

壳寡糖诱导对烟草花叶病病情发展的影响

郭成瑾, 商文静, 商鸿生*

(西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 在温室控制条件下, 研究了壳寡糖诱导处理对烟草花叶病病情增长的影响。采用不同浓度的壳寡糖(10、50、100、150和200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分别处理烟草后24 h, 再接种烟草花叶病毒(TMV), 结果表明, 壳寡糖处理使花叶病显症延迟, 系统症状明显减轻。未喷药对照与壳寡糖处理的病情发展曲线都可拟合 Logistic 模型, 但壳寡糖处理的模型参数不同。数据分析表明, 达到5级严重度所需天数、病害严重度降低率和病情发展曲线下面积(AUDPC)都大幅度降低。在壳寡糖的各浓度间, 以50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对病情增长的影响最大, 其次为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其余浓度都较小。结果证明壳寡糖的作用特点符合系统诱导抗病性的性质。

关键词: 壳寡糖; 系统诱导抗病性; 烟草花叶病毒

中图分类号: S432.4⁺1, S572

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2006)04-0014-04

Effects of Chito oligosaccharide Treatment on Disease Development of Tobacco Mosaic

GUO Cheng jin, SHANG Wen jing and SHANG Hong sheng*

(College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: The epidemiological effects of chito oligosaccharide treatment on disease development of tobacco mosaic were studied in greenhouse. Tobacco plants were inoculated with TMV in 24 h after chito oligosaccharide treatment at different concentrations(10、50、100、100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The results showed that the day of symptom appearing was delayed and systemic symptoms were remarkably reduced in treated plants. The disease progress curves in both treated and untreated plants were fitted to logistic model with different parameters. Mathematical analysis indicated that the days of reaching disease severity 5, the decrease rate of disease severity and AUDPC, were greatly decreased in treated plants. The treatment with chito oligosaccharide at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ had the greatest effect to disease development, and then 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was the next. The experimental results testified the specialty of chito oligosaccharides were the same with the property of systemic induced resistance.

Key words: Chito oligosaccharides; Induced systemic resistance; TMV

壳寡糖(Chito oligosaccharides)是采用特殊工艺降解如虾、蟹、昆虫外壳或真菌细胞壁得到的一种寡糖。其商品制剂已经作为一种无公害农药上市,用于防治植物真菌和细菌病害,效果很好^[1~5]。进一步的研究发现,壳寡糖对植物病毒病害也有较好的诱抗效果^{6~10]},但对其诱抗特点

与作用机制尚缺乏研究。本试验在前期试验的研究基础上^[10],研究了不同剂量的壳寡糖诱导处理烟草后,对烟草花叶病病情增长的影响,旨在为开发壳寡糖制剂的使用技术提供依据。

收稿日期: 2006 01 23 修回日期: 2006 03 04

基金项目: 国家 863 高技术研究发展计划项目(2001AA625010); 西北农林科技大学创新团队建设计划

作者简介: 郭成瑾(1978—),女,陕西宝鸡人,在读硕士,主要从事植物病理学研究。

*通讯作者,商鸿生(1940—),男,辽宁大连人,教授,博士生导师,主要从事植物病理学和植物免疫学研究。

1 材料与方法

1.1 材料

供试壳寡糖由中科院大连化学物理研究所糖工程研究室提供。壳寡糖 100%质量分数,聚合度(DP)为 3~10,分子量 3 KD。

供试植物材料普通烟(*Nicotiana tabacum*) K326 品种为 TMV 的系统寄主。

供试毒源 TMV 为本研究室保存。使用前在普通烟上繁殖,按 Gooding^[11]方法提纯,经 200~300 nm 紫外扫描确定纯度和浓度。JEM-100E 透射电镜观察 TMV 粒体。接种枯斑寄主检测 TMV 的侵染活性。

