

防御酶系对山茶灰斑病诱导抗性的响应

李姝江¹ 朱天辉² 黄艳娜³

(1 四川农业大学农学院, 雅安 625014 2 四川农业大学林学院, 雅安 625014

3 四川农业大学森林保护省级重点实验室, 雅安 625014)

摘要: 为揭示水杨酸 (SA) 诱导山茶产生抗病性反应机制, 采用琼脂平板法测定了 SA 对山茶灰斑病菌 *Pestalotiopsis guenii* (Desm.) Stey 的影响。结果表明, 浓度为 0~5 mmol/L 的 SA 对该菌的生长没有抑制作用。用 SA 喷雾涂布叶片诱导山茶抗性, 其植株内过氧化物酶 (POD)、多酚氧化酶 (PPO)、过氧化氢酶 (CAT)、苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 等防御酶对山茶灰斑病菌诱导信号有不同响应。诱导并挑战接种处理的植株体内上述酶活性比只诱导不接种处理上升速度快, 不同浓度的 SA 诱导及诱导后挑战接种植株体内的 POD、PPO、CAT、PAL 活性与 SA 浓度呈正相关。各防御酶活性与感病指数的相关性分析表明, CAT 活性与感病指数显著负相关 ($r = -0.9730$), 除 PPO 与感病指数的相关系数很低外, 其它酶均较高, 尽管未达到显著水平, 但仍说明 POD、PAL 在诱导山茶抗病性中具有重要作用。

关键词: 水杨酸; 山茶; 灰斑病菌; 诱导抗性; 防御酶

Response of the defense enzymes to induced resistance of camellia gray spot

Li Shujuan¹ Zhu Tianhui² Huang Yanna³

(1. College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan Province, China 2. College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan Province, China 3. Provincial Key Laboratory of Forest Protection, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan Province, China)

Abstract To reveal the response mechanism of salicylic acid (SA) to induced resistance of camellia, the effect of SA to *Pestalotiopsis guenii* (Desm.) Stey was determined using the agar plate method. The results showed that the concentration of SA at 0–5 mmol/L had no inhibition effect to the growth of the pathogen. The defense enzymes such as peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), catalase (CAT) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) had different responses to the disease resistance of camellia induced by spraying SA. The enzymes treated with both inducement and challenge inoculation were faster than those only treated with inducement in the plants. The activities of POD, PPO, CAT, and PAL with different concentrations of SA inducement and challenge inoculation had the positive correlations with the concentration of SA. The correlation analysis showed that the CAT activity had significant correlation ($r = -0.9730$) with infection index. However, the rest enzymes didn't show significant correlations with infection index, but still had high correlation coefficients except PPO, indicating that POD and PAL played important roles in the induced resistance.

Key words salicylic acid; camellia; *Pestalotiopsis guenii*; induced resistance; defense enzyme

基金项目: 国家科技资源共享平台 (2005DKA21207-13), 长江上游林业生态工程省级重点实验室资助项目

作者简介: 李姝江, 女, 1983 生, 博士研究生, 研究方向为林木病害, email: lishujuan@163.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: zhutianhu@tom.com

收稿日期: 2010-04-12

植物诱导抗病性是植物中普遍存在的一种遗传机能,只要采用合适的诱导因子处理就可使这种潜能表达出来,一些非生物物质如水杨酸 (salicylic acid, SA)^[1-2]、甲壳低聚糖 (chitin-oligosaccharide)^[3]、茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 及其衍生物、苯并噻唑类 (benzo (1,2,3) thiazole-7-carbothioic acid S-methylester, BTH)、2,6-二氯异烟酸 (2,6-dichloroisonicotinic acid, NA)、乙烯 (ethylene, ETH) 等^[4]均能诱导植物产生系统获得抗性 (systemic acquired resistance, SAR)。其中,SA 已被普遍认为是诱导 SAR 的信号分子之一,可诱导烟草抗烟草花叶病毒^[5]、水稻抗白叶枯病^[6]、玉米抗大斑病^[7]、花生抗叶斑病^[8]、黄瓜抗黑星病^[9]、桉树抗青枯病^[10]等。山茶灰斑病是严重影响山茶观赏价值的重要园林植物病害,目前有关该病的报道主要集中在对病原菌生物学特性^[11]以及化学防治等^[12]方面,而将诱导抗病性机制应用于园林植物,特别是多年生木本植物,至今尚未见报道。

