

Effects of Four Treatments on the Detoxification of *Dendranthema* Tissue Culture Seedlings

Guoshu Li^{1,2*}, Zhengji Wang¹, Shuguo Fan^{1,2}, Chengdong Xu^{1,2}, Yunqin Gang¹

¹School of Chemistry and Life Science, Chuxiong Normal University, Chuxiong Yunnan

²Institute for Bio-Resources Research and Development of Central Yunnan Plateau, Chuxiong Yunnan

Email: hslxgs@cxtc.edu.cn

Received: Mar. 30th, 2020; accepted: May 2nd, 2020; published: May 9th, 2020

Abstract

In order to study the effective method of detoxification of tissue culture seedlings of chrysanthemum, the *Dendranthema* was selected as the experimental material and tissue culture technology was used to obtain tissue culture seedlings of chrysanthemum. Then, four kinds of detoxification techniques were used to detoxify the microstem-tip, to detoxify the microstem-tip, to detoxify the heat treatment, and to detoxify the diurnal temperature. The results showed that the detoxification of microstem tip was one of the simple and effective methods to remove chrysanthemum virus. After transplanting, the external morphological observation method showed that 100mg/L of moroxydine hydrochloride had the best detoxification effect on chrysanthemum. Heat treatment is conducive to the detoxification of chrysanthemum tissue culture seedlings. The detoxification method is simple and effective.

Keywords

Dendranthema, Tissue Cultured Seedling, Detoxification Test, Micro Stem Tip Detoxified

四种处理对菊花组培苗脱毒效果的比较

李国树^{1,2*}, 王振吉¹, 范树国^{1,2}, 徐成东^{1,2}, 岗云芹¹

¹楚雄师范学院化学与生命科学学院, 云南 楚雄

²滇中高原生物资源开发与利用研究所, 云南 楚雄

Email: hslxgs@cxtc.edu.cn

收稿日期: 2020年3月30日; 录用日期: 2020年5月2日; 发布日期: 2020年5月9日

*第一作者。

摘要

为研究菊花组培苗脱毒的有效方法,选取生长不正常的菊花为外植体,经植物组织培养技术获得菊花组培苗;然后采用微茎尖脱毒、病毒唑或盐酸吗啉胍培养茎尖培养、热处理脱毒培养、昼夜变温脱毒4种脱毒技术对组培苗进行处理。结果表明:微茎尖脱毒处理是脱除菊花病毒简单有效的方法之一;经移栽通过外部形态观察法检测,100 mg/L的盐酸吗啉胍处理菊花的脱毒效果最好;热处理有利于菊花组培苗脱毒;指示植物检测菊花脱毒方法简单,效果明显。

关键词

菊花, 组培苗, 脱毒检测, 微茎尖脱毒

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

菊花(*Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvel.)是菊科宿根多年生的草本植物,具有较高的观赏价值和药用价值而被广泛栽培利用[1],但是菊花是多年生宿根花卉,在栽培管理中容易受到病毒浸染和病虫害的危害而导致叶片黄化、皱叶花叶、叶片畸形、叶背紫红色、植株矮小、花色不正常、花朵畸形、花小、花枝变短。病毒危害严重时,既影响其产量及观赏价值[2],还会导致全株死亡等。

为筛选出菊花组培苗的脱毒培养方法及病毒检测的最佳方法,采用已带有病毒病的菊花植株为外植体,进行植物组织培养得到带有病毒的菊花试管苗,并将已培养带病毒病的试管苗分别用:含病毒唑的培养基、昼夜变温处理、高温培养、低温培养、茎尖脱毒培养五种方法进行脱毒处理研究,再采用千日红、曼陀罗、苋色黎3种指示植物进行涂抹栽培,对其外部生长形态特征和脱毒效果观察检测,以筛选出菊花组培苗的脱毒培养方法及病毒检测的最佳方法,为菊花脱毒试管苗生产提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 材料

自楚雄师范学院菊花栽培基地取回植株矮小、叶片黄化、皱叶花叶、叶片畸形、花色不正常的菊花(*Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvel.)植株作外植体,经消毒后接种于愈伤诱导、茎叶分化和生根培养基中,经60 d培养成菊花试管苗后,再进行以下实验。

