

# 水杨酸诱导水稻抗菌物质对稻瘟病菌的抑制作用

王瑞霞 王振中 纪春艳 李云锋 董章勇

华南农业大学资源环境学院, 广州 510642

**摘要** 采用平板法和气相色谱-质谱联用(GC-MS)方法,研究水杨酸(salicylic acid, SA)诱导处理水稻后产生的小分子的抗菌物质对稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)孢子萌发的影响以及含量的变化。结果表明:水杨酸诱导处理后的水稻叶片提取物质对稻瘟病菌孢子萌发具有抑制作用;水杨酸诱导处理后,水稻的2个品系CO39和CA101A51产生了分支酸、丁子香酚、稻壳酮A(Momilactone A, MA)、稻壳酮B(Momilactone B, MB)4种化合物,且水杨酸甲酯、苯酚、豆甾醇和 $\beta$ -谷甾醇、2种酯类物质、十一碳烷等化合物含量均发生变化。水杨酸诱导处理可以调动抗病相关的次生代谢过程,合成植保素及其他抗菌物质,从而提高植物的抗病性。

**关键词** 水杨酸; 抗菌物质; 气相色谱-质谱联用

**中图分类号** S 435 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)02-0193-04

水杨酸(salicylic acid, SA)是植物体内的小分子物质,具有多种重要的生理功能,是一种新的植物激素,并与植物的抗病性密切相关<sup>[1-2]</sup>。外源使用水杨酸能诱导烟草、黄瓜和拟南芥表达SAR基因和产生SAR。目前,SAR研究主要集中在双子叶植物,单子叶植物的SAR研究相对较少,水稻SAR的研究则仅见少量报道<sup>[3-6]</sup>。

已有的研究表明,水杨酸喷雾处理水稻后,可显著提高水稻对稻瘟病的抗性,且水杨酸诱导水稻的幼苗体内与抗菌物质合成酶的活性密切相关<sup>[2-3]</sup>。在此基础上,笔者采用平板法和气相色谱-质谱联用(GC-MS)方法,观察水杨酸诱导水稻后产生的小分子抗菌物质及其对真菌的抑制作用,旨在对水杨酸的抗病作用机制给予阐释。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试水稻和菌株

以CO39为背景的水稻(*Oryza sativa*)抗稻瘟病近等基因系,分别为C101A51(含*Pi-2*抗稻瘟病基因)和CO39(不含已知抗稻瘟病基因);稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)为广东省优势小种ZC13,菌株为97-151a。供试水稻和菌株均由华南农业大学植物病理生理学研究室提供。

### 1.2 主要试剂与仪器

试剂:水杨酸(分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司),甲醇、乙酸乙酯(分析纯,天津市化学试剂一厂)。仪器:旋转蒸发仪(Heidolph HB contr),真空抽滤器(XZ-1,上海仪表集团供销公司),6890N气相色谱仪(Agilent),5975N质谱仪(Agilent),OlympusCX40显微镜(Carl Zeiss),Universal 32R台式高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),B2071GVC超低温冰箱(LG公司)。

### 1.3 孢子悬浮液的制备

将稻枝梗培养基煮沸30 min,接种供试稻瘟病菌,于28℃培养15 d,菌丝长满后加入适量灭菌水,用玻棒搅拌洗去菌丝,沥干水后摊1薄层于灭菌培养皿中,置于蓝光灯下光照2~3 d,再用无菌水制成孢子悬浮液。孢子悬浮液的浓度为 $10^5$ 个/mL。

### 1.4 水杨酸溶液的喷施

用蒸馏水将水杨酸配成8 mmol/L(用1 mmol/L NaOH调节pH至7.0)。用8 mmol/L水杨酸(pH 7)喷雾处理水稻CO39和C101A51的4叶1心期幼苗,以水处理为对照。喷雾时均加入0.05% Tween-20。

