

瓜类尖孢镰刀菌致病物质 β -D-葡萄糖苷酶活性与致病性的相关性分析

肖荣凤, 蓝江林, 车建美, 刘波, 刘丹莹

(福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003)

摘要:【研究目的】研究瓜类尖孢镰刀菌 β -D-葡萄糖苷酶活性与致病性的关系, 为菌株致病性强弱快速测定提供一种新的辅助方法;【方法】测定了 19 株来自不同瓜类寄主尖孢镰刀菌菌株的致病性及致病物质 β -D-葡萄糖苷酶活性, 构建菌株的发病率(y)与酶活(x)的曲线模型;【结果】菌株致病性测定结果表明, 同一寄主及不寄主来源的菌株致病性有差异。供试菌株中有 12 个强致病菌株, 发病率在 80% 以上; 2 个中等致病菌株, 发病率分别为 60% 和 70%; 2 个弱致病菌株发病率均为 30%, 以及 3 个非致病菌株。菌株 β -D-葡萄糖苷酶活测定结果表明, 同一寄主不同菌株的酶活存在明显差异, 来自黄瓜、甜瓜和西瓜寄主菌株酶活变化范围依次为 (21.57-54.89)、(16.28-41.83) 和 (14.98-32.43) $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$; 不同寄主(黄瓜、甜瓜和西瓜)菌株的 β -D-葡萄糖苷酶活也存在差异, 平均酶活为黄瓜 (34.08 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$) > 甜瓜 (27.86 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$) > 西瓜 (20.95 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$);【结论】菌株的 β -D-葡萄糖苷酶活性与其致病性关系分析表明, 当酶活性小于 30 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时, 菌株发病率与酶活呈正相关; 当酶活大于 30 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$, 菌株的发病率大于 90%。

关键词: 尖孢镰刀菌; 瓜类; 致病性; β -D-葡萄糖苷酶

中图分类号: S432 文献标识码: A

Study on the Correlation between the Activity of β -D-glucosidase and the Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* Strains from Cucurbitaceous Crops

Xiao Rongfeng, Lan Jiangling, Che Jianmei, Liu Bo, Liu Danying

(Agricultural Bioresource Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003)

Abstract:【OBJECTIVE】Studying the correlation of pathogenicity and β -D-glucosidase activity of strains in order to find the fast testing method of the pathogenicity of *Fusarium oxysporum* from cucurbitaceous crops.【METHOD】we tested the pathogenicity and β -D-glucosidase activity for nineteen strains isolated from cucumber, melon and watermelon, and form a correlation construct of pathogenicity (y) and β -D-glucosidase activity (x).【RESULTS】The results showed that significant differences of the pathogenicity and β -D-glucosidase activity were found among different strains from the same or the different host-plants. The tested strains were grouped into pathogenicity and nonpathogenicity, and the β -D-glucosidase activity of strains from cucumber, melon and watermelon were in the range of 21.57-54.89, 16.28-41.83 and 14.98-32.43 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively. The average activity of the strains from cucumber, melon and watermelon were 34.08, 27.86, 20.95 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$.【CONCLUSION】There was a positive correlation between the β -D-glucosidase activity and pathogenicity of *F. oxysporum* isolated from cucurbitaceous crops while the activity was less than 30 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$; contrarily, disease incidence of strains were more than 90% while more than 30 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Key words: *Fusarium oxysporum*, cucurbitaceous crops, β -D-glucosidase, pathogenicity

基金项目: 国家 863 计划项目资助“茄科作物青枯病和枯萎病生防菌剂的研究与应用”(2006AA10A211); 福建省自然科学基金资助“黄瓜枯萎病内生防菌短芽孢杆菌 GFP 基因标记及其生防机理的研究”(2006J0068)。

第一作者简介: 肖荣凤, 女, 1977 年出生, 福建泰宁人, 助理研究员, 硕士, 主要从事植物病理学及生物防治研究; 通信地址: 350003 福州市五四路 247 号, 福建省农科院农业生物资源研究所, Tel: 0591-87848933, E-mail: ying_24401@163.com。

