

赵 静,常继东,郑丽君,等. 对羟基苯甲酸对尖孢镰刀菌生物学特性及侵染毒力的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(22):291-294.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.22.052

对羟基苯甲酸对尖孢镰刀菌生物学特性及侵染毒力的影响

赵 静¹, 常继东², 郑丽君³, 王志远⁴

(1. 玉溪师范学院化学生物与环境学院, 云南玉溪 653100; 2. 云南省新平县杨武镇卫生院, 云南新平 653400;

3. 云南省玉溪市质量技术监督综合检测中心, 云南玉溪 653100; 4. 德宏师范高等专科学校生命科学系, 云南德宏 678400)

摘要:明确对羟基苯甲酸对尖孢镰刀菌侵染毒力的影响, 可为克服三七连作障碍提供有效的策略。结合荧光素二乙酸酯-碘化丙啶(FDA-PI)染色及马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板萌发法, 分析不同浓度下对羟基苯甲酸与尖孢镰刀菌孢子活性的相关性; 采用酶学法分析不同浓度下对羟基苯甲酸对真菌纤维素酶分泌的影响。FDA-PI 染色结果表明, 当对羟基苯甲酸浓度为 5 mmol/L 时, 尖孢镰刀菌产孢数量最多, 孢子活性最强。PDA 平板萌发测定结果显示, 对羟基苯甲酸浓度为 1 mmol/L 时, 尖孢镰刀菌孢子的平均萌发率为 58.05%, 孢子萌发率最高。低浓度的对羟基苯甲酸胁迫下, 尖孢镰刀菌分泌的纤维素酶活性增加, 而高浓度下降低; 对羟基苯甲酸浓度为 5 mmol/L 时, 纤维素酶活性最高, 峰值出现在培养 4 d 时, 达到 1.57 U/mL, 是相同时间下对照的 5.6 倍。研究表明, 低浓度对羟基苯甲酸(1~5 mmol/L)胁迫有利于尖孢镰刀菌孢子生长, 且提高其分泌的纤维素酶活性。

关键词:对羟基苯甲酸; 尖孢镰刀菌; 孢子活性; 纤维素酶

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)22-0291-04

三七根腐病是三七生产中的一类重要病害, 不仅影响三七产量, 更影响三七质量, 其中以镰刀菌型根腐病最为多见^[1]。在三七栽培中, 随着连作年限的延长根腐病发病率明显增加^[2]。根腐病的发生与连作条件下植物根系分泌物对病原菌的化感

作用有密切关系。研究三七根系分泌物对病菌的化感致病性是解析连作条件下根腐病形成机制的有效途径。

在植物的生长发育过程中, 根系作为植物与土壤的接触部分, 不仅从土壤中吸收水分和养分, 还通过分泌的方式向周围释放一些无机离子和有机化合物, 这些物质是一类复杂的混合物, 是植物连作对根际土壤微生物产生影响的重要媒介之一, 参与植物与周围环境的物质交换与信号传递, 是根际最为重要的营养和能量来源, 也是构成植物不同根际微生态特征的关键因素^[3-5]。对羟基苯甲酸为酚

收稿日期:2020-03-13

基金项目:云南省科技厅青年基金(编号:2017FD160)。

作者简介:赵 静(1983—), 女, 云南玉溪人, 博士, 副教授, 主要从事作物病虫害与防治研究。E-mail:hujun_maolv@163.com。

通信作者:王志远, 博士, 副教授, 主要从事作物病虫害与防治研究。

E-mail:yuan33441@sina.com。

[15] 欧春平, 夏 军, 王中根, 等. 土地利用/覆被变化对 SWAT 模型水循环模拟结果的影响研究——以海河流域为例[J]. 水力发电学报, 2009, 28(4): 124-129.

[16] 曹丽娟, 张冬峰, 张 勇, 等. 中国当代土地利用变化对黄河流域径流影响[J]. 大气科学, 2008, 32(2): 300-308.

[17] 于志磊, 秦天玲, 王 刚, 等. 川江流域土地利用时空格局动态变化特征[J]. 南水北调与水利科技, 2016, 14(2): 38-43, 61.

[18] 张 琳, 杨晓玉. 大清河流域土地利用变化[J]. 黑龙江水利科技, 2015, 43(10): 12-14.

