

硅和诱导接种对黄瓜炭疽病的抗性研究

梁永超, 孙万春

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘要: 以抗/感炭疽病的津研4号和新泰密刺两个黄瓜品种为材料, 研究了硅酸盐和诱导接种炭疽菌对多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性和木质素含量的影响及其与抗病性的关系。结果表明: 诱导接种能使处理叶(第3叶)和非处理叶(第4、6叶)的PPO活性显著增强, 能诱导植株产生系统抗病性, 而加硅与不加硅处理之间的PPO活性差异不显著; 随着叶位升高, 诱导接种与不诱导接种处理之间的PPO活性差异越小, 甚至在第6叶各处理间的差异均不显著, 由下向上, 所获得的系统抗病性逐渐减弱。同样, 诱导接种能增强植株PAL活性和提高植株木质素含量; 但加硅处理均不能提高植株PPO、PAL活性和木质素含量, 甚至使PAL活性还略有降低。经诱导接种处理的病情指数显著低于对照, 相对免疫效果达33.2%, 而不施硅接种处理与施硅接种处理之间的植株病情指数无显著差异。

关键词: 炭疽菌; 酶活性; 木质素; 黄瓜; 硅

Resistance of Cucumber Against Anthracnose Induced by Soluble Silicon and Inoculated *Colletotrichum lagenarium*

LIANG Yong-chao, SUN Wan-chun

(Department of Plant Nutrition, College of Natural Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Sandy and hydroponic culture experiments were conducted with both resistant and susceptible cucumber cultivars to investigate the effects of soluble silicon and inoculation with *Colletotrichum lagenarium* on leaf polyphenoloxidase (PPO) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activities and lignin content. The results showed that PPO activities of the 3rd leaf (inoculated), and the 4th and 6th leaf in plants inoculated with *Colletotrichum lagenarium* were significantly higher than those of un-inoculated plants. The inoculation of *Colletotrichum lagenarium* induced systemic acquired resistance (SAR) of cucumber plants, while no significant difference was observed in PPO activity between Si deprived (Si-) and Si supplied (Si+) plants. No significant difference in PPO activity was found between the treatment with Si alone and the control either. Silicate did not act as an inducing factor and exhibited less effect on PPO activity. Difference of PPO activity in cucumber leaves between inoculated and un-inoculated plants decreased with increasing of leaf position. Similarly, inoculation with *Colletotrichum lagenarium* increased PAL activity and lignin content, while silicate failed to significantly enhance PAL activity and lignin content. The cucumber plants inoculated with *Colletotrichum lagenarium* had significantly lower disease index with relative immunization efficiency of 33.2% compared to those without inoculation, while no significant difference was observed in disease index between Si deprived (Si-) and Si supplied (Si+) plants.

Key words: *Colletotrichum lagenarium*; Enzyme activity; Lignin; Cucumber; Silicon

收稿日期: 2001-04-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970430)

作者简介: 梁永超(1961-), 男, 浙江新昌人, 教授, 博士, 主要从事植物抗逆营养生理与生态研究。Tel: 025-4396393; Fax: 025-4396678; E-mail: ycliang@njau.edu.cn

随着植物病害防治研究的深入,新的防治方法不断出现。随着减少农药用量、保护生态环境观念的树立,无污染的有效防治方法越来越受到科研人员和消费者的重视^[1]。硅对于植物抗真菌病害的作用引起国内外的广泛兴趣^[2~10]。可溶性硅的应用为植物抗病性研究提供了一条新的思路和方法。这一领域的研究在国外尤其是欧洲开展较早,现已在某些植物病害,如黄瓜和大、小麦白粉病及其它病害上普遍应用。但其作用机理一直存在争议,尚未完全清楚^[2~8]。而该领域的研究在国内尚属空白。

笔者比较研究了硅和接种炭疽菌对黄瓜叶片多酚氧化酶、苯丙氨酸解氨酶活性和木质素含量的影响及其与抗病性的关系,旨在阐明硅对黄瓜抗炭疽病的影响及其机制。

1 材料与方 法

1.1 供试黄瓜品种和菌种

感病品种为在温室内对炭疽病较感的津研 4 号;抗病品种为在温室内对炭疽病较抗的新泰密刺。

黄瓜炭疽菌(*Colletotrichum lagenarium*)由南京农业大学农学院植物逆境生理实验室提供。

1.2 试验设计

设置(1)对照(CK);(2)加硅不接种(Si + C-);(3)不加硅接种(Si - C+);(4)加硅接种(Si + C+) 4 个处理,每个处理重复 4 次。

