

超低温处理植物脱毒研究进展

杨 智^{1,2}, 陈 春 伶^{1,3}, 徐 美 隆^{1,3}

(1. 国家经济林木种苗快繁工程技术研究中心, 宁夏 银川 750004; 2. 宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021;

3. 种苗生物工程国家重点实验室, 宁夏 银川 750004)

摘 要:超低温处理是新兴的植物脱毒技术,是以超低温保存和植物组织培养为基础的一种方法。该方法不受茎尖大小的限制,具有操作简便、实验周期短、脱毒效率高等优点。现对超低温处理的原理、优势、不足以及步骤等作以综述,以增加人们对该技术的认识,并对其应用前景进行了简要探讨。

关键词:超低温处理;茎尖剥离;热处理;植物病毒;脱毒

中图分类号:TB 66;Q 813.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)12-0184-04

植物病毒素有植物癌症之称,在植物体内通过微管组织和胞间连丝进行扩散,干扰植物的新陈代谢、降低作物的产量和品质,甚至导致植物死亡^[1-4]。农作物感

染病毒的现象非常普遍,自从 1892 年俄国微生物学家 Dimini Iwanowsky 发现烟草花叶病毒以来,人类发现的植物病毒已多达近千种^[1-2,5]。全球每年因植物病毒造成的经济损失约 600 亿美元^[6]。植物病毒已成为降低农作物产量和质量的主要因素之一^[7]。Brison 等^[8]利用超低温处理(Cryotherapy)成功脱除李痘病毒(PPV),脱毒率 50%,是茎尖剥离脱毒率 19% 的 2.5 倍,标志着超低温处理方法的确立。Helliot 等^[9]利用超低温处理成功

第一作者简介:杨智(1987-),男,硕士,现主要从事葡萄脱毒与病毒检测等研究工作。E-mail:yuboyuan0123@outlook.com.

基金项目:宁夏科技支撑计划资助项目;国家科技支撑计划资助项目(2013BAD09B00);宁夏回族自治区科技攻关资助项目。

收稿日期:2013-01-18

[8] 李王艳.佳县红枣产业的困惑:枣价为何十年上不去[N].华商报,2012-12-26:B9.

[9] 李新岗,黄建,高文海.抗裂制干枣新品种阎良相枣[J].园艺学报,2004,31(3):418.

[10] 王长柱,高京草,刘振中.早熟大果型鲜食枣品种—七月鲜[J].园艺学报,2003,30(4):499.

[11] 王长柱,高京草,高文海,等.枣品种改良研究进展[J].果树学报,2007,24(5):673-678.

[12] 武婷,王继贵,赵忠祥,等.鲜食枣新品种早脆王的性状表现及栽培技术[J].落叶果树,2011(5):25-27.

[13] 安广池.枣新品种‘伏脆蜜’[J].园艺学报,2010,37(3):501-502.

[14] 高京草,王长柱,高华.影响枣裂果因子的研究[J].西北林学院学报,1998,13(4):23-27.

[15] 王长柱,高京草.陕西鲜枣生产问题探讨[J].西北园艺,2002(2):7-8.

[16] 高京草,王长柱,高文海.从 2007 年枣大面积裂果谈我国枣产业结构调整[J].中国果树,2008(4):64-65.

[17] 闫忠心,鲁周民,刘坤,等.我国红枣资源加工利用研究现状与展望[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2010,38(6):102-106.

[18] 韩博强.陕西果业如何销出大天地[N].华商报,2013-1-7:B1.

Dilemma and Cogitation of Jujube Industry in Shaanxi Province

WANG Chang-zhu, GAO Jing-cai

(College of Horticulture, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: On the theme of jujube industry in Shaanxi province, the industrial developing advantages were discussed from three aspects, including cultivation history and germplasm resources, natural conditions and regional characteristics, as well as industrial systems and bases. Problems and challenges in the industry were analyzed from improving and regionalizing jujube varieties, preventing natural disasters, enhancing economic benefits and industrialization degrees, as well as developing their brands. On the basis of these, some strategies on the sustainable development of Shaanxi jujube industry were put forward.

