

# 热处理结合茎尖培养去除 甘薯丛枝病植原体

兰 平<sup>1</sup>, 李文凤<sup>2</sup>, 朱水芳<sup>3</sup>, 王振镒<sup>1</sup>

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100; 2 河北农业大学 植保系, 河北 保定 071001; 3 农业部 植物检疫研究所, 北京 100029)

**[摘 要]** 以甘薯丛枝病试管苗病株为材料, 用热处理结合茎尖培养法对甘薯丛枝病病株进行了去除植原体的研究。结果表明, 0.5 mm 以下茎尖培养可以去除植原体, 茎尖越小, 去除植原体的效果越好, 但成苗率降低; 0.8 mm 以上茎尖培养不能去除植原体, 但是成苗率较高。(39±1)℃ 高温连续处理 2~3 周后, 剥取茎尖培养可以提高去除植原体的效率, 对成苗率影响不大, 热处理时间越长, 去除植原体效果越好, 但被处理的试管苗易死亡。甘薯丛枝病试管苗在(39±1)℃ 高温下, 以处理 3 周为宜。

**[关键词]** 热处理; 甘薯丛枝病; 植原体; 茎尖培养

**[中图分类号]** Q945; S435.311

**[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2782(2001)03-001-04

甘薯是重要的粮食作物之一, 经济价值较高, 在我国已有 400 多年的栽培历史。甘薯丛枝病在我国东南沿海主薯区流行多年, 且发病率高, 是影响我国甘薯产量和品质的一个主要限制因子。

甘薯丛枝病典型症状是植株叶小、褪绿、矮缩和侧枝丛生<sup>[1]</sup>。甘薯丛枝病病原物是一种类菌质体(Mycoplasma-like organism, MLO)<sup>[2,3]</sup>, 现在国际上统称植原体(Phytoplasma)<sup>[4]</sup>。近来研究<sup>[5,6]</sup>表明, 植原体病害症状的发生与内源 C/A(细胞分裂素/生长素)比值失调有关。目前, 对植原体类病害尚没有特效防治药剂, 也没有特效抗病品种, 培养无毒苗仍然是提高甘薯产量和品质的重要手段之一。鲁雪华等<sup>[7]</sup>首次应用无菌茎尖培养技术, 获得了 7% 的去除植原体植株。廖俊杰等<sup>[8]</sup>发现热处理结合茎尖培养可以大大提高脱毒率。但对甘薯丛枝病试管苗进行热处理结合茎尖培养, 去除植原体病原物的研究还未见报道。本研究在这方面首次进行了初步探讨, 并对获得的试管苗进行 PCR 及 Nested-PCR 分子检测, 试图为甘薯丛枝病的防治提供新途径。

## 1 材料与方法

**材料来源与培养** 甘薯(*Ipomoea batatas* Lam) 丛枝病病株材料是由中国林业科学院提供的甘薯丛枝病试管苗, 采用单叶节段扦插于 1/2 MS 无激素

培养基中扩繁。健苗是由市场购买的健薯, 在花钵中于温室里培养。

甘薯丛枝病(MLO)分子检测 茎尖培养成的幼苗扩繁到一定规模后, 用 PCR 方法进行脱毒效果检测, 具体检测方法参见兰平等<sup>[9]</sup>的方法。

**热处理** 将带毒试管苗转接于新培养基, 开始生长后置于(39±1)℃ 光照培养箱中, 湿度保持 70%~80%, 连续处理 2~3 周后, 培养新生茎尖。

**培养基的配制和筛选** 以 MS 为基本培养基, 并附加不同质量浓度的各种激素组合(表 1), 调 pH 值为 5.8~6.0, 高压灭菌。

表 1 茎尖培养培养基

Table 1 Medium of apical culture of sweet potato

培养基代号 Medium code	培养基成分/(mg·L <sup>-1</sup> ) Components of medium
A	MS+IAA 0.6+NAA 0.2+AD(腺嘌呤)5.28
B	MS+IAA 0.6+NAA 0.2
C	MS+6-BA 0.5+NAA 0.2+AD 5.28
D	MS+6-BA 0.5+活性炭(Active carbon) 2000
E	MS+6-BA 0.5
F	1/2 MS+IAA 0.15
G	1/2 MS+IBA 0.15

