

任平,阮祥稳,赵文娟,等. 猕猴桃溃疡病 P-L 菌株诱导植株系统的抗性[J]. 江苏农业科学,2017,45(21):109-111.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.029

猕猴桃溃疡病 P-L 菌株诱导植株系统的抗性

任平^{1,3},阮祥稳²,赵文娟^{1,3},秦涛³

(1. 陕西省酶工程技术研究中心,陕西西安 710600; 2. 陕西省生物农业研究所,陕西西安 710600;
3. 中国科学院西北生物农业中心,陕西西安 710600)

摘要:将不同致病力的猕猴桃溃疡病菌接种于猕猴桃植株上,测定与抗病性相关的苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)这 5 种防御酶的活性,结果表明,猕猴桃溃疡病不同致病力菌株会导致猕猴桃植株的 POD、PPO、SOD、CAT、PAL 活性明显提高;接种强致病力菌株 P-H 使猕猴桃植株的 5 种防御酶活性变化剧烈,尤其是 POD 活性明显上升后又明显下降;与接种无菌水相比,接种不同浓度 P-L 菌株可导致猕猴桃植株 POD、PPO、SOD、CAT、PAL 的活性明显提高,其中接种浓度为 10^7 CFU/mL 的 P-L 菌株发酵液,5 种酶活性明显高于其他 2 个浓度处理,且与 P-H 菌株接种侵染的各酶活性变化趋势相同。高浓度 P-L 菌株发酵液具有更好的激发植株体内防御酶活性的能力,弱致病力猕猴桃溃疡病菌 P-L 发酵液能诱导猕猴桃植株产生抗病性。

关键词:猕猴桃;溃疡病;防御酶;诱导抗性;P-L 菌株;过氧化物酶;发酵液

中图分类号: S436.634 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)21-0109-03

生物防治是控制植物病害、减少化学农药污染的有效途径,而诱导抗性又是植物病害生物防治的重要机理之一^[1]。诱导抗性是通过诱发植物免疫机制来实现的,利用物理、化学或生物因子预先处理植物,使原来的感病反应产生局部的或系统的抗性^[2]。植物经外界刺激或诱导会引起植物产生一些应急反应,进而引起植株的生理生化指标变化,使植物产生抗性。目前,研究植物诱导抗性机制时,主要是研究一些与抗病相关的酶或物质^[3]。植物受病原菌侵染或生物因子诱导,植物体内与抗病反应密切相关的防御酶活性会升高,其中苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)等是存在于植物体内与抵抗病原微生物侵染有关的重要酶类^[4]。

猕猴桃溃疡病是猕猴桃生产过程中的一个重要病害,化学药剂难以有效地防控,即使大量使用农药,也收效甚微,还造成猕猴桃产品和生态环境污染。根据“植物获得性抗性”学说^[5],用猕猴桃溃疡病弱致病菌株发酵液进行诱导接种,可刺激猕猴桃植株体内产生对溃疡病的抗体,进而使猕猴桃植株产生对溃疡病的抗性,从而达到不用化学农药、用弱致病菌株防控猕猴桃溃疡病的目的,实现猕猴桃的无污染生产。

前期研究发现,接种猕猴桃溃疡病弱致病菌株 P-L 发酵液能提高猕猴桃植株对强致病菌株 P-H 的抗性。在此基础上,本试验通过将不同浓度 P-L 菌株发酵液接种到猕猴桃植株上,测定其体内 PAL、POD、PPO 等酶的活性变化,分析弱致病菌株是否会引起植物系统产生抗病性,为揭示其生防机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

