ACTA AGRICULTURAE BOREALI-SINICA 华北农学报·2007, 22(增刊): 1-4

玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 发酵液对黄瓜白粉病抗性的影响

郭敬华, 孟庆芳, 李亚宁, 杨文香, 张 汀, 周 锟, 刘大群

(1.河北农业大学 植物保护学院,河北 保定 071001;
2.河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心,河北 保定 071001)

摘要: 药效试验表明,玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 发酵液对黄瓜白粉病有良好的防效,其中发酵液保护作用的防效为 88.63%,治疗作用的防效为 82.26%,表明该发酵液对黄瓜白粉病的防治既有保护作用又有治疗作用。通过对喷施发酵液后黄瓜叶片内的抗病相关酶的活性的测定发现,喷施 Men-myco-93-63 发酵液后黄瓜叶片内 POD, CAT, PAL, PPO 等酶的活性在一定时间内有明显上升的趋势。

关键词: 链霉菌 Men-myco-93-63; 发酵液; 黄瓜白粉病; 酶活性

中图分类号: S432.2+3　　文献标识码: A　　文章编号: 1000-7091(2007)增刊-0001-04

Effect of the Fermentation Broth of *Streptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63 on the Resistance of Cucumber Powdery Mildew

GUO Jing-hua, MENG Qing-fang, LI Ya-ning, YANG Wen-xiang, ZHANG Ting, ZHOU Kun, LIU Da-qun

(1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;
2. Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001, China)

Abstract: The significant controlling effect of the fermentation broth of *Stremptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63 on cucumber powdery mildew were proofed through the efficacy test. There are two kinds of controlling effect of the fermentation. One is the protecting effect, which was 88.63% in our test. Another is treating effect, which was 82.26%. Several resistance-related enzymatic activities of the leaves of cucumber were detected, such as peroxidase (POD), catalase (CAT), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), and polyphenol oxidase (PPO). All of the activities of these enzymes in the treated cucumber seedlings were higher than those in the untreated at the certain periods.

Key words: *Stremptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63; Fermentation; Cucumber powdery mildew; Enzymatic activity

黄瓜白粉病是由瓜类白粉菌(*Sphaerotheca fuliginea*)引起的一种潜育期短、再侵染频繁、流行性强的叶斑病,是黄瓜生产上的主要病害之一。随着保护地栽培的发展,它的危害越来越严重[1]。目前,生产上主要采用化学药剂防治该病,但由于长期大量使用,使得抗药性、高残留、污染环境等不利影响日益突出,高效、低毒、无残留的生物农药成为发展的热点。2004 年,杨文香等研究了 3 株链霉菌 M63, S15 和 S93 对黄瓜白粉病及黄瓜生长的影响,结果表明,3 株链霉菌对黄瓜白粉病具有保护性防治作用。本实验室研究发现,拮抗菌 Men-myco-93-63 发酵液对田间瓜类白粉病的防病效果达 90% 以上,但对其作用机理尚未明确。本研究针对拮抗菌 Men-myco-93-63 发酵液对黄瓜植株内的苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化氢酶(CAT)活性的影响进行了研究,以期揭示其生理作用机理。

1 材料和方法

1.1 供试黄瓜品种及菌种

黄瓜品种: 感病品种长春密刺(购自黑龙江哈尔滨市香坊区种子公司); 白粉病菌: 黄瓜白粉病菌

收稿日期: 2007-03-20
基金项目: 国家 863 计划(2006AA10A211); 河北省科学技术研究与发展计划(05547005D-2); 河北农业大学 9816 项目
作者简介: 郭敬华(1977-), 女, 河北邯郸人, 在读硕士, 主要从事植物病害生物防治研究工作
通讯作者: 刘大群(1958-), 男, 河北石家庄人, 博士生导师, 从事植物病害生物防治和分子植物病理学研究。

(*Sphaerotheca fuliginea*)(采自河北农科院植保所温室);生防菌株:玫瑰黄链霉菌(*Streptomyces roseoflavus*) Men-myco-93-63(河北农业大学生防室提供)。

