

文章编号:1001-1498(2004)01-0012-07

水杨酸诱导桉树抗青枯病的作用 及相关酶活性变化

冉隆贤, 谷文众, 吴光金

(中南林学院资源与环境学院, 湖南 株洲 412006)

摘要:在毒性测定中,1~20 mmol 水杨酸(salicylic acid,SA)对桉树青枯病菌的生长无抑制作用。通过淋根,1~5 mmol 的 SA 可以诱导桉树苗显著地增强对青枯病的抗性,但以 5 mmol 最佳。过氧化物酶(POX)和多酚氧化酶(PPO)的活性,在 0.1~5 mmol SA 范围内,随着浓度的升高相应增强;SA 淋根 3~9 d 后挑战接种青枯病菌均能诱导桉树显著提高对青枯病的抗性,但以间隔 5~7 d 效果最好,且 POX 和 PPO 的酶活性与抗病性的变化趋势相符,均在第 7 天升至最高值,分别比对照高 2 倍和 1 倍。POX 酶灵敏快速,更能准确地反映植株抗病性的变化;叶片注射 SA 不能诱导桉树抗青枯病。

关键词:青枯病;尾叶桉;过氧化物酶;多酚氧化酶;青枯菌;水杨酸;诱导抗病性

中图分类号:S718.83 S792.39 **文献标识码:**A

水杨酸(又称邻羟基苯甲酸,salicylic acid,SA)是一种广泛存在于植物体内的酚类物质。据称早在公元前 4 世纪,古希腊医师希波克拉底(Hippocrates)就使用柳树皮作为镇痛剂^[1],但其有效成分直至 19 世纪才弄清楚,主要是柳树皮中的水杨酸类化合物起作用。1874 年,德国人首先合成了 SA,1898 年 Bayer 公司推出了对肠胃刺激较小的乙酰水杨酸,商品名为阿司匹林,广泛地应用于人类疾病的治疗,成为至今仍然有效的药物。然而,SA 在植物上的应用却要晚得多,White 于 1979 年首次报道阿司匹林可以诱导烟草对花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)的抗性^[2];1982 年 Van Loon 等提出 SA 的诱导活性与病程蛋白(pathogen-related proteins, PR-proteins)有关^[3]。此后,在世界范围内,SA 的作用在不同的植物病害系统中得到了广泛的研究,但主要集中在两个方面:一是外源 SA 诱导不同植物抵抗病害的能力;二是诱导抗病信号的传导机理。外源 SA 可诱发烟草(*Nicotiana tabacum* L.)、黄瓜(*Cucumis sativus* Linn.)、马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)、番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)、豌豆(*Pisum sativum* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、大麦(*Hordeum vulgare* L.)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)等多种植物对真菌、细菌和病毒的抗性^[4,5]。但是,SA 的诱导抗病作用在同一植物的不同病害中也有不一致的报道,如 SA 可以诱导黄瓜对瓜枝孢霉(*Cladosporium cucumerinum* Ellis & Arth.)的抗性^[6],却不能诱导对瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp.)的抗性^[7]。

收稿日期:2003-03-18

基金项目:国家自然科学基金(39970615)和国家留学基金(第二批科研资助,第 69 号)资助

作者简介:冉隆贤(1962—),男,土家族,贵州思南人,教授,荷兰 UTRECHT 大学博士毕业,主要研究方向:植物诱导抗病性和抗病基因工程。Email:longxianran@163.com.

桉树 (*Eucalyptus* spp.) 青枯病是由青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith) Yabuuchi et al.) 引致的一种维管束病害。自 1982 年曹季丹报道桉树青枯病在我国广西发生以来^[8], 此病在广东^[9]、广西^[10]和海南^[11]普遍发生和流行, 在福建^[12]和台湾也有分布^[13]。在流行区域, 青枯病的发病率达到 20% ~ 40%, 而重病区则高达 90% 以上^[14]。目前尚无有效的防治方法。

国内外对桉树青枯病的症状、病原、流行规律和防治方法均开展了一些工作, 但尚未见利用诱导抗病方法提高桉树对青枯病抗性的报道。本文以桉树青枯病为研究对象, 开展了以 SA 为诱导剂诱导桉树抗青枯病的试验, 并测定了与桉树抗病性相关的酶活性, 为桉树青枯病的持续控制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 桉树苗的培养

