

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.10.003

感染赤星病后不同烟草品种叶片防御酶的变化^①

耿莉娜¹, 龙艳玲², 徐宸¹,
汪代斌¹, 赵敏¹, 胡军华²

1. 重庆烟草科学研究所, 重庆 400715; 2. 西南大学 柑橘研究所, 重庆 400712

摘要: 研究了云烟 87, K326, Beinhart1000-1 3 个烟草品种被赤星病菌侵染后烟草叶片相关防御酶的变化, 包括氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、 β -1,3 葡聚糖酶(GLU)、几丁质酶(CHO), 以期通过防御相关酶活性变化规律与赤星病侵染过程、品种抗病性的关系, 揭示不同烟草品种对赤星病的抗病机制。结果表明, 在受赤星病菌侵染后, 抗病品种 Beinhart1000-1 在接种赤星病菌后, SOD, POD, PAL 活性迅速升高并高于对照, 但 CAT 活性在 Beinhart1000-1 中基本低于对照, GLU 活性变化明显大于感病品种。赤星病菌侵染烟草后, 烟草体内的防御酶发生变化, 这些防御酶活性变化可作为烟草对赤星病抗性鉴定的生理指标。

关键词: 烟草赤星病; 防御酶; 抗病蛋白

中图分类号: S435.72

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)10-0019-06

烟草赤星病严重影响烟草品质和产量, 给世界烟草产业带来巨大经济损失^[1]。长期使用化学药剂防治会引起环境污染、农药残留、抗药性等问题; 生物防治虽无毒无害无污染, 但其作用缓慢、稳定性差、易受外界环境影响等缺点成为开发的难点, 因此研究烟草的抗病性和选育抗赤星病烟草品种是防治该病最经济有效的途径^[2-3]。有研究发现烟草中一些酶类如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、 β -1,3 葡聚糖酶(GLU)、几丁质酶(CHO)与烟草的抗病反应密切相关^[4]。为进一步明确烟草感染赤星病后体内防御酶活性变化与烟草抗病性的关系, 本研究选取抗赤星病品种 Beinhart1000-1、感赤星病品种 K326 和云烟 87 分别接种赤星病菌, 在不同时间段测定 7 种酶活性并进行系统的比较和分析, 以期能为烟草赤星病的生理生化机制和烟草抗病性鉴定指标提供新的参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试烟草品种为云烟 87, K326, Beinhart1000-1, 来自中国农业科学院烟草研究所。播种于温室花盆内, 后移栽于温室, 常规管理, 当 8~10 片真叶完全展开时接种。实验地点为西南大学柑桔研究所综防实验室。

供试菌株为 *Alternaria tenuissima*, 来自重庆市巫溪烟草种植区典型赤星病烟草植株上分离纯化, 经致病力鉴定和分子鉴定确认, 病原菌在 PDA 培养基上 25 °C 培养 7d 后待用。

BCA 蛋白质定量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。几丁质酶(CHO)试剂盒、 β -1,3 葡聚糖酶(GLU)试剂盒、苯丙氨酸解氨酶(PAL)试剂盒、多酚氧化酶(PPO)试剂盒、过氧化物酶(POD)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒购自苏州科铭生物技术有限公司。

① 收稿日期: 2018-01-25

基金项目: 中国烟草总公司重庆市公司项目(NY20150401070001, NY20150601070012); 中国烟草总公司重大专项项目(110201501015); 湖南省烟草公司项目(201543050024056)。

作者简介: 耿莉娜(1983-), 女, 高级农艺师, 博士, 主要从事烟草植保的研究。

通信作者: 胡军华, 副研究员, 博士。

1.2 实验方法

1.2.1 症状观察及取样

在待测烟草品种植株下部叶片上针刺接种菌饼, 每张叶片上接种 1 个菌饼, 接种后 25 ℃ 保湿培养, 每天观察叶片受病菌侵染后情况. 分别于接种后 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 96 h, 140 h, 192 h, 240 h 取样, 每次选取植株上部第一片完全展开的叶片, 以同生育期同部位成熟叶片针刺接 PDA 培养基作空白对照. 样品液氮速冻后 -80 ℃ 保存备用.

