

张清霞,王 英,李 曦,等. 金针菇发酵液和 BTH 对烟草抗病性的诱导作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):220-222.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.060

金针菇发酵液和 BTH 对烟草抗病性的诱导作用

张清霞¹, 王 英^{2,3}, 李 曦¹, 刘正坪^{2,3}, 唐文华², 童蕴慧¹

(1. 扬州大学, 江苏扬州 225009; 2. 中国农业大学, 北京 100193; 3. 北京农学院, 北京 102206)

摘要:利用烟草-花叶病病害体系检测苯并噻唑硫代乙酸甲酯(benzothiadiazoles, BTH)、金针菇(*Flammulina velutipes*)发酵液提取物(JZG)诱导抗病作用。试验用盆栽珊西烟(*Nicotiana tobacum*, Xanthi-nc)为材料,用诱导剂处理烟草第6片叶,然后在上部未处理叶接种烟草花叶病毒(TMV),结果发现上部叶片产生的 TMV 枯斑数与对照相比显著减少,说明这2种诱导剂能诱导烟草植株产生系统抗病性。同时研究了 BTH、JZG 作为诱导剂处理烟草后寄主内几种抗病相关酶的变化,结果表明烟草叶片组织中的几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶活性增加,且酶活性可在处理后15 d内维持高于对照组的水平。

关键词:几丁质酶; β -1,3-葡聚糖酶;烟草;金针菇;病程相关蛋白

中图分类号: S435.72 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0220-02

诱导抗性是指植物受到适当刺激后获得的对随后病原菌侵染的抵抗能力^[1]。许多植物上诱导的防卫反应不仅在植物的初侵染部位增强,而且在未受侵染、空间上隔离的部位也增强,这种诱导抗性又称为系统性获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)。病原菌诱导的 SAR 一个显著特征就是寄主植物水杨酸(ssalicylic acid, SA)合成的增加。SA 是 SAR 信号传导中的重要因子。SAR 的另一个特征是所谓的 SAR 基因的激活,包括编码病程相关蛋白的基因^[2],它们通常被用作诱导抗性的标记。人们通过系统研究发现,不但真菌、细菌和病毒能诱导植物产生抗病性^[2-3],而且一些体外无杀菌作用的化学物质,如水杨酸(SA)、2,6-二氯异烟酸(INA)、苯并噻唑硫代乙酸甲酯(benzothiadiazole, BTH)^[4]等也具有这种能力。

植物诱导抗病性具有抗病谱广、持续时间长、系统性等优点,而且大部分的诱导剂对环境无污染^[5]。这些特点说明植物诱导抗病性在农业生产上具有良好的应用前景。BTH 就是这样一个理想的诱导剂,它不仅能诱导植物抵抗苗期病害,而且对植物采后病害也有良好的防治效果^[6]。但是 BTH 目前只在欧洲市场实现了商品化,在我国尚未注册应用。本项工作作为寻找新型诱抗剂的初步研究,利用烟草系统来检测金针菇发酵液是否具有诱导寄主抗病性的功能,以及经该液体处理后寄主体内抗病相关蛋白的变化。

1 材料与方法

1.1 植物材料

烟草品种:珊西烟(*Nicotiana tobacum*, Xanthi-nc),温室

收稿日期:2015-05-11

基金项目:国家自然科学基金(编号:31000875);扬州大学生科技创新基金资助。

作者简介:张清霞(1976—),女,博士,副教授,主要从事植物病害生物防治。E-mail:zqx817@sohu.com。

通信作者:唐文华,博士,教授,主要从事土传病害生物防治研究。

E-mail:wenhuatang@sina.com。

中自然光照生长,植株第13片真叶完全展开时用于试验。

1.2 供试抗性诱导剂

JZG(金针菇发酵液提取物),金针菇菌株接入马铃薯液体培养基中,放置振荡摇床(130 r/min)培养12 d(28℃),纱布过滤,滤液用乙酸乙酯以1:1比例抽提,然后旋转蒸发,以甲醇溶解浓缩物(浓缩1000倍),使用时兑蒸馏水稀释1000倍;BTH(benzothiadiazoles),诺华农化有限公司生产,使用浓度为75 μg/mL。

1.3 供试毒源与浓度

TMV 毒源由中国农业大学植病系病毒室提供,取1 g 病叶加10 mL 磷酸缓冲液(pH 值6.8)研磨成匀浆,纱布过滤,磨擦接种普通烟,发病后病叶用作 TMV 毒源。