Key words: Shaanxi jujube industry; advantage; dilemma; strategy

从香蕉中脱除黄瓜花叶病毒(CMV)及香蕉条斑病毒(BSV)。Wang 等^[10-14]成功将该技术应用于马铃薯、甘薯、木莓、葡萄等植物。Wang 等^[13]研究发现,利用超低温处理技术可以同时脱除马铃薯 Y 病毒(PVY)和马铃薯卷叶病毒(PLRV),脱毒率分别为 91%~95% 和 83%~86%。不仅如此,Wang 等^[12]还发现超低温处理结合热处理可以脱除茎尖剥离结合热处理无法去除的木莓丛矮病毒(RBDV),脱毒率为 35%,该研究成果使得顽固病毒的脱除成为可能。2009 年,Wang 等^[15]的研究成果,标志着超低温处理成为国际学术界承认的植物脱毒技术。目前,该技术研究主要集中在国外,我国的相关报道为数不多,蔡斌华等^[16]利用该技术成功脱除草莓轻型黄斑病毒(SMYEV);曲先^[17]利用该技术成功脱除 PVY 和马铃薯 S 病毒(PVS)。为此,现就超低温处理技术进行综述,以增加人们对该技术的认识,并对其应用前景进行了简要探讨。

1 超低温处理的原理

20 世纪 50 年代,人们发现病毒在植物体内呈不均匀分布,顶端分生组织不含或只含有少量病毒^[18-19],将该部位组织进行培养能够获得脱毒的植株。超低温处理和茎尖剥离都是基于此理论,不同之处在于,茎尖剥离利用机械切割的方法获得植物顶端分生组织,而超低温处理是利用液氮超低温(-196℃)对植物细胞的选择性杀伤,得到存活的顶端分生组织^[15,20]。顶端分生组织能够在超低温处理后存活,与其本身的细胞特性有关。顶端分生组织位于茎尖和根尖,直径约 0.1 mm,长约 0.25 mm^[20]。这些细胞能够分裂和自我更新,具有排列紧密、体积小、立方形、核质比高、细胞质浓稠、无成熟液泡的特点^[12]。这样的细胞自由水含量低,在超低温环境中细胞质保持无定形状态,或产生不会造成细胞死亡的微小冰粒,从而存活^[21]。然而,具有成熟液泡的已分化细胞由于含有大量自由水,在超低温环境中会形成树枝状冰晶,这些冰晶破坏细胞的膜结构从而导致细胞死亡^[21]。正是由于超低温处理对细胞的选择性杀伤,保留顶端分生组织,杀伤含有病毒的其它细胞,所以经超低温处理繁殖而来的植株很可能是脱毒的。

2 超低温处理的优点

2.1 脱毒率不受茎尖大小的限制,操作简便易于推广

茎尖剥离受到茎尖大小的限制,存在脱毒率与成活率之间的矛盾。茎尖越小脱毒率越高,但是成活率越低;反之亦然^[19]。所以茎尖剥离通常采用 0.2~0.4 mm 的茎尖^[19,22-23]。此技术需要操作熟练的技术人员。不仅要求操作人员熟练使用解剖镜,而且要求操作精准迅速。因为剥离时间过长易造成茎尖褐化,降低成活率。超低温对植物细胞的选择性杀伤与细胞本身的特性有

关。因此,无论茎尖取的大还是小,能够在超低温处理后存活的细胞都只是顶端分生组织细胞和部分叶原基细胞,所以超低温处理不受茎尖大小的限制^[10,13-14]。该试验采用 1.0~1.5 mm 的茎尖为试材^[10,13-14]。1.5 mm 的茎尖肉眼可见,试验操作难度大大降低,剥取茎尖的速度也随之提高,可以在短时间内取得大量茎尖用于脱毒试验。而且,超低温处理不需要额外的仪器设备,一般的植物组织培养实验室都可以完成^[15,20]。液氮也是在多数国家都可以买到的药品。这些优势使得超低温处理成为操作简便、易于推广的植物脱毒技术。

