

瓜枝孢弱致病菌诱导黄瓜植保素的积累及抑菌活性

石延霞^{1*}, 关爱民^{1,2}, 李宝聚^{1**}

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ² 河南大学生命科学学院, 河南开封 456001)

摘要: 瓜枝孢 (*Cladosporium cucumerium*) 弱致病菌株 2-2A₂ 诱导黄瓜产生对黄瓜黑星病的抗病性反应。对经 2-2A₂ 诱导后黄瓜叶片中提取的物质进行生物活性试验、硅胶板薄层层析、高效液相色谱分析, 证明 2-2A₂ 可以有效诱导黄瓜中类黄酮类植保素的积累。

关键词: 黄瓜; 弱致病菌; 诱导抗性; 植保素

中图分类号: S 642.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 02-0361-05

Accumulation and Activity of Phytoalexins in Cucumber Induced by Pathogenicity-impaired Strain of *Cladosporium cucumerium*

SHI Yan-xia^{1*}, GUAN Ai-min^{1,2}, and LI Bao-ju^{1**}

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² Department of Biology, Henan University, Kaifeng, Henan 456001, China)

Abstract: Effect of resistance of cucumber against *Cladosporium cucumerium* was induced by pathogenicity-impaired strains (PIS) 2-2A₂. The toxicity of extracted compounds to *C. cucumerium* was carried out successively by bioassay, thin-layer chromatograms (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the effective ingredients were flavonoid phytoalexins and they could be induced by PIS 2-2A₂ in cucumber leaves

Key words: Cucumber; Pathogenicity-impaired strain; Induced resistance; Phytoalexins

植物保卫素 (phytoalexin, 简称植保素) 是植物受到生物或非生物因子侵袭时在体内合成并迅速积累的抗微生物活性的小分子化合物, 在植物抗病过程中起着重要的作用 (Smith, 1996)。对茄科和禾本科植物中植保素的研究已很深入 (Kokubun & Harborne, 1995)。黄瓜植保素则是 Frawe 等 (1998) 在研究硅诱导黄瓜抗白粉病的试验中首次发现的, 葫芦科植物中也存在黄酮类植保素——鼠李黄素。这一结果为在葫芦科植物中研究诱导抗病机理开辟了新的领域。

瓜枝孢 (*Cladosporium cucumerium*) 导致黄瓜黑星病的发生, 严重影响黄瓜的产量和质量。安全有效防治方法的研究成为控制病害的重要发展方向, 让黄瓜在病害发生期前获得免疫及抗病性, 是实现这一目标的重要手段。关爱民等 (2005) 筛选到的瓜枝孢弱致病菌株可以诱导黄瓜对黑星病的稳定抗病性。研究瓜枝孢弱致病菌的诱导抗病性机理, 可为开发真菌疫苗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试黄瓜品种为 ‘山东密刺’。供试菌株为瓜枝孢强致病菌株 2-2 和由其诱变筛选到的弱致病菌

收稿日期: 2006 - 12 - 18; 修回日期: 2007 - 02 - 28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370983, 30400060); 科研院所社会公益研究专项项目 (2004D B4J153); 农业部蔬菜遗传与生理重点开放实验室项目

* E-mail: shiyanxia813@163.com; ** 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: libj@mail.caas.net.cn)

株 2-2A₂, 均由中国农业科学院蔬菜花卉研究所蔬菜病害综合防治组保存。

1.2 瓜枝孢弱致病菌的诱导抗病性试验

将黄瓜种子于 28 ℃ 恒温箱中催芽, 播种于蛭石 草炭为 1:1 的营养钵中, 待幼苗长至 2 片真叶期用于抗性表达研究。将弱致病菌株 2-2A₂ 在 PDA 培养基上培养 5 d, 用蒸馏水配制成浓度为 4×10^7 个/mL 的孢子悬浮液, 以喷雾法接种在 5 d 苗龄的 100 株黄瓜苗上, 48 h 后挑战接种相对应有活力的强致病菌孢子悬液, 接种浓度为 4×10^5 个/mL 孢子悬浮液。接种强致病菌的 100 株黄瓜苗植株设为对照。挑战接种后 4 d 调查发病情况。

