

# 感染 MLO 泡桐组培苗代谢变化与致病机理的关系\*

田国忠 黄钦才 袁巧平 张锡津

(中国林业科学院林业研究所, 北京 100091)

## 摘 要

感染泡桐丛枝病类菌原体(PWB-MLO)的泡桐组培苗表现出典型的丛枝症状。电子显微镜和 DAPI 荧光显微镜检查结果显示病苗的症状严重度与其韧皮部筛管内 MLO 密度成正相关。HPLC 分析病与健株内源激素和酚类物质含量,发现病株游离 IAA 含量明显低于健康对照,并且 IAA 含量变化与邻苯二酚含量变化呈显著正相关性( $r=0.90$ ,  $n=11$ )。细胞分裂素(Z+ZR, iPA)、GA<sub>3</sub>和 ABA 含量变化与 MLO 侵染关系不密切。病健株抽提液过氧化物酶、IAA 氧化酶、多酚氧化酶和苯丙氨酸裂解酶(PAL)活性的差异,以及外源 NAA 和邻苯二酚处理对病苗与健苗生长的不同影响进一步反映了 MLO、邻苯二酚和 IAA 相互联系和作用的本质。

**关键词** 泡桐组织培养、MLO 致病机理、吲哚乙酸(IAA)、邻苯二酚

由类菌原体引起的泡桐丛枝病是我国泡桐树种上最严重病害问题。由于病原难于人工培养,对致病机理研究遇到许多困难,有限的研究结果,未能阐明病原与寄主相互作用的本质问题<sup>[1,2]</sup>。在泡桐丛枝病研究方面,虽然有一些涉及病原对寄主代谢影响的报道<sup>[3-5]</sup>,但对这些变化与病原致病过程的关系则缺乏了解。作者采用泡桐离体培养方法保存 PWB-MLO 获得成功<sup>[6]</sup>,在此基础上开展了感染 MLO 的泡桐组培苗代谢变化与致病机理之间相互关系的研究,从而揭示了病原 MLO 浓度、内源激素水平、过氧化物酶和 IAA 氧化酶,以及某些酚类物质变化与症状表达之间的某些内在联系,为进一步阐明 MLO 致病机理提供了新的依据。

## 1 材 料 和 方 法

### 1.1 植物、病原和组织培养

取感染泡桐丛枝病类菌原体(PWB-MLO)的泡桐病芽于 MS 培养基上离体培养,光照 14h/天,光强 4500lx,温度  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 30—60 天取具节茎段继代培养。PWB-MLO 保存在 3

1993-03-30 收稿, 1993-05-28 收修改稿。

\* 国家自然科学基金资助项目。

个无性系 C85-028D, C443D 和 C85-034D 上, 以 C85-028D 的脱毒苗 T35-028<sup>[6]</sup>, 毛泡桐 (*Paulownia tomentosa* S.) 种子苗 XH 和 C443H 无病芽组培苗为健康对照。

在 MS 培养基中分别附加不同浓度的萘乙酸 (NAA, 浓度分别为 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0mg/L 培养基) 或邻苯二酚 (浓度分别为 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1mg/L 培养基), 来培养带病和健康泡桐组培苗, 比较病株和健株反应差异。

## 1.2 MLO 的检测

取感染 MLO 的组培苗幼茎、叶柄和细根部位进行 DAPI 荧光显微镜和电子显微镜检查<sup>[7]</sup>。

## 1.3 内源激素和酚类物质的 HPLC 分析

分别于组培苗不同培养期取样测定内源激素和某些酚类物质水平。材料分成茎叶和根两部分, 按鲜材料与甲醇 (内含 1mmol/L BHT 作为抗氧化剂) 1:5 比例 (w/v) 抽提游离 IAA, 细胞分裂素 (Z+ZR, iPA), GA<sub>3</sub> 和 ABA, 以及酚酸类化合物。HPLC 为 Waters 244 型, 色谱条件为 Novapak C18 柱, 流动相 20%CHCN-40%CH<sub>3</sub>OH-40%H<sub>2</sub>O, pH≈3.0, 流速 0.7ml/min, UV254nm×0.1AUFS 检测器。酚类物质分析流动相为 40%CH<sub>3</sub>OH, 其它条件与前相似。

