

烟草花叶病毒诱发抗性的研究*

黄丽丽 魏宁生

(西北农业大学植保系, 陕西杨陵·712100)

摘要 用烟草花叶病毒(TMV)接种过敏性寄主枯斑三生烟或心叶烟的半叶或下部两叶,可诱导出未接种的另半叶或上部叶对TMV再次感染的抗性,诱发接种后7d用TMV进行攻击接种,所产生的枯斑直径明显小于对照。诱发抗性最早在诱发接种后3~4d被检测到,第7d左右达到高峰。温度对诱发抗性的产生有很大影响。诱发接种叶上部的未接种叶因叶位不同,其抗性强弱也不同。经TMV诱发后的心叶烟可表现出对TMV和CMV两者的抗性,在攻击接种CMV后,潜育期比对照延长1~2d。

关键词 烟草花叶病毒,心叶烟,枯斑三生烟,诱发抗性

中图分类号 S432.23

诱发抗性现象最早由Yarwood^[1,2]发现,以后Ross^[3]在TMV感染的过敏性烟草上,Loebenstein^[4]在其他两个病毒——寄主组合,即TMV感染的曼陀罗和PVX感染的千日红上,分别观察到局部诱发抗性的产生。系统诱发抗性最早由Gilpatrick等^[5]在香石竹上观察到。Ross^[6]对枯斑三生烟上系统诱发抗性作了较为详细的研究。Bozarth^[7]在继续Ross的工作时,企图用机械的和化学的伤害以及细菌的感染来诱发抗性的产生,但均未成功。以后,又有许多学者对系统诱发抗性进行了研究,但大多数研究都是在枯斑珊西烟(*Nicotiana tabacum* var. Xathi-nc)和枯斑三生烟(*Nicotiana tabacum* var. Samsun NN)上进行,只有Fraser等^[8]用心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)进行过诱发抗性研究,其研究结果表明TMV感染心叶烟后诱发出了系统的敏感性,即未感染叶对TMV再次感染的敏感性增强。系统诱发抗性的研究目前我国尚为空白。本文旨在研究心叶烟上系统诱发抗性的产生及影响因素。

1 材料和方法

1.1 材料

心叶烟种子及TMV株系均由西北农业大学植保系病毒室提供,枯斑三生烟种子由德国生物研究中心提供。育苗及试验过程在防虫温室中进行(个别试验例外),温室中春秋季节日均温约20~25℃,夏季约27~29℃。TMV普通株系用常规法在普通烟(*Nicotiana tabacum*)苗上增殖。CMV毒源由西安市农科所提供,采用常规法在心叶烟上增殖。

1.2 试验方法

采用汁液摩擦接种,分半叶法和多叶法两种试验方法。接种浓度为每克鲜病叶加3 mL 缓冲液。枯斑大小的测量在装有测微尺的Olympus实体显微镜下进行,每个枯斑测

收稿日期:1993-03-23.

*国家自然科学基金资助项目。

量垂直两个方向的直径,平均后得出每个枯斑的直径,每叶片或半叶随机测量20个枯斑,每株按不同叶位分别统计,平均后得出每位叶的枯斑直径。

1.3 材料处理方法

诱发抗性的产生 把40株长势基本一致的6~7叶期的枯斑三生烟苗修剪至5叶,平分为4组。第一组作为处理,下部两叶用TMV汁液诱发接种;第二组的下部两叶用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液摩擦叶面;第三组用自来水摩擦叶面;第四组不作任何处理。以二、三、四组为对照。7 d后用TMV汁液攻击接种所有烟苗的上部三片叶,测量枯斑直径均在诱发接种后第7 d进行。

温度对诱发抗性的影响 选长势基本一致的心叶烟苗修剪至5叶,处理与对照各30株,分成3组,用TMV汁液诱发接种处理株的半叶后,第一组处理及对照(各10株)置于较高的温度下,日均温 27°C ,日平均温度范围为 $20\sim 34^{\circ}\text{C}$;第二组处理及其对照置于较低的温度条件下,日均温 22°C ,日平均温度范围为 $19.5\sim 24.5^{\circ}\text{C}$,光照均为自然光;第三组处理株及其对照置培养箱中,在恒温 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下培养,人工光照光强为 9000 lx ,光照16 h,7 d后用TMV汁液攻击接种处理与对照株的另半叶。

