

壳寡糖诱导植物抗病毒病研究初报^{*}

商文静¹, 赵小明^{1, 2}, 杜昱光², 商鸿生¹

(1 西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100;

2 中国科学院 大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

[摘 要] 以海洋壳寡糖中科6号为试材, 对寡糖类化合物抗病毒性质和抗病毒机理进行了初步研究。室内生测结果表明, 烟草用50 $\mu\text{g/mL}$ 中科6号预防处理后24 h再接种烟草花叶病毒(TMV), 其对由TMV引起的烟草花叶病毒病的相对防效为84.73%, 显著高于对照; K-I染色法试验结果表明, 预防处理烟草半叶上的淀粉斑平均为35个, 明显少于对照; 叶绿素测定结果表明, 50 $\mu\text{g/mL}$ 中科6号预防处理的烟草叶绿素含量达8.67 $\mu\text{g/g}$, 高于发病对照和病毒A预防处理组, 低于空白对照。

[关键词] 壳寡糖; 中科6号; TMV; 诱导抗病性

[中图分类号] S432.2⁺6; S432.4⁺1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2005)05-0073-03

植物病毒病会给农作物生产带来严重的经济损失, 据估计, 全世界每年仅由烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)造成的损失就达1亿美元以上。由于病毒在植物细胞中专性寄生, 其复制所需的物质、能量和场所完全依赖寄主, 使得植物病毒病的防治尤为困难, 至今尚无有效的化学防治药剂^[1, 2]。有研究^[3, 4]表明, 许多健康植物、动物和微生物的提取物及代谢产物在一定程度上能抑制植物病毒的侵染和复制, 这些天然的抗植物病毒物质具有无污染、无药害等优点, 在生产实践中的应用潜力巨大。本研究以生物寡糖制剂——中科6号为材料, 研究了其抗植物病毒的性质和机制, 以便为其应用于生产实践提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

供试毒源为烟草花叶病毒(Tobacco Mosaic Virus, TMV), 由亚洲蔬菜研究与开发中心K. S. Green女士惠赠, 在普通烟(*Nicotiana glauca*)上繁殖。供试药剂中科6号(质量分数100%壳寡糖), 由中国科学院大连化学物理研究所研制。供试植物为普通烟。

1.2 方 法

1.2.1 中科6号对烟草花叶病毒病的相对防效
试验采用完全随机设计, 中科6号浓度设置25, 50,

75和100 $\mu\text{g/mL}$ 4个水平, 烟苗经中科6号预防处理后接TMV时间设置48, 24和12 h 3个水平, 共12个处理, 每处理12株, 重复5次, 以清水处理为对照。中科6号和清水处理均于烟草大十字期采用叶面喷施法进行; 病毒接种方法采用常规汁液机械摩擦接种, 接种质量浓度为40 $\mu\text{g/mL}$ 。接种后每隔3 d调查1次各处理植株的发病和生长情况, 计算病情指数和相对防效, 取其平均值并进行方差分析。

病情指数 = $\frac{\sum [(\text{感病植株} \times \text{该级代表值}) / (\text{调查点株数} \times \text{最高级代表值})]}{\times 100\%}$

相对防效/% = $\frac{(\text{对照平均病情指数} - \text{处理平均病情指数})}{\text{对照平均病情指数}} \times 100\%$

1.2.2 中科6号对烟草叶片叶绿素含量的影响
选取生长发育基本一致, 叶色浓绿的普通烟。植株打顶, 抹去老叶, 每株留对生的2片叶, 用50 $\mu\text{g/mL}$ 中科6号处理烟苗, 24 h后用40 $\mu\text{g/mL}$ TMV机械摩擦接种。分别设发病对照、600倍病毒A处理对照和空白对照, 每处理3个重复。开始发病5 d后, 采收各处理相同叶位的叶片, 将采收的叶片剪碎, 混匀, 然后称取新鲜叶片0.2 g, 按照文献[5]的方法提取叶绿素, 并用2021型分光光度计在652 nm处测定其光密度值, 以体积分数80%丙酮为对照, 计算叶片叶绿素含量。

1.2.3 中科6号对病毒侵染点的影响 选取4株

* [收稿日期] 2004-08-27

[基金项目] 国家“863”高新技术研究与发展计划项目(2001AA 625010); 西北农林科技大学青年基金项目

[作者简介] 商文静(1972-), 女, 辽宁大连人, 讲师, 在职博士, 主要从事植物病毒学研究。

生长均一、叶色深绿的普通烟。植株打顶,抹去老叶,每株留 4 片长势均一的叶片,用 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 中科 6 号处理左半叶,24 h 后用 $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ TMV 机械摩擦接种整个叶片。接种 7 d 后将待测植株移至黑暗处 12 h,将叶片摘下,放入体积分数 95% 乙醇中加热至 80 固定,至叶片完全褪色为止,然后用 K-I 混合剂染色,根据侵染点处出现的淀粉—碘兰色反应,以相同叶位为 1 组,测定侵染点数。