2.2. 方法

2.2.1. 微茎尖脱毒培养技术

在解剖镜下剥取不同长度的菊花试管苗的顶芽、侧芽,剥取的茎尖携带1-3个叶原基的茎尖进行接种,每瓶接种3个茎尖,共接种10瓶进行培养,每7 d观察一次。

2.2.2. 试管苗抑制病毒药品处理脱毒

用已培养两个的幼嫩试管苗作为外植体,切取长约1.0 cm长菊花试管苗的顶芽、侧芽接种于含有病毒唑针剂(设5个浓度:0 mg/L、5 mg/L、7 mg/L、10 mg/L、15 mg/L)和盐酸吗啉胍(设5个浓度:0 mg/L、

15 mg/L、30 mg/L、50 mg/L、70 mg/L)的 MS + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 2.0 mg/L 上诱导培养。以上 10 种培养基每种培养基接种 3 个茎尖，每种培养基接种 3 瓶，共 90 瓶。放于温度为 25℃、光照 2000 lx、每天光照 12 h 的组培室内培养。每 3 d 观察记录一次生长情况。

2.2.3. 热处理结合茎尖培养脱毒

经 60 d 培养成菊花试管苗采用热处理方法进行脱毒。采用两种方式进行，第一种方式为缓慢处理，把恒温水浴锅的温度设置成三个梯度：45℃、50℃、60℃，当水温达到预定温度后，把菊花试管苗分别放在不同温度下处理，每天处理 8 个小时，晚上 9 点放回组培室的培养室内进行常规培养，连续处理三天；第二种方式为快速处理，直接把恒温水浴锅的温度设为 90℃，然后把经 60 d 培养成菊花试管苗(瓶装)放入 90℃ 的沸水中处理 5 min；晚上 9 点放回组培室的培养室内进行常规培养，连续处理三天；培养三周后进行脱毒效果检测。

2.2.4. 昼夜变温处理脱毒

在参照超低温保存和植物昼夜交替生物钟改变的基础上建立昼夜温差培养，选取菊花脱毒效果最佳的昼夜温差组合，设立试验如下：第一组：白天温度为 5℃，晚上温度为 28℃，连续处理三周；第二组：白天温度为 28℃，晚上温度为 5℃，连续处理三周。

2.3. 脱毒效果检测方法

2.3.1. 性状观察鉴定法

将完成脱毒处理、培养三周后的菊花脱毒苗炼苗 5 d 后，移栽到室外隔离栽培，进行植株生长状态、外部形态观察及脱毒效果检测。选取红壤土为栽培基质，将取回来的红壤土用细筛子筛取较细的部分备用，首先用 0.5% 的高锰酸钾消毒红壤土和育苗袋，从培养瓶取出脱毒苗后用多菌灵处理 5 min，然后把脱毒菊花苗栽培到红壤土中进行观察生长情况。

2.3.2. 指示植物鉴定法

分别将经过脱除病毒试验处理的试管苗制成溶液，涂抹在长势良好、健康的曼陀罗、千日红、苜蓿色藜幼嫩叶片 7 d 后观察生长情况。

2.3.3. 外部形态鉴定法

将经过脱毒处理的试管苗移栽至红壤土 3 周后观察统计其生长情况。

3. 结果与分析

3.1. 菊花脱毒效果

3.1.1. 微茎尖培养处理后茎尖长度与茎尖生长情况

经过微茎尖培养处理一段时间后观察微茎尖生长情况，剥取的茎尖长度不同生长情况也不同，具体表现为表 1：

Table 1. The growth of stem tips of different lengths
表 1. 不同长度茎尖的生长情况统计表

茎尖长度(mm) Shoot-Tip Length (mm)	茎尖总数/个 Total Shoot-Tip/Bud	生长情况 Growth Situation
0.4<	4	茎尖生长1周后白化，死亡
0.4-0.8	4	茎尖生长3周后出现愈伤组织后分化为丛芽

Continued

0.8~1.0	4	茎尖2周后直接生长为叶片
>1.0	4	茎尖2周后逐生长为小苗

由表 1 可知, 经微茎尖培养处理后发现: 茎尖越小成活率越低, 因为茎尖在剥离过程中失去过多的水分从而导致死亡; 当茎尖长度为 0.4~0.8 mm 时茎尖易分化成愈伤组织, 然后逐渐分化为丛芽; 当茎尖长度超过 0.8 mm 时, 由于剥离的茎尖所携带的叶原基多, 从而导致茎尖直接分化生长为小苗。具体表现如下图 1、图 2。

