

植物诱抗剂 AHO 联合茎尖培养脱除马铃薯 S 病毒和马铃薯 Y 病毒

张丽珍¹, 赵立华¹, 吴 阔¹, 陈永对¹, 苏晓霞¹, 张仲凯¹, 董家红^{2*}

(1. 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南省农业生物技术重点实验室, 农业部西南作物基因资源与种质创制重点实验室, 昆明 650205; 2. 云南中医药大学中药学院暨云南省南药可持续利用重点实验室, 昆明 650500)

摘要 研究了植物诱抗剂 3-丙酮基-3-羟基羧吲哚(3-acetyl-3-hydroxyoxindole, AHO)联合茎尖培养从试管苗中脱除马铃薯 S 病毒(PVS)、马铃薯 Y 病毒(PVY)的方法和效率。取 PVS 侵染的‘定薯 3 号’和‘定薯 4 号’以及 PVY 侵染的‘靖薯 3 号’和‘靖薯 4 号’的壮芽, 茎尖剥离后培养至 4~5 个叶片, 用 100 mg/L 植物诱抗剂 AHO 水剂喷施试管苗, 每隔 2 d 喷施一次, 共 3 次, 末次喷施 2 d 后取茎尖剥离培养, 获得再生试管苗。用电子显微镜负染色、ELISA、荧光定量 RT-PCR 检测再生试管苗的带病毒情况。结果显示, AHO 对 4 个品种的马铃薯试管苗生长无影响, 用 AHO 处理后再生茎尖剥离培养, 脱毒率均高于未处理的对照; 检测结果还显示 AHO 处理的马铃薯再生苗的带毒量也低于未处理的对照, 且随处理次数增加带毒量下降。研究结果表明, 利用植物诱抗剂 AHO 联合茎尖剥离培养方法可以提高脱除 PVS、PVY 的效率, 获得无病毒核心苗。

关键词 3-丙酮基-3-羟基羧吲哚; 茎尖培养; 马铃薯 S 病毒; 马铃薯 Y 病毒; 病毒脱除

中图分类号: S435.32 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2021418

Elimination of potato virus S and potato virus Y by plant resistance inducer AHO combined with shoot tip culture

ZHANG Lizhen¹, ZHAO Lihua¹, WU Kuo¹, CHEN Yongdui¹, SU Xiaoxia¹,
ZHANG Zhongkai¹, DONG Jiahong^{2*}

(1. *Biotechnology and Germplasm Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Yunnan Provincial Key Lab of Agricultural Biotechnology, Key Lab of Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Kunming 650205, China*; 2. *School of Chinese Materia Medica and Yunnan Key Laboratory of Southern Medicinal Resource, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China*)

Abstract Elimination method and efficiency of potato virus S (PVS) and potato virus Y (PVY) from *in vitro* plantlets by 3-acetyl-3-hydroxyoxindole (AHO), a plant resistance inducer, combined with shoot-tip culture were investigated. Shoot tips of PVS-infected ‘Dingshu No. 3’ and ‘Dingshu No. 4’ and PVY-infected ‘Jingshu No. 3’ and ‘Jingshu No. 4’ were cultured to 4–5 leaves, respectively. 100 mg/L AHO was sprayed on the *in vitro* plantlets every two days for three times, and shoot tips were cultured at two days after third spray to acquire the regenerated plantlets. Viruses in the regenerated plantlets were detected by electron microscope negative staining, ELISA and real time RT-PCR, respectively. The results showed that AHO had no effect on the growth of potato *in vitro* plantlets, and the virus-free *in vitro* plantlets ratio of AHO-treated plantlets was higher than that of untreated control. The test results also showed that the virus relative concentration of regenerated plantlets treated with AHO was lower than that of untreated control, and decreased with the increase of treatment times. The results showed that AHO combined with shoot-tip stripping culture could enhance the efficiency of PVS and PVY elimination, and virus-free stock plantlets could be obtained.

Key words 3-acetyl-3-hydroxyoxindole; shoot tip culture; potato virus S; potato virus Y; virus elimination

收稿日期: 2021-07-31 修订日期: 2021-11-20

基金项目: 云南省现代农业马铃薯产业技术体系建设项目(2019KJTX003); 云岭学者(2016–2020)

* 通信作者 E-mail: dongjhn@126.com

马铃薯是世界上继水稻、玉米、小麦后的第四大主粮作物。我国马铃薯年种植面积稳定在 500 万 hm^2 以上,在保障粮食安全、助力脱贫攻坚中起到重要作用。马铃薯的种薯繁殖主要靠无性繁殖,极易感染病毒,由于病毒在马铃薯体内的积累,造成马铃薯种性退化,品质与产量降低。能侵染马铃薯属的病毒有 40 余种,病毒病害是马铃薯产业的重要危害^[1-3]。近年的研究数据显示,马铃薯 S 病毒(potato virus S, PVS)、马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY)是我国马铃薯试管苗和种薯上检出率最高的 2 种病毒,检出率近 20%,高于其他病毒的检出率^[4-5]。有效控制马铃薯病毒病的主要方法是通过茎尖脱毒,然而传统的茎尖脱毒,较难脱除 PVS、PVY 等^[6]。使用抗病毒化合物病毒唑(ribavirin)干扰病毒复制,联合茎尖脱毒可成功脱除马铃薯 X 病毒(potato virus X, PVX)、马铃薯 M 病毒(potato virus M, PVM)、PVY 和 PVS,获得健康马铃薯植株^[7-11]。由于植物种类、品种、感染病毒种类的不同,病毒唑会对植物产生不同程度的毒性,即使在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度条件下,植株的生长也会受到严重影响^[8],在 0~150 mg/L 浓度范围,马铃薯试管苗株高和鲜重会随着病毒唑的浓度增加而降低^[12]。