## 1.4 过氧化物、IAA 氧化、多酚氧化和苯丙氨酸裂解酶活性, 以及过氧化物同工酶活性测定

取冰冻组培苗茎叶组织 1—2g, 按鲜材料与 0.04mol/L PBS (pH5.8) 1:1 比例 (w/v) 于研钵中研磨 (低温下) 后离心, 14000r/min, 10min, 上清液供酶活性测定; 为除去酶液中抑制物质, 采用相同缓冲液 4℃ 下透析 48h。

过氧化物酶和 IAA 的氧化酶活性测定按 Forchetti<sup>[3]</sup> 的方法, 在 254nm 下测定 IAA 的氧化产物吸收值, 用 Salkowski 试剂法<sup>[9]</sup> 测定 IAA 的降解量。多酚氧化酶活性和 PAL 活性测定见 Sheen<sup>[10]</sup> 的方法, 多酚氧化酶作用底物为邻苯二酚, PAL 作用底物为 L- 苯丙氨酸。过氧化物同工酶测定按田国忠的方法<sup>[4]</sup>。

# 2 结 果

## 2.1 染病泡桐组培苗症状与病原含量的关系

当具腋芽的染病泡桐茎段移入新 MS 培养基后, 双侧或单侧腋芽萌生, 新出茎叶变小, 叶柄变短或退化, 节间缩短, 叶腋处腋芽分化, 生根少或不生根; 后期腋芽和顶芽膨大白化, 生长停滞。病苗幼茎超薄切片的电子显微镜观察发现韧皮部筛管充满大量病原 MLO 细胞; 腋芽和顶芽膨大白化组织系由薄壁细胞液泡膨大, 叶绿素减少所致。不同无性系病苗症状差异较大, 其中 C85-028D 腋芽和顶芽膨大和白化最为普遍, 继代组培苗 97.5%—100% 表现为严重症状; C443D 由于节间缩短而严重矮化, 但腋芽和顶芽膨大不明显, 继代苗严重丛枝率为 82.2%—91.5%, 轻症苗率为 3.9%—6.7%, 无症状苗率为 4.6%—11.1%; 而 C85—034D 的症状类型介于前两者之间, 继代苗严重丛枝率 (以下简称 C85-034D<sub>1</sub>) 为 50%—97.3%, 轻症苗率 (C85-034D<sub>2</sub>) 占 13%—45%, 2%—13.3% 的苗表现为无症状带菌苗 (C85-034D<sub>3</sub>)。

从图 1 中可以看出, 病原 MLO 对株高生长的影响与无性系遗传特性有关。C85-028D 在培养 10—30 天范围内株高增加迅速, 节间伸长, 叶片较大, 叶柄较长, 腋芽和顶芽膨大不显著。病原检测结果显示幼茎筛管内 MLO 浓度下降, 至 40 天以后, MLO 含量又回升到原来水平, 症状也越来越严重, C443D 苗体内之所以 MLO 浓度一直较高, 与无性系本身生长缓慢特

