

文章编号:1001-1498(2005)01-0001-09

枣疯病和泡桐丛枝病原植原体分离物的 组织培养保藏和嫁接传染研究

田国忠¹, 温秀军², 李永¹, 孙朝晖², 赵玉芬², 郭晓军²,
黄钦才¹, 李志清³, 赵俊芳³

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所,北京 100091; 2. 河北省林业科学院森林保护研究所,河北 石家庄 050051;
3. 河南省濮阳市林业科学研究所,河南 濮阳 457000)

摘要:分别从河北唐县赞皇大枣、辽宁凌源梨枣和河南濮阳扁核酸 3 个品种的枣疯病和来自山东、江西和北京的不同无性系的泡桐丛枝病树上采集丛枝枝条作为组织培养材料,获得的枣疯病和泡桐丛枝病组培苗皆表现典型的丛枝症状。其中感染植原体的赞皇大枣组培苗(R)和扁核酸组培苗(HPD)在未加任何激素的 MS 培养基和其它培养基交替继代培养 1 a 以上仍能维持丛枝苗生长;而发病梨枣(LD)除产生丛枝外,还出现叶片黄化和植株矮化、枯梢等衰退症状。泡桐丛枝病植原体可在不同无性系组培苗上通过各种培养基交替和单纯的 MS 培养基继代培养,并已在实验室内连续保藏达 10 a,其引致丛枝症状的能力无明显的改变。用枣树 R 染病材料作接穗,以健康冬枣(DJ)和抗病婆枣(W14)砧木进行组培苗间嫁接传病试验,可使部分 DJ 和 W14 发病;而嫁接未发病的砧木多数像健苗一样正常生长。用感染山东泡桐丛枝病植原体 ZD 株系丛枝组培苗为接穗,嫁接健康泡桐无性系组培苗致使无性系 MB33、TY2T 和 C125 发病。用植原体 16S rDNA 通用引物进行 PCR,确证了泡桐和枣树发病苗和嫁接发病组培苗体内存在植原体。用 DAPI 荧光显微镜技术比较组培苗韧皮部筛管中的植原体浓度,结果显示,R 和嫁接发病冬枣(DJ-R)筛管中植原体浓度相对较高,但仍低于各泡桐无性系染病丛枝组培苗;HPD 和 LD 浓度中等,而发病的 W14 砧木含有植原体的筛管数量较少、且浓度很低。在嫁接不成功或未发病的 DJ 和 W14 砧木组织及健康对照组织中皆检测不到植原体荧光。

关键词:枣疯病植原体;泡桐丛枝病;组织培养;嫁接传病

中图分类号:S763

文献标识码:A

Propagation and Long-Term Preservation of Several Isolates of Jujube Witches' Broom and Paulownia Witches' Broom Phytoplasmas in *in vitro* Cultured Plantlets and Grafting Transmission of the Pathogens from the Diseased to Healthy Plantlets

TIAN Guozhong¹, WEN Xiujun², LI Yong¹, SUN Zhaohui², ZHAO Yufen², GUO Xiaojun²,
HUANG Qincan¹, LI Zhiqing³, ZHAO Junfang³

(1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, CAF, Beijing 100091, China;

2. Institute of Forest Protection, Hebei Academy of Forestry, Shijiazhuang 050061, Hebei, China;

3. Puyang Institute of Forestry, Henan Province, Puyang 457000, Henan, China)

Abstract: The diseased shoots of three jujube (*Ziziphus zizyphus*) cultivars, Pbzao from Tang County, Hebei Province, Lizao from Lingyuan County, Liaoning Province and Bianhesuanzao from Puyang, Henan Province, respectively infected with different isolates

收稿日期:2003-06-23

基金项目:国家自然科学基金项目(300706221)、国家“十五”科技攻关项目(2001BA509B1202)和河北省林业厅项目(2000185),并得到中央级科研院所科技基础性工作专项(2001DEA10004)资金支持

作者简介:田国忠(1963—),男,山东莒县人,研究员,博士。

of jujube witches' broom (JWB)-phytoplasmas as well as paulownia (*Paulownia* spp.) witches' broom (PWB)-phytoplasma from Shandong, Jiangxi Provinces and Beijing were collected and cultured *in vitro* on various media. The *in vitro* cultured and infected plantlets displayed typical witches' broom symptoms, except for the hypertrophy and whiting of axillary and top buds often associated with some paulownia plantlets with PWB-phytoplasma. Plantlets with JWB-phytoplasma Pozao (jujube) isolate (Ft) and Bianhesuanzao (jujube) isolate (HPD) were subcultured on MS medium without addition of any hormone and grew well all along with witches' broom symptom for more than one year, while the Lizao (jujube) isolate (LD) showed obvious decline symptoms such as leaf yellows, dwarf and dieback besides ordinary witches' broom. PWB-phytoplasma isolates had been maintained in the laboratory in variety of paulownia tissue-cultured plantlets for over 10 years and no pathogenic mutation associated with these phytoplasma isolates was detected. When Ft scions with JWB-phytoplasmas were grafted on the healthy jujube stocks, certain percentages of stocks of Dongzao (jujube) (DJ) and Pozao (W14) cultivars became infected and appeared typical witches' broom symptoms, while there was no typical symptom on unsuccessful-grafting stocks. The ZD scion with PWB-phytoplasma C85-028D isolate was also used to graft-transmit the phytoplasma into three paulownia clones, C125, TY2T and MB33, consequently causing typical witches' broom symptoms. The existence of both JWB- and PWB-phytoplasmas in diseased plantlets and graft-transmitted stocks was certified by polymerase chain reaction (PCR) using phytoplasmal 16SrDNA universe primer pairs, R16mF2/ R2. The relative concentrations of both phytoplasmas in the phloems of JWB and PWB plantlets were also evaluated by DAPI staining fluorescence microscopy. The results showed that Ft and graft-infected DJ had relative more strong JWB-phytoplasma fluorescence emitted from the phloem than that of HPD and LD, but still rather lower than that of paulownia plantlets infected with PWB-phytoplasma; whereas less phytoplasmas and less number of phloem with JWB-phytoplasmas were detected in W14 stock already with witches' broom symptom which coincided with its relatively high resistance to JWB-phytoplasma. There were no phytoplasma fluorescence observed in the healthy plantlet as well as the stock grafted unsuccessfully.

