

# 烟草蚀纹病毒弱株系的选育及免疫效果研究

张满良

(西北农业大学植保系, 陕西杨凌 712100)

**摘 要** 1991~1995 年利用钴 60 照射和亚硝酸处理进行了烟草蚀纹病毒 (TEV) 弱株系的选择及防病效果试验。结果表明, 钴 60 照射病毒溶液能产生弱株突变体的适宜剂量是 1.29, 2.58 C/kg, 亚硝酸处理的适宜浓度和时间是  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 30~50 min。经选择效果明显的弱株有 R<sub>4</sub> 和 H<sub>8</sub>, 其室内交互保护试验的效果最高分别是 85.8% 和 47.4%; 田间防病效果分别为 81.6% 和 40.3%。两个弱株免疫后接种强株, 其烟株体内病毒含量均低于强株对照。试验还表明, 亚硝酸处理较钴 60 能产生较多的弱株突变体。

**关键词** 烟草蚀纹病毒, 钴 60, 亚硝酸, 弱株系选择

**中图分类号** S435.72

烟草蚀纹病毒 (Tobacco etch virus TEV) 是一种世界性的病毒病害。在自然界中, TEV 主要侵染茄科植物, 尤其是烟草最易感染<sup>[1]</sup>。近年来, 陕西渭北烟区烟草蚀纹病普遍发生, 是仅次于黄瓜花叶病的一种病毒病害, 严重影响烟叶的产量和质量<sup>[2]</sup>。目前, TEV 的防治是采用药剂防蚜, 但效果不理想。国内在 80 年代初期, 利用弱株系防治番茄和辣椒上的烟草花叶病毒 (TMV) 取得了好的效果<sup>[3]</sup>, 但烟草蚀纹病毒弱株系的选择和利用还未见报道。为了寻找一种经济有效的防治措施, 1991~1995 年利用钴 60 照射和亚硝酸处理选育了 TEV 的弱株系, 并进行了室内和田间防治试验。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验毒源

TEV 毒源从渭北烟田采得, 并经过分离、纯化和鉴定。病毒在 xanthi 烟上增殖, 在防虫网室和温室保留。

### 1.2 TEV 弱株的获得

1.2.1 钴 60 照射 取在 xanthi 烟上增殖的 TEV 病叶, 剪碎后放入研钵中, 加入磷酸盐缓冲液与金钢砂, 充分研磨后用纱布过滤, 滤液进行 8000 r/min 离心, 取上清液备用。钴 60 处理是在中国科学院西北水土保持研究所同位素实验室进行。处理剂量为 1.29, 2.58, 25.8, 77.4, 129, 258, 387 C/kg。每个处理用 30 mL 病毒汁液, 分别装入试管内用钴 60 照射。处理后将病毒汁液磨擦接种在苜蓿上, 每个处理接种 10 株, 接种后放于无虫温室, 定期观察记载枯斑出现的情况。

1.2.2 亚硝酸诱变处理 取 16 个试管并编号, 每个试管各加 10 mL 病毒溶液, 按序号均分为 4 组。按组依次加入 4, 2, 1, 0.5  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  亚硝酸钠溶液 1 mL。然后每个试管各加

醋酸缓冲液 1 mL, 每组又分 30, 40, 50, 60 min 处理, 每处理一管, 处理结束后加入  $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 PBS, 接种在苜色藜上, 每处理接种 5 株, 放于无虫温室, 观察枯斑的出现

1.2.3 弱株突变体的分离和选择 将上述钴 60 和亚硝酸处理在苜色藜上产生的枯斑, 用刀片分别挖取, 放在擦净的玻璃片上, 加一滴 PBS, 并放入少许金钢砂, 用洗净的玻璃棒将枯斑捣碎后接种在 xanthi 烟上。每个枯斑接种 1 株, 每个处理接种 50 个枯斑。接种后, 定期观察记载症状表现, 淘汰所有表现明显症状的单斑分离株, 将不表现症状的又转接在苜色藜上。选取在 xanthi 烟上无症, 而在苜色藜上出现枯斑的分离株, 连续转接 3~4 次, 结果稳定的, 作为弱毒株进行增殖。

### 1.3 室内交互保护试验

取不同叶龄的 xanthi 烟苗 (4 叶期、7 叶期、10 叶期), 把已初选的弱毒株用汁液磨擦接种在不同叶龄期的烟苗上, 放于  $18\sim 25^{\circ}\text{C}$  的温室中, 15 d 后, 给每个处理接种 TEV 强毒株, 并设单独接种强毒株作为对照, 观察记载发病株、发病时间, 并计算发病率、交互保护效果, 以及保护效果与株龄和时间的关系。