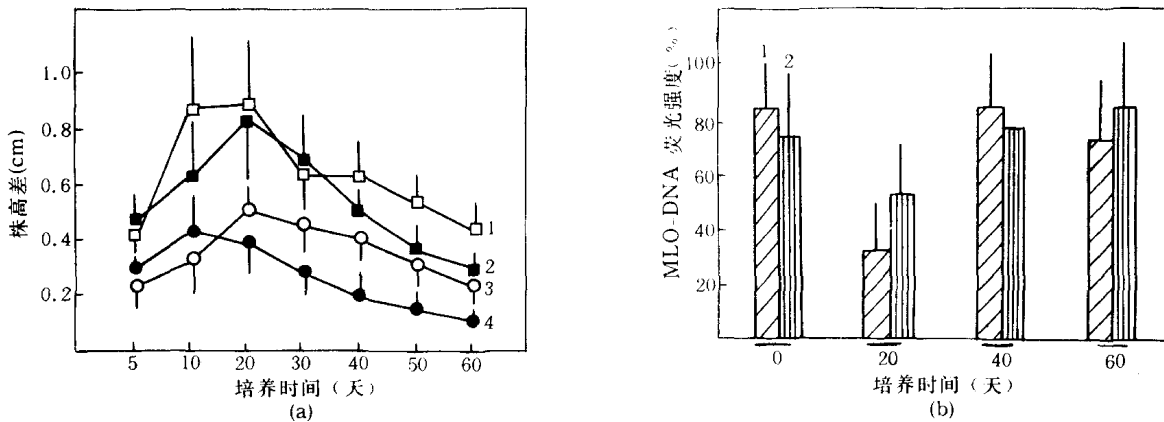


图 1 茎段组培苗在 MS 培养基上株高变化曲线与 MLO 含量变化

(a) 培养天数与株高变化的关系, 垂直线为标准差 ( $n=15-20$ ), 1 为 T35-028, 2 为 C85-028D, 3 为 C443H, 3 为 C443D;  
(b) 培养天数与韧皮部 MLO 特异性荧光强度的关系, 垂直线为标准差 ( $n=10$ ), 1 为 C85-028D, 2 为 C443D

性有直接联系。这说明症状的严重度与病株体内 MLO 含量成正相关。表现不同症状类型的 C83-034D 的韧皮部筛管内 MLO 浓度大小依次为  $D_1 > D_2 > D_3$ , 并且进一步证明了在无症状的部分筛管中检查到 MLO 特异荧光团, 而且随着筛管内 MLO 数量增加和扩展, 丛枝症状会随之出现。

## 2.2 病苗与健苗内源激素含量差异

图 2 显示了不同无性系和不同生长期病健株游离 IAA 含量变化趋势。C85-028D 茎叶总的 IAA 含量明显低于脱毒苗 T35-028。虽然各种因素都有可能影响 IAA 水平, 但病株与健株的培养条件和取样时间与部位的一致消除了可能的系统误差, 因而病株游离 IAA 含量下降的趋势是确定的。而游离 IAA 含量降低的水平在很大程度上与 MLO 引起症状的严重度是一致的。

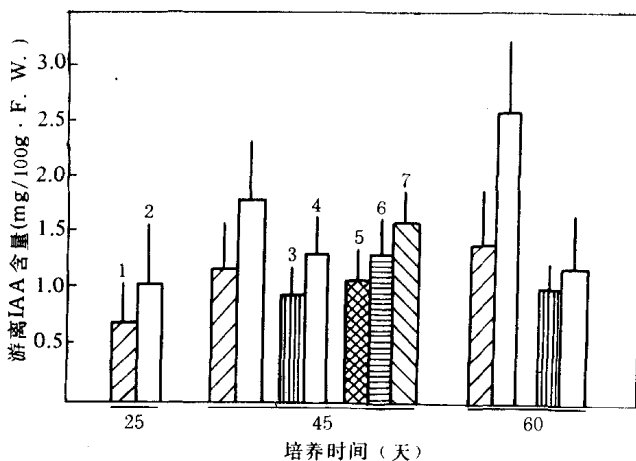


图 2 不同生长期各无性系病健苗游离 IAA 含量变化  
1 为 C85-028D, 2 为 T35-028, 3 为 C443D, 4 为 C443H, 5 为 C85-034D<sub>1</sub>, 6 为 C85-034D<sub>2</sub>, 7 为 C85-034D<sub>3</sub>. 垂直线为四次重复取样测定标准差

细胞分裂素 (Z+ZR, iPA) 测定结果表明, 病株地上部分茎叶总的细胞分裂素 (Cytokinin, 简称 CK) 含量也比健康对照低, 但对这种变化尚无法与症状发展直接联系起来。很可能是由于 IAA 含量降低后, 病株生根能力下降, 而 CK 的主要合成位点在根部, 从而导致地上部 CK 水平下降。健苗根部的测定结果也证明了较高浓度的 CK 存在。

病株与健株在  $GA_3$  和 ABA 含量上都无明显规律性差异。  $GA_3$  在不同无性系间差异明显, 其中  $GA_3$  含量以  $C85-028 > XH > C85-034 \geq C443$ ; 这种差异似乎与无性系的株高特性和感染 MLO

后的矮化程度有关。病与健株继代培养苗 30 天之内 ABA 水平都很低, 至 60 天时体内浓度增高, 但病与健株之间未有规律性差异。MLO 侵染虽然阻碍和破坏了植物有机营养运输系统, 造成光合作用降低, 但对木质部水分吸收影响不大, 故与 ABA 累积相关的水分胁迫不明显是可以理解的。