Key words jujube witches' broom (JWB)-phytoplasma; paulownia witches' broom (PWB)-phytoplasma; *in vitro* culture; grafting transmission

由于枣疯病和泡桐丛枝病植原体都不能离体人工培养,给这类病害研究带来了许多困难。比如毒源的采集和保藏、病菌的纯化、病理学研究、抗病性鉴定等即受到季节、采样地点、环境条件等的限制。本实验室曾通过组织培养方法成功地用泡桐组织培养苗繁殖和保藏了几个泡桐 (*Paulownia* spp.) 丛枝病植原体株系,并以此为基础开展了一系列基础和应用研究^[1~4]。在枣树 (*Ziziphus zizyphus* (L.) Meikle) 的组培和脱毒研究方面也有一些研究报道^[5~9]。但对枣树组培苗体内的植原体的浓度变化则缺乏研究;而且,在相同培养条件下,对枣树与泡桐染病组培苗症状的变化、病菌浓度差异比较、枣树病与健株组培苗间的嫁接试验研究及长期保藏方法等方面,皆未见相关研究报道。

本研究收集了我国不同地区的染病泡桐和枣树材料,通过组织培养方法获得了不同植原体株系,并进一步采用微芽嫁接方式将病原物传染至多个无性系(品种)健康组培苗上,并探讨了染病枣树和泡桐之间在症状、病原物繁殖等方面的异同,为植原体病害研究,特别是病菌遗传多样性和致病性变异分析、抗病性鉴定和治疗药剂筛选等研究奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

携带泡桐丛枝病植原体的发病泡桐材料的组织培养始于1990年8月份^[1]。毒源分别来自于山东兖州(C443D、C85-028D、C83-44D、C85-034D、Q4D)、北京(ODR)、江西分宜(FYD)^[3]。所获得的染病组培苗一直通过茎段继代培养在实验室内长期保存。所用的健康组培苗材料,多数为经过了温度处理和茎尖培养获得的脱毒苗,包括从上述染病苗经脱毒获得的无性系C85-028(简称T85-028),直接取自田间的外植体后经脱毒处理无性系为C125(兰考泡桐 *P. elongate* S. Y. Hu)、TY2T(覃优2号)和MB33(毛白33)。

感染枣疯病植原体、并表现典型丛枝症状的枣树病枝鲜材料分别采自不同地区的不同品种上。2001年6月份采自河北唐县的毒源,引起婆枣丛枝症状,编号为Ft。2002年7月份采自辽宁凌源四官营子镇的毒源,在梨枣品种表现典型丛枝症状,编号为LD;2002年9月份采自河南濮阳市郊的毒源,引起当地扁核酸品种发病,编号为HPD;健康枣树品种组培苗包括抗病材料W14,冬枣DJ由河南泌阳市农

科所提供。

1.2 植原体-植物共生体组织培养及长期保藏方法

从田间采集的病枝(去掉叶片),截成 2~3 cm 具节茎段,然后用自来水冲洗 1~2 h,用 70%酒精处理 1 min,然后放在 0.1%升汞溶液中消毒 15~20 min,用灭菌水洗涤后,接种于固体培养基上,并于 25 ℃光照培养箱中培养。15 d 至 1 个月间隔转接至新培养基上。获得的无菌存活外植体侧芽萌条生长至 2 cm 以上后,截取新抽出的具芽抽条转入新的培养基中继代培养。并在 1~2 个月间隔内继代培养 1 次。

用于培养枣树和泡桐病与健康组培苗的培养基主要包括:普通 MS、A (MS + 6-BA 2.4 mg L⁻¹ + NAA 0.2 mg L⁻¹)、B (MS + BA 0.1 mg L⁻¹ + NAA 0.1 mg L⁻¹)、ZF (MS + 6-BA 2.0 mg L⁻¹ + BA 0.5 mg L⁻¹ + 蔗糖 30 g L⁻¹)、JA (MS + 6-BA 5.0 mg L⁻¹ + BA 0.1 mg L⁻¹ + NAA 0.1 mg L⁻¹ + KT 2.5 mg L⁻¹)、Hy (1/2 MS + BA 0.02 mg L⁻¹ + NAA 0.02 mg L⁻¹)、Ly (MS + 6-BA 0.2 mg L⁻¹ + NAA 0.01 mg L⁻¹) 等。

在培养方式上,采用棉塞、耐高温的塑料膜、用石蜡将含有染病组培苗的三角瓶完全封口等方式,然后在正常的光照培养条件下培养。

用含 MS 培养基的试管斜面插入组培苗枝条,然后放入 5~8 ℃的冰箱内暗保藏,并于 30 d 间隔从冰箱中取出,于正常组培条件下光照培养 1~2 d,然后放回冰箱内继续低温保藏。

1.3 微芽嫁接传病试验

将染病接穗基部用灭菌的解剖刀削成楔状,在砧木主茎中部叶柄与主茎交接的主茎偏上部位向下斜切一口,然后将适宜粗细和大小、感染植原体的接穗插在切口上(接口不需绑缚),将接种体小心移入含有新制备的培养基的广口培养瓶中,于正常光照条件下培养。所有嫁接操作皆在超净工作台上完成,嫁接所用工具都要经过高温灭菌处理^[3]。

1.4 DAPI 荧光显微镜观察

分别取田间发病的病枝、组培苗及嫁接传病苗茎段进行徒手横切和纵切片。5%戊二醛固定切片,DAPI(4',6-二脒基的-2-苯基吡啶盐酸)染色,后用 Olympus 落射荧光显微镜检查韧皮部植原体特异性荧光,紫外线激发滤光片波长为 365 nm,阻断滤光片波长为 420 nm^[11]。

1.5 直接和巢式 PCR

取待测枣树或泡桐组培苗新鲜组织约 0.3 g,抽提植物总 DNA,以植原体 16S rRNA 基因保守序列设

计引物对 R16mF2/R2 和 R16F2/R2,进行直接多聚酶链式反应(PCR)和巢式 PCR(nested-PCR),扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳,然后于紫外灯下检查 1.5 kb 或 1.2 kb 的特异扩增片段的有无^[3]。

