

# 瑞香素对烟草青枯病的防治效果及其作用机理

杨亮<sup>1</sup> 韩松庭<sup>1</sup> 李吉秀<sup>1</sup> 王焱<sup>1</sup> 李石力<sup>1</sup> 江厚龙<sup>2</sup>  
陈少鹏<sup>2\*</sup> 丁伟<sup>1\*</sup>

(1. 西南大学植物保护学院, 重庆 400715; 2. 中国烟草总公司重庆市公司, 重庆 400023)

**摘要:** 为探究植物次生代谢产物瑞香素对烟草 *Nicotiana tabacum* 青枯病的防治效果及其诱导抗性作用, 通过室内和田间试验评价瑞香素对烟草青枯病的防治效果, 利用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 和实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 技术分析其对烟草体内酶活性、木质素含量、激素水平和抗性相关基因表达量的影响。结果表明, 叶面喷施瑞香素对烟草青枯病有较好的防治效果, 其中 2.85 mg/L 处理的防治效果最佳, 其次是 5.70 mg/L 和 11.40 mg/L 处理, 接种后 14 d 的相对防效依次为 66.93%、42.52% 和 48.03%。瑞香素处理可显著提高烟草体内过氧化物酶、苯丙氨酸解氨酶和多酚氧化酶的活性, 处理后 12 h 分别较对照显著提高了 3.56 倍、1.68 倍和 1.82 倍; 瑞香素处理后 4 d 和 7 d 烟草根部木质素含量分别较对照显著提高了 1.33 倍和 1.54 倍; 瑞香素处理后 6 h 烟草体内茉莉酸和脱落酸含量分别较对照显著提高了 35.98% 和 34.55%, 而水杨酸含量较对照显著降低了 25.56%。同时, 叶面喷施 2.85 mg/L 瑞香素后显著抑制了茉莉酸途径拮抗基因 *JAZ3* 的表达, 处理后 6 h 的表达量较对照下调了 9.19 倍, 同时显著促进病程相关基因 *PR1* 的表达。提前喷施 2.85 mg/L 瑞香素能有效控制田间烟草青枯病发生, 相对防效达到 52.22%~75.54%, 显著高于对照药剂苯并噻二唑的相对防效 33.50%~53.00%。表明瑞香素能提升烟草体内酶活性和根部木质素含量, 促进抗性基因表达, 对田间烟草青枯病有稳定的防治效果, 具有开发为防治烟草青枯病的植物激活剂的潜力。

**关键词:** 瑞香素; 烟草青枯病; 诱导抗性; 植物激活剂; 防治效果; 抗性基因

## Control efficacy of daphnetin against tobacco bacterial wilt and its action mechanism

Yang Liang<sup>1</sup> Han Songting<sup>1</sup> Li Jixiu<sup>1</sup> Wang Yao<sup>1</sup> Li Shili<sup>1</sup> Jiang Houlong<sup>2</sup>  
Chen Shaopeng<sup>2\*</sup> Ding Wei<sup>1\*</sup>

(1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Chongqing Branch of China National Tobacco Corporation, Chongqing 400023, China)

**Abstract:** To investigate the control efficacy of daphnetin on tobacco bacterial wilt and explore the induced systemic resistance of daphnetin on tobacco plants, the pot and field experiments were performed, respectively. Then, plant enzymes, lignin content and plant resistance genes under daphnetin treatment were evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC) and real-time quantitative PCR. The results showed that spray application of 2.85 mg/L daphnetin had the optimal control efficacy on tobacco bacterial wilt, with control efficacy of 66.93% at 14 days after inoculation with *Ralstonia solanacearum*, which was more efficient than 5.70 mg/L and 11.40 mg/L daphnetin treatment, with control efficacy as 42.52% and 48.03%, respectively. Furthermore, daphnetin could significantly induce

基金项目: 国家自然科学基金(32202338), 国家重点研发计划(2022YFD1700304), 重庆市烟草专卖局(公司)科技项目(B20221NY1312)

\* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: ndchenshaopeng@163.com, dwing818@163.com

收稿日期: 2023-06-14

the activity of plant enzymes, including peroxidase (POD), phenylalanin ammonialyase (PAL) and polyphenol oxidase (PPO), which were improved 3.56-, 1.68-, and 1.82- times compared with control treatment at 12 h after application. Lignin content of tobacco roots was significantly induced 1.33-fold and 1.54-fold at 4 d and 7 d after daphnetin application. Compared with the control at 6 h after daphnetin application, jasmonic acid and abscisic acid contents in tobacco were significantly increased by 35.98% and 34.55%, while salicylic acid content significantly decreased by 25.56%. Meanwhile, daphnetin could significantly down-regulate expression level of jasmonate ZIM-domain 3 (*JAZ3*) with 9.19-fold, and induce expression level of pathogenesis-related protein gene 1 (*PR1*). Control efficacy of 2.85 mg/L daphnetin treatment was 52.22%–75.54% in field conditions, significantly higher than benzothiadiazole treatment with 33.50%–53.00%. Therefore, application of daphnetin improved plant enzyme activity and root lignin content, inducing expression levels of plant resistance genes, and displayed stable field control efficacy on tobacco bacterial wilt. Thus daphnetin could be used as an alternative plant elicitor for controlling tobacco bacterial wilt.

**Key words:** daphnetin; tobacco bacterial wilt; induced resistance; plant elicitor; control efficacy; resistance gene

由青枯雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 侵染引起的青枯病属于土传细菌病害,该菌致病力强,寄主广泛,能侵染我国近百种植物,包括烟草 *Nicotiana tabacum*、番茄 *Solanum lycopersicum*、辣椒 *Capsicum annuum* 和马铃薯 *Solanum tuberosum* 等茄科作物,阻碍作物安全生产,造成严重的经济损失 (Mansfield et al., 2012; Jiang et al., 2017)。青枯雷尔氏菌通过根部伤口或自然孔口侵染进入植物的根部,在细胞间隙定殖,随后进入木质部导管中,大量繁殖并分泌胞外多糖,堵塞维管束水分运输,造成植物萎蔫死亡,具有潜伏期长、暴发迅速、危害严重以及难防难治等特点 (Genin & Denny, 2012; Zuluaga et al., 2013; Lowe-Power et al., 2018)。近年来,烟草青枯病在重庆、四川和云南等省市烟草种植区发生加重,严重制约着烟草产业的健康发展 (Li et al., 2017; Liu et al., 2017a)。目前,从抗病育种、生物防治和化学防治等方面对该病害的防控开展了大量研究,至今仍无理想的防控措施,该病已成为阻碍茄科作物生产可持续发展的瓶颈 (赵倩等, 2022)。因此,以植物免疫激活为导向,挖掘绿色、低毒、高效和安全的植物源天然激活剂并提升对青枯病的防控效果对于作物安全生产有重大意义 (赵显阳等, 2018; 郑雪芳等, 2018)。

植物免疫激活剂是指对病原菌没有直接抑制作用或活性很低,通过增强植物的免疫防御系统,进而促使植物产生对病原菌的系统诱导抗性的物质 (张越等, 2020)。近年来,大量研究聚焦筛选天然活性小分子化合物,通过激活植物系统免疫来抵御病虫害的发生 (Chen et al., 2018; Guo et al., 2020; Wang et al.,