2 结果与分析

2.1 中科 6 号室内相对防效

表 1 列出中科 6 号 4 个浓度水平在各预防处理时间上病情指数和相对防效的平均值,其中预防处理 24 h 后接种 TMV,烟草对烟草花叶病毒病的平均相对防效达 77.9%,显著高于其他 2 个处理。

表 1 中科 6 号处理后不同时间接种 TMV 对烟草花叶病毒病的防治效果

Table 1 Control effect on TMV with Zhongke 6 in different treatment stages

处理时间 Treatment time	病情指数 Average ID	相对防效/% Relative control effect
48 h	53.75	33.84 c
CK	81.25	
24 h	15.75	77.09 a
CK	68.75	
12 h	35.00	53.33 b
CK	75.00	

注:同列数据后标不同字母者差异显著($P < 0.05$)。下表同。

Note: The data in the same column with different letter means the differences are significant ($P < 0.05$). The following table is the same.

表 2 结果表明,用不同浓度中科 6 号预防处理后 24 h 接种 TMV,其中以 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 中科 6 号处理的效果最好,其对烟草花叶病毒病的相对防效高达 85.45%,显著高于对照和其他处理。

表 2 不同浓度中科 6 号对烟草花叶病毒病的防治效果

Table 2 Control effect on TMV with Zhongke 6 in different treatment concentrations

中科 6 号/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Zhongke 6	病情指数 Average ID	相对防效/% Relative control effect
25	15.00	78.18 b
50	10.00	85.45 a
75	21.00	75.27 b
100	35.00	69.45 c
CK	68.75	

症状观察结果表明(图 1),用中科 6 号预防处理后 24 h 接种 TMV,可以明显减轻烟草花叶病症状,处理叶片只有轻微花叶和褪绿,而对照叶片花叶

症状明显,且伴有明显疱斑,叶片扭曲畸形。

综合以上结果认为,中科 6 号对烟草花叶病有明显预防效果,是一种较为理想的抗病毒制剂。

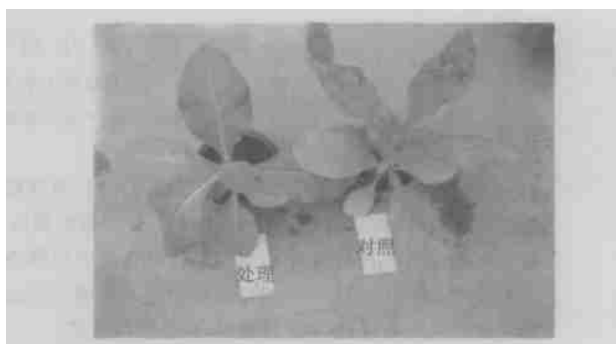


图 1 中科 6 号处理与对照 TMV 症状比较

Fig 1 Comparison on TMV symptom of CK and treatment with Zhongke 6

2.2 中科 6 号对植物叶绿素含量的影响

TMV 侵染烟草以后,会进一步增殖扩展,造成植物组织内叶绿体降解,干扰叶绿素的合成,引起叶片褪绿花叶^[6]。图 2 结果表明,用 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 中科 6 号预防处理的烟苗,其叶绿素含量达 $8.67\text{ }\mu\text{g/g}$,高于发病对照和病毒 A 预防处理组,低于空白对照。说明烟苗经中科 6 号预防处理后,能够抑制病毒对叶绿体的降解,减少病毒对叶绿素合成的干扰,减轻症状表现,提高叶片光合作用及植物抗病性。

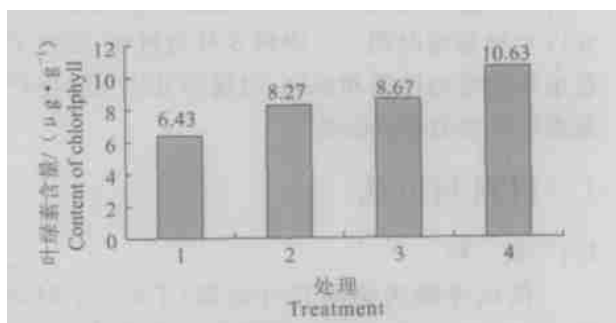


图 2 中科 6 号处理对烟草叶绿素含量的影响

1 发病对照; 2 600×病毒 A; 3 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 中科 6 号; 4 空白对照