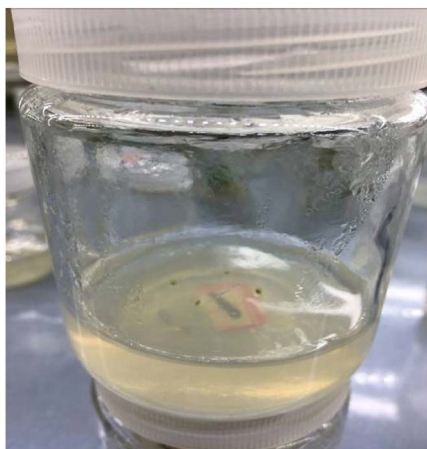


Figure 1. Death after albinism of stem tip
图 1. 茎尖白化后死亡

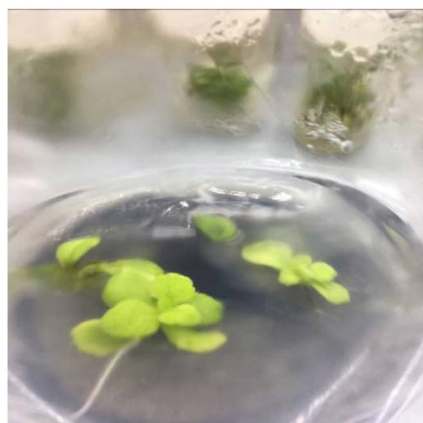


Figure 2. Stem tip differentiation into chrysanthemum seedlings
图 2. 茎尖分化为菊花小苗

3.1.2. 药剂与茎尖培养脱毒处理效果

1) 病毒唑茎尖培养脱毒处理结果

经病毒唑结合茎尖培养茎尖后, 茎尖的生长不良。将菊花顶芽、侧芽和根尖接入滴有不同质量浓度病毒唑的培养基中, 5 天后发现 3 mg/L 和 10 mg/L 的病毒唑先出现褐化后逐渐死亡, 继续观察一星期发现 5 mg/L 和 15 mg/L 的愈伤组织也同样表现为褐化死亡, 综上分析原因为: 病毒唑质量浓度太高, 导致愈伤组织褐化、死亡。

2) 盐酸吗啉胍与茎尖培养处理结果

经过不同质量浓度的盐酸吗啉胍培养茎尖一段时间后观察茎尖的成活率，发现不同的处理组成活率不尽相同，具体为表 2:

Table 2. The survival rate of the stem tip in the treatment of hydrochloric acid

表 2. 盐酸吗啉胍处理茎尖的成活率统计表

盐酸吗啉胍质量浓度(mg/L) Moroxydine Hydrochloride Mass Concentration (mg/L)	接种数/瓶 Vaccination Number/Bottle	成活数/瓶 Survival Number/Bottle	成活率% Rate of Survival %
10 mg/L	10	4	40
15 mg/L	10	5	50
30 mg/L	10	7	70
50 mg/L	10	5	50
70 mg/L	10	8	80
100 mg/L	10	9	90

由表 2 可知：经盐酸吗啉胍结合茎尖培养后，盐酸吗啉胍质量浓度的不断增加，菊花顶芽、侧芽和根尖的生长情况也随之提高；由此可知，盐酸吗啉胍质量浓度的增加对菊花茎尖的成活率没有影响，但对其生长势具有提高作用，使菊花小苗的叶片更浓绿，植株更健壮。

3.1.3. 热处理与茎尖脱毒处理结果

在第一组缓慢中温处理过程中，60℃处理的菊花无菌苗在处理到第三天时叶片出现发黄、失绿的现象，剥取茎尖接入培养基 4 天后白化、死亡；45℃和 50℃处理接入培养基培养 1 周后死亡；对于第二组快速高温处理，在处理过程中植株变黄，叶片失绿，剥取茎尖培养 5d 后白化死亡。分析原因：缓慢中温处理时间过长导致植株无法适应死亡，快速高温处理则可能温度过高而导致植株直接死亡，剥取的茎尖也无任何生理活性。对于缓慢中温处理可适当缩短处理时间，而快速高温处理则可以适当降低温度或者缩短处理时间。