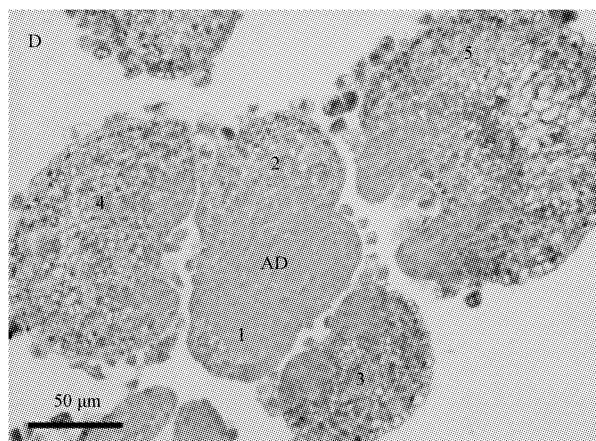


图 1 SPCSV 免疫组化染色后的甘薯(199004.2)茎尖横切切片^[11]

注:AD:顶端分生区;1~5:第 1 到第 5 叶原基;图中紫色部分显示 SPCSV 感染区域。

Fig. 1 Immunohistochemical localization of SPCSV in a cross-section of shoot tips of sweet potato line 199004.2^[11]

Note: AD: The apical dome of meristem; 1~5: The first leaf primordia to the fifth one; SPCSV infected cells are detected by purple staining.

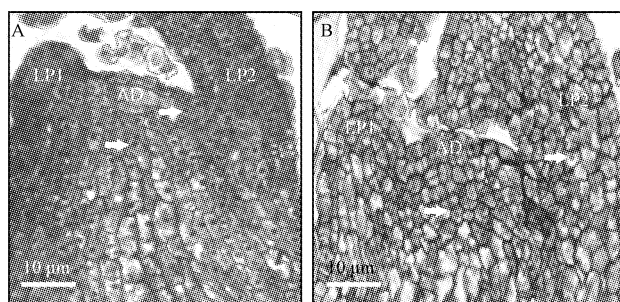


图 2 甘薯(199004.2)茎尖纵切切片^[11]

注:A:未经超低温处理的茎尖;B:超低温处理后,经过 1 d 复苏培养的茎尖;AD:顶端分生区;LP1:第 1 叶原基;LP2:第 2 叶原基;箭头所指为细胞核清晰可见的活细胞。

Fig. 2 Longitudinal sections of shoot tips of sweet potato line 199004.2^[11]

Note: A: A non-treated shoot tip; B: A cryo-treated shoot tip after 1 day of post-culture; AD: The apical dome of meristem; LP1: The first leaf primordium; LP2: The second leaf primordium. Surviving cells were recognized by densely stained nuclei (arrows).

2.2 试验周期短、成本低

茎尖剥离存在脱毒率与成活率之间的矛盾,所以现在常用的方法是热处理结合茎尖剥离。在 37~40℃ 条件下,病毒被钝化,在植物体内的传播速度变慢,而植物生长相对正常,因此在茎尖部位就会有更大的区域不含病毒,剥离茎尖时就可以剥取更大的茎尖^[24],这样就能在保证脱毒率的基础上提高成活率。但是,此方法增加了热处理的步骤,该步骤通常需要 30~40 d,这必然使试验成本提高,周期增长。通常情况下超低温处理不需要热处理,因此,超低温处理与热处理结合茎尖剥离相比,试验周期更短、成本更低(表 1)。

表 1 不同脱毒方法试验周期比较^[13]

Table 1 Analysis of time period required by different methods^[13] d

脱毒方法	预处理	热处理	复苏	再生	生根	总时间
超低温处理	3	0	10	28	14	55
茎尖剥离	0	0	10	35	14	59
热处理	0	28	10	35	14	87
热处理结合茎尖剥离	0	28	10	35	14	87

2.3 脱毒率高

超低温处理对细胞的选择性杀伤使得带病毒的植物细胞几乎全部死亡,存活的只是分生区和部分幼嫩叶原基细胞,而这些存活的细胞恰恰不含或只含有少量病毒^[15,20]。因此,超低温处理后再生的植株脱毒率很高(表 2)。

表 2 超低温处理与茎尖剥离脱毒率的比较^[20]

Table 2 Efficiency of virus eradication compared between cryotherapy and meristem culture^[20]

