

茉莉酸甲酯对烟草幼苗抗病毒的影响

何红卫^{1,2} 廖令洁¹ 肖文娟¹ 宾金华^{1*}

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广东广州 510631; 2. 暨南大学华文学院, 广东广州 510610)

摘要: 用茉莉酸甲酯处理 4 叶期烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 幼苗后接种烟草花叶病毒, 考察发病情况和病情指数, 并测定一些与抗病相关的酶活性。结果表明, 茉莉酸甲酯处理后接种病毒明显降低巴西烟草的病情指数, 提高几丁内切酶、 β 1,3- 葡聚糖苷酶、SOD、脂氧酶的活性。其中仅 SOD 活性与抗病有较密切的关系。茉莉酸甲酯可能是诱导巴西烟草抗花叶病毒信号物质。

关键词: 烟草; 茉莉酸甲酯; 烟草花叶病毒; 几丁酶; β 1,3- 葡聚糖苷酶; SOD; 脂氧酶

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2004)03-0241-06

Effect of Methyl Jasmonate on the Resistance of Tobacco Seedlings to TMV

HE Hong-wei^{1,2} LIAO Lin-jie¹ XIAO Wen-juan¹ BIN Jin-hua^{1*}

(1. College of Life Science, South China Normal University, Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou 510631, China; 2. College of Chinese Language and Culture of Jinan University, Guangzhou 510610, China)

Abstract: Four-leaf seedlings of tobacco were used to study the resistance to tobacco mosaic virus (TMV). After the seedlings were sprayed with 1 mg ml⁻¹ methyl jasmonate (MJ) once a day for 3 days, then TMV was inoculated to the leaves. Among three tobacco varieties, brazil tobacco (BX) showed lower disease index than the other two (GH₅₅ and K₃₂₆). Endochitinase, β 1,3-Glucanase, superoxide dismutase (SOD) and lipoxigenase activities increased in MJ-treated BX tobacco seedlings. It is suggested that MJ plays an important role in the increase of SOD and in the resistance of BX tobacco against TMV.

Key words: Tobacco; Methyl jasmonate; Tobacco mosaic virus; Chitinase; β 1,3-Glucanase; SOD; Lipoxigenase

茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MJ)是新发现的一种植物生长调节物质, 广泛存在于植物中, 它在植物抗病信号转导中起作用^[1,2]。我们曾报道茉莉酸甲酯诱导烟草幼苗抗炭疽病^[3]。茉莉酸甲酯明显提高烟草幼苗的苯丙氨酸解氨酶(PAL)和过氧化物酶活性, 提高病原相关蛋白(pathogen related protein, PRP)、富含羟脯氨酸蛋白和木质素含量, 它们与茉莉酸甲酯诱导烟草幼苗抗病密切相关^[3-5]。自然界中, 除真菌和细菌外, 病毒也会侵染植物, 对植物造成严重危害, 如烟草花叶病毒、黄瓜花叶病毒等^[6]。MJ 与植物抗病毒的关系未见报道, 本文用茉莉酸甲酯处理烟草幼苗, 探讨其对病毒的诱导抗性以及对

一些与抗病相关的酶活性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)为巴西(BX)、广黄₅₅(GH₅₅)和 K₃₂₆ 3 个品种, 由广东农业科学研究院烟草室周会光先生提供。烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)由华南农业大学病毒研究所孙慎霞提供。

1.2 处理方法

由于茉莉酸甲酯不溶于水, 需用乙醇助溶(乙醇

收稿日期: 2003-04-01 接受日期: 2003-07-09

基金项目: 广东省自然科学基金(940721, 990461)资助

* 通讯作者 Corresponding author

的终浓度为 0.1%, MJ 的含量为 1 mg ml^{-1}), 因而对照除水处理外, 尚有一个 0.1% 乙醇处理的对照。清晨时分别用 MJ 溶液、水、0.1% 乙醇喷洒 4 叶期烟草幼苗, 每天 1 次连续喷洒 3 d, 第三天下午接种 TMV。以接种处理为处理 0 d, 以后每 2 d 于下午取幼苗, 根据中华人民共和国行业标准《烟草病虫害分级及调查方法》(YC/T39-1996) 对烟草病害严重程度进行分级和统计, 计算病情指数(以株为单位)。然后将幼苗贮藏于 -70°C 下备用。