3.1.4. 昼夜变温处理脱毒后茎尖的生长结果

经过昼夜变温处理的茎尖培养一段时间的生长情况如图 3~5:



Figure 3. Culture diagram of stem tip inoculation

图 3. 茎尖接种培养图

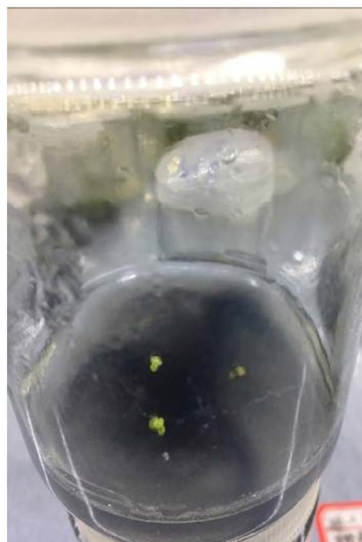


Figure 4. Growth diagram of stem tip differentiation
图 4. 茎尖分化生长图



Figure 5. Growth and differentiation diagram of stem tip stem and leaf
图 5. 茎尖茎、叶生长分化图

由图 3~5 可见：经过昼夜变温处理的茎尖培养后，茎尖生长缓慢，茎尖在生长过程中未出现愈伤组织分化；接种后的茎尖直接生长出菊花的叶片和茎秆，随着培养时间的延长 30 d，将带有茎、叶的茎段后再转接到生根培养基中培养，最终长成根、茎、叶等器官的菊花组培苗。

3.2. 菊花检测技术效果

3.2.1. 性状观察鉴定法结果

用四种脱毒技术对菊花组培脱毒苗进行鉴定，基于药剂处理结合茎尖培养脱毒苗生长势较好，直接将其移栽到室外通过外部性状观察对比初步鉴定脱毒效果，对于表现花叶症状的脱毒试管苗无需再进行其他检测，而对于未表现症状的脱毒试管苗则需要进一步采用 ELISA 对其检测。检测对照如下图 6 和图 7。

由图 6 和图 7 对比可知，将未经过任何处理的试管苗与经 100 mg/L 盐酸吗啉胍处理后的脱毒试管苗通过同等条件下的移栽观察其生长势发现，未经过任何处理的试管苗 2 周后叶缘和部分茎尖出现枯斑和

黑斑,可初步判定通过组培生产的组培苗本身可能携带一定的病毒,需通过一定的脱毒技术对其进行脱毒方可进行大量生产;经 100 mg/L 盐酸吗啉胍处理后的脱毒试管苗移栽 2 周后并未出现任何生长方面的问题,且生长速度较快,叶片持续翠绿,植株健壮,可初步判断经过高质量浓度的盐酸吗啉胍处理茎尖的试管苗生长势较好,可保持植株的稳定生长,若要确定其植株是否还携带病毒,需要进一步的进行 ELISA 精确鉴定。