培养苗木的基质为湖南省浏阳市镇头的菜园土。将其与河沙按比例 12:5 (v/v) 混合均匀后, 在 121 ℃ 下灭菌 2 次 (间隔 24 h 以上), 每次 1 h。

尾叶桉 (*Eucalyptus urophylla* S. T. Blake) 种子来自广东省雷州林业局。播种时用 1/2 Hbagland 营养液^[15] (此液含 10 μmol FeEDDHA (Fe-ethylenediamine di-*o*-hydroxyphenylacetic acid; CIBA-Geigy, Basel, Switzerland)) 浸湿土壤, 播种后覆盖灭菌的细沙, 在白天和夜间温度分别为 25 ~ 28 ℃ 和 20 ~ 23 ℃, 相对湿度为 70% 左右的培养室中培养 4 周后, 移栽至装有 100 g 灭菌土的塑料钵中 (口径 5.5 cm), 每钵 4 株。待苗木平均高度达到 8 ~ 10 cm 时用于诱导抗病性试验。

1.2 病菌的培养

桉树青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 为抗利福平的 R1zr 菌株, 其野生型菌株 R1z 分离自广东省雷州林业局北坡林场的尾叶桉病株。

取保存于 -85 ℃ 超低温冰箱中的菌种, 划线培养于改良的 Kelman 平板培养基上^[16], 其配方为 (g L⁻¹): 胨蛋白胨 (proteose peptone, Oxoid) 10, 酪蛋白氨基酸 (casamino acid, Oxoid) 5, 葡萄糖 10, 琼脂粉 (Difco) 12。病菌在 30 ℃ 下培养 24 h 后转接于新的 Kelman 平板培养基上, 再培养 48 h。用无菌蒸馏水洗下菌体, 在 7 600 ×g 下离心 10 min, 去除上清液, 再用无菌蒸馏水稀释至所需浓度 10⁵ cfu (colony forming unit) mL⁻¹ 备用。

1.3 SA 的配制及其对青枯菌的毒性测定

将 SA 溶解在蒸馏水中, 用 1 mol 的 NaOH 将溶液的 pH 值调节至中性, 配制成 50 mmol 的母液, 使用时用蒸馏水稀释至所需浓度。

SA 对青枯菌的毒性试验采用抑菌圈法。取 0.1 mL 浓度为 10⁸ cfu mL⁻¹ 青枯菌悬浮液于改良的 Kelman 平板培养基上 (d = 6.5 cm), 涂抹均匀。待表面无液滴后, 将浸有不同浓度 SA (1、5、10、20 mmol) 的圆形滤纸片 (d = 7 mm) 放入培养皿中间, 用浸过无菌蒸馏水的滤纸片作对照; 每浓度重复 3 次, 在 30 ℃ 下培养 24 h 后记录抑菌圈的直径, 计算平均值。

1.4 不同浓度 SA 淋根诱导桉树抗青枯病试验

当苗木平均高度达到 8 ~ 10 cm 时, 分别用 0.01、0.1、0.5、1、5 mmol SA 淋根, 每处理为 20 株幼苗, 每钵淋 10 mL, 对照淋无菌蒸馏水。1 周后切除顶芽, 伤口处接种浓度为 10⁵ cfu mL⁻¹ 的青枯菌液, 每株 0.2 ~ 0.3 μL; 接种时切取对照和各处理的顶芽保存于 -20 ℃ 的冰箱中, 用

于酶活性的测定。将接种后的苗木置于白天和夜间温度分别为 30 和 25 ,相对湿度为 93 %以上和光照为 12 h 的培养室中发病。10 d 后记录植株的发病等级,并计算病情指数。发病等级以“0、1、2、3”表示:0 表示未发病;1 表示变褐或枯死的长度在 0.5 cm 以下;2 表示变褐或枯死的长度在 0.5 ~ 2.0 cm 之间;3 表示变褐或枯死的长度在 2.0 cm 以上或全株死亡。病情指数的计算公式为:(各级病株数 ×该级代表值) ×100/(总株数 ×最高一级代表值)。

1.5 挑战接种前不同间隔用 SA 淋根诱导桉树抗青枯病的作用

用 5 mmol SA 在接种当天和接种前 1 ~ 9 d 淋根,每个处理为 20 株幼苗,对照淋蒸馏水;接种时切取对照和各处理的顶芽保存于 - 20 的冰箱中,用于酶活性的测定。接种方法和发病条件与 1.4 相同。10 d 后记载发病等级并计算病情指数。

