

苯并噻二唑(BTH)诱导黄瓜幼苗对霜霉病抗性的研究

李玉红¹ 程智慧^{1*} 陈鹏² 陈晓光¹

(¹西北农林科技大学园艺学院, 杨凌 712100; ²西北农林科技大学生命科学学院, 杨凌 712100)

摘要: 用 0.5 mmol/L BTH (苯并噻二唑) 溶液在接种黄瓜霜霉病菌前 4、8、12、24、48、96、168 h (7 d) 和接种后 2、4 d 处理二叶期的黄瓜幼苗, 结果表明 BTH 对霜霉病菌无直接的抑制作用, 但能诱导黄瓜幼苗对霜霉病产生局部和系统的抗性, 系统抗性的表达在处理 48 h 产生并持续 7 d 以上。几丁质酶和 -1,3-葡聚糖酶活性测定结果表明, BTH 处理可系统性地增强这两种酶的活性, 且与黄瓜对霜霉病的诱导抗性密切相关。

关键词: 黄瓜; 霜霉病; BTH; 诱导抗性; 几丁质酶; -1,3-葡聚糖酶

中图分类号: S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 02-0278-05

Studies on Induction Resistance to *Pseudoperonospora cubensis* by BTH in Cucumber Seedlings

Li Yuhong¹, Cheng Zhihui^{1*}, Chen Peng², and Chen Xiaoguang¹

(¹College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; ²College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: 0.5 mmol/L BTH was used in seedling with two true leaves 4, 8 and 12 h, or 1, 2, 4 and 7 days before or 4 and 2 days after inoculation with *P. cubensis*. Results obtained showed that BTH had not a curative effect but could induce local and systemic resistance in cucumber against the downy mildew. Expression of systemic resistance in leaves was detectable 48 h after treatment and continued for at least 7 days. Chitinase and -1,3-glucanase activities analysis showed that induced resistance in cucumber leaves was accompanied by a systemic increasing in both enzymes activities. Two enzymes were related to resistance to downy mildew in cucumber.

Key words: Cucumber downy mildew; BTH; Induced resistance; Chitinase; -1,3-glucanase

霜霉病是我国黄瓜栽培上普遍发生的严重病害之一。无论是露地还是保护地栽培, 常常因此病遭受严重损失, 应用农药虽能减缓霜霉病的发生及蔓延, 但会导致环境污染和农药残留等严重问题, 因此黄瓜的抗病性育种及寻求黄瓜对霜霉病抗性的方法是科研工作者的重要课题。

植物的诱导抗性是近年来非常活跃的研究领域之一, 在实践上也有不少成功的例子^[1~4]。BTH (苯并噻二唑) 是一种人工合成的诱导剂, 已有报道其对马铃薯、花椰菜、番茄、大豆等作物的多种病害都有较好的诱抗效果^[1~4], 但能否诱导黄瓜幼苗对霜霉病产生抗性则未见国内外有相关报道。因此本研究对 BTH 诱导黄瓜对霜霉病产生抗性及其产生抗性的部分生理生化机制进行探讨, 以期对霜霉病控制提供理论依据和有效途径。

1 材料与方 法

1.1 材料

以感病品种 ‘长春密刺’ 为材料, 20 ~ 35 °C 温室内培养, 第 2 片真叶刚展开时供试。

收稿日期: 2005 - 04 - 13; 修回日期: 2005 - 07 - 11

基金项目: 国家 ‘十五’ 科技攻关重大专项课题 (2004BA516A09); 西北农林科技大学青年学术骨干支持计划项目; 西北农林科技大学科研专项基金资助项目 (042M083)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: chengzh@public.xa.sn.cn)

