

生长素类物质对植原体感染酸枣组培苗的影响

孙清荣^{1,*}, 孙洪雁¹, 王妍², 刘嘉芬¹, 周广芳¹, 刘庆忠¹

¹山东省果树研究所, 农业部泰安温带果树资源重点野外科学观测试验站, 山东省果树生物技术育种重点实验室, 山东泰安 271000; ²山东农业大学园艺学院, 山东泰安 271000

摘要: 观察生长素类物质对感染植原体病酸枣试管苗影响的结果表明: 添加外源 NAA 和 IBA 后的病苗丛枝症状和不加生长素类物质相似, 均表现伸长生长和梢较上部位有多个分枝梢生长, 而在培养基中添加 IAA 后可使病苗从其基部产生更多丛生芽。培养 9 个月后, 用 NAA、IBA 和 IAA 处理的都没有检测出植原体病原脱除的绿苗, 也没有观察到丛生症状减轻的病苗。

关键词: 生长素; 植原体; 酸枣; 组培苗

Effects of Auxin Analogs on Phytoplasma in Infected Sour Jujube Shoots Grown *in vitro*

SUN Qing-Rong^{1,*}, SUN Hong-Yan¹, WANG Yan², LIU Jia-Fen¹, ZHOU Guang-Fang¹, LIU Qing-Zhong¹

¹Shandong Fruits Biotechnology Breeding Key Lab, The State Agriculture Ministry Experiment Station of Temperate Fruits Germplasm Key Outdoor Observation in Taian, Shandong Institute of Pomology, Taian, Shandong 271000, China; ²College of Horticulture, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

Abstract: Sour jujube witches' broom is resulted from imbalance of endogeneous hormones, which is caused by phytoplasma. In order to investigate the effects of auxin analogs on witches' broom phytoplasma, the infected shoots of sour jujube (*Zizyphus spinosus* Hu.) were used as materials. The infected shoots were treated with exogenous auxin analogs NAA, IBA and IAA, respectively. The results showed that NAA and IBA didn't affect witches' broom, and IAA promoted shoot clumps production. After the treatments of NAA, IBA and IAA for 9 months, PCR analysis of phytoplasma presence showed the pathogen of witches' broom phytoplasma was not been eliminated in tested shoots, remission of witches' broom symptom was not observed in all treatments.

Key words: auxin analogs; phytoplasma; sour jujube; *in vitro* shoots

枣疯病是由一种专门寄生于韧皮部筛管分子的病原——植原体引起的, 是枣树生产的一种毁灭性检疫病害。由于植原体病原不能人工培养, 使与致病相关的分子生物学和病害生理研究不足, 极大地增加了枣疯病的防治难度。最新的一些研究结果表明, 组织培养的方法可以保存植原体病原 (Jarausch 等 1996; Wongkaew 和 Fletcher 2004), 也可以通过离体再生或添加外源生长素的方法脱除病原 (Dai 等 1997; Gribaudo 等 2007; Mirna 等 2007; Parmessur 等 2002) 或茎尖培养结合超低温处理脱除病原 (Wang 和 Valkonen 2008)。但在组织培养中添加外源生长素对酸枣枣疯病试管苗症状的影响未见报道。枣疯病丛枝症状的形成是由于细胞分裂素和生长素(C/A)的比值异常增高, 主要是细胞分裂素含量的增加所引起 (赵锦等 2006)。本文的目的是想采用组织培养方法, 在培养基内附加不同种类和不同浓度的生长素类物质, 研究外源生长素类物

质对酸枣丛枝病试管苗症状的影响, 为枣疯病病树的治愈提供参考。

材料与方法

以感染植原体病(JWB)具有丛枝症状的泰山酸枣(*Zizyphus spinosus* Hu.)为试材, 按照常规方法培养试管苗, 带病试管苗在不加任何生长调节物质的 MS 培养基(MS0)上保存。剪取试管苗茎尖部分, 高度 1 cm 左右, 转移到附加 IBA、IAA 和 NAA 的 MS 培养基上, 每一种生长素类物质分别取 0.5、1.0、2.0 和 4.0 mg·L⁻¹, 共设 12 个处理, 每一处理 30 个梢, 重复 3 次, 以不加任何生长调节物质为对

收稿 2008-11-27 修订 2009-01-21

资助 山东省农科院博士科研启动基金(2007YBS004)、国家林业科技支撑计划(2006BAD01A1701、2006BAD18B02)和山东省农业良种工程项目(2005LZ07-01、2006LZ07-01)。

* E-mail: qingrongsun@hotmail.com; Tel: 0538-8282059

照。每一继代培养周期为 45 d, 继代培养 6 次。观察每一处理的丛枝症状并测算苗高、增殖芽梢数和总干重。

1/2MS 培养基中分别附加 IBA、IAA 或 NAA, 浓度均为 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 观察生长素类物质对丛枝病苗生根的效应。

