

# 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\*

张智慧<sup>1</sup> 聂燕芳<sup>2</sup> 何 磊<sup>1</sup> 李云锋<sup>1\*</sup> 王振中<sup>1</sup>

1. 华南农业大学植物病理生理学研究室/教育部生物防治工程研究中心, 广州 510642;

2. 华南农业大学制药工程系, 广州 510642

**摘要** 采用 0.1 mmol/L 的水杨酸 (salicylic acid, SA) 喷雾处理抗稻瘟病近等基因系水稻 CO39 和 C101LAC。结果表明: 脂氧合酶 (LOX)、苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 和过氧化物酶 (POD) 活性在不同亲和性互作水稻中均在早期上升, 与亲和性互作水稻 CO39 相比, 高度非亲和性互作水稻 C101LAC 3 种酶的诱导活性增加明显、速度快; 过氧化氢酶 (CAT) 的诱导活性则在不同亲和性互作水稻中均下降。对病程相关蛋白 (PR 蛋白)  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶和几丁质酶的测定结果表明, 高度非亲和性互作水稻 2 种酶诱导活性的出现高峰期和强度也明显要早且高于亲和性互作水稻。对内源水杨酸的测定结果表明, 不同亲和性互作水稻的 SA 含量均没有明显的变化, 表明外源 SA 诱导的水稻抗病性可能与内源 SA 信号通路无关。

**关键词** 水杨酸; 水稻; 防御酶; PR 蛋白

**中图分类号** S 435.111.4<sup>+</sup>1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)05-0541-05

水杨酸 (salicylic acid, SA) 作为一种外源信号分子, 可以诱导植物对病原菌的抗性反应, 但主要参与植物对活体营养型病原菌的抗病性<sup>[1]</sup>。SA 诱导的植物抗病性主要通过诱导植物膜脂过氧化, 产生 HR 反应, 并诱导植物 PR 蛋白基因的表达, 进一步诱导植物的系统抗病性。据报道, 外源 SA 能诱导烟草、黄瓜、拟南芥、水稻等产生对多种病害的 SAR 反应<sup>[2]</sup>。在 SA 诱导的水稻抗瘟性研究中, 蔡新忠等<sup>[3]</sup>证实外源 SA 叶面喷雾能减轻水稻幼苗稻瘟病的发生, 可诱导水稻的系统性抗瘟性。SA 通过活化苯丙烷类代谢途径, 快速大量合成木质素、Mommilactone A 等物质, 从而使水稻产生对稻瘟菌的诱导抗性<sup>[4]</sup>。吴国昭等<sup>[5]</sup>研究表明水杨酸甲酯能有效提高野生稻幼苗对稻瘟病的抗性, 可以显著提高叶片内香草酸和咖啡酸的含量。有观点认为外源 SA 处理后内源 SA 含量局部或系统性的升高是诱导 SAR 产生的关键信号分子之一<sup>[6]</sup>, 但在水稻中内源 SA 是否与诱导抗病性有关, 尚未获得广泛认同。

笔者在前期的研究中, 用系列 SA 浓度梯度处理抗稻瘟病近等基因系水稻 CO39 和 C101LAC, 结果表明 0.1 mmol/L 的 SA 具有最好的诱导水稻抗

瘟性效果。

为了更好地分析外源 SA 诱导水稻抗瘟性的早期抗病反应机制, 并探讨外源 SA 处理与水稻内源 SA 变化的关系, 笔者对 SA 诱导的水稻重要防御性酶活性及内源 SA 含量的变化规律进行了研究, 旨在为研究外源 SA 诱导水稻的抗瘟性机制提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

广东省稻瘟病菌优势小种 ZC<sub>13</sub> (菌株为 97-151a) 由广东省农业科学院植保所朱小源研究员提供。抗稻瘟病近等基因系水稻 C101LAC (含 *Pi-1* 抗稻瘟病基因) 及背景品系 CO39 (不含已知抗病基因, 感病对照) 为笔者所在实验室保存, 分别与稻瘟病菌菌株 97-151a 组成高度非亲和性互作和亲和性互作<sup>[7]</sup>。