1.2.2 酶活测定

按照各个酶活测定试剂盒说明书的要求, 分别提取 3 个烟草品种不同时间段样品的粗酶液, -20 ℃ 保存备用.

按照 BCA 蛋白质定量试剂盒说明书步骤测量绘制标准曲线并测定 3 个烟草品种各时段样品的粗酶液在 520nm 处的吸光值, 并根据标准曲线计算出各样品相应的蛋白浓度.

按照各个酶活测定试剂盒说明书步骤测定几丁质酶(CHO)、 β -1,3 葡聚糖酶(GLU)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)7 种酶在各相应波长处的吸光值. 根据各酶试剂盒对应的酶活计算公式计算 7 种酶的酶活性, 以未接菌的烟草叶片中的酶活为对照, 计算接菌后的酶相对活性(酶相对活性=接菌后酶活性 \div 未接菌的酶活性), 以起始点为对照作图.

1.2.3 统计分析

采用 SPSS 20.0 软件对酶活数据进行分析, 用 Excel 2007 进行数据计算和制图.

2 结果与分析

2.1 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性变化

测定不同抗性烟草品种接种赤星病菌后其叶片内苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性时发现, PAL 活性在不同抗性烟草品种叶片中有明显差异(图 1). Beinhart1000-1 品种 PAL 活性显著增高, 接种 36 h 时 PAL 相对活性迅速升为 10.49, 以后快速下降, 48 h 时低于对照(起始点), 仅是对照的 31.81%, 96 h 又回升与对照接近, 其后 PAL 活性基本都低于对照; 云烟 87 和 K326 品种接种后 PAL 活性都低于对照, K326 在 24 h 时 PAL 相对活性升为 1.79, 96 h 又回降与对照接近, 以后又上升, 在 140 h 时 PAL 活性为 2.6, 其后回降到与对照接近; 云烟 87 在 24 h 时缓慢升至与对照接近, 36 h 时 PAL 相对活性升为 1.76, 以后下降, 96 h 时仅为对照的 30.52%, 其后回升到与对照接近.

2.2 多酚氧化酶(PPO)活性变化

从图 2 看出, Beinhart1000-1 品种感染赤星病菌后 PPO 活性略有增高, 接种 12 h 时 PAL 相对活性升为 1.40, 以后下降并低于对照, 48 h 时相对酶活性回升至 4.44, 以后又下降并低于对照, 140 h 时又开始上升, 192 h 时迅速升至 10.96, 其后又下降; 云烟 87 和 K326 品种感染赤星病后 36 h 内 PPO 活性均降低, 但各有差异, K326 品种在 36 h 内 PPO 活性低于对照, 48 h 时升至 2.31, 以后下降并低于对照, 192 h 回升至与对照接近, 240 h 时相对活性迅速升至 20.02; 云烟 87 接种后在 192 h 内 PPO 活性都低于对照, 其后缓慢上升, 240 h 时相对活性升至 2.01.

