

香石竹斑驳病毒(CarMV)脱除对几种生理指标的影响

王丽花¹, 吴学尉¹, 杨秀梅², 瞿素萍², 王继华^{1,*}, 莫锡君¹

云南省农业科学院¹花卉研究所; ²农业部花卉产品质量监督检验测试中心(昆明), 昆明650205

摘要: 感染病毒的香石竹组培苗于(38.5±1) °C条件下热处理29 d后, 切取0.1~0.2 mm的茎尖生长点无菌培养成苗后, 经DAS-Elisa检测获得脱除香石竹斑驳病毒(*Carnation mottle virus*, CarMV)的香石竹脱毒苗, 取脱毒苗与非脱毒苗的叶片, 测量叶绿素a、叶绿素b、类胡萝卜素、丙二醛(MDA)、干物质含量几种生理生化指标。结果表明, 脱毒苗与非脱毒苗相比: (1)叶绿素和类胡萝卜素含量增加, 具有较强的光合效率; (2)与抗性生理有关的MDA含量下降, 衰老减缓; (3)光合物质的形成与积累增多, 干物质含量增加。

关键词: 香石竹斑驳病毒; 脱毒; 生理指标

Production of CarMV-Free Carnation Plants and Its Effects on Some Physiological Indicators

WANG Li-Hua¹, WU Xue-Wei¹, YANG Xiu-Mei², QU Su-Ping², WANG Ji-Hua^{1,*}, MO Xi-Jun¹

¹Flower Research Institute; ²Supervision and Testing Center for Flowers and Ornamental Plant Quality, Ministry of Agriculture, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China

Abstract: The common tissue culture seedlings were cultured in heat-treatment conditions (38.5±1) °C for 29 d, then the stem-apexes were cut at 0.1–0.2 mm and cultured in sterile condition. *Carnation mottle virus* (CarMV)-free carnation plants were obtained which had been detected CarMV by DAS-Elisa. Leaves of CarMV-free seedlings and common seedlings were cut down and measured the contents of chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids, malondialdehyde (MDA) and dry-matter. The results showed that comparative study between CarMV-free seedlings and common seedlings: (1) chlorophyll and carotenoids content of CarMV-free seedlings increased, and the photosynthetic efficiency was high; (2) MDA content which relate to the physiological resistance of CarMV-free seedlings decreased, delaying aging; (3) formation and accumulation of photosynthates increased that could cause more dry-matter content.

Key words: *Carnation mottle virus* (CarMV); virus-elimination; physiological indicators

香石竹, 又名康乃馨, 为石竹科石竹属的多年宿根性草本植物, 是我国最重要的出口花卉之一。香石竹主要靠扦插繁殖, 长期的营养繁殖使病毒危害严重, 切花质量明显下降, 产花量降低, 不同程度地引起植株矮化、畸形、花叶、坏死, 花朵变小, 花苞开裂, 花碎色等, 严重影响了鲜切花产量和质量(蔡红等2001)。利用茎尖脱毒技术开展香石竹复壮的研究工作也就应运而生(伊廷双等2001; 许杰2008)。脱毒苗具有抗病性强、生长势旺、高产等特点, 迄今为止, 对脱毒处理后植株的产量、性状等方面的研究已经十分广泛(栾运芳和王建林2002; 陈选阳等2001; 薛建平等2004; 扬鹏等2002), 但针对香石竹脱毒苗与非脱毒苗生理生化指标变化方面的研究尚未有报道。本研究以

热处理结合剥取茎尖生长点获得的脱除香石竹斑驳病毒(*Carnation mottle virus*, CarMV)的脱毒苗为材料, 通过对脱毒香石竹与非脱毒香石竹的叶绿素a (chlorophyll a, chl a)、叶绿素b (chlorophyll b, chl b)、类胡萝卜素、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、干物质含量等生理生化指标进行测定, 从生理生化方面对脱除CarMV病毒的香石竹种苗的优异品质进行揭示, 以期对香石竹种苗复壮和育种研究提供理论依据。

