

# 水杨酸对烟草抗黄瓜花叶病毒的诱导效应

师金鸽,李占杰,杨铁钊

(河南农业大学 农学院,河南 郑州 450002)

**摘要:**通过外源水杨酸(Salicylic acid,SA)处理烟苗,研究了水杨酸处理的烟草接种黄瓜花叶病毒后,其病情指数及抗病相关酶活性和  $H_2O_2$  含量的变化。结果表明:接种 CMV 后 21 d,SA 处理烟株的病情指数显著低于对照;SA 预处理的烟株在接种 CMV 前后叶片内的过氧化物酶(POD)活性和过氧化氢( $H_2O_2$ )含量提高,过氧化氢酶(CAT)活性下降。表明水杨酸具有诱导烟草抗黄瓜花叶病毒的效应。

**关键词:**烟草;水杨酸;黄瓜花叶病毒;过氧化物酶;过氧化氢酶;过氧化氢

**中图分类号:**S435.72 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)06-0108-04

## The Induced Effects of Salicylic Acid on Tobacco Resistance to Cucumber Mosaic Virus

SHI Jin-ge, LI Zhan-jie, YANG Tie-zhao

(Agronomy College of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The changes of enzyme activities of peroxidase (POD) and catalase (CAT), the content of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and the disease occurrence were studied after the tobacco leaves were treated with salicylic acid (SA), then were inoculated with cucumber mosaic virus (CMV) the next day. The results showed that, after 21 d of inoculation with CMV, the disease indexes of tobacco plants treated with SA was lower than CK, and the activity of CAT decreased, while the activity of POD and the content of  $H_2O_2$  increased in the plants treated with SA. The results indicated that salicylic acid could induce the tobacco resistance to cucumber mosaic virus.

**Key words:** Tobacco; Salicylic acid; Cucumber mosaic virus; Peroxidase; Catalase; Hydrogen peroxide

黄瓜花叶病毒寄主范围很广,据研究报道,能侵染约 800 种植物<sup>[1]</sup>。近几年,烟草感染 CMV 有上升的趋势<sup>[2]</sup>。而植物内源 SA 是诱导植物产生系统抗病性(SAR)的信号物质,它在植物体内具有多种生理调节作用<sup>[3]</sup>。SA 不仅是植物产生过敏反应(Hypersensitive response, HR)和系统获得性抗性(Systemic acquired resistance, SAR)所必需,而且也是病原物侵染植物后活化一系列防卫反应信号传递过程中的重要组成成分,能诱导一些植物体内病程相关蛋白基因的表达,近来有研究证明,分离到 SA-结合蛋白具有过氧化氢酶活性,SA 能抑制该酶的活性,从而使植物体内活性氧积累,提高植物的抗病性<sup>[4]</sup>。刘太国等<sup>[3]</sup>认为水杨酸的外源应用可以比较有效地诱导烟草抗病品种对病毒病产生抗病性。早在 1979 年,

White<sup>[5]</sup>就报道了烟草叶片注射 SA 后,引起病程相关蛋白(Pathogenesis related protein, PRP)积累,并提高烟草对烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)侵染的抵抗力。赵明敏<sup>[6]</sup>报道,水杨酸诱导的烟草对 TMV 的抗性试验中,指出水杨酸处理后烟草叶片内 TMV 检出量明显降低和枯斑数明显减少。但对喷施 SA 后植株生理代谢的变化研究较少。本试验通过对抗病相关酶活性和活性氧的测定,以期探讨外源 SA 提高烟草对 CMV 抗性的生理机制提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

烟草(*Nicotiana tabacum*)品种为 K326。黄瓜花叶

收稿日期:2008-07-18

基金项目:河南省烟草专卖局资助项目(hykj200201)

作者简介:师金鸽(1985-),女,河南临颖人,硕士,主要从事烟草抗病育种研究。

通讯作者:杨铁钊(1956-),男,河南临颖人,教授,博士生导师,主要从事烟草遗传育种研究。

病毒(CMV)是在河南许昌烟田具有典型黄瓜花叶症状的病株上接种蚜虫,然后将带毒蚜虫接种于无毒黄瓜幼苗上,经分离获得纯 CMV。保存此病毒并接种在烤烟品种 K326 叶片上繁殖,以此作为本试验毒源。

1.2 试验方法

用 0.5 mmol/L 的 SA<sup>[7]</sup>喷洒小十字期烟草幼苗,以喷洒清水作为对照。分别于喷后 24,48,72,96 h 取整株叶片,用液氮处理后保存于 - 20 ℃ 冰箱中以备测 POD、CAT 活性和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量。