硅酸盐处理方法:砂培试验中的加硅处理是在第 5 真叶展开时,对第 2 真叶喷洒 20 mmol/L 的硅酸钾溶液;水培试验是在霍格兰营养液中加入 1.7 mmol/L 的硅酸钾溶液。

诱导接种方法:在对黄瓜叶片进行硅酸盐处理后的第 2 天,用微量进样器,采用点滴法将黄瓜炭疽病菌孢子悬浮液(浓度为 5×10^5 个/ml)接种于第 3 真叶,每叶 30 滴,每滴 5 μ l。接种后黄瓜第 3 真叶(接种叶)均用保鲜袋套上保湿 48h。

采样时间:诱导接种后第 7 天采样,分别测定第 3、第 4 和第 6 叶片的多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性及木质素含量。

1.3 种植与管理

砂培试验:种子经 0.5%高锰酸钾溶液消毒后在 25 $^{\circ}$ C 恒温箱内催芽,露白后播种于育苗盘内,待第 1 真叶露尖后移植于 160 mm \times 130 mm 的塑料花盆内,内装洗净的蛭石,每盆 1 株,每 2 d 浇 1 次霍格兰完全营养液并及时补充水分。整个种植与管理过程

均在人工温室内进行,每天光照 13h 左右并保持温度 25 $^{\circ}$ C(昼)/20 $^{\circ}$ C(夜)。

水培试验:育苗与砂培试验相同。当第 1 片真叶露尖后移入具有带孔盖板的 6.0 L 塑料箱中,装入 5.0 L 霍格兰营养液,调 pH 值至 5.5。每天通气 3h,每 2 d 调 1 次 pH 值,每 6 d 换 1 次霍格兰营养液。每天光照 13h,25 $^{\circ}$ C(昼)/20 $^{\circ}$ C(夜)。

1.4 测定方法

PPO 活性测定:参照徐朗莱和 Arnow 的方法^[11,12],取鲜样叶片 0.5g 左右放入研钵中,加入 5 ml 50 mmol/L 硼酸缓冲液(pH8.7,内含 5 mmol/L 亚硫酸氢钠)和 0.1g PVP 及少量石英砂,在冰浴条件下研成匀浆,于 4 $^{\circ}$ C,9000g 离心 20 min,取上清液测定 PPO 活力。PPO 活力测定时,反应混合液中含 4.4 ml 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH6.8),0.5 ml 150 μ mol/L 邻苯三酚,0.1 ml 酶液,20 $^{\circ}$ C 反应 5 min 后,加入 0.5 ml 15% H_2SO_4 终止反应,测定 420 nm 处的 OD 值,以每分钟 OD 值变化 0.001 为一个酶活力单位(U)。

PAL 活性测定:参照欧阳光察^[13]的方法,取黄瓜叶片 1.0g 左右于预冷研钵中,加入 5 ml 50 mmol/L 硼酸缓冲液(pH8.8,内含 5 mmol/L 巯基乙醇和 1 mmol/L EDTA)和 0.1g PVP 及少量石英砂,冰浴研成匀浆,于 4 $^{\circ}$ C,9000g 离心 25 min,上清液即为粗酶液。在 5 ml 反应体系中含 0.2 ml 酶液,3.8 ml 硼酸缓冲液,1 ml 0.6 mmol/L L-苯丙氨酸。于 40 $^{\circ}$ C 水浴保温 60 min 后,立即加入 6 mol/L HCl 终止反应,测定 OD₂₉₀ 值,以 OD 值变化 0.01 为一个酶活力单位(U)。

木质素含量测定:称取鲜样叶片 0.5g 左右,参照波钦诺克方法(1987)^[14],测定木质素含量。先用 10%醋酸处理分离出糖、有机酸和其它可溶性化合物,用丙酮处理分离出叶绿素、脂肪和其它脂溶性化合物,用 72%的硫酸分离出纤维素、半纤维素。沉淀用蒸馏水洗涤后,在硫酸存在的条件下,用重铬酸钾氧化水解产物中的木质素,过量的重铬酸钾用硫酸亚铁铵测定。按下式计算木质素含量:

$$\text{木质素含量}(\%) = 0.433 \times K(a - b) / \text{FW}$$

其中:K- 硫酸亚铁铵的滴定度(用重铬酸钾标定);

a- 对照所用硫酸亚铁铵体积(ml);

b- 滴定过剩重铬酸钾所用硫酸亚铁铵体积(ml);