1.4 处理时间与方法

取长势均一的珊西烟(13叶期),各种诱导剂或清水以涂抹方式处理烟草的第6片叶,以湿润为准。清水处理为对照。每个处理3次重复,每个重复3株。处理6 d后,在上部未用诱导剂处理的第7、8、9片叶片表面采用摩擦接种法接种 TMV。

1.5 调查时间

TMV 枯斑充分表现(接种 TMV 后2~3 d,25℃),统计各处理不同叶位的枯斑数目。

1.6 取样方法

分别在诱导剂处理珊西烟后1、6、9、15、20、25 d,取上部未处理的第7、8、9叶为样本,液氮速冻,放入-80℃冰箱保存待用。

1.7 酶活性的测定

将各处理珊西烟叶片在液氮中研磨,按1 g:2 mL的比例用0.1 mol/L的柠檬酸钠缓冲液(pH 值为5.0)制成匀浆,15 000 r/min 离心15 min(4℃),取上清液为粗酶液。按 Boller 的方法^[7]测定总几丁质酶活力。总几丁质酶活力的定义:在以上条件下催化相当于1 μmol N-乙酰基葡萄糖胺(GluNAc)所需的酶量为1个酶活单位(U)。按 Abeles 等的方法^[8]测定 β -1,3-葡聚糖酶活力。 β -1,3-葡聚糖酶活

力的定义:1 min 产生 1 μmol 葡萄糖当量还原糖的酶量为 1 个酶活单位(U)。

2 结果与分析

2.1 BTH 与 JZG 对珊西烟抗病性的诱导

使用 BTH 与 JZG 处理珊西烟第 6 片叶,6 d 后在上部未处理的第 7、8、9 片叶接种 TMV,接种 2 d 后枯斑反应完全显现。由表 1 可见,BTH 和 JZG 处理的第 7、8、9 片叶上的 TMV 枯斑数较对照差异显著($P < 0.05$),据目测观察,病斑大小无差异。TMV 枯斑数以第 7 叶上最多,第 8 叶、第 9 叶次之,说明 BTH、JZG 在幼嫩组织上诱导的抗性较强,这也符合系统性诱导抗性的特性。说明 BTH 和 JZG 能诱导植株产生系统抗性,减少了 TMV 的侵染。

表 1 珊西烟经诱导剂处理后对接种 TMV 的枯斑反应

处理	浓度	枯斑数(个)		
		第 7 叶	第 8 叶	第 9 叶
清水 CK		58.3a	31.7a	11.3a
BTH	75 $\mu\text{g/mL}$	13.3b	6.3b	5.0b
JZG	稀释 1 000 倍	9.3b	10.3b	6.0b

注:同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$);BTH:苯并噁唑硫代乙酸甲酯;JZG:金针菇发酵液提取物。

2.2 BTH 与 JZG 处理珊西烟后总几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性的变化

用 BTH 和 JZG 处理珊西烟第 6 片叶,对照用清水处理,之后 1、6、9、15、20 d 及 25 d 取上部未处理叶片为样本测定总几丁质酶的活性和 β -1,3-葡聚糖酶活性,结果见图 1,BTH 和 JZG 均能增强珊西烟叶片中总几丁质酶活性。从处理后 1 d 即可检测到酶活性高于对照,BTH 处理珊西烟后烟草叶组织中几丁质酶活性持续上升,处理后 25 d 内维持高于对照的酶活性水平,且在处理后 20 d 达到最高,以后逐渐下降直至对照水平;JZG 处理的珊西烟几丁质酶活性则在诱导后 15 d 达到最高水平。对 β -1,3-葡聚糖酶的检测发现了相似的结果(图 2):BTH 和 JZG 处理珊西烟后,均使其叶片组织中 β -1,3-葡聚糖酶活性增加,明显高于对照水平,二者都能在诱导后 15 d 内使 β -1,3-葡聚糖酶活性保持高于对照的水平,以后酶活性缓慢下降。BTH 和 JZG 处理珊西烟后,珊西烟叶片的总几丁质酶活性由低到高增加,以后呈下降趋势,而 β -1,3-葡聚糖酶活性虽然高于对照,但是从诱导 1 d 起就呈下降趋势。

