

引用格式: 史子尹, 张海楠, 李浩, 等. 茶菊茎尖分生组织高效脱毒再生体系优化[J]. 西北植物学报, 2024, 44(10): 1557-1566. [SHI Z Y, ZHANG H N, LI H, et al. Optimization of efficient virus-free regeneration system from shoot apical meristem of tea chrysanthemum[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2024, 44(10): 1557-1566.] DOI: 10.7606/j.issn.1000-4025.20240175

茶菊茎尖分生组织高效脱毒再生体系优化

史子尹, 张海楠, 李浩, 吕晋慧*

(山西农业大学 林学院, 山西晋中 030801)

摘要 【目的】筛选适宜热处理时间和脱毒剂, 优化茶菊茎尖分生组织高效脱毒再生体系, 解决脱毒苗获得率低的问题。【方法】以 6 个茶菊品种无菌苗为材料, 采用昼/夜 40 °C/32 °C 变温、化学脱毒剂及其组合预处理无菌苗, 比较茎尖分生组织的出愈率、再生频率和平均再生芽数及不同方法脱毒效果。【结果】茎尖分生组织再生频率在不同品种茶菊间差异显著, 并以‘婺源皇菊’最高 (54.77%); 茎尖分生组织再生在不同昼夜变温热处理时长间差异显著, 以‘杭白菊’、‘七月雪’再生效果最好。‘婺源皇菊’茎尖分生组织再生在脱毒剂水杨酸、利巴韦林、脱落酸处理下均受到抑制, 在水杨酸、利巴韦林结合变温热处理下得到促进, 在高浓度脱落酸结合热处理下受到严重抑制, 且 10 $\mu\text{mol/L}$ 水杨酸结合热处理的促进效果最好。在适宜热处理、化学脱毒剂结合热处理可获得茶菊完全脱毒苗。【结论】10 $\mu\text{mol/L}$ 水杨酸浓度结合 40 °C/32 °C 昼/夜变温预处理 40 d 能显著提高茎尖分生组织再生频率, 获得脱毒苗。

关键词 茶菊; 茎尖分生组织; 热处理; 化学脱毒剂; 再生体系; 脱毒

中图分类号 S682.11

文献标志码 A

Optimization of efficient virus-free regeneration system from shoot apical meristem of tea chrysanthemum

SHI Ziyin, ZHANG Hainan, LI Hao, LÜ Jinhui*

(College of Forestry, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi 030801, China)

Abstract [Objective] In order to optimize the efficient virus elimination and regeneration system from shoot apical meristem of tea chrysanthemum, suitable heat treatment duration and detoxification agents, this study aims to improve the problem of low virus-free seedlings obtaining ratio. [Methods] Six tea chrysanthemum varieties were used as materials. The axenic seedlings were pre-treated with alternating heat temperature treatment of 40 °C/32 °C day/night, detoxification agents such as salicylic acid, ribavirin, and abscisic acid, as well as a combination of detoxification agents and heat treatment. The rate of callus induction, regeneration frequency, and average number of regenerated shoots from inoculated shoot apical meristems were compared among different treatment methods, the detoxification efficacy of various treatments were evaluated. [Results] There was a significant difference in the regeneration frequency of shoot apical meristems among different varieties of tea chrysanthemum, with ‘Wuyuan Huangju’ having

收稿日期: 2024-03-20; 修改稿收到日期: 2024-06-08

基金项目: 山西省现代农业产业技术体系建设种岗位专家项目 (2021-11)

作者简介: 史子尹 (1999—), 女, 硕士, 主要从事园林植物种质资源创制与利用研究。E-mail: 3164997732@qq.com

* 通信作者: 吕晋慧, 教授, 硕士生导师, 主要从事菊花种质资源创新与开花机理研究。E-mail: 335493446@qq.com

the highest regeneration frequency of 54.77%. Under different heat treatment days, the difference in regeneration of shoot apical meristems in tea chrysanthemum reached a significant level, with ‘Hangbaiju’ and ‘Qiyuexue’ showing the best regeneration after 40 °C/32 °C heat treatment. Salicylic acid, ribavirin, and abscisic acid treatments inhibited the regeneration of shoot apical meristems. Salicylic acid and ribavirin treatments combined with heat treatment promoted the regeneration of shoot apical meristems, while high concentration abscisic acid combined with heat treatment severely inhibited the regeneration of shoot apical meristems. Treatment with 10 μmol/L salicylic acid combined with heat treatment showed the best regeneration. Virus-free seedlings were obtained through suitable heat treatment combined with detoxification agents. [Conclusion] The combination of 10 μmol/L salicylic acid with 40 °C/32 °C day/night pretreatment for 40 days significantly enhances the regeneration frequency of shoot apical meristems, and obtains virus-free seedlings.

Key words tea chrysanthemum; shoot apical meristem; heat treatment; chemical detoxification agent; regeneration system; virus elimination

菊花(*Chrysanthemum morifolium*)作为一种药食同源的多年生宿根草本,栽培历史悠久。茶菊含黄酮、氨基酸、绿原酸、异绿原酸、木犀草苷和多种微量元素等对人体有益成分,具有良好的医疗保健功效^[1],市场价值较高,种植规模逐渐扩大。由于长期连作、老株分苗等不恰当栽培方式导致病毒累积,致使茶菊病虫害严重、抗性降低,严重影响菊花品质和观赏价值。目前,菊花感染的病毒多达 20 多种,主要有菊花 B 病毒(chrysanthemum virus B,CVB)、番茄不孕病毒(tomato aspermy virus,TAV)、菊花矮化类病毒(chrysanthemum stunt viroid,CSVd)等^[2]。脱毒苗可以提高茶菊品质及产量^[3-4],对茶菊进行脱毒复壮迫在眉睫。

迄今,常用的脱毒方法有茎尖分生组织培养法、热处理法、化学处理法、超低温处理法、电疗法等,这些方法均基于茎尖分生组织培养,而仅茎尖分生组织培养基本不能完全脱除病毒,通常须与其他处理方法相结合使用,但却严重影响茎尖分生组织再生^[5-9]。因此,研究一种具有较高繁殖系数的脱毒处理方法,建立更完善的茶菊茎尖分生组织再生体系对茶菊脱毒苗培育有一定的现实意义。本试验以 6 个茶菊品种为材料,对比不同品种茶菊茎尖分生组织再生差异,研究热处理、脱毒剂处理及脱毒剂结合热处理对茎尖分生组织再生的影响,以期建立完善茶菊茎尖分生组织高效再生体系,为茶菊的脱毒苗生产提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 试验材料

在山西省运城市田间调查,采集表现明显染病

症状的茶菊品种‘婺源皇菊’、‘金丝皇菊’、‘杭白菊’、‘北京菊’、‘七月雪’、‘乳荷’植株,经转录组测序分析感染菊花 B 病毒(CVB)、菊花 R 病毒(chrysanthemum virus R,CVR)、美国山核桃卡拉病毒(*Carya illinoensis* carlavirus 1,CICV1)3 种病毒。选取检测结果呈阳性的植株为供试材料,培养无菌苗进行试验。