1.3 酶活性测定

取不同植株上的烟草幼苗叶片, 用液氮研成粉末。称取 1 g, 分别用各种待测酶的缓冲液研磨, 于 $18000 \times g$ 下离心 20 min (4°C), 取上清液测定酶活性。

几丁酶活性测定 按 Legrand 等^[7]的方法进行, 以底物几丁质被酶降解产生的 n-乙酰葡糖胺(nAGA)的量表示酶活性。

β 1,3-葡聚糖苷酶活性测定 按 Joosten 和 De Wit^[8]方法进行, 以底物昆布糖被酶降解产生的葡萄糖量表示酶活性。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定 按宋风鸣等^[9]的方法进行, 活性定义为 NBT 的光化还原刚好被 SOD 抑制 50% 的酶量为一个酶单位。

脂氧酶(lipoxygenase, LOX)活性测定 按 Koch 等^[10]的方法进行。

2 结果

2.1 抗花叶病毒

3 个品种烟草幼苗在接种病毒后, 发病情况较严重, 病情指数明显提高(表 1)。喷洒乙醇后再接种病毒, BX 烟草幼苗的病情指数有所降低, GH₅₅ 略微降低, K₃₂₆ 则增加; 喷洒 MJ 后接种病毒, 巴西烟草幼苗的病情指数明显降低, GH₅₅ 没有明显变化, K₃₂₆

表 1 茉莉酸甲酯对烟草幼苗抗花叶病毒的影响
Table 1 Effect of methyl jasmonate (MJ) on three varieties of tobacco seedlings resistant to TMV

处理 Treatment	病情指数 Disease index(%)		
	巴西 BX	广黄 ₅₅ GH ₅₅	K ₃₂₆
水 Water	21.2±2.2	17.1±1.7	20.8±1.6
乙醇 Alcohol	16.3±1.5	15.4±1.7	24.1±1.9
茉莉酸甲酯 MJ	5.1±0.9	17.4±1.1	17.6±1.2

在喷洒溶液后的第 3 天下午接种病毒 TMV was inoculated on the third day afternoon after spraying with MJ once a day.

略微降低(表 1)。表明 MJ 有诱导 BX 烟草幼苗抗花叶病毒的作用。

2.2 抗病相关酶活性

BX 烟草幼苗接种病毒, 叶片的几丁内切酶活性逐渐增加, 10 d 后略微降低; 乙醇处理后接种病毒, 几丁内切酶活性在初期明显增加, 但随后降低, 这两种处理的酶活性均高于处理前的酶活性(图 1A)。MJ 处理后接种病毒, BX 烟草幼苗叶片的几丁内切酶活性逐渐增加, 10 d 后就高于前两种处理(图 1A)。与水处理对照相比, 乙醇处理降低 BX 烟草幼苗的几丁内切酶活性, 而 MJ 处理的则明显增加(图 1B)。可见, MJ 可提高 BX 烟草幼苗叶片的几丁内切酶活性, 接种处理的酶活性比未接种的略高。

