

王 蕾, 陈玉婷, 蔡昆争, 等. 外源硅对青枯病感病番茄叶片抗氧化酶活性的影响[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(3): 74-78.

外源硅对青枯病感病番茄叶片抗氧化酶活性的影响

王 蕾¹, 陈玉婷¹, 蔡昆争¹, 汪国平²

(1 华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642;

2 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】探讨青枯菌侵染下外源硅处理对番茄青枯病的抗性效果及生理作用机理, 为青枯病的有效防治提供参考依据. 【方法】选择青枯病易感番茄品种为试验材料, 通过盆栽土培和水培试验, 研究硅处理和青枯菌 *Ralstonia solanacearum* 接种对番茄青枯病情指数、叶片抗氧化酶活性的影响. 【结果和结论】硅能显著增强番茄青枯病抗性. 硅处理使青枯病的病情指数在土培试验和水培试验下分别降低 29.1% ~ 93.0% 和 6.3% ~ 100.0%. 青枯菌侵染条件下硅处理能显著增加番茄叶片抗氧化酶活性. 在土培试验中, 加硅使番茄叶片的 POD、CAT 酶活性分别增加了 43.17% 和 23.17%; 水培试验在接种第 3 天, 加硅使 POD、CAT、PAL 酶活性分别增加了 122%、337% 和 31%. 本研究表明硅对番茄青枯病的抗性机理可能是硅诱导植物产生一系列生物化学防御反应, 增强了番茄对青枯病菌的抗性.

关键词: 硅; 番茄叶片; 青枯病; 抗病性; 抗氧化酶活性
中图分类号: S511 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2014)03-0074-05

Effects of exogenous silicon supply on the activity of antioxidant enzymes of tomato leaves infected by *Ralstonia solanacearum*

WANG Lei¹, CHEN Yuting¹, CAI Kunzheng¹, WANG Guoping²

(1 College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】The objective of this study was to investigate the physiological mechanism of silicon-induced resistance of tomato plant to bacterial wilt. 【Method】Pot experiments with soil and hydroponic cultivation were conducted to study the effects of silicon supply on the disease index of bacterial wilt and antioxidant enzymes of tomato leaves. 【Result and conclusion】The results showed that exogenous Si treatment reduced the disease index of bacterial wilt by 29.1% – 93.0% respectively in soil cultivation experiment and 6.3% – 100% respectively in hydroponic experiment compared with no-Si-treatment. Compared with the no-silicon treatment, Si application increased POD and CAT activity of tomato leaves by 43.17% and 23.17% in soil cultivation experiment. Si amendments significantly increased POD, CAT and PAL activity of tomato leaves by 122%, 337% and 31% respectively in hydroponic experiments. In conclusion, Si supply has an important role in suppressing bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. The pathogen resistance mediated by Si is associated with the activation of defense-related enzyme activities in leaves.

Key words: silicon; tomato leaves; bacterial wilt; disease resistance; antioxidant enzyme activity

青枯病是一种由青枯病 *Ralstonia solanacearum* 引起的毁灭性土传病害,广泛分布于热带亚热带及温带地区,对蔬菜生产造成严重影响^[1]。青枯病病原菌变异大,寄主范围广,至今尚没有有效的防治办法^[2]。传统的防治方法包括选用抗性品种、生物农药防治及采用轮作等方式。抗病品种由于病原菌变化快,品种抗性容易丧失;化学防治效果不佳,而且对食品安全及环境有很大副作用。城市垃圾堆肥由于重金属、抗生素和激素类物质的存在应用受到限制。因此,采取其他有效措施控制青枯病的危害已经成为蔬菜生产中亟待解决的重要问题。