收稿 2011-10-25 修定 2012-02-09

资助 国家“863”计划课题(2011AA100208)和云南省重点新产品开发计划(2011BB013)。

* 通讯作者(E-mail: wjh0505@gmail.com; Tel: 0871-5895788)。

材料与方法

1 实验材料

供试材料采自云南省农科院花卉所江边基地大田生长期感染病毒的香石竹(*Dianthus caryophyllus* Linn)植株品种‘云彤’、‘云靛’、‘云菁’、‘云绛’和‘云丽’。按王丽花等(2005)的方法获得脱除CarMV病毒的5个香石竹品种脱毒苗,即香石竹组培苗于(38.5±1) °C条件下热处理29 d后切取0.1~0.2 mm的茎尖生长点,无菌培养成苗后,各品种随机抽取5个单株经DAS-Elisa检测CarMV病毒后获得。

2 方法

于2011年2月12日(测定非脱毒苗)和6月12日(测定脱毒苗)分别选取不同品种植株相同位置的叶片测定叶绿素a、叶绿素b、类胡萝卜素和MDA的含量,干物质的测定取培养基以上的植株部分。各品种每个指标取3组叶片样品为重复处理测定其指标含量,用SAS 9.1 (SAS Institute Inc.)的单因素方差分析(Anova) Duncan法分析脱毒苗和非脱毒苗各处理指标实验数据的差异显著性。叶绿素a、叶绿素b含量和类胡萝卜素含量参照王学奎(2000)和金霞等(2010)的分光光度法;MDA含量参照李合生(1999)的硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法,按公式 $C(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})=6.54\times(A_{532}-A_{600})-0.56\times A_{450}$ 计算MDA浓度,再转化为MDA含量($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$);干物质参照张志良(1991)的低恒温直接干燥法测定。

结果与讨论

1 五个香石竹品种脱毒前后CarMV病毒携带状况

预先检测5个香石竹品种CarMV病毒携带情况,经热处理每品种剥取0.1~0.2 mm茎尖生长点20

个,无菌条件下培养一周后转绿,3~4周后发育成完整植株,每品种随机取5株正常成活的单株切取其叶片分别进行CarMV病毒检测。DAS-ELISA检测结果表明,5个香石竹品种脱毒前均携带CarMV病毒,不同品种携带的CarMV病毒量存在差异,‘云靛’感染CarMV病毒最重;脱毒处理后,5个品种均获得无CarMV病毒单株,共20株,其中‘云彤’和‘云菁’各5株、‘云绛’4株、‘云丽’和‘云靛’各3株。对此20单株进行扩繁作为测定干物质等生理指标的材料。

2 叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素含量的测定

叶绿素和类胡萝卜素分布在基粒的类囊体薄膜上,在植物的光合作用中具有非常重要的作用,其含量的高低是植物进行光合作用强弱的重要指标(黄华康2002),且类胡萝卜素能将吸收的光能传递给叶绿素a,是光合作用不可缺少的光合色素。香石竹脱毒苗和非脱毒苗的叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素测定结果见表1。脱毒香石竹苗叶片的叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素含量均显著高于非脱毒香石竹苗($P<0.01$),三种生理指标增幅最大的品种分别为‘云靛’(61.42%)、‘云绛’(64.46%)和‘云靛’(58.43%),增幅最小的品种分别为‘云丽’(21.29%)、‘云菁’(38.96%)和‘云彤’(31.07%)。脱毒苗叶绿素和类胡萝卜素含量的增加,说明脱毒香石竹苗比非脱毒香石竹苗具有较强的光合作用能力。

3 MDA含量的测定

丙二醛(MDA)是膜脂过氧化产物之一,MDA含量的高低可代表细胞膜损伤程度的大小,通常利用它作为膜脂过氧化程度的指标,表示细胞膜的过氧化程度和植物对逆境条件反应的强弱(陈贵

表1 香石竹脱毒苗和非脱毒苗叶片叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素的含量

Table 1 The chlorophyll a, b and carotenoids contents of CarMV-free seedlings and common seedlings on carnation