3-乙酰基-3-羟基吲哚(3-acetyl-3-hydroxyoxindole, AHO)是从板蓝 *Strobilanthes cusia* 中分离得到的一种天然产物,对菊科白粉菌 *Erysiphe cichoracearum*、烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus)、番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt tospovirus)有较好的抑制效果^[13-15],作用机制研究表明,AHO 作用于植物水杨酸途径介导的防御反应而激活植物的系统获得抗性^[13,16],以抵抗病原菌的侵染。AHO 属于植物源的抗性诱导剂,能诱导植物产生抗性,抑制病毒在植物体内的复制、运动,且不影响植物正常生长。

本研究在继代培养前的马铃薯茎尖组织培养小苗上喷施 100 mg/L AHO 水剂,经过 3 次处理后,能快速有效地获得无病毒健康马铃薯再生苗,为生产马铃薯无病毒种苗提供了有效措施。

1 材料与方法

1.1 植物材料、诱抗剂及质粒

带病毒马铃薯材料为‘定薯 3 号’‘定薯 4 号’‘靖薯 3 号’‘靖薯 4 号’的薯块,经 ELISA、负染色

电镜观察方法检测,确定‘定薯 3 号’和‘定薯 4 号’的薯块携带 PVS,‘靖薯 3 号’和‘靖薯 4 号’的薯块携带 PVY。

AHO 干粉由中国科学院昆明植物所郝小江实验室提供,取 1 g AHO 干粉先溶于 1 mL 二甲基亚砜,然后用 ddH_2O 定容至 100 mL,获得 1% 的 AHO 水剂(浓度为 10 g/L)作为储存液,用细菌过滤器过滤后保存备用。使用时取储存液用 ddH_2O 稀释 100 倍(浓度为 100 mg/L)。

用于构建 PVS、PVY 荧光定量检测方法标准曲线的重组质粒为本实验室自制。

1.2 马铃薯茎尖剥离、茎尖组织培养、扩繁

马铃薯薯块用 10~20 mg/L 赤霉素溶液浸种 15~30 min,晾干后催芽至芽长 1~2 cm。取健壮芽,流水冲洗 30 min,无菌条件下用 75% 乙醇浸泡 30 s,无菌水冲洗 2 次;再用 0.1% 升汞浸泡 6 min,无菌水漂洗 5~8 次,消毒的外植体接种在 MS 培养基上^[17],培养获得马铃薯植株。剪取该马铃薯植株的茎尖,借助 40 倍双目解剖镜,剥离茎尖直至露出半圆形光滑的生长点,用锋利的无菌解剖针小心切取 0.2 mm 以下的带 1~2 个叶原基的茎尖,迅速接种于已准备好的茎尖培养基($\text{MS}+0.6 \text{ mg}/\text{mL}$ 6-BA + 0.3 mg/mL GA + 0.1 mg/mL NAA)上,于温度 20~25 $^{\circ}\text{C}$,光照 2 000~3 000 lx,每天光照 12 h 条件下培养,直至长成带 4~5 个叶片的完整马铃薯试管苗。每个试管苗植株可剪成 4~5 段扩繁,每隔一节带一片叶,切段直立地插入培养基中培养。

1.3 AHO 处理试管苗

培养 11 d 后,分别取带有 PVS 的‘定薯 3 号’和‘定薯 4 号’以及带有 PVY 的‘靖薯 3 号’和‘靖薯 4 号’的试管苗,各 24 株(平均株高 5 cm 左右),喷施 100 mg/L AHO 水剂,以喷施不含 AHO(其他条件相同)的溶液为对照,每隔 2 d 喷施 1 次,共喷施 3 次,再培养 2 d 后取试管苗测株高、根长和鲜重;剥离茎尖置于茎尖培养基培养长至 4~5 个叶片,用负染色电镜观察、ELISA 以及荧光定量 PCR 检测。

试验数据使用 Excel 2007、SPSS 23.0 软件进行统计分析。

1.4 负染色方法

马铃薯芽眼部分或者组培苗负染参考文献^[18]。取 0.5 g 病叶置于 20 μL 的 2.5% 戊二醛上切碎,将

铜网置于浸出液表面吸附 3 min, 吸干铜网表面液体后置于 1% 的钼氨酸 (m/V , 溶于 pH 7.2 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液) 染色 2 min。在透射电镜 (FEI TECNAI G2, USA) 下观察。

1.5 ELISA

采用 ELISA 对‘定薯 3 号’‘定薯 4 号’‘靖薯 3 号’‘靖薯 4 号’中的病毒进行检测。所检病毒包括 PVX、PVY、PVS、PLRV、PVA、TSWV、TZSV 和 PVM。TZSV 为本实验室自制抗体, 其余病毒的检测试剂盒购自美国 Agdia 公司, 按照说明书进行检测。阳性样品为本实验室保存, 阴性样品为健康马铃薯试管苗。

