

外源诱抗剂对烟草青枯病的诱抗效果研究

江厚龙¹, 李 鹏², 李钠钾¹, 催伟伟¹, 张 艳¹, 耿丽娜¹, 丁 伟¹

(¹重庆烟草科学研究所/西南大学植物保护学院/植物保护博士后科研流动站, 重庆 400715;

²平顶山学院, 河南平顶山 467000)

摘要:为研究外源诱抗剂对烟草青枯病的诱抗效果,利用外源水杨酸、核黄素和草酸等诱抗物质处理烟苗,研究3种物质处理后接种青枯病对相关酶活性、可溶性蛋白含量、病情指数和相对防效的影响。结果表明,3种诱抗物质均能提高叶片内的苯丙氨酸酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)的活性及可溶性蛋白含量,但却降低了过氧化氢酶(CAT)活性。3种物质均可诱导烟草对青枯病的抗性,前期以核黄素的诱抗效果较好,平均防效达55.71%(5天),且与水杨酸差异不显著;中期(8天)以水杨酸防效较好,防效为42.20%,显著高于其他2种物质;后期水杨酸的诱抗效果好,平均防效达33.67%(11天)。

关键词:烟草;水杨酸;核黄素;草酸;诱导抗性

中图分类号:S572

文献标志码:A

论文编号:2014-0736

Inhibition Effects of Induced Resistance on Tobacco Resistance to *Ralstonia solanacearum*

Jiang Houlong¹, Li Peng², Li Naji¹, Cui Weiwei¹, Zhang Yan¹, Geng Lina¹, Ding Wei¹

(¹Chongqing Tobacco Science Research Institute/ College of Plant Protection, Southwest University/

Postdoctoral Research Station of Plant Protection, Chongqing 400715;

²Pingdingshan University, Pingdingshan Henan 467000)

Abstract: The objectives of this study were to investigate the inhibition effects of induced resistance on tobacco resistance to *Ralstonia solanacearum*. The effects of disease index, relative control effect, enzyme activities and content of water-soluble protein were studied after the tobacco leaves had been treated with salicylic acid (SA), riboflavin and oxalate acid, and inoculated with *Ralstonia solanacearum* the next day. The results showed that after leaf treated with the three induced-resistances, the activities of PAL, POD and PPO, the content of soluble protein were increased while CAT activities were inhibited in leaves. The three resistant inducers could induce the tobacco to produce resistance to *Ralstonia solanacearum*. At earlier stage (5 d), the riboflavin had the best induced resistance effects, the effective percentage was 55.71%, and there were no significant differences with SA. At mid-term (8 d), SA had the highest induced resistance effects, the effective percentage was 42.20%, and significantly higher than the other two. At later stage (11 d), SA had the best induced resistance effects; the effective percentage was 33.67%.

Key words: tobacco; salicylic acid; riboflavin; oxalate acid; induced resistance

0 引言

烟草青枯病是危害烟草最重的病害之一,俗称“烟瘟”、“半边疯”,一旦发生便造成全株死亡,是烟草生产

的毁灭性病害^[1]。青枯病主要在中国南方烟区发生,华南的部分烟田发病率达30%~50%,近年来,烟草青枯病有由南向北蔓延的趋势^[2]。烟草青枯病防治一直

基金项目:重庆市烟草专卖局项目“重庆烟区不适用鲜烟叶优化技术研究”(NY20130501070003);重庆市烟草专卖局项目“重庆烟草壮苗培育技术研究与示范(NY20120301070011)。

第一作者简介:江厚龙,男,1980年出生,河南信阳人,在读博士后,主要从事烟草栽培与生理生态研究。通信地址:400715 重庆市北碚区天生路2号棉研楼 重庆烟草科学研究所, Tel: 023-68250770, E-mail: jhl513@163.com。

