mg/L 中,每水平接种 30 个茎尖,为保证营养充分,每 28 d 更新 1 次培养基。每 7 d 观察 1 次,28 d 后统计成活率,49 d 后统计脱毒率。

成活率=(接种成活的外植体数/接种外植体总数)×100%;

脱毒率=(脱除病毒的外植体数/成活的外植体数)×100%。

(2)病毒唑结合茎尖培养法。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验^[7],对茎尖长度、病毒唑质量浓度及处理时间进行筛选,共 9 个处理,每处理接种 30 个茎尖,试验设计见表 1。将不同长度的茎尖接种于添加了不同质量浓度病毒唑的培养基 MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.04 mg/L 中。每 28 d 更新 1 次培养基,以保证病毒唑的药效以及茎尖生长对养分和水分的需求,当每处理达到要求的时间时,将茎尖转入到不加病毒唑的正常培养基中。每 7 d 观察 1 次,28 d 后统计成活率,49 d 后统计脱毒率。

表 1 病毒唑结合茎尖培养法中的 $L_9(3^4)$ 正交试验设计

水平 Level	因素 Factor		
	A	B	C
	病毒唑质量浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Virazole concentration	处理时间/d Processing time	茎尖长度/mm Shoot-tip length
1	5	28	0.4~0.5
2	10	35	0.6~0.8
3	15	42	0.9~1.0

(3)热处理结合茎尖培养法。热处理主要采用昼夜变温及逐步升温的方式^[8]。昼夜变温即白天和夜晚的温度不一致,热处理设置的最终温度为白天(08:00—22:00)38℃,晚上(22:00—次日 08:00)32℃。但是直接进行高温处理,试管苗的成活率很低,为了让试管苗有一个锻炼的过程,热处理前期采取逐步升温的方式对试管苗进行预处理,即设置白天起始温度为 28℃,每隔 1 d 升 2℃,升至 38℃时停止;夜间起始温度为 26℃,每隔 1 d 升 2℃,升至 32℃时停止。这样经过预处理后再以白天 38℃,晚上 32℃,进行最终的热处理,以此时为准,分别继续处理 30,45,60 d。不同时间下各处理 120 株试管苗。热处理过程在人工气候箱中完成,人工气候箱光照时间设为 14 h,光照强度设为 80%,相对湿度设为 60%。为保证试管苗对水分的需求,热处理期间每 15 d 更新 1 次培养基。热处理后对成活的试管苗剥取长度为 0.4~0.5 mm 的茎尖接种于培养基 MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.04 mg/L 中,每个时间处理下接种 30 个茎尖。28 d 后统计成活率,49 d 后统计脱毒率。

表 2 不同茎尖长度对菊花茎尖成活率及脱毒率的影响

茎尖长度/mm Shoot-tip length	茎尖总数 Total shoot-tip	成活率/% Survival rate	脱毒率/% virus-elimination rate		
			CMV	CVB	TMV
0.9~1.0	30	86.7	12.0	7.4	7.7
0.6~0.8	30	80.0	30.4	24.0	25.0
0.4~0.5	30	66.7	61.9	63.2	55.0
0.2~0.3	30	33.3	72.7	88.9	70.0

表 3 茎尖培养法中菊花脱毒率的方差分析结果

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 <i>SS</i>	均方 <i>MS</i>	固定模型 <i>F</i>
茎尖长度 Shoot-tip length	3	8 660.2	2 886.7	88.8**
病毒种类 Viruses	2	90.0	45.0	1.4
随机误差 Random error	6	194.7	32.5	
总计 Total number	11	8 945.0		

注(Note): $F_{0.05}(3,6)=4.76,F_{0.01}(3,6)=9.78;F_{0.05}(2,6)=5.14,F_{0.01}(2,6)=10.9$ 。

表 3 表明,不同长度茎尖之间的脱毒率差异极显著,而不同病毒之间的脱毒率差异不显著。当茎尖长度为 0.2~0.3 mm 时,CMV、CVB、TMV 3 种

1.3 病毒检测方法

采用 ELISA 对脱毒处理的试管苗进行检测^[9]。分别采用 ELISA 中的双抗夹心法(CVB、TMV)和直接法(CMV)对不同种类的病毒进行检测。

2 结果与分析

2.1 茎尖培养法中不同茎尖长度对菊花茎尖成活率和脱毒率的影响

菊花茎尖在接入培养基后,培养 7 d 左右,部分茎尖生长点出现了浅绿色芽点突起,同时另一部分茎尖出现了褐化现象,继而死亡;培养 14 d 左右,一部分茎尖开始分化成芽,另一部分茎尖基部出现了大量的愈伤组织;培养 28 d 后,成活的茎尖均分化成苗。