植物材料	病原名称	茎尖成活率/%		脱毒率/%		参考文献
		茎尖剥离	超低温处理	茎尖剥离	超低温处理	
香蕉	CMV	100	76	4	34	[9]
香蕉	BSV	100	76	76	90	[9]
葡萄	GVA	75	60	12	96	[14]
马铃薯	PLRV	55	87	56	85	[13]
马铃薯	PVY	55	87	62	93	[13]
李属根状茎	PPV	85	50	19	50	[8]
木莓	RBDV	60	30	0	35	[12]
柑橘	HLB	69	85	25	98	[25]
甘薯	SPCSV	100	87	100	100	[11]
甘薯	SPFMV	100	87	10	100	[11]
甘薯	SPLL	100	85	10	100	[10]

3 超低温处理的不足

3.1 种间差异大,针对不同品种需要分别建立超低温脱毒体系

植物品种不同,其组织特性、含水量以及对超低温的耐受程度必然有所不同。这就要求超低温处理试验针对不同植物品种分别建立合适的试验程序。比如合适的脱水剂种类、脱水剂浓度、脱水时间、脱水步骤等。这种差异甚至存在于同种植物的不同亚种之间^[15]。

3.2 茎尖成活率低

超低温处理需要对茎尖进行脱水、干燥、还要将茎

尖置于一196℃的液氮中。这些步骤必然对茎尖造成伤害,从而使成活率降低。脱水会降低茎尖细胞的活性;干燥茎尖所使用的玻璃化溶液含有聚乙二醇和二甲亚砜(DMSO),这 2 种药品对植物细胞有毒性作用^[15]。液氮超低温会将大部分茎尖细胞杀死,不仅使成活率降低,而且延长了茎尖复苏所用的时间,从几周到几个月不等,视植物品种而定^[15,22]。

4 超低温处理试验步骤

目前常用的超低温处理方法包括:包埋干燥法、玻璃化法、小滴玻璃化法、包埋玻璃化法^[20]。在进行超低温处理前,通常要对茎尖进行脱水和干燥,以强化茎尖对超低温的耐受能力^[21]。虽然超低温处理的试验方法很多,但是总体可以概括为以下几个步骤:一是以带毒的植物为材料进行组织培养建立试管苗体系;二是以机械切割的方式获得植物茎尖;三是对茎尖进行处理以增强其对干燥和超低温的耐受能力(通常是将茎尖培养于含有高浓度蔗糖的培养基上,使其脱水);四是干燥茎尖以增强其对超低温的耐受力(如无菌风干燥或玻璃化处理);五是液氮超低温处理(将茎尖置于液氮中);六是茎尖复苏及再生;七是再生植株的继代繁殖及相关检测;八是得到无毒的健康植株^[15,20]。

5 展望

超低温处理凭借其诸多优势很可能代替传统的茎尖剥离成为新一代植物脱毒技术。超低温处理基于超低温保存,理论上,只要能利用超低温保存保存种质的植物都可以用超低温处理进行脱毒^[15]。自从麝香石竹苗端的超低温保存成功以来,超低温保存已成功应用于约 200 种植物材料^[26],然而超低温处理目前只应用于十种植物,因此其应用前景非常广阔。不仅如此,经超低温处理成功脱毒的健康植物材料还可以利用试验筛选得到的超低温保存条件进行健康种质的长期保存,从而避免因长期组织培养造成的变异。

由植物种质差异而造成的超低温处理条件的不同已成为限制该方法应用的主要因素。因此,进一步对超低温处理的原理进行研究,找出影响冰晶形成的主要因素,筛选出相对通用的超低温处理方法将是未来研究的重点。

参考文献

- [1] 朱述钧,王春梅,陈浩. 抗植物病毒天然化合物研究进展[J]. 江苏农业学报,2006,22(1):86-90.
- [2] 陈芳,王子成. 植物脱毒新技术-低温疗法[J]. 河南农业科学,2006(12):11-13,81.
- [3] 曹雪松. 植物病毒在细胞内和细胞间运动的研究[J]. 莱阳农学院学报,2002,19(4):251-252.
- [4] 张振臣,李大伟,于嘉林,等. 植物病毒细胞间运动及运动蛋白基因介导的抗病性研究进展[J]. 农业生物技术学报,2000,8(4):403-408.
- [5] 洪健,陈集双,周雪平,等. 植物病毒的电镜诊断[J]. 电子显微学报,

1999,18(3):274-289.