植保素活性研究: 将弱致病菌株 2-2A₂ 在 PDA 培养基上培养 5 d, 用蒸馏水配制成浓度为 4×10^7 个/mL 的孢子悬浮液, 按不同时间均匀喷雾接种到黄瓜苗叶面上。包括 4 个处理: 只接种弱致病菌株 (A), 只接种强致病菌株 (T), 弱致病菌株诱导后接种强致病菌株 (A + T), 清水对照。每处理 3 次重复, 每重复 15 株黄瓜苗。于黄瓜苗 2 片真叶期, 以喷雾方式用 2-2A₂ 诱导接种, 诱导接种后分别于 24、48、72 h 挑战接种 2-2, 挑战接种后 48 h 取样进行植保素提取分析。

病情调查: 0 级, 无病斑; 1 级, 病斑面积占整个叶面积的 10% 以下; 3 级, 病斑面积占整个叶面积的 11% ~ 25%; 5 级, 病斑面积占整个叶面积的 26% ~ 50%; 7 级, 病斑面积占整个叶面积的 51% ~ 75%; 9 级, 病斑面积占整个叶面积的 75% 以上。病情指数 = $[\sum (\text{各级病叶数} \times \text{相对级数值}) / (\text{调查总叶数} \times 9)] \times 100$; 防治效果 (%) = $[(\text{对照病指} - \text{弱致病菌株病指}) / \text{对照病指}] \times 100$ 。

1.3 植保素提取液生物活性的测定

植保素提取与纯化参照 Daayf 等 (1997) 的方法并稍有改动。用 3 mL 甲醇溶解样品, 浓缩至 1 mL 用于抑菌试验。本研究中以每 100 mL 80% 酸化甲醇浸提样品后浓缩量为 1 mL 的植保素为原液, 记为植保素浓度 1%, 以下试验均采用该浓度提取液。

植保素提取液的活性测定采用平板抑菌圈法。配制瓜枝孢 2-2 菌株孢子悬浮液, 与 PDA 培养基混合。打取直径为 0.45 cm 的滤纸片, 蘸取各处理植保素提取液, 置于含菌平板中, 每个处理提取的植保素活性测定均设 4 次重复, 每个重复两皿。23 ℃ 恒温培养箱中黑暗培养, 4 d 后观察。

1.4 植保素提取液薄层层析 (TLC) 分析及其抑菌试验

硅胶板为 GF254, 规格为 50 mm × 100 mm, 用前活化。点样量 10 μL, 流动相为二氯乙烷 乙酸乙酯 = 7:3。各处理点样后预饱和 20 min, 于层析缸中进行薄层层析。层析后在 254、365 nm 紫外灯下观察, 拍照。每批样品均重复 3 次, 以 3 次重复的结果相近为标准。配制瓜枝孢 2-2 孢子悬浮液, 混合微温未凉、含有少量琼脂的 PDA 培养基, 然后将混合物喷雾于进行过供试样品层析的薄层层析板上, 无菌条件下 23 ℃ 恒温黑暗保湿培养, 2 d 后观察抑菌效果。同一批样品的抑菌试验重复 2 次, 以结果一致为准。

1.5 植保素提取液高效液相色谱 (HPLC) 分析

色谱条件为: 仪器为 Agilent 1100, 色谱柱为 Agilent C18 柱, 样品进样量 10 μL, 柱温 30 ℃, 流速 0.8 mL/min, 柱压 167 ~ 185 × 10⁵ Pa, 空跑柱压为 12 ~ 18 × 10⁵ Pa。

紫外检测器检测, 检测波长 272 nm, 带宽 16 nm, 参比波长 360 nm。流动相为甲醇 水 = 2:3 (272 nm, 335 nm 为类黄酮类物质检测的特异波长)。

