

离体条件下进行治疗枣疯病药物 筛选的可行性研究

赵锦¹, 代丽², 薛陈心², 刘孟军²

(1. 河北农业大学 生命科学学院, 河北 保定 071000; 2. 河北农业大学 中国枣研究中心, 河北 保定 071001)

摘要: 以婆枣带枣疯病组培苗为试材, 在培养基中添加不同浓度及不同次数的盐酸-四环素(Tetracycline, Tc)和盐酸-土霉素(Oxytetracycline, Ox)药物, 培养40 d后, 观察其对病苗生长情况的影响, 并对转健苗进行植原体特异PCR检测, 结果表明, 25 μg/mL的药物浓度处理一次可使枣疯病症状消失, 并完全杀灭枣疯病病原, 达到理想效果; 同时本研究中田间和组培条件下相同药物治疗效果的一致性进一步说明了利用组织培养技术进行药物筛选的可行性。

关键词: 枣疯病; 组培苗; 植原体; 药物

中图分类号: S 665.1

文献标识码: A

Selecting remedial drugs for witches' broom disease via tissue culture

ZHAO Jin¹, DAI Li², XUE Chen-xin², LIU Meng-jun²

(1. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China;

2. Research Center of Chinese Jujube, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: The plantlets with witches' broom disease of *Ziziphus jujuba* cv. Pozao were used as materials in this paper. The diseased plantlets were cultured in the medium with different concentration and times of Tc and Ox. After 40 days, the growth conditions of the treated plantlet were observed and the phytoplasma of healing plantlets was also detected by PCR. The results showed that 25 μg/mL Tc and Ox could reverse the diseased symptom and kill phytoplasma completely. At the same time, the consistency of treated effect between field and tissue culture also showed that selecting remedial drugs via tissue culture was feasible.

Key words: witches' broom disease; drugs; phytoplasma; plantlet

枣树原产我国, 是我国第一大干果树种, 以其抗逆性强、栽培容易、结果早、经济寿命长、枣果营养丰富、用途广泛、经济效益和生态效益显著等独特优势, 已经成为我国果树发展中的热点之一。枣疯病

是由植原体引起的枣树重大毁灭性传染病害, 同时也是植物界重大疑难病害之一^[1-4]。长期以来, 为了彻底根除此病害, 研究者尝试了各种技术措施和方法, 如手术治疗、药物治疗及抗病品种筛选

收稿日期: 2005-06-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(39970523); 河北省自然科学基金项目(300129)

作者简介: 赵锦(1977-), 女, 河北安平人, 博士, 副教授, 从事枣种质资源和生物技术研究。

通讯作者: 刘孟军(1965-), 男, 河北望都人, 教授, 从事枣种质资源和育种研究。

等^[5-9],其中,药物治疗作为一种主要的技术手段被广泛应用,但迄今为止,由于在田间进行药物筛选,环境条件难以控制、工作量大,又受季节时间限制,以至于进程缓慢,使枣疯病的治疗药物主要局限在四环素、土霉素等抗生素范围内。为了扩大筛选范围、加快筛选进程,本研究利用已建立的枣疯病带病组织培养体系,通过在培养基中添加药物,进行离体条件下枣疯病治疗药物的筛选研究,旨在建立组培筛选药物的技术体系、探索在组织培养条件下进行治疗药物快速筛选的可行性,为枣疯病治疗药物的高效筛选开辟新的途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

挑选生长旺盛,具典型丛枝症状(有 10 个以上分枝)的带枣疯病婆枣组培苗,取其茎尖和茎段(带 4 个叶片)作药物处理。将同一株小苗切分后接入不同剂量或种类的培养基中,以保证所用基因型和生长势一致的小苗进行各组药物处理。

1.2 培养条件

MS 基本培养基,蔗糖 3%,琼脂 0.35%,pH 灭菌前为 6.2,高压灭菌 17 min,光照 1 400~1 600 lx,光周期为 16 h/8 h,温度控制在 25~30 ℃ 之间。

