

杨郑州,黄柳芳,谢晓娜,等. 叶疫病病菌侵染芒果后叶片细胞壁降解酶活性测定[J]. 江苏农业科学,2019,47(10):138-141.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.030

叶疫病病菌侵染芒果后叶片细胞壁降解酶活性测定

杨郑州,黄柳芳,谢晓娜,苏仕林

(百色学院农业与食品工程学院,广西百色 533000)

摘要:为明确叶疫病病菌侵染芒果后细胞壁降解酶活性的变化,以台农芒果叶作为试验材料,通过体外培养的方法分离得到芒果叶疫病病菌,将其接种于离体的芒果幼叶,利用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法和紫外分光光度计法检测病原菌侵染过程中细胞壁降解酶活性的变化。结果表明,在细胞壁降解酶中, β -葡萄糖苷酶活性最高,羧甲基纤维素酶(Cx)活性与多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性次之,聚甲基半乳糖醛酸酶(PMG)活性最低;纤维素酶在病原菌侵染初期最早分泌并起作用,并且纤维素酶比果胶酶对芒果叶片的致病作用明显。

关键词:芒果;叶疫病;细胞壁降解酶;活性测定;3,5-二硝基水杨酸法;紫外分光光度计法;减少产量损失

中图分类号: S436.67+9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)10-0138-03

芒果被称为热带水果之王。在我国,芒果主要种植在东南部的云南和南部的贵州与广西地区^[1-2],芒果叶疫病别称为交链孢霉叶枯病,主要危害树冠下老叶,在一些实生苗与嫩叶上发病率高,其生长温度条件充足,在雨水充足时期发病率高,随着雨水的降临,叶疫病的菌丝可侵染嫩叶及抵抗力弱的老叶,具有一定的传染性。严重时可导致叶片大量枯死,影响植株生长。植物细胞壁是植物健康的保障,病原菌通过入侵植物细胞壁,分泌细胞壁降解酶使植物受到侵染,从而导致病害的发生。细胞壁降解酶是病原菌侵染寄主组织的主要致病因子之一^[3],本试验致力于研究植物细胞壁降解酶的种类与其在致病过程中所起到的作用,为进一步研究芒果与叶疫病病菌的互作机制及减少芒果果产量损失提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用材料为台农芒果,摘取病叶为广西壮族自治区百色市右江区本地台农芒果树上的老叶,分离纯化得到芒果叶疫病病菌,针刺法接种于离体台农芒果幼叶,台农幼苗于 2016 年 9 月至 2017 年 1 月种植于百色学院实验楼前,待叶长至 8 张时,取不同植株同一位置的幼叶,以针刺后不接种菌丝的叶片为空白对照,放于 28℃ 条件下倒置培养,分别于接种后 2、4、6、8、10、12 d 取样,而后样品保存于 -20℃ 冰箱。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离与纯化 摘取疑似芒果叶疫病的台农芒果叶片,于实验室用流水洗净,表面消毒后,使用 0.1% 氯

化汞消毒 1.5 min,75% 乙醇消毒 30 s,蒸馏水润洗 3 次每次 1 min;所用器皿均已高压灭菌,利用剪刀裁取病健交界处 0.5 mm² 左右叶片,放入马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基中,28℃ 倒置培养。通过点接的方法分离纯化致病菌。

1.2.2 病原菌反侵染 根据柯赫氏法则将已纯化的菌丝分别接种至同一品种、同一长势的百色市本地健康无病害的实生苗上。摘取与叶疫病病原症状一致的叶片,重新进行叶片中致病菌的分离,观察 2 种病菌是否为同一种。

1.2.3 酶液的提取 称取叶片 1 g,放入研钵中,进行冰浴研磨,1 g 样品中加入 5 mL 1 mol/L NaCl 提取液(20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,pH 值 7.4),然后倒入 10 mL 离心管中,4℃,10 000 r/min 离心 15 min,上清液即为酶的粗提液,于 4℃ 保存。

1.2.4 羧甲基纤维素酶(Cx)活性测定 量取 1 mL 粗酶液,加入 1 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,再加入 1 mL 底物(底物配制:称取 0.1 g 羧甲基纤维素钠溶于 10 mL pH 值为 5.0 的 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中),在 50℃ 下酶解 30 min,加入 1 mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS),沸水浴 10 min,取出后经流水冷却,在 540 nm 处测定吸光度。