供试化学脱毒剂水杨酸(salicylic acid,SA)购置于天津市天力化学试剂有限公司;利巴韦林(ribavirin)、脱落酸(abscisic acid,ABA)购置于上海麦克林生化科技有限公司。RNAprep Pure Plant Kit (Polysaccharides & Polyphenolics-rich) RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒购置于天根生化科技(北京)有限公司,DNA 分子量标准(100~2 000 bp)、2× SanTap PCR Mix 酶购置于生工生物工程(上海)股份有限公司。反转录试剂盒(All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix)购置于江苏百时美生物科技有限公司。

1.2 培养基与培养条件

以 1/2 MS 培养基为生根培养基,MS 培养基为分化培养的基础培养基。培养基中蔗糖、琼脂含量分别为 30.0 g/L、7.0 g/L,pH 均调至 5.8。在温度为(25±1) °C,光照强度为 2 000~3 000 lx,光照时间为昼/夜 16 h/8 h 条件下培养。

1.3 无菌苗预处理及茎尖组织培养

茶菊无菌苗茎尖分生组织在接种分化培养基之前设置 4 类预处理:(1)对照,无菌苗无预处理;(2)热处理,无菌苗进行不同时长的 1 次、2 次昼/夜 40 °C/32 °C 持续热处理;(3)化学脱毒剂处理,无菌苗进行不同浓度水杨酸、利巴韦林、脱落酸预处理;(4)

化学脱毒剂结合热处理,无菌苗同时进行化学脱毒剂处理和1次热处理。预处理后剖取0.5 mm茎尖分生组织,每处理重复分别接种10~15个茎尖分生组织,重复3~4次。

1.3.1 茎尖分生组织直接培养

选择生长健壮的茶菊无菌苗,剥取0.5 mm茎尖分生组织接种于分化培养基(MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA)中。置于弱光下培养3~4 d,后转入正常光照下继续培养,35 d后统计出愈率、再生频率、平均再生芽数,筛选出茎尖分生组织再生能力最强的茶菊品种进行后续试验。

出愈率=(茎尖分生组织出愈数/接种茎尖分生组织总数)×100%;再生频率=(分化出不定芽的茎尖分生组织数/接种茎尖分生组织总数)×100%;平均再生不定芽数=分化出的不定芽总数/可分化出不定芽的茎尖分生组织数。

1.3.2 茎尖分生组织热处理后培养

1次热处理:将健壮的无菌苗(25~30 d苗龄)移入人工气候培养箱,光照培养(6:00—22:00),起始温度26℃,每隔1 d升1℃,直至40℃;黑暗培养(22:00至次日6:00),起始温度26℃,每隔1 d升1℃,直至32℃。完成逐步升温后,以白天40℃、夜晚32℃分别持续处理0 d、20 d、30 d、40 d。

2次热处理:经1次热处理20 d、30 d、40 d后的无菌苗分别转接至生根培养基,25~30 d后移入人工气候培养箱进行2次热处理,即在昼/夜温度40℃/32℃下持续处理40 d。热处理完成后,剖取无菌苗0.5 mm茎尖分生组织接种于分化培养基中,35 d后统计出愈率、再生频率、平均再生芽数。

1.3.3 茎尖分生组织化学脱毒剂处理后培养

将‘婺源皇菊’带芽茎段分别接入添加不同浓度水杨酸(0,10,20,40 μmol/L)、利巴韦林(0,10,20,40 mg/L)、脱落酸(0,10,20,30 mg/L)的生根培养基中进行预处理,预处理30 d后剥取0.5 mm茎尖分生组织接种于分化培养基中,35 d后统计出愈率、再生频率、平均再生芽数。

1.3.4 茎尖分生组织化学脱毒剂结合热处理后培养

将‘婺源皇菊’带芽茎段分别接入添加不同浓度水杨酸(0,10,20,40 μmol/L)、利巴韦林(0,10,20,40 mg/L)、脱落酸(0,10,20,30 mg/L)的生根培养基中,培养25~30 d后移入人工气候培养箱,40℃/32℃(昼/夜,16 h/8 h)热处理40 d,随后剖取无

菌苗0.5 mm茎尖分生组织,接种于分化培养基中,35 d后统计出愈率、再生频率、平均再生芽数。

1.4 RT-PCR检测

‘婺源皇菊’经不同脱毒方法处理后,剖取茎尖分生组织再生出的无菌苗,取其顶端叶片各0.1 g,提取总RNA后反转录,根据NCBI GenBank中收录的病毒基因序列,结合转录组测序结果进行相应引物设计,设计特异性引物(CVB-F:5'-TCCTTTCA-GAGGGTTATCAACAGAAGATCAAAA-3';CVB-R:5'-CAAAGCAGCAAAATCTTTAACGAATTTCT-ATCTCAA-3';CVR-F:5'-TTCCTTAGAGGGCT-AGGTTTCGACGTA-3';CVR-R:5'-TTAAGCA-CTGGAAGCACTTGAGCGAT-3';CICV1-F:5'-CTATAAGATCCCTATTGATTACGCAATTT-3';CICV1-R:5'-TTTCCCAACCGTTGTGTGATCTGC-3';N-F:5'-GTTTCCCTGATCAAACCTAGAG-GTTACCA-3';N-R:5'-CCAGTAGATATTGAT-GGTATTTCGTGAACC-3')进行RT-PCR检测,其中,N-F/R为内参基因。反转录、PCR反应体系及具体程序参照试剂盒方法。

1.5 数据分析

使用Excel整理与分析数据;用SPSS 13.0方差分析,确定处理间的差异显著性;利用Origin 2023绘图。

2 结果与分析

2.1 不同品种茶菊茎尖分生组织再生能力差异分析

茶菊茎尖分生组织接入分化培养基5 d后,部分开始膨大;10 d左右部分出现绿色芽点或突起,20 d后部分茎尖分生组织开始有不定芽形成,培养35 d后分化成苗(图1)。不同品种茶菊茎尖分生组织再生差异比较,结果(表1)表明,茶菊茎尖分生组织出愈率在不同品种间差异显著($P<0.05$),‘婺源皇菊’、‘金丝皇菊’、‘北京菊’显著高于其他品种,且以‘婺源皇菊’出愈率最高(96.46%),而其余品种中‘杭白菊’茎尖分生组织易出现褐化死亡现象,茎尖出愈率仅为68.94%。同时,茎尖分生组织再生频率、平均再生芽数在不同茶菊品种间差异也达显著水平($P<0.05$),‘婺源皇菊’茎尖分生组织的再生频率(54.77%)和平均再生芽数(5.81个)均显著高于其他品种,且不定芽长势良好,而‘乳荷’茎尖分生组织的再生频率和平均再生芽数分别为29.10%和1.17个。