2 结果与分析

2.1 染病枣树和泡桐外植体在组培条件下的症状表达和病菌浓度比较

2.1.1 感染植原体枣树和泡桐组培苗症状的异同

在培养过程中,经表面消毒的染病枣树外植体在枝条分支部位开始有新的隐芽萌生。将萌芽分别于不同的培养基上继代培养,结果发现,组培苗生长、分化及丛枝症状表达受培养时间、培养基内激素的影响较大。在未加激素的 MS 培养基上,Fr 丛枝症状典型,枝条细弱,腋芽伸长明显,基部无明显的愈伤化,个别组培苗还出现根芽分化现象。当将外植体转接到新的 MS 培养基后,病菌的早期生长较快,叶片淡绿至深绿,1 个月之后生长减慢,部分中下部叶片开始黄化,若一直在此培养基上连续培养 2~3 个月后,多数苗会出现部分或全部叶片枯死或脱落现象,直至整株死亡。这种现象的出现似乎多数与培养基的水分和养分供应短缺无直接联系。在 ZF 培养基上,Fr 除表现为枝条丛生、叶片变小、黄化或褪绿,严重时出现顶梢枯死外,还在基部形成松散的愈伤组织;在 A 培养基上,其茎基部产生较大松软的白色愈伤组织,主茎丛簇生长,节间缩短;在 B 培养基上,Fr 生长较旺,叶色绿,腋芽伸长明显,并有较多短粗根分化;在 HY 培养上,Fr 植株生长明显衰退,枯梢或叶尖枯,整株叶片黄化、矮缩(见图 1)。

在 MS 培养基上,HPD 也表现出典型的丛枝症状,但病株叶片较 Fr 大,叶色淡绿,植株矮化程度较低;随着培养时间加长,也出现部分苗叶片黄化,甚至枯死现象;当将其从 MS 培养基转入 A 培养基后,基部分化出较大愈伤组织块,地上部茎叶绿色,丛枝症状明显。

LD 外植体在 A 培养基上初期分化出较多的丛生芽,丛生芽叶片较小,叶色淡绿,将其转接于 MS 培养基上培养后,表现出典型的丛枝症状,节间较短、叶片变小、黄化和或退化、次级腋芽萌生、植株生长缓慢,后期则出现明显梢枯和生长衰退症状。将其移入 A、JA、ZF 等培养基中皆未能逆转病菌衰退的趋势。

健康的枣树品种冬枣(DJ)、W14 和梨枣(WL1)

在相应的培养基上的形态与染病组培苗有明显差异,表现为主茎明显比病苗粗1~3倍。在MS培养基上,健康组培苗叶片大,叶面积为病苗的2~5倍,无明显的腋芽萌生、节间较长,个别苗有根系分化;后期多数苗有中长根生长。

与枣疯病组织培养特性相比,各无性系泡桐丛枝病组织培养苗在MS培养基上皆表现典型的丛枝症状,而且在继代培养后期(约30 d后)一些无性系会出现特有的腋芽和顶芽膨大和白化症状。这类症状在受试的枣树品种上一一直未观察到。而且,染病泡桐各无性系组培苗茎段在移入新的培养基后,能维持丛枝苗较长时间的连续生长或存活。在培养基水分供应正常和有足够的生长空间的条件下,可维持生长达半年以上,很少出现枣疯病苗培养过程中常出现的严重衰退或全株死亡现象。泡桐丛枝病组培苗与枣疯病组培苗在培养过程中存活能力变化的差异原因尚不清楚。但结合田间发病枣树死亡率明显高于泡桐发病树的事实分析,两种病菌与其相应的寄主之间的互作关系可能存在着很大的差异。

2.1.2 染病组培苗体内植原体的检测 用DAPI对不同染病枣树和泡桐组培苗幼茎切片染色,然后在落射荧光显微镜下检查植原体特异荧光的分布和强度。结果显示,在MS培养基上,枣树组培苗Rt的韧皮部筛管中植原体浓度中至强,HPD次之。但Rt在A、Hy、Ly和ZF培养基上生长时,似乎茎部组织的植原体浓度低于在MS培养基的浓度。对枣树病苗基部分化的愈伤组织的切片观察结果显示,仍存在不规则的微管束的愈伤组织的木质部外围筛管部位仍易于检测到植原体荧光。而且在已变褐或未分化的、松散的黄褐色愈伤组织薄壁细胞内也观察不到细胞核荧光,说明这些组织细胞已经瓦解。相比之下,在泡桐丛枝病组培苗组织中,几乎所有具微管束组织的横切片和纵切片筛管中都被大量植原体特异性荧光充满。可见,泡桐染病苗在各类组培条件下良好的生长特性和有利于植原体生长和繁殖的特点,成为植原体繁殖和纯化理想的实验材料(参见图2)^[12]。各无性系(品种)染病苗体内的植原体都易于用植原体的通用引物对R16mF2/R2经直接PCR扩增出1.5 kb的特异片段,而不必经过nested-PCR过程。这也进一步肯定了发病苗体内植原体的存在。

2.2 病与健康组培苗间的嫁接传病

2.2.1 2个枣树品种嫁接传病结果 枣树嫁接传病实验是以普通冬枣(DJ)和抗病婆枣无性系W14健康

组培苗为砧木,以Rt组培苗为接穗进行嫁接的。嫁接后,多数嫁接组合的接口愈合良好,并在接口处产生少量淡绿色的愈伤组织。少数嫁接体的接穗在接口处变褐枯死。也有部分嫁接接穗在嫁接后从接口上脱落(表1)。由于嫁接实验是在两地由不同人员操作完成的,两品种间嫁接成功率的差异可能与嫁接技术有关,而非品种特性所致。在嫁接成功的组合中(以接穗能正常存活30 d以上为准),砧木的反应和生长可归为3种不同类型:(1)砧木能在MS或其它培养基上产生典型丛枝症状;(2)砧木生长衰退,节间缩短,叶片黄化或部分枝叶枯死,在部分嫁接组合中也出现了接口处组织变褐和坏死现象;(3)砧木生长与未嫁接植株无明显的差异,叶片大、节间长,无明显腋芽分化,主茎较粗。DJ和W14砧木皆可通过嫁接发病,并表现出类似Rt接穗的典型丛枝症状,但这两个无性系的症状也有明显差异(见图1),其中,感病冬枣叶片较大,茎较粗,而发病W14苗叶片很小、主茎纤细。嫁接接种后同一品种出现上述三种不同反应可能与不同生理或抗性状态的枣树组培苗个体间对嫁接接种反应的不同有关。也可能有时虽然接穗被成功地固定于砧木上,但接穗和砧木的韧皮部未能直接连通,接穗仅能通过砧木木质部从培养基中吸收水分维持接穗的存活,而未能传病。