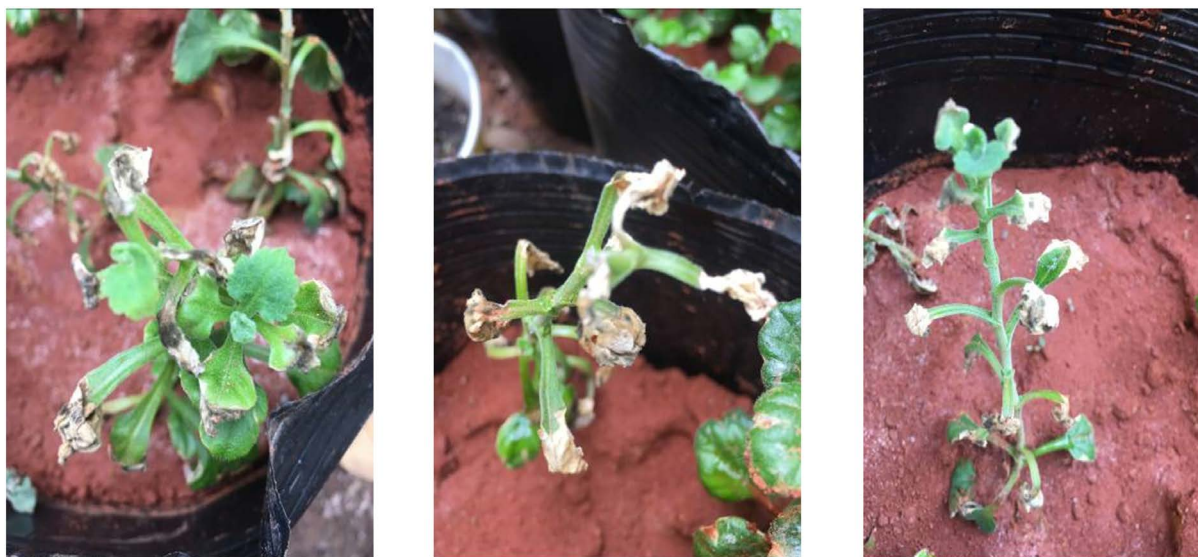


Figure 6. Growth of tube seedlings without any treatment
图 6. 未经任何处理的试管苗生长情况图

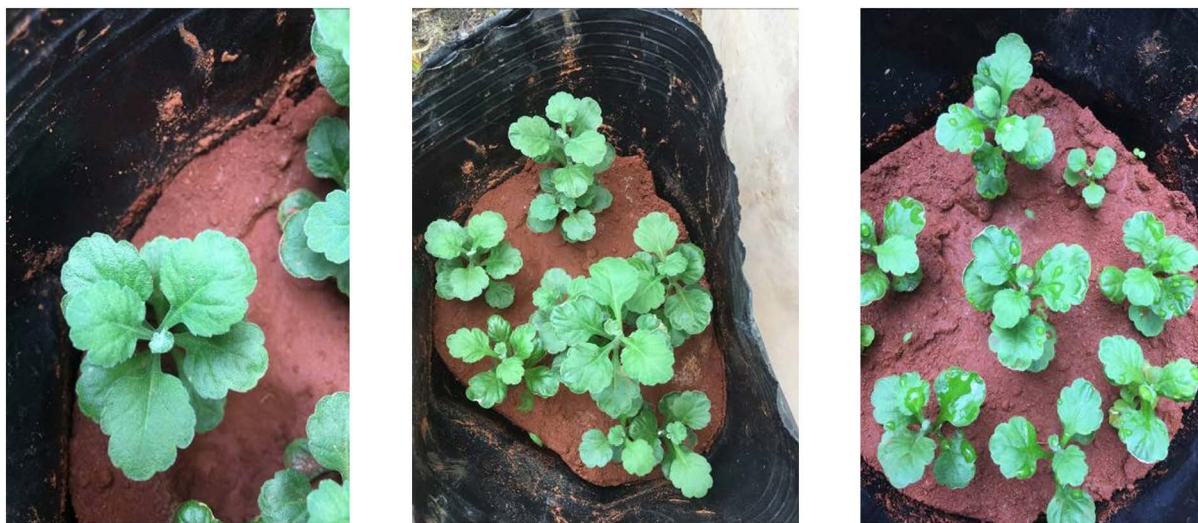


Figure 7. Growth of virus-free tube seedlings treated with 30 mg/L moroxydine hydrochloride
图 7. 经 30 mg/L 盐酸吗啉胍处理后的脱毒试管苗生长情况图

3.2.2. 指示植物鉴定法结果

对经过微茎尖培养形成的愈伤组织和丛生芽采用苋色藜和曼陀罗指示植物鉴定,但是该方法具有一定的偶然性和误差,对于检测结果需要进一步的采用更为精确的 ELISA 方法。具体检测对照情况如下图 8~11。



Figure 8. Amaranth color chenopodium treated with callus of microstem tip
图 8. 微茎尖愈伤组织涂抹苋色藜处理图



Figure 9. Amaranth color chenopodium treated with shoot solution from microstem tips
图 9. 微茎尖丛芽液涂抹苋色藜处理图



Figure 10. Application of mandala on callus of microstem tip
图 10. 微茎尖愈伤组织涂抹曼陀罗图



Figure 11. Mandala diagram with bud solution from microstem tip cluster
图 11. 用微茎尖丛芽液涂抹曼陀罗图