通讯作者: 刘波, 男, 1957 年出生, 福建省惠安人, 研究员, 博士, 从事病虫害生物防治研究, 通信地址: 福州市五四路 247 号, E-mail: laeptb@pub3.fz.fj.cn。

收稿日期: 2008-03-18, 修回日期: 2008-04-24。

现代植物病理学从病原菌的致病性与寄主植物对病菌的敏感性两方面来探讨病原菌与寄主的互作机理。关于病原菌产生的细胞壁降解酶在致病中的作用,国内外有过一些报道,并发现在致病过程中果胶酶(PMG、PMTE)及纤维素酶(Cx、 β -葡萄糖苷酶)起着重要作用^[1-11]。 β -葡萄糖苷酶是纤维素酶系中的一个重要组分,其在西瓜枯萎病病程中起着降解细胞壁纤维素破坏植物细胞组织的作用^[1]。车建美等^[12-14]对尖孢镰刀菌 β -D-葡萄糖苷酶活性测定条件及菌株酶活多态性进行了研究。关于瓜类尖孢镰刀菌 β -D-葡萄糖苷酶活性与致病性的关系研究较少。笔者较系统地研究瓜类寄主(黄瓜、甜瓜和西瓜)尖孢镰刀菌的 β -D-葡萄糖苷酶活性与致病性关系,旨在为菌株致病性强弱测定提供一种新的辅助方法,与常规的寄主致病性测定相合,起到克服寄主致病性测定过程中工作量大,不稳定等因素的影响,使菌株的致病性强弱能得到更准确的反映。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试菌株:19株于2003年分离自黄瓜、甜瓜和西瓜寄主作物的尖孢镰刀菌菌株并保存在福建省农科院农业生物资源研究所。供试种子:黄瓜(夏三尺,上海)、甜瓜(华美,韩国)、西瓜(亚历山大,韩国)。试剂:pNPG, Sigma公司产品,其余试剂为国产分析纯。仪器:岛津UV-2550。于2004年在福建省农科院农业生物资源研究所进行了试验研究。

1.2 方 法

1.2.1 菌株致病性测定 分别挑取供试菌株少量纯化菌丝体于PS液体培养基摇床培养7d,培养液用双层纱布过滤获得病原菌孢子悬浮液,伤根后分别浸根接种1~2片真叶的各自寄主植物,以清水处理作对照,每处理接30株苗,置于 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的人工气候箱培养,光照控制为光暗交替12h:12h,逐日观察植株的发病症状,统计发病率。菌株致病性强、中、弱划分标准为:发病率在75%以上的为强致病菌株;发病率在31%~75%之间的为中等致病菌株;发病率在30%以下的为弱致病菌株;发病率等于0的为非致病菌株。

1.2.2 致病物质 β -D-葡萄糖苷酶活性测定

(1)标准曲线绘制,对硝基苯酚—光密度标准曲线参照车建美等^[12]。用pH5.0的 $0.2\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ Na_2HPO_4 - $0.1\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液,配制不同浓度的对硝基苯酚溶液,定容至10ml(0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08和 $0.1\text{mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$),各取2ml,再加入2ml $1\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ Na_2CO_3 溶液显色,在400nm波长下测定其

吸光值,并作标准曲线。

(2)供试菌株活性测定^[12],供试菌株于PS液体培养基培养,装瓶量为100ml,每瓶接入5个6mm的菌片,25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,120r $\cdot\text{min}^{-1}$,培养7d后,用双层纱布过滤,滤液于10000r $\cdot\text{min}^{-1}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心20min,取上清液进行测定,试验重复3次。取0.1ml适度稀释的粗酶液,加入0.9ml pH5.0的 $0.2\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ Na_2HPO_4 - $0.1\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液,于50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴预热5min,加入1ml $4\text{mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的p-NPG溶液,16min后立即加入1ml $1\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 溶液终止反应,室温放置5min后,于400nm处测吸光值OD。以加热失活的酶液按照同样的方法处理作空白。在上述条件下,每毫升酶液每分钟水解产生 $1\mu\text{mol}$ 的对硝基苯酚的酶活力,定义为一个酶活单位。