FW- 样品鲜重(g)。

1.5 抗病效应试验

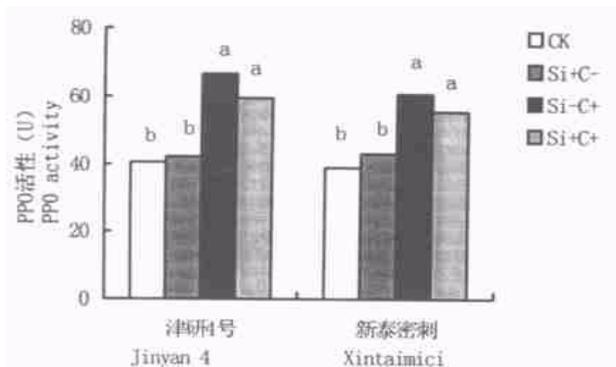
本试验所采用的黄瓜品种为津研4号,设置(1)CK;(2)Si-C+;(3)Si(20)C+等3个处理,硅酸钾浓度为20mmol/L。在黄瓜第5片真叶长出时,按以上设置,对第2真叶喷洒硅酸钾,第3真叶用 5×10^5 个/ml的炭疽菌孢子悬浮液诱导接种。诱导接种7d后,用 1.2×10^6 个/ml的炭疽菌孢子悬浮液对所有处理的整个植株喷洒,进行挑战接种(致病接种),薄膜覆盖保湿24h。挑战接种15d后,进行病情指数调查,病情指数调查参考农业部农药检定所编的《农药田间药效试验准则》(二)中的黄瓜炭疽病分级标准。

2 结果与分析

2.1 诱导接种和硅处理对黄瓜叶片多酚氧化酶(PPO)活性的影响

2.1.1 诱导接种和硅处理对黄瓜第3叶片(处理叶)多酚氧化酶(PPO)活性的影响 从图1中可看出,津研4号和新泰密刺品种的PPO活性接种均比不接种的显著增强,而在接种处理中加硅与不加硅之间的叶片PPO活性差异不显著;只加硅不接种处理与对照的PPO活性的差异也不显著。表明诱导接种能显著增强植株的抗病性,硅酸钾本身并不是一种激发子,对植株PPO活性无影响,即使在有病原物侵染条件下也不能提高植株的PPO活性。

2.1.2 诱导接种和硅处理对黄瓜非处理叶(第4.6叶)多酚氧化酶(PPO)活性的影响 从图2中可看出,津研4号和新泰密刺两个品种第4叶接种处理比不接种处理的PPO活性明显要高,差异显著(q



同一组方柱上的不同字母表示q测验在 $P=0.05$ 水平上差异显著
Different letters above the square column of the same group are significantly different at 0.05 level according to q test

图1 处理叶(第3叶)PPO活性

Fig. 1 Polyphenoloxidase activity of the leaf inoculated (the 3rd leaf)

测验)。说明病原物诱导接种所产生的抗病性为系统获得性抗性,能增强整个植株的抗病能力。但在所有处理中,加硅与不加硅处理的PPO活性差异不显著,说明硅对黄瓜抗炭疽病的效果可能不显著,无法通过激活防卫基因,诱导植株产生系统抗病性而达到抑制病害的作用。也可看出第6叶片的所有处理的PPO活性差异都不显著。说明植株的系统抗病性能够向上传输,但离诱导部位越远则越弱。

2.2 诱导接种和硅处理对黄瓜叶片苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的影响

从图3中可看出,接种处理比不接种处理的PAL活性显著增强。在所有不接种处理中,施硅与不施硅植株的PAL活性无差异。但在砂培试验中,加硅处理植株比不加硅处理植株的PAL活性显著下降;在水培试验中,施硅接种处理植株也比不施硅接种处理植株的PAL活性略有降低。