### 2.3 酚类物质含量变化与 IAA 水平之间的关系

采用 HPLC 分别对病株与健株的甲醇抽提液中邻苯二酚、原儿茶酸、氯原酸、p- 香豆酸、对羟基苯甲酸、阿魏酸、没什子酸和丁香酸等一元和二元酚进行定量分析比较。结果发现邻苯二酚、p- 香豆酸和对羟基苯甲酸含量的变化与 MLO 的感染有直接的联系。其中病株体内邻苯二酚含量明显降低, 约为健苗对照含量的 1/5 至 4/5。而 p- 香豆酸和对羟基苯甲酸含量则升高, 但变化幅度明显低于邻苯二酚。

对所测定的不同无性系的病与健株酚类物质含量和游离 IAA 含量之间进行相关性分析。结果表明 (见图 3), 邻苯二酚含量变化对 IAA 含量影响最大。两者呈明显的正相关性, 根据 11 个样品的相应数据, 得出 IAA 含量 (y) 与邻苯二酚含量 (x) 之间的线性回归方程为  $y = 2.4518 + 0.3697x$ ,  $r = 0.90$ , 0.1% 水平差异显著。p- 香豆酸和对羟基苯甲酸与 IAA 含量变化无明显相关性。

邻苯二酚等二元酚作为生长素的保护剂, 在植物正常生长和发育过程中所起的调节作用已为试验所证实<sup>[11,12]</sup>。MLO 侵染造成体内邻苯二酚水平降低, 很可能是病原与寄主相互作用过程中被氧化产生对 MLO 有抑制作用的醌类化合物的结果。作为健康植物体内存在的天然抗病物质, 这一氧化途径在病害抗性上的作用也已被证实<sup>[13]</sup>。可见邻苯二酚含量的变化在 MLO 致病过程中起非常关键作用。

当甲醇抽提液未加抗氧化剂 BHT, 而在 4℃ 下静置 15—20 天后再测定游离 IAA 和酚类物质含量时, 发现病株和健株抽提液中邻苯二酚和 IAA 含量都明显下降, 原儿茶酸水平却显著提高。并且比较病株与健株变化可以看出, 健株的变化程度大于病株, 从而出现病株 IAA 含量高于健株汁液的情况。其它酚酸, 包括 p- 香豆酸和对羟基苯甲酸在抽提液放置过程中变化微小。

### 2.4 过氧化物酶及同功酶、IAA 氧化酶、多酚氧化酶和 PAL 活性变化

图 4 和表 1 显示了病与健组培苗体内过氧化物酶活性差异。从中可以看出病株抽提液过氧化物酶活性总是高于健康对照, 而且这种差异随继代苗生长时间加长而增大。图 5 反映了病与健株, 以及不同无性系间碱性过氧化物同功酶在高 Rf 值区的明显差异, 这种变化与过氧化物酶活性变化一致。

由于病株与健株汁液中酚类物质, 特别是邻苯二酚含量差异较大, 未经透析的酶液 IAA 氧化酶活性与过氧化物酶活性不一致。因而尚不能肯定健株体内 IAA 氧化酶活性高于病