2 结果与分析

2.1 菌株致病性测定结果

19株尖孢镰刀菌菌株回接寄主后的致病性测定结果见图1。结果表明,同一寄主及不寄主来源的菌株致病性有差异。依据菌株致病性强、中、弱划分标准,有12个强致病菌株,对各自寄主的发病率在80%以上,包括菌株F-H.6.5-030318-J2(黄瓜)、F-H.6.5-030318-J4(黄瓜)、F-H.6.5-030318-B1(黄瓜)、F-H.6.5-030318-B3(黄瓜)、F-T.1.7-030514-03(甜瓜)、F-T.1.7-030514-12(甜瓜)、F-T.1.7-030514-21(甜瓜)、F-X.1.7-030527-01(西瓜)、F-X.1.7-030520-03(西瓜)、F-X.1.7-030527-12(西瓜)、F-X.1.7-030520-02(西瓜)和F-X.1.7-030520-12(西瓜);2个中等致病菌株F-X.1.7-030527-02(西瓜)和F-X.1.7-030527-15(西瓜),对各自寄主的发病率分别为60%和70%;2个弱致病菌株F-T.1.7-030514-31(甜瓜)和F-X.1.7-030520-13(西瓜),发病率均为30%;3个非致病菌株F-H.6.5-030318-J1(黄瓜)、F-T.1.7-030520和F-X.1.7-030520-11(西瓜)。

2.2 菌株致病物质 β -D-葡萄糖苷酶活测定结果

对硝基苯酚—光密度标准曲线如图2所示。回归分析结果表明,吸光度(y)与对硝基苯酚的浓度(x)呈明显的线性关系, $y=9.0977x$ ($R^2=0.9968$)。

尖孢镰刀菌菌株的 β -D-葡萄糖苷酶活测定分析结果表明(表1),同一寄主不同菌株的酶活存在明显差异,不同寄主菌株的酶活也存在较大差异。就同一寄主而言,5株黄瓜尖孢镰刀菌的酶活居于(21.57-54.89)U $\cdot\text{ml}^{-1}$ 之间,5株甜瓜尖孢镰刀菌的酶活变化范围在(16.28-41.83)U $\cdot\text{ml}^{-1}$ 之间,9株西瓜尖孢镰刀菌的酶活最低为14.98U $\cdot\text{ml}^{-1}$,最高为32.43U $\cdot\text{ml}^{-1}$ 。而不同寄主菌株的平均酶活为黄瓜>甜瓜>西瓜,依次为

