

玫瑰黄链霉菌Men-myco-93-63诱抗粗蛋白对黄瓜的诱抗作用

郭景红¹, 韩兴², 甄丹妹¹, 孟庆芳¹, 康占海¹, 王冰¹, 李亚宁^{1*}, 刘大群^{1,2}

(1. 河北农业大学植物保护学院/河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心/国家北方山区农业工程技术研究中心, 保定 071001;

2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

摘要: 玫瑰黄链霉菌 *Streptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63 是分离自马铃薯疮痂病自然衰退土壤中的一株拮抗链霉菌, 该菌株及其代谢产物对多种重要的植物病原菌都具有较强的抑制作用, 为了探明该生防菌产生的诱抗粗蛋白对黄瓜抗病性的诱导作用, 采用离体叶片接种的方法, 发现诱抗粗蛋白诱导黄瓜叶片灰霉病发病直径显著小于对照; 经组织染色法和紫外分光光度计法测定, 发现诱抗粗蛋白可以诱导黄瓜叶片中活性氧 (ROS) 的积累和超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和多酚氧化酶 (PPO) 等抗病相关酶活性的显著提高; 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 测定, 发现诱抗粗蛋白还可以诱导黄瓜叶片中 *PR-1a*、*PR-3*、*PR-9* 和 *NPR1* 等抗病相关基因表达的上调, 试验结果表明 Men-myco-93-63 产生的诱抗粗蛋白能够诱导黄瓜抗病性的提升。

关键词: 玫瑰黄链霉菌; 诱抗蛋白; 诱导抗病性; 防御酶活性; 抗病相关基因

中图分类号: S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261(2020)02-0272-08

Induced Resistance of Crude Protein Produced by *Streptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63 to Cucumber Disease

GUO Jinghong¹, HAN Xing², ZHEN Danmei¹, MENG Qingfang¹, KANG Zhanhai¹,
WANG Bing¹, LI Yaning^{1*}, LIU Daqun^{1,2}

(1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei/Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province/National Engineering Research Center for Agriculture in Northern Mountainous Areas, Baoding 071001, China.

2. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: *Streptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63 is an antagonistic *Streptomyces* sp. isolated from the soil where potato scab could decline naturally. The strain and its metabolites have strong inhibitory effects on many important plant pathogens. In order to investigate the induction resistance of the crude protein produced by Men-myco-93-63 to cucumber disease, leaf inoculation was used *in vitro*. The results showed that the lesion diameter of gray mold in the leaves of cucumber induced by crude protein was significantly smaller than that of buffer solution. Detected by tissue staining and ultraviolet spectrophotometry, the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and activity of resistance-related enzymes such as superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO), were significantly increased in cucumber leaves induced by crude protein compared with buffer solution. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) showed that the crude protein could also induce the up-regulation of the expression of resistance-related genes such as *PR-1a*, *PR-3*, *PR-9* and *NPR1* in cucumber leaves, indicating that the crude protein produced by Men-myco-93-63 could induce disease resistance in cucumber.

收稿日期: 2019-08-19

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0200900); 河北省现代农业产业技术体系创新团队项目 (HBCT2018060204); 河北省科技计划项目 (15227530)

作者简介: 郭景红, 硕士研究生, E-mail: 1248001431@qq.com; *通信作者, 教授, E-mail: yaning22@163.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.02.013

Key words: *Streptomyces roseoflavus*; protein elicitor; induced disease resistance; defense enzyme activity; resistance-related genes