2.3 诱导接种和硅处理对黄瓜叶片木质素含量的影响

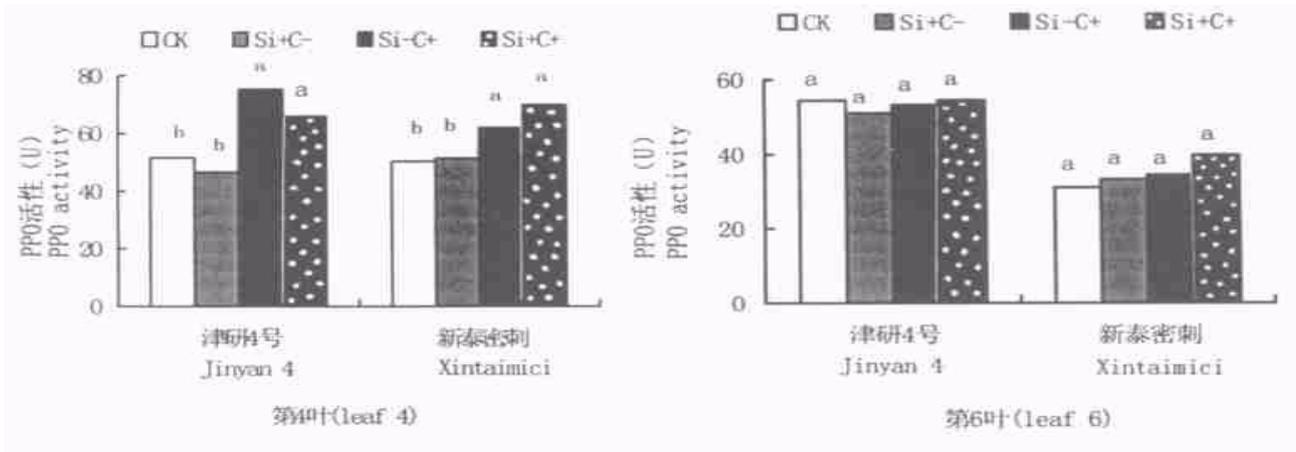
本试验所采用的黄瓜品种为新泰密刺,测定其第3叶片的木质素含量。从图4中可看出,接种处理比不接种处理的木质素含量明显要高,且差异极显著;加硅与不加硅处理的差异不显著。说明诱导接种能提高植株的木质素含量,加强寄主植物的木质化能力,从而提高植株的系统抗病能力,但加硅对木质素含量无显著影响。

2.4 诱导接种和硅处理对黄瓜抗炭疽病的效应

从表中可看出,经接种诱导处理的黄瓜炭疽病病情指数显著低于对照(q测验),相对免疫效果达33.2%,而Si-C+处理与Si(20)C+处理之间的植株病情指数无差异。这与多酚氧化酶、苯丙氨酸解氨酶活性和木质素含量变化很相似,说明诱导接种能通过增强与抗病有关的各种酶活性,提高木质素含量增强植株的木质化作用而达到提高植株抗病的目的。

3 讨论

硅能提高植物的抗病性已是不争的事实,如据Menzies等(1991)报道,加硅能使黄瓜叶片上的白粉病斑的数目、面积及分生孢子的萌发数显著减少,用硅酸钾代替硅酸钠对病害的抑制作用相同,而用硫酸钾代替硅酸钾或硅酸钠都不能减轻病害,说明对白粉病起作用的是Si而不是 Na^+ 或 K^+ [7]。但对其作用机理尚存在争论。目前主要有两种假说,一种是硅沉淀假说,认为沉积在乳突体、表皮层或受真菌