将水稻播种在盛有稻田土的塑料盆中, 置于温度 24~26 °C、光照 14 h 小时的生长室中培养。按照常规方法管理, 于水稻植株第 4 片叶完全展开时接种。

收稿日期: 2009-12-08; 修回日期: 2010-03-22

\* 国家自然科学基金项目 (30971887、30600399) 和广东省自然科学基金项目 (07006683、05300351) 资助

\*\* 通讯作者。E-mail: yunfengli@scau.edu.cn

张智慧, 女, 1985 年生, 华南农业大学资源环境学院硕士研究生。研究方向: 植物病理学。E-mail: zhihuizhang11@126.com

## 1.2 主要试剂

供试水杨酸、亚油酸、几丁质和昆布多糖均购自美国 Sigma 公司, 甲醇、乙酸乙酯为国产色谱纯, 其他试剂均为国产分析纯。

## 1.3 水稻叶片的处理及取样

用 0.1 mmol/L SA 溶液喷雾接种, 保湿 24 h。分别于接种后 0、8、12、24、48、72 h 进行取样, 用于各种酶活性及内源 SA 含量测定, 以含 0.05% Tween 20 的灭菌双蒸水为对照。每处理重复 3 次。

## 1.4 相关防御酶活性的测定

1) 脂氧合酶(LOX)。粗酶液提取以及活性测定参照张建成等<sup>[8]</sup>的方法进行, 以 25 °C 反应 15 min 后  $D_{240}$  增加 0.01 为 1 个酶活性单位, 酶比活力以  $U_1$  表示。

2) 苯丙氨酸解氨酶(PAL)。粗酶液提取与活力测定参照李云锋等<sup>[9]</sup>的方法进行, 酶比活力以  $U_2$  表示。

3) 过氧化物酶(POD)。POD 提取方法: 在每样品中加入预冷的 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0, 含 1% PVP), 冰浴下研磨, 4 °C 下 13 600 r/min 离心 20 min, 取上清液。POD 活性按纪春艳等<sup>[7]</sup>的方法测定, 酶比活力以  $U_3$  表示。

4) 过氧化氢酶(CAT)。粗酶液提取同 CAT 提取方法, 活性测定参照刘琼光等<sup>[10]</sup>方法进行, CAT 比活力以  $U_4$  表示。

5) 几丁质酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶。粗酶液的提取以及活性测定参照张衍荣等<sup>[11]</sup>方法进行。几丁质酶活性测定是以胶体几丁质为底物进行反应, 测定反应后所产生的 N-乙酰氨基葡萄糖胺的量, 其酶活性单位定义为以 37 °C 反应 1 h 后  $D_{585}$  增加 0.01 为 1 个酶活性单位, 酶比活力以  $U_5$  表示。 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性测定是以昆布多糖为底物进行反应, 测定反应后产生的还原糖量, 还原糖量的测定采用 DNS 法, 其酶活性单位定义为 30 min 从昆布多糖中释放 1  $\mu$ g 葡萄糖所需的酶量, 酶比活力以  $U_6$  表示。

6) 粗酶液蛋白的含量。以牛血清白蛋白为标准蛋白, 按照 Bradford<sup>[12]</sup>方法测定。

## 1.5 水稻叶片中内源 SA 的提取及含量的测定

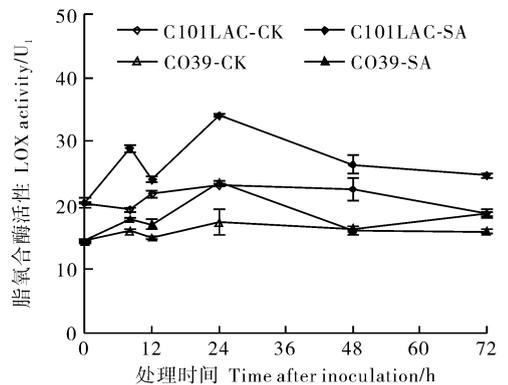
取 1 g 水稻叶片进行内源 SA 的分析, SA 的提取与含量测定参考 Bowling 等<sup>[13]</sup>方法进行。

HPLC(美国 Agilent 1100)分析条件: 流动相为甲醇/水=40/60, 紫外光检测器波长为 302 nm, 柱温为 30 °C, 以保留时间定性, 外标法定量, 保留时间为 4.4 min, 最低检测限为 10 ng。

## 2 结果与分析

### 2.1 SA 诱导水稻叶片 LOX 活性的变化

SA 处理后, 不同亲和性互作水稻品系 LOX 活性变化如图 1。试验结果表明, 在 SA 诱导后, 高度非亲和互作水稻品系 C101LAC 的 LOX 活性在 8 h 和 24 h 各出现 1 个峰, 与对照相比, 酶活性分别增加了 49.74% 和 47.19%。而亲和互作水稻品系的 LOX 活性在 SA 诱导 24 h 后出现 1 个高峰, 与对照相比, 酶活性增加了 36.50%。与亲和性互作水稻相比, 高度非亲和互作水稻 LOX 酶活性同一时间点上均高于亲和性互作水稻。



CO39: 亲和性互作品系 A compatible interaction rice cultivar; C101LAC: 高度非亲和性互作品系 A highly incompatible interaction rice cultivar (下图同 the same as following figures).