1.3 药物种类及添加方法

国产盐酸-四环素和盐酸-土霉素。

药物添加方法:在超净工作台,紫外灯照射粉剂药物 4 h 以上,消毒双蒸水溶解,在培养基灭菌后冷凝前分剂量加入。

1.4 病原检测方法

利用已知植原体 16SrDNA 的保守序列合成引

物,引物序列为 P1:AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T,P7:CGT CCT TCA TCG GCT CTT。PCR 反应采用 30 μL 体系,各组分及其用量为:10×PCR buffer 3.0 μL,25 mmol/L Mg²⁺ 2.0 μL,30 ng/μL P1/P7 各 1 μL,30 ng/μL DNA 1 μL,2 mmol/L dNTP 2 μL,5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.3 μL,消毒双蒸水 19.7 μL。扩增程序:94℃,6 min;94℃ 50 s,58℃ 1 min 40 s,72℃ 2 min 30 s,37 cycles;72℃ 7 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶(含约 0.5 μg/mL 溴化乙锭)进行电泳检测,电泳缓冲液为 0.5 × TBE。电泳结束后在紫外灯下观察并摄影记录。

2 结果与分析

2.1 盐酸-四环素和盐酸-土霉素对枣疯病病苗的治疗效果

在培养基中分别添加 0.5 μg/mL、15 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL 浓度的盐酸-四环素和盐酸-土霉素,各 5 个处理,15 次重复。培养 40 d 后,调查各处理中组培苗的生长情况,结果见表 1。

由表 1 可以看出,在培养基中添加一定浓度的盐酸-四环素和盐酸-土霉素后,从表观症状上对枣疯病病苗均有明显的治疗效果。在添加不同浓度药物的培养基中,枣疯病病苗的丛枝症状均完全逆转,新生叶片叶色转绿、面积明显增大,托叶刺生长正常,腋芽不萌发或偶有萌发,其中添加低剂量药物(如 5 μg/mL)培养基中的小苗因药物抑制而表现叶片发黄的时期不明显,且生长较旺;但随药物浓度的增加,小苗的生长逐渐受到一定程度的抑制,表现为茎段生长量减小、生根数量也逐渐下降;药物浓度越高,受抑越严重。

表 1 培养基中添加不同药物后病苗的生长情况

Table 1 The growth condition of diseased plantlet cultured in medium with different drugs

药物 Drug	浓度/(μg·mL ⁻¹) Content	平均生根条数 Average amounts of roots	枣疯病症状表现及生长情况 The symptom and growth condition of diseased plantlet after 40 - days cultured
CK	0	2~3	症状明显(小叶丛生、托叶刺变为小叶)
	5	1~2	症状消失,生长良好
	15	0~1	症状消失,生长良好
	25	无	症状消失,开始 5~10 d 生长受抑,10 d 后恢复生长
	50	无	症状消失,生长明显受抑
盐酸-四环素	5	1~2	症状消失,生长良好
	15	0~1	症状消失,生长良好
	25	无	症状消失,开始 5~10 d 生长受抑,10 d 后恢复生长
	50	无	症状消失,生长明显受抑

2.2 药物转健苗继代培养及病原检测情况

为了进一步确定盐酸-四环素和盐酸-土霉素的治疗效果,将药物处理40 d后的转健苗分别在不添加药物和添加与第一次处理相同浓度药物的培养基上进行继代培养,每处理10次重复。40 d后再观察各处理中组培苗的生长结果。

对在继代培养中不添加药物的处理发现,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物处理一次后枣疯病症状虽然可以暂时消失,但在不添加药物的继代培养基中又出现症状复发现象,复发率100%,表明此浓度并没有全部杀死枣疯植原体,部分病原体存在植株中,一旦药效消失,病原体可以再度繁殖;15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物处理一次后继代培养中只有40%的组培苗健壮生长,完全正常,其余60%症状复发,说明此浓度下治疗效果也不理想,只是有可能全部杀死病原;25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物一次处理后,组培苗均没有出现症状复发现象。

