

植物保护



海藻糖增强烟草对普通花叶病的抗性及其机理的初步分析

石永春¹, 刘金燕¹, 王小彦², 陈芊伊¹, 王潇然¹, 刘卫群¹

1 河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002;

2 遵义市烟草公司技术中心, 遵义 563000

摘要: 【目的】明确海藻糖能否增强烟草对烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 病的抗性。【方法】采用半叶枯斑法、组织化学染色法、qPCR 等技术分析海藻糖对 TMV 钝化、预防和抑制的效果, 海藻糖处理后烟叶中活性氧的含量和渗透调节物质的含量、抗氧化酶活性变化, 相关抗氧化和抗病基因的表达变化。【结果】海藻糖能够钝化 TMV, 对花叶病有治疗和预防的效果。海藻糖处理 24 h 后, 烟叶中 H₂O₂ 和脯氨酸含量升高, POD 和 SOD 活性下降, APX 和编码 NADPH 氧化酶亚基基因的表达水平升高, 抗病基因 PR、N-LIKE 基因和 NiEIG-48 表达增加。海藻糖处理未影响烟株的正常生长。【结论】认为海藻糖可能通过提高叶片中的 H₂O₂ 含量, 激活抗病基因表达而增强烟草对 TMV 的抗病性。

关键词: 海藻糖; TMV; 抗病性; H₂O₂; PR

引用本文: 石永春, 刘金燕, 王小彦, 等. 海藻糖增强烟草对普通花叶病的抗性及其机理的初步分析 [J]. 中国烟草学报, 2017, 23 (3)

烟草花叶病毒 (*Tobacco Mosaic Virus*, TMV) 属烟草花叶病毒属 (*Tobamovirus*), 其导致的烟草普通花叶病是栽培中的常见病害。与其他病原物一样, TMV 侵染也会诱导植物出现系统获得性抗性 (systemic acquired resistance, SAR) [1]。而小分子化合物可以模仿 SAR 过程, 诱导病程相关 (pathogenic-related, PR) 蛋白增加, 从而为植物提供广谱、长效的抗性 [2-3], 并可能引起代谢或形态学上的改变 [4]。面对当前抗病品种有限、育种滞后的现实, 挖掘利用烟草自身产生的抗性分子, 增强烟株对烟草花叶病的抗性, 对烟草栽培具有重要的理论和实践意义。

海藻糖 (trehalose) 是一种非还原性二糖, 由两分子葡萄糖以 α - α -(1 → 1) 糖苷键连接而成, 在植物界广泛存在。最早于 1832 年在黑麦中发现。2007 年 Karim 等证明烟草中也存在海藻糖, 浓度可达到 10 μ g/g (鲜重) [5]。

海藻糖参与植物的生物与非生物胁迫响应。如 Schluepmann 等用 30 mM 海藻糖处理拟南芥, 诱导防御相关的转录因子 WRKY6 和 PR 蛋白、 β -1,3-葡聚糖酶基因的表达增加 [6]。Renard-Merlier 等用海藻糖处理小麦, 导致对小麦对白粉病抗性的增加 [7]。

Isidorov 等发现, *Armillaria ostoyae* 侵染欧洲赤松后, 根中的海藻糖含量增加 [8]。Luo 等发现热胁迫下, 海藻糖能减少小麦叶片中的 ROS 含量, 且具有浓度效应 [9]。da Costa 等用 10% 海藻糖处理酵母细胞后, 增加对 H₂O₂ 的耐受性 [10]。

在烟草中, 有关海藻糖的研究较少, 且大多集中在逆境胁迫方面。如外源海藻糖处理可增加烟苗对于旱胁迫的抗性 [11]。将拟南芥海藻糖 -6-P 合成酶转化烟草, 获得了较高的对镉和铜的耐受性 [12]。将海藻糖 -6-磷酸合成酶基因转化烟草, 发现将转基因烟株具有较强的盐胁迫耐受性 [13]。而外源海藻糖能否增加烟草对花叶病的抗病性, 机理如何? 对烟草后期的生长是否有影响? 还未见相关报道。本文报道了海藻糖处理后烟草中抗病相关的基因表达、生理生化和植物性形态指标的变化, 为栽培上利用海藻糖提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料和处理