1.6 荧光定量 RT-PCR

用于荧光定量 RT-PCR 检测的引物采用 Primer 5 设计, 引物序列见表 1。用购自 Ambion 公司的

TRIzol 试剂提取样品总 RNA。用北京全式金公司 One-Step gDNA Removal 反转录试剂盒合成 cDNA 第一链, 用 FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 制备反应体系, 包括 cDNA 1 μL , 上、下游引物 (10 $\mu mol/L$) 各 2.5 μL , Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) 10 μL , ddH₂O 4 μL 。反应在 Applied Biosystems StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 荧光定量 PCR 仪上进行, 反应程序为: 95 $^{\circ}C$ 10 min; 95 $^{\circ}C$ 10 s, 57 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 30 s, 40 个循环。每个反应 5 个重复。

标准曲线: 用 Nano Drop 2000 测定重组质粒的 PVS 浓度为 141.70 ng/ μL , OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.83; PVY 浓度为 135.25 ng/ μL , OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.84。对重组质粒进行 10 倍连续梯度稀释, 作为病毒检测用阳性标准品, 用于构建标准曲线。

表 1 PVS 和 PVY 的检测引物

Table 1 Primers for detection of PVS and PVY

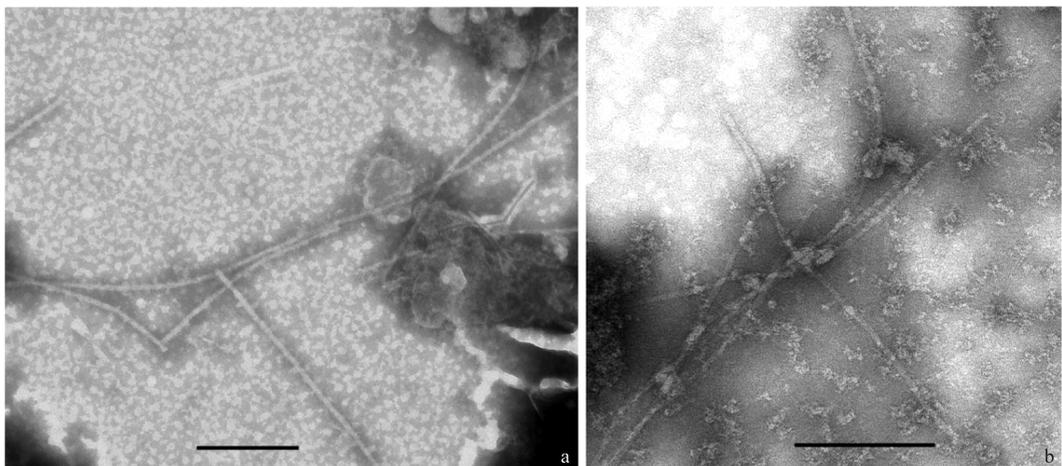
引物名称 Primer	序列(5'-3') Sequence	扩增片段长度/bp Length	参考病毒序列号 GenBank accession no. of reference virus
PVS-F	GCCGATTTGACACATTTCGAT	198	LC511880.1
PVS-R	CAATCTCAGCGCCAAGCAT		
PVY-F	TCGCCAAATGTCAACGGAGT	214	EF026076.1
PVY-R	CTAAACCCACATCCCGCAGA		

2 结果与分析

2.1 负染色电镜及 ELISA 检测种薯芽带毒种类

在‘定薯 3 号’‘定薯 4 号’‘靖薯 3 号’‘靖薯 4

号’的薯块新芽汁液中, 用电镜均观察到线状病毒粒子 (图 1), 未发现其他病毒粒子。ELISA 检测结果表明‘定薯 3 号’和‘定薯 4 号’的样品中带有 PVS, ‘靖薯 3 号’和‘靖薯 4 号’中带有 PVY, 没有检测到其他病毒。



a: ‘定薯3号’中的PVS, 标尺=200 nm; b: ‘靖薯3号’中的PVY, 标尺=200 nm

a: PVS particles in the saps of ‘Dingshu No.3’, bar=200 nm; b: PVY particles in the saps of ‘Jingshu No.3’, bar=200 nm

