

甄丹妹,郭景红,韩 兴,等. 玫瑰黄链霉菌活性代谢产物诱导黄瓜白粉病抗性[J]. 江苏农业科学,2019,47(11):148-150.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.11.033

玫瑰黄链霉菌活性代谢产物诱导黄瓜白粉病抗性

甄丹妹¹, 郭景红¹, 韩 兴¹, 李佳露¹, 杨慧慧¹, 李亚宁¹, 刘大群^{1,2}

(1. 河北农业大学植物保护学院/河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心/国家北方山区中心,河北保定 071000;

2. 中国农业科学院研究生院,北京 10081)

摘要:为研究玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 活性代谢产物 RM 对黄瓜幼苗的诱导抗病性,通过筛选不同浓度 RM 对黄瓜白粉病的防效,得出最佳诱导抗性浓度;采用试剂盒对 RM 诱导后接种白粉病菌的黄瓜幼苗进行防御酶活性以及活性氧含量变化情况的检测。试验结果表明,RM 对黄瓜白粉病的最佳诱抗浓度为 100 mg/L,施用 RM 后过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性提高,过氧化氢(H₂O₂)含量升高。

关键词:玫瑰黄链霉菌;诱导抗病性;黄瓜白粉病;过氧化氢酶;过氧化物酶;H₂O₂

中图分类号: S436.421.1⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)11-0148-03

白粉病是黄瓜种植上危害很普遍、发病较严重的病害,黄瓜白粉病在全国各露地和保护地栽培的黄瓜上均普遍发生,一般黄瓜生长中后期病情发展迅速,导致叶片枯黄、植株干枯,条件适宜时,几天时间内,白粉病即可迅速传遍整个温室,造成黄瓜大面积减产^[1]。目前生产上对该病害的防控主要是以化学防治为主,但由于病原菌对化学农药抗药性的产生以及白粉病病情扩展迅速等特点,给其防治带来了很大困难,亟需更加环保、稳定、持久的防治方法和策略。近年来,利用诱导因子诱导植物自身产生抗病性和进行作物免疫的方法作为防治病害更为安全有效、经济实用、环境友好的新措施,越来越受到研究者的关注和重视^[2]。

病原菌侵入植物引起寄主体内一系列生理指标的变化,可能诱导植株产生一些对自己生长有利并且可以在一定程度上抑制病原菌的物质,即诱导植物产生抗病性。苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)等防御酶与植物的抗病反应密切相关,可以作为衡量诱导抗病性的重要指标。余晓燕等研究了粉红单端孢菌体蛋白激酶诱导芒果产生对黑斑病的抗性,POD、过氧化氢酶(CAT)、PPO、 β -1-3 葡聚糖酶、几丁质酶活性都有所增强,并检测到氧爆发^[3];赵建等发现施用寡核腐霉发酵液对番茄叶片细胞膜具有保护性,能降低丙二醛含量,提高超氧化物歧化酶(SOD)、PPO 和 PAL 活性^[4];姚佳采用放线菌发酵液防治油菜菌核病时,发现其可以诱导油菜 SOD、PPO、POD 活性升高^[5];薛磊采用生防链霉菌 ZY153、B49、X4、Z13、S42 诱导棉花抗黄萎病时,发现其可显著提高棉花叶片、根系的 POD、PPO 和 PAL 活性,增加棉花叶片内单宁、二元酚、木质素及游离脯氨酸含

