

文章编号:1001-1498(2005)03-0300-05

脂氧合酶、脱落酸与茉莉酸在合作杨损伤 信号传递中的相互关系

张可文, 安 钰, 胡增辉, 杨 迪, 沈应柏*

(北京林业大学生命科学与技术学院,北京 100083)

摘要:以合作杨为实验材料,检测了人为机械损伤后 2、4、8、12、24、48 h 损伤叶片与邻近健康植株叶片内脂氧合酶(Lipoxygenase,Lox)活性、脱落酸(ABA)、茉莉酸(JA)含量的变化情况。结果显示:(1)人为损伤不但引起损伤植株体内 ABA、JA 含量及 Lox 活性的升高,而且健康植株体内该三种物质的变化与之有相同的升高趋势,表明植物体受伤后,在体内迅速合成信号物质发生防御反应,这种防御反应不仅在受损伤的植株体内发挥作用,还可以释放某种挥发性物质并通过空气传递到邻近健康植株,诱导邻近植株产生抗性;(2)在 ABA、JA 积累的同时,Lox 的活性也升高且趋势一致,Lox 与 ABA、JA 的合成有密切关系。

关键词:合作杨;脂氧合酶;脱落酸;茉莉酸;信号转导;诱导抗性

中图分类号:S718.43 **文献标识码:**A

Relationship between Lipoxygenase and ABA and JA in Wounded Signal Transduction of Heathy Populus Seedlings

ZHANG Ke-wen, AN Yu, HU Zeng-hui, YANG Di, SHEN Ying-bai*

(College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, P. R. China)

Abstract: Using the poplar as materials, the authors examined and compared the activity of lipoxygenase (Lox) and the dynamic level of ABA and JA in different leaves: the mechanical damaged leaves and the leaves of the neighboring healthy plant after being damaged. The result showed that: (1) the mechanical wounding enhanced the activity of Lox and induced the concentration of ABA and JA increasing in the leaves. It could be concluded that mechanical wounding could induce the defensive of the damaged plant. Furthermore, there might exist some airborne signals, which transferred the wounding message to neighboring plants, and induced defense reaction of the neighboring healthy plants. (2) Lox activity and the contents of ABA and JA increased with similar trend along with the mechanical wounding, indicating that Lox maybe act to the key process of the biosynthesis to ABA and JA.

Key words: *Populus × Xiaozhuanica* cv 'Opera'; lipoxygenase(Lox); ABA; JA; signal transduction; induced defense

动物在受到疾病或天敌侵害时会产生动物信息素,提高自身免疫能力并对同类警示,类似的现象在植物界也发生。植物在受到机械损伤或昆虫取食后,在自身发生一系列的防御反应的同时,会释放挥

发性物质引起邻近健康植株产生抗性而降低受伤程度^[1]。邻近植株获得抗性的现象称为植物通讯^[2](interplant communication)。有关植物通讯的研究主要集中在草本植物方面,如烟草(*Nicotiana tabacum*

收稿日期:2004-12-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目:“树木个体间防御信号传递的分子机理研究(30170764)”

作者简介:张可文(1978—),女,内蒙古赤峰人,硕士研究生。

*责任作者

L.)、番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 受昆虫胁迫时产生水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)、酚类等物质,用于抵抗病虫害侵袭,同时还会释放茉莉酸甲酯(MeJA)等挥发性物质引起临近植株体内JA等代谢物质的增多^[3,4]。平立岩等^[5]发现人为机械损伤毛白杨(*Populus tometosa* Carr.)、复叶槭(*Acer negundo* L.)、合作杨(*P. × xiaozhuanica* W. Y. Hsu et Liang cv. 'Opera')后会释放大量的挥发性物质引起其下风处植株产生抗性,认为挥发物充当了植株间信号分子的作用。进一步研究证明,受伤复叶槭叶片内ABA、JA含量升高,邻近健康植株叶片内的这两种物质含量也升高^[6],ABA、JA作为抗性信号分子已被普遍接受^[7]。有证据表明,脂氧合酶(Lipoxygenase, Lox)参与调控ABA、JA等一些抗性信号分子的产生与释放^[8],它们之间的相互关系将成为植物抗性研究的切入点。本文以合作杨为实验材料,研究人为机械损伤后,损伤植株与邻近健康植株体内Lox活性与ABA、JA含量的变化关系,进一步探索植物抗性信号在植株间传递的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

