

# 机械损伤和茉莉酸甲酯对烟株蛋白酶抑制剂的诱导作用研究

杨丽文 程新胜 薛泽春 席征 张现

(中国科学技术大学烟草与健康研究中心 合肥 230052)

**摘要:** 为了进一步研究蛋白酶抑制剂对昆虫生长发育的影响, 选取机械损伤和茉莉酸甲酯作为信号路径的激发子, 研究了它们在不同条件下诱导烟株局部和系统性的胰蛋白酶抑制剂和胰凝乳蛋白酶抑制剂的表达。结果显示: 机械损伤或茉莉酸甲酯处理后, 烟株处理叶和系统叶中胰蛋白酶抑制剂和胰凝乳蛋白酶抑制剂含量都有不同程度升高; 施用 2.4 mmol/L 茉莉酸甲酯时两者的增加量最为显著; 机械损伤能明显抑制 2.4 mmol/L 茉莉酸甲酯的诱导作用, 对 1.2 mmol/L 茉莉酸甲酯具有协同作用。

**摘要:** 烟草; 机械损伤; 茉莉酸甲酯; 胰蛋白酶抑制剂; 胰凝乳蛋白酶抑制剂; 抗虫性

中图分类号: S433.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-5708(2006)06-0033-05

## Research on the mechanical wounding and methyl jasmonate induced augment of proteinase inhibitors in tobacco

YANG Li-wen CHENG Xin-sheng XUE Ze-chun XI Zheng ZHANG Xian

(Research Center of Tobacco and Health, USTC, Hefei 230052, China)

**Abstract:** Proteinase inhibitor is one of the most important compounds in plants, which can effectively resist the growth and propagation of insects. Mechanical wounding and methyl jasmonate (MeJA) were chosen as elicitors of the response pathway to investigate the augment of trypsin proteinase inhibitor (TI) and chymotrypsin proteinase inhibitor (CI) in tobacco. Results showed that mechanical wounding or MeJA can induce local and systemic increases of both TI and CI in different levels. Maximum levels of TI and CI in tobacco leaves would be reached when tobacco plants were treated with 2.4 mmol/L MeJA. Moreover, mechanical wounding can affect the production of TI and CI in a positive way when the plants were treated with 1.2 mmol/L MeJA while in a negative way with 2.4 mmol/L MeJA.

**Key words:** mechanical wounding; methyl jasmonate; trypsin proteinase inhibitor; chymotrypsin proteinase inhibitor; anti-insect

植物蛋白酶抑制剂 (Proteinase inhibitors, PIs) 是分子量较小的多肽或蛋白质<sup>[1]</sup>。作为植物重要的防御物质, 它们能够与昆虫消化道内的蛋白酶形成复合物, 使酶失活, 从而阻断或削弱蛋白酶对外源蛋白的水解, 干扰昆虫的正常消化作用<sup>[2-4]</sup>。此外, 蛋白酶抑制剂分子还可以通过消化道进入到昆虫的血液淋巴系统, 干扰昆虫蜕皮过程和破坏免疫<sup>[5-6]</sup>。与其它抗虫蛋白相

比, PIs 具有独特的优势: 抗虫谱广; 昆虫不易产生耐受性; 易于诱导表达; 分子量小、含量丰富; 性质稳定、易于操作等, 更为重要的是, 现已证明蛋白酶抑制剂转入食用作物中对人畜没有副作用<sup>[6-8]</sup>。目前研究较多的 PIs 主要是胰蛋白酶抑制剂 (trypsin proteinase inhibitor, TI) 和胰凝乳蛋白酶抑制剂 (chymotrypsin proteinase inhibitor, CI), 两者都属于丝氨酸类蛋白酶抑制剂, 它们与植物抗虫关系最为密切, 因为大多数昆虫 (包括大部分鳞翅目、直翅目、双翅目、膜翅目以及某些鞘翅目) 肠道内的蛋白酶主要是丝氨酸蛋白酶<sup>[9-10]</sup>。昆虫在取食了含有 CI 和 TI 的食物后, 会消化不良、缺乏必需氨基酸、生长发育受阻、甚至死亡<sup>[11]</sup>。早在半个多世纪