诱导抗病性是指植物在生物或非生物因子的诱导下, 为抵御病原菌的侵染而产生的一系列抗病性反应, 因其具有不影响植物自身遗传特性, 来源广泛, 可操作性强, 广谱性与持续性以及安全性等诸多优点, 逐渐成为生物防治研究中的热点^[1]。蛋白激发子是最主要的一类植物诱抗剂, 能够被寄主植物细胞识别, 并通过一系列的信号转导逐级传递至植物其他组织细胞, 进而诱导植物组织或细胞发生相应的防卫反应, 如活性氧的迸发、防御酶活性的增强以及抗病相关基因和抗病相关蛋白的表达, 从而激发植物的抗病性^[1]。植物在识别诱导因子后, 能够迅速产生并积累大量的 ROS, ROS 包括过氧化氢(H₂O₂)、超氧根离子(O₂⁻)、氢氧根离子(OH⁻)、单线态氧(¹O₂)等, 出现 ROS 迸发现象, 这是植物防御反应体系中发生最早期的反应之一, 也是最关键的反应之一, 可作为诱导植物防御反应的标志^[3]。在植物诱导抗病反应机理研究中, 防御酶活性的变化已是公认的重要生理生化指标, 其中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)等抗性相关酶主要参与了诱导抗病过程中的酶活催化反应、次生物质的代谢过程以及抗病相关物质的合成^[4]。在抗病相关基因方面, *PR-1* 基因不仅是植物系统获得抗病性的关键基因, 还是水杨酸信号转导途径的重要标志基因^[5]; *NPR1* 基因可以调控植物体内 *PR-1* 和 *PR-5* 等 *PR* 基因的表达, 是植物系统获得抗病性过程中的关键调控因子, 并且 *NPR1* 基因在调控植物抗病过程中的水杨酸信号转导途径和茉莉酸、乙烯信号转导途径的协同与拮抗关系中同样发挥着重要作用^[5]。

目前, 报道的蛋白激发子大多来源于真菌, 少数为细菌, 很少来源于放线菌^[6]。玫瑰黄链霉菌 *Streptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63 是一株分离自马铃薯疮痂病自然衰退土壤中的生防链霉菌^[7], 该菌株及其发酵液对黄萎病^[8]、白粉病^[9]和线虫^[10]等多种重要植物病害具有较好的防治效果, 并且对黄瓜等作物表现出促生和诱导抗病性的作用。本研究以烟草和黄瓜幼苗为试验对象, 已分离获得了具有生物活性的 Men-myco-93-63 诱抗粗蛋白, 研究了诱抗粗蛋白的热稳定性等^[11], 为了进一步探究该诱抗粗蛋白诱导黄瓜的抗病性作用及其机理, 本文以黄瓜-灰霉病互作体系为研究对象, 利用 Men-myco-93-63 产生的诱抗粗蛋白处理黄瓜幼苗, 检测分析处理后黄瓜叶片对灰霉病的抗病效果, 分析叶片中几种防御酶活性的变化、抗病相关物质含量以及抗病相关基因表达的变化, 证实了 Men-myco-93-63 诱抗粗蛋白的诱抗作用, 为进一步开发生防放线菌蛋白类激发子及探明其诱抗机制提供重要依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

黄瓜品种: 香农 4 (黑龙江哈尔滨市香坊区种子公司)。

菌株: 玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 和黄瓜灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 由河北农业大学植物病害生物防治实验室提供。

PDA 培养基: 马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, 琼脂粉 1.8%。

发酵培养基: 葡萄糖 2.4%, 可溶性淀粉 0.8%, 花生饼粉 1.5%, 玉米浆 0.8%, 氯化钠 0.4%, 碳酸钙 0.3%, 磷酸二氢钾 0.02%^[12]。

1.2 发酵液的制备

将斜面保存的玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 菌种在 PDA 上活化培养 7 d 至孢子发育成熟, 将孢子刮下, 制成孢子悬浮液, 调整孢子浓度为 5×10^8 cfu/mL, 取 200 μ L 孢子悬浮液接种于 100 mL 发酵培养基中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床振荡培养 5 d^[12]。

