

茉莉酸甲酯对烟草幼苗抗炭疽病的影响

宾金华 潘瑞炽

(华南师范大学生物系, 广州 510631)

摘要 本文探讨了茉莉酸甲酯(MJ)对烟草幼苗抗炭疽病(由毁灭性刺盘孢引起)的影响。不同品种烟草抵抗毁灭性刺盘孢孢子侵染的能力不同,“巴西”品种的抗性强,“K₃₂₆”品种抗性弱,“广黄₅₅”品种抗性居中。MJ处理烟草幼苗后,可以减轻幼苗炭疽病的发病程度;同时烟草幼苗的病原相关蛋白含量有所提高,但只有“巴西”烟草的PR蛋白含量与抗病显著正相关。

关键词 烟草; 茉莉酸甲酯; 诱导抗病性; 病原相关蛋白

EFFECT OF METHYL JASMONATE ON RESISTANCE OF TOBACCO (*NICOTIANA TABACUM* CV. SAMSUM NN) SEEDLINGS TO *COLLETOTRICHUM DESTRUCTIVUM* O' GARA

Bin Jinhua Pan Ruichi

(Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract Four-leaf seedlings of tobacco were used to study the resistance to anthracnose disease caused by *Colletotrichum destructivum* O' Gara infection. After or before treatment in seedlings sprayed with 1 mg ml⁻¹ methyl jasmonate (MJ) one time a day for 3 days, fungous spores (10⁸ ml⁻¹) were inoculated to the leaves by spraying 2 times at an interval of 12 hours. The numbers of lesion of leaves were recorded and pathogenesis-related proteins (PRP) were determined after treatment for 7 to 15 days. When tobacco seedlings were inoculated with spores, the resistibility was quite different among three varieties. Brazil variety showed stronger resistance to this disease than K₃₂₆ and Guanghuang₅₅. Treating with MJ before spore inoculation, the infection symptom in seedlings was reduced, indicating that MJ can induce the resistance of tobacco to fungous infection. The PRP contents of seedlings increased after treating with MJ or inoculating with spores. The correlation coefficient between PRP of Brazil variety and infection degree was -0.9958. It is suggested that PRP is significantly related to fungus resistance in tobacco seedlings of this variety.

Key words Tobacco; Methyl jasmonate; Induced resistance; Pathogenesis-related protein

植物诱导抗病性是科学家普遍极关心的问题, 通过诱导使植物获得抗病性比应用农药防治具有更显著的优点^[1,2]。近十年来我国也逐步开展植物诱导抗病性的研究, 已在一些植物获得免疫植株^[3-6], 但所用诱导物多为致病性病原物, 用于实践仍然有一定距离。

茉莉酸甲酯(Methyl jasmonate, 简作MJ)在植物中普遍存在并具有重要的生理功能, 是一类极具潜在开发应用价值的新型植物生长调节物质^[7-10]。研究表明, MJ与植物抗病性有一定的关系^[11]。病原相关蛋白(Pathogenesis-related proteins, 简称PR蛋白)是植物病原菌或一些特定化合物处理后新产生或累积的一种或多种蛋白, 它在植物抗病中参与了局部或系统的抗性^[12-15]。

烟草是我国重要的经济作物, 在生长中常受到各种病害的侵染, 致使烟叶品质下降和减产, 造成巨大的经济损失。为此, 我们选择烟草为材料, 探讨MJ作为外源性诱导物应用的可能性及诱导抗病与PR蛋白的关系。

1 材料与方 法

材料 供试烟草(*Nicotiana tabacum*, cv. Samsum NN)三个品种: “K₃₂₆”, “广黄₅₅”和“巴西”, 均由广东省农业科学研究院烟草室提供, 烟草毁灭性刺盘孢(*Colletotrichum destructivum* O' Gara)由华南农业大学植保系菌种室提供。

孢子悬浮液制备 烟草毁灭性刺盘孢在固体马铃薯培养基上培养(25℃), 待菌丝长得较旺盛后诱导孢子产生, 分离孢子用无菌水制成 10^8 孢子 ml^{-1} 悬液, 待用。

MJ溶液配制 取MJ用适量95%乙醇溶解, 然后用无菌水配成 1 mg ml^{-1} 的MJ溶液, 乙醇终浓度为9%。

MJ处理和接种 MJ处理: 傍晚时用 1 mg ml^{-1} 溶液雾状喷洒于长有4片叶的烟草幼苗, 直到叶面布满均匀液滴, 保湿12 h。第2、3天各重复一次。接种: 用 10^8 孢子 ml^{-1} 悬液雾状喷洒, 保温12 h, 12 h后重复1次。本试验设有两种处理方法, 一为先用MJ处理后再接种, 另一为接种后再喷MJ溶液。同时也分别用9%乙醇、MJ溶液或孢子悬液喷洒作为对照。

