

周星洋, 张功营, 董丽红, 等. 青枯菌侵染不同抗病烟草品种的防御性酶活性及代谢组分差异分析[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(3): 73-81.

青枯菌侵染不同抗病烟草品种的防御性酶活性及代谢组分差异分析

周星洋, 张功营, 董丽红, 杨恩兰, 万树青

(华南农业大学 农学院/天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】为烟草抗病育种和抗性鉴定提供生化代谢指标。【方法】采用茎部注射法对抗病品种粤烟 97 和感病品种长脖黄接种青枯雷尔菌 *Ralstonia solanacearum*, 并采用比色法和 GC-MS 法分别进行相关防御性酶活性及代谢物质的测定。【结果】抗病品种粤烟 97 的 PAL、SOD、POD、PPO 活性, 接菌组与对照组均分别高于感病品种长脖黄的接菌组与对照组; 抗病品种粤烟 97 和感病品种长脖黄分别在接菌后第 7 天和第 5 天, PAL 活性高于对照组, 其余时间酶活性接菌组均低于对照组; 抗病品种粤烟 97 和感病品种长脖黄在受青枯雷尔菌侵染前期, SOD、POD、PPO 酶活性均提高, 随着时间延长酶活性均低于对照组。POD 和 PPO 同工酶凝胶电泳表明: 抗病品种粤烟 97 同工酶类型多于感病品种长脖黄; 接菌后第 3 天, 粤烟 97 的同工酶谱带宽度与色度增强, 而长脖黄无增强现象。说明抗病品种能快速应对外界刺激, 加速相关抗病物质的形成。代谢物检测表明: 抗病品种粤烟 97 接菌组中肌肉肌醇、烟碱、苹果酸、L-苏氨酸等物质的相对质量分数高于对照组, 而感病品种长脖黄接菌组中这些物质均低于对照组, 反映品种间抗青枯病能力的强弱可能与上述物质有关。【结论】烟草不同抗病品种叶片中 PAL、SOD、POD、PPO 酶活性的高低, 以及上述代谢物质含量的变化, 可作为反映烟草抗青枯病的生化指标。

关键词:烟草; 青枯雷尔菌; 防御性酶; 酶活性; 同工酶; 代谢组分
中图分类号:S432.42 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2016)03-0073-09

Differences of defensive enzyme activities and metabolites between resistant and susceptible tobacco cultivars infected by *Ralstonia solanacearum*

ZHOU Xingyang, ZHANG Gongying, DONG Lihong, YANG Enlan, WAN Shuqing
(College of Agriculture, South China Agricultural University/Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】In order to provide the biochemical and metabolic basis of tobacco breeding for disease resistance and resistance identification. 【Method】Resistant (Yueyan 97) and susceptible (Changbohuang) tobacco cultivars were inoculated with *Ralstonia solanacearum* by trunk injection. Defensive enzyme activities and metabolites were measured by using colorimetric method and GC-MS. 【Result】The activities of phenylalanine ammonia lyase (PAL), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) in the resistant cultivar ‘Yueyan 97’ were higher than those in the susceptible cultivar ‘Changbohuang’ with the same inoculation treatment. The PAL activities of

收稿日期:2015-09-24 优先出版时间:2016-04-15
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20160415.1555.026.html>
作者简介:周星洋(1989—),男,硕士研究生, E-mail: 569056710@qq.com; 通信作者:万树青(1953—),男,教授,博士, E-mail: wanshuqing@scau.edu.cn
基金项目:广东省烟草专卖局(公司)科技项目(粤烟[2009]17号)

Yueyan 97 and Changbohuang were higher than that in control on the seventh and fifth days after inoculation, respectively. The PAL activities of both cultivars were lower compared to control at any other time. For both cultivars, SOD, POD and PPO activities increased compared to control in the earlier days, but were lower compared to control during the later time period. The types of POD and PPO isozymes in the resistant cultivar ‘Yueyan 97’ were higher than those in the susceptible cultivar ‘Changbohuang’. The width and color of isozyme bands of Yueyan 97 were enhanced at 3 d after inoculation, while those of Changbohuang were not enhanced. It suggested that the resistant cultivar could quickly respond to external stimuli and accelerate the formation of defense-related substances. Detection of metabolites showed that the relative contents of some substances in Yueyan 97 such as myo-inositol, nicotine, malic acid, and *L*-threonine were higher compared to control, but in Changbohuang were lower compared to control, suggesting that cultivar differences in resistance against *R. solanacearum* might be related to these substances. 【Conclusion】 These four defensive enzyme activities and the contents of the above metabolites could be used as biochemical indexes for evaluating tobacco resistance against *R. solanacearum*.

Key words: tobacco; *Ralstonia solanacearum*; defensive enzyme; enzyme activity; isozyme; metabolite

烟草青枯病是一种由青枯雷尔菌 *Ralstonia solanacearum* 引起的系统性侵染病害, 现已成为世界各产烟区最主要的病害之一^[1]。该病在我国河南、山东、江苏、云南、广西、广东、福建等地普遍发生, 烟株一旦染病, 往往整株死亡, 其危害是毁灭性的, 给生产造成重大经济损失^[2]。因此, 研究青枯菌致病机理和寻找有效的防治青枯病的方法是当前植物病理学研究的重要课题之一, 其中抗病育种防治青枯病的生化机制最为重要。国内外学者对大量的相关病害进行研究, 发现植物在受病害侵袭过程中表现出一系列复杂的生理生化变化, 包括体内代谢的变化、细胞内活性氧的积累与清除、抗病信号的产生与转导、防卫反应的表达与调控等^[3-4]。在这一复杂过程中, 一些与植物抗病性相关的酶类起着很重要的调控作用^[5-6], 如苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonium lyase, PAL)、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶 (Peroxidase, POD) 和多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase, PPO) 等。同工酶谱分析作为一种认识基因存在和表达的工具已被大量运用于种质分类与种间遗传差异分析^[7-9], 其规律性变化可以作为一种早期的鉴别手段, 用来研究植物的抗病性问题。因此, 笔者选择了 2 个不同抗性的烟草品种, 进行青枯病菌的接种试验, 在接菌后不同时段及时采样, 测定与病程相关的防御性酶活性以及代谢组分, 从而了解烟草抗、感青枯病的变化过程, 旨在烟草抗青枯病育种提供生化方面的依据。