图 1 电镜观察到的病毒粒子

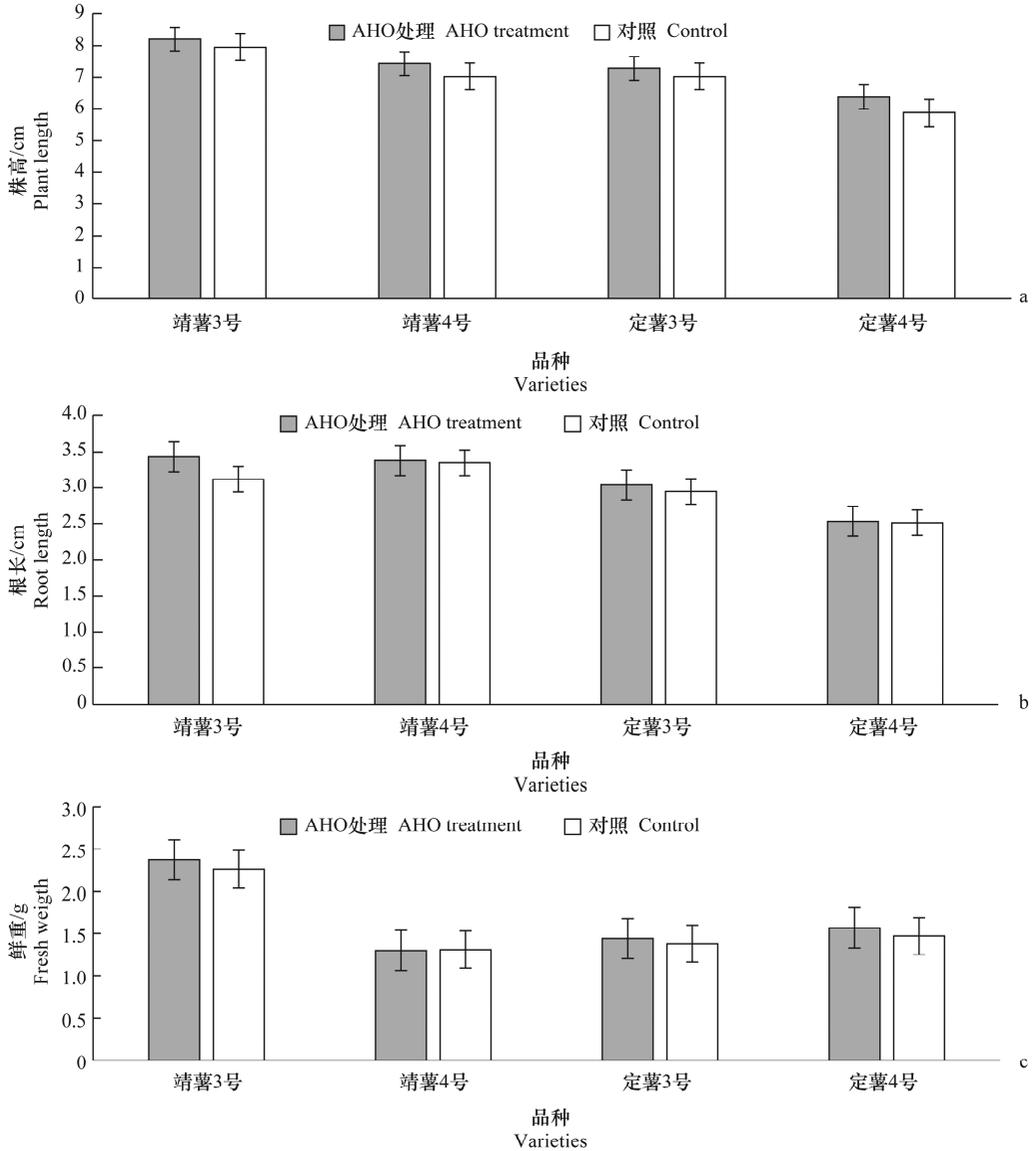
Fig. 1 Virus particles under the electron microscope

2.2 AHO 处理

2.2.1 AHO 处理对马铃薯试管苗生长的影响

携带 PVS 的‘定薯 3 号’和‘定薯 4 号’以及携带 PVY 的‘靖薯 3 号’和‘靖薯 4 号’的试管苗,喷施

3 次 100 mg/L 的 AHO 后 2 d(扩繁后的第 20 天)取试管苗测量株高(cm)、根长(cm)和鲜重(g)。由图 2 可见,喷施 100 mg/L AHO 的 4 个品种株高、根长和鲜重较对照略有增加,无不良影响。



误差线表示标准差,检测样品数为24个, $n=24$ 。a: 株高; b: 根长; c: 鲜重
Error bar represents standation deviation, 6 samples were detected, $n=24$. a: Plant length; b: Root length; c: Fresh weighth

图 2 AHO 对马铃薯试管苗生长的影响

Fig. 2 Effect of AHO on the growth of *in vitro* potato plantlets

2.2.2 ELISA 和电镜检测 AHO 处理后的试管苗

每个品种各挑选 24 株试管苗,分别用 100 mg/L AHO 喷施,对照不含 AHO(其他条件相同),每隔 2 d 喷施 1 次,共 3 次,末次喷施 2 d 后取试管苗再进行茎尖剥离脱毒,培养 30 d 后,取存活试管苗用 ELISA 检测 PVX、PVY、PVS、PLRV、PVA、TSWV、TZSV 和 PVM 等病毒,各品种均未检测到 PVX、PL-

RV、PVA、TSWV、TZSV 和 PVM,在‘定薯 3 号’和‘定薯 4 号’检测到 PVS,在‘靖薯 3 号’和‘靖薯 4 号’检测到 PVY,与用于脱毒的薯块检测结果一致,但 AHO 处理的试管苗阴性率要高于对照(表 2)。

进一步计算 ELISA 检测的 OD 值平均值发现,处理前、对照、AHO 处理的试管苗,PVS、PVY 的 ELISA 检测 OD 值平均值呈递减趋势(图 3)。

表 2 马铃薯试管苗存活率及病毒脱除率¹⁾Table 2 Survival rate and virus elimination rate of *in vitro* potato plantlets

处理 Treatment	定薯 3 号 Dingshu No. 3		定薯 4 号 Dingshu No. 4		靖薯 3 号 Jingshu No. 3		靖薯 4 号 Jingshu No. 4	
	苗存活率/% Survival rate	PVS 脱除率/% PVS elimination rate	苗存活率/% Survival rate	PVS 脱除率/% PVS elimination rate	苗存活率/% Survival rate	PVY 脱除率/% PVY elimination rate	苗存活率/% Survival rate	PVY 脱除率/% PVY elimination rate
	AHO 处理 AHO treatment	45.8(11/24)	18.2(2/11)	58.3(14/24)	21.4(3/14)	50.0(12/24)	8.3(1/12)	54.2(13/24)
对照 Control	58.3(14/24)	0.0(0/14)	50.0(12/24)	8.3(1/12)	54.2(13/24)	7.7(1/13)	54.2(13/24)	0.0(0/13)