### 1.4 弱株免疫后 TEV 在烟株体内含量的测定

免疫株接种强株后分别于 10, 20, 30, 40, 50 d 测定烟株体内 TEV 病毒含量。测定用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 双抗体夹心法。方法参考文献 [4] 用本研究室制备好的 TEV 抗血清提取  $\gamma$  球蛋白。 $\gamma$  球蛋白的提取是先用硫酸铵沉淀, 经过透析后再用 Watman DE 52 纤维素层析。酶标抗体的制备所用交联剂为戊二醛, 酶用碱性磷酸酶 (西德进口), 底物用磷酸对硝基苯。

### 1.5 弱株在田间防治 TEV 的效果试验

1994 年在西北农业大学农作一站试验田进行了弱株防病的效果试验。试验用弱株有  $R_4$  和  $H_{88}$ , 并设不接种弱株为对照, 共 3 个处理, 每个处理小区面积  $133.34 \text{ m}^2$ , 行距 1 m, 株距 0.6 m, 随机排列, 重复 2 次。试验品种为  $NC_{89}$ 。烟草移栽前 7 d, 用磨擦接种的方法接种弱株  $R_4$  和  $H_{88}$ 。移栽后让其自然发病, 定期观察记载发病株, 计算发病株率及防治效果。1995 年在淳化县十里塬乡十里塬村进行了大田防治示范, 所用弱株为  $R_4$ , 烟草品种用  $NC_{89}$ , 面积  $1333.4 \text{ m}^2$ , 并设  $666.7 \text{ m}^2$  对照, 其他方法同上。7 月 15 日调查防治效果。

## 2 试验结果

### 2.1 钴 60 处理及弱株的选择

TEV 病毒溶液经钴 60 不同剂量处理并接种苜色藜后显示, 在苜色藜上仅  $1.29 \text{ C/kg}$  和  $2.58 \text{ C/kg}$  两个处理出现枯斑, 共分离枯斑 106 个, 最后选出  $H_7$  和  $H_{88}$  无症弱株。

### 2.2 亚硝酸诱变处理及弱株的选择

亚硝酸处理的病毒溶液, 容易使接种叶发生药害。经试验, 适宜的接种浓度为  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理的病毒溶液和 PBS 稀释液的比为  $1:1$ ,  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的为  $1:10$ ,  $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的为  $1:20$ 。按以上稀释后接种叶片均不产生药害。

亚硝酸处理病毒溶液的试验表明,  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 30, 40, 50, 60 min, 在苜色藜上均不产生枯斑。 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  除 60 min 外, 其余时间处理都能产生枯斑。

对苜色藜上产生的枯斑, 经接种 xanthi 烟以后, 表现无症状的有 297 个, 淘汰所有表

现症状的单斑分离株,将不表现症状的单斑分离株,又接种到苜色藜上,一周后,产生枯斑的有 4 个,重复 3 次结果一致。这 4 个单斑分离株均为  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  亚硝酸处理的突变体,分别称为  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  和  $R_4$  弱株。

### 2.3 弱株的交互保护试验

将获得的弱株在无虫温室内进行了交互保护试验,试验寄主为 *xanthi* 烟,结果(表 1)表明,在亚硝酸处理的四个初选弱株中,以  $R_4$  保护效果较好,其次是  $R_2$ ,其余弱株保护效果相对低。钴 60 处理的两个弱株以  $H_3$  较好。

表 1 TEV 弱株的交互保护试验

弱株	3~4 叶期			5~6 叶期			7~9 叶期		
	试验株数	发病株数	保护 %	试验株数	发病株数	保护 %	试验株数	发病株数	保护 %
$R_1$	80	61	23.7	80	47	41.2	80	44	43.6
$R_2$	80	44	45.0	79	26	67.1	78	11	86.5
$R_3$	78	56	28.2	80	52	35.0	80	54	30.8
$R_4$	80	41	48.7	78	23	70.5	80	11	85.8
$H_7$	77	55	28.6	80	56	30.0	80	51	34.6
$H_{38}$	80	52	35	80	43	46.2	80	41	47.4
对照	80	80		80	80		80	78	

结果还表明,在弱株免疫后,5~6 叶期和 8~9 叶期接种强株的,其保护效果较好,而在 3~4 叶期接种强株的弱株保护效果较差。说明弱株的保护效果与烟草的株龄有关。