1.6 叶片注射 SA 诱导桉树抗青枯病的测定

在苗木保湿 24 h 后,用 0.001 ~ 1 mmol SA 注射桉苗顶芽下的第 3 或第 4 对叶片。注射后的苗木放置到相对湿度为 85 %左右的培养室中。7 d 后,接种青枯病菌,接种方法和发病条件与 1.4 相同。10 d 后记载发病等级并计算病情指数。

1.7 酶液的提取及酶活性的测定

酶液的提取:称取对照和处理的顶芽(0.5 g),放入预冷的研钵中,加入 5 mL 0.1 mol 磷酸缓冲液(pH 6.8),0.05 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)及少量石英砂,在冰浴中研磨以后,于 4 下 12 000 ×g 离心 20 min,上清液即为粗酶液。

过氧化物酶(POX):采用愈创木酚法^[17]。在 50 mL 0.1 mol 磷酸缓冲液(pH 6.8)中,加入愈创木酚 0.25 mL,于磁力搅拌器上加热搅拌使愈创木酚溶解。待溶液冷却后,加入 30 %过氧化氢 0.15 mL,制成反应混合液,保存于 4 冰箱中。取 1 mL 粗提酶液加 3 mL 反应混合液,在 24 ~ 25 下反应 5 min 后,于 470 nm 处测定光密度(optical density, OD)值,以 OD₄₇₀值变化 0.001 为一个酶活性单位。用 1 mL 0.1 mol 磷酸缓冲液(pH 6.8)加 3 mL 反应混合液作为测定样品的对照。酶活性的大小用 OD₄₇₀ min⁻¹ mg⁻¹ protein 表示。

多酚氧化酶(PPO):在样品的反应体系中,加 1.5 mL 0.1 mol 磷酸缓冲液(pH 6.8),1 mL 浓度为 1 mmol 儿茶酚(邻苯二酚)和 0.1 mL 粗提酶液。24 ~ 25 反应 10 min 后,读取 OD₄₂₀值,以 OD 值变化 0.001 为一个酶活性单位。在对照的反应体系中将酶液换成 0.1 mL 浓度为 0.1 mol 磷酸缓冲液(pH 6.8)。酶活性的大小用 OD₄₂₀ min⁻¹ mg⁻¹ protein 表示^[18]。

蛋白质含量的测定:在测定各样品酶活性的同时,用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量^[17]。

2 结果和分析

2.1 SA 对青枯病菌的毒性

诱导抗病性的特征之一是外源诱导剂刺激植物产生抑菌物质,以抵御病菌的侵害,而外源诱导剂本身对病菌无直接毒性。抑菌圈法测定的结果表明,在浸有 1 ~ 20 mmol SA 的滤纸片周围,青枯病菌生长正常,由此说明,SA 对青枯病菌无直接毒性。

2.2 不同浓度 SA 淋根诱导桉树抗青枯病的效果及酶活性的变化

在苗木根部淋不同浓度的 SA 后,过氧化物酶(POX)和多酚氧化酶(PPO)活性的变化与桉树苗抗病性密切相关。苗木的抗病性和两种酶的活性均随着 SA 浓度的提高而增强(图 1A, B)。当 SA 的浓度为 0.01 mmol 时,桉树苗的 POX 和 PPO 酶活性与对照植株的相比均无明显

变化,而且,其抗青枯病的能力与对照的也无差别。当浓度为 0.1 ~ 0.5 mmol 时,桉树苗的两种酶活性均有所上升,其病情指数下降,表现出诱导抗病活性,但与对照的差异不显著;而当浓度提高到 1 和 5 mmol 时,SA 可以明显地降低青枯病菌的危害,病情指数分别比对照降低 15.6 和 25,差异显著($P=0.05$) (图 1A),而且,POX 酶的活性分别是对照的 1.8 和 2.4 倍,PPO 酶的活性分别是对照的 1.6 和 2 倍(图 1B)。在预备试验中,曾用 10 和 20 mmol 的 SA 淋根,但在 48 h 后,分别有 20 %和 60 %的苗木叶缘卷曲,最后干枯死亡,表明高浓度 SA 对尾叶桉苗的毒性较强。