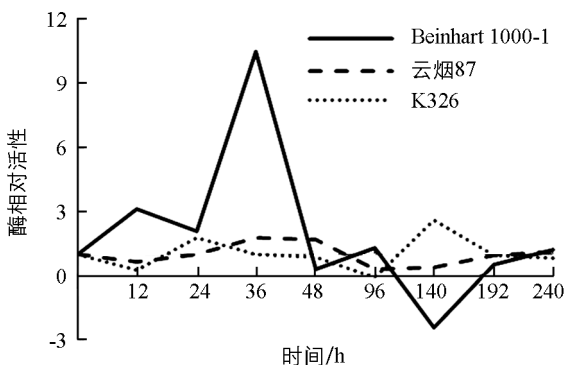


图 1 不同抗性烟草品种接种赤星病菌后 PAL 相对酶活性变化

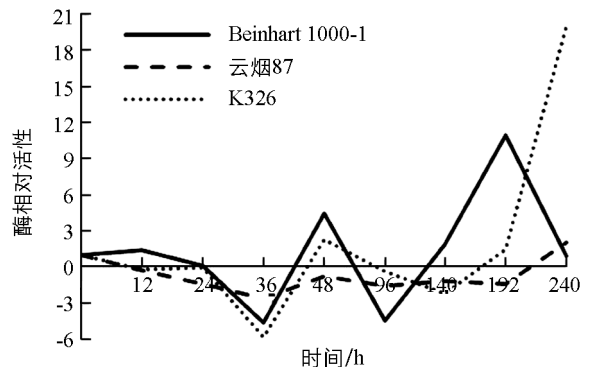


图 2 不同抗性烟草品种接种前后 PPO 相对酶活性变化

2.3 过氧化物酶(POD)活性变化

测定不同抗性烟草品种接种赤星病菌后其叶片内苯丙氨酸解氨酶(POD)活性时发现, PAL 活性在不同抗性烟草品种叶片中有明显差异(图 3). Beinhart1000-1 和 K326 品种感染赤星病后 12 h 内 POD 活性均上升, 但幅度不同, Beinhart1000-1 较 K326 上升明显, 12 h 时两者 POD 相对活性分别为 5.31 和 1.02, 其后均下降, Beinhart1000-1 在 36 h 时又迅速上升, 140 h 时 POD 相对活性达 17.51, 以后又下降; K326 在 24 h 后迅速上升, 36 h 时活性为 13.02, 随后下降, 在 192 h 时又上升至 4.03; 云烟 87 叶片内 POD 活性变化不大, 在各时期基本均低于对照.

2.4 过氧化氢酶(CAT)活性动态变化

测定结果表明(图 4), 接种赤星病菌后 3 种不同品种烟草叶片内 CAT 活性发生明显变化. K326 品种在接种 24 h 内 CAT 活性升高, 随后下降并低于对照, 96 h 时酶活性又开始迅速回升, 在 140 h 上升至 5.73, 其后又下降; Beinhart1000-1 和云烟 87 则相反, 在 140 h 内其 CAT 活性基本都低于对照, 140 h 时开始缓慢上升, 在 192 h 时酶相对活性分别上升至 1.74, 1.72, 随后均下降.

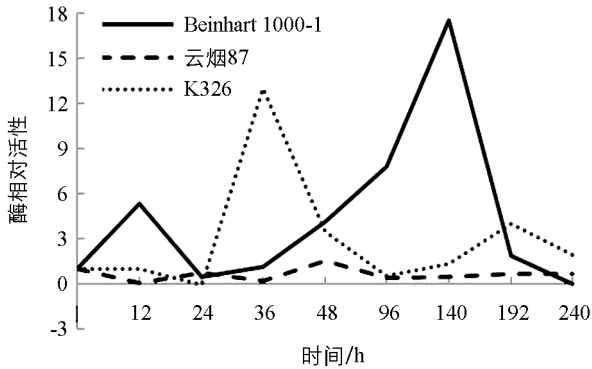


图 3 不同抗性烟草品种接种前后 POD 相对酶活性变化

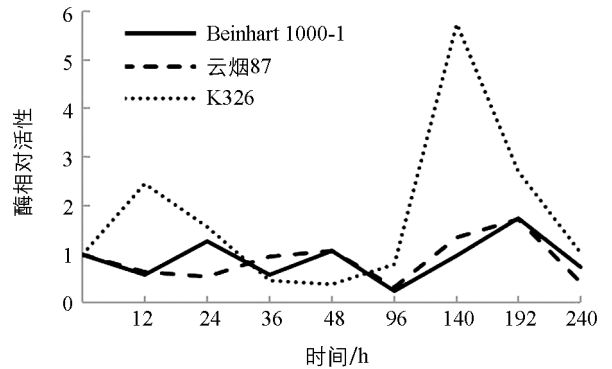


图 4 不同抗性烟草品种接种前后 CAT 相对酶活性变化

2.5 超氧化物歧化酶(SOD)活性变化

测定结果表明(图 5), 接种赤星病菌后 Beinhart1000-1 在 24 h 内 SOD 活性升高, 随后下降并低于对照, 192 h 时酶活性又开始迅速回升, 在 240 h 时酶相对活性上升至 9.14; 云烟 87 和 K326 则相反, 在 12 h 内活性均降低并低于对照, 随后云烟 87 在 24 h 时 SOD 活性开始显著上升, 在 140 h 时酶相对活性达到 6.25; K326 在 36 h 时 SOD 活性开始显著升高, 48 h 时酶相对活性达到 5.40, 随后快速下降, 在 96 h 后活性均低于对照.

