

中图分类号: S532; Q517 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2007)05-0275-04

β-氨基丁酸诱导马铃薯叶片晚疫病抗性适宜浓度筛选

李亚军, 田振东, 柳俊, 谢从华

(国家蔬菜改良中心华中分中心, 湖北省马铃薯工程技术研究中心, 华中农业大学, 湖北 武汉 430070)

摘要: β-氨基丁酸(DL-β-aminobutyric acid, BABA)是一种非蛋白氨基酸,能有效诱导多种植物产生对多种病原菌的抗性。为了解BABA处理浓度和时间对马铃薯叶片晚疫病抗性的诱抗效果,本试验用四个浓度梯度(0.5 mmol·L⁻¹、1 mmol·L⁻¹、2 mmol·L⁻¹和4 mmol·L⁻¹)的BABA喷雾处理马铃薯植株,处理1 d、2 d、3 d和4 d后分别取离体叶片接种晚疫病菌。结果表明:在0.5~4 mmol·L⁻¹范围,随着BABA浓度增加和处理时间的延长,叶片抗性逐渐增强。2 mmol·L⁻¹和4 mmol·L⁻¹ BABA处理3 d后接种,离体叶片晚疫病抗性显著提高。

关键词: 马铃薯; β-氨基丁酸; 诱导抗性; 晚疫病

由致病疫霉(*Phytophthora infestans* de Bary)引起的晚疫病是马铃薯最严重的病害之一,一般年份可减产10%~20%,大流行年份减产可达50%~70%,甚至绝产。我国每年马铃薯因晚疫病而引起的损失约10亿美元^[1]。β-氨基丁酸作为一种结构简单的非蛋白质氨基酸,能诱导马铃薯、番茄、烟草、辣椒、花椰菜、黄瓜和向日葵等多种植物产生对多种病原菌的抗性,是一种极具潜力的植物化学诱抗剂^[2-3]。BABA所诱导抗病性具有特异性(pathosystem-specific),不同的植物所需BABA处理的浓度和时间各不相同。2 mmol·L⁻¹浓度的BABA处理番茄植株3 d后能诱导番茄产生对*P. infestans*的抗性^[4]; 1 mmol·L⁻¹浓度的BABA处理辣椒植株4 d,能诱导辣椒对疫霉病产生抗性^[5]; 0.25 mmol·L⁻¹浓度BABA预处理1 d即能诱导葡萄对霜霉菌的局部和系统抗性^[6]。Si-ammour等^[7]的结果显示,BABA能够诱导感病马铃薯和拟南芥产生对*P. infestans*的抗性,而另一种诱抗剂苯并噻二唑(BTH)则没有诱抗效果。到目前为止,关于BABA对植物的诱抗机理还不清楚。本研究以马铃薯水平抗性为材料,采用成株活体喷洒不同浓度的BABA,诱导不同时间后取样,然后离体叶片在室

内接种晚疫病菌,观察和记载不同浓度和诱导时间的马铃薯叶片的抗性水平变化,以期对BABA诱导的马铃薯晚疫病抗性有一个动态了解,选出适宜的诱抗浓度和诱导时间组合,便于开展诱导抗性基因表达的系统研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料、β-氨基丁酸及晚疫病病原菌

供试材料为马铃薯水平抗性品系LBR-2,由国际马铃薯中心(CIP)惠赠(CIP Code 386209.10),该品系具有中等晚疫病田间抗性。

β-氨基丁酸购自Sigma公司,用无菌蒸馏水配制成所需的浓度。

晚疫病病原菌是由生理小种1、3、4、1.3组成的混合小种,保存在燕麦培养基(6%燕麦片、2%蔗糖和1.5%琼脂粉)中,使用前在感病的块茎薄片上活化。

1.2 试验方法

1.2.1 材料种植

将马铃薯块茎播种于塑料钵(20 cm×25 cm)中,在温室中培养,出苗后进行施肥和灌水等日常管理。材料共种植150钵,50钵为一个重复。

1.2.2 β-氨基丁酸处理方法

出苗生长7周后,从每个重复中挑选长势基本一致、健康无伤害的植株40钵用于β-氨基丁酸处理。将β-氨基丁酸配置成0.5、1、2、4 mmol·L⁻¹

收稿日期: 2007-07-31

基金项目: 国家自然科学基金(30471100)