2020)。香豆素类化合物作为一类具有苯骈 $\alpha$ -吡喃酮母核的天然化合物,主要通过苯丙烷类代谢途径合成,以游离态或糖苷的形式广泛存在于茄科、十字花科、伞型科和菊科等植物中 (Stringlis et al., 2019)。当植物受到病原菌侵染时,香豆素类化合物合成途径被迅速激活并产生大量活性物质,提升寄主的系统抗性并抑制病原菌生长,进而起到防治效果 (El Oirdi et al., 2010; Sun et al., 2014; 吴劲松, 2020)。香豆素类化合物具有抗菌活性、杀螨/杀虫活性、激活植物免疫、调控营养吸收和塑造根际微生物菌群等功能,在微生物-植物互动中发挥着重要作用 (Voges et al., 2019; 刘瑾林等, 2019; Stassen et al., 2021)。Beyer et al. (2019) 研究发现拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 对大豆锈病的非寄主抗性与香豆素类化合物东茛菪内酯的富集有关。Sun et al. (2014) 研究发现渐狭叶烟草 *Nicotiana attenuat* 中东茛菪内酯作为一种植保素能通过茉莉酸途径激活植物免疫系统,进而抵御链格孢菌 *Alternaria alternata* 的侵染。Cai et al. (2020) 研究发现4-甲氧基香豆素能促进烟草体内活性氧积累和酶活性升高,通过水杨酸途径激活植物免疫系统以抵御烟草花叶病毒病的危害。香豆素类化合物被证实具有激活植物免疫、抵御植物病害侵染的作用,但大部分研究主要集中在其对植物病毒和真菌病害的防控效果方面,对植物细菌病害的防控效果和作用机制仍不清楚。

瑞香素是一种简单香豆素类化合物,具有抗炎、抗氧化和抑制病原菌生长的作用,在医学领域研究应用较广泛,其农用生物活性也被逐渐关注 (Fylak-

takidou et al., 2004; Stringlis et al., 2019)。本课题组前期研究发现瑞香素对青枯雷尔氏菌有较好的抑制活性,能通过靶向抑制青枯雷尔氏菌胞外多糖合成和三型分泌系统表达来降低其致病力,进而有效防治青枯病的发生(Yang et al., 2018; 2021a, b)。但关于低浓度瑞香素在促进植物系统抗性、抵御青枯雷尔氏菌侵染的研究报道极少。本研究采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)、实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)和植物酶活检测等手段评价瑞香素对烟草防御酶活性、木质素含量、激素含量和抗性基因表达量的影响,明确瑞香素对烟草青枯病的防控效果及其激活植物系统抗性的作用机制,以期将瑞香素开发为植物激活剂用于土传病害防控提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试烟草和菌株:烟草品种为云烟87,由玉溪中烟种子有限责任公司提供,易感青枯病,种于西南大学植物保护学院温室内,于16 L:8 D、昼夜温度28 ℃/20 ℃、相对湿度60%条件下培养至4叶期供试。青枯雷尔氏菌菌株CQPS-1由西南大学天然产物农药研究室从重庆市彭水县的发病烟株上分离获得,于-80 ℃保存备用(Liu et al., 2017b)。

供试培养基:营养肉汤(nutrient broth, NB)液体培养基成分为胰蛋白胨10 g、酵母提取物1 g、酪蛋白水解物1 g,去离子水定容至1 L, pH 7.0;营养琼脂(nutrient agar, NA)固体培养基为NB液体培养基中加入15 g琼脂粉和5 g葡萄糖。

试剂及仪器:98%瑞香素(daphnetin),上海源叶生物科技有限公司;过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、苯丙氨酸解氨酶(phenylalanin ammonialyase, PAL)和多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)检测试剂盒和木质素检测试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;SteadyPure通用型RNA提取试剂盒、Evo M-MLV反转录预混试剂盒和SYBR® Green Pro Taq HS预混qPCR试剂盒,湖南艾科瑞生物工程有限公司;其余试剂均为国产分析纯。UV1000紫外分光光度计,上海天美科学仪器有限公司;Multiskan GO全波长酶标仪,美国Thermo公司;Allegra X-30R台式离心机,美国Beckman Coulte公司;Mini-Sub-Cell GT电泳仪、T100™ Thermal Cycler PCR扩增仪、CFX96™ Real-Time System RT-qPCR仪,美国Bio-Rad公司;

1260 Infinity II高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;3WBD-16型背负式电动喷雾器,台州市路桥区农意喷雾器厂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 瑞香素对烟草青枯病的室内防治效果测定

用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解瑞香素并梯度稀释配制成0.36、0.71、1.43、2.85、5.70、11.40和22.80 mg/mL共7个浓度。取保存的青枯雷尔氏菌菌株CQPS-1,在NA固体平板上于28 ℃划线培养2 d,挑取单菌落至NB液体培养基中,于28 ℃、180 r/min条件下过夜培养至 $A_{600\text{nm}}$ 为1.0,再稀释10倍,制成终浓度约为 $10^8$  CFU/mL的菌悬液,保存备用。取生长40 d的4叶期云烟87幼苗,分别用0.36、0.71、1.43、2.85、5.70、11.40和22.80 mg/L瑞香素喷施叶面,每株喷施3 mL,每个浓度处理3次重复,每个重复12株烟苗。第1次喷药后间隔3 d再喷施1次药剂,共施药2次;以喷施2次等量0.1% DMSO处理作为对照。第2次喷药后3 d采用无伤根灌根方式接种 $10^8$  CFU/mL青枯雷尔氏菌悬液,每株接种10 mL。将烟苗放置在28 ℃恒温培养室培养,光照和湿度自然,从接种后第2天开始,每天同一时间调查青枯病发生情况,记录发病株数并计算病情指数。室内烟草青枯病分级标准:0级,全株没有发病症状;1级,1%~25%叶片萎蔫;2级,26%~50%叶片萎蔫;3级,51%~75%叶片萎蔫;4级,全株萎蔫。病情指数= $\sum$ (发病株数×该病级代表值)/(调查总株数×最高级代表值),相对防效=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数×100%(Han et al., 2021)。

为明确瑞香素对青枯菌生长的影响,按上述方法配制含不同浓度瑞香素的NB液体培养基,分别为0.36、0.71、1.43、2.85、5.70、11.40和22.80 mg/L共7个浓度。将上述制备好的青枯菌菌悬液稀释10倍,使其浓度为 $10^9$  CFU/mL,按体积比0.5%将青枯菌加入含瑞香素NB液体培养基中,以不接菌的NB液体培养基为对照,于28 ℃、180 r/min条件下培养24 h,利用全波长酶标仪检测培养液的吸光值 $A_{600\text{nm}}$ ,比较各处理的青枯菌生长情况。每个处理3次重复。

#### 1.2.2 瑞香素处理后烟草体内酶活性的测定

为探究瑞香素对烟草体内防御酶活性的影响,取生长40 d的4叶期云烟87幼苗,用2.85 mg/L瑞香素均匀喷施在叶片背面和正面,每株喷施3 mL,以喷施等量0.1% DMSO处理作为对照。喷施后0、6、12和24 h每个处理分别随机选取9株烟苗,收集同

一位置的叶片组织于无酶离心管中,并迅速置于液氮中保存,每个处理3个重复,每个重复3株烟苗。POD、SOD、PAL和PPO的提取及测定参照高俊凤(2006)方法并略有改动:精确称取保存于液氮中的烟草叶片2.0 g,置于预冷研钵中,加入液氮研磨至粉末状,迅速分装到4个无酶管中,分别向无酶管中加入1 mL对应的酶提取液并充分混匀,于4℃以8 000×g离心10 min,上清液即为粗酶液。