Fig 2 Effect of Zhongke 6 on chlorophyll content in tobacco leaf

1 Positive control; 2 Virus A (600×);

3 Zhongke 6 ($50\text{ }\mu\text{g/mL}$); 4 Negative control

2.3 中科 6 号对 TMV 侵染点的影响

侵染点减少是植物抗病的表现之一^[7]。试验结果表明,用 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 中科 6 号预防处理后 24 h 再接种 TMV,烟草叶片上处理半叶的平均侵染点为 36.25 个,显著低于对照 73.25 个,表明中科 6 号预防处理对病毒侵入有一定的抑制作用。

3 讨 论

20 世纪 80 年代前期,美国 Peter A lbershem 教授首先提出寡糖具有调控植物生长发育、繁殖、防病、抗病等功能,并认为寡糖将成为一类新型的植物激素(或称植物调节因子)^[8]。此后寡糖在植物体内作为诱导物诱导植物抗病性的特性越来越受到人们的关注,并相继在真菌性、细菌性病害中得到证实^[9~12],但对其抗病机理的研究尚不多见。中科 6 号是寡糖的一种——壳寡糖(oligosaccharide)的纯品,采用特殊工艺从海洋低等动物(如虾、蟹和昆虫等)体内以及一些微生物(如真菌和藻类)中提取得到。

本研究明确了中科 6 号具有诱导植物抗病毒的特性,并初步明确了其诱导抗性表达的时间和表达量,证明中科 6 号可以改善植物的生理状态,推测其对植物体内的病毒本身也具有一定的抑制作用。在抗病性表达的 3 个环节中,中科 6 号表现出对病毒侵入具有一定的影响,但由于本研究采用的接种方法为机械摩擦接种,因而还不能得出中科 6 号具有诱导抗侵入特性的结论。侵染点数量的减少可能是由于中科 6 号在体外钝化了病毒,或者存在其他机制,从而影响了病毒的侵入。植物诱导抗病性是一个复杂的病理过程,有关中科 6 号诱导抗病性的性质及其机制,还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 江 山,韩熹莱 植物病毒病化学防治研究进展[J]. 中国病毒学,1995,10(1): 1- 7.
- [2] 安德荣 植物病毒化学防治的研究现状和所面临的问题[J]. 生命科学,1994,6(2): 15- 18.
- [3] 刘瑞学,张碧峰 抗植物病毒剂的研究和应用[J]. 国外农业——植物保护,1994,7(3): 8- 11.
- [4] 马鹏鹏,何立干 壳聚糖对植物病害的抑制作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(6): 82- 86.
- [5] 高俊凤 植物生理学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司,2000.
- [6] 侯玉霞,李重九,刘 仪,等 抗病毒剂对烟草花叶病毒与烟草叶绿体互作的影响[J]. 植物保护,1998,24(2): 10- 13.
- [7] 李振岐 植物免疫学[M]. 北京: 中国农业出版社,1997.
- [8] 皮特·沃伯姆 低聚糖素[J]. 刘 英,译 科学,1986,(1): 16- 26.
- [9] 王长云,管涛涛 多糖抗病毒作用研究进展[J]. 生物工程进展,2000,20(1): 17- 20.
- [10] 杜昱光,白雪芳,李曙光,等 寡聚糖生物农药对棉花体内细菌数量和作物生长的作用[J]. 中国微生物生态学杂志,2001,13(2): 70- 72.
- [11] 赵 雷,梁存元,刘红荣,等 壳寡糖对烟草黑胫病的作用[J]. 应用与环境生物学报,2000,6(5): 436- 439.
- [12] 孙 辉,杜昱光,马 青,等 真菌源寡聚糖对几种植物病原菌的抑制作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2003,31(1): 127- 130.

First report on oligosaccharide induced resistance to plant virus

SHANG Wen-jing¹, ZHAO Xiao-ming^{1,2}, DU Yu-guang², SHANG Hong-sheng¹

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

2 Institute of Dalian Chemistry and Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: The resistance characteristics and mechanism of oligosaccharide, a kind of ocean oligosaccharide (Zhongke 6), to plant virus were studied. The bioactivity of Zhongke 6 resistance to TMV was tested. Results showed that relative control effect with 50 $\mu\text{g/mL}$ concentration of Zhongke 6 pretreatment for 24 h was 84.73%. The TMV infection sites on tobacco leaves were tested with K-I dyeing method. Results showed that Zhongke 6 could influence the characteristics of intruding of TMV. Average starch spots on semi leaf treating with 50 $\mu\text{g/mL}$ Zhongke 6 were 35, significantly less than CK. Chlorophyll contents on leaf pretreatment with 50 $\mu\text{g/mL}$ Zhongke 6 was 8.67 $\mu\text{g/g}$, more than positive CK and Virus A treatment, but less than negative CK. The decomposition of chloroplast resulting from virus was restrained after pretreatment with Zhongke 6. The virus interfering synthesis of chlorophyll was reduced. The virus symptom was light. The photosynthesis and resistance to virus were improved.

Key words: oligosaccharide; Zhongke 6; TMV; induced resistance