

-氨基丁酸诱导辣椒产生 PR 蛋白及其酶活性的变化

李惠霞^{1,2} 谢丙炎^{1*} 冯兰香¹

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ² 甘肃农业大学草业学院植物病理系, 甘肃兰州 730070)

摘要: 经 $1\,000\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ -氨基丁酸 (-aminobutyric acid, BABA) 诱导处理后, 3个辣(甜)椒品种叶片细胞间液的蛋白质电泳分析表明, 寄主植物经 BABA 处理 3 d 后病程相关蛋白 (PR) 被诱导产生。对叶片中 -1,3-葡聚糖酶、几丁质酶和过氧化物酶活性动态测定表明, 升高幅度辣椒品种高于甜椒品种。

关键词: 辣椒; -氨基丁酸; PR 蛋白; 酶活性

中图分类号: S 641.3 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 06-1335-03

Accumulation of Pathogenesis-related Proteins and Their Activities of Pepper Plants Induced by -aminobutyric Acid

Li Huixia^{1,2}, Xie Bingyan^{1*}, and Feng Lanxiang¹

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² Department of Plant Pathology, Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Pathogenesis-related (PR) proteins in the intercellular fluids of three pepper cultivars leaves were induced after treatments with $1\,000\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ -aminobutyric acid (BABA). The results of enzymic assays showed that activities of -1,3-glucanases, chitinases and POD were heightened in hot peppers more than that in sweat peppers

Key words: Pepper; -aminobutyric acid; PR protein; Enzymes activity

1 目的、材料与方法

-氨基丁酸 (-aminobutyric acid, BABA) 是一种由番茄根系分泌的非蛋白氨基酸^[1]。已有研究发现 BABA 可诱导番茄、马铃薯、棉花、花生、西甜瓜、花椰菜、向日葵等作物对卵菌或真菌病害的系统获得抗性 (SAR)^[2]。Sunwoo 等^[3]和谢丙炎等^[4]分别就 BABA 对辣椒和甜椒抗病性的诱导作用进行报道。病程相关蛋白 (PR) 被认为是 SAR 途径的分子标志, -1,3-葡聚糖酶 (PR1, PR2) 和几丁质酶 (PR3) 研究较多, 功能较为清楚, 此外还有类甜味蛋白 (PR5)、蛋白酶抑制剂 (PR6)、过氧化物酶 (PR9)、防御素和脂类转移蛋白等 14 个 PR 蛋白家族^[5]。因此, 分析 BABA 诱导辣椒对疫病 (*P. capsici* L.) 的抗性与甜(辣)椒叶片中 PR 的诱导积累, 以及 -1,3-葡聚糖酶 (PR-2)、几丁质酶 (PR-3) 和过氧化物酶 (PR-9) 活性的动态变化的关系, 对于揭示其诱导抗病的机制和开发利用辣椒抗病性的遗传潜能具有重要的意义。

‘CV98’是辣椒疫病的抗病品种, ‘茄门’为感病甜椒品种, ‘931’为感病辣椒品种, 以上均由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供。

-氨基丁酸 (BABA) 购于 Sigma 公司 (分析纯)。叶片胞间液 (intercellular fluids, IF) 蛋白的提取参考 Parent 等^[6]的方法, 提取的 IF 液贮于 -20 备用。

收稿日期: 2006-05-09; 修回日期: 2006-08-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270236); 国家‘十五’科技攻关项目 (2001BA509B0606); ‘948’重大项目 (2003-Z69)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: xieby@mail.caas.net.cn)

试验所用聚丙烯酰胺凝胶中分离胶浓度为 15%，浓缩胶的浓度为 5%，胶厚 0.8 mm，电泳时电流保持 14 ~ 16 mA；电泳后，凝胶参考郭尧君^[7]银染法染色。

- 1,3 - 葡聚糖酶活性测定参考 Joosten 等^[8]的方法，酶活力单位 (U) 定义为 37 °C 下单位时间每克鲜样质量叶片催化底物昆布多糖产生 1 nmol 的葡萄糖为 1 个酶活力单位，即 $1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$ ，参照标准曲线求出样品液中的葡萄糖量。

几丁质酶活性测定参照 Boole^[9]的方法，酶活性单位 (U) 定义为单位时间每克鲜样质量叶片水解几丁质生成 1 nmol N - 乙酰基葡萄糖为 1 个酶活单位，即 $1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$ 。

过氧化物酶活性测定采用愈创木酚法^[10]，酶活性单位 (U) 定义为 1 g 鲜样质量辣椒叶片每分钟吸光度的变化值，即 $\text{OD}_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$ 。