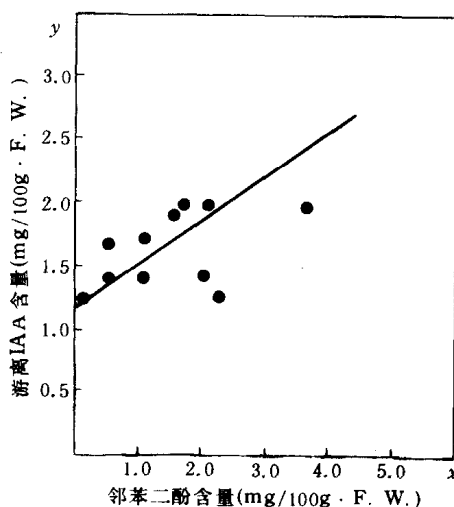


图3 邻苯二酚含量与游离 IAA 含量之间相关性分析

回归曲线为  $y = 2.4518 + 0.3697x$ ,  $r = 0.90$

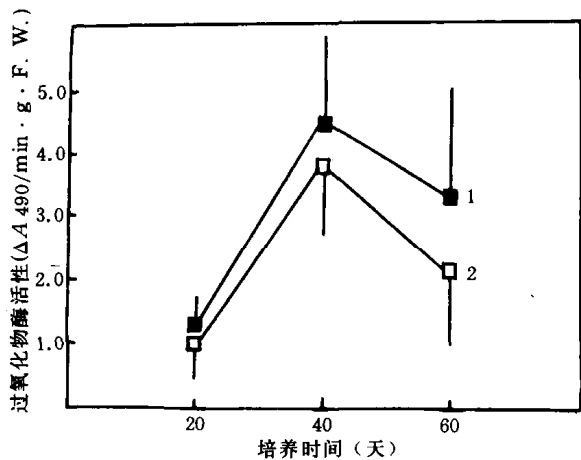


图 4 病与健株抽提液过氧化物酶活性  
垂直线为 4 次取样测定标准差, 1 为 C85-028D, 2 为 T35-028

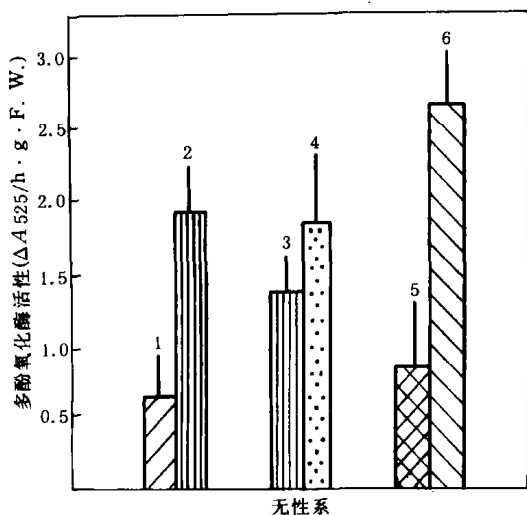


图 6 多酚氧化酶测定结果  
1 为 C85-028D, 2 为 T35-028, 3 为 C443D, 4 为 C443H, 5 为 C83-034D<sub>1</sub>, 6 为 C85-034D<sub>3</sub>; 垂线为标准差 (n=3)

株。既然这种现象在健株 IAA 氧化酶测定中存在<sup>[9]</sup>, 那么在病与健的比较时就显得更为突出。

图 6 显示病株汁液多酚氧化酶活性明显低于健株, 相反病株体内 PAL 活性则有增高的趋势。已知多酚氧化酶活性与植物对病原

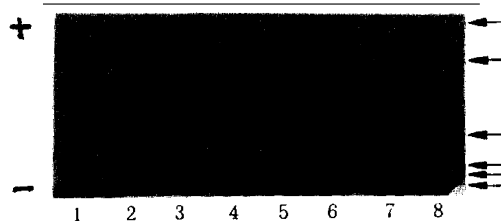


图 5 病与健株过氧化物同工酶谱  
1 为 XH, 2, 3, 5 为 C85-028D, 4 为 T35-028, 6 为 C85-034D<sub>2</sub>, 7 为 C85-034D<sub>1</sub>, 8 为 C443D; 7.5%PAGE (pH 8.9)

表 1 生长 60 天病株与健株对照抽提液过氧化物酶和 IAA 氧化酶活性测定结果<sup>a)</sup>

| 过氧化物酶<br>(U/min · g · F.W.) |             | IAA 氧化物<br>(μgIAA/h · g · F.W.) <sup>b)</sup> |             |
|-----------------------------|-------------|-----------------------------------------------|-------------|
| C85-028D                    | T35-028     | C85-028D                                      | T35-028     |
| 3.38 ± 0.69                 | 2.27 ± 1.00 | 1.43 ± 0.49                                   | 2.44 ± 0.65 |

a) 测定酶液未经透析处理, 数据为 4 次重复取样测定平均值 ± 标准差;  
b) 为 Salkowski 试剂法测定结果。

的抗性有关, 而 PAL 则是植物苯丙氨酸类代谢中起关键作用的限速酶<sup>[13]</sup>, 因而它们在植物对 MLO 抗性 & 病原 MLO 对泡桐致病过程中的作用值得进一步探讨。

## 2.5. NAA 和邻苯二酚对病苗与健苗生长和 MLO 增殖的影响

在 MS 培养基中附加各种浓度的 NAA 后, 随着浓度增高 (0—2.0mg/L) 病株的丛枝和矮化症状缓解, 当 NAA 浓度达 1.0mg/L 时开始分化粗短根, 节间伸长明显; 培养 20 天后的幼苗筛管中 MLO 浓度降低, NAA 浓度越高, 筛管中 MLO 荧光强度越低, 但至 40 天后, 各浓度处理 MLO 浓度都开始回升, 不同处理之间的差异也越来越小。比较 NAA 对病株与健株株高影响可以发现病株需补充更高浓度的生长素才能达到健株高度, 而此浓度已开始抑制健株生长。以上结果意味着 NAA 不是通过抑制病原增殖, 而是通过调节 MLO 侵染引起的内源生长素水平失调来缓解丛枝和矮化症状的。