本研究以 SA 为诱导因子,测定 SA 诱导以及诱导后挑战接种山茶叶内苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammoniolyase, PAL)、过氧化物酶 (peroxidase, POD)、多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性的变化与病害发生的关系,以期揭示 SA 诱导山茶产生抗病性反应机制。

1 材料与方法

1.1 材料

山茶品种:七心红 *Camellia pitardii* 4年生,雅安花卉公司购买,种植于田间,行距 1m,株距 0.5m。培养基:PDA培养基(马铃薯 200g 葡萄糖 20g 琼脂 20g 蒸馏水 1000mL)。

供试菌种:山茶灰斑病菌 *Pestalotiopsis guipinii* (Desm.) Stey,四川农业大学森林保护省级重点实验室提供,接种于 PDA 平板上,25~28℃人工气候箱培养,4天后用打孔器打直径为 5mm 的菌丝块,备用。

供试试剂:水杨酸(分析纯)购自上海通微生物技术有限公司;0.05%吐温 80 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP,分析纯)、磷酸(分析纯)、氯化硝基四氮唑蓝 (NBT, 99%)、99% D-甲硫氨酸、邻苯二酚(分析纯)、99.5%高锰酸钾、硼酸(分析纯)、99% D-苯丙氨酸等均购自上海实验试剂有限公司。

1.2 不同浓度水杨酸对病原菌菌丝生长的影响

平板法测定,即在 PDA 培养基中加入经微孔滤膜 (0.22μm) 过滤的 SA,配成终浓度为 0.05、1、2、3、5、7、10mmol/L 的含 SA 平板,1mmol/L NaOH 调节 pH 至 6.8。接种直径为 0.5cm 的菌丝圆片,以不加 SA 为对照,25~28℃、12h 光周期培养,观察菌丝生长情况。每处理重复 3 次,分别在接种后第 2 天和第 4 天测定菌落直径。

1.3 水杨酸的诱导处理

根据 1.2 中的 SA 浓度筛选结果,设置 SA 浓度为 0.5、2、5mmol/L 进行诱导处理,以清水作对照。调节溶液 pH 至 6.8 加 0.05% 吐温 80 进行叶面喷雾处理,套袋保湿 12h,3 次重复,第 2、3 天各重复 1 次,以确保 SA 能够有效被植株吸收。

试验设置:① SA 诱导但不接种;② SA 诱导后间隔 3 天挑战接种灰斑病菌两组处理。由于病原菌多以伤口侵入,因此均采用针刺接种,以接种清水为对照,每处理重复 3 次,每株为 1 个重复。其中一组用于防御酶活性的测定,分别于接种前 1 天和接种后 1、2、3、4、5、7、10、15 天随机选取各处理山茶平行叶,−80℃超低温冰箱中保存备用。另一组于接种后 10 天进行病情调查,计算感病指数及诱抗效果。病情分级标准:0 级:叶片无病斑;1 级:叶片病斑面积为 10cm² 以下;2 级:叶片病斑面积为 10~20cm²;3 级:叶片病斑面积为 20~40cm²;4 级:叶片病斑面积为 40cm² 以上。

感病指数 = $\left[\sum (\text{病级指数} \times \text{病叶数}) / (\text{叶数总和} \times \text{发病最重的病级数}) \right] \times 100$

诱抗效果 (%) = $\left[(\text{对照感病指数} - \text{处理感病指数}) / \text{对照感病指数} \right] \times 100$