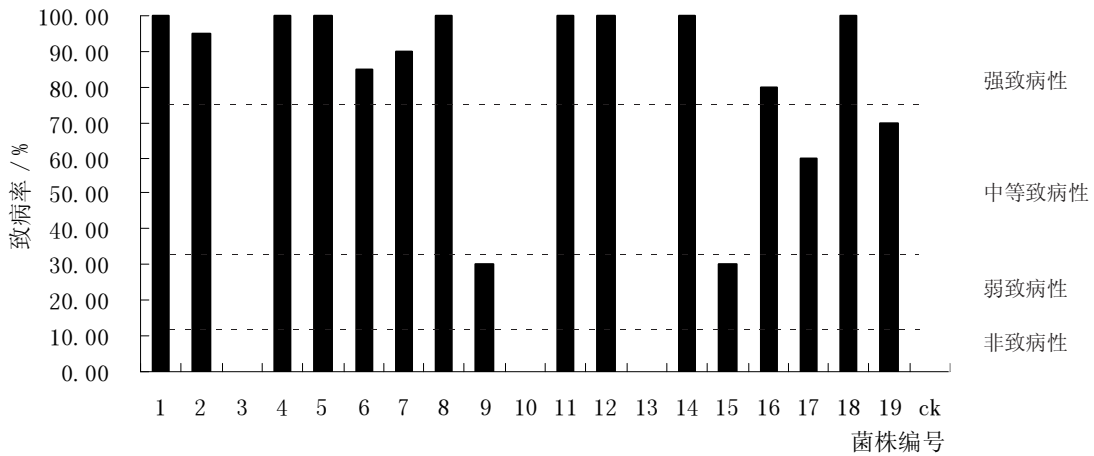


图1 瓜类尖孢镰刀菌菌株致病性测定结果

注: No. 1: F-H. 6. 5-030318-J2; No. 2: F-H. 6. 5-030318-J4; No. 3: F-H. 6. 5-030318-J1; No. 4: F-H. 6. 5-030318-B3; No. 5: F-H. 6. 5-030318-B1; No. 6: F-T. 1. 7-030514-03; No. 7: F-T. 1. 7-030514-12; No. 8: F-T. 1. 7-030514-21; No. 9: F-T. 1. 7-030514-31; No. 10: F-T. 1. 7-030520 ; No. 11: F-X. 1. 7-030520-02; No. 12: F-X. 1. 7-030520-03; No. 13: F-X. 1. 7-030520-11; No. 14: F-X. 1. 7-030520-12; No. 15: F-X. 1. 7-030520-13; No. 16: F-X. 1. 7-030527-01; No. 17: F-X. 1. 7-030527-02; No. 18: F-X. 1. 7-030527-12; No. 19: F-X. 1. 7-030527-15 ck: 清水对照

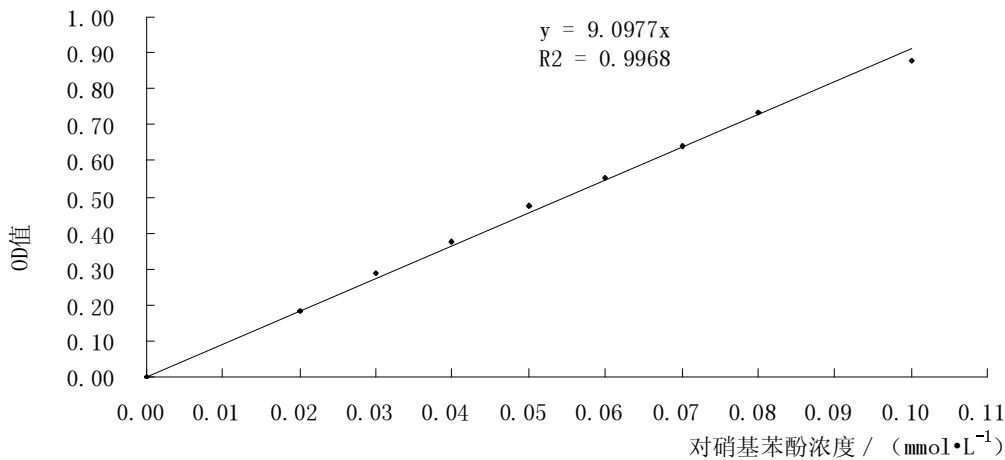


图2 对硝基苯酚-光密度标准曲线

表1 不同寄主尖孢镰刀菌菌株的β-D-葡萄糖苷酶活性测定结果

寄主	菌株数	β-D-葡萄糖苷酶活性(U·ml ⁻¹)
黄瓜	5	34.08(21.57-54.89)
甜瓜	5	27.86(16.28-41.83)
西瓜	9	20.95(14.98-32.43)