叶位与诱发抗性的关系 将10~11叶期的大龄心叶烟苗修剪至8叶,用TMV汁液诱发接种处理株的下部两叶,7 d后用TMV汁液攻击接种所有烟苗的上部6叶。

诱发抗性发展速率测试 将100株心叶烟苗修剪至5叶,TMV汁液诱发接种50株的下部两叶作为处理,另50株作为对照,随后在第4,7,10,20,28 d分别用TMV汁液攻击接种10株处理和10株对照烟苗的上部三片叶,用80株枯斑三生烟做与心叶烟相似的试验,攻击接种在诱发接种后第2,4,7,10 d进行。

以上试验结果的统计分析均采用 t 值测验法^[9]。

2 结果与分析

2.1 诱发抗性的产生

用枯斑三生烟进行多次多叶试验的结果表明,用TMV诱发接种后,植株上部未接种叶对TMV的攻击接种表现出一定的抗性,即在攻击接种后,试验叶上产生的枯斑明显小于对照叶上的枯斑,只有对照的40%~50%。

为了证明诱发抗性的产生不是因磷酸缓冲液(PB)的作用或机械擦伤刺激所产生,设计了包括多项对照的试验。结果表明,其健株、自来水处理株、磷酸缓冲液处理株和TMV诱发接种处理株的平均枯斑直径分别为0.94,0.92,0.88和0.43 mm。把健株的枯斑直径与其他比较,用 t 测验,在显著水平 α 为0.05时,只有TMV诱发接种的处理与其差异显著,其他与健株枯斑直径间无显著性差异。若把TMV汁液诱发接种的处理株与各个对照在攻击接种后形成的枯斑直径相比较,其差异极显著。表明磷酸缓冲液(PB)和自来水均不能刺激诱发抗性的产生;机械擦伤(金钢砂摩擦)也不能产生诱发抗性,它们与不作任何处理的健株大致相同。分析结果明确了诱发抗性的产生是由于TMV的感染。

用心叶烟在不同季节进行了10多次多叶或半叶试验,结果(表1)表明,用TMV诱发接种后,植株中未接种的叶或半叶对TMV的攻击接种表现出相当的抗性,攻击接种后处理叶或半叶上产生的枯斑明显小于对照叶或半叶上的,且结果有一定的稳定性,说明心叶

烟上诱发抗性的产生并非偶然。但它比枯斑三生烟上的诱发抗性稍弱。用心叶烟进行的多次试验还发现,攻击接种后,处理株比对照株的枯斑初现期延迟 1~2 d。

表 1 心叶烟上的诱发抗性试验

攻击接种日期	平均枯斑直径(mm)		比率(%)	攻击接种日期	平均枯斑直径(mm)		比率(%)
	处理株	对照株			处理株	对照株	
1989-12-14	0.63	0.95	66	1990-05-11	0.56	0.77	75
1990-02-18	0.55	0.91	60	1990-06-07	0.54	0.76	71
1990-03-19	0.59	1.03	57	1990-08-27	0.73	1.04	70
1990-04-10	0.62	0.83	75	1990-10-05	0.52	0.82	63

注:攻击接种与诱发接种间隔期均为 7 d;比率为处理与对照枯斑直径之比。

2.2 不同因子对诱发抗性的影响

温度对诱发抗性的影响 从表 2 看出,相同处理置于不同的温度条件下时,枯斑直径变化很大。在常温下处理株的平均枯斑直径为 0.52 mm,而置于高温条件下的平均枯斑直径为 0.73 mm,处理的枯斑直径在常温下只有高温的 71%。同样,对照株的枯斑直径在常温下也只有高温的 79%,统计学分析表明,在 α 为 0.01 时,处理株的枯斑直径在常温与高温条件下差异极显著,对照株的枯斑直径也有相似的分析结果。从表 2 中还可看出,常温下处理株的枯斑直径只有其相应对照的 63%。统计学分析结果表明,常温下处理与对照的枯斑直径差异极显著。在高温条件下,处理株的枯斑直径为相应对照的 70%,处理与对照的枯斑直径差异显著。这一结果明确了高温对诱发抗性的不利影响,即高温可降低诱发抗性的水平,常温或稍低的温度则有利于诱发抗性的表现。此外恒温 26℃与日均温 27℃的变温条件对诱发抗性的影响也有很大差异。恒温 26℃处理与对照的枯斑直径无显著性差异,而变温条件下则有抗性产生,说明恒温对诱发抗性的不利影响。