邻苯二酚对病株与健株生长的影响的差异特别显著 (见表 2), 随着培养基中邻苯二酚浓度增加, 丛枝症状减轻。至 0.01mg/L 时病苗丛枝消失 (但生根能力和株高降低)。比较病株与健株对邻苯二酚耐受浓度, 可以看出当培养基中邻苯二酚浓度达 0.05mg/L 时病苗能正常生

表 2 邻苯二酚处理对病苗和健苗生长及病原浓度的影响<sup>a)</sup>

| 处理浓度<br>(mg/L) | 组培苗      | 症状类型 <sup>b)</sup> | 株高 (cm) <sup>c)</sup> | MLO 浓度 <sup>d)</sup> |
|----------------|----------|--------------------|-----------------------|----------------------|
| 0.000          | C85-028D | WBIII              | 3.06±0.99             | +++—++++             |
|                | T35-028  | NS                 | 3.84±1.36             | —                    |
| 0.005          | C85-028D | WBII               | 3.79±0.60             | +++                  |
|                | T35-028  | NS+PTI             | 3.78±0.13             | —                    |
| 0.010          | C85-028D | WBI+PTI            | 2.86±0.096            | ++                   |
|                | T35-028  | NS+PTII            | 1.19±0.51             | —                    |
| 0.025          | C85-028D | NS+PTII            | 2.35±1.15             | +                    |
|                | T35-028  | NS+PTIII           | 1.47±0.67             | —                    |
| 0.050          | C85-028D | NS+PTIII           | 2.05±0.71             | +                    |
|                | T35-028  | NS→D               | /                     | —                    |
| 0.100          | C85-028D | NS+PTIII           | 1.05±0.25             | +(-)                 |
|                | T35-028  | D                  | /                     | —                    |

a) 表中为培养 40 天的调查结果; b) WBI 至 WBIII 表示丛枝症状由轻变重, NS 表示无丛枝症状, PTI 至 PTIII 为药剂引起的矮化症状由轻至重, D 表示苗枯死; c) 为平均株高 ± 标准差 ( $n=10-30$ ); d) +—++++ 表示 MLO-DNA 荧光强度由低至高, +(-) 为多数切片检查不到 MLO, — 检查不到 MLO。

长, 但健康对照却全部枯死, 至 0.1mg/L 时, 仍有一半的茎段苗存活, 而健康茎段培养两周后即全部变褐死亡。邻苯二酚对株高的影响也进一步显示了附加低浓度的邻苯二酚即对健康植株产生抑制效应, 但对病苗的生长具有促进作用。虽然在高浓度时病苗生长也受抑制, 但丛枝症状却减轻或消失。MLO 检查结果证实, 高浓度的邻苯二酚对 MLO 的增殖具有抑制作用。以上试验进一步验证了邻苯二酚在 MLO 致病过程中起重要作用的推论。

### 3 讨 论

从本试验结果可以得出, 感染 PWB-MLO 后的泡桐组培苗体内过氧化物酶及同功酶活性增加, 邻苯二酚含量明显降低, 从而促进了由过氧化物酶——IAA 氧化酶参与的生长素氧化分解, 导致体内游离 IAA 含量明显低于健康水平, 引起植株节间缩短, 顶端优势丧失, 腋芽萌生, 生根能力下降或丧失, 最后表现为典型的丛枝症状。而伴随着生根能力的丧失, 体内细胞分裂素水平也随之降低, 进一步导致顶芽膨大和白化等严重症状。这可能是 MLO 致病过程中关键因素, 虽然涉及 MLO 致病过程尚有某些问题有待澄清, 但根据已有的试验证据, 可以推断 MLO 的侵染和危害首先破坏了寄主韧皮部筛管及附近薄壁细胞组织结构和渗透势, 打破了这些组织细胞内正常代谢的空间调节机制, 引起邻苯二酚等物质的氧化, 产生对病原 MLO 有抵抗作用的醌类物质, 这类物质又成为 IAA 氧化酶的激活剂和羧基受体, 促进 IAA 氧化脱羧形成 3-亚甲基氧吲哚或类似物质, 脱下的羧基与醌进一步作用会产生原儿茶酸。本试验结果显示的健株抽提液中邻苯二酚和游离 IAA 含量的降低与原儿茶酸含量的增高即是证据之一。MLO 侵染造成植株维管系统的破坏已被许多试验证实<sup>[1,2]</sup>, 而邻苯二酚作为正常植株 IAA 的一种保护剂, 其自身又易被氧化; 造成在一定条件下又会成为 IAA 氧化分解的加速剂。所以许多离体条件下所测定的酶活性或代谢过程也许不能完全反映健株体内正常代谢途径<sup>[14]</sup>, 但却可能代表了 MLO 侵染后的病理代谢变化。病理代谢的另外一种可能变化是