1.3 诱抗粗蛋白的提取

取发酵液, 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 20 min, 取上清, 0.22 μ m 滤膜抽滤两次去除菌体。加入硫酸铵饱和溶液, 使上清液中硫酸铵的饱和度达到 30%, 4 $^{\circ}$ C 静置 4 h, 4 $^{\circ}$ C、10000 r/min 离心 15 min, 取上清液加入硫酸铵粉末使上清液中的饱和度达到 70%, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 4 $^{\circ}$ C、10000 r/min 离心 15 min, 取沉淀溶于适

量磷酸盐缓冲液 (PBS, 20 mmol/L, pH 7.8), 用蒸馏水 4 °C 透析 24 h 期间更换一次蒸馏水, 再用 PBS 缓冲液 4 °C 透析 24 h, 期间更换一次缓冲液, 4 °C、8000 r/min 离心 15 min, 取上清, 在冷冻干燥机中 -50 °C 冷冻干燥成粉末, 获得诱抗粗蛋白, 将其在 -20 °C 保存备用。采用 Tricine-SDS-PAGE 电泳检测蛋白分子量。

1.4 诱抗粗蛋白对黄瓜灰霉病的诱抗效果

采用改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒将诱抗粗蛋白稀释至 3 mg/mL, 备用。在直径 15 cm、高 15 cm 的花盆中培养黄瓜幼苗 (每盆 1 株, 营养土与普通土 1:1 混合, 光照 11 h), 当黄瓜幼苗生长至 4 叶 1 心时, 取 3 mg/mL 的诱抗粗蛋白溶液于小型喷壶中, 对黄瓜幼苗的下部叶片进行喷雾处理, 每株幼苗喷施 10 mL (叶面均匀挂满雾滴), 以缓冲液为对照, 每个处理设 3 个重复 (每个重复 3 株幼苗)。喷雾处理后 24 h, 用消毒处理的剪刀分别剪下处理黄瓜的处理叶片和系统叶片 (下部喷雾处理的叶片为处理叶, 未处理的上部叶片为系统叶), 将其放置于水培养基 (含 1.5% 琼脂) 的培养皿中, 用打孔器分别取空白 PDA 培养基和扩繁培养 7 d 的黄瓜灰霉菌菌块, 分别接种于每片黄瓜叶片的两侧, 将培养皿放置在培养箱中培养, 试验重复 3 次, 3 d 后测量记录病斑直径, 计算抑制率, 抑制率 (%) = (对照病斑直径 - 处理病变直径) / 对照病斑直径 × 100。

1.5 诱抗粗蛋白处理后黄瓜叶片中活性氧的积累

分别采用 DAB 和 NBT 组织染色法对诱抗粗蛋白诱导黄瓜叶片中过氧化氢和超氧负离子的产生和积累进行分析^[13]。取生长至 3 叶 1 心的黄瓜幼苗 (培养条件同 1.4), 利用 1 mL 无针头注射器将 3 mg/mL 的粗蛋白溶液从叶片背面注入黄瓜幼苗的叶片中, 缓冲液作对照, 处理 4 h 后, 剪下注射处理的整个叶片, 将叶片分别浸入 1 mg/mL DAB 的磷酸缓冲液 (0.02 mol/L, pH=7.0) 和含有 1% NBT 10 mM 磷酸缓冲液 (0.02 mol/L, pH=7.0) 中, 真空渗透 5 min, 染色 1 h, 用 95% 乙醇脱色至组织透明, 于显微镜下观察拍照。

1.6 诱抗粗蛋白处理后黄瓜叶片中防御酶活性及抗病相关物质含量

取生长至 4 叶 1 心的黄瓜幼苗 (培养条件同 1.4), 将 3 mg/mL 的粗蛋白溶液对黄瓜幼苗下部的两叶片进行喷雾处理, 每株幼苗喷施 10 mL (叶面均匀挂满雾滴), 并以缓冲液为对照, 每个处理设 3 个重复 (每个重复 3 株幼苗)。分别于处理后的 0、1、3、5 和 7 d 用消毒的剪刀剪下处理黄瓜幼苗的处理叶片和系统叶片。采用苏州科铭生物有限公司的试剂盒测定超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、多酚氧化酶 (PPO) 和苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的活性变化以及丙二醛 (MDA) 和过氧化氢 (H₂O₂) 含量水平的变化。