### 1.5 样品采集

分别在水杨酸诱导处理水稻幼苗后的0、24、

收稿日期: 2010-09-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471129)

王瑞霞, 博士研究生, 研究方向: 植物病理学, E-mail: wangruixia2893@163.com

通讯作者: 王振中, 博士, 教授, 研究方向: 植物病理学, E-mail: zzwang@scau.edu.cn

36、48、72 h 采样。样品用液氮保存,置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

## 1.6 水稻叶片中小分子物质的提取

参照 Kodama 等<sup>[7]</sup>的方法,准确称取处理组和对照组的水稻叶片 5 g,剪成碎片后分别置于预冷的研钵中,液氮研磨成粉状,加入 50 mL 80% 甲醇研磨成浆,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,次日再以 2 倍体积的 80% 甲醇抽提 10 min 后收集抽提液,以 2 800 r/min 离心 30 min,上清液真空浓缩。上清部分加入 40 mL 乙酸乙酯,充分振荡摇匀,萃取,直至乙酸乙酯相变为无色。收集乙酸乙酯相,其中一部分用于抑菌检测,另一部分用 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 减压蒸馏除去乙酸乙酯,得到粗样品。

## 1.7 提取物对稻瘟病菌孢子萌发的影响

分别吸取 25  $\mu\text{L}$  稻瘟病菌孢子悬液,滴在凹玻片的凹处,然后分别加入 0、20、50、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  样品的乙酸乙酯溶液,轻轻混匀后置于垫有湿滤纸的培养皿中,在 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养。24 h 后在显微镜下观察孢子萌发情况,将芽管生长长度超过孢子直径的一半定义为孢子萌发,计算孢子萌发抑制率,各处理重复 3 次。

## 1.8 GC-MS 检测

过滤后将所制备的样品溶于 0.5 mL 无水甲醇中,用孔径 0.45  $\mu\text{m}$  的有机滤膜过滤,供 GC-MS 检测。采用 Agilent 6890N 气相色谱仪和 5975N 质谱仪进行检测,GC-MS 的分析条件,色谱柱:HP-5MS,30 m $\times$ 250  $\mu\text{m}$ ,ID $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ ;气相色谱操作条件:气化室温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,传输线温度 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;色谱柱升温程序:初温 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并保持 2 min,以 $15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并保持 1 min;进样方式为不分流进样,进样量为 1  $\mu\text{L}$ ;质谱:EI 离子源,倍增器电压 1 300 V;离子源温度 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,四极杆温度 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;全扫描(SCAN)质量范围 50~500 amu;样品为稀释 10 倍进样。

# 2 结果与分析

## 2.1 提取物对稻瘟病菌孢子萌发的抑制作用

试验结果表明,经水杨酸诱导处理后,水稻叶片提取物对稻瘟病菌孢子萌发有抑制作用,0、20、50、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的提取物对孢子萌发抑制率分别为 0、(5.1 $\pm$ 0.2)%、(35.2 $\pm$ 1.4)%、(67.3 $\pm$ 2.4)%,且在供试条件下,随提取物质浓度的升高,孢子萌发抑

制率逐渐升高。这说明水杨酸诱导水稻后,叶片提取物对稻瘟病菌有较强的抑制作用。

## 2.2 水稻抗菌物质的 GC-MS 检测

GC-MS 分析发现,与清水对照相比,经水杨酸诱导处理后,在水稻 2 个品系 CO39 和 CA101A51 的叶片中主要化合物均发生了变化,各峰物质相对百分含量如图 1 所示。

水杨酸甲酯:水杨酸诱导处理后不同时间 CO39 和 C101A51 的提取物中 MeSA 含量变化如图 1-A 所示。与水处理相比,水杨酸诱导处理后 24、36、48、72 h C101A51 和 CO39 的提取物中 MeSA 的含量有所升高;水杨酸甲酯(methyl salicylate, MeSA)是植物防卫基因表达的高效调节子,是诱导防卫反应的信号分子。