1.2 BTH对黄瓜霜霉病局部和系统抗性诱导试验

为了判断 BTH 是否对黄瓜霜霉病有系统诱导抗性, 对供试幼苗整株进行喷雾接种霜霉病菌, 并分别于接种前 2 d、接种后 2、4 d 用 0.5 mmol/L BTH 处理 (诱导剂及所用浓度已经筛选) 黄瓜幼苗的第 1 真叶, 对照为清水。接种时用喷壶将霜霉病菌孢子囊悬浮液 (采摘新鲜、染霜霉病叶片, 用毛笔将霉层刷到烧杯中, 将霜霉病菌稀释成浓度为 $10 \times$ 显微镜下每个视野含有 10~15 个孢子的悬浮液) 均匀喷在黄瓜幼苗上, 接种病菌 7 d 后分别统计幼苗第 1 真叶和第 2 真叶的病情指数。各处理重复 3 次, 每重复 30 株。病情指数的统计参见李宝聚等^[5]的方法。为了描述方便, 分别用 BF 和 CF 表示 BTH 处理和对照的第 1 真叶, 用 BS 和 CS 表示 BTH 处理和对照幼苗的第 2 真叶。

1.3 BTH对黄瓜霜霉菌孢子囊萌发影响的试验

采集新鲜的黄瓜霜霉病叶, 置于 20 °C 恒温箱中保湿培养 24 h, 使其产生大量的孢子囊。将配制好的 0.5 mmol/L BTH 溶液 10 mL 倒入培养皿中 (对照为清水), 将黄瓜病叶上产生的新鲜孢子囊用灭菌的毛笔刷洗到含 BTH 溶液或清水的培养皿中, 置于 20 °C 恒温箱中培养。每隔 3 h 吸取不同溶液处理的孢子囊悬浮液 2 滴 (约 50 μ L) 于载玻片上, 加盖玻片, 在光学显微镜下随机观察 10 个视野内约为 100 个以上的孢子囊的萌发情况, 重复 3 次, 记载孢子囊数、萌发孢子囊数, 计算孢子囊萌发率 (%)。

1.4 BTH对黄瓜霜霉病局部和系统抗性诱导时间测定

用 0.5 mmol/L BTH 处理 (对照为清水) 黄瓜幼苗的第 1 真叶, 分别在处理后 4、8、12、24、48、96 和 168 h 整株接种霜霉病菌。共 14 个处理 (包括对照), 每处理 3 次重复, 每小区 30 株。

1.5 BTH处理后黄瓜幼苗几丁质酶和 -1,3 葡聚糖酶活性测定

试验共分两部分, 第 1 部分是采集未接种霜霉菌的样品, 即用 0.5 mmol/L BTH 处理 (对照为清水) 黄瓜幼苗第 1 真叶。第 2 部分是采集接种霜霉菌后的样品, 即用 BTH 处理 (对照为清水) 第 1 真叶 2 d 后再整株接种。各处理 3 次重复, 每重复 20 株。分别在规定时间内采收黄瓜幼苗的第 1 真叶和第 2 真叶测定酶活性。

取 1 g 鲜叶片, 用 5 mL 乙酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH 5.0) 冰浴研磨, 离心后取上清液测定酶活性 (3 次重复)。几丁质酶活性测定参考文献 [6], 1 个酶活力单位 (U) 为每小时分解胶态几丁质产生 1 μ mol N-乙酰葡萄糖胺所需的酶量。-1,3 葡聚糖酶活性测定参考文献 [7], 1 个酶活力单位 (U) 为每小时反应产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量。

2 结果与分析

2.1 BTH对黄瓜霜霉病局部和系统抗性的诱导

由图 1 可见, 在接种前 2 d 用 BTH 处理可大大降低黄瓜第 1 真叶和第 2 真叶霜霉病的病情指数, 而在接种后 2 d 和 4 d 再用 BTH 处理时, 无论是第 1 真叶还是第 2 真叶与对照相比, 病情指数均无显著差异。此结果表明在接种前 2 d 用 BTH 处理引起叶片病情指数的降低是由于诱导抗性的产生。

黄瓜霜霉病菌孢子囊萌发试验结果表明, 孢子囊在 0.5 mmol/L BTH 溶液或清水中均可萌发, 萌发率在 3 h 时分别为 20% 和 21.2%, 6 h 时分别为 60.7% 和 54.9%, 而 9 h 时分别为 85.3% 和 90.5%。在 BTH 溶液中孢子囊萌发率和对照相比