由图 8~11 可见: 分别用菊花微茎尖培养分化的愈伤组织和菊花的丛生芽液涂抹指示植物菟色藜与曼陀罗 2 周后观察到: 不论是在菟色藜植株和叶片, 还是曼陀罗的植株和叶片上并未出现任何枯斑或黑斑状, 也就是说, 经过茎尖脱毒后的菊花试管苗不带病毒。因此可以判定: 本次培养的菊花微茎尖分化的愈伤组织和丛生芽不含有感染菟色藜的马铃薯 S 病毒和感染曼陀罗的马铃薯 X 病毒, 达到了菊花脱毒的目的。

4. 结论与讨论

4.1. 结论

4.1.1. 微茎尖脱毒处理是脱除菊花病毒简单有效的方法之一

经研究发现, 病毒在植株体内分布不均匀, 茎尖组织不含微管系统, 几乎不含病毒或者病毒含量较少[3] [4] [5]。微茎尖脱毒培养剥取 0.6~0.8 mm 的茎尖易分化成愈伤组织, 从而分化为无毒幼苗, 这样既能保证脱毒苗的脱毒率又能保证成活率。

4.1.2. 100 mg/盐酸吗啉胍培养基能效脱除菊花组培苗的病毒

近年来的研究表明, 在培养基内加入抗病毒药剂, 药剂会阻止病毒 RNA 帽子结构的合成, 从而使病毒复制受阻[6] [7]。把微茎尖形成的愈伤组织接入含有病毒唑或盐酸吗啉胍的培养基中, 出现了不同的情况: 在病毒唑培养基中, 无论病毒唑质量浓度为多少, 都出现了褐化的现象, 而在盐酸吗啉胍培养基中, 在 100mg/盐酸吗啉胍培养基中成活率高达 90%; 对于脱毒效果, 经过盐酸吗啉胍处理过的茎尖长势均匀, 植株健壮。研究表明, 适当浓度的盐酸吗啉胍能抑制病毒的复制、扩增, 从而保证植株的正常生长, 达到脱毒目的。但是在药剂处理过程中应充分考虑药剂质量浓度对茎尖的伤害。

4.1.3. 热处理有利于菊花组培苗脱毒

在热处理过程中, 温度高、时间长、容易脱除病毒, 然而, 植物的成活率却得不到保证, 因此, 热处理时, 温度的控制十分重要[8]。将经过壮苗后的植株在 60℃ 的水浴中连续处理 3 天后, 植株开始萎蔫, 颜色由绿色逐渐变为黄绿色, 剥取茎尖接入培养基 1 周后茎尖白化, 死亡。研究表明, 热处理过程中温度超过植物的耐性高可直接导致植株死亡; 热处理时间过长会使植株本身失去生理活性, 剥取的茎尖成活率也会大幅度的降低。

4.1.4. 指示植物检测菊花脱毒方法简单, 效果明显

脱毒苗的检测技术单一, 而对于脱毒苗的健康评测则是一个重点内容[9] [10]。指示植物鉴定法和性状观察鉴定法是生物学鉴定的一种方法, 结果一目了然, 但是很难排除由于外部条件的影响导致的机械

损伤或者内部的生理性死亡, 结果存在误差和偶然性。通过性状观察鉴定法和指示植物鉴定法只能初步判定脱毒苗是否处于健康状况, 对于是否还携带某种病毒, 可以采用多时段、多方法的结合进行综合检测, 同时还可以尝试一些新的、更加灵敏的检测方法, 最终确定是否为无毒苗。

4.2. 讨论

首先对于盐酸吗啉胍处理菊花茎尖能否脱去病毒目前还没有报道, 需要进一步的实验来进行探究, 其中着重考虑两个问题。一是盐酸吗啉胍在 120℃ 的高压灭菌锅内生物活性是否减半甚至丧失, 二是盐酸吗啉胍如果能脱去植物体的病毒, 其作用机理如何?