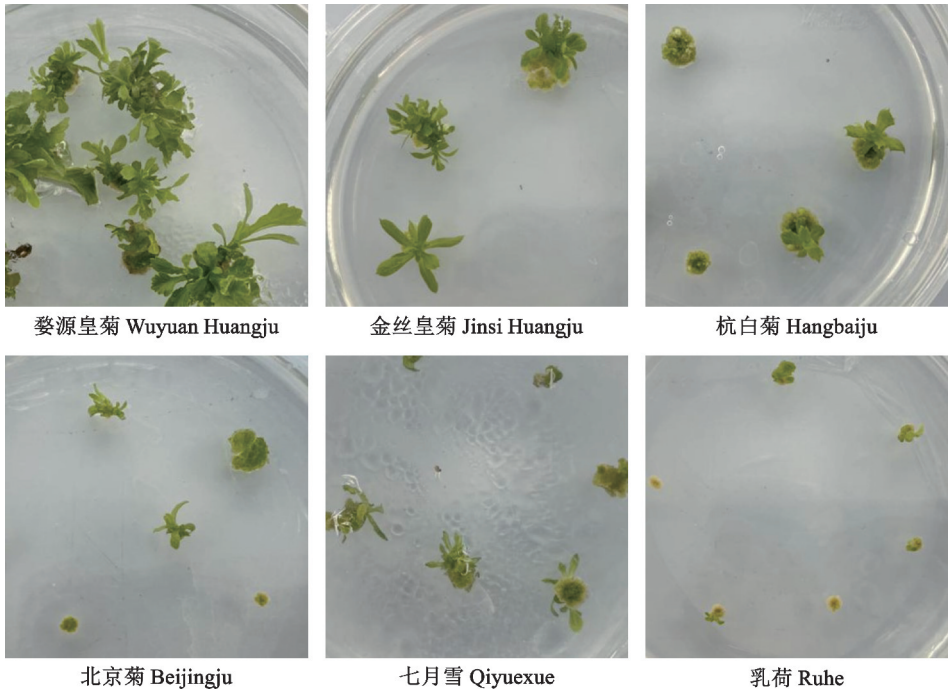


图 1 不同茶菊品种茎尖分生组织培养 35 d 再生情况

Fig. 1 Regeneration of shoot apical meristem of different tea chrysanthemum varieties after culturing for 35 days

表 1 不同品种茶菊茎尖分生组织再生差异

Table 1 Differences in shoot apical meristem regeneration among different tea chrysanthemum varieties

品种 Variety	出愈率 Callus induction frequency/%	再生频率 Regeneration frequency/%	平均再生芽数 Average number of regenerated buds
婺源皇菊 Wuyuan Huangju	96.46±2.20a	54.77±2.25a	5.81±0.16a
金丝皇菊 Jinsi Huangju	90.21±3.21a	44.18±3.81b	3.54±0.29b
杭白菊 Hangbaiju	68.94±4.08b	31.89±2.47c	2.32±0.15c
北京菊 Beijingju	89.86±1.99a	38.98±1.92bc	1.51±0.06de
七月雪 Qiyuexue	75.13±1.03b	32.86±2.11c	1.84±0.10d
乳荷 Ruhe	76.83±2.24b	29.10±2.47c	1.17±0.08e

注:数据表示平均值±标准误差。同列不同小写字母表示品种间在 0.05 水平差异显著。

Note: The data in the table is represented by mean ± standard error. Different lowercase letters within same column indicate significant differences among variety at the 0.05 level.

2.2 热处理对茶菊茎尖分生组织再生的影响

由表 2 可知,不同热处理时间对各品种茶菊茎尖分生组织出愈率、再生频率、平均再生芽数影响均达显著水平($P<0.05$)。在茎尖分生组织出愈率方面,经 1 次昼/夜 40℃/32℃热处理后,‘杭白菊’处

理 20~40 d、‘七月雪’处理 20 d 和 40 d 均比对照(0 d)显著提高,‘婺源皇菊’热处理 30 d 时显著降低,‘金丝皇菊’、‘北京菊’、‘乳荷’均较对照无显著变化;经 2 次昼/夜 40℃/32℃热处理后,‘婺源皇菊’、‘金丝皇菊’、‘北京菊’茎尖分生组织出愈率均与对照无显著差异,‘杭白菊’中仅在累积热处理 30 d+40 d 时最低,‘七月雪’在各累积热处理下均比对照显著提高,‘乳荷’在累积热处理 30 d+40 d 时显著增加,在 40 d+40 d 时无菌苗全部死亡。

在茎尖分生组织再生频率方面,经 1 次昼/夜 40℃/32℃热处理后,‘婺源皇菊’、‘金丝皇菊’、‘北京菊’、‘乳荷’在各热处理时间下均比对照不同程度降低,并以‘婺源皇菊’降幅最大(11.41%~83.49%),且各处理时间之间差异显著,‘杭白菊’和‘七月雪’在热处理 40 d 和 20 d 后分别较对照显著提高 53.78%和 69.08%,在其他处理时间下均降低;经 2 次昼/夜 40℃/32℃热处理后,‘婺源皇菊’、‘金丝皇菊’茎尖分生组织再生频率在各累积热处理下均比对照显著降低,其余品种均比对照不同程度提高,且大多达到显著水平;在 40 d+40 d 累积热处理下,‘婺源皇菊’、‘杭白菊’、‘七月雪’茎尖分生组织再生频率显著高于其他累积热处理,而‘金丝皇菊’和‘北京菊’均低于其他累积热处理时间,‘乳荷’茎尖分生组织再生频率随着累积热处理时间的增加而显著降低。

表 2 热处理不同时间对茶菊茎尖分生组织再生的影响

Table 2 Effects of different time of primary and double heat treatment on the regeneration of shoot apical meristem among different tea chrysanthemum varieties

