赵婉晴,林壁润,杨祁云,等.胆酸钠诱导的烟草抗TMV效应及其作用机制[J].华中农业大学学报,2026,45(3):215-224.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2026.03.019

胆酸钠诱导的烟草抗TMV效应及其作用机制

赵婉晴[1],林壁润[2],杨祁云[2],陈泽鹏[3],时映[4],陈烽[4],杨欢[4],阮小蕾[1]

1.华南农业大学植物保护学院/广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室,广州 510642;
2.广东省农业科学院植物保护研究所/广东省植物保护新技术重点实验室,广州 510640;
3.中国烟草总公司广东省公司,广州 510610;4.广东烟草梅州市有限公司,梅州 514021

摘要 为筛选针对烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus,TMV)的新型免疫诱抗剂,采用甘草酸二钾、甘草酸二胺、甘草霜、胆酸钠、铝试剂分别处理烟草;24 h后接种TMV;7 d后进行定量PCR和Weatern-blot检测。结果显示:10 mg/mL的胆酸钠处理烟草,可以有效抑制*TMV-CP*基因的表达和CP的积累,其最佳诱导时间是24 h,接种TMV后的第11天进行第2次胆酸钠处理,诱导的TMV抗性可以持续30 d以上。对茉莉酸通路、水杨酸通路和乙烯通路相关基因的表达情况分析显示,胆酸钠诱导的TMV抗性与茉莉酸信号通路密切相关。研究表明,胆酸钠是针对TMV的1种有效的免疫诱抗剂,胆酸钠处理还可以促进烟苗的生长。

关键词 烟草花叶病毒;胆酸钠;免疫诱抗剂;烟草诱导抗病性
中图分类号 S435.72 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2026)03-0215-10

烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus,TMV)是侵染烟草最常见的病毒[1],TMV属于杆状病毒科(*Baculoviridae*),烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*),是正单链RNA病毒,其病毒粒体是长约300 nm、直径约18 nm的直杆状颗粒[2]。在自然环境中,TMV寄主广泛且传播速度快,给我国烟草产业带来重大的经济损失[3]。目前,针对TMV的传统防控措施主要包括从源头阻断病毒的侵染和传播的培育脱毒烟苗[4]、加强田间管理、注意水肥的合理性、及时清理生产垃圾、尽可能地降低病毒传播的风险[5]等。

植物免疫诱抗剂是指没有直接杀菌活性,但能激活植物免疫系统使植物获得或提高对病原菌抗性的药物或生物代谢产物[6]。根据不同的来源,植物免疫诱抗剂可分为生物源诱导子和非生物源活性分子;根据种类可分为有机酸类、无机化合物、寡糖类和蛋白多肽类以及植物免疫诱导菌(如木霉菌、芽胞杆菌)等[7-8]。许多植物免疫诱抗剂对植物都有促生长作用,应用后植株的株高、茎围、根长等生理指标高于常规生长的植物[9]。

邱德文[10]利用极细链格孢(*Alternaria tenuissima*)的主效蛋白激发子Pea T1和Hrip研发出了广谱的免疫诱抗剂-阿泰灵,该制剂能促进植物根系生长,强化免疫反应,有效防治病害。郭红莲等[11]采用50和75 μg/mL的壳寡糖诱导心叶烟,发现能有效抑制枯斑的发生而且能体外钝化TMV,使其病毒粒体发生断裂,失去致病性。王静等[12]叶面喷施壳寡糖与水杨酸不仅能激发晒红烟的自身免疫系统,使其病程相关蛋白基因表达量增高,产生抗病性,还能提质增产。

胆酸钠(sodium cholate)是胆汁酸与钠离子结合后的有机金属盐,易溶于水和醇,是一种非变性的去垢剂和表面活性剂,蛋白研究中常用于膜受体和其他质膜蛋白的提取,可促进膜蛋白溶解并维持其天然状态。胆酸钠大部分应用于医学、畜牧业以及工业领域,目前尚鲜见胆酸钠应用于植物抗病方面的相关报道。为了研发新型的植物免疫诱抗剂,笔者所在研究室测试了多种药剂对TMV的诱导抗性。本研究采用胆酸钠喷施烟草后再接种TMV,通过分析药剂处理后植株里*TMV-CP*基因的表达情况来探究其是否能诱导烟草对TMV产生抗性,考察其促生长作用和诱抗作用持续性,为后续开发新型免疫诱抗剂提供技术参考。

收稿日期:2025-07-04
基金项目:广东省烟草专卖局(公司)科技项目(粤烟科项202201)
赵婉晴,E-mail:2358511560@qq.com
通信作者:阮小蕾,E-mail:ruanxl@scau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 供试材料和药剂

供试植物材料为普通烟草种子，品种为粤烟-97，由笔者所在实验室提供。烟种进行常规育种，获得不带病毒的健康烟苗。供试药剂有6种，分别为胆酸钠（陕西然糠生物科技有限公司）、甘草霜（武汉那拉白医药化工有限公司，甘草酸含量为7%）、甘草酸二钾（广东明通生物科技有限公司）、甘草酸二胺（成都普菲德生物科技有限公司）、铝试剂（上海源叶生物科技有限公司）、6%寡糖·链蛋白（阿泰灵，河北中保绿农作物科技有限公司）。

1.2 供试病毒和接种方法

TMV（普通株系）由笔者所在实验室分离和保存。取感染TMV症状明显的病株的幼嫩叶片1.0 g于研钵中，加入20 mL 0.5 mol/L磷酸缓冲液充分研磨，得到TMV接种液。经过荧光定量PCR检测，其浓度为3.47×10^8 copies/μL。采用常规方法机械摩擦接种TMV于健康烟苗，具体操作为：接种前将金刚砂均匀撒在烟草顶部嫩芽的下一级嫩叶的对叶上，用纱布蘸取病毒接种液从叶柄至叶尖轻轻摩擦叶片3～5次，以叶片无明显损伤为宜，等待2 min后用喷壶喷洒少量清水冲去接种叶上的金刚砂，便于日后观察病症。

1.3 药剂处理烟草诱导*TMV-CP*基因表达

配制成不同质量浓度供试药剂：甘草酸二钾，0.1、1、10、20 mg/mL；甘草酸二胺，0.1、1、10、20 mg/mL；甘草霜，0.1、1、20、50 mg/mL；胆酸钠，0.1、1、5、10、20 mg/mL；铝试剂，0.1、0.5、1、5 mg/mL；阿泰灵，0.75 mg/mL。

