

Local Sun-Cured Tobacco Germplasm Resources for the Genotypic Difference of Tobacco Black Shank Resistance and the Mechanisms of Tobacco Black Shank

Yan Li¹, Lieshu Zhu², Qiang Yao¹, Xiaoliang Zhang¹, Wei Guo¹, Chengsheng Yan^{3*}

¹ Hengnan County Corporation, Tobacco Company in Hengyang City, Hengyang Hunan

² Hunan Agricultural University, Changsha Hunan

³ Tobacco Company in Hengyang City, Hengyang Hunan

Email: zhytobacco@sina.com

Received: Jun. 1st, 2017; accepted: Jun. 13th, 2017; published: Jun. 16th, 2017

Abstract

Aiming to explore germplasm resources of the local sun-cured tobacco which were resistant to the tobacco black shank was identified in field period in this study in order to the methods identification the tobacco black shank in breeding. The result showed that there were significant differences in resistance among different species. The 13 species were high-resistance varieties such as *Jipizhong*, *Buye637* and so on. *Cunsanpi*; *Hanguyan*, *Kumaye*, *Baiyandahua* were medium-resistance varieties; susceptible varieties were *Bagumaoyan* and *Mayangquanyan*. The study was conducted on the relationship between biochemical reactions and resistance mechanisms of the 10 species with different resistance to tobacco black shank. The results showed that the resistant varieties polyphenol oxidase, superoxide dismutase activity, wood hormone levels of the resistant species after artificial inoculation were higher than susceptible ones.

Keywords

Tobacco, Germplasm Resources, Tobacco Black Shank, Resistance Mechanism

地方晒烟资源对烟草黑胫病抗性的基因型差异以及烟草黑胫病机理的研究

李艳¹, 朱列书², 姚强¹, 张小良¹, 郭维¹, 颜成生^{3*}

*通讯作者。

文章引用: 李艳, 朱列书, 姚强, 张小良, 郭维, 颜成生. 地方晒烟资源对烟草黑胫病抗性的基因型差异以及烟草黑胫病机理的研究[J]. 农业科学, 2017, 7(3): 201-208. <https://doi.org/10.12677/hjas.2017.73026>

¹衡阳市烟草公司衡南县分公司, 湖南 衡阳

²湖南农业大学, 湖南 长沙

³衡阳市烟草公司, 湖南 衡阳

Email: zhytobacco@sina.com

收稿日期: 2017年6月1日; 录用日期: 2017年6月13日; 发布日期: 2017年6月16日

摘 要

为了发掘地方晒烟抗烟草黑胫病种质, 寻找烟草抗黑胫病育种抗性亲本, 本研究通过对这些晒烟进行室内烟草黑胫病抗性鉴定, 发现不同品种间抗性差异明显, 抗病品种有鸡皮种、部叶637、邵黄一号、寸三皮等13个品种; 中抗品种有早谷烟、苦麻叶、白岩大花; 中感品种有麻阳泉烟、把固毛烟; 选择10个对烟草黑胫病抗、感性不同的品种进行了生化反应与抗性关系的研究, 结果表明人工接种后, 抗性品种多酚氧化酶活性、超氧化物歧化酶活性、木质素含量均高于感病品种。

关键词

烟草, 种质资源, 黑胫病菌, 品种抗性

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

烟草黑胫病是一种分布广泛、危害严重的世界性烟草主要病害。1986年 BreddeHan 在印度尼西亚的爪哇首次发现, 此后该病流行蔓延迅速。目前在全国烟区均普遍发生, 目前尚无高效药物防治该病, 号称为“烟草三大癌症”之一。

传统的黑胫病诱发鉴定、自然鉴定和接种鉴定方法虽然可靠, 但是对环境条件要求严格, 并且周期长、需要大量劳力, 因此本研究采取室内接种鉴定的方法, 在高温高湿情况下, 使烟株接种黑胫病菌。通过对晒烟品种植株接种黑胫病后的生理生化指标的变化, 为烟草抗黑胫病育种提供理论指导, 以期能通过这些生理生化变化建立早期品种黑胫病抗性鉴定的方法, 减少劳动量和缩短鉴定周期。

