SA诱导拟南芥对灰霉病的抗性与木质素含量的关系

王 媛[1]， 杨红玉[1*]， 程在全[2]

(1. 云南师范大学生命科学学院，昆明 650092； 2. 云南省农业科学院，昆明 650223)

摘要 对拟南芥植株喷施水杨酸后，接种灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)，观察植物对病原物反应的变化。结果表明：喷施水杨酸可以降低拟南芥灰霉病的发生率。在平板培养中，水杨酸对灰霉菌分生孢子的萌发及菌丝的生长均无明显抑制作用，因此认为水杨酸处理后发病率的下降是由于水杨酸处理提高了植物的抗病性，且诱导抗性的持久期在10 d以上。观察中还发现在拟南芥叶片上喷施SA或接种灰霉菌都会使叶片PAL和POD活性上升，进而引起木质素的积累，两者在积累量上和时间程度上具较好的一致性，说明水杨酸诱导拟南芥抗灰霉病的过程中，通过PAL和POD活性的提高进而引起木质素含量的增加，可能是诱导拟南芥产生抗性的机制之一。

关键词 水杨酸； 拟南芥； 灰霉病； 诱导抗性

中图分类号 S 432.23

Relationship between SA-induced resistance to grey mold in *Arabidopsis* and the lignin contents

Wang Yuan[1]， Yang Hongyu[1]， Cheng Zaiquan[2]

(1. *School of Life Sciences*, *Yunnan Normal University*, *Kunming* 650092, *China*;
2. *Yunnan Academy of Agricultural Sciences*, *Kunming* 650223, *China*)

Abstract The effect of exogenous salicylic acid (SA) on the resistance of *Arabidopsis* to grey mold disease was discussed in this paper. Plant leaves were inoculated with fungal conidia after spraying with SA. The results showed that spraying plants with SA decreased the incidence of the disease. The direct inhibitory effect of SA on mycelial growth and conidial germination was not observed in our experiment. This suggests that the decreased disease incidence may be due to SA-induced resistance. Furthermore, the effect of SA could last for 10 days. It was also observed that the activities of phenylalanine ammonia lyase (PAL) or proxidase (POD) and the levels of lignin were increased after SA treatment or inoculated with *Botrytis*. SA treatment not only enhanced the resistance of *Arabidopsis* to *Botrytis*, but also increased the deposition of lignin and raised enzyme activities. The results suggested that the deposition of lignin is related to the resistant reaction of *Arabidopsis* to grey mold disease. It might be regarded as a biochemical response of *Arabidosis* to grey mold disease.

Key words salicylic acid; *Arabidopsis*; gray mold; induced resistance

灰霉病是由灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea* Pers.)引起的一种可危害蔬菜、果树及花卉等多种植物的重要病害。灰葡萄孢菌能侵染200多种植物，包括很多的农作物[1]。目前对灰霉病的防治主要依赖化学方法，主要药剂有多菌灵、腐霉利(速克灵)、苯菌灵、百菌清等，但是由于药物的重复使用，使病菌迅速产生抗药性，其防效大大下降[2]。水杨酸(salicylic acid, SA)是植物体激素，对一些重要的代谢起调控作用。能促进植物开花、气孔关闭、种子萌发、增加膜通透性及离子的吸收。SA诱导多种植物对病毒、真菌及细菌病害产生抗性的功能尤其受到普遍关注。对花生、黄瓜、马铃薯等作物施用外源水杨酸，能够诱导这些作物产生抗病性[3-5]。

胡景江等人研究表明：杨树溃疡病菌诱导杨树

收稿日期： 2006-10-09 修订日期： 2007-04-13
基金项目： 云南省自然科学基金(2003C0028R)；云南省农业生物技术重点实验室开放基金(02ZD070)
* 通讯作者 E-mail：Yanghongyukm@126.com

细胞壁木质素的积累与其对溃疡病的抗性有密切的关系[6]。而SA诱导拟南芥对灰霉病的抗性是否与木质素有关,目前尚无文献报道。本研究探讨了SA诱导拟南芥对灰霉病的抗性与PAL、POD活性及木质素含量的关系,为进一步揭示SA诱导拟南芥产生抗病性的生理生化机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试品种

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)Columbia生态型,由美国Lehle Seeds公司提供。种子用Lehle seeds培养基,22 ℃,90%相对湿度,12 h光照,12 h黑暗的光照培养箱中培养。幼苗移入盆中土培,于(23±2) ℃,相对湿度70%±5%,8 h光照、16 h黑暗的培养室中培养,7 d浇2次Lehleseeds营养液[7],温室培养至28 d待用。