1.2.5 β -葡萄糖苷酶活性测定 参照“1.2.4”步骤,底物配制:称取 0.1 g 水杨苷溶于 10 mL pH 值为 5.0 的 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

1.2.6 多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性测定 参照“1.2.4”步骤,底物配制:称取 0.1 g 多聚半乳糖醛酸溶于 10 mL pH 值为 5.0 的 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

1.2.7 聚甲基半乳糖醛酸酶(PMG)活性测定 参照“1.2.4”步骤,底物配制:称取 0.1 g 果胶溶于 10 mL pH 值为 5.0 的 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

Cx、 β -葡萄糖苷酶、PG 与 PMG 的酶活性单位为 50℃ 下 1 min 催化 1 μ g 还原糖所需酶量,根据 D-半乳糖标准曲线计算生成的还原糖,还原糖采用 DNS 比色法测定。

酶蛋白浓度测定按照 Bradford 的方法^[4]进行,用考马斯亮蓝 G-250 显色,在 595 nm 处比色测定,用小牛血清蛋白(BSA)作标准曲线 $y = 0.362 2x + 0.078 1$, $r^2 = 0.998 4$ 。

收稿日期:2018-01-09

基金项目:国家自然科学基金(编号:31760221);广西自然科学基金(编号:2017GXNSFBA198007);2017 年广西高校中青年教师基础能力提升项目(编号:2017KY0742,2017KY0743);2017 年百色学院校级特色研究团队项目(编号:百院字[2017]235 号)。

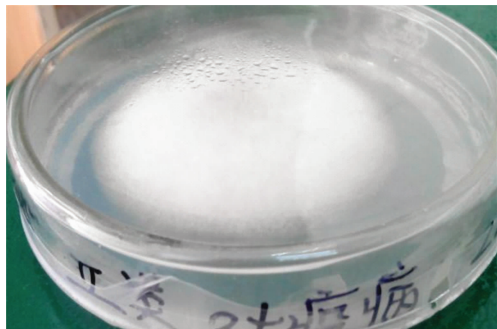
作者简介:杨郑州(1982—),男,河南平顶山人,硕士,助教,主要从事动植物生理生化方面的研究。E-mail:21775285@qq.com。

通信作者:谢晓娜,博士,讲师,主要从事作物逆境生理及分子的研究。E-mail:452712796@qq.com。

2 结果与分析

2.1 芒果叶疫病病原菌形态结构

由图 1、图 2 可知,此次分离得到的病原菌即为芒果叶疫病病原菌细极链格 [*Alternariatenuissima* (Fr.) Wiltsh], 属半知菌类真菌。湿度大时病斑上出现灰色霉状物,即病菌分生孢子梗和分生孢子。梗单生或 2~3 根丛生,褐色,偶尔出现 1 个膝状曲折,分生孢子倒棍棒形,单生或 2~4 个串生,孢身褐色,大小为 $(18.8 \sim 31.3) \mu\text{m} \times (8.0 \sim 12.5) \mu\text{m}$,具横隔膜 3~6 个,纵隔膜 1~3 个,喙变化较大,色略浅,长 $3.8 \sim 11.3 \mu\text{m}$ 。



A. 培养基病原菌形态



B. 反侵染的菌体形态 ($\times 100$ 倍)

图1 芒果叶疫病病原菌株与菌体形态



A. 对照

B. 针划创伤处理图

图2 芒果叶疫病病原菌针划创伤芒果叶片的症状

芒果叶疫病病原菌前期生长较为缓慢,在生长至第 3 天后生长态势急剧上升,第 7 天可达到生长顶峰,第 8 天开始有孢子产生。病原菌菌丝生长形态细密、绵软,菌丝向上生长约 0.5 cm,形成内凹外凸的形状,菌丝以散射状形势向外扩散,孢子以接种中心为圆心向培养基边缘部分扩散,在孢子生成过程中孢子可在培养皿中形成同心圆。