硅是地壳中含量第二丰富的元素,也是植物健康生长的有益元素^[3]。在黄瓜^[4]、小麦^[5]上的研究表明,根部施硅能够提高植株对炭疽病菌、白粉病菌的抵抗能力,硅可能诱导植物产生一系列生物化学防御反应,使植物产生“系统获得性抗病性(System acquired resistance, SAR)”。Huang 等^[6]研究表明硅可以增加番茄对根腐病的抵抗能力。目前已有研究表明硅能显著降低番茄青枯病的发病率^[7-10],研究发现硅主要积累在根部,而茎和叶积累较少,根系硅含量与青枯菌的数量成反比。硅可在叶片细胞壁水平上产生诱导抗性^[7-8]。在分子水平上,青枯病感染条件下硅处理能增强叶片 3 个看家基因(Housekeeping genes) *PGK*、*TUB* 和 *ACT* 的表达^[9]。Diogo 等^[8]采用 qRT-PCR 技术研究了硅对青枯病抗性的作用机理。Ghareeh 等^[10]研究表明,青枯菌感染后,硅诱导植物产生抗性信号分子,增加与防御、信号转导、抗性有关的茉莉酸/乙烯标记基因(*JERF3*, *TSRF1* and *ACCO*)、氧化胁迫标记基因(*FD-I* and *POD*)的表达。以往研究仅限于硅对青枯病的抗病效果及诱导基因表达的影响^[7-10],未涉及到叶片抗氧化酶活性的影响。本研究通过青枯菌接种和硅处理,从叶片保护酶的角度阐明硅对番茄青枯病的影响及机理,为硅制剂在防治番茄青枯病中的应用提供理论依据和有效途径。

1 材料与方法

1.1 材料

供试番茄 *Lycopersicon esculentum* Mill. 品种:台湾红圣女,为番茄青枯病易感品种,由吉林省科丰种业生产。供试土壤:水稻土,取自广东省增城市朱村。土壤的基本理化性状为:有机质 16.04 g · kg⁻¹,全氮 1.581 g · kg⁻¹,全磷 1.285 g · kg⁻¹,全钾 26.24 g · kg⁻¹,碱解氮 66.24 mg · kg⁻¹,有效磷

110.8 mg · kg⁻¹,速效钾 49.94 mg · kg⁻¹,土壤 pH 5.29,有效硅 31.02 g · kg⁻¹。供试菌种:青枯菌,为生理小种 1 生化型 III,由华南农业大学园艺学院提供。

1.2 试验方法

1.2.1 土培试验 2012 年 5 月在华南农业大学农学院温室大棚内进行。在培养箱中育苗,培养箱光照条件为 14 h · d⁻¹,光照度 200 μmol · m⁻² · s⁻¹,昼夜温度为 28 °C/25 °C,相对湿度为 80%。当番茄长到 3 片叶时移苗到温室进行正式盆栽试验。盆直径 16.0 cm、高 16.5 cm,土壤为风干土,过 2 mm 筛,每盆装土 2 kg,每盆 2 株。移栽前在土壤中加入尿素 95.6 mg · kg⁻¹,过磷酸钙 235.6 mg · kg⁻¹,氯化钾 48 mg · kg⁻¹,以供给番茄植株生长对养分的需求。试验共设 4 个处理,即不施硅不接菌(CK),加硅不接菌(Si),接菌不加硅(Rs),接菌加硅(Rs + Si),每个处理重复 10 次。添加的硅为 K₂SiO₃,浓度为 2 mmol · L⁻¹,不加 Si 处理的土壤中通过添加等量浓度的氯化钾来补充由于施硅带来的钾。在番茄幼苗长到 5~6 叶时对接菌处理进行青枯病接种,在接种后第 1、5 天分别取倒数第 2、3、4 片叶测定过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)。

1.2.2 水培试验 种子消毒、催芽同土培试验。选取芽长一致的种子均匀播种于塑料杯中,用海绵固定植物,每杯播种 2 粒,置于培养箱内生长,昼夜温度 28 °C/25 °C。试验处理同土培试验,营养液使用华南农业大学番茄营养液配方:Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 590 mg · L⁻¹、KNO₃ 404 mg · L⁻¹、KH₂PO₄ 136 mg · L⁻¹、MgSO₄ · 6H₂O 246 mg · L⁻¹,以及微量元素 H₃BO₃ 2.86 mg · L⁻¹、MnSO₄ · H₂O 2.13 mg · L⁻¹、ZnSO₄ · 6H₂O 0.22 mg · L⁻¹、CuSO₄ · 5H₂O 0.08 mg · L⁻¹、EDTA - Fe - Na 20 mg · L⁻¹、(NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 2H₂O 0.02 mg · L⁻¹。每 3 d 更换 1 次营养液,待番茄长到“两叶一心”期时进行加硅(K₂SiO₃)处理,加硅 2 mmol · L⁻¹,不加硅处理的则以氯化钾补充产生的钾浓度差异。在接种后第 1、3 天分别取倒数第 2、3、4 片叶测定过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性。