对继代培养中添加二次药物处理的组培苗生长情况观察发现,两种药物在4种浓度条件下均无表现枣疯病症状情况,但高浓度药物(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对转健苗生长出现了严重抑制现象,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下甚至出现部分组培苗枯死;而添加低浓度药物(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的培养基中转健苗生长良好,全部没有症状复发现象。

对药物处理一次(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和两次后的转健苗分别进行PCR检测,均未发现有植原体特异带出现,检测结果见图1;而且将转健苗在未添加药物的培养基中持续继代(1年半),均未发现有症状复发现象。由此可看出,通过在培养基中添加高浓度药物一次处理(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和低浓度多次处理(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)均可以使枣疯病病毒转健,并全部杀死病原。但从经济和提高效率角度考虑,本试验认为以添加25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的药物一次处理的效果最佳,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的药物治疗效果见图2,治疗转健苗在无药物继代培养基中生长情况见图3。



注:M为分子量标准;1,3为病苗对照,出现植原体特异条带(1.8 kb);2,4-8为药物转健苗,无植原体特异条带

图1 药物转健苗和病苗对照的PCR检测结果
Fig.1 The PCR amplified results of healing and diseased plantlet with P1/P7 primers



图2 在添加25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物的培养基中,病苗转化情况
Fig.2 The conversion of diseased plantlet in medium with 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tc and Ox



图3 药物转健苗在无药物培养基中生长情况
Fig.3 The growth condition of healing plantlet in medium without drugs

2.3 组培条件下与田间药物用量的比例关系

利用相同批次的盐酸-四环素和盐酸-土霉素药物进行了大样本田间药物滴注试验,筛选得到的有效剂量为1.0 g/L,与组培条件下药物处理1次的有效剂量25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的比例达到40:1,此结果说明组培条件下筛选出的药物剂量在田间生产实践中应用时应扩大几十倍,这为筛选药物的田间应用提供了一定的计算依据,为最终的生产实践奠定了基础;同时也说明了盐酸-四环素和盐酸-土霉素在田间和组培条件下药效的一致性。

3 讨论

3.1 组培条件下进行药物筛选的可行性

对四环素类药物防治植原体类病害的作用机理研究表明,四环素可以引起植原体菌体的破裂或消失,达到抑制病原的生长效果^[10]。李加友也曾报道,采用盐酸-四环素、交沙霉素、枝原清以不同浓度处理组培条件下的泡桐和甘薯丛枝组培苗,结果表明效果良好,症状无复发,经电镜观察未发现植物植原体的存在^[11]。而本研究中采用国产盐酸-四环素和盐酸-土霉素处理枣疯病组培苗,使用浓度为25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,效果良好,能彻底杀灭枣疯病植原体,并使病苗转健,无复发。另外,本研究在田间和组培条件下开展同种药物试验,药效结果表现出了很高的一致性。

以上结果均说明,组培筛选结果可定性指导实际生产中的应用试验,当然生产中的应用剂量需要具体摸索。但利用带病组培体系进行药物筛选是完全可行的,不仅能大大缩短筛选时间,提高筛选效

率,而且筛选范围可以大幅度扩展,有望筛选出抗生素之外的其他更高效、环保的治疗药物;同时本研究也为其他植物病害的治疗药物筛选研究提供了有益参考。

3.2 组培和田间条件下治疗效果的差异

许多田间试验表明,抗生素的应用使枣疯病的症状消失大多是暂时的,往往隔一段时间后复发,不能彻底清除病原^[12];而组织培养条件下的该类药物的治疗结果却能彻底杀死病原,没有症状复发现象。分析造成这种差异的原因,作者认为很可能是田间输液治疗很难将药物运输到植株体内植原体存在的每一个部位,那些药物能运输到的部位,又达到了足够的药量,病原被杀灭;那些药物不能运输到的部位,即便是高效药物也不可能杀灭病原。而在组培试验中,植株个体小、药剂吸收充分,能在最大程度上杀灭病原,表现该药剂应有的作用。