由表 2 可以看出,随着菊花茎尖长度的增加,茎尖成活率上升,二者呈正相关,其中长度为 0.9~1.0 mm 茎尖的成活率较长度为 0.2~0.3 mm 的茎尖高 53.4%,由此可见,茎尖长度对茎尖成活率的影响较大。此外,随着茎尖长度的增加,茎尖中同一种病毒的脱毒率逐渐下降。进一步对脱毒率进行方差分析,结果见表 3。

病毒的平均脱毒率为 77.2%,较长度为 0.9~1.0 mm 的茎尖高 68.2%,且差异极显著。而不同病毒的脱毒率是由病毒本身的特性及其在茎尖中的含量

决定的,方差分析结果表明,茎尖培养法对不同病毒的脱毒效果基本一致。

在综合比较茎尖成活率和脱毒率后发现,长度为 0.2~0.3 mm 茎尖中病毒的脱毒率虽高,但是茎尖成活率太低,而长度为 0.9~1.0 mm 茎尖的成活率虽高,但茎尖中病毒的脱毒率极低,二者均不适合在生产上应用。而当茎尖长度为 0.4~0.5 mm 时,茎尖成活率为 66.7%,CVB、TMV 和 CMV 3 种病毒的脱毒率均高于 55.0%,茎尖成活率和脱毒率都很高,所以在生产上剥取长度为 0.4~0.5 mm 的茎尖进行脱毒培养比较适宜。

2.2 病毒唑结合茎尖培养法中不同因素对菊花茎尖成活率与脱毒率的影响

由表 4、表 5 可以看出,随着病毒唑质量浓度的

增加,茎尖的成活率总体下降;随着茎尖长度的增加,茎尖的成活率基本上升。其中对菊花茎尖成活率影响最大的因素是病毒唑质量浓度,其次是茎尖长度,处理时间的影响较小。随着茎尖长度的增加,病毒的脱毒率总体下降。其中对脱毒率影响最大的因素是茎尖长度,其次是病毒唑质量浓度,处理时间影响较小。

总体而言,在病毒唑结合茎尖培养法中,茎尖长度对菊花茎尖脱毒率的影响最大,而病毒唑质量浓度对茎尖成活率的影响最大。而由极差分析得出,当病毒唑质量浓度为 5 mg/L、处理时间为 35 d、茎尖长度为 0.9~1.0 mm 时,茎尖的成活率最高;而当病毒唑质量浓度为 10 mg/L、处理时间为 28 d、茎尖长度为 0.4~0.5 mm 时,茎尖的脱毒率最高(表 5)。

表 4 菊花病毒唑结合茎尖培养法中的 L₉(3⁴)正交试验结果

试验号 Test number		病毒唑 质量浓度(A)/ (mg·L ⁻¹) Virazole concentration	处理时间 (B)/d Processing time	茎尖长度 (C)/mm Shoot-tip length	成活率/% Survival rate	脱毒率/% Virus-elimition rate			
						CMV	CVB	TMV	总计 Total
1		5 (1)	28 (1)	0.4~0.5 (1)	66.7	61.9	63.2	60.0	251.8
2		5 (1)	35 (2)	0.6~0.8 (2)	76.7	36.4	33.3	30.4	176.8
3		5 (1)	42 (3)	0.9~1.0 (3)	86.7	16.0	14.8	11.5	129.0
4		10 (2)	28 (1)	0.6~0.8 (2)	60.0	47.4	47.1	44.4	198.9
5		10 (2)	35 (2)	0.9~1.0 (3)	73.3	23.8	21.7	18.2	137.0
6		10 (2)	42 (3)	0.4~0.5 (1)	53.3	88.2	86.7	81.3	309.5
7		15 (3)	28 (1)	0.9~1.0 (3)	46.7	33.3	30.8	28.6	139.4
8		15 (3)	35 (2)	0.4~0.5 (1)	36.7	80.0	83.3	81.8	281.8
9		15 (3)	42 (3)	0.6~0.8 (2)	20.0	40.0	28.6	33.3	121.9
总计 Total					520.1	427.0	409.5	389.5	1 746.1