2004年3月在中国林业科学研究院采集了合作杨枝条,扦插于直径为25 cm的塑料盆中,培养土为施以复合肥料的苗圃表土,缓苗后每月供给50 g·kg⁻¹ Hongland 营养液。盆栽苗露天培养于北京林业大学苗圃,统一管理确保苗木水肥状况一致。培育过程中,经常浇水以避免干旱胁迫影响实验结果,经常挪动花盆以免根长出盆外对根系造成损伤。

1.2 损伤处理

机械损伤实验于2004年7月进行。用止血钳快速挟伤1年生合作杨扦插苗功能叶片,垂直叶缘不损及中脉,损伤面积达总叶面积的15%;损伤后迅速将损伤植株与另一长势相同的健康植株放入同一密闭玻璃器室(100 cm × 50 cm × 150 cm)内,同时放另一长势相同植株于密闭气室外作为对照处理,2 h后采样,再将另一损伤植株与另一健康植株同时放入密闭气室,4 h后采样;依次进行8、12、24、48 h的采样。密闭玻璃气室放置于25 ℃、通气良好光线充足的实验室内。诱导处理1.5、2、4、8、12、24、48 h后采样。分别采集受损伤植株的损伤叶和健康植株的叶片(诱导叶)以及未作处理的对照(0 h)植株叶片。采样完毕迅速将叶片投入液氮中,-70 ℃保存

备用。

1.3 Lox 酶活性检测

参照 Axelrod^[9]的方法并加以改进。取植物样品0.2 g,液氮下充分研磨,按1:5(w/v)加入预冷的0.05 mol L⁻¹(pH6.5)磷酸缓冲液,4 ℃下搅拌4 h后,4 ℃下10 000 r·min⁻¹离心30 min,回收上清液用于Lox活性测定。3 mL反应体系中含有亚油酸(1 mol·L⁻¹)母液25 μL,柠檬酸-磷酸缓冲液(0.1 mol L⁻¹, pH6.0)2.775 mL,反应温度30 ℃,于234 nm测吸光度的变化。加0.2 mL酶液启动反应,4 s后计时,记录15 s内234 nm值的变化。

1.4 ABA及JA分析

ABA、JA的分析采用内标法定量^[10]。称取0.5 g样品,剪碎后放在0 ℃预冷的研钵中,加少量80%预冷的甲醇在冰浴中迅速研磨成匀浆后,转移至小烧杯中,加400 ng D₃-ABA,-20 ℃过夜。次日过滤,滤液反复冻融3次,4 000 r·min⁻¹离心10 min,上清液转移至梨形瓶中,35 ℃真空浓缩至水相。调pH值至2.5~3.0后用乙酸乙酯萃取3次,合并萃取液,35 ℃真空浓缩去除乙酸乙酯相。用甲醇溶解蒸发瓶内的残留物,过C₁₈Cep-Pak小柱,所得的溶液转移至毛细管中经甲酯化处理,用于GC-MS检测。

样品被进样到GC/MS仪(Trace 2000-Voyager, Finnigan, Thermo-Quest)中分离鉴定。

GC分析条件:色谱柱OV-1,25 m × 0.25 mm × 1.0 μm。载气为氦气,压力为6 kPa,流速为0.8 mL/20 ℃/min升至200 ℃后再以10 ℃/min升至280 ℃;280 ℃进样不分流。

MS质谱采用:EI:70 eV,从m/z30-500全扫描1次,Me-ABA:m/e 190,RT:10.44 min;Me-D-ABA:m/e 193,RT:11.01 min;Me-JA:224,RT:7.48 min。

实验用甲醇、乙酸乙酯、柠檬酸、磷酸等化学试剂为分析纯,购自北京化学试剂公司;亚油酸购于Sigma公司;D₃-ABA是英国威尔士大学Dr. Rogerhorgan所赠。

1.5 数据分析

用单因素方差分析处理相应数据,所用软件为Microsoft Excell数据处理软件包。文中描述性数据用平均值±标准误。显著水平设计为P=0.05,极显著水平P=0.01。对F检验差异显著的,采用q检验比较处理和对照的差异。