1.7 诱抗粗蛋白处理后黄瓜叶片中抗病相关基因表达量

黄瓜幼苗处理及取样同 1.6, 使用 TaKaRa 公司的 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 提取叶片的 RNA。使用 ABM 公司的 5×All-In-One RT MasterMix 试剂盒进行反转录合成 cDNA。根据 RNA 的浓度进行均一化计算, 使得反转录体系中 RNA 浓度为 1500 ng/20 μL, 5×All-In-One RT MasterMix 4 μL, Nuclease-free H₂O 补足 20 μL 体系, 混匀以上成分, 瞬时离心, 25 °C 10 min; 42 °C 15 min; 85 °C 5 min。-20 °C 保存备用。

以反转录的 cDNA 为模板, 使用全式金生物技术有限公司的 qPCRMix, 于罗氏 LightCycler® 96 实时荧光定量 PCR 仪对抗病相关基因的表达情况进行分析。抗性相关基因及内参基因的引物序列 (表 1) 参考 Alizadeh^[14]和 Shores^[15]。

表 1 抗性相关基因及内参基因引物

Table 1 The primers of resistance related genes and internal reference gene

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer (5'—3')	反向引物 Reverse primer (5'—3')
PR1a	TGCTCAACAATATGCGAACC	TCATCCACCCACAACCTGAAC
PR3	TGGTCACTGCAACCCTGACA	AGTGGCCTGGAATCCGACT
PR9	AGAGCAACAAGGTCGGTTTCA	GTGCCGACATCCTAGCTCAAG
NPR1	TTACTGATAAGGGCAAGAAGGCC	AAAGTTCACAAAGAGCAGGATGG
Actin	TCCACGAGACTACCTACAACCT	GCTCATAACGGTCAGCGAT

qRT-PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 10 s, Tm 退火 15 s, 72 °C 延伸 20 s, 45 个循环; 溶解 95 °C 10 s, 65 °C 60s, 97 °C 1 s; 37 °C 冷却 30 s。根据检测到的 CT 值, 按照基因相对表达量公式: $2^{-\Delta\Delta CT}$, 计算诱导抗病相关基因的表达情况^[16]。

2 结果与分析

2.1 诱抗粗蛋白的提取

玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 无菌体发酵液上清经硫酸铵分级沉淀和透析后, 获得了诱抗粗蛋白, 经 Tricine-SDS-PAGE 电泳检测, 与标准蛋白 Marker 对比, 诱抗粗蛋白的分子量在 15~66 kD 范围内 (图 1)。

2.2 诱抗粗蛋白对黄瓜灰霉病的诱抗效果

诱抗粗蛋白处理的黄瓜叶片的处理叶和系统叶的病变直径均明显小于对照组的病变直径, 抑制率分别为 41.41% 和 26.40%, 差异显著。诱抗粗蛋白处理叶的病变直径小于系统叶的病变直径, 但差异不显著。而空白 PDA 培养基未能引起黄瓜叶片的病变, 排除了 PDA 培养基对本试验的干扰, 表明玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 诱抗粗蛋白对黄瓜灰霉病具有较好的诱抗效果, 可以诱导黄瓜对灰霉病产生抗病性 (图 2)。