DAPI植原体检测结果显示,嫁接发病冬枣在筛管内发出中等强度的植原体荧光,存在植原体的筛管比例也很高,甚至出现高于Rt的情况。而发病后的W14在多数筛管内植原体的特异荧光强度都较低,且存在较多未有明显植原体荧光的筛管分子和许多未有明显植原体存在的切片。用Rt接穗嫁接W14的某些组合中,也出现了虽然病接穗已枯死而W14砧木照样发病,发病砧木中也检测到了植原体存在的现象。但在嫁接后未发病的DJ和W14则检测不到植原体荧光。直接PCR和nested-PCR也进一步证明了发病嫁接苗体内植原体的存在。虽然W14发病苗体内植原体的浓度比DJ发病苗低,但仍能像DJ一样用直接PCR即可扩增出植原体的特异DNA带,说明体内的植原体已达到一定的浓度。

当部分嫁接组合的接穗在嫁接后不久从接口脱落后,这些组合的砧木都未表现病症。这暗示病与健康苗短时间的伤口接触引起病菌从接穗侵入砧木的可能性较小。只有待接穗和砧木的韧皮部筛管相通后病菌才可能顺利侵染健康砧木组织。而且也发现,从接口脱落至MS培养基上的病接穗与仍在砧

木上的病接穗相比,掉到培养基上病接穗的叶色较好、嫁接成功的病接穗多数叶色较淡、生长减慢、出现枯梢或枯叶等衰退现象。

表 1 枣树嫁接传病试验结果

嫁接组合 (砧木-接穗)	株数	成活 株数	未接 活株数	丛枝症状 株数	衰退 株数	发病率/ %	备注
W14-R	104	104	0	60	0	57.7	嫁接组合体在 ZF 培养基上生长,后取发病砧木转入 MS 培养基培养
	23	18	6	17	0	73.9	
DJ-R	9	4	5	2	1	22.2	嫁接组合体在 JA 培养基上生长,后取发病砧木转入 MS 培养基培养

注:W14-R 组合嫁接在河北省林科院完成,第一栏为在河北省林科院组培室内调查结果,调查时间为 2002 年 10 月,第二栏为 2002 年 9 月份从河北省林科院移入中国林科院森环所组培室的嫁接苗,并转接培养基 1 次后于 2003 年 2 月份的调查结果。