2.6 几丁质酶(ChT)活性变化

从图 6 可以看出, Beinhart1000-1 品种感染赤星病菌后 ChT 活性略有增高, 12~36 h 之间活性较对照低, 随后回升至与对照接近; 其他品种与 Beinhart1000-1 相反, 在接种 12 h 内 ChT 活性降低, 随后 K326 叶片内 ChT 活性保持相对稳定, 与对照接近; 云烟 87 在 12 h 后开始上升, 在 36 h 时和 140 h 时 ChT 相对活性分别升至 5.93 和 37.73, 随后活性迅速降低.

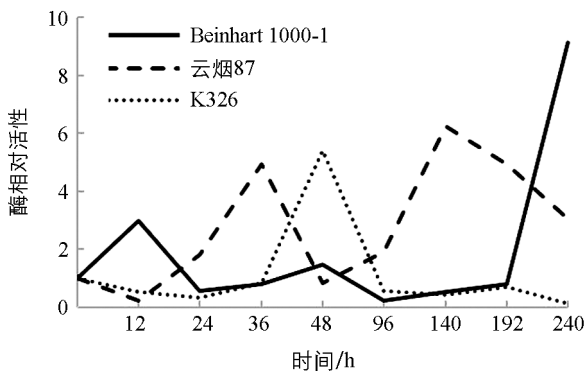


图 5 不同抗性烟草品种接种前后 SOD 相对酶活性变化

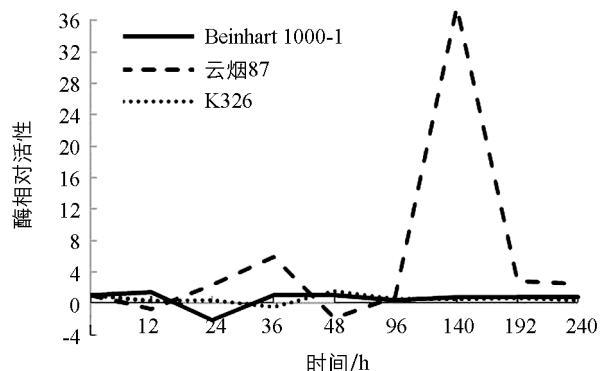


图 6 不同抗性烟草品种接种前后 ChT 相对酶活性变化

2.7 β -1,3-葡聚糖酶(GLU)活性变化

从图 7 可以看出,接种赤星病菌后 3 种不同品种烟草叶片内 GLU 在 24 h 内活性各有不同幅度的上升,其中 Beinhart1000-1 较其他品种上升快,在 24 h 和 140 h 时酶相对活性分别达 3.15 和 20.47,但在 36 h~48 h 之间其活性下降并低于对照;云烟 87 和 K326 的 GLU 活性变化趋势相似,在 36 h 内波动不大并基本趋近对照值,随后上升,在 48 h 时酶相对活性分别升至 2.92 和 3.45,随后缓慢下降至接近对照。