样品 HPLC 测定前, 首先进行植保素提取的回收率检测, 回收率测定条件与样品的测定条件一致, 当回收率达到 85% 以上时进行整批样品的色谱分析。

分析结果用波峰面积表示, 单位以毫吸光度 (mAu) 表示, $A = -\lg(T)$ 是 360 nm 吸光度, 无量纲, 以 A 乘 1 000 作为信号单位, 因此称为 mAu。

2 结果与分析

2.1 瓜枝孢弱致病菌的诱导抗病性

瓜枝孢弱致病菌致病性有不同程度的降低, 对本项目组前期筛选到的弱致病菌进行诱导抗病性试验, 发现瓜枝孢弱致病菌株 2-2A₂诱导黄瓜对黑星病的抗病性效果明显, 病情指数 25.9, 诱导抗病效果达到 62.5%, 而强致病菌株 2-2的病指数为 69.0。

2.2 植保素提取液的生物活性

图 1显示 2-2A₂诱导处理 (A)、2-2A₂诱导后挑战接种 (A + T)、只接种强致病菌株的处理 (T), 均在诱导后 48 h抑菌活性物质的含量最高。从图 1, a中可以看出, 处理 A 植保素的积累在 24 h时极少, 但在 48 h时就达到了最大值, 其抑菌圈直径比清水对照大 66.67%。从图 1, b中看到 A + T在诱导后 48 h和 72 h接种的处理抑菌物质含量均较高。从图 1, c中看到处理 T在诱导接种 48 h抑菌活性仍然很高, 但在 72 h抑菌圈直径变小, 抑菌物质活性成分积累量明显下降。

图 1, a、b、c中的清水对照植株中也有少量的植保素积累, 也出现细小抑菌圈, 这可能是健康植株在受到喷水等外界刺激时, 植株组织产生了应激反应, 表现出植保素少量积累的结果。

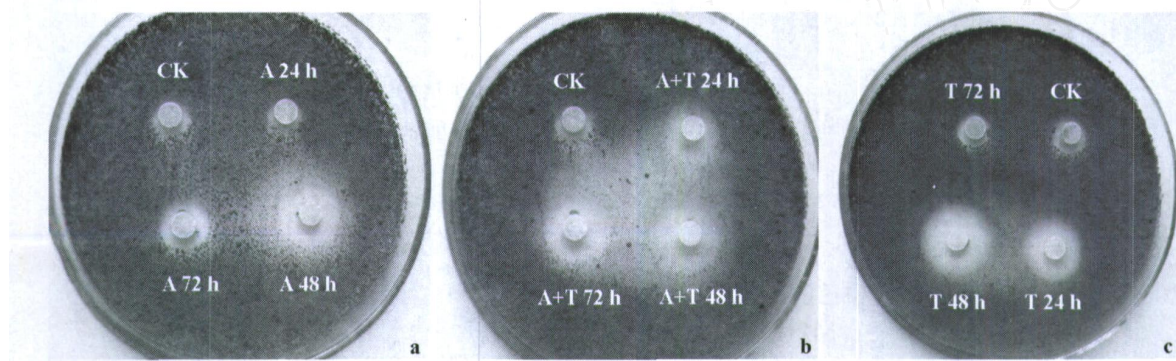


图 1 瓜枝孢挑战接种后 48 h的植保素抑菌效果

a: 瓜枝孢弱致病菌株 2-2A₂ 诱导 (A) 24、48、72 h的处理; b: 2-2A₂ 诱导 (A) 24、48、72 h后又挑战接种 (T) 的处理; c: 强致病菌株 2-2接种 (T) 24、48、72 h的处理; CK为清水对照。