[19] 祝琳丹. 潜江市土地利用/土地覆被时空格局变化及预测研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2013.

[20] 韦海航, 郑芊卉, 庄家尧, 等. 竹山县土地利用景观格局动态变化分析[J]. 林业资源管理, 2018, 12(6): 78-85.

[21] 李艳忠, 刘昌明, 刘小莽, 等. 植被恢复工程对黄河中游土地利用/覆被变化的影响[J]. 自然资源学报, 2016, 31(12): 2005-2020.

[22] 严登华, 王 浩, 张建业, 等. 生态海绵智慧流域建设——从状态改变到能力提升[J]. 水科学进展, 2017, 28(2): 302-310.

[23] 徐 岚, 赵 羿. 利用马尔柯夫过程预测东陵区土地利用格局的变化[J]. 应用生态学报, 1993, 4(3): 272-277.

[24] 马亚鑫, 丛 辉, 周维博, 等. 西安市土地利用景观格局动态演变及驱动力分析[J]. 西北林学院学报, 2017, 32(4): 186-192.

[25] 秦罗义, 白晓永, 王世杰, 等. 近 40 年来贵州普定典型喀斯特高原景观格局变化[J]. 生态学杂志, 2014, 33(12): 3349-3357.

[26] 丁一汇, 李维京, 庄丽莉, 等. 我国 2000 年干旱情况分析与发展趋势展望[J]. 气象, 2000, 26(10): 3-9.

酸类化感物质,是自然界中常见的化合物,存在于高等植物、微生物、苔藓和土壤中。酚酸类物质是导致作物产生连作障碍的主要因素,它可以直接或间接地促进或抑制微生物生长,进而影响作物生长。Ren 等研究了丛枝菌根定殖是否能缓解西瓜枯萎病,改变植物对病原菌的反应,结果表明,丛枝菌根的侵染抑制了西瓜根和根际病原菌的生长,使病害指数降低了 89.3%,这是因为丛枝菌根的侵染改变了根系分泌物,抑制了西瓜枯萎病菌孢子的萌发^[6]。郝文雅等以不同抗性西瓜品种以及化感水稻品种为试验对象,对其根系分泌物中可溶性糖和游离氨基酸的含量和组成进行分析,并研究了氨基酸对西瓜专化型尖孢镰刀菌生长的影响,结果表明,西瓜的根系分泌物能够促进镰刀菌孢子萌发和产孢,而水稻根系分泌物却具有反向作用^[7]。

本研究拟探究对羟基苯甲酸胁迫下尖孢镰刀菌的生物学特性及致病力,以探明对羟基苯甲酸对尖孢镰刀菌的化感作用,以期为连作条件下根腐病的发生及病害防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌株及试验时间

尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)由云南农业大学植物病理学重点实验室惠赠。试验于 2019 年在玉溪师范学院分子生物学实验室进行。

1.2 孢子活性的检测

1.2.1 孢子悬浮液的制备 将尖孢镰刀菌菌株分别在含有 1、5、10、50 mmol/L 对羟基苯甲酸的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基中于 26℃ 下振荡培养 7 d,以不添加对羟基苯甲酸的 PDA 培养基为对照(CK)。将培养好的病原菌孢子混合液依次用 200 目(孔径 0.075 mm)和 300 目(孔径 0.048 mm)筛网过滤,去除菌丝和培养基杂质。然后取 30 mL 滤液于 50 mL 离心管中,在 5 000 r/min 下离心 5 min,去上清液后以无菌水进行重悬并离心,重复 2~3 次。用磷酸缓冲盐溶液(PBS, pH 值为 7.4)将孢子重悬。

1.2.2 FDA-PI 荧光染液的配制、染色及孢子死亡率的计算 荧光素二乙酸酯-碘化丙啶(FDA-PI)荧光染液的配制及染色参照柴阿丽等的方法^[8],尖孢镰刀菌孢子悬浮液染色后于荧光显微镜下观察,采用血细胞计数器根据孢子着色情况计算孢子死亡率。