- [6] Wei T, Zhang C, Hong J, et al. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO[EB/OL]. 2010, 6(6); e1000962[http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000962].
- [7] 陈齐斌,沈嘉祥. 抗植物病毒剂研究进展和面临的挑战与机遇[J]. 云南农业大学学报,2005,20(4):505-512.
- [8] Brison M, de Boucaud M T, Pierronnet A, et al. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. *Prunus* rootstock experimentally contaminated with plum pox potyvirus[J]. Plant Science, 1997, 123:189-196.
- [9] Helliott B, Panis B, Poumay Y, et al. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.) [J]. Plant Cell Reports, 2002, 20:1117-1122.
- [10] Wang Q C, Valkonen J P T. Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips[J]. Plant Pathology, 2008, 57:338-347.
- [11] Wang Q C, Valkonen J P T. Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato by shoot tip culture and cryotherapy[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 154:135-145.
- [12] Wang Q C, Wilmer J C, Minna-Liisa R, et al. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips[J]. Molecular Plant Pathology, 2008, 9(2):237-250.
- [13] Wang Q C, Liu Y, Xie Y H, et al. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of potato leafroll virus (PLRV) and Potato virus Y (PVY) [J]. Potato Research, 2006, 49:119-129.
- [14] Wang Q C, Munir Mawassi, Li P, et al. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L [J]. Plant Science, 2003, 165:321-327.
- [15] Wang Q C, Jari P T V. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method[J]. Trends in Plant Science, 2009, 14(3):119-122.
- [16] 蔡斌华,张计育,渠慎春,等. 通过玻璃化超低温处理脱除草莓轻型

黄边病毒(SMYEV)研究[J]. 果树学报, 2008, 25(6):872-876.

- [17] 曲先. 低温疗法脱除马铃薯病毒及遗传变异分析[D]. 郑州:河南大学, 2009.
- [18] Li W B, Hartung J S, Levy L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 66:104-115.
- [19] 孙琦,张春庆. 植物脱毒与检测研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2003, 34(2):307-310.
- [20] Wang Q C, Panis B, Engelmann F, et al. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation[J]. Annals of Applied Biology, 2009, 154:351-363.
- [21] 徐刚标,陈良昌. 植物种质超低温保存[J]. 经济林研究, 1998, 16(2):15-16, 53.
- [22] Faccioli G, Marani F. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting[M]. In: Hadidi A, Khetarpal RK, Koganezawa H (eds) Control of plant virus diseases. St. Paul: APS Press, 1998:346-380.
- [23] 高尚士. 花卉病毒病的检疫及消除方法[J]. 植物检疫, 1994(6):340-341.
- [24] 王永伟,王慧霞,贺丹,等. 观赏植物病毒病害及病毒脱除研究现状与发展趋势[J]. 中国农学通报, 2008, 24(5):313-317.
- [25] Ding F, Jin S X, Hong N, et al. Vitrification-cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberobacter asiaticus*, the citrus Huanglongbing pathogen, from *in vitro* adult shoot tips[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27:241-250.
- [26] 梁宏,王起华. 植物种质的玻璃化超低温保存[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(1):43-45.

(致谢:感谢西北农林科技大学园艺学院王乔春教授惠赠英文文献并指导试验;感谢种苗生物工程国家重点实验室各位老师的指导和支持;特别感谢邱文平教授,徐美隆老师和陈春伶老师对试验的指导。)

Research Progress of Plant Virus Eradication Using Super Low Temperature Processing

YANG Zhi^{1,2}, CHEN Chun-ling^{1,3}, XU Mei-long^{1,3}

(1. The National Center of Research and Engineering Technology of Economic Forest Tree Speedy Propagation, Yinchuan, Ningxia 750004; 2. College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 3. State Key Laboratory of Seeding Bio-engineering, Yinchuan, Ningxia 750004)

Abstract: Super low temperature processing is an emerging plant virus eradication technology based on cryopreservation and plant tissue culture. This method is independent of the size of shoot tips used with advantages of easy manipulation, short experimental period and high efficiency of pathogen eradication. The principle, advantages, disadvantages and steps of super low temperature processing were summarized in order to improve its understanding, and its application prospects were briefly discussed.

Key words: super low temperature processing; peel tubes; heat treatment; plant virus; virus eradication