

水杨酸诱导太子参对叶斑病的抗性

钟爱清, 林丛发, 翁琳琳, 陈芦根, 叶永茂

(福建省宁德市农业科学研究所, 福建 福安 355017)

摘要: 为探讨水杨酸 SA 对太子参叶斑病的诱抗效果以及有关酶活性的变化与 SA 抗病作用的可能联系, 在离体培养条件下, 运用水杨酸 $0.5 \sim 15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6 种不同浓度处理太子参组培苗, 在 $1 \sim 7 \text{ d}$ 内测定叶片相关酶活性的变化, 诱导培养 7 d 后, 用太子参叶斑病孢子悬浮液对组培苗进行抗性鉴定。结果表明, SA $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导处理后能明显增强太子参叶片内 POD、PPO 酶活性, 降低 CAT 酶活性, 其中 POD 活性比对照增加 170%, PPO 活性比对照增加 293%, CAT 活性比对照降低 43.3%。6 种浓度均能不同程度地诱导太子参对叶斑病产生抗性, 以 $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸的诱抗效果最好, 达到 59.6%, 诱抗效果极显著高于其他处理浓度。

关键词: 诱导抗性; 水杨酸; 太子参; 酶活性

中图分类号: S 332.2; S 432.2+3

文献标识码: A

Taizishen's Resistance to Leaf Spot Disease Induced by Salicylic Acid

ZHONG Ai-qing, LIN Cong-fa, WENG Lin-lin, CHEN Ru-gen, YE Yong-mao

(Ningde Agriculture Institute, Fu'an, Fujian 355017, China)

Abstract: Salicylic acid (SA) was applied on Taizishen (*Pseudostellaria heterophylla*) to induce the plant's resistance to the leaf spot disease. Enzyme activities relating to the disease-resistance were investigated. *In vitro*-regenerated Taizishen plantlets were treated under aseptic conditions with 6 different concentrations of SA, $0.5 \sim 15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, to determine the optimum SA induction level. Activities of various enzymes in the leaves were determined within 1–7 days after SA treatment. The disease-resistance of the treated plantlets was observed with the application of a water suspension of the leaf spot spores, 7 days after the treatment. The results showed that (a) the activity of the enzymes, such as peroxidase and polyphenol oxidase, in the leaves was enhanced by SA treatment; (b) the catalase activity was significantly inhibited after induction by SA at a concentration of $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; and (c) POD activity increased by 170%, PPO increased by 293%, and CAT decreased by 43.3%, as compared to the control. SA concentration in the range of $0.5 \sim 15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ appeared to be capable of inducing the disease-resistance in Taizishen. The best result seemed to be at the concentration of $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA, as the average effective rate was 59.6%, which was significantly higher than those achieved by the other treatments.

Key words: induced resistance; salicylic acid; Taizishen; enzyme activity

福建省闽东地区是太子参的主产区, 近几年种植面积逐渐扩大, 但由于近年来太子参叶斑病 *Phyllosticta commonsii* 有不同程度的发生和流行^[1], 发病率高达 30%~55%, 造成太子参叶片焦枯死亡, 减产 15%~28%, 严重影响了太子参的产量和质量^[2], 直接损害农民的收益。目前防治太子参叶斑病主要依靠农业防治和化学药剂防治, 易造成产品和环境污染, 因此, 迫切需要寻找一个新的途径减少化学农药使用, 从根本上对太子参生长过程中叶斑病等病害进行防治。植物诱导抗病性是国际上近期兴起的重要的农业研究领域, 利用激

发子诱导抗病性来提高农作物自身的抗病, 被认为是植物病害保护的新途径和新技术^[3]。化学诱导因子的诱导抗性已在多种植物(如水稻、番茄、黄瓜、烟草等)上得到证实, 有些已在生产上推广和应用^[4], 很多研究表明水杨酸(SA)等诱抗剂能够诱导多种作物提高抗病性^[5], 但目前国内尚未见太子参诱导抗性方面的相关报道。本试验以太子参组培苗为材料, 旨在研究水杨酸诱导因子对太子参叶斑病的诱抗效果以及有关酶活性的变化与 SA 抗病作用的可能联系, 为揭示 SA 的诱导抗病机制提供线索, 并从中筛选出水杨酸诱抗的最佳浓度, 为

收稿日期: 2011-02-12 初稿; 2011-05-05 修改稿

作者简介: 钟爱清 (1973-), 女, 农艺师, 主要从事植物生物技术研究 (E-mail: lcf877@126.com)

基金项目: 福建省宁德市科技局资助项目 (20090053)