作者简介: 杨丽文 (1979-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 烟草化学生态学。中国科学技术大学烟草与健康研究中心

基金项目: 国家烟草专卖局资助项目 (110200202002)

收稿日期: 2005-11-30

以前,人们就观察到了PIs的抗虫作用:在离体情况下,低浓度的大豆胰蛋白酶抑制剂能抑制甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)幼虫肠道中绝大部分胰蛋白酶的活性。活体试验表明,当饲喂含有TI和CI这两种抑制剂的人工饲料时,幼虫的取食量明显下降,表现出营养不良、虫体变轻、幼虫龄期延长等现象<sup>[5-6,12-13]</sup>。由于PIs具有杀虫谱广、抗性发展慢和易表达等优点,分子生物学家将之视为一个良好的抗虫剂。1987年Hilde等首次将豇豆胰蛋白酶抑制剂转入烟草叶片并表达成功。目前已有多种转PIs基因植物,我国不少棉花种植区商业化栽种的所谓双抗棉就是导入苏云金杆菌杀虫结晶蛋白(Bt-ICP)和PIs基因的转基因作物<sup>[8,14]</sup>。

植物抗性的产生包括自身固有的和诱导形成的两种机制,研究表明植物的诱导抗性主要有以水杨酸(Salicylic acid, SA)和茉莉酸(Jasmonic acid, JA)为内源信号物质的两条路径,分别诱导植物抵御病原菌和昆虫的入侵<sup>[15-19]</sup>。机械损伤和茉莉酸甲酯(Methyl jasmonate, MeJA)可以诱导植株组织内源JA含量局部和系统性的增加,进而产生JA信号路径的应答,使组织内抗虫物质,如多酚类物质、蛋白酶抑制剂、尼古丁等含量升高<sup>[20-24]</sup>。

本文选取机械损伤和MeJA作为信号路径的激发因子,研究了它们在不同条件下诱导烟株产生局部和系统性的TI和CI含量的变化的现象。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 实验材料

供试品种为云烟85。在盛有细土的育苗盘于25℃下发芽,出苗后,每日在育苗室中(25℃)用生物效应灯照射14h,长至3叶期时将其移至小塑料钵中培养,植株的第5片真叶完全展开时用于实验。

MeJA为Apex Organics(Leicestershire, UK)产品。考马斯亮蓝G-250为Fluka公司产品;胰酶,胰凝乳蛋白酶,胰蛋白酶抑制剂,偶氮酪蛋白,N-苯甲酰-L-酪氨酸对硝基苯胺(BINA)均为Sigma公司产品。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 机械损伤和MeJA对烟株的处理

实验分为7个不同的处理组,每组用5株烟苗,分别为:(1)对照组:喷施9%的乙醇溶液;(2)机械损伤处理;(3)喷施1.2 mmol/L MeJA;(4)喷施2.4 mmol/L MeJA;(5)喷施4.8 mmol/L MeJA;(6)损伤12h后再施1.2 mmol/L MeJA;(7)损伤12h后再施2.4 mmol/L Me-

JA。选取烟苗的第3片叶(从基部到顶部)作为处理叶,用1支消毒过的接种针沿着叶脉对称地划4道伤口做损伤处理;将MeJA溶于9%的乙醇溶液中,用小型喷雾器均匀地喷洒在烟株叶片上,直至叶面有少许溶液下滑,并将周围的叶片遮住。然后迅速用塑料袋封起来保湿。处理结束后24h,剪下处理叶和烟株的第4片叶,分别用于检测局部和系统性的蛋白酶抑制剂含量。