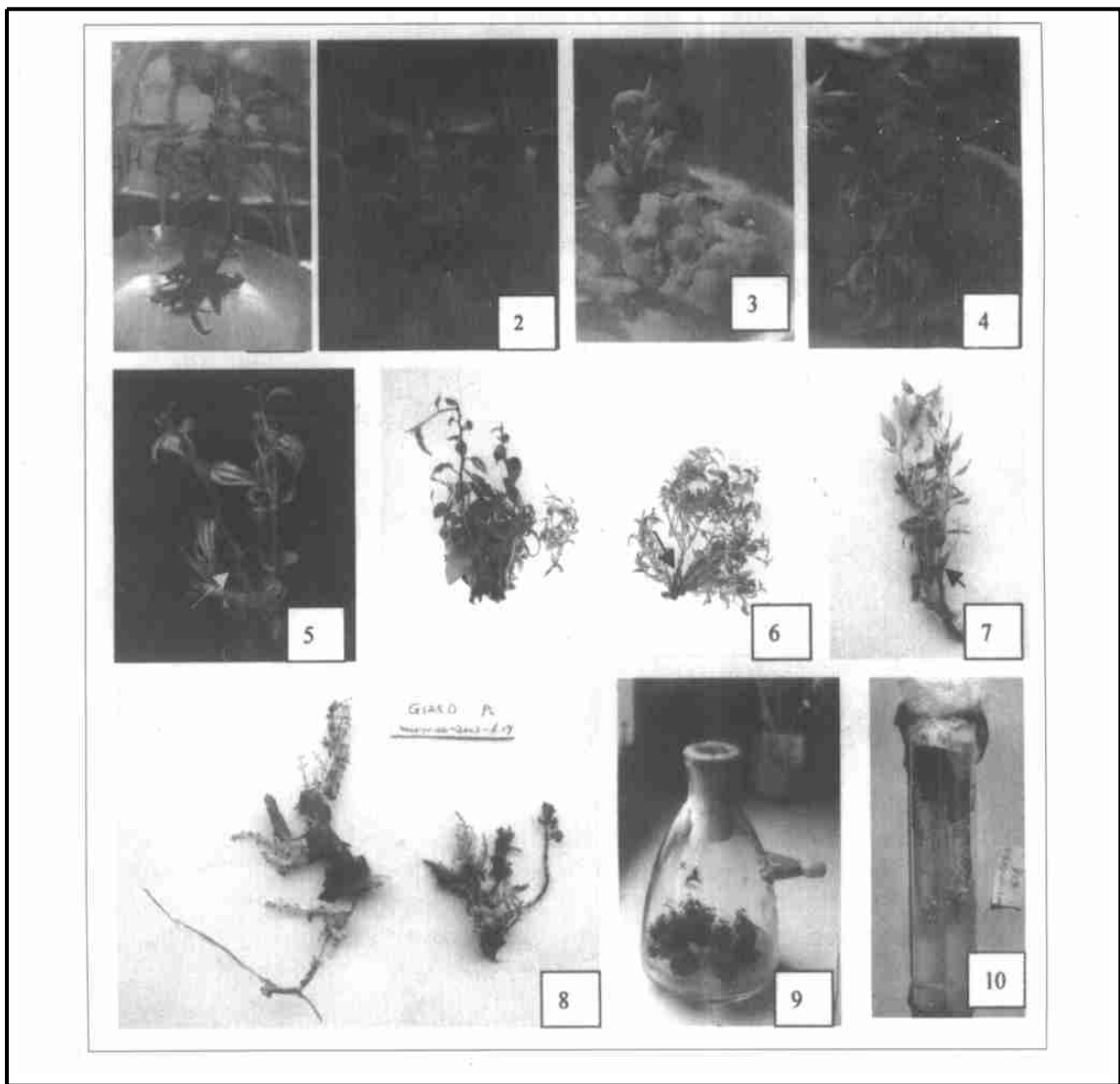


图 1 泡桐和枣树染病组培苗症状、嫁接传病实验和长期保藏实验结果

1~4:感染枣疯病外植体的组织培养,1. 河南濮阳扁核酸丛枝组培苗,2. 辽宁凌源市梨枣丛枝组培苗,3,4. 河北唐县婆枣品种丛枝组培苗,其中 3 为在 A 培养基中,1,2 和 4 为 MS 培养基;5~7:枣树嫁接传病实验,5,6. 用 R 病组培苗为接穗,以 W14 健苗为砧木,5 为嫁接 43 d 结果,6 为嫁接 174 d 结果,左示嫁接不成功的砧木和接穗(切口处组织褐化),右示嫁接成功组合,接穗和砧木皆表现为丛枝症状;7. DJ-R 嫁接成功苗,箭头示嫁接接口;8. Cl25 嫁接发病苗在 MS 培养基上持续培养 233 d,丛枝症状典型;9. 泡桐 TY21D 病苗茎段在 MS 和石蜡密封的容器中培养实验;10. 枣树染病组培苗茎段低温保藏实验,示保藏 84 d 时茎段维持绿色,未有明显生长。

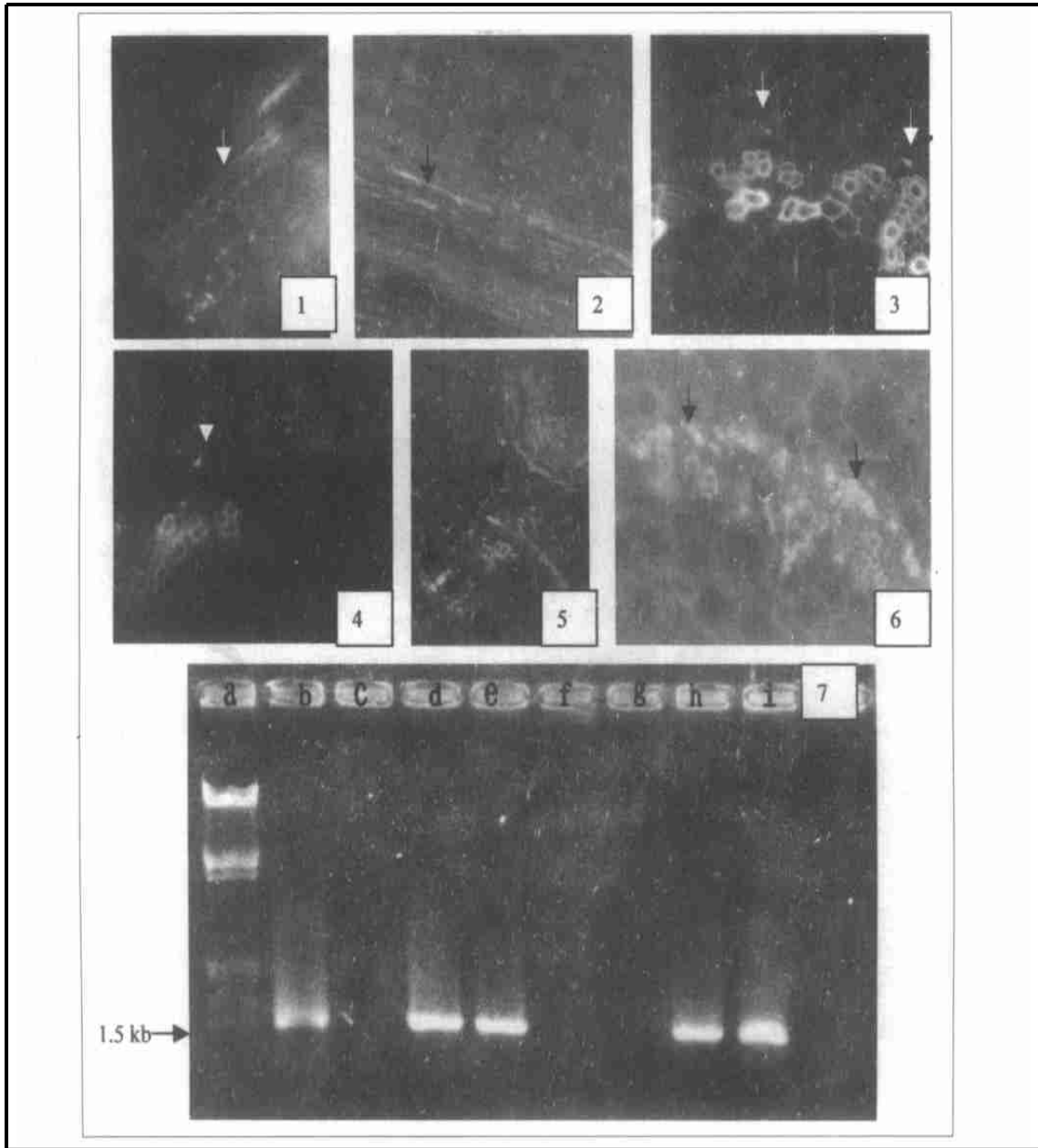


图 2 染病组培苗和嫁接发病苗的病原检测结果

1~6:DAPI 荧光显微镜检查枣树和泡桐染病组培苗幼茎切片中植原体荧光。1. 嫁接发病冬枣 D1 幼茎纵切片,示筛管中量植原体荧光,2. HPD 幼茎纵切,3. W14 嫁接发病苗横切片,示植原体荧光低至无,4.LD 幼茎横切片,5. FT 在 A 培养基上在基部形成愈伤组织中的不规则的韧皮部区域有强植原体荧光;6. 嫁接发病的 TY2TD 泡桐丛枝组培苗幼茎横切片,示大量的被植原体充满的筛管分子。箭头指向为韧皮部植原体荧光位置。7:PCR 检测组培苗体内植原体的存在,a-DNA marker,b-Ft,c-W14 健康组培苗,d-LD,e-HPD,f-TY2T,g-MB33 健康组培苗,h-ZD,i-GY2TD,j-清水对照。