<http://xuebao.scau.edu.cn>

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用烟草品种: 高度感病品种长脖黄及高度抗病品种粤烟 97, 均由广东南雄烟草科学研究所提供; 烟草青枯雷尔菌由广东省农科院何自福研究员惠赠; 病菌的保存与增殖参照匡传富等^[10]的方法。

仪器: LRH 型生化培养箱 (广东省韶关市鑫腾科普有限公司); FC-18R 台式高速冷冻离心机 (厦门仪达仪器有限公司); DYCZ-24DN 型垂直电泳槽 (北京六一仪器厂); DYY 11B 三恒电泳仪 (北京六一仪器厂); 10 μ L 微量进样器 (德国 Eppendorf AG); UV-8500PC 型紫外-可见分光光度计 (上海天美科学仪器有限公司); 1702-MP8 型电子天平 (德国 Startorius 公司); 岛津 GC-MS Q2010 Ultra (日本 Shimadzu 公司)。

1.2 试验方法

选取长势一致、3~4 叶龄的健康烟草植株供试, 将其移栽至装有灭菌土的 18 cm $\times$ 23 cm 的塑料盆中, 每个处理为 5 株, 设置 3 个重复, 放置于室外环境下。待烟苗生长 7 d 后, 接菌组参照黎定军等^[11]茎部注射法, 用注射器将 1 mL 青枯雷尔菌液 (5×10^8 cfu $\cdot$ mL⁻¹) 从叶腋处注入烟茎基部的维管束里, 并在接菌处注意保湿, 对照组为清水处理的烟苗。分别在处理 1、3、5、7、9、11 d 后, 取同一叶位处的烟叶进行相关生化指标的测定, 其中代谢组分差异分析选择接菌后的第 3 天进行。

1.2.1 防御性酶活性测定 PAL 的提取及活性测定参照薛应龙等^[12]方法; SOD 的提取与测定参照邹

琦^[13] 163-165 的方法;POD 的提取与测定参照张志良^[14] 的方法;PPO 的提取与活性测定参照李靖等^[15] 的方法。PAL 以每分钟 $D_{290\text{ nm}}$ 变化 0.01 所需要的酶量定义为 1 个酶活性单位(U);POD 和 PPO 分别以每分钟 $D_{470\text{ nm}}$ 、 $D_{410\text{ nm}}$ 变化 1.00 所需要的酶量定义为 1 个酶活性单位(U);SOD 以每分钟 $D_{560\text{ nm}}$ 抑制 50 % 所需要的酶量定义为 1 个酶活性单位(U)。

1.2.2 POD 和 PPO 同工酶电泳 酶液制备:取 0.1 g 样品,加入 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预冷的 Tris-HCl (pH 6.8) 缓冲液 1.5 mL,冰浴研磨,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 15 min,取上清液,于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

电泳:采用不连续的聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳技术^[13] 131-135,上样缓冲液不加 SDS 和 β -巯基乙醇,电极缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-Gly 缓冲液,样品不经加热处理。同工酶电泳采用聚丙烯酰胺为 7.5% 的分离胶、4% 的浓缩胶。样品上样量为 10 μL [$V(\text{样品缓冲液}):V(\text{粗酶液})=1:1$],于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下电泳,浓缩胶 80 V、电泳 30 min,分离胶 120 V、电泳 1.5 h。以溴酚蓝作指示剂,电泳结束后,取下胶进行染色。

POD 同工酶染色:称取 0.1 g 联苯胺,加少量无水乙醇溶解,依次加入 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的醋酸溶液 10 mL, $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的醋酸钠溶液 10 mL,水 70 mL,最后加入 3~5 滴质量分数为 30% 的过氧化氢溶液。将凝胶电泳胶带放入装有染色液的塑料小盆中,并轻轻晃动,待条带清晰后,立即用相机拍照记录。

PPO 同工酶染色:3 份质量分数为 1% 邻苯二酚溶液,1 份 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH6.8),1 份质量分数为 0.06% 对苯二胺溶液,混合均匀后,将胶带放入染色液中 3~5 min,即可见到棕红色的多酚氧化酶酶带。

1.2.3 代谢组分差异分析 烟草样品前处理方法:参考 Tikunov 等^[16] 和 Roessner 等^[17] 建立的方法。

气相色谱条件:进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$ 。升温程序:初始温度 50 $^{\circ}\text{C}$,保持 1 min,以 $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温速度升到 150 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min,最后以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温速度升到 250 $^{\circ}\text{C}$,保持 10 min。以高纯氦气(体积分数大于 99.999%)为载气采用不分流进样方式,进样量 1 μL ,载气流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

质谱条件:电子轰击源(EI),离子源温度 200 $^{\circ}\text{C}$,四极杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$,接口温度 250 $^{\circ}\text{C}$,电子能量 70 eV,溶剂延迟时间 4 min;调谐方式为标准调谐,质谱扫描方式为全扫描,扫描范围为 50~500 aum 。使用 NIST 2011 谱库进行图谱检索。