感病程度 接种后7-15 d观察和记录叶片表面的病斑数目。根据每片叶片的病斑数对感病程度分级: 0级为叶片无病斑, 1级为1-5个病斑/叶, 2级为6-10个病斑/叶, 3级为11-15个病斑/叶, 4级为16-25个病斑/叶, 5级为26个以上病斑/叶。处理后一定天数分别取样, 制成丙酮粉后存于-80℃中备用。

PR蛋白含量测定 PR蛋白提取按照Ohashi和Matsuoka^[15]方法进行。按照Bradford^[16]方法测定蛋白质含量, 以牛血清蛋白作标准曲线。

2 实验结果

2.1 不同处理对烟草幼苗抗毁灭性刺盘孢的影响

从表1可见, 正常生长的烟草幼苗以9%乙醇或 1 mg ml^{-1} MJ处理都未感染烟草炭疽病。人工接种毁灭性刺盘孢的孢子悬液(10^8 孢子 ml^{-1})后, 三个品种烟草幼苗的叶片均出现病

斑, 以 K₃₂₆ 发病最重 (5 级), 广黄₅₅ 次之 (4 级), 巴西最轻 (3 级)。证明实验所用真菌孢子具有感染能力。用乙醇 (9%) 处理烟草, 不能降低幼苗炭疽病的发病程度, 即没有提高烟草的抵抗能力。用 MJ 处理烟草后再接种毁灭性刺盘孢的孢子, 幼苗的发病程度明显降低。喷洒孢子后再用 MJ 处理, 烟草幼苗的发病程度也有所减轻。总的来看, 三个品种烟草抵抗毁灭性刺盘孢侵染的能力不同; MJ 可以提高烟草幼苗的抗病能力。

2.2 不同处理对烟草幼苗 PR 蛋白含量的影响

4 叶期后三个品种烟草幼苗的 PR 蛋白逐渐增加, 13 d 后又逐渐下降, 广黄₅₅ 的 PR 蛋白含量最高, K₃₂₆ 次之, 巴西含量最低 (图 1A)。乙醇处理使三个品种烟草幼苗 PR 蛋白含量降低, 以 K₃₂₆ 和广黄₅₅ 降低明显; 但处理后 0.5 d 和 4.5 d 出现两个峰, 以 K₃₂₆ 和广黄₅₅ 的峰较高, 处理 5 d 后 PR 蛋白含量逐渐增加, 巴西烟草的 PR 蛋白含量明显低于 K₃₂₆ 和广黄₅₅ (图 1B)。MJ 处理使烟草幼苗 PR 蛋白含量明显增加, 巴西烟草 PR 蛋白含量增加大于 K₃₂₆ 和广黄₅₅, 但在处理 0 d 后幼苗 PR 蛋白含量短暂下降, 2 d 后逐渐增加, 以巴西烟草增加较明显, 处理 7-8 d 后即达到较高水平, 而 K₃₂₆ 在处理 13 d, 广黄₅₅ 在处理 17 d 后才达到较高的水平 (图 1C)。

表 1 不同处理对烟草幼苗抗毁灭性刺盘孢子的影响

Table 1 Effect of different treatments on tobacco seedlings resistant to *Colletotrichum destructivum* O' Gara

| 处理 Treatments | 感病程度 Infection degree* | | |
|------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|--------|
| | K ₃₂₆ | Guanghuang ₅₅ | Brazil |
| 对照 Control | 0 | 0 | 0 |
| 乙醇 Alcohol (9%) | 0 | 0 | 0 |
| 茉莉酸甲酯 Methyl jasmonate (1 mg ml ⁻¹) | 0 | 0 | 0 |
| 接种孢子 Spore inoculation (10 ⁸ ml ⁻¹) | 5 | 4 | 3 |
| 处理 1 Treatment 1 | 5 | 4 | 3 |
| 处理 2 Treatment 2 | 3 | 2 | 1 |
| 处理 3 Treatment 3 | 4 | 2 | 2 |

*0 = No disease spot; 1 to 5 represent a leaf with 1-5, 6-10, 11-15, 16-25 and more than 25 spots, respectively, Same for Tab. 2.

Treatment 1: 乙醇处理后接种孢子 Treated with alcohol, then inoculated with spores; Treatment 2: MJ 处理后接种孢子 Treated with MJ, then inoculated with spores; Treatment 3: 接种孢子后再用 MJ 处理 Inoculated with spores, then treated with MJ.