1.2.2 酶液的提取:参照Ward K A等<sup>[25]</sup>的方法。取诱导后烟叶鲜样1片,称重前除去叶脉,按m:v=1:10的比例加入0.2 mol/L的Tris-HCl缓冲液(pH 7.8),内含0.1% Tween-20,冰浴匀浆,匀浆液在4℃,15 000 × g离心15 min,上清液作为粗酶液。

1.2.3 胰蛋白酶抑制剂含量测定:参照Ward K A等<sup>[25]</sup>的方法,略作改进。取0.2 mL酶液和0.5 mL的0.1 μg/μL的胰蛋白酶溶液在室温下振荡混合10 min,加入100 μL的25 mg/mL偶氮酪蛋白37℃培育30 min,再在12000 × g下离心10 min,取100 μL的上清液和100 μL的0.5 mol/L的NaOH,在DLAB全自动酶标仪上于450 nm下检测吸光度值。以胰蛋白酶抑制剂绘制标准曲线。结果以μg/mg蛋白表示。总蛋白含量用Bradford方法测定<sup>[26]</sup>。

1.2.4 胰凝乳蛋白酶抑制剂相对活性测定:参照Willdon D C等<sup>[27]</sup>的方法,略作改进。取0.2 mL酶液和0.3 mL的100 μg/mL胰凝乳蛋白酶溶液在室温下振荡混合30 min,然后取50 μL上述混合液加入96孔板孔内,加入100 μL pH7.8的Tris-HCl缓冲液和50 μL 0.28 mmol/L的BINA,在酶标仪上于405 nm下检测5 min内的吸光度变化值。对照不加酶液,代用等体积的缓冲液。结果以 $(\Delta A_{ck} - \Delta A_{待测}) / \Delta A_{ck} \times 100$ 表示。

用SPSS软件对单因子处理(1~5)作Duncan分析、对双因子处理(6~7)作T测验。

## 2 实验结果

### 2.1 机械损伤和茉莉酸甲酯处理对烟株TI和CI的诱导

从图1可以看出,机械损伤和MeJA可以局部和系统性的诱导烟草体内TI和CI含量升高。受机械损伤后,烟株的TI在局部和系统叶上都显著地增加,但CI的变化不显著。而烟株喷施1.2、2.4、4.8 mmol/L MeJA后,TI和CI在局部和系统叶上的增加量都比较显著,对于局部叶,TI的含量分别为对照组的2.65、3.80、1.35倍,CI的含量分别为对照组的1.80、2.10、1.55

倍。值得注意的是,烟株施用 2.4 mmol/L MeJA 时, TI 和 CI 的增加最为显著,而施用 4.8 mmol/L MeJA 时, TI 和 CI 的增加量较 1.2 和 2.4 mmol/L 处理时明显有所降低。对于系统性叶, TI 和 CI 的表现与局部叶趋势相同, TI 的含量分别为对照组的 1.50、3.20、1.90 倍, CI

的含量则分别为对照组的 1.80、2.60、1.50 倍,也是以 2.4 mmol/L MeJA 处理的 TI 和 CI 的增加量最为显著,但施用 4.8 mmol/L MeJA 时, TI 的含量较 1.2 mmol/L 的高,低于 2.4 mmol/L MeJA 组; CI 的含量则要比 1.2 或 2.4 mmol/L MeJA 处理时低。