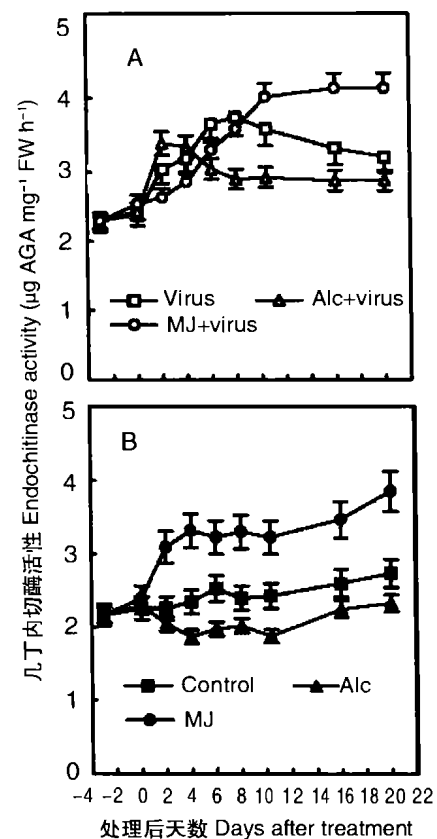


图 1 TMV (A) 和茉莉酸甲酯 (B) 对巴西烟草幼苗叶片几丁内切酶活性的影响

Fig. 1 Effect of TMV (A) and methyl jasmonate (MJ) (B) on leaf endochitinase activity in BX tobacco seedlings

BX 烟草幼苗接种病毒后, 叶片的几丁外切酶活性明显增加, 乙醇或 MJ 处理后接种病毒, 酶活性都低于只接种病毒的(图 2A)。正常生长的 BX 烟草幼苗, 叶片的几丁外切酶活性随发育逐渐增加, 乙醇处理的酶活性明显增加, MJ 处理的开始时只略

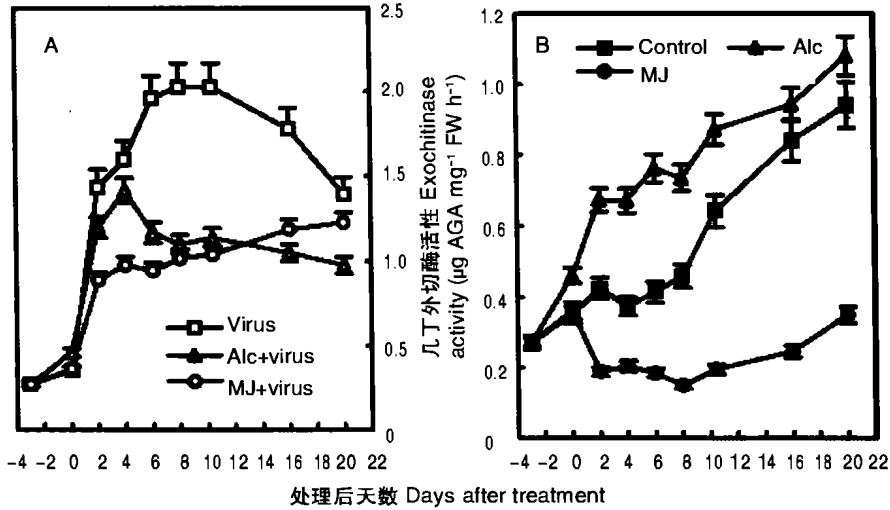


图 2 TMV (A)和茉莉酸甲酯 (B)对巴西烟草幼苗叶片几丁外切酶活性的影响

Fig. 2 Effect of TMV(A) and methyl jasmonate (MJ) (B) on leaf exochitinase activity in BX tobacco seedlings

微增加,随后略微降低,8 d 后又逐渐回升(图 2B)。可见 MJ 能降低 BX 烟草幼苗几丁外切酶的活性。

BX 烟草幼苗接种病毒后,叶片的 β 1,3- 葡聚糖苷酶活性略有增加,10 d 后逐渐降低,乙醇处理后再接种病毒,酶活性明显降低,8 d 后又逐渐回升

到处理前水平,MJ 处理后再接种病毒,酶活性明显增加(图 3A)。正常生长的 BX 烟草幼苗,叶片的 β 1,3- 葡聚糖苷酶活性逐渐增加,乙醇处理明显增加酶活性,但 4 d 后又下降,而 MJ 处理的酶活性明显降低(图 3)。