1.2 方法

1.2.1 处理方法 在 25℃温室中,选用 3~4 片真叶期,长势均一的普通烟烟苗,用不同浓度的壳寡糖溶液,喷雾处理供试烟苗的下部第 3 片真叶,壳寡糖浓度设置 10、50、100、150 和 200 μg/mL 5 个水平,以清水处理为对照,每个处理重复 3 次。处理 24 h 后,在处理叶的上位叶片,采用常规汁液摩擦接种法接种 TMV,接种液质量浓度为 2 μg/mL,以不喷药处理为对照。每隔 3 d 调查一次各处理植株的发病严重度。严重度标准依据中华人民共和国烟草行业标准—烟草普通花叶病严重度分级及调查方法(YC/T 39 1996)的基础上,加以细化,拟定以下 10 级标准:

0 级:无可见症状;1 级:心叶褪绿,花叶不明显;2 级:心叶轻微花叶至轻微皱缩;3 级:心叶明

显花叶或皱缩,其他叶片无可见症状;4 级:心叶明显花叶或皱缩,其它叶片轻微花叶;5 级:心叶明显花叶或皱缩,其它叶片明显花叶,轻度凹凸不平;6 级:心叶明显花叶或皱缩,其它叶片明显花叶和凹凸不平,叶缘轻度卷曲;7 级:心叶皱缩畸形,其它叶片明显花叶,轻度皱缩;8 级:心叶皱缩畸形,其它叶片明显花叶,部分叶片皱缩畸形,有深绿色疱斑;9 级:全株叶片花叶,叶片皱缩畸形,有深绿色疱斑,但植株未矮化;10 级:全株叶片花叶,叶片严重畸形,有深绿色疱斑,植株矮化。

1.2.2 数据分析 以调查时间为自变量,以不同浓度壳寡糖处理后烟草的平均严重度为依变量,采用软件 CurveExpert 1.3 进行曲线拟合, MATLAB6.5 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 烟草发病严重度增长模型

人工接毒致病,全部发病,以发病严重度代表病情变化。未喷药对照在接毒后第 10 天显症,此后严重度持续增长,至接毒后 19 d,增长至高峰而趋于停滞。不同浓度壳寡糖处理后,显症延迟,严重度缓慢增长,至接毒后 25 d,仍保持这一趋势,严重度始终比对照有不同程度的降低。各浓度之间,以 50 μg/mL 壳寡糖处理植株显症最迟,接毒后第 16 天显症,延迟了 6 d,且病害严重度最低,其次为 10 μg/mL 浓度的处理,接毒后第 13 天显症,延迟了 3 d,而 100 至 200 μg/mL 浓度的处理,严重度也有降低,但降幅较小(表 1)。

表 1 不同浓度壳寡糖处理烟草后烟草花叶病的严重度变化

Table 1 Changes of disease severity after chito oligosaccharide treatment at various concentrations in tobacco plants									
处理/(μg·mL ⁻¹) Treatment	接种后天数/d Days after inoculation								
	1	4	7	10	13	16	19	22	25
10	0	0	0	0	0.7	1.0	3.0	4.0	4.7
50	0	0	0	0	0	0.3	2.7	3.7	4.0
100	0	0	0	1.3	2.3	3.0	4.7	5.0	7.0
150	0	0	0	1.3	2.0	3.7	5.3	6.7	6.7
200	0	0	0	1.3	1.7	3.3	4.7	6.0	7.3
CK	0	0	0	2.0	5.3	8.3	9.0	9.0	9.0

注:表中数据为 3 次重复平均值;CK 为未喷药处理。下表同。

Note: The seventy value in the table are average of three repeats. CK: Untreatment control. The following table is the same.

