

用 CEV 直接感染柑桔愈伤组织的接种方法的研究

陈 纯 贤* 万 蜀 渊

(华中农业大学柑桔研究所, 武汉 430070)

摘要 根据 CEV 机械传染及高温诱导发病的特性, 用三种方法直接接种柑桔愈伤组织, 结合形态学观察、增殖率比较和电泳检测, 结果表明, 带毒切伤浸泡是 CEV 离体感染柑桔愈伤组织的有效方法。30℃ 培养条件下, 感染 CEV 的愈伤组织大约在 8d 后发生明显褐变, 并会逐渐加深, 同时, 感染后的愈伤组织的质地也趋坚硬, 且表现出特殊的病理生长特性, 前期 (0—20d) 显著地较健康对照生长快, 后期 (20—40d) 则明显减缓甚至停止生长。

关键词 柑桔裂皮病类病毒 (*citrus exocortis viroid*, CEV), 柑桔愈伤组织, 带毒切伤浸泡

动物病毒组织培养方法的建立对病毒学的发展起了很大的推动作用, 鉴于此, 探索植物病原的离体培养体系对其研究和发展也有十分重要的意义。虽然植物病原不能在人工培养基上生长, 但可以在离体培养的寄主组织或细胞里繁殖^[1]。Zaitlin 等认为利用分离的细胞、原生质体、愈伤组织块更利于研究病毒、类病毒等病

原的侵染、复制过程及寄主的病理变化, 它们具有田间植株所不具有的优点^[2]。

柑桔裂皮病类病毒 (*citrus exocortis viroid*, CEV) 是危害柑桔等多种农作物的重要病害^[3]。CEV 的离体培养和研究体系首先是用草本病

* 现工作单位为中国科学院植物研究所
1994-09-28 收稿

株如感染 CEV 的蕃茄和爪哇三七的外植体建立的^[4-6]。但是,利用 CEV 直接感染健康寄主的培养物建立离体培养体系的报道却不多见。杨光等尝试用甘氨酸-聚鸟氨酸-甘露醇-CaCl₂ (pH9.0) 接种液将 CEV 接种到爪哇三七原生质体内,30min 后即可检测到 CEV^[7]。后来本实验室首次获得了直接离体接种柑桔愈伤组织的初步结果^[10]。本研究将探索 CEV 直接感染柑桔愈伤组织的有效接种方法,并对其应用前景进行讨论。

1 材料与方法

1.1 供试材料及其愈伤组织的诱导

供试材料为 Etrong 香橙 Arizona 861-S-1 (*Citrus medica* var. Etrong Engl.)。Etrong 香橙愈伤组织是由隔离区内的植株新梢经消毒后在 MT 培养基 (加 1.5mg/L 2,4-D + 1.0mg/L NAA + 0.15mg/L KT + 3.0% 蔗糖) 上诱导而来,继代两次备用。培养温度为 26±1℃,光照强度为 1500—2000lx。

1.2 CEV 病原的提取

CEV 病原为从湖南省溆浦园艺场采得的严重裂皮的枳砧脐橙叶片的核酸提取物。提取参考马修理等的方法^[11],所得含 CEV 的总核酸粗提液经 2mmol/L LiCl 处理,用无水乙醇沉淀其上清液,收集 CEV 的小分子量核酸,干燥后溶于适量 0.1mmol/L EDTA (pH8.0) 中,此为 CEV 病原液。接种实验时用 0.45μm 微孔滤膜抽滤灭菌。

1.3 CEV 的接种实验

CEV 病原液可用含 0.14mmol/L CaCl₂ 和 0.1mol/L 甘氨酸的 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH8.5) 稀释 10 倍。三种接种方法为直接浸泡法、带毒切伤法、带毒切伤浸泡法。接种前先将白色愈伤组织块切成大小基本一致的方形小块 (见图 1 的中行,每块约 0.4g),带毒切伤即用浸过 CEV 病原液的解剖刀从垂直方向在方形愈伤组织小块相对的两个面上各浅切四刀;浸泡即将带毒切伤后或未切伤的愈伤组织小块直接浸泡在 CEV 接种液中,26℃ 和 30℃ 下