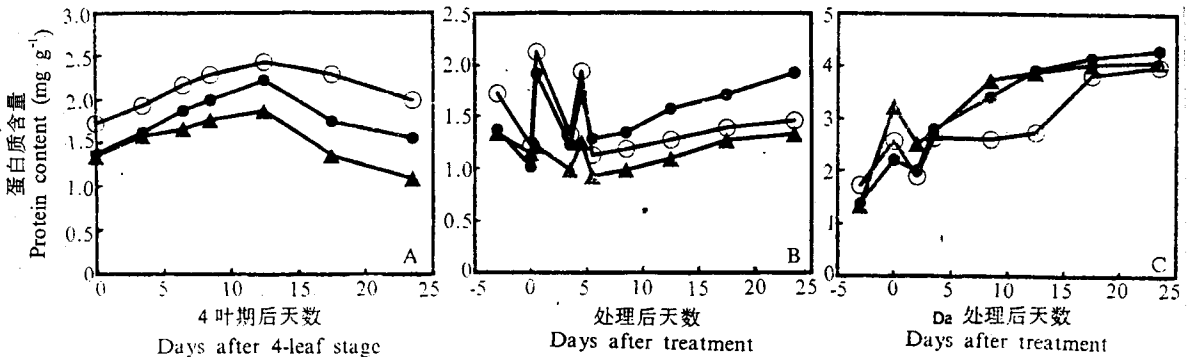


图 1 乙醇和茉莉酸甲酯处理后烟草幼苗 PR 蛋白含量变化

Fig.1 Changes of pathogenesis-related protein contents in tobacco seedlings treated with alcohol or methyl jasmonate

A: Control; B: Alcohol treatment; C: Methyl jasmonate treatment

●—● K₃₂₆; ○—○ 广黄₅₅ (Guanghuang₅₅); ▲—▲ 巴西 (Brazil)

接种孢子当天, 三个品种烟草幼苗的 PR 蛋白含量下降, 但随后 PR 蛋白含量迅速增加, 接

种 5 d 后含量达到较高的水平。处理后的 10 d 前巴西烟草的幼苗 PR 蛋白含量低于 K_{326} 和广黄₅₅, 但 10 d 后则相反(图 2A)。乙醇处理后接种孢子, 三个品种烟草幼苗的 PR 蛋白含量逐渐增加, K_{326} 和广黄₅₅ 的变化有起伏, 巴西烟草 PR 蛋白的增加平缓, 而且低于 K_{326} 和广黄₅₅ (图 2B)。烟草幼苗用 MJ 处理后接种孢子, 三个品种烟草幼苗的 PR 蛋白含量都增加, 以 K_{326} 烟草的增加最为明显(图 2C)。烟草幼苗接种孢子后用 MJ 处理, 三个品种烟草幼苗的 PR 蛋白含量逐渐增加, 广黄₅₅ 和 K_{326} 在处理 6 d 出现小峰, 而巴西烟草比它们早 2 d, 在处理 4 d 即出现高峰, 但低于 K_{326} 和广黄₅₅ (图 2D)。