1) 在存活率列的括号中分子代表存活试管苗株数,分母代表起始试管苗总株数;在脱除率列的括号中分子代表获得的无病毒试管苗株数,分母代表存活株数。

Numerator and denominator in the bracket of survival rate column represent survival numbers and total numbers of *in vitro* plantlets, respectively. Numerator and denominator in bracket of elimination rate column represent virus-free plantlet numbers and survival *in vitro* plantlets, respectively.

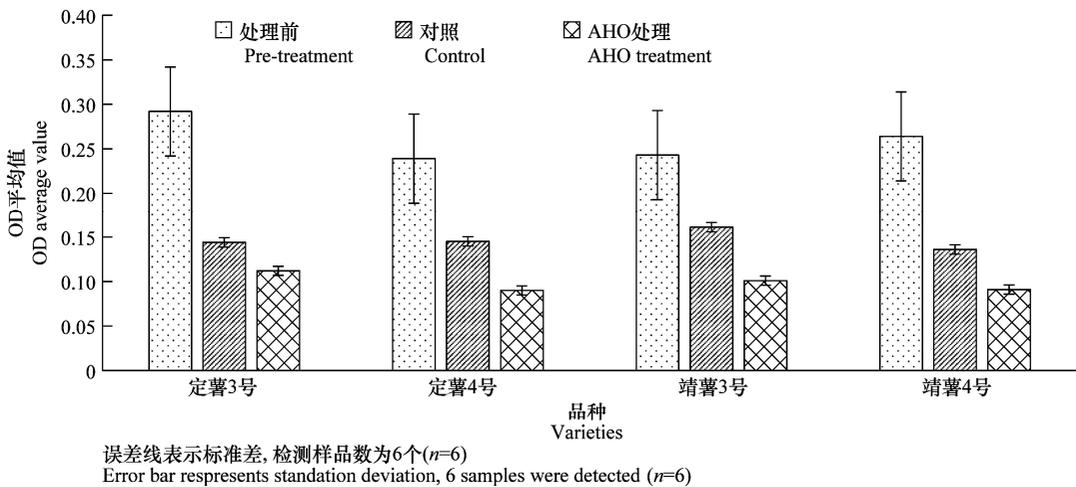


图 3 处理前、对照、AHO 处理的马铃薯试管苗 ELISA 检测

Fig. 3 ELISA detection for *in vitro* potato plantlets of pre-treatment, control and AHO-treatment

抽取每个处理 ELISA 检测值最低的试管苗进行负染色电镜观察验证,结果见表 3、4,电镜观察显

示处理前、对照、AHO 处理的试管苗中的病毒粒子数量也呈下降趋势。

表 3 ‘定薯 3 号’和‘定薯 4 号’试管苗处理前、对照、AHO 处理 ELISA 和电镜负染色检测¹⁾Table 3 ELISA and electron microscope (EM) negative staining detection of ‘Dingshu No. 3’ and ‘Dingshu No. 4’ *in vitro* plantlets of pre-treatment, control and AHO-treatment

处理前 Pre-treatment			对照 Control			AHO 处理 AHO-treatment		
品种及编号 Variety and no.	PVS ELISA	电镜检测 EM observation	品种及编号 Variety and no.	PVS ELISA	电镜检测 EM observation	品种及编号 Variety and no.	PVS ELISA	电镜检测 EM observation
定薯 3 号-1 Dingshu No. 3-1	0.296	++LV	定薯 3 号-2 Dingshu No. 3-2	0.156	+LV	定薯 3 号-3 Dingshu No. 3-3	0.159	+LV
定薯 3 号-2 Dingshu No. 3-2	0.288	+LV	定薯 3 号-3 Dingshu No. 3-3	0.187	+LV	定薯 3 号-4 Dingshu No. 3-4	0.070	—
			定薯 3 号-8 Dingshu No. 3-8	0.082	+—LV	定薯 3 号-8 Dingshu No. 3-8	0.072	—
			定薯 3 号-14 Dingshu No. 3-14	0.210	++LV	定薯 3 号-10 Dingshu No. 3-10	0.089	+—LV

续表 3 Table 3(Continued)

处理前 Pre-treatment			对照 Control			AHO 处理 AHO-treatment		
品种及编号 Variety and no.	PVS ELISA	电镜检测 EM observation	品种及编号 Variety and no.	PVS ELISA	电镜检测 EM observation	品种及编号 Variety and no.	PVS ELISA	电镜检测 EM observation
定薯 4 号-1 Dingshu No. 4-1	0.195	++LV	定薯 4 号-2 Dingshu No. 4-2	0.199	++LV	定薯 4 号-5 Dingshu No. 4-5	0.089	+LV
			定薯 4 号-3 Dingshu No. 4-3			0.169		
定薯 4 号-2 Dingshu No. 4-2	0.283	+LV	定薯 4 号-8 Dingshu No. 4-8	0.092	+-LV	定薯 4 号-7 Dingshu No. 4-7	0.066	—
			定薯 4 号-11 Dingshu No. 4-11			0.074		