1.4 酶液的提取及活性测定

酶液的提取参照童蕴慧等^[13]的方法:0.5g 山茶叶片,液氮研磨,加适量聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 及 5mL 0.5mol/L pH 6.8 磷酸缓冲液研磨成匀浆,2℃、12000g 离心 20min,上清液为粗酶液。

POD 活性测定参照 Srivastava & van Huystee^[14]的方法, PPO 活性测定参照庞发虎和王正德^[15]的方法, CAT 活性测定参照时朝等^[16]方法, PAL 活性测定参照陈建中等^[17]方法。

1.5 数据处理

试验数据采用 Microsoft Excel 和 LSD 多重差异比较、SSR 测验进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 外源水杨酸对山茶灰斑病菌菌丝生长的影响

结果表明, 供试灰斑病菌在含 SA 的平板上均生长良好, 第 2 天除 10 mmol/L SA 处理与对照有显著差异外 ($P < 0.05$), 其它处理与对照差异均不显著; 第 4 天 7 mmol/L SA 的平板上灰斑病菌生长情况与对照差异显著 ($P < 0.05$), 而 10 mmol/L 处理与对照差异达极显著水平 ($P < 0.01$)。说明高浓度的 SA 处理抑制灰斑病菌菌丝生长, 而浓度为 0~5 mmol/L 的 SA 对山茶灰斑病菌生长没有抑制作用。

2.2 水杨酸诱导后山茶防御酶活性时序变化

2.2.1 POD 活性

不同浓度的 SA 诱导及诱导后挑战接种植株体内的 POD 活性水平均显著高于对照, 且酶活性变化幅度与 SA 浓度呈正相关, 以 5 mmol/L SA 处理的酶活性最高, 变化幅度最大, 而 SA 浓度为 0.5 mmol/L 和 2 mmol/L 两个处理在酶活变化幅度上差异不显著。SA 诱导后挑战接种后的 1~2 天, 对照的酶活性有一个急剧下降的过程, 之后表现较为平稳, 但在整个处理阶段保持在较低的活性水平 (图 1)。

2.2.2 PPO 活性

山茶经 SA 诱导及诱导后挑战接种, 均可引起山茶叶内 PPO 活性增强。其中 SA 诱导处理的酶活性随 SA 浓度的增大而显著升高, 且在处理的整个阶段均高于对照, 5 mmol/L SA 诱导处理的酶活性变化幅度最大, 其次为 2 mmol/L, 0.5 mmol/L 最小; 而诱导后挑战接种处理中, 2 mmol/L 与 5 mmol/L SA 处理表现较为相似的酶活性变化趋势, 除接种后 1~3 天 2 mmol/L SA 处理较 5 mmol/L 的变化幅度大以外, 其余时间均未表现出显著差异, 而 0.5 mmol/L 的 SA 处理变化幅度最小 (图 1)。

2.2.3 CAT 活性

山茶经 SA 诱导及诱导后挑战接种, 引起 CAT 活性的变化存在较大差异。2 mmol/L 和 5 mmol/L SA 诱导后 CAT 活性变化幅度较大, 均表现较高的活性水平, 这与活性氧的有效清除有关, 而 0.5 mmol/L SA 诱导后 CAT 活性受抑制。在 SA 诱导后挑战接种处理中, 2 mmol/L 和 5 mmol/L 处理的 CAT 活性较对照及 0.5 mmol/L 处理高, 且初期缓慢上升, 随后趋于下降; 在整个阶段中, 0.5 mmol/L 处理的酶活性除第 3~5 天较对照高外, 其余时间均低于对照 (图 1)。