实验材料为烟草 K326 (*Nicotiana tabacum* cv. K326), 温室常规栽培至 8 叶期, 生长期间无胁迫。

基金项目: 遵义市烟草公司科技项目 (201506)

作者简介: 石永春 (1978—), 博士, 副教授, 主要研究烟草逆境生理, Tel: 0371-63555790, Email: shiyongchun369@gmail.com

收稿日期: 2016-12-01; **网络出版日期:** 2017-03-14

海藻糖 (Amresco) 为分析纯, 纯度 99.8%。

盆栽处理方式: 将海藻糖溶于水后配置为 1、2、3 mM 的处理液, 均匀喷施于 8 叶期烟草, 对照喷施清水, 每棵苗喷施 50 mL, 24 h 后, 取 6、7 片叶 (自下而上) 用于酶活性、丙二醛、脯氨酸和可溶性糖含量、组织化学染色、以及 qPCR 实验分析。

大田处理方式: 10 mM 的海藻糖溶于水后喷施 8 叶期烟苗, 对照为水喷施, 每棵喷施 50 mL 至叶片湿润。24 h 后移入大田, 常规栽培。

1.2 实验方法

1.2.1 过氧化物酶 (peroxidase, POD) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性按照 Pandolfini 的方法测定^[14]。

1.2.2 丙二醛 (MDA) 含量按照 Carmak and Horst 的方法测定^[15]。脯氨酸含量参照张殿忠等的方法测定^[16]。可溶性糖含量参照 Baxter 的方法进行^[17]。

1.2.3 组织化学染色: 超氧阴离子按照 Kim 的方法进行^[18], H₂O₂ 组织化学染色按照 Fotopoulos 的方法进行^[19]。

1.2.4 病毒钝化检测

(1) 普通烟草花叶病 (TMV) 病毒粗提纯。参照欧阳本友的方法对烟草花叶病毒进行粗提纯^[20]。

(2) 对 TMV 的抑制作用测定。

①钝化实验。采用半叶枯斑法^[21], 用摩擦接种法对心叶烟左半叶接种病毒与清水等体积混合液, 右半叶接种不同浓度海藻糖 (1、2、3 mM) 和病毒等体积混合液, 每个处理接种 10 个叶片, 5 d 后统计枯斑数目, 并计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{左半叶枯斑数} - \text{右半叶枯斑数}}{\text{左半叶枯斑数}} \times 100\%$$

②治疗实验。对心叶烟全叶均匀接种病毒, 24 h 后, 左半叶均匀涂抹清水, 右半叶涂抹不同浓度海藻糖。每处理重复 5 个叶片, 5 d 后统计枯斑数目并计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{左半叶枯斑数} - \text{右半叶枯斑数}}{\text{左半叶枯斑数}} \times 100\%$$

③预防实验。对心叶烟全叶涂抹不同浓度海藻糖, 对照全叶涂抹清水, 24 h 后, 均匀接种病毒。每处理重复 5 个叶片, 5 d 后统计枯斑数目并计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照叶枯斑数} - \text{海藻糖处理叶枯斑数}}{\text{对照叶枯斑数}} \times 100\%$$

1.2.5 qPCR: RNA 的提取参照康为世纪植物 RNA 提取试剂盒 (CW0588) 说明书进行, 样品 RNA 的反转录参照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司) 说明书进行。qPCR 的体系及反应条件按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司) 说明书进行。引物设计如下表所示:

1.2.6 数据处理和统计方法

试验数据采用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析, 由 one-way ANOVA 法分析均值差异的显著性, 显著性水平 $P < 0.05$, 以 * 表示其差异性, 显著性水平 $P < 0.01$, 以 ** 表示其差异性; 采用 Excel 2007 软件绘图制表。

表 1 引物设计
Tab.1 Primer design

名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
<i>Actin</i> (内参)	GGAAACATCGTCCTTAGTGGTG	AATCCAGACACTGAACTTGCGT
<i>AUXIN</i>	TTTGGTGGTTGGGCTAGTATGC	TGGGGTGGGGAATTGTTTAGG
<i>PIN</i>	TACAGGCAGCTCTACCGCAAGG	CAGTGTTATCGGCAACGCAATC
<i>NtEIG48</i>	GAAAATGGCTGATATTCCACCTG	GTTTACGTGCTGGACATCCTCTTAC
<i>N-like</i>	GACTACGTTCTAAGAAGGTCCTAATTGTGC	CACCAAACCAATCAAGATCACCTGC
<i>PR-1a</i>	GTTGAGATGTGGGTCGATGAG	AGTTACGCCAAACCACCTGAG