Fig 1 Fungitoxicity of the extracted compounds from leaves of cucumber to *C. cucumerium* after challenge inoculation for 48 h

a: Induced by PIS 2-2A₂ strain (A) for 24 h, 48 h, 72 h; b: Challenging inoculation (T) after induction for 24 h, 48 h, 72 h by 2-2A₂ strain (A); c: Inoculated for 24 h, 48 h, 72 h by 2-2 strain (T); CK: Control

2.3 植保素提取液的 TLC分析

图 2的 A和 B分别为紫外波长 254 nm和 365 nm两种条件下跑板后的层析照片, 图 2, C为在薄层层析后的层析板上的植保素抑菌活性测定的结果照片。

从图 2, A、B可以看到, 植保素提取液在薄层层析板上层析出 4个主要带斑, 其中以弱菌诱导后 48 h (b泳道的 R_f值 0.4处) 和挑战接种后 72 h (f泳道的 R_f值 0.4处)、仅接种强菌 24 h (g泳道的 R_f 0.4处) 的带斑最明显, 此层析带斑就可能为得到的植保素提取液最主要的活性物质, 进一步的抑菌活性试验将对该结果进行验证。

2.4 植保素提取液在层析板上的抑菌活性

从图 2, C中看到, 图中灰黑色是瓜枝孢菌在层析板上正常生长繁殖, 未出现瓜枝孢菌受抑制生长的现象, 白色的带斑处为图 2, A、B中 R_f值 0.3 ~ 1.0处出现的带斑, 此处瓜枝孢菌受层析出的成分抑制而无法生长, 因此仍显示出层析板的白色底色。清水对照在 R_f值为 0.3、0.4有微弱的白色抑菌带斑, 而弱菌诱导的植保素提取液具有较大的白色抑菌带斑, 尤其是弱菌诱导 48 h、72 h,

白色抑菌带斑明显大于其它处理,这一现象表明植保素提取液在 Rf 值为 0.3、0.4 处层析到的物质具有明显的抑菌活性。该提取液在 Rf 值为 0.9、1.0 也出现较弱的抑菌带斑,其活性低于 Rf 为 0.3 和 0.4 处层析出的组份,因此初步确定弱菌诱导黄瓜产生 4 种植保素。其中以 2-2A₂ 诱导后 48 h 出现的组份抑菌活性最高,此处抑菌带斑最明显,该结果说明 PIS 2-2A₂ 诱导后 48 h 植保素积累量最大,此结论与前面生物活性测定结果一致。

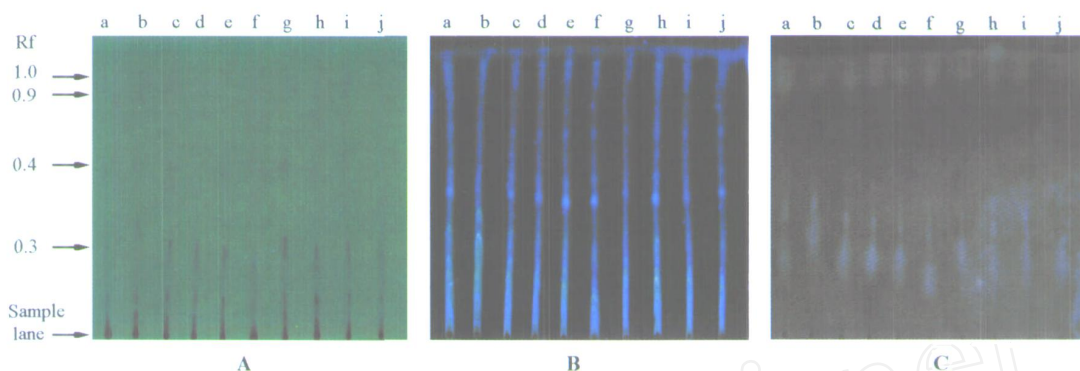


图 2 植保素提取液薄层层析效果及抑菌结果

A: 紫外波长 254 nm 层析观察; B: 紫外波长 365 nm 层析观察; C: 层析板上抑菌结果。

a 到 j 依次为弱菌诱导 24、48、72 h,

挑战接种 24、48、72 h, 仅接强菌 24、48、72 h, 清水对照。图中箭头所示为各层析带斑。

Fig. 2 Thin-layer chromatograms and bioassay analysis for evaluating the fungitoxicity of extracted phytoalexins