2.2.4 PAL 活性

在诱导处理中, 0.5 mmol/L 的 SA 诱导后表现出较低的 PAL 活性, 仅第 3~5 天的酶活性高于对照; 5 mmol/L 的处理较 2 mmol/L 提前 4 天达到活性高峰, 且两者的酶活性变化幅度均大于 0.5 mmol/L 处理。在诱导后再挑战接种的各处理中 1~3 天 PAL 均表现出较对照低的酶活性, 这与接种后对照积极抵抗病原菌的侵入有关; 整个处理阶段, 5 mmol/L 的 SA 处理较其它两个处理的酶活性都高, 但三者均表现出相似的变化趋势, 即 PAL 活性初期升高, 后期缓慢下降, 且高于对照 (图 1)。

2.3 防御酶活性与感病程度的相关性

结果表明, 除 CAT 活性与感病指数显著负相关外, PAL、POD 活性的相关系数均未达到显著水平, 但由于其相关系数较高, 所以与山茶的抗病性仍然具有很高的相关性; 而 PPO 活性的相关系数很低, 仅为 -0.2840 因此不能作为抗性指标。SA 诱导并挑战接种 10 天后, 对照及 0.5、2、5 mmol/L 处理的感病指数分别为 50.80、67.10、47.90、38.40, 其中 0.5 mmol/L 的 SA 诱导后挑战接种发病最为严重, 诱抗效果为 -32.09%; 其次是 2 mmol/L 处理, 诱抗效果仅为 5.71%; 以 5 mmol/L 的 SA 处理感病指数最低, 诱抗效果达到 24.41% (表 1)。表明随着 SA 处理浓度的升高, 山茶的抗病能力随之增强, 处理浓度过低, 不仅不能诱导植物的抗病性, 相反会在一定程度上增加植物的感病能力。

3 讨论

近年来, SA 在诱导植物抗病性方面的作用已备受关注。吴建丽和郝建军^[18]研究表明, SA 是诱导抗性产生的重要因素, 能激活一系列植物抗性防御反应。从本试验结果可以看出, 0~5 mmol/L 的 SA 对山茶灰斑病无直接毒性, 并能使感病指数显著下降。

植物的抗病性建立在一系列物质代谢的基础上, 其中催化这些代谢反应的酶^[19-21]为关键因子。本研究用 SA 诱导并挑战接种后, POD 和 CAT 出现应急反应, 活性大幅度升高, 并分别于 1 周左右达到高峰, 之后开始下降, 这与 Avdiushko 等^[22]的“POD 和 CAT 可以清除 SOD 歧化产生的 H_2O_2 和超氧自由基, 以避免对细胞的伤害”的结论一致; 而 POD 活性与岳东霞等^[23]的结果不一致, 可能与提取方法不同有关, 如 Srivastava & van Huystee^[14]的方法加大