**培养条件** 切取热处理后及未处理的带毒试管苗茎尖区 2~3 cm 茎端, 余下部分进行继代培养或检测, 再将茎端部分 1~2 个叶原基的茎尖(约 0.2~0.45 mm)切下, 快速转入茎尖生长培养基中, 培养 7~14 d 后, 转入 1/2 MS 无激素培养基中继续培

**[收稿日期]** 2000-11-24

**[基金项目]** 农业部农业生物技术应用研究专项基金(95 农-15-04-03)

**[作者简介]** 兰 平(1970-), 男, 安徽宁国人, 硕士, 在读博士, 主要从事高等植物体内细胞间的信息传递和物质运输研究。

养。培养室温度为28~30℃,每天光照16h,光照度为1450 lx,湿度为70%~80%。

## 2 结果与分析

### 2.1 茎尖培养基的筛选

为了最终获得脱毒苗,首先要选择利于成苗的培养基,为此设计了几种培养基配方(表1)。以MS为基本培养基,添加不同的激素配比,观察不同配方培养基对成苗率的影响(结果见表2)。从表2可见,培养基A的成苗率最高,为76.9%,离体茎尖接种3~4d后开始膨胀变绿,4~7d分化出芽。转入无激素培养基继续培养,3d即有根萌发,10d达生根

高峰,芽随后旺盛生长,接种后2~3个月便可长成具6~8片叶、6~7cm高的茎尖苗。而培养基E的成苗率最低,仅为42%,所以选择A做为进一步试验的培养基。从表2还可以初步看出,NAA利于生根而不利萌芽,AD可以部分抑制NAA的作用,提高成苗率(由培养基A,B的比较推出)。另外,茎尖培养在含6-BA的培养基上,成苗率都较低,活性炭可以部分抑制6-BA的效应,提高成苗率。当然,更好的培养基还需要进一步研究。对甘薯而言,茎尖长到一定程度转到1/2MS中一般都能生根,不需添加外源激素IAA,IBA,NAA等。

表2 不同培养基对甘薯茎尖培养的影响

Table 1 Effects of media on the apical culture of sweet potato

培养基代号 Medium code	接种数 Inoculated number	愈伤组织情况 Calluses state	成苗率/% Rate of plantlet formation
A	13	3个2~3mm愈伤组织 Three calluses with the size of 2-3 mm	76.9
B	12	6个大小不等淡黄色愈伤组织 Six light-yellow calluses with variable size	66.5
C	16	5个1cm以上淡黄色硬愈伤组织块,5个灰褐色松软小愈伤组织 Five light-yellow hard calluses with the size over 1 cm, Five small dust-colour soft calluses	56
D	22	7个大愈伤块,4个灰褐色松软小愈伤组织 Seven big calluses, four dust-colour soft calluses	58.3
E	12	6个淡黄色愈伤组织 Six light-yellow calluses	42
F	5	2个淡黄色硬愈伤组织 Two light-yellow hard calluses	60
G	6	3个乳白色松散愈伤组织 Three cream colored soft calluses	50

### 2.2 茎尖大小与成苗率和脱毒率的关系

由表3可知,切取的茎尖大小与获得无毒苗的比率呈显著负相关,当茎尖<0.3mm时,脱毒率最高为21%,当茎尖在0.8mm以上时,脱毒率为0。切取茎尖大小与成苗率呈正相关,当茎尖<0.3mm

时,成苗率仅有23%,当茎尖为0.8mm以上时,成苗率为80%~100%。从表3还可以看出,茎尖在0.3mm以下时,有6个污染和4个枯萎,且不易操作,效率低。考虑到成苗率和脱毒率,更好的脱毒方法显得尤为重要。