图 1 SA 诱导水稻叶片 LOX 活性的变化

Fig. 1 Changes of LOX activity in rice leaves induced by SA

### 2.2 SA 诱导水稻叶片 PAL 活性的变化

SA 处理后, 不同亲和性互作水稻品系 PAL 活性变化如图 2。

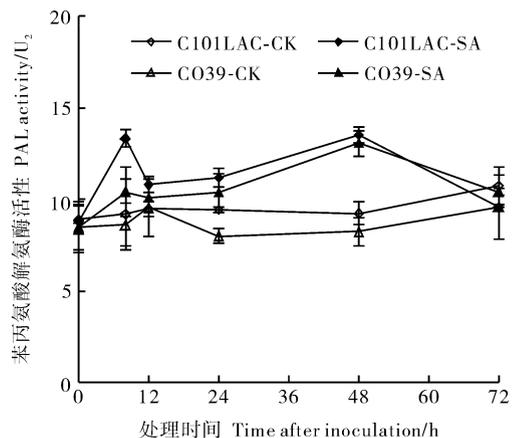


图 2 SA 诱导水稻叶片 PAL 活性的变化

Fig. 2 Changes of PAL activity in rice leaves induced by SA

试验结果表明,高度非亲和互作水稻 C101LAC 的 PAL 活性在 SA 处理后 8 h 和 48 h 均出现高峰,与对照相比,酶活性分别增加 45.21% 和 46.32%。亲和互作水稻品系 CO39 的 PAL 活性在 SA 处理后也分别在 8 h 和 48 h 出现高峰,分别比对照增加 20.93% 和 58.50%。在同一时间点上,高度非亲和互作水稻的 PAL 诱导活性均高于亲和互作水稻。

### 2.3 SA 诱导水稻叶片 POD 活性的变化

SA 处理后,不同亲和性互作水稻 POD 活性变化如图 3。试验结果表明,高度非亲和互作水稻品系 C101LAC 的 POD 活性在 SA 处理后 8 h 形成 1 个高峰,是对照的 2.15 倍。亲和互作水稻品系 CO39 的 POD 活性在 SA 处理后 12 h 上升,在 24 h 时形成 1 个高峰,是对照的 1.96 倍。与亲和性互作水稻相比,高度非亲和互作水稻 POD 诱导活性高峰明显要早于亲和性互作水稻。