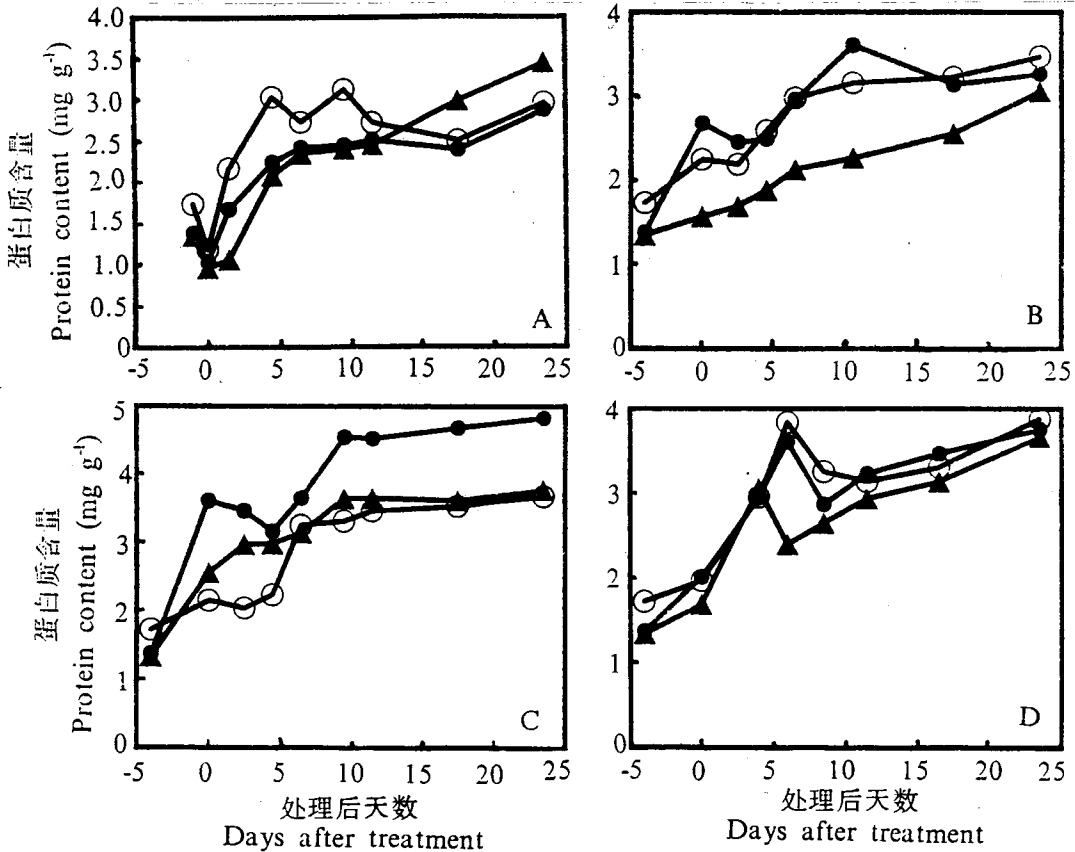


图 2 真菌孢子对烟草幼苗 PR 蛋白含量的影响

Fig. 2 Changes of pathogenesis-related protein contents in tobacco seedlings after inoculating with fungous spores

A: Inoculated with spores; B: Inoculated with spores after alcohol treatment; C: Inoculated with spores after methyl jasmonate treatment; D: Treated with methyl jasmonate after inoculating with spores

●—● K_{326} ; ○—○ 广黄₅₅ (Guanghuang₅₅); ▲—▲ 巴西 (Brazil)

将各种处理的 PR 蛋白平均, 可以看到, 乙醇处理降低烟草幼苗的 PR 蛋白含量; MJ 处理则明显提高 K_{326} 品种的 PR 蛋白含量, 巴西品种比对照提高 1 倍多(表 2)。将接种孢子处理的感病程度与 PR 蛋白含量做相关性分析可见, 三个品种烟草幼苗在两者之间都存在着一定的相关性, 但只有巴西的相关系数(-0.9958)达到显著相关水平, K_{326} (-0.7286) 和广黄₅₅ (-0.5842)

都没有达到显著相关水平, 即巴西烟草幼苗的 PR 蛋白与抗病能力正相关。

表2 烟草幼苗病原相关蛋白含量与感病程度的回归分析
Table 2 Regression analysis between average contents of pathogenesis-related proteins (PRP) and the disease of tobacco seedlings

| 处理 Treatment | K ₃₂₆ | | Guanghuang ₅₅ | | Brazil | |
|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------|
| | 感病程度 Infection degree | 病原相关蛋白 PRP (mg g ⁻¹)* | 感病程度 Infection degree | 病原相关蛋白 PRP (mg g ⁻¹)* | 感病程度 Infection degree | 病原相关蛋白 PRP (mg g ⁻¹)* |
| 对照 Control | | 1.77 | | 2.11 | | 1.52 |
| 乙醇 Alcohol | | 1.50 | | 1.47 | | 1.15 |
| 茉莉酸甲酯 Methyl jasmonate (MJ) | | 3.03 | | 2.39 | | 3.20 |
| 接种孢子 Spore inoculation | 5 | 2.01 | 4 | 2.33 | 3 | 1.96 |
| 处理 1 Treatment 1 | 5 | 2.74 | 4 | 2.83 | 3 | 2.06 |
| 处理 2 Treatment 2 | 3 | 3.76 | 2 | 2.78 | 1 | 3.06 |
| 处理 3 Treatment 3 | 4 | 2.59 | 2 | 2.59 | 2 | 2.56 |
| 回归方程 Regression equation | Y=7.36-1.12X | | Y=11.0-3.08X | | Y=6.79-1.88X | |
| 相关系数 Correlation coefficient | -0.8533 | | -0.5195 | | -0.9958 | |
| 显著性 Significance | 不显著 Not significant | | 不显著 Not significant | | 显著 Significant | |

* 此处的病原相关蛋白为平均值 Mean values

处理 1, 2, 3 见表 1. For treatments 1, 2 and 3, see Tab. 1.