1.2 供试黄瓜植株的培养

将黄瓜种子置于28℃培养箱中催芽,待露白时播于盛有草碳、珍珠岩的穴盘内于23℃、光照循环为16 h/8 h光照培养箱内培养,待黄瓜长至二叶期时备用。

1.3 黄瓜白粉菌的保存及其孢子悬浮液的制备

1.3.1 菌种的保存 待黄瓜第2片真叶长出后,将白粉菌分生孢子抖落于黄瓜植株上,培养4~5 d,待叶片上形成白色粉状病斑,用于试验接种并定期在新的植株上保存和繁殖菌种,每隔10 d繁殖1次,供试验用。

1.3.2 孢子悬浮液的制备 接种前24 h抖去叶片上老的分生孢子,使接种体保持新鲜一致。用毛笔将分生孢子刷入盛有清水的烧杯中配浓度为10 x 10倍镜下每视野20个分生孢子左右的悬浮液。使用时现配现用。

1.4 试验处理

保护作用:在黄瓜苗上喷Men-myco-93-63发酵液24 h后在其叶片上喷白粉菌孢子悬浮液(+F+P),喷清水不接菌(+W-P)、喷发酵液不接菌(+F-P)和喷清水后24 h接菌(+W+P)4个处理。

治疗作用:在黄瓜苗上接种白粉菌孢子悬浮液24 h后在其叶片上喷Men-myco-93-63发酵液(+P+F),不接菌喷清水(-P+W)、不接菌喷发酵液(-P+F)和接菌后24 h喷清水(+P+W)4个处理。

分别在以上处理后的0,1,3,5,7 d取样测POD,PAL,CAT及PPO的活性,每个处理重复3次。

1.5 酶活性的测定方法

POD的提取及活性测定:准确称取植物叶组织0.5 g,放于研钵中加5 mL 0.2 mol/L的磷酸缓冲液(pH 6.0)在冰浴中研磨匀浆,将滤液在10 000 r/min,0~4℃下离心20 min,上清液为酶粗提液,4℃保存备用。采用愈创木酚法[3]测定吸光度值。

PAL的提取及活性测定:准确称取植物叶组织0.5 g放入研钵中,加3 mL 5 mmol/L的巯基乙醇硼酸缓冲液、0.1 g聚乙烯吡咯烷酮(PVP)在冰浴条件下研磨匀浆。将滤液在10 000 r/min,0~4℃下离心20 min,上清液为酶粗提液,4℃保存备用。采用李靖等[4]的方法测定吸光度值。

PPO和CAT的提取及活性测定:准确称取植物叶组织0.5 g,放于研钵中加5 mL 0.05 mol/L的磷酸缓冲液(pH6.8)冰浴条件下研磨匀浆,将滤液在15 000 r/min,0~4℃下离心20 min,上清液为粗提液,4℃保存备用。PPO采用李靖等[4]的方法测定吸光度值,CAT采用Cakmak法[5]测定吸光度值。

2 结果与分析

2.1 发酵液和接种对**POD**活性的影响

从图1-A可以看出,当发酵液用作保护剂时,接菌前,处理组与对照组酶活性相近。在接菌后,处理组叶片内过氧化物酶活性明显上升,第2~3天时即达到峰值,此时酶活为未喷施发酵液时的2.5倍,并且比同时期的清水对照处理的酶活高40%,第3天后酶活开始下降,第7天后趋于平缓,活性几乎与对照组的活性相同,但仍高于对照处理。总体来说对照组的过氧化物酶活性也在逐步升高,但趋势较为平缓。清水对照组的酶活高峰出现在处理的4~5 d,晚于接菌发酵液处理。

从图1-B可以看出,当发酵液用作治疗剂时,在喷施药剂前,接菌的叶片内的POD活性已经开始上升。喷施发酵液后,处理组的酶活在喷发酵液后第1 d即达到峰值,此时比清水对照组高约50%,表现出明显差异。随后酶活平缓下降,第7天后达到低点,但仍高于清水对照组。同处理的清水对照组的酶活性变化不大。

