

菌克毒克防治烟草普通花叶病毒(TMV)及对病程相关蛋白的诱导作用研究

杜春梅 李浩戈 赵秀香 吴元华 贝纳新

(沈阳农业大学 沈阳 110161)

摘要 1998~1999年在室内进行了菌克毒克防治TMV药效试验。室内结果表明,使用菌克毒克150倍液、200倍液、250倍液预防烟草花叶病毒的防效依次为82.2%、70%、61.1%。

抗病毒剂菌克毒克注射于珊西烟(*Nicotiana tabacum* var. Xanthi nc)下部叶片,上部叶片接种TMV,结果菌克毒克诱导上部未注射叶片对TMV侵染的抗性对侵染的抑制率为65.5%~82.6%,对菌克毒克处理叶片及上部叶未处理叶片细胞间液中的病程相关蛋白进行电泳分析,结果表明,菌克毒克可系统地诱导珊西烟产生7种健康植株所没有的PR蛋白,PR蛋白的诱导与抗病性、耐病性的诱导相一致。

关键词 菌克毒克 烟草花叶病毒 药效 诱导抗性 病程相关蛋白

菌克毒克(宁南霉素)是从诺尔斯霉菌西昌变种(*Streptomyces nousei* var. xichangensis)的发酵液中分离的一种新抗生素,经纯化、紫外光谱、红外光谱、核磁共振、水解产物分析等研究,证明为胞嘧啶核苷胺型抗生素,对革兰氏阴性和阳性细菌具抑制作用,并证实对烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)有防治作用^[1,2]。另外,国内外曾报道了多种物质如阿司匹林、水杨酸^[3]、83增抗剂^[4]等能诱导植物产生对

病毒的抗性,并且这种诱导抗性与病程相关蛋白(Pathogenesis-related proteins, PR)有关^[5]。经1998~1999年室内试验及1999年的田间小区对比试验和大田示范,探讨了菌克毒克对烟草花叶病毒的防治效果,并以珊西烟和TMV组成的病害系统为研究对象,进一步探明了菌克毒克诱导抗病性与PR蛋白之间的关系,现报道如下。

杜春梅,博士研究生,主要从事植物病毒学研究。

收稿日期:2000-06-05

和中感的范围;缺乏高抗的对照。在本研究以前,也没有人提出过实用的鉴定烟草对CMV的抗性指数分级标准,作者参考有关文献^[2,4],并结合鉴定结果的实际情况,提出了前述抗性划分标准,该划分标准可在实际应用中根据对照品种抗性指数作适当调整。根据本研究的结果和体会,现提出如下标准对照品种作为室内鉴定烟草对CMV抗性时的对照品种,供烟草种质资源研究者参考。高抗对照:神农大叶烟或通州;中抗对照:TI245或铁把子;中感对照:K326或RG17;高感对照:亮黄或G-28。并规定接种强度为亮黄和G-28发病株率达90%~99%。

参考文献

- 1 全国烟草侵染性病害调查研究总结报告. 全国烟草侵染性病害调查研究协作组. 1992
- 2 李丽丽,等. 油菜种质资源抗病毒病鉴定研究. 作物品种资源, 1992(2):32~42
- 3 林奇英,等. 烟草品种对病毒病的抗性鉴定. 中国烟草, 1987(3):16~17
- 4 作物品种资源研究方法. 中国农科院作物品种资源所. 农业出版社, 1985. 218
- 5 Fulton R W. Resistance in the tobacco to CMV infection (Abatr). Phytopath, 1953, 43:472

Study on tobacco germplasm screening for resistance to CMV

Wang Fenglong Shi Jiao Qian Yumei Wang Jinbo Shi Wanhua Han Xiaodong
(Qingzhou Tobacco Research Institute, CNTC Qingzhou, Shandong 262500)

Abstract

Of 922 accessions of *N. tabacum*, 16 accessions showed high resistance, 165 accessions showed middle resistance, 416 accessions showed middle susceptible and 325 accessions showed high susceptible to cucumber mosaic virus (CMV) when screened using artificial inoculation.