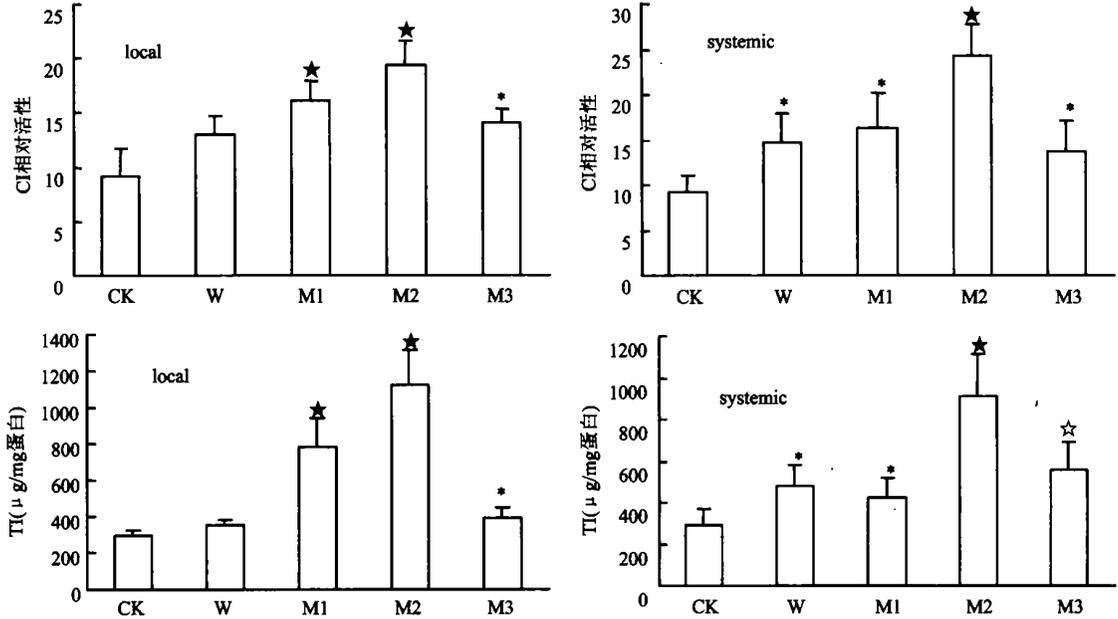


图 1 机械损伤和茉莉酸甲酯诱导烟株局部叶胰蛋白酶抑制剂和胰凝乳蛋白酶抑制剂含量的变化

CK-对照组; W-机械损伤; M1-1.2 mmol/L 茉莉酸甲酯; M2-2.4 mmol/L 茉莉酸甲酯; M3-4.8 mmol/L 茉莉酸甲酯。每个柱形图表示平均值+S.E. (n = 5)。(\* P ≤ 0.05, ☆ P ≤ 0.01, P ≤ 0.001 下同)