2 结果与分析

2.1 海藻糖对烟草花叶病抗性的影响

采用半叶枯斑法初步分析海藻糖对 TMV 的抑制效果, 结果显示 (表 2、3、4), 海藻糖对 TMV 有

钝化、抑制增殖和预防的效果, 且都具有浓度效应, 最高钝化效果、复制增殖抑制率和预防效果分别可达 22.13%、39.43% 和 47.19%。

表 2 海藻糖对 TMV 的体外钝化效果

Tab.2 *in vitro* deactivation effects on trehalose to TMV

海藻糖 /mM	左半叶总枯斑数	右半叶总枯斑数	抑制率 /%
1	490	428	12.65
2	514	414	19.46
3	506	394	22.13

表 3 海藻糖对 TMV 的治疗效果

Tab.3 Therapy effects of trehalose on TMV

海藻糖 /mM	左半叶总枯斑数	右半叶总枯斑数	抑制率 /%
1	404	319	21.04
2	432	330	23.61
3	421	255	39.43

表 4 海藻糖对 TMV 的预防效果

Tab.4 Prevention effects of trehalose on TMV

海藻糖 /mM	对照叶总枯斑数	海藻糖处理叶总枯斑数	抑制率 /%
1		504	16.83
2	606	418	31.02
3		320	47.19

2.2 海藻糖对烟草叶片抗氧化能力的影响

植物的抗病性和活性氧之间关系密切。喷施海藻糖 24 h 后, 烟草叶片中 POD 和 SOD 酶活性 (图 1A、B) 降低, *APX*、*rbohD* 和 *rbohF* 的表达水平 (图 1E) 增加, 叶片中的 MDA (图 1C)、 H_2O_2 和超氧阴离子 (图 1D) 含量增加, 但没有明显的浓度效应。

2.3 海藻糖对烟草叶片渗透调节能力的影响

喷施海藻糖 24 h 后, 叶片中的脯氨酸含量 (图 2A) 增加, 且与海藻糖浓度呈正相关。但海藻糖对叶片中可溶性糖含量 (图 2B) 的影响不大。

2.4 海藻糖对烟叶抗病基因表达的影响

qPCR 检测显示, 海藻糖处理后, 烟草叶片中的 *PR-1a* (图 3A)、*N-LIKE* 基因 (图 3B) 和 *NtEIG-48* (图 3C) 的表达水平均明显升高。其中 *PR-1a* 的表达水平增加最多, 最多可达到对照水平的 100.13 倍 (2 mM 海藻糖处理); *N-LIKE* 基因最多可增加至对照的 2.62 倍 (3 mM 海藻糖处理); *NtEIG-48* 可增加至对照的 2.25 倍 (3 mM 海藻糖处理)。证明叶面喷施海藻糖对烟叶的抗病性具有明显的增强作用。