种植抗病品种是防治黑胫病经济而有效的措施。通过发掘地方晒烟抗烟草黑胫病种质, 为烟草抗黑胫病育种提供抗性亲本。

2. 材料与方法

2.1. 供试品种

供试品种为 22 份地方晒烟资源(由中国烟草中南农业试验站提供, 为目前中国现存所有的晒烟品种的种子, 并用于国家种质资源平台建设项目), 详见表 1。

2.2. 供试菌株

烟草黑胫病菌 0 号生理小种(由中国农科院青州烟草研究所提供)

Table 1. Tested sun-cured tobacco germplasm resources
表 1. 参试晒烟种质资源

序号 Serial number	品种名称 Variety name	来源 Source	株型 Plant type	叶尖 Tip	叶面 Leaf	叶缘 Leaf margin	叶片厚薄 Leaf thickness	叶形 Leaf shape
2	鸡皮种	湖南	桶形	渐尖	稍平	微波	较厚	卵圆
3	部叶 637	湖南	塔形	渐尖	稍皱	微波	中等	宽卵圆形
7	苦麻叶	湖南	桶形	尾尖	稍平	平滑	中等	长椭圆形
8	麻阳泉烟	湖南	桶形	渐尖	稍平	微波	中等	椭圆形
9	长叶旋烟	湖南	桶形	尾尖	稍平	微波	较薄	卵圆
10	白岩大花	湖南	桶形	渐尖	平	微波	较薄	长椭圆形
12	大叶毛烟	湖南	桶形	尾尖	稍皱	微波	中等	椭圆形
13	泸溪柳叶尖	湖南	塔形	渐尖	稍平	微波	中等	卵圆
14	艾口烟	湖南	桶形	渐尖	稍平	微波	中等	卵圆
15	邵黄一号	湖南	桶形	尾尖	平	微波	较薄	长椭圆形
16	寸三皮	湖南	桶形	渐尖	稍皱	微波	中等	长椭圆形
17	猫耳烟	湖南	桶形	渐尖	稍平	微波	较薄	椭圆形
18	苗市多叶	地方	桶形	尾尖	稍平	微波	中等	心脏形
20	天堂旱烟	地方	桶形	渐尖	稍皱	微波	中等	椭圆形
21	广杂 87 号	选育	桶形	渐尖	稍皱	微波	中等	椭圆形
23	Robertsom	美国	桶形	渐尖	平	微波	较薄	宽椭圆形
24	早谷烟	湖南	桶形	渐尖	平	微波	中等	心脏形
25	云阳柳叶烟	湖南	桶形	渐尖	平	微波	中等	长椭圆形
26	平地乡大柳叶	湖南	桶形	渐尖	平	微波	中等	长椭圆形
27	晒 9118	湖南	桶形	渐尖	稍平	微波	中等	长椭圆形
28	晒 92414	选育	桶形	渐尖	稍平	微波	中等	卵圆
30	Va331-1	巴西	桶形	尾尖	稍平	微波	中等	长椭圆形

2.3. 培养基作方法

按照 YC/T 41-1996 烟草品种抗病性鉴定标准, 燕麦片琼胶培养基具体制作方法为: 燕麦片 30 g 放入烧杯, 先加水 1000 ml, 再在沸水浴中加热 1 h, 用纱布过滤后加水补足 1000 ml, 最后将 17~20 g 琼胶融化后分装灭菌(121℃, 20 min)。

2.4. 菌谷制作方法

按照 YC/T 41-1996 烟草品种抗病性鉴定标准, 菌谷具体制作方法为: 先将谷子煮至约有一半谷粒开花捞出, 装入三角瓶高压(121 摄氏度、1.5 个大气压)灭菌 1 小时。将已培养好的黑胫病菌种, 接种到灭菌后并已冷却的谷子上, 然后置于 28℃~30℃下培养 10 至 14 天, 即成。

2.5. 地方晒烟对烟草黑胫病菌的抗性鉴定

采用随机区组试验设计, 每个品种 25 株, 设 3 次重复。

试验于 2008 年 2 月在湖南农业大学育苗大棚播种, 漂浮育苗。按照 YC/T 41-1996 烟草品种抗病性鉴定标准, 烟苗在大十字期进行假植, 在育苗漂浮盘上每 4 个格子栽一棵苗, 待苗龄达到 40~50 天时, 移入湖南农业大学生物安全学院实习基地, 进行接种鉴定, 每株接种 3~5 mg, 温度控制在 28 摄氏度左右。调查时间: 在接种后第 3、5、7、10 日进行抗性鉴定, 每次调查各品种全部植株。