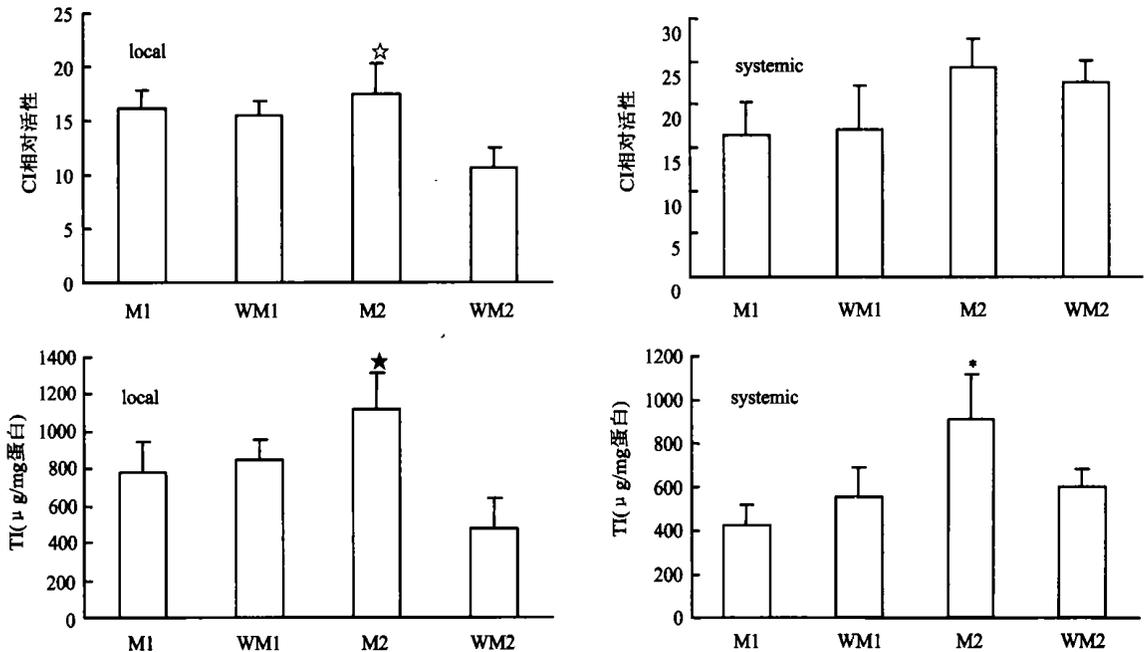


图 2 机械损伤和茉莉酸甲酯双因子交互对烟草 TI 和 CI 的影响

M1-1.2 mmol/L MeJA; WM1-损伤+1.2 mmol/L MeJA; M2-2.4 mmol/L MeJA; WM2-损伤+2.4 mmol/L MeJA。每个柱形图表示平均值+S.E. (n = 5)。

## 2.2 机械损伤和茉莉酸甲酯互作对烟株 TI 和 CI 的影响

从图2可以看出,机械损伤对 MeJA 的诱抗效果的影响因 MeJA 的浓度不同而异:烟株在损伤 12 h 后喷施 2.4 mmol/L MeJA 时, TI 和 CI 在局部叶和系统叶上的含量明显要比 2.4 mmol/L MeJA 单独处理时有所降低,其中 CI 在局部叶上差异达到了显著水平、TI 在局部叶和系统叶上的差异分别达到了极显著和显著水平;然而,损伤后施用 1.2 mmol/L MeJA 处理中, TI 在局部和系统叶上比 MeJA 单独处理略高; CI 的含量与 1.2 mmol/L MeJA 单独处理的相比,在局部叶上略低、系统叶上略高。

## 3 讨论

我们的实验表明:烟株在单独实施机械损伤或喷施不同浓度 MeJA 时,可以导致局部和系统性 TI 和 CI 含量的升高,说明机械损伤和 MeJA 能够很好地诱导烟株产生 JA 信号路径的应答,我们同期进行的生测试验也表明取食损伤或 MeJA 处理烟株叶片的斜纹夜蛾幼虫,其相对生长速率要比对照组明显降低(全文另发),进一步证实了蛋白酶抑制剂对昆虫生长的抑制作用。与同类研究相比,在我们的实验中,损伤处理的 TI 和 CI 增加量并不都显著,这可能是由于我们实验中的烟叶受创伤程度小,没有诱导足量的内源 JA 含量增加,相应的表达也不是很强,因为创伤信号应答强度与植株受伤程度在一定范围成正相关<sup>[28-29]</sup>。我们的数据也表明:MeJA 的用量与烟草植株的应答强度间并非总是呈正相关,超过一定的浓度植物的应答下降。这可能与植物抗性的 JA 和 SA 路径的应答有关,当 MeJA 用量较低时,内源 JA 的增加量不是很多,其产生的应答也不是很强;然而,植物相应的应答是有一定限度的,当 MeJA 用量超过烟草植株的应答限度,多余的 MeJA 反倒会诱导 SA 信号路径的功能性成份(如, MeSA)增加,从而抑制了 JA 信号路径的应答。前期相关的研究中也报道有类似的情况<sup>[30]</sup>。

值得注意的是机械损伤与不同浓度的 MeJA 互作表现: MeJA 的浓度为 2.4 mmol/L 时,两者的互作表现为拮抗; MeJA 的浓度为 1.2 mmol/L 时,两者在整体上则表现为协同。这种情况在本质上与我们在两因子单独处理中所发现的 MeJA 浓度与植物应答的表现是相同的,对于 2.4 mmol/L 烟草植株作出了最大限度的应答,而机械损伤中产生的 JA 则是过量了,从而产生了拮抗效应;在 1.2 mmol/L MeJA 处理来说,机械损伤形