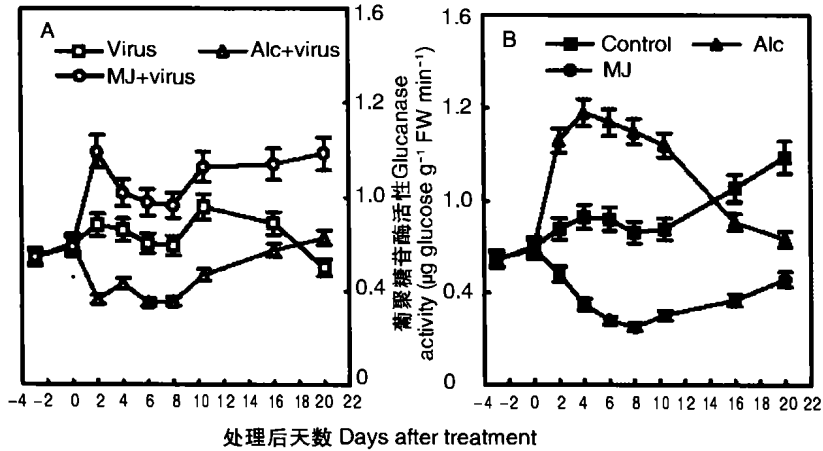


图 3 TMV (A)和茉莉酸甲酯(B)对巴西烟草幼苗叶片 β 1,3- 葡聚糖苷酶活性的影响

Fig. 3 Effect of TMV(A) and methyl jasmonate (MJ) (B) on leaf β 1,3- glucanase activity in BX tobacco seedlings

表 2 不同处理对 BX 烟草幼苗抗 TMV 及抗病相关酶活性的影响

Table 2 Effect of different treatments on the resistance to TMV, and the changes in chitinase, β 1,3- glucanase and SOD activity in BX tobacco seedlings

处理 Treatments	病情指数 Disease index	几丁内切酶 Endochitinase (μ g AGA mg^{-1} FW h^{-1})	几丁外切酶 Exochitinase (μ g AGA mg^{-1} FW h^{-1})	β 1,3- 葡聚糖苷酶 β 1,3- glucanase (μ g glucose g^{-1} FW min^{-1})	SOD (U g^{-1} FW min^{-1})
Virus	21.2%	3.01	1.43	0.627	1.08
Alc+virus	16.3%	2.77	0.992	0.459	3.20
MJ+virus	5.12%	3.13	0.919	0.780	6.10
相关系数 Correlation coefficient		0.528	0.817	0.659	-0.991
r_{01}		不显著 Not significant	不显著 Not significant	不显著 Not significant	显著 Significant

df=1, r_{01} = 0.988

BX 烟草幼苗接种病毒, 叶片的 SOD 活性没有明显变化, 乙醇处理后接种病毒, SOD 活性明显增加, MJ 处理后接种病毒, SOD 活性大幅增加(图 4A)。而 BX 烟草幼苗的 SOD 活性在生长过程中没有明显变化, 乙醇处理使 SOD 活性有所增加, MJ

处理则使 SOD 活性明显增加(图 4B)。

正常生长的和乙醇处理的 BX 烟草幼苗叶片的 LOX 活性没有明显变化, 而 MJ 处理后出现明显的活性峰, 表明 MJ 能明显提高 LOX 的活性(图 5)。

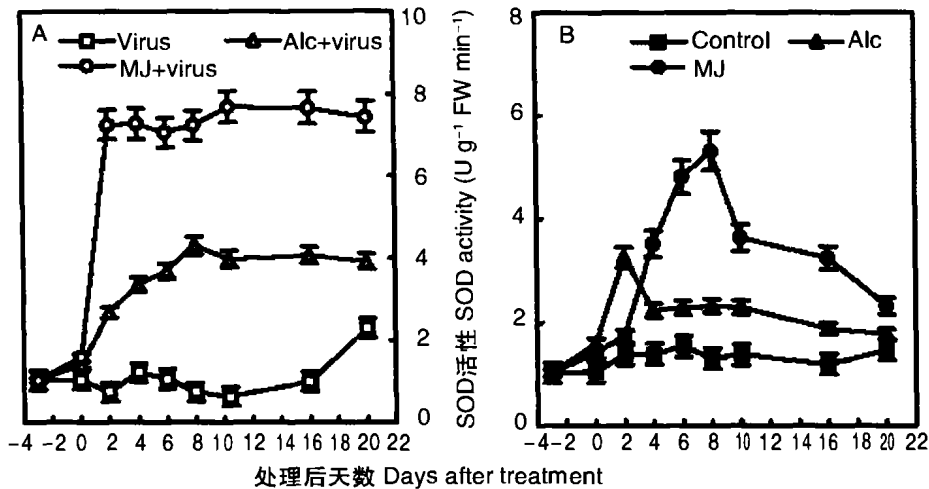


图 4 TMV (A)和茉莉酸甲酯 (B)对巴西烟草幼苗叶片 SOD 活性的影响

Fig. 4 Effect of TMV (A) and methyl jasmonate (MJ) (B) on leaf SOD activity in BX tobacco seedlings