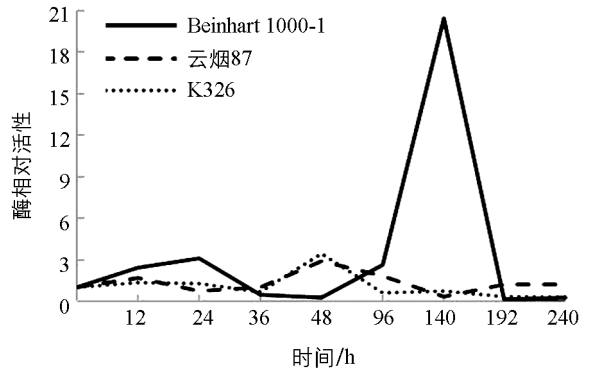


图 7 不同抗性烟草品种接种前后 GLU 相对酶活性变化

3 讨论

超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)共同组成植物体内的有效活性氧清除系统,在植物机体防御体系中起重要作用^[5-6].本实验中抗病品种 Beinhart1000-1 在接种赤星病菌后 SOD,POD 活性迅速升高并高于对照,感病品种云烟 87 接种后其 SOD 降低,24 h 后快速上升,POD 活性基本无变化;K326 其 SOD,POD 活性均降低并基本低于对照,随后 SOD 和 POD 活性迅速上升,说明抗病品种在接菌后 SOD,POD 酶系统启动均比感病品种早,且活性也高于感病品种. Montalbini 等^[7]和匡传富等^[8]也发现抗病烟草品种在接种病原物后 SOD 活性比感病品种高,且活性增长也明显大于感病品种;Joseph 等^[9]的研究结果也表明,抗病品种的 POD 活性较感病品种高,且在病原物侵染早期,其 POD 活性会迅速升高,与本文结果一致.另外接菌后 CAT 活性在 Beinhart1000-1 中基本低于对照;云烟 87 在 CAT 活性后期小幅度升高;K326 在接种后 CAT 活性迅速升高,与吴元华等^[10]研究结果一致.另外由接种赤星病菌后 3 种不同抗性烟草中 SOD,POD,CAT 3 种酶相对活性的变化可以发现,抗病品种 Beinhart1000-1 中活性氧清除组合系统为 SOD+POD;感病品种云烟 87 为 SOD+CAT;K326 为 SOD+POD+CAT,由此笔者推测在烟草抗病性反应过程中,SOD 酶体系是基础的 ROS 清除系统,POD 酶体系比 SOD 酶防御系统清除能力强,而 CAT 酶体系则是 SOD 和 POD 的“加强版”酶防御系统.SOD 和 POD 早期(0~12 h)的活性与烟草品种抗赤星病呈正相关,CAT 活性与烟草的抗病性呈负相关,CAT 与 SOD 和 POD 早期(0~12 h)的活性高低可以作为烟草对赤星病菌抗性鉴定的指标.

苯丙氨酸解氨酶(PAL)是催化苯丙烷类代谢途径第一步反应酶,也是该代谢途径的关键酶和限速酶,在它的催化下苯丙烷类生成反式肉桂酸并进一步转化为类黄酮、木质素等次生代谢产物,因此被看成是植保工程的关键防御酶^[11-12].研究发现,许多植物在遭受外部伤害时,植物的防卫系统特别是苯丙烷类代谢被激活,PAL 活性迅速上升,因此 PAL 活性可以作为植物抗逆境能力的一个生理指标^[13].在本研究中,抗病品种 Beinhart1000-1 在接种后 PAL 酶活迅速升高,并维持在较高水平,随后下降,说明植株细胞在受到病原菌刺激后启动 PAL 酶系统产生木质素并沉积在细胞壁周围,阻止病原菌进一步扩散.感病品种云烟 87 和 K326 在接种后都比对照 PAL 酶活性低,随后小幅度的升高,可能是由于感病品种对病原菌的侵入反应迟钝,PAL 活性变化较慢,生成的木质素少,对病原菌的阻止力度不大,从而表现为感病.陈学平等^[14]研究发现,在感染 TMV 后,具有 SAR 抗性的烟草品种对 TMV 表现出较高的敏感性,且抗病品种 PAL 活性明显高于感病品种,与本文结果一致;刘学敏等^[15]也发现接种赤星病菌后,抗病品种 CV87 的 PAL 活性升高,感病品种 NC89 的 PAL 活性降低,与本文结果一致.因此在寄主植物抗病性反应过程中,PAL 活性与烟草抗赤星病正相关,PAL 活性变化可以作为烟草对赤星病菌抗性鉴定的指标.