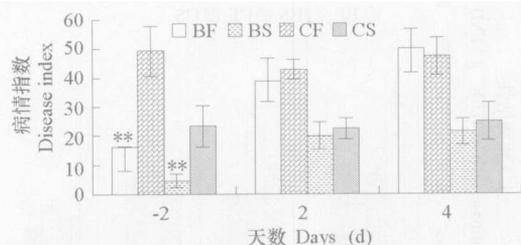


图 1 接种前或接种后用 BTH 处理对黄瓜霜霉病病情指数的影响

BF: 0.5 mmol/L BTH, 第 1 真叶; CF: 清水, 第 1 真叶;
BS: 0.5 mmol/L BTH, 第 2 真叶; CS: 清水, 第 2 真叶。

**表示在 1% 水平上的显著性。

Fig. 1 Effect of BTH solutions treatment before or after inoculation on the downy mildew disease index in the cucumber

BF: The first true leaves after treatment with 0.5 mmol/L BTH;
CF: The first true leaves after treatment with water;

BS: The second true leaves after treatment with 0.5 mmol/L BTH;
CS: The second true leaves after treatment with water;

** : Denotes at 1% level signification

无显著差异, 此结果进一步表明 BTH对霜霉病无直接抑制作用, 但可诱导黄瓜幼苗对霜霉病产生局部抗性和系统抗性。

2.2 BTH对黄瓜霜霉病局部抗性和系统抗性诱导时间的初步确定

BTH处理后不同时间接种霜霉菌, 叶片的病情指数存在明显差异 (图 2, 图 3)。BTH处理 4、8 或 12 h后接种霜霉菌, 第 1真叶和第 2真叶的病情指数和对照相比并无显著差异; BTH处理后 24 h接种, 第 1真叶的病情指数大大降低, 与对照相比差异显著, 说明 BTH诱导黄瓜产生对霜霉病局部抗性的时间在处理后 24 h。BTH处理 48 h后接种, 第 1真叶和第 2真叶的病情指数与对照相比有极显著差异。此结果说明 BTH诱导黄瓜产生对霜霉病系统抗性的时间为处理后 48 h。在处理后 168 h (7 d) 接种, 第 1真叶和第 2真叶的病情指数与对照相比仍差异显著, 说明 BTH对黄瓜霜霉病抗性诱导的持久期至少在 168 h (7 d) 以上。

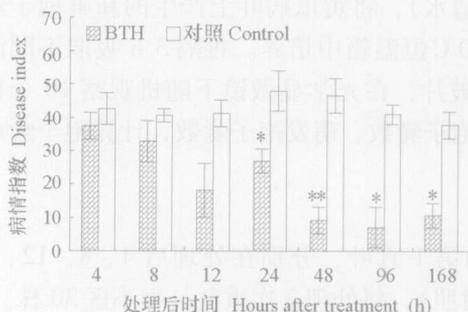


图 2 BTH处理后不同时间接种黄瓜第 1真叶病情指数

*表示在 5%水平上的显著性; **表示在 1%水平上的显著性。

Fig 2 Disease index on the first leaves of cucumber seedlings after different time intervals between BTH treatment and inoculation

*: Denotes at 5% level signification; **: Denotes at 1% level signification

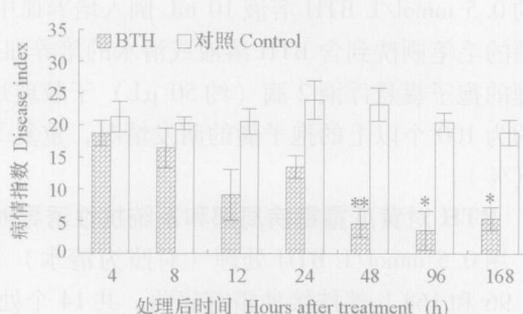


图 3 BTH处理后不同时间接种黄瓜第 2真叶病情指数

*表示在 5%水平上的显著性; **表示在 1%水平上的显著性。

Fig 3 Disease index on the second leaves of cucumber seedlings after different time intervals between BTH treatment and inoculation

