

机械性损伤与氨基丁酸的交互作用对烟草防卫性酶活性的影响

葛少林, 程新胜*, 杨丽文, 薛泽春

(中国科学技术大学烟草与健康研究中心, 合肥 230052)

摘要: 研究 β -氨基丁酸 (BABA) 和剪叶对烟草 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Yunyan 85) 防卫性酶活性和两者间互作对其抗性激发的影响。结果表明: 喷施 BABA 或剪叶都能明显地提高烟草的苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 和多酚氧化酶 (PPO) 的活性, 且这些酶活性的变化与 BABA 的浓度和诱抗时间有关。然而在剪叶后使用 BABA, 会削弱对 PAL 和 PPO 活性的诱导。BABA+剪叶处理后烟草花叶病 (TMV) 症状明显较 BABA 单独处理的严重, 这表明 BABA 和机械性损伤呈现拮抗效应。BABA 及其它以水杨酸 (SA) 为信号分子的化学诱抗剂可能不适宜用于剪叶后的烟草幼苗。

关键词: β -氨基丁酸; 剪叶损伤; 烟草; 防卫性酶; 拮抗作用

中图分类号: Q946.54

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)04-0324-05

Interaction Effects of BABA and Leaf Wounding on Defense-related Enzymes in Tobacco

GE Shao-lin, CHENG Xin-sheng*, YANG Li-wen, XUE Ze-chun

(Research Center of Tobacco and Health, University of Science & Technology, Hefei 230052, China)

Abstract: By spraying β -aminobutyric acid (BABA) or/and leaf wounding treatments, the activities of defense-related enzymes were determined to investigate the interaction effects of BABA and wounding on the resistance of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Yunyan 85) to tobacco mosaic virus (TMV). The results showed that wounding or BABA treatment caused a significant increase of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and polyphenol oxidases (PPO) activities, which were associated with BABA concentrations and timing of induction. However, leaf wounded by pruning in combination with addition of BABA decrease the activities of PAL and PPO, resulting in obviously more TMV symptoms than BABA treatment alone. The results suggest that BABA and wounding exhibit antagonistic effect. It is likely that BABA and other SA-dependent chemical inducers should not be applied to the wounded tobacco seedlings.

Key words: β -Aminobutyric acid; Wounded leaves; Tobacco; Defense-related enzymes; Antagonistic action

大量的研究表明, 利用一些非杀菌性化学物质能激发植物的防卫反应, 产生系统抗性, 防御多种病害, 这些化学物质包括水杨酸 (SA)、苯并噁二唑 (BTH)、 β -氨基丁酸 (BABA)、2,6-二氯异烟酸 (INA)、噻菌灵以及茉莉酸 (JA) 等, 其中 BTH、噻菌灵以及二氢茉莉酸丙酯已进入大田应用^[1-3], β -氨基丁酸是近年来新发现的一种化学激发子, Siegrist

等^[4]用其处理烟草, 证明它能明显地降低烟草叶片上烟草花叶病 (TMV) 病斑的数目和大小、诱导烟草对 TMV 产生抗性。

对苗床上幼苗进行剪叶以提高幼苗的整齐度、增加单位面积的可用苗数量, 已应用于不少作物及林木的幼苗培养上, 也是目前烟草生产过程中的一种重要的农艺措施^[5-7]。研究证实机械损伤亦能诱导

收稿日期: 2004-12-13 接受日期: 2005-03-31

基金项目: 国家烟草专卖局重大项目“无公害”烟叶生产技术研究与推广 (110200202002) 资助

* 通讯作者 Corresponding author

植物防卫反应,而剪叶正是一种机械性损伤^[8]。有试验证实不同路径的诱抗因子间存在交互作用效应,有的是增效、有的是拮抗^[9],作为一种诱抗因子,机械损伤与 BABA 间存在怎样的交互作用效应尚无报道。本文以烟草幼苗为研究对象,通过检测不同处理的烟草植株防卫性酶活性的变化,研究机械损伤与 BABA 这种化学激发子对诱导烟草抗 TMV 的交互作用效应,为 BABA 在烟草苗期的合理使用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试烟草为我国烟草栽培品种云烟 85 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Yunyan 85); 将育苗盘中四叶期幼苗移栽到装有蛭石的塑料盆钵中,在 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,每天用 $900\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光照 12 h,并定期浇灌全素营养液,待第 6 片叶平展后用于试验处理。

供试药剂 BABA 为 FLUKA (Buchs, Switzerland) 公司产品。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