2.2 Cx 活性测定

由图 3 可知,试验处理组酶活性在接种后 4 d 达到高峰,此时是对照组的 1.365 倍,随后酶活性开始下降,在 12 d 又

达到第 3 次酶活性高峰,为对照组的 3.938 倍。对照组酶活性在培养过程中随着时间的推移整体逐渐降低。

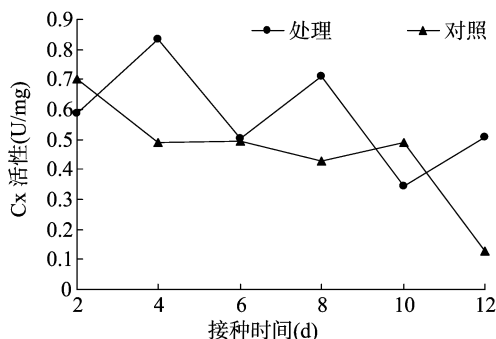


图3 接种芒果叶疫病病原菌后叶片内 Cx 酶活性的变化

2.3 β -葡萄糖苷酶活性变化

由图 4 可知, β -葡萄糖苷酶在接种后 2 d 达到酶活性高峰,是对照组酶活性的 1.243 倍,试验处理组在接种后 10 d 达到第 2 次酶活性高峰,是对照组酶活性的 2.807 倍。试验组 β -葡萄糖苷酶活性在 10 d 后开始急剧下降,对照组 β -葡萄糖苷酶活性随着时间的增加而下降。

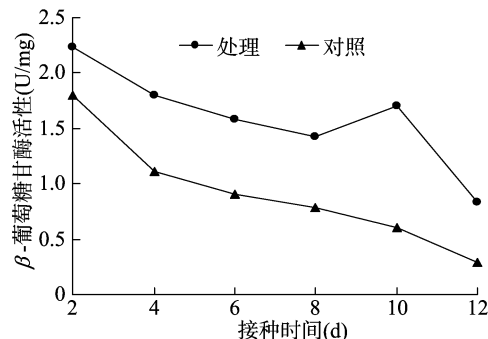


图4 接种芒果叶疫病病原菌后叶片内 β -半乳糖苷酶活性变化

2.4 PG 活性的变化

由图 5 可知,接种后 2 d 试验处理组 PG 活性低于对照组 PG 活性,此时试验组叶片中 PG 活性受到抑制,接种后 6 d PG 活性逐渐上升,接种后 8 d PG 活性达到峰值,是对照组的 2.596 倍。对照组 PG 活性随着接种时间的增加整体逐渐减小。

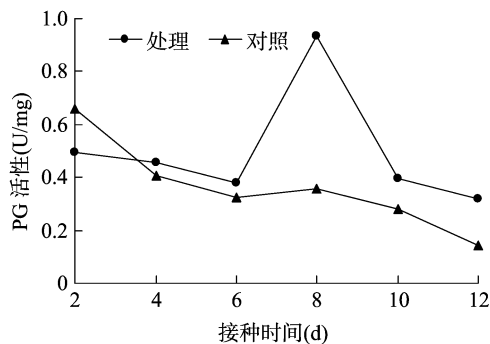


图5 接种芒果叶疫病病原菌后叶片内 PG 活性变化

2.5 PMG 活性变化

由图 6 可知,试验处理组 PMG 活性在接种后 4~6 d 内无明显变化,接种 8 d 后受到明显抑制,接种 10 d 后活性达到高峰,是对照组 PMG 活性的 1.568 倍,对照组 PMG 接种后先