量^[6];暴增海等采用海洋放线菌 BM-2 发酵液诱导黄瓜根部防御酶 PAL、POD、PPO、SOD 活性升高,提高黄瓜对枯萎病的抗性^[7]。另外,活性氧过氧化氢(H₂O₂)是一种可以扩散的小分子,不仅可以直接杀死病原菌,参与膜脂过氧化,介入植物过敏反应(HR),而且过氧化氢还可以导致细胞壁木质化和 HR 细胞的死亡,过氧化氢还可以跨过细胞膜进入侵染点以外的组织中,作为第 2 信使激活防卫基因的表达,最终导致植物对病原菌产生抗性^[8]。一些真菌产生的特异性诱导物能诱导寄主细胞氧化爆发,大豆在 2 种不同的非特异性诱导物 *Verticillium dahliae* 277 和 Oligogalacturonide 作用下,5 min 内即出现氧爆发(ROS)^[9]。冷害、臭氧、重金属、伤害、植物激素和病原物侵染等许多逆境都会产生活性氧,活性氧可以诱导植物激活一些胁迫相关的基因,对抗环境的变化^[10]。此外,在细胞外基质中 H₂O₂ 及其他活性氧的作用不止局限于参与防卫反应,还参与调控细胞壁组分的合成,比如木质素合成^[11]。

玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 是分离自马铃薯疮痂病自然衰退土壤的 1 株生防链霉菌^[12],笔者从该生防菌发酵液中分离到 1 组具有抑菌活性的次级代谢产物,经过分离、提取和结构鉴定,最终确定该活性组分为 2 种五烯大环内酯类抗菌活性代谢产物 RoflAMYCOIN 和 Menmyco-A(简称 RM),并对其结构和制备过程申请了国家发明专利(专利申请号 201710091330.X)。为明确玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 活性代谢产物 RM 诱导植株抗病性的情况及其作用机制,本研究检测分析了 RM 诱导黄瓜幼苗对白粉病的抗性与防御酶 POD、CAT 活性及过氧化氢含量的关系,筛选出 RM 诱导抗病性的最佳浓度,为进一步揭示玫瑰黄链霉菌代谢产物诱导抗病性的生理生化作用机制提供了理论依据,同时也为开发新型植物免疫诱抗剂用于瓜类蔬菜白粉病的防控提供了思路和途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 供试黄瓜品种为津春 3 号,由天津市农业

收稿日期:2018-02-01

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0200900);中药材病虫害综合防控及无公害生产技术研发与示范(编号:HBCT2013040203)。

作者简介:甄丹妹(1992—),女,河北保定人,硕士研究生,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail:15100325833@163.com。

通信作者:李亚宁,博士,教授,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail:yaning22@163.com。

科学院黄瓜研究所提供。

1.1.2 供试菌 供试黄瓜白粉病菌从田间自然发病的黄瓜植株上采集,用小刷子将采来的发病叶片上的白粉孢子刷入无菌水中,用纱布及漏斗将杂质过滤掉制成胞悬液,并向其中加入少量吐温-20。用血球计数板计数,白粉孢子浓度为 2.2×10^5 个/mL。现配现用。

1.2 试验方法

1.2.1 玫瑰黄链霉菌发酵液的制备 将斜面保存的玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上活化培养 7 d 至孢子成熟,将孢子刮下,制成孢子悬浮液,调整孢子浓度为 5×10^8 CFU/mL,向装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中接入 200 μ L 孢子悬浮液,30 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床振荡培养 5 d。

1.2.2 玫瑰黄链霉菌活性代谢产物 RM 的提取 发酵液经 4 500 r/min 离心 30 min,弃上清,菌丝沉淀用约 3 倍体积甲醇浸泡,在超声波清洗器中振荡处理 30 min,滤纸过滤得黄色甲醇溶液,在旋转蒸发仪中 50 $^{\circ}$ C 将甲醇减压蒸发至干,加入适量乙酸乙酯,超声振荡,使其充分混合,可见有黄色粉末状物质逐渐析出,静置 2 h,抽滤得到黄色粉末状物质,即为代谢产物 RM。

1.2.3 RM 诱导抗性最佳浓度的筛选 试验于 2017 年 4 月 10 日至 5 月 30 日在河北农业大学植物保护学院温室进行,将黄瓜种子置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中催芽,待露白时播种于直径为 15 cm 的营养钵中(基质为 $V_{\text{营养土}}:V_{\text{土壤}}=1:1$),温室培养至第 1 张真叶展开、第 2 张真叶展开 2/3 时待用。对温室黄瓜苗先喷施 RM 药剂以及对对照药剂,24 h 后喷施白粉病菌的胞悬浮液。共 9 组处理,每组处理 8 棵苗,定期观察并记录其发病情况。

