

花生网斑病诱导抗性及其寄主防御酶应答反应和 *NPR1* 表达的测定

夏淑春¹, 王学武², 王志葵³, 况川¹, 张茹琴¹, 鄢洪海¹

(1. 青岛农业大学 农学与植物保护学院, 山东 青岛 266109; 2. 青岛市植物保护站, 山东 青岛 266101;

3. 青岛市即墨植物保护站, 山东 青岛 266110)

摘要: 采用叶面喷施水杨酸、病原菌培养滤液、草酸等因子诱导花生植株对网斑病抗病性, 并测定寄主防御酶活性变化和 *NPR1* 基因表达量, 来探讨花生诱导抗病性及作用机制。结果表明: 诱导处理可以使花生获得系统抗病性, 且以 2.0 mmol/L 水杨酸诱导花生网斑病抗性效果最好, 控制病害效果达到 35.3%; 寄主防御酶活性升高与诱导抗病性强度呈正相关, 但几种防御酶在诱导抗病性应答反应中的变化存在显著差异; 实时荧光定量 PCR 分析表明: 2.0 mmol/L 的 SA 诱导处理后花生叶片中 *NPR1* 表达量明显升高, 与诱导抗病性密切相关。

关键词: 花生网斑病; 诱导抗病性; 水杨酸; 寄主防御酶; *NPR1* 基因

中图分类号: S565.201 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)增刊-0388-05

Peanut Web Blotch Induced Resistance and the Host Defense Enzyme Response and Determination of *NPR1* Expression

XIA Shu-chun¹, WANG Xue-wu², WANG Zhi-kui³, KUANG Chuan¹,
ZHANG Ru-qin¹, YAN Hong-hai¹

(1. College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China; 2. Qingdao Plant Protection Station, Qingdao 266101, China; 3. Qingdao-Jimo Plant Protection Station, Qingdao 266110, China)

Abstract: Induce peanut plants to spot disease resistance by spraying salicylic acid on leaves, pathogen culture filtrate, oxalic acid and other factors. Then determine the changes of host defense enzyme activity and *NPR1* gene expression to explore the induced disease resistance and its mechanism. Results show that peanut can get systemic resistance by induction. Best results for 2.0 mmol/L salicylic acid induced peanuts and the controlling efficacy was 35.3%. The host defense enzyme activity was positively correlated with the intensity of induced disease resistance, but the induced disease resistance response changes of several defense enzymes varies greatly from the other. Real-time fluorescent quantitative PCR analysis showed that the tendency for 2.0 mmol/L of SA induced *NPR1* expression in peanut leaf volume increased significantly after treatment, which is closely related to the induction of disease resistance.

Key words: Peanut web blotch; Induced resistance; Salicylic acid; Host defense enzymes; *NPR1* gene

1982 年 Kuć 等用试验证明了诱导抗病性的存在, 且水杨酸等因子可诱导拟南芥、烟草、玉米等产生抗性, 是已被认定的系统获得抗性的化学诱导剂^[1]。植物系统获得抗病性的发生涉及基因的表达和调控, 而防御酶分析则可以作为认识基因存在和表达的工具^[2]。超氧化物歧化酶(SOD)是植物

体内超氧阴离子自由基的清除剂, 参与植物对各种逆境的生理生化反应, 是植物体内一种重要的抗氧化酶类, 而苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)则是酚类物质的氧化及木质素的合成关键酶类, 与植物的抗病性密切相关^[3]。因此, 防御酶的规律性变化可以作为一种早

收稿日期: 2013-09-10

基金项目: 山东省科技发展项目(2009GG10009022); 山东省自然科学基金项目(ZR2011CL005); 山东省“泰山学者”建设工程专项经费(BS2009NY040)

作者简介: 夏淑春(1964-), 女, 辽宁锦州人, 副教授, 主要从事植物有害生物综合治理研究。

通讯作者: 鄢洪海(1964-), 男, 吉林九台人, 教授, 博士, 主要从事植物病理生理与分子生物学研究。

期的鉴别手段,用来研究植物的抗病性问题。另外,病程相关基因非表达子 1 (Non-expressor of PR1, *NPR1*) 是不同形式的抗病性信号传导途径的交叉点,是调节植物整体抗病性的重要因子,通过对转 *NPR1* 基因植物的分析,发现 *NPR1* 的表达会影响抗病信号传导途径中下游抗病基因的反应,从而提高植株对真菌和细菌病原体的抗性^[4-5],因此,*NPR1* 作为植物广谱抗病性基因也倍受人们关注。