通讯作者:丁伟,男,1966年出生,河南南阳人,教授,博士生导师,主要从事天然产物农药和烟草有害生物系统控制的研究。

收稿日期:2014-03-18, **修回日期:**2014-07-21。

是世界性的难题,国内外专家通过农业、化学和生物及品种等措施来防治烟草青枯病方面做了大量研究,并取得了一定的进展^[3-5]。植物具有抵抗病害的潜在能力,当被某种因子刺激后,这种能力便可被激活,从而产生对病菌再次侵染的有效抵抗力^[6]。通过物理、化学或生物因素的诱导来激发植物的潜在抗病能力已成为植物病害防治的新途径,成为植物病理学研究的一个全新的热点领域。为了探索烟草对青枯病菌的潜在抵抗能力,笔者研究了水杨酸、核黄素和草酸等3种诱导剂激发烟草抵抗青枯病潜在能力的效果,探讨了其诱抗机理,以期在生产上防治烟草青枯病提供较为有效的途径。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于2013年在西南大学温室内进行,供试品种为‘云烟87’。在烟苗5叶1心时,分别用水杨酸(0.5 mmol/L)、草酸(10 mmol/L)、核黄素(2 mmol/L)喷淋于叶片上进行诱导,至全部叶片湿润且水滴下为止,每隔2天诱导1次,共3次。第3次诱导后3天,在烟株根部两侧切深度2~4 mm、长约1~2 cm切口,然后用10 mL浓度为 3×10^8 cfu/mL的强病力烟草青枯病菌株菌(*Ralstonia solanacearum*)悬液接种,3次重复。以喷淋清水为对照。烟株保湿培养,接种后5天开始调查发病情况,每隔3天调查1次,共3次。

1.2 样品采集与指标测定

酶活性测定于接种后2天开始取样,每隔2天取样1次,共6次。取样时由下至上依次剪取各处理叶片,取样后根据试验要求立即准确称量,并及时处理。苯丙氨酸解氨酶活性的测定采用分光光度计法^[7],过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法^[8],多酚氧化酶活性的测定采用邻苯二酚法^[9],过氧化氢酶活性测定采用过氧化氢氧化法^[10],可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝(G-250)法^[11]。

2 结果与分析

2.1 诱抗物质对烟草青枯病的诱抗效果

3种诱抗物质诱导烟草对青枯病抗性的效果见表1。由表1可知,3种诱抗剂对烟草青枯病均有一定的诱抗效果,且随时间的推移这种效果有逐渐下降的趋势。处理后第5天即青枯病发病初期,诱抗效果以核黄素较好,其平均相对防效达55.71%,平均病情指数为6.48;其次为水杨酸,平均相对防效为50.95%,平均病情指数为7.41;草酸的诱抗效果最差。处理后第8天,水杨酸的诱抗效果最好,平均相对防效为42.2%;其次为核黄素;草酸的诱抗效果最差。由处理后第11天的诱抗效果可知,水杨酸诱导烟草对青枯病抗性的效果最高,平均相对防效达到了33.67%,平均病情指数为54.63;其次为核黄素,平均相对防效为30.29%;草酸的平均相对防效和平均病情指数均较差。3种物

表1 3种诱抗物质对烟草青枯病的诱抗效果

处理	病情指数			相对防效/%		
	5 d	8 d	11 d	5 d	8 d	11 d
草酸	9.26	27.78	59.26	35.95±5.54a	33.43±1.29a	28.07±0.48a
水杨酸	7.41	24.07	54.63	50.95±4.97ab	42.20±1.13c	33.67±1.35b
核黄素	6.48	25.93	57.41	55.71±2.98b	37.74±1.24b	30.29±1.40ab
CK	14.81	41.67	82.41	—	—	—

注:同列不同大写字母表示在0.05水平上差异显著。

质均能诱导烟草对青枯病的抗性潜能,但前期以核黄素较好,后期以水杨酸较好,草酸的诱抗效果最差。

2.2 诱抗物质对防御酶系诱导活性的影响

2.2.1 苯丙胺解氨酶(PAL)活性 3种诱抗物质对烟草叶片PAL活性的影响见图1。由图1可知,核黄素处理后烟草叶片PAL的活性呈先上升后下降的趋势,第4天呈现小高峰,至第8天时达到高峰,而后又逐渐降低;水杨酸处理的叶片PAL活性在前期低于核黄素处理,其峰值明显高于核黄素处理(第8天时);草酸处理的叶片PAL活性也呈先升后降的趋势,其活性相对平