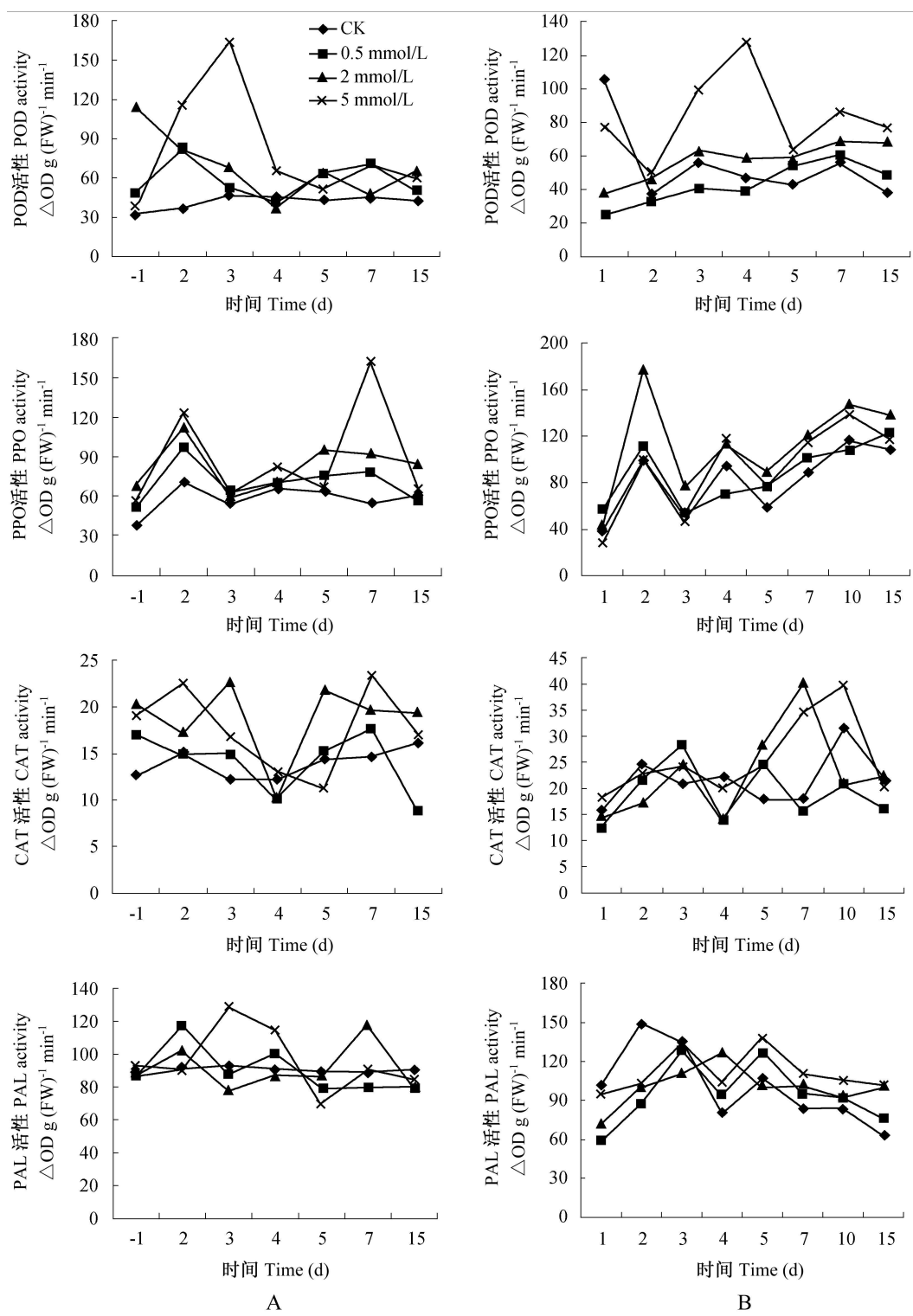


图 1 防御酶系活性变化

Fig 1 Changes of the defense enzyme activity

注: A: SA 处理不接种; B: SA 处理并接种灰斑菌。Note A: SA treated B: SA treated and *P. guenpinii* inoculated

了离子强度, 更有利于 POD 与质膜或细胞壁的分
离; 另外, CAT活性与王海华等^[24]的结果也不一致,
可能由于本试验病原菌的挑战接种扰乱了山茶体内

代谢平衡, 使寄主的 2种酶防御体系失去相应作用,
不能清除体内产生的活性氧, 导致细胞崩溃死亡, 表
现出叶片坏死的典型症状。

表 1 防御酶活性与感病指数的相关性
Table 1 Correlation analysis between infection index and enzyme activities

处理 Treatment	POD活性 POD activity	PPO活性 PPO activity	CAT活性 CAT activity	PAL活性 PAL activity	感病指数 Infection index	诱抗效果 (%) Induced effect
CK	55.05±1.19 b	81.98±2.29 d	21.56±0.88 b	100.55±1.41 b	50.80±1.61 b	—
0.5 mmol/L	43.11±1.22 c	87.71±1.70 c	19.21±2.10 bc	94.94±1.07 c	67.10±0.28 a	-32.09±0.63 c
2 mmol/L	57.45±1.56 b	113.09±1.19 a	22.70±0.35 ab	100.69±0.05 b	47.90±1.04 c	5.71±0.05 b
5 mmol/L	82.80±0.18 a	92.40±0.72 b	25.55±0.14 a	110.90±0.91 a	38.40±0.76 d	24.41±0.12 a
相关系数 Correlation coefficient	-0.9206	-0.2840	-0.9730*	-0.9296	-0.9206	—

注: 表中数据后不同英文字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著 (SSR 测验), * 表示显著相关。Note: Data followed by different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ level by SSR test. * means significant correlations between infection index and enzyme activities.