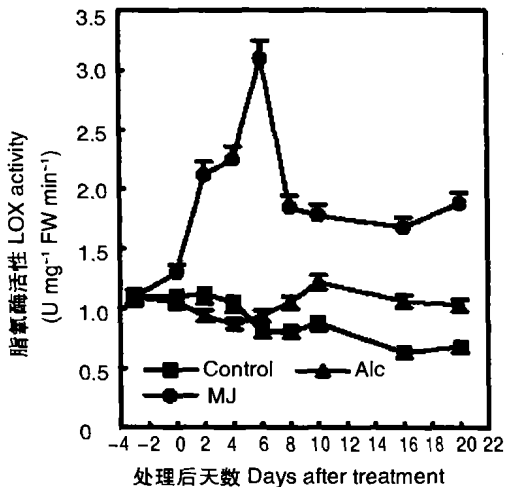


图 5 茉莉酸甲酯对巴西烟草幼苗叶片脂氧酶活性的影响
Fig. 5 Effect of methyl jasmonate on leaf lipoxigenase (LOX) activity in BX tobacco seedlings

2.3 相关性分析

将接种过 TMV 的 BX 烟草幼苗叶片的几丁内切酶、几丁外切酶、 β 1,3- 葡聚糖苷酶、SOD 活性的平均值(图 1-4 曲线各自平均)与病情指数做相关分析(表 2), 相关系数最高为 SOD(-0.991), 达到 $p=0.1$ 水平的显著度(表 2, $r_{0.1}=0.988$), 表明 SOD 活性与 BX 抗病毒有较密切的关系。其余 3 个酶—几丁内

切酶、几丁外切酶、 β 1,3- 葡聚糖苷酶的相关系数分别为 0.528、0.817、0.659, 未达到显著相关的水平, 它们与抗病毒的关系不密切。

3 讨论

烟草生长发育过程中, 受到许多病虫害的侵染, 病毒是其中一种较严重的病害。由于目前没有针对病毒的有效药物, 防治难度较大。植物对病毒侵染的抗性有两种主要的方式, 一种是基于植物本身固有的抗病能力, 另一种是诱导植物抗病的方式。前者指植物细胞内含有抑制病毒增殖的物质, 或植物细胞内缺乏某些使病毒增殖及致病所需的辅助因子, 因而病毒无法复制, 例如烟草中的 *N* 基因可以抗烟草花叶病毒侵染^[11]; 后者则是指用一些物质处理植株或病毒侵染的植株后, 诱导植物对随后的病毒侵染产生抗性, 如水杨酸(SA)^[12-13]、寡糖^[16,17]、精胺(spermin)^[18]、油菜素类固醇^[19]等。本实验中, MJ 能明显提高 BX 烟草的抗病毒能力(表 1), 与抗真菌的情况一样^[3]。

在抗病毒或是 SA 诱导烟草抗病毒中, 常伴有 PRP 的增加^[20-23]。目前已知 PRP 有 5 种, PRP₁ 的功能尚不清楚, PRP₂ 是 β 1,3- 葡聚糖苷酶^[8], PRP₃ 是几丁酶^[8,9], PRP₄ 和 PRP₅ 的功能尚不清楚。一些植