烟苗长到 6~7 片叶时移栽到大田,10 片真叶时,再喷 1 次 0.5 mmol/L 的 SA,对照喷洒清水。分别于喷后第 2 天接种 CMV,接种后 24,48,72,96 h 取接种部位以上 2~3 片叶,用液氮处理后保存于 - 20 ℃ 冰箱中以备测 POD、CAT 活性和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量。每个处理 3 次重复,每重复 20 株。

接种后第 5 天开始调查病情,每 2 d 调查一次,记录发病情况,分级标准按中华人民共和国行业标准《烟草病虫害分级及调查方法》(YC/T 39 - 1996)进行,最后将调查结果进行统计分析,计算病情指数和诱抗效果<sup>[8]</sup>:

诱抗效果 =  $\frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100\%$

CMV 接种方法<sup>[9]</sup>:取 10 g 感染烟草黄瓜花叶病毒(CMV)严重的烟草叶片(卷曲),用 50 mL 无菌水研磨成匀浆,离心取上清液,稀释至 1 000 mL。采用人工摩擦接种的方法将 CMV 病毒接种于对照和 SA 处理烟株的第 7 片叶上。

过氧化物酶活性的测定<sup>[10]</sup>:取 1.0 g 鲜烟叶,放入研钵中,加入 0.02 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mL 研磨成匀浆,于 4 10 000 r/min 离心 15 min,收集上清液保存在冷处。取光径 1 cm 比色杯两只,于一只中加入反应混合液 A 3 mL, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mL,作为校零对照,另一只中加入反应混合液 3 mL,上述酶液 1 mL,立即开启秒表计时,于分光光度计 470 nm 波长下测定 OD 值,每隔 1 min 读数一次。以每分钟 OD 变化值表示酶活性大小,即以 OD<sub>470</sub>/ (min · g) 蛋白质表示。

过氧化氢酶活性的测定:采用南京建成生物工程研究所提供的 A007 CAT 测试盒(过氧化氢酶测试盒)测定。

过氧化氢含量的测定:采用南京建成生物工程研究所提供的 A064 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)测试盒测定。

2 结果与分析

2.1 SA 对烟草抗 CMV 的诱导效果分析

接种 CMV 后第 5 天时,发现对照烟株开始表现轻微花叶症状,而喷施 SA 的烟株则未表现任何症

状,直到接种后第 9 天,喷施 SA 的烟株才表现出轻微花叶症状。接种 CMV 后 21 d 对照和喷施 SA 的烟株病情指数和诱抗效果列于表 1,对照烟株的病情指数 53.65~55.64,平均为 55.24;喷施 SA 的烟株病情指数为 37.15~39.23,平均 38.11,极显著(p < 0.01)低于对照,诱抗效果为 31.01%。结果表明,外源喷施 SA 对诱导 K326 抗 CMV 起到一定作用。

表 1 接种 CMV 后 21 d 烟株的病情指数和 SA 的诱抗效果

Tab.1 The disease indexes of tobacco plants on 21 d after inoculated with CMV and the induced effect treated with SA					
处理	病情指数/ % Disease indexes				诱抗效果/ %
Treatment	平均				Induced effect
SA	37.15	39.23	37.96	38.11	31.01
对照	53.65	55.42	55.64	55.24	-

2.2 外施水杨酸对烟草体内过氧化物酶活性的影响

用 0.5 mmol/L 的 SA 喷洒小十字期烟草幼苗,并测定了喷后 24,48,72,96 h 叶片 POD 活性(图 1),烟草幼苗叶片内 POD 活性随生长进程而逐渐增强。用 SA 处理的烟草幼苗叶片内 POD 活性明显高于对照,且在 48 h 后 POD 活性显著增强。

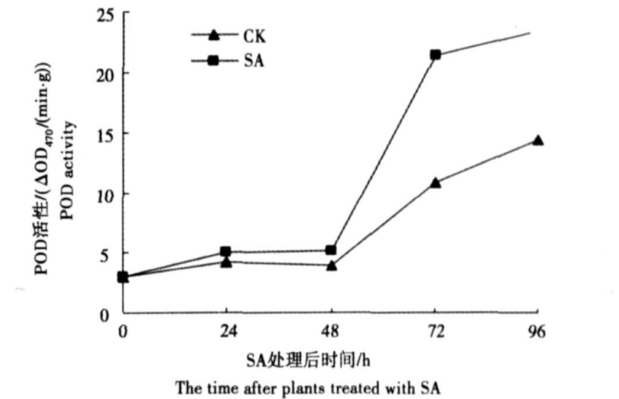


图 1 烟草幼苗叶片 POD 活性变化  
Fig. 1 The change of POD activity in tobacco seedling leaves