本研究将就如何诱导花生网斑病抗性,以及诱导抗病性的机制进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料及处理

供试花生品种为感病品种白沙 1016,由山东省花生研究所提供。供试花生网斑病菌从采自山东省莱阳市花生田病株上分离培养获得,并经单孢分离纯化。将花生品种白沙 1016 种植于经干热高温灭菌处理的花盆土壤中,待到植株生长至始花期用于接种和诱导抗性试验。接种用花生网斑病菌的孢子悬浮液浓度为 1×10^5 个分生孢子/mL,内加 0.1% 的 Tween-20,及适量蔗糖以增加孢子附着性和活性。孢子悬浮液制备前病菌先在燕麦琼脂培养基上增殖培养 25 d 后,以无菌水冲刷菌体,调配孢子悬浮液。

诱抗剂①病原菌培养滤液制备:燕麦培养液中 26 °C 振荡培养 20 d,4 层纱布过滤,滤液 1 500 r/min 离心 20 min,高压灭菌 10 min,然后配制浓度 1%、2%、5% (V/V) 原液用于诱抗处理,②草酸、 MgSO_4 、 K_2HPO_4 、水杨酸溶液制备:药剂先溶于蒸馏水,然后用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值 = 7,并分别配制不同浓度药液,内加 0.1% 的 Tween-20 以增加药剂与叶片的粘附性。

1.2 试验处理及样品采集

将供试诱抗剂喷雾处理盆栽的花生植株,每盆 10 mL,保湿 24 h 后挑战接种网斑病菌,以无菌水处理为对照。在诱抗剂处理后第 0、12、24、36、48、60、72、84、96 h 时分别采集植株中部叶片作为测试样品,置于冰箱中备用。接种植株 20 d 后调查发病情况,花生网斑病分级标准参照袁虹霞等^[6]方法进行,通过病情指数比较处理间诱导抗病性效果,并进行差异显著性分析。

病情指数 (DI) = Σ (发病叶片数 × 发病级数) / (最高病级数 × 调查总叶片数) × 100。

1.3 寄主防御酶的提取及活性测定

PAL 酶的提取和活性参照陈捷等^[7]方法,SOD 酶液的提取及测定参照李合生^[8]的方法,PPO

酶液的提取及测定参考 Cheng 和 Crisosto^[9]的方法,个别略有改动和方法优化。

1.4 水杨酸处理后 *NPR1* 基因的表达分析

RNA 提取参照 TaKaRa 植物 RNA 提取试剂盒说明书进行,以纯化后的总 RNA 为模板,在反转录酶的作用下反转录成 cDNA。以花生 *Actin* 基因(序列号 GU354312.1) 作为内参,其引物对设计为 *Act*-F: 5'-TTGGGATGGGTGCAAGG-3' 和 *Act*-R: 5'-CTGTGAGCAGAACTGGGTG-3',目的基因 *NPR1* 引物对设计为 *NPR1*-F: 5'-CTCATTTCAGCCGAACCATC-3' 和 *NPR1*-R: 5'-TCAATCAACAACCTGCTCCAA-3'。对反转录获得的 cDNA 做梯度稀释,进行荧光定量反应,绘制相对标准曲线。

反应体系为 25 μL ,含有 12.5 μL SYBR Master Mix, 2.0 μL cDNA, 8.5 μL ddH₂O,上、下游引物各 1.0 μL (引物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)。

反应程序为:95 °C 预变性 1 min;95 °C 变性 15 s,57 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 45 s,40 次循环。每个样品重复 3 次,数据采用相对定量方法进行分析。

试验数据用 SPSS 软件进行方差分析,采用新复极差测验法进行平均数的比较,应用 Excel 软件进行制图。

2 结果与分析

2.1 花生网斑病诱抗抗性效果

由表 1 可以看出,各诱抗处理的花生网斑病发生情况比对照都有一定减轻,表明诱抗剂诱导了花生对网斑病抗性。然而,诱抗剂不同、浓度不同,诱导抗病的效果也各不相同。2.0 mmol/L 的水杨酸和 1.0 mmol/L 的磷酸氢二钾诱导抗病效果最好,病情指数分别下降 35.3% 和 32.3%。硫酸镁、0.5、5.0 mmol/L 水杨酸和 0.5、5.0 mmol/L 磷酸氢二钾的诱抗效果不明显,说明诱抗剂及其施用浓度对诱导抗病性的效果影响显著。