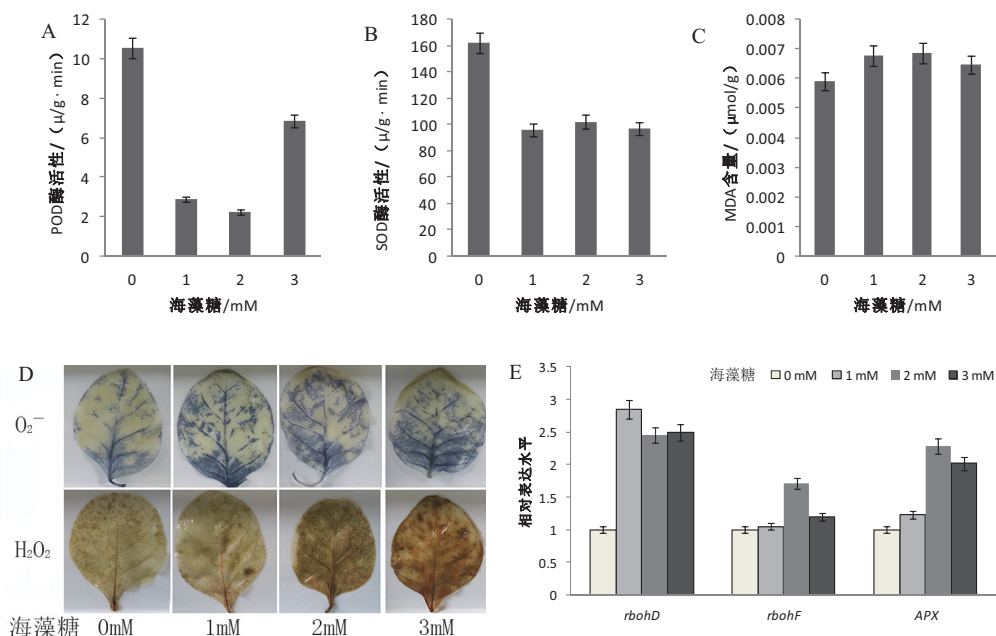


图1 喷施海藻糖对烟草叶片中 ROS 和抗氧化酶的影响

Fig.1 Effects of trehalose on ROS contents and antioxidant enzyme activities in tobacco leaves

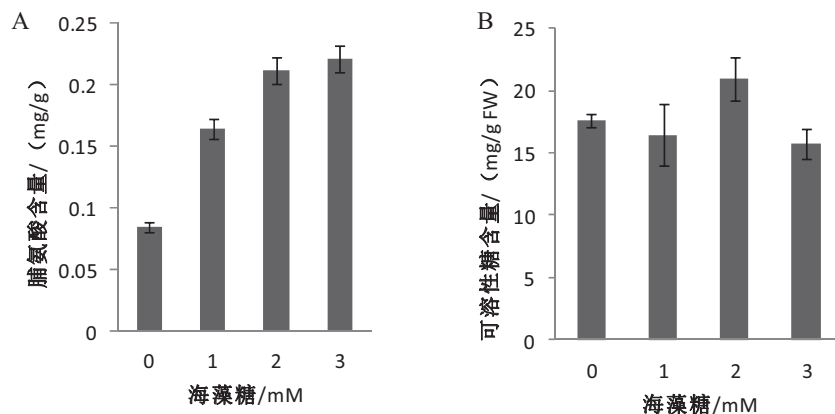


图2 海藻糖对烟草叶片中脯氨酸和可溶性糖含量的影响

Fig.2 Effects of trehalose on contents of proline and soluble sugar in tobacco leaves

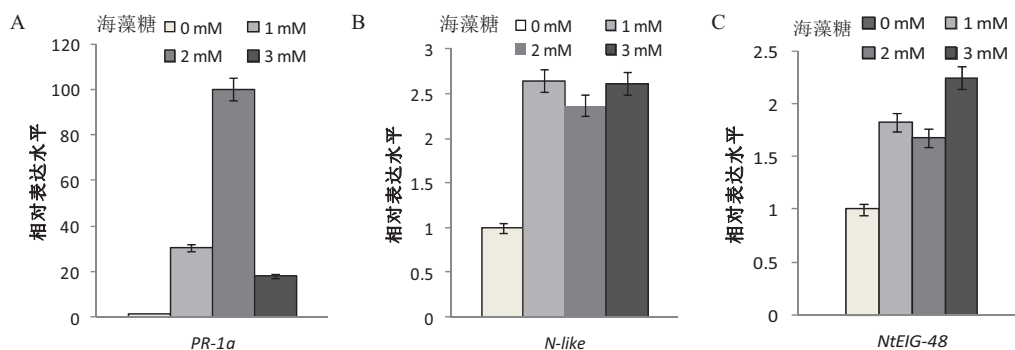


图3 海藻糖对烟叶中抗病相关基因表达的影响

Fig.3 Effects of trehalose on expression levels of disease resistance-related genes in tobacco leaves

2.5 海藻糖对烟草生长和后期农艺性状的影响

海藻糖处理 24 h 后, 烟草叶片中的 *PIN* (图 4A) 和 *AUX* (图 4B) 的表达水平都增加, 分别最多增加至对照水平的 8.19 倍 (2 mM 海藻糖处理) 和 9.17 倍 (3 mM 海藻糖处理)。但由于烟草中 IAA 的转运受多基因的控制, 故而海藻糖处理对叶片中 IAA 含量的影响还需研究。