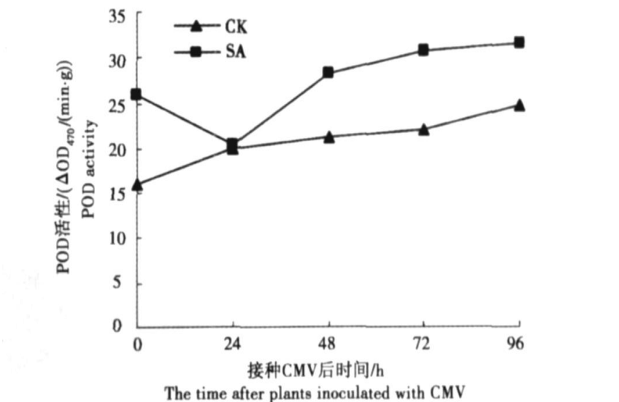


图 2 接种 CMV 后烟株叶片 POD 活性变化  
Fig. 2 The change of POD activity in tobacco leaves after inoculated with CMV

当烟株接种 CMV 后,对照叶片 POD 活性基本上保持上升的趋势(图 2);SA 处理的叶片内 POD 活性先下降,而后迅速增强,但其活性一直高于对照。

### 2.3 外施水杨酸对烟草体内过氧化氢酶活性的影响

SA 处理的烟草幼苗叶片 CAT 活性随生长进程而逐渐降低,在 0~48 h 高于对照,以后逐渐低于对照;而对照烟株的 CAT 活性在 0~48 h 逐渐降低,48~72 h 又增强,随后又开始下降(图 3)。

当接种 CMV 后,SA 处理和对照烟株叶片的 CAT 活性均在 0~24 h 迅速增强,但 SA 处理的烟株叶片 CAT 活性增强更快,明显高于对照;接种 24~72 h SA 处理和对照叶片的 CAT 活性均下降,并且 SA 处理下降的较快,明显低于对照(图 4);72 h 之后,SA 处理和对照烟株叶片的 CAT 活性略微升高。

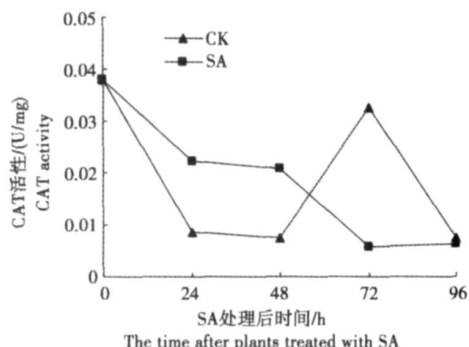


图 3 烟草幼苗叶片 CAT 活性变化

Fig. 3 The change of CAT activity in tobacco seedling leaves

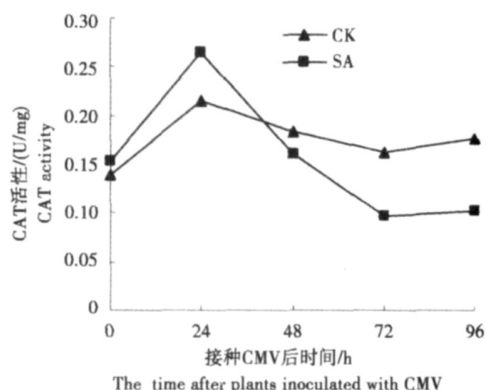


图 4 接种 CMV 后烟株叶片 CAT 活性变化

Fig. 4 The change of CAT activity in tobacco leaves after inoculated with CMV

### 2.4 外施水杨酸对烟草体内过氧化氢含量的影响

SA 处理烟草幼苗叶片  $H_2O_2$  含量在处理后的 0~72 h 内表现出上升趋势,72 h 时高于对照,之后开始下降,但仍高于对照;对照烟草幼苗叶片  $H_2O_2$  含量活性在处理后的 0~48 h 呈上升趋势,之后开始下降,72 h 后低于 SA 处理(图 5)。