分支酸:水杨酸诱导处理后不同时间 CO39 和 C101A51 的提取物中分支酸含量变化如图 1-B 所示。水杨酸诱导处理后,C101A51 和 CO39 品系都产生了分支酸。

稻壳酮 A:水杨酸诱导处理后不同时间 CO39 和 C101A51 的提取物中稻壳酮 A 含量变化如图 1-C 所示。水杨酸诱导处理后,C101A51 和 CO39 品系都产生了稻壳酮 A(Momilactone A, MA)。

稻壳酮 B:水杨酸处理后不同时间 CO39 和 C101A51 的提取物中稻壳酮 B 含量变化如图 1-D 所示。水杨酸诱导处理后,C101A51 和 CO39 品系都产生了稻壳酮 B(Momilactone B, MB)。

从 2 个品系 C101A51 和 CO39 来看,水杨酸诱导处理后,水稻体内都产生了 MA、MB,它们是水杨酸 PA 中的一类,都是二萜类化合物。本试验用水杨酸喷雾处理稻苗后稻叶中迅速产生了含有 MA、MB 的抑菌物质,它们对稻瘟病菌分生孢子萌发有很强的抑制作用。水杨酸诱导处理后,这种抑菌物质的产生可能与水杨酸诱导稻苗产生抗病性有关。

苯酚和丁子香酚:水杨酸诱导处理后不同时间 CO39 和 C101A51 的提取物中苯酚和丁子香酚含量变化如图 1-E、F 所示。水杨酸处理后,C101A51 和 CO39 品系内苯酚和丁子香酚含量增加。

豆甾醇和 $\beta$ -谷甾醇:水杨酸诱导处理 C101A51 和 CO39 的提取物中豆甾醇、 $\beta$ -谷甾醇含量变化如图 1-G、H 所示。水杨酸处理后,C101A51 和 CO39 品系豆甾醇、 $\beta$ -谷甾醇含量增加,豆甾醇和 $\beta$ -谷甾醇都是植物甾醇,具有良好的抗氧化作用。