为进一步明确海藻糖对烟草生长的长期效果, 将喷施了 10 mM 海藻糖的烟苗移栽入大田, 60 d 和 90 d (打顶后) 时监测农艺性状, 结果 (表 5) 显示, 海藻糖处理后, 烟株的茎围、最大叶长、最大叶宽在 60 d 和 90 d 时都高于对照。但在 60 d 时, 海藻糖处理的株高低于对照, 叶片数仅比对照高 0.35 片, 但打顶后 (90 d), 海藻糖处理的株高高于对照, 且叶片数也比对照多 2.85 片。由于是在移栽后 75 d 同时

打顶, 这些数据说明海藻糖处理可能促进了烟草的营养生长, 且可能通过促进后期 (打顶后) 上部叶开片而增加有效叶片数。

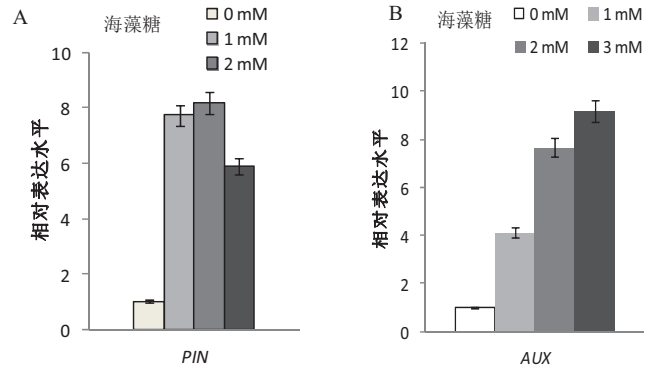


图 4 海藻糖对烟叶中 IAA 转运基因表达的影响

Fig.4 Effects of trehalose on expression levels of IAA transport genes

表 5 海藻糖处理对烟草农艺性状的影响

Tab.5 Effects of trehalose on agronomic traits of tobacco

试验	株高 /cm	茎围 /cm	最大叶长 /cm	最大叶宽 /cm	叶片数 / 片	
60 d	对照	181.05	8.46	77.80	30.23	22.15
	处理	178.24*	9.12**	81.42**	32.66**	22.50*
90 d	对照	154.77	8.92	80.07	33.92	17.75
	处理	168.30**	9.36 *	83.01 **	34.85 **	20.60 **

3 讨论

生物或非生物胁迫都能诱导植物产生活性氧, 并导致膜脂或生物大分子的过氧化, 而后启动抗氧化反应。但海藻糖对活性氧的作用却存在两种相反的报道, 一是激活活性氧的产生。如 Gao 等发现, 外源海藻糖处理蚕豆叶片 24 h, 导致保卫细胞中 H_2O_2 的积累, 并与海藻糖浓度呈正相关^[22]。二是消除活性氧。如海藻糖处理后的小麦, 热激诱导的 ROS 含量显著低于对照, 并与海藻糖的浓度呈负相关^[9]。海藻糖预处理后的水稻, 盐胁迫下也有类似效果^[23]。POD、SOD 和抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 是植物细胞中负责清除活性氧的主要酶类^[24]。质膜上的 NADPH 氧化酶对活性氧的产生具有重要作用, *rbohD* 和 *rbohF* 编码 NADPH 氧化酶的两个重要亚基^[25]。本研

究的结果与 Gao 的一致, 都证明海藻糖处理后 24 h, SOD 和 POD 酶活性下降、叶片中 H_2O_2 积累。同时还发现叶片中超氧阴离子含量增加, 以及 *rbohD/F* 表达水平的上调。这些数据都支持海藻糖处理后 24 h, 叶片中 ROS 增加。

N 基因通过结合 TMV 的解螺旋酶诱发超敏反应, 抑制 TMV 对烟草的侵染^[26]。*N-LIKE* 基因是 *N* 基因的同源基因^[27], 在烟草中以基因家族的形式存在, 目前仅有少数 *N-like* 基因的结构和功能比较清楚。Gao 等在 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN (抗性) 中克隆到两个 *N-like* 基因——*NL-C26* and *NL-B69*, 发现他们在 Samsun NN 和 Samsun nn (易感) 中都表达, 但在 Samsun nn 中并不引起超敏反应^[27]。烟草 K326 易感 TMV, 通过 qPCR 也检测到了 *N-like* 基因的表达,