POD活性采用愈创木酚法测定,取0.2 mL粗酶液,加入质量浓度为0.3%的愈创木酚溶液1 mL,测量反应体系在波长470 nm处的吸光值 $A_{470\text{ nm}}$ ,每分钟读取1次数值,以每分钟 $A_{470\text{ nm}}$ 变化0.01为1个酶活单位。试验设3次技术重复。

SOD活性采用氮蓝四唑光还原法测定,取0.2 mL粗酶液,再依次加入130 mmol/L甲硫氨酸0.6 mL、750  $\mu\text{mol/L}$ 氮蓝四唑0.6 mL、100  $\mu\text{mol/L}$ 乙二胺四乙酸二钠0.6 mL、20  $\mu\text{mol/L}$ 核黄素0.6 mL、0.05 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.8)3 mL和蒸馏水1 mL,在4 000 lx条件下光照15 min,测定反应体系在波长560 nm处的吸光值 $A_{560\text{ nm}}$ ,计算SOD活性。SOD活性=(光照下 $A_{560\text{ nm}}$ -样品 $A_{560\text{ nm}}$ )/(光照下 $A_{560\text{ nm}}$ ×0.5×样品质量×测定酶液体积×时间)。试验设3次技术重复。

PAL活性测定参照高俊凤(2006)方法,取1 mL粗酶液,加入0.02 mol/L L-苯丙氨酸1 mL和磷酸缓冲液1 mL,40℃水浴30 min,测定反应体系在波长290 nm处的吸光值 $A_{290\text{ nm}}$ ,以每分钟 $A_{290\text{ nm}}$ 变化0.01作为1个酶活单位。试验设3次技术重复。

PPO活性测定参照高俊凤(2006)方法,取0.5 mL粗酶液,加入磷酸缓冲液1.5 mL和0.1 mol/L邻苯二酚1 mL,37℃水浴10 min,测定反应体系在波长410 nm处的吸光值 $A_{410\text{ nm}}$ ,以每分钟 $A_{410\text{ nm}}$ 变化0.01作为1个酶活单位。试验设3次技术重复。

### 1.2.3 瑞香素处理后烟草根系木质素含量的测定

瑞香素喷施烟草叶片的方法同1.2.2,喷雾处理后0、1、2、3、4、5、6和7 d每个处理分别随机取3株烟草,收集根系组织,置于80℃烘干至恒重,研磨后过孔径0.425 mm筛,称取5 mg于1.5 mL离心管中备用。利用木质素检测试剂盒按照说明书进行木质素含量的测定。在装有样品的离心管中加入40%乙酰溴-冰乙酸溶液500  $\mu\text{L}$ 和高氯酸20  $\mu\text{L}$ ,将样品于80℃水浴40 min,轻柔振荡。待样品冷却后加入2 mol/L NaOH 20 mL并混匀,以8 000×g离心10 min,取上清液20  $\mu\text{L}$ 于新离心管中,加入980 mL冰乙酸。以不加提取样品液的处理为空白对照,在波长

280 nm处记录吸光值 $A_{280\text{ nm}}$ 。每个处理3次重复。根系木质素含量= $\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{检测液}} \div (V_{\text{上清液}} \times m \div V_{\text{乙酰化}}) = 2.184 \times \Delta A / m$ ,其中 $\Delta A$ =处理吸光值 $A_1$ -空白对照吸光值 $A_0$ ; $\epsilon$ 为木质素消光系数; $d$ 为比色皿光径; $V_{\text{检测液}}$ 为检测液体积; $V_{\text{上清液}}$ 为上清液体积; $m$ 为样本质量; $V_{\text{乙酰化}}$ 为乙酰化反应体系体积。

### 1.2.4 瑞香素处理后烟草体内激素含量的测定

为探究瑞香素对烟草激素水平的影响,采用HPLC技术检测水杨酸、茉莉酸和脱落酸的含量。瑞香素喷施烟草叶片的方法同1.2.2,收集处理后6 h和12 h烟叶样品,加入液氮速冻并研磨粉碎待测。精确称取0.2 g烟叶样品,加入2 mmol/L盐酸1 mL萃取2次,超声提取30 min,以8 000×g离心10 min,收集上清液,在氮吹仪上冰浴吹干,加入0.5 mL乙腈溶液进行溶解,过0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜后进行茉莉酸含量的HPLC检测,采用C18反相色谱柱(长250 mm×直径4.6 mm,填充物粒径5  $\mu\text{m}$ ),流动相A为乙腈,流动相B为1%甲酸水溶液,两者体积比为45:55,进样量10  $\mu\text{L}$ ,流速1 mL/min。另外精确称取0.1 g烟叶样品,加入预冷70%甲醇1 mL过夜浸提,以8 000×g离心10 min,收集上清液,在氮吹仪上冰浴吹干,加入1 mL甲醇溶液进行溶解,过0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜后进行水杨酸含量的HPLC检测,采用C18反相色谱柱(长250 mm×直径4.6 mm,填充物粒径5  $\mu\text{m}$ ),流动相A为甲醇,流动相B为0.1%乙酸水溶液,两者体积比为35:65,进样量10  $\mu\text{L}$ ,流速0.8 mL/min。再精确称取0.2 g烟叶样品,用1 mL预冷的70%甲醇过夜浸提,12 000×g离心10 min,收集上清液于40℃减压蒸发后,再采用等体积的石油醚、三乙胺和乙酸乙酯溶液进行萃取,并在40℃减压蒸发至干,加入1 mL甲醇溶液进行溶解,过0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜后进行脱落酸含量的HPLC检测,采用C18反相色谱柱(长150 mm×直径4.6 mm,填充物粒径5  $\mu\text{m}$ ),流动相A为甲醇,流动相B为0.1%乙酸水溶液,两者体积比为55:45,进样量20  $\mu\text{L}$ ,流速0.8 mL/min。根据出峰时间和峰面积计算各激素的含量,每个处理3次重复。

### 1.2.5 瑞香素处理后烟草体内抗性基因表达量的测定

瑞香素处理方法和取样方法同1.2.2,经液氮冷冻后研磨成粉末,利用SteadyPure通用型RNA提取试剂盒参照说明书进行总RNA的提取。用50  $\mu\text{L}$  RNase Free ddH<sub>2</sub>O溶解提取的总RNA,利用全波长酶标仪检测总RNA浓度,利用凝胶电泳检测RNA质量。浓度和质量均合格的总RNA采用Evo M-