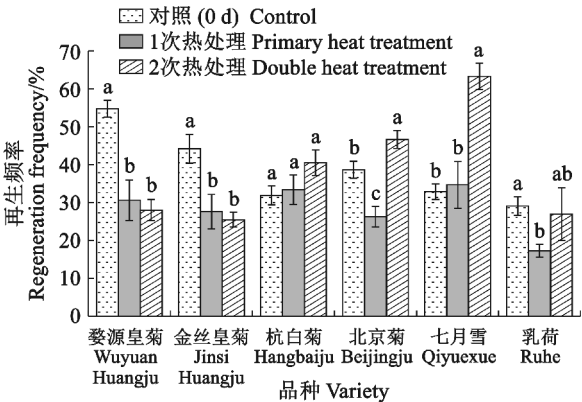
指标 Index	热处理时间 Heat treatment time/d	婺源皇菊 Wuyuan Huangju	金丝皇菊 Jinsi Huangju	杭白菊 Hangbaiju	北京菊 Beijingju	七月雪 Qiyuexue	乳荷 Ruhe
出愈率 Callus induction frequency/%	0(CK)	96.46±2.20a	90.21±3.21ab	68.94±4.08c	89.86±1.99abc	75.13±1.03c	76.83±2.24b
	20	100.00±0.00a	86.30±3.16b	85.56±0.86ab	83.81±2.53bc	100.00±0.00a	68.26±1.59b
	30	73.79±3.57b	100.00±0.00a	84.26±3.24ab	88.43±0.46abc	76.84±2.15c	77.14±2.86b
	40	92.22±4.84a	87.27±2.73b	98.08±1.92a	93.27±3.42ab	94.44±5.56ab	73.81±1.19b
	20+40	100.00±0.00a	88.04±1.52ab	95.24±4.76a	95.05±2.48ab	100.00±0.00a	75.40±3.97b
	30+40	94.51±1.84a	100.00±0.00a	66.67±3.03c	100.00±0.00a	87.96±0.46b	100.00±0.00a
	40+40	96.30±3.70a	100.00±0.00a	76.74±5.44bc	78.25±3.55c	100.00±0.00a	—
再生频率 Regeneration frequency/%	0(CK)	54.77±2.25a	44.18±3.81a	31.89±2.47c	38.98±1.92b	32.86±2.11c	29.10±2.47bc
	20	48.52±4.55a	43.52±6.19a	24.46±2.70c	20.63±1.59c	55.56±6.42b	15.88±0.79d
	30	9.04±1.05e	17.96±2.18b	24.07±0.93c	23.15±0.93c	16.43±2.71d	22.86±2.86cd
	40	33.33±2.36bc	21.31±3.13b	49.04±0.96a	38.76±3.56b	31.94±3.67c	13.10±0.60d
	20+40	26.01±3.17cd	26.95±1.04b	39.68±3.17b	51.28±1.28a	58.40±2.10b	45.24±2.38a
	30+40	22.73±0.85d	30.56±2.78ab	30.30±3.03c	50.00±3.21a	56.02±3.62b	35.56±2.22b
	40+40	38.73±2.82b	18.89±1.11b	51.52±1.52a	38.73±2.82a	75.40±3.97a	—
平均再生芽数 Average number of regenerated buds	0(CK)	5.81±0.16a	3.54±0.29a	2.32±0.15ab	1.51±0.06ab	1.84±0.10d	1.17±0.08a
	20	4.63±0.63b	1.90±0.21b	1.63±0.24b	1.40±0.24b	1.78±0.12d	1.00±0.00a
	30	4.33±0.33bc	2.83±0.44ab	1.67±0.17b	1.33±0.33b	2.00±0.29cd	1.00±0.00a
	40	5.08±0.21ab	2.36±0.19ab	1.97±0.13ab	1.18±0.10b	2.67±0.17ab	1.33±0.33a
	20+40	3.42±0.22c	3.06±0.24ab	2.11±0.11ab	1.56±0.09ab	2.22±0.12bcd	1.67±0.19a
	30+40	3.25±0.16c	2.83±0.17ab	2.03±0.17ab	2.08±0.08a	2.92±0.08a	1.67±0.17a
	40+40	4.22±0.11bc	2.33±0.33ab	2.58±0.13a	1.28±0.15b	2.47±0.07abc	—

注:同列不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著。下同。
Note: The different lowercase letters within the same column indicate significant difference among treatments at 0.05 level. The same as below.

在茎尖分生组织平均再生芽数方面,经 1 次昼/夜 40 ℃/32 ℃热处理后,‘婺源皇菊’、‘金丝皇菊’在各热处理时间均比对照不同程度降低,但仅个别处理达显著水平,‘杭白菊’、‘北京菊’、‘乳荷’中均未受到显著影响,‘七月雪’在热处理 40 d 后显著升高,但在其他处理时间下无显著变化;经 2 次昼/夜 40 ℃/32 ℃热处理后,‘婺源皇菊’均比对照显著降低,‘七月雪’较对照显著升高,其他品种较对照均无显著变化,且各品种内累积热处理时间之间也多无显著差异。

由图 2 可知,在不同热处理次数下,各茶菊品种茎尖分生组织平均再生频率差异均达显著水平($P<0.05$),并根据其变化趋势可分为 3 种类型:第 1 种类型是茎尖分生组织再生频率随着热处理次数的增加而增加,品种有‘杭白菊’、‘七月雪’;第 2 种类型是茎尖分生组织再生频率在 1 次热处理时最低,在第 2 次热处理时上升,品种有‘北京菊’、‘乳荷’;第 3 种类型是茎尖分生组织再生频率随着热处理累积时间的增

加而降低,品种有‘婺源皇菊’、‘金丝皇菊’。



不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著。
图 2 不同热处理次数下各品种茶菊茎尖分生组织平均再生频率比较
Different lowercase letters indicate that there is a significant difference among treatments at 0.05 level.
Fig. 2 Comparison of average regeneration frequency of shoot apical meristems among different tea chrysanthemum varieties under different heat treatment time

2.3 化学脱毒剂处理对‘婺源皇菊’茎尖分生组织再生的影响

由于茎尖分生组织的特殊性,考虑到化学脱毒剂的毒害作用,选用再生能力最强的‘婺源皇菊’进行后续试验。前期预试验中,‘婺源皇菊’茎尖分生组织在添加不同浓度水杨酸、利巴韦林、脱落酸的分化培养基中未再生,无法直接利用茎尖分生组织与化学脱毒剂进行混培,故将带芽茎段接种于添加不同种类、不同浓度化学脱毒剂的生根培养基中进行预处理,而后剖取其茎尖分生组织进行培养。

表 3 显示,在各浓度水杨酸、利巴韦林、脱落酸处理下,‘婺源皇菊’茎尖分生组织出愈率均较对照(CK)增加,但未达到显著水平($P>0.05$),而其再生频率和平均再生芽数较对照不同程度降低,在 20 $\mu\text{mol/L}$ 水杨酸、10 mg/L 利巴韦林、20 mg/L 脱落酸处理下均达到显著水平,再生频率降幅分别为 27.31%、22.40%、64.63%,平均再生芽数降幅分别为 12.05%、52.67%、29.26% ($P<0.05$)。说明水杨酸、利巴韦林、脱落酸预处理抑制‘婺源皇菊’茎尖分生组织再生。

表 3 不同浓度化学脱毒剂处理下‘婺源皇菊’茎尖分生组织再生情况
Table 3 Shoot apical meristem regeneration of ‘Wuyuan Huangju’ under different concentration of chemical detoxification agents