实验处理和接种 在烟苗的第 6 片叶平展后,用消毒后的剪刀剪去第 3、4 片叶的 1/3,后用蒸馏水喷雾,为剪叶处理。BABA 用蒸馏水溶解,分别配制成 1、5 和 10 mmol/L 的水溶液,用微量喷雾器喷施到烟苗的第 3、4 片叶上,至叶片上有明显的液滴出现为止,为 BABA 处理。在第 3、4 片叶剪叶后立即喷施 BABA 水溶液,浓度和药量同上,为剪叶+BABA 处理。以蒸馏水喷雾至有明显的液滴出现为对照。处理后所有的烟苗均放入保湿袋中,24 h 后,在第 5 片叶上用喷枪接种 TMV ($10\ \mu\text{g ml}^{-1}$ 的磷酸缓冲液),接种后用去离子水冲洗叶片并在塑料袋中 25°C 保湿 24 h^[10]。每种处理均处理 20 株烟苗。

TMV 症状观察 在接种 TMV 后,将各处理烟株的顶端心叶做好标记,15 d 后观察植株及该新生叶的生长及病害症状。

酶液的提取 在 TMV 接种后的第 2、4、6 天分别将 5 株被处理烟苗的第 1、2、6 片叶采下立即冷冻或测定。称取 1 g 鲜样,根据所测的酶加入 5 ml 缓冲液(其中 PPO 用 pH6.9 的磷酸缓冲液; PAL 用含 5 mmol/L β - 巯基乙醇的 pH8.8 的硼酸缓冲液),再加入适量的石英砂,冰浴匀浆,然后于 4°C 、13 000 xg 下离心 15 min。上清液于 -20°C 下保存备

用。用于样品酶活性测定。

苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的测定 参照 Hino 的方法^[11]并略作修改:反应混合液包括 0.5 ml 的粗酶液、2 ml 的 pH8.8 硼酸缓冲液以及 1 ml 的 0.05 mol/L 的苯丙氨酸。在 40°C 下保温 30 min。用盐酸和乙醚的混合液终止反应。在 290 nm 处测定 OD 值的变化。以 OD_{290} 每小时变化 0.01 所需酶量为一个酶活力单位(U),酶活性以 $\text{U g}^{-1}\text{FW}$ 来表示。

多酚氧化酶(PPO)活性的检测 参照 Perter 等^[12]的方法:以邻苯二酚作反应底物,检测 $\lambda = 490\ \text{nm}$ 处吸光值在 2 min 内的变化。以每分钟内 OD_{490} 值变化 0.01 为一个酶活力单位(U),酶活性以 $\text{U g}^{-1}\text{FW}$ 来表示。

数据分析 实验结果利用 SPSS12.0 版统计软件进行 Duncan 分析,比较各处理间的差异显著性。

2 实验结果

2.1 不同处理对烟草抗 TMV 的影响

在 TMV 接种 15 d 后,除少数植株外,出现明显症状的多是接种时的心叶和新生叶片。在外观上各处理间有明显不同:对照叶片严重地皱缩、畸形,叶面布满深绿色的泡斑,花叶;剪叶处理的叶缘部分卷曲,泡斑明显;5 和 10 mmol/L BABA 处理的大多数叶形正常、无明显泡斑,1 mmol/L BABA 处理株则可见少量泡斑;BABA+剪叶处理的叶片均出现不同程度的皱缩、畸形,泡斑明显,TMV 症状明显地较所对应的 BABA 单独处理的严重(图 1)。

2.2 BABA 和剪叶单独处理对 PAL 活性的影响

从表 1 可以看出,喷清水的对照植株在接种 TMV 后 PAL 活性缓慢上升;而喷施 BABA 的各处理能明显地诱导 PAL 活性上升,且 PAL 活性与 BABA 浓度成正比,PAL 活性随时间推移也进一步增加。

剪叶处理的烟苗在接种 TMV 后,其 PAL 的活性明显地高于对照,在接种后第 2 天为 $124.8\ \text{U g}^{-1}\text{FW}$,是对照的 1.36 倍,到了第 4 天为对照的 2.4 倍,到了第 6 天又降为 1.36 倍。峰值在第 4 天出现。

2.3 BABA 和剪叶单独处理对 PPO 活性的影响

从表 2 可见,对照在接种 TMV 后,其 PPO 活性在 2-6 d 逐渐上升;喷施 BABA 也能提高 PPO 的活性,且诱导程度受浓度和时间影响,接种 TMV 后