并发现其对海藻糖有响应,这能否证明海藻糖能增加K326对TMV的抗性,还有赖于*N-like*基因的深入研究。

脯氨酸不仅是渗透调节物质,还与植物对病毒的抗性有关^[28-29]。检测黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)侵染前后的胡椒,发现对CMV有抗性的品种叶片中脯氨酸含量远高于易感品种;而CMV侵染后,易感品种叶片中的脯氨酸含量大幅升高,而抗性品种叶片中脯氨酸含量变化不大^[28]。类似的结果在TMV侵染的胡椒叶片中也有发现^[29]。*PR-1a*是编码病程相关蛋白基因^[30],*NtEIG-48*是烟草中响应病害的WRKY转录因子^[31],它们都与植物对病毒的抗性密切相关^[29-31]。海藻糖处理引起叶片中脯氨酸含量的增加(图2-A),与*PR-1a*、*NtEIG-48*表达水平的增加一起,证明海藻糖的确增强了烟叶对病毒的抗性。*PR-1a*和*NtEIG-48*对病毒或病原菌的提取物都有响应^[29-31],因此,海藻糖是否对其他病害也有抗性,尚需更广泛深入的研究。

生长素对植物的营养生长非常重要。*PIN*和*AUX*分别编码生长素IAA的外向和内向转运体蛋白^[32-33]。本研究首次报道了海藻糖处理增加烟叶中*PIN*和*AUX*的表达水平。由于TMV的复制酶和IAA响应蛋白之间存在互作^[34],且IAA含量增加可能促进TMV对烟草的侵染^[35],海藻糖处理后叶片中IAA浓度究竟如何,还需要更多的分析。

大田实验结果显示,海藻糖处理后的烟苗,茎围、最大叶长和最大叶宽都高于对照,打顶后有效叶片数也多于对照。表明海藻糖不仅能增加烟株的抗病性,且对农艺性状影响不大,还可促进烟株健壮生长。

4 结论

本研究通过半叶枯斑法,发现海藻糖具有钝化TMV、治疗和预防普通花叶病的作用。初步分析了其内在机理,认为海藻糖可能通过诱导烟叶中活性氧的产生,增加渗透调节物质,激活细胞内的抗性基因的表达,从而增强烟草对花叶病的抗性。同时还发现,海藻糖能够抑制烟叶中的IAA外流,促进烟叶的营养生长;大田施用海藻糖还具有增加烟株茎围、叶长、叶宽和有效叶片数的长期效果。

作为一种新型内源性生长调节剂,海藻糖具有无污染不残留、有效增强烟草抗病性、且不影响烟株正

常生长的特点,有望在栽培上使用。若能进一步研究海藻糖对烟草其他病害的抗性、对烟叶中IAA和内容的含量、以及对大田烟叶产量的影响,将为烟草栽培提供更多参考数据。

参考文献

- [1] Durrant W E, Dong X. Systemic acquired resistance[J]. Annu Rev Phytopathol, 2004, 42(4): 185-209.
- [2] Oostendorp M, Kunz W, Dietrich B, et al. Induced disease resistance in plants by chemicals[J]. Eur J Plant Pathol, 2001, 107(1): 19-28.
- [3] Gozzo F. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(16): 4487-4503.
- [4] Gozzo F, Faoro F. Systemic acquired resistance (50 years from discovery): moving from the lab to the field[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(51): 13473-13491.
- [5] Karim S, Aronsson H, Ericson H, et al. Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose[J]. Plant Mol Biol, 2007, 64(4): 371-386.
- [6] Schluempmann H, Van D A, Aghdasi M, et al. Trehalose mediated growth inhibition of Arabidopsis seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation [J]. Plant Physiol, 2004, 135(2): 879-890.
- [7] Renard-Merlier D, Randoux B, Nowak E, et al. Iodur 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction[J]. Phytochemistry, 2007, 68(8): 1156-1164.
- [8] Isidorov V A, Lech P, Żółciak A, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of metabolites from the needles and roots of PIN1e seedlings at early stages of pathogenic fungi Armillaria ostoyae attack[J]. Trees, 2008, 22(4): 531-542.
- [9] Luo Y, Li W M, Wang W, et al. Trehalose: protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress[J]? Environ Exp Bot, 2008, 63(1-3): 378-384.
- [10] da Costa M N D, da Silva CG, Mariani D, et al. The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1780(12): 1408-1411.
- [11] 张建波, 王莎莎, 郝大海, 等. 干旱和低温胁迫影响烟草幼苗海藻糖代谢的差异比较 [J]. 生物技术通报, 2015, 31(10): 111-118.
ZHANG Jianbo, WANG Shasha, HAO Dahai, et al. Comparison of metabolic differences of trehalose in Nicotiana tabacum seedlings under drought and chilling

