

菊花脱除花叶病毒组培技术研究*

裴智能⁽¹⁾ 孟远兰⁽¹⁾ 吴光金⁽²⁾

(1. 湖北省当阳市森林病虫害防治检疫站 宜昌 444100; 2. 中南林业科技大学 长沙 410000)

摘要:以患花叶病菊花 0.5~0.8 mm 幼嫩茎尖为外植体,愈伤组织的诱导在 MS+BA2.0 mg/L+NAA0.1 mg/L 培养基上效果最好,诱导率达 96.0%;愈伤组织分化出芽以 MS+BA3.0 mg/L+NAA0.1 mg/L 效果最佳,分化率达 60.0%,每块愈伤组织平均分化出 4 个芽;幼苗在 1/2MS+NAA0.1 mg/L 培养基中生根率达 92.0%,株平均生根 5.1 条。组培苗经症状观察和汁液传染实验试验检测,以后种方法结果为依据,获得菊花脱毒苗 19 株,脱毒率为 63.3%。

关键词:菊花;组织培养;脱毒苗;花叶病毒

Study on Technique of Tissue Culture of Virus B Free *Chrysanthemum Morifolium*

Pei Zhineng⁽¹⁾ Meng Yuanlan⁽¹⁾ Wu Guangjin⁽²⁾

(1. Station for Forest Pest and Disease Control and Quarantine in Hubei Province Yichang 444100;
2. Central South Scientific and Technical University of Forestry Changsha 410000)

Abstract:The shoot tips with a length of 0.5~0.8 mm is suitable for explants, which came from *Chrysanthemum* with CMV. Callus grew well on MS+BA2.0 mg/L+NAA0.1 mg/L and 96.0% explants formed. About 60.0% callus developed with the best result on MS+BA3.0 mg/L+NAA0.1 mg/L, and there were 4 buds every callus. The buds were cut and transferred into 1/2MS+NAA0.1 mg/L, and the rooting rate was 92.0% with 5.1 roots per average plant. Two ways about symptom observing and sap transmission were used in the experiment to test virus free seedlings. By testing, there were 19 *Chrysanthemum* virus-free seedlings, which virus-free rate was 63.3% through the second method.

Key words: *Chrysanthemum*; tissue culture; virus free seedling; CMV

菊花 *Chrysanthemum morifolium*, 为菊科菊花属多年生宿根草本花卉植物,一般是通过分离母体的一部分进行繁殖,若感染病毒后则病毒在母体中逐代积累,危害日益严重。危害菊花的病毒种类较多,目前公开报道的就有 20 多种^[1,2]。菊花花叶病是由菊花 B 病毒 *Chrysanthemum Virus B* 引起的,严重制约菊花切花规模生产的发展,是急需解决的问题。近年来,我们利用组织培养技术脱除菊花花叶病毒进行了试验研究,现将试验研究结果总

结如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 外植体

采自患花叶病菊花当年生嫩枝的茎尖。

* 收稿日期:2005-12-10

作者简介:裴智能(1973~),男,工程师,硕士,森林病虫害研究。

1.1.2 培养基成分

以 MS 作为基本培养基,附加不同浓度的细胞分裂素(BA)和生长素萘乙酸(NAA)、蔗糖 3.0%、琼脂 0.8%、pH5.6。

1.2 方法

1.2.1 茎尖切取、消毒及接种

切取菊花 3~5 cm 的顶芽或腋芽,用自来水冲洗 2 次后,在解剖镜下切取 0.5~0.8 mm 的茎尖放入消毒过的培养皿中,用 70% 酒精表面消毒 10 s 后,用无菌水冲洗 2 次,再用 0.1% 升汞消毒 1.5 min 后,用无菌水冲洗 3 次,在超净工作台上将消毒茎尖接种到培养基表面。

1.2.2 激素配对外植体愈伤组织诱导的影响

将茎尖接种到 MS+相同浓度 BA+不同浓度 NAA 的培养基上,培养 20 d 后观察诱导愈伤组织的产生情况。

1.2.3 激素对比对愈伤组织分化出芽的影响

切取松散、鲜嫩的愈伤组织块,转接到 MS+相同浓度 NAA+不同浓度 BA 的培养基上,培养 30 d 后观察芽的分化情况。

1.2.4 幼苗生根培养

分化的芽苗长到 2~3 cm 时,切下转入 1/2MS+不同浓度 NAA 的生根培养基上,培养 15 d 后观察组培苗的生根情况。

1.2.5 培养条件

放在培养室中培养,温度 25 ± 1 °C,光照 12 h/d,强度 1 500~2 000 lx。

1.3 接种处理与统计分析

各试验内容每项接种 5 瓶,每瓶 5 个外植体,重复试验 2~3 次。统计时除去被污染的外植体,将重复试验数一并进行统计分析。

1.4 脱毒苗的检测

根据花叶病毒病害特点,选择症状观察和汁液传染试验检测方法。

2 结果与分析

2.1 激素对比对愈伤组织诱导的影响

切取 0.5~0.8 mm 菊花茎尖,接种到 BA 浓度均为 2.00 mg/L, NAA 浓度分别为 0.05, 0.10, 0.50 mg/L 的 3 种 MS 培养基上。培养 20 d 后观察愈伤组织诱导情况(见表 1)。