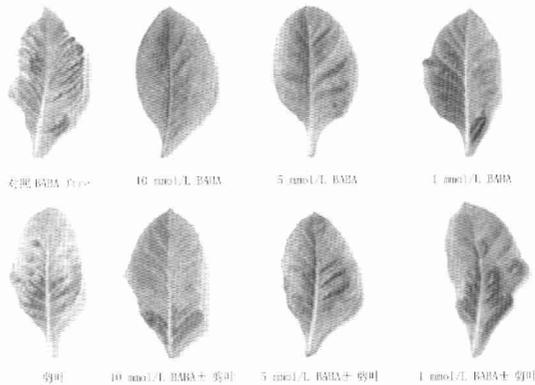


图 1 不同处理的同期心叶接种 TMV 15 d 后的症状

Fig. 1 Disease symptoms in uppermost leaves with different treatments in tobacco infected by TMV after 15 days
The lower four leaves were collected from tobacco wounded mechanically by pruning.

第 2 天的 PPO 活性随 BABA 浓度升高而升高;到了第四天 PPO 活性大幅度提高,但与 BABA 浓度间无相关性;1 mmol/L BABA 诱导 PPO 活性约为对照的 10 倍,然而 5 mmol/L、10 mmol/L BABA 处理只分别是对照的 5.4 和 5.9 倍;到了第 6 天,BABA 各处理的 PPO 活性呈下降趋势,但仍较对照高。峰值在第 4 天出现。

与喷施清水的对照相比,剪叶处理的 PPO 活性显著提高,接种 TMV 后的第 2 天,其 PPO 活性是对照的 3.6 倍;峰值也在第 4 天出现,第 6 天则有所下降,但其降幅比 BABA 处理的要小(表 2)。

2.4 BABA 和机械损伤结合对 PAL 和 PPO 的影响

通过对同一时间不同处理间 PAL 的活性进行

Duncan 差异性分析表明:接种 TMV 后的第 2 天,剪叶和 10 mmol/L BABA 单独处理所激发的 PAL 活性较高,10 mmol/L BABA+剪叶和 5 mmol/L BABA 处理的次之,以 1 mmol/L BABA+剪叶处理的最低。BABA 单激发处理以及与剪叶互作的双激发处理中,PAL 的活性与 BABA 浓度呈正比,并且 BABA 单激发处理的 PAL 活性高于其对应的双激发处理(如 1 mmol/L BABA 的 PAL 活性是 $11.13 \text{ U g}^{-1}\text{FW}$ > 1 mmol/L BABA+剪叶的 $8.23 \text{ U g}^{-1}\text{FW}$),但差异不显著;除 10 mmol/L BABA+剪叶外,其余双激发处理间都存在显著性差异,双激发的拮抗作用明显。

接种后第 4 天,除 1 mmol/L BABA+剪叶外,其余双激发处理的 PAL 活性均显著小于剪叶处理的。

表 1 剪叶和 BABA 间的互作对烟草叶片 PAL 活性($\text{U g}^{-1}\text{FW}$)的影响

Table 1 Interaction effects of BABA and leaf wounding on PAL activity in *N. tabacum* leaves

BABA (mmol/L)	剪叶 Wounded leaves	TMV接种后的天数 Days after inoculation with TMV		
		2	4	6
		0	-	91.20±2.77 bc
0	-	124.80±7.33 a	240.00±19.98 b	150.40±30.53 ab
1	-	92.80±5.77 bc	102.40±4.23 cd	116.80±20.98 bc
5	-	110.40±5.54 ab	128.00±11.54 c	145.60±8.46 ab
10	-	132.80±6.40 a	223.47±25.54 b	169.60±18.86 a
1	+	70.40±5.60 c	305.60±37.63 a	62.40±2.77 d
5	+	92.00±12.87 bc	144.00±4.80 c	73.60±15.26 cd
10	+	111.20±7.63 ab	64.23±4.23 d	91.2±0.58 cd

同栏数值后不同字母表示差异显著 Values within a column followed by different letters are significantly different at 5% level.

表2 剪叶和 BABA 交互对烟草叶片 PPO 活性(U g⁻¹FW)的影响Table 2 Interaction effects of BABA and leaf wounding on PPO activity in *N. tabacum* leaves

BABA (mmol/L)	剪叶 Wounded leaves	TMV接种后的天数 Days after inoculation with TMV					
		2		4		6	
		Mean	Letter	Mean	Letter	Mean	Letter
0	-	4.20±0.15	f	6.17±0.44	f	11.43±1.28	de
0	+	15.07±0.35	a	22.67±2.68	c	25.87±2.03	ab
1	-	11.13±0.52	cd	61.1±3.34	a	26.40±1.37	ab
5	-	11.93±0.39	bc	33.2±1.63	b	17.30±2.59	c
10	-	13.67±0.91	ab	36.33±1.12	b	20.87±1.07	b
1	+	8.23±1.04	e	17.77±1.33	cd	30.33±2.57	a
5	+	9.23±0.32	de	11.45±1.44	ef	10.03±1.81	e
10	+	9.5±1.18	de	16.87±0.55	de	15.80±0.76	cd