- stress [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(10): 111-118.
- [12] Martins L L, Mourato M P, Baptista S, et al. Response to oxidative stress induced by cadmium and copper in tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) engineered with the trehalose-6-phosphate synthase gene (*AtTPS1*) [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36(3):755-765.
- [13] 郭蓓, 胡磊, 何欣, 等. 海藻糖-6-磷酸合成酶转基因烟草提高耐盐性的研究 [J]. *植物学通报*, 2008, 25(1):41-49. GUO Bei, HU Lei, HE Xin, et al. Trehalose-6-phosphate synthase transgenic tobacco enhanced tolerance to salt stress [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2008, 25(1):41-49.
- [14] Pandolfini T, Gabbrielli R, Comparini C. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L [J]. *Plant, Cell Environ*, 1992, 15(6): 719-725.
- [15] Cakmak I, Horst W J. Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxidodismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycinemax*) [J]. *Physiol Plant*, 1991, 83(3): 463-468.
- [16] 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法 [J]. *植物生理学通讯*, 1990, 4: 62-65. ZHANG Dianzhong, WANG Peihong, ZHAO Huixian. Determination of the content of free proline in wheat leaves [J]. *Plant physiology communication*, 1990, 4: 62-65.
- [17] Baxter C J, Quick W P. Elevated sucrose phosphate synthase activity in transgenic tobacco sustains photosynthesis in older leaves and alters development [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54(389): 1813-1820.
- [18] Kim M S, Kim H S, Kim Y S, et al. Superoxide anion regulates plant growth and tuber development of potato[J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(10): 1717-1725.
- [19] Fotopoulos V, De Tullio M C, Barnes J, et al. Altered stomatal dynamics in ascorbate oxidase over- expressing tobacco plants suggest a role for dehydroascorbate signaling [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(4): 729-737.
- [20] 欧阳本友. 烟草花叶病毒提纯的改良程序 [J]. *植物学通报*, 1985, 3(4): 57. OYANG Benyou. Modification of the Method of Purification of TMV [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 1985, 3(4): 57.
- [21] 陈启建, 刘国坤, 吴祖建, 等. 大蒜精油对烟草花叶病毒的抑制作用 [J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2005, 34(1):30-33. CHEN Qijian, LIU Guokun, WU Zujian, et al. The inhibiting effect of volatile oil extracted from *Allium Satuvum* L. on Tobacco masaic virus [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (natural science edition)*, 2005, 34(1):30-33.
- [22] Gao J, Wang N, Xu S S, et al. Exogenous application of trehalose induced H₂O₂ production and stomatal closure in *Vicia faba* [J]. *Bio Plant*, 2013, 57 (2): 380-384.
- [23] Mostofa M G, Hossain M A, Fujita M. Trehalose pretreatment induces salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings: oxidative damage and co-induction of antioxidant defense and glyoxalase systems [J]. *Protoplasma*, 2015, 252(2): 461- 475.
- [24] Ray P D, Huang B W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling [J]. *Cell Signal*, 2012, 24(5): 981-990.
- [25] Bolwell G P, Bindschedler L V, Blee K A, et al. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53 (372): 1367-1376.
- [26] Wright K M, Duncan G H, Pradel K S, et al. Analysis of the N gene hypersensitive response induced by a fluorescently tagged tobacco mosaic virus [J]. *Plant Physiol*, 2000, 123(4): 1375-1386.
- [27] Gao J, Sasaki N, Kanegae H, et al. The TIR-NBS but not LRR domains of two novel N-like proteins are functionally competent to induce the elicitor p50-dependent hypersensitive response [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2007,71:78-87.
- [28] Petrova D, Chaneva G, Stoimenova E, et al. Effect of cucumber mosaic virus on the contents of chlorophyll, proline, the degree of lipid peroxidation and phenotypic expression of pepper lines with different susceptibility to virus [J]. *Oxidation Communications*, 2012, 35:182-189
- [29] Mandal R, Kathiria P, Psychogios N, et al. Progeny of tobacco mosaic virus-infected *Nicotiana tabacum* plants exhibit trans-generational changes in metabolic profiles [J]. *Biocatalysis & Agricultural Biotechnology*, 2012, 1(2):115-123
- [30] 商文静, 吴云锋, 赵小明, 等. 壳寡糖诱导烟草防御酶系活性变化及 *PR-1a* 基因表达研究 [J]. *植物病理学报*, 2010, 40(1): 99-102. SHANG Wenjing, WU Yunfeng, ZHAO Xiaoming, et al. Changes of defensive enzymes and PR-1a gene expression of tobacco induced by chito-oligosaccharides [J]. *Acta Phytophthologica Sinica*, 2010, 40(1): 99-102.
- [31] Takemoto D, Yoshioka H, Doke N, et al. Disease stress-inducible genes of tobacco: expression profile of elicitor-responsive genes isolated by subtractive hybridization [J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 118: 545-553.
- [32] Müller A, Guan C, Gälweiler L, et al. AtPIN12 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control [J]. *EMBO J*, 1998, 17(23): 6903-6911.

