

滁菊组织培养脱病毒技术研究

邓衍明, 褚芳玲, 华如枝 (安徽省滁州市农业科学研究所, 安徽滁州 239000)

摘要 采用改良热处理结合茎尖分生组织培养的方法, 建立滁菊组培脱毒快繁技术体系。研究表明, 滁菊茎段诱导的最佳培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA +0.1 mg/L NAA; 茎尖增殖的最佳培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA +0.1 mg/L NAA; 壮苗生根的最佳培养基为 1/2MS+0.1 mg/L NAA。接种脱毒结果为, 脱毒率>83%, 茎尖成活率>42%。

关键词 滁菊; 组织培养; 热处理; 脱毒

中图分类号 Q943.7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)14-04130-01

Study on Virus-free Technique of Chuzhou Chrysanthemum by Tissue Culture

DENG Yan-ming et al (Agricultural Science Institute of Chuzhou, Chuzhou, Anhui 239000)

Abstract Rapid propagation technical system of the virus-free plantlets of Chuzhou Chrysanthemum was established by shoot tip meristematic tissue culture combined with improved heating treatment. The optimum stem induction medium was MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA. The optimum shoot tip propagation medium was MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA. The optimum rooting medium was 1/2 MS + 0.1 mg/L NAA. The virus-free ratio of shoot tips was above 83 % and the survival ratio was above 42 %.

Key words Chuzhou Chrysanthemum; Tissue culture; Heating treatment; Virus-free

滁菊 [*Dendranthema morifolium* (Ramat) Tzvel 'chuju'] 是菊科菊属多年生宿根草本植物, 已有几百年的栽培历史, 数百年的栽培使滁菊感染了较重的病毒病, 使其种性退化、产量降低、品质变劣。侵染滁菊的病毒主要有番茄不孕病毒 (TAV)、马铃薯 X 病毒 (PVX)、马铃薯 Y 病毒 (PVY) 和黄瓜花叶病毒 (CMV) 等。笔者在对滁菊组培脱毒时, 保证其独特种性和药用保健价值不发生改变。

1 材料与方法

1.1 材料 滁菊由滁州市农科所提供; 番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、曼陀罗 (*Datura stramonium*)、心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*)、千日红 (*Gomphrena globosa*)、苋色藜 (*Chenopodium amaranticolor*)、克氏烟 (*Nicotiana megulosphon*)、普通烟 (*N. tabacum*)、抗血清 (TAV、PVX、PVY、CMV), 由安徽农业大学植保学院提供。

1.2 方法

1.2.1 外植体的选取、灭菌与接种。 从田间选取发病植株的茎段, 除去叶, 将茎段切割成 3~5 cm 长小段, 用自来水冲洗 10~15 min。在超净工作台上用浓度 0.1 % 升汞消毒, 加入 5 滴吐温-80, 并不时轻轻搅动。8~10 min 后倒去升汞液, 注入灭过菌的蒸馏水, 涮洗 6~8 次。按无菌操作要求, 将材料置白瓷盘中再行分离、切割、接种。

1.2.2 培养基激素用量的筛选。 采用 MS 作为基本培养基, 细胞分裂素用 6-BA, 生长素用 NAA, 添加的蔗糖为 30 g/L, 琼脂为 6.5 g/L, pH 值调整为 5.6。培养室温度设为 (25±1)℃, 每天光照 14 h, 光照强度为 2 500 lx。茎段诱导培养基的激素设置 2 组试验: 第 1 组, NAA 为 0.1 mg/L, 6-BA 设置 1.0、2.0、3.0 mg/L 3 种处理。第 2 组, 6-BA 为 2.0 mg/L, NAA 设置 0.1、0.2、0.5 mg/L 3 种处理。等到培养瓶中丛生苗茎高达 3 cm 以上时, 将其剪下进行生根培养。生根培养基中只添加 NAA, 设置 0.01、0.5 mg/L 3 种处理, 同时对 MS 的大量元素设置正常和减半 2 种处理。

1.2.3 试管苗的热处理方法。 经壮苗生根后的完整植株, 转

移到光照培养箱中继续生长, 温度采用阶段升温法, 即 32℃×2 d、34℃×2 d、36℃×2 d、38℃×42 d, 其他条件同培养室。处理期间注意观察培养物, 并对出现的情况及时采取相应措施。

1.2.4 热处理后试管苗的茎尖培养。 在超净工作台上将经热处理的幼苗自培养瓶中取出, 置于体视显微镜下剥取带有 2 个以上叶原基的 0.5~1.0 mm 的茎尖, 迅速接种到准备好的培养基上。在茎段诱导培养基的基础上, 保持 NAA 0.1 mg/L 不变, 在培养过程中根据情况对 6-BA 的用量进行调整。