MLV 反转录预混试剂盒合成单链 cDNA。参考 Wang et al. (2023) 设计烟草相关抗性基因 *NtEFE26*、*NtNPR1*、*NtJAZ3*、*NtPR1* 以及 *NtEF* 的引物, 分别为 *NtEFE26*-F (5'-CGGACGCTGGTGGCATAAT-3') / *NtEFE26*-R (5'-CAACAAGAGCTGGTGCTGGATA-3')、*NtNPR1*-F (5'-GGCCTGGCTAAACTCCTTTTT-C-3') / *NtNPR1*-R (5'-AGCCGATTCAAGTGCTCCTC-3')、*NtJAZ3*-F (5'-TGAAAACAAGGTGTGGCTTGG-3') / *NtJAZ3*-R (5'-CCTACACAAAAGGGCACTGAA-3')、*NtPR1*-F (5'-ATGGTCAATACGGCGAAAC-3') / *NtPR1*-R (5'-CCTAGCACATCCAACACGAA-3')、*NtEF*-F (5'-GAAAGACTGCTTATTGACTCACC-3') / *NtEF*-R (5'-CCACACGACCAACAGGGACA-3'), 均委托深圳华大基因科技服务有限公司合成。以 *NtEF* 为参考基因, 利用 SYBR® Green Pro Taq HS 预混 qPCR 试剂盒进行目的基因的定量检测。20  $\mu$ L 反应体系: 2 $\times$ SYBR Green Pro Taq HS Premix 10  $\mu$ L、正反向引物各 1  $\mu$ L、cDNA 模板 2  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu$ L。反应程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 56  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算目的基因的相对表达量 (Livak & Schmittgen, 2001)。

### 1.2.6 瑞香素对烟草青枯病的田间防治效果测定

于 2019 年在贵州省遵义市正安县市坪乡井水台村烟草青枯病常年重发地进行试验, 试验地面积约 1 200 m<sup>2</sup>, 海拔 1 201 m, 地势平整, 土壤 pH 为 5.1。烤烟品种为云烟 87, 采用漂浮育苗。垄体高度 30 cm,

行距 110 cm $\times$ 株距 55 cm, 每个小区长 10 m、宽 7 m, 均按大田相关标准进行统一管理。试验共设 3 个处理, 即 2.85 mg/L 瑞香素处理、62.5 mg/L 苯并噻二唑 (benzothiadiazole, BTH) 药剂对照以及清水空白对照, 每个处理 3 次重复, 共 9 个小区, 随机区组分布, 每个小区约 100 株, 设置保护行。在烟草团棵期 (5 月 28 日)、旺长期 (6 月 7 日) 使用电动喷雾器进行叶面喷施, 每个小区喷施 3 L。烟草青枯病发病等级按照《烟草病虫害分级及调查方法》(GB/23222—2008) 进行调查, 在发病初期开始调查, 每隔 15 d 调查 1 次, 共调查 5 次。计算病情指数和相对防效。

### 1.3 数据分析

利用 SPSS 16.0 统计软件对试验数据进行方差分析, 应用 Duncan 氏新复极差法和 Student's *t* 检验法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 瑞香素对烟草青枯病的室内防治效果

与对照相比, 2.85 mg/L 瑞香素对烟草青枯病的防治效果最佳, 能够推迟 4 d 发病, 在接种青枯雷尔氏菌后 14 d, 2.85、5.70 和 11.40 mg/L 瑞香素处理的烟草病情指数分别为 1.17、2.03 和 1.83, 均低于对照处理的 3.53 (图 1-A), 相对防效分别为 66.93%、42.52% 和 48.03%, 显著高于其他浓度处理 (图 1-B)。同时, 0.36~11.40 mg/L 瑞香素处理不影响青枯雷尔氏菌的正常生长 (图 2), 表明低浓度瑞香素并不是通过抑制青枯雷尔氏菌生长来有效控制烟草青枯病的发生。

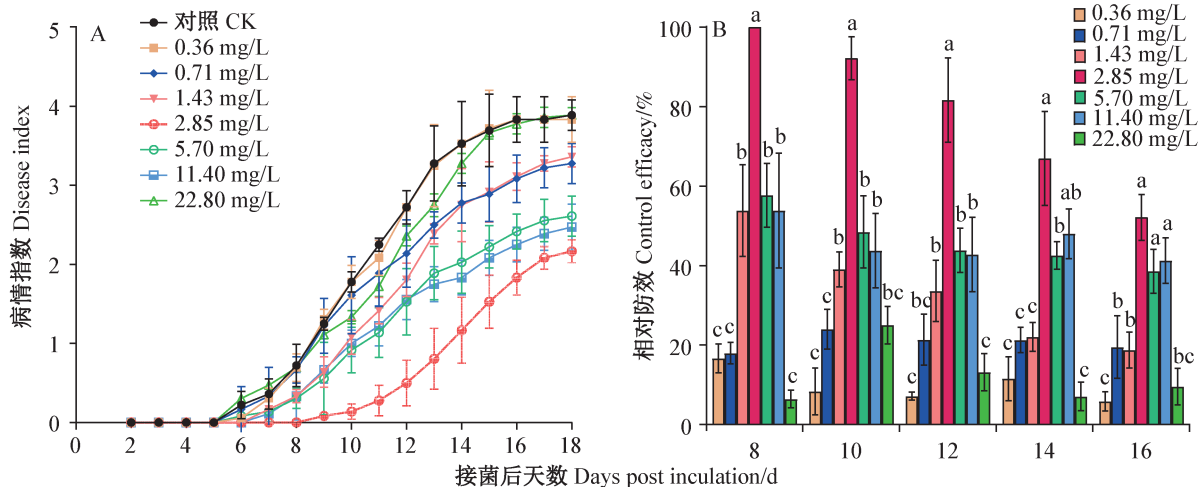


图 1 不同浓度瑞香素对烟草青枯病的防治效果

Fig. 1 Control efficacy of different concentration of daphnetin on tobacco bacteria wilt

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差。不同小写字母表示同一时间点不同处理间经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ( $P < 0.05$ )。Data are mean $\pm$ SD. Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments at the same time by Duncan's new multiple range test ( $P < 0.05$ ).

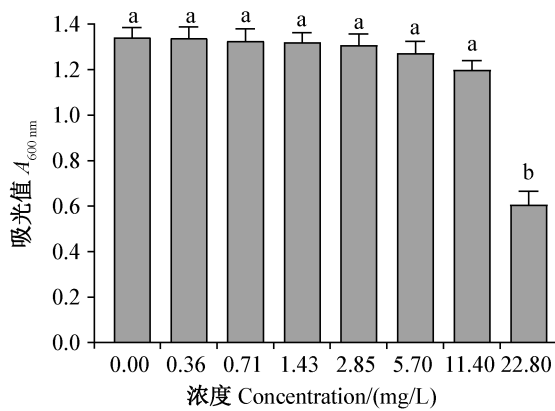


图2 不同浓度瑞香素对烟草青枯病菌生长的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of daphnetin on growth of *Ralstonia solanacearum*

图中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著( $P<0.05$ )。Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ( $P<0.05$ ).