1.2.3 青枯病接种处理 土培试验接菌方法:采用伤根灌注法,在每盆注入浓度约为 3 × 10⁸ CFU · mL⁻¹ 的菌悬液 5 mL 于番茄植株的根部。在接菌后第 6 天,青枯病开始发病时,每隔 2 d 进行病情指数的调查。直至番茄枯死为止,调查期间正常管理。

水培接菌方法:用剪刀伤根,将浓度为 3×10^8 CFU · mL⁻¹ 的菌液倒入营养液中. 在接菌后第 3 天,青枯病开始发病时,每天进行病情指数的调查. 直至番茄枯死为止,调查期间正常管理.

1.3 测定指标及方法

1.3.1 病情指数的调查 青枯病的发病情况根据方中达^[11]的方法进行调查. 0 级:无症状;1 级:1 片叶片半萎蔫;3 级:2~3 片叶片萎蔫;5 级:除顶端 1~2 片叶片外,其余叶片均萎蔫;6 级:所有叶片均萎蔫;9 级:叶片和植株枯死. 病情指数(*I*)按下式计算:

$$I = \frac{\sum(\text{病级株数} \times \text{病级代表数值})}{(\text{总株数} \times 9 \text{ 级的代表数值})} \times 100\%.$$

1.3.2 叶片酶活性的测定 POD、CAT 和 PAL 酶活性测定参照陈建勋和王晓峰^[12]的方法,略有改动. 称取番茄叶片 0.2 g,加入 1 mL 的 PBS(pH6.0),冰浴研磨,15 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,取部分上清液经适当稀释后用于 POD 和 CAT 酶活性测定. 称取新鲜叶片 500 mg,先加 1.5 mL 预冷的提取液(即 6 mmol · L⁻¹ 巯基乙醇硼酸缓冲液)、过量的聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)、少量石英砂在冰浴下研磨成浆,再加 3.5 mL 预冷的提取液使其终体积为 5 mL. 于 12 000 r · min⁻¹、4 ℃ 下离心 15 min,用吸管吸取上清液(即粗酶液)用于酶活性测定.

1) CAT 酶活性的测定:反应体系包括 φ 为 0.3% H₂O₂ 1 mL, H₂O 1.95 mL,最后加入 0.05 mL 酶液,共 3 mL. 启动反应,测定 D_{240 nm} 的降低速度. 将每分钟 D_{240 nm} 减少 0.01 定义为 1 U.

2) POD 酶活性的测定:反应体系包括 φ 为 0.3% H₂O₂ 1 mL, φ 为 0.2% 愈创木酚 0.95 mL, PBS(pH 6.0) 1 mL,最后加入 0.05 mL 酶液,共 3 mL. 启动反应,记录 D_{460 nm} 的增加速度. 将每分钟 D_{460 nm} 增加 0.01 定义为 1 U.

3) PAL 酶活性的测定:反应液包括 0.02 mol · L⁻¹ L-苯丙氨酸 1 mL、0.1 mol · L⁻¹ 硼酸缓冲液(pH8.8)2 mL 和 0.1 mL 粗酶液,对照以 0.1 mL 巯基乙醇缓冲液代替酶液. 反应液用涡旋混合器混匀后立即测起始 D_{290 nm},并精确记时. 将测定后的各管于 30 ℃ 水浴保温 30 min,测定各管的 D_{290 nm},每一样品重复 2 组. 将每 30 min 的 D_{290 nm} 增加 0.01 所需酶量定义为 1 U.

PAL 酶活性 = 30 min 内吸光度的差值 × V₁V₂m × 0.01,式中,V₁ 为测定时的酶液用量/mL;V₂ 为酶液总体积/mL;m 为样品鲜质量/g.

1.4 数据分析

采用 Excel 2007 录入数据、制作图表和计算,采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析和多重比较.

2 结果与分析

2.1 硅处理对青枯病病情指数的影响

由图 1a 的土培试验结果可知,在青枯菌接种条件下,与不加硅相比,硅处理显著降低番茄的病情指数,其中第 6 和第 10 天分别降低了 29.1% 和 93.0%.