物被诱导抗病时,其 β 1,3-葡聚糖苷酶和几丁酶的活性会增高^[21-23],我们也曾报道 MJ 可以提高烟草幼苗^[3]和愈伤组织^[26]的 PRP 含量。本实验中, MJ 处理提高 BX 烟草幼苗几丁内切酶活性,对几丁外切酶活性没有明显影响,显示 MJ 诱导 BX 烟草幼苗抗花叶病毒与几丁内切酶的关系较为密切。MJ 处理使 BX 烟草幼苗的 β 1,3-葡聚糖苷酶活性降低, MJ 处理后接种病毒,其活性增加,而只接种病毒的 BX 烟草幼苗却没有明显增加,预示着 MJ 处理和病毒协同作用才能诱导 β 1,3-葡聚糖苷酶活性增加,而此时 BX 烟草幼苗表现出对病毒的抗性,说明 MJ 仍与 BX 烟草幼苗抗病毒有关,但 MJ 并不能简单地诱导出 β 1,3-葡聚糖苷酶的活性,此酶活性的诱导可能有复杂的机制。

Fodor 等^[27]发现,在烟草植株获得系统抗性时, SOD 活性增加。SA 处理时也诱导 SOD 活性。他们认为 SOD 在抗病中起作用。本试验中, MJ 处理明显提高 BX 烟草幼苗的 SOD 活性, MJ 处理后接种病毒, SOD 活性也明显增加,相关分析表明, MJ 诱导 BX 烟草幼苗抗花叶病毒与 SOD 活性有较密切的关系。Aranda 等^[28]发现黄瓜花叶病毒在黄瓜子叶复制时,子叶 LOX 基因表达被抑制,表明 LOX 对病毒复制可能有不利的作用。本实验中 MJ 能明显诱导 LOX 活性, LOX 可能在 BX 烟草幼苗抗病毒中起作用。

Park 等^[25]报道诱导辣椒(hot pepper)抗病毒时有 PRP₄ 表达, MJ 和乙烯也可以诱导其表达,而 SA 不能诱导 PRP₄ 表达,他们认为独立于 SA 的辣椒抗 TMV 与 MJ 和乙烯有密切的关系。Guo 等^[29]认为,在烟草抗 TMV 时,存在一条独立于 SA 和乙烯的诱导抗性基因表达的信号转导途径。而我们发现 MJ 能提高烟草愈伤组织的乙烯和 SA 的含量,但前者增加较迅速,后者较慢^[26]。因此,我们认为 MJ 可能是诱导 BX 烟草抗 TMV 信号物质,并且可能是通过 SA 和乙烯的介导起作用。