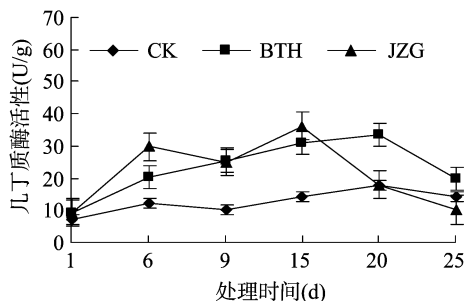


图 1 BTH 和 JZG 处理珊西烟后几丁质酶活性的变化

已有报道说明 BTH 能在许多作物上诱导 SAR,在烟草上可诱导几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性增强^[9]。JZG 与

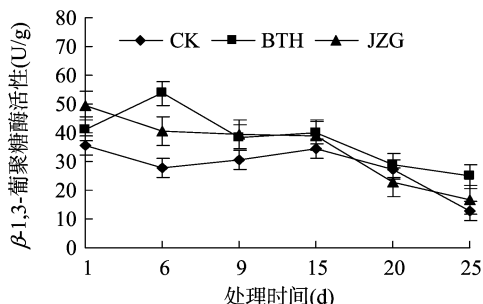


图 2 BTH 和 JZG 处理珊西烟后 β -1,3-葡聚糖酶活性的变化

BTH 在珊西烟上具有相似的反应,都可诱导几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶,并且降低 TMV 的侵染率,说明 JZG 作为诱导剂可诱导植物产生防卫反应。

3 讨论

用 BTH 和 JZG 处理珊西烟下部叶片后,发现上部未处理叶片上 TMV 枯斑数目均较清水对照显著减少。这一特性符合系统性获得性抗性的主要特征:即经过生物的或非生物因子诱导处理后,植株处理或未处理部位产生对随后病原物侵染的抗性。

几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶是植物病程相关蛋白 (PRs),也是 SAR 的重要标记。正常情况下,这 2 种酶只有低水平的组成型表达,当用诱导因子处理后,酶活性会迅速增加。这 2 种酶在离体条件下具有联合抑菌活性,因此通常被看作是植物抵抗病原菌潜在的抗性机制^[10-11]。BTH 和 JZG 能诱导珊西烟体内总几丁质酶活性和 β -1,3-葡聚糖酶活性的提高,并且能维持较长一段时间,这对于诱导抗病效果是一个重要的影响因素。BTH 和 JZG 诱导珊西烟后 20 d 内,几丁质酶活性保持在较高的水平, β -1,3-葡聚糖酶活性也可在诱导后 15 d 内维持在较高的水平。这说明 BTH 和 JZG 处理珊西烟植株 15~20 d 内,植株是处在抗病反应时期。这为适时地使用 BTH 和 JZG 提供了参考的信息,即可在病害发生前的 15 d 内使用诱导剂。

BTH 是已经商品化的诱抗剂,它能在许多作物上诱导抗性,而且其诱导植物的抗性与其诱导的几丁质酶活性和 β -1,3-葡聚糖酶活性的增加有关^[12]。本研究表明金针菇发酵液提取物与 BTH 有相似的抗 TMV 反应,且具有相似的酶活性变化趋势。这说明 JZG 作为诱导剂可能诱导植物产生与 BTH 诱导(部分)相同的防卫反应,也就是说金针菇发酵液的乙酸乙酯提取相中有起诱导作用的物质,其有效成分还有待于今后进一步研究确认。

参考文献:

- [1] Hammerschmidt R, Kuc J. Induced resistance to disease in plants [M]. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995.
- [2] Ward E R, Uknes S J, Williams S C, et al. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance [J]. The Plant Cell, 1991, 3(10): 1085-1094.
- [3] Ross A F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants [J]. Virology, 1961, 14: 340-358.

温以斌,王宝祥,刘艳,等. 水稻品种对黑条矮缩病和灰飞虱抗性的关联性分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):222-225.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.061

水稻品种对黑条矮缩病和灰飞虱抗性的关联性分析

温以斌,王宝祥,刘艳,王康君,代慧敏,刘金波,蒲汉春,徐大勇

(江苏省连云港市农业科学院/江苏徐淮地区连云港农业科学研究所/江苏省现代作物生产协同创新中心,江苏连云港 222006)