2 结果分析与讨论

2.1 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果 (图 1) 显示，经 BABA 诱导处理后，辣 (甜) 椒叶片胞间可溶性蛋白质随诱导时间推移而发生变化，3 个辣 (甜) 椒品种叶片在诱导后 3 d 均有 1 条分子量为 12.5 kD 新蛋白条带出现，诱导处理 4 d 后，没有出现减弱。辣椒品种 CV98 和 931 有 3 条分子量小于 14.4 kD 的蛋白条带出现明显的增强，但甜椒品种茄门蛋白条带在这一区域只有 1 条增强，这说明有新的特异蛋白产生或量的增加。

2.2 - 1,3 - 葡聚糖酶活性

以昆布多糖为底物测定的 - 1,3 - 葡聚糖酶活性结果表明 (图 2)，辣椒疫病抗性品种 CV98 于 BABA 诱导处理 1 d 后，- 1,3 - 葡聚糖酶活性即开始升高，并于 4 d 后达到最高值，为处理前的 4.5 倍。感病甜椒品种茄门和 931 辣椒的 - 1,3 - 葡聚糖酶活性在 BABA 处理 1 d 后均出现下降，但随后开始升高，于 BABA 诱导处理 4 d 后达到峰值，分别为处理前的 1.9 倍和 2.5 倍，到处理 6 d 后基本保持这一水平不变。其中茄门甜椒具有较高的 - 1,3 - 葡聚糖酶基础活性，但诱导后增高幅度不及辣椒品种 931 和 CV98 的增幅，这与辣椒品种被 BABA 处理后诱抗效果要比甜椒高的结论^[4]相一致。推测 - 1,3 - 葡聚糖酶可能参与 BABA 诱导抗性的表达。

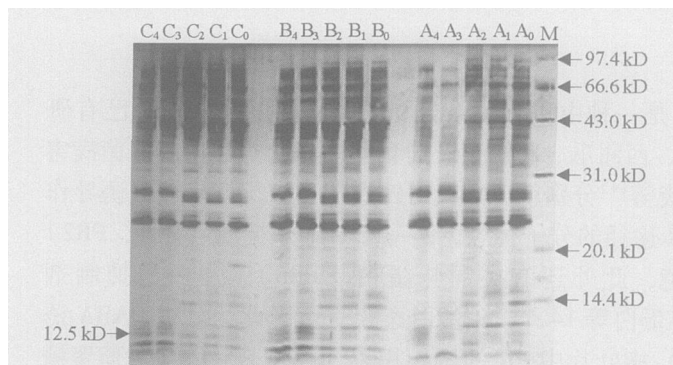


图 1 BABA 处理前后叶片胞间蛋白的 SDS-PAGE

M: 低分子量标准蛋白; A: '茄门'; B: 'CV98'; C: '931'。下标 1~4 分别为 BABA 处理后天数。

Fig 1 SDS-PAGE of intercellular fluids treated with BABA

M: Protein marker; A: 'Qimen'; B: 'CV98'; C: '931'.

Subscript 1 - 4 are the days after treated with BABA.

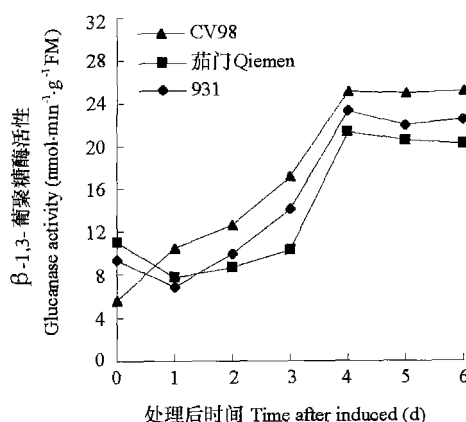


图 2 BABA 诱导辣椒 - 1,3 - 葡聚糖酶的变化

Fig 2 Glucanase activities of pepper leaves after treatment with BABA

2.3 几丁质酶活性

以几丁质为底物测定的几丁质酶活性结果 (图 3) 表明，辣椒品种 CV98、931 和茄门甜椒经 BABA 诱导 1 d 后，几丁质酶活性均出现不同程度的提高。辣椒品种 CV98 和 931 的几丁质酶活性升高

较快,并于处理 3 d后达到峰值,分别为处理前的 15.9倍和 5.5倍,此后没有出现明显的下降。茄门甜椒几丁质酶活性增加较为缓慢,于 BABA 处理 4 d后达到峰值,大约为处理前酶活性的 5倍,处理 6 d后仍保持较高的活性水平。这与 Cohen等^[11]在番茄上的结果基本一致。辣椒 CV98几丁质酶基础活性虽然较低,但经 BABA 诱导后,迅速升高,而且升高的幅度远远高于感病的辣椒 931和甜椒茄门。以上结果表明,BABA 诱导后,辣椒品种比甜椒品种能更迅速的对诱抗剂作出反应,同时也反映出抗病品种与感病品种相比应激能力更强。