2.2 诱导处理对寄主防御酶系活性的影响

2.2.1 诱导处理对 PAL 酶活性的影响 从图 1 可以看出,与对照水处理比较,几种诱抗剂均能不同程度地提高 PAL 的活性,但是变化趋势和活性增加程度不同。诱导处理后,磷酸氢二钾溶液处理对 PAL 活性影响最显著,72 h 酶活性达到峰值,为 121.8 U/(g·min);水杨酸处理对 PAL 活性的影响与磷酸氢二钾处理效果相近,酶活性一直保持在较高的水平。草酸、硫酸镁和病菌滤液处理 PAL 活性变化趋势相似,在 60~72 h 时酶活性达到峰值,影响效果

也明显。

表 1 几种诱抗剂对花生网斑病抗病性诱导效应

Tab.1 Effects of inducers on <i>Phoma arachidicola</i> of peanut			
处理 Treatment	浓度 /(mmol/L) Concentration	病情指数 Disease index	诱抗效果/% Induced disease resistance effect
对照 CK	—	36.8a	—
水杨酸	0.5	33.2b	9.8
Salicylic acid	2.0	23.8e	35.3
	5.0	33.5b	9.0
草酸	0.01	27.9d	24.2
Oxalate	0.05	32.7b	11.1
	0.10	36.0a	2.2
硫酸镁	0.5	35.6a	3.2
Magnesium	1.0	32.9b	10.6
sulfate	5.0	33.0b	10.3
磷酸氢二钾	0.5	33.1b	10.1
Potassium hyarogen	1.0	24.9e	32.3
phosphate	5.0	35.6a	3.3
病菌滤液(V/V)	1%	31.4c	14.7
Germs filtrate	2%	29.1c	20.9
	5%	33.5b	8.9

注:采用 Duncan's 新复极差法比较处理对照差异显著性。 $P=0.05$ 。

Note: Differences between different treatments were analyzed according to Duncan's new multiple range test. $P=0.05$.

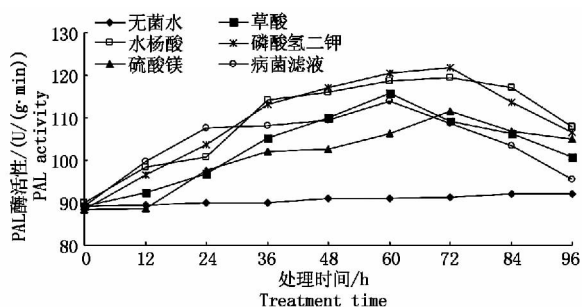


图 1 诱抗剂诱导处理对 PAL 活性的影响

Fig.1 Effect of inducers on PAL activity before inoculation with *Phoma arachidicola*

图 2 为诱导处理并挑战接种处理对 PAL 活性影响曲线,可以看出酶活性较仅作诱导处理的 PAL 活性变化曲线有明显差异。用水杨酸作为诱抗剂的处理挑战接种后,其 PAL 酶活性增加最为显著,处理 12 h 后酶活性急剧增加,在 36 h 时酶活性达到峰值,为 $149.8 \text{ U}/(\text{g} \cdot \text{min})$,之后缓缓下降,较图 1 中水杨酸对该酶的影响强烈,活性进一步增加,而且峰值出现早了 36 h。草酸、磷酸二氢钾、硫酸镁和病菌滤液作为诱抗剂处理后再挑战接种, PAL 酶活性较图 1 中单纯诱导处理的曲线也有一定变化,主要酶活性最高峰值都有所增加,但出现时间基本还在 60~72 h 时间内,主要是强度有一定程度提高。

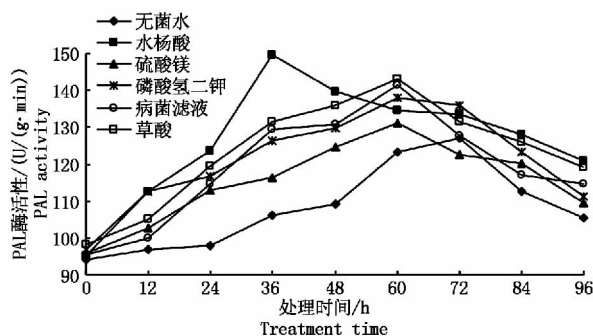


图 2 诱导处理并挑战接种对花生植株 PAL 活性的影响

Fig.2 Effect of inducers on PAL activity after inoculation with *Phoma arachidicola*