1.2 供试菌种

灰霉菌(*B. cinerea*)由云南师范大学植物生理研究室提供,菌株在马铃薯培养基上,28 ℃培养8 d[7]。用无菌水从培养基上洗脱灰霉病原孢子,配制成含2×10^5个/mL的孢子悬浮液待用。

1.3 SA诱导处理

用0.1 mmol/L SA处理拟南芥后,间隔4 d接种灰霉病菌,接种灰霉菌后第4、5、7、9 d统计发病率和病情指数并计算抗性效果。另用0.1 mmol/L SA溶液喷雾至拟南芥植株全部湿润,设灰菌水为对照,分别于喷药后第1~9天(逐天)、12 d后接种灰霉菌,接种9 d后记录病情,灰霉病斑的分级为:无病斑为0级,病斑占叶面积的10%~25%、26%~50%、51%~75%、75%以上,分别为1级、2级、3级、4级[8-9]。计算公式为:发病率=(病叶数量/调查总叶数量)×100%,病情指数=($\sum$病害级数×该级叶片数/叶片数总和×发病最重级的代表数级)×100,诱抗效果以病指数下降百分率表示,即诱抗效果=(对照病指-处理病指)/对照病指×100%。每处理设3次重复。

1.4 SA对灰霉菌的影响

1.4.1 SA对灰霉菌孢子萌发的影响

先将配制好的0.1 mmol/L SA溶液10 mL倒入培养皿中(以灭菌水做对照),将配制好的孢子悬浮液接种到含有SA和灭菌水的培养皿中,28 ℃培养。每隔12 h观察孢子的萌发情况,重复3次,记载孢子数、萌发孢子数,计算孢子萌发率[10]。

1.4.2 SA对灰霉菌作用的平板测定

在灭菌后的PDA培养基中加入水杨酸诱抗剂,使培养基中的水杨酸诱抗剂浓度达到0.1 mmol/L,冷却后制成平板,对照为培养基中加入与SA等量灭菌水后制成的平板。平板上涂抹1 mL 2×10^5个/mL的灰霉孢子悬浮液,28 ℃培养5 d后观察菌丝的生长情况,3次重复。抑菌率=(对照菌丝生长量-处理菌丝生长量)/对照菌丝生长量×100%[9]。

1.5 抗病指标的测定

试验共分两部分:一是采集未接种灰霉菌的植物样品,即用0.1 mmol/L SA喷雾处理(以灭菌水作对照)的拟南芥叶片,二是采用接种灰霉菌后的植物样品,即用0.1 mmol/L SA处理4 d后再整株接种灰霉菌,重复3次,分别在规定时间内采集叶片,进行相关指标的测定。每个指标测定时设3个重复,然后进行统计分析。

1.5.1 PAL活性测定

采用薛应龙的方法略有调整[11]。

1.5.2 POD活性测定

采用张志良的方法略有调整[12]。

1.5.3 木质素含量测定

采用骆桂芬等的方法略有调整[13]。

2 结果与分析

2.1 SA对拟南芥灰霉病抗性的诱导

随着时间的变化,用SA处理和对照植株的发病率及病情指数都呈增高趋势,但在测定期内用SA处理植株的发病率及病情指数都低于对照植株的发病率及病情指数(表1),这说明SA处理降低了植株对灰霉病的敏感性。

表1 SA诱导处理拟南芥对灰霉病的抗性效果

时间/d	发病率/%		病情指数		诱抗效果/%	
	对照	SA诱导	对照	SA诱导	对照	SA诱导
4	15.52±0.26	(5.60±0.31)**	12.00±0.12	(3.69±0.08)**	—	69.17±0.20
5	46.57±0.38	(19.30±0.35)**	47.00±0.69	(17.57±0.38)**	—	62.33±0.23
7	58.50±0.55	(43.60±0.35)**	68.03±0.08	(27.50±0.40)**	—	60.50±0.40
9	65.23±0.31	(57.91±0.60)**	76.33±0.44	(32.03±0.66)**	—	57.73±0.27