参考文献

- [1] Bin J H(宾金华), Pan R C(潘瑞炽). Methyl jasmonates: Biochemistry, biophysiology and role in plant resistance [J]. Chin Bull Bot(植物学通报), 1995, 12:17-21.(in Chinese)
- [2] Creelman R A, Mellut J E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants [J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1997, 48: 355-38.
- [3] Bin J H(宾金华), Pan R C(潘瑞炽). Effect of methyl jasmonate on resistance of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) seedlings to *Colletotrichum destructum* O' Gara [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 1997, 5(4):21-26.(in Chinese)
- [4] Bin J H(宾金华), Pan R C(潘瑞炽). The relationship of the disease resistance of tobacco seedlings induced by methyl jasmonate with peroxidase activity and lignin content [J]. Chin J Appl Envir Biol(应用与环境生物学报), 1999, 5(2):160-164.(in Chinese)
- [5] Bin J H(宾金华), Jiang S(姜胜), Huang S Q(黄胜琴), et al. The relationship between methyl jasmonate induced anthracnose resistance of tobacco seedlings and phenylalanine ammonia-lyase activity and cell wall substances [J]. Acta Phytophysiol Sin(植物生理学报), 2000, 26:1-6.(in Chinese)
- [6] Palukaitis P, Roossinck M J, Dietzgen R G, et al. Cucumber mosaic virus [J]. Adv Virus Res, 1992, 41:281-348.
- [7] Legrand M, Kauffmann S, Geoffroy P, et al. Biological function of pathogenesis-related proteins are chitinases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84:6750-6754.
- [8] Joosten M H A J, De Wit P J G M. Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (Syn. *Fulvia*) as β 1,3-glucanases and chitinase [J]. Plant Physiol, 1989, 89:945-951.
- [9] Song F M(宋凤鸣), Zheng Z(郑重), Ge X C(葛秀春). The role of activated oxygen and lipid peroxidation in plant-microbe interaction [J]. Plant Physiol Comm(植物生理学通讯), 1996, 32: 377-385.(in Chinese)
- [10] Koch E, Meier B M, Eiben H G, et al. A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic *Pseudomonads* [J]. Plant Physiol, 1992, 99: 571-576.
- [11] Whitham S, Dinesh-Kumar S P, Choi D, et al. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to toll and the interleukin-1 receptor [J]. Cell, 1994, 78:1101-1115.
- [12] Kang M K, Park K S, Choi D. Coordinated expression of defense-related genes by TMV infection or salicylic acid treatment in tobacco [J]. Mol Cells, 1998, 8:388-392.
- [13] Murphy A M, Carr J P. Salicylic acid has cell-specific effects on tobacco mosaic virus replication and cell-to-cell movement [J]. Plant Physiol, 2002, 128:552-563.
- [14] Naylor M, Murphy A M, Berry J O, et al. Salicylic acid can induce resistance to plant virus movement [J]. Mol Plant-Microbe Inter, 1998, 11:860-868.
- [15] Chivasa S, Murphy A M, Naylor M, et al. Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus replication via a novel salicylhydroxamic acid-sensitive mechanism [J]. Plant Cell, 1997, 9:547-557.
- [16] Klarzynski O, Plesse B, Joubert J M, et al. Linear β 1,3-glucans are elicitor of defense responses in tobacco [J]. Plant Physiol, 2000, 124:1027-1037.
- [17] Klarzynski O, Descamps V, Plesse B, et al. Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus [J]. Mol Plant-Microbe Inter, 2003, 16:115-122.
- [18] Yamakawa H, Kamada H, Satoh M, et al. Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic patho-

- genesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection [J]. *Plant Physiol*, 1998, 118:1213-1222.
- [19] Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, et al. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice [J]. *Plant J*, 2003, 33:887-898.
- [20] Yalpani N, Silverman P, Wilson T M, et al. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco [J]. *Plant Cell*, 1991, 3:809-818.
- [21] Cote F, Cuit J R, Asselin A, et al. Pathogenesis-related acidic beta-1,3-glucanase genes of tobacco are regulated by both stress and developmental signals [J]. *Mol Plant-Microbe Inter*, 1991, 4: 173-181.
- [22] Domingo C, Conejero V, Vera P. Genes encoding acidic and basic class III β -1,3-glucanases are expressed in tomato plants upon viroid infection [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 24:725-732.
- [23] Repka V, Tamas L, Fischerova I, et al. Identification and partial characterization of β -1,3-glucanase from virus-infected cucumber cotyledons [J]. *Acta Virol*, 1997, 41:35-39.
- [24] Repka V. Intra- and extracellular isoforms of PR-3 class chitinase in virus-infected cucumber plants [J]. *Acta Virol*, 1997, 41:71-75.
- [25] Park C J, Shin R, Park J M, et al. A hot pepper cDNA encoding a pathogenesis-related protein 4 is induced during the resistance response to tobacco mosaic virus [J]. *Mol Cells*, 2001, 11:122-127.
- [26] Yan W W(严文文), Li Y F(李艳芳), He L H(贺立红), et al. Effect of caffeic acid and cobalt chloride on the defense related enzymes of tobacco calli inducing by methyl jasmonate [J]. *Chin Bull Bot(植物学通报)*, 2003, 20:67-74.(in Chinese)
- [27] Fodor J, Gullner G, Adam A L, et al. Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco (role in systemic acquired resistance) [J]. *Plant Physiol*, 1997, 114:1443-1451.
- [28] Aranda M A, Escaler M, Wang D, et al. Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:15289-15293.
- [29] Guo A, Salih G, Klessig D F. Activation of a diverse set of genes during the tobacco resistance response to TMV is independent of salicylic acid; induction of a subset is also ethylene independent [J]. *Plant J*, 2000, 21:409-418.