## 2.2 瑞香素对烟草体内防御酶活性的影响

叶面喷施瑞香素能显著提升烟草体内防御酶活

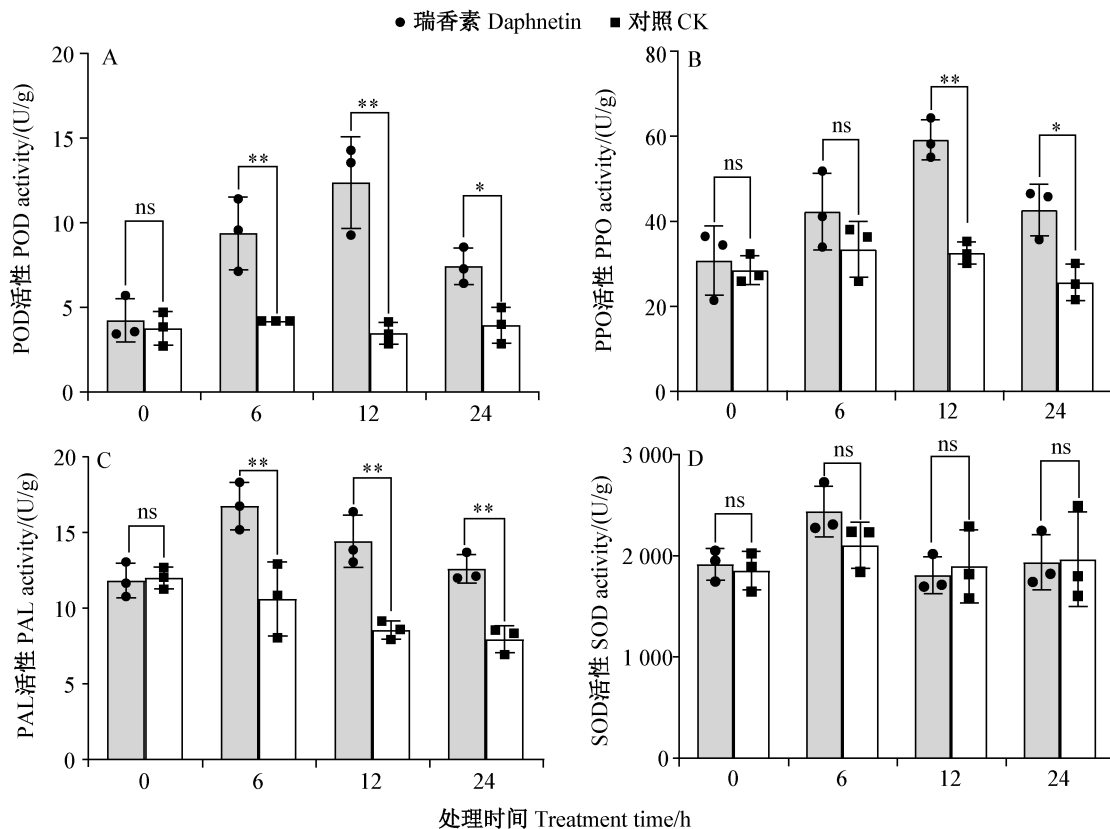


图3 瑞香素对烟草体内防御酶活性的影响

Fig. 3 Effect of daphnetin on defensive enzymes activity of tobacco plant

图中数据为平均数±标准差。\*和\*\*分别表示处理组和对照组之间经Student's *t*检验法检验差异显著( $P<0.05$ 和 $P<0.01$ ), ns表示无显著差异。Data are mean±SD. \* or \*\* indicates significant difference between the treatment group and control group by Student's *t* test ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), ns indicates no significant difference.

性,各酶活性均呈现先上升后下降的趋势,但各酶活性达到峰值的时间不同,其中,POD和PPO的活性均在处理后12 h达到峰值(图3-A~B),PAL和SOD的活性均在处理后6 h达到峰值(图3-C~D)。瑞香素处理后12 h烟草体内POD、PPO和PAL的活性分别较对照显著提高了3.56倍、1.82倍和1.68倍(图3)。

## 2.3 瑞香素对烟草根部木质素含量的影响

瑞香素处理后1~3 d,烟草根部木质素含量无明显差异;处理后4、5、6和7 d,根部木质素含量逐渐提升,分别为16.44、20.14、21.15和23.82 mg/g,显著高于对照,分别较对照显著提高了1.33倍、1.39倍、1.44倍和1.54倍(图4)。

## 2.4 瑞香素对烟草体内激素含量的影响

与对照相比,叶面喷施瑞香素能显著提升烟草中茉莉酸含量,处理后6 h和12 h分别较对照显著提升了35.98%和39.32%(图5-A);叶面喷施瑞香素后6 h即可显著抑制烟草中水杨酸含量,较对照显著降低了25.56%(图5-B);但却显著提升了脱落酸含量,较对照显著提高了34.55%(图5-C)。

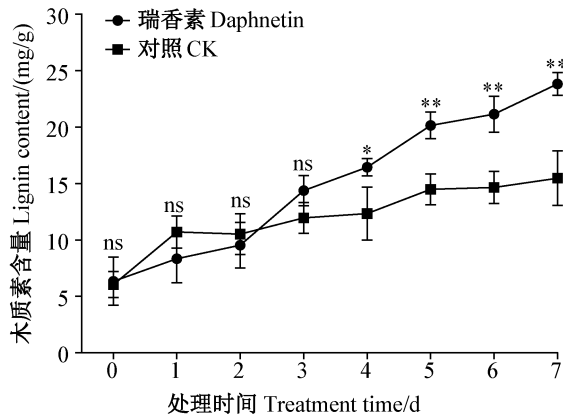


图4 瑞香素对烟株根部木质素含量的影响

Fig. 4 Effect of daphnetin on the lignin content in tobacco roots

图中数据为平均数±标准差。\*和\*\*分别表示处理组和对照组之间经 Student's *t* 检验法检验差异显著 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ), ns 表示无显著差异。Data are mean±SD. \* or \*\* indicates significant difference between the treatment group and control group by Student's *t* test ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), ns indicates no significant difference.

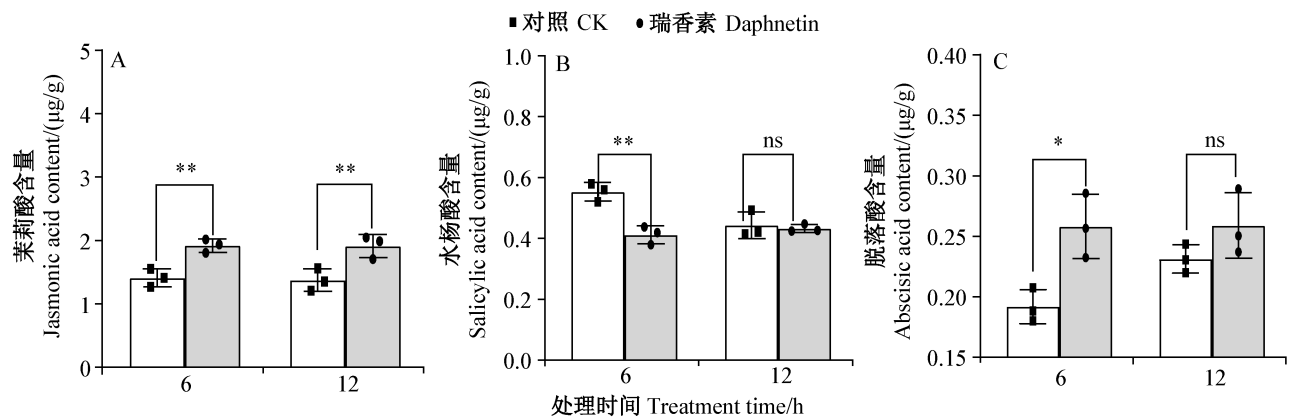


图5 瑞香素对烟草激素含量的影响

Fig. 5 Effect of daphnetin on the hormones content of tobacco plant

图中数据为平均数±标准差。\*和\*\*分别表示处理组和对照组之间经 Student's *t* 检验法检验差异显著 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ), ns 表示无显著差异。Data are mean±SD. \* or \*\* indicates significant difference between the treatment group and control group by Student's *t* test ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), ns indicates no significant difference.