1.3 孢子萌发率的计算

制备对羟基苯甲酸浓度分别为 1、5、10、50 mmol/L 的 PDA 培养基,以不添加对羟基苯甲酸的 PCA 培养基为对照(CK)。把灭过菌的微孔滤膜平铺在制备好的 PDA 平板上,使微孔滤膜平铺于培养基表面,把制备的孢子悬浮液平铺在滤膜上,用三角玻璃棒将菌悬液涂布均匀(每个平板涂布 70 μ L 菌悬液),用封口膜封口后置于 28℃ 下培养,5~8 h 后制作玻片观察并记录孢子的萌发情况,每个处理重复 3 次,每个样本检查 100 个孢子,统计孢子萌发率。

1.4 酶活性的测定

纤维素酶活性的测定采用羧甲基纤维素钠(CMC-Na)法。

2 结果与分析

2.1 FDA-PI 荧光染色效果观察和孢子死亡率的计算

尖孢镰刀菌新鲜孢子悬浮液利用 FDA 染液单染后,在荧光显微镜下,活孢子呈亮绿色荧光(图 1-a);经加热致死的孢子利用 PI 染液单染后,死孢子发出红色荧光(图 1-b)。取 1 mL 新鲜孢子悬浮液与 1 mL 加热致死的孢子悬浮液混合均匀,经 FDA-PI 染液染色后,在荧光显微镜下可明显观察到发出红色荧光的死孢子和发出绿色荧光的活孢子(图 1-c)。上述结果表明,采用 FDA-PI 染色方法能较好地对比尖孢镰刀菌孢子的死活进行判断,其中活孢子呈绿色荧光,死亡孢子呈红色荧光。

由表 1 可知,在不同浓度(0、1、5、10、50 mmol/L)对羟基苯甲酸胁迫下,尖孢镰刀菌产孢数量有较大区别。其中,对羟基苯甲酸浓度为 5 mmol/L 时产孢数量最多,经血细胞计数器检测得出,孢子数量为 180 万个/mL,其次为含 1 mmol/L 对羟基苯甲酸的培养基,产孢数量为 170 万个/mL。对羟基苯甲酸浓度为 50 mmol/L 时不产孢子。经 FDA-PI 双染后死孢子在荧光显微镜下呈红色,活孢子呈绿色。在 0、1、5、10 mmol/L 对羟基苯甲酸胁迫下,尖孢镰刀菌孢子死亡率分别为 79%、75%、64%、70%,悬浮液中孢子死亡个数分别为 94.8 万、127.5 万、115.2 万、56.0 万个/mL。当对羟基苯甲酸浓度为 5 mmol/L 时,尖孢镰刀菌产孢数量最多,经 FDA-PI 染色后,孢子存活率也最高。

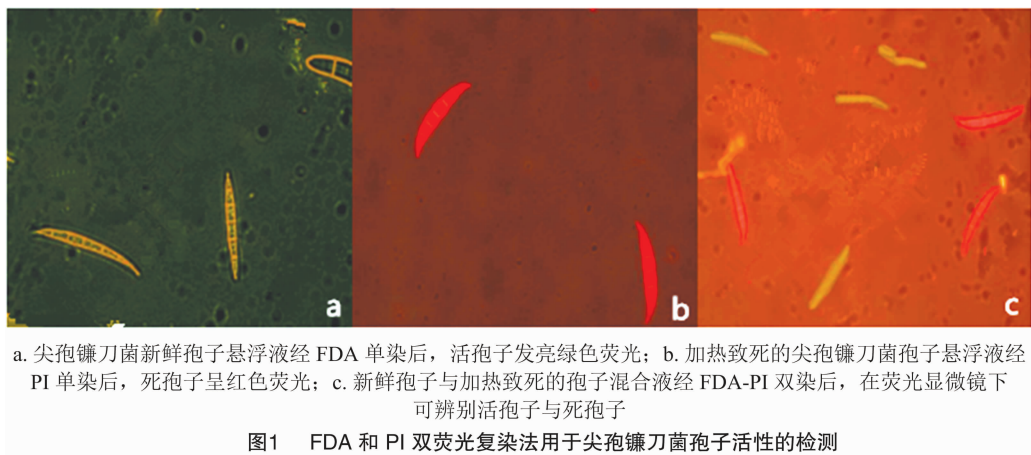


表 1 对羟基苯甲酸胁迫下尖孢镰刀菌产孢量及孢子死亡率

对羟基苯甲酸浓度 (mmol/L)	孢子总数 (万个/mL)	活孢子数量 (万个/mL)	死孢子数量 (万个/mL)	孢子死亡率 (%)
0	120.0 ± 0.6b	25.2 ± 1.0c	94.8 ± 1.0c	79
1	170.0 ± 1.2b	42.5 ± 0.6c	127.5 ± 1.0c	75
5	180.0 ± 2.1b	64.8 ± 1.2c	115.2 ± 1.5c	64
10	80.0 ± 11.1a	24.0 ± 8.5b	56.0 ± 4.9b	70
50	0	0	0	—