同栏数值后不同字母表示差异显著 Values within a column followed by different letters are significantly different at 5% level

值得注意的是,此时随 BABA 浓度降低,双激发处理中 PAL 活性反而升高。到了第 6 天,单激发的 PAL 活性都显著高于其对应的双激发处理的。

从表 2 可见,在接种 TMV 后的第 2 天,仅剪叶处理的 PPO 活性最高,不同浓度的 BABA 单激发处理的次之,对照最低。单激发处理的 PPO 活性都显著高于其对应的双激发处理。在第 4 天,以 1 mmol/L BABA 处理的 PPO 活性最高,10 mmol/L 和 5 mmol/L BABA 处理的次之,仍以对照的为最低,并且,剪叶和 BABA 单独处理的 PPO 活性仍显著高于其对应的双激发处理,不过,这时 PPO 活性与 BABA 浓度间的关系无相关性。第 6 天,以 1 mmol/L BABA 和剪叶处理的 PPO 活性最高,剪叶和 1 mmol/L BABA 单独处理的次之,而以 5 mmol/L BABA+剪叶处理的最低。这表明 BABA 和剪叶间存在着明显的相互抑制作用,尤其是 5 mmol/L、10 mmol/L BABA 与剪叶处理间。

3 讨论

PAL 是苯丙烷类代谢路径中的关键性酶和限速酶,与木质素、植保素以及其它一些抗性次生代谢物的合成密切相关,在诱导植物抗病中起着重要的作用^[13],PPO 在植物的多酚类代谢及木质化过程中发挥作用,也是植物抗病性的一个生化指标^[14]。在本试验中,单独使用 BABA 能诱导烟草植株的 PAL 活性增加,且 PAL 活性随 BABA 的浓度增加而升高,随接种后时间延长而上升,与 Ron Porat 等^[15]用 BABA 诱导柚子抗青霉 (*Penicillium digitatum*) 病的结果一致。BABA 处理也诱导 PPO 活性上升,但 PPO 活性与 BABA 浓度和接种后时间的关系与诱导 PAL 活性有差异(表 1,2)。剪叶这种机械性损

伤也能诱导 PAL、PPO 活性升高,从而诱导植物的抗性^[16]。但是,BABA 和机械性损伤同时处理的植株的 PAL、PPO 活性明显小于 BABA 或剪叶单独处理的,可见剪叶和 BABA 在 PAL 和 PPO 活性的激发上存在拮抗效应。同时,这种拮抗效应也表现在处理植株的外在症状上,剪叶弱化了 BABA 诱导烟草抗 TMV 的能力(图 1)。

不同的激发子所诱导的防卫反应依赖不同的信号分子和传递途径,且不同途径间存在着互作效应。Niki 等^[17]的研究表明水杨酸(SA)和茉莉酸(JA)处理烟草时对病程相关蛋白(PR proteins)基因的表达有拮抗作用,且拮抗程度与浓度呈正相关。苯丙噻二唑 [Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid-S-methylester, BTH] 是一种 SA 功能性类似物,Thaler 等^[18]证实它与 JA 间也存在拮抗作用。有研究表明 BABA 诱导烟草抗 TMV 依赖信号分子 SA 的积聚^[4],而在机械损伤的诱抗过程中,信号分子 JA 快速积聚,并在创伤信号转导中起重要的作用^[9],可能正是由于 BABA 和创伤分别诱导的 SA 和 JA 发生相互作用,从而导致了两者表现出拮抗。SA 和 JA 的拮抗作用主要表现为它们相互抑制对方的合成以及下游防卫反应的激发, Pena-Cortes 等^[20]和 Engelberth 等^[21]证实 SA 阻止 12-氧-植物二烯酸(12-oxy-phytodienoic acid)的合成及其向 JA 的转化;此外,SA 还抑制 JA 合成位置下游碱性 PR 蛋白、蛋白酶抑制剂等防卫基因的表达^[17,22-24];反之,JA 也使 SA 及其糖苷衍生物的合成受阻^[25,26],并抑制 SA 信号途径中防卫基因的表达^[17,27-29]。