成的 JA 则相当于对低浓度下诱抗剂的一种补充,表现为协同。

尽管世界上首先出现的转 PIs 基因作物是烟草,但现实情况是我们还不能将这种转 PIs 基因烟草应用于大田,不过,我们的试验表明可以通过化学诱导的方式激活烟草潜在的 PIs 基因,产生相应的抗生物质——PIs 的表达,抑制害虫的生长繁殖。目前我国在烟草生产上,育苗过程中有 2~3 次的剪叶,后期打顶,这都是一种机械性损伤,在这两个时期使用诱抗剂必须要考虑到机械损伤的影响。另外,有研究证实 PIs 与多酚类结合使用能更加有效的抑制鳞翅目幼虫的生长发育和中肠蛋白酶的活性<sup>[31]</sup>,而烟草中含有大量的多酚类物质,其含量因烟草种类、生育期的不同而异,因此,未来应该就不同生长期的烟草对化学诱抗剂的应答以及烟草次生物质与 PIs 的互作进行更深入的研究,以便将化学诱抗剂尽快应用于烟草大田生产。

## 参考文献

- [1] Walker A J, Ford L, Majerus M E N, et al. Characterization of the midgut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata*) and its sensitivity to proteinase inhibitors [J]. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1998, 28: 173-180
- [2] Bode W, Huber R. Structural basis of the endoproteinase protein inhibitor interaction [J]. *Biochem. Biophys. Acta.*, 2001, 477: 241-252
- [3] Franco O L, Melo F R. Osmoprotectants a plant strategy in response to osmotic stress [J]. *Rus. J. Plant Physiol.*, 2000, 47: 137-144
- [4] Oliveira A S, Pereira R A, Lima L M, et al. Activity towardbruchid pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the algaroba tree (*Prosopis juliflora* D. C.) [J]. *Pest Biochem. Physiol.*, 2002, 72: 122-132
- [5] 卢晓风, 夏玉先, 裴炎. 植物蛋白酶抑制剂在植物抗虫与抗病中的作用 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1998, 25 (4): 328-333
- [6] 曲晓华, 浦冠勤. 蛋白酶抑制剂的研究与应用 [J]. *蚕桑茶叶通讯*, 2003, 1: 19-22
- [7] Puzsai A, Bardocz G G, Alonso R, et al. Expression of the insecticidal bean alpha-amylase inhibitor transgene has minimal detrimental effect on the nutritional value of peas fed to rats at 30% of the diet [J]. *J. Nutr.*, 1999, 129: 1597-1603
- [8] 刘会香, 张星耀. 植物蛋白酶抑制剂及其在林木抗虫基因工程中的应用 [J]. *林业科学*, 2005, 41 (3): 148-157
- [9] 肖怀秋, 林亲录, 李玉珍, 等. 蛋白酶抑制剂抗虫基因工程研究进展 [J]. *生物技术报*, 2004, 6: 22-25