病害严重度分级按 YC/T39-1996 的规定(0 级: 全株无病; 1 级: 茎部病斑不超过茎围的二分之一, 或半数以下叶片轻度凋萎, 或下部少数叶片出现病斑; 2 级: 茎部病斑超过茎围的二分之一, 或半数以上; 3 级: 茎部病斑环绕茎围, 或三分之二以上凋萎; 4 级: 病株全部叶片凋萎或枯死)计算发病率和病情指数。

病株率(%) = 发病株数/调查总株数 × 100; 病情指数 = $\sum(\text{各级病株数} \times \text{该病级}) / (\text{调查总株数} \times 4)$, 以 3 个重复最后 1 次调查的平均病指作为抗性划分标准。

抗性划分标准: 抗病(R): 病指 25 以下; 中抗(MR): 病指 25.1~50; 中感(MS): 病指 50.1~75; 感病(S): 病指 75 以上。

2.6. 烟草黑胫病机理的研究

试验根据参试品种对烟草黑胫病抗性鉴定结果, 选取对生理小种 0 号高抗的品种革新 3 号、16 号品种(寸三皮)、21 (广杂 87 号)、28 (晒 92414), 中抗品种 7 (苦麻叶)、24 (早谷烟)、金星 6007 及感病品种 8 (麻阳泉烟)、11 (把固毛烟)、小黄金 1025 按上述接种方法接种, 以不接种为对照, 设 3 个重复, 接种和发病后取样。

2.6.1. 多酚氧化酶(PPO)活性测定

称取鲜烟叶 1 g, 加入 0.05 mol/L (pH 6.0)的磷酸缓冲液 5 mL 和提取缓冲液(0.1 mol/L Tris2HCl) 2 mL, 冰浴匀浆, 离心, 留上清液备用。反应体系为 0.1 mol/L 的邻苯二酚和 1 mol/L 0.05 mol/L (pH 6.0)的磷酸缓冲液 3.9 mL, 酶液 0.1 mL, 对照以蒸馏水替代酶液反应温度为 30℃, 反应时间为 2 min, 测 OD398 [1]。

2.6.2. 超氧化物歧化酶活性测定

称取 0.5 g 鲜样叶, 加入 0.05 mol/L (pH 7.8)的磷酸缓冲液 5 mL 冰浴匀浆, 离心, 留上清液备用。反应体系为试剂一 1 ml、样品 0.030 ml (对照管 0.030 蒸馏水), 试剂二 0.1 ml, 试剂三 0.1 ml, 试剂四 0.1 ml, 用漩涡混匀器充分混匀, 置 37 摄氏度温水浴 40 分钟, 加入显色剂 2 ml, 混匀, 室温放置 10 分钟, 于波长 550 nm, 1 cm 光径比色杯, 蒸馏水, 比色。

2.6.3. 木质素的测定

参照文献 25 的方法: 接种前和发病后分别称取不同晒烟品种叶片病健叶片 5 g, 取样快速干燥后, 称取叶片干样 0.05 g, 先用 1%醋酸、丙酮等分离出水溶性和脂溶性化合物, 再用 72%硫酸水解除去纤维素和半纤维素, 2500 r/min 离心后 0.05 mol/l 重铬酸钾 - 硫酸氧化水解样品中的木质素, 过量的重铬酸钾采用碘量法滴定, 在终点前加倒去上清液, 沉淀用蒸馏水洗涤后, 用 1 ml 淀粉指示剂, 然后滴定到绿色, 根据标准液的消耗量计算样品中的木质素的含量。

$$\text{木质素的含量}(\%) = 0.43 \times k(a - b) \div DW$$

K: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{SO}_3$ 的浓度; DW: 样品干重(g); a: 滴定对照液所用 0.5 mol/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{SO}_3$ 体积(ml); b: 滴定样品液所用 0.5 mol/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{SO}_3$ 体积(ml)。