2.2.2 3 个泡桐无性系嫁接传病结果 本实验用泡桐染病组培苗为接穗,成功地使 3 个新的泡桐无性系 MB33、C125 和 TY2T 组培苗嫁接传染泡桐丛枝病植原体,发病后的 3 个无性系在普通的 MS 培养基上皆表现典型丛枝症状。但从症状严重程度看,以 TY2T 丛枝症状最重,C125 症状相对较轻。用 C125 重症苗茎段继代培养过程中,同一瓶中常出现类似

过去 C443D 和 C85-034D 等的重症苗、轻症苗或无症苗共存的情况^[13]。重症苗叶片和叶柄退化,腋芽和顶芽膨大白化、无根;轻症苗腋芽伸长,叶片变小,节间变短,无根或有细短根分化;无症苗生长近健康苗,无明显腋芽分化(图 1-8)。在以前的研究中,曾开展过几种泡桐无性系嫁接接种实验研究,但 C125 无性系在多次嫁接实验中一直都未发病^[31],本次实

验最终使 C125 嫁接发病。分析成功的原因可能与本次嫁接时砧木的生理状态更有利于病菌的侵染和定殖有关,并暗示了植株抗性的丧失或抗性诱导表达能力的变化等因素可能在发挥作用。

2.3 植原体的长期保藏方法及效果

2.3.1 植原体株系的组织培养保藏效果 对本实验室通过泡桐和枣树无性系(品系或品种)组织培养方式保存的植原体株系的统计结果可以看出(表 2),用组织培养病原物与寄主共生体的方法是长期保存植原体株系(分离物)的一种有效方法。在本实验室内通过定期(1~3 个月)的茎段继代培养,保存时间最长的、来自山东兖州的泡桐丛枝病植原体一株系 C85-028D 已达 10 a 之久。虽然最初保存此分离物的泡桐无性系(C85-028)已因污染而丢失,但此病原物已通过嫁接传染至中林 3 号无性系(*Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl. × *P. tomentosa* (Thunb.) Steud.) (ZH) 上(编号为 ZD),并进一步通过嫁接传染至多个泡桐无性系组培苗上,包括本次嫁接传病到了 TY2T、MB33 和 C125 三个无性系上,所引致的丛枝症状典型,也未发现病菌在致病性方面的显著遗传变异。多年来利用此材料开展的大量实验结果说明,此技术是保藏植原体活体的理想方式之一。在

本实验室内,枣树染病苗的组培时间也已达 2 a 多。但枣树染病苗生活力随着在单一培养基上持续培养时间增长而出现明显的衰退现象,所以,定期的继代培养是保存枣树与植原体共生体的关键。在相对感病品种上,像婆枣、冬枣等组培苗体内植原体可维持在一个中等浓度水平,能够用作接穗嫁接传染健康的组培苗。Dai 等(1999)的研究发现,在对感染桑树萎缩病植原体(16SrFB, 16SrFB(*npB*))的桑树(*Morus alba* L.)组培苗继代培养过程中,出现许多桑树苗体内的植原体消失而使组织自动脱毒的现象。但这种情况在多数枣树和泡桐与之相应的植原体株系共生体培养过程中较少出现^[12]。

2.3.2 不同组织培养方法和低温保藏方式的比较

用上述常规方式定期继代培养共生体的方法长期保存植原体毒源的不足之处是仍比较费时、费工。在操作过程中,常会因培养基污染或其它管理失误而导致菌种被毁坏,比如来自江西分宜的 FYD 株系、保存在几个泡桐无性系上的多个山东分离株系皆因各种原因而未能保存至今(见表 2)。所以在现有保藏技术的基础上,建立更有效、规范、安全和简便的植原体株系组织培养保藏程序和技术是提高植原体保藏质量的重要任务。

表 2 通过泡桐和枣树无性系(品系或品种)组织培养保存的植原体株系

植原体	植原体-寄主组合		获得发病组 获得染病组	获得染病组 育苗方式	病组组培在 MS 培养基上症状	幼茎筛管 病菌浓度	保藏持续 时间	
	组合编号	寄主品种 (无性系)						病原物来源
泡桐丛枝病植原体	C443D	台湾泡桐 × 海岛泡桐	山东兖州	1990	田间病枝直接组培	WB, THW	强	至 1994
	C83-44D	德州毛泡桐	同上	1991	同上	WB, THW	强	至 1994
	C85-034D	楸叶泡桐	同上	1991	同上	WB, THW	强	至 1994
	Q4D	楸叶泡桐	同上	1991	同上	WB, THW	中	至 1994
	FYD	白花泡桐	江西分宜	1993	同上	WB	中	至 1996
	QDR	种源未知	北京	1991	同上	WB, THW	中	至 1996
	C85-028D	C85-028(毛泡桐)	山东兖州	1991	同上	WB, THW	强	至 2000
	C020D	C020(白花泡桐)	C85-028D	1999	嫁接传病	WB, THW	强	至 2000
	CAD	XuH(菅县毛泡桐)	同上	1995	同上	WB, THW	强	至 2000
	ZD	ZH(中林 3 号)	同上	1995	同上	WB, THW	中	至今
	C125D	C125(兰考泡桐)	同上	2001	同上	WB, THW	中至强	至今
	TY2TD	TY2T(覃优 2 号)	同上	2001	同上	WB, THW	中	至今
	MB33D	MB33T(毛白 33)	同上	2001	同上	WB, THW	强	至今
枣疯病植原体	HPD	扁核酸枣	河南濮阳	2002	田间病枝直接组培	WB	低至中	至今
	LD	梨枣	辽宁凌源	2002	同上	WB	低至中	至今
	R	赞黄大枣	河北唐县	2001	同上	WB	中	至今
		W14(抗病婆枣)	Rt	2002	嫁接发病	WB	低或无	至今
		DI(冬枣)	同上	2002	嫁接发病	WB	中	至今