2.3 诱抗粗蛋白处理后黄瓜叶片中活性氧的积累

活性氧迸发是植物的早期防御反应之一, 活性氧主要包括过氧化氢和超氧负离子等。诱抗粗蛋白

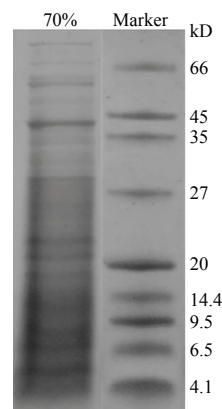
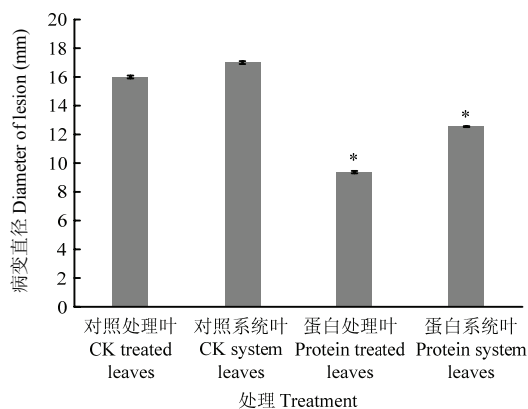
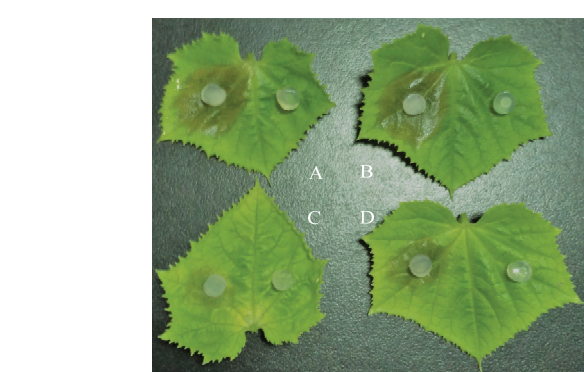


图 1 诱抗粗蛋白 Tricine-SDS-PAGE 电泳图

Fig. 1 Crude protein elicitor in Tricine-SDS-PAGE



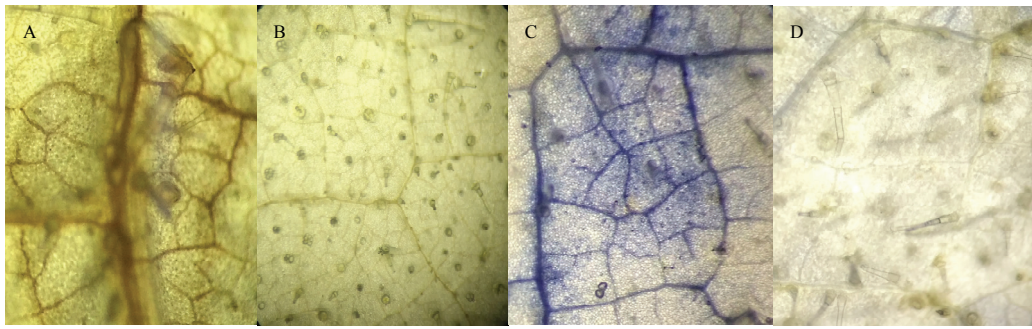
注: 左图的 A、B 分别代表缓冲液处理黄瓜处理叶和系统叶, C、D 分别代表诱抗粗蛋白处理黄瓜处理叶和系统叶, 每个叶片的左侧和右侧分别接种灰霉菌块和空白 PDA 培养基; 右图为蛋白溶解缓冲液和诱抗粗蛋白分别处理的黄瓜处理叶和系统叶接种灰霉菌菌后的病变直径统计分析。

Note: A and B on the left figure represent treated leaves and system leaves of cucumber treated with protein dissolution buffer, C and D represent treated leaves and system leaves of cucumber treated with inducing crude protein, the left and right sides of each leaf were inoculated with *B. cinerea* and blank PDA medium, respectively; The figure on the right shows the statistical analysis of the diameter of lesions of cucumber treated leaves and system leaves treated with protein dissolution buffer and inducing crude protein inoculated with *B. cinerea*.