品种	叶绿素a			叶绿素b			类胡萝卜素		
	脱毒苗	非脱毒苗	增幅/%	脱毒苗	非脱毒苗	增幅/%	脱毒苗	非脱毒苗	增幅/%
‘云彤’	14.55 ^a	10.80 ^b	34.68	4.25 ^a	2.82 ^b	50.97	2.98 ^a	2.27 ^b	31.07
‘云靛’	10.99 ^a	6.81 ^b	61.42	2.84 ^a	1.86 ^b	52.17	2.36 ^a	1.49 ^b	58.43
‘云菁’	13.15 ^a	9.36 ^b	40.56	3.90 ^a	2.81 ^b	38.96	2.70 ^a	1.92 ^b	41.02
‘云绛’	14.18 ^a	9.08 ^b	56.06	3.89 ^a	2.37 ^b	64.46	3.05 ^a	1.97 ^b	54.90
‘云丽’	10.84 ^a	8.93 ^b	21.29	3.09 ^a	2.20 ^b	40.26	2.25 ^a	1.67 ^b	34.99

通过Duncan检验,同一品种脱毒苗和非脱毒苗间不同小写字母表示在1%的水平有显著性差异。表2、表3同此。

等1991)。香石竹脱毒苗与非脱毒苗相比具有较低的MDA含量(表2), 这就说明脱毒苗的膜脂损伤程度显著小于非脱毒苗($P<0.01$), 即脱毒苗的膜脂稳定性高, 具有更强的抗逆性。其中‘云绛’降幅最大为27.49%, ‘云靛’降幅最小为17.70%, 这从另一方面说明脱毒苗和非脱毒苗MDA含量以及降幅的多少跟原植株的带毒量有关, 原植株感染病毒越严重, 则其细胞膜损伤程度越大, MDA含量越高, 脱除病毒的难度也相应增大。

表2 香石竹脱毒苗与非脱毒苗MDA的含量

Table 2 MDA contents of CarMV-free seedlings and common seedlings on carnation

品种	脱毒苗/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	非脱毒苗/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	降幅/%
‘云彤’	0.203 ^b	0.278 ^a	26.98
‘云靛’	0.423 ^b	0.514 ^a	17.70
‘云菁’	0.216 ^b	0.294 ^a	26.53
‘云绛’	0.211 ^b	0.291 ^a	27.49
‘云丽’	0.104 ^b	0.136 ^a	23.53

4 干物质含量的测定

干物质是衡量植物有机物积累、营养成分多寡的一个重要指标, 其积累量等于净光合作用的量, 即干物质含量的高低直接反映出植物光合效率的强度。五个香石竹品种的脱毒苗与非脱毒苗干物质含量测定结果具体见表3。五个品种的脱毒苗的干物质含量均显著高于非脱毒苗($P<0.01$), 这也就说明脱毒苗的光合效率明显大于非脱毒苗, 因此脱毒苗的有机物积累多, 具有更丰富的营养成分, 此结果与叶绿体的测定研究结果一致。其中, ‘云靛’的增幅最大达55.76%, 其余品种增幅依次顺序为‘云菁’ (51.06%) > ‘云绛’ (48.45%) > ‘云彤’

表3 香石竹脱毒苗与非脱毒苗的干物质含量

Table 3 Dry-matter contents of CarMV-free seedlings and common seedlings on carnation

品种	干物质含量/%		增幅/%
	脱毒苗	非脱毒苗	
‘云彤’	10.00 ^a	7.02 ^b	42.43
‘云靛’	10.12 ^a	6.49 ^b	55.76
‘云菁’	10.40 ^a	6.89 ^b	51.06
‘云绛’	9.76 ^a	6.57 ^b	48.45
‘云丽’	11.20 ^a	7.96 ^b	40.65