太子参叶斑病的综合防治提依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试药剂为水杨酸 (SA) (成都格雷西亚化学技术有限公司); 供试太子参品种为“柘参 1 号”茎尖外植体诱导产生的脱毒组培苗; 供试菌种为本试验组取叶斑病症状的叶片经分离、提纯, 鉴定为叶点霉 (*Phyllosticta* sp.)。

1.2 太子参脱毒再生苗的培育

利用太子参 0.2~0.5 mm 大小的生长点离体培养获得再生植株, 通过正交试验确定了茎尖诱导成芽初代培养基为 MS+6-BA 2 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+GA₃ 0.1~0.2 mg·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹; 适于愈伤组织不定芽增殖的继代培养基为 MS+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.01 mg·L⁻¹+白糖 30 g·L⁻¹; 再生植株的快速繁殖可通过愈伤组织不断分化不定芽和单茎节切段繁殖 2 种途径进行; 单茎节切段快繁培养基为 MS+蔗糖 30 g·L⁻¹, 以上培养基均加 0.8% 琼脂, pH 值 6.5, 培养条件为 L:D=12h:12h, 光照强度为 4 000 Lx。

1.3 太子参叶斑病病原菌的分离鉴定

1.3.1 叶斑病叶切片观察 从田间取回叶斑病叶, 徒手切片压片镜检, 用目镜测微尺和镜台测微尺测量孢子大小, 选大小不同的孢子各测 30 个。

1.3.2 叶斑病原菌的分离 取叶斑病叶病健交界处组织在 70% 的酒精中浸泡 10 s, 经 0.1% 的升汞液灭菌 4 min, 无菌水冲洗 6 次后置于 PDA 培养基上 23℃ 暗培养 10 d, 待长出菌丝后转接培养, 菌丝体产孢后, 用单孢分离法提纯培养, 显微镜下观察孢子形态。

1.3.3 叶斑病病原菌致病性的鉴定 (1) 孢子悬浮液的配置: 取 PDA 斜面培养的病菌, 用无菌水洗下分生孢子稀释配制成 4×10^5 个·mL⁻¹ 的菌液, 孢子含量用血球计数板计测。(2) 病原菌回接试验: 以盆栽太子参苗为材料, 用注射器轻微扎破太子参苗叶片, 滴上叶点霉孢子悬浮液, 以清水为对照, 罩上薄膜, 23~24℃ 下保湿培养。

1.4 诱导抗性试验设计

1.4.1 诱导剂的配制 用 NaOH 将 100 mmol·L⁻¹ 的水杨酸母液调至 pH 值 6.5, 分别稀释至浓度为 15、8、5、2.5、1、0.5 mmol·L⁻¹ 溶液; 诱抗剂均用 0.45 μm 的微孔膜加压过滤, 得到无菌滤液供试。

1.4.2 诱导处理 在太子参组培苗长出 2~3 叶时

将其浸入稀释的供试诱抗剂 10 s, 取出后转接至 MS+蔗糖 3% 培养基中, 每个处理 10 瓶, 每瓶 10 株, 重复 3 次, 以无菌水处理作对照。诱导后的 1~7 d 内取处理叶片进行酶活性的测定。

1.5 水杨酸处理后酶活性的测定

用分光光度计比色法测定酶活性大小, 酶活性 ($U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) = ΔOD 值 \times 稀释倍数 / (鲜样重 \times 反应时间)。(1) 过氧化物酶 (POD) 的提取及活性测定采用文献 [6] 的方法: 称取 0.2 g 太子参叶片, 加入 0.05 mol·L⁻¹ 的 pH 值 6.0 的磷酸缓冲液及少量的石英砂于研钵中, 冰浴研磨成匀浆后定容至 3 mL, 于 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 上清液即为酶粗提液, 反应液为: 依次加入 2.9 mL 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液, 1.0 mL 2% H₂O₂, 1.0 mL 0.05 mol·L⁻¹ 愈创木酚和 0.1 mL 酶液, 反应体系加入酶液后, 立即于 34℃ 水浴中保温 3 min, 470 nm 波长下比色, 测定 2 min 内 OD 变化值。(2) 多酚氧化酶 (PPO) 液活性的测定: 酶液提取方法同上, 活性测定方法依据李合生等 [7] 的方法, 反应液为 1 mL 25 mol·L⁻¹ 的 pH 值 6.8 的磷酸缓冲液 (内含 0.5 mL 10 mol·L⁻¹ 邻苯二酚) 和 0.05 mL 酶液, 37℃ 条件下于 398 nm 波长检测 2 min 内 OD 变化值。(3) 过氧化氢酶 (CAT) 活性的测定: 参照 Kraus 和 Fletcher 的方法测定 [8], 取叶片 0.5 g, 按 1:10 (w/v) 加入预冷的 50 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH 值 7.0), 冰浴研磨, 以 10 000 r·min⁻¹ (4℃) 离心 20 min, 收集上清液, 反应液为 1 mL 磷酸缓冲液 (pH 值 7.8) (内含 0.3 mL 16.5 mmol·L⁻¹ H₂O₂), 加入 0.05 mL 酶液启动反应, 并记录 1 min 内 240 nm 下的吸光值变化 ΔOD 值。