表 2 温度对心叶烟诱发抗性的影响¹⁾

叶 位	枯斑直径(mm)					
	高 温		常 温		恒 温	
	处理	对照	处理	对照	处理	对照
半叶 ²⁾	0.73	0.98	0.49	0.76	1.14	1.03
半叶 2	0.74	1.04	0.52	0.83	1.01	1.08
半叶 3	0.72	1.09	0.55	0.86	0.98	1.10
平均每半叶	0.73	1.04	0.52	0.82	1.04	1.07
比率(%) ³⁾	70		63		97	

注:1)表中数据为 10×20×2 个枯斑直径的平均值;2)代表植株最下部第一叶片的半叶(另半叶作为诱发接种),依次类推;3)比率为处理与对照枯斑直径之比。

叶位对诱发抗性的影响 用 20 株 10~11 叶期的心叶烟进行试验,结果表明,处理株枯斑直径为对照的 71%,经 *t* 测验,两者差异极显著。单从处理株各叶位枯斑直径变化的情况,很难看出诱发抗性随叶位变化的情况,但处理株各位叶与对照株相应叶位的枯斑直径比率则表明:叶位不同,诱发抗性的强弱不同。从统计结果看,在第一位叶,处理株枯斑直径为对照的 64%;从第二位叶至第五位叶,处理株枯斑直径分别为对照的 71%,67%,75%,73%;而最上部叶即第六位叶,处理株的枯斑直径为对照的 79%。说明随叶位升高,即距离诱导叶愈远,其诱发抗性愈弱,离诱导叶愈近,诱发抗性则愈强。本研究结果中诱发

抗性随叶位升高而减弱的趋势非常明显。

2.3 诱发抗性的发展速率

心叶烟试验结果 对结果分别统计并进行差异显著性分析表明,诱发接种后 7, 10, 20 d 进行攻击接种的处理株, 枯斑直径分别为其对照的 56%, 71% 和 81%, 与其对照差异极其显著; 诱发接种后 4 d 进行攻击接种的与其对照有显著性差异, 处理株枯斑直径为对照的 83%, 只有第 28 d 后攻击接种的与其对照的枯斑直径无显著性差异, 为对照的 94%。说明在诱发接种后 4 d, 植株上部未接种的叶片即可产生较弱的诱发抗性, 在第 7 d 左右诱发抗性达到高峰, 处理株的枯斑直径比对照减小了 44%, 以后, 随间隔期延长, 诱发抗性逐渐减弱, 至 28 d 时则完全检测不到诱发抗性的存在。

枯斑三生烟试验结果 试验方法与心叶烟相似。试验结果(表 3)的统计分析表明, 间隔 2 d 的处理与对照枯斑直径之间无显著性差异, 说明此时诱发抗性还未产生; 随着间隔期延长, 诱发抗性逐渐增强, 在诱发接种后 7 d 左右达到高峰, 第 10 d 又开始减弱。枯斑的三生烟试验结果与心叶烟相似, 诱发抗性的产生, 发展速率和趋势也基本一致, 即诱发抗性最早在诱发接种后 3~4 d 可检测到, 以后逐渐增强, 至第 7 d 左右达到高峰, 之后, 则呈下降趋势, 抗性逐渐减弱。但枯斑三生烟上的诱发抗性明显比心叶烟上的抗性强。

表 3 枯斑三生烟上不同间隔期试验结果

间隔时间 (d)	处理株 (mm)	对照株 (mm)	比率 (%)
2	1.03	1.21	85
4	0.90	1.32	70
7	0.44	0.87	51
10	0.59	1.03	59

2.4 TMV 诱发抗性对 CMV 的影响

心叶烟上的多次试验结果表明, 由 TMV 诱发的抗性, 对 CMV 的攻击接种同样表现出抗性, 表现为 CMV 攻击接种后的潜育期较对照延长 1~2 d, 而对于 CMV 引起的系统感染症状影响不大。