脱毒剂 Detoxification agent	处理浓度 Treatment concentration	出愈率 Callus induction frequency/%	再生频率 Regeneration frequency/%	平均再生芽数 Average number of regenerated buds
水杨酸 SA	0 $\mu\text{mol/L}$ (CK)	96.46 $\pm$ 2.20a	54.77 $\pm$ 2.25a	5.81 $\pm$ 0.16a
	10 $\mu\text{mol/L}$	100.00 $\pm$ 0.00a	47.62 $\pm$ 3.99ab	5.23 $\pm$ 0.25ab
	20 $\mu\text{mol/L}$	100.00 $\pm$ 0.00a	39.81 $\pm$ 2.31b	5.11 $\pm$ 0.11b
	40 $\mu\text{mol/L}$	100.00 $\pm$ 0.00a	50.00 $\pm$ 3.21a	5.17 $\pm$ 0.30b
利巴韦林 Ribavirin	0 mg/L (CK)	96.46 $\pm$ 2.20a	54.77 $\pm$ 2.25a	5.81 $\pm$ 0.16a
	10 mg/L	100.00 $\pm$ 0.00a	42.50 $\pm$ 3.82c	2.75 $\pm$ 0.14c
	20 mg/L	100.00 $\pm$ 0.00a	43.64 $\pm$ 1.82bc	3.20 $\pm$ 0.20c
	40 mg/L	100.00 $\pm$ 0.00a	51.85 $\pm$ 1.85ab	4.73 $\pm$ 0.07b
脱落酸 ABA	0 mg/L (CK)	96.46 $\pm$ 2.20a	54.77 $\pm$ 2.25a	5.81 $\pm$ 0.16a
	10 mg/L	100.00 $\pm$ 0.00a	29.09 $\pm$ 1.85c	3.96 $\pm$ 0.17b
	20 mg/L	100.00 $\pm$ 0.00a	19.37 $\pm$ 1.41d	4.11 $\pm$ 0.31b
	30 mg/L	100.00 $\pm$ 0.00a	36.05 $\pm$ 1.49b	5.46 $\pm$ 0.14a

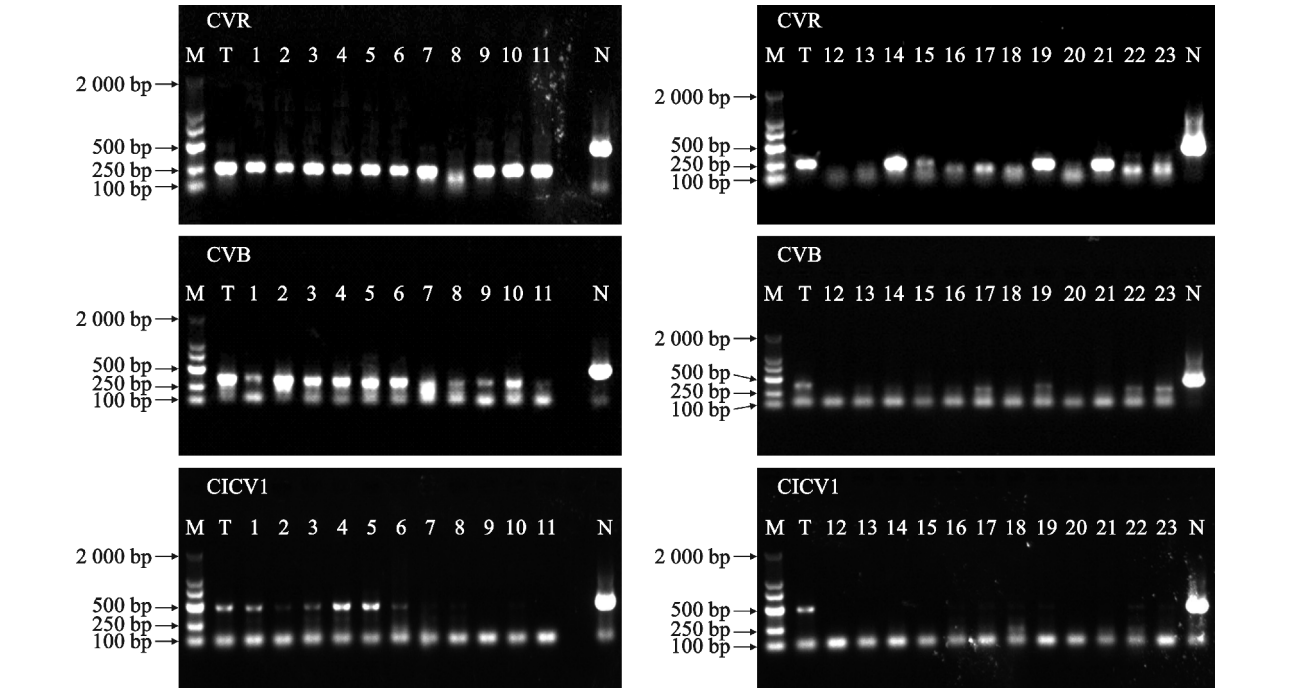
2.4 化学脱毒剂结合热处理对‘婺源皇菊’茎尖分生组织再生的影响

由表 4 可知,各浓度水杨酸、利巴韦林结合 1 次热处理下‘婺源皇菊’茎尖分生组织出愈率均与对照(CK)无显著差异($P>0.05$),30 mg/L 脱落酸结合热处理下茎尖分生组织出愈率低于其他处理,与 10 mg/L 脱落酸处理差异显著($P<0.05$)。‘婺源皇菊’茎尖分生组织再生频率在各浓度水杨酸、利巴韦林结合热处理下均高于对照,且随着浓度增加而逐渐下降。在低浓度下差异达显著水平,此时水杨酸处理分别高出对照 98.05%、78.16%,利巴韦林处理高出对照 72.10%、55.39% ($P<0.05$);在 10 mg/L 脱落酸结合热处理下‘婺源皇菊’茎尖分生组织再生频率高于对照,但无显著差异,20 mg/L 、30

mg/L 脱落酸结合热处理下显著低于对照,降幅分别为 42.06%、83.32%。‘婺源皇菊’茎尖分生组织平均再生芽数在各浓度水杨酸、利巴韦林结合热处理下均低于对照,10 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 水杨酸及 10 mg/L 、20 mg/L 利巴韦林处理下与对照差异显著($P<0.05$);在 10 mg/L 、20 mg/L 脱落酸结合热处理下‘婺源皇菊’茎尖分生组织平均再生芽数与对照无显著差异,而在高浓度(30 mg/L)脱落酸处理下比对照显著降低 73.82%,同时显著低于其他浓度脱落酸处理($P<0.05$)。说明水杨酸、利巴韦林结合热处理对茎尖分生组织再生起促进作用,而高浓度脱落酸结合热处理则严重抑制茎尖分生组织再生,其中以 10 $\mu\text{mol/L}$ 水杨酸结合热处理对茎尖分生组织再生的促进效果最好。

