

细菌性角斑病病菌诱导黄瓜产生系统抗病性机理的研究

石延霞, 张楠, 李宝聚*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 本研究发现, 用黄瓜亲和病原菌——细菌性角斑病病菌诱导接种后可以使黄瓜叶片产生系统抗病性, 诱导抗病效果与诱导间隔期有关, 其中以间隔 24 和 48 h 效果较好。诱导接种后, 接种叶片及其上位、下位叶片 (未经诱导处理的叶片) 中抗性相关物质 (如 H_2O_2 、 NO_2^-) 含量、脂氧合酶 (LOX) 活性均比对照有明显提高; 信号物质水杨酸 (SA) 含量与未经诱导接种的叶片也有明显变化, 证实信号物质水杨酸在亲和病原菌诱导抗病作用中起到抗病信息传递的作用。

关键词: 黄瓜; 亲和病原菌; 系统抗病性

中图分类号: S 642.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 02-0221-06

Studies of Mechanism of Systemic Resistance in Cucumber Induced by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

SHI Yan-xia, ZHANG Nan, and LI Bao-ju*

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Systemic resistance of cucumber can be evoked when only one of the leaves inoculated by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, and the effect of protection is related with induced intervals, interval 24, 48 h has better effect. After induced inoculating, the content or activity of hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion (NO_2^-), lipxygenase (LOX) in inoculated leaf and its upper, lower leaf (non-induced leaf) were much higher than the control. Meanwhile, the content of salicylic acid increase obviously.

Key words: cucumber; aggressive pathogenic; systemic induced resistance

在生物诱导抗病性的研究中发现, 病毒或真菌弱毒菌株作为激发子诱导寄主产生抗病性的现象普遍存在, 寄主受亲和病原菌侵染后对该病害甚至其他多种病害产生抗性的现象, 在生产实践中也普遍发生, 但相关研究报道较少。田间病害调查中发现, 黄瓜在感染细菌性角斑病病菌后, 黄瓜霜霉病的发生受到严重抑制甚至不再发生; 西葫芦受到白粉病病原菌侵染后, 病毒病的发生明显减轻。

在自然界中, 并未发现由病原物导致寄主物种灭绝的现象发生, 这充分证明寄主和病原物间发生了一个协同进化的过程 (Mark & Rausher, 2001), 通过调节寄主周围生态环境将病害发生控制在一定经济阈值内。这种亲和病原菌诱导抗病性具有广谱性, 它不仅诱导寄主对该病害产生抗性, 同时对其它病害具有“交互保护”作用, 从而达到病害可持续控制的目的。

作者以黄瓜亲和病原菌——细菌性角斑病病菌为诱导物, 研究黄瓜产生系统抗病性的现象, 以期揭示系统抗病性产生的机理, 为植物系统诱导抗病性及其机理的研究提供新的理论依据。

收稿日期: 2007 - 09 - 20; 修回日期: 2008 - 01 - 02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30400060); 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAD07B02); 农业部蔬菜遗传与生理重点开放实验室项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: libj@mail.caas.net.cn; libaoju62197975@126.com)

1 材料与方法

1.1 材料

供试黄瓜品种为‘山东密刺’；供试菌种为黄瓜细菌性角斑病病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*)，由中国农业科学院蔬菜花卉研究所保存，经活化和致病性试验证实具有强致病性。

1.2 亲和病原菌诱导的系统抗病性试验

以黄瓜致病菌——黄瓜细菌性角斑病病菌为诱导菌，角斑病病菌在 NA 培养基平板上培养 36 h，配制成 3×10^7 cfu · mL⁻¹ 菌悬液用于诱导接种。在黄瓜 3 片真叶期进行试验，采用点滴法诱导接种第 2 片真叶，评价其上位叶和下位叶的病情。试验共设 6 个处理。对照：清水处理的黄瓜植株；用喷雾法整株接种角斑病病菌；接种黄瓜第 2 片真叶，24、48、72 和 96 h 后以喷雾法整株接种角斑病病菌。接种后保湿培养。每处理均设 3 次重复，每个重复 20 株。

1.3 亲和病原菌诱导的系统抗病性机理研究

以黄瓜角斑病病菌为诱导菌，在黄瓜 3 片真叶期，用点滴法接种黄瓜角斑病病菌于第 2 片真叶，保湿培养 12、24、48、72、96 h 后，采集接种叶片及其下位、上位叶片，称质量后，放入 -20℃ 冰箱中保存，备用。分别进行脂氧合酶 (LOX) 活性及超氧阴离子、活性氧、水杨酸含量测定，每处理均设 3 次重复，单独测定各次重复，取平均值分析。