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.2 对羟基苯甲酸胁迫下尖孢镰刀菌孢子的萌发率

采用 PDA 平板法观察孢子的萌发情况,结果发现,在对羟基苯甲酸浓度为 1、5 mmol/L 的培养基中,孢子萌发最早,萌发时间为 5.5 h。其次为对照,萌发时间为 6 h。对羟基苯甲酸浓度为 10 mmol/L 时,萌发时间为 11 h,而羟基苯甲酸浓度为 50 mmol/L 时,尖孢镰刀菌孢子无萌发。

由图 2 可知,不同浓度对羟基苯甲酸胁迫下,尖孢镰刀菌孢子的萌发率不同,其中 CK 组的平均萌发率为 42.45%;对羟基苯甲酸浓度为 1 mmol/L 时,孢子萌发率最高,平均萌发率为 58.05%;对羟基苯甲酸浓度为 5 mmol/L 时,孢子的萌发率低于浓度为 1 mmol/L 时,平均萌发率为 50.8%,对孢子的萌发仍有促进作用,但促进作用减缓;对羟基苯甲酸浓度为 10 mmol/L 时,孢子萌发率低于空白对照组,平均萌发率为 29.5%,对孢子的萌发开始有抑制作用;当对羟基苯甲酸浓度 50 mmol/L 时,完全抑制孢子的萌发,孢子平均萌发率为 0。

2.3 对羟基苯甲酸胁迫下纤维素酶活性的变化

植物细胞壁主要由纤维素、半纤维素、木质素

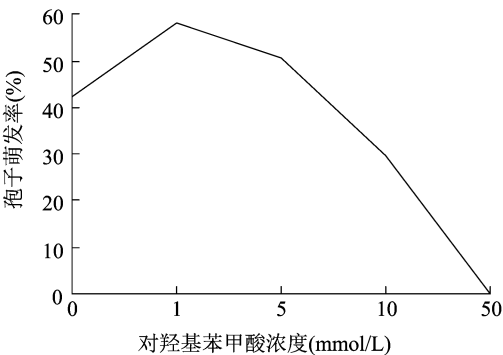


图2 对羟基苯甲酸胁迫下尖孢镰刀菌孢子萌发率

和壁蛋白等组成。其中,纤维素是构成细胞壁的骨架物质^[9]。植物细胞壁是植物健康的保障,病原菌可以通过入侵植物细胞壁,分泌细胞壁降解酶使植物受到侵染而感病^[10]。因此,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^[11]。由图 3 可知,在低浓度的对羟基苯甲酸胁迫下,尖孢镰刀菌分泌的纤维素酶活性增加,而高浓度下降低。对羟基苯甲酸浓度为 5 mmol/L 时,纤维素酶活性最高,峰值出现在培养 4 d 时,达到 1.57 U/mL,是相同时间下对照的 5.6 倍。由此可以得知,低浓度对羟基苯甲酸有利于尖孢镰刀菌入侵植物组织。