表 1 NAA 不同浓度对菊花茎尖愈伤组织诱导的影响

激素种类与浓度/(mg·L ⁻¹)	接种数/个	愈伤组织数/个	诱导率/%	愈伤组织形态特征	增殖速度
MS+BA2.00+NAA0.05	50	42	84.0	淡黄色、结构紧密有的老化	慢
MS+BA2.00+NAA0.10	50	48	96.0	浅绿色、结构松散颗粒状	最快
MS+BA2.00+NAA0.50	50	46	92.0	淡黄色、结构致密	较快

由表 1 可知,菊花茎尖在 3 种培养基上都能诱导出愈伤组织,诱导率在 84.0% 以上。当 MS 培养基中附加适宜浓度的 BA 后, NAA 的浓度与愈伤组织形成和生长密切相关,随着 NAA 浓度的增加,愈伤组织结构由紧密到松散再到致密,增殖速度由慢到快再到较快。其中在 MS+BA2.00+NAA0.10 培养基上,愈伤组织诱导效果最好,诱导率达 96.0%,愈伤组织呈鲜嫩松散颗粒状,有利于进一步诱导芽的形成。继续培养 30 d 后,愈伤组织开始分化出少量绿色的芽点。

2.2 激素不同对比对愈伤组织分化出芽的影响

把在 MS+BA2.00+NAA0.10 培养基上形成的嫩绿色松散颗粒状的新鲜愈伤组织切成大小一致的小块,转接到含有不同浓度的 BA 和 NAA 配比的培养基上培养。培养 15 d 后,部分愈伤组织的表面开始呈现出绿色小芽点。继续培养 20 d,芽点逐渐成长小嫩芽。培养 35 d 时,统计愈伤组织分化情况(见表 2)。

表2 BA不同浓度对菊花愈伤组织分化出芽的影响

激素种类与浓度/(mg·L ⁻¹)	接种愈伤组织数/个	分化成芽愈伤组织数/个	分化率/%	芽/块
MS+NAA0.10+BA1.00	50	10	20.0	2
MS+NAA0.10+BA2.00	50	26	52.0	4
MS+NAA0.10+BA3.00	50	30	60.0	4
MS+NAA0.10+BA5.00	50	20	40.0	3

由表2可知,在MS培养基中,NAA浓度相同,BA不同浓度对菊花愈伤组织不定芽的分化和生长有明显差异。结果表明:以MS+BA3.00+NAA0.10对愈伤组织分化出芽效果最佳,分化率达60.0%,每块愈伤组织平均长4个芽,且生长健壮。

2.3 生根培养与移栽

2.3.1 生根培养

当分化的幼苗长到2~3cm,切下转接到不含激素的1/2MS培养基上和含有不同NAA浓度的1/2MS培养基上培养。每瓶接种5株幼苗,培养5d后,靠近基部的茎表面出现白色小突起。培养10d后,由小突起长成白色的小根。培养15d后,观察不同培养基上试管幼苗生根情况(见表3)。

表3 NAA不同浓度对菊花脱毒幼苗生根的影响

培养基/(mg·L ⁻¹)	接种株数/株	生根株数/株	生根率/%	生根总数/条	株平均数/条	生长情况
1/2MS	50	39	78.0	168	4.3	一般
1/2MS+NAA0.10	50	46	92.0	235	5.1	好
1/2MS+NAA0.30	50	47	94.0	212	4.5	一般
1/2MS+NAA0.50	50	46	92.0	189	4.1	一般

由表3可知,菊花幼苗在无激素的培养基上生根率达78.0%,在含有NAA0.10~0.50的培养基上其生根率可达92.0%以上,随着NAA浓度的增加,发根条数减少,根生长状况有所下降,这与裘文达等的研究结果相似^[3]。根据试验结果,以1/2MS+NAA0.10的生根培养效果较好。

2.3.2 组培苗移栽

拿出培养瓶,揭开瓶盖,让幼苗在室内自然光下炼苗1~2d后轻轻取出,洗净粘附在根部的培养基。将幼苗移栽到盛河沙的小塑料盆中,淋透水,2星期后再移栽到盛土的瓦盆中,注意及时浇水、施肥和防治病虫害。