1.4 测定项目

脂氧合酶提取及活性测定参照 Axelrod 等 (1981) 的方法。

NO₂⁻ 提取及测定参照 Ding (1998) 的方法。NO 的终末产物为 NO₂⁻，由 NO 与水 and 氧反应所生成。通过测定叶片中的 NO₂⁻ 含量，可测得反应中 NO 的产量。

H₂O₂ 提取及测定参照沈文飏等 (1997) 的方法。

水杨酸 (SA) 的测定，取 1 g 黄瓜叶片，以 5 mL 甲醇研磨并超声波抽提 30 min，9 500 ×g 离心 15 min，收集上清液。上述步骤重复 2 次，合并 3 次抽提液。将样品抽提液直接上样于经预处理的 DEAE-52 纤维素层析柱，收集洗脱液。用 5% 的三氯醋酸 (TCA) 把洗脱液调至 pH 2.5 以下，过活化后的 OASIS 短柱，用 2 mL 80% 甲醇洗脱，供 HPLC 法测定水杨酸含量。HPLC 色谱分析：HPLC 仪器为岛津 Class Vp 系列，色谱柱为 C₁₈ 柱；流动相为乙腈-甲醇-醋酸缓冲液 = (30:10:60)；荧光检测器，Em 为 405，Ex 为 230，柱温 35℃，柱压 8.1 MPa，流速为 0.8 mL · min⁻¹，样品进样量 100 μL，标样进样量 1 μL。

单位鲜样质量 SA 含量 (μg · g⁻¹ FM) = (C_样 × 定容体积) / 样品质量。C_样 = (A_样 × C_标 × V_标) / (A_标 × V_样)；A：峰面积；C：浓度；V：体积。

2 结果与分析

2.1 亲和病原菌诱导的黄瓜系统抗病性反应

黄瓜角斑病病菌诱导接种第 2 片真叶后，发现诱导接种可以导致黄瓜诱导接种叶片的上位叶和下位叶产生对黄瓜角斑病的抗病性反应，并且抗病性效果可持续 3 周 (表 1)。诱导接种后 7 d 调查，诱导间隔期为 24 h 的处理，下位叶的相对防效达 69.49%；而诱导间隔期为 96 h 的处理，防效仅为 8.47%。接种后 14 d 调查发现，诱导间隔 24 h 的处理病情指数为 23.33，相对防效达 58.34%，诱导间隔 96 h 的处理病情指数为 51.00，防效仅为 8.93%。接种后 21 d 调查发现，诱导间隔 24 h 的处理相对防效达 47.61%，诱导间隔 96 h 的处理防效为 -0.39%。在整个系统诱导抗病过程中，诱导间隔期为 24 和 48 h 的处理诱导抗病性效果较好，21 d 时诱导叶片下位叶的防效分别为 91.65% 和 85.87%，而诱导间隔期 96 h 的处理最先发病，说明系统诱导抗病性的产生与诱导间隔期有着密切的

联系，间隔 24、48 h 的效果较好，下位叶的诱导抗病效果可能好于上位叶片。

表 1 角斑病病菌诱导接种后黄瓜植株系统抗性的表达情况

Table 1 Effect of system ic induced resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

诱导间隔 时间 /h Interval time	7 d				14 d				21 d			
	下位叶 The lower leaf		上位叶 The upper leaf		下位叶 The lower leaf		上位叶 The upper leaf		下位叶 The lower leaf		上位叶 The upper leaf	
	病情 指数 Disease index	防效 / % Protective effect	病情 指数 Disease index	防效 / % Protective effect	病情 指数 Disease index	防效 / % Protective effect	病情 指数 Disease index	防效 / % Protective effect	病情 指数 Disease index	防效 / % Protective effect	病情 指数 Disease index	防效 / % Protective effect
对照 Control	5.00	-	0.00	-	10.56	-	0.00	-	15.79	-	0.00	-
0	39.33	-	6.13	-	56.00	-	19.16	-	56.25	-	25.26	-
24	12.00	69.49aA	0.00	100aA	23.33	58.34aA	1.10	94.26aA	29.47	47.61aA	2.11	91.65aA
48	13.29	66.21bA	0.00	100aA	26.09	53.41bB	1.91	90.03aA	37.00	34.33bB	3.57	85.87bA
72	24.74	37.09cB	0.00	100aA	47.00	16.07cC	2.09	89.09aA	51.76	8.34cC	15.07	40.34cB
96	36.00	8.47dC	1.35	77.98bB	51.00	8.93dD	24.62	28.50bB	56.47	0.39dD	25.52	1.03dC

注：表中小写英文字母为在 $P=0.05$ 水平的差异显著性比较；大写英文字母为在 $P=0.01$ 水平的差异显著性比较。

Note: The small letters mean significant difference ($P=0.05$); The capital letters mean significant difference ($P=0.01$).