药剂处理烟草的方法参照商文静[13]、罗琰[14]的方法，有改动。具体如下：选择十字期的烟苗作为试验材料，选择顶部嫩芽下一级的2片叶片作为处理叶，用金刚砂轻微摩擦造成轻微创伤，再分别将不同质量浓度的药剂喷施到处理叶上；清水和阿泰灵处理分别作为阴性对照和阳性对照，每种药剂处理20株苗，诱导24 h后机械摩擦接种TMV。接种7 d后，取接种叶上部的2～3片幼叶，提取RNA，进行定量PCR检测*TMV-CP*的表达量。

1.4 烟草TMV含量的荧光定量PCR分析

*TMV-CP*基因的质粒标准品由笔者所在实验室制备[15]，已经成功构建了扩增曲线、熔解曲线、标准曲线。标准曲线方程为$y=-3.7596x+44.997$，$R^2=0.999\ 1$，R^2大于0.98；溶解曲线出现单一峰；构建的TMV定量PCR体系可用于样本检测。

利用核酸蛋白仪测定RNA样品的纯度和质量。采用广州瑞真生物公司的反转录试剂盒（Evo M-MLV RT Kit for qPCR）将RNA反转成cDNA，反应体系为：RNA终质量浓度为50 ng/μL、5×RTase Reaction Buffer MIX Ⅱ 2.0 μL、Evo M-MLV RTase Enzyme Mix 0.5 μL、Reverse Primer 0.5 μL，RNA free water加至总体积为10 μL。反转录PCR的反应程序为：37 ℃、15 min；85 ℃、5 s；4 ℃、∞。

反转录完成后的cDNA作为模板，使用广州瑞真公司的试剂盒（SYBR Green Premix Pro *Taq* HS Qpcr Kit）进行绝对定量PCR。反应体系为：cDNA，1.0 μL；2×SYBR Green Pro *Taq* HS Premix，5 μL；Forward Primer，0.2 μL；Reverse Primer，0.2 μL；RNA free water，TMV 3.6 μL，共10 μL。反应程序为：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s、60 ℃退火和延伸30 s；共40个循环。熔解曲线采集：95 ℃，15 s；60 ℃，30 s；95 ℃，15 s。具体引物序列见表1。

表1 绝对定量PCR引物序列

Table 1 Absolute quantitative PCR primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	基因组区域 Genome region	片段长度/bp Fragment length
qTMV-CP-F	CGTGTTCTTGTC-GTCAGCGTG	*CP*	218
qTMV-CP-R	GTGCTGTGAC-TAGCGGGTCT		

1.5 胆酸钠处理后烟草诱导的TMV抗性和促生长作用及机制分析

1）胆酸钠处理后*TMV-CP*的积累量Western blot分析。用1、5、10、20 mg/mL的胆酸钠分别处理烟苗，清水和阿泰灵处理分别作为阴性和阳性对照，诱导24 h后在烟苗上部叶摩擦接种TMV，接种7 d后取样进行Western blot分析。具体操作参照李倩文[16]方法。TMV的特异性抗体和羊抗兔酶标二抗均由笔者所在实验室提供。

2）胆酸钠处理烟草诱导TMV抗性的诱导期分析。根据初筛结果，用10 mg/mL的胆酸钠处理烟草，分别于诱导12、24、48、72 h后摩擦接种TMV，喷施清水作为空白对照，每种处理接种8株烟草，接种7 d后进行定量PCR检测病毒的表达量。

3）胆酸钠处理烟草诱导的TMV抗性的持续期分析。取100株长势相近健康烟草4～5叶，用10

mg/mL的胆酸钠进行处理，清水和阿泰灵处理分别作为阴性和阳性对照。处理完成24 h后接种TMV。此时将这100株烟苗分为2组，每组50株。第1组，只用胆酸钠处理1次，在病毒接种后的第7、10、11、15、23、30天分别取接种叶上部的2～3片幼叶进行定量PCR检测病毒的表达量。第2组在病毒接种后的第11天进行第2次药剂处理，所用药剂质量浓度与第1次相同，方法为顶叶的下部叶喷施。统计第2次药剂处理后第4、12、19天，即第1次药剂处理后的第15、23、30天的病毒表达量。

4）胆酸钠处理诱导烟草抗TMV的效果分析。用10 mg/mL的胆酸钠处理烟草2次，分别用清水和阿泰灵处理作为阴性和阳性对照。处理组和对照组均处理100株烟草。第1次处理24 h后摩擦接种TMV，第2次处理后的第19天，即第1次处理30 d后，统计烟草的发病情况，计算病情指数和相对防效。烟草花叶病严重程度分级标准采用GB/T 23222—2008《烟草病虫害分级及调查方法》，以株为单位调查病情的严重程度。

5）胆酸钠处理对烟草的促生长作用分析。选取40株长势相近健康烟草4～5叶，分为2组，每组20株。第1组用10 mg/mL的胆酸钠对烟草进行整株喷施处理1次。第2组用相同浓度的胆酸钠喷施处理烟草2次。第1次喷施处理后的第12天进行第2次处理，2组烟草均于第1次处理45 d后根据YC/T142—2010《烟草农艺性状测量方法》测定株高、根长、总鲜质量，计算其平均值。统计分析药剂处理对烟草的促生长作用，喷施清水作为对照。

6）胆酸钠处理后烟草抗病相关基因的变化情况分析。10 mg/mL胆酸钠喷施烟草后，摩擦接种TMV，接种后第2天和第7天分别取样。在NCBI数据库中查询烟草抗病基因，挑选茉莉酸（jasmonic acid，JA）、水杨酸（salicylic acid，SA）、乙烯通路的相关基因，根据基因的相对表达量初步探究药剂处理后烟草防御反应的调控网络。

JA信号通路选择茉莉酸合成的6个关键基因：丙二烯氧化物环化酶基因*AOC*、丙二烯氧化物合成酶基因*AOS*、冠菌素敏感蛋白1基因*COI1*、抗病相关基因*LOX*（脂氧合酶基因）、转录抑制因子基因*JAZ1*、转录因子基因*MYC2*。SA信号通路选择苯丙氨酸解氨酶基因*PAL*、转录因子基因*NPR1*、抗病相关基因*PR*，共3个基因。乙烯信号通路的基因分别是乙烯信号受体基因*ETR1*、乙烯信号通路的负调控因子基因*CTR1*，共2个基因。