表3 茎尖大小与脱毒率、成苗率的关系

Table 3 Apical size and the rate of phytoplasma-free and plantlet formation

茎尖/mm Size of apical	接种数 Inoculated number	污染及枯萎 Contaminating and wilting	成苗率/% Rate of plantlet formation	检测株数 Number of detected plants	脱毒株数 Number of phytoplasma-free plant	脱毒率/% Rate of phytoplasma-free plant
<0.3	26	6个污染,4个枯萎 Six contaminating, four wilting	23	19	4	21
0.3~0.5	22	1个污染,2个枯萎 One contaminating, two wilting	36	17	2	11
0.5~0.8	13	1个污染,4个枯萎 One contaminating, four wilting	61	22	1	4.5
0.8~1.0	5	0	80	17	0	0
>1.0	8	0	100	9	0	0

### 2.3 热处理结合茎尖培养的脱毒效果

热处理21d后,剥取茎尖培养的植株,经PCR及Nested-PCR方法检测,结果(表4)表明,热处理

14d剥取茎尖培养的植株脱毒率比未处理的高,但二者相差程度不大,但继续处理1周(即热处理21d)再剥取茎尖培养的植株脱毒率则明显高于未

热处理而直接剥取茎尖培养的植株,由此可见脱毒成苗率差异不大,说明成苗率与热处理与否,热处理需要一定的热处理时间。由表4还可以看出,三者的时间的长短关系不大,而与茎尖大小有关。

表4 热处理结合茎尖培养对脱毒率与成苗率的影响

Table 4 The effect of heat treatment and apical culture on obtaining plantlets of phytoplasma-free and the plantlet formation

处理时间/d Days after treatment	接种数 Inoculated number	成苗株数 Number of plantlet formation	成苗率/% Rate of plantlet formation	检测株数 Number of detecting plant	脱毒株数 Number of phytoplasma- free plant	脱毒率/% Rate of phytoplasma- free plant
0	52	18	34.6	14	2	14.2
14	40	11	27.5	26	6	18.5
21	46	12	26.0	23	16	70.0

### 3 讨论

#### 3.1 茎尖生长培养基

由于本研究主要目的是探讨茎尖培养以及热处理结合茎尖培养对脱除甘薯丛枝病病原体的效应,而不是具体研究培养基中各种激素的作用,因此本研究中筛选的茎尖生长培养基是有限的,最好的培养基成苗率虽然达76.9%,但还不是很高。同时,由于材料限制,有的培养基接种数较少,不利于比较。另外,本研究中发现6-BA对成苗率影响很大,添加6-BA的培养基,其茎尖易形成愈伤组织,不易分化出芽。这和鲁雪华等<sup>[7]</sup>的报道一致。但也有人报道,6-BA对茎尖分生组织发芽很有效,成芽率达66.7%~86.5%,甚至达94.4%不等<sup>[10,11]</sup>,这可能是由于甘薯品种的来源、遗传特性,以及有无感病而导致其内源激素含量不一样造成的。根据何放亭等<sup>[6]</sup>报道,甘薯丛枝病发生和病株中细胞分裂素与生长素的变化有关。病株中玉米素含量异常增高,生长素含量变化不大。

另外,笔者发现腺素和活性炭在甘薯茎尖培养中有良好的作用,不仅可以提高成苗率,而且成苗时间缩短了14d左右。

#### 3.2 茎尖大小与脱毒率的关系

研究发现,纯粹茎尖培养,不经过任何处理,脱毒率是很低的,小心切割0.3mm以下茎尖时才得到21%的脱毒率,成苗率达23%,所以,工作效率很低,不适宜工厂化生产。另外,茎尖太小,不易操作,易切破圆锥体,这样茎尖易形成愈伤组织,不易形成植株。茎尖培养的另一个严重问题是茎尖太小易污染和枯萎。但是,茎尖稍大,固然有利于成苗,脱毒率却大大降低。如何解决这一矛盾是工厂化生产无毒种苗亟待解决的首要问题,也是今后的工作重点之一。