### 3 讨论

植物激活剂能够在不影响病原菌生长的条件下,通过激活植物的免疫防御系统达到有效控制病害发生的效果(De Kesel et al., 2021)。商品化的外源化学小分子植物激活剂主要有 BTH、2,6-二氯异烟酸(2,6-dichloroisonicotinic acid, INA)、噻酰菌胺(tiadinil, TDL)和异噻菌胺等(张越等, 2020)。植物源次生代谢产物是筛选植物激活剂的重要资源库,如 N-羟基哌啶酸能够激活植物系统获得抗性并在植物体内转运,同时通过提高植物病程相关基因表

### 2.5 瑞香素对烟草体内抗性基因表达的影响

瑞香素处理能显著抑制茉莉酸途径拮抗基因 *JAZ3* 的表达量,处理后 10 min 和 6 h 分别较对照下调了 31.59 倍和 9.19 倍(图 6-A)。同时,瑞香素处理显著提高了 *PR1* 基因的表达量,处理后 6、12 和 24 h 分别较对照显著提高了 14.60 倍、20.34 倍和 27.53 倍(图 6-B)。瑞香素处理也能抑制 *NPR1* 基因的表达量,较对照下调了 2.23~3.65 倍(图 6-C);但对乙烯合成基因 *EF26* 的表达量无显著影响(图 6-D)。

### 2.6 瑞香素对烟草青枯病的田间防控效果

叶面喷施瑞香素和 BTH 后均能有效减缓烟草青枯病的发生。在发病高峰(7月30日),2.85 mg/L 瑞香素和 62.5 mg/L BTH 处理的烟苗病情指数分别为 2.75 和 4.79,显著低于对照的病情指数 8.09(图 7-A)。2.85 mg/L 瑞香素处理对烟草青枯病的相对防效为 52.22%~75.54%,显著高于对照药剂 BTH 处理的相对防效 33.50%~53.00%(图 7-B)。

达和激活相关代谢途径来抵御细菌病害的侵染(Chen et al., 2018);小檗碱通过激活植物体内防御酶活性和病程相关基因表达来有效控制烟草花叶病的发生(Guo et al., 2020);香豆素类化合物作为一种重要的次生代谢产物,被证实能有效抵御烟草灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 以及链格孢菌等病原真菌的侵染(El Oirdi et al., 2010; Sun et al., 2014)。本研究结果表明,叶面喷施瑞香素能有效防控烟草青枯病的发生,显著提高烟草体内 PPO、PAL 和 POD 的活性,增加烟草根部木质素含量。其中, PPO 是植物响应生物和非生物胁迫的重要酶,参与植物防御、质体氢

化水平调节和苯丙烷途径等(Zhang & Sun, 2021)。PAL是苯丙氨酸代谢的关键酶,参与植保素、木质素和胼胝质等物质的合成(Dong & Lin, 2021)。木质素是由植物体内木质素单体形成的重要酚类物质,木质素单体可被POD氧化形成木质素单体自由基,自由基相互结合形成稳定的木质素聚合物,使细胞和次生细胞壁具有一定的强度和刚度,从而抵御病

原菌的入侵(Chou et al., 2018)。Cai et al.(2020)研究发现4-甲氧基香豆素能提高烟草中SOD和POD活性。Saleh & Madany(2015)研究结果表明香豆素处理能显著提升植物体内激素含量和POD活性。与上述研究结果相似,本研究证实瑞香素能够增强烟草体内的抗病相关酶活性,激活其免疫系统,有效控制青枯病的发生,是一种潜在的植物激活剂。

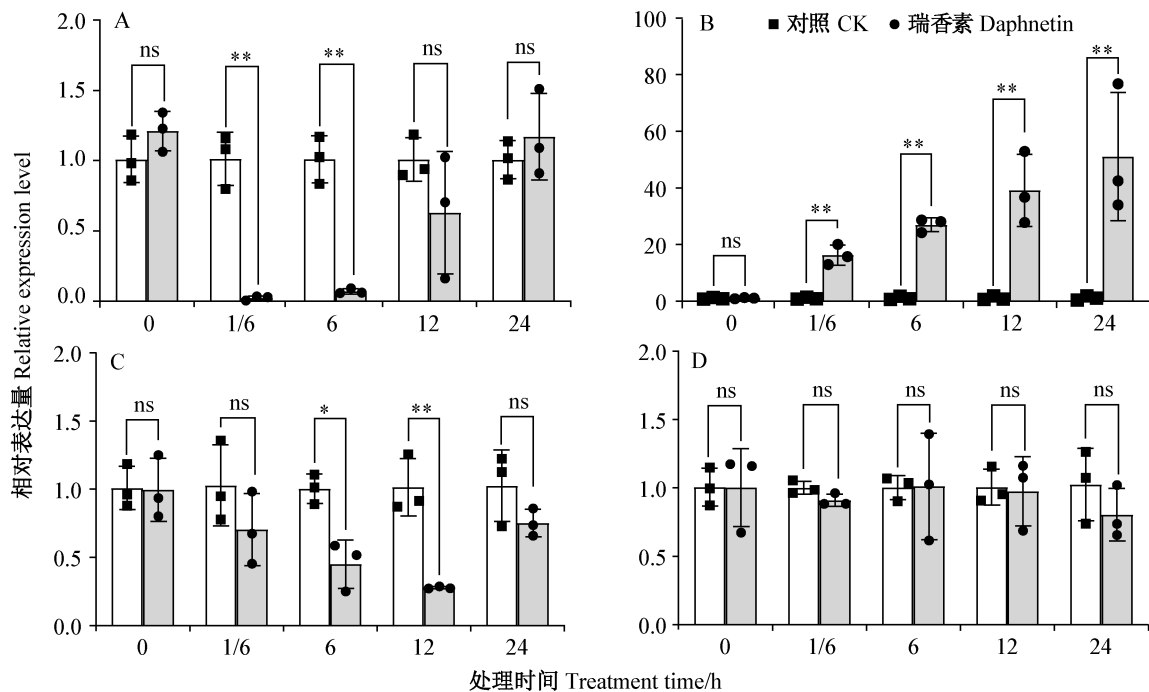


图6 瑞香素对烟草抗性基因 *JAZ3*(A)、*PRI*(B)、*NPR1*(C)和 *EF26*(D)相对表达量的影响

Fig. 6 Effects of daphnetin on relative expression levels of *JAZ3* (A), *PRI* (B), *NPR1* (C) and *EF26* (D) genes in tobacco plant. Data are mean±SD. \* or \*\* indicates significant difference between the treatment group and control group by Student's *t* test ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), ns indicates no significant difference.