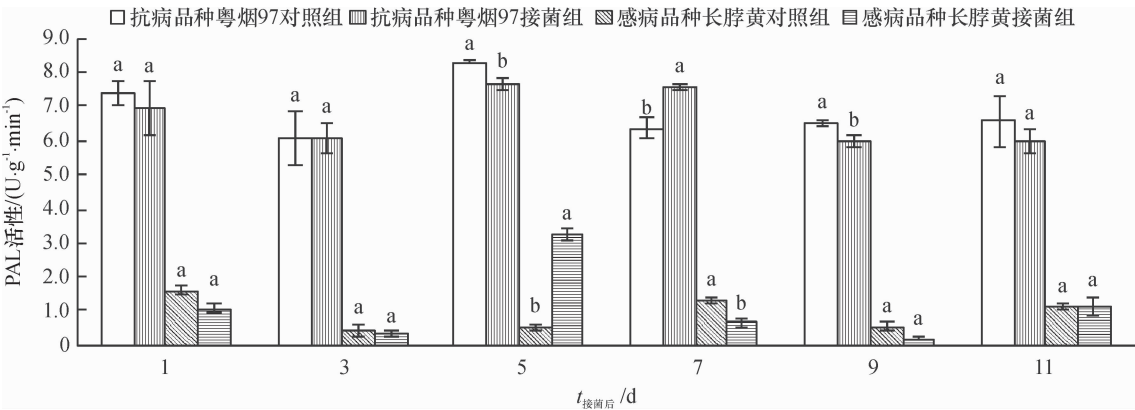
1.3 数据分析

试验数据采用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS11.5 数据处理软件进行数据统计分析,酶活性数值均为平均值 $\pm$ 标准差。应用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 几种防御性酶活性变化

2.1.1 PAL 活性变化 从图 1 可知,抗病品种粤烟 97 的 PAL 活性在整个测定时期,接菌组与对照组均高于感病品种长脖黄。抗病品种粤烟 97 在接菌后第 7 天酶活性显著高于对照组 ($P<0.05$),其余时间酶活性均低于对照组;感病品种长脖黄在接菌后第 5 天, PAL 活性显著高于对照组 ($P<0.05$),其余时间酶活性均低于对照组。



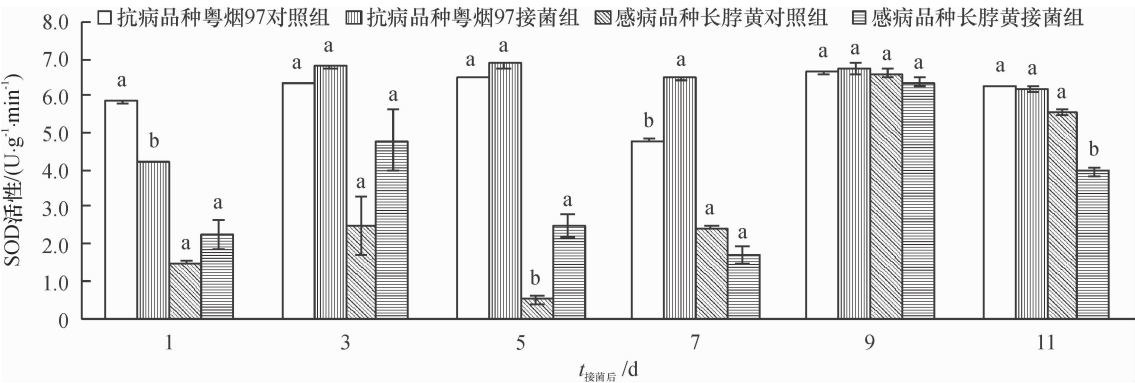
相同时间同一烟草品种不同柱子上方凡是有有一个相同小写字母者,表示该品种对照组和接菌组间差异不显著 ($P>0.05$, Duncan's 法)。

图1 不同抗病烟草品种接种青枯雷尔菌后叶片 PAL 活性(以鲜质量计)的变化

Fig.1 Changes of PAL activities (based on fresh mass) in leaves of resistant and susceptible tobacco cultivars after inoculation of *Ralstonia solanacearum*

2.1.2 SOD 活性变化 从图 2 可知,抗病品种粤烟 97 的 SOD 活性在整个测定时期,接菌组与对照组均高于感病品种长脖黄。抗病品种粤烟 97 在接菌后第 3、5、7、9 天,SOD 活性均高于对照组,其中第 7 天差异显著 ($P < 0.05$);感病品种长脖黄在接菌后第

1、3、5 天,SOD 活性均高于对照组,其中第 5 天差异显著 ($P < 0.05$)。由此得知,抗、感品种在受到青枯菌侵害后,均能使 SOD 迅速被激活,从而起到清除或阻止病原菌所造成伤害的作用。

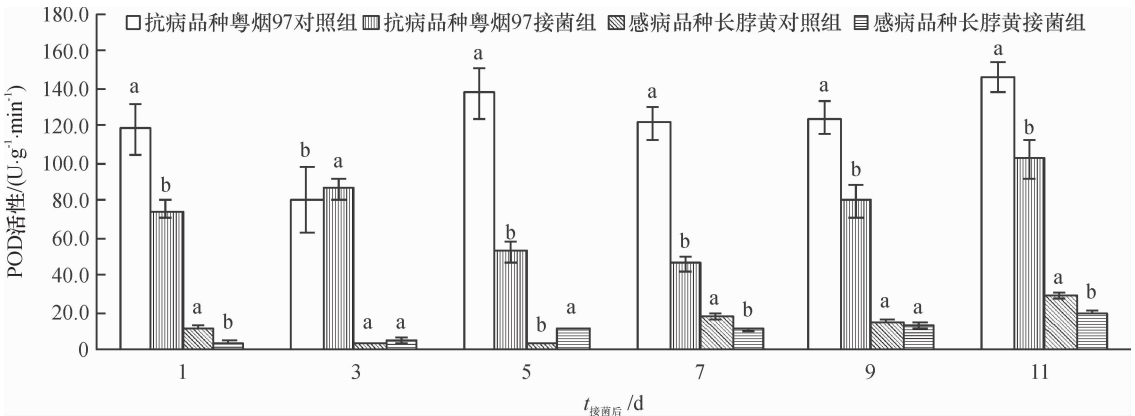


相同时间同一烟草品种不同柱子上方凡是有个相同小写字母者,表示该品种对照组和接菌组间差异不显著 ($P > 0.05$, Duncan's 法)。
图 2 不同抗病烟草品种接种青枯雷尔菌后 SOD 活性(以鲜质量计)的变化