1) *表示差异显著($p<0.05$),**表示差异极显著($p<0.01$)。

用 0.1 mmol/L SA 处理间隔不同的时间，再接种灰霉病菌，其诱导拟南芥产生抗性的效果。SA 处理 1 d 后接种病原菌就表现出诱抗效果，间隔 4 d 后接种可表现出最大的诱抗效果。SA 处理后 12 d 接种，诱抗效果低于 20%。结果表明，在接种前 1～10 d用 SA 处理引起病情指数的降低是由于诱导抗性的产生，且抗性的持久期至少在 10 d 以上。

灰霉菌孢子在 0.1 mmol/L SA 溶液和灭菌水中均可萌发，在整个取样期萌发率与对照无显著差异，孢子萌发后菌丝的生长情况也基本相似，由表 2 看出，在含有 SA 的 PDA 培养基上培养 5 d 后，灰霉菌落直径均与对照间差异不显著，证明 SA 溶液对灰霉菌孢子的萌发无直接的抑制作用。

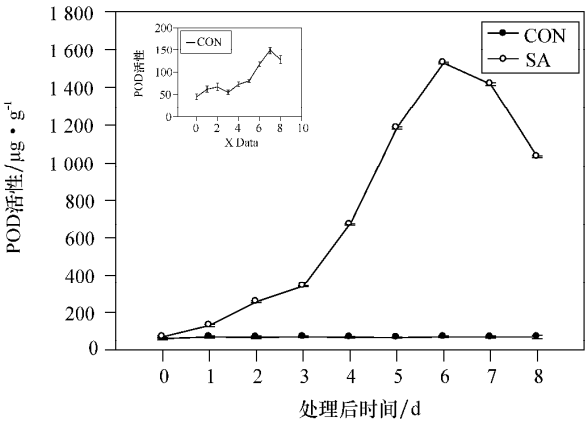
表 2　SA 对灰霉病原菌活性的影响[1)]

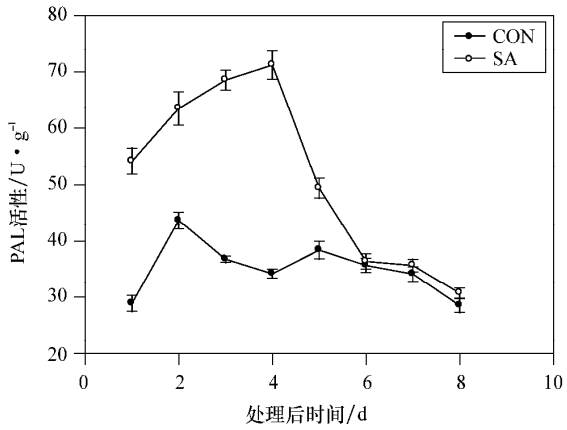
药剂	药剂浓度/mmol·L^{-1}	灰霉菌落直径/cm	抑菌率/%
CK	0	8.842±0.073 3	—
SA	0.1 mmol/L	8.675±0.098 6	1.889

1) 菌落直径为 3 次重复均值±标准误差。

2.2　外施 SA 对拟南芥叶片 POD 和 PAL 活性的影响

SA 处理后拟南芥叶片 POD 活性迅速上升(图 1)，在处理后 6 d，POD 活性达到最高峰，在其他取样时间均明显高于对照；从 PAL 活性变化动态看，在 SA 处理后 4 d 内 PAL 活性较高，在第 4 天达到最高峰，然后开始下降，处理后 6 d 时叶片的 PAL 活性基本与对照接近。





在 POD 活性变化的图中，因为对照的 POD 活性随时间的变化很小，用同样的坐标表示不出 POD 活性的变化，所以在左图的左上角用一个小图表示对照的 POD 活性，其纵坐标的间隔用大图纵坐标的 1/4 的间隔表示。

图 1　SA 处理后拟南芥叶片 POD 和 PAL 活性的变化

2.3　SA 处理对拟南芥叶片木质素含量的影响

用 SA 处理后，叶片木质素含量变化趋势见图 2。从图 2 可以看出，SA 处理后拟南芥叶片木质素含量在处理后 1～3 d 与对照接近，而 4～6 d 则明显高于对照，并在取样期内一直保持上升趋势。

2.4　在经 SA 处理和未处理的叶片上接种灰霉菌后 POD 和 PAL 活性的变化

接种灰霉菌后，对照和 SA 处理的叶片 POD 和 PAL 活性一直上升(图 3)，POD 活性在接种后 6 d 达到最高峰，PAL 在接种后 4 d 达到最高峰，然后 POD 和 PAL 活性都迅速下降，但在取样时间内经 SA 处理后的酶活性都明显高于对照。