2 结果与分析

2.1 损伤对叶片 ABA 含量的影响

从图 1 可以看出,损伤后 2 h,损伤叶中 ABA 含量即迅速增加,与对照的差异显著(表 1, 111.33, $P < 0.01$),表明受伤植株在短时间内即可对伤害作出反应;4 h 达到最大值,随着时间的延长 ABA 含量逐渐下降,在 48 h 时降至最低,但一直比对照植株的含量高(80.25, $P < 0.05$)。损伤叶中 ABA 含量持续上升的部分原因可能是由于损伤组织的失水引起的。Hildmann 等^[11]的研究表明:在水分胁迫下植物体 ABA 的含量虽然升高很快,但并不合成伤诱导蛋白,伤害和水分胁迫引起的 ABA 水平的增加可能属于不同的信号转导途径。信号诱导叶片中 ABA 含量从 2 h(88.77, $P < 0.01$)即逐渐增加,24 h 时达到最大值(116.76, $P < 0.01$),峰值出现的时间明显较损伤

叶滞后。由于实验过程中损伤植株与完好植株之间有一定的距离,说明损伤植株释放了某种挥发性的物质,充当了报警信号的作用,并且这些挥发物分子要经过一段时间的浓度积累才能发挥作用,进而诱发邻近健康植株防御反应的启动。有关损伤诱导挥发物的实验结果表明:损伤确实能诱导挥发物的大量释放,但究竟是哪种或哪几种物质充当了报警信号的作用尚有待深入研究^[12]。

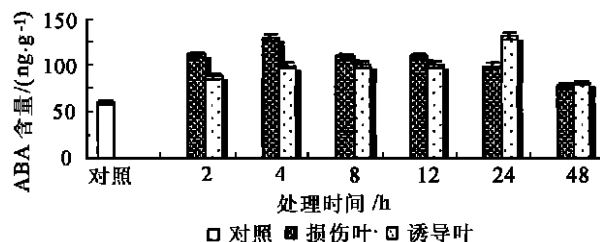


图 1 机械损伤后不同鲜叶片脱落酸(ABA)含量的变化

表 1 不同处理与对照的脱落酸(ABA)、茉莉酸(JA)与内脂酶活性(Lox)含量的差异显著性检验

处理	ABA 含量/(ng g ⁻¹)		JA 含量/(ng g ⁻¹)		Lox 含量/(mol mg ⁻¹ min ⁻¹)	
	损伤叶	诱导叶	损伤叶	诱导叶	损伤叶	诱导叶
CK	60.01	60.01	18.71	18.71	1.41	1.41
2(1.5) h	111.33**	88.77**	19.70	31.41**	1.69	1.57
4 h	127.93**	99.22**	135.21**	39.61**	3.52**	1.95**
8 h	109.10**	100.27**	22.40	40.13**	2.42**	2.32**
12 h	109.07**	100.07**	22.20	40.63**	1.69	1.43
24 h	99.06**	116.76**	19.12	119.72**	1.46	1.42
48 h	80.25*	81.08**	19.83	25.43**	1.76	1.73*
D _{0.05}	16.76	15.53	4.61	4.97	0.73	0.30
D _{0.01}	21.10	18.23	5.81	6.25	0.92	0.38

注:1. 处理中“(1.5)”表示损伤后 1.5 h 测定的 Lox 含量;2. 表中数据均为鲜叶的含量;3. $q_{0.05}(7,14) = 4.83$, $q_{0.01}(7,14) = 6.08$;4. **为极显著差异,*为显著差异

2.2 损伤后不同叶片 JA 含量的变化

如图 2 所示,损伤后 2 h 内植物叶片中 JA 的含量略有增加,4 h 时迅速上升并达到最大值(135.21, $P < 0.01$),随后 JA 的含量下降得很快,4~12 h 维持近似水平,在 24~48 h 之间基本上恢复正常(对照)水平(19.83, $P > 0.05$)。诱导叶片中 JA 的含量在 2~12 h 内缓慢升高,在 24 h 达到最大值(119.72, $P <$

0.01),明显滞后于损伤叶,这与 ABA 在信号诱导叶片中达到最大值的时间一致,在一定程度上说明了植株间信号转导的同步性。8 h 后诱导叶片 JA 含量均高于损伤叶片,推测报警信号能诱导健康植株体内 JA 的合成,且它的诱导作用强于机械损伤 8 h 后对损伤叶的诱导,但具体细节尚待进一步证实。