- [ 10 ] 张锐, 郭三堆. 植物抗虫基因工程研究进展[ J ]. 生物技术通报, 2001, 2 : 8-12
- [ 11 ] 王琛柱, 项秀芬, 张书芳, 等. 大豆胰蛋白酶抑制剂对棉铃虫幼虫消化生理和生长发育的影响[ J ]. 昆虫学报, 1995, 38 ( 3 ) : 272-277.
- [ 12 ] Gatehouse A M R, Norton E, Davison G M, et al. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant proteinase inhibitor in vitro and in vivo [ J ]. *J. Insect Physiol.*, 1999, 45 : 545-558
- [ 13 ] Franco O L, Santos R C, Araujo M A M, et al. Effects of black-eyed pea trypsin/ chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*[ J ]. *Phytochemistry*, 2003, 63 : 343-349.
- [ 14 ] 柳武革, 薛庆中. 蛋白酶抑制剂及其在抗虫基因工程中的应用[ J ]. 生物技术通报, 2000, 1 : 20-25.
- [ 15 ] Thaler J S, Richard K, Diane E, et al. Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense pathways; effects on several plant parasites[ J ]. *Oecologia*, 2002, 131 : 227-235.
- [ 16 ] Maleck K, Dietrich R A. Defense on multiple fronts; how to plants cope with diverse enemies[ J ]. *Trends Plant Sci.*, 1999, 4 : 215-219.
- [ 17 ] Achuo E A, Audenaert K, Meziane H. The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco[ J ]. *Plant Pathol.*, 2004, 53 : 65-72
- [ 18 ] Pieterse C M, Van Loon L C. Salicylic acid-independent plant defence pathways[ J ]. *Trends Plant Sci.*, 1999, 4 : 52-58
- [ 19 ] Thaler J S, Farag M A, Pare P W, et al. Jasmonate-deficient plants have reduced direct and indirect defences against herbivores[ J ]. *Ecol. Lett.*, 2002, 5 : 764-774.
- [ 20 ] Thaler J S. Jasmonic acid mediated interactions between plants, herbivores, parasitoids, and pathogens : A review of field experiments in tomato[ M ] // grawal A A A, Tuzun S, bent E. Inducible plant defenses against pathogens and herbivores; Biochemistry, ecology, and agriculture, American Phytopathological Society. 1999, 319-334.
- [ 21 ] Constabel C P, Ryan C A. A survey of wound and methyl jasmonate induced leaf polyphenol oxidase in crop plants[ J ]. *Phytochemistry*, 1998, 47(4) : 507-511.
- [ 22 ] Tschamtkes T, Thiessen S, Dolcha R, et al. Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*[ J ]. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2001, 29 : 1025-1047.
- [ 23 ] Bailey B A, Strøm M D, Baea H, et al. Gene expression in leaves of *Theobroma cacao* in response to mechanical wounding, ethylene, and/ or methyl jasmonate [ J ]. *Plant Sci.*, 2005, 168 : 1247-1258
- [ 24 ] Avdiushko S A, Brown G C, Dahlman D L, et al. Methyl jasmonate exposure induced insect resistance in cabbage and tobacco[ J ]. *Environ. Entomol.*, 1997, 26 : 642-654.
- [ 25 ] Ward K A, Tung P, Lamb N, et al. Structural requirements for biologically active jasmonates: Induction of protease inhibitors and cotyledon senescence[ J ]. *Plant Growth Regul.*, 1999, 27 : 49-56
- [ 26 ] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[ J ]. *Anal. Biochem.*, 1976, 72 : 248-254
- [ 27 ] Willdon D C, Thain J F, Minchin P E H, et al. Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant[ J ]. *Nature*, 1992, 360 : 62-65.
- [ 28 ] Van Dam N M, Horn M, Mares M, et al. Ontogeny constrains systemic protease inhibitor response in *Nicotiana attenuata*[ J ]. *J. Chem. Ecol.*, 2001, 27 : 547-568.
- [ 29 ] Von Dahl C C, Baldwin I T. Methyl jasmonate and cis-jasmone do not dispose of the herbivore-induced jasmonate burst in *Nicotiana attenuata*[ J ]. *Physiol Plant*, 2004, 120 : 474-481.
- [ 30 ] Carolyn W T, Lee P, Seda E, et al. Enhancement of ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures with methyl jasmonate is dependent on timing and dosage of elicitation[ J ]. *Lett. Biotechnol.*, 2004, 1595-1599.
- [ 31 ] 王琛柱, 钦俊德. 大豆胰蛋白酶抑制剂与棉酚或丹宁混用对棉铃虫中肠蛋白酶和生长率的影响[ J ]. 昆虫学报, 1996, 39 ( 4 ) : 337-341.