图 2 诱抗粗蛋白诱导黄瓜对灰霉病的抗病性

Fig. 2 Induced resistance of cucumber to *B. cinerea* by the crude protein elicitor

处理的黄瓜叶片部位经 DAB 染色后, 叶片呈现褐色, 而对照叶片无褐色变化, 表明诱导粗蛋白处理黄瓜叶片可以诱导过氧化氢在叶片中富集。同样, 诱抗粗蛋白处理的黄瓜叶片部位经 NBT 染色后, 叶片呈现蓝色, 而对照叶片无蓝色变化, 表明诱导粗蛋白处理黄瓜叶片也可以诱导超氧阴离子在叶片中积累 (图 3)。



注: A 和 B 分别代表诱抗粗蛋白和蛋白溶解缓冲液分别处理的黄瓜叶片经 DAB 染色结果; C 和 D 分别代表诱抗粗蛋白和蛋白溶解缓冲液分别处理的黄瓜叶片经 NBT 染色结果。

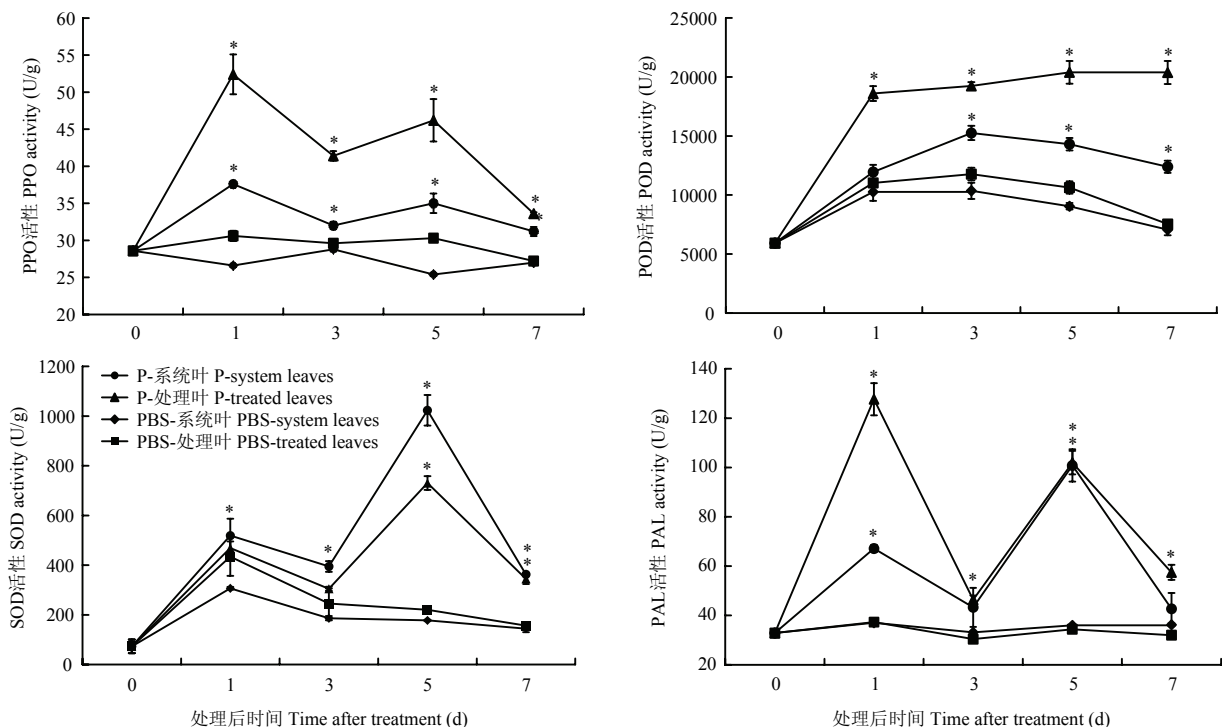
Note: A and B respectively represent the results of DAB dyeing of cucumber leaves treated with crude protein and protein dissolution buffer. C and D respectively represent the results of NBT dyeing of cucumber leaves which are treated with crude protein and protein dissolution buffer.