水培试验中(图 1b),接种处理青枯病发病率显著高于加硅接种. 接种处理在第 4 和第 6 天的发病率分别为 66.6% 和 100%. 在第 5 和第 6 天加硅接种处理比接种处理青枯病发病率分别降低了 94.9% 和 93.6%.

以上土培和水培试验表明. 施硅能显著增强番茄对青枯病的抗性,缓解病害对番茄生长的危害.

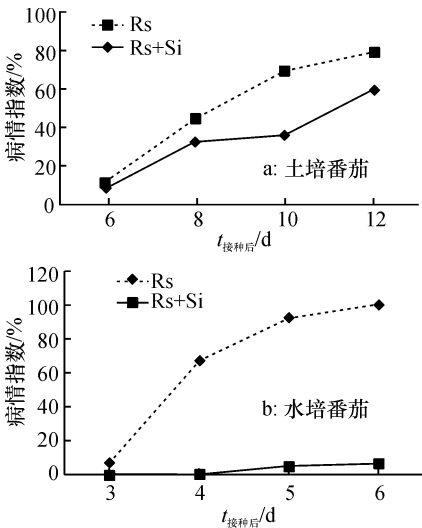
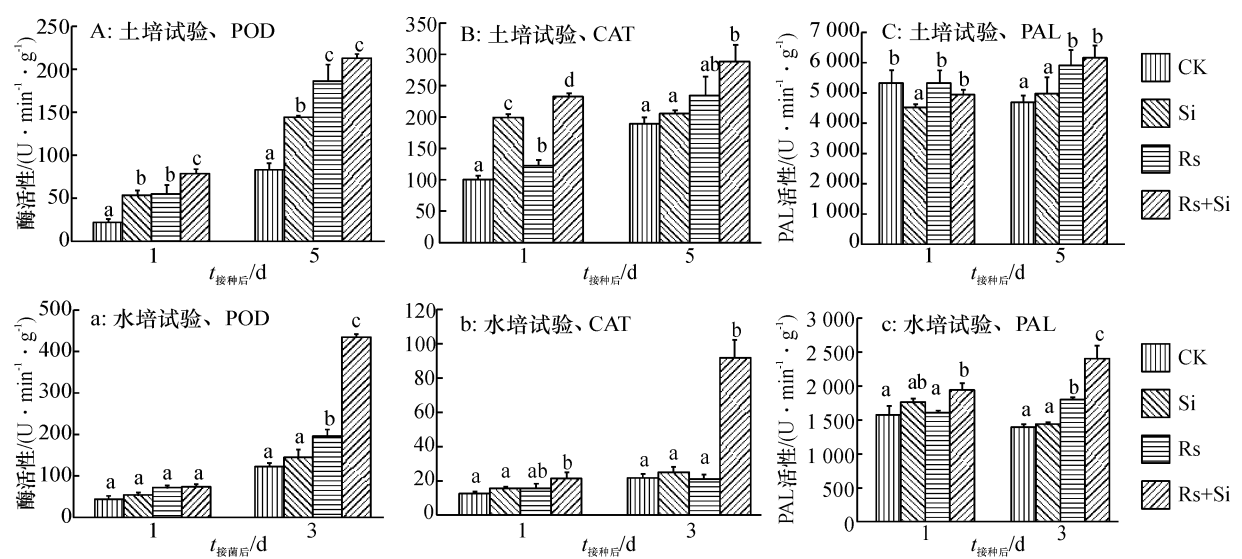


图 1 硅和接种处理对番茄青枯病病情指数的影响
Fig. 1 Effects of silicon supply and *Ralstonia solanacearum* inoculation on the disease index of bacterial wilt in tomato plants

2.2 硅和青枯菌对番茄叶片抗氧化酶活性的影响

2.2.1 POD 酶活性 土培试验如图 2A,在接种后第 1 和第 5 天,加硅处理(Si)的 POD 酶活性比对照(CK)增加了 142.36% 和 13.04%;在接种第 1 天,硅 + 接种处理(Rs + Si)比单一接种的处理(Rs)的 POD 酶活性增加了 43.17%.