Key words: Tobacco; Germplasm; CMV; Resistance identification

(责任编辑 徐建华)

1 材料和方法

1.1 材料

供试药剂 2%菌克毒克(宁南霉素)烟草专用型,黑龙江强尔生化技术开发有限公司生产。农药登记号为:LS981485。

1.2 室内试验方法

1.2.1 供试毒源 烟草花叶病毒(TMV)繁殖保存在感病烟草品种 NC89 上。

1.2.2 供试植株 枯斑寄主心叶烟防虫温室中培养幼苗。

1.2.3 菌克毒克对 TMV 侵染的保护作用 选取长势一致的心叶烟幼苗,先喷施菌克毒克,以喷清水作对照,48h、24h 后汁液摩擦接种处理叶片,处理 10 株,重复 3 次。调查心叶烟枯斑数,计算病斑抑制率。

病斑抑制率(%) $\times (1 - \text{处理叶枯斑数} / \text{对照叶枯斑数}) \times 100\%$

1.2.4 菌克毒克对 TMV 侵染的治疗作用 选长势一致的心叶烟,先用汁液摩擦接种 TMV,一定时间后喷施菌克毒克,以清水为对照,每处理 10 株,重复 3 次,调查心叶烟枯斑数,计算病斑抑制率。

1.3 PR 蛋白的提取

1.3.1 药剂处理 菌克毒克稀释 150 倍,通过叶片下表皮注射法施与第 5 片真叶,以注射清水为对照。

1.3.2 接种 提纯 TMV 加适量金刚砂,摩擦接种于珊西烟叶面,接种浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,以烟株第 5 片真叶产生 50~100 个枯斑为宜,根据菌克毒克处理叶片及同一叶位对照叶片的枯斑数计算出侵染抑制率。

1.3.3 蛋白提取 参考 Parent J. G. (1984)^[6]及 Rathmoll, W. G. (1974)^[7]的方法提取植物叶片细胞间液。分别采收接种 TMV 的全株叶片、下部注射菌克毒克及上部未注射菌克毒克的叶片。切去主脉,将叶片切口向上,放入烧杯,注入重蒸水。在真空器内通过反复抽气减压,使细胞间隙充满重蒸水,取出叶片,用滤纸吸去叶片表面附着的多余水分,放入离心管中,4000r/min 离心 15min,获取细胞间液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.3.4 电泳方法 SDS-PAGE 采用不连续系统,分离胶中聚丙烯酰胺浓度 12%,浓缩胶中浓度为 4%,胶厚 0.8mm,电泳缓冲液 0.02mol/L Tris-HCl,0.0192mol/L 甘氨酸 0.1% SDS 80V/6h,电泳后固定、染色、脱色、调查。

2 结果与分析

2.1 室内试验结果

2.1.1 菌克毒克对 TMV 侵染的保护作用 由表 1 可知,菌克毒克对 TMV 枯斑寄主心叶烟有较好的保护作用,接种前 24h 喷药 150 倍液处理防效达 82.2%。优于接种前 48h 和 24h 的其它几种喷药处理,但如果药剂与病毒混合 10min 后再接种,病斑抑制率可达 95.5%,说明药剂对病毒在体外有很好的钝化作用。

2.1.2 菌克毒克对 TMV 侵染的治疗作用 由表 2 可知,菌克毒克对 TMV 枯斑寄主心叶烟有一定的治疗作用,接种后 24h 150 倍液、200 倍液和 250 倍液处理分别可达 50%、46.7%、41.1% 的防效。

2.2 菌克毒克诱导珊西烟对 TMV 侵染的抗性

表 1 菌克毒克对 TMV 侵染的保护作用

处 理	心叶烟	
	每叶枯斑数/个	病斑抑制率/%
接种前 48h 喷药		
150 倍	30	66.7
200 倍	30	66.7
250 倍	44	51.7
接种前 24h 喷药		
150 倍	16	82.2
200 倍	27	70.0
250 倍	35	61.1
药剂与病毒混合 10min	4	95.5
CK	90	