2.4 过氧化物酶活性的变化

BABA 诱导后,3个辣(甜)椒品种的叶片中过氧化物酶(POD)活性出现了不同程度的增高,其中茄门甜椒过氧化物酶基础活性较高,但诱导后变化幅度不大,约升高 50%~60%。辣椒品种 CV98和 931的过氧化物酶基础活性虽然低,但 BABA 处理后即迅速出现增高,分别于处理后 3 d和 4 d达到峰值(图 4),说明辣椒经 BABA 诱导后,过氧化物酶也可能参与诱导抗性的表达。

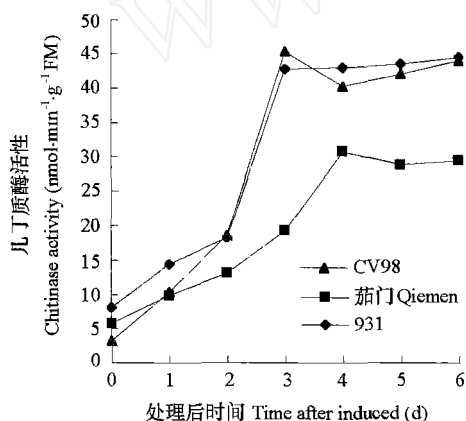


图 3 BABA 诱导辣椒几丁质酶的变化

Fig 3 Chitinase activities of pepper leaves after treatment with BABA

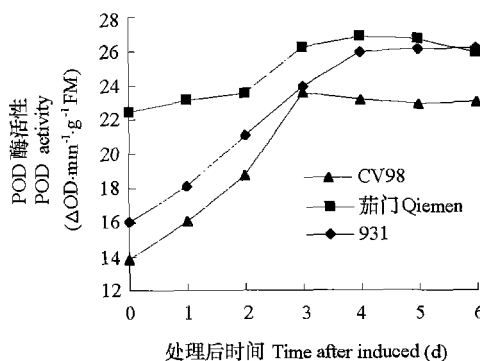


图 4 BABA 诱导辣椒 POD 酶的变化

Fig 4 POD activities of pepper leaves after treatment with BABA

参考文献:

- Gamliel A, Katan J. Influence of seed and root exudates on fluorescent *Pseudomonas* and fungi in solarized soil. *Phytopathology*, 1992, 82: 320~327
- Cohen Y, Reuveni M, Baider A. Local and systemic activity of BABA (DL-3-aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevines. *Eur. J. Plant Pathol.*, 1999, 105: 351~361
- Sunwoo J Y, Lee Y K, Hwang B K. Induced resistance against *Phytophthora capsici* in pepper plants in response to DL-3-aminobutyric acid. *Eur. J. Plant Pathol.*, 1996, 102: 663~670
- 谢丙炎, 李惠霞, 冯兰香. -氨基丁酸诱导辣(甜)椒抗疫病作用研究. *园艺学报*, 2002, 29 (2): 137~140
- Xie B Y, Li H X, Feng L X. Induction of resistance to *Phytophthora capsici* in pepper plants by DL-3-aminobutyric acid. *Acta Horticulturae Sinica*, 2002, 29 (2): 137~140 (in Chinese)
- van Loon L C, van Strien E A. The families of pathogenesis related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1999, 55: 85~97
- Parent J G, Richard H, Alain A. Detection of pathogenesis-related (PR or b) and of other proteins in the intercellular fluid of hypersensitive plants infected with tobacco mosaic virus. *Can. J. Bot.*, 1984, 62: 564~569
- 郭尧君. SDS电泳技术的实验考虑及最新进展. *生物化学与生物物理进展*. 1991, 18 (1): 1~12
- Guo Y J. Advancement and progress in technologies of SDS-PAGE. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1991, 18 (1): 1~12 (in Chinese)
- Joosten M H A J, de Wit P J G M. Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* using *Fulvum fulva* as 1,3-β-glucanases and chitinases. *Plant Physiol*, 1989, 89: 945~951
- Boller T, Gehri A, Mauch F, Vogeli U. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta*, 1983, 157: 22~31
- Canoleca M E, Munoz R, Alcazar H D, Espin A. Isoperoxidase involvement in the resistance of infection by Cucumber Mosaic Virus. *Plant Physiol*, 1994, 143: 213~217
- Cohen Y. 3-Aminobutyric acid induces system resistance against *Peronospora tabacina*. *Physiol Mol Pathol*, 1994, 44: 273~288