2.2 烟草发病严重度增长曲线拟合

通过对不同浓度壳寡糖处理与对照间严重度变化的比对分析,并采用软件 CurveExpert 1.3 对严重度增长进行曲线拟合,各浓度壳寡糖处理与未处理对照的严重度增长均符合 Logistic 模型。

$$y=a/[1+b\times exp(-cx)]$$

式中: y 为发病平均严重度, x 为调查时间(d)。

表 2 列出了不同处理浓度和对照的 Logistic 方程各参数值及其标准误差(S)与相关系数(r)。相关系数(r)的大小是判断拟合函数适合度的标

准,其值越接近 1 表明拟合函数符合程度越高,从表 2 中可以看出,各浓度处理和未喷药对照的拟

合函数完整的表达出原数据增长趋势。

表 2 烟草花叶病严重度增长模型参数

Table 2 The parameters of disease progress curve of tobacco mosaic

处理 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Treatment	Logistic 方程: $y = a / [1 + b \times \exp(-cx)]$ Logistic equation				
	a	b	c	S	r
10	4.8719	4399.6341	0.4585	0.1912	0.9962
50	3.8932	2.81E+08	1.0657	0.0685	0.9994
100	7.9511	62.8864	0.2301	0.4733	0.9869
150	7.1636	206.6382	0.3396	0.2492	0.9969
200	8.2775	110.3234	0.2630	0.2834	0.9961
CK	9.0744	1825.3526	0.6088	0.1913	0.9992

采用软件 MATLAB6.5 对各处理严重度增长曲线作图,烟草发病严重度随时间变化规律见图 1。

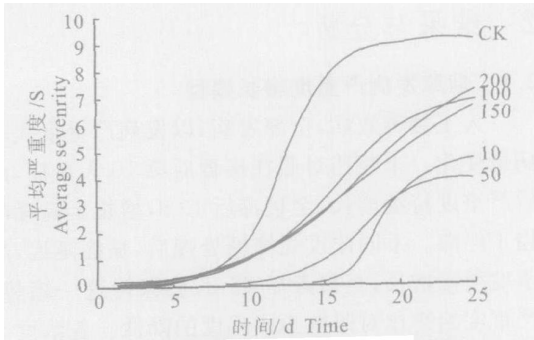


图 1 烟草花叶病严重度增长 Logistic 曲线

Fig. 1 The disease progress curve of tobacco mosaic

表 3 烟草花叶病严重度增长曲线分析

Table 3 The analysis of disease progress curve of tobacco mosaic

处理 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Treatment	达到 5 级时的天数/d Days of reaching severity 5	病害严重度降低率 / % Decrease rate of disease severity	病情发展曲线下面积 AUDOC
10	—	47.8	33.1241
50	—	55.6	27.1877
100	20.3	22.2	61.2930
150	18.2	25.6	67.3660
200	19.5	18.9	63.0531
CK	12.6	—	114.9260

2.3 严重度增长曲线分析

利用软件 MATLAB6.5 对不同处理烟草花叶病严重度增长曲线进行分析(表 3),结果表明:未喷药对照达到 5 级严重度需要 12.6 d,以 10 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壳寡糖诱导处理后,烟草花叶病严重度未达 5 级,100 至 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的各处理需要 18.2 d 至 20.3 d,比对照延迟 5.6 ~ 7.7 d;以最高严重度(峰值)计算病害严重度降低率,结果以 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壳寡糖诱导处理的最高,为 55.6%,以

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理的次之,为 47.8%,而 100 至 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的各处理严重度降低率较小,为 18.9% ~ 25.6%;病情发展曲线下面积(AUDOC)是病情的累计值,代表致病效应的总和,与病株受害程度直接相关。各处理的变化范围从 33.1241 到 67.3660,大幅低于未喷药对照的 114.9260,这表明壳寡糖诱导有明显防治效果,以 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理效果最佳,病情发展曲线下面积(AUDOC)比未喷药对照减小了 76.4%,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理次之,比未喷药对照减小了 71.2%,且 100 至 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理也比未喷药对照分别减小了 46.7%、41.4%和 45.1%。总之,由各个指标衡量,诱导抗病性的效果都以 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 诱导处理最好,其次为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,诱导处理浓度增高,效果反而降低。