各 30min,随后用 MT 培养液轻漂一遍。对照为健株核酸抽提物同样处理。在 30℃ 下培养。观察形态学变化,20 d 后继代一次,并分别于接种时 (0d)、继代时 (20d)、制样时 (40d,电泳检测^[12]) 称鲜重,分三阶段计算平均增殖率 (rate of increase, 简记 RI), 其中 $RI_1 = (\text{继代时鲜重} - \text{接种时鲜重}) / \text{接种时鲜重}$, $RI_2 = (\text{制样时鲜重} - \text{继代时鲜重}) / \text{继代时鲜重}$, $RI_3 = (\text{制样时鲜重} - \text{接种时鲜重}) / \text{制种时鲜重}$ 。并进行比较分析。

2 结果

2.1 接种后柑桔愈伤组织的形态学变化

CEV 接种后最明显的变化是,第 8 天即可观察到有的愈伤组织块发生褐变,与对照有明显差别,随着培养时间的增加褐变会加深 (图 1),到后期 (20—40d) 有的甚至因褐变严重而生长停滞。感染后的愈伤组织质地也趋坚硬。对照在高温培养下也有些轻微的褐变,但发生较迟。根据褐变块数计算的感染率和电泳检测的结果基本一致 (表 1),说明愈伤组织块的褐变正是 CEV 侵染并致病的直观反映。至于不同接种方法下褐变的愈伤组织块数不同是因为感染率不同造成的。可以看出,带毒切伤浸泡

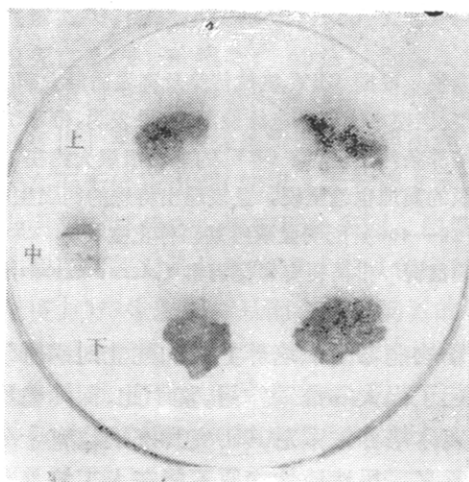


图 1 接种后的柑桔愈伤组织在 20d 和 40d 的生长状况

注: 中行,用于接种的愈伤组织小块;上行,健康对照;下行,CEV 感染后褐化

表 1 接种 CEV 后柑桔愈伤组织的褐变情况和感染率比较

接种方法	发生褐变的管数				感染率(%)	
	第 10 天	第 20 天	第 30 天	第 40 天	电泳结果	褐变结果
带毒切伤浸泡	6	16	18	18	90	85
带毒切伤	4	9	11	11	55	40
直接浸泡	1	5	8	8	40	30

注: 每处理统计 20 管

是 CEV 离体感染柑桔愈伤组织的最有效的接种方法, 愈伤组织的损伤是 CEV 离体接种成功的重要条件之一。

2.2 愈伤组织平均增殖率的比较

不同接种方法下愈伤组织的平均增殖率在不同阶段是不同的(表 2)。分别对它们进行方差分析和邓肯氏多重差异范围测验, 结果表明, 带毒切伤浸泡的 RI_1 显著高于对照并显著高于带毒切伤和直接浸泡, 但 RI_2 的表现却正好相反, 总的增殖率(RI_3)则因前两者抵消而趋同。显然, 三种接种方法的平均增殖率各异是因为它们的感染率不同造成的。带毒切伤浸泡所表现的与对照完全相反的增殖规律, 反映出柑桔愈伤组织块感染 CEV 后的特殊病理生长特性, 而带毒切伤和直接浸泡因感染率不高, 所以其平均增殖率介于健康对照和具高感染率的带毒切伤浸泡之间。

表 2 不同接种方法的愈伤组织平均增殖率比较

接种方法	RI_1	RI_2	RI_3
带毒切伤浸泡	1.222a	0.271c	1.822a
带毒切伤	1.048b	0.353b	1.739ab
直接浸泡	0.970bc	0.355b	1.653b
对照	0.840c	0.443a	1.623b

注: 以上数据均为 20 管的平均值; 表中 a、b、c 代表邓肯氏多重范围测验的显著性

为了进一步明确其生长特性, 统计所有 CEV 感染的愈伤组织的平均增殖率与健康对照进行 t 测验, 结果和带毒切伤浸泡与对照的结果完全一样。30℃ 下感染 CEV 的柑桔愈伤组织在前期(0—20d)的增殖明显地比健康对照快, 而在后期(20—40d)却又显著地减缓甚至停滞。导致出现这种特殊病理反应的原因还有待进一步研究。