表 5 病毒唑结合茎尖培养法中菊花茎尖成活率及脱毒率的极差分析结果

指标 Index		因素 Factor	病毒唑质量浓度 Virazole concentration	处理时间 Processing time	茎尖长度 Shoot-tip length
成活率 Survival rate		$\bar{x}_1$	76.7	57.8	52.2
		$\bar{x}_2$	62.2	62.2	52.2
		$\bar{x}_3$	34.5	53.3	68.9
		R	42.2	8.9	16.7
		$\bar{x}_1$	109.2	138.9	228.8
脱毒率 Virus-elimition rate		$\bar{x}_2$	152.9	136.3	113.6
		$\bar{x}_3$	146.6	133.5	66.2
		R	43.7	5.4	162.6

进一步对菊花茎尖成活率及脱毒率进行方差分析,结果见表 6。由表 6 可以看出,就茎尖成活率而言,只有病毒唑质量浓度 3 个水平之间差异显著,茎尖长度及处理时间各水平间差异不显著,这进一步证明了对茎尖成活率影响最大的因素是病毒唑质量浓度。进而说明,当有病毒唑存在时,茎尖长度不再是决定茎尖成活率的主导因子,病毒唑对茎尖的生

长存在抑制作用,会造成茎尖死亡。

由表 6 还可以看出,就对茎尖脱毒率而言,3 个因素中,茎尖长度及病毒唑质量浓度 3 个水平之间差异均极显著,处理时间各水平间差异不显著,这说明茎尖长度和病毒唑质量浓度对茎尖脱毒率的影响都很大,但是病毒唑质量浓度对茎尖脱毒率的影响没有茎尖长度大,这也表明茎尖长度仍是决定茎尖

脱毒率的关键,而病毒唑的存在起到了辅助作用。此外,不同病毒的脱毒率差异不显著,这说明病毒唑对不同病毒的影响差异不显著,这可能是因为病毒

唑是一种广谱的病毒抑制剂,对各种病毒的作用基本一致。

表 6 病毒唑结合茎尖培养法中菊花茎尖成活率和脱毒率的方差分析结果

Table 6 Variance analysis for survival rate and virus-elimination rate of shoot-tip culture with virazole treatment					
指标 Index	变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 <i>SS</i>	均方 <i>MS</i>	<i>F</i>
成活率 Survival rate	病毒唑质量浓度 Virazole concentration	2	2 763.0	1 381.5	28.5*
	处理时间 Processing time	2	118.8	59.4	1.2
	茎尖长度 Shoot-tip length	2	555.6	277.8	5.7
	随机误差 Random error	2	96.8	48.4	
	总计 Total number	8	3 534.2		
脱毒率 Virus- elimition rate	病毒唑质量浓度 Virazole concentration	2	1 118.3	559.2	11.9**
	处理时间 Processing time	2	14.8	7.4	<1
	茎尖长度 Shoot-tip length	2	13 979.3	6 989.7	148.7**
	病毒种类 Viruses	2	78.2	39.1	<1
	随机误差 Random error	16	752.7	47.0	
	总计 Total number	26	15 865.1		

注(Note): $F_{0.05(2,2)}=19$, $F_{0.01(2,2)}=99$; $F_{0.05(2,16)}=3.63$, $F_{0.01(2,16)}=6.23$ 。

总而言之,在病毒唑结合茎尖培养法中,茎尖长度是决定茎尖脱毒率的关键因素,病毒唑质量浓度对茎尖成活率及脱毒率均有很大的影响,处理时间对茎尖成活率及脱毒率的影响均较小。极差分析结果显示,当病毒唑质量浓度为 10 mg/L、处理时间为 28 d、茎尖长度为 0.4~0.5 mm 时,菊花茎尖的脱毒率最高,但这个组合不在 $L_9(3^4)$ 正交设计中,由于处理时间对茎尖脱毒率的影响较小,所以 $L_9(3^4)$ 正交设计中的 6 号组合可看作是本次试验中脱毒效果最好的组合。

2.3 热处理结合茎尖培养法中不同热处理时间对菊花茎尖成活率和脱毒率的影响

由表 7 可知,随着热处理时间的延长,试管苗的成活率逐渐下降,其中热处理 60 d 的试管苗,其成活率较未经热处理的试管苗降低了 69.2%。这是因为菊花本身的耐热性较差^[10-11],无法承受较高的处理温度和过长的处理时间。