1.6 诱导处理后的病害检测

将各处理的盆栽太子参苗叶片剪下, 经表面消毒后正面朝上置于灭菌的内置湿滤纸培养皿上, 针刺法接种, 用灭菌的针刺伤叶片, 在每叶片中央接种孢子悬浮液 20 μL, 在 25~28℃ 下, L:D=12 h:12 h 的条件下培养, 每处理重复 3 次, 以未经水杨酸处理的叶片作对照。接种后当对照病斑率达 50% 以上, 按病斑占全叶面积的百分率记载, 计算病情指数及诱抗效果, 并按如下标准分级: 0 级病斑 0%, 1 级 1%~10%, 2 级 10%~50%, 3 级 50% 以上。病情指数 = \sum (病级叶片数 \times 代表级数) / (叶片总数 \times 最高级值) $\times 100$, 诱抗效果以病情指数下降百分率表示, 诱抗效果 = (对照病指 - 处理病指) / 对照病指 $\times 100\%$ [9]。

1.7 数据处理

利用 DPS7.05 统计软件，进行单因素方差分析（one-way ANOVA）和 LSD 显著性水平检验，利用 Microsoft Excel 2003 制图。

2 结果与分析

2.1 太子参病原菌分离鉴定结果

对自然发病的太子参病叶切片观察发现：分生孢子器埋生，直径为 69~140 μm，深褐色，器壁厚度多变，外层厚壁为暗褐色，内层为浅褐色，孔

口圆形。分生孢子椭圆形、卵形，顶端钝圆，无色，单胞，光滑，无或有 1~2 个油球，大小为 (2.1~6.7) μm×(4.7~16.4) μm（宽×长）。与文献描述的叶点霉 *Phyllosticta* 形态一致（图 1）。回接试验结果表明：4 d 后病原菌悬浮液回接的叶片开始产生水浸状病斑，7 d 后病斑扩大，枯死，并产生轮纹状黑色小点，经镜检为叶点霉孢子器，症状与自然发病症状一致，清水对照不发病（图 2）。



图 1 太子参叶斑病叶切片显微照片
Fig 1 Diseased leaf section of *Pseudostellaria heterophylla* under microscope

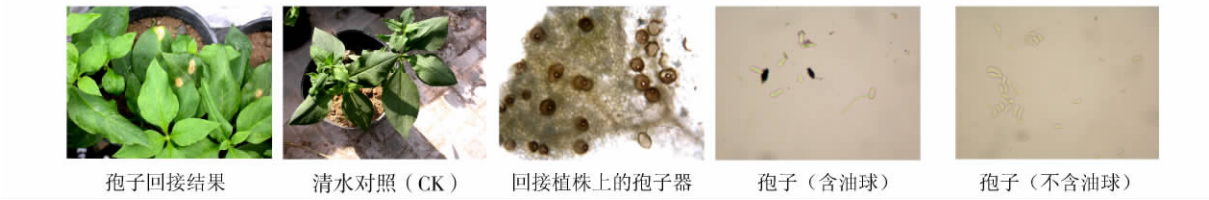


图 2 回接植株症状及病原菌形态
Fig 2 Symptoms on plant and morphology of pathogen after grafting

2.2 诱抗效果的测定结果

水杨酸 6 种处理浓度均能诱导太子参植株对叶斑病产生抗性（表 1），病情指数都比对照处理明显降低，诱抗效果显著，较低浓度的处理比高浓度

的处理诱导抗病效果好，其中 5 mmol·L⁻¹ 水杨酸的诱抗效果最好，均值达到 59.6%，与其他各处理相比达到极显著差异。

表 1 水杨酸 6 种处理浓度对太子参叶斑病的诱抗效果
Table 1 Taizishen's resistance to leaf spot disease induced by 6 SA treatments