#### 3.3 热处理结合茎尖培养脱毒

热处理结合茎尖培养可以更有效的脱毒。据王

际轩报道<sup>[12]</sup>,热处理可以脱除苹果潜隐型病毒CLSV及SPV等,但很难脱去SGV等,而用茎尖培养方法易于脱除SGV。这样,采用热处理与茎尖培养相结合的方法可以相互补充,以更好发挥其脱病毒效果。热处理是一种异于常态的高温逆境,热处理时持续长时间高温可能引起处理植物组织的衰退并易使植株枯死。Nyland等<sup>[13]</sup>在热处理时采用KCN降低呼吸速率,延长处理苗寿命;Corverse等<sup>[14]</sup>在越桔热处理时,通过提高二氧化碳量到1.2mL/L,以加强光合作用,使其在38℃下不能度过30d的Cabot品种,安然度过了45d。可见,对能源物质开源节流的各方法都能保持或延长处理苗的寿命。同时,从上述文献中可以看出,这些热处理材料绝大多数是木本植物,而且是盆栽苗进行热处理。这两点无疑可以延长处理苗的寿命。因为草本植物耐热性不如木本植物,高温热处理的苗木死亡严重。因此,延长苗木寿命就成为热处理获得无毒苗的关键。30多年来,美国、英国、罗马尼亚等国多次对热处理脱毒设施与方法进行改进,使不易掌握的草莓热处理脱毒工作逐步得到开展<sup>[14,15]</sup>。廖俊杰等<sup>[8]</sup>对草莓组培苗进行热处理,研究发现其脱毒效果比盆栽苗更好。

本研究发现,试管苗热处理结合茎尖培养脱毒率可达70%,比单纯的茎尖培养获得无毒苗的效率约3.5倍。试管苗进行热处理的一个难度就是如何延长处理苗的寿命。试管苗幼嫩,根系不发达,同时,高温热处理时,培养基损失大,试管苗易因培养基枯竭而死亡。为克服此类问题,有人研究应用昼夜高低温交替循环的方式代替持续高温热处理脱毒,并取得了成功的结果<sup>[15~17]</sup>。笔者也尝试过,但脱毒效果不明显。因此,笔者坚持用持续高温进行热处理,解决培养基耗损问题,即把培养的三角瓶放在盛有水的磁盘中,并适时加水,这样,培养基的耗损大大减小,而试管苗又得到高温处理。通过此方法成功脱除了甘薯丛枝病植原体。但使用此法甘薯试管苗只能持续处理24d,(39±1)℃,如何延长热处理时

间以提高脱毒率还有待于进一步研究。

致谢:本文承蒙中国农业大学生物学院张蜀秋教授审阅,中国林业科学院田国忠研究员、罗飞硕士惠赠研究材料,特此一并致谢!