从经过生长素类物质处理培养的病株试管苗的幼嫩顶梢提取总 DNA, 以健康试管苗作对照。采用通用引物 P1 (5' aagagtttgatcctggctcaggatt 3') 和 P7 (5' cgtccttcacggctctt 3') 进行直接 PCR, 用 R16F2n (5' gaaacgactgctaagactgg 3') 和 R16R2 (5' tgacggcggtgtgtacaaaccccg 3') 进行 Nested-PCR (Lee 等 1998), 扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 置紫外灯下检测 1.8 kb (直接 PCR 产物) 和 1.2 kb (Nested-PCR 产物) 植原体特异扩增片段的有无。

试验结果采用 DPS v3.01 软件进行统计分析, 不同处理平均值用 Duncan 法进行多重比较分析。

实验结果

1 不同生长素类物质对酸枣丛枝病试管苗生长的影响

通过对加 IBA 和 NAA 以及不加任何生长调节

物质的培养基上的丛枝试管苗的生长形态进行系统调查分析的结果表明, 不同处理之间差异不明显, 都表现出苗高, 从上部叶腋处产生腋芽梢(图 1-a~c) (NAA 资料未列出), 即都表现出枣疯病试管苗的丛枝症状。而 IAA 处理的病苗增高变差, 增殖变强, 从病苗基部产生更多的丛生芽梢(图 1-d、e)。当浓度低于 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 三种生长素类物质对病苗症状都无明显影响(资料未列出)。而健康对照在附加任何生长素类物质的培养基上都只表现伸长生长而无增殖生长(图 1-f)。

2 不同浓度生长素类物质对酸枣丛枝病苗症状的影响

IBA 或 NAA 处理和不加生长素类物质的对照相似, 母梢平均生长高度及其增殖后所有梢的平均高度差异不明显(表 1)。IAA 处理, 浓度在 $0.5\sim 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 和不加生长素类物质的对照差异不显著, 但浓度由 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 升高到 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 母梢和所有梢的平均高度都明显变小, 和不加生长素类物质的对照差异显著(表 1)。这一结果反映了生长素类物质对植物生长的两重作用, 浓度较低促进伸长生长, 浓度较高抑制伸长生长。但本文中浓度较低的生长素类物质与不加生长素类物质的对照相比, 都不表现对丛枝病苗伸长生长的促进作用, 这可能是病



图 1 不同生长素类物质对酸枣丛枝病试管苗的影响

Fig.1 Effects of auxin analogs on sour jujube witches' broom shoots

a、b: 不加生长素类物质的对照病苗, a: 培养 40 d, b: 培养 130 d; c: 培养基中附加 $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA; d、e: 培养基中附加 $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA, d: 培养 40 d, e: 培养 130 d; f: 不加或只加生长素类物质的培养基上的健康苗。

表1 不同浓度生长素类物质对酸枣丛枝病苗生长高度、增殖梢数及干重的影响

Table 1 Effects of different auxin analog concentrations on plant height, shoot proliferation and shoot dry weight of sour jujube witches' broom shoots

生长素类物质	浓度/mg·L ⁻¹	母梢高度/cm	所有梢高度/cm	增殖芽梢数/个	增殖梢数总干重/mg
对照	0	4.3±0.8 ^a	2.1±0.7 ^a	3.9±0.8 ^{ef}	73.2±4.2 ^d
IAA	0.5	4.1±1.0 ^a	1.9±0.7 ^{ab}	7.3±1.1 ^{cd}	141.2±26.4 ^c
	1.0	3.6±0.9 ^{ab}	1.5±0.4 ^{ab}	8.3±1.3 ^c	155.3±15.2 ^c
	2.0	3.0±0.9 ^{ab}	1.5±0.6 ^{ab}	14.8±1.3 ^b	221.9±13.2 ^b
	4.0	2.3±0.6 ^b	1.0±0.4 ^b	17.3±1.6 ^a	407.4±15.7 ^a
IBA	0.5	4.3±0.7 ^a	1.8±0.6 ^{ab}	8.1±0.8 ^{cd}	145.7±18.1 ^c
	1.0	3.2±0.5 ^{ab}	1.5±0.4 ^{ab}	6.5±0.7 ^d	141.0±16.7 ^c
	2.0	3.2±0.6 ^{ab}	1.4±0.7 ^{ab}	2.7±0.7 ^f	74.9±10.0 ^d
	4.0	3.6±0.7 ^{ab}	1.5±0.4 ^{ab}	3.3±0.5 ^{ef}	68.9±16.9 ^d
NAA	0.5	4.2±0.3 ^a	1.8±0.4 ^{ab}	8.1±0.6 ^{cd}	134.0±5.6 ^c
	1.0	3.3±0.4 ^{ab}	1.4±0.4 ^{ab}	7.9±0.4 ^{cd}	129.0±13.7 ^c
	2.0	3.5±0.6 ^{ab}	1.6±0.2 ^{ab}	4.9±1.1 ^e	75.1±4.9 ^d
	4.0	3.4±0.4 ^{ab}	1.5±0.3 ^{ab}	4.2±0.9 ^{ef}	71.1±11.4 ^d