其次对于菊花耐热性问题需要深入研究, 找到不同品种菊花的耐热性, 从而根据其耐热性设置不同的处理温度, 同时也应该考虑要脱去病毒的生理活性, 兼顾菊花耐热性和病毒生理活性找寻合适的脱去病毒方法。目前报道的菊花脱除病毒方法单一[11], 应该继续深入研究脱除植物体内病毒的有效方法, 从而找寻最适合菊花脱毒的有效方法。

最后对于指示植物鉴定法和性状观察鉴定法能够对病毒进行初步判定, 但是每一种植物病毒都有一定的寄主范围, 因此需要耗费长时间选取不同的指示植物进行检测[12]。对于病毒检测技术目前应用最多的就是酶联免疫吸附检测技术[13], 但是该方法只能检测一种病毒, 对于存在菊花体内的多种病毒需要进行多次检测。分子生物学反转录 PCR 在植物病毒检测中应用广泛。无论是血清学检测技术还是分子生物学鉴定都具备灵敏度高, 特异性强, 检测速度快, 操作也比较简单, 可以应用大批量样品的检测。但同时也存在一定的缺陷, 如抗体制备的时间长, 耗费时间, 若采取购买的方式则太昂贵。电镜观察法是在电子显微镜下直观的观察病毒粒子的大小, 病毒外壳蛋白的性状以及病毒浸染寄主后引起的细胞超微结构的变化, 从而鉴定出病毒种类的一种方法[14]。无论采取哪种检测病毒的方式, 都应该综合考虑病毒的生理生化特性。

基金项目

云南省省级重点学科建设“生物学”建设(编号 IRTSTYN)、云南省高校特色植物资源研究与开发科技创新团队、云南省高校滇中民族植物学重点实验室培育基地项目和王振吉“彝乡英才”项目的资助。

参考文献

- [1] 尤燕平, 彭诗怡, 朱文莹, 等. 茎尖培养法脱除菊花 B 病毒的研究[J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(5): 144-148.
- [2] 赵霜, 李青, 时颂. 不同处理方法对菊花“神马”脱除病毒的影响[J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(3): 103-106.
- [3] 周健, 张舜, 龚道新, 等. 盐酸吗啉胍对植烟土壤酶活性的影响[J]. 安徽农业科学, 2015(4): 135-136.
- [4] 邓叶, 阳淑金, 杜新平, 等. 菊花高效瞬时转化体系建立及稳定遗传植株再生[J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(1): 48-53.
- [5] 杨鹏辉. 菊花品种“日本红”的脱毒处理及健康检测方法研究[D]: [硕士学位论文]. 雅安: 四川农业大学, 2011.
- [6] 知博. 木荷蒿(*Argyranthemum*)茎尖超低温保存与脱除菊花矮化类病毒(CSVd)的效应与机理研究[D]: [硕士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2015.
- [7] Song, A., You, Y., Chen, F., et al. (2013) A Multiplex RT-PCR for Rapid and Simultaneous Detection of Viruses in *Chrysanthemum*. *Letters Microbiology*, **56**, 8-13. <https://doi.org/10.1111/lam.12007>
- [8] 吴红芝, 孔宝华, 陈海如, 等. RT-PCR 检测菊花 B 病毒的研究[J]. 西南农业大学学报. 2002. 24(2): 115 - 117.
- [9] 王仁睿, 李明福, 马洁, 等. “日本红”(*Dendranthema morifolium*)上菊花 B 病毒(CVB)检测技术及脱毒技术研究[C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2010 年学术年会论文集. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [10] 唐焕伟, 曲彦婷, 张兴. 脱毒技术在食用菊种苗繁育中的应用研究[C]//中国园艺学会. 中国园艺学会观赏园艺专业委员会 2008 年学术年会论文集. 北京: 中国林业出版社, 2008.

-
- [11] Zhao, S., Li, Q. and Dai, S. (2013) Effects of Different Treatment Methods on Virus Elimination of *Chrysanthemum morifolium* “Shenma”. *Plant Diseases and Pests*, **6**, 5-9.
- [12] 伏旭, 李培武, 贺莉, 等. 酶联免疫吸附检测法的应用研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2012, 34(3): 41-44.
- [13] 王玉田, 曹丽芳, 杨哲, 等. 基于 FTIR, FT-Raman 的脱毒繁育和硫磺熏制祁菊花的药用成分分析研究和光谱表征[J]. 光谱学与光谱分析, 2016, 36(9): 2780-2783.
- [14] 刘辉辉. 杭白菊病毒病原鉴定及脱毒苗生物学性状与品质性状分析[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2015.