### 2.4 TEV 弱株对病毒增殖的影响

对 5 片叶龄的烟株接种弱株后 15 d,再接种强株,经 10, 20, 30, 40, 50 d,用酶联免疫吸附实验双抗体夹心法,测定每个处理烟株体内病毒的含量,结果(表 2)表明,弱株免疫后接种强株的烟株光密度值均低于未免疫的强株对照。4 个弱株中,亚硝酸处理以  $R_4$  较好,钴 60 处理以  $H_3$  较好,两个弱株免疫的烟株体内病毒含量均较低。同时还说明,免疫烟株接种强株后,烟株体内病毒含量最高的时间是接种强株后 30 d,单接强株对照则出现在接种后 20 d,较前者提前 10 d。

表 2 免疫株接种强株后不同时间烟株体内病毒含量的测定

弱株名称	光密度值 (O. D)				
	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d
$R_2$	0.187	0.215	0.471	0.312	0.247
$R_4$	0.093	0.197	0.315	0.187	0.163
$H_{38}$	0.034	0.091	0.264	0.127	0.101
$H_7$	0.112	0.186	0.293	0.152	0.131
强株	0.413	1.239	1.024	0.813	0.752

### 2.5 弱株在田间防病的效果

1994 年在西北农业大学农作一站试验结果表明,在自然发病的情况下,接种  $R_4$  弱株的,烟草蚀纹病的平均防治效果为 81.6%,接种  $H_3$  弱株的平均防效为 40.3%,而没有接种弱株的对照发病率为 36.7%,说明弱株在田间情况下,对烟草蚀纹病有明显的免疫作用。同时还说明,弱株免疫的烟株发病也晚,对照始病期在 6 月 4 日,发病高峰在 6 月

23日。弱株免疫的,始病期在 6月 12日,发病高峰在 7月 2日。

1995年在淳化县十里塬乡十里塬村进行了 R<sub>4</sub>弱株防治烟草蚀纹病的大田示范,结果表明,用 R<sub>4</sub>弱株免疫的蚀纹病的发病率为 11.3%,未免疫的烟田发病率为 39.6%,防治效果为 71.4%。

### 3 讨 论

钴 60和亚硝酸处理 TEV 病毒溶液都能产生弱株突变体,但亚硝酸处理产生的较多,而钴 60较少。产生这种结果的原因,可能是钴 60对病毒有较大破坏作用的结果。

在 TEV 弱株系选择中,从苋色藜上进行枯斑分离,经反复试验证明,在叶龄较大的叶片上成功率较低,而在株龄和叶龄较小以及生长幼嫩的叶片上分离成功率可提高。因此,研究枯斑分离的条件,例如温度、土壤条件以及植株生长状况等是有用的。

室内和田间试验结果表明,烟草蚀纹病毒弱株对强株有明显的免疫作用。在田间情况下,弱株的免疫效果明显低于室内。造成这种结果的原因可能是烟草蚀纹病毒和黄瓜花叶病毒或烟草花叶病毒等复合侵染的结果。

在田间情况下,为害烟草的主要病毒病害除烟草蚀纹病毒外,还有黄瓜花叶病毒和烟草花叶病毒等。为了对这三种病毒都能起到防治作用,是否可用 3种病毒弱株的混合物接种,需要进一步试验。

#### 参 考 文 献

- 1 张满良,魏宁生. 陕西渭北地区烟草病毒病的毒原鉴定. 中国烟草, 1991(1): 21~ 27
- 2 魏宁生,张满良. 三种烟草病害对烟叶产量和品质的影响. 西北农业大学学报, 1992(3): 33~ 36
- 3 张秀华. 用弱株系防治番茄花叶病的效果. 中国农业科学, 1981(6): 78~ 80
- 4 梁训生. 植物病毒血清学技术. 北京: 农业出版社, 1985
- 5 Smith K M. A textbook of plant virus diseases. London: Longman Group, 1972. 501~ 503
- 6 Stover R H. Association in tobacco of the sever symptom response to etch virus and the white Burley character. Phytopathology, 1951, 41: 1125~ 1126

## Induced Mild Strains of Tobacco Etch Virus

Zhang Manliang

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

**Abstract** Mild strains of tobacco etch are studied. The suitable dosage of C<sup>60</sup> treatment is 1.29 C/kg and 2.58 C/kg for producing TEV mutant. The suitable density of HN O<sub>2</sub> treatment is 1 mol<sup>o</sup> L<sup>-1</sup> 30~ 50 min. R<sub>4</sub> strain and H<sub>8</sub> strain are better. The protection effect of R<sub>4</sub> and H<sub>8</sub> is 85.8% and 47.4% in greenhouse, respectively. The effect of R<sub>4</sub> to control tobacco etch virus is 81.6% in the field, whereas H<sub>8</sub> is 40.3%. The virus content of immune plant is lower than check. The results show that HN O<sub>2</sub> treatment can produce more mutants than C<sup>60</sup>.

**Key words** tobacco etch virus, mild strain, controlling virus effect