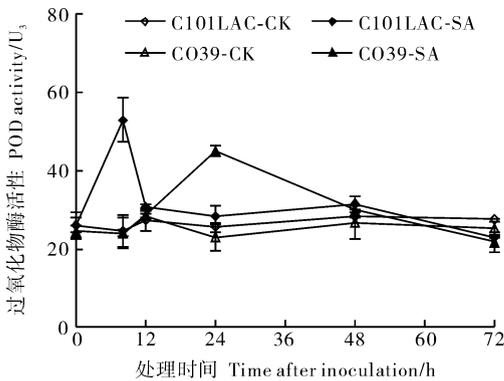


图 3 SA 诱导水稻叶片 POD 活性的变化

Fig. 3 Changes of POD activity in rice leaves induced by SA

### 2.4 SA 诱导水稻叶片 CAT 活性的变化

SA 处理后,不同亲和性互作水稻 CAT 活性变化如图 4。试验结果表明,SA 处理后,高度非亲和

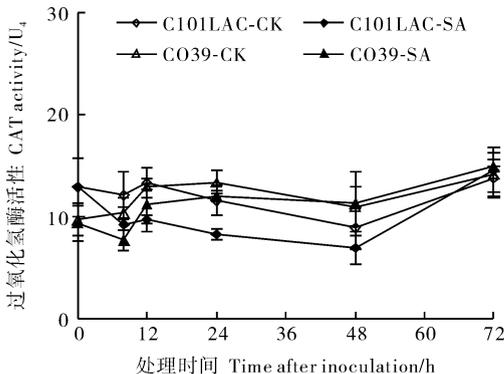


图 4 SA 诱导水稻叶片 CAT 活性的变化

Fig. 4 Changes of CAT activity in rice leaves induced by SA

互作水稻品系 C101LAC 和亲和互作水稻品系 CO39 的 CAT 活性在 SA 处理后 8 h 呈现下降趋势,不同时间点的活性均低于对照。

### 2.5 SA 诱导水稻叶片几丁质酶活性的变化

SA 处理后,不同亲和性互作水稻品系的几丁质酶活性变化如图 5。试验结果表明,在 SA 处理后,高度非亲和互作水稻品系 C101LAC 的几丁质酶活性在 8 h 时出现一个高峰,比对照增加了 53.26%,亲和互作水稻品系 CO39 几丁质酶活性则在 SA 处理后 24 h 达到高峰,2 个水稻品系的几丁质酶活性均高于对照。与亲和性互作水稻相比,高度非亲和互作水稻的几丁质酶活性在 SA 诱导后的 24 h 内均高于亲和性互作水稻。

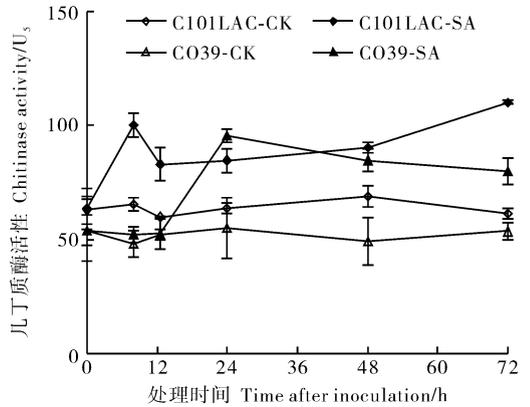


图 5 SA 诱导水稻叶片几丁质酶活性的变化

Fig. 5 Changes of chitinase activity in rice leaves induced by SA

### 2.6 SA 诱导水稻叶片 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性的变化

SA 处理后,不同亲和性互作水稻品系的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性变化如图 6。试验结果表明,高度非亲和互作水稻品系 C101LAC 的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性在 SA 处理 8 h 后开始上升,在 12 h 和 48 h 时均出现 1 个高峰,分别是对照的 1.48 倍和 1.82 倍。亲和互作水稻品系 CO39 的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性则在 SA 处理 48 h 后出现 1 个高峰,酶活性为对照的 2.33 倍。与亲和性互作水稻相比,高度非亲和互作水稻  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性升高的时间快,且同一时间点上均高于亲和性互作水稻。

### 2.7 SA 诱导水稻叶片内源 SA 的变化

SA 处理后不同亲和性互作水稻内源 SA 的含量变化如图 7。试验结果表明,SA 处理后高度非亲和互作水稻和亲和性互作水稻的内源 SA 含量均变化不明显,表明外源 SA 处理对水稻内源 SA 的变化影响较小。

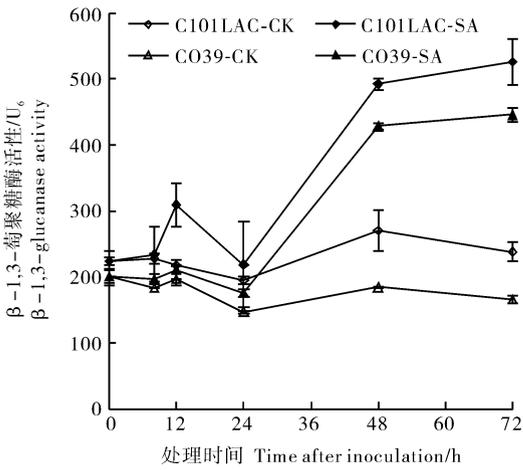


图 6 SA 诱导水稻叶片  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性的变化  
Fig. 6 Changes of  $\beta$ -1,3-glucanase activity in rice leaves induced by SA