2.7. 数据分析方法

采用 excel 图表进行分析。

3. 结果与分析

3.1. 抗性鉴定

如表 2 所示, 抗性品种占 72%、中抗品种占 18%、感病品种占 10%。抗病品种有品种 02 (鸡皮种)、03 (部叶 637)、06 (辰溪香烟)、12 (大叶毛烟) 13 (泸溪柳叶尖)、14 (艾口烟)、15 (邵黄一号)、16 (寸三皮)、17 (猫耳烟)、18 (苗市多叶)、20 (天堂旱烟)、21 (广杂 87 号)、23 (Robertsom)、25 (云阳柳叶烟)、28 (晒 92414)、30 (Va331-1); 中抗品种有: 24 (早谷烟)、07 (苦麻叶)、10 (白岩大花)、26 (平地乡大柳叶); 中感品种有 08 (麻阳泉烟)、11 (把固毛烟)。来源于湖南的 16 份晒烟品种(除了品种 18、20、21、23、28、30 以外, 均来源于湖南)中, 抗性品种占 63.5%、中抗品种占 25%、中感病品种占 12.5%。

本试验抗性鉴定结果中, 抗病(包括高抗、中抗、抗病)品种所占比率为 90%, 高于许美玲、戴培刚试验所得结论(分别为 58.69%、27.40%), 这种抗性差异很可能与供试菌株的生理小种的差异有关, 也可能与抗性诱发鉴定方法的差异有关; 也说明这些抗病地方种质尤其是发病指数低于 10% 的品种(品种 13、18、30), 是选育抗黑胫病品种的珍贵的抗性来源, 加上地方种质具有适应性强、抗逆性好的优点, 因此他们具有很高的抗性利用价值。

3.2. 供试烟株接种烟草黑胫病菌前后生理生化指标的变化

3.2.1. 多酚氧化酶接种前后活性变化

本试验结果与魏相峰[2] [3] [1]、杨建卿[1]的研究结果一致。由图 1 可知, 接种前, 抗性品种 PPO 活性大于感病品种, 范围分别为 192~399 U/g·ml·min、147~182 U/g·ml·min。接种后, 对照和作了接种处理的品种多酚氧化酶活性均比接种前提高很多, 前者较接种前提高幅度为 73%~251%, 后者提高幅度为 231%~524%, 可见作了再接种后, 接种的处理多酚氧化酶活性要比对照提高幅度更大。抗性品种的接种后多酚氧化酶活性要比中抗、感病品种的高, 中抗的也要比感病的活性强。这可能是由于烟草黑胫病菌毒素的攻击激活了 PPO 基因的表达, 产生了大量 PPO, 使得接种后抗感品种 PPO 活性大于对照。

3.2.2. 超氧化物歧化酶接种前后活性变化

本试验结果与匡传富[4]、房保海[5]等所得的结果相似。由图 2 可知, 接种前, 抗性品种 SOD 活性显著大于感病品种, 范围分别为 0.564~0.859 U/ml、0.349~0.402 U/ml。在接种后各品种 SOD 酶不论作了接种处理与否, 活性均有很明显的提高: 中抗品种提高幅度略大于抗性品种, 显著大于感病品种; 接种处理略高于对照。做了接种的处理在接种前酶活性范围是 0.349~0.837 U/ml, 接种后 0.931~1.648 U/ml, 对照在接种后是 0.598~1.578 U/ml。这说明病原菌感染激活了 O_2^- 的产生系统, 植株体内产生大量的活性氧 O_2^- , 激活了 SOD 基因的表达[3] [1] [4], 产生了大量 SOD。

3.2.3. 木质素接种前后含量变化

由图 3 可知, 在接种前, 抗感品种、对照与处理的木质素含量差别极小。在接种黑胫病菌后, 各处理木质素含量均有所增加, 幅度为 5%~9.5%, 并且抗性品种的增加量明显要高于感病品种; 对照(未接种)增加幅度不大, 木质素增加量低于 1%。根据参试品种接种后多酚氧化酶活性变化规律: 抗性品种多酚氧化酶活性要比感病的强, 从而抗性品种多酚氧化酶催化形成木质素含量比感病品种高。

4. 小结与讨论

1) 22 份参试地方晒烟种质中, 抗性品种占 72%、中抗品种占 18%、感病品种占 10%。来源于湖南的 16 份晒烟品种(除了品种 18、20、21、23、28、30 以外, 均来源于湖南)中, 抗性品种占 63.5%、中抗品种占 25%、中感病品种占 12.5%, 黑胫病抗性和中抗品种分布频率在总体以及华中烟区分布频率高于戴