采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行相对定量qRT-PCR分析，选用*GAPDH*为内参基因。使用的PCR引物序列见表2；反应体系和反应程序见本文1.4“烟草TMV含量的荧光定量PCR分析”。

表2　相对定量PCR引物序列

Table 2　Relative quantitative PCR primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primers equence
GAPDH-F	AGCTCAAGGGAATTCTCGATG
GAPDH-R	AACCTTAACCATGTCATCTCCC
SOD-F	CTCCTACCGTCGCCAAAT
SOD-R	GCCCAACCAAGAGAACCC
CAT-F	AGGTACCGCTCATTCACACC
CAT-R	AAGCAAGCTTTTGACCCAGA
APX-F	GCTGGAGTTGTTGCTGTTGA
APX-R	TGGTCAGAACCCTTGGTAGC
AOC-F	CGGCTCAACTGATTCCTCTACAC
AOC-R	CCTTTCTTTTCCTCTTCGTGTTTG
AOS-F	CAATACGGAAGAGCCAAACGC
AOS-R	AACTCATCGGGTCGGTCAAA
COI1-F	GGATTGACTGATTTGGCGAAGG
COI1-R	CCCCAGGCCGGACATAGAAG
JAZ1-F	GAGATTGTGGATTCCGGTCGAT
JAZ1-R	GCGGTGGATACCAAGGCTGA
LOX-F	ACGAAGGTGTTGAAGGCTCTGTC
LOX-R	ATGGTATCGCGGAAATGAGGTT
MYC2-F	TTCAACCAAGAAACCCTTCAACA
MYC2-R	CCATCTCCCCAGCCCAACA
PAL-F	ACCTAATGGCGAAACCCTC
PAL-R	TGAACTCGGGCTTTCCATTC
PR-F	TGAGTCGTGGGCATAATACTG
PR-R	TAGAACCTTTGACCTGGGAC
NPR1-F	CTGAAACGCCTCTCGGAAAC
NPR1-R	TCCTCGCCGACAAAATGCAC
CTR1-F	GCACCACAGGTTGTAGCAG
CTR1-R	TTAAGATTCGGTCTCAGCA
ETR1-F	ACATCTACCGCCCATACAA
ETR1-R	CATACCTACCCGTCTCCTC

1.6　数据处理

数据分析采用软件SPSS23进行。采用单因素方差分析；多重比较采用Duncan's法和LSD法，并采用字母标记法表示差异显著性，显著性均设置为0.05。

2 结果与分析

2.1 药剂处理对烟苗 *TMV-CP* 基因表达情况的影响

不同质量浓度的药剂处理烟草后，接种TMV 7 d后烟草中TMV的含量见表3。由表3可知，5种药剂分别处理烟苗后其TMV的拷贝数与清水对照相比均显著下降，说明这5种药剂处理都可以诱导烟草产生TMV抗性。相同试剂的不同浓度处理烟草后其TMV的拷贝数差异较大。与清水对照相比，甘草酸二钾、甘草酸二胺、甘草霜、胆酸钠、铝试剂等5种试剂诱导TMV抗性最佳的质量浓度分别是10、10、20、10、1 mg/mL。其中，10 mg/mL的胆酸钠处理后烟苗中TMV含量最低。

表3 药剂诱导后烟草中TMV的含量

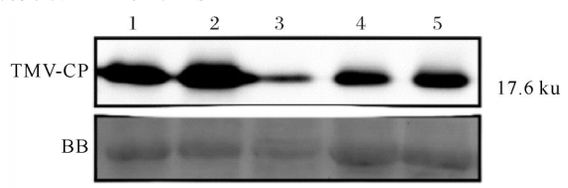
Table 3 TMV content in tobacco induced by candidate agents copies/μL

处理 Treatment	甘草酸二钾 Dipotassium glycyrrhizinate	甘草酸二胺 Glycyrrhetinic acid diamine	甘草霜 Gancao frost	胆酸钠 Sodium cholate	铝试剂 Aluminum reagent
100 μg/mL	$8.14\times10^{8}\pm8.78\times10^{7}$b	$3.30\times10^{8}\pm7.76\times10^{7}$b	$6.07\times10^{6}\pm9.60\times10^{5}$c	$3.53\times10^{7}\pm4.52\times10^{6}$b	$1.57\times10^{8}\pm4.65\times10^{7}$b
500 μg/mL	—	—	—	—	$2.59\times10^{7}\pm3.51\times10^{6}$c
1 mg/mL	$3.36\times10^{8}\pm9.04\times10^{7}$b	$2.99\times10^{7}\pm1.90\times10^{6}$c	$5.48\times10^{6}\pm6.57\times10^{5}$c	$4.47\times10^{6}\pm1.39\times10^{6}$c	$5.26\times10^{5}\pm3.25\times10^{4}$d
5 mg/mL	—	—	—	$5.89\times10^{6}\pm1.31\times10^{6}$c	$3.09\times10^{7}\pm4.38\times10^{6}$c
10 mg/mL	$6.33\times10^{6}\pm7.24\times10^{5}$c	$1.82\times10^{5}\pm2.33\times10^{4}$d	—	$8.93\times10^{4}\pm7.82\times10^{3}$d	—
20 mg/mL	$2.66\times10^{8}\pm3.61\times10^{7}$b	$4.27\times10^{7}\pm4.62\times10^{6}$c	$6.42\times10^{5}\pm5.75\times10^{4}$d	$1.66\times10^{7}\pm2.33\times10^{6}$b	—
50 mg/mL	—	—	$3.99\times10^{8}\pm1.04\times10^{8}$b	—	—
CK−	$1.40\times10^{9}\pm1.78\times10^{8}$a	$1.43\times10^{9}\pm1.38\times10^{8}$a	$1.34\times10^{9}\pm2.76\times10^{8}$a	$1.59\times10^{9}\pm2.08\times10^{8}$a	$1.60\times10^{9}\pm3.87\times10^{8}$a
CK+	$6.10\times10^{4}\pm1.04\times10^{4}$d	$3.45\times10^{4}\pm1.27\times10^{4}$e	$8.25\times10^{4}\pm1.07\times10^{4}$e	$5.19\times10^{4}\pm6.15\times10^{3}$d	$7.75\times10^{4}\pm3.66\times10^{3}$e

注Note：CK−：清水 Water；CK+：阿泰灵 Atelin；表中同列数据中不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$），下同。Different lowercase letters within the same column in the table indicate significant differences；—表示药剂未进行处理，— indicates that the medication was not processed. The same below.