2.5　拟南芥叶片上接种灰霉菌后木质素含量的变化

从图 4 可以看出，SA 处理的叶片，木质素含量在整个取样期均高于未处理，无论 SA 处理还是未处理，接种灰霉菌后木质素含量变化趋势接近，随接种后时间的增加，木质素含量一直保持增长的趋势。

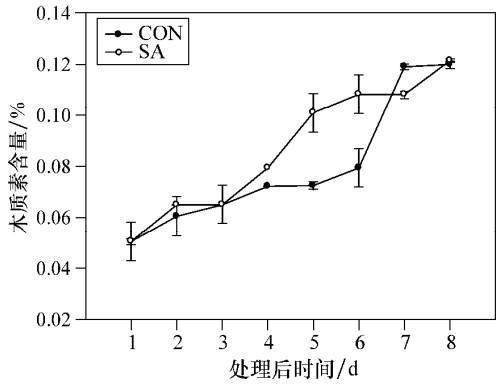
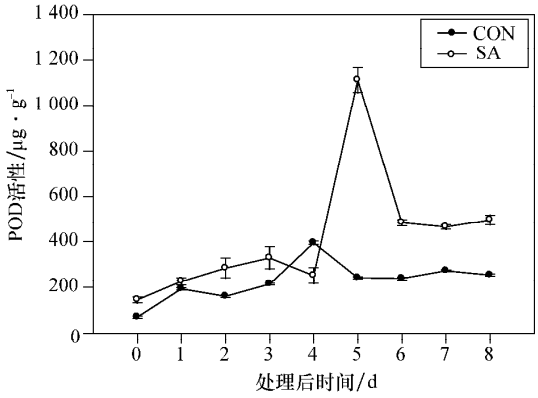


图 2　SA 处理后拟南芥叶片木质素含量变化



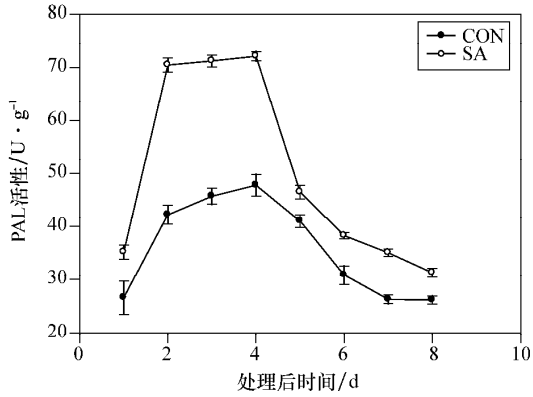


图3 在经SA处理和未处理的拟南芥叶片上接种病菌后POD活性和PAL活性的变化

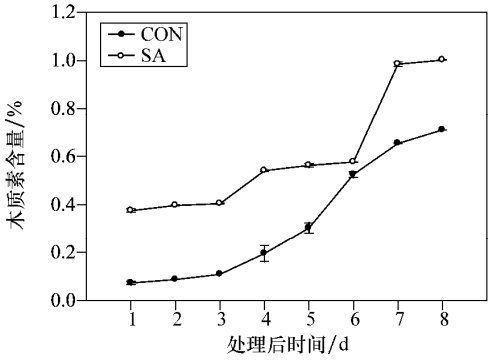


图4 接种病菌后拟南芥叶片木质素含量的变化

3 讨论

接种灰霉菌前4～9 d喷施SA,拟南芥的灰霉病病情指数明显下降,说明SA能够诱导拟南芥植物对灰霉病产生抗性。而本试验所喷施的SA浓度,即0.1 mmol/L对灰霉菌无直接毒性。因此病情指数降低是由于SA诱导拟南芥提高抗病性的结果,而且在SA处理1 d后就有比较明显的诱导效果,诱导抗性的持久期在10 d以上,诱导效果在20%以上。