强致病菌株 P-H、弱致病菌株 P-L,由陕西省科学院酶工程研究所微生物实验室筛选出来;15 株试验植株为 2 年生盆栽猕猴桃实生苗。金氏 B 培养基(KBA 培养基):蛋白酶解蛋白胨 20.0 g, KH_2PO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g,甘油 15.0 mL,加蒸馏水到 1 L, pH 值为 7.2。培养基 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株悬液的制备及接种 将不同致病力 P-H 菌株、P-L 菌株分别接种于 KBA 培养基中,26 °C 160 r/min 振荡培养 30 h;将 P-L 菌株发酵液用无菌水分别稀释成 10^5 、 10^6 、 10^7 CFU/mL 等 3 个浓度,采用超声波对细胞进行破碎,超声波输出功率为 250 W,工作 6 s,间隔 5 s,总工作时间 6.6 min;将 P-H 菌株发酵液用无菌水稀释成 10^6 CFU/mL 作为对照 1(CK1),以无菌水处理作为对照 2(CK2);每处理选取长势一致、健壮的猕猴桃植株各 3 株,每株选择 3 张大小均匀、长势良好的叶片,将菌液及无菌水均匀喷在猕猴桃叶片上进行诱导抗性试验,套上保鲜袋。

1.2.2 POD、PPO、SOD、CAT、PAL 活性的测定 接种前及接种后 2、6、10、15、20 d 分别采集猕猴桃叶片,测定其 POD、PPO、PAL、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)的活性。POD 提取及活性测定参照张龙翔等的方法^[6]进行,以 1 g 鲜质量 1 min 内 $D_{470\text{ nm}}$ 值变化 0.01 作为 1 个酶活性单位(U)。PPO 提取及活性测定参照朱广廉等的方法^[7]进行,以 1 g 鲜质量 1 min 内 $D_{525\text{ nm}}$ 值变化 0.01 为 1 个酶活性单位(U)。SOD 提取及活性测定参照朱广廉等的方法^[7]进行,以抑制氮蓝四唑(NBT)还原的 50% 酶量为 1 个酶活性单位,以不加酶液而用缓冲液代替酶液的处理为空白对照,酶活性计算公式为:

收稿日期:2016-06-17

基金项目:陕西省科学院基础科研项目(编号:2013K-16)。

作者简介:任平(1972—),女,陕西西安人,副研究员,主要从事微生物资源应用开发。E-mail:mysrenping@163.com。

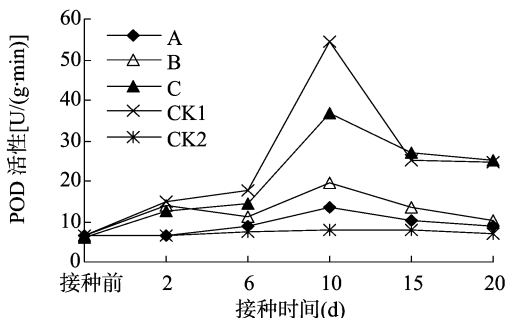
$$N = 2 \times (D_{560 \text{ nm}} \text{ 空白} - D_{560 \text{ nm}} \text{ 处理}) / D_{560 \text{ nm}} \text{ 空白}。$$

CAT 提取及活性测定参照李合生的方法^[8]进行,采用紫外吸收法,以 1 g 鲜质量 1 min 内 $D_{240 \text{ nm}}$ 减少 0.1 的酶量为 1 个酶活性单位(U)。PAL 提取及活性测定参照薛应龙等的方法^[9]进行,以 1 g 鲜质量 $D_{290 \text{ nm}}$ 值变化 0.01 所需酶量为 1 个酶活性单位(U)。

2 结果与分析

2.1 P-L 菌株不同浓度发酵液对过氧化物酶(POD)活性的影响

由图 1 可知,处理组和对照组在接种前的 POD 活性差异不明显;处理组和 CK1 的 POD 活性在接种后 2~6 d 多为缓慢升高,在接种后 6~10 d 的 POD 活性明显上升且达到峰值,后下降较快,接种 15 d 后趋于平稳;接种后 20 d 时,处理组和 CK1 的 POD 活性仍高于 CK2;CK2 的 POD 活性在 20 d 内变化不大;处理 C(P-L 菌株发酵液浓度为 10^7 CFU/mL)的 POD 活性明显高于其他 2 个处理;处理组的 POD 活性变化趋势与 CK1 一致,且 POD 活性始终高于 CK2,这是由于当病原菌在植株体内活动时,过氧化物酶对病原菌极为敏感,很可能与其他代谢系统协同作用,使体内活性氧物质保持在一个正常的动态水平,同时,其还可以氧化枝条组织中的酚类化合物,相应产物阻止病原物的扩展,提高了其抗性水平。 10^7 CFU/mL 高浓度 P-L 菌株发酵液具有更强激发 POD 活性的能力。