2.2 胆酸钠处理对烟草TMV-CP积累量的影响

由图1可知，用不同质量浓度的胆酸钠处理烟草24 h后接种TMV，接种7 d后，与未处理样本相比，不同质量浓度的胆酸钠处理烟草后，烟叶中TMV-CP的积累量不同。其中，10 mg/mL的胆酸钠处理烟草，TMV-CP的积累量最少，说明胆酸钠处理可以抑制TMV-CP的合成。结合定量PCR检测结果，说明10 mg/mL的胆酸钠处理烟草可以诱导较强的TMV抗性。因此，后续试验均以10 mg/mL的胆酸钠作为处理药剂浓度。



1～4分别表示1、5、10、20 mg/mL胆酸钠，5表示未诱导。1 to 4 represent 1, 5, 10, and 20 mg/mL sodium cholate, respectively, while 5 indicates no induction.

图1 胆酸钠处理对TMV-CP积累量的影响

Fig.1 Effect of sodium cholate on TMV-CP acccumulation

2.3 胆酸钠处理烟草诱导TMV抗性的最佳诱导时长

用胆酸钠处理烟草，分别于诱导12、24、48、72 h后在烟草上部叶接种TMV，接种7 d后TMV表达情况结果显示，与清水对照相比，分别诱导12、24、48、72 h后接种TMV，烟叶中的TMV含量都有所降低。其中，诱导24 h后接种TMV，烟叶中的病毒含量最低，具体见表4。因此，确定胆酸钠诱导烟草产生抗性的最佳时长为24 h。

2.4 胆酸钠处理烟草诱导的TMV抗性的持续期

为了探究胆酸钠处理诱导烟草TMV抗性的持续时间，用10 mg/mL的胆酸钠处理烟叶2次，分别在接种病毒的不同时间检测TMV的表达量，由表5可以看出，用胆酸钠处理1次的前提下，接种病毒后第7～10天，烟苗中病毒含量维持在较低的水平；接种病毒后的11～30 d，无论是胆酸钠处理还是阿泰灵处理，病毒含量都日趋升高，但低于对照组，说明只用药剂处理1次无法维持较长时间的TMV抗性。

表 4　胆酸钠诱导不同时长烟草 TMV 的含量

Table 4　Sodium cholate-induced changes in tobacco TMV content over different time periods

copies/μL

处理 Treatment	处理时间/h Time			
	12	24	48	72
胆酸钠 10 mg/mL Sodium cholate	$4.86\times10^{7}\pm1.44\times10^{5}$b	$9.04\times10^{4}\pm7.45\times10^{3}$b	$4.07\times10^{5}\pm7.15\times10^{4}$b	$1.28\times10^{6}\pm1.08\times10^{5}$b
CK−	$1.32\times10^{8}\pm1.20\times10^{7}$a	$1.26\times10^{8}\pm6.51\times10^{6}$a	$1.21\times10^{8}\pm3.02\times10^{6}$a	$1.15\times10^{8}\pm9.28\times10^{5}$a

注 Note：表中同列数据中不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。Different lowercase letters within the same column in the table indicate significant differences.

表 5　胆酸钠处理烟草后 TMV 的表达量

Table 5　Expression levels of TMV in tobacco treated with sodium cholate　　copies/μL

处理 Treatment	处理时间/d Time					
	7	10	11	15	23	30
D-1	$0.75\times10^{5}\pm1.05\times10^{3}$b	$4.62\times10^{5}\pm2.23\times10^{3}$b	$2.93\times10^{6}\pm1.64\times10^{4}$b	$2.02\times10^{8}\pm4.23\times10^{6}$a	$2.32\times10^{8}\pm2.67\times10^{6}$a	$5.38\times10^{8}\pm3.21\times10^{6}$b
A-1	$0.55\times10^{5}\pm2.02\times10^{3}$b	$1.02\times10^{5}\pm1.52\times10^{3}$b	$0..90\times10^{6}\pm2.31\times10^{4}$b	$4.58\times10^{7}\pm3.53\times10^{5}$b	$5.27\times10^{7}\pm5.32\times10^{5}$b	$5.42\times10^{7}\pm1.85\times10^{5}$c
D-2	−	−	−	$5.25\times10^{4}\pm1.71\times10^{2}$c	$1.16\times10^{5}\pm1.64\times10^{3}$c	$8.83\times10^{5}\pm1.64\times10^{3}$d
A-2	−	−	−	$2.50\times10^{4}\pm2.54\times10^{2}$c	$0.49\times10^{5}\pm1.84\times10^{3}$c	$4.84\pm\times10^{5}\pm2.64\times10^{3}$d
CK	$1.10\times10^{8}\pm2.05\times10^{6}$a	$3.45\times10^{8}\pm3.21\times10^{6}$a	$3.65\times10^{8}\pm2.21\times10^{6}$a	$4.84\times10^{8}\pm3.05\times10^{6}$a	$6.23\times10^{8}\pm2.11\times10^{6}$a	$6.32\times10^{9}\pm3.04\times10^{7}$a

注 Note：D-1：胆酸钠处理 1 次 Sodium cholate treatment once；D-2：胆酸钠处理 2 次 Sodium cholate treatment twice；A-1：阿泰灵处理 1 次 Atelin treatment once；A-2：阿泰灵处理 2 次 Atelin treated twice. 表中不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$），下同。Different lowercase letters in the table indicate significant differences（$P<0.05$），the same below.