2.2 脂氧合酶活性的变化

用黄瓜角斑病菌诱导黄瓜叶片后，接种叶片、接种叶片上位叶片、下位叶片与对照相比脂氧合酶 (LOX) 活性多数发生不同程度的提高 (图 1, A)，诱导后 48 h 到达高峰 ($6.51 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$)，此后活性迅速下降。对照组的 LOX 活性则相对稳定，并低于诱导叶片，到 72 h 活性开始下降。诱导叶片的下位叶，LOX 活性低于诱导叶片，上位叶的变化趋势与诱导叶片一致。比较不同叶位在诱导后 48 h LOX 活性变化发现，诱导叶片在该时间活性最高 ($6.51 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$)，其次为诱导叶的上位叶 ($5.89 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$)，最低为下位叶 ($5.64 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$)，但三者均高于相应的对照处理。LOX 是信号传导中茉莉酸合成途径的关键酶和限速酶，它的变化可能是由于诱导抗病信号传导中存在茉莉酸途径所致。

2.3 NO_2^- 含量的变化

黄瓜角斑病菌诱导后诱导叶、上位叶及下位叶中 NO_2^- 含量都明显高于相应的对照 (图 1, B)。其中诱导叶片在角斑病菌接种后 24 h 就到达了含量高峰 ($6.66 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$)，此后下降，在 48 ~ 72 h 保持相对稳定水平，到 96 h 含量再次上升 ($6.32 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$)，而对照始终保持在 $1.1 \sim 1.4 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$ 之间，没有明显变化；诱导叶片的下位叶，在诱导后 48 h 出现含量高峰 ($6.21 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$)；诱导叶片的上位叶在诱导后 24 h 出现含量高峰 ($13.25 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$)，明显高于诱导叶及其下位叶，这一结果与角斑病菌诱导接种后黄瓜植株的系统抗病性表达结果 (表 1) 一致，在诱导接种 24 h 后，诱导叶片的上位叶片病情指数最低，相对防效最高，3 次调查分别为 100%、94.26% 和 91.65%，表明角斑病菌诱导后， NO_2^- 存在上传导现象，同时诱导后诱导叶片上位叶大量合成 NO_2^- 。

2.4 H_2O_2 含量的变化

黄瓜受角斑病菌诱导后，接种叶片、下位叶和上位叶的 H_2O_2 含量均高于相应的对照 (图 1, C)。接种叶片中 H_2O_2 含量在接种后 48 h 上升到一个峰值 ($123.56 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$)，之后迅速下降，在接种叶片的下位叶中 H_2O_2 含量也出现上升下降趋势，上位叶片在测量范围内 H_2O_2 含量始终保持在较高水平，没有明显变化，只在诱导后 72 h 出现一个小的峰值。

2.5 水杨酸 (SA) 含量的变化

经黄瓜角斑病菌诱导处理的黄瓜叶片中 SA 的含量有显著提高。黄瓜的第 2 片真叶经过诱导处理后，SA 的含量呈升高—降低—再升高的趋势变化，其上位叶、下位叶片中也有类似变化，并在诱导接种后 48 h 达到最高峰。而未经诱导处理的黄瓜第 2 片真叶几乎没有变化。这说明亲和病原菌可以

诱导植株产生与抗性相关的信号物质, 且诱导叶片产生的信号物质能上下传导, 使整个植株产生抗病性。

由试验结果可知, 亲和病原菌诱导黄瓜后, 该植株中与产生抗性相关的信号物质 SA 的含量增加, 激活 SA 信号传导途径, 导致抗病信号可以迅速地向上、向下传递, 从而使整个植株产生对其他病原菌的抗性。但其向下传递的速度较快, 诱导 48 h 的黄瓜叶片中 SA 的含量要低于其下位叶的含量,