Table 2. Identification results of anti-black shank
表 2. 抗黑胫病鉴定结果

序号 Serial number	发病率% Incidence	发病指数% Disease index	抗性级别 Resistance level
2	13.33	13.89	R
3	33.04	20.46	R
6	15.00	23.61	R
7	62.81	43.43	M R
8	70.83	59.85	M S
10	50.48	27.63	M R
11	76.43	61.43	M S
12	53.38	25.00	R
13	13.33	6.94	R
14	45.71	18.33	R
15	25.79	12.83	R
16	26.39	10.56	R
17	42.78	23.47	R
18	27.76	5.00	R
20	18.60	10.65	R
21	47.78	21.39	R
23	30.71	19.88	R
24	51.22	43.12	M R
25	19.20	15.91	R
26	45.00	27.50	M R
28	27.57	15.96	R
30	11.67	5.83	R

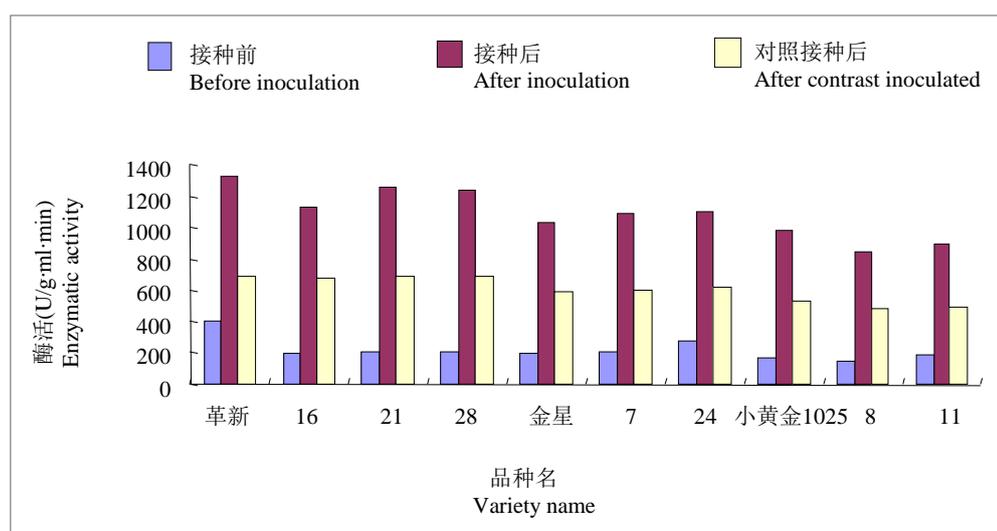


Figure 1. Changes of polyphenol oxidase activity before and after inoculation
图 1. 接种前后多酚氧化酶活性变化