Fig. 2 Changes of SOD activities (based on fresh mass) in leaves of resistant and susceptible tobacco cultivars after inoculation of *Ralstonia solanacearum*

2.1.3 POD 活性变化 从图 3 可知,抗病品种粤烟 97 的 POD 活性在整个测定时期,接菌组与对照组均高于感病品种长脖黄。抗病品种粤烟 97 在接菌后第 3 天,酶活性显著高于对照组 ($P < 0.05$),其余时

间酶活性均显著低于对照组 ($P < 0.05$);感病品种长脖黄在接菌后第 3、5 天,酶活性高于对照组,其中第 5 天差异显著 ($P < 0.05$),其余时间 POD 活性均低于对照组。



相同时间同一烟草品种不同柱子上方凡是有个相同小写字母者,表示该品种对照组和接菌组间差异不显著 ($P > 0.05$, Duncan's 法)。
图 3 不同抗病烟草品种接种青枯雷尔菌后 POD 活性(以鲜质量计)的变化

Fig. 3 Changes of POD activities (based on fresh mass) in leaves of resistant and susceptible tobacco cultivars after inoculation of *Ralstonia solanacearum*

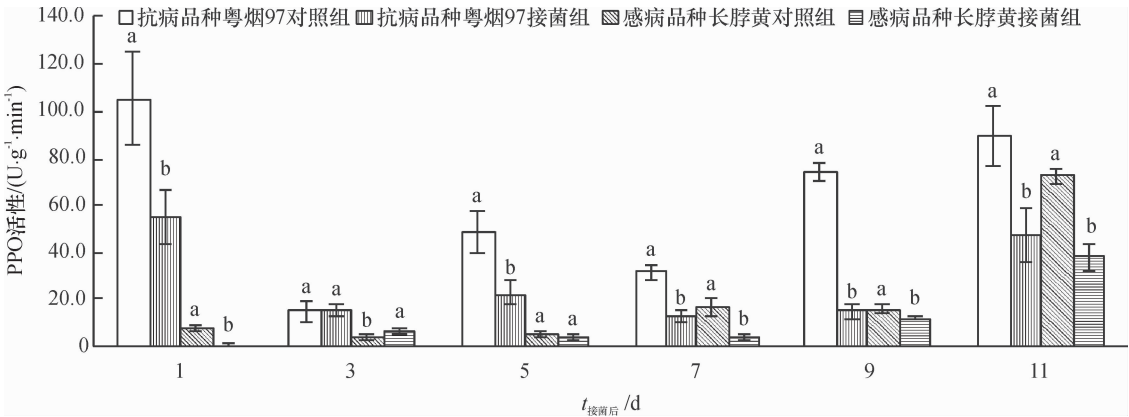
2.1.4 PPO 活性变化 从图 4 可知,抗病品种粤烟 97 对照组、接菌组的 PPO 活性均高于感病品种长脖黄的。接菌后第 3 天,粤烟 97 和长脖黄的 PPO 活性略高于各自的对照组,其余时间均低于各自的对照组。

2.2 接菌处理对不同品种烟草叶片中 POD 和 PPO 同工酶表达的影响

2.2.1 对 POD 同工酶的影响 从图 5A 可看出,抗病品种粤烟 97 接菌后,整个测定期间 POD 同工酶谱

带未增加,但凝胶电泳谱带宽度与色度均发生变化。接菌后第 3 天,接菌组的同工酶谱带较对照组谱带宽,且颜色较深;接菌后第 1、11 天,接菌组 POD 同工酶谱带色度比对照组弱;接菌后第 5 天,接菌组 POD 同工酶谱带条数比对照组少,且部分条带颜色较浅;接菌后第 7、9 天,接菌组与对照组 POD 同工酶谱带无明显差异。从图 5B 可看出,感病品种长脖黄在接菌后第 1、5、7、9 天,接菌组 POD 同工酶谱带颜色均比对照组颜色浅;接菌后第 3、11 天,同工

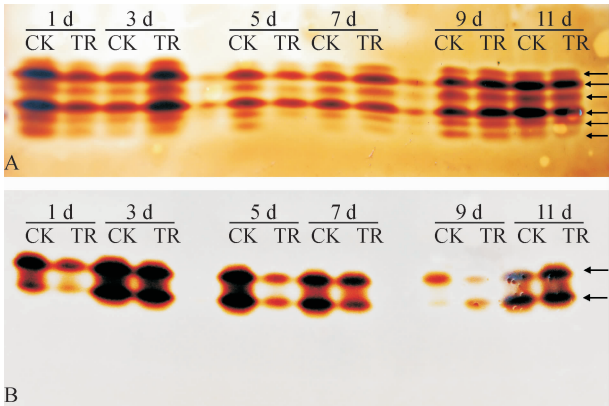
酶谱带宽度和颜色与对照基本无差别。对比图 5 A、图 5 B 可知,抗病品种粤烟 97 的 POD 同工酶谱带为 6 条,感病品种长脖黄的 POD 同工酶谱带为 2 条,说明抗病品种粤烟 97 的 POD 同工酶类型多于感病品种长脖黄的 POD 同工酶类型。