注:3 次重复平均值

表 2 菌克毒克对 TMV 侵染的治疗作用

处 理	心叶烟	
	每叶枯斑数/个	病斑抑制率/%
接种后 48h 喷药		
150 倍	45	50.0
200 倍	48	46.7
250 倍	53	41.1
接种后 24h 喷药		
150 倍	49	45.6
200 倍	54	40.0
250 倍	99	34.4
CK	90	

注:3 次重复平均值

表 3 菌克毒克诱导珊西烟对 TMV 的抗性

叶位	每叶枯斑数/个		侵染抑制率/%
	水	菌克毒克	
8	78.5	27.1	65.5
7	102.4	17.8	82.6
6	87.6	20.7	76.4

注:3 次重复平均值

于珊西烟下部第 5 片真叶注射菌克毒克或水 7d 后,在第 6 片、第 7 片、第 8 片真叶接种 TMV。结果表明,经菌克毒克处理后,上部叶片抗 TMV 侵染的能力提高,枯斑数目降低,侵染抑制率达到 65.5%~82.6%(表 3)。

2.3 菌克毒克诱导 PR 蛋白的产生

珊西烟下部第 5 片真叶注射菌克毒克或水,一周后,各处理样品经真空抽渗、离心获得细胞间隙可溶性蛋白。经电泳检测获得细胞间隙 PR 蛋白区带,从电泳图谱可见,被 TMV 侵染的以及经菌克毒克处理的植株的叶片皆显示出 7 条健康植株以及水处理所没有的蛋白区带。从电泳图谱可以看出,同一株珊西烟上,菌克毒克注射下部叶片后,不但注射叶产生 PR 蛋白,而且上部未注射叶也产生这种蛋白。说明菌克毒克可系统地诱导 PR 蛋白的产生。

3 结论与讨论

当前,植物病毒病害的药剂防治已成为当今世界植病学

科前沿领域的热点问题,受到越来越广泛的重视,研究人员正从天然和合成两方面开展抗植物病毒药剂的研制工作。1995年一种新型农用抗生素宁南霉素(菌克毒克)被报道^[1],并证实对烟草花叶病毒有抑制作用。本研究温室测定结果表明,菌克毒克对TMV引起的烟草花叶病具有明显的保护作用 and 一定的治疗作用,有降低病毒浓度、缓解症状表现的效应。

关于PR蛋白与植物诱导抗性之间的关系已引起人们的很大兴趣。Antoniw(1986)^[5]曾指出,PR蛋白与病毒的局限化相关,它可能参与病毒在寄主体内的局限化过程,孙凤成等(1995)^[9]认为耐病毒诱导剂88-D可系统性地诱导珊西烟对TMV的抗性,同时,它对PR蛋白的诱导也是系统性的,抗性的提高与PR蛋白的诱导相一致。还有研究认为,在PR蛋白中,有些蛋白具有几丁质酶^[10]和葡聚糖酶^[11]的活性,尤其PR蛋白中含有病毒复制抑制因子(IVF)的发现^[12],再次证明了PR蛋白与植物诱导抗性之间的关联。因此,研究抗植物病毒剂对PR蛋白的诱导能力,是了解抗病毒剂能否具有诱导抗性作用的一个重要内容。本研究表明,菌克毒克能系统性的诱导珊西烟对TMV的抗性及耐病性,同时,它也系统地诱导植株产生PR蛋白。因此,诱导PR蛋白的产生可能是菌克毒克提高寄主抗病性、抑制TMV侵染的机制之一。