34.08、27.86 和 20.95U·ml⁻¹。

2.3 菌株致病物质 β -D- 葡萄糖苷酶活性与致病性关系

从黄瓜、甜瓜和西瓜这3种寄主尖孢镰刀菌的β -D- 葡萄糖苷酶活性与其致病性基本成三次曲线正相关性(图3),菌株的发病率(y)与酶活(x)的曲线模型为: $y=-223.43+24.067x-0.5872x^2+0.0047x^3$ ($R^2=0.5416$)。当酶活性小于30U·ml⁻¹时,菌株发病率与酶活呈正相关,包含的菌株有 F-T.1.7-030514-31(酶活 18.13U·ml⁻¹,

发病率 30%)、F-X.1.7-030520-13(酶活 14.98U·ml⁻¹,发病率 30%)、F-X.1.7-030527-02(酶活 22.12U·ml⁻¹,发病率 60%)、F-X.1.7-030527-15(酶活 15.25U·ml⁻¹,发病率 70%)、F-X.1.7-030527-01 (酶活 19.37U·ml⁻¹,发病率 80%)、F-T.1.7-030514-03 (酶活 27.27U·ml⁻¹,发病率 85%)、F-H.6.5-030318-J (酶活 23.84U·ml⁻¹,发病率 95%)、F-X.1.7-030520-03 (酶活 21.71U·ml⁻¹,发病率 100%)、F-X.1.7-030520-02(酶活 21.85U·ml⁻¹,发病率 100%)、F-X.1.7-030527-12 (酶活 25.2U·ml⁻¹,发病率 100%); 当酶活大于30U·ml⁻¹,菌株的发病率大于90%, 包括的菌株有 F-H.6.5-030318-J2、F-T. 1.7-030514-12、F-T.1.7-030514-21、F-H.6.5-030318-B3、F-H.6.5-030318-B1、F-X.1.7-030520-12; 3个非致病菌株 F-H.6.5-030318-J1、F-T.1.7-030520 和 F-X.1.7-030520-11的酶活分别为 21.57、16.28 和 15.53U·ml⁻¹。