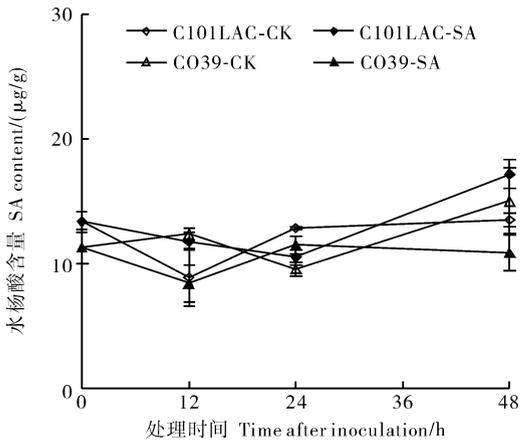


图 7 SA 诱导水稻叶片内源 SA 的变化

Fig. 7 Changes of SA content in rice leaves induced by SA

### 3 讨论

LOX、POD、CAT 和 PAL 是参与水稻抗病反应的重要保护酶类。本试验结果表明,在外源 SA 处理后,高度非亲和性互作水稻中 LOX 活性在 8 h 就出现了明显的高峰,但在亲和性互作水稻中其活性于 24 h 时才出现高峰,且高度非亲和互作水稻的 LOX 诱导活性均高于亲和性互作水稻;LOX 的作用主要是通过酶促作用来启动植物的膜脂过氧化,与植物的过敏性坏死反应直接相关<sup>[14]</sup>;本研究中 LOX 在不同亲和性互作水稻中的诱导活性变化表明 SA 诱导的水稻抗病性可能与膜脂过氧化有关。在不同亲和性互作水稻中,POD 和 PAL 活性均在 SA 处理后早期上升,与亲和性互作水稻相比,高度非亲和性互作水稻中的诱导活性升高更快、更强,这可能与木质素等抗菌化合物的合成有关<sup>[15]</sup>。有研

究认为 CAT 为一种 SA 结合蛋白,SA 可通过这种结合来抑制 CAT 活性,从而导致  $H_2O_2$  积累,从而引起 HR 反应<sup>[16]</sup>。本研究表明 SA 处理后,不同亲和性互作水稻中的 CAT 活性均下降,说明 SA 诱导的抗病性可能与  $H_2O_2$  的积累和 HR 反应有关。

病程相关蛋白(PR 蛋白)的积累是植物获得系统抗性的重要原因<sup>[1]</sup>,其中  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶是 2 种重要的 PR 蛋白。本研究结果表明,SA 处理后,不同亲和互作水稻的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性均能增加;与亲和性互作水稻相比,高度非亲和性互作水稻 PR 蛋白在 SA 处理早期增加明显、速度快,表明 SA 诱导的植物抗病性可能与植物的系统获得抗性有关。

对许多病原菌与植物(如烟草、拟南芥、黄瓜等)互动的研究表明,内源 SA 含量局部或系统性的升高是植物 SAR 产生的关键信号分子之一,如 TMV 侵染烟草后,烟草叶片中内源 SA 含量从 100~200 ng/g 上升至 1.5  $\mu$ g/g<sup>[17]</sup>。在日前所检测内源 SA 含量的所有植物中,水稻幼苗内源 SA 的含量最高,约为烟草中 SA 含量的 50 倍<sup>[18]</sup>。Silverman 等<sup>[19]</sup>用稻瘟菌和丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)处理水稻幼苗后,内源 SA 含量没有明显变化,因此认为内源 SA 在水稻抗病反应中并不起信号传递作用;也有学者认为内源 SA 在外源 SA 诱导的水稻抗性反应信号传递中起正面调节作用<sup>[20]</sup>。本研究表明,外源 SA 处理后,水稻幼苗的内源 SA 含量也无明显变化,说明内源 SA 在外源 SA 诱导的水稻抗瘟性中可能也没有起到信号传递的作用,但是否在其他水稻品种(系)中也不起作用,仍有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] SMITH J L, MORAES C M D, MESCHER M C. Jasmonate and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants[J]. *Pest Manag Sci*, 2009, 65: 497-503.
- [2] HALIM V A, VESS A, SCHEEL D, et al. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defense[J]. *Plant Biol*, 2006 (8): 307-313.
- [3] 蔡新忠, 郑重, 宋凤鸣. 水杨酸对水稻幼苗抗瘟性的诱导作用[J]. *植物病理学报*, 1996, 26(1): 7-12.
- [4] 蔡新忠, 郑重. 水杨酸诱导水稻幼苗抗瘟性的生化机制[J]. *植物病理学报*, 1997, 27(3): 231-236.
- [5] 吴国昭, 曾任森. 外源水杨酸甲酯和茉莉酸甲酯处理对挺立型普通野生稻保护酶活性的影响[J]. *西北农业学报*, 2007, 16