为了维持 TMV 的高度抗性，在第 1 次接种后的第 11 天进行第 2 次药剂处理。接种病毒后的 15～30 d，烟叶中 TMV 的表达量仍然维持较低的水平，显著低于对照组；而且 2 种药剂处理的烟苗中 TMV 含量没有明显差异，说明使用 2 次药剂处理可以诱导 30 d 以上的 TMV 抗性。

2.5　胆酸钠处理诱导烟草高抗 TMV

图 2 为使用最佳诱导浓度的甘草酸二钾、甘草酸二胺、甘草霜、胆酸钠、铝试剂分别处理烟草后接种 TMV 10 d 后烟草的症状。由图 2 可知，清水处理的烟叶表现出明显的花叶；阿泰灵和胆酸钠处理后的烟叶没有皱缩、花叶；其他药剂处理的烟叶有轻微的花叶症状。说明胆酸钠处理可以诱导烟草高抗 TMV，其诱导的 TMV 抗性高于其他 4 种药剂。

表 6 为 2 次胆酸钠处理后且接种 TMV 30 d 后烟株的病情指数和相对防效。由表 6 可知，2 次胆酸钠处理后，烟苗的病情指数显著低于对照组，其对 TMV 的防治效果较好，与阳性对照阿泰灵相当。

2.6　胆酸钠处理对烟草生长的影响

由图 3 可知，用 10 mg/mL 的胆酸钠处理 2 次的烟草 45 d 后的生长状况明显优于清水处理。由表 7 可知，烟株株高、根长、鲜质量等生长指标明显高于清水对照，其中，胆酸钠处理 2 次的指标要高于处理 1 次的指标，差别不显著。

2.7　胆酸钠处理诱导烟草抗病相关基因表达情况

用 10 mg/mL 的胆酸钠喷施烟草后摩擦接种 TMV，第 7 天的基因表达量与第 2 天的表达量相比，JA 信号通路中 *AOS*、*AOC*、*COI1*、*LOX* 显著上调，表示该通路的信号传导增强，茉莉酸的积累量增加；而 *JAZ1* 和 *MYC2* 的相对表达量显著下调表明茉莉酸的积累没有受到抑制（图 4A）。*LOX*、*AOS*、*AOC* 这 3 个基因是 JA 信号通路中促进茉莉酸积累的关键基因。*LOX* 以 α-亚麻酸为底物合成 13S-氢过氧亚麻酸，*AOS* 和 *AOC* 可以将 13-HPOT 转化为具有光学



从上到下2排植株，均按照从左到右编号。上排从左至右分别为：清水、甘草霜、铝试剂、甘草酸二胺处理；下排从左至右分别为：甘草酸二钾、胆酸钠处理、阿泰灵处理。Two rows of plants from top to bottom are numbered from left to right. The top row from left to right is: water, licorice frost, aluminum reagent, and diaminoglycyrrhizic acid treatment; the bottom row from left to right is: disodium glycyrrhizinate, sodium cholate treatment, and atelocollagen treatment.

图2 不同药剂处理后接种TMV 10 d的症状对比

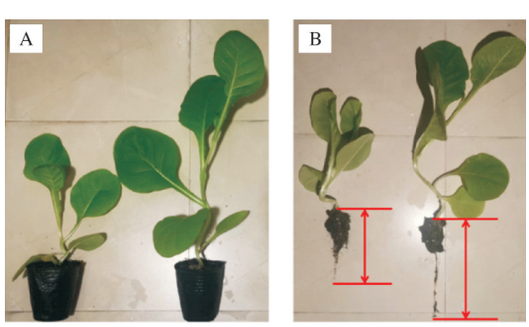
Fig.2 Comparison of symptoms after 10 days of TMV inoculation under different treatments

表6 2次胆酸钠处理诱导的TMV的相对防效

Table 6 Relative efficacy of TMV induced by two sodium cholate treatments

组别Group	病情指数 Disease index	相对防效/% Relative prevention effect
胆酸钠处理 Sodium cholate treatment	14.02a	80.45a
CK+	12.98a	81.90a
CK−	71.72b	-

注Note：同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).



A：株高对比图，左边为清水处理，右边为胆酸钠处理Comparison chart of plant height, with water treatment on the left and sodium cholate treatment on the right；B：根长对比图，左边为清水处理，右边为胆酸钠处理Root length comparison chart, with water treatment on the left and sodium cholate treatment on the right.

图3 胆酸钠2次处理后烟株的的生长情况对比

Fig.3 Comparison of growth of tobacco plants after two treatments with sodium cholate

表7 胆酸钠处理对烟苗生理指标的影响

Table 7 Effects of sodium cholate treatment on physiological indicators of tobacco seedlings

组别 Group	株高/cm Plant height	根长/cm Root length	鲜质量/g Fresh weight
A	29.4.±1.6a	17.4±1.3a	18.7±0.8a
B	31.2±2.9a	19.6±1.1a	16.4±0.7a
CK−	19.5±1.8b	13.6±0.8b	13.5±0.8b

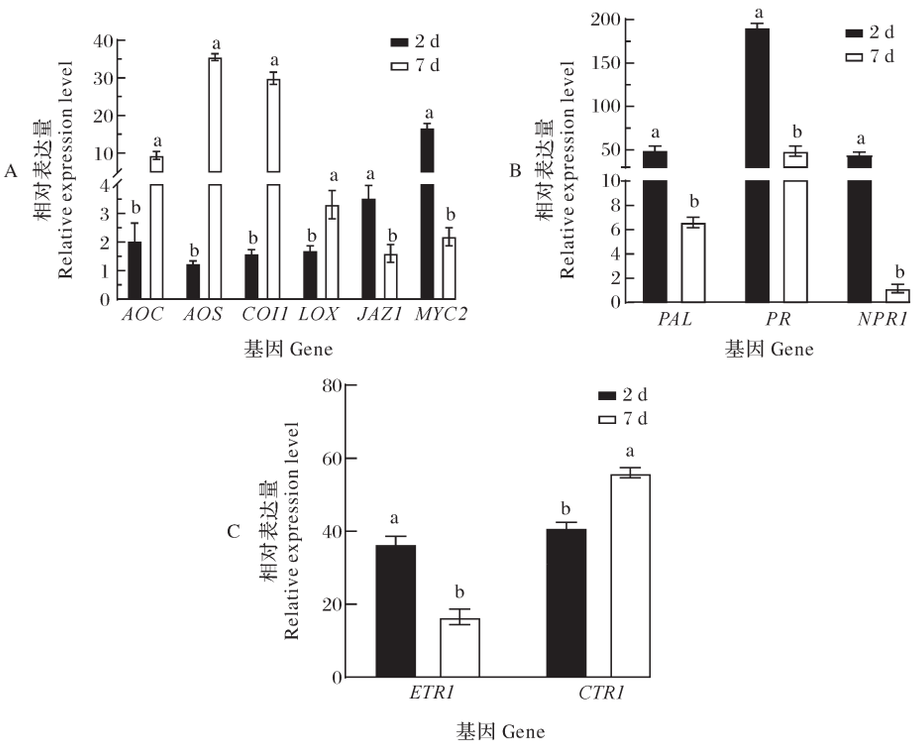
注Note：A：胆酸钠处理1次Sodium cholate treatment once；B：胆酸钠处理2次Sodium cholate treatment twice.