A— 10^5 CFU/mL P-L 菌株; B— 10^6 CFU/mL P-L 菌株; C— 10^7 CFU/mL P-L 菌株; CK1—P-H 菌株; CK2—无菌水。下同

图1 P-L 菌株不同浓度发酵液对 POD 活性的影响

2.2 P-L 菌株不同浓度发酵液对多酚氧化酶(PPO)活性的影响

由图 2 可知,处理组和对照组在接种前的 PPO 活性差异不明显;处理 B、处理 C、CK1 的 PPO 活性在接种后 2~10 d 明显上升且达到峰值,后下降较快,接种后 20 d 仍高于 CK2;处理 A 的 PPO 活性在接种后 2~6 d 缓慢升高,在接种后 6~10 d 的 PPO 活性明显上升且达到峰值,后有所下降,接种后 20 d 时,处理 A 的 PPO 活性高于处理 B、CK2;CK2 的 PPO 活性在 20 d 内变化不大;处理 C 的 PPO 活性明显高于其他 2 个处理;处理组的 PPO 活性变化趋势与 CK1 基本一致,且其 PPO 活性始终高于 CK2,这可能是由于植物在对病原菌侵染的防卫反应中,需要更多的多酚氧化酶参与,而多酚氧化酶不仅参与酚类物质的氧化,同时也参与木质素的形成,木质素一方面增加了细胞壁抗病原物的穿透压力,另一方面限制了真

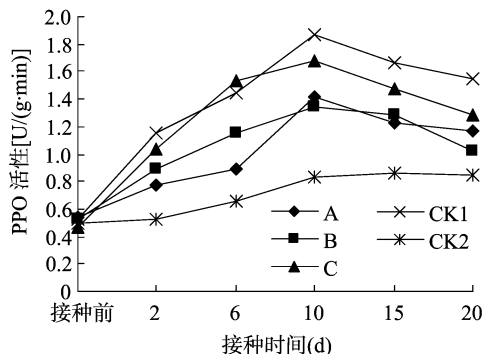


图2 P-L 菌株不同浓度发酵液对 PPO 活性的影响

菌酶和毒素的扩散,阻碍了病原菌从寄主获得水和营养物质^[10]。 10^7 CFU/mL 高浓度 P-L 菌株发酵液具有更强激发 PPO 活性的能力。

2.3 P-L 菌株不同浓度发酵液对超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

由图 3 可知,处理组和对照组在接种前的 SOD 活性差异不明显;处理组和 CK1 的 SOD 活性在接种后 2 d 呈下降趋势,处理 B、处理 C、CK1 在接种后 2~10 d 的 SOD 活性明显上升并达到峰值,后下降较快,接种后 20 d 时,处理组和 CK1 的 SOD 活性仍高于 CK2;处理 A 的 SOD 酶活性在接种后 2~15 d 缓慢上升且达到峰值,接种后 20 d 时的 SOD 活性高于处理 B、CK2;CK2 的 SOD 活性在 20 d 内变化不大;处理 C 的 SOD 酶活性高于其他 2 个处理;处理组的 SOD 活性变化趋势与 CK1 一致,且其 SOD 活性始终高于 CK2,这可能是当病原菌侵染时 SOD 活性上升,以清除病原菌刺激产生的自由基,防止氧自由基伤害细胞膜系统,使细胞内保持一个稳定、有利于生长的环境^[11]。 10^7 CFU/mL 高浓度 P-L 菌株发酵液具有更强激发 SOD 活性的能力。