图 3 诱抗粗蛋白处理后黄瓜叶片中活性氧的积累

Fig. 3 The accumulation of ROS in cucumber leaves treated by the crude protein elicitor

2.4 诱抗粗蛋白处理后黄瓜叶片中防御酶活性及抗病相关物质含量

诱抗粗蛋白可显著提高黄瓜叶片中 SOD、POD、PPO 和 PAL 的活性。处理 5 d 后, 诱抗粗蛋白处理的叶片中 SOD 活性均达到最高, 其中诱抗粗蛋白处理的系统叶和处理叶的 SOD 活性分别是对照的 5.8 和 3.3 倍, 并且诱抗粗蛋白处理的黄瓜系统叶片的 SOD 活性高于处理叶片。处理 3 d 后, 诱抗粗蛋白处理的系统叶的 POD 活性达到最高, 约是对照的 1.5 倍, 但低于同一时间诱抗粗蛋白处理叶片的活性, 而处理 5 d 后的 POD 活性达到最高, 约是对照的 1.9 倍。处理 1 d 后, 诱抗粗蛋白处理的系统叶片和处理叶片的 PPO 活性均达到最高, 分别是对照的 5.8 和 3.3 倍。诱抗粗蛋白处理的叶片的 PAL 活性在处理 1 d 后达到最高, 约是对照的 3.4 倍, 而系统叶片的 PAL 活性在处理 5 d 后达到最高, 约是对照的 2.8 倍 (图 4)。



注: *表示显著性差异 ($P < 0.05$)。下同。

Note: * indicated significant difference at 0.05 level. The same below.

图 4 诱抗粗蛋白处理后黄瓜叶片中防御酶活性的变化

Fig. 4 Changes in the activities of defensive enzymes in cucumber leaves treated by the crude protein elicitor

丙二醛 (MDA) 是植物膜脂过氧化的产物之一, 其含量体现细胞质膜过氧化的程度, 含量越高表明细胞质过氧化程度越高, 细胞膜受到的损伤越严重^[17]。处理 3 d 后, 诱抗粗蛋白处理的处理叶片和系统叶片内的 MDA 含量均达到最低水平, 分别是对照的 0.83 和 0.63 倍。过氧化氢 (H_2O_2) 属于活性氧的一种, 诱抗粗蛋白处理的处理叶片和系统叶片的 H_2O_2 含量在处理 1 d 后迅速达到了最高, 分别是对照的 1.82 和 1.84 倍; 随着时间的变化, H_2O_2 含量逐渐降低, 达到新的平衡状态, 避免了含量长时间过高对细胞产生损害 (图 5)。