BABA 和剪叶这两种有着不同信号途径的激发子互作时有拮抗作用,因此在剪叶的幼苗上使用 BABA 及其它以 SA 为信号分子的化学诱抗剂可能

是不适宜的, 使用与之信号途径相同的诱抗剂, 如茉莉酸系列, 是否有增效作用还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Michael O, Walter K, Bob D, et al. Induced disease resistance in plants by chemicals [J]. *Europ J Plant Pathol*, 2001, 107:19–28.
- [2] Sticher L, Mauch-Mani B, Metraux J P. Systemic acquired resistance [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1997, 35:235–270.
- [3] Xu H J(徐后娟), Zhang J(张军), Mu LY(慕利义), et al. Effect of propyl dihydrojasmonate on tobacco resistance to black shank [J]. *Chin J Pesticide Sci(农药学报)*, 2003, 3:73–76. (in Chinese)
- [4] Siegrist J, Orober M, Buchenauer H. β -Aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2000, 56:95–106.
- [5] Liu G S(刘国顺), Xi X Y(习向银), Shi X D(时向东), et al. Effect of clipping treatment on growth and physiological characteristics of flue-cured tobacco seedlings in floating system [J]. *Chin Tobacco Sci(中国烟草科学)*, 2003, 1:25–27. (in Chinese)
- [6] Gong J H(龚建华). Effect of clipping treatment on growth and yield of aubergine [J]. *China Vegetables(中国蔬菜)*, 1997, (6): 29. (in Chinese)
- [7] Reed T D. Float greenhouse tobacco-transplant production guide [J]. *Va Coop Ext Serv Bull*, 1996, 436–451.
- [8] Farmer E E, Ryan C A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors [J]. *Plant Cell*, 1992, 4:129–134.
- [9] Rojo E, Solano R, Sa'nchez-Serrano J J. Interactions between signaling compounds involved in plant defense [J]. *J Plant Growth Regul*, 2003, 22:82–98.
- [10] Fang Z D(方中达). *Research Methods on Plant Diseases[M]*. 2nd ed, Beijing: China Agricultural Press, 1996. 280–281. (in Chinese)
- [11] Hino F, Okazaki M, Miura Y. Effects of kinetin on formation of scopoletin and scopolin in tobacco tissue cultures [J]. *Agri Biol Chem*, 1982, 46:2195–2202.
- [12] Constabel C P, Ryan C A. A survey of wound- and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47:507–511.
- [13] Dixon R A, Paiva N L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism [J]. *Plant Cell*, 1995, 7:1085–1097.
- [14] Mayer A M. Polyphenol oxidase in plants—recent progress [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26:11–20.
- [15] Porat R, Vinokur V, Weiss B, et al. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by β -aminobutyric acid [J]. *Europ J Plant Pathol*, 2003, 109:901–907.
- [16] Hara-Nishimura I, Matsushima R. A wound-inducible organelle derived from endoplasmic reticulum: a plant strategy against environmental stresses [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6:583–588.
- [17] Niki T, Mitsuhashi I, Seo S, et al. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related protein genes in wounded mature tobacco [J]. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39:500–507.
- [18] Thaler J S, Fidantsef A L, Bostock R M. Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato [J]. *J Chem Ecol*, 2002, 28:1131–1159.
- [19] Stratmann J W. Long distance run in the wound response—jasmonic acid is pulling ahead [J]. *Trends Plant Sci*, 2003, 8:247–250.
- [20] Pena-cortes H, Albercht T, Part S, et al. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis [J]. *Planta*, 1993, 191:123–128.
- [21] Engelberth J, Koch T, Bachmann N, et al. Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrils coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125:369–377.
- [22] Doares H, Narvaez-vasquez J, Conconi A, et al. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108: 1741–1746.
- [23] Doherty H M, Selvendran R R, Bowles D J. The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxybenzoic acids [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1988, 33:377–384.
- [24] Gupta V, Willits M G, Glazebrook J. *Arabidopsis thaliana* EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2000, 13:503–511.
- [25] Sano H, Seo S, Koizumi N, et al. Regulation by cytokinin of endogenous levels of jasmonic and salicylic acids in mechanically wounded tobacco plants [J]. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37:762–769.
- [26] Seo S, Okamoto M, Seto H, et al. Tobacco MAP kinase: A possible mediator in wound signal transduction pathways [J]. *Science*, 1995, 270:1988–1992.
- [27] Petersen M, Brodersen P, Naested H, et al. *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance [J]. *Cell*, 2000, 103:1111–1120.
- [28] Feys B J F, Benedetti C E, Penfold C N, et al. *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen [J]. *Plant Cell*, 1994, 6:751–759.
- [29] Traw M B, Kim J, Enright S, et al. Negative cross-talk between salicylate- and jasmonate-mediated pathways in the Wassilewskija ecotype of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Ecol*, 2003, 12:1125–1135.