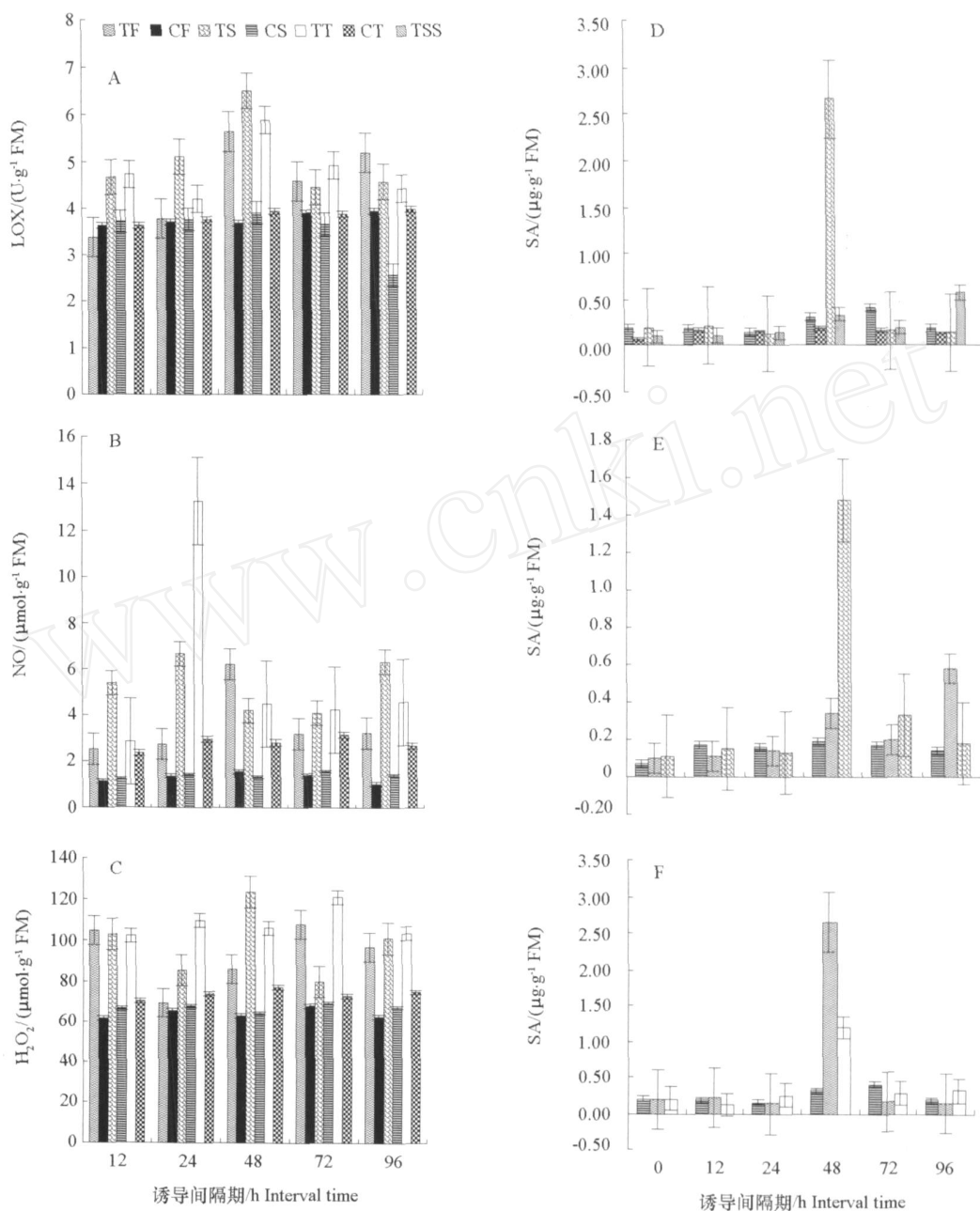


图 1 亲和病原菌诱导后信号相关物质变化

TF: 诱导叶的下位叶片; CF: 下位叶对照叶片; TS: 经诱导接种的叶片; TSS: 诱导接种的上位叶片;

CS: 未诱导的对照叶片; TT: 诱导叶的上位叶片; CT: 上位叶片的对照叶片。

Fig. 1 Change of signal substance after aggressive pathogen inducing cucumber

TF: Lower leaf from the inoculated leaf; CF: The control of lower leaf; TS: Inoculated leaf; TSS: Inoculated upper leaf;

CS: Untreated leaf; TT: Upper leaf from the inoculated leaf; CT: The control of upper leaf