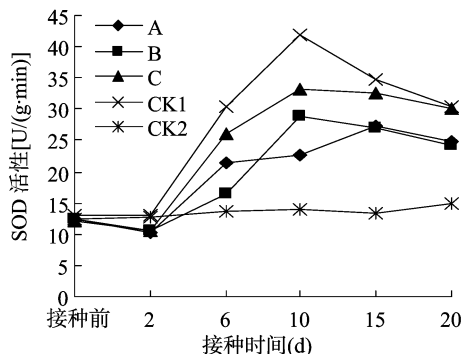


图3 P-L 菌株不同浓度发酵液对 SOD 活性的影响

2.4 P-L 菌株不同浓度发酵液对过氧化氢酶(CAT)活性的影响

由图 4 可知,处理组和对照组在接种前的 CAT 活性差异不明显;处理组和 CK1 的 CAT 活性在接种后 6 d 达到第 1 个峰值,这可能是在病菌侵染初期,细胞经 SOD 过程产生 H_2O_2 ,使胞内活性氧的数量迅速增加,CAT 活性也随之上升;后 CAT 活性值下降,并在接种 10 d 后又上升,在接种后 15 d CAT 活性达到第 2 个峰值,这可能是猕猴桃接种病菌,其枝条细胞有新的代谢产物产生,从而进一步刺激 CAT 活性上升;处理组的 CAT 活性变化趋势与 CK1 一致,且 CAT 活始值高于 CK2。 10^7 CFU/mL 高浓度 P-L 菌株发酵液具有更强激发

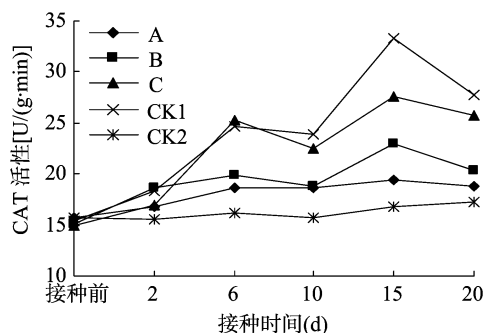


图4 P-L 菌株不同浓度发酵液对 CAT 活性的影响

CAT 活性的能力。

2.5 P-L 菌株不同浓度发酵液对苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性的影响

由图 5 可知,处理组和对照组在接种前的 PAL 活性差异不明显;处理组和 CK1 的 PAL 活性在接种后 2~6 d 明显升高,接种后 6 d PAL 活性达到峰值,后又缓慢下降,接种 10 d 后趋于平稳;接种后 20 d 时,处理组和 CK1 的 PAL 活性仍高于 CK2,CK2 的 PAL 活性在 20 d 内活性变化不大;处理组的 PAL 活性变化趋势与 CK1 一致,且 PAL 活性始终高于 CK2,这可能是由于病原菌攻击引起植物体合成大量新的 PAL,以抵抗病原菌侵入对植物的伤害。 10^7 CFU/mL 高浓度 P-L 菌株发酵液具有更强激发 PAL 活性的能力。

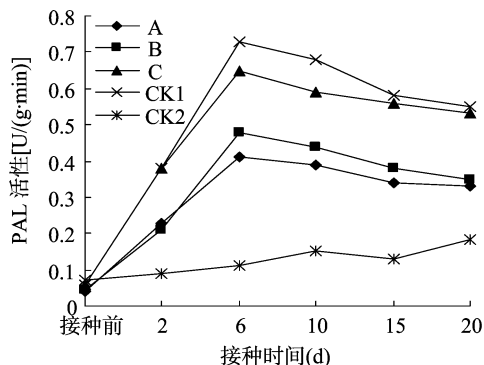


图5 P-L 菌株不同浓度发酵液对 PAL 活性的影响

3 结论与讨论

植物病害生物防治机制包括抗生作用、溶菌作用、重寄生作用、竞争作用、交互保护作用及促生作用^[12-13],诱导系统抗性也被认为是生防菌的一种重要防病机制。植物的诱导抗病包括木质化、防御酶活性、病程相关蛋白、植保素等多种生理生化因子的合成。有大量研究表明,参与植物体内多种防卫反应的 PAL、PPO、POD 等酶系与植物抗病性密切相关^[14],这些酶的活性与植株抗病性呈正相关,在植物的抗病反应中起到非常重要的作用。