同一列中标有不同字母的表示差异显著($P < 0.05$)。

苗自身的内源细胞分裂素过高所致(赵锦等2006)。

IBA和NAA在较低浓度0.5和1.0 mg·L⁻¹时,每个母梢增殖芽梢数比不加生长素类物质的对照显著增加。但当浓度升高到2.0 mg·L⁻¹以上时,随浓度的增加,增殖数下降,增殖倍数和外加生长素类物质的对照差异不显著。IAA处理的病苗增殖倍数随其浓度的增加而增加,所有加和外加生长素类物质处理之间差异显著。1.0 mg·L⁻¹到4.0 mg·L⁻¹处理之间也差异显著,而0.5 mg·L⁻¹和1.0 mg·L⁻¹之间差异不显著。植物生长素类物质的生理作用是促进细胞伸长,对细胞分裂没影响,而本文中IBA和NAA在0.5 mg·L⁻¹和1.0 mg·L⁻¹及IAA从0.5 mg·L⁻¹升高到4.0 mg·L⁻¹时都表现出促进丛枝病苗增殖生长的作用,这可能是由于在培养基中附加外源生长素类物质后丛枝病苗中异常高的C/A值趋于平衡,形成有利于试管苗增殖生长的C/A比值所致。因为在组织培养中,大多数植物包括健康酸枣的组培快繁以细胞分裂素和生长素的适当配比最有利于增殖(刘翠云等1995;代丽等2006)。本文中健康的对照植株最适宜增殖和伸长的培养基为MS添加2.0 mg·L⁻¹和0.4 mg·L⁻¹ IBA(资料未列出)。

3 不同生长素类物质对酸枣丛枝病苗干重的影响

IAA和较低浓度(0.5~1.0 mg·L⁻¹)的IBA和NAA处理与不加生长素类物质的对照相比,其丛枝病苗的干重显著增加(表1),表明外源生长素类物质调节C/A值使丛枝病苗能更好的生长,但与已报道的甘

蔗(Wongkaew和Fletcher 2004)和长春花(Mirna等2007)病苗加入外源生长素类物质使部分植株病原脱除的结果不同。因为生长素类物质处理后的病苗经PCR检测植原体病原仍存在(图2)。

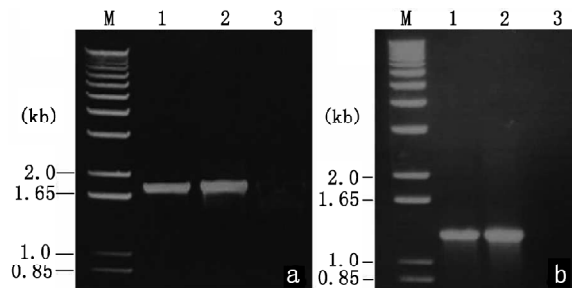


图2 生长素类物质处理后和不经生长素类物质处理的酸枣病苗植原体病原PCR检测

Fig.2 PCR analysis of phytoplasma pathogens in infected shoots with treatment of auxin analogs

a: 通用引物P1/P7扩增1.8 kb片段; b: Nested-PCR R16F2n/R16R2扩增1.2 kb片段。M: DNA分子量标准; 1: 不加生长素处理的病苗; 2: 加生长素处理的病苗; 3: 健康对照。

4 不同生长素类物质对酸枣丛枝病苗生根的影响

据范国强等(2006)报道,IBA对泡桐丛枝病苗生根作用明显,根粗,须根多,而NAA的作用不明显,根细,须根少。而本文结果是NAA更有利于酸枣丛枝病苗生根,生根率高,根粗而短,而健康对照形成的根细而长(图3),其次为IAA,第三为IBA,这表明植原体类型不同或侵染的植物基因型不同其

对外源生长素类物质的反应也不同。根据 Lee 等 (1998) 的分类, 酸枣丛枝病的植原体为第 V 组 B 亚组, 而泡桐丛枝病的植原体则为第 I 组 D 亚组。

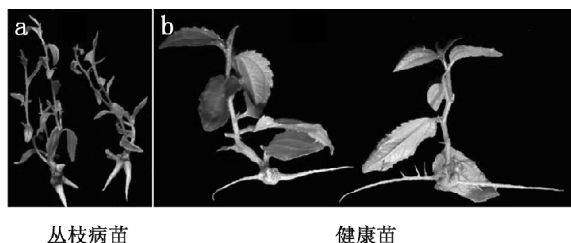


图3 NAA对酸枣丛枝病试管苗生根的影响
Fig.3 Effect of NAA on rooting of sour jujube witches' broom shoots