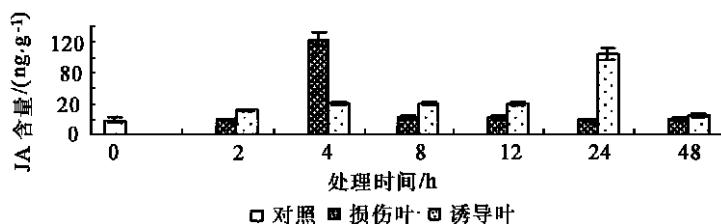


图 2 机械损伤后不同鲜叶片茉莉酸(JA)含量的变化

2.3 损伤后不同叶片 Lox 活性变化情况

从图3可以看出,损伤后1.5 h,合作杨叶片中 Lox 活性开始升高,4 h 达到高峰(3.52, $P < 0.01$),表明机械损伤使植株体内 Lox 活性迅速升高,随着时间延长,酶活性逐渐降低。诱导叶片酶活性变化趋势基本

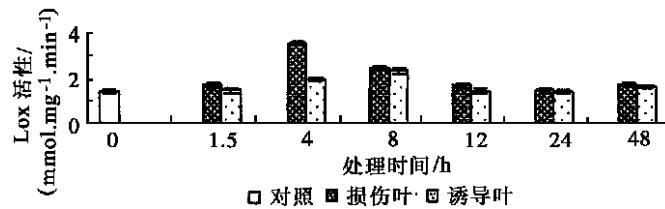


图3 机械损伤后不同鲜叶片酯氧合酶(Lox)活性的变化

3 结论与讨论

3.1 JA、ABA 与 Lox 关系

JA 积累是伤害胁迫的一个重要信号。近年来越来越多的证据表明,JA 合成的最前体物质是-亚麻酸,它在 Lox 的作用下,氧化成 13(s)-氢过氧化亚麻酸,然后在氢过氧化酶的作用下形成 12,13-环氧亚麻酸,经过结构重排,环化为 12-氧代植物二烯酸,进一步经过还原形成 JA^[13]。胁迫诱导 JA 积累是一个复杂的信号传导过程,在烟草^[14]、拟南芥^[15]中的实验表明:Lox 是该信号合成途径的关键酶。作者以杨树为材料的试验表明:Lox 活性变化趋势与 JA 浓度积累水平一致,都在 4 h 达到高峰,以后逐渐降低。这说明 Lox 的作用确实与 JA 的合成有关。

大量研究表明:ABA 是一种重要的逆境信号物质。逆境胁迫下,植物通过 ABA 的信息传递可有效地调整其水分及一些代谢关系,使植物对环境胁迫作出积极、主动的适应性反应^[13]。机械损伤后,损伤叶片中 Lox 活性变化趋势与 ABA 浓度积累一致,认为这二者之间有某种联系。有证据表明:ABA 合成的限速步骤是其合成前体物质黄质醛的转化^[16]。黄质醛由 40 碳新黄质(9⁻cis-neoxanthin)裂解而来,Lox 的主要作用在于催化双键氧化裂解^[17],形成黄质醛^[18]。新黄质的裂解明显受到多种 Lox 抑制剂的抑制^[19],说明 Lox 调控着 ABA 的生物合成。

ABA 与 JA 有相似的生理作用,但在伤诱导途径中有关 ABA 与 JA 的关系目前还没有统一的说法。Hildmann^[11]等在 JA 水培的马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)叶片中没有检测到 ABA 的增加,但却有 ABA 应答基因的表达,说明 JA 在 ABA 的下游起作用。作者的实验中检测到 JA 对伤害的反应比 ABA 相对滞后,也证明了 JA 在 ABA 的下游起作用。二者同

与损伤叶相同,但高峰滞后到 8 h,再次说明损伤植株确实释放了某些气体挥发物并诱导邻近健康植株体内发生抗性反应。健康植株与损伤植株 Lox 的变化趋势一致,可能暗示损伤植株与诱导植株体内的抗性途径具有一致性。

受 Lox 调控,其合成底物有相似的结构,说明它们的信号途径可能存在交叉,但是否属于同一途径还需要深入研究。

3.2 Lox 在伤信号转导中的作用

植物组织损伤后体内会发生许多生理生化变化,经伤信号的产生、释放、识别和转导最终导致防御反应相关基因的表达,进而合成一些蛋白酶抑制剂,富含羟脯氨酸的糖蛋白,苯丙氨酸解氨酶,查尔酮合成酶等抗性物质^[20]。杨迪^[21]的实验证实:损伤引起植株体内 ABA、JA 含量在短时间内升高,随后引起酚类等抗性物质含量增加,表明 ABA、JA 在抗性物质合成的上游起作用,这与 Pena-Cortes 的伤信号转导模型^[22]一致,而 ABA、JA 的含量明显受 Lox 活性影响,这可能说明,伤信号首先激活 Lox,Lox 并促进 ABA、JA 的合成,进而导致一系列防御反应相关基因的表达,但细节尚不清楚。