表 4 化学脱毒剂结合热处理下‘婺源皇菊’茎尖分生组织再生情况

处理 Treatment	脱毒剂浓度 Detoxification agent concentration	出愈率 Callus induction frequency/%	再生频率 Regeneration frequency/%	平均再生芽数 Average number of regenerated buds
水杨酸 SA+40 ℃/ 32 ℃,40 d	0 μmol/L(CK)	92.22±4.84a	33.33±2.36b	5.08±0.21a
	10 μmol/L	100.00±0.00a	66.01±0.65a	4.33±0.07b
	20 μmol/L	100.00±0.00a	59.38±3.03a	4.74±0.21ab
	40 μmol/L	100.00±0.00a	35.10±2.89b	3.44±0.24c
利巴韦林 Ribavirin+40 ℃/ 32 ℃,40 d	0 mg/L(CK)	92.22±4.84a	33.33±2.36c	5.08±0.21a
	10 mg/L	100.00±0.00a	57.36±1.73a	4.40±0.06b
	20 mg/L	100.00±0.00a	51.79±1.04b	3.96±0.09c
	40 mg/L	100.00±0.00a	35.04±1.71c	4.93±0.16a
脱落酸 ABA+40 ℃/ 32 ℃,40 d	0 mg/L(CK)	92.22±4.84ab	33.33±2.36a	5.08±0.21a
	10 mg/L	100.00±0.00a	40.45±1.87a	5.59±0.16a
	20 mg/L	91.63±0.40ab	19.31±1.93b	4.94±0.24a
	30 mg/L	82.22±1.11b	5.56±0.56c	1.33±0.33b



M. DL 2000 DNA marker; T. 阳性对照; N. 内参基因; 1—6. 茎尖分生组织直接培养; 7—11. 40 ℃/32 ℃热处理 20 d+茎尖分生组织培养; 12. 40 ℃/32 ℃热处理 40 d+茎尖分生组织培养; 13—15. 40 ℃/32 ℃热处理(40+40)d+茎尖分生组织培养; 16—18. 水杨酸、利巴韦林、脱落酸+40 ℃/32 ℃热处理 40 d+茎尖分生组织培养; 19—21. 水杨酸、利巴韦林、脱落酸+茎尖分生组织培养; 22—23. 40 ℃/32 ℃热处理 30 d+茎尖分生组织培养。

图 3 不同处理方法下‘婺源皇菊’再生苗病毒检测电泳图

M, DL 2000 DNA marker. T, positive control. N, internal detection. 1—6, stem tip meristem culture. 7—11, heat treatment at 40 ℃/32 ℃ for 20 days + stem tip meristem culture. 12, heat treatment at 40 ℃/32 ℃ for 40 days + stem tip meristem culture. 13—15, heat treatment at 40 ℃/32 ℃ for (40+40) days + stem tip meristem culture. 16—18, salicylic acid, ribavirin, and abscisic acid treatment + heat treatment at 40 ℃/32 ℃ for 40 days + stem tip meristem culture. 19—21, salicylic acid, ribavirin, and abscisic acid treatment + stem tip meristem culture. 22—23, heat treatment at 40 ℃/32 ℃ for 30 days + stem tip meristem culture.

Fig. 3 Electrophoresis map of virus detection of virus-free seedlings in ‘Wuyuan Huangju’ under different treatments

2.5 不同处理方法再生苗脱毒效果分析

图 3 显示,‘婺源皇菊’茎尖分生组织直接培养下再生苗 CVR(247 bp)、CVB(389 bp)、*Carya illinoensis* carlavirus 1(CICV1,502 bp)仍具特异性条带,但部分条带较阳性对照亮度减弱,说明茎尖分生组织培养可以减少植株体内病毒含量,但不能获得完全脱毒苗。随着热处理时间的延长,再生苗 CVR、CVB 条带亮度逐渐减弱,热处理 40 d、40 d+40 d 时均未出现对应特异性条带,CICV1 在热处理下均未出现特异性条带,说明热处理可完全脱除 CICV1,而热处理 40 d、40 d+40 d 可完全脱除 3 种病毒。脱毒剂单一处理可完全脱除 CICV1,但不能完全脱除 CVR、CVB。脱毒剂结合热处理可同时脱除 2 种或 3 种病毒,最终在热处理、脱毒剂结合热处理下共检测出 5 株‘婺源皇菊’完全脱毒苗。

3 讨论

在无病毒苗的生产培育中,由于茎尖分生组织中病毒含量很少或没有,以及其中干细胞的天然抗病毒免疫功能^[10-11],使用最广泛的脱毒方式是茎尖分生组织培养脱毒。茎尖分生组织获得难度大,且在不同植物之间存在较大差异。本研究结果显示,不同品种茶菊茎尖分生组织再生频率差异显著,其中以‘婺源皇菊’茎尖分生组织再生能力最佳。

在茎尖分生组织再生过程中发现,培养皿中形成的愈伤组织后期易玻璃化,再生的不定芽较细弱,而组培瓶中再生的不定芽较健壮,可伸长至 2~3 cm。这一方面可能是愈伤组织增殖诱导造成的低氧微环境会降低其再生能力^[12],加重玻璃化程度;另一方面由于组培瓶生长空间大,瓶盖具有透气膜,而培养皿密封性较好,无法与外界进行气体交流,导致不定芽生长状态欠佳。接种容器的选择会对植株再生过程产生一定程度的影响^[13]。

考虑到茶菊耐热性较差,直接以恒温进行热处理可能导致无菌苗成活率下降,本试验以变温方式进行热处理,比较不同热处理时间对茎尖分生组织再生的影响,发现大部分茶菊品种茎尖分生组织再生频率在热处理 20 d、30 d 时最低,与对照差异显著,而在热处理 40 d 时与对照差异不显著,较处理 20 d、30 d 有所上升。茎尖分生组织可以直接响应高温胁迫,植株经过中度热启动后,茎尖分生组织中许多热记忆基因的表达发生变化,继续重度热触发刺激后,其表达进一步上调或下调,从而为分生组织提供保护机制,保护干细胞的特性和活性使其免受