2.2.2 诱导处理对 PPO 酶活性的影响 由图 3 可以看出,与对照水处理相比,各诱抗剂处理都能够提高花生植株 PPO 酶的活性。在几种诱抗剂中以磷酸氢二钾溶液诱导处理对 PPO 酶活性影响最显著,在处理 48 h 后达到峰值 $116.5 \text{ U}/(\text{g} \cdot \text{s})$,之后迅速下降;其次是水杨酸处理,硫酸镁最差,但都影响显著,增加明显。几种诱抗剂对 PPO 酶活性的影响变化曲线比较相似。

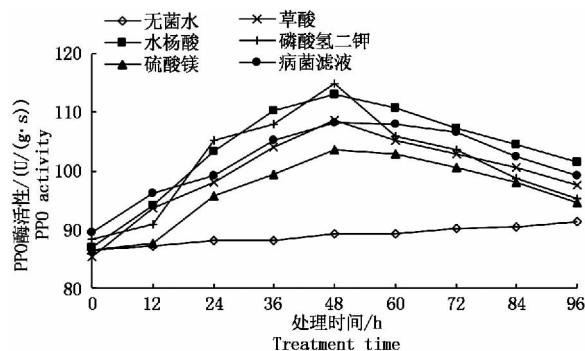


图 3 挑战接种前诱导处理对 PPO 活性的影响

Fig.3 Effect of inducers on PPO activity before inoculation with *Phoma arachidicola*

从图 4 可以看出,水杨酸作为诱抗剂处理花生植株后再接种网斑病菌,对 PPO 酶活性变化影响最显著,酶活性升高迅速,在处理 36 h 时就达到最大值 $146.1 \text{ U}/(\text{g} \cdot \text{s})$,相比图 3 仅作诱导处理不作挑

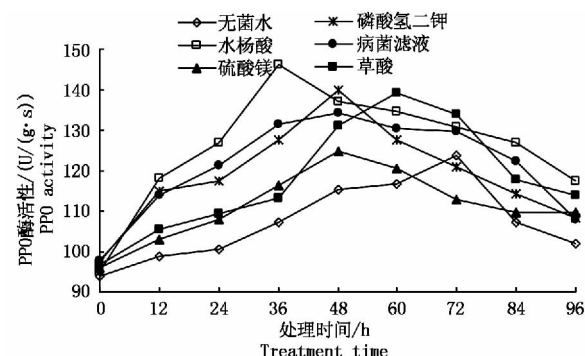


图 4 挑战接种后诱导处理对 PPO 活性的影响

Fig.4 Effect of inducers on PPO activity after inoculation with *Phoma arachidicola*

战接种活性进一步提高,并且峰值提早 12 h 出现。之后酶活性缓慢下降,直到 72 h 仍然维持较高的活性水平,96 h 时酶活性仍高于其他诱导剂处理,持效期较长。草酸作为诱抗剂处理挑战接种后,较单独诱抗处理 PPO 酶活性也有进一步增加,但相比峰值较前者晚 12 h。其他几种诱抗剂也都有不同程度增加 PPO 酶的活性作用,但曲线变化不是十分显著。

2.2.3 诱导处理对 POD 酶活性的影响 从图 5 可以看出,诱抗剂处理之后,POD 酶活性有了不同程度的提高。其中,以磷酸氢二钾诱导处理效果最为明显,处理后 12 h,酶活性迅速升高,60 h 时达到最大值为 $134.6 \text{ U}/(\text{g} \cdot \text{min})$,之后迅速下降。水杨酸处理与磷酸二氢钾比较相似。其次是草酸处理、病菌滤液和硫酸镁。但病菌滤液处理后 POD 酶活性 48 h 就达到峰值,比其他几种诱抗剂处理峰值出现早 12 h。

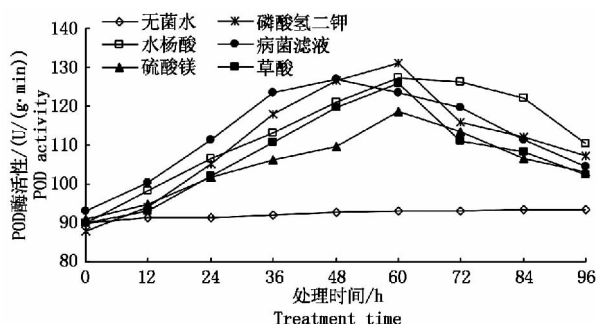


图 5 挑战接种前诱导处理对 POD 活性的影响

Fig. 5 Effect of inducers on POD activity before inoculation with *Phoma arachidicola*