作者简介: 李亚军(1980-),女,博士研究生,主要从事马铃薯晚疫病抗性相关的研究。

的浓度, 用小喷壶喷洒在叶片上, 形成均匀的薄水雾即可, 以清水处理为对照, 每一浓度每次喷洒 2 钵植株。β 氨基丁酸处理时间分别为取样前 4 d、3 d、2 d 和 1 d。最后在同一天取样并接种晚疫病病原菌。

1.2.3 接种方法

接种前, 用蒸馏水将块茎薄片上培养的晚疫病病原菌孢子囊洗入烧杯中, 4℃ 冰箱中放置 3~4 h 促使游动孢子释放, 然后用 1~2 层纱布过滤、镜检, 将孢子浓度调至约 2×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。取对照和氨基丁酸处理的马铃薯植株顶端以下第 3~4 片充分展开的复叶, 移至室内。每个处理取 10 片单叶放入铺有湿滤纸的塑料筐中, 于每片单叶叶背主脉左右各滴 10 μL 游动孢子悬浮液。塑料筐盖上塑料薄膜用于保湿。

1.2.4 病情调查

接种 48、60、72 h 后, 分别观察叶片发病情况, 将病斑在 3 个时间点的发展情况用病害发展曲线下面积 (The area under the disease progress curve, AUDPC) 来描述, 这一参数能够有效描述病情发展累积情况。发病越严重, AUDPC 越大。其计算公式如下:

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Y_i 为接种后 i 观察时间叶片发病面积。本研究中 t_i 值分别为 48、60 和 72。

依据公式对每个处理的原始数据进行计算。

1.2.5 统计分析

以上方法从材料种植开始, 3 次重复。以 SAS 软件进行邓肯新复极差法多重比较。

2 结果与分析

2.1 马铃薯植株叶片接种后 AUDPC 的方差分析

计算 AUDPC 值, 各数值列于表 1。选用 SAS 软件的 Anova 程序, 按双因素随机区组设计进行方差分析, 各参数列于表 2。

从表 2 中可以看出: BABA 不同浓度处理间 AUDPC 值差异达到极显著水平, 预示只有 BABA 达到一定浓度后才能有效诱导马铃薯产生抗性。AUDPC 值在预处理天数之间也存在极显著差异, 表明预处理时间对 BABA 诱导产生抗性有很大的影响。预处理浓度与预处理时间的交互作用差异不显著, 表明在本试验中, BABA 预处理浓度与预处理时间之间没有明显的互作效应。

表 1 离体叶片接种发病曲线下面积 (AUDPC)

($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

BABA 处理时间 (d)	不同 BABA 浓度处理的 AUDPC														
	0 (CK)			0.5			1			2.0			4.0		
1	415	743	583	434	898	471	360	775	695	363	520	635	620	599	665
2	395	753	678	310	875	722	296	568	621	244	383	595	275	410	427
3	374	682	656	372	700	422	256	420	727	48	120	312	111	245	260
4	371	766	691	431	505	577	265	367	434	67	135	200	460	151	216

表 2 不同浓度 β 氨基丁酸和不同处理时间
双因素方差分析

变异来源	DF	SS	MS	F 值	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
区组间	2	768 384.40				
处理时间	3	446 704.98	148 901.66	14.02**	2.85	4.34
处理浓度	4	925 776.57	231 444.14	21.79**	2.62	3.86
处理时间 × 处理浓度	12	237 730.77	19 810.90	1.87	2.02	2.69
误差	38	403642.93	10622.18			
总变异	59	2782239.65				

2.2 预处理浓度对 β 氨基丁酸诱导抗性的影响

利用邓肯新复极差法对 β 氨基丁酸预处理浓度进行多重比较, 结果列于表 3。0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 BABA 预处理马铃薯植株后接种病原菌, 发现与对照之间差异不显著; 当预处理浓度达到 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, AUDPC 值从 592 下降到 482, 与 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度处理之间差异不显著, 但与对照相比差异达到显著水平; 当预处理浓度增加到 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, AUDPC 值继续下降到 310 和 294, 与对照之间的差异达到极显著水平。该结果表明, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