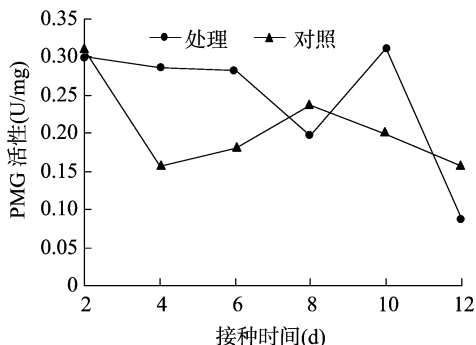


图6 接种芒果叶疫病病菌后叶片内 PMG 活性变化

急剧下降后达到平衡。

2.6 酶活醒比较

由图 7 可知,芒果感染叶疫病病菌后 β -葡萄糖苷酶活性最高,Cx、PG 活性次之,PMG 活性最低。

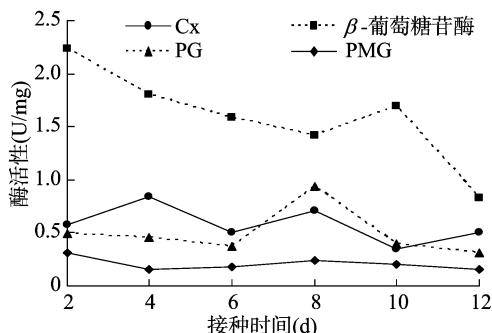


图7 接种芒果叶疫病病菌后叶片内细胞壁降解酶活性变化

3 结论与讨论

本试验探讨了细胞壁降解酶的致病性作用,试验从芒果叶疫病病原菌的提取到病原菌的致病机制研究,期间做了多次预试验与试验分析,并从中挑选出最佳的试验方案。本研究所用的芒果病叶最佳的消毒方法为流水冲洗 5 min,氯化汞消毒溶液消毒 1.5 min,75% 乙醇消毒 30 s,最后得出的芒果病叶细菌感染率最低。芒果叶疫病具有感染性,可通过空气中的水与风传播,孢子可随风依附在树叶上,遇水后生长,因此芒果叶疫病在雨季多发。病原菌侵染过程中相关酶的活性出现高低起伏变化可能是活体外叶片的自身免疫作用, β -葡萄糖苷酶在接种后 2 d 出现酶活性高峰,Cx 和 PG 在接种后 8 d 出现酶活性高峰,这与前人研究结果一致。李敏等人在研究可可球二孢产细胞壁降解酶在侵染芒果果实过程中的作用时发现可可球二孢在离体培养条件下或接种芒果果实后均可产生 PG、PMG、多聚半乳糖醛酸反式消除酶(PGTE)、果胶甲基反式消除酶(PMTE)及 Cx,其中 PG、PMG 和 Cx 活性较高,PGTE 和 PMTE 活性极低^[5]。在大量分泌的 3 种细胞壁降解酶中,PG 和 Cx 活性高峰出现较早,PMG 活性高峰出现较迟。芒果叶疫病病原菌侵染过程中, β -葡萄糖苷酶活性最高,Cx、PG 活性次之,PMG 活性最低。王麒然等研究花生品种对叶腐病的抗性鉴定时发现,花生叶腐病菌能产生果胶酶、纤维素酶、木聚糖酶、漆酶等细胞壁降解酶,无论活体外养还是接种植株体内都表现为果胶酶活性最高,其次是漆酶和木聚糖酶,活性最弱的是纤维素酶^[6]。高增贵等研究发现,玉

米茎腐病菌在活体内和活体外都能分泌细胞壁降解酶,其产生的果胶酶、纤维素酶等都对玉米胚根有明显的浸解作用,并且随着酶液浓度的升高浸解能力也逐渐增强,表明果胶酶、纤维素酶等细胞壁降解酶是玉米茎腐病菌的重要致病因子^[7]。Lalaoui 等研究发现,木聚糖酶在菜豆褐斑病菌(*Phylllosticta phaseolina*)致病中起重要作用^[8]。陈晓林等研究发现,腐烂病菌在寄主体内产生细胞壁降解酶的活性变化规律不同,PMG 和木聚糖酶在接种后最先被检测到活性显著升高,PMG 活性于接种后第 13 天达到高峰,随后活性降低,而木聚糖酶和其他 3 种酶活性则随接种天数的增加活性不断增强;5 种细胞壁降解酶中,Cx 最大酶活性最低,而木聚糖酶活性最高,是其他酶最大酶活性的 1.74 ~ 7.44 倍^[9]。因此,细胞壁降解酶是一些植物病原菌的重要致病因子。Kang 等研究发现,引起小麦根腐的禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)分泌果胶酶活性高的菌株致病性相对强,并且果胶甲基半乳糖醛酸酶(PME)和 PG 不仅比其他酶活性高,而且它们之间还存在协同作用,突显果胶酶是该病菌的主要致病因子^[10-11]。张大智等探讨了芒果细菌性角斑病在发病过程中产生细胞壁降解酶的种类及其在致病过程中的作用,结果发现细胞壁降解酶在病原菌的入侵和致病过程中起重要作用^[12]。果胶酶在病原菌侵染初期最早分泌并起作用,纤维素酶主要降解次生壁,致病作用发生在后期,并且果胶酶比纤维素酶对芒果叶片的致病作用明显^[12]。但本研究发现起主要致病作用的是纤维素酶,纤维素酶活性先达到峰值,之后果胶酶活性才升高,这可能是由于致病菌的不同而导致了二者分泌先后顺序的差异。本研究通过对芒果活体接种叶疫病病菌产生的细胞壁降解酶进行活性分析,也表明 β -葡萄糖苷酶活性最高,Cx、PG、PMG 活性与病菌侵染芒果及叶疫病发生密切相关,进一步明确了细胞壁降解酶在一些病菌致病中起着重要作用,是主要的致病因子的观点。