1.2.5 脱毒效果鉴定方法。

1.2.5.1 指示植物鉴定。 取试管苗嫩叶加 PBS (磷酸缓冲液) 研磨后取上清液, 分别接种在各对应指示植物的叶片上。用人工摩擦接种法接种后将寄主置 40 目防虫网内常规培养, 15 d 后观察记载发病情况。

1.2.5.2 血清学 (ELISA) 检测。 将组培苗加 PBS 研磨后沉淀, 取上清液作为抗原在酶标测定板上分别与 TAV、PVX、PVY、CMV 抗血清反应, 并以 PBS 为对照, 观察反应结果。

1.2.5.3 电子显微镜检测。 采用负染制片法进行检测, 经 JEM-100SX 透射电镜观察有无病毒粒子。

2 结果与分析

2.1 培养基不同激素配比的筛选结果 表 1 表明, 结合增殖倍数和壮苗等方面的考虑, 诱导滁菊茎段腋芽萌发的最佳培养基为: MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。滁菊茎段经 4~6 周即可诱导出大量可供转接的幼苗, 增殖倍数为 5~8 倍。在切取茎尖脱毒培养时, 使用了该配比, 但丛生芽生长过于细弱, 且增殖倍数过高, 于是逐步下调 6-BA 的用量, 至 1.0 mg/L 时最佳。

表 2 表明, 在壮苗生根培养试验中, 除了不添加任何激素的 MS 培养基外, 其他几种都可以用来作为生根培养, 但综合生长表现和经济成本两方面因素, 最佳生根培养基应为 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L。

2.2 脱毒效果鉴定结果 表 3 表明, 在对剥离的长度小于 0.7 mm 的茎尖培养出的试管苗进行脱毒效果鉴定时, 3 种方法均没有检出 TAV、PVX、PVY 和 CMV 这 4 种病毒。因

(下转第 4159 页)

作者简介 邓衍明 (1976-), 男, 安徽来安人, 硕士, 农艺师, 从事无性繁殖作物的组培脱毒和花卉的组培快繁技术研究。

收稿日期 2007-02-13

实现第 1、2 蘖不缺位。

3.3 创建合理的群体结构是保证 控制高峰苗,减少无效分蘖,提高分蘖成穗率,必须以降低群体起点为前提。2005~2006 年蒙城县多点调查结果得出新麦 18 丰产高效的群体结构指标:基本苗 180 万~240 万/hm²,冬前茎蘖数 900 万~1 200 万/hm²,年后总茎蘖数 1 200 万~1 500 万/hm²,分蘖成穗率 50%~60%,最大 LAI 8.5~9.0,最终成穗数 630 万~675 万/hm²,单穗重 1.55~1.70 g。

3.4 加强拔节孕穗期肥水管理,推广“三增三减”施肥技术 在肥料运筹技术上,改革“一炮轰”传统施肥法,推广“三增三减”施肥法。即一增有机肥施用量,适当减少化肥使用量;二增追肥量,适当减少基肥量;三增中后期追肥量,适当减少中前期追肥量。研究表明,最佳 N 肥运筹方式为:基肥:拔节孕穗肥的比例为 6:4 或 5:5,即由传统的基肥为主施肥法改为追肥为主施肥法,小麦冬前、返青不施肥,使 N 肥后移和春 N 后移,可控制春季无效分蘖,改善中后期群体光合性能,提高单穗重和最终产量。当基部节间定长后视墒情、苗情和天气状况追施拔节孕穗肥,一般追纯氮 105~120 kg/hm²。大群体麦田要适当推迟和减少追氮量,以防群体过大而发生倒伏,开花后 7~10 d 视墒情、苗情和天气酌补粒肥纯氮 30~45 kg/hm²。

3.5 综防病虫害

3.5.1 化除技术。年前日均气温 10℃趁天晴进行化学除草,春季要在小麦拔节前进行化学除草。

3.5.2 综防病虫害。新麦 18 抗病性较强,返青拔节期重点

防治小麦白粉病、锈病和纹枯病;抽穗灌浆期重点防治小麦赤霉病、纹枯病和小麦穗蚜。生育中后期以准确的病虫害测报为基础,及时对麦田进行药肥混喷 2~3 次,达到防病治虫、养根保叶、增粒增重的多重效果。药剂配方:用 40%百虫死 525 ml/hm²+20%粉锈宁 750 ml/hm²+10%吡虫啉 300 g/hm²+883 丰产灵 150 ml/hm²+200%磷酸二氢钾。