摘要:为分析水稻品种对黑条矮缩病和灰飞虱抗性的关联性,对 49 个品种进行田间接种鉴定、人工接种鉴定、抗生性和排驱性试验。结果表明,田间接种中发病率低于 20% 的品种较多,田间接种鉴定受到外部环境因素影响因素较大,发病率明显低于人工接种鉴定。在田间接种和人工接种鉴定中,籼稻品种的发病率低于粳稻品种。抗生性试验显示,仅 5 个籼稻品种的抗生性值低于 81%,粳稻品种均感虫。籼稻品种排驱性值明显低于粳稻品种,籼稻品种对灰飞虱的抗性高于粳稻品种。对水稻品种的黑条矮缩病抗病性和灰飞虱抗虫性进行关联性分析结果,田间鉴定中品种发病率与对灰飞虱排驱性呈极显著正相关,而与品种对灰飞虱抗生性没有相关性。人工接种鉴定中品种发病率与品种对灰飞虱的抗生性和排驱性都呈显著正相关。排驱性与田间接种鉴定发病率和人工接种鉴定发病率均呈极显著正相关。表明在灰飞虱传毒过程中,抗虫品种在一定程度上影响了传毒效果,培育抗灰飞虱品种在一定程度上可以减轻水稻黑条矮缩病的危害。

关键词:水稻;黑条矮缩病;灰飞虱;关联性

中图分类号: S435.112⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0222-04

灰飞虱 [*Laodelphax striatellus* Fallén (Homoptera:Delphacidae)] 是对水稻有严重危害的害虫之一,广泛分布于亚洲各国的水稻种植区。在水稻生产上,除灰飞虱自身通过取食造成危害,由其传播的黑条矮缩病 (rice black-streaked dwarf virus disease, RBSDVD) 造成的产量损失更为严重^[1-2]。近年来,由灰飞虱传播的水稻黑条矮缩病在江苏和浙江等省份大流行,主要原因在于大量感病、感虫品种的种植,携带黑条矮

缩病毒 (rice black-streaked dwarf virus, RBSDV) 的灰飞虱种群数量较大,以及易于灰飞虱种群繁殖的稻麦轮作栽培措施^[3]。

目前,国内部分学者已开展水稻黑条矮缩病和灰飞虱遗传基础研究,发现了一批抗灰飞虱水稻品种,如 RH、Mudgo、ASD7、IR36、IR64 等,并定位到近 20 个抗灰飞虱 QTL^[4-9]。王宝祥等开展了抗黑条矮缩病水稻种质资源筛选和相关基因定位工作,筛选到了多个抗病品种,如来自东南亚的籼稻品种 Kanyakumari 29、Madurai 25 和 Vietnam 160 等^[10]。潘存红等利用珍汕 97B/明恢 63 的重组自交系群体,对水稻黑条矮缩病抗性 QTL 进行分析,共检测到 6 个 QTL,并对其中 1 个进行了精细定位,这些位点的抗性等位基因来自抗病亲本明恢 63^[11-12]。王英利用 Tetep/淮稻 5 号构建分子连锁图谱,共检测到 4 个抗性 QTL^[13],但通过重复鉴定表明,明恢 63 和 Tetep 的发病率可达 20% 以上,高抗种质资源的发掘和相关抗病基

收稿日期:2015-04-15

基金项目:江苏省科技支撑计划(编号:BE2013301);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(12)5112];国家水稻产业体系项目(编号:CARS-01-01A)。

作者简介:温以斌(1969—),男,江苏灌南人,高级农艺师,主要从事水稻新品种选育及栽培技术推广工作。E-mail:wbxrice@163.com。

通信作者:徐大勇,研究员。E-mail:xudayong3030@sina.com。

[4] Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, et al. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat[J]. The Plant Cell, 1996, 8(4):629-643.

[5] Kessmann H, Staub T, Hofmann C, et al. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals[J]. Annual Review of Phytopathology, 1994, 32:439-459.

[6] 王伟,唐文华,周洪友,等. BTH 对厚皮甜瓜抗病性的诱导作用研究[J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(5):48-53.

[7] Boller T, Gehri A, Mauch F, et al. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function[J]. Planta, 1983, 157(1):22-31.

[8] Abeles F B, Bosshart R P, Forrence L E, et al. Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves[J]. Plant Physiology, 1971, 47(1):129-134.

[9] Friedrich L, Lawton K, Ruess W, et al. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco[J]. The Plant Journal, 1996, 10(1):61-70.

[10] Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T. Antifungal hydrolases in pea tissue: II. inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase[J]. Plant Physiology, 1988, 88(3):936-942.

[11] Sela-Buurlage M B, Ponstein A S, Bres-Vloemans S A, et al. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity[J]. Plant Physiology, 1993, 101(3):857-863.

[12] Colson-Hanks E S, Deverall B J. Effects of 2,6-dichloroisonicotinic acid, its formulation materials and benzothiadiazole on systemic resistance to *Alternaria* leaf spot in cotton[J]. Plant Pathology, 2000, 49:171-178.