A: Wavelength 254 nm; B: Wavelength 365 nm; C: Fungitoxicity of extracted phytoalexins on thin-layer plate

a, b, c: Induced for 24 h, 48 h, 72 h by PIS 2-2A₂; d, e, f: Induced and challenging inoculated for 24 h, 48 h, 72 h by 2-2; g, h, i: Inoculated for 24 h, 48 h, 72 h by 2-2; j: Control. Arrow indicated the bands of thin-layer chromatograms and bioassay for evaluation of the fungitoxicity

2.5 植保素提取液的高效液相色谱分析

根据黄瓜植株经诱导后合成的植保素主要为类黄酮类物质的报道 (Frave et al, 1998), 以及高效液相色谱对类黄酮类物质分析的特点可以知道, 液相色谱分析在流动相进行到 6~8 min 时, 分离到的成分应该为类黄酮类物质, 如果该时间段出现洗脱峰明显变化, 说明植保素合成积累发生变化。

本试验中分别将瓜枝孢 2-2A₂ 菌株诱导 24、48、72 h 以及再经挑战接种 2-2 后的幼苗样品进行高效液相色谱分析。结果发现 2-2A₂ 诱导 24 h 后, 处理 A 出现一个小的洗脱峰, 其他几个处理间洗脱峰面积变化不明显; 在 2-2A₂ 诱导 48 h 后, 各处理间洗脱峰面积出现明显差异, 以诱导后挑战接种的处理 A+T 在 6.834 min 出现的洗脱峰面积最大; 其次为仅 2-2A₂ 诱导的处理 A 在 7.719 min 出现洗脱峰面积较大; 处理 T 在 6.885 min 时出现洗脱峰; 清水对照在 7.728 min 出现洗脱峰, 其峰面积低于上述 3 个处理; 在 2-2A₂ 诱导 72 h 后, 各处理均在 6.8~7.9 min 间出现洗脱峰, 洗脱峰面积间变化不明显 (图 3)。

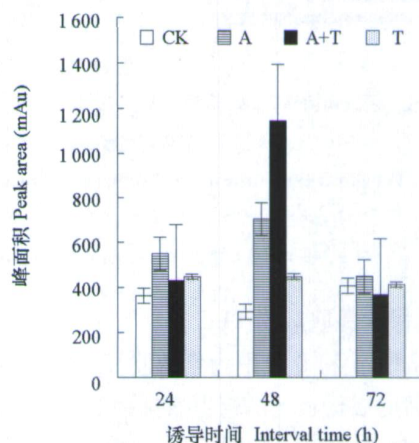


图 3 上样 6.8~7.9 min 植保素高效液相色谱分析

CK: 清水对照; A: 瓜枝孢弱致病菌株处理;

T: 强致病菌株处理; A+T: 瓜枝孢弱致病菌株诱导后挑战接种强致病菌株。

Fig. 3 Peak area analysis of phytoalexins with HPLC at 6.8-7.9 min after sample loading

CK: Control; A: Different time points of induction with PIS 2-2A₂; T: Inoculation with pathogenic strain 2-2; A+T: Challenged by pathogenic strain 2-2 after induction with PIS 2-2A₂.