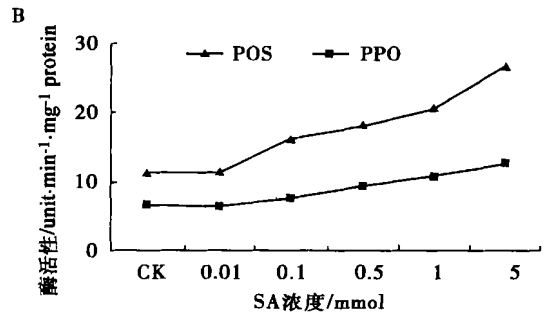


图 1 不同浓度 SA 淋根诱导桉树抗青枯病的效果(A)及酶活性的变化(B)

2.3 不同间隔施用 SA 后诱导桉树抗青枯病的效果及酶活性的变化

SA 诱导桉树抗青枯病的持续时间见图 2A。5 mmol SA 在淋根 1 d 后接种病菌,与对照相比,病情指数降低 11.8,但差异不显著。在间隔为 3 ~ 9 d 时,5 mmol 均可以显著地提高桉树对青枯病的抗性,病情指数比对照分别降低 20.5,24.0,27.1 和 22.7,差异显著($P=0.05$)。第 7 天时诱导效果达到最大值;至第 9 天时,诱导效果开始降低,表明 SA 淋根后诱导桉树抗青枯病的持续时间在 9 d 以上。

不同间隔施用 SA 后植株酶活性的变化见图 2B。POX 和 PPO 酶活性在施用 SA 后 1 ~ 7 d 内均呈递增趋势,至第 7 天时达到最大值,分别比对照增加近 2 倍和 1 倍;第 7 天后两种酶的活性均开始下降,这与桉树苗抗病性的变化趋势相符合(图 2A、B)。由于测定 POX 所需的时间短,方法简便,且变化非常明显,因此,用 POX 反映桉树苗抗病性的变化更合适。

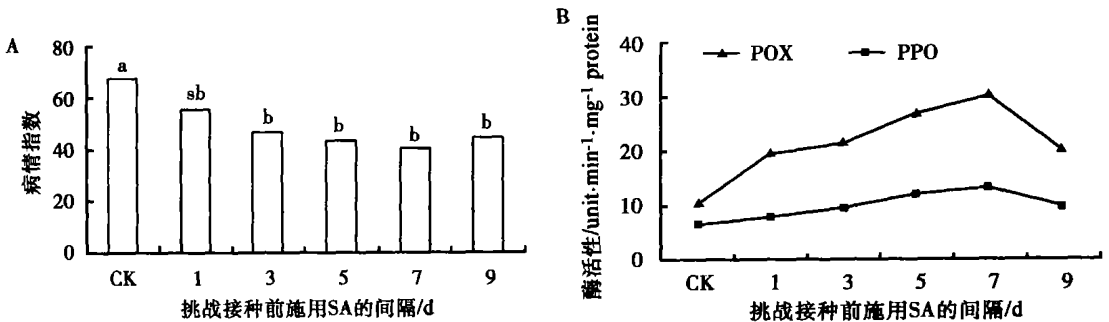


图 2 挑战接种前不同时间间隔施用 SA 后诱导桉树抗青枯病的效果(A)和酶活性的变化(B)

2.4 叶片注射 SA 诱导桉树对青枯病的抗性

在接种后第 5—7 天观察到,注射了 0.01 ~ 1 mmol SA 的桉树苗,其顶端的菌脓比对照和注射 0.001 mmol SA 的桉树苗要少,病情指数也稍低,但差异不显著。至第 10 天时,各处理与对照的发病情况已无明显差别,表明叶片注射 SA 对桉树抗青枯病无诱导效果(图 3)。而且,高浓度的 SA 对桉树苗有较强的毒性。当浓度达 1 mmol 时,近 30% 的叶片卷曲枯死。

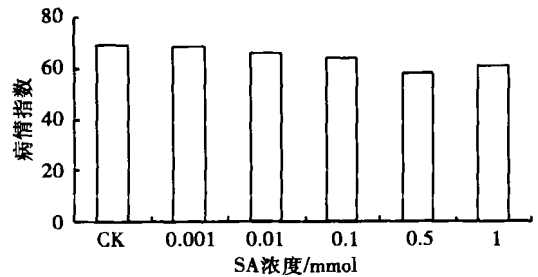


图 3 叶片注射 SA 诱导桉树抗青枯病的效果

3 结论和讨论

(1) 在本试验中,1 ~ 20 mmol SA 对桉树青枯病菌无直接毒性,因此,使用 SA 淋根后,病情指数降低是由于 SA 诱导桉树苗提高抗病性的结果,而不是 SA 对青枯病菌的抑制作用。