选取热处理后成活的试管苗,剥取长度为 0.4~0.5 mm 的茎尖进行培养后统计成活率和脱毒率,结果见表 8。由表 8 可以看出,随着热处理时间的延长,

茎尖的成活率逐渐下降,其中热处理 30 d 后剥取的茎尖成活率与未经热处理的茎尖相同,但当热处理时间超过 45 d 后,与未经热处理的茎尖相比,热处理的茎尖成活率开始下降。这说明虽然经热处理后试管苗得以成活,但是也受到了热损伤,热处理时间越长受到的热损伤越大,剥取的茎尖生长受到了抑制,热处理后剥取的茎尖成活率也降低。同时热处理后茎尖中 CVB、TMV 和 CMV 3 种病毒的脱毒率较未经热处理时明显提高,且随着热处理时间的延长,3 种病毒的脱毒率逐渐上升,其中热处理 60 d 后,CMV 和 CVB 的脱毒率均可达到 100.0%。

表 7 热处理时间对菊花试管苗成活率的影响

Table 7 Effect of heat treatment time on survival rate of test-tube plantlet	
热处理时间/d Heat treatment time	成活率/% Survival rate
0	100.0
30	69.2
45	59.2
60	30.8

表 8 热处理结合茎尖培养法中不同热处理时间对菊花茎尖成活率及脱毒率的影响

Table 8 Effect of different heat treatment times on survival rate and virus-elimination rate of shoot-tip culture with heat treatment						
热处理时间/d Heat treatment time	茎尖总数 Total shoot-tip	成活率/% Survival rate	不同病毒的脱毒率/% Virus-elimination rate of different viruses			
			CMV	CVB	TMV	总计 Total
0	30	66.7	61.9	63.2	55.0	180.0
30	30	66.7	85.0	80.0	75.0	240.0
45	30	63.3	89.5	84.2	84.2	257.9
60	30	56.7	100.0	100.0	94.1	294.1
总计 Total			339.5	324.2	308.3	972.0

进一步对热处理后茎尖的脱毒率进行方差分析,结果见表 9。由表 9 可以看出,不同热处理时间的茎尖脱毒率差异极显著,这说明经热处理后茎尖的脱毒效果明显加强^[12],这是因为随着热处理时间的延长,病毒的浓度逐渐降低,使得病毒的脱毒效果逐渐增强。此外,不同病毒的脱毒率差异也极显著,

表 9 热处理结合茎尖培养法中菊花茎尖脱毒率的方差分析结果

Table 9 Variance analysis for virus elimination rate of shoot-tip culture with heat treatment

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 <i>SS</i>	均方 <i>MS</i>	<i>F</i>
热处理时间 Heat treatment time	3	2 266.2	755.4	164.2* *
病毒种类 Viruses	2	103.0	51.5	11.2* *
随机误差 Random error	6	27.8	4.6	
总计 Total number	11	2 397.0		

注(Notes): $F_{0.05(3,6)}=4.76$, $F_{0.01(3,6)}=9.78$; $F_{0.05(2,6)}=5.14$, $F_{0.01(2,6)}=10.9$ 。

综合考虑热处理对菊花试管苗的成活率、茎尖成活率和脱毒率的影响后发现,与未经热处理的试管苗相比,热处理 45 d 的试管苗成活率降低 40.8%,热处理 60 d 的试管苗成活率降低 69.2%,二者相差 28.4%;与未经热处理的茎尖相比,热处理 45 d 的茎尖成活率降低 3.4%,热处理 60 d 的茎尖成活率降低了 10.0%,二者相差 6.6%;与未经热处理的茎尖相比,热处理 45 d 后 CMV、CVB 和 TMV 的脱毒率分别提高 27.6%,21.0%和 29.2%,热处理 60 d 后 CMV、CVB 和 TMV 的脱毒率分别提高 38.1%,36.8%和 39.1%,二者分别相差 10.5%,15.8%和 9.9%。虽然热处理 60 d 的试管苗成活率很低,其茎尖的成活率与热处理 45 d 茎尖相差不多,但脱毒率却明显提高,其中 CMV、CVB 的脱毒率均能达到 100.0%,具有较好的脱毒效果。因此,在生产上,可以选择热处理 60 d 后剥取长度为 0.4~0.5 mm 的茎尖进行脱毒处理。