另外,本研究中盐酸-四环素和盐酸-土霉素等抗生素类药剂的应用试验表明,该类药剂除了可以杀灭枣疯病植原体病原,同时也抑制枣疯病病菌的生长,对其有一定的毒害作用。所以本研究认为今后药物治疗枣疯病的重点有两个方面:一方面是筛选出能杀灭植原体的高效环保药剂,即既能杀灭植原体的同时对枣树本身和周围环境又无伤害或伤害小的药剂;另一个方面是提高药剂在患病植株体内的运输效果,尽可能保证药剂能最大程度灌输到植物体内每一个植原体存在的部位,这需要对药物水溶性、用药时间、用药方法和药械等各个因素全面考虑。

参考文献:

- [1] 刘仲健,罗焕亮,张景宁. 植原体病理学[M]. 北京: 中国林业出版社,1999, 1, 37.
- [2] 曹玉璞,叶元康主编. 支原体与支原体病[M]. 北京: 人民卫生出版社,2000, 243.
- [3] 周俊义,刘孟军,侯保林. 枣疯病研究进展[J]. 果树科学,1998,15(4):354-359.
- [4] 潘青华. 枣疯病研究进展及防治措施[J]. 北京农业科学,2002(3):4-8, 21.
- [5] 王清和. 砍疯枝能否防治枣疯病的探讨[J]. 中国果树,1980,(1):43-44.
- [6] 侯保林,齐秋锁,赵善香,等. 手术治疗枣疯病的初步探索[J]. 河北农业大学学报,1987,10(4):11-17.
- [7] 王焯,于保文,全德全,等. 四环素族等药物对枣疯病的初步治疗试验[J]. 中国农业科学,1980(4):65-69.
- [8] 温秀军,孙朝辉,孙士学等. 抗枣疯病枣树的品种及品系的选择[J]. 林业科学,2001,17(5):87-92.
- [9] LIU M J, ZHOU J Y, ZHAO J. Screening of Chinese jujube germplasm with high resistance to witches' broom disease[J]. Acta Horticulturae,2004, 663:575-579.
- [10] 曹玉璞,叶元康,主编. 支原体与支原体病[M]. 北京: 人民卫生出版社,2000. 251.
- [11] 李加友. 抗生素对组培条件下植物支原体作用的初探[J]. 南京农专学报,1997,13(4):25-31.
- [12] 曹玉璞,叶元康主编. 支原体与支原体病[M]. 北京: 人民卫生出版社,2000. 250-265.

(编辑:李 川)

(上接第 69 页)

- [4] THOMMA BPHJ, EGGERMONT K, PENNINGCKX IAMA, et al. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 15107-15111.
- [5] PARKER J E, HOLUB E B, FROST L M, et al. Characterization of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* which suppresses resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different *RPP* genes [J]. Plant Cell, 1996, 8: 2033-2046.
- [6] DONG X. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is non responsive to inducers of systemic acquired resistance[J]. Plant Cell, 1994, 6: 1583-1592.
- [7] ADAM L, SOMERVILLE S C. Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 1996, 9: 341-356.
- [8] SIMONE FERRARI, JULIA M, PLOTNIKOVA, GIULIA DE LORENZO, et al. *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires *EDS4* and *PAD2*, but not *SID2*, *EDS5* or *PAD4* [J]. The Plant Journal, 2003, 35: 193-205.
- [9] 朱杰华,杨志辉,邵铁梅,等. 中国部分地区马铃薯晚疫病病菌生理小种的组成及分布[J]. 中国农业科学,2003, 36(2):169-172.
- [10] KAMOUN S, HUITEMA E, VLEESHOUWERS V G A A. Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response[J]. Trends Plant Sci, 1999, 4: 196-200.

(编辑:李 川)