### [参考文献]

- [1] Chen T A. Proceeding of symposium on plant virus and virus-like Disease[J]. Council of Agriculture Plant Protection, 1993, (1): 29-42.
- [2] Rober P K, Lawson R H, Monroe R L, et al. Sweet potato little leaf (witches-broom) associated with a mycoplasma-like organism[J]. Phytopathology, 1972, (62): 903-909.
- [3] Darek A J, Sagar C. Witches broom chlorotic little leaf of sweet potato in Guadalcanal, Solomon Islands, Possibly caused by mycoplasma-like organisms[J]. Phytopath Z, 1978, (92): 1-11.
- [4] 裘维蕃. 关于在植物病理学及其相关学科中一些术语翻译的商榷[J]. 植物病理学报, 1997, 27(2): 104-106.
- [5] Raj B R, Ramawat K G. Micropropagation of little leaf diseased eggplants infected with mycoplasma-like organisms[J]. Journal of Horticultural Science, 1993, 68(1): 25-30.
- [6] 何放亭, 武红巾, 陈子文, 等. C/A 值与甘薯丛枝病症状发生的关系[J]. 植物病理学报, 1997, 27(1): 43-46.
- [7] 鲁雪华, 陈扬春. 通过茎尖培养获得去除类菌质体的甘薯植株及其验证技术的研究[J]. 作物学报, 1985, 11(3): 191-197.
- [8] 廖俊杰, 洪建源, 邓明琴. 草莓茎热处理脱病毒的研究[J]. 北方果树, 1991, (4): 5-9.
- [9] 兰平, 李文凤, 朱水芳, 等. 甘薯丛枝病植原体(Phytoplasma)的 PCR 检测[J]. 植物学通报, 2001, 18(2): 210-215.
- [10] 廖嘉信, 钟美丽. 甘薯无病毒苗培育及病毒鉴定[J]. 中华农业研究, 1979, 28(3): 139-144.
- [11] 陈应东, 张雄坚, 冯祖虾. 甘薯茎尖分生组织培养方法研究[J]. 中国甘薯, 1990, (4): 5-7.
- [12] 王际轩. 苹果脱病毒技术及其应用[J]. 西北园艺, 1994, (2): 32-34.
- [13] Nyland G, Goheen A C. Heat therapy of virus diseases of perennial plant[J]. Anu Rev Phytopathol, 1969, (7): 331-354.
- [14] Converse R H, George R A. Elimination of mycoplasma-like organism in cabot highbush blueberry with high-carbon dioxide thermotherapy[J]. Plant Disease, 1987, 71(1): 36-38.
- [15] Posnette A F, Cropley R. Heat treatment for the inactivation of strawberry viruses[J]. J Hort Sci, 1958, (33): 282-283.
- [16] Barlass M, Skene K G M, Woodham R C, et al. Regeneration of virus-free grapes using in vitro apical culture[J]. Annu Appl Biol, 1982, (101): 291-295.
- [17] Lozoya-Saldana H, Dawson W O. The use of constant and alternating temperature regimes and tissue culture to obtain PVS-free potato plants[J]. American Potato J, 1982, (59): 221-230.

## Obtaining sweet-potato phytoplasma-free plantlets by heat treatment and apical culture

LAN Ping<sup>1</sup>, LI Wen-feng<sup>2</sup>, ZHU Shui-fang<sup>3</sup>, WANG Zhen-yi<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science, Northwestern Agricultural and Forestry Sci-Tech University, YangLing, Shaanxi 712100;

<sup>2</sup> Department of plant protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China;

<sup>3</sup> Plant Quarantine Institute, Ministry of Agriculture, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Taking the sweet potato witches-broom plantlets (tissue culture) as the material, the study of obtaining sweet potato witches broom-free plantlets by the method of heat treatment and apical culture was carried out. The results showed that apical culture can eliminate the phytoplasma when the size of apical was less than 0.5 mm, however, when the size of apical is more than 0.8 mm, it can't eliminate the phytoplasma thoroughly. The rate of plantlet formation had close relation with the size of the excised apical. The bigger the apical was, the higher was the rate of plantlets formation. But the rate of phytoplasma-free plantlets had negative relation with the size of the excised apical. The infected sweet potato test-tube plantlets were treated with  $(39 \pm 1)^\circ\text{C}$  for 2-3 weeks, then the apicals were excised for culturing in vitro. It was efficient to increase the rate of phytoplasma-free plantlets (it reached 70%) pretreated with heat. At the same time, plantlet formation had no relation with the treatment time, it was only related to the size of excised apical. To sum up, heat treatment and apical culture method is worth while in production of Phytoplasma-free sweet potato plantlets.

**Key words:** heat treatment; sweet potato witches broom; phytoplasma; apical culture