3 讨论

寻找非生物诱导植物抗病的因子是目前人们非常重视的一项工作, MJ 在植物抗病中起着抗病信息传递体的作用^[17-19]。本实验证明, 三个品种烟草幼苗经 MJ 处理, 降低接种毁灭性刺盘孢孢子后的感病程度, 用 MJ 处理接种孢子的幼苗也有相似的结果; 而乙醇没有提高烟草的抵抗力。可以认为 MJ 可提高烟草幼苗抵抗炭疽病的能力。

本实验发现, MJ 处理或接种孢子到烟草幼苗, 植株 PR 蛋白含量明显增加, 以 MJ 处理增加较大, 品种间增加的幅度有所差异。将 PR 蛋白与感病程度做回归分析, 得知三个品种的相关系数都是负值, 其中只有巴西烟草的相关达到显著水平。显然, 从 PR 蛋白含量的角度出发并不能解释 K₃₂₆ 和广黄₅₅ 的 PR 蛋白含量高于巴西, 而抗病能力却相反这一事实。目前已知烟草的 PR 蛋白有多种, 且实验证明其中一些是几丁酶, β -1,3-葡聚糖酶, 溶菌酶或具有抗菌活性的物质^[14]。但烟草的 PR 蛋白并非都与抗病直接相关, 其中一些 PR 蛋白的功能至今仍不清楚^[13]。Schweizen 等^[20]曾报道茉莉酸诱导的蛋白与抗性无关, MJ 也可以诱导营养性贮藏蛋白和花色素苷等^[11]。由此可见, MJ 诱导烟草叶片产生一系列蛋白, 但这些蛋白并不都与抗病有关。因此对 PR 蛋白与抗病关系的研究不能停留在量变化的水平上。今后对特定的 PR 蛋白进行定性研究可能更具意义。无疑, MJ 在植物抗病中起作用, 但有关机理需要深入研究。

参考文献

- 1 李冠, 欧阳光察. 植物诱导抗病性. 植物生理学通讯, 1990, (6):1
- 2 Rayls J, Uknes S, Ward E. Systemic acquired resistance. Plant Physiol, 1994, 104:1109
- 3 刘英慧, 陈延熙. 西瓜炭疽病的人工免疫研究. 植物病理学报, 1989, 19:86

- 4 李冠, 薛应龙. 哈密瓜抗疫霉病的诱导免疫研究. 科学通报, 1988, (6):469.
- 5 李洪连, 王守正, 王金生等. 诱抗菌激发子诱导黄瓜产生对疽病的抗性. 植物生理学报, 1993, 19(4):320
- 6 陈延熙, 费玉珍, 梅汝鸿等. 苹果炭疽病人工免疫研究. 生物防治通报, 1985, 1:16
- 7 潘瑞炽, 李海航. 茉莉酸—天然生长抑制剂. 植物生理学通讯, 1989, (2):78
- 8 Parthier B. Jasmonates, new regulators of plant growth and development: Many facts and few hypotheses on their actions. Botany Academy, 1991, 104:446
- 9 Sembdner G, Parthier B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1993, 44:569
- 10 Gross D, Parthier B. Novel natural substances acting in plant growth regulation. J Plant Growth Regulator, 1994, 13:93
- 11 宾金华, 潘瑞炽. 茉莉酸甲酯的生理生化及在植物抗病中的作用. 植物学通报, 1995, 12:22
- 12 杜良成, 王钧. 病原相关蛋白及其在植物抗病中的作用. 植物生理学通讯, 1990, (4):1
- 13 蔡新忠, 宋风鸣, 郑重. 植物病原相关蛋白. 植物生理学通讯, 1995, 31(2):129
- 14 Carr J P, Klessing D F. The pathogenesis-related protein of plant. In: Seltow J K eds. Genetic Engineering: Principle and Methods. Plenum Press, New York and London, 1989, vol. 11:65
- 15 Ohashi Y, Matsuoka M. Synthesis of stress proteins in tobacco leaves. Plant Cell Physiol, 1985, 26(3):473
- 16 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72:248
- 17 Gundlach H H, Muller J, Kutchan T M et al. Jasmonic acid is signal transducer in elicitor induced plant cell cultures. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89:2389
- 18 Farmer E E, Ryan C A. Interplant commutation: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87:7713
- 19 Enyedi A J, Yalpanl N, Silverman P et al. Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. Cell, 1992, 70:879
- 20 Schweizer P, Gees R, Mosinger E. Effect of jasmonic acid on the interaction of barley (*Hordeum vulgare* L.) with the powdery mildew *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Plant Physiol, 1993, 102:503