此结果显示处理 A + T在色谱分析中出现洗脱峰的时间较早且洗脱峰变化明显, 峰面积最大, 因此推断在诱导后 48 h再挑战接种的处理 (A + T) 中植保素的合成积累量最大, 2-2A₂诱导黄瓜植株中植保素的积累, 从而使黄瓜植株表现出诱导抗病性效果。

3 讨论

植物的次生代谢物起着重要的生理作用。植物受到病原菌的感染或外源物质的刺激后会启动相应的防御反应系统。这种防卫绝大多数是利用体内已有的信号传导途径和代谢途径来传递防御反应信号, 植保素的合成多是已有代谢途径的延伸, 在病原菌与寄主互作中, 植保素的积累与植物抗病性密切相关 (Guo et al, 1998; Amero et al, 2001; Liu & Dixon, 2001)。

在黄瓜的诱导抗病性中, 植保素的积累是重要的抗病反应 (Thomzik et al, 1997; Tamogami & Kodama, 2000)。黄瓜植株受瓜枝孢弱致病菌株 (PIS 2-2A₂) 诱导后植保素积累情况的研究, 初步明确了瓜枝孢弱致病菌株在次生代谢物质方面存在的诱导抗病性。

根据 Liu和 Dixon (2001) 对葫芦科作物中存在类黄酮类植保素的研究结果, 分析了瓜枝孢弱致病菌株诱导黄瓜后产生的次生代谢物质, 经平板抑菌圈法生物测定初步明确该物质具有明显的抑菌活性。将该物质纯化后进行硅胶板薄层层析, 结果在层析板上出现多个带斑, 对该层析板上带斑进行杀菌活性测定, 发现在 R_f为 0.3、0.4、0.9和 1.0处各出现明显抑菌带, 说明该提取物质可能存在至少 4种抑菌活性成分。同时对该提取物质进行高效液相色谱分析, 色谱图显示在 6.8 ~ 7.9 min处出现明显洗脱峰, 波形面积成规律性变化, 明确该物质为类黄酮类植保素。

本研究结果也从次生代谢方面初步明确了瓜枝孢弱致病菌株可以诱导黄瓜组织内植保素的合成积累, 对于增强寄主抗病性具有明显效果, 为 PIS 2-2A₂诱导抗病性积累的深入研究奠定了基础。

References

- Amero J, Requejo R, Jorin J, Lopez-Valbuena R, Tena M. 2001. Release of phytoalexins and related isoflavonoids from intact chickpea seedlings elicited with reduced glutathione at root level. *Plant Physiological Biochemistry*, 39: 785 - 790.
- Daayf F, Schmitt A, Belanger R R. 1997. Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Plant Physiology*, 113: 719 - 727.
- Frawe A, Abou-Zaid M, Menzies J G, Belanger R R. 1998. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathology*, 88: 396 - 401.
- Guan Aimin, Shi Yanxia, Yang Shengyu, Li Baoju. 2005. The characteristic study on attenuated strains of *Cladosporium cucumerium*. *Acta Phytopathology Sinica*, 35 (6): 196 - 199. (in Chinese)
- 关爱民, 石延霞, 杨生玉, 李宝聚. 2005. 瓜枝孢 (*Cladosporium cucumerium*) 弱致病菌特性初步研究, *植物病理学报*, 35 (6): 196 - 199.
- Guo Z J, Lamb C, Dixon R A. 1998. Potentiation of the oxidative burst and isoflavonoid phytoalexin accumulation by serine protease inhibitors. *Plant Physiology*, 118: 1487 - 1494.
- Kokubun T, Harborne J B. 1995. Phytoalexin induction in the sapwood of plants of the Maloideae (Rosaceae): biphenyls or dibenzofurans. *Phytochemistry*, 40: 1649 - 1654.
- Liu C, Dixon R A. 2001. Elicitor-induced association of isoflavone O-methyltransferase with endomembranes prevents the formation and 7-O-methylation of daidzein during isoflavonoid phytoalexin biosynthesis. *Plant Cell*, 13: 2643 - 2658.
- Smith C J. 1996. Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. *New Phytology*, 132: 1 - 45.
- Tamogami S, Kodama O. 2000. Coronatine elicits phytoalexin production in rice leaves (*Oryza sativa* L.) in the same manner as jasmonic acid. *Phytochemistry*, 54: 689 - 694.
- Thomzik J E, Stenzel K, Stocker R. 1997. Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51: 265 - 278.