2.4 不同脱毒方法脱除菊花体内 3 种病毒的比较

将茎尖培养法、病毒唑结合茎尖培养法以及热处理结合茎尖培养法中筛选出的脱毒效果最好的组合进行比较,以筛选出脱除菊花体内病毒的最佳途径。将病毒唑结合茎尖培养法中 6 号组合及热处理 60 d 后长度为 0.4~0.5 mm 的茎尖成活率和脱毒率与茎尖培养法中长度为 0.4~0.5 mm 茎尖的成活率和脱毒率分别进行比较。结果显示,与茎尖培养法中长度为 0.4~0.5 mm 的茎尖相比,病毒唑结合茎尖培养法中 6 号组合茎尖成活率降低了 13.4%,CMV、CVB 和 TMV 3 种病毒的脱毒率分别提高了 26.3%,23.5%和 26.3%;热处理 60 d 后长度为 0.4~0.5 mm 的茎尖成活率降低了 10.0%,CMV、CVB 和 TMV 3 种病毒的脱毒率分别提高了

其中 CMV 的脱毒率最高,而 TMV 的脱毒率最低,CVB 居中。经热处理后各病毒表现出了不同的脱毒率,这可能因为不同病毒的耐热极限温度不同,所以对热处理的反应也不同,一般病毒的耐热极限温度越高,植物中的病毒越难脱除。

35.0%,40.0%和 39.1%。由此可以看出,病毒唑结合茎尖培养法的脱毒效果优于茎尖培养法,但热处理结合茎尖培养法的脱毒效果不但优于茎尖培养法,同时也优于病毒唑结合茎尖培养法。

3 讨 论

茎尖培养脱除病毒的原理是,植物的生长点以及生长点附近被认为无病毒或病毒浓度很低^[13-14]。一般茎尖长度越小,茎尖的脱毒率越高。本研究中,菊花“墨菊”长度为 0.2~0.3 mm 茎尖中 CMV、CVB 和 TMV 3 种病毒的脱毒率较高,分别为 72.7%,88.9%和 70.0%,但是茎尖越小,成活率越低,长度为 0.2~0.3 mm 的茎尖成活率只有 33.3%。所以综合考虑成活率和脱毒率后,生产上以剥取长度为 0.4~0.5 mm 的茎尖进行脱毒培养比较适宜。

化学药剂用于病毒的脱除,主要是由于这类物质对植物病毒有体外钝化作用,或者在活体内有抑制病毒及治疗作用,或者可以诱导寄主植物产生与病毒相关的蛋白,从而提高植株的抗病性^[15]。其中病毒唑是应用比较广泛的试剂,但实际应用中植物会有不同程度的药害^[16]。本试验发现,用病毒唑处理后,菊花茎尖生长受到抑制,甚至会褐化死亡,同时随着病毒唑处理时间的延长,茎尖分化的试管苗出现了玻璃化、黄化等现象,其长势也较未添加病毒唑培养的正常试管苗弱。

热处理主要是利用病毒和寄主植物对高温忍耐性的差异,当植物组织处于高于正常温度的适当高温环境时,可部分或完全钝化植物组织中的病毒,但寄主植物组织很少或不会受到伤害^[17-18]。本研究未采用单独的热处理方式,是因为 CMV、CVB 和

TMV 3 种病毒的耐热极限温度很高,其中 CMV 的热钝化温度为 70 ℃,CVB 的热致死温度为 70~80 ℃,而 TMV 的热致死温度在 90 ℃ 以上^[19-20],在此温度下菊花无法存活,所以选用热处理结合茎尖培养法来达到脱毒的目的。菊花本身耐热性很差,直接高温处理,试管苗的成活率极低,因此本研究采用逐步升温及昼夜变温的方式,这样在温度逐步升高的过程中,试管苗逐渐得以锻炼,可增加其成活率,但本试验未对恒温处理的试管苗进行茎尖脱毒研究,这在后续试验还将进一步进行分析。

本研究的 3 种脱毒方法中,只有热处理结合茎尖培养法中 CMV、CVB 和 TMV 3 种病毒的脱毒率差异极显著;而茎尖培养法及病毒唑结合茎尖培养法中,CMV、CVB 和 TMV 3 种病毒的脱毒率虽然有所不同,但差异均不显著。这说明热处理结合茎尖培养法对不同病毒的脱毒效果有差异,而茎尖培养法及病毒唑结合茎尖培养法对不同病毒的脱毒效果基本一样。生产上可根据病毒自身的性质选择适宜的脱毒方法。

本研究结果显示,3 种脱毒方法中,茎尖培养法中脱毒效果最好的是长度为 0.4~0.5 mm 的茎尖,茎尖成活率为 66.7%,CMV、CVB 和 TMV 的脱毒率分别为 61.9%,63.2%和 55.0%;病毒唑结合茎尖培养法中脱毒效果最好的组合是病毒唑质量浓度为 10 mg/L、处理时间为 42 d、茎尖长度为 0.4~0.5 mm,茎尖成活率为 53.3%,CMV、CVB 和 TMV 的脱毒率分别为 88.2%,86.7%和 81.3%;热处理结合茎尖培养法中脱毒效果最好的是在热处理 60 d 后剥取长度为 0.4~0.5 mm 的茎尖,茎尖成活率为 56.7%,CMV、CVB 和 TMV 的脱毒率分别为 100.0%,100.0%和 94.1%。