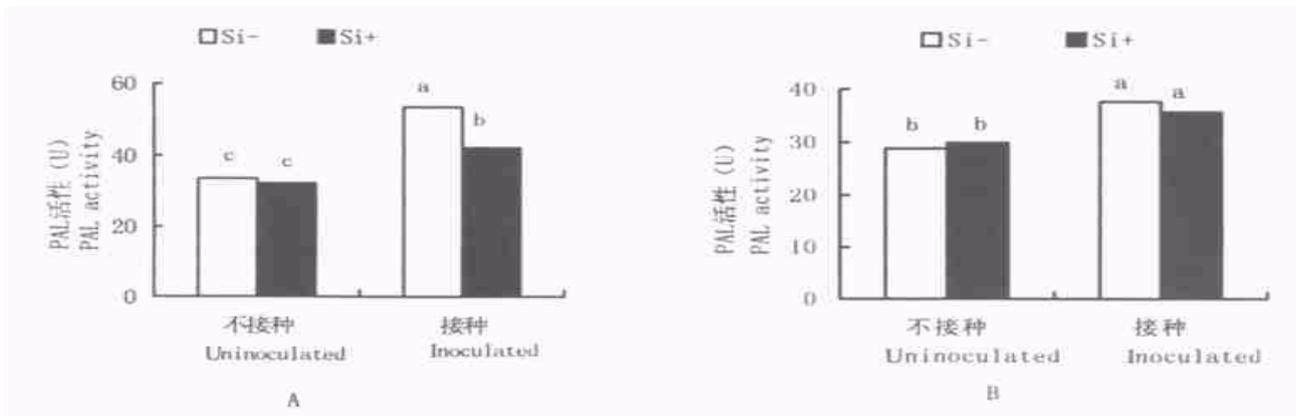


同一组方柱上方的不同字母表示 q 测验在 P=0.05 水平上差异显著

Different letters above the square column of the same group are significantly different at 0.05 level according to q test

图 2 非处理叶的 PPO 活性

Fig. 2 Polyphenoloxidase activity of the un-inoculated leaves



A 为砂培试验,加硅处理是在第 5 真叶展开时,对第 2 真叶喷洒 20 mmol/L 的硅酸钾溶液;

B 为水培试验,加硅处理是在霍格兰营养液中加入 1.7 mmol/L 的硅酸钾溶液

A is the result from the sandy culture experiment where Si treatments were undertaken by spraying 20 mmol/L Si as soluble potassium silicate when the 5th leaf was fully expanded; B is the result from hydroponic experiment where nutrient solutions containing 1.7 mmol/L Si as potassium silicate were supplied for the treatments with Si

图 3 诱导接种和硅处理对黄瓜叶片 PAL 活性的影响

Fig. 3 Effects of soluble silicon and inoculation with *Colletotrichum lagenarium* on phenylalanine ammonia-lyase in leaves of cucumber plants

表 诱导接种和加硅处理后的黄瓜炭疽病病情指数和相对免疫效果

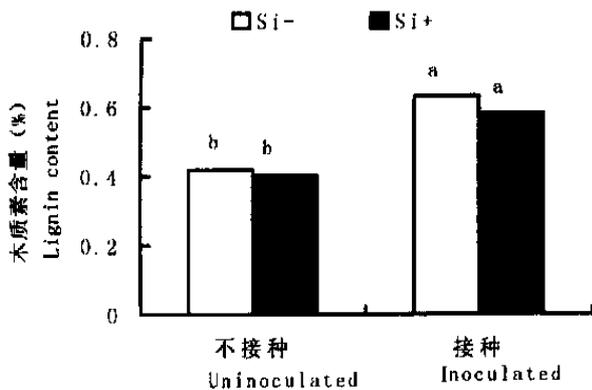
Table Effects of soluble silicon and inoculation with *Colletotrichum lagenarium* on disease index and relative immunization efficiency in leaves of cucumber plants

处理 Treatment	病情指数 (%) Disease index	相对免疫效果 (%) Relative immunization efficiency
CK	45.99 a	-
Si - C +	30.77 b	33.2
Si(20) C +	30.77 b	33.2

浸染部位、伤口处的硅增加了植物细胞壁的机械强度^[9,10],起着天然的“机械或物理屏障”作用;另一种假说是,硅可能参与植物寄主和病原物相互作用体系的代谢过程,经过一系列生理生化反应和信号传导,激活寄主防卫基因,诱导植株系统抗病性的表达而达到抑制病害的作用^[2,3]。

Koga(1988)认为,由于病原物浸染细胞,导致细胞膜透性增加,水分大量蒸发,可溶态硅随木质部的质流不断地被输送到受病原物侵染的部位或伤口

处。硅与有机酸、二酚和多酚类化合物形成难溶的络合物,在细胞死亡过程之中中和之后,通过降解,酚类化合物被释放出来,这样可以解释受病原物侵染细胞的细胞壁乳突体部位酚类化合物含量的增加和硅沉淀的形成。并且认为起作用的是难溶性硅,而不是可溶性硅。X射线能谱分析数据显示,硅与通常以可溶态无机化合物形式存在的 Al、Ca、K、Mg、Mn、Na 等元素没有关系^[4]。而另一些学者认为,在病原物侵染部位或伤口处硅的淀积主要是由于蒸腾作用,如果用塑料袋套住叶片保持高湿环境,则在叶片受侵染部位或伤口处没有发现硅的淀积,在根部也没有硅的淀积;并通过扫描电镜发现一些受真菌侵染的部位并没有硅的淀积,而一些有硅淀积的部位仍然阻挡不住真菌菌丝的侵入^[3,5]。