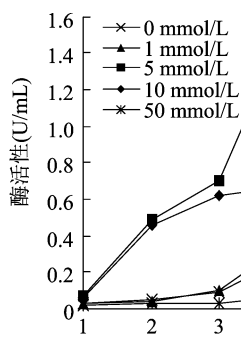


图3 对羟基苯甲酸胁迫下尖孢镰刀菌产生的纤维素酶活性

3 讨论

研究表明,酚酸类物质是导致作物产生连作障碍的主要因素,它可以直接或间接地促进或抑制微生物生长,进而影响作物生长^[12]。马燕会等通过盆栽试验及高效液相色谱(HPLC)技术发现,对羟基苯甲酸可增加根系分泌物中对镰刀菌生长具有促进作用的氨基酸种类和含量^[13]。甄文超等研究发现,对羟基苯甲酸可提高草莓根际镰刀菌的数量,致使根际微生物组成由“细菌型”向“真菌型”转变^[14]。在前期研究中,笔者已明确从三七重茬土壤中提取到的29种化感物质对尖孢镰刀菌具有明显的化感作用^[15]。本研究中,对羟基苯甲酸在低浓度下可增加孢子产孢活性,促进孢子的萌发,最适宜的浓度为5 mmol/L,该浓度下,尖孢镰刀菌产孢数量最高,且通过FDA和PI双荧光复染法检测得出,孢子存活率最高,死亡率最低,另外在该浓度下尖孢镰刀菌分泌的纤维素酶活性也最高。

荧光素二乙酸酯(fluorescein diacetate, FDA)可以自由通过细胞膜,被非特异性酯酶分解产生荧光素,并积蓄在活细胞内产生荧光^[16]。碘化丙啶(propidium iodide, PI)不能透过完整的细胞膜,但能够透过死细胞的细胞膜而使细胞核被染红^[16]。本研究中,在对羟基苯甲酸胁迫下,利用FDA-PI染色及PDA平板萌发法检测孢子活性,发现在相同浓度对羟基苯甲酸胁迫下,PDA平板萌发法测定的孢子活性更强。如当对羟基苯甲酸浓度为5 mmol/L时,PDA平板萌发法测得的孢子平均萌发率为50.8%;而通过FDA-PI染色法得出,活孢子比例为37%,远低于平板萌发法。这说明FDA-PI染色

剂对孢子活性具有一定的抑制作用,但相较于PDA平板萌发法方便、快捷。

参考文献:

- [1] Miao C P, Mi Q L, Qiao X G, et al. Rhizospheric fungi of *Panax notoginseng*: diversity and antagonism to host phytopathogens [J]. Journal Ginseng Research, 2016, 40(2): 127-134.
- [2] 毛中顺, 龙月娟, 朱书生, 等. 三七根腐病研究进展[J]. 中药材, 2013, 36(12): 2051-2054.
- [3] Berendsen R L, Pieterse C M J, Bakker P A H M. The rhizosphere microbiome and plant health [J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(8): 478-486.
- [4] 李吉. 怀牛膝连作对根际土壤微生物群落结构和功能多样性的影响[D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [5] 李春宏, 殷剑美, 王立, 等. 连作对芋头根际土壤理化性状和微生物特性的影响[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(4): 825-833.
- [6] Ren L X, Zhang N, Wu P, et al. Arbuscular mycorrhizal colonization alleviates *Fusarium* wilt in watermelon and modulates the composition of root exudates [J]. Plant Growth Regulation, 2015, 77(1): 77-85.
- [7] 郝文雅, 沈其荣, 冉炜, 等. 西瓜和水稻根系分泌物中糖和氨基酸对西瓜枯萎病原菌生长的影响[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(3): 77-82.
- [8] 柴阿丽, 韩云, 武军, 等. 基于FDA-PI双荧光复染法的茄病镰刀菌孢子活性检测[J]. 中国农业科学, 2015, 48(14): 2757-2766.
- [9] 陈玉. 天然纤维素超微结构层次及不同内切纤维素酶降解特异性的研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [10] 杨郑州, 黄柳芳, 谢晓娜, 等. 叶疫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.
- [11] 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.
- [12] 谢越, 肖新, 周毅, 等. 5种酚酸物质对滁菊扦插幼苗生长及酶活性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(6): 19-24.
- [13] 马燕会, 齐永志, 赵绪生, 等. 自毒物质胁迫下不同草莓品种枯萎病抗性变化的研究[J]. 河北农业大学学报, 2012, 35(2): 93-97.
- [14] 甄文超, 曹克强, 代丽, 等. 连作草莓根系分泌物自毒作用的模拟研究[J]. 植物生态学报, 2004, 28(6): 828-832.
- [15] 赵静, 张晓东, 王连春, 等. 三七重茬根际土壤中化感物质的测定及其对三七根腐菌的生长作用[J]. 中国微生物学杂志, 2018, 30(2): 146-154.
- [16] Schumacher T E, Eynard A, Chintala R. Rapid cost-effective analysis of microbial activity in soils using modified fluorescein diacetate method [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(6): 4759-4762.