稳。3种诱导物质处理后,烟草叶片PAL活性的变化均呈先升高后逐渐降低的趋势,第8天的活性最高,分别较对照提高了73.61%、128.45%、107.17%(草酸、水杨酸和核黄素);第12天,水杨酸、核黄素和草酸处理后烟草叶片的PAL活性分别较对照增加了48.19%、55.62%和40.82%。

2.2.2 过氧化物酶(POD)活性 3种诱抗物质对烟草叶片POD活性的影响见图2。图2显示,3种诱抗物质处理后烟草叶片的过氧化物酶(POD)活性均较对照高。水杨酸处理后烟草叶片的POD活性呈逐渐上升趋势,

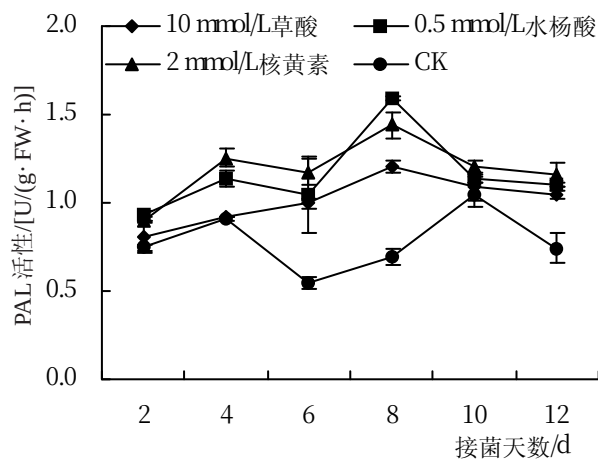


图1 烟草幼苗叶片 PAL 活性的变化

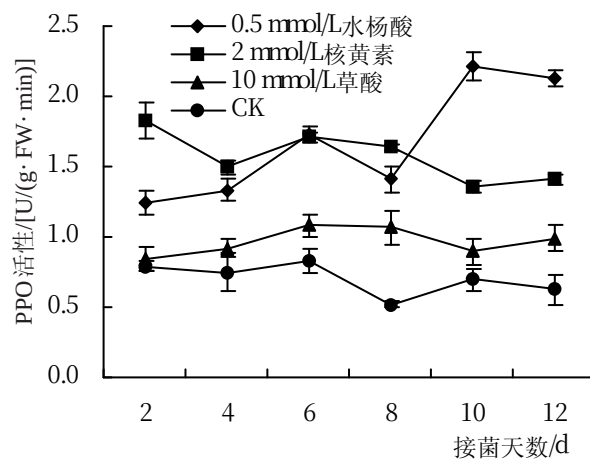


图3 烟草幼苗叶片 PPO 活性的变化

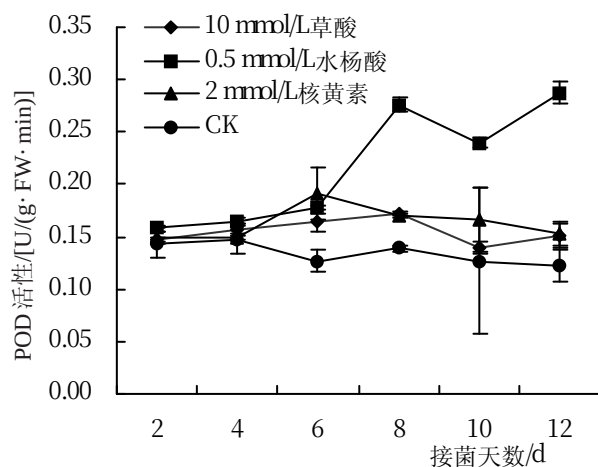


图2 烟草幼苗叶片 POD 活性的变化

于第12天达到峰值,此时比对照增加了134.36%;核黄素处理后叶片的POD活性变化呈先上升后下降的趋势;第6天时POD活性达峰值,较对照增加了50.70%;第12天比对照增加了24.27%。草酸处理后POD的活性变化相对平缓,峰值出现在第8天,增加了23.72%;第12天较对照增加了22.82%。