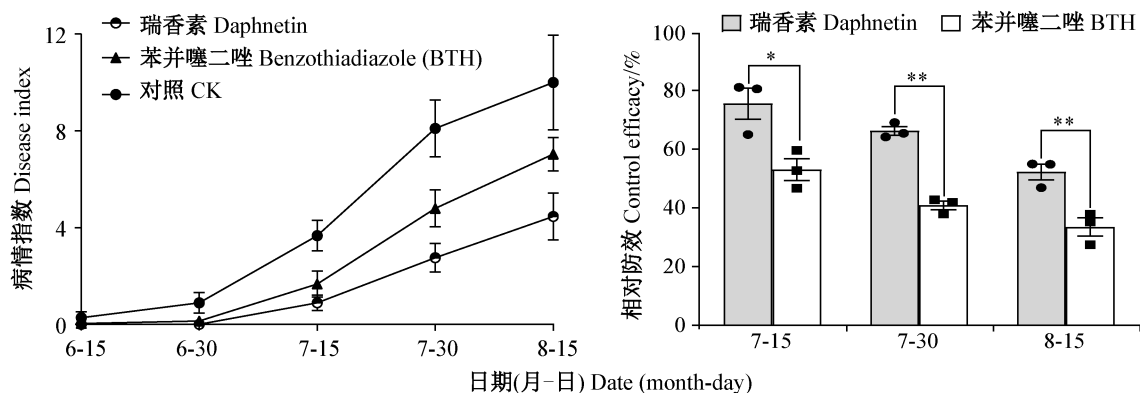


图7 叶面喷施瑞香素对烟草青枯病的田间防治效果

Fig. 7 Control efficacy of daphnetin on tobacco bacterial wilt in field condition

图中数据为平均数±标准差。\*和\*\*分别表示处理组和对照组之间经 Student's *t* 检验法检验差异显著 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ )。Data are mean±SD. \* or \*\* indicates significant difference between the treatment group and control group by Student's *t* test ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ).

香豆素类化合物参与植物铁元素吸收和免疫防

御系统,在植物-病原菌互作及植物-微生物互作中



发挥着信号分子作用(Stringlis et al., 2019; Stassen et al., 2021)。这类化合物被证实可能通过茉莉酸途径来激活植物的防卫反应, 抵御病原真菌和病毒的侵染(Sun et al., 2014)。链格孢菌侵染渐狭叶烟草能诱导其产生东莨菪内酯和东莨菪苷, 这2种化合物在体外具有抑制链格孢菌生长的中等活性, 其受茉莉酸信号系统调控(Sun et al., 2014; Li & Wu, 2016; 吴劲松, 2020)。本研究发现叶面喷施瑞香素能显著抑制烟草茉莉酸途径拮抗基因*JAZ3*的表达, 促进病程相关基因*PR1*的表达, 从而提升了烟草对青枯菌的抵抗力。病程相关蛋白是植物响应生物胁迫诱导的一类蛋白, 在抵御青枯雷尔氏菌侵染过程中发挥着重要作用(Liu et al., 2019)。病原物入侵、生物胁迫和超敏反应等都会诱导*PR1*基因的表达, 刺激病程相关蛋白的产生, 因此*PR1*是植物系统获得抗性的指示基因。病程相关基因非表达蛋白是水杨酸信号途径的转录调控因子, 可有效调控水杨酸介导的系统获得抗性的启动(Chen et al., 2021)。JAZ(jasmonate ZIM-domain)蛋白是茉莉酸调控通路的因子, JAZ蛋白结合MYC2转录因子, 促进茉莉酸开启应答反应来调控茉莉酸信号的传导, 从而增强对生物胁迫的抗性(李永华等, 2021)。JAZ3基因与诱导系统抗性相关, 是茉莉酸介导的防卫反应的标志基因。本研究发现瑞香素处理后烟草体内*PR1*基因的表达量被显著诱导, 同时茉莉酸途径拮抗基因*JAZ3*和*NPR1*的表达量被显著抑制, 对乙烯合成酶基因*EF26*无显著影响, 这促进了烟草茉莉酸含量显著升高, 因此推测瑞香素处理下烟草对青枯雷尔氏菌侵染的抗性应答类似于系统诱导抗性, 表明瑞香素可能通过茉莉酸信号途径激活植物的免疫防御系统, 但具体作用机制仍需进一步研究。

综上所述, 瑞香素叶面喷施可有效防控烟草青枯病, 显著增强植物体内酶活性, 促进根部木质素含量, 提升烟草体内茉莉酸含量并促进抗病相关基因表达, 激活烟株的免疫防御系统, 有效延缓烟草青枯病的发生。因此, 瑞香素是一种潜在的、有效的植物激活剂, 具有防治植物细菌病害的潜力。

### 参 考 文 献 (References)

- Beyer SF, Beesley A, Rohmann PFW, Schultheiss H, Conrath U, Langenbach CJG. 2019. The *Arabidopsis* non-host defence-associated coumarin scopoletin protects soybean from Asian soybean rust. *The Plant Journal*, 99(3): 397–413
- Cai L, Zhang W, Jia HY, Feng H, Wei XF, Chen HT, Wang DB, Xue Y, Sun XC. 2020. Plant-derived compounds: a potential source of drugs against tobacco mosaic virus. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 169: 104589
- Chen J, Zhang JY, Kong MM, Freeman A, Chen H, Liu FQ. 2021. More stories to tell: nonexpressor of pathogenesis-related genes1, a salicylic acid receptor. *Plant, Cell & Environment*, 44(6): 1716–1727
- Chen YC, Holmes EC, Rajniak J, Kim JG, Tang S, Fischer CR, Mudgett MB, Sattely ES. 2018. *N*-hydroxy-pipecolic acid is a mobile metabolite that induces systemic disease resistance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(21): 4920–4929
- Chou EY, Schuetz M, Hoffmann N, Watanabe Y, Sibout R, Samuels AL. 2018. Distribution, mobility, and anchoring of lignin-related oxidative enzymes in *Arabidopsis* secondary cell walls. *Journal of Experimental Botany*, 69(8): 1849–1859
- De Kesel J, Conrath U, Flors V, Luna E, Mageroy MH, Mauch-Mani B, Pastor V, Pozo MJ, Pieterse CMJ, Ton J, et al. 2021. The induced resistance lexicon: do's and don'ts. *Trends in Plant Science*, 26(7): 685–691
- Dong NQ, Lin HX. 2021. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1): 180–209
- El Oirdi M, Trapani A, Bouarab K. 2010. The nature of tobacco resistance against *Botrytis cinerea* depends on the infection structures of the pathogen. *Environmental Microbiology*, 12(1): 239–253
- Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaides DN. 2004. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Current Pharmaceutical Design*, 10(30): 3813–3833
- Gao JF. 2006. *Experimental guidance for plant physiology*. Beijing: Higher Education Press, pp. 201–221 (in Chinese) [高俊凤. 2006. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, pp. 201–221]
- Genin S, Denny TP. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annual Review of Phytopathology*, 50: 67–89
- Guo WH, Yan H, Ren XY, Tang RR, Sun YB, Wang Y, Feng JT. 2020. Berberine induces resistance against tobacco mosaic virus in tobacco. *Pest Management Science*, 76(5): 1804–1813
- Han ST, Yang L, Wang Y, Ran YA, Li SL, Ding W. 2021. Preliminary studies on the antibacterial mechanism of a new plant-derived compound, 7-methoxycoumarin, against *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Microbiology*, 12: 697911
- Jiang GF, Wei Z, Xu J, Chen HL, Zhang Y, She XM, Macho AP, Ding W, Liao BS. 2017. Bacterial wilt in China: history, current status, and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1549
- Li J, Wu J. 2016. Scopolin, a glycoside form of the phytoalexin scopoletin, is likely involved in the resistance of *Nicotiana attenuata* against *Alternaria alternata*. *Journal of Plant Pathology*, 98(3): 641–644
- Li SL, Liu YQ, Wang J, Yang L, Zhang ST, Xu C, Ding W. 2017. Soil acidification aggravates the occurrence of bacterial wilt in South China. *Frontiers in Microbiology*, 8: 703
- Li YH, Xiao NW, Liu YB. 2021. Mechanisms of repression and termination of jasmonate signaling in plant defense. *Journal of Plant Protection*, 48(3): 563–569 (in Chinese) [李永华, 肖能文, 刘勇