相同时间同一烟草品种不同柱子上方凡是有一个相同小写字母者,表示该品种对照组和接菌组间差异不显著 ($P>0.05$, Duncan's 法)。

图 4 不同抗病烟草品种接种青枯雷尔菌后 PPO 活性(以鲜质量计)的变化

Fig. 4 Changes of PPO activities (based on fresh mass) in leaves of resistant and susceptible tobacco cultivars after inoculation of *Ralstonia solanacearum*

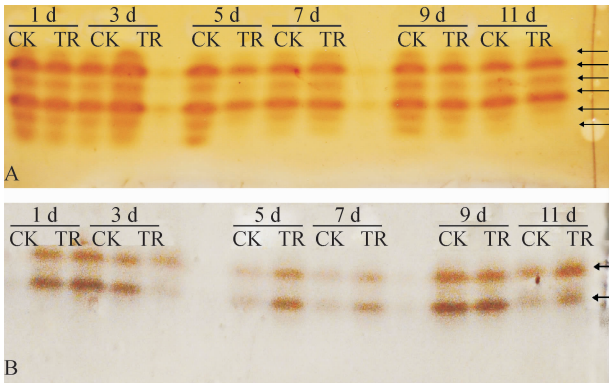


CK:对照组,TR:接菌组;A:抗病品种粤烟 97,B:感病品种长脖黄。
图 5 不同抗病烟草品种接种青枯雷尔菌后叶片 POD 同工酶谱带

Fig. 5 Electrophoretic isoenzyme patterns of POD in leaves of resistant and susceptible tobacco cultivars after inoculation of *Ralstonia solanacearum*

2.2.2 对 PPO 同工酶的影响 从图 6A 可以看出,抗病品种粤烟 97 接菌后第 1、7 天,接菌组与对照组的 PPO 同工酶谱带无明显差异;接菌后第 3 天,PPO 同工酶谱带宽度与色度均高于对照组;接菌后第 5 天,PPO 同工酶谱条带数与色度均低于对照组;接菌后第 9、11 天,部分 PPO 同工酶谱带色度略低于对照组。从图 6B 可以看出,感病品种长脖黄接菌后第 1、9、11 天,PPO 同工酶谱带条数、色度与对照组无明显差异;接菌后第 3 天,PPO 同工酶谱带色度均低于对照组;接菌后第 5 和 7 天,PPO 同工酶谱带色度略高于对照组。对比图 6 A、图 6 B 可知,抗病品种粤烟 97 的 PPO 同工酶谱带最多为 6 条,最少为 4

条,感病品种长脖黄的 POD 同工酶谱带为 2 条,说明抗病品种粤烟 97 的 PPO 同工酶类型多于感病品种长脖黄的 PPO 同工酶类型。



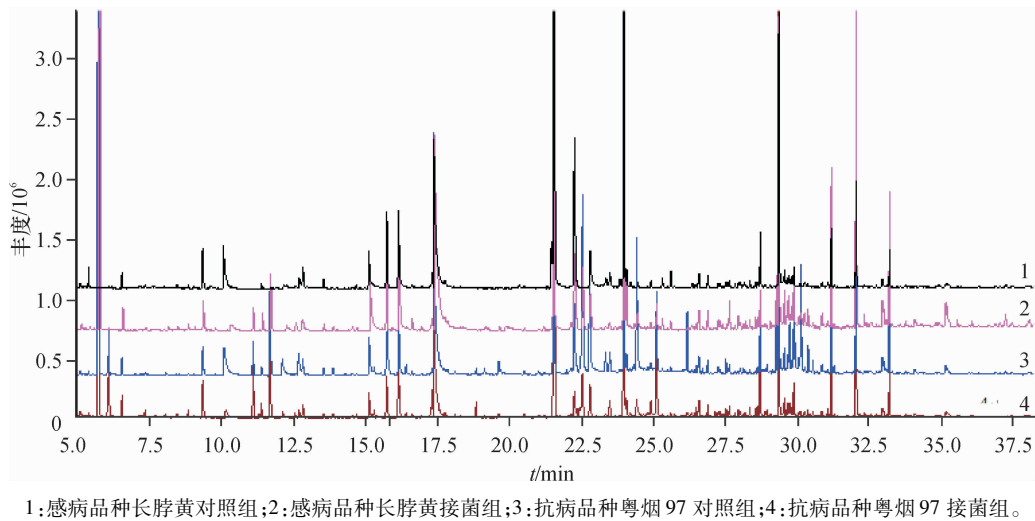
CK:对照组,TR:接菌组;A:抗病品种粤烟 97, B:感病品种长脖黄。
图 6 不同抗病烟草品种接种青枯雷尔菌后叶片 PPO 同工酶谱带

Fig. 6 Electrophoretic isoenzyme patterns of PPO in leaves of resistant and susceptible tobacco cultivars after inoculation of *Ralstonia solanacearum*

2.3 代谢组分差异分析

对不同抗病品种接菌处理后叶片提取物进行 GC-MS 测定,得到总离子流图(图 7)。从图 7 可以直观地看出不同抗病品种间存在明显差异,接菌组与对照组间,峰的数量和强度也都存在差异。

通过岛津质谱工作站对总离子流图的处理分析,峰面积归一化法测量了各组分的百分含量。通过检索和解析初步分离最多确定了 70 个化合物。鉴定的各组分及相对质量分数见表 1。



1:感病品种长脖黄对照组;2:感病品种长脖黄接菌组;3:抗病品种粤烟 97 对照组;4:抗病品种粤烟 97 接菌组。

图 7 不同抗病烟草品种接种青枯雷尔菌后代组组分的 GS-MS 总离子流图

Fig. 7 Total ion chromatograms of metabolites of resistant and susceptible tobacco cultivars after inoculation of *Ralstonia solanacearum*