当接种 CMV 后,烟株叶片的  $H_2O_2$  含量变化趋

势如图 6 所示,SA 处理烟株和对照烟株叶片的  $H_2O_2$  含量均在接种后上升。SA 处理烟株叶片的  $H_2O_2$  含量在处理后的各时段均高于对照,其中 SA 处理在 72 h  $H_2O_2$  含量达到最大值;对照烟株在接种后 48 h 叶片  $H_2O_2$  含量达到最大值。由此表明,喷施 SA 显著提高了烟草植株体内的  $H_2O_2$  含量。

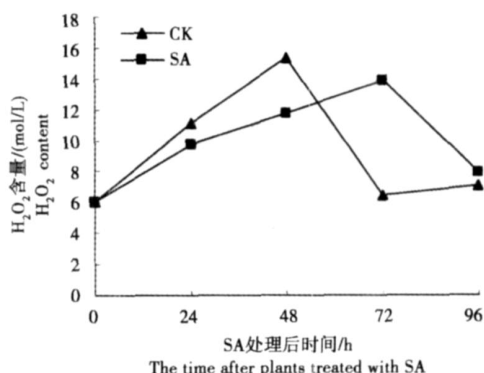


图 5 烟草幼苗叶片  $H_2O_2$  含量变化

Fig. 5 The change of  $H_2O_2$  content in tobacco seedling leaves

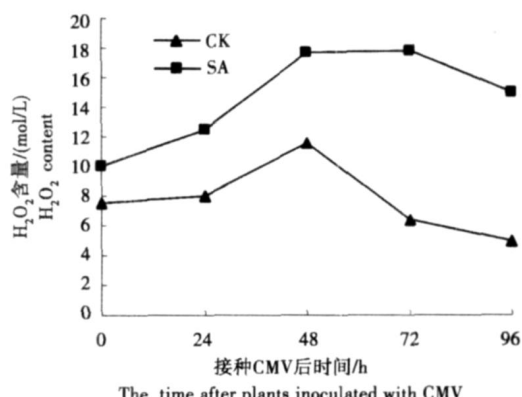


图 6 接种 CMV 后烟株叶片  $H_2O_2$  含量变化

Fig. 6 The change of  $H_2O_2$  content in tobacco leaves after inoculated with CMV

## 3 讨论

分别在苗期和移栽后 10 片真叶期用 0.5 mmol/L SA 处理烟草植株,并在第 2 次 SA 处理后的第 2 天接种 CMV。统计分析了接种后 21 d 的烟株发病情况,结果显示 SA 处理显著提高了烟草植株对 CMV 的抗性,诱抗效果达到 31.01%。由此证明 SA 喷施可以提高烟草植株对 CMV 的抗性。

植物的抗病性与某些酶有关系<sup>[11]</sup>,这些酶的变化规律可以作为抗病性早期的鉴别方法。POD、CAT 等都是常用来鉴定植物抗性的酶,当植物在受到病原菌或是抗病激发子诱导后,常引起其活性发生变化。SA 处理后可以诱导系统酶活性的提高,黄瓜和苜蓿幼苗经 SA 处理后 POD 活性提高<sup>[12,13]</sup>。王伟等<sup>[14]</sup>指出 POD 活性提高是作物感病

后整体获得抗病性的表现之一,使植物抗病保护机制加强。本试验的研究结果表明,SA 预处理的烟株接种 CMV 后 POD 的活性总体上呈上升趋势,说明 SA 诱导可以使烟草对 CMV 产生抗性。张宗申<sup>[15]</sup>曾报道,草酸对 POD 的作用明显被抑制,可能是先诱发了植物体内活性氧积累,进而诱导 POD 活性。本试验 SA 处理的烟株在接种 CMV 后 24 h 内 POD 活性也有下降,这种现象是否与张宗申研究相同,需要进一步研究证明。

CAT 功能是清除病原物侵染造成的活性氧(主要是  $H_2O_2$ ) 积累。CAT 催化  $H_2O_2$  分解为  $H_2O$  和  $O_2$ ,能清除植物体内过量的  $H_2O_2$ ,从而将  $H_2O_2$  维持在正常水平。植物-病原物互作并可使 CAT 活性发生变化并影响植物体内  $H_2O_2$  的积累<sup>[16]</sup>。Chen 等<sup>[17]</sup>鉴定出一种烟草的可溶性 SA 结合蛋白(SA-binding protein, SABP),该蛋白与 CAT 高度同源,具有 CAT 活性。试验表明,SA 与 SABP 结合后阻碍了 CAT 活性,提高  $H_2O_2$  水平,激活抗病相关基因表达。许多研究者对多种病害体系进行了研究,总体趋势是烟草感病后 CAT 活性下降<sup>[11]</sup>。本试验研究结果表明,SA 诱导降低了烟株体内的 CAT 活性,提高了  $H_2O_2$  水平,说明 SA 预处理烟草后接种 CMV,可以诱导烟草对 CMV 产生一定的抗性。接种 CMV 后,SA 处理的烟株 72 h 和对照处理的烟株 48 h 后叶片  $H_2O_2$  含量开始降低,出现这种现象的原因可能是植株体内  $H_2O_2$  水平的过多提高反过来再次诱导 CAT 的活性增加<sup>[17]</sup>。