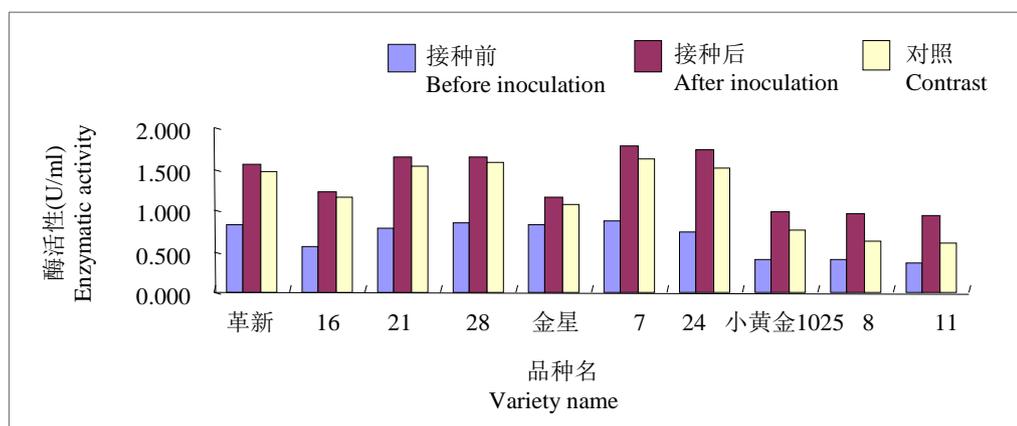


Figure 2. Changes of SOD before and after inoculation

图 2. 接种前后 SOD 的变化

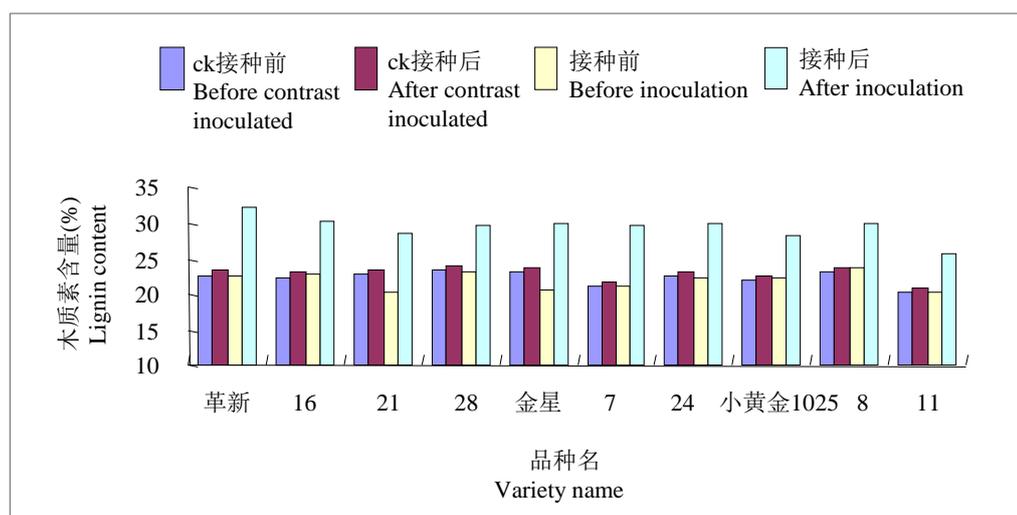


Figure 3. Changes of lignin before and after inoculation

图 3. 接种前后木质素含量变化

培刚、刘艳华、王志德等人所做试验得出的结论，这很可能与供试菌株的差异有关，因为不同品种对各个黑胫病菌的生理小种抗性也不同，也可能与抗性鉴定的方法以及样本量的差异有关，同时也说明这些地方晒烟抗性种质抗性育种具有珍贵的利用价值。

2) 从改良品种抗性单个角度考虑，以下晒烟品种可通过杂交，用于选育抗黑胫病烤烟品种，即 02 (鸡皮种)、03 (部叶 637)、06 (辰溪香烟)、13 (泸溪柳叶尖)、14 (艾口烟) 15 (邵黄一号)、16 (寸三皮)、17 (猫耳烟)、18 (苗市多叶)、20 (天堂旱烟)、21 (广杂 87 号)、23 (Robertsom)、25 (云阳柳叶烟)、28 (晒 92414)、30 (Va331-1)。品种 15 (邵黄一号)和品种 18 (苗市多叶)的各项植物学指标均较好，且抗黑胫病，可以与一些优良烤烟品种进行杂交，作为抗黑胫病非轮回亲本进行回交，选育高产、高抗的烤烟品种。

3) 本研究认为，不同抗性的品种接种黑胫病菌后，多酚氧化酶活性、超氧化物歧化酶活性、木质素含量均显着提高，对照则变化相对较小，或者说变化量没有接种黑胫病菌的高，并且抗性越高，活性提高量越大。所以接种后测定木质素含量、多酚氧化酶活性、超氧化物歧化酶活性可以作为晒烟品种抗性的生理生化指标。

参考文献 (References)

- [1] 杨建卿, 许大风, 江彤, 等. 不同烟草品种罹黑胫病后几种酶活性的变化[J]. 合肥工业大学学报, 28(7): 817-819.
- [2] Hammerschmidt, R., Nuckles, E.M. and Kuć, J. (1982) Association of Enhanced Peroxidase Activity with Induced Systemic Resistance of Cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology*, **20**, 73-82.
- [3] 魏相峰. 不同抗性烟草品种感染 *Pseudomonas syringae*pv. *tabaci* 病菌后几种酶活性测定[J]. 检验检疫科学, 2006, 2: 16-18.
- [4] 匡传富, 罗宽. 烟草品种对青枯病抗病性及抗性机制的研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2002, 28(5): 395-398.
- [5] 房保海, 张广民, 迟长风, 等. 烟草低头黑病菌毒素对烟草丙二醛含量和某些防御酶的动态影响[J]. 植物病理学报, 2004, 34(1): 27-31.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjas@hanspub.org