(2) 用 SA 淋根后,桉树苗抗青枯病的能力与酶活性的变化密切相关。低浓度 SA (0.1 ~ 0.5 mmol) 虽然可以提高苗木的 POX 和 PPO 酶活性,但不足以抵御青枯病菌的侵害。在浓度为 1 ~ 5 mmol 范围内,POX 和 PPO 酶的活性显著上升,桉树苗对青枯病的抗性与对照植株相比差异显著。由此说明,桉树苗淋 SA 后,当 POX 和 PPO 酶的活性分别为对照的 1.8 和 1.6 倍以上时,苗木的抗病性显著地提高。因此,两种酶活性增强均可以作为苗木抗病性的生化指标,尤其是 POX 酶,灵敏快速,更能准确地反映抗病性的变化动态,这与宋从凤等报道的结果相吻合^[19]。

(3) 5 mmol SA 淋根 3 ~ 9 d 后,挑战接种青枯病菌均能明显地诱导桉树抗青枯病,但以间隔 5 ~ 7 d 为最好。当间隔为 9 d 时,苗木的抗病性比间隔 5 ~ 7 d 的稍低,说明 SA 诱导桉树苗抗青枯病的持续时间为 9 d 左右。同时,POX 和 PPO 在第 7 天升至最高,说明 POX 和 PPO 的酶活性与抗病性的变化动态高度相关。同时,还观察到植株在施用 SA 5 d 或 7 d 后,蛋白质的含量比对照植株的低 10% ~ 15% 左右,由此可推测,植物抗病性的提高是植物自身消耗能量的过程。

(4) SA 通过叶片注射不能诱导桉树抗青枯病,这与 Van Loon 和 Antoniw 在 1982 年报道的结果相似。他们发现,用 SA 注射烟草下部的 3 个叶片,不能稳定地诱导烟草抗花叶病毒病。SA 在进入烟草根部的木质部后,能够持续地传输到植株的其它部位,但是,注射到烟草叶片中的 SA 则不能通过韧皮部传输^[3]。Lee 等报道,注射到烟草叶片中的 SA,很快地被转化成葡萄糖水杨酸 (glucosyl salicylate) 和水杨酸葡萄糖苷 (SA 2-O- β -D-glucoside),认为这是植物本身解毒的一种方式^[20]。因此,当 SA 被注射到桉树叶片中后,SA 很可能被快速地还原成葡萄糖苷或其它产物的形式,不能被叶柄的输导组织传输至植株的其它部位,从而不能诱导植株产生抗病性。

(5) 在国内外植物诱导抗病性的研究中,SA 被公认为很有前途的外源诱导剂之一,它对人和畜无毒副作用,且不污染环境。但自 1979 年 White 发现阿司匹林可以诱导烟草抗花叶病毒病

以来^[2],SA 在生产上并未得到广泛的应用。究其原因,主要是由于不同植物对 SA 的敏感性或忍耐程度不一样,在同种植物的不同病害,或不同植物的同种病害系统中如何确定 SA 的用量很难把握。本试验中只用了尾叶桉作为诱导材料,SA 对尾叶桉的其它病害,或其它易感青枯病的桉树是否也有诱导抗病性,需要广泛深入地研究之后才能将其应用于桉树病害的防治实践中。

参考文献:

- [1] Klessig D F, Malamy J. The salicylic acid signal in plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 26:1439 ~ 1458
- [2] White R F. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco[J]. *Virology*, 1979, 99: 410 ~ 412
- [3] Van Loon L C, Antoniw J F. Comparison of the effects of salicylic acid and ethephon with virus-induced hypersensitivity and acquired resistance in tobacco[J]. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 1982, 88:237 ~ 256
- [4] Metraux J P. Systemic acquired resistance and salicylic acid:current state of knowledge[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2001, 107(1):13 ~ 18
- [5] Sticher L, Mauch-Mani B, Metraux J P. Systemic acquired resistance [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1997, 35:235 ~ 270
- [6] Narusaka Y, Narusaka M, Horio T, et al. Comparison of local and systemic induction of acquired disease resistance in cucumber plants treated with benzothiadiazoles or salicylic acid[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1999, 40 (4): 388 ~ 395
- [7] Chen C Q, Banger R R, Benhamou N, et al. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas* spp. against *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1999, 105(5): 477 ~ 486
- [8] 曹季丹. 巴西柳桉、巨桉青枯病调查初报[J]. *广西林业科技资料*, 1982, 4: 30 ~ 31
- [9] 张明兴,吴光金,林雪坚,等. 桉树青枯病发病规律的研究[J]. *中南林学院学报*, 1996, 16(2): 28 ~ 33
- [10] 施仲美,奚福生,何贵整,等. 桉树品系对青枯病抗性及其稳定性的研究[J]. *广西林业科学*, 2000, 29(1): 1 ~ 6
- [11] 李洪,伍筱影. 海南省林木病害概况、发生原因及防治意见[J]. *热带林业*, 1996, 24(3): 101 ~ 103
- [12] 何学友. 我国林木青枯病研究概况[J]. *森林病虫通讯*, 1997(1): 43 ~ 46
- [13] Wang W Y. Survey of *Eucalyptus* diseases in Taiwan[J]. *Bulletin of Taiwan Forestry Research Institute*, 1992, 7:179 ~ 194
- [14] 陈二英,伍筱影. 海南岛桉树青枯病的发病概况及其防治意见[J]. *热带林业*, 1995, 23:1 ~ 4
- [15] Hoagland D R, Arnon D I. The water culture method for growing plants without soil [J]. *California Agricultural Experiment Station Bulletin*, 1938, 347:36 ~ 39
- [16] Kelman A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium[J]. *Phytopathology*, 1954, 44:683 ~ 685
- [17] 张志良. 植物生理学实验指导(第 2 版)[M]. 北京:高等教育出版社, 1990. 154 ~ 184
- [18] 孔凡明,许志刚. 水稻不育系抗白叶枯病与体内酶活性变化的关系[J]. *安徽农业大学学报*, 1998, 25(3): 217 ~ 223
- [19] 宋从凤,王金生,施仲美,等. 桉树对青枯病抗性与过氧化物酶及同工酶关系的研究[J]. *广西林业科学*, 2000, 29(1): 7 ~ 10
- [20] Lee H, Raskin I. Glucosylation of salicylic acid in *Nicotiana tabacum* cv. xanthi-nc[J]. *Phytopathology*, 1998, 88(7): 692 ~ 697

Role of Salicylic Acid in Induction of Resistance against Bacterial Wilt in *Eucalyptus urophylla* and Changes of Peroxidase and Polyphenol Oxidase

RAN Long-xian, GU Wenzhong, WU Guangjin

(Central South Forestry University, Zhuzhou 412006, Hunan, China)

Abstract : The results from toxicity test indicated that salicylic acid (SA) at 1 ~ 20 mmol had no direct inhibition over the growth of *Ralstonia solanacearum* grown on modified Kelman agar plates. SA within range of 1 ~ 5 mmol was capable of inducing systemic acquired resistance (SAR) against eucalypt bacterial wilt by root pouring, but the best induction of disease resistance could only be obtained with 5 mmol salicylic acid 7 days prior to inoculation of the pathogen. Correspondingly, the activities of peroxidase (POX) and polyphenol oxidase (PPO) increased when SA was more than 0.1 mmol, and reached the highest level at the concentration of 5 mmol. Within 3 ~ 9 days between SA application and challenge inoculation on decapitated shoot tip with *R. solanacearum*, 5 mmol SA was able to induce systemic resistance against the pathogen, but the best inducing results could be gained within intervals of 5 ~ 7 days. The activities of POX and PPO were positively correlated to the enhance disease resistance, by increasing to their maxima at the 7th day, with 2 times and 1 time higher, respectively, than those from the controlled plants. Concerning the sensitivity, POX was better than PPO to reflect the physiological change of eucalypt seedlings upon application of SA. Infiltration with SA into lower leaves could not induce SAR against bacterial wilt upon challenge inoculation on wounded shoot tips.

Key words : bacterial wilt; *Eucalyptus urophylla*; POX; PPO; *Ralstonia solanacearum*; salicylic acid; systemic acquired resistance