3 讨论

植物病毒的离体接种最初采用与自然侵染相同的方法, 如汁液传播的采用针刺方法; 靠特定昆虫传播的则利用相应的带毒昆虫作介体^[1,13]。本研究采用带毒切伤浸泡能有效地使 CEV 感染柑桔愈伤组织, 在易控制的培养条件下操作, 远比田间接种时需要隔离区 and 高温诱导发病方便易行。此法为研究 CEV 与寄主细胞的关系、离体检测及抗性筛选提供了一条新途径。

高温培养条件(30℃)下 CEV 感染的愈伤组织前期比对照增殖更快, 而后期却明显减缓的生长特性在以前也有一些初步的报道^[4,5,7,8]。其解释是, 高温条件易造成组织伤害有利于 CEV 的侵染和复制, 同时 CEV 在初期又可刺激产生特异性蛋白质, 使受侵染的病组织能适应高温条件而维持一段时间的快速增殖, 后期因严重致病而生长减缓; 但正常组织却没有这些反应, 这种推断还有待于更深入的研究证实。

无病毒良种繁育体系是建立在现代脱毒技术和病毒鉴定技术基础之上的, 茎尖嫩芽嫁接技术是广泛应用的脱毒方法之一, 但判断是否脱除了病毒或类病毒还需要有与之配套的鉴定技术。带毒切伤浸泡接种感染寄主后, 在受控条件(30℃)下, 只需很短时间(8d)就开始表现出十分直观的褐变症状, 把它作为检测或检疫 CEV 的指标, 将可使该体系成为继指示植物、双向电泳、分子杂交之后的一种最为经济快捷的鉴定方法。因此, 进一步筛选更广泛的寄主, 并对离体条件下被侵染寄主的病理变化进行系统深入的研究是十分必要的。

参 考 文 献

- [1] Smith K M. In: Plant Virus, Smith K M, Chapman and Hall Press, London. 1977, 164—174.
- [2] Zaitlin M, Beachy R N. Adv Virus Res. 1974, 19:1—35.
- [3] Diener T O. Viroids and Viroid Diseases, John Wiley and Sons Press, New York, 1979.
- [4] Duran-Vila N, Semancik J S. Phytopathology. 1982, 72:777—781.
- [5] Marton L, N Duran-Vila, JJ Lin, *et al.* Virology, 1982, 122:229—238.
- [6] 周咏芝,陈雅丽,刘瑜,等. 病毒学报, 1987, 3: 277—281.
- [7] 刘瑜, 赵鸿燕, 周咏芝, 等. 病毒学杂志, 1989, 4: 297—303.
- [8] 熊翠英,丁达明,周咏芝, 等. 微生物学报, 1988, 28: 361—366.
- [9] 杨光,丁达明,周咏芝, 等. 病毒学报, 1989, 5: 277—279.
- [10] Wan S Y, Hu W. in: Proceedings of Seventh International Citrus Congress, Acireale (Italy), 1992, 253.
- [11] 马修理,熊学德,熊克勇, 等. 病毒学杂志, 1988, 3: 370—375.
- [12] Schumacher J, John W Randles, Detlev Reisner. Anal. Biochem., 1983, 135:288—295.
- [13] Sander F S, Mertes G. Adv. Virus Res., 1984, 29:215—262.

STUDIES ON INOCULATING METHODS OF DIRECT INFECTION OF CITRUS CALLI WITH CEV

Chen Chunxian Wan Shuyuan

(Institute of Citrus, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070)

Abstract Three methods of direct inoculation of in vitro citrus calli with CEV were described in this paper, based on its characteristics that CEV can be mechanically transmitted and that its pathogenesis can be stimulated by relative high temperature. The results showed that inoculation through cutting and soaking with CEV-RNA extracts was the most efficient method of in vitro CEV-infection of citrus calli, according to morphological observation, comparison of the rate of increase (RI) and two-dimensional electrophoretic analysis of inoculated calli. Compared with control (both cultured in 30°C), CEV-infected calli grew brown evidently from 8 days after inoculation, and their texture was getting stiff. At the same time, infected calli had special pathological rate of increase that they grew more quickly in early phase (0—20 days) and became much slower and almost stopped increasing in subcultural period (20—40 days).

Key words CEV (citrus exocortis viriod), citrus calli, inoculation through cutting and soaking