活性的12-氧-植物二烯酸(OPDA)。OPDA经过OPR3(OPDA reductase 3)催化五元环上的双键进行还原反应和3个β-氧化反应，形成JA。JA经过甲酯化可生成甲基茉莉酸JA-Ile。JA-Ile被JAT转运到核中，与COI1所形成的复合物结合，导致JA信号途径的抑制子(jasmonate ZIM-domain，JAZ)被26s蛋白酶体水解，从而启动转录因子MYCs，完成激素传导，促进植物生长发育，启动防御反应，增强植物的抗病性。通过其转录激活域TAD与MED25相互作用，MYC2能将RNA聚合酶Ⅱ和其他转录因子招募到它的靶基因区域中，形成转录共激活复合物，该复合物激活下游防御基因的转录表达[17]。

SA信号通路中*PAL*、*PR*、*NPR1*的相对表达量均显著下调，表明该通路受到一定程度的抑制(图4B)。PAL途径是植物合成水杨酸的一个重要途径。*NPR1*具有水杨酸结合口袋，可直接结合水杨酸分子。进入细胞核的NPR1蛋白通过与TGAs转录因子互作，激活水杨酸响应基因表达，完成水杨酸信号传递[18]。病程相关蛋白(PR蛋白)是植物响应病原菌侵染或环境胁迫时产生的功能蛋白。这些分子的积累可能激活植物的防御体系，从而增强其抗病能力[19]。

乙烯信号通路中的*ETR1*相对表达量显著下调，*CTR1*的相对表达量显著上调，说明该通路受到一定程度的抑制(图4C)。*CTR1*作为乙烯信号转导系统的关键调控因子，其本质是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，该蛋白通过N端结构域与乙烯信号受体ETR1形成复合物，同时通过磷酸化修饰EIN2蛋白，实现对乙烯信号通路的负向调控[20]。

根据相关基因的表达量的分析可以推断，胆酸钠诱导的TMV抗性和促生长作用与烟草的茉莉酸信号通路密切相关。



A：茉莉酸信号通路 Jasmonic acid signaling pathway；B：水杨酸信号通路 Salicylic acid signaling pathway；C：乙烯信号通路 Ethylene signaling pathway. 柱状图中不同小写字母表示同一基因不同处理时间差异显著（$P<0.05$），下同。Different lowercase letters in the bar chart indicate significant differences ($P<0.05$). The same as below.

图 4　信号通路相关基因的相对表达量变化情况

Fig. 4　Changes in relative expression levels of signaling pathway-related genes

3　讨　论

针对 TMV 的防控，在生产上种植抗病品种，能够从源头上防止 TMV 的发生。但由于品种的地域限制和经济效益，并非每个烟区都能种植具有高抗病性的品种，因此还要结合其他措施进行综合防控[21]。抗病毒药剂如免疫诱抗剂的使用，将整体提升烟草从苗期到田间的 TMV 抗性。本研究用甘草酸二钾、甘草酸二胺、甘草霜、胆酸钠、铝试剂等 5 种药剂处理烟草，均可以诱导不同程度的 TMV 抗性，有开发为免疫诱抗剂的潜力。胆酸钠的研究主要在动物、合成制药、医学等领域，如 Pan 等[22]利用胆酸钠激活小鼠体内的 FXT 信号，从而改善非酒精性脂肪性肝炎。经过初步测试，一定浓度范围内的胆酸钠对烟叶没有毒性作用（结果未显示）。将胆酸钠用于植物保护研究，拓宽了这种药剂的应用领域。

阿泰灵作为中国第一种抗病毒的蛋白类生物农药，其作用范围极广，可防治烟草、水稻、西瓜、玉米、小麦等植物病毒病[23]、葡萄灰霉病[24]等真菌病害以及其他综合性病害。与阿泰灵相比，使用胆酸钠处理烟苗，诱导的 TMV 抗性与阿泰灵无显著差异。然而，本研究只测试了 TMV 一种病毒，在后续的研究中，还要用胆酸钠处理烟草和其他农作物开展田间试验，检测其对其他病毒和不同类型病原生物的诱导抗性，进一步测试其开发成 1 种优秀免疫诱抗剂的潜质。

植物产生免疫反应是受到多种信号途径共同调控的结果，调控过程往往伴随着复杂的信号传导、基因变化、蛋白的合成和代谢[25]。结合烟草激活自身免疫相关途径中的基因分析，有助于了解烟草获得抗性的机制。JA 是调控烟草生长发育和防御反应的重要物质。JA 信号途径中，多种基因共同调节 JA 在烟草中的积累[17]。本研究初步证明胆酸钠处理烟草后，其 JA 信号通路中的 *AOS*、*AOC*、*COI1*、*LOX* 的相对表达量显著上调而 *JAZ1* 和 *MYC2* 的相对表达量显著下调。为了证明这个过程中茉莉酸确实有积累，确实是 JA 信号途径起重要作用，后续还需要结合代谢组学与茉莉酸抑制剂实验进一步验证。

孙凯文[26]发现利用外源脱落酸处理植株能增强

植物体内JA信号通路中的JAZ1的水解，导致MYC2上调，促使茉莉酸介导的应答生物胁迫的防御反应发生。但在本研究中胆酸钠处理后烟草的*JAZ1*、*MYC2*同时下调，这可能是由于*JAZ1*下调，促进了*MYC2*与转录中介体亚基MED25结合成复合物，从而诱导JA响应基因表达[27]，说明胆酸钠处理烟草7 d时已经激活了下游基因的转录。