热触发处理影响,而仅受热触发作用的未热启动幼苗会即刻崩溃并死亡^[14-15]。这可能与细胞自噬有关,通过热启动信号刺激通路相关的自噬关键基因,热处理 40 d 甚至更长时间时在植株顶端分生组织中被激活表达,植株热应力增强,对高温的抗性增强,从而表现在植株再生方面^[16]。同时,本试验中发现经热处理后,‘婺源皇菊’、‘金丝皇菊’、‘北京菊’、‘乳荷’幼苗茎尖分生组织再生频率较对照均降低,而‘杭白菊’、‘七月雪’茎尖再生频率较对照有所提高,可能与热处理后‘杭白菊’、‘七月雪’茎尖愈伤组织在后期培养中褐化程度缓解有关。不同品种间酚类物质含量、多酚氧化酶(PPO)活性不同,愈伤组织褐化程度不同,酚类物质含量高的品种易褐化^[17]。‘杭白菊’、‘七月雪’茎尖分生组织在培养过程中较易褐化,说明其酚类物质含量可能高于其他品种;而温度是影响 PPO 活性的重要因素之一,不同植物中 PPO 活性表现的最适温度各异,当温度超过最适反应温度后,随着热处理时间的增加,PPO 活性下降^[18],褐化程度减小,间接影响茎尖分生组织再生频率。通过比较不同品种茶菊热处理后茎尖分生组织的再生情况,初步了解不同品种茶菊在热胁迫条件下的生理反应和适应能力,有助于筛选出适应性强、生长快速的茶菊品种,为其在不同环境条件下的栽培提供参考。由于高温抑制植物组织中病毒 RNA 的合成,温度越高,钝化病毒效果越好,由此可以探索不同品种茶菊在脱毒热处理时所能承受的最高温度及持续时间,从而提高脱毒率。

利巴韦林在植物脱毒中应用最为广泛,如有研究是将茎尖直接接入添加利巴韦林的分化培养基中培养^[19],且对特定病毒脱除效果较好。在本研究前期预实验中,‘婺源皇菊’茎尖分生组织在直接添加利巴韦林的分化培养基中无法再生,甚至褐化死亡,故选择预处理法进行试验,分析利巴韦林对‘婺源皇菊’的影响与其他植物种类可能存在差异,进而脱毒效果各异。本试验表明,利巴韦林预处理结合茎尖分生组织培养不能完全脱除 3 种病毒,但在此基础上结合热处理可获得完全脱毒苗。脱落酸(ABA)通过诱导胞间连丝上的胼胝质沉积,从而限制病毒的细胞间运动,达到脱除病毒的效果^[20]。有研究表明 ABA 预处理结合茎尖分生组织培养对菊花类病毒脱除效果较好^[21]。在本研究中,ABA 预处理严重抑制‘婺源皇菊’茎尖分生组织再生,同时无法完全脱除 3 种病毒,说明 ABA 预处理对 CVR、CVB、CICV1 这 3 种病毒脱除效果较差。

水杨酸(SA)作为一种内源激素,调节植物抗氧化系统中相关酶的表达,促进生长发育过程,在植物防御和胁迫响应过程中发挥重要作用^[22-24]。陈龙研究表明 10 $\mu\text{mol/L}$ SA 促进茎尖分生组织再生效果最好,而高浓度 SA 则显著抑制^[25]。马小燕研究外源 1,10,50,100 $\mu\text{mol/L}$ SA 对苹果增殖的影响,发现当 SA 浓度超过 10 $\mu\text{mol/L}$ 后增殖系数随 SA 浓度上升而下降,且后期 10 $\mu\text{mol/L}$ SA 处理茎尖分生组织再生频率也高于对照;同时表明 SA 在结合热处理过程中对茎尖分生组织再生发挥促进作用^[26]。本研究采用 10,20,40 $\mu\text{mol/L}$ SA 处理无菌茶菊苗发现,3 种 SA 浓度处理均抑制茎尖分生组织再生,并以 20 $\mu\text{mol/L}$ SA 影响最大。这可能是 SA 浓度过高导致植物细胞内氧化应激反应强烈,抑制植物正常生长,而较低浓度 SA 可以在一定程度上提高植物细胞的抗氧化性,但不同植株间存在差异^[25]。同时有研究表明低氧激活 RAP2.12 蛋白,促进 SA 一系列的生物合成和防御反应,通过过量 PLT 依赖的途径抑制愈伤组织再生,同时 SA 处理削弱 RAP2.12 突变体愈伤组织芽再生这一过程,从而说明 SA 处理在一定程度上降低了细胞全能性和植物再生能力^[12]。水杨酸在结合热处理时则对茎尖分生组织再生表现为促进作用,水杨酸可能是通过改变抗氧化酶的活性和非酶抗氧化剂的水平来提高植株的抗性,在一定程度上缓解胁迫对植物的伤害,进而影响植株的再生。Golovatskaya 等和 Tran 等提出 SA 参与胁迫与组织再生之间存在某种潜在联系^[27-28]。SA 结合热处理促进茶菊茎尖分生组织再生,在一定程度上说明 SA 能增强茶菊的抗逆性,使其在高温等环境胁迫下具更强适应性。同时,SA 作为植物 RNAi 过程中的关键信号分子,

可能在脱毒过程中提高或不影响脱毒率的情况下进一步提高茎尖分生组织再生频率。本研究表明,10 $\mu\text{mol/L}$ SA 结合热处理下茶菊茎尖分生组织再生频率最高,且可获得完全脱毒苗。

本研究在热处理、化学脱毒剂结合热处理下仅获得 5 株完全脱毒苗,综合考虑茎尖分生组织再生及脱毒率的情况下,后续可在水杨酸结合热处理法基础上继续优化进行其他茶菊品种病毒脱除试验,研究其在植物抗病毒免疫过程中的作用机制,进一步完善优化试验程序,以提升脱毒苗的获得效率,更好地进行无病毒苗培育及生产。此外,通过研究不同脱毒处理后茎尖分生组织再生情况还可为茶菊的育种和遗传改良提供重要信息,进而提高其产量和品质。

4 结 论

(1)在茎尖分生组织培养法中,不同品种茶菊茎尖分生组织再生频率存在显著差异,由高到低依次为‘婺源皇菊’>‘金丝皇菊’>‘北京菊’>‘七月雪’>‘杭白菊’>‘乳荷’。

(2)不同昼/夜 40 $^{\circ}\text{C}$ /32 $^{\circ}\text{C}$ 变温热处理时间下,不同品种茶菊茎尖分生组织再生效果差异显著,并以‘杭白菊’、‘七月雪’再生效果最好。

(3)脱毒剂水杨酸、利巴韦林、脱落酸处理均抑制茎尖分生组织再生,其中水杨酸的抑制作用最小。

(4)不同脱毒剂结合昼夜变温热处理对茎尖分生组织再生的影响效果差异显著,其中以 10 $\mu\text{mol/L}$ 水杨酸结合热处理再生效果最好,再生频率为 66.01%,显著高于对照。

(5)在适宜热处理、化学脱毒剂结合热处理下可获得完全脱毒苗。

参考文献:

[1] 戴思兰,温小惠. 菊花的药食同源功效[J]. 生命科学, 2015, 27(8): 1083-1090.
DAI S L, WEN X H. Efficacy of the medicinal and food chrysanthemum[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2015, 27(8): 1083-1090.

[2] 王铁霖,秦朗,杜用玺,等. 菊花病毒病研究进展[J]. 中国现代中药, 2021, 23(9): 1655-1663.
WANG T L, QIN L, DU Y X, *et al.* Virus diseases in *Chrysanthemum morifolium*: A review[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2021, 23(9): 1655-1663.