*: Denotes at 5% level signification; **: Denotes at 1% level signification

2.3 BTH处理对黄瓜幼苗几丁质酶活性的影响

未接种时, BTH处理的第 1真叶和第 2真叶几丁质酶活性在整个取样时期始终高于对照 (图 4), 此结果表明 BTH不仅可诱导处理部位的几丁质酶活性升高, 而且也可系统性诱导几丁质酶活性增强。

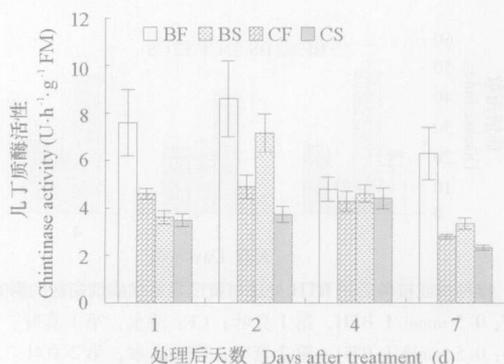


图 4 BTH处理后黄瓜叶片的几丁质酶活性

BF: 0.5 mmol/L BTH, 第 1真叶; CF: 清水, 第 1真叶;

BS: 0.5 mmol/L BTH, 第 2真叶; CS: 清水, 第 2真叶。

Fig 4 Activities of chitinase in cucumber leaves after BTH treatment

BF: The first true leaves after treatment with 0.5 mmol/L BTH;

CF: The first true leaves after treatment with water;

BS: The second true leaves after treatment with 0.5 mmol/L BTH;

CS: The second true leaves after treatment with water

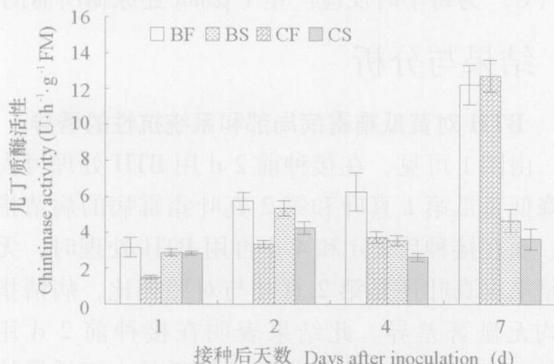


图 5 接种后黄瓜叶片的几丁质酶活性

BF: 0.5 mmol/L BTH, 第 1真叶; CF: 清水, 第 1真叶;

BS: 0.5 mmol/L BTH, 第 2真叶; CS: 清水, 第 2真叶。

Fig 5 Activities of chitinase in cucumber leaves after inoculation

BF: The first true leaves after treatment with 0.5 mmol/L BTH;

CF: The first true leaves after treatment with water;

BS: The second true leaves after treatment with 0.5 mmol/L BTH;

CS: The second true leaves after treatment with water

接种后, 对照的几丁质酶活性明显升高 (图 5)。BTH 处理的第 1 真叶在接种后 1、2 和 4 d 时均高于对照, 在接种后 7 d 则和对照接近; 第 2 真叶, 处理的幼苗几丁质酶活性在整个取样期始终高于对照。此结果表明几丁质酶活性与黄瓜对霜霉病的抗性有关。

2.4 BTH 处理对黄瓜幼苗 β -1,3 葡聚糖酶活性的影响

未接种时, BTH 处理的第 1 真叶 β -1,3 葡聚糖酶活性在整个取样时期始终高于对照 (图 6), 在第 2 真叶上, BTH 处理 4 d 和 7 d 后的幼苗其 β -1,3 葡聚糖酶活性也明显高于对照。此结果表明 BTH 不仅可诱导处理部位的 β -1,3 葡聚糖酶活性升高, 而且也可系统诱导 β -1,3 葡聚糖酶活性增强。

接种后, 对照的 β -1,3 葡聚糖酶活性明显升高 (图 7)。BTH 处理的第 1 真叶在接种后 1、2 和 4 d 时均高于对照, 接种后 7 d 则和对照接近; 在第 2 真叶上, 处理的幼苗在整个取样期 β -1,3 葡聚糖酶活性均高于对照, 此结果表明 β -1,3 葡聚糖酶活性与黄瓜对霜霉病的抗性密切相关。