Lox 活性、ABA、JA 含量在邻近健康植株中具有相似的变化规律,有所不同的是诱导叶片中三者的升高都滞后于损伤植株。这表明植株间确实存在通讯现象,也说明株间报警信号积累到一定浓度时才能发挥有效作用,但受伤植株释放的挥发性报警信号分子通过什么途径诱导健康植株叶片中 Lox 活性增强,继而导致一系列防御反应的细节,尚需进一步的研究。

参考文献:

- [1] Baldwin I E, Schultz J C. Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants [J]. Science, 1983, 221: 277 ~ 278
- [2] Baldwin I E, Schmelz T. Wound-induced changes in root and shoot jasmonic acid pools correlate with induced nicotine synthesis in *Nicotiana sylvestris* Spegazzini and Comes [J]. Chemical Ecology, 1994, 20: 2139 ~ 2157

- [3] Seskar M, Shulaev V, Raskin I. Endogenous methylsalicylate in pathogen inoculated tobacco plants [J]. *Plant Physiology*, 1998, 116:387 ~ 392
- [4] Kenton P, Murl A J, Atzorn R, et al. Jasmonic acid accumulation in tobacco hypersensitive response lesion [J]. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 1999, 12(1):74 ~ 78
- [5] Ping L Y, Sheng Y B. Comparison of leaf volatiles induced by mechanical damage from diverse taxonomic tree species [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(3):261 ~ 266
- [6] 杨迪, 李庆. 损伤与邻近健康复叶槭植株内脱落酸和茉莉酸含量变化 [J]. *北京林业大学学报*, 2003, 24(4):35 ~ 38
- [7] John Turner G, Christine E, Alessandra D. The jasmonate signal pathway [J]. *Plant Cell*, 2002, 14:153 ~ 164
- [8] 吴劲松, 种康. 茉莉酸类作用的分子生物学研究 [J]. *植物学通报*, 2002, 19(2):164 ~ 170
- [9] Axelord B, Cheesbrough T M, Bureau J M, et al. Membrane-associated and soluble lipoxygenase is from in tomato pericarp [J]. *Plant Physiol*, 1993, 103:1211 ~ 1221
- [10] 彭运生, 凌祖铭. 高效液相色谱测定水稻幼苗中内源激素的方法研究 [J]. *分析测试学报*, 1992, 11(2):52
- [11] Hildman T, Ebnet M, Pena-Cortes H, et al. General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as result so mechanical wounding [J]. *The Plant Cell*, 1993, 4:1157 ~ 1170
- [12] Ping L Y, Sheng Y B. Plant volatile released in succession from artificially wounded ash leaf maple leaves [J]. *Austrian Journal of Plant Physiology*, 2001, 28(6):513 ~ 517
- [13] McConn M, Creelman R A, Bell E, et al. Jasmonat is essential for insect defense in Arabidopsis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:5473 ~ 5474
- [14] 宫长荣, 李艳梅, 杨立钧. 水分胁迫下离体烟叶中脂氧合酶活性、水杨酸与茉莉酸积累的关系 [J]. *中国农业科学*, 2003, 36(3):269 ~ 272
- [15] Bell E, Mullet J E. Lipoxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyljasmonate [J]. *Mol Gen Genet*, 1991, 230:456 ~ 462
- [16] Siedow J M. Plant lipoxygenase: structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 1991, 42:145 ~ 148
- [17] Parry A D, Horgan R. Carotenoid metabolism and the biosynthesis of abscisic acid [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30:815 ~ 821
- [18] Merlit S, Graudat J. Genetic analysis of abscisic acid signal transduction [J]. *Plant Physiol*, 1997, 114:751 ~ 757
- [19] Lee H S, Milberr B V. Endogenous biosynthetic precursors of (+)-abscisic acid IV. Biosynthesis of ABA from [²H] carotenoids by acyl-free system from avocado [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1997, 24:715 ~ 726
- [20] 刘新, 张蜀秋. 茉莉酸类在伤信号转导中的作用机制 [J]. *植物生理学通讯*, 2000, 36(1):76 ~ 81
- [21] 杨迪. 不同损伤形式对杨树诱导抗性及体内防御信号物质的影响 [D]. 北京:北京林业大学, 2003
- [22] Pena-Cortes H, Fisahn J, Willmitzer L, et al. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor gene expression in tomato and potato plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:4106 ~ 4133