表 1 不同抗病烟草品种接种青枯雷尔菌后品种间代谢物差异比较¹⁾

Tab. 1 Comparison of metabolites from resistant and susceptible tobacco cultivars after inoculation of *Ralstonia solanacearum*

序号	$t_{\text{保留}}/\text{min}$	代谢物名称	相对质量分数/%			
			长脖黄对照组	长脖黄接菌组	粤烟 97 对照组	粤烟 97 接菌组
1	7.362	硼酸	...	...	...	0.06
2	9.377	乳酸	0.58	0.37	0.42	0.61
3	10.108	L-缬氨酸	...	0.65	...	0.27
4	11.725	草酸	1.03	1.27	0.48	0.89
5	12.118	L-亮氨酸	...	0.26	...	...
6	12.691	L-异亮氨酸	...	0.41	...	0.19
7	13.571	丙二酸	...	0.09	...	0.17
8	13.892	L-正缬氨酸	...	0.08	...	...
9	15.173	丝氨酸	1.15	0.68	0.84	2.86
10	15.308	2-氨基乙醇	...	0.10	...	...
11	15.756	甘油	1.03	...	...	...
12	15.772	磷酸	...	0.97	2.51	3.66
13	16.196	L-苏氨酸	1.39	0.79	0.73	2.63
14	16.432	甘氨酸	...	0.12	0.16	...
15	16.639	丁二酸	0.17	0.04	...	0.07
16	17.330	甘油酸	0.16	0.05	0.71	1.41
17	17.421	烟碱	6.93	5.38	1.88	4.07
18	17.775	壬酸	...	...	...	0.07
19	19.153	L-甲硫氨酸	...	0.08	...	...
20	19.645	L-天冬氨酸	...	0.14	0.19	0.36
21	21.455	2-嘧啶羧酸	...	...	...	0.36
22	21.568	苹果酸	8.61	4.29	4.16	9.79
23	22.288	L-吡咯烷酮-5-羧酸	1.97	1.17	0.70	4.56
24	22.360	赤藓糖醇	...	0.08	...	0.12
25	22.539	4-氨基丁酸	...	...	1.63	...
26	22.833	L-苯丙氨酸	0.91	2.01	...	0.88
27	23.358	4-羟基苯乙胺	...	0.32	...	...
28	23.504	十二烷醇	...	0.32	...	...
29	23.992	L-蔗糖酸	1.94	0.77	3.14	16.67

续表1 Tab.1 continued

序号	保留时间/min	代谢物名称	相对质量分数/%			
			长脖黄对照组	长脖黄接菌组	粤烟97对照组	粤烟97接菌组
30	24.223	正十六烷	…	…	…	0.10
31	24.432	戊酸	…	…	1.91	1.52
32	25.137	L-谷氨酸	0.39	1.09	0.84	0.72
33	26.190	L-天冬酰胺	…	0.63	1.74	0.24
34	26.567	碘十六烷	0.10	…	…	…
35	26.618	D-来苏糖	1.94	0.18	0.11	0.13
36	26.918	核糖醇	0.25	0.15	0.10	0.19
37	27.276	D-鼠李糖	0.10	0.07	…	0.09
38	27.334	木糖醇	…	…	…	0.16
39	27.540	十四烷醇	…	0.16	…	0.10
40	27.608	L-阿拉伯糖	…	0.06	0.10	0.14
41	27.669	D-赤藓糖	0.39	0.08	0.35	0.27
42	27.848	核糖酸	…	…	…	0.12
43	28.145	D-葡萄糖醇	…	0.09	…	…
44	28.567	莽草酸	0.15	…	0.07	0.08
45	28.634	酒石酸	0.16	0.06	…	…
46	28.730	柠檬酸	0.48	0.48	0.16	0.36
47	28.965	N-乙酰-L-赖氨酸	…	0.06	…	…
48	29.157	腺嘌呤	…	0.05	…	…
49	29.578	β-D-果糖	0.55	0.36	1.57	2.02
50	29.653	阿拉伯糖醇	0.17	0.08	…	…
51	29.714	α-D-果糖	0.36	0.19	1.08	1.40
52	29.826	D-甘露糖	…	…	0.17	0.32
53	29.832	鲨肌醇	0.26	0.15	…	…
54	29.906	D-(+)-塔罗糖	0.68	0.58	1.84	2.65
55	29.952	L-赖氨酸	…	0.31	0.21	…
56	30.120	阿洛糖	0.13	…	0.27	0.48
57	30.160	L-酪氨酸	0.12	1.12	0.26	…
58	30.391	D-甘露醇	0.26	0.09	0.62	0.27
59	30.874	D-木糖	…	0.07	…	0.42
60	30.978	顺式-9-十六碳烯酸	…	…	…	0.04
61	31.204	棕榈酸	1.89	1.05	0.48	0.73
62	31.229	D-葡萄糖酸	…	0.08	…	…
63	32.069	肌肉肌醇	10.11	0.99	11.90	22.17
64	32.353	D-半乳糖	0.11	…	…	0.21
65	32.981	五羟基己醛	0.38	…	0.12	…
66	33.033	色氨酸	…	0.11	…	…
67	33.226	硬脂酸	1.65	0.72	0.36	0.45
68	35.185	D-甘露糖酸	0.46	0.08	…	0.10
69	35.242	D-甘油-D-古洛糖-庚酸	0.40	…	…	…
70	37.256	D-纤维二糖	0.17	…	…	…