诱导剂	浓度 (mmol·L ⁻¹)	病情指数				诱抗效果(%)			
		I	II	III	均值	I	II	III	均值
水杨酸	0.5	60.2	55.5	52.4	56.1cdC	36.8	37.4	38.6	37.6cdCD
	1	56.3	50.5	49.2	52.0cdC	40.9	43.0	42.4	42.1bcBC
	2.5	53.1	41.2	48.3	47.5dCD	44.3	53.5	43.4	47.1bB
	5	43.3	33.4	32.5	36.4eD	54.5	62.3	61.9	59.6aA
	8	65.2	58.2	53.3	58.9eBC	31.6	34.3	37.7	34.5dD
	15	73.7	70.1	67.8	70.5bB	22.7	20.9	20.6	21.4eE
对照(CK)	0	95.3	88.6	85.4	89.8aA	0.0	0.0	0.0	0fF

注：同列数据后不同大小写字母分别代表不同处理间 0.01 和 0.05 差异显著。

2.3 SA 处理后 PPO、POD 和 CAT 的活性变化

以水杨酸 SA 最适浓度 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 1) 对太子参组培苗诱导 1~7 d 内, 叶片几种防御酶活性的动态变化趋势随时间变化的规律略有不同 (表 2), 其中 POD、PPO 活性增加比对照组均有显著提高, CAT 活性呈下降趋势。

2.3.1 对 POD 活性的影响 经 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 处理后, 太子参叶片 POD 的活性在处理呈上升趋势, 3 d 后达到高峰值, 而后呈下降趋势 (表 2、图 1-A), 但比对照处理均有明显提高, 7 d 内比对照增加 170%。

2.3.2 对 PPO 活性的影响 PPO 活性变化规律与 POD 变化相似 (表 2、图 3-B), 在诱导处理后, PPO 活性变化呈上升趋势, 3 d 后达到高峰值, 而后也呈下降趋势, 但比对照处理提高 293%, 达到极显著差异。

2.3.3 对 CAT 活性的影响 CAT 酶活性变化与 POD 和 PPO 酶活性的变化有所不同 (表 2、图 3-C), SA 处理后 1~3 d, 太子参叶片 CAT 活性持续下降, 最大降幅为 71.6%, 达到极显著差异, 第 4 d 后 CAT 活性有所回升, 但未升到对照水平, 1~7 d 内 CAT 活性平均降低 43.3%。

表 2 SA 处理对 PPO、POD 和 CA 活性的影响
Table 2 Changes of enzyme activities

相关酶	酶活性($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)							
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	均值
POD	4.22	8.36	10.23	7.55	7.13	7.14	3.87	6.93
CK ₁	2.12	2.06	2.53	2.75	2.92	2.83	2.72	2.56
PPO	0.31	0.42	0.91	0.80	0.73	0.52	0.44	0.59
CK ₂	0.1	0.13	0.13	0.16	0.15	0.17	0.18	0.15
CAT	150	130	50	62	80	110	123	101
CK ₃	183	171	176	172	180	189	178	178

3 讨 论

植物受到病原菌侵染或被诱导处理后, 与抗病反应密切相关的防御酶活性变化是诱导抗性产生的重要机制之一^[10], 植物对病原物侵入的生理生化反应是以酶的催化活动来实现的, 植物防御酶可催化一些诱导型抗病物质如木质素、植保素等的合成, 间接影响植物的抗病反应。许多研究证明, PPO、POD 等均属于与植物抗病有关的防御酶, 也是植保素、酚类物质合成的重要酶, 这些酶活性的增

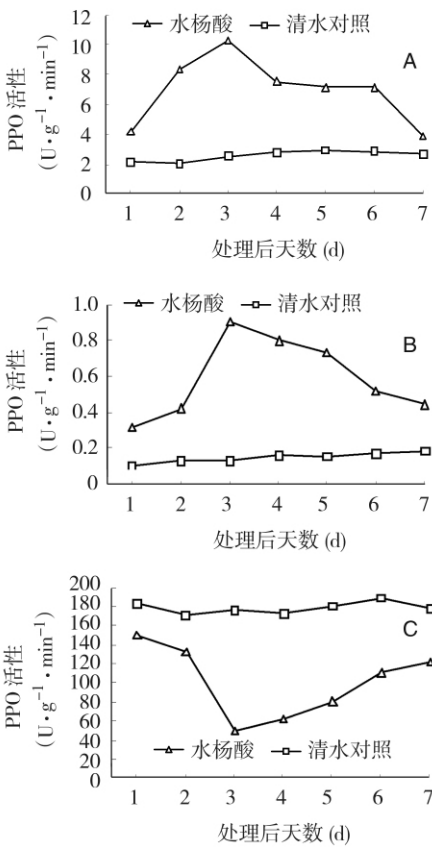


图 3 水杨酸处理后太子参叶片 POD (A)、PPO (B)、CAT (C) 活性的变化

Fig 3 Changes in peroxidase, polyphenol oxidase and catalase activities in leaves treated by salicylic acid