菌克毒克作为一种新型的胞嘧啶核苷类农用抗生素,其如何抑制病毒的复制,降低病毒在植物体内的浓度以及植物不被病毒危害等许多问题还需进一步研究探讨。

参考文献

- 1 向固西,胡厚之,等.一种新的农用抗生素-宁南霉素.微生物学报,1995,35(5):368~374
- 2 赵秀榆,李朝荣,等.宁南霉素防治烟草花叶病毒应用技术研究及示范推广.植保技术与推广.1998,18(6):36~37
- 3 White,R.F.and Antoniw J.F.Crop Protection 1983,2(3)259~271
- 4 Li,Huafang,White,R.F.and Antoniw,J.F.J. Phytopathol. 1990,128:299~305
- 5 Antoniw J.F.and White,R.F.Plant Mol. Biol. 1986,6:145~149
- 6 Parent J.G.and Asselin,A.Can.J. Bot. 1984,62:564~569
- 7 Rathmell,W.G.and Sequeira L.Plant Physiol. 1974,53:317~318
- 8 Jamet,E and Fritig,B.Plant Mol. Biol. 1986,6~9
- 9 孙凤成,雷新云.耐病毒诱导剂88-D诱导珊西烟产生PR蛋白及对TMV侵染的抗性.植物病理学报,1995,25(4):345~349
- 10 Legrand,M,Kauffmann,S.Etal Proc. Acad. Sei. USA 1987,84:6750~6754
- 11 Kauffmann,S.,Legrand,M.Etal EMBO 1987,5(6)3209~3212
- 12 安德荣,幕小倩,等.第一届生命科学青年学术研讨会论文集.中国农业科技出版社,1993.109

Control of TMV and pathogenesis-related proteins induced in tobacco with Junkeduke

Du Chunmei Li Haoge Zhao Xiuxiang Wu Yuanhua Bei Naxin
(Shenyang Agricultural University Shenyang 110161)

Abstract

Tobacco mosaic virus(TMV) is one of major factors limiting the improvement of tobacco yield and quality in China. A new agricultural antibiotic Junkeduke was studied for controlling TMV during 1998-1999. Junkeduke was isolated from fermentation broth of *Streptomyces noursei* var. xichangensis. It belongs to a cytosine nucleic acid structural antibiotic. Experiments showed that the greenhouse control effects of Junkeduke at a dilution of 150, 200 and 250 were 82.2%, 70% and 61.1% respectively, the field control effects were 71.6%, 62.8% and 43% respectively. It was superior to other agents and could play a role of obviously simulating tobacco growth and improving tobacco yield and quality.

When Junkeduke was injected into the leaves of tobacco Xanthi nc 7 days prior to inoculation with TMV, it reduced the number of lesions produced on non-injected leaves of the same plants. The number of local lesions produced on non-injected leaves was decreased by 65.5%-82.6%. In Xanthi nc plant injected with Junkeduke, the PR proteins were found not only in the intercellular fluid of injected tissue but also in those of non-injected upper leaves. It was possible that PR proteins might be responsible for decreasing the degree of pathogenesis on infected plants, and this was correlated to the induction of resistance/ tolerance to virus infection.

Key words Junkeduke; TMV; Controlling effect; Induced resistance; Pathogenesis-related proteins

(责任编辑 徐建华)

《中国种业》征订启事

《中国种业》是由中国农业科学院作物品种资源研究所和中国种子协会共同主办的全国性、专业性、技术性种业科技期刊。该刊面向全国,服务于国内外。主要以我国种子产业化、良种繁育、种子检验检疫、种子加工贮藏等方面的研究实用高新技术为主,坚持为育繁推、产加销一体化和实现种子产业化服务的办刊宗旨。主要栏目:企业家风采、政策法规、实用新技术与新成果、专题综述、实验研究技术与方法、市场观察、国外动态、种子产业化、名特新优品种、供求信息等。读者对象:各级农业科研、推广部门,各级种子管理、经营企业的领导干部和技术研究人员,大中专农业院校师生,农村专业户和广大农业生产经营者。双月刊,16开本,56页,彩色四封和彩色插页。每期定价3.00元,全年18.00元。国内统一刊号:CN11-4413/S,国际标准刊号:ISSN1000-6435,邮发代号82-132。全国各地邮局均可订阅。漏订者可直接汇款至编辑部订阅,邮挂者需每期另加2.00元。

地址:100081 北京市白石桥路30号《中国种业》编辑部 电话:(010)62186657 传真:(010)62186629