[3] 吴茜,蔡晓霖,管志勇,等. 茶菊病毒检测与脱除技术研究[J]. 核农学报, 2021, 35(7): 1548-1556.
WU X, CAI X L, GUAN Z Y, *et al.* Research of virus detection and elimination of tea chrysanthemum[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2021, 35(7): 1548-1556.

[4] 颜克如. ‘杭白菊’病毒检测及不同世代脱毒苗产量品质的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.

[5] ZHANG Z B, LEE Y, SIVERTSEN A, *et al.* Low temperature treatment affects concentration and distribution of chrysanthemum stunt viroid in *Argyranthemum* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 224.

[6] KAUR C, RAJ R, KUMAR S, *et al.* Elimination of bean yellow mosaic virus from infected cormels of three cultivars of

gladiolus using thermo-, electro- and chemotherapy[J]. 3 *Bio-tech*, 2019, 9(4): 154.

[7] 冯光惠, 杜虎平, 李夏隆, 等. 携病毒马铃薯茎尖分化成苗与脱毒率检测[J]. 西北植物学报, 2015, 35(3): 622-627. FENG G H, DU H P, LI X L, *et al.* Meristem differentiation seedlings and detoxification detection of potato bringing virus [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, 35 (3): 622-627.

[8] ZARGHAMI R, AHMADI B. Production of plum pox virus-free and prunus necrotic ringspot virus-free regenerants using thermotherapy and meristem-tip culture in *Prunus persica* L. [J]. *Erwerbs-Obstbau*, 2022, 65(4): 719-727.

[9] ABDULHASSAN H A, SALEH B A, HARKATI D, *et al.* In silico pesticide discovery for new anti-tobacco mosaic virus agents; Reactivity, molecular docking, and molecular dynamics simulations[J]. *Applied Sciences*, 2022, 12(6): 2818.

[10] DELSENY M. Innate antiviral immunity in plant apical meristem explained[J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2021, 343 (4): 5-6.

[11] 杜斐, 焦雨铃. WUSCHEL 介导的固有免疫: 植物干细胞抵御病毒侵害的新机制[J]. 植物学报, 2020, 55(5): 537-540. DU F, JIAO Y L. WUSCHEL-mediated innate immunity in plant stem cells provides a novel antiviral strategy[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2020, 55(5): 537-540.

[12] KOO D, LEE H G, BAE S H, *et al.* Callus proliferation-induced hypoxic microenvironment decreases shoot regeneration competence in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2024, 17 (3): 395-408.

[13] 位明君, 许悦, 肖卓琳, 等. 须芒草 (*Schizachyrium scoparium*) 组织培养与再生体系的建立 [J/OL]. 分子植物育种, 2022(2022-06-21)[2023-11-26]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220620.1825.010.html>. WEI M J, XU Y, XIAO Z L, *et al.* Establishment of tissue culture regeneration system of *Schizachyrium scoparium* [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2022 (2022-06-21) [2023-11-26]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220620.1825.010.html>.

[14] IKEDA M, TAKASAKI H, MITSUDA N. Thermomemory in shoot apical meristem; Regulation of carbohydrate metabolism and stem cell identity[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14 (9): 1427-1429.

[15] OLAS J J, APELT F, ANNUNZIATA M G, *et al.* Primary carbohydrate metabolism genes participate in heat-stress memory at the shoot apical meristem of *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(9): 1508-1524.

[16] SEDEH H T, BAZGIR E. Thermopriming-induced autophagy in shoot apical meristem of *Arabidopsis* [J]. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2021, 19(4): e2901.

[17] 丁燕, 郭佳慧, 范紫云, 等. ‘海大 2 号’菠萝蜜茎尖组培褐变过程中酚类物质及相关酶活性的影响[J]. 热带作物学报, 2023, 44(3): 562-568.

DING Y, GUO J H, FAN Z Y, *et al.* Effects of phenolic substances and related enzyme activities in the process of tissue culture browning of *Artocarpus heterophyllus* stem tips of ‘Haida 2’ [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2023, 44(3): 562-568.

[18] 苗文娟, 何鑫, 夏玥, 等. 滁菊多酚氧化酶和过氧化物酶热钝化动力学研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(13): 9-14. MIAO W J, HE X, XIA Y, *et al.* Thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase from chuju [J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(13): 9-14.

[19] KEREŠA S, VONČINA D, LAZAREVIĆ B, *et al.* Partial elimination of viruses from traditional potato cultivar ‘Brinjak’ by chemotherapy and its impact on physiology and yield components[J]. *Horticulturae*, 2022, 8(11): 1013.

[20] ALAZEM M, LIN N S. Antiviral roles of abscisic acid in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1760.

[21] 张怡. 食用菊品种类病毒脱毒体系建立和优化[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.

[22] 刁倩楠, 蒋雪君, 陈幼源, 等. 外源水杨酸预处理对低温胁迫下甜瓜幼苗生长及其抗逆生理特性的影响[J]. 西北植物学报, 2018, 38(11): 2072-2080. DIAO Q N, JIANG X J, CHEN Y Y, *et al.* Effects of exogenous salicylic acid pretreatment on growth and resistance physiological indexes in melon seedling under chilling stress [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2018, 38 (11): 2072-2080.

[23] 滕建晒, 陈健, 彭亮, 等. 水杨酸调控内源 H₂S 缓解黑大豆铝胁迫的作用机理研究[J]. 西北植物学报, 2019, 39(1): 121-130. TENG J S, CHEN J, PENG L, *et al.* Mechanism of salicylic acid regulating endogenous H₂S alleviating aluminum stress in the root of black soybean [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2019, 39(1): 121-130.

[24] 王立红, 李星星, 孙影影, 等. 外源水杨酸对 NaCl 胁迫下棉花幼苗生长生理特性的影响[J]. 西北植物学报, 2017, 37 (1): 154-162. WANG L H, LI X X, SUN Y Y, *et al.* Effects of exogenous salicylic acid on the physiological characteristics and growth of cotton seedlings under NaCl stress [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2017, 37(1): 154-162.

[25] 陈龙. 外施褪黑素促进苹果脱毒的技术与机理研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2021.

[26] 马小燕. 苹果病毒 RPA-LFD 法检测与外源水杨酸脱除技术研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2022.

[27] GOLOVATSKAYA I F, KADYRBAEV M K, BOYKO E V, *et al.* Salicylic acid improves cold resistance of *Solanum tuberosum* regenerants via regulation of the antioxidant system [J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2023, 70(5): 112.

[28] TRAN S, ISON M, DIAS N C F, *et al.* Endogenous salicylic acid suppresses de novo root regeneration from leaf explants[J]. *PLoS Genetics*, 2023, 19(3): e1010636.