1) 长脖黄为感病品种,粤烟97为抗病品种;“…”表示未检测到。

从表1可以看出烟株被青枯雷尔菌侵染后代谢物差异较为明显,粤烟97接菌后烟叶样本中代谢物相对质量分数高于其对照组,且长脖黄接菌后相对质量分数低于其对照组的是乳酸、甘油酸、肌肉肌醇、L-苏糖酸、苹果酸、L-吡咯烷酮-5-羧酸、烟碱、丝氨酸、L-苏氨酸、D-来苏糖、核糖醇、β-D-果糖、D-(+)-塔罗糖、棕榈酸、硬脂酸,说明烟草抗青枯病能力的强弱可能与这些物质有关,或者与参与形成上

述代谢物的酶活性有关;2 个不同抗病品种接菌后共同产生或者相对质量分数比对照增高的物质分别为:*L*-缬氨酸、草酸、*L*-异亮氨酸、丙二酸、磷酸、*L*-天冬氨酸、赤藓糖醇、*L*-苯丙氨酸、十四烷醇、*L*-阿拉伯糖、*D*-木糖,不同抗病品种烟草在受到青枯雷尔菌侵袭时均会刺激体内代谢物含量的改变,其含量的增高说明上述代谢物可能参与抗病相关物质的形成。

3 讨论与结论

与植物抗病相关的 PAL、SOD、PPO 和 POD 均属于植物防卫系统相关酶,因此可作为植物抗病的生化指标。在植物体内,PAL 是苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶,催化 *L*-苯丙氨酸解氨生成反式肉桂酸(合成各种酚类及木质素的前体物质),因而调控与植物抗病有关的酚类物质和木质素在植物体内的合成和积累^[18]。研究表明,PAL 活性与植物抗病性呈正相关^[15, 19]。本研究中,在整个测定期间,抗病品种粤烟 97 的 PAL 活性均高于感病品种长脖黄,说明烟草品种抗病强弱,与体内 PAL 活性呈正相关。SOD 作为植物体内活性氧清除系统重要保护酶之一,能清除超氧化物阴离子自由基,提高植物抗逆性^[20]。本研究表明,抗病品种粤烟 97 在接菌后第 3、5、7、9 天,SOD 活性均大于对照,感病品种长脖黄在接菌后第 1、3、5 天,SOD 活性均高于对照,抗病品种 SOD 活性在接菌组与对照组中均高于感病品种,说明在青枯雷尔菌侵染后抗病品种可高效地清除活性氧的伤害,感病品种由于本身 SOD 活性低,接菌后酶活性增长幅度较小而使其受到伤害。POD 是一种应激酶,其活性与植物抗病性有着密切的关系,在活性氧的清除和维持植物体内活性氧的正常水平中起作用;POD 还能催化木质素合成,木质化的细胞壁机械性能加强,不透水气,阻止营养物质、水分、色素等的扩散,使病原菌无法获得营养而死亡^[21-22]。研究表明,POD 活性与植物的抗病性具有正相关关系^[23-26]。PPO 是一类广泛分布于植物体内的质体金属酶,能直接以 O_2 为氧化底物将酚氧化成醌,从而抑制病虫害的侵袭。PPO 不仅参与酚类物质的氧化,同时也参与木质素的形成^[27]。本研究发现抗病品种粤烟 97 的 POD 活性高于感病品种长脖黄,且 POD 同工酶谱分析表明,抗病品种粤烟 97 的谱带条数均要多于感病品种长脖黄。接菌后抗病品种的 POD 活性迅速升高,而感病品种则较弱,2 品种的 POD 活性随着时间延长均降低,说明青枯雷尔菌侵染烟草后均能刺激体内 POD 活性的提高,且抗病品种总体强于感病品种。抗病品种粤烟 97 和感病品种长脖黄接菌后第 3 天,PPO 活性略高于对照组,随

着时间延长酶活性均降低。抗病品种粤烟 97 中 PPO 活性高于感病品种长脖黄,可能与其抗病性强有关。

烟草植株受到病菌侵染时,引起相关酶活性的改变,继而引起植株体内代谢物质的改变,形成的代谢物本身具有抗病作用或者进一步通过转化形成与抗病有关的次级代谢物。例如 PAL 酶活性高低会影响 *L*-苯丙氨酸含量^[28],POD 酶活性影响某些糖类、氨基酸类等与木质素合成有关物质的含量^[29]。本研究发现,粤烟 97 与长脖黄在接菌处理 3 d 时,SOD、POD、PPO 活性均比对照高,而 PAL 活性均低于对照组,因此植株体内相关酶催化形成的物质应该有所提高,或者酶促反应的底物应该有所降低。代谢物检测表明,2 个抗病性不同的品种接菌后共同产生或者相对质量分数比对照增高的物质分别为:*L*-缬氨酸、草酸、*L*-异亮氨酸、丙二酸、磷酸、*L*-天冬氨酸、赤藓糖醇、*L*-苯丙氨酸、十四烷醇、*L*-阿拉伯糖、*D*-木糖,说明此类代谢物含量的变化可能与防御性酶活性有关;粤烟 97 接菌后烟叶样本中代谢物相对质量分数高于其对照组,但长脖黄接菌后相对质量分数低于其对照组的物质分别为:乳酸、甘油酸、肌肉肌醇、*L*-蔗糖酸、苹果酸、*L*-吡咯烷酮-5-羧酸、烟碱、丝氨酸、*L*-苏氨酸、*D*-来苏糖、核糖醇、 β -*D*-果糖、*D*-(+)-塔罗糖、棕榈酸、硬脂酸,说明此类代谢物含量的变化与防御性酶活性变化无关,可能与其他酶活性变化有关。研究表明,肌醇在植物体内通过自身氧化途径可以代谢为与植物细胞壁合成息息相关的多糖,从而提高植物抗病性^[30]。烟碱作为一种防御性物质,在烟草受到病虫害侵袭时会刺激体内产生大量烟碱^[31],此外,相关研究表明,在细胞质中苹果酸酶催化苹果酸脱羧形成的丙酮酸参与莽草酸途径,进一步形成丙酮酸族氨基酸和一些与防御反应有关的次生代谢物质^[32]。*L*-蔗糖酸作为 *L*-抗坏血酸的一种降解产物,广泛存在于植物体内,其含量的增加,说明抗坏血酸积极参与抗氧化作用,保护机体免于自由基的威胁^[33]。不同烟草品种抗青枯病的机理,不仅与其体内防御性酶活性有关,可能还与某些代谢物或与其相关的酶活性变化有关。

参考文献:

- [1] HAYWARD A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1991, 29: 65-87.
- [2] 刘雅婷,张世光. 烟草青枯病的研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2001, 16(1): 72-76.
- [3] 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.