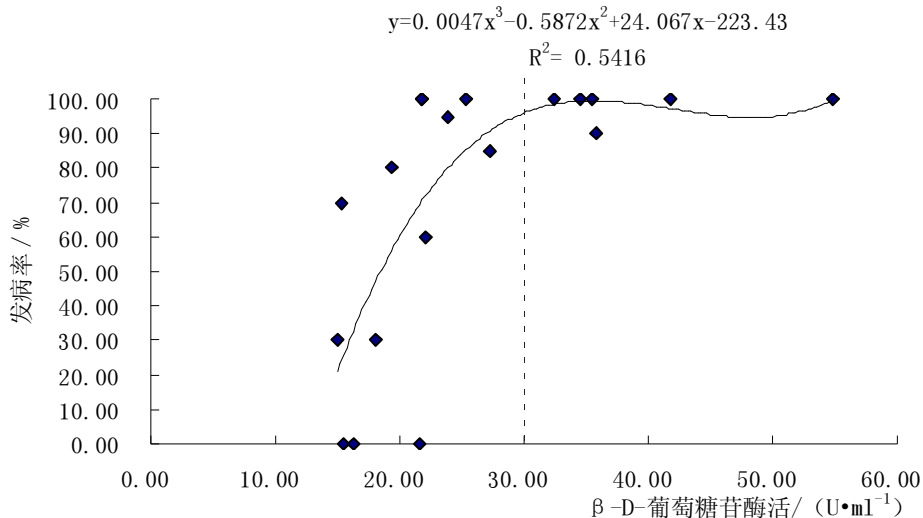


图3 菌株致病物质 β-D-葡萄糖苷酶活性与致病性关系

3 讨论

病原菌的致病性与寄主植物感病性实际上病原菌与寄主的相互作用的结果反映。植物细胞壁的复杂且有规则的结构能对病原菌侵害细胞构成一种屏障。当病原菌遇到植物细胞壁时,需要专化的酶才能使其降解。病原菌逐渐形成了识别植物细胞壁化学结构的方法,从而产生适当的酶类分解各种细胞壁组分^[1]。高洪敏^[2]的研究表明,玉米茎腐病菌 (*Fusarium graminearum* 和 *pythum aphanidermatum*) 产生的细胞壁降解酶首先降解细胞壁中胶层,然后逐渐降解细胞壁,使细胞壁变薄直至消失,从而病菌在侵染中能有效地利用寄主的细胞质营养成分,细胞壁被分解后产生大量的细胞壁碎屑和微纤丝,使寄主维管束的纹孔膜堵塞而导致萎蔫症状。此外,在黄瓜黑星病菌(*Cladosporium cucumerinum*)^[3,4]、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)^[5]、玉米茎腐病菌(*Rhizoctonia solani*)^[6]、黄瓜霜霉病菌(*Pseudoperonospron cubensis*)^[7]、玉米弯孢霉叶斑病菌(*Curvularia lunata*)^[8]、玉米纹枯病菌^[9]、水稻纹枯病菌(*Thanatephorus cucumeris*)^[10]、苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)^[11]、西瓜枯萎病菌(*F.oxysporum*)^[1] 等方面的相关报道都证明了细胞壁降解酶与病菌的致病过程密切相关。

β-葡萄糖苷酶是纤维素酶系中的一个组分,它主要作用于 β-(1,4)糖苷键,还能作用于 β-(1,1)、(1,2)、(1,3)、(1,6)糖苷键^[15]。瓜类尖孢镰刀菌菌株的 β-D-葡萄糖苷酶活测定分析结果表明,同一寄主不同菌株的 β-D-葡萄糖苷酶活存在明显差异,不同寄主菌株的 β-D-葡萄糖苷酶活也存在差异。与车建美等^[13,14]报道的黄瓜、瓠瓜寄主间及其与非瓜类寄主间的尖孢镰刀菌 β-D-葡萄糖苷酶活性具有明显差别的研究结果具

有一致性。β-D-葡萄糖苷酶是病原菌特异性细胞壁降解酶,不同菌株的 β-D-葡萄糖苷酶活具有明显差异也间接反映了菌株群体的多态性。

β-D-葡萄糖苷酶作为一种细胞壁降解酶,它破坏细胞壁结构,使病原菌易于侵入。笔者的研究表明,从黄瓜、甜瓜和西瓜这3种寄主尖孢镰刀菌的 β-D-葡萄糖苷酶活性与其致病性基本成三次曲线正相关性,菌株的发病率(y)与酶活的曲线模型为: $y = -223.43 + 24.067x - 0.5872x^2 + 0.0047x^3$ ($R^2 = 0.5416$)。当酶活性小于 $30U \cdot ml^{-1}$ 时,菌株发病率与酶活呈正相关;当酶活大于 $30U \cdot ml^{-1}$,菌株的发病率大于 90%。在甜瓜尖孢镰刀菌菌株中这种关系表现得尤为明显,但在西瓜尖孢镰刀菌菌株中,有2个菌株略有不同,菌株 F-X.1.7-030527-02 (No.17) β-D-葡萄糖苷酶活为 $22.12U \cdot ml^{-1}$,致病性为 60%;菌株 F-X.1.7-030520-11 (No.13) 酶活略高于菌株 F-X.1.7-030520-12 (No.15) 和 F-X.1.7-030527-15 (No.19),但其却表现非致病性。此结果符合王纯利^[1]报道的西瓜枯萎病菌株 β-1,4-葡萄糖苷酶活性与致病性的关系的研究结果。产生这种现象的原因是当病原菌遇上寄主细胞壁时,在细胞壁组分的诱导下,分泌一种特有的降解酶来分解细胞壁。致使寄主萎蔫,β-D-葡萄糖苷酶活性越高,则分解细胞壁的速度就越快^[3]。