3 种脱毒方法各有优缺点,直接剥茎尖操作简单,但脱毒效果不强;病毒唑结合茎尖培养法,其脱毒效果虽较前者强,但对植物存在一定的药害作用;热处理结合茎尖培养法的脱毒效果最强,但是热处理持续的时间较长且需要一定的仪器设备,繁殖一批脱毒苗的周期相对较长。在生产实践中人们可根据自身现有的基本条件选择适宜的脱毒方法。

本研究只探讨了 3 种方法对菊花脱除病毒效果的影响,此外还有很多方法如愈伤组织培养、原生质培养、珠心培养、花药培养^[21]等尚未应用到菊花的脱毒研究中,这些方法的脱毒效果在未来的研究中还有待探讨。

[参考文献]

[1] 韩学俭. 菊花病毒病及其防治 [J]. 江西农业科技,1995(5):31-32.
Han X J. The virus diseases and control of *Dendranthema morifolium* [J]. Jiangxi Agricultural Science and Technology, 1995(5):31-32. (in Chinese)

[2] 吴红芝,孔宝华,陈海如,等. 昆明地区菊花病毒病的调查与鉴定 [J]. 云南农业大学学报,2002,17(1):24-27.
Wu H Z,Kong B H,Chen H R,et al. Survey and identification of chrysanthemum virus diseases in Kunming [J]. Journal of Yunnan Agricultural University,2002,17(1):24-27. (in Chinese)

[3] 李 润,曾 莉,郭蓓蓓,等. 马铃薯茎尖脱毒培养技术的研究进展 [J]. 农业科技通讯,2012(9):13-16.
Li R,Zeng L,Guo B B,et al. Research progress on technology of shoot-tip culture for potato [J]. Agriculture Science and Technology Communication,2012(9):13-16. (in Chinese)

[4] 李志强,王 晶,丁国亮,等. 草莓热处理结合茎尖脱毒技术研究 [J]. 北方园艺,2012(5):125-127.
Li Z Q,Wang J,Ding G L,et al. Study on heat treatment and shoot tip virus elimination technique of strawberry [J]. Northern Horticulture,2012(5):125-127. (in Chinese)

[5] 周晓波,吴艺飞,丁茜黄. 卷丹百合脱毒快繁技术研究 [J]. 中国农学通报,2012,31(28):201-205.
Zhou X B,Wu Y F,Ding Z Y. Study on the detoxification and rapid propagation of *Lilium lancifolium* Thunb. [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2012,31(28):201-205. (in Chinese)

[6] 许传俊,黄珺梅,曾碧玉,等. 病毒唑对大花蕙兰 CyMV 及 ORSV 脱毒效果初探 [J]. 亚热带植物科学,2012,41(1):7-9.
Xu C J,Huang J M,Zeng B Y,et al. Influence of ribavirin on *Cymbidium hybridum* virus eradication [J]. Subtropical Plant Science,2012,41(1):7-9. (in Chinese)

[7] 续九如,黄智慧. 林业试验设计 [M]. 北京:中国林业出版社,1995.
Xu J R,Huang Z H. Forestry experiment design [M]. Beijing: China Forestry Publishing House,1995. (in Chinese)

[8] 王仁睿,李明福,李桂芬,等. 菊花品种“日本红”的脱毒和组织培养 [J]. 植物生理学通讯,2009,45(8):797-798.
Wang R R,Li M F,Li G F,et al. Viruses elimination and tissue culture of *Dendranthema morifolium* [J]. Plant Physiology Communications,2009,45(8):797-798. (in Chinese)

[9] 孙 伟,焦 奎. 酶联免疫吸附分析法在植物病毒检测中的应用 [J]. 化学研究与应用,2002,14(5):510-514.
Sun W,Jiao K. Application of ELISA in the detection of plant virus [J]. Chemical Research and Application,2002,14(5):510-514. (in Chinese)

[10] Zhou R G,Fan Z H,Li X Z,et al. The effect of heat acclimation on membrane hermostability and relative enzyme activity [J]. Acta Agronomica Sinica,1995,21(5):568-572.