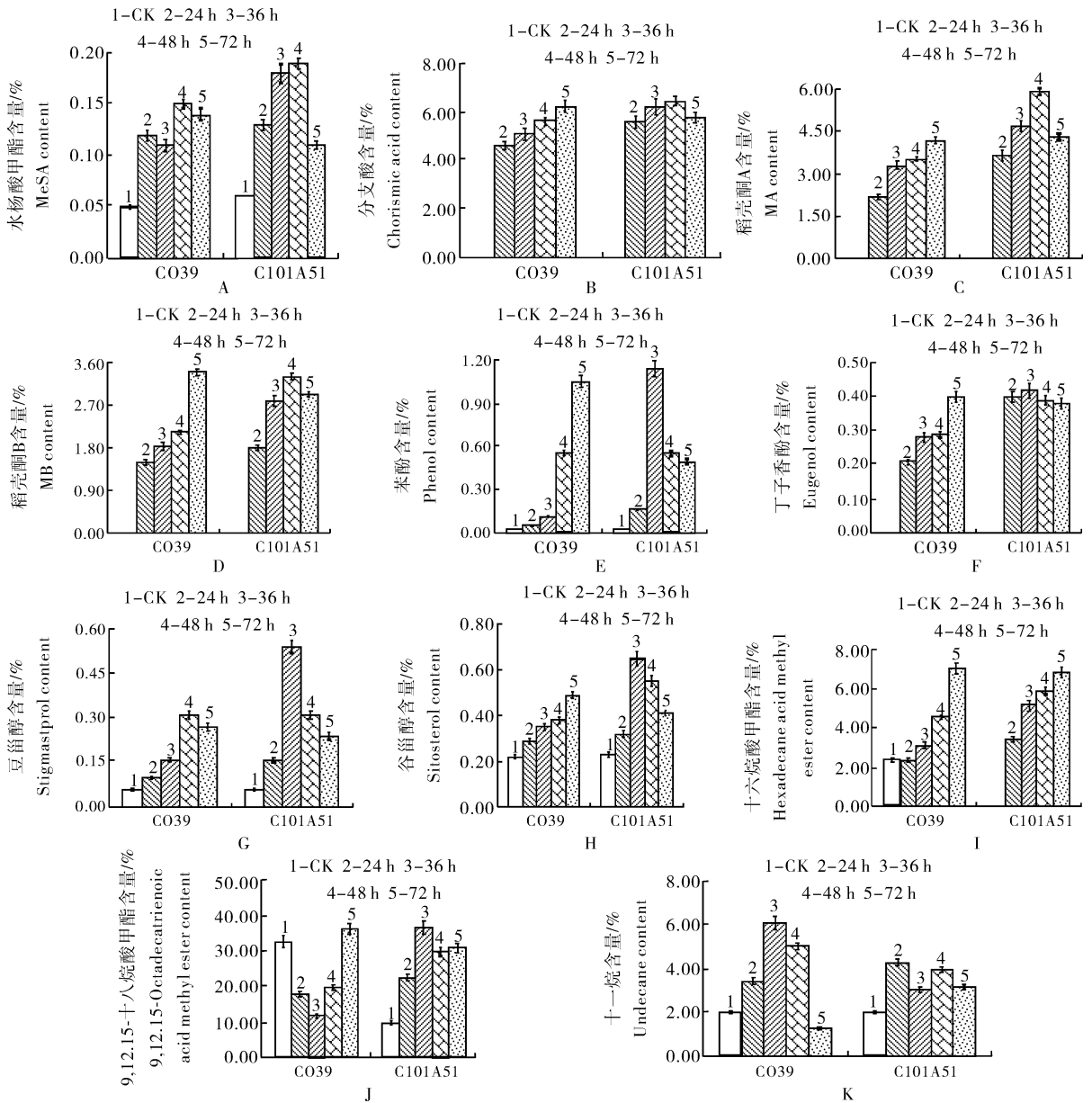


图 1 水杨酸诱导处理后水稻 CO39 和 C101A51 叶片中提取物的变化

Fig.1 Relative percent in rice leaves of CO39 and C101A51 by SA treatment

酯类物质：水杨酸诱导处理 C101A51 和 CO39 的提取物中酯类物质含量变化如图 1-I,J 所示。本试验水杨酸诱导处理会导致水稻 2 个品系十六烷酸甲酯含量的增加,C101A51 的 9,12,15-十八烷酸甲酯含量上升,而在 CO39 中的含量 48 h 前含量下降,之后略有上升,其原因有待进一步探讨。

十一碳烷：水杨酸诱导处理 C101A51 和 CO39 后,水稻体内产生了更多的挥发性烷烃类物质十一碳烷(图 1-K),这些物质在水稻诱导抗病性中的作用有待进一步探讨。

### 3 讨论

本试验结果表明:水杨酸诱导处理后,在水稻叶片的提取物中,能提取到抑制稻瘟病菌萌发和细菌生长的物质,且经 GC-MS 检测,提取物和对照相比,水杨酸诱导处理后水稻叶片可产生分支酸、丁子香酚、稻壳酮 A、稻壳酮 B;水杨酸诱导处理后,会导致水稻叶片中苯酚、水杨酸甲酯、甾醇、β-甾醇和十一烷含量的升高;水杨酸诱导处理后,C101A51 的 9,12,15-十八烷酸甲酯含量明显上升,而在 CO 39 中的含量 48h 前含量下降,之后略有上升。