方柱上方的不同字母表示 q 测验在 $P=0.05$ 水平上差异显著
Different letters above the square column are significantly different at 0.05 level according to q test

图 4 诱导接种和硅处理对黄瓜叶片木质素含量的影响

Fig. 4 Effects of soluble silicon and inoculation with *Colletotrichum lagenarium* on lignin content in leaves of cucumber plants

据报道,硅能使植株体内与抗病性有关的酶类、酚类物质增加^[2,6]。这一系列证据显示,硅有可能不是依靠机械物理作用而是通过参与代谢作用,诱导植株系统抗病性的表达而达到抑制植物病害作用。Cherif(1994)等指出,硅与其它诱导剂相比,一个显著优势是在病原物侵染之前不改变植物的正常生理代谢,不会因消耗能量而导致作物减产^[2]。而其它诱导剂如病原物、草酸、水杨酸等却会改变正常代谢途径,消耗能量,导致不必要的减产。本试验表明,硅对黄瓜叶片多酚氧化酶、苯丙氨酸解氨酶活性和木质素含量没有显著影响,对抗炭疽病效果也不显著。看来,硅对不同作物、不同真菌引起的病害的

抗病效果和机理可能各不相同,要完全弄清其机理有待于进一步探索。下一步的工作将进一步研究硅对黄瓜抗御其它病害的效果及其抗病机制如与抗病性有关的酶类、酚类、木质素等物质的影响,以便为正确评价硅对抗作物真菌病害的效果、揭示其作用机制提供理论基础,也为认识硅的生物学作用提供新的实验依据。

References :

- [1] Kuc J. Protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant Pathol.* 1975, 7:195 - 199.
- [2] Cherif M, et al. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathology*, 1994, 84: 236 - 242.
- [3] Cherif M, et al. Studies of silicon distribution in wounded and *Pythium ultimum* infected cucumber plants. *Physiol. and Mol. Plant Pathology*, 1992, 41:371 - 385.
- [4] Koga H, et al. Hypersensitive cell death, autofluorescence, and insoluble silicon accumulation in barley leaf epidermal cells under attack by *Erysiphe graminis* f.sp.hordei. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1988, 32:395 - 409.
- [5] Cherif M, et al. Use of potassium silicate amendments in recirculating nutrient solutions to suppress *Pythium ultimum* on longer English cucumber. *Plant Disease*, 1992, 76:1008 - 1011.
- [6] Cherif M, et al. Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1992, 41:411 - 425.
- [7] Menzies J G, et al. Effect of soluble silicon on the parasitic fitness of *spherotheca fuliginea* on *cucumis sativus*. *Phytopathology*, 1991, 81: 84 - 88.
- [8] Carver T L W, et al. Silicon deprivation enhances localized autofluorescent responses and phenylalanine ammonia-lyase activity in oat attacked by *Blumeria graminis*. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 1998, 52:245 - 257.
- [9] Carver T L W, et al. The relation between insoluble silicon and success or failure of attempted penetration by powdery mildew (*Erysiphe graminis*) germings on barley. *Physiological Plant Pathology*, 1987, 31:133 - 148.
- [10] Heath M C. The suppression of the development of silicon-containing deposits on French bean leaves by exudates of the bean rust fungus and extracts from bean rust-infected tissue. *Physiological Plant Pathology*, 1981, 18:149 - 155.
- [11] Xu L L, et al. Successive recording method for assay of peroxidase activity. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1989, 12(3):82 - 83. (in Chinese)
徐朗莱,等.过氧化物酶活力连续记录测定法.南京农业大学学报,1989,12(3):82 - 83.
- [12] Arnou L E. Colorimetric determination of the components of 2,4-dihydroxyphenyl alanine. *Biol. Chem.* 1937, 118:531 - 539.
- [13] Ouyang G C. Assay of Phenylalanine Ammonia-lyase Activity. *Guide to Plant Physiology*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1989:136 - 145. (in Chinese)
欧阳光察.苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的测定.植物生理学实验手册.上海:上海科学技术出版社,1989:136 - 145.
- [14] Boqinluoke X H. *Analysis Methods of Plant Biochemistry*. Beijing: Science Press, 1987. (in Chinese)
X. H.波钦诺克著(荆家海、丁钟荣译).植物生物化学分析方法.北京:科学出版社,1987.