接种猕猴桃溃疡病不同致病力菌株会导致猕猴桃植株的 POD、PPO、SOD、CAT、PAL 活性明显提高,而接种强致病力菌株会使猕猴桃的 5 种防御酶活性变化剧烈,尤其是 POD 活性急剧上升后又迅速下降,这种变化可能与强致病力菌株对植

物具有致病性,能导致植物发病及生理功能紊乱等有关^[15];与接种无菌水相比,接种 P-L 菌株不同浓度发酵液可导致猕猴桃植株的 POD、PPO、SOD、CAT、PAL 活性明显提高,其中接种浓度为 10^7 CFU/mL P-L 菌株发酵液的猕猴桃植株的 5 种酶活性明显高于接种 10^6 、 10^5 CFU/mL 的,且与 P-H 菌株侵染后的酶活性变化趋势相同, 10^7 CFU/mL 高浓度 P-L 菌株发酵液具有更强激发植株体内防御酶活性的能力。

不论是弱致病菌还是强致病菌,在一定程度上都可导致与抗病反应相关的一些生理生化指标的变化,而且有时植株对强致病力溃疡病菌的反应更加敏感。因此,在诱导植物提高抗病能力时,须选择合适的诱导菌株和接种强度,以达到预期的生防目的。

参考文献:

- [1] 谭可菲,段玉玺,王晓峰,等. 根结线虫生防菌 *sne8* 对番茄诱导抗性的初步研究[J]. 黑龙江农业科学,2011(1):22-24.
- [2] 令利军,冯 蕾,雷 蕾,等. 地衣芽孢杆菌 TG116 诱导黄瓜抗病性相关防御酶系的研究[J]. 西北师范大学学报(自然科学版),2016,52(1):100-104.
- [3] 张鹏翀,胡增辉,沈应柏. 植物诱导抗性的研究进展[J]. 现代农业科学,2008,15(9):22-23.
- [4] Zheng Y H, Fung R M, Wang S Y, et al. Transcript levels of antioxidative genes and oxygen radical scavenging enzyme activities in chilled zucchini squash in response to super atmospheric oxygen[J]. Postharvest Biology and Technology,2008,47(3):151-158.
- [5] 刘永胜,王 永,秦立金,等. FOC-RA-5 诱导后黄瓜叶片内几种酶活性的变化[J]. 北方园艺,2016(6):1-5.
- [6] 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 2 版. 北京:高等教育出版社,1997.
- [7] 朱广廉,钟海文,张海琴. 植物生理学实验[M]. 北京:北京大学出版社,1990.
- [8] 李合生. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:32-33.
- [9] 薛应龙,欧阳光察,澳绍根. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究Ⅳ. 水稻幼苗中 PAL 活性的动态变化[J]. 植物生理学报,1983,9(3):301-305.
- [10] 张树生,胡 蕾,刘忠良,等. 植物体内抗病相关酶与植物抗病性的关系[J]. 安徽农学通报,2006,12(13):48-49,5.
- [11] 李 森,檀根甲,李 瑶,等. 不同抗性猕猴桃品种感染溃疡病前后几种保护酶活性变化[J]. 激光生物学报,2009,18(3):370-378.
- [12] 陈立华,金 秋,牛 明,等. 棘孢木霉对水稻纹枯病原菌立枯丝核菌生物防治的研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):115-117.
- [13] 李建文,高易宏,吴 辉,等. 生防菌 BS04 防治辣椒疫病机制[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):151-153.
- [14] 林陈强,李占飞,张 慧,等. 枯草芽孢杆菌 CS16 诱导香蕉抗病性相关防御酶系的研究[J]. 福建农业学报,2013,28(6):570.
- [15] 张赛群,邹燕红,吴素琴,等. 青枯雷尔氏菌无致病力菌株诱导番茄系统获得性抗性研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2008,47(增刊2):31-35.