BABA 预处理已能显著提高马铃薯供试材料 LBR-2 对 *P. infestans* 的抗性。而 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ BABA 预处理能够极显著提高 LBR-2 的抗性。

表 3 β-氨基丁酸预处理浓度的多重比较

预处理浓度 ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	AUDPC 平均值	差异显著性	
		0.05	0.01
CK	592	a	A
0.5	560	ab	A
1.0	482	b	A
2.0	310	c	B
4.0	294	c	B

2.3 预处理时间对 β-氨基丁酸诱导抗性的影响

β-氨基丁酸不同预处理时间下的 AUDPC 值进行多重比较结果列于表 4。BABA 预处理 1 d 和 2 d, AUDPC 差异不显著。当 BABA 预处理 3 d 和 4 d, AUDPC 值分别下降到 381 和 348, 与预处理 1 d 和 2 d 相比达到了极显著水平。表明预处理 3 d 后, BABA 已经有效诱导马铃薯产生抗性。

表 4 β-氨基丁酸预处理时间的多重比较

预处理时间 (d)	平均值 (AUDPC)	差异显著性	
		0.05	0.01
1	558	a	A
2	503	a	A
3	381	b	B
4	348	b	B

2.4 不同处理浓度和不同处理时间对 β-氨基丁酸诱导马铃薯晚疫病抗性的影响

从前述方差分析结果得知 BABA 预处理浓度与预处理时间之间没有明显的互作效应, 因此本试验中, $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ BABA 预处理 LBR-2 植株 3 d 和 4 d, 能极显著诱导 LBR-2 产生抗性。β-氨基丁酸诱导 LBR-2 产生抗性需要一定时间, 从图 1 中可以看出, 随着预处理时间的延长和预处理浓度的增加, AUDPC 值逐渐下降, 即植株对 *P. infestans* 的抗性逐渐增强, $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 BABA 预处理 3 d 和 4 d 后, AUDPC 值明显低于对照。

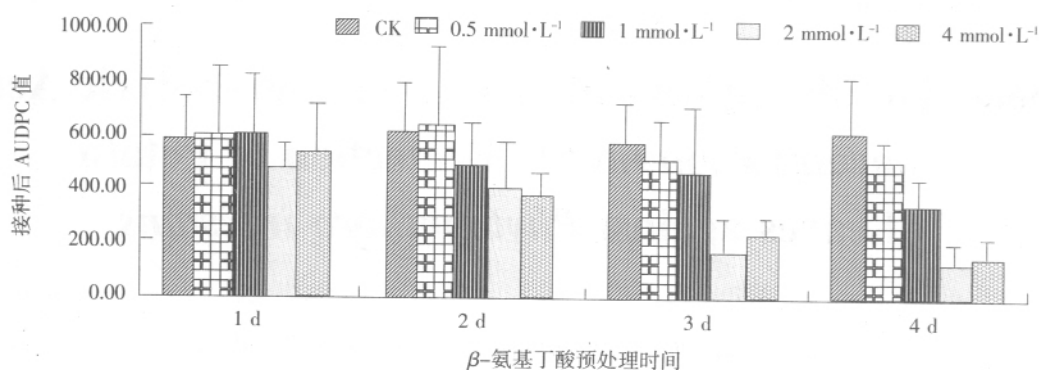


图 1 不同 BABA 处理浓度和不同诱导时间对马铃薯晚疫病抗性的影响(误差线为 SD 值)

3 讨论

植物诱导抗病性具有广谱、抗性持久且稳定、无污染等特点。利用植物自身的防卫体系, 提高抗病害能力是植物病害防治的一种新思路^[8]。β-氨基丁酸是一种对环境安全的非蛋白氨基酸, 已有研究表明 BABA 能诱导多种植物对多种病原菌的抗性^[9], 研究其诱导抗性产生的机理对于深入了解植物诱导抗性具有重要意义。华中农业大学马铃薯实验室已经开始探索 BABA 诱导马铃薯产生晚疫病抗性的机理研究。选取合适的 BABA 浓度和处