2.2.3 多酚氧化酶(PPO)活性 3种诱抗物质对烟草叶片PPO活性的影响结果见图3。由图3可知,3种物质处理后对烟草叶片的PPO活性有不同程度的影响。水杨酸处理叶片后,PPO活性有2个高峰,分别较对照提高了109.68%(第6天)、219.23%(第10天)。核黄素处理后,叶片的PPO活性呈下降、上升、下降、上升的趋势,第2天PPO的活性最高,较对照提高了132.20%;第8天的效果最明显,较对照提高了215.38%。草酸处理后烟草叶片的PPO活性变化较小,PPO活性以第6天最强,较对照提高了30.65%;处理效果以第8天最明显,较对照提高了105.13%。第

12天,水杨酸、核黄素、草酸处理后PPO活性分别比对照增加了240.41%、125.52%和57.44%。

2.2.4 过氧化氢酶(CAT)活性 3种诱抗物质对烟草叶片CAT活性的影响见图4。由图4可以看出,这3种诱抗物质处理后,均在一定程度上降低了烟草叶片的CAT活性;各处理烟草叶片的CAT活性均以第2天最高,之后各处理的CAT活性均呈缓慢变化。3种诱导物质对烟草叶片CAT活性表现为,第4天以核黄素处理最高,第6、8、10和12天均以草酸处理最高。

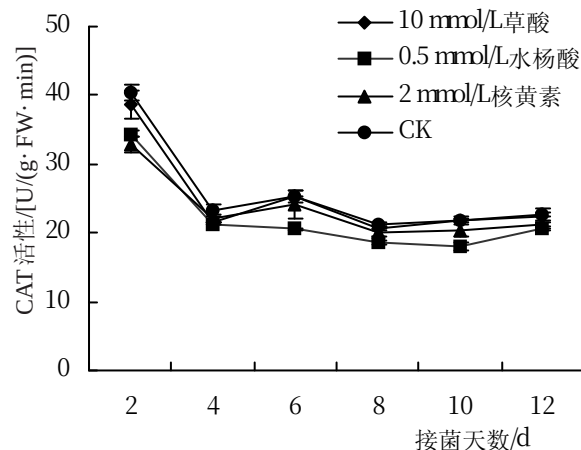


图4 烟草幼苗叶片 CAT 活性的变化

2.2.5 可溶性蛋白含量 3种诱抗物质对烟草叶片可溶性蛋白含量的影响见图5。如图5显示,3种诱抗物质处理后烟草叶片的可溶性蛋白含量在6个测定时期均高于对照,且不同诱抗物质处理效果间有明显差异。水杨酸诱导后烟草叶片的可溶性蛋白的含量呈先下降后上升再下降的趋势,第8天达到高峰,较对照提高了160.86%,12天较对照提高了91.34%。核黄素处理后叶片的可溶性蛋白含量呈先上升后下降的趋势,第8天达到高峰,较对照提高了120.98%,第12天仅比对照

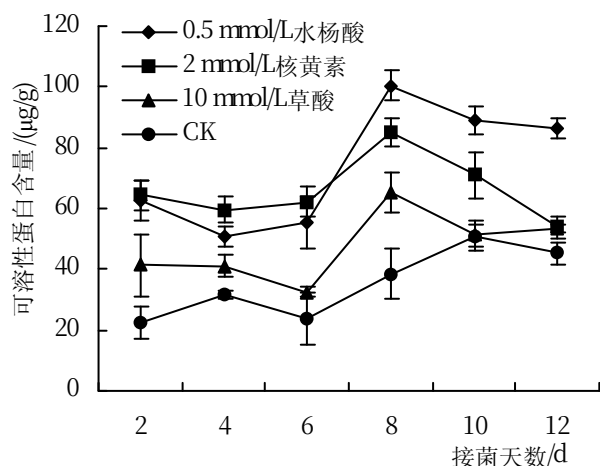


图5 烟草幼苗叶片可溶性蛋白含量的变化

增加19.15%。草酸对烟草叶片可溶性蛋白含量的影响较前2种物质小,处理后可溶性蛋白含量呈先下降后上升再降低的趋势,峰值出现在第8天,较对照增加了69.72%;第2天的效果最明显,比对照提高了84.11%。