1) LV 表示线状病毒粒子; ++ 表示样品观察 30 个视野能观察到 >30 个病毒粒子; + 表示每个样品观察 30 个视野能观察到 10~30 个病毒粒子; +- 表示每个样品观察 30 个视野能观察到 <10 个病毒粒子; - 表示未能观察到病毒粒子。处理前和处理的试管苗扩繁于同一母株的试管苗, 属于同一批次, 一部分用于处理前检测, 另一部分用作对照及 AHO 处理。下同。

LV represents filamentous virus particles. ++ represents more than 30 virus particles were observed every 30 views/sample. + represents 10-30 virus particles were observed every 30 views/sample. +- represents less than 10 virus particles were observed every 30 views/sample. - represents no virus particle was observed. The *in vitro* plantlets used as pre-treatment, control, and AHO-treatment were multiplied from one same stock plantlet. The same applies below.

表 4 ‘靖薯 3 号’和‘靖薯 4 号’试管苗处理前、对照、AHO 处理 ELISA、电镜负染色检测

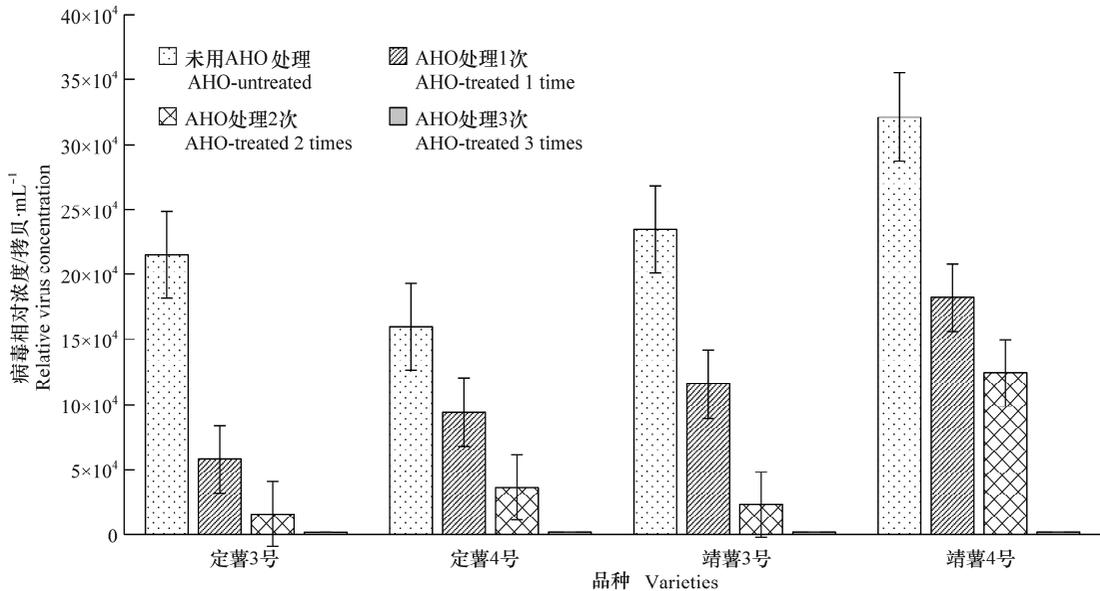
Table 4 ELISA and electron microscope (EM) negative staining detection of ‘Jingshu No. 3’ and ‘Jingshu No. 4’ *in vitro* plantlets of pre-treatment, control and AHO-treatment

处理前 Pre-treatment			对照 Control			AHO 处理 AHO-treatment		
品种及编号 Variety and no.	PVY ELISA	电镜检测 EM observation	品种及编号 Variety and no.	PVY ELISA	电镜检测 EM observation	品种及编号 Variety and no.	PVY ELISA	电镜检测 EM observation
靖薯 3 号-1 Jingshu No. 3-1	0.196	++LV	靖薯 3 号-2 Jingshu No. 3-2	0.072	—	靖薯 3 号-2 Jingshu No. 3-2	0.046	—
			靖薯 3 号-4 Jingshu No. 3-4			0.204		
靖薯 3 号-2 Jingshu No. 3-2	0.289	+LV	靖薯 3 号-6 Jingshu No. 3-6	0.197	+LV	靖薯 3 号-6 Jingshu No. 3-6	0.106	+LV
			靖薯 3 号-11 Jingshu No. 3-11			0.092		
靖薯 4 号-1 Jingshu No. 4-1	0.285	+LV	靖薯 4 号-2 Jingshu No. 4-2	0.197	++LV	靖薯 4 号-2 Jingshu No. 4-2	0.056	—
			靖薯 4 号-4 Jingshu No. 4-4			0.084		
靖薯 4 号-2 Jingshu No. 4-2	0.243	++LV	靖薯 4 号-7 Jingshu No. 4-7	0.092	+LV	靖薯 4 号-7 Jingshu No. 4-7	0.099	+LV
			靖薯 4 号-12 Jingshu No. 4-12			0.196		

2.2.3 荧光定量 RT-PCR 检测病毒相对量

为证实 AHO 对病毒的抑制作用, 用荧光定量 RT-PCR 对分别喷施 1、2、3 次 AHO 的马铃薯试管苗进行病毒相对量检测, 检测结果见图 4。抑制率由病毒相对浓度计算而得, 计算公式: 抑