理时间对于诱导机理研究十分必要。本试验结果显示 $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $4.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ BABA 预处理马铃薯植株 3 d 和 4 d 后接种, LBR-2 株系离体叶片的晚疫病抗性显著提高。Olivieri 等^[10]利用感病品种 Bintje 和较高水平抗性的品种 Pampeana, 研究了 BABA 对马铃薯晚疫病田间诱抗的效果, 表明 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ BABA 处理的叶片对晚疫病抗性表现最强, BABA 接种 3 d 后的叶片抗性水平最高。本研究离体叶片接种诱抗结果与 Olivieri 等的田间诱抗结果一致。作为一种用途广泛的植物化学诱抗剂, 目前对 BABA 的认识还停留在诱导抗性这一现象的

观察, 其诱导抗病性的机理有待深入研究。考虑到浓度较高时BABA 可能也会对叶片具有伤害作用^[6], 因此, 可以认为选择 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ BABA 处理叶片, 是研究 BABA 诱导抗性研究的适宜浓度。

[参 考 文 献]

- [1] 宋伯符, 谢开云. CIP 的全球晚疫病防治倡议与我国的参与[J]. 马铃薯杂志, 1997, 11(13) : 51- 58.
- [2] Jakab G, Cottier V, Toquin V, et al. β aminobutyric acid- induced resistance in plants[J]. Eur J Plant Pathol, 2001, 107: 29- 37.
- [3] Cohen Y R. β aminobutyric acid- induced resistance against plant pathogens[J]. Plant Dis, 2002, 86: 448- 458.
- [4] Cohen Y, Gisi U. Systemic translocation of 14C DL- β aminobutyric acid in tomato plants in relation to induced resistance against *Phytophthora infestans*[J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1994, 45: 441- 446.
- [5] Hwang B K, Sunwoo J Y, Kim Y J, et al. Accumulation of β 1, β - glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL - β - amino butyric acid - induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici* [J]. Eur J Plant Pathol, 1997, 107: 29- 37.
- [6] Cohen Y, Reuveni M, Baider A. Local and systemic activity of BABA (DL- 3- aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevines[J]. Eu J Plant Pathol, 1999, 105: 351- 361.
- [7] Si- ammou L- 1our A, Mauch- mani B, Mauch F. Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker: β - Aminobutyric acid but not BTH protects potato and *Arabidopsis* from infection [J]. Mol Plant Pathol, 2003, 4: 237- 248.
- [8] 李惠霞, 谢丙炎, 冯兰香. 植物化学诱抗剂的研究现状与展望[J]. 园艺学报, 2000, 27(增刊) : 539- 545.
- [9] 杨宇红, 陈霄, 谢丙炎. β 氨基丁酸诱导植物抗病作用及其机理[J]. 农药学报, 2005, 7(1) : 7- 13.
- [10] Olivieri F P, Lobato M C, Gonzalez A E, et al. Enhancement of potato defense mechanisms by BABA in multigenic resistance potato cultivars. Systemic response against *Phytophthora* and *Fusarium* [J]. Pest Manag Sci, 2006, 62(2): 162- 170.

Selection of Appropriate DL - β amino- butyric Acid Concentration on the Protection of Potato Leaves against *Phytophthora infestans*

Li Yajun, Tian Zhendong, Liu Jun, Xie Conghua

(National Center for Vegetable Improvement (Central China Branch); Potato Engineering and Technology Research Center of Hubei Province; Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: As a non- protein amino acid, DL - β amino- butyric acid (BABA) protects numerous plants against various pathogens. In this study, potato plants were sprayed with different BABA solutions ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). The detached leaves from the plants treated with BABA for 1, 2, 3 and 4 days were collected and used for inoculation with *Phytophthora infestans* separately. The results showed that the resistant level of potato leaves was enhanced with the increase of BABA concentration from 0.5 - $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and the days after BABA treatment from 1- 4 d. Pre- treatment of potato plants with BABA ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) three days before pathogen inoculation induced a significantly higher level of resistance to *P. infestans* compared with the control.

Key Words: potato; DL- β amino- butyric acid; late blight; induced resistance