PAL是木质素与植保素沿苯丙烷类代谢途径合成的关键调节酶,可使木质素大量生成并沉积在细胞壁周围,将病原菌限制在一定的细胞范围之内,从而修复伤口、抑制病原菌的繁殖^[22]。Mauch & Slisarenko^[25]研究证明, PAL 能介导合成木质素和水杨酸,从而产生抗病性。本试验 PAL 活性表现为初期升高,后期缓慢下降的趋势,这与 Mandal等^[26]、Ca i等^[27]、Dixon等^[28]众多研究结果一致, PAL 活性的变化反应了在病原菌侵入时植物抵抗病原菌侵染的能力,因此 PAL 活性的高低与植物抗病能力有关,这与 PAL 和感病指数相关性分析结果是一致的。PPO 参与酚的氧化,可形成对细菌毒性较高的醌类物质^[22],本试验 PPO 活性的变化随 SA 浓度的增大而显著升高,该酶活性的增加可激活寄主潜在的抗病基因的表达,使寄主植物表现出抗病性,而相关性分析表明,在山茶诱导抗性中 PPO 的作用不及 POD、CAT、PAL,这与李淑菊等^[29]的研究结果相似。

在对山茶诱导机制的研究中,除 PPO 外,经 SA 诱导后植株体内的 POD、CAT、PAL 活性与植物的诱抗效果呈正相关,其中高浓度 SA 诱导后各生化指标的变化幅度最大。结合陈芳等^[30]、王海华等^[24]的研究报道可以看出,在对病原菌无抑制作用的前提下,SA 处理浓度越高,对病原菌引起的自身代谢失调的保护反应就越强,植物表现的抗病性也就越强。在生产实践中,若将 SA 与生防菌剂配合使用,可能会有更好的防治效果。由于 SA 是一个有效的内源信号分子,因此,SA 在植物防卫反应中的作用、转运方式以及寄主体内其它生理生化因子的响应还

有待进一步探讨。

参 考 文 献 (References)

[1] 吴国昭, 谢丽君, 宋圆圆, 等. 外源信号物质诱导广东高州普通野生稻抗稻瘟病的生理生化机理. 西北农业学报, 2009, 18(3): 254- 258

[2] 余文英, 王伟英, 邱永祥, 等. 水杨酸对甘薯抗薯瘟病和抗氧化酶系统的影响. 福建农林大学学报, 2008, 37(1): 23- 26

[3] 李唯淑, 胡景江. 低聚壳聚糖诱导大叶黄杨抗白粉病的组织病理学机制. 西北林学院学报, 2009, 24(5): 106- 109

[4] 徐建明, 朱云林, 王伟中, 等. 外源诱导植物获得抗病性的研究进展. 江苏农业科学, 2001(4): 7- 10

[5] 丁秀英, 张军, 苏宝林. 水杨酸在植物抗病中的作用. 植物学通报, 2001, 18(2): 163- 168

[6] 刘凤权, 王金生. 水杨酸诱导水稻幼苗抗白叶枯病研究. 植物保护学报, 2000, 27(1): 47- 52

[7] 余迪求, 岑川, 杨明兰, 等. 玉米不同组织过氧化氢酶水杨酸敏感性的差异和外源水杨酸处理提高玉米抗病性的研究. 植物学报, 1999, 41(12): 1293- 1298