植物的抗病性是建立在一系列的物质代谢基础上的,SA虽然不是诱导抗性产生的最初系统信号,但却是诱导抗性产生的重要因素[4]。很多研究表明:外施SA后,植物体内的SA水平提高,SA与SA受体蛋白(SA-binding protein, SABP)结合,抑制过氧化氢酶的活性及自由基的产生,激活POD的合成及其他防卫反应[14]。例如,用SA处理黄瓜叶片,促进叶片POD活性迅速升高[4]。水稻幼苗用SA处理后,迅速提高PAL和与木质素合成有关的各种POD的活性,快速大量合成木质素使组织木质化。本研究结果表明:SA处理或接种灰霉菌都会使拟南芥叶片PAL和POD活性上升,进而引起木质素的积累,且两者在积累量上和时间程度上表现出较好的一致性。其中用SA处理后与对照相比,POD上升的幅度很大。经相关性分析后发现POD活性的迅速上升与SA的诱抗效果相关性非常高,说明POD活性的上升与SA的诱导效果之间关系非常密切。但经SA处理后接种灰霉菌与未经SA处理接种灰霉菌相比,酶活性的提高和木质素的积累不仅在时间进程上快于未经SA处理接种灰霉菌的,而且在量上也大于只经灰霉菌接种处理的。植物对病原物入侵的感病与抗病反应差异往往就在于其识别并启动自身防卫系统的时间差异上。如果植物能够迅速识别病原物,传递信号,启动防卫反应,那么在植物与病原物的互作中,植物便表现抗病;反之,植物就感病[7]。

苯丙氨酸解氨酶(PAL)是苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶,在木质素的合成中起重要作用,因而与植物抗病性密切相关[15]。现已证明在拟南芥中,PAL能介导合成木质素和水杨酸,从而产生抗病性[16]。POD在由酚类聚合成木质素中起着重要的作用,因此它在植物体内的活性也与植物抗病性有密切关系。经草莽酸途径进行苯丙烷类代谢而合成的木质素使细胞壁木质化,增强植物细胞壁的机械强度,从而阻止病原菌的进一步穿透,而且木质素的低分子量酚类前体以及多聚作用时产生的游离基可以钝化真菌的膜、酶和毒素[15]。本研究结果表明:SA诱导拟南芥抗灰霉病的过程中,通过PAL和POD活性的提高进而引起木质素含量的增加,这可能是诱导拟南芥产生抗性的机制之一。

参考文献

[1] ERI M, GOVRIN, ALEX LEVINE. Infection of *Arabidopsis* with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense

responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR) [J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48: 267 - 276.

[2] 童蕴慧,纪兆林. 灰霉病防治研究进展[J]. 中国生物防治, 2003:19(3):131 - 135.

[3] 王桂兰,陈 超,杨 余,等. 水杨酸导花生对叶斑病抗性研究初报[J]. 北京农学院报, 1999,14(4):6 - 9.

[4] 李淑菊,马德华,庞金安,等. 水杨酸对黄瓜几种酶活性及抗病性的诱导作用[J]. 华北农学报,2000,15(2):118 - 122.

[5] 赵离飞. 水杨酸诱导小麦赤霉毒素抗性研究[J]. 洛阳农业高等专科学校学报,2001,21(4):261 - 262.

[6] 胡景江,朱 玮,文建雷. 杨树细胞壁 HRGP 和木质素的诱导积累与其对溃疡病抗性的关系[J]. 植物病理学报,1999,29(2):151 - 156.

[7] 杨红玉,李 湘,张一凡,等. 灰霉菌培养及其对拟南芥的侵染[J]. 西南农业学报,2005(18):431 - 434.

[8] 戴富明,周蓓琪,陆金萍,等. 灰霉灵防治番茄灰霉病[J]. 上海蔬菜,1994,4:29 - 30.

[9] 古燕翔,王代军. 外源诱导物水杨酸对草坪型高羊茅弯孢霉叶斑病抗性影响的研究[J]. 中国草地, 2003,25(4):56 - 71.

[10] 程智慧,李玉红,孟焕文,等. BTH 诱导黄瓜幼苗对霜霉病的抗性与细胞壁 HRGP 和木质素含量的关系[J]. 中国农业科学, 2006,39(5):935 - 940.

[11] 薛应龙,欧阳光察,澳绍根. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究[J]. 植物生理学报,1983,9:301 - 305.

[12] 张志良. 植物生理学试验指导(第 2 版)[M]. 北京:高等教育出版社,1990.

[13] 骆桂芬,崔俊涛,张 莉,等. 黄瓜叶片中糖和木质素含量与霜霉病诱导抗性的关系[J]. 植物病理学报,1997,27(1):65 - 69.

[14] 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.

[15] 宾金华,潘瑞炽. 茉莉酸甲酯诱导烟草幼苗抗性与过氧化物酶活性和木质素含量的关系[J]. 应用与环境生物学报,1999,5(2):160 - 164.

[16] MAUCH-MANI B, SLISARENKO A J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*[J]. Plant Cell, 1996,8:203 - 212.