3 讨论

3.1 烟草花叶病毒通过接触传染,发病后病情增长是病株体内病毒粒子增殖的结果,本试验在控制条件下进行接毒,免除了在发病过程中各种外来毒源的干扰,观测到的严重度增长,反映了本源病毒增殖动态。研究表明,烟草花叶病严重度增长符合 Logistic 模型,壳寡糖处理抑制了病毒增殖,改变了 Logistic 曲线的陡度和模型的各参数。分析表明,壳寡糖诱导有多方面的流行病学效应,包括减低严重度峰值,降低病害严重度和减小病情发展曲线下面积等。

3.2 壳寡糖抑制烟草花叶病的适宜浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,提高浓度效果反而降低,这与本课题组先前的病理学试验结果^[10]一致。壳寡糖是通过激活烟草抗病性,来抑制病情发展的,并非直接抑制病原物,其机制与杀菌剂等毒性化合物不同。杀菌剂等毒性制剂的药效与剂量成正相关,提高剂

量,效果增高。Van Loon 等^[12]曾提出系统诱导抗病性的特征,其中提到激发剂量与此种抗病性的表达强度的关系,不符合毒性化合物的剂量-反应模式,存在最佳剂量,偏离此最佳剂量,则降低表达强度。本试验的结果进一步证实壳寡糖的作用特点符合系统诱导抗病性的性质。

3.3 壳寡糖制剂(好普)已经用于病害的防治,但迄今并无田间应用的技术规程,各地大致按照杀菌剂的模式确定施药方法^[2~8],并不符合壳寡糖的作用特点,本试验结果为合理使用壳寡糖制剂提供了依据,有助于改进寡糖农药的田间使用技术。

参考文献:

[1] ElGhaouth A, Anl J, Grenier J, *et al.* Effect of chitosan on cucumber plant: Suppression of *Pythium aphanideimatum* and induction of defense reactions[J]. *Phytopathology*, 1994, 84: 313~320.

[2] 余 清,刘 勇,莫笑晗,等.氨基寡糖素在烟草上的应用[J]. *中国生物防治*, 2002, 18(3): 128~131.

[3] 廖璇刚,盛仙俏,吴惠玲.氨基寡糖素防治番茄苗晚疫病试

验[J]. *植保技术与推广*, 2001, 21(7): 14.

[4] 徐作翥,李林,李长松,等.中生菌素和氨基寡糖素对西瓜枯萎病防治试验[J]. *中国蔬菜*, 2003(3): 10~12.

[5] 苏小记,王亚红,贾丽娜.氨基寡糖素对辣椒病害的控制作用研究[J]. *中国农学通报*, 2004, 20(2): 195~197.

[6] 赵小明,李东鸿,杜昱光,等.2%氨基寡糖防治苹果花叶病[J]. *植物保护*, 2002, 28(5): 15~17.

[7] 赵小明,杜昱光,白雪芳.氨基寡糖素诱导作物抗病毒病药效试验[J]. *中国农学通报*, 2004, 20(4): 245~247.

[8] 李应金,刘 勇,李 强,等.几种药剂防治烟草病毒病田间药效比较[J]. *植物保护*, 2005, 31(4): 88~91.

[9] 郭红莲,李 丹,白雪芳,等.壳寡糖对烟草 TMV 病毒的诱导抗性研究[J]. *中国烟草科学*, 2002, (4): 1~3.

[10] 商文静,赵小明,杜昱光,等.壳寡糖诱导植物抗病毒病研究初报[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2005, 33(5): 73~75.

[11] Gooding G V jr, Hebert T T. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities[J]. *Phytopathology*, 1967, 57(11): 1285.

[12] Van Loon L C, Bakker P A H M, Pieterse C M J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1998, 36: 453~483.