3.6 改田间管理措施一促到底为视苗情促控结合 运用化控或镇压技术控旺苗生长。具体镇压的程度应掌握旺苗控上促下连续压,壮苗促根防旺酌情压,弱苗防旱防冻宜轻压。一般情况下弱苗不镇压,苗小无蘖不能压,苗大无蘖宜重压,拔节以后不能压。冬季镇压一般应在封冻前的晴天午后进行,春季镇压在解冻后进行。结合冬前化除喷一次矮壮素、多效唑(PP₃₃₃)或壮丰胺,控制旺苗基部节间伸长,增强麦苗抗寒能力。而对已受冻旺苗,应于返青初期用耙子狠耨枯叶,促使麦苗新叶见光,尽快恢复生长,但要禁止牲畜啃吃麦苗。同时应在日平均气温升到 3℃时适当早浇返青水并结合追肥,促进新根新叶长出。虽然主茎死亡较多,但只要及时加强水肥管理,保存活的主茎、大分蘖,促发小分蘖,仍可争取较高产量。对于受冻晚弱苗由于其临近越冬时仅有 3 叶左右,没有分蘖和次生根,麦苗素质弱,抗寒能力差,易受冬季强寒潮袭击危害,必须加强对这类晚弱麦田的增温防寒工作,如撒施农家肥,保护分蘖节不受冻害。同时,早春不可深松土,以防断根伤苗。

参考文献

[1] 中华人民共和国农业部. 小麦——新麦 18 [EB/OL].(2006-06-14) [2007-01-09].<http://www.farmers.org.cn/showcontenteng>.

(上接第 4130 页)

表 1 不同激素对比对滁菊茎段增殖的影响				
处理	接种后天数//d			
	8	15	22	29
0.1 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA	0.1	1.0	2.1	2.8
0.1 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA	0.3	1.1	3.4	4.3
0.1 mg/L NAA + 3.0 mg/L 6-BA	0.4	1.2	4.1	5.2
2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA	0.3	1.2	3.5	4.6
2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA	0.3	1.0	3.0	3.4
2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA	0.2	1.0	2.9	3.1

表 2 不同培养基对滁菊试管苗生根的影响				
处 理	接种后 12 d		接种后 17 d	
	根数//条	平均根长//cm	根数//条	平均根长//cm
MS	0	0	2.5	0.4
MS+0.1 mg/L NAA	4.2	0.6	5.4	1.2
MS+0.5 mg/L NAA	5.1	0.7	6.5	1.4
1/2 MS(大量元素减半)	4.8	0.5	6.3	1.1
1/2 MS+0.1 mg/L NAA	5.5	0.7	7.1	1.5
1/2 MS+0.5 mg/L NAA	5.2	0.8	6.9	1.6

此,对试管苗进行热培养后,完全可以剥离带 2 个以上叶原基的较大的茎尖(0.5~0.7 mm)进行脱毒培养。这一“改良热处理结合茎尖分生组织培养”的方法在降低了试验的操作难度和经济成本的同时,可以大幅度提高茎尖培养的成活率(>83%)和脱毒率(>42%)。

表 3 热处理后试管苗剥离茎尖的长度对其成活率和脱毒率的影响

茎尖长度//mm	接种数//个	成活数//个	成活率//%	脱毒率//%
0.5~0.6	50	21	42	100
0.6~0.7	50	26	52	100
0.7~0.8	50	34	68	98
0.8~0.9	50	37	74	83

3 讨论

(1)根据病毒在植物体内分布不均衡原理,剥离茎尖的大小与去毒效果密切相关。为脱除病毒,剥离的茎尖应尽可能小,但太小的茎尖又不易成活。是否还可以优化热处理的条件,剥离更大的茎尖进行培养还需要进一步研究。

(2)菊花的组织培养途径是很多的。如果可以通过愈伤组织形成的途径得到无病毒,而且又没有变异,则可以利用滁菊的叶片等器官作为外植体开展组培脱毒试验,既可降低工作难度,又能节约资金,是值得尝试的。

参考文献

[1] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,1991:56~64.
[2] 高亦珂,赵勃,丁国勋.菊花茎叶外植体再生体系的研究[J].北京林业大学学报,2001(1):32~33.
[3] 蒋细旺,刘国锋,包满珠.菊花 9 个品种叶片和茎段快速高效再生体系的建立[J].华中农业大学学报,2003(2):162~166.
[4] 魏梅生,黄冲.植物病毒 ELISA 检测实验数据处理系统的建立[J].植物检疫,2001(1):21~22.