- [33] Swarup R, Friml J, Marchant A, et al. Localization of the AUX2in permease AUX21 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(20): 2648-2653.
- [34] Padmanabhan M S, Kramer S R, Wang X, et al. Tobacco mosaic virus replicase-auxin/indole acetic acid protein interactions: reprogramming the auxin response pathway to enhance virus infection [J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(5):2477-2485.
- [35] Colluma T D, Padmanabhan M S, Hsieh Y, et al. Tobacco mosaic virus-directed reprogramming of auxin/indole acetic acid protein transcriptional responses enhances virus phloem loading [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016:e2741.

Enhancing resistance to TMV of tobacco by exogenous trehalose and preliminary analysis of its mechanism

SHI Yongchun^{1*}, LIU Jinyan¹, WANG Xiaoyan², CHEN Qianyi¹, WANG Xiaoran¹, LIU Weiqun¹

¹ Life Science College, Henan Agricultural University, Zhengzhou, 450002, China;

² Technology Center, Zunyi Tobacco Company, Zunyi, 563000, China

Abstract: [Objective] The aim of current study was to determine the role of trehalose, an endogenous molecule of tobacco, played in enhancing resistance to tobacco mosaic virus (TMV) in tobacco. [Methods] Leaf lesion assay, histochemical stain and qPCR techniques were used to determine effects of trehalose on resistance to TMV and antioxidant system in tobacco. [Results] Trehalose could deactivate TMV, and induce preventive and therapeutic process in tobacco. Twenty-four hours after trehalose treatment of tobacco, levels of H₂O₂ and proline increased, activities of POD and SOD decreased, gene expression levels of *APX*, subunits of NADPH oxidase, *PR*, *N-like* and *NIIG-48* gene increased. Furthermore, agronomic traits were not impaired by trehalose treatment. [Conclusions] Trehalose increased TMV resistance in tobacco, probably through increasing H₂O₂ contents and activating expression of disease resistant genes.

Keywords: trehalose; TMV; disease resistance; H₂O₂; PR

Citation: SHI Yongchun, LIU Jinyan, WANG Xiaoyan, et al. Enhancing resistance to TMV of tobacco by exogenous trehalose and preliminary analysis of its mechanism [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2017, 23(3)

*Corresponding author. Email: shiyongchun369@gmail.com

更正启事

发表于本刊 2017 年第 23 卷第 2 期 37-41 页《施氮量对烤烟常规化学成分含量及主流烟气中 7 种有害成分释放量的影响》一文，由于作者校对疏忽，第六作者“喻宝华”名字出现错误。特此将第六作者更正为：喻保华
特此更正。

《中国烟草学报》编辑部