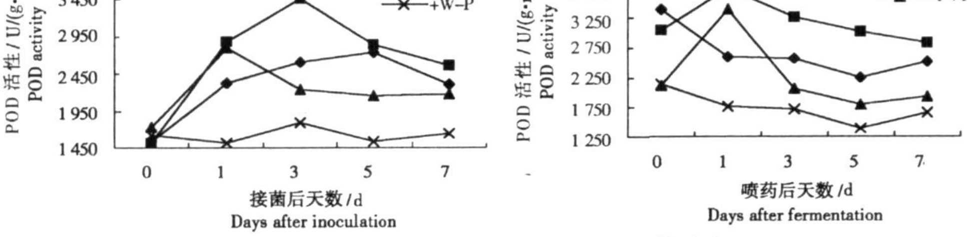

图1 发酵液和接种对黄瓜**POD**活性的影响

Fig 1 Effect of fermentation liquid and inoculation on POD activity in cucumber

当黄瓜叶片上不接菌,只喷发酵液时,与清水对照相比,叶片内的过氧化物酶的活性也表现出了明

显的变化。未喷发酵液前处理组与对照组的酶活一致, 在喷发酵液后, 处理组叶片内 POD 活性明显上升, 在第 1 天时即达到高峰, 比同时期对照组叶片内酶活高一倍。第 3 天后处理组叶片内酶活开始下降, 但直到第 7 天酶活仍高于清水对照组。

2.2　发酵液和接种对 CAT 活性的影响

从图 2-A 可以看出, 当用发酵液作保护剂时, 未接菌时 2 组处理的叶片内 CAT 活性基本一致。但接菌后处理组的过氧化氢酶活性明显上升, 到第 3 天时达到最高峰, 随后开始下降, 但仍然稳定在一个比较高的水平上。而清水对照组的酶活性值表现的比较稳定。在第 3 天时, 处理组的植株叶片内酶活比对照组高 30%, 在第 3 天以后处理组的酶活性也一直比对照组高 20% 左右, 无论与对照组相比还是与接菌前相比, Men-myco-93-63 发酵液均引起了显著的酶活变化。

从图 2-B 可以看出, 当发酵液用作治疗剂时, 与不接菌的植株相比, 喷药前的植株叶片内已经存在相当含量的 CAT, 但是活性差异不显著。喷药后第 1 天处理组的酶活上升至最高峰, 比同时期的对照处理的酶活性高 50%。随后处理组酶活平缓下降, 但是始终高于清水对照组。清水对照组的酶活变化不显著。

当单独喷施发酵液不接菌时, 酶活的高峰期在喷药后的第 1 天即出现, 并且高于同时期接菌后的清水对照组 40%。之后酶活迅速降低, 到第 7 天与清水对照基本相同。清水对照组的变化不明显。

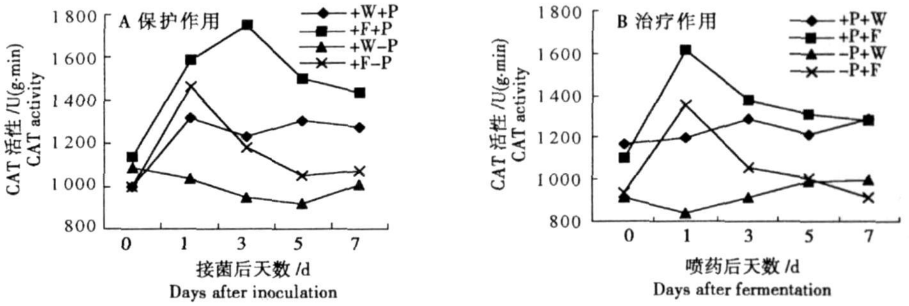

图 2　发酵液和接种对黄瓜 **CAT** 活性的影响

Fig. 2　Effect of fermentation liquid and inoculation on CAT activity in cucumber

2.3　发酵液和接种对 PPO 活性的影响

从图 3-A 可以看出, 当发酵液用作保护剂时, 未接菌时各处理的酶活的差异不显著。在接菌 1 d 后喷药处理组多酚氧化酶的活性即升至高峰, 比对照组高 60%, 酶活性差异显著。在第 3 天下降后继续缓慢升高, 并且始终高于对照组。