本研究表明,病原菌侵染宿主时,起主要作用的细胞壁降解酶是 β -葡萄糖苷酶,羧甲基纤维素酶二者都属于纤维素酶,纤维素酶起作用不断分解植物的细胞壁,降低机体免疫力;而在接种之后,PG 与 PMG 开始活跃,二者都属于果胶酶,致病菌开始生长;也即是纤维素酶在病原菌侵染初期最早分泌并起作用,并且纤维素酶比果胶酶对芒果叶片的致病作用明显。

参考文献:

- [1]周荣光,杨兆祥,王金,等. 芒果皮提取物的体外清除自由基作用研究[J]. 云南中医中药杂志,2012,33(2):50-52.
- [2]刘荣光,欧古经,谢燕萍,等. 广西芒果生产与科研考察[J]. 广西农业科学,1995(5):213-217.
- [3]Patil R,Pathak V. Effect of fruit ripeness in relation to synthesis and activity of cell wall degrading enzymes of mango rot pathogens[J]. Indian J Mycol Plant Pathol,1994,24(2):156-157.
- [4]Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry,1976,72(1/2):248-254.
- [5]李敏,高兆银,胡美姣,等. 可可球二孢(*Botryodiplodia theobromae*)细胞壁降解酶对芒果果实致病作用[J]. 果树学报,2011,28(6):1054-1058.

陈丽潇,刘鑫,王跃华,等.抗根肿病大白菜小孢子培养及分子鉴定[J].江苏农业科学,2019,47(10):141-143.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.031

抗根肿病大白菜小孢子培养及分子鉴定

陈丽潇¹,王跃华¹,刘鑫¹,惠麦侠¹,赵利民¹,赵小平²

(1.西北农林科技大学园艺学院,陕西杨凌 712100; 2.陕西省杂交油菜研究中心,陕西杨凌 712100)

摘要:以 10 个抗根肿病大白菜品种为试材,研究影响小孢子出胚的因素,并对 DH 植株进行根肿抗性分子检测。结果表明,基因型是影响出胚的最主要因素,参试的 10 个品种中仅有 3 个出胚,其中 15CR82 出胚率最高,为 3.36 个/蕾。基因型还决定了胚状体的类型及大小,胚的大小对于转绿成苗率有一定影响。一般直径大于 2 mm 的胚状体容易转绿成苗。用根肿抗性基因 *CRa* 的特异分子标记 *CRaEXON4-3* 筛选 DH 群体,获得 27 个携带抗性基因植株。

关键词:大白菜;抗根肿病;游离小孢子培养

中图分类号: S634.103 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)10-0141-03

大白菜(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*)属于十字花科芸薹属芸薹种大白菜亚种,是一种起源于我国的重要蔬菜作物。根肿病是由芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae* Woron)侵染引起的一种世界性病害^[1-2],主要感病植物有大白菜、青菜、芥菜等十字花科蔬菜^[3]。根肿病病菌被归为原生界根肿菌门,其通过侵染十字花科植物根毛导致根部薄壁细胞增生而形成肿瘤^[4],从而影响植物吸水功能^[5],使地上部分生长迟缓、缺水萎蔫^[6]。该病最初于 1737 年被发现在地中海西岸(英国)和欧洲南部(前苏联列宁格勒),由于该病传染力强,传播途径多,感病植物根部释放的休眠孢子在土壤中存活可达 10 年^[7],随后在世界各地的十字花科蔬菜种植区域蔓延扩散。又由于发病初期蔬菜地上部分的症状不明显,不易被发现,使得发病地区减产严重,根肿病又有“根癌”之称,已成为一种世界性难题。