3 讨论

本研究用 TMV 在过敏性烟草枯斑三生烟上诱导出对 TMV 再次感染的抗性, 其结果与 Ross 报道的结果基本相似^[6]。早在 1962 年, Loebenstein^[10]在心叶烟上曾用 TMV 的外壳蛋白诱导出对 TMV 再次感染的抗性, 抗性表现为枯斑数与枯斑直径的减少, 但此抗性并非由病毒感染而引起。Fraser^[8]用 TMV 感染心叶烟, 则在未感染叶片诱导出系统的敏感性, 表现为枯斑数较对照增加 1.4~3.5 倍, 而枯斑直径只比对照减小了 16%。本研究经反复试验, 首次证实 TMV 在心叶烟上能诱导出对 TMV 再次感染的抗性。

统计结果表明, 枯斑数目的变化甚大, 有时处理株的枯斑数只有对照的 40%~50%, 而有时却与对照相差无几甚至更多。枯斑数目和枯斑大小是叶片对病毒接种反应的两个独立特性。接种浓度、叶龄、温度、化学药剂等都对枯斑大小和数目有不同的影响, 因此, 本研究选择枯斑直径作为诱发抗性的测定指标。

本研究还首次证实, 心叶烟上的系统诱发抗性在不同叶位间有明显的差异, 距离诱导叶愈近, 抗性愈强, 反之则愈弱; 心叶烟上的系统诱发抗性产生及发展与枯斑三生烟上的结果相似, 只是抗性较弱; 由 TMV 在心叶烟上诱发的抗性, 对 CMV 的攻击接种也表现

出抗性,表现为潜育期较对照延长 1~2 d.

研究证明,温度对诱发抗性的影响是显著的,恒温与变温条件对诱发抗性的产生也有极大影响。在变温条件下,尽管有 30℃以上的高温,但并未影响枯斑的形成与诱发抗性的产生,只是诱发抗性较弱而已。但在恒温条件下,处理与对照的枯斑直径相差无几,没有抗性产生,说明恒温 27℃条件虽不影响枯斑形成,但影响抗性的产生。

本研究所取得的结果,只是诱发抗性的现象,而未涉及到诱发抗性的本质及原理。从所得结果推论,似乎有某些物质的形成与传导参与,这些物质可能涉及到病毒的复制和扩展,但这些还有待于更进一步研究探讨。

参 考 文 献

- 1 Yarwood C E. Acquired resistance to tobacco mosai virus in been (Abstr.). *Phytopathology*, 1953, 43:490
- 2 Yarwood C E. Localized acquired resistance to tobacco mosaic virus. *Phytopathology*, 1960,50:741~744
- 3 Ross A F. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology*, 1961,14:329~339
- 4 Loebenstein G. Further evidence on systemic resistance induced by localized necrotic virus infections in plants. *Phytopath*, 1963, 53:306~308
- 5 Gilpatrick J D, Weintraub M. An unusual type of protection with carnation mosaic virus. *Science*, 1952, 115:701~702
- 6 Ross A F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. *Virology*, 1961,14:340~358
- 7 Bozarth RF. Some biological and physiological aspects of the systemic resistance induced by tobacco mosaic virus in hgpersensitive tobacco; [Ph. D. thesis]. Cornell Univ 1962.
- 8 Fraser R S S, Loughlm A A R, Whenham R J. Acquired systemic susceptibility to infection by tobacco mosaic virus in *Nicotiana glutinosa*. *J gen virol*,1979,43:131~141
- 9 南京农业大学主编. 田间试验和统计方法. 北京:农业出版社,1979
- 10 Loebenstein G. Inducing partial protection in the host with native virus protein. *Virology*, 1962,17:574-581

Systemic Induced Resistance of Tobacco Mosaic Virus

Huang Lili Wei Ningsheng

(Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract Inoculation of half-leaves of lower 2 leaves of hypersensitive tobacco *Nicotiana tabacum* var Samsun NN or *Nicotiana glutinosa*, with tobacco mosaic virus (TMV) induce a high level of resistance to TMV in the opposite half-leaves or upper leaves. Challenge inoculation with TMV of the resistant half-leaves of upper leaves 7 days after the first inoculation resulted in limited lesion formation, the lesions were constantly smaller than those on the control plants. Temperature has a great effect upon the induced resistances. The strong and weak resistance of the uninoculated leaves in the upper of the induced inoculated leaves is different because of different leaf positions. The leaves of *N. glutinosa* with TMV induced resistance were resistant not only to TMV but also to cucumber mosaic virus(CMV). The latent period of CMV in resistant leaves was 1-2 days longer than that on the control plants.

Key words TMV, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana tabacum* var. Samsun NN., induced resistance