MLO 首先诱导病株体内过氧化物酶和同功酶活性增高来促进邻苯二酚的氧化,进而提高 IAA 氧化酶活性,使 IAA 氧化分解。已经报道在植物正常代谢过程中 IAA 的氧化产物就达 14 种之多<sup>[15]</sup>,因而病原与寄主相互作用过程中 IAA 氧化变化可能比预料的复杂。对许多植物与病原真菌、细菌、病毒或 MLO 等相互作用过程中,酚类物质或过氧化物酶的变化已被广泛认识,但对其与激素,特别是与生长素变化之间的关系和它们在致病过程中的作用往往未被重视,深入阐明这些代谢变化的实质,不仅对病原致病机理,而且会对病害防治提供某些依据。

本试验同 Davey 等<sup>[16]</sup>报道结果一样未能证明 MLO 具有合成或诱导合成 CK 的能力。所以按 C/A(细胞分裂素/生长素)值影响丛枝形成理论分析<sup>[17]</sup>,MLO 对内源激素的影响,是通过降低生长素水平来产生 C/A 值增大效应的。由于 CK 和生长素之间还存在着协同效应<sup>[18]</sup>,事实上生长素降低的同时,也导致了 CK 水平下降。

**致谢** 本文得到王 蕤研究员审阅和指教,王文芝、叶水英、卞学渝和孙福生等同志协助进行仪器分析,熊耀国先生提供泡桐试材,在此一并感谢。

### 参 考 文 献

- [1] McCoy, R.E., *The Mycoplasmas.*, Vol. 3, Academic Press, 1983, 229—264.
- [2] Kirkpatrick, B. C., *The Mycoplasmaology*, Vol.5 Academic Press, 1989, 241—293.
- [3] 王 蕤、王守宗、孙秀琴,林业科学,1981, 17:281—286.
- [4] 田国忠、金开璇、汪 跃,林业科学研究,1990, 3:146—150.
- [5] Doi, Y., Asuyama, H., *The Mycoplasma Diseases of Trees and Shrubs*, Academic Press, 1981, 135—146.
- [6] 田国忠、袁巧平、黄钦才等,两岸植病学术研讨会论文集,中国植物病理学会,北京,1992, 65—66.
- [7] 金开璇、田国忠、汪 跃,植物病理学报,1989, 19:185—188.
- [8] Silva, M. F., Tigier, H. A., *Physiol. Plant.*, 1983, 59:355—358.
- [9] Lee, T. T., Starratt, A. N., Jevnika, J. J., *Phytochemistry*, 1982, 21:517—523.
- [10] Sheen, S. J., *Plant Physiol.*, 1973, 51:839—844.
- [11] Stonier, T., Yang, H. M., *Plant Physiol.*, 1973, 51:391—395.
- [12] Lee, T. T., *Plant Physiol.*, 1977, 59:372—375.
- [13] Nicholsson, R., Hammerschmitt, R., *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1992, 30:369—389.
- [14] Gelinas, D. A., *Plant Physiol.*, 1973, 51:967—972.
- [15] Lee, T. T., Starrat, A. N., *Hormonal Regulation of Plant Growth and Development*, Agro. Botanical Publisher (India), 1988, 28—80.
- [16] Davey, J. E., Staden, J. V., Leeuw, G. T. N. D., *Physiol. Plant Pathol.*, 1981, 19:193—200.
- [17] Smigocki, A. C., Owens, L. O., *Plant Physiol.*, 1989, 91:801—811.
- [18] Saleh, A. N., *Physiol. Plant.*, 1981, 51:399—401.