表 1 温室试验中的药剂处理及浓度

处理	药剂	药剂浓度 (mg/L)
1	RM	20
2	RM	40
3	RM	60
4	RM	80
5	RM	100
6	RM	160
7	RM	320
8	武夷菌素	60
9	清水	

1.2.4 温室诱导抗病性试验 设置 5 个处理:处理 1,无菌水作空白对照(阴性对照);处理 2,水杨酸处理,浓度为 5 mmol/L(阳性对照);处理 3,筛选出的最适浓度的 RM 处理;处理 4,只接白粉病菌;处理 5, RM 处理后接白粉病菌。每个处理 20 盆。

用 100 mg/L 的 RM 溶液喷雾处理黄瓜幼苗,设置阴性对照为水,阳性对照为水杨酸(5 mmol/L),24 h 后接种白粉病菌^[13],分别于处理后 1、3、5、7 d 取样,采用苏州科铭生物技术有限公司试剂盒进行 CAT、POD 活性测定和活性氧 H₂O₂ 含量的测定。

1.2.5 诱抗结果的调查及统计 白粉病病害分级标准:0

级:无病斑;1 级:病斑面积占整个叶面积 5% 及以下;3 级:病斑面积占整个叶面积 6%~10%;5 级:病斑面积占整个叶面积 11%~20%;7 级:病斑面积占整个叶面积 21%~40%;9 级:病斑面积占整个叶面积 40% 以上。

病情指数 = $100 \times \Sigma(\text{各级病叶数} \times \text{各级代表值}) / (\text{调查总叶数} \times \text{最高级代表值})$;

防治效果 = $\frac{\text{对照区病情指数} - \text{处理区病情指数}}{\text{对照区病情指数}} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 RM 诱导黄瓜抗病性最佳浓度的筛选

调查结果如表 2 所示,喷施 80、100、160 mg/L RM 后对白粉病的防效明显高于 60 mg/L 武夷菌素对照处理;喷施 100 mg/L RM 防效最好,因此在后续的温室诱导抗性试验中,选择 100 mg/L RM 进行喷施处理。

表 2 RM 诱导黄瓜抗白粉病的效果

处理	药剂	病情指数	防治效果 (%)
1	20 mg/L RM	1.90	75.73
2	40 mg/L RM	3.00	61.69
3	60 mg/L RM	1.90	75.73
4	80 mg/L RM	1.10	85.95
5	100 mg/L RM	1.06	86.46
6	160 mg/L RM	1.13	85.57
7	320 mg/L RM	1.39	82.25
8	60 mg/L 武夷菌素	2.52	67.82
9	清水对照	7.83	0

2.2 CAT 活性的测定

CAT 是一种诱导酶,由植物本身所引起的 CAT 活性的增加与其抗病性呈正相关。由图 1 可知,喷施 RM 处理后 3 d CAT 活性高于阴性对照(水)处理,低于阳性对照(水杨酸)处理,5 d 时 RM 处理与阴性对照 CAT 活性接近;喷施 RM 后接种白粉病原菌处理的 CAT 活性在处理 5 d 与其他处理差异显著,且达到最大值,表明喷施 RM 后再喷施白粉病原菌处理的 CAT 活性高于只喷施白粉病原菌的处理,喷施 RM 后 CAT 活性在病原菌侵染的条件下增加得更明显。