注: 台湾泡桐 *Paulownia kawakamii* Ito, 毛泡桐 *P. tomentosa* (Thunb.) Steud., 楸叶泡桐 *P. catalpifolia* Gong Tong, 白花泡桐 *P. fortunei* (Seem.) Hemsl., 中林 3 号 *Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl. × *P. tomentosa* (Thunb.) Steud., 兰考泡桐 *P. elongata* S. Y Hu, 枣 *Ziziphus zizyphus* (L.) Meikle; WB 为丛枝症状, THW 为腋芽和顶芽膨大和白化; 为 DAPI 荧光显微镜检查结果, “强”表示韧皮部大部分筛管被植原体荧光充满, “中”表示约有半数以上筛管内检测到中量的植原体荧光, 荧光在筛管内分布不均匀或强度中等, “低”; 截至 2003 年 5 月底。

在泡桐染病组培苗培养过程中,当三角瓶的塞子由棉塞(外包牛皮纸)改为耐高温的聚苯乙烯塑料膜封口后,继代培养频次明显降低了,由原来的1~2个月转接一次,可减少到2~4个月转接1次。塑料封口瓶与棉塞和带透气滤膜的培养瓶相比大大降低了培养基的水分蒸发速度,避免了因培养基的水分短缺造成的组培苗生长衰退。而且也发现,泡桐丛枝病组培苗在相对密闭的塑料膜封口处理情况下,培养早期的丛枝症状比透气条件好的棉塞培养瓶内的病菌症状轻。这在一定程度上延长了染病组培苗的培养时间。

当将泡桐苗 TY21D 组培苗茎段放入含充足的 MS 培养基的大三角瓶内,然后用石蜡将瓶口完全封闭,在断绝与大气的气体交换的密闭三角瓶中光照培养情况下,早期(60 d 内)病菌根系分化比与外界有正常气体交换的培养瓶中病菌的根分化时间略有提早,根分化数目也相对较多,并有叶片增大趋势。但培养后期(至 120 d 后)这种差异逐渐减小,且完全封闭组培丛枝苗首先出现了从根和茎基部向主茎的变褐和坏死现象。至 180 d,各处理瓶皆出现从茎基部向梢部扩展的变褐坏死现象,但此时梢部仍存活,且丛枝症状明显。取存活梢部丛枝茎段移入新的 MS 培养基上,其丛枝症状典型。DAPI 荧光显微镜检查丛枝组织韧皮部筛管内的病原浓度仍很高。

将感病组培苗 R、LD 和泡桐 ZD 组培苗茎段插入试管内的 MS 培养基斜面上,然后将此含染病组培苗活体的试管置于低温下(8℃左右)保藏(1~2 月取出 2~3 次于光照条件下培养 1~2 d 后重新放回冰箱冷藏)。结果显示,保藏 84 d 后的茎段仍维持组织存活,在新的 MS 培养基中皆能重新生长,且 DAPI 染色切片证明病菌的繁殖。但当冰箱温度降 4~6℃时,导致大部分泡桐无性系染病组培苗枯梢或全株死亡。而枣树染病苗 R、HPD 和 LD 在此温度保藏 60 d 以上仍未被冻死。说明枣树组培苗比泡桐对低温的耐受能力强。通过适当降低组培苗和植原体的生长和代谢活动可以延长保藏时间、大大减少转代次数。此进一步的保藏条件和长期保藏效果实验仍在进行中。

3 讨论

迄今,植原体毒源的繁殖和保藏只能在活体寄主植物上。由于枣树和泡桐皆为落叶树种,在树木长达 5 个月的休眠期(华北为 11 月至次年 3 月)和

~3 个月的低浓度期(4~6 月)间获取毒源带来很大困难。即使是在生长和发病期间,也受树龄、品种抗性、生长期和环境的影响,其体内的病菌浓度出现波动。这些都给枣疯病和泡桐丛枝病研究带来很多不便。采用组织培养苗在室内活体保存和繁殖植原体已被证明是这类病菌大量繁殖植原体和长期保存毒源的良好方式之一,为进一步开展相关的研究带来了极大的便利^[2~4,13,14]。国外对苹果树簇叶病植原体(16Srx-A)和杨树丛枝病植原体[16SrFB, 16SrFB(ip-B)]等的组织保存试验也证明了这一结论^[15~18]。现在所获得的不同地区、不同枣树品种上的 3 个植原体株系同泡桐丛枝病组培苗一样将成为植原体分类鉴定、遗传变异研究、植原体治疗药剂的筛选和抗病品种的选育研究的重要材料。在长期保藏植原体-寄主植物共生体方面,初步肯定了适宜的低温条件可以做到象其它可培养微生物纯培养那样方便。这不仅可以减少常规组织培养保藏的工作量,减少病菌的变异,而且,可以有效地扩大保藏植原体的种类和株系,使进一步开展相关研究成为可能。能否采用保藏植物种质的超低温技术,比如液氮,保藏植原体与寄主植物共生体也是值得研究的课题。

根据本实验的结果尚无法确定这 3 个植原体株系在遗传背景和致病性上的差异。虽然 3 个植原体组培体系在相同培养基上表现出了生长和症状的差异,但不清楚这种差异是由病菌还是寄主的遗传背景造成的。进一步探讨通过嫁接传病方式将泡桐丛枝病菌或枣疯病原不同分离物转接至 1 种或几种更适宜于组织培养、植原体繁殖和保藏的标准品种上,将有助于确定植原体株系间的基因或致病性差异。

从组培苗嫁接传病试验结果,及生产上大量应用的枣树品种间及酸枣(*Ziziphus zizyphus* (L.) Meikle var. *spinosa* (Bunge) Y.L. Chen)和枣树品种间的嫁接繁殖实践来看,泡桐不同种、无性系之间,枣树不同品种之间皆具有良好的嫁接亲和性。因而可以采用所获得的染病枣树和泡桐组培苗为毒源,对待鉴定泡桐或枣树种质材料的抗性鉴定工作将变得更加方便和可靠^[3]。现已开始对自然或田间嫁接接种鉴定选择的抗性泡桐和枣树品系进行收集和组织培养工作。将此嫁接技术用于对基因转化泡桐组培苗材料的鉴定也已取得了初步的结果^[19~21]。