在植物抵御外界侵害时，除了茉莉酸通路，水杨酸和乙烯信号通路的传导也会受到调控，曾婉琳[28]用氨基寡糖素处理烟草后，发现烟草的PAL、POD、SOD的活性增强。刘澄瑾[29]用苯丙烯菌酮处理烟草，发现烟草水杨酸通路中的*PR*基因上调，释放出*NPR1*基因。乙烯通路中的*ETR1*基因上调，水杨酸和乙烯信号通路共同诱导烟草的TMV抗性。本研究中，胆酸钠处理烟草后，检测到水杨酸通路的相关基因和乙烯信号通路的*ETR1*基因受到了抑制，这有可能是茉莉酸信号通路抑制了前两者的信号。有研究表明，当JA和SA信号途径间隔24 h激活且JA激发子浓度较低时，JA途径与SA途径相互协同。而当两途径同时激活时，JA途径对SA途径拮抗[30]。植物体内的茉莉酸类化合物以及外源喷施茉莉酸不仅能促进植物生长发育，还能有效增强植物的抗逆性[31]。本研究中，胆酸钠具体的作用机制还需要代谢组学和相关生化实验进行验证。

参考文献 References

[1] 朱贤朝. 中国烟草病害[M]. 北京：中国农业出版社，2002. ZHU X C. Tobacco diseases of China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002(in Chinese).

[2] LIU G Y, YANG J X, WANG H, et al. A new phenolic amide from stems of *Cassia fistula* and their anti-tobacco mosaic virus activities[J]. Asian journal of chemistry, 2014, 26(18): 6301-6302.

[3] 宋丽云. 我国烟草TMV和CMV种群结构遗传分析[D]. 北京：中国农业科学院，2012. SONG L Y. Phylogeographic analysis of TMV and CMV of tobacco in China [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012(in Chinese with English abstract).

[4] 刘桔，陈泽鹏，林壁润，等. 防控烟草病毒病制剂的研发与应用[J]. 农业研究与应用，2021(2)：26-33. LIU J, CHEN Z P, LIN B R, et al. Development and application of preparations for preventing and controlling tobacco virus diseases[J]. Agricultural research and application, 2021(2): 26-33(in Chinese with English abstract).

[5] 张长华，关国经，冯光群，等. 以农业预防措施为主的烟草病毒病综合防治技术[J]. 贵州农业科学，2006，34(2)：49-51. ZHANG C H, GUAN G J, FENG G Q, et al. Comprehensive techniques with agricultural prevention measures for controlling tobacco mosaic virus[J]. Guizhou agricultural sciences, 2006, 34(2): 49-51(in Chinese with English abstract).

[6] QIU D W, DONG Y J, ZHANG Y, et al. Plant immunity inducer development and application [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2017, 30(5): 355-360.

[7] ZHU F, CAO M Y, ZHANG Q P, et al. Join the green team: inducers of plant immunity in the plant disease sustainable control toolbox[J]. Journal of advanced research, 2024, 57: 15-42.

[8] 范晓霞，梁建功. 手性纳米材料的制备及其抗菌和抗病毒研究进展[J]. 华中农业大学学报，2024，43(5)：106-115. FAN X X, LIANG J G. Progress on preparation of chiral nanomaterials and its antibacterialand antiviral properties[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2024, 43(5): 106-115(in Chinese with English abstract).

[9] 马赫. 两种诱抗剂对番茄幼苗生长和抗病性的影响[D]. 沈阳：沈阳农业大学，2019. MA H. Effects of two inducing agents on growth and disease resistance of tomato seedlings [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019 (in Chinese with English abstract).

[10] 邱德文. 生物农药的发展现状与趋势分析[J]. 中国生物防治学报，2015，31(5)：679-684. QIU D W. Analysis of the development situation and trends of biological pesticides in China [J]. Chinese journal of biological control, 2015, 31(5): 679-684 (in Chinese with English abstract).

[11] 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，2002，23(4)：1-3. GUO H L, LI D, BAI X F, et al. On indiuced resistance to TMV with oligochitosan [J]. Chinese tobacco science, 2002, 23(4): 1-3 (in Chinese with English abstract).

[12] 王静，饶超奇，侯振武，等. 喷施壳寡糖与水杨酸对晒红烟诱导抗性及品质的影响[J]. 河南农业大学学报，2021，55(6)：1021-1028. WANG J, RAO C Q, HOU Z W, et al. Effects of chitosan oligosaccharide and salicylic acid on induced resistance and quality of dark sun-cured tobacco [J]. Journal of Henan Agricultural University, 2021, 55(6): 1021-1028 (in Chinese with English abstract).

[13] 商文静. 壳寡糖对烟草花叶病毒的诱导抗病作用和体外抑制作用[D]. 杨凌：西北农林科技大学，2006. SHANG W J. Chito-oligosaccharides induced resistance in tobacco to TMV and its inhibitory effects *in vitro* [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2006(in Chinese with English abstract).

[14] 罗琰. 康宁霉素抗烟草花叶病毒活性及其调控拟南芥根系生长的机制[D]. 济南：山东大学，2010. LUO Y. The anti -TMV activities triggered by trichokonins, and the mechanisms of *Arabidopsis* root development involved in trichokonin VI[D].

Jinan：Shandong University，2010（in Chinese with English abstract）.

[15] 邓嘉伟．胆酸钠诱导的TMV抗性及相关机理研究[D]．广州：华南农业大学，2023.DENG J W. A study on TMV-resistance induced by sodium cholate and its related mechanisms [D]. Guangzhou：South China Agricultural University，2023（in Chinese with English abstract）.

[16] 李倩文．取食不同病毒后烟蚜miRNA的差异分析及新型烟草免疫诱抗剂的筛选[D]．广州：华南农业大学，2020.LI Q W.Differential analysis of the miRNA of Myzus persicae after feeding different viruses and the screening of new tobacco immune inducers[D].Guangzhou：South China Agricultural University，2020（in Chinese with English abstract）.

[17] 蒋科技，皮妍，侯嵘，等．植物内源茉莉酸类物质的生物合成途径及其生物学意义[J]．植物学报，2010，45(2)：137-148.JIANG K J，PI Y，HOU R，et al.Jasmonate biosynthetic pathway：its physiological role and potential application in plant secondary metabolic engineering[J].Bulletin of botany，2010，45(2)：137-148（in Chinese with English abstract）.