[8] 王桂兰, 陈超, 杨余, 等. 水杨酸诱导花生对叶斑病抗性研究初报. 北京农学院学报, 1999, 14(4): 6- 10

[9] 李红玉, 郭金魁, 周功克. 水杨酸诱导黄瓜抗黑星病抗性的部位差异和时效性. 应用与环境生物学报, 1999, 5(6): 640- 642

[10] 冉隆贤, 谷文众, 吴光金. 水杨酸诱导桉树抗青枯病的作用及相关酶活性变化. 林业科学研究, 2004, 17(1): 12- 18

[11] 邢勇, 何定萍. 山茶花灰斑病菌生物学特性研究. 植物病理学报, 1990, 20(3): 161- 166

[12] 黄新华. 百菌清等 3 种药剂防治油茶炭疽病药效试验. 江西林业科技, 2000(2): 18- 19

[13] 童蕴慧, 郭桂萍, 徐敬友, 等. 拮抗菌诱导番茄植株抗灰霉病机理研究. 植物病理学报, 2004, 34(6): 507- 511

- [14] Srivastava O P, van Huystee R B. Evidence for close association of peroxidase, polyphenol oxidase, and IAA oxidase isozymes of peanut suspension culture medium. *Canadian Journal of Botany*, 1973, 51: 2207–2215
- [15] 庞发虎, 王正德. 驱蚊香草不同外植体的多酚氧化酶活性及褐变控制的研究. *北方园艺*, 2008(9): 117–119
- [16] 时朝, 郑彩霞, 徐莎. PP333对桂花幼树生长及叶片抗氧化酶活性的影响. *北方园艺*, 2010(12): 152–155
- [17] 陈建中, 盛炳成, 刘克均. 苯丙酸类代谢与苹果对轮纹病抗性的关系. *果树科学*, 1997, 14(3): 149–152
- [18] 吴建丽, 郝建军. 水杨酸与植物诱导抗病性. *辽宁林业科技*, 2005(1): 33–35
- [19] 郭文硕. 杉木对炭疽病的抗性与其苯丙氨酸解氨酶的关系. *应用与环境生物学报*, 2002, 8(6): 592–595
- [20] Ge X C, Song F M, Chen Y Y, et al. Activities of defense-related enzymes induced by benzothiadiazole in rice to blast fungus. *Chinese Rice Research Newsletter*, 2001, 9(4): 10–11
- [21] Latha P, Anand T, Ragupathi N, et al. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. *Biological Control*, 2009, 50(2): 85–93
- [22] Avdushko S A, Ye X S, Kuc J. Detection of several enzymatic activities in leaf prints of cucumber plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1993, 42: 441–454
- [23] 岳东霞, 张要武, 庄勇, 等. 水杨酸对黄瓜植株抗病酶系和白粉病抗性的诱导作用. *河北农业大学学报*, 2003, 26(4): 14–17
- [24] 王海华, 曹赐生, 康健, 等. 水杨酸诱导的水稻对白叶枯病的系统抗性与未处理叶酶活性的变化. *中国水稻科学*, 2002, 16(3): 252–256
- [25] Mauch M, Slisarenko A J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell*, 1996, 8: 203–212
- [26] Mandal S, Mallick N, Mitra A. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47(7): 642–649
- [27] Cai K Z, Gao D, Luo S M, et al. Physiological and cytological mechanisms of silicon-induced resistance in rice against blast disease. *Physiologia Plantarum*, 2008, 134(2): 324–333
- [28] Dixon R A, Achim L, Kota P, et al. The phenylpropanoid pathway and plant defense—a genomic perspective. *Molecular Plant Pathology*, 2002, 3: 371–390
- [29] 李淑菊, 马德华, 庞金安. 水杨酸对黄瓜几种酶活性及抗病性的诱导作用. *华北农学报*, 2000, 15(2): 118–122
- [30] 陈芳, 慕小倩, 梁宗锁, 等. 水杨酸对附子叶斑病的诱导抗性及其作用机理研究. *西北农业学报*, 2007, 16(2): 245–249