讨 论

酸枣丛枝病苗对不同的外源生长素类物质反应不同, IBA 和 NAA 对酸枣病苗的症状影响较小, 这和 Mirna 等(2007)报道的添加外源 IBA 可以从长春花病苗上脱除翠菊黄化病原(aster yellows)的结果不同, 这可能是由于植原体病原的类型不同, 对生长素类物质的反应也不同, 因为在 Mirna 的同一个试验中添加 IBA 并没有从长春花上脱除榆树黄化病(elm yellows)和蕃茄大芽病(stolbur) (Mirna 等 2007)。

外源生长素类物质 IAA 导致酸枣丛枝病苗产生更多的丛生芽梢, 其表现类似于细胞分裂素的增殖作用。在组织培养中, 大多数植物包括健康酸枣的组培快繁以细胞分裂素和生长素的适当配比最有利于增殖(刘翠云等1995; 代丽等2006), 本文中 IAA 促进枣疯病苗从基部产生更多的丛生苗, 可能是由于外源 IAA 可促使枣疯病苗中细胞分裂素和生长素(C/A)的异常高的比值降低并趋于正常, 因而 IAA 表现出促进酸枣丛枝病苗的试管苗的增殖生长。而 IBA 和 NAA 没有表现调节 C/A 值的作用, 表明不同的植物基因类型或感染的植原体病原的类型不同对外源生长素类物质的反应也不同。NAA 和 ABA 的使用可以减轻泡桐丛枝病症状(范围强等 2006), 2,4-D 可以脱除甘蔗的甘蔗黄化病(Parmessur 等

2002), 而桑在不加任何激素的培养基上培养就可以脱除桑矮化病(Dai 等 1997)。田国忠等(2001)也报道, 含有激素合成相关基因的根癌农杆菌接种感染植原体的泡桐丛枝组培苗, 可使丛枝症状减轻。这些结果都表明植原体可影响植物的激素代谢, 但在不同的植物中其影响的作用不同(赵锦等 2006; 田国忠等 2001)。总之, 植原体影响植物激素代谢的机制尚不清楚, 值得深入研究。

参考文献

- 代丽, 王玖瑞, 刘孟军, 赵锦, 周俊义, 刘晓光, 刘彩霞(2006). 酸枣组培快繁的影响因素. 河北农业大学学报, 29 (3): 26~28
- 范围强, 冯志敏, 翟晓巧, 曹艳春, 董占强, 蒋建平(2006). 植物生长调节物质对泡桐丛枝病株幼苗形态和叶片蛋白质含量变化的影响. 河南农业大学学报, 40 (2): 137~141
- 刘翠云, 张小红, 马洪明(1995). 酸枣微繁殖技术研究. 西北植物学报, 15 (4): 301~306
- 田国忠, 朱水芳, 罗飞, 李怀方, 裘维蕃(2001). 根癌农杆菌对感染植原体的泡桐组培苗症状的影响. 林业科学研究, 14 (3): 258~264
- 赵锦, 刘孟军, 代丽, 周俊义(2006). 枣疯病病树中内源激素的变化研究. 中国农业科学, 39 (11): 2255~2260
- Dai Q, He F-T, Liu P-Y (1997). Elimination of phytoplasma by stem culture from mulberry plants (*Morus alba*) with dwarf disease. *Plant Pathol*, 46: 56~61
- Gribaudo I, Ruffa P, Cuozzo D, Gambino G, Marzachi C (2007). Attempts to eliminate phytoplasmas from grapevine clones by tissue culture techniques. *Bull Insectol*, 60 (2): 315~316
- Jarausch W, Lansac M, Dosba F (1996). Long-term maintenance of nonculturable apple-proliferation phytoplasmas in their micropropagated natural host plant. *Plant Pathol*, 45: 778~786
- Lee I-M, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, Bartoszyk IM (1998). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int J Syst Bacteriol*, 48: 1153~1169
- Mirna UP, Hrvoje L, Martina EM (2007). Effect of indole-3-butyric acid on phytoplasmas in infected *Catharanthus roseus* shoots grown *in vitro*. *FEMS Microbiol Lett*, 268: 171~177
- Parmessur Y, Alijanabi S, Saumtally S, Dookun-Saumtally A (2002). Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. *Plant Pathol*, 51: 561~566
- Wang QC, Valkonen JPT (2008). Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips. *Plant Pathol*, 57: 338~347
- Wongkaew P, Fletcher J (2004). Sugarcane white leaf phytoplasma in tissue culture: long-term maintenance, transmission, and oxytetracycline remission. *Plant Cell Rep*, 23: 426~434