SA 处理能够提高植株叶片内的  $H_2O_2$  的含量可能的原因是,一方面它们提高了产生  $H_2O_2$  的一些酶的活性(如 SOD 和 POD),另一方面降低了清除  $H_2O_2$  的 CAT 的活性<sup>[18]</sup>。这也可能是在接种后 0~24 h SA 处理和对照处理的烟株叶片 CAT 活性升高,而  $H_2O_2$  含量仍旧会升高的原因。这些与吴元华等<sup>[19]</sup>报道的对感病烟草品种 NC89 接种 PVY<sup>N</sup>后,除最初 CAT 活性略有升高外,以后活性均低于对照相一致。喷施 SA 后烟草体内酶活性变化的内在机制有待于进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Thomas J S, Elaine C, Timothy S. The structure of cucumber mosaic virus and comparison to cowpea chlorotic mottle virus [J]. Journal of Virology, 2000, 74(16): 7578 - 7586.
- [2] 魏颖颖,王凤龙,钱玉梅. 植物与黄瓜花叶病毒互作的

研究[J]. 植物保护, 2005, 31(1): 15 - 18.

- [3] 刘太国,石延霞,文景芝,等. 水杨酸诱导烟草对 TMV 的抗性和 PAL 活性变化研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 190 - 191.
- [4] 沈文飏,徐朗莱,叶茂炳. 水杨酸诱导植物抗病性的新进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(3): 237 - 240.
- [5] White R F. Acetyl salicylic acid(aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco [J]. Virology, 1979, 99: 410 - 412.
- [6] 赵明敏. 水杨酸诱导的烟草对烟草花叶病毒的抗性[J]. 长江大学学报:自然科学版, 2006, 3(3): 156 - 157.
- [7] 张富平,张蕊. 低温下外源水杨酸对玉米幼苗保护酶活性的影响[J]. 玉米科学, 2007, 15(4): 83 - 85.
- [8] 范树国. 植物病毒及其卫星在寄主体内的移动和分布[J]. 中国病毒学, 2005, 20(6): 675 - 681.
- [9] 贺立红,韩锡居,龙肖娟,等. 茉莉酸甲酯对烟草幼苗可溶性物质含量的影响及与诱导抗病的关系[J]. 华南师范大学学报:自然科学版, 2001, 4: 88 - 94.
- [10] 丁国华,苏燕,徐启江,等. 外源 DNA 导入烟草后过氧化氢酶活性及其同工酶变化的研究初报[J]. 农垦师专学报, 1997(4): 87 - 90.
- [11] 翟彩霞,马春红,秦君,等. 植物诱导抗病性的常规鉴定—相关酶活性变化与诱导抗病性的关系[J]. 植物保护学报, 2004, 20(5): 222 - 224.
- [12] 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.
- [13] 孙涛,曹致中,马晖玲,等. 水杨酸诱导苜蓿对霜霉病抗性的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2006(3): 61 - 64.
- [14] 王纬,陈辉,周世伟,等. 水杨酸和氨基酸对烟草黄瓜花叶病毒病防治效果的研究[J]. 烟草科技, 1996(1): 43 - 45.
- [15] 张宗申. 非生物诱导剂对黄瓜叶片过氧化物酶的系统诱导作用[J]. 植物病理学报, 1998, 28(1): 145 - 150.
- [16] 何晨阳,王金生. 植物过敏反应中的生理生化变化[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(2): 150 - 154.
- [17] Chen Z, Klessig D F. Identification of a soluble salicylic acid-binding protein that may function in signal transduction in the plant disease resistance response[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 8179 - 8183.
- [18] 吴建丽,郝建军. 水杨酸与植物诱导抗病性[J]. 辽宁林业科技, 2005(1): 33 - 35.
- [19] 吴元华,文才艺,李浩戈,等. 烟草感染马铃薯 Y 病毒脉坏死株后六种酶活性变化的研究[J]. 中国烟草学报, 1999, 2(5): 30 - 34.