水培试验如图 2a,在接种第 1 天,各处理间 POD 酶活性无显著变化. 在接种第 3 天,接种处理比对照的 POD 酶活性增加了 59.6%,加硅接种处理比单一接种处理的 POD 酶活性增加了 122%,差异显著.



各图中相同接种时间、不同柱上凡是有有一个相同小写字母者,表示差异不显著 (Duncan's 法, $P>0.05$).

图2 土培试验和水培试验中加硅和接种处理对番茄叶片酶活性的影响

Fig. 2 Effects of Si and *Ralstonia solanacearum* inoculation on the enzyme activity of tomato leaves in pot and hydroponic experiments

2.2.2 CAT 酶活性 在土培试验接种第1天,加硅处理的CAT酶活性比对照升高了96.62%,第5天则没有显著差异.加硅接种(Rs+Si)在第1和第5天分别比接种处理(Rs)升高了91.0%和23.17%.(图2B).

水培试验,接种第1天,番茄叶片CAT酶活性变化不大;在接种第3天,加硅接种处理则显著增加CAT酶活性,比单一接种增加了337%(图2b).

2.2.3 PAL 酶活性 PAL是木质素与植保素沿苯丙烷类代谢途径合成的关键调节酶,在它们与酚类物质的合成中起重要的作用,其活性与植物抗病性密切相关.如图2C,在土培不接种第1天,与对照(CK)相比,硅处理使叶片PAL酶活性下降了15.6%;在接种条件下,硅处理的PAL酶活性与对照(Rs)差异不显著.

如图2c所示,水培试验在不接种条件下,硅处理对PAL酶活性没有显著影响;而在接种条件下,硅处理在接种后第1和第3天PAL酶活性比单一接种处理分别增加21.12%和31.26%,差异达显著水平.

3 讨论与结论

3.1 硅处理与番茄青枯病的抗性

本试验结果表明,加硅处理可以降低番茄青枯病病情指数,其中土培番茄第10天的防病效果达到93.0%,水培番茄第6天的防效效果达到100%,这与以往的研究结果^[7]相似.硅肥作为一种环境友好型肥料对于土传病害青枯病的防治起到较好的作

用.本研究发现,接种青枯菌后番茄根部的硅含量显著增加,研究结果与Dannon和Wydra^[7]的相似.硅在番茄根部的累积量与番茄其他组织中青枯菌的数量呈负相关,硅能诱导植物产生抗性,提高植物对病害的耐受力,并与植物的抗性因子相互作用,从而间接影响了青枯病菌的生长和生理状态^[7-10].番茄接种青枯病菌后,番茄受到病原菌的侵害,但可能因为加硅为病菌侵入构建了一道“机械屏障”,减轻了病菌侵染和危害的程度,再者硅能诱导植物产生抗病性,增加了番茄对病原菌的抵抗力,从而使番茄抵御病害的能力加强.

3.2 硅处理和青枯病侵染对叶片抗氧化酶活性的影响

POD、CAT、PAL是与植物抗病相关的抗氧化酶^[13].PAL是苯丙烷类代谢途径中的关键酶和限速酶,由于该途径的中间产物(酚类物质)以及终产物(木质素、黄酮、异类黄酮等物质)被认为与植物防御病原物侵染有关,所以PAL被认为是一种抗氧化酶^[14].POD是木质素合成的关键酶之一,PAL和POD的提高会增加木质素植保素的含量,从而提高植物的抗病性^[15].在寄主与病原菌的相互作用中,硅可能起代谢调节作用,能诱发植物寄主对病原菌产生一系列的抗性反应.如黄瓜接种*Pythium* spp.病菌后,硅处理植株病情指数低、POD和多酚氧化酶(PPO)活性增强的程度高于对照^[16].本研究发现,在土培试验中,未接种条件下,硅能提高POD、CAT的活性,这与张国良等^[17]的试验结果相似.土培硅处理

使 PAL 活性先降低后升高,但差异并不显著. 在水培接种第 3 天,加硅接种处理能显著提高 POD、CAT 和 PAL 活性. 魏国强^[18]研究发现,受白粉病菌侵染和硅酸盐处理的黄瓜植株中,PAL 活性有明显的提高. 水稻接种稻瘟病后加硅能显著增加 POD、PAL 活性^[19]. Cai 等^[20]研究表明,外源施硅能显著提高感/抗水稻品系接种稻瘟病菌后叶片中 POD、PAL 活性,这与本试验在水培处理中的研究结果相似. 毛爱军等^[15]研究表明接种辣椒疫霉菌 *Phytophthora capsici* 后,水杨酸处理植株中 POD、PAL 活性大幅度增加,与本研究结果相似.