泡桐丛枝病和枣疯病的药剂治疗主要依赖四环

素簇药剂的树干注射方式,治疗后的复发和药害问题是制约这类药剂推广应用的主要限制因素。筛选高效、低毒的新型治疗药剂是这类病害防治上的重要研究方向之一。现已建立起了泡桐丛枝病组培苗体系,可用于多种植原体病害治疗剂的间接筛选研究^[4]。所以,用枣树染病组培苗开展治疗枣疯病药剂筛选对于找到针对于枣疯病防治的新型药剂可能更有潜力。

关于不同来源枣疯病植原体、泡桐丛枝病植原体之间,枣疯病植原体和泡桐丛枝病植原体之间生物学和遗传关系是值得探讨的问题。比如两种植原体的归类、致病性变异、相互传播等问题都尚待明确。现已通过 16S rRNA 基因分析比较,将这两种病菌划归不同的植原体组,其中枣疯病为榆树黄化组 [16S rRNA-B, 16S rRNA-B (*nrC*)] ,泡桐丛枝病为翠菊黄化组 (16S rRNA-D) ;并有研究根据分子生物学手段鉴别这两种病菌,推断在田间存在泡桐丛枝病和枣疯病菌可能的混合感染现象^[22~24]。也有研究报道,传播枣疯病植原体的中华拟菱纹叶蝉 (*Hishimononides chinensis* Anufriev) 能够传播泡桐丛枝病^[25]。所以本实验室也开展了用泡桐和枣树病与健康组培苗间相互嫁接传病试验,以期明确两种病菌的致病专化性,这对于进一步明确二者的相互关系具有重要的理论和实践意义。而且,在我国不同地区的枣疯病或泡桐丛枝病植原体中是否存在遗传多态性,特别是在致病性上的变异问题,可以通过收集、组培不同地区、不同症状类型的枣树或泡桐染病组培苗,然后通过嫁接传染至 1~2 种标准的鉴别品种上,来了解不同分离物的致病性主要分化和变异状况。

参考文献:

- [1] 袁巧平,田国忠,黄钦才.泡桐丛枝病原 MLO 在寄主离体培养组织中的保存与繁殖[J].植物病理学报,1994,24(2):115~120
- [2] 张锡津,田国忠,黄钦才.温度处理和茎尖培养结合脱除泡桐丛枝病类菌原体(MLO)[J].林业科学,1994,30(1):34~38
- [3] 田国忠,张锡津,罗飞,等.抗病和感病泡桐无性系组培苗对嫁接传染植原体的不同反应[J].林业科学,1999,35:31~39
- [4] 田国忠.用染病组织培养苗测定治疗植原体病害药剂的试验[A].见:周明国.中国植物病害化学防治研究(第三卷)[M].北京:中国农业科技出版社,2002:305~310
- [5] 孙清荣,孙洪雁,郑红军,等.酸枣叶片不定植株的诱导[J].果树科学,2000,17(1):48~51
- [6] 程佑发,安黎哲,浦铜良,等.枣愈伤组织诱导和再生植株[J].西北植物学报,2000,20(3):364~369
- [7] 严仁玲,刘贵仁,张磊,等.外源植物激素对枣树试管苗快速繁殖的影响[J].果树科学,1990,7(4):231~233
- [8] 罗晓芳,田砚亭,李云,等.金丝小枣组织培养快速繁殖的研究[J].北京林业大学学报,1996,18(2):9~15
- [9] 田砚亭,王红艳,牛辰,等.枣树脱除类菌原体(MLO)技术的研究[J].北京林业大学学报,1993,15:20~26
- [10] 朱文勇,杜学梅,郭黄萍,等.骏枣茎尖培养脱除枣疯病 MLO[J].园艺学报,1996,23(2):197~198
- [11] 金开璇,田国忠,汪跃.组织化学技术快速检测泡桐丛枝病研究[J].植物病理学报,1989,19(3):185~188
- [12] 田国忠,张锡津,朱水芳,等.间接免疫荧光显微术检测泡桐丛枝病原 MLO 的研究[J].林业科学研究,1996,9(1):1~6
- [13] Tian Guozhong, Huang Qircai, Yuan Qiaoping, et al. Correlation of metabolic changes of infected paulownia tissue culture with PWB-MLO pathogenic mechanism[J]. Science in China, 1995, Series B 38(8):934~943
- [14] 廖晓兰,朱水芳,陈红运,等.植原体 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测鉴定方法的建立[J].植物病理学报,2002,32(4):361~367
- [15] Dai Q, He F T, Liu P Y. Elimination of phytoplasma by stem culture from mulberry plants (*Morus alba*) with dwarf disease[J]. Plant Pathology, 1997, 46:56~61
- [16] Cousin M T, Roux J, Millet N, et al. Maintenance of MLOs (mycoplasma-like organisms) on *Populus alba* micropropagation[J]. J. Phytopathology, 1990, 130:17~23
- [17] Jarausch W, Lansac M, Dosba F. Micropropagation for maintenance of mycoplasma-like organisms in infected *Prunus maritima* GF8-1[J]. Acta Horticulturae, 1994, 359:169~176
- [18] Sears B B, Klomprens K L. Leaf tip cultures of the evening primrose allow stable, aseptic culture of mycoplasma-like organism [J]. Canada Journal of Plant Pathology, 1989, 11:342~348
- [19] Jarausch W, Lansac M, Dosba F. Long-term maintenance of nonculturable apple-proliferation phytoplasmas in their micropropagated natural host plant[J]. Plant Pathology, 1996, 45:778~786
- [20] 田国忠,张志善,李志清,等.我国不同地区枣疯病发生动态和主导因子分析[J].林业科学,2002,38(2):83~91
- [21] 温秀军,孙朝辉,孙士学,等.抗枣疯病枣树品种及品系的选择[J].林业科学,2001,37(5):87~92
- [22] 何放亭,武红巾,陈子文,等.枣疯病中两种类菌原体混合感染的探讨[A].见:刘仪,唐文华.植物病理学研究进展[M].北京:中国农业科技出版社,1995:P389
- [23] 廖晓兰,朱水芳,罗宽.植原体的分类及分子生物学研究进展[J].植物检疫,2002,16(3):167~172
- [24] Lee I M, Davis R E, Gundersen D E. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes[J]. Annu. Rev. Microbiol., 2000, 54:221~255
- [25] 金开璇,高志和.吸食枣疯病的中国拟菱纹叶蝉传播泡桐丛枝病[J].林业科技通讯,1980,(3):22~24