如图 6 所示,诱导处理后再挑战接种花生网斑病菌,植株中 POD 酶活性比接种前和单独诱导处理都有明显提高,尤其以水杨酸处理影响显著。水杨酸处理中 POD 酶活性在 12 ~ 24 h 急剧升高,48 h 时达到最大值 $141.6 \text{ U}/(\text{g} \cdot \text{min})$,且直到 96 h 时植株 POD 酶活性一直保持较高水平。其次对 POD 酶的影响依次是草酸、病菌滤液、磷酸氢二钾,硫酸镁最差。另外,水杨酸、病菌滤液作为诱抗剂处理比草

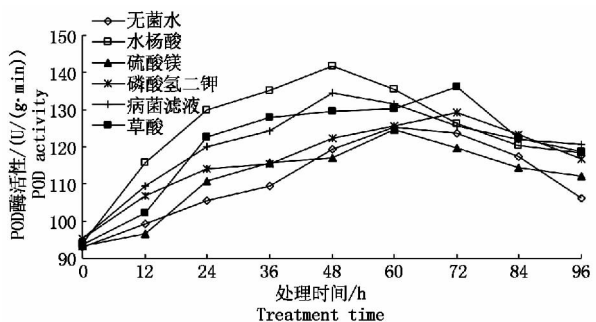


图 6 挑战接种后诱导处理对 POD 活性的影响

Fig. 6 Effect of inducers on POD activity after inoculation with *Phoma arachidicola*

酸、磷酸氢二钾、硫酸镁处理 POD 酶活性峰值出现早 12 h。

2.3 *NPR1* 对水杨酸处理的应答反应

由图 7 可以看出,在水杨酸处理并接种花生网斑病菌 4 h 叶片中 *NPR1* 的表达量与对照差异不显著;但之后快速表达,且表达量增高呈双峰曲线变化;分别在处理 12、24 h 时,叶片中 *NPR1* 的表达量出现峰值,以 24 h 的表达量为最高。上述试验结果表明,水杨酸处理不仅诱导了花生网斑病抗性,而且还对花生叶片中 *NPR1* 的表达有促进作用,出现 2 个表达高峰可能和诱导后进行挑战接种有关。

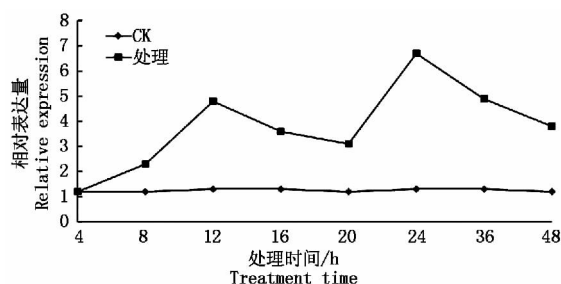


图 7 水杨酸处理对花生叶片 *NPR1* 基因表达量的影响

Fig. 7 Effects of Salicylic acid on the quantity of peanut leaf *NPR1* gene expression

3 结论与讨论

用 SA 等物质作为诱抗剂处理花生叶片后,可以诱导花生对网斑病抗病性,使花生受网斑病菌的侵染减轻。其中以 2.0 mmol/L 的 SA 诱导抗病效果最为显著,病情指数下降最明显。从 SA 在不同浓度范围诱导花生网斑病抗性结果看,SA 诱导作用有一定的生理浓度水平,当低于需要的最低生理浓度时诱导效果不明显,而浓度过高诱导效果也会下降,并且还会产生副作用,与李红玉等^[10]用 SA 诱导黄瓜黑星病抗性的研究结果相似。

用诱抗剂处理花生叶片及挑战接种花生网斑病菌,能够不同程度的影响花生植株叶片中寄主防御酶活性,寄主抗病相关酶系活性提高与田间控制病害效果呈正相关,说明诱导寄主防御酶活性增强是花生网斑病抗性的重要生理生化基础。在用诱抗剂处理及挑战接种病菌试验中,以水杨酸处理对 POD、PAL、PPO 的活性影响最显著,主要表现在酶活性峰值出现提前(与单独用诱抗剂处理比较) 12 ~ 36 h,且活性提高显著;在只用诱抗剂处理花生植株试验中,磷酸二氢钾的作用效果好于其他诱抗剂,促进几种防御酶活性升高最为明显;上述试验表明:水杨酸处理对接种病菌表现更为活跃,暗示其在植物诱导抗病性中具有特殊作用,与其他一般性诱导因子的作用显然不同。杨丽娟等研究发现,不同