冯晶^[16]对玉米弯孢霉叶斑病菌产生的细胞壁降解酶的致病作用研究表明植物体内的酶活性必须超过一个阈值,才能引起组织的病变。比较该研究中3种寄主尖孢镰刀菌的 β-D-葡萄糖苷酶活与致病性关系,可得到一个初步的结论,即就这3种寄主尖孢镰刀菌菌株而言,采用此文的 β-葡萄糖苷酶提取与测定方法,当菌株 β-D-葡萄糖苷酶活大于 $30.00U \cdot ml^{-1}$ 时,其为强

致病菌株的概率很大;而菌株 β -D- 葡萄糖苷酶活小于 $20.00\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时, 其致病性表现较弱或为无致病菌株。但这一结论还有待对更大菌株群体的研究证实, 如果这一结论成立, 它将使人们能更准确地监测田间这3种瓜类尖孢镰刀菌的种群致病性, 通过 β - 葡萄糖苷酶活性测定分析田间土壤及植株体内的菌株致病性, 起到更好地进行田间枯萎病的防治。有关 β - 葡萄糖苷酶在枯萎病致病作用中的分子基础, 有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 王纯利,王冬梅.西瓜枯萎病菌致病力与镰刀菌酸和 β -1,4- 葡萄糖苷酶活性的关系.新疆农业大学学报,2000,23(1):1-6.
- [2] 高洪敏,宁家林,于兵,等.玉米茎腐病菌致病因子对玉米超微结构的影响.玉米科学,2006,14(2):147-149.
- [3] Strider D L, Winstead N N. Production of cell-wall dissolving enzymes by *Cladosporium cucumerinum* in cucumber tissue and in artificial media. *Phytopathology*, 1961,51(11):765-768.
- [4] 李宝聚,周长力,赵奎华,等.黄瓜黑星病菌致病机理的研究II:细胞壁降解酶及其在致病中的作用.植物病理学报,2000, 30(1):13-18.
- [5] 李宝聚,陈立芹,孟伟军,等.温湿度调控对番茄灰霉病菌产生的细胞壁降解酶的影响.植物病理学报, 2003,33(3):209-212.
- [6] 高增贵,陈捷,高洪敏,等.玉米茎腐病产生的细胞壁降解酶种类及其活性分析.植物病理学报, 2000,30(2):148-152.
- [7] 石延霞,李宝聚.黄瓜霜霉病菌致病作用与两种细胞壁降解酶关系初探.园艺学报, 2003, 30(4):465-466.
- [8] 黄丽丽,王兰,康振生,等.玉米叶片受新月弯孢菌侵染后的细胞病理学的变化.植物病理学报, 2004,34(1):21-26.
- [9] 陈捷,高洪敏,纪明山,等.玉米茎腐病菌产生的细胞壁降解酶的致病作用.植物病理学报,1998,28(3):221-226.
- [10] Jayasinghe C K, Wijayaratne S C, Fernando T H. Characterization of cell wall degrading enzymes of *Thanatephorus cucumeris*. *Mycopathologia*, 2004,157 (1):73-79.
- [11] 霍云凤,娄国强,王振河.苹果炭疽病致病机理研究.安徽农业科学, 2006, 34(6):1163-1164,1166.
- [12] 车建美,刘波,朱育菁,等.尖孢镰刀菌中 β -D- 葡萄糖苷酶活性测定条件的研究.江西农业大学学报, 2006, 28(1):126-128.
- [13] 车建美,刘波.尖孢镰刀菌 β -D- 葡萄糖苷酶的多态性.亚热带农业研究,2005,1(3):26-29.
- [14] 车建美,刘波.尖孢镰刀菌 β -D- 葡萄糖苷酶异质性的研究.中国农学通报, 2005, 21(8):349-351.
- [15] 许晶,张永忠,孙艳梅. β - 葡萄糖苷酶的研究进展.食品研究与开发, 2005, 26(6):183-186.
- [16] 冯晶,高增贵.玉米弯孢霉叶斑病菌产生的细胞壁降解酶的致病作用研究.杂粮作物,2002,(3):164-166.