在本研究中,抗病品种 Beinhart1000-1 在接种后 PPO 酶相对活性变化曲线有 3 个峰值,且升高幅度逐渐增大;感病品种云烟 87 和 K326 在接种后叶片中 PPO 基本低于对照,且活性变化不大. Beinhart1000-1 中 PPO 活性总的变化趋势大于感病品种,PPO 活性与烟草病程反应呈正相关.邹芳斌等^[16]研究苗期感染枯萎病菌发现,高抗品系 PPO 活性值迅速上升,中抗、低抗品系 PPO 活性值变化不大,而高感、中感品系

PPO 活性值迅速下降, 与本文结果大致相同; 魏相峰等^[17]在不同抗性烟草品种感染 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 病菌后也发现抗病品种 PPO 活性高于感病品种, 并认为 PPO 活性的变化与品种抗病性表现呈正相关. 分析认为赤星病菌侵染能诱导烟草体内 PPO 活性升高, 促进大量积累酚类化合物, 而酚类化合物是细胞形成木质素的前提, 能促进细胞壁和组织的木质化以抵抗病原菌侵染, 另外酚类化合物还能形成醌, 醌的次生反应所产生黑色素的痂还阻止感染扩散^[18]. 感病品种 K326 中 PPO 活性与抗病品种 Beinhart1000-1 相差较大, 这可能是 K326 易感赤星病的原因之一.

很多植物病原真菌细胞壁的主要成分为葡聚糖和几丁质, 而植物体内 β -1,3 葡聚糖酶(GLU)、几丁质酶(CHO)能够降解病原菌细胞壁, 抵抗病原菌的侵染和抑制病原菌生长, 因此两种酶活性的提高是植物抗逆性增强的很好体现^[19-20]. 左豫虎等^[21]用不同抗性大豆接种疫霉菌后发现 GLU 和 CHO 活性均上升, 且抗病品种的酶活性高峰比感病品种出现时间早, 维持时间长, 并认为大豆对大豆疫霉根腐病的抗性与 GLU 和 CHO 的活性呈正相关. 本研究中, 3 种不同抗性烟草品种在接种赤星病菌后, 其叶片内 GLU 活性基本都高于对照值, 但 Beinhart1000-1 升高幅度明显大于云烟 87 和 K326; 对于 CHO, 云烟 87 在后期升高幅度较大, Beinhart1000-1 和 K326 两个品种 CHO 活性基本都接近对照, 变化很小. 这可能是因为在抗病品种 Beinhart1000-1 中, 病原菌侵入主要诱导 GLU 酶体系产生抗病反应, 而云烟 87 中主要诱导 CHO 酶体系产生抗病反应, 且两者在抗病反应中都有两个峰值, 这可能是由于在接种初期, 两种不同抗性烟草中的两种酶分别有效阻止了病原菌的入侵, 水解赤星病菌细胞壁, 抑制病菌生长, 同时酶解后病原菌的细胞壁破碎物又可作为激发子再次刺激植物产生抗病防卫反应, 导致酶活性又一次升高. 感病品种 K326 两种酶相对活性基本无变化, 与 Beinhart1000-1 和云烟 87 相比相差较大, 对赤星病菌抵抗能力差, 这可能是发病原因之一.

参考文献:

- [1] 张亚, 何可佳, 罗坤, 等. 烟草赤星病研究进展及对策 [J]. 陕西农业科学, 2007(2): 82-84.
- [2] 易龙. 烟草内生与附生细菌互作对赤星病的控病及机理研究 [D]. 重庆: 西南农业大学, 2004.
- [3] 蒋彩虹. 烟草赤星病抗性分子标记筛选 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [4] 宋瑞芳, 丁永乐, 宫长荣, 等. 烟草抗病性与防御酶活性间的关系研究进展 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(5): 309-314.
- [5] 杜秀敏, 殷文璇, 张慧, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(1): 48-50.
- [6] 奉斌, 代其林, 王劲. 非生物胁迫下植物体内活性氧清除酶系统的研究进展 [J]. 绵阳师范学院学报, 2009, 28(11): 50-53.
- [7] MONTALBINI P, BUONAURIO R. Effect of Tobacco Mosaic Virus Infection of Levels of Soluble Superoxide Dismutase (SOD) in *Nicotiana Tabacum* and *Nicotiana Glutinosa* Leaves [J]. *Plant Science*, 1986, 47(2): 135-143.
- [8] 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.
- [9] JOSEPH L M, KOON T T, MAN W S. Antifungal Effects of Hydrogen Peroxide and Peroxidase on Spore Germination and Mycelial Growth of *Pseudocercospora* Species [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1998, 76(12): 2119-2124.
- [10] 吴元华, 文才艺, 李浩戈, 等. 烟草感染马铃薯 Y 病毒脉坏死株系后六种酶活性变化的研究 [J]. 中国烟草学报, 1999, 5(2): 30-34.
- [11] 程水源, 陈昆松, 刘卫红, 等. 植物苯丙氨酸解氨酶基因的表达调控与研究展望 [J]. 果树学报, 2003, 20(5): 351-357.
- [12] 黄小贞, 赵德刚. 植物苯丙氨酸解氨酶表达调控机理的研究进展 [J]. 贵州农业科学, 2017, 45(4): 16-20.
- [13] 江昌俊, 余有本. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展 [J]. 安徽农业大学学报, 2001, 28(4): 425-430.
- [14] 陈学平, 姚忠达, 郭家明, 等. 不同烟草品种感染 TMV 病程过程中 CAT、PAL 活力变化研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(2): 103-107.
- [15] 刘学敏, 陈宇飞, 董长军. 烟草对赤星病菌的抗性与其防御酶活性的关系 [J]. 烟草科技, 2003, 186(1): 43-46.
- [16] 邹芳斌, 司龙亭, 李新, 等. 黄瓜枯萎病抗病性与防御系统几种酶活性关系的研究 [J]. 华北农学报, 2008, 23(3): 181-184.

- [17] 魏相峰, 汤会君. 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]. 检验检疫学报, 2006, 16(2): 17–19.
- [18] ZAWISTOWSKI J, BILIADERIS C G, ESKIN N A M. Polyphenol Oxidase [M] // Robinson D S, Skin NAME. Oxidative Enzymes in Foods. London: Elsevier Science Publishers, 1991.
- [19] 李春娟, 单世华, 许婷婷, 等. 几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2004, 15(5): 502–505.
- [20] 王廷璞, 马静静, 赵菲佚. β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶在农作物病虫害防治中的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(26): 14417–14419.
- [21] 左豫虎, 康振生, 杨传平, 等. β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性与大豆对疫霉根腐病抗性的关系 [J]. 植物病理学报, 2009, 39(6): 600–607.

Changes in Activities of Defensive Enzymes in the Leaves of Different Tobacco Varieties Infected by the Pathogen of Tobacco Brown Spot

GENG Li-na¹, LONG Yan-ling², XU Chen¹,
WANG Dai-bin¹, ZHAO Min¹, HU Jun-hua²

1. Chongqing Tobacco Science Research Institute, Chongqing 400715, China;

2. Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China

Abstract: In order to explore the resistance mechanism of tobacco varieties to tobacco brown spot, an experiment was conducted, in which three tobacco varieties (Yunyan87 and K326, and the resistant variety Beinhart1000) were infected with tobacco brown spot, and then the changes in activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), polyphenol oxidase (PPO), phenylalanine ammonia lyase (PAL), β -1,3 glucanase (GLU) and chitinase (CHT) in the leaves were monitored. The results showed that after the inoculation of tobacco brown spot, the activities of SOD, POD and PAL of Beinhart1000-1 increased rapidly and were significantly higher than those of the control but the activity of CAT in Beinhart1000-1 was lower than that of the control. The change in its GLU activity was significantly greater than that of the susceptible varieties. These results suggested that early rapid increase in enzyme activities might be used as a physiological indicator for selecting tobacco varieties resistant to tobacco brown spot.

Key words: tobacco brown spot; defensive enzyme; resistance protein

责任编辑 周仁惠