这在一定程度上说明, 地心引力对 SA 的传递有一定的影响。水杨酸含量的变化与角斑病菌诱导接种后黄瓜植株的系统抗病性表达结果 (表 1) 不完全一致, 在诱导叶片的上位叶抗病效果高于下位叶片, 而水杨酸积累在上位叶中的含量低于下位叶片。

3 讨论

经研究发现, 亲和病原菌诱导黄瓜产生的诱导抗病性效果与其他化学诱导剂、物理因子等存在相似性, 但又有其特点 (李冠和欧阳光察, 1990)。本研究结合前人对诱导抗病机制的研究方法, 从信号传递物质方面对亲和病原菌的诱导抗病性进行了初步研究。结果发现, 亲和病原菌诱导寄主黄瓜之后, 激活了寄主的抗性信号的传导, 与抗病信号传导相关的脂氧合酶、超氧阴离子、活性氧、水杨酸等均表现不同程度的变化, 寄主表现出系统抗病反应 (Den et al, 2003)。分析抗病信号传导涉及到几个传递途径:

首先, 亲和病原菌侵染寄主后诱导 NADPH 氧化酶合成是过氧化物合成酶信号途径的第一步, 在此过程中产生 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 可以在健康植物木质化过程中产生, 这个过程也可被激发子诱导所产生 (Alvarez et al, 1998; Klarzynski et al, 2003), 一方面 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 直接攻击病原菌, 抑制病原微生物发育, 另一方面 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 可作为过氧化物合成酶信号途径的第二信使, 通过产生其它信号, 在诱导植保素信号中起作用。

其次, 水杨酸 (SA) 在超氧化物合成酶信号途径中通过改变细胞中的 H_2O_2 水平来活化防卫反应, 水杨酸通过阻断过氧化氢酶活性, 导致 H_2O_2 水平提高 (Klessig et al, 2000), 因此, 亲和病原菌侵染后寄主在不同的诱导间隔期内出现 H_2O_2 含量增加的现象, 同时在亲和病原菌侵染后, 诱导叶片 SA 浓度显著增高, 诱导叶片的上位叶片和下位叶中 SA 含量也明显高于未经过亲和病原菌诱导的相应叶位的叶片, 说明 SA 在亲和病原菌诱导寄主后作为系统获得抗性中的自然信号传递物质。在诱导叶片的上位叶中水杨酸含量低于下位叶, 但诱导叶片的上位叶抗病效果高于下位叶片, 说明系统抗病效果除了与系统抗病信号物质传递相关, 也可能与黄瓜叶片的衰老程度有关, 但同时也表明在诱导叶片的上位叶和下位叶片中只要存在水杨酸积累就可以产生系统抗病性作用。

在另一个反应中, 脂氧合酶 (LOX) 是茉莉酸合成途径的关键酶和限速酶, 是过敏反应信号传递中的重要物质 (Axelrod et al, 1981), 本研究用黄瓜角斑病菌诱导黄瓜叶片后, 接种叶片、接种叶片上位叶片、下位叶片与对照相比脂氧合酶活性均发生不同程度的改变。在这一变化中, LOX 激活磷脂酶 A2, 导致作为第二信使的物质及超氧离子释放, 产生对微生物有毒性的氢过氧化物酶衍生物, 并将抗病信号放大、传递, 诱导防御基因的表达, 起到过敏反应作用。

再有, 在 NO 合成酶途径中, 反应产物是 NO、瓜氨酸和 $NADP^+$, NO 和 $O_2^{\cdot-}$ 作用生成 $ONOO^{\cdot-}$, 可能对病原菌有毒性, 同时 NO 刺激鸟苷酸环化酶催化 GTP 形成 cGMP, 提高蛋白激酶或加入长距离信号传导 (陈英等, 2002; 董海丽和井金学, 2003)。本研究中黄瓜角斑病菌诱导后诱导叶、诱导叶片上位叶及下位叶中 NO_2^- 含量都明显高于相应的对照, 并且三者均存在由低到高再到低的变化过程, 说明亲和病原菌激活了 NO 合成酶途径的长距离信号传导作用, 导致诱导抗病效果在植物中向上、向下传导。

综上可知, 关于激发子信号传导, 可能每种激发子单独起作用, 也可能这些信号相互作用。细胞中可能存在协调的信号网络, 当信号与其受体相互作用, 激活某些信号途径, 同时可能增加其它信号途径对这些信号的敏感性。在本研究中, 亲和病原菌侵染引起抗病信号的传导, 也是多种信号物资协调作用的信号传导网络, 当亲和病原菌侵染寄主时, 引起寄主细胞壁木质素合成以抵御病原菌, 而木质化作用中产生的 H_2O_2 作为第二信使诱导植保素合成, 同时受病原菌刺激, 激活水杨酸、茉莉酸信