[18] KUMAR S，ZAVALIEV R，WU Q L，et al.Structural basis of NPR1 in activating plant immunity[J]. Nature，2022，605(7910)：561-566.

[19] DONG J X，CHEN C H，CHEN Z X.Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response[J].Plant molecular biology，2003，51(1)：21-37.

[20] LACEY R F，BINDER B M.How plants sense ethylene gas：the ethylene receptors[J]. Journal of inorganic biochemistry，2014，133：58-62.

[21] TSALIKI E，MOYSIADIS T，TOUMPAS E，et al.Evaluation of Greek tobacco varieties（*Nicotiana tabacum* L.）grown in different regions of Greece[J/OL]. Agriculture，2023，13(7)：1394 [2025-07-04]. https：//doi. org/10.3390/agriculture13071394.

[22] PAN L Y，YU Z，LIANG X L，et al.Sodium cholate ameliorates nonalcoholic steatohepatitis by activation of FXR signaling[J/OL]. Hepatology communications，2023，7(2)：e0039 [2025-07-04].https：//doi.org/10.1002/hep4. e0039.

[23] 邱德文．植物免疫诱导剂：蛋白质生物农药“阿泰灵”的创制与利用[C]//陈万权．植保科技创新与农业精准扶贫：中国植物保护学会2016年学术年会论文集．北京：中国农业科学技术出版社，2016. QIU D W. Development and application of plant immune inducer：protein biopesticide “Ataline”[C]// CHEN W Q.Plant protection technology innovation and targeted poverty alleviation in agriculture：proceedings of the 2016 academic annual conference of the Chinese Society of Plant Protection. Beijing：China Agricultural Science and Technology Press，2016（in Chinese with English abstract）.

[24] 陈乃琦，龙川，王健立．植物免疫诱抗剂6%寡糖·链蛋白（阿泰灵）对葡萄抗病抗逆优质增产试验[J]．烟台果树，2019(1)：19-21.CHEN N Q，LONG C，WANG J L.Field trial on the effect of plant immune inducer 6% oligosaccharide-chain protein（Aetalin）on disease resistance，stress tolerance，and yield improvement in grapes [J].Yantai fruits，2019(1)：19-21（in Chinese）.

[25] 丁丽娜，杨国兴．植物抗病机制及信号转导的研究进展[J]．生物技术通报，2016，32(10)：109-117. DING L N，YANG G X.Research advances in the mechanism and signal transduction of plant disease resistance[J].Biotechnology bulletin，2016，32(10)：109-117（in Chinese with English abstract）.

[26] 孙凯文．植物激素脱落酸对茉莉酸介导的防御反应的调控[D]．南京：南京师范大学，2019.SUN K W.Regulation of plant hormone abscisic acid on jasmonic acid mediated defense response [D]. Nanjing：Nanjing Normal University，2019（in Chinese with English abstract）.

[27] CHEN R，JIANG H L，LI L，et al.The *Arabidopsis* mediator subunit MED25 differentially regulates jasmonate and abscisic acid signaling through interacting with the MYC2 and ABI5 transcription factors[J]. The plant cell，2012，24(7)：2898-2916.

[28] 曾婉琳．防控烟草青枯病的植物免疫诱抗剂筛选及其抗病机理研究[D]．广州：华南农业大学，2020.ZENG W L.Screening and resistance mechanism of plant immune inducers to tobacco bacterial wilt，caused by ralstonia solanacearum [D]. Guangzhou：South China Agricultural University，2020（in Chinese with English abstract）.

[29] 刘澄瑾．苯丙烯菌酮诱导烟草抗TMV活性及其作用机制初探[D]．沈阳：沈阳化工大学，2022.LIU C J.Phenylpropanoid induces tobacco anti TMV activity[D]. Shenyang：Shenyang University of Chemical Technology，2022（in Chinese with English abstract）.

[30] JIAO L，BIAN L，LUO Z X，et al.Enhanced volatile emissions and anti-herbivore functions mediated by the synergism between jasmonic acid and salicylic acid pathways in tea plants [J].Horticulture research，2022(1)：1076-1087.

[31] 焦龙，蔡晓明，边磊，等．茉莉酸类化合物：从植物的诱导抗虫防御反应到生长-防御权衡[J]．应用生态学报，2018，29(11)：3876-3890.JIAO L，CAI X M，BIAN L，et al.Jasmonates：from induced plant anti-herbivore defensive reaction to growth-defense tradeoffs [J].Chinese journal of applied ecology，2018，29(11)：3876-3890（in Chinese with English abstract）.

Sodium cholate induced tobacco TMV resistance and its mechanisms

ZHAO Wanqing[1], LIN Birun[2], YANG Qiyun[2], CHEN Zepeng[3],
SHI Ying[4], CHEN Feng[4], YANG Huan[4], RUAN Xiaolei[1]

1.*College of Plant Protection, South China Agricultural University/Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signaling and Crop Disease Prevention and Control, Guangzhou 510642, China*;
2.*Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Guangdong Province Key Laboratory of New Technologies for Plant Protection, Guangzhou 510640, China*;
3.*Guangdong Branch of China National Tobacco Corporation, Guangzhou 510610, China*;
4.*Meizhou Branch of Guangdong Tobacco Company, Meizhou 514021, China*

Abstract Tobacco mosaic virus (TMV) is the most common and significant virus infecting tobacco. Tobacco was treated with potassium glycyrrhizinate, glycyrrhizic acid diamide, glycyrrhetin, sodium cholate, and aluminum reagent to screen novel immune elicitors against TMV. TMV was inoculated after 24 hours of treatment. Quantitative PCR and Western blot were used for detection after 7 days. The results showed that treating tobacco with 10 mg/mL sodium cholate effectively inhibited the expression of TMV gene and the accumulation of TMV-coating protein (CP), with an optimal induction time of 24 hours. A second sodium cholate treatment on the 11th day post-TMV inoculation sustained induced TMV resistance for over 30 days. The results of analyzing the expression of genes related to the JA pathway, SA pathway, and ethylene pathway showed that sodium cholate-induced TMV resistance is closely associated with the JA signaling pathway. It is indicated that sodium cholate is an effective immune elicitor against TMV and promotes the growth of tobacco seedlings.

Keywords tobacco mosaic virus (TMV); sodium cholate; immune elicitors; induced disease resistance in tobacco

(责任编辑:陆文昌)