- 波. 2021. 植物防御中茉莉酸信号通路抑制与终止的作用机制. 植物保护学报, 48(3): 563–569]
- Liu JL, Zhou H, Guo FY, Ding W. 2019. Research advances in pesticidal activities of coumarin derivatives and acaricidal mechanism of scopoletin. Chinese Journal of Pesticide Science, 21 (S1): 692–708 (in Chinese) [刘瑾林, 周红, 郭富友, 丁伟. 2019. 香豆素类化合物的农药活性及东莨菪内酯杀螨作用机理研究进展. 农药学报, 21(S1): 692–708]
- Liu Y, Liu QP, Tang YM, Ding W. 2019. NtPR1a regulates resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Nicotiana tabacum* via activating the defense-related genes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 508(3): 940–945
- Liu Y, Tang YM, Qin XY, Yang L, Jiang GF, Li SL, Ding W. 2017b. Genome sequencing of *Ralstonia solanacearum* CQPS-1, a phylo-type I strain collected from a highland area with continuous cropping of tobacco. Frontiers in Microbiology, 8: 974
- Liu Y, Wu DS, Liu QP, Zhang ST, Tang YM, Jiang GF, Li SL, Ding W. 2017a. The sequevar distribution of *Ralstonia solanacearum* in tobacco-growing zones of China is structured by elevation. European Journal of Plant Pathology, 147(3): 541–551
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Methods, 25(4): 402–408
- Lowe-Power TM, Khokhani D, Allen C. 2018. How *Ralstonia solanacearum* exploits and thrives in the flowing plant xylem environment. Trends in Microbiology, 26(11): 929–942
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, et al. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology, 13(6): 614–629
- Saleh AM, Madany MMY. 2015. Coumarin pretreatment alleviates salinity stress in wheat seedlings. Plant Physiology and Biochemistry, 88: 27–35
- Stassen MJJ, Hsu SH, Pieterse CMJ, Stringlis IA. 2021. Coumarin communication along the microbiome-root-shoot axis. Trends in Plant Science, 26(2): 169–183
- Stringlis IA, de Jonge R, Pieterse CMJ. 2019. The age of coumarins in plant-microbe interactions. Plant and Cell Physiology, 60(7): 1405–1419
- Sun HH, Wang L, Zhang BQ, Ma JH, Hettenhausen C, Cao GY, Sun GL, Wu JQ, Wu JS. 2014. Scopoletin is a phytoalexin against *Alternaria alternata* in wild tobacco dependent on jasmonate signalling. Journal of Experimental Botany, 65(15): 4305–4315
- Voges MJEEE, Bai Y, Schulze-Lefert P, Sattely ES. 2019. Plant-derived coumarins shape the composition of an *Arabidopsis* synthetic root microbiome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116(25): 12558–12565
- Wang WW, Zhou PY, Mo XC, Hu LF, Jin N, Chen X, Yu ZX, Meng JP, Erb M, Shang ZC, et al. 2020. Induction of defense in cereals by 4-fluorophenoxyacetic acid suppresses insect pest populations and increases crop yields in the field. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 117 (22): 12017–12028
- Wang Y, Yang L, Zhou X, Wang Y, Liang YJ, Luo BS, Dai YH, Wei ZL, Li SL, He R, et al. 2023. Molecular mechanism of plant elicitor daphnetin-carboxymethyl chitosan nanoparticles against *Ralstonia solanacearum* by activating plant system resistance. International Journal of Biological Macromolecules, 241: 124580
- Wu JS. 2020. The “chemical defense” of plants against pathogenic microbes: phytoalexins biosynthesis and molecular regulations. Chinese Journal of Applied Ecology, 31(7): 2161–2167 (in Chinese) [吴劲松. 2020. 植物对病原微生物的“化学防御”: 植保素的生物合成及其分子调控机制. 应用生态学报, 31(7): 2161–2167]
- Yang L, Guan DL, Valls M, Ding W. 2021b. Sustainable natural biore-sources in crop protection: antimicrobial hydroxycoumarins induce membrane depolarization-associated changes in the transcriptome of *Ralstonia solanacearum*. Pest Management Science, 77(11): 5170–5185
- Yang L, Wei ZL, Li SL, Xiao R, Xu QQ, Ran YA, Ding W. 2021a. Plant secondary metabolite, daphnetin reduces extracellular polysaccharides production and virulence factors of *Ralstonia solanacearum*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 179: 104948
- Yang L, Wu LT, Yao XY, Zhao SY, Wang J, Li SL, Ding W. 2018. Hydroxycoumarins: new, effective plant-derived compounds reduce *Ralstonia pseudosolanacearum* populations and control tobacco bacterial wilt. Microbiological Research, 215: 15–21
- Zhang J, Sun XL. 2021. Recent advances in polyphenol oxidase-mediated plant stress responses. Phytochemistry, 181: 112588
- Zhang Y, Yang DY, Zhang NL, Qi X, Hao ZS, Chen L, Fan ZJ. 2020. Research progress on the plant disease elicitor. Bulletin of National Natural Science Foundation of China, 34(4): 519–528 (in Chinese) [张越, 杨冬燕, 张乃楼, 齐欣, 郝泽生, 陈蕾, 范志金. 2020. 植物抗病激活剂研究进展. 中国科学基金, 34(4): 519–528]
- Zhao Q, Li JM, Lei T, Wang J, Cai XJ. 2022. Screening, identification and evaluation of acidophilic *Bacillus subtilis* CLB-17 for bio-control of *Ralstonia solanacearum* causing tobacco wilt. Journal of Plant Protection, 49(2): 528–538 (in Chinese) [赵倩, 李军民, 雷庭, 王静, 蔡宪杰. 2022. 嗜酸性 PGPR 菌株 CLB-17 的筛选、鉴定及其对烟草青枯病菌的生防活性. 植物保护学报, 49(2): 528–538]
- Zhao XY, Pan LY, Chen M, Fu YQ, Xiang ML, Zeng XC. 2018. Inductive effect of methyl jasmonate to bacterial wilt and the effects on the activities of antioxidant enzymes in pepper seedlings. Journal of Plant Protection, 45(5): 1103–1111 (in Chinese) [赵显阳, 盘柳依, 陈明, 付永琦, 向妙莲, 曾晓春. 2018. 茉莉酸甲酯对辣椒抗青枯病的诱导效应及抗氧化酶活性的影响. 植物保护学报, 45(5): 1103–1111]
- Zheng XF, Liu B, Zhu YJ, Lin KM, Ge CB, Chen DJ. 2018. Control effects of plant vaccine avirulent *Ralstonia solanacearum* against tomato bacterial wilt disease in the field. Journal of Plant Protection, 45(5): 1096–1102 (in Chinese) [郑雪芳, 刘波, 朱育菁, 林抗美, 葛慈斌, 陈德局. 2018. 植物疫苗鄂鲁冷特对番茄青枯病的田间防治效果. 植物保护学报, 45(5): 1096–1102]
- Zuluaga AP, Puigvert M, Valls M. 2013. Novel plant inputs influencing *Ralstonia solanacearum* during infection. Frontiers in Microbiology, 4: 349