制率 = (1 - 喷施 AHO/不喷施 AHO) × 100%。由图 4 可知, AHO 对‘定薯 3 号’‘定薯 4 号’和‘靖薯 3 号’‘靖薯 4 号’试管苗中的 PVS 和 PVY 具有显著的抑制效果, 喷施 3 次后, 抑制率可达 99.97% 以上。



AHO未处理、AHO处理1次、AHO处理2次的试管苗是同一个试管苗分别在AHO处理前、处理1次和2次后取样进行荧光定量RT-PCR检测; AHO处理3次是指第3次喷施后2天取茎尖分离培养后的试管苗,并用ELISA检测为阴性。误差线表示标准差, $n=6$
 One same *in vitro* plantlet were collected for real time RT-PCR detection Pre-AHO-treated, and 1 time and 2 times post AHO-treated. AHO-treated 3 times means shoot tips of treated in plantlets were stripped and cultured to 4-5 leaves *in vitro* plantlets, which were negative samples by ELISA testing. Error bar represents standard deviation, $n=6$

图 4 AHO 处理后马铃薯试管苗中病毒相对量

Fig. 4 Virus relative concentration of *in vitro* plantlets

3 讨论

马铃薯大田种薯和试管苗样品中 PVS、PVY 的检测率较高^[4-5],可能与这两种病毒较难通过茎尖培养脱除有关。AHO 能诱导植物产生系统性抗性,本研究用 100 mg/L AHO 喷施携带 PVS 的‘定薯 3 号’‘定薯 4 号’和携带 PVY 的‘靖薯 3 号’‘靖薯 4 号’的试管苗,茎尖剥离培养后,发现用 AHO 处理与对照的苗存活率均在 50%,株高、根长、鲜重无显著差异(图 2),说明 AHO 对‘定薯 3 号’‘定薯 4 号’‘靖薯 3 号’‘靖薯 4 号’的试管苗无毒性;病毒检测发现,携带 PVS 的‘定薯 3 号’和‘定薯 4 号’试管苗用 AHO 处理后 PVS 阴性率为 19.80%,未处理的试管苗 PVS 阴性率为 4.17%;用 AHO 处理的‘靖薯 3 号’和‘靖薯 4 号’试管苗 PVY 阴性率为 11.85%,未处理的为 3.84%。ELISA 检测显示,带毒试管苗检测到病毒 OD 值,相对未处理呈下降趋势(图 3)。负染色电镜观察显示,用 AHO 处理,带毒试管苗平均每 30 个视野观察的病毒粒子低于未处理(表 3、4)。荧光定量 RT-PCR 检测了未处理、处理 1 次、2 次、3 次后(第 3 次的取 ELISA 检测为阴性的试管苗),对 PVS、PVY 具有显著的抑制效果(图 4),抑制率高于 99.97%。通常马铃薯病毒的脱除效率依据病毒种类、病毒量等特性,往往需要茎尖

剥离 3 次以上,才能普遍获得无毒(或检测不到病毒)的试管苗,我们的研究表明,使用 AHO 处理后,提高了病毒的脱除效率。茎尖分生组织培养技术是获得马铃薯无病毒苗非常有效的方法,但脱毒效率往往会受到茎尖分生组织大小、病毒特性、品种的影响,在分生组织培养前,通过热处理、冷冻处理、病毒唑或几种方法联合可以提高脱除病毒的效率^[11],但因病毒唑的植物毒性,会降低茎尖分生组织存活率^[19-20]。本文使用的 AHO 除对植物有较好的诱抗作用外,与对比较并没有植物毒性,为有效脱除马铃薯病毒提供了一个可选的方法。

参考文献

- [1] 郭志乾,董凤林. 马铃薯病毒性退化与防治[J]. 中国马铃薯, 2004, 8(1): 48-49.
- [2] SALAZAR L F. Potato virus and their control [M]. Lima: International Potato Center, 1996: 19.
- [3] WANG Biao, MA Yanli, ZHANG Zhibo, et al. Potato virus in China [J]. Crop Protection, 2011, 30(9): 1117-1123.
- [4] 范国权,白艳菊,高艳玲,等. 我国马铃薯主产区病毒病发生情况调查[J]. 黑龙江农业科学, 2014, 27(3): 68-72.
- [5] 张丽珍,董家红,郑宽瑜,等. 云南省马铃薯脱毒试管苗和微型薯病毒检测与分析[J]. 中国马铃薯, 2015(1): 42-45.
- [6] 吴兴泉,时妍,杨庆东. 我国马铃薯病毒的种类及脱毒种薯生产过程中病毒的监测[J]. 中国马铃薯, 2011, 25(6): 363-366.