- (3):82-84.
- [6] WANG D, AMORNSIRIPANITCH N, DONG X N. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants [J]. *PLoS Pathog*, 2006(2):1042-1050.
- [7] 纪春艳, 李云锋, 王振中. 稻瘟菌糖蛋白激发子 CSBI 纯化过程的优化[J]. *华中农业大学学报*, 2007, 26(1):37-40.
- [8] 张建成, 范永山, 董金皋. 玉米大斑病菌毒素对玉米叶肉细胞脂氧合酶活性的影响 [J]. *植物病理学报*, 2003, 33(5):421-424.
- [9] 李云锋, 王振中, 贾显禄. 稻瘟菌激发子 CSB I 诱导水稻防御性相关酶的活性变化[J]. *作物学报*, 2004, 30(6):613-617.
- [10] 刘琼光, 兰娣, 张静一, 等. 水稻与基腐病菌互作中的活性氧代谢[J]. *华中农业大学学报*, 2007, 26(4):451-455.
- [11] 张衍荣, 王小菁, 张晓云, 等. 水杨酸对豇豆枯萎病的抑制作用 [J]. *华中农业大学学报*, 2006, 25(6):610-613.
- [12] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [13] BOWLING S A, GUO A, GAO H, et al. A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance [J]. *The Plant Cell*, 1994(6):1845-1857.
- [14] 宋凤鸣, 郑重, 葛秀春. 活性氧及膜脂过氧化在植物-病原物互作中的作用 [J]. *植物生理学通讯*, 1996, 32(5):377-385.
- [15] 李兆亮, 原水兵, 刘成连, 等. 水杨酸对黄瓜叶片抗氧化剂酶系的调节作用 [J]. *植物学报*, 1998, 40(4):356-361.
- [16] CHEN Z X, KLESSING D F. Identification of a soluble SA-binning protein that may function in signal transduction in the plant disease resistance response [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:8179-8183.
- [17] ENYEDI A J, YALPANI N, SILVERMAN P, et al. Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:2480-2484.
- [18] RASKIN I, SKUBATZ H, TANG W, et al. Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants [J]. *Ann Bot*, 1990, 66:369-373.
- [19] SILVERMAN P, SESKAR M, KAMTER D, et al. Salicylic acid in rice, biosynthesis, conjugation and possible role [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108:633-639.
- [20] 杨妩敏, 刘学群, 王春台, 等. 外源胁迫对水稻内源茉莉酸和水杨酸的影响 [J]. *武汉科技学院学报*, 2005, 18(10):61-63.

## Changes of Resistance-Related Defense Enzymes Activities and Endogenous Salicylic Acid in Rice Induced by Exogenous Salicylic Acid

ZHANG Zhi-hui<sup>1</sup> NIE Yan-fang<sup>2</sup> HE Lei<sup>1</sup> LI Yun-feng<sup>1</sup> WANG Zhen-zhong<sup>1</sup>

1. *Laboratory of Physiological Plant Pathology, South China Agricultural University/Engineering Research Center of Biological Control, Ministry of Education, Guangzhou 510642, China;*  
 2. *Department of Pharmaceutical Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*

**Abstract** Salicylic acid (SA) is an important signaling hormone in plants, playing a role in induced defense responses. After treatment with exogenous SA, changes in liposygenase (LOX) activity, phenylalanine ammonialyase (PAL) activity and peroxidase (POD) activity increased significantly compared with those in control. The activity of three enzymes increased more remarkably and rapidly on the leaves of the incompatible rice line than those in the compatible rice line. CAT activity decreased on the leaves of two rice cultivars. Pathogenesis-related proteins (PR proteins) are a characteristic of systemic acquired resistance (SAR) in plants. The results showed that changes in two PR proteins, chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase, were also increased more remarkably and rapidly on the leaves of the incompatible rice line than on those of the compatible rice line. The results also showed that endogenous SA had little change either on the leaves of the two rice cultivars after inoculation with exogenous SA. The results suggest that defense-related enzymes and SAR in rice leaves induced by exogenous SA might play an important role in rice resistance to rice blast.

**Key words** salicylic acid; rice; resistance-related defense enzymes; PR protein

(责任编辑:陈红叶)