加对植物抗病非常有利, 有利于限制病原菌侵入和扩展^[11]。本试验研究发现, 与清水对照相比, 水杨酸 $0.5\sim15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内均能不同程度地诱导太子参对叶斑病产生抗性, 以 $5.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸的诱抗效果最好, 达 59.6%, 极显著高于其他处理浓度; $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸诱导处理后能显著地增强太子参再生苗体内防御酶 POD、PPO 的活性, 其中 POD 活性比对照增加 170%, PPO 活性比对照增加 293%, 说明太子参苗经诱导剂处理后对叶斑病的抗性与 PPO、POD 活性增强有关。

水杨酸 (SA) 是植物界广泛存在的一种酚类化合物, 是植物抗性反应的重要信号分子, 能激活与植物抗病反应相关的防御保护系统, 涉及并参与植物的过敏性反应和系统获得抗性 (SAR) 反应, 在植物的 SAR 信号传导和抗性反应中起着关键作用^[12]。很多研究表明 SA 的信号传导机制与 SA 结合蛋白 (SABP) 有关, 通过抑制过氧化氢酶

(CAT) 活性而使植物体细胞内积累高水平的 H_2O_2 进而激活抗病反应途径中抗病基因的表达^[13], H_2O_2 是植物病理反应的信号物质也能直接对病菌产生伤害, 因而 SA 诱导植物抗病性被认为是通过专一地抑制 CAT 活性从而增加植物体内 H_2O_2 的含量, 最终导致与 SAR 有关的防卫基因表达和植物抗病性的诱导^[14]。本试验研究发现, 与清水对照相比, $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸诱导处理后能极显著地降低太子参再生苗叶片 CAT 活性, 其中第 3 d 最大降幅达 71.6%, 1~7 d 内 CAT 活性平均降幅低 43.3%, 这也说明太子参对叶斑病的抗性与 CAT 活性降低有关。

参考文献:

- [1] 桑维钧, 熊继文, 宋宝安, 等. 贵州太子参主要真菌病害的调查与防治 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34 (14): 3314—3316, 3318.
- [2] 徐宏辉. 太子参叶斑病发生规律及防治措施 [J]. 植物医生, 2007, 20 (2): 27—28.
- [3] 李玉红, 陈鹏, 程智慧, 等. 草酸和对黄幼苗霜霉病抗性和胞间隙病程相关蛋白的诱导 [J]. 植物病理学报, 2006, 36 (3): 238—243.
- [4] 王勇刚, 曾富华, 吴志华, 等. 植物诱导抗病与病程相关蛋白 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2002, 28 (2): 177—182.
- [5] 刘亚光, 马超, 冯蕾. 几种化学诱抗剂对大豆细菌性斑点病诱导抗性的研究 [J]. 中国油料作物学报, 2008, 30 (1): 116—118.
- [6] 萧浪涛, 王三根. 植物生理学实验技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 103—104.
- [7] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 164.
- [8] KRAUS T E, FLETCHER R A. Paclobutrazol protect wheat seedlings from heat and paraquat injury. Is detoxification of active oxygen involved [J]. Plant Cell Physiol, 1994, 35 (1): 45—52.
- [9] 董玉红, 高祖明, 李升东. 不同化学诱导因子对蔬菜炭疽病的诱导抗性效应 [J]. 山东农业科学, 2002, (4): 35—37.
- [10] 董汉松. 植物诱导抗病性原理和研究 [M]. 北京: 科学出版社, 1995: 1—7, 185—193.
- [11] 马晶晶, 蒋继志, 王树桐, 等. 几种化学物质诱导草莓抗根腐病的初步研究 [J]. 河北农业大学学报, 2006, 29 (3): 62—65.
- [12] 丁秀英, 张军, 苏宝林, 等. 水杨酸在植物抗病中的作用 [J]. 植物学通报, 2001, 18 (2): 163—168.
- [13] 余迪求, 岑川, 李保健, 等. 植物系统获得的抗病性和信号传导 [J]. 植物学报, 1999, 41 (2): 115—124.
- [14] CHEN Z, RICIGLIANO J W, KLESSIG D F. Purification and characterization of a soluble salicylic acid binding protein from tobacco [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 9533—9537.

(责任编辑: 林玲娜)