从图 3-B 可以看出, 当发酵液用作治疗剂时, 与不接菌的处理相比, 接菌后的叶片酶活性很高, 但接菌的 2 个处理间酶活性差异不显著。接菌 1 d 后, 接菌后的处理组酶活上升至高峰, 但只比其对照组高 20%, 随后活性开始下降。对照组的酶活性变化很大, 但和对照组相比, 药剂处理后的黄瓜叶片内酶活性始终高 15% 以上。

当单独喷施发酵液时, 未喷施发酵液前叶片内多酚氧化酶的活性基本一致, 但在喷药后的第 1 天迅速上升到最高点, 随后开始平缓下滑, 但与不接菌的对照组相比, 多酚氧化酶活性始终维持在一个较高的水平, 甚至始终高于同时期接菌的发酵液处理的叶片酶活。

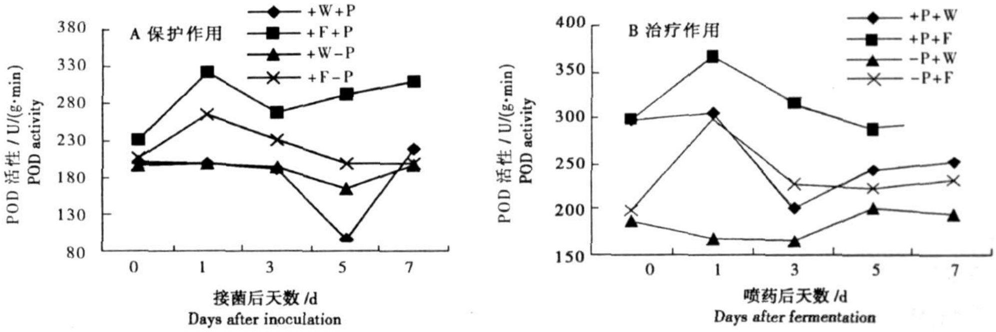

图 3　发酵液和接种对黄瓜 **PPO** 活性的影响

Fig 3　Effect of fermentation liquid and inoculation on PPO activity in cucumber

2.4　发酵液和接种对 PAL 活性的影响

从图 4-A 可以看出, 当发酵液用作保护剂时, 接菌前各处理叶片内的酶活一致。接菌后的处理组叶片内酶活迅速上升, 在第 2~ 3 天达到高峰, 随后开始下降。在活性高峰时, 比同处理的对照组高 1.7 倍。到第 7 天时, 酶活性和对照组基本相同。相对

而言,清水对照组的酶活性变化较为平缓,且基本保持不变。

从图4-B可以看出,当其用作治疗剂时,喷药后第1天发酵液处理组的酶活达到峰值,比同时期其对照组的酶活高47%。随后酶活开始下降,同时对照组有一个缓慢上升的过程,但到第7天时,喷药后的黄瓜叶片内苯丙氨酸解氨酶活性仍略高于清水对照。

当单独喷施发酵液时,苯丙氨酸解氨酶的活性也有明显变化。其高峰出现在喷药1 d后,酶活开始下降,到第5天时活性变化不太明显。而且,喷发酵液但不接菌的黄瓜叶片内PAL酶活始终高于同时期的接菌和不接菌的清水对照处理。