(42.43%) > ‘云丽’ (40.65%), 5个品种的脱毒苗干物质增幅高低存在差异, 这可能与非脱毒苗的病毒感染轻重程度有关。

本研究还观察到脱除CarMV病毒的香石竹脱毒苗和非脱毒苗生长势表现出不同的特点, 脱毒苗长势快、叶片大而叶色深, 这和温学森等(2002)研究地黄光合色素含量与叶色的关系结果一致, 即叶绿素含量高者叶色为深色。且本实验结果也表明, 香石竹脱除CarMV病毒后叶绿素a和b、类胡萝卜素含量比非脱毒苗要高, 说明在相同的光照条件下, 叶绿素含量高的脱毒苗其净光合速率高, 氮代谢活跃, 可以同化更多的光能, 积累更多的有机成分和营养物质(干物质), 从而使脱毒苗的品质得到明显提高, 这也为脱毒苗的高产高质量特性提供了一定的理论依据。MDA是膜脂过氧化作用的主要产物之一, 具有很强的细胞毒性, 对细胞中的许多生物大分子如蛋白质、核酸等均有很强的破坏作用, 并参与破坏生物膜的结构与功能, MDA含量高低可以反映细胞膜过氧化作用的强弱和质膜破坏的程度(徐洪文等2009; Foyer和Noctor 2000; Mittler 2002; Mittler等2004)。脱除CarMV病毒的香石竹脱毒苗MDA含量显著低于非脱毒苗, 这就说明脱毒苗细胞膜过氧化作用和质膜破坏程度较弱, 对于逆境胁迫有较强的抵抗力。本文的结果表明脱除CarMV病毒的香石竹脱毒苗测定的各项生理指标都优于非脱毒苗, 反映了脱毒后植株的复壮是其生理功能改善的结果。植株感染病毒后, 病毒可能加速叶片衰老, 缩短绿叶功能期(Lee 1966), 势必影响到正常的生理过程, 导致植物光合作用减弱, 因此, 减少病毒对光合作用等正常生理活动的不良影响, 是提高种苗质量的重要因素之一。

参考文献

- 蔡红, 孔宝华, 刘进元, 陈海如(2001). 昆明地区香石竹病毒病及综合防治研究. 云南农业大学学报, 16 (1): 18~19
- 陈贵, 胡文玉, 谢甫缙, 张立军(1991). 提取植物体内MDA的溶剂及MDA作为衰老指标的探讨. 植物生理学通讯, 27 (1): 44~48
- 陈选阳, 陈凤翔, 袁照年, 庄宝华, 翁定河(2001). 甘薯脱毒对一些生理指标的影响. 福建农业大学学报, 30 (4): 449~453
- 黄华康(2002). 马铃薯脱毒对一些生理指标的影响. 中国马铃薯, 16 (3): 137~140
- 金霞, 金志芳, 孙光举, 陈曦(2010). 分光光度法测定海水中叶绿素

- 含量的研究. 广州化工, 38 (4): 132~136
- 李合生(1999). 植物生理生化实验原理与技术. 北京: 高等教育出版社, 260~261
- 栾运芳, 王建林(2002). 脱毒与未脱毒马铃薯叶片光合特性的比较研究. 中国农业科学, 35 (2): 222~224
- 王丽花, 苏艳, 杨秀梅, 张璐萍, 莫锡君(2005). 大花香石竹生长点脱毒技术研究. 中国种业, (5): 38~39
- 王学奎(2000). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社: 134~136
- 温学森, 娄红祥, 杨世林, 李先恩, 程秀民, 徐丽珍, 郑俊华(2002). 地黄不同品种光合色素含量及其与叶色的关系. 中国中药杂志, 27 (11): 828~831
- 徐洪文, 宋凤斌, 朱先灿, 童淑媛(2009). 两种基因型玉米苞叶保护酶及膜透性研究. 农业系统科学与综合研究, 25 (3): 307~311
- 许杰(2008). 麝香石竹的组培脱毒技术研究. 安徽农业科学, 36 (12): 4864~4866
- 薛建平, 张爱民, 盛玮, 张国旺(2004). 安徽药菊脱毒苗与非脱毒苗生理生化的比较研究. 中国中药杂志, 29 (6): 514~517
- 扬鹏, 郑晓军, 王玉国, 孙毅(2002). 枣树茎尖脱毒培养过程中的细胞显微结构和3种保护酶活性的变化. 植物生理学通讯, 38 (4): 341~343
- 伊廷双, 胡虹, 罗桂芬(2001). 昆明地区香石竹病毒病流行状况调查及脱病毒苗的制备. 云南植物研究, 23 (3): 345~349
- 张志良(1991). 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社: 1~2
- Foyer CH, Noctor G (2000). Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytol*, 146 (3): 359~388
- Lee YP (1966). Potato phosphorylase. *Method Enzymol*, (8): 550~554
- Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7 (9): 405~410
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*, 9 (10): 490~498