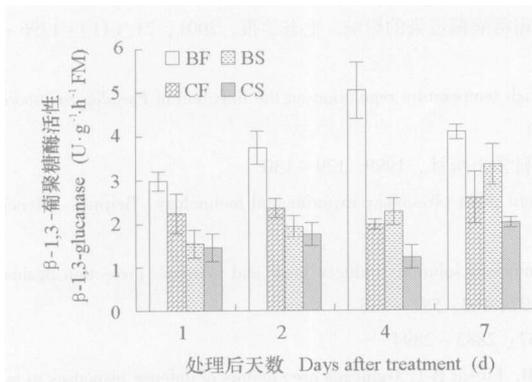


图 6 BTH 处理后黄瓜叶片的 β -1,3 葡聚糖酶活性

BF: 0.5 mmol/L BTH, 第 1 真叶; CF: 清水, 第 1 真叶;
BS: 0.5 mmol/L BTH, 第 2 真叶; CS: 清水, 第 2 真叶。

Fig. 6 Activities of β -1,3-glucanase in the cucumber leaves after BTH treatment

BF: The first true leaves after treatment with 0.5 mmol/L BTH;
CF: The first true leaves after treatment with water;
BS: The second true leaves after treatment with 0.5 mmol/L BTH;
CS: The second true leaves after treatment with water

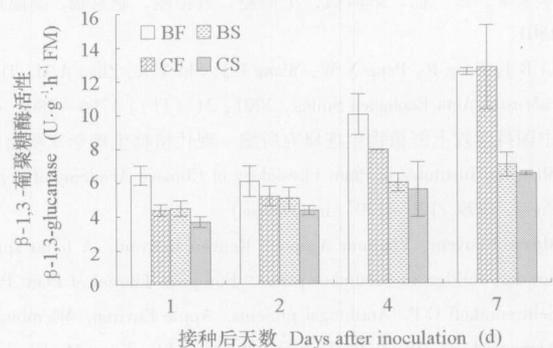


图 7 接种后黄瓜叶片的 β -1,3 葡聚糖酶活性

BF: 0.5 mmol/L BTH, 第 1 真叶; CF: 清水, 第 1 真叶;
BS: 0.5 mmol/L BTH, 第 2 真叶; CS: 清水, 第 2 真叶。

Fig. 7 Activities of β -1,3-glucanase in the cucumber leaves after inoculation

BF: The first true leaves after treatment with 0.5 mmol/L BTH;
CF: The first true leaves after treatment with water;
BS: The second true leaves after treatment with 0.5 mmol/L BTH;
CS: The second true leaves after treatment with water

3 讨论

本研究结果表明, BTH 对霜霉菌孢子囊的萌发无抑制作用。BTH 处理可以使黄瓜第 1 真叶和第 2 真叶霜霉病病情指数大大降低, 这种作用是由于 BTH 处理后诱导黄瓜产生局部和系统抗性的结果。BTH 诱导黄瓜幼苗产生霜霉病抗性的持久期至少在 7 d 以上 (图 2, 图 3)。BTH 处理后 24 h, 就有局部抗性表达, 48 h 系统抗性才表达到一个相当强的水平。BTH 处理后系统抗性 (48 h) 表达相对局部抗性 (24 h) 滞后, 表明了系统获得诱导抗性 (SAR) 的基因表达在防卫反应中是必须的^[2]。

有很多的研究表明, 几丁质酶及 β -1,3 葡聚糖酶与植物的抗病性关系密切^[8~11]。几丁质和 β -1,3 葡聚糖是真菌细胞壁的重要结构成分, 许多真菌的菌丝顶端 β -1,3 葡聚糖和几丁质暴露在表面, 能够直接受到 β -1,3 葡聚糖酶和几丁质酶的水解^[8,9], 不仅使真菌菌丝生长点受到破坏, 而且在水解过程中由真菌细胞壁释放出来的寡糖能够作为植物多种抗病反应的激发因子, 诱导植物的全面防卫反应^[8]。为了检测 BTH 诱导的抗性是否激活了黄瓜体内与防卫反应有关的分子的合成, 作者对几丁质酶及 β -1,3 葡聚糖酶活性进行了研究。经 BTH 处理的黄瓜叶片, 几丁质酶及 β -1,3 葡聚糖酶活性均高于对照 (图 4, 图