近年来,根肿病的防治方法主要有农业防治、生物防治、化学防治及抗病育种等。而从环境保护、成本、管理难易程度

等方面考虑,选用抗病品种是目前防治根肿病的最佳方案^[8]。游离小孢子培养(isolated microspore culture,简称 IMC)技术是由 Nitsch 在进行花药培养的同时创建和发展的,1982 年德国的 Lichter 率先在甘蓝型油菜上成功地进行了游离小孢子培养,并发现小孢子胚胎及其再生植株的产量远高于花药培养^[9],这引起了育种工作者的浓厚兴趣,此后小孢子培养技术在农作物,尤其是芸薹属蔬菜作物中得到了迅速发展。利用游离小孢子培养技术,可以快速纯化含有抗病基因的植株,并从大量的抗病双单倍体(doubled haploid,简称 DH)群体中,寻找具有优良生物性状的植株作为亲本进行下一步的育种工作。本研究以 10 份市售的抗根肿病大白菜品种为材料,筛选易出胚的基因型材料,并利用根肿抗性基因 *CRa* 分子标记对种质进行筛选,以期为大白菜抗根肿病新品种的选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试抗根肿病大白菜材料为 15CR37、15CR38、15CR53、15CR82、15CR104、15CR121、15CR122、15CR128、15CR132、15CR136,均由西北农林科技大学十字花科蔬菜研究室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 试材准备 材料于 2016 年 10 月 15 日播种于陕西省油菜杂交中心大田,自然条件下春化,常规田间管理,于 2017 年 3 月 26 日始花期至 4 月 22 日终花期取材培养。

1.2.2 游离小孢子培养 在大白菜初花期和盛花期,于每天 08:00—11:30 摘取健壮花序上未开的花蕾,花蕾长度为

收稿日期:2018-03-11

基金项目:国家自然科学基金(编号:31372062);国家重点研发计划(编号:2017YFD0101802);西北农林科技大学科技推广项目(编号:TGZX2017-8);国家大宗蔬菜技术产业体系(编号:CARS-23-G-22)。

作者简介:陈丽潇(1992—),女,湖北十堰人,硕士研究生,主要从事蔬菜生物技术与遗传育种研究。E-mail:chenlixiao920417@163.com。

通信作者:惠麦侠,博士,副教授,主要从事蔬菜生物技术与遗传育种研究。E-mail:maixiahui@163.com。

[6]王麒然,吴菊香,张茹琴,等.花生叶腐病菌分泌的细胞壁降解酶活性测定及致病性分析[J].植物生理学报,2016,52(3):269-276.

[7]高增贵,陈捷,高洪敏,等.玉米茎腐病菌产生的细胞壁降解酶种类及其活性分析[J].植物病理学报,2000,30(2):148-152.

[8]Lalaoui F, Halama P, Dumortier V, et al. Cell wall-degrading enzymes produced *in vitro* by isolates of *Phaeosphaeria nodorum* differing in aggressiveness[J]. Plant Pathol, 2000, 49(6): 727-733.

[9]陈晓林,牛程旺,李保华,等.苹果树腐烂病菌产生细胞壁降解酶

的种类及其活性分析[J].华北农学报,2012,27(2):207-212.

[10]Kang Z, Buchenauer H. Ultrastructural and cytochemical studies on cellulose, xylan and pectin degradation in wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*[J]. J Phytopathol, 2000, 148(5): 263-275.

[11]Thorsten H. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms[J]. Frontiers in Plant Science, 2012, 3: 1-5.

[12]张大智,詹儒林,柳凤,等.杧果细菌性角斑病菌细胞壁降解酶的致病作用[J].果树学报,2016,33(5):585-593.