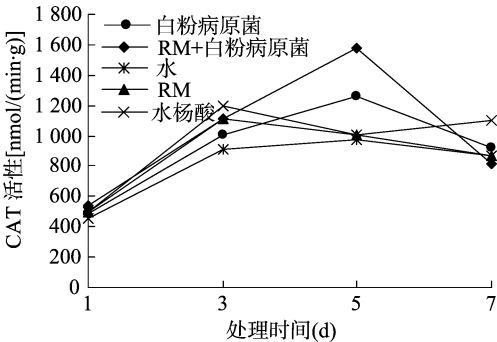


图 1 不同处理后 CAT 活性的变化

2.3 POD 活性的测定

POD 在植物抗逆体系中主要用来消除氧自由基。由图 2 可以看出,喷施 RM 处理后 1~3 d 与喷施水处理的 POD 活性接近,5 d 达到最高值,为 587.65 U/g,喷施水杨酸后 POD 活

性持续升高,在5 d达到最高,喷施水后 POD 活性增加不明显,通过 RM 处理与阳性对照(水杨酸)、阴性对照(水)比较可知,喷施 RM 后可以引起 POD 活性升高,并与阴性对照差异显著;先喷施 RM 再接种白粉病原菌后5 d,POD 活性达到最高值,为679.26 U/g,只接种白粉病原菌的 POD 活性也有所升高,但是,先喷施 RM 后再接白粉病原菌处理的 POD 活性在处理5 d时高于只接种白粉病原菌处理。

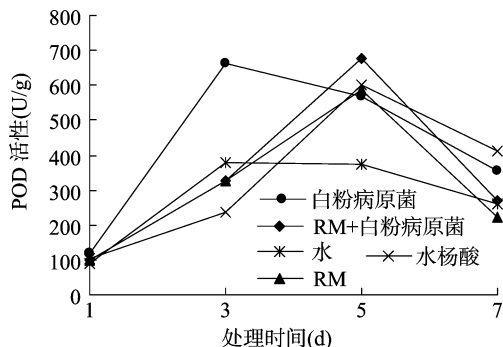


图2 不同处理后 POD 活性变化

2.4 H₂O₂ 含量的测定

过氧化氢属于活性氧的一种,活性氧主要有超氧阴离子、羟自由基和过氧化氢。氧爆发在植株过敏性坏死反应中起着重要的作用,病原菌侵染后的很短时间内,活性氧在侵入点急剧增加。由图3可以看出,喷施 RM 后接种白粉病原菌,在1~3 d,过氧化氢含量增加,对入侵的白粉病菌起到了抵御的作用,在3~7 d,可能由于体内防御酶活性增高,将过氧化氢分解为水,导致 H₂O₂ 含量降低,只接种白粉病原菌处理和喷施 RM 处理的 H₂O₂ 含量在处理3、5 d 稍高于阴性对照;喷施无菌水和水杨酸处理的 H₂O₂ 含量变化不明显。此外喷施 RM 处理后再接种病原菌的 H₂O₂ 含量在3 d 达到最高值,而只喷施白粉病菌的处理则在处理后5 d 达到最高值。

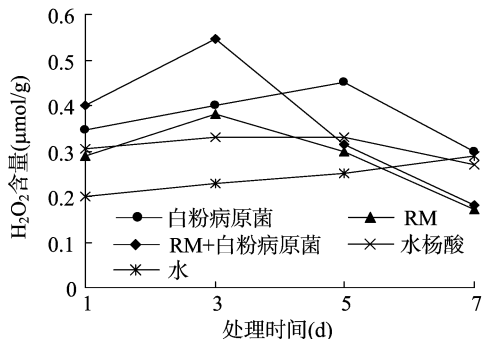


图3 不同处理后 H₂O₂ 含量变化

3 讨论与结论

通过对黄瓜白粉病的温室诱抗试验可以发现,玫瑰黄链霉菌 Men - myco - 93 - 63 产生的活性代谢产物 RM 对防治黄瓜白粉病具有保护作用,其诱导黄瓜产生白粉病抗性的最佳浓度为 100 mg/L。黄瓜叶片喷施 RM 后引起黄瓜植株内过氧化氢含量增高,抵制了白粉病原菌的侵染,酶活性不同程度的增加,并明显高于对照,通过体内防御酶如 POD、CAT 清除活性氧自由基,防止活性氧含量过高对植株的损伤。由于活性氧对细胞的毒害作用,植物细胞具有高效的活性氧清除