- [4] WALTERS D, WALSH D, NEWTON A, et al. Induced resistance for plant disease control: Maximizing the efficacy of resistance elicitors[J]. *Phytopathology*, 2005, 95(12): 1368-1373.
- [5] NANDAKUMAR R, BABU S, VISWANATHAN R, et al. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Soil Biol Biochem*, 2001, 33(4/5): 603-612.
- [6] JUNG W J, JIN Y L, KIM Y C, et al. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici* [J]. *Biol Control*, 2004, 30(3): 645-652.
- [7] TORRES A M, SATOVIC Z, CANOVAS J, et al. Genetics and mapping of new isozyme loci in *Vicia faba* L. using trisomics[J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91(5): 783-789.
- [8] WARNKE S E, DOUCHES D S, BRANHAM B E. Isozyme analysis supports allotetraploid inheritance in tetraploid creeping bluegrass (*Agrostis palustris* Huds.) [J]. *Crop Sci*, 1998, 38(3): 801-805.
- [9] HUANG H, LAYNE D R, PETERSON R N. Using isozyme polymorphisms for identifying and assessing genetic variation in cultivated pawpaw (*Asimina triloba* (L.) Dunal)[J]. *J Am Soc Hortic Sci*, 1997, 122(4): 504-511.
- [10] 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.
- [11] 黎定军,周清明. 烟草品种(系)对青枯病菌的抗性鉴定与分析[J]. 湖南农业大学学报, 1996, 22(3): 275-277.
- [12] 薛应龙,欧阳光察,澳绍根. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究: IV: 水稻幼苗中 PAL 活性的动态变化[J]. 植物生理学报, 1983, 9(3): 301-306.
- [13] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [14] 张志良. 植物生理学试验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 268-271.
- [15] 李靖,利容千,袁文静. 黄瓜感染霜霉病菌叶片中一些酶活性的变化[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 39-45.
- [16] TIKUNOV Y, LOMMEN A, DE VOS C R, et al. A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles[J]. *Plant Physiol*, 2005, 139(3): 1125-1137.
- [17] ROESSNER U, WAGNER C, KOPKA J, et al. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Plant J*, 2000, 23(1): 131-142.
- [18] ADAMKOVA S, LUHOVA L, PETRIVALSKY M, et al. Characterization of enzyme phenylalanine ammonia-lyase and its role in activation of defensive mechanisms in plants [J]. *Chem Listy*, 2006, 100(7): 486-494.
- [19] 寿森炎,冯壮志,殷一平,等. 番茄抗感青枯病品种的生理生化差异[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2005, 31(5): 550-554.
- [20] 刘家忠,龚明. 植物抗氧化系统研究进展[J]. 云南师范大学学报(自然科学版), 1999, 19(6): 1-11.
- [21] 胡青平,徐建国,薄芳芳,等. 烟草感染青枯菌前后 POD 及同工酶的变化[J]. 中国农学通报, 2007, 23(6): 497-500.
- [22] 宋凤鸣,郑重,葛秀春. 活性氧及膜脂过氧化在植物-病原物互作中的作用[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(5): 377-385.
- [23] 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]. *Can J Bot*, 1998, 76(12): 2119-2124.
- [24] PATEL S J, SUBRAMANIAN R B, JHA Y S. Biochemical and molecular studies of early blight disease in tomato [J]. *Phytoparasitica*, 2011, 39(3): 269-283.
- [25] YUBEDEE A G. Role of polyphenol oxidase, peroxidase and total phenol content in differential resistance of *Dioscorea* species to *Fusarium moniliforme* [J]. *Indian J Agr Sci*, 1998, 68(10): 644-646.
- [26] GULSEN O, EICKHOFF T, HENG-MOSS T, et al. Characterization of peroxidase changes in resistant and susceptible warm-season turfgrasses challenged by *Blissus occiduus* [J]. *Arthropod-Plant Inte*, 2010, 4(1): 45-55.
- [27] 张树生,胡蕾,刘忠良,等. 植物体内抗病相关酶与植物抗病性的关系[J]. 安徽农学通报, 2006, 12(13): 48-49.
- [28] 崔彦玲,张环. 番茄叶霉病抗性与苯丙氨酸解氨酶的相关性[J]. 华北农学报, 2003, 18(1): 79-82.
- [29] 蒋选利,李振岐,康振生. 过氧化物酶与植物抗病性研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2001, 29(6): 124-129.
- [30] 张梦,谢益民,杨海涛,等. 肌醇在植物体内的代谢概述: 肌醇作为细胞壁木聚糖和果胶前驱物的代谢途径[J]. 林产化学与工业, 2013, 33(5): 106-114.
- [31] 沈嘉,程新胜. 植物抗虫性物质烟碱的研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(5): 459-464.
- [32] 宋超,张立军,贾永光,等. 植物的苹果酸代谢和转运[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(5): 419-428.
- [33] DEBOLT S, MELINO V, FORD C M. Ascorbate as a biosynthetic precursor in plants [J]. *Ann Bot-London*, 2007, 99(1): 3-8.

【责任编辑 柴 焰,庄 延】