水稻叶片经水杨酸诱导处理后十一碳烷含量比对照升高,也许可以利用这些物质来预测水稻的抗病性。苯酚具有较强的杀菌能力,丁子香酚也可以对前来侵染作物的病原菌细胞或孢子起毒杀作用。植物在诱导子激发的过程中诱导产生的小分子芳香族化合物或含氧化合物组分在植物抵御病害中具有重要的作用,其抗菌活性可作为直接抵御病原侵染的化学防卫因素。小分子酚类化合物作用病原菌后,除可损伤病菌的胞浆膜,使胞浆内容物外渗、漏出外,还能使细胞膜上的氧化酶和脱氢酶失活,最终导致细菌死亡,具有广谱抗菌力<sup>[8]</sup>。水杨酸甲酯除了具有抗菌活性,也作为植物信号分子而诱导受感染植株的相邻植株或受感染植株的健康组织防卫基因的表达<sup>[3]</sup>。

植物的酚类化合物是通过多条途径合成的,其中重要的一条是莽草酸途径(shikimic acid pathway)。分支酸是莽草酸途径的重要枢纽物质,本试验结果同时也检测到分支酸的存在。谷甾醇是一种混合性植物甾醇,谈满良等<sup>[9]</sup>从蓝桉(*Eucalyptus globulus* Labill)果实提取物中分离到15个化合物,通过抗菌活性测定, $\beta$ -桉叶油醇和 $\beta$ -谷甾醇对稻瘟病菌孢子萌发具有较强的抑制活性。本试验结果也同样说明,水杨酸诱导水稻后,会显著提高水稻体内

豆甾醇和谷甾醇的含量,通过改变植物体内的物质代谢,增加抗菌物质的积累,提高植物的抗病性。

## 参 考 文 献

- [1] RASKIN I. Salicylate, a new plant hormone[J]. *Plant Physiology*, 1992, 99(3): 799-803.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] DAW B D, ZHANG L H, WANG Z Z. Salicylic acid enhances antifungal resistance to *Magnaporthe grisea* in rice plants[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2008, 37: 637-644.
- [5] 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.
- [6] 张衍荣, 王小菁, 张晓云, 等. 水杨酸对豇豆枯萎菌的抑制作用[J]. *华中农业大学学报*, 2006, 25(6): 610-613.
- [7] KODAMA O, MIYAKAWA J, AKATSUKA T, et al. Sakurane, a flavanone phytoalexin from ultraviolet-irradiated rice leaves[J]. *Phytochemistry*, 1992, 31: 3807-3809.
- [8] SESKAR M, SHULAEV V, RASKIN I. Endogenous methyl salicylate in pathogen inoculated tobacco plants [J]. *Plant Physiology*, 1998, 116(1): 387-392.
- [9] 谈满良, 周立刚, 汪冶, 等. 蓝桉果实抗稻瘟病菌成分分离及其活性[J]. *植物病理学报*, 2007, 37(5): 535-540.

## Inhibitory activity of antibiotic substances extraction induced by salicylic acid in rice leaves against *Magnaporthe grisea*

WANG Rui-xia WANG Zhen-zhong JI Chun-yan LI Yun-feng DONG Zhang-yong  
College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University,  
Guangzhou 510642, China

**Abstract** The low-molecular-weight antibiotic substances of low molecular weight induced in rice leaves by salicylic acid(SA) treatment were studied. Plate method was used to detect the effect of the extract on spore germination and Gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS) was used to analyse these low-molecular-weight antibiotic substances. The results showed that the induced substances can effectively inhibit spore germination in *Magnaporthe grisea*. GC-MS analysis also revealed that SA could significantly induce many kinds of low-molecular-weight compounds in rice leaves and that their content was increased as compared to the control group. SA could cause the production of momilactone A, momilactone B, eugenol, and chorismic acid evidently, SA could alter the levels of phenol, methyl salicylate, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, undecane and methyl ester. These results provided direct evidence that the rice plant produces phytoalexins in response to SA treatment.

**Key words** salicylic acid; antibiotic substances; gas chromatography-mass spectrometry