这些研究结果对于草地贪夜蛾在陕西省的适生性分布预测及田间种群监测具有重要意义。

参考文献

- [1] 杨学礼, 刘永昌, 罗茗钟, 等. 云南省江城县首次发现迁入我国西南地区的草地贪夜蛾[J]. 云南农业, 2019(1): 72.
- [2] 姜玉英, 刘杰, 吴秋琳, 等. 我国草地贪夜蛾冬繁区和越冬区调查[J]. 植物保护, 2021, 47(1): 212 - 217.
- [3] 赵琳超, 廖用信, 陈壮美, 等. 不同温度对草地贪夜蛾幼虫和蛹生长发育的影响[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2020, 43(1): 41 - 47.
- [4] 张红梅, 尹艳琼, 赵雪晴, 等. 草地贪夜蛾在不同温度条件下的生长发育特性[J]. 环境昆虫学报, 2020, 42(1): 52 - 59.
- [5] 鲁智慧, 和淑琪, 严乃胜, 等. 温度对草地贪夜蛾生长发育及繁殖的影响[J]. 植物保护, 2019, 45(5): 27 - 31.
- [6] 谢殿杰, 张蕾, 程云霞, 等. 不同饲养温度对草地贪夜蛾过冷却点和体液冰点的影响[J]. 植物保护, 2020, 46(2): 62 - 71.
- [7] 张红梅, 王燕, 尹艳琼, 等. 卵和蛹短时高温对草地贪夜蛾生长发育的影响[J]. 植物保护学报, 2020, 47(4): 831 - 838.
- [8] 王冀, 江志红, 丁裕国, 等. 21 世纪中国极端气温指数变化情况预估[J]. 资源科学, 2008(7): 1084 - 1092.
- [9] 马昱, 马春森. 气候变化下极端高温对昆虫种群影响的研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2016, 46(5): 556 - 564.
- [10] 洪波, 程登发, 吐尔逊, 等. 新疆地区马铃薯甲虫发育与温度关系的研究[J]. 植物保护, 2009, 35(6): 60 - 63.
- [11] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] 但建国, 梁广文, 庞雄飞. 不同温度条件下小菜蛾实验种群的研究[J]. 华南农业大学学报, 1995(3): 11 - 16.
- [13] 徐盼, 徐志宏, 李绍进, 等. 不同温度下康氏粉蚧实验种群生命表[J]. 昆虫学报, 2012, 55(12): 1362 - 1367.
- [14] 韩兰芝, 翟保平, 张孝羲. 不同温度下的甜菜夜蛾实验种群生命表研究[J]. 昆虫学报, 2003(2): 184 - 189.
- [15] 谢殿杰, 张蕾, 程云霞, 等. 不同温度下草地贪夜蛾年龄-阶段实验种群两性生命表的构建[J]. 植物保护, 2019, 45(6): 20 - 27.
- (责任编辑: 田 喆)
-
- (上接 245 页)
- [7] KLEIN R, LIVINGSTON C. Eradication of potato virus X from potato by ribavirin treatment of cultivated potato shoot tips [J]. American Journal of Potato Research, 1982, 59: 359 - 365.
- [8] WAMBUGU F M, SECOR G A, GUDMESTAD N C. Eradication of potato virus Y and S from potato by chemotherapy of cultured axillary bud tips [J]. American Potato Journal, 1985, 62: 667 - 672.
- [9] GRIFFITHS H M, SLACK S A, DODDS J H. Effect of chemical and heat therapy on virus concentrations in *in vitro* potato plantlets [J]. Canadian Journal of Botany, 1990, 68: 1515 - 1521.
- [10] KUSHNARENKO S, ROMADANOVA N, ARALBAYEVA M. Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient *Potato virus M* and *Potato virus S* eradication in potato (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* shoots [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2017, 53: 425 - 432.
- [11] GONG Huiling, IGIRANEZA C, DUSENGEMUNGU L. Major *in vitro* techniques for potato virus elimination and post eradication detection methods [J]. American Journal of Potato Research, 2019, 96: 379 - 389.
- [12] YANG Lijie, NIE Bihua, LIU Jun, et al. A reexamination of the effectiveness of ribavirin on eradication of viruses in potato plantlets *in vitro* using ELISA and quantitative RT-PCR [J]. American Journal of Potato Research, 2014, 91: 304 - 311.
- [13] LI Yanmei, ZHANG Zhongkai, JIA Yantao, et al. 3-Acetyl-3-hydroxyoxindole: a new inducer of systemic acquired resistance in plants [J]. Plant Biotechnology Journal, 2008, 6(3): 301 - 308.
- [14] 陈永对, 刘春明, 李宏光, 等. 植物源天然产物 AHO 对烟草花叶病毒的田间防效试验[J]. 中国植保导刊, 2013, 33(4): 45 - 48.
- [15] 陈永对, 张洁, 吴阔, 等. 植物源天然产物 AHO 对番茄斑萎病毒属病毒病的田间防效[J]. 南方农业学报, 2014, 45(12): 2167 - 2171.
- [16] CHEN Yongdui, DONG Jiahong, BENNETZEN J L, et al. Integrating transcriptome and microRNA analysis identifies genes and microRNAs for AHO-induced systemic acquired resistance in *N. tabacum* [J/OL]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 12504. DOI: 10.1038/S41598-017-12249-y.
- [17] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. Physiologia Plantarum, 1962, 15: 473 - 479.
- [18] 方琦, 丁铭, 董家红, 等. 云南澳洲坚果苗木感染番茄斑萎病毒属病毒初报[J]. 园艺学报, 2013, 40(2): 350 - 354.
- [19] CASSELLS A C, LONG R D. The elimination of potato viruses X, Y, S and M in meristem and explant cultures of potato in the presence of virazole [J]. Potato Research, 1982, 25: 165 - 173.
- [20] KARIMPOUR S, DAVARYNEJAD G, AGHL M Z, et al. *In vitro* thermotherapy and thermo-chemotherapy approaches to eliminate some viruses in *Pyrus communis* L. cv. 'Natanz' [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2020, 22(6): 1645 - 1653.
- (责任编辑: 田 喆)