浓度的 SA 处理后,梨叶片中 SOD、PPO 活性都有显著增加,但几种酶的同工酶带数没变,说明 SA 诱导后仅是在防御酶的表达量上存在差异,即 SA 能够促进梨叶片中 SOD 和 PPO 酶活性的增强,但并未诱导表达新的基因^[11]。因此,水杨酸处理可能是激活了花生一些抗病基因的表达。

花生叶片中的 *NPR1* 基因在 SA 诱导后相对表达量升高,表明外源 SA 有助于花生植株叶片中 *NPR1* 基因的激活,从而促进下游防卫基因的表达,建立植物的系统获得抗性。李敏等^[12]研究表明水杨酸诱导后香蕉叶片的 *NPR1* 基因表达增强,本试验研究结果与其一致。

SA 介导的植物抗病反应是由于复杂的植物保护机制被激活所致,外源 SA 处理后可以提高花生叶片 PAL、POD 和 PPO 防御酶活性,表明花生体内的 SA 信号被激活。而 SA 处理后花生植株中 *NPR1* 基因表达量的变化,亦说明外源 SA 诱导对于激活植物体内的 SA 信号传导是有益的。已有研究表明:*NPR1* 在核中的累积量与外源 SA 浓度相关,并且对 PR 基因的激活是很有必要的^[13-15]。

参考文献:

- [1] Blanco F, Salinas P, Cecchini N M *et al.* Early genomic responses to salicylic acid in Arabidopsis [J]. *Plant Mol Biol* 2009, 70(1): 79-102.
- [2] 余叔文. 植物生理学与分子生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 1992: 415.
- [3] 吴岳轩, 曾富华, 王容臣. 杂交稻对白叶枯病的诱导抗性与细胞内防御系统关系的初步研究 [J]. *植物病理学报*, 1996, 26(2): 127-131.
- [4] Cao H, Li X, Dong X. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance [J]. *Proc Natl Acad Sci* 1998, 95: 6531-6536.
- [5] Reuber T L, Plotnikova J M, Dewdney J *et al.* Correlation of defence gene induction defects with powdery mildew susceptibility in Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants [J]. *Plant Journal*, 1998, 16(4): 473-485.
- [6] 袁虹霞, 孙炳剑, 李洪连, 等. 花生品种(系)对叶斑病的抗性鉴定 [J]. *河南农业科学* 2004(1): 35-38.
- [7] 陈捷, 蔺瑞明, 高增贵, 等. 玉米弯孢叶斑病菌毒素对寄主防御酶系活性的影响及诱导抗性效应 [J]. *植物病理学报* 2002, 32(1): 43-48.
- [8] 李合生. 植物生理生化试验原理与技术 [M]. 北京: 高等教育出版社 2000: 23-24.
- [9] Cheng G W, Crisosto C H. Browning potential, phenolic composition, and polyphenoloxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue [J]. *J Amer Soc Hort Sci* 1995, 120(5): 835-838.
- [10] 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 [J]. *应用与环境生物学报*, 1999, 5(6): 640-642.
- [11] 刘凤权, 王金生. 水杨酸对水稻防卫反应酶系的系统诱导 [J]. *植物生理学通讯* 2002, 38(2): 121-123.
- [12] 李敏, 李胜军, 裴新梧. 香蕉 *NPR1* 基因片段的克隆及对水杨酸的早期应答反应 [J]. *农业生物技术学报* 2007, 15(2): 352-353.
- [13] Kinkema M, Fan W H, Dong X N. Nuclear localization of *NPR1* is required for activation of PR gene expression [J]. *The Plant Cell* 2000, 12: 2339-2350.
- [14] 张智慧, 聂燕芳, 何磊, 等. 外源水杨酸诱导水稻相关防御酶活性及内源水杨酸含量的变化 [J]. *华中农业大学学报* 2010, 29(5): 541-545.
- [15] 高丽娟, 张玉星. 水杨酸对梨 SOD、PPO 同工酶和 *NPR1* 表达的影响 [J]. *园艺学报* 2012, 40(1): 40-48.