3 结论

为了提高烟草对青枯病菌侵染的抵抗能力,本研究利用3种外源诱抗物质处理烟苗。结果表明,水杨酸、核黄素、草酸处理烟草叶片均能提高抗性相关酶的活性。前期的PPO活性以核黄素处理较高,后期以水杨酸处理较高;POD活性和可溶性蛋白含量以水杨酸处理较高;CAT活性以草酸处理较高,且3种处理均低于对照;PAL活性则以核黄素处理较高。由相对防效可以看出,第5天时,核黄素的防效显著高于草酸,而草酸与水杨酸间的防效没有显著差异。第8天时,水杨酸的防效显著高于其他2种物质,核黄素显著高于草酸。第11天的平均相对防效以水杨酸最高(33.67%),显著高于草酸(28.07%),水杨酸与核黄素(30.29%)间不具显著差异;核黄素与草酸间不具显著差异。因此,在诱导烟草对青枯病的抗性时,以水杨酸诱导效果最好,其次为核黄素,草酸的诱导效果最差。

4 讨论

目前,解决烟草青枯病危害的主要手段是抗病育种,但抗病育种具有周期长、抗性丧失快等缺点^[12],因此,只通过抗病育种来防治青枯病是不现实的。合理轮作及药剂和生物等措施来防治青枯病虽然起到了一定的效果,但仍未从根本上解决青枯病对烟叶生产的危害。要彻底解决烟草的青枯病危害,还必须从提高烟草自身的抵抗力入手。在提高植物抵抗病原物侵害的能力方面学者们做了大量研究,笔者尝试性研究了

利用诱抗物质提高烟草对青枯病的抵抗力。

水杨酸是一种植物自身能够合成的、类似植物激素的酚类化合物,是诱导植物产生系统获得抗性的关键信号分子之一^[13],能诱导植物对病毒、真菌和细菌产生抗性^[14],进而抵抗各种病原物的入侵^[15]。在1979年,White^[16]曾报道施用外源水杨酸可提高烟草对病原物侵染的抗性。本研究表明,用浓度为0.5 mmol/L的外源水杨酸处理烟苗叶片后,能明显降低烟苗青枯病的病情指数,提高相对防效。这主要是因为水杨酸处理后提高叶片了的POD、PAL、PPO和CAT的活性及可溶性蛋白含量,增强了烟株对病原微生物入侵的抵抗能力。师金鸽等^[17]也报道了外源水杨酸处理烟苗能提高烟草体内抗性关键酶的活性,显著提升烟苗的抗性。刘太国等^[18]、赵明敏^[19]的报道也验证了水杨酸的这种功效。外源水杨酸也可诱导辣椒^[20]、白菜^[21]、小麦^[22]等多种作物对病原菌的抵抗能力。

核黄素作为植物抗病性的激发子,能够激发植物的防御反应使其对病原菌产生抗性。有研究发现,核黄素能显著提高小麦^[23]、番茄^[24]、马铃薯^[25]等作物的抗病性。本研究显示,核黄素处理烟苗后,烟叶的PAL、POD和PPO的活性及可溶性蛋白含量有明显的提高,但对CAT活性影响不大;接种青枯病菌后烟苗的病情指数明显降低。这说明核黄素能提高烟苗对青枯病菌侵染的抵抗能力,降低了青枯病对烟草危害。Dong等^[26]也报道了核黄素能提高烟草的抗病性,杨飞飞等^[27]发现核黄素也能诱导烟草对赤星病的抗性和防卫相关基因表达。

本研究表明,草酸处理在一定程度上提高了烟苗叶片的PAL、POD和PPO的活性,但对CAT的活性却有抑制作用。李玉红^[28]也报道草酸能促使叶片SOD和POD活性的升高,而CAT活性却受到一定程度的抑制;张宗申^[29]则认为草酸对POD的活性有明显的抑制作用;郑小林等^[30]认为草酸对果实PPO的活性也有提高作用。