2.4 脱毒组培苗的检测

2.4.1 症状观察法

将组培苗栽植在花盆中,定期观察有无花叶症状。试验中,对30株菊花脱毒组培苗进行了半年的观察,其中22株生长正常,没有出现花叶病症状,3株出现了不明显的花叶症状,2株花叶症状典型,其它3株生长不良并伴有斑驳症状。根据观察结果,本试验初步获得了22株脱毒组培苗,脱毒率为77.3%。

2.4.2 汁液传染试验法(汁液摩擦接种法)

取病叶组织在研钵中研碎,然后加2~10倍的水,用纱布过滤并挤出汁液^[4]。接种时,将少量金刚砂(400~600目)加入汁液中,用毛笔蘸取汁液在健康植株的嫩叶片上来回摩擦,然后用清水将叶面多余的汁液和金刚砂轻轻洗去。

本试验是将待测菊花脱毒组培苗的叶片和自然病株的病叶(作对照)分别在灭菌研钵中研磨制取接种汁液,然后按照上述方法分别摩擦接种到健康的菊花嫩叶上(每株接种3叶)。试验结果表明:脱毒苗汁液接种30株90叶,发病11株29叶;对照(自然病株汁液)接30株90叶,发病28株79叶。由此可知有19株组培苗脱除了病毒,脱毒率为63.3%。

3 结论与讨论

(1)以0.5~0.8mm菊花幼嫩茎尖为外植体,愈伤组织的诱导在MS+BA2.00+NAA0.10培养基上效果较好,诱导率达96.0%,愈伤组织结构松散,有利于进一步诱导出芽;愈伤组织分化出芽以MS+BA3.00+NAA0.10培养基较合适,分化率达60.0%,每组织块平均分化出4个芽,且芽苗生长良好;菊花脱毒幼苗在1/2MS+NAA0.10上

生根率达 92.0%。

(2)菊花病毒种类多,脱毒后如何防止再感染,值得进一步研究,否则前功尽弃。笔者认为,选用抗病单株而不用感病株作外植体培育抗病无性系,即从广义上进行脱毒培养可能有更大发展前途,需要在今后做进一步研究。

(3)脱毒苗的检测方法有多种,本试验采用症状观察法和汁液摩擦接种法。2种检测结果有一定差别,分析其原因是症状观察法是1种直观的方法,只能检测出已经表现出明显症状的病株,而隐性带毒株在观察法检测中却把它作为健康株,从而

提高了其脱毒率。因此还要结合其它方法,才会得到更为准确可靠的检测结果。

参考文献

- [1]徐丽娟,曲善珊,王采石等.切花菊快速繁殖研究.莱阳农学院学报,1997,14(2):123~125.
 [2]蔡祝南,杨莉莉,彭超美等.切花菊脱毒及脱毒苗的检测.植物病理学报,1992,22(1):34.
 [3]裘文达,李曙轩.菊花名贵品种组织培养快速繁殖的研究.浙江农业大学学报,1983,9(2):105~114.
 [4]方中达.植病研究方法.北京:农业出版社,1982.

古树名木生长特征

1 年龄特征

我国的古树名木年龄主要集中在100~499 a区段,500 a以上的古树名木较少。100~299 a区段的古树占全国古树总量的61.6%,300~499 a区段的古树占全国古树总量的36.6%,500 a以上的古树占全国古树总量的1.5%,1 000 a以上的古树占0.3%,其中四川省编号为5 139、位于和平乡胜利村的黄葛树(别名大叶榕、黄葛榕)树龄为4 600 a。

2 树高特征

据对21个省(区、市)的有效树高数据分析,我国的古树名木树高主要集中在10~20 m区段,占古树名木总量的53.4%;10 m以下的区段,占总量的24.5%;21~30 m区段,占古树名木总量的19.1%;30 m以上的区段,占总量的3.0%。其中广西壮族自治区编号为62、株序号为1 110的1株高山榕树龄800 a,树高达58 m。

3 胸围特征

据对21个省(区、市)的有效胸围数

据分析,我国古树名木的胸围主要集中在100~299 cm区段,占古树名木总数的69.5%;100 cm以下区段,占古树名木总数的3.8%;300~499 cm区段,占古树名木总数的17.3%;500 cm以上区段,占古树名木总数的9.4%。其中陕西省编号为61 213 210 526、位于合阳县皇甫庄乡河西坡村的文冠果树龄800 a,胸围6 800 cm。

4 冠幅特征

据对21个省(区、市)的有效冠幅数据分析,我国古树名木的平均冠幅主要集中在5~20 m区段,占全国古树名木总数的86.7%;冠幅在5 m以下区段,占古树名木总数的10.5%;冠幅在21~40 m区段,占古树名木总数的2.6%;冠幅在40 m以上的古树名木占0.2%。其中江西省编号为02 260 145、位于磨溪乡新田村五组石门陈塘坝上的1株樟树树龄2 000 a,冠幅为53 m。

(摘自:中国绿色时报)