机制。活性氧可以被很多酶清除,如参与抗氧化系统的 POD、SOD 和 CAT,它们对于维持抗氧化系统的平衡具有重要作用。Keppler 等使烟草悬浮培养细胞感染野火病细菌后,活性氧大量产生,细菌数量明显下降,但加入 SOD 等活性氧清除剂后,细菌数量增加,并延缓了 HR 的发生^[14]。CAT、POD 等防御酶是存在于植物体内与抵制病原微生物侵染有关的重要酶,RM 诱导后引起 H₂O₂ 含量升高,CAT、POD 活性增强,因此诱导抗病性很可能是玫瑰黄链霉菌 Men - myco - 93 - 63 防病抗病的主要作用机制之一。除了笔者前期研究中发现的 Men - myco - 93 - 63 活性代谢产物具有直接抑菌作用外(数据未发表),该活性产物 RM 还可以诱导黄瓜植株中主要防御酶活性的提高,并且这种诱导作用在病原菌侵染的条件下表现得更为明显。研究 POD、CAT 活性及 H₂O₂ 含量与玫瑰黄链霉菌活性产物诱导黄瓜抗病性的关系,初步证实了 RM 具有诱导抗病性作用,在此基础上,今后还将对 RM 诱抗的信号途径、分子机制进行更为深入的研究。

参考文献:

- [1] 沈虹,尤超,张营营,等. 黄瓜白粉病综合防治研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2017(8):133-137.
- [2] 程智慧,李玉红,孟焕文,等. BTH 诱导黄瓜幼苗对霜霉病的抗性与细胞壁 HRGP 和木质素含量的关系[J]. 中国农业科学,2006,39(5):935-940.
- [3] 余晓燕,毕阳,李永才,等. *Trichothecium roseum* 蛋白激酶诱导杏果抗黑斑病的作用机理[J]. 食品科学,2015,36(4):254-259.
- [4] 赵建,黄建国,袁玲,等. 寡雄腐霉发酵液对番茄生长的影响及对灰霉病的防治作用[J]. 生态学报,2014,34(23):7093-7100.
- [5] 姚佳. 放线菌发酵液对油菜菌核病的生物防治研究[D]. 雅安:四川农业大学,2010.
- [6] 薛磊. 棉花黄萎病生防链霉菌的抗病促生作用及其机制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2013.
- [7] 暴增海,马桂珍,王淑芳,等. 海洋放线菌 BM-2 菌株对黄瓜的促生作用和诱导抗性研究[J]. 作物杂志,2013(5):94-98.
- [8] Zamioudis C, Stringlis G, Berendsen R L. Induced systemic resistance triggered by beneficial microbes[C]. Abstracts of ICPP 2013 10th International Congress of Plant Pathology,2013.
- [9] Apostol I, Heinsteins P F, Low P S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: role in defense and signal transduction[J]. Plant Physiology,1989,90(1):109-116.
- [10] You J, Chan Z L. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants[J]. Frontiers in Plant Science,2015,6:1092.
- [11] Slesak I, Libik M, Karpinska B, et al. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses[J]. Acta Biochimica Polonica,2007,54(1):39-50.
- [12] Liu D Q. Biological control of *Streptomyces scabies* and other plant pathogens[D]. Minnesota:University of Minnesota,1992.
- [13] 郭敬华,孟庆芳,李亚宁,等. 玫瑰黄链霉菌 Men - myco - 93 - 63 发酵液对黄瓜白粉病抗性的影响[J]. 华北农学报,2007,22(增刊1):1-4.
- [14] Keppler L D, Beltsville M D, Baker C J. O₂⁻ - initiated lipid peroxidation in a bacteria - induced hypersensitive reaction in tobacco cell suspensions[J]. Phytopathology,1989,79(5):555-562.