6), 接种后对照的黄瓜叶片几丁质酶及 β -1,3-葡聚糖酶活性迅速增加, 但比 BTH 处理的黄瓜叶片酶活性增加的迟一些 (图 5, 图 7), 说明 BTH 处理能提前诱导黄瓜体内与防卫反应有关的几丁质酶及 β -1,3-葡聚糖酶的合成, 使其在黄瓜对霜霉病的抗性中发挥了一定的作用。

参考文献:

- 1 Hideo Ishii, Yasunori Tomita, Takeshi Horio, Yoshihiro Narusaka Induced resistance of acibenzolar-S-methyl (CGA 245704) to cucumber and Japanese pear diseases European Journal of Plant Pathology, 1999, 105: 77 ~ 85
- 2 Toal E S, Jones P W. Induction of systemic resistance to sclerotinia sclerotiorum by oxalic acid in oilseed rape Plant Pathology, 1999, 48: 759 ~ 767
- 3 Doubrava N S, Dean R A, Kuc J. Induction of systemic resistance to anthracnose caused by oxalate and extracts from spinach and rhubarb leaves Physiological and Molecular Plant Pathology, 1988, 33: 69 ~ 79
- 4 Moshe Reuveni, Vladimir Agapov, Reuven Reuveni A foliar spray of micronutrient solutions induces local and systemic protection against powdery mildew in cucumber plants European Journal of Plant Pathology, 1997, 103: 581 ~ 588
- 5 李宝聚, 彭仁, 彭霞薇, 王福建, 石艳霞, 赵哀梅. 高温调控对黄瓜霜霉病菌侵染的影响. 生态学报, 2001, 21 (11): 1796 ~ 1801.
Li B J, Peng R, Peng X W, Wang F J, Shi Y X, Zhao A M. The effect of high temperature regulation on the infection of *Pseudoperonospora cubensis* Acta Ecologica Sinica, 2001, 21 (11): 1796 ~ 1801 (in Chinese)
- 6 中国科学院上海植物生理研究所编. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 129 ~ 130
Shanghai Institutes of Plant Physiology of Chinese Academy of Sciences Modern plant physiology experimental technology Beijing: Science Press, 1999. 129 ~ 130 (in Chinese)
- 7 Moshe Reuveni, Vladimir Agapov, Reuven Reuveni A foliar spray of micronutrient solutions induces local and systemic protection against powdery mildew in cucumber plants European Journal of Plant Pathology, 1997, 103: 581 ~ 588
- 8 Selitrennikoff C P. Antifungal proteins Apple Environ Microbiol, 2001, 67: 2883 ~ 2894
- 9 Klarzynski O, Plesse B, Joubert J M, Yuin J C, Kopp M, Kloareg B, Fritig B. Linear β -1,3-glucans are elicitors of defense responses in tobacco Plant Physiol, 2000, 124: 1027 ~ 1037
- 10 Kim Y, Hwang B K Purification, N-terminal amino acid sequence and antifungal activity of chitinases from pepper stems treated with mercuric chloride Physiological and Molecular Plant Pathology, 1996, 48 (6): 417 ~ 432
- 11 李宝聚, 范海延, 孙艳秋, 石延霞. 葡萄糖诱导黄瓜体内水杨酸的积累及其抗霜霉病关系的初步研究. 园艺学报, 2005, 32 (1): 115 ~ 117
Li B J, Fan H Y, Sun Y Q, Shi Y X Accumulation of salicylic acid in cucumber treated with glucohexase and its relation to systemic acquired resistance against cucumber downy mildew. Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32 (1): 115 ~ 117 (in Chinese)