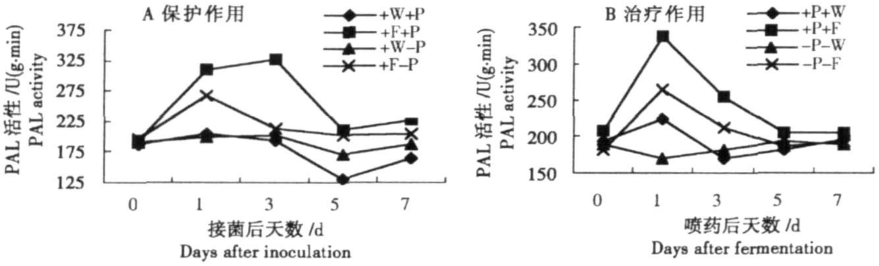

图4 发酵液和接种对黄瓜PAL活性的影响

Fig 4 Effect of Fermentation liquid and inoculation on PAL activity in cucumber

2.5 发酵液对黄瓜白粉病的防治效果

从表1可以看出,喷发酵液处理与清水对照相比显著降低了黄瓜白粉病的病情指数,并且发酵液保护作用的防效达到88.63%,治疗作用的防效达到82.26%,说明该发酵液对黄瓜白粉病的防治既有保护作用又有治疗作用。

表1 发酵液对黄瓜白粉病的防治效果

Tab.1 Effect of fermentation liquid on cucumber powdery mildew

试验处理 Treatment	保护作用 Protectine effect		治疗作用 Treating effect	
	病情指数 Disease index	防效/% Controlling effect	病情指数 Disease index	防效/% Controlling effect
发酵液 Fermentation	0.52 a	88.63	0.72 a	82.26
清水对照 CK	4.59 b	00.00	4.04 b	0.0

注:不同字母表示q测验在p=0.05水平上差异显著性

Note: Different alphabet indicated significantly different at P=0.05 level to q test

3 讨论

研究表明,Men-myco-93-63发酵液可以激活黄瓜主要防御酶系,特别是喷Men-myco-93-63发酵液再接病菌处理几种防御酶系活性始终处于很高水平,在POD,PPO,CAT和PAL 4个防御酶系中均表现明显。已有研究表明,POD,PPO和PAL是存在于植物体内与抵抗病原微生物侵染有关的重要酶[7]。特别是关于苯丙氨酸解氨酶活性与植物抗病性的关系多数人认为苯丙氨酸解氨酶活性升高和植物抗病性有关[8],说明Men-myco-93-63发酵液除具有直接抑菌作用外,还可以诱导黄瓜主要防御酶系活性的提高,而且这种诱导效应在病原菌侵染的作用下表现更为明显。本试验结果表明,Men-myco-93-63发酵液在一定时间内可以有效积累和储存抗性物质,提高了黄瓜的系统抗病性。总之,在黄瓜抵御由*Sphaerotheca fuliginea*引起的黄瓜白粉病的过程中,Men-myco-93-63发酵液对寄主防御反应相关酶系活性提高具有重意义。本研究只是初步探讨了POD,PPO,CAT,PAL与抗病性的关系,对其他抗病因子如植保素、抗病蛋白以及直接对病原菌起作用的酶类如几丁质酶、葡聚糖酶等也应进行深入全面的研究。

参考文献:

[1] Khan M W, Khan A M. Studies on the cucurbit powdery mildew. I. Perithecial production in cucurbit powdery mildew in northern India[J]. Indian Phytopath, 1970, 23: 497-501.

[2] 杨文香,张 汀,刘大群. 三株链霉菌对黄瓜白粉病及黄瓜生长的影响[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(4): 80-84.

[3] 朱光廉,钟文海,张爱琴. 植物生理学实验[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 366-368.

[4] 李 靖,利荣千,袁文静. 黄瓜感染霜霉病菌叶片中一些酶活性的变化[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 277-283.

[5] Cakmak I, Manrschner H. Magnesium deficiency and highlight intensity enhance activities of super oxide dismutase ascorbate peroxides, and lutathione reductase in leaves[J]. Plant Physiology, 1992, 98: 1222-1227.

[6] 方中达. 植病研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1998: 366-368.

[7] Dorey S, Kopp M, Geoffroy P, *et al*. Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitin [J]. Plant Physiology, 1999, 121: 163-171.

[8] 魏国强,钱琼秋,朱祝军. 黄瓜白粉病抗性及生理机制的研究[J]. 华北农学报, 2004, 19(2): 64-66.