号传导途径, 并通过 H_2O_2 将信号扩大, 向植株传导导致系统抗病性。事实证明, 许多信号途径可能被其它途径的第二信使调节。一些转录因子只有几个信号途径相结合才能被激活, 每个信号途径可使转录因子的一个氨基酸残基磷酸化, 大量的磷酸化才能形成其有活性的构相, 激活防御基因表达 (Coquoz et al, 1995; 蔡新忠和郑重, 1999; 王生容和朱克恭, 2002)。

本研究以病原菌为激发子诱导植物产生抗病性的现象是以寄主与病原物的协同进化过程理论为基础, 从系统抗病性的现象及机理入手, 在一定程度上揭示了亲和病原菌与系统抗性之间的关系, 以期系统抗病性的理论及实践应用提供一定的技术支持。

References

- Alvarez M E, Pennell R I, Meijer P J, Ishikawa A, Dixon R A, Lamb C. 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92: 773 - 784.
- Axelrod B, Cheesbrough T M, Leak S. 1981. Lipoxygenase from soybeans. *Methods in Enzymology*, 7: 443 - 451.
- Cai Xin-zhong, Zheng Zhong. 1999. Mechanisms and pathways of plant systemic acquired resistance. *Journal of Plant Protection*, 26 (1): 83 - 90. (in Chinese)
- 蔡新忠, 郑 重. 1999. 植物系统获得抗病性的产生机理和途径. *植物保护学报*, 26 (1): 83 - 90.
- Chen Ying, Huang Min-ren, Zhuge Qiang, Wang Ming-xiu. 2002. Signaling pathways and interplay in plant disease resistance. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition*, 26 (3): 85 - 90. (in Chinese)
- 陈 英, 黄敏仁, 诸葛强, 王明庥. 2002. 植物抗病信号传导途径及其相互作用. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 26 (3): 85 - 90.
- Coquoz J L, Buchala A J, Meuwly P, Métraux J P. 1995. Arachidonic acid treatment of potato plants induces local synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Phytopathology*, 85: 1219 - 1224.
- Den Hartog M, Verhoef N, Munnik T. 2003. Nod factor and elicitors activate different phospholipid signaling pathways in suspension-cultured alfalfa cells. *Plant Physiology*, 132 (1): 311 - 317.
- Ding A H. 1998. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophage. *J Immunol*, 141: 2407 - 2412.
- Dong Hai-li, Jing Jin-xue. 2003. Role of ROS and NO in plant disease resistance responses. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition*, 31 (1): 161 - 166. (in Chinese)
- 董海丽, 井金学. 2003. 活性氧和一氧化氮在植物抗病反应中的作用. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 31 (1): 161 - 166.
- Klarzynski O, Descamps V, Plesse B, Yvin J C, Kbaieg B, Fritig B. 2003. Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16 (2): 115 - 122.
- Klessig D F, Dumer J, Noad R, Navarre D A, Wendehenne D, Kumar D, Zhou M J, Shah J, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H. 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 8849 - 8855.
- Li Guan, Ouyang Guang-cha. 1990. Induced disease resistance of plant. *Plant Physiology Communications*, (6): 1 - 5. (in Chinese)
- 李 冠, 欧阳光察. 1990. 植物诱导抗病性. *植物生理学通讯*, (6): 1 - 5.
- Mark D, Rausher. 2001. Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature*, 411 (14): 857 - 864.
- Shen Wen-biao, Ye Mao-bing, Xu Lang-lai. 1997. Changes of ability of scavenging active oxygen during natural senescence of wheat flag leaves. *Acta Botanica Sinica*, 39: 634 - 640. (in Chinese)
- 沈文彪, 叶茂柄, 徐朗莱. 1997. 小麦旗叶自然衰老过程中清除活性氧能力的变化. *植物学报*, 39: 634 - 640.
- Wang Sheng-rong, Zhu Ke-gong. 2002. Advances of research on systemic acquired resistance in plant. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 10 (2): 32 - 35. (in Chinese)
- 王生容, 朱克恭. 2002. 植物系统获得抗病性研究进展. *中国生态农业学报*, 10 (2): 32 - 35.