参考文献

- [1] 刘雅婷,张世光.烟草青枯病的研究进展[J].云南农业大学学报,2001,16(1):72-76.
- [2] 孔凡玉.烟草青枯病的综合防治[J].烟草科技,2003(4):42-43.
- [3] 尹华群,易有金,罗宽,等.烟草青枯病内生拮抗细菌的鉴定及小区防效的初步测定[J].中国生物防治,2004,20(3):219-220.
- [4] Ran L X, Liu C Y, Wu G J. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in china [J]. Biological Control,2005,32:111-120.
- [5] Ramazan Cakmakc, Figen Donmez, Adil Aydin. Growth promotion

- of plants by plant growth- promoting rhi- zobaoteria under greenhouse and two different field soil conditions[J]. *Soil Biology & Biochemistry*,2005,8:1-6.
- [6] Dang J L, Jones J D G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection[J]. *Nature*,2001,411:826-833.
- [7] 王敬文,薛应龙.植物苯丙氨酸解氨酶的研究 I . 植物激素对甘薯快根苯丙氨酸解氨酶和肉桂酸 4-羟化酶活性变化及其伴随性的影响[J].*植物生理学报*,1981,7(4):373-378.
- [8] 张志亮.植物生理学实验指导(第二版)[M].北京:高等教育出版社,1990,154.
- [9] 朱广廉,钟文海,张爱琴.植物生理学实验[M].北京:北京大学出版社,1991:229-231.
- [10] 邹琦.植物生理生化实验指导[M].北京:中国农业出版社,2000:54.
- [11] 李如亮.生物化学实验[M].武汉:武汉大学出版社,1998:57-58.
- [12] Granda G. Characteristics of colombian isolates of pseudomonas solanacearum from tobacco[J]. *Phytopathology*,1975,65:1004-1009.
- [13] Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, et al. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance [J]. *Science*, 1993,261:754-756.
- [14] 李兆亮,原永兵.黄瓜细胞中水杨酸的信号传递研究[J].*植物学报*, 1998,40(5):430-436.
- [15] Alvarez M E. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance[J]. *Plant Mol Biol*,2000,44:429-442.
- [16] White R F. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco[J]. *Virology*,1979,21(5):410-412.
- [17] 师金鸽,李占杰,杨铁钊.水杨酸对烟草抗黄瓜花叶病毒的诱导效应[J].*华北农学报*,2008,23(6):108-111.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 毛爱军,王永健,冯兰香,等.水杨酸诱导辣椒抗疫病生化机理的研究[J].*中国农学通报*,2005,21(5):219-222.
- [21] 王利英,侯喜林,陈晓峰.水杨酸诱导不结球白菜抗黑斑病机制的探讨[J].*南京农业大学学报*,2009,32(4):23-27.
- [22] Kong L R, Anderson M, Ohm H W. Induction of wheat defense and stress- related genes in response to *Fusarium graminearum*[J]. *Genome*,2005,48(1):29-40.
- [23] 杜文超,刘昌来,董汉松.外施核黄素诱导小麦对白粉病菌的抗性[J].*华北农学报*,2011,26(5):230-233.
- [24] 裴冬丽,丁锦平,张庆琛.核黄素诱导番茄幼苗抗白粉菌机理研究[J].*河南师范大学学报:自然科学版*,2012,40(5):121-124.
- [25] Jordan C M, Wakeman R J, Devey J E. Toxicity of free riboflavin and methionine-riboflavin solution to *Phytophthora* infestants and the reduction of potato late blight disease[J]. *Can J Microbiol*,1992, 38:1108-1111.
- [26] Dong H, Beer S V. Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway[J]. *Phytopathology*,2000,90(8):801-811.
- [27] 杨飞飞,董汉松.核黄素诱导番茄抗病性与 Pti 蛋白激酶基因表达[J].*鲁东大学学报:自然科学版*,2009,25(1):59-64.
- [28] 李玉红,程智慧,孟焕文.草酸诱导黄瓜幼苗对霜霉病的抗性与 H₂O₂ 的关系[J].*西北植物学报*,2008,28(6):1160-1164.
- [29] 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.
- [30] 郑小林,田世平,李博强.草酸对冷藏期间桃果实抗氧化系统和 PPO 活性的影响[J].*园艺学报*,2005,32(5):788-792.