综合以上结果表明,加硅可以显著降低番茄青枯病的发病率,可能是由于硅处理提高番茄叶片保护酶活性,增强植物自身抵抗力,从而提高番茄对青枯病的抗性作用. 这为硅肥在生产中的应用提供了理论依据.

参考文献:

[1] 汪国平,袁四清,熊正葵,等. 广东省番茄青枯病相关研究概况[J]. 广东农业科学,2003,30(1):51.

[2] 尹贤贵,王小佳,张赞,等. 我国番茄青枯病及抗病育种研究进展[J]. 云南农业大学学报,2005,20(2):163-167.

[3] EPSTEIN E. The anomaly of silicon in plant biology[J]. PNAS, 1994, 91(1):11-17.

[4] 梁永超,孙万春. 硅和诱导接种对黄瓜炭疽病的抗性研究[J]. 中国农业科学,2002,35(3):266-261.

[5] 杨艳芳,梁永超,娄运生,等. 硅对小麦过氧化物酶,超氧化物歧化酶和木质素的影响及与抗白粉病的关系[J]. 中国农业科学,2003,36(7):813-817.

[6] HUANG Chenhua, ROBERTS P D, DATNOFF L E. Silicon suppresses *Fusarium* crown and root rot of tomato[J]. J Phytopathol, 2011, 159(6/7/8):546-554.

[7] DANNON E A, WYDRA K. Interaction between silicon amendment, bacterial wilt development and phenotype of *Ralstonia solanacearum* in tomato genotypes[J]. Physiol Mol Plant Pathol, 2004, 64(5):233-243.

[8] DIOGO R V C, WYDRA K. Silicon-induced basal resist-

ance in tomato against *Ralstonia solanacearum* is related to modification of pectic cell wall polysaccharide structure [J]. Physiol Mol Plant Pathol, 2006, 60(4):120-129.

[9] GHAREEB H, BOZSÓ Z, OTT P G, et al. Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-accumulator tomato implicates priming effect[J]. Physiol Mol Plant Pathol, 2011,75(3):83-89.

[10] GHAREEB H, BOZSÓ Z, OTT P G, et al. Silicon and *Ralstonia solanacearum* modulate expression stability of housekeeping genes in tomato [J]. Physiol Mol Plant Pathol, 2011,75(4):176-179.

[11] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,1998.

[12] 陈建勋,王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州:华南理工大学出版社,2002.

[13] MEHDY M C. Active oxygen species in plant defense against pathogens[J]. Plant Physiol, 1994, 105(2):466.

[14] 胡景江,左仲武,刘彦超. 壳聚糖对油松种子萌发及幼苗生理生化特性的影响[J]. 西北林学院学报,2003,18(4):21-23.

[15] 毛爱军,王永健,冯兰香,等. 水杨酸诱导辣椒抗疫病生化机制的研究[J]. 中国农学通报,2005,21(5):219-222.

[16] LIANG Y C, SUN W C, SI J, et al. Effects of foliar and root applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus* [J]. Plant Pathol, 2005, 54(5):668-685.

[17] 张国良,戴其根,张洪程,等. 硅肥和接种纹枯病菌对水稻膜脂过氧化和抗氧化酶活性的影响[J]. 扬州大学学报,2006,26(1):49-53.

[18] 魏国强. 硅提高黄瓜白粉病抗性和耐盐性的生理机制研究[D]. 宁波:浙江大学,2004.

[19] 孙万春,薛高峰,张杰,等. 硅对水稻防御性关键酶活性的影响及其与抗稻瘟病的关系[J]. 植物营养与肥料学报,2009,15(5):1023-1028.

[20] CAI Kunzheng, GAO Dan, LUO Shiming, et al. Physiological and cytological mechanisms of silicon-induced resistance in rice against blast disease[J]. Physiol Plant, 2008,134(2):324-333.

【责任编辑 周志红】