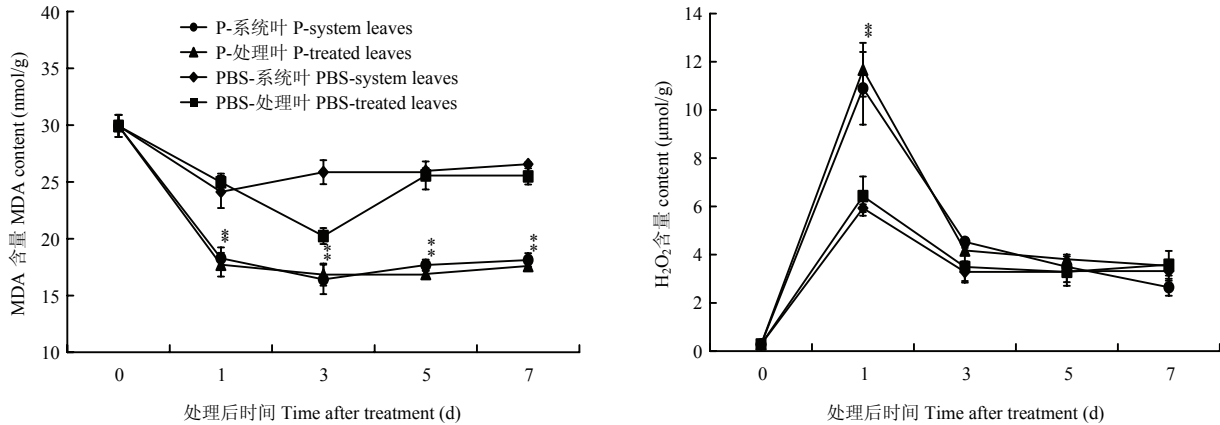


图 5 诱抗粗蛋白处理后黄瓜叶片中防御相关物质含量的变化

Fig. 5 Changes in the content of defensive substance in cucumber leaves treated by the crude protein elicitor

2.5 诱抗粗蛋白处理后黄瓜叶片中抗病相关基因表达量的变化

诱抗粗蛋白可诱导黄瓜叶片中抗病相关基因的表达。处理 3 d 后, 处理叶片的 *PR-1a*、*PR-3*、*PR-9* 和 *NPR1* 基因的相对表达量均达到最高, 分别是对照的 2.3、2.3、2.4 和 4.5 倍。并且处理 3 d 后, 系统叶片的 *PR-1a*、*PR-9* 和 *NPR1* 基因的相对表达量也达到最高, 分别是对照的 2.1、2.1 和 1.9 倍。而系统叶片的 JA/ET 信号通路的标志基因 *PR-3* 的相对表达量在处理 5 d 后达到最高, 是对照的 1.6 倍, 表明该基因可能是通过 JA/ET 信号通路起作用, 进而导致表达的延后 (图 6)。

3 讨论

激发子可以诱导植物抗病性的产生, 增强植物的抗病防御能力, 对植物起到保护作用。研究发现, 从侧孢短芽胞杆菌 *Brevibacillus laterosporu* 中获得的激发子 PeBA1 可以诱导烟草对 TMV 和灰霉病的系统抗性, 显著降低了枯斑数量和病斑直径^[18]。从解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 中获得的激发子 PeBL1 可以诱导烟草抗病性的产生, 对 TMV 的病斑数和病斑直径的抑制率达 42.91% 和 43.23%, 对假单胞杆菌致病变种 *Pseudomonas spp.* 的抑制率达 30.01%^[19]。但目前报道的具有诱导抗病性的蛋白激发子大多来源于生防细菌, 很少来源于生防放线菌, 本试验从生防放线菌玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 中获得的诱抗粗蛋白可以诱导黄瓜对灰霉病的系统抗性, 显著降低灰霉菌的病斑直径, 表明玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 诱抗粗蛋白可以诱导黄瓜对灰霉病的抗病性, 与来源于生防细菌的蛋白激发子具有相似的诱导抗病性作用, 丰富了蛋白激发子的来源。但该诱抗粗蛋白的效应蛋白及其对其他病害或植物的诱导抗病性作用还需进一步分离纯化和验证。

激发子诱导植物抗病性的产生, 可以通过检测其处理植物后, 植物体内的活性氧的迸发, 抗病相关防御酶活性的变化以及抗病相关基因的表达情况进行验证分析。从病原菌中分离获得蛋白类激发子处理烟草和棉花后, 可以引起植物体内 POD、PPO 和 PAL 等抗性相关酶活性的提高以及 *PR1-a*、*PR1-b* 和 *NPR1* 等抗病相关基因表达的上调^[20]; 从生防细菌中获得的蛋白激发子处理烟草后, 可以引起烟草体内 *PR-1a*、*PR-5*、*NPR1* 和 *PAL* 等抗病相关基因表达的上^[18,19]。本试验测定了从玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 中获得的诱抗粗蛋白处理黄瓜幼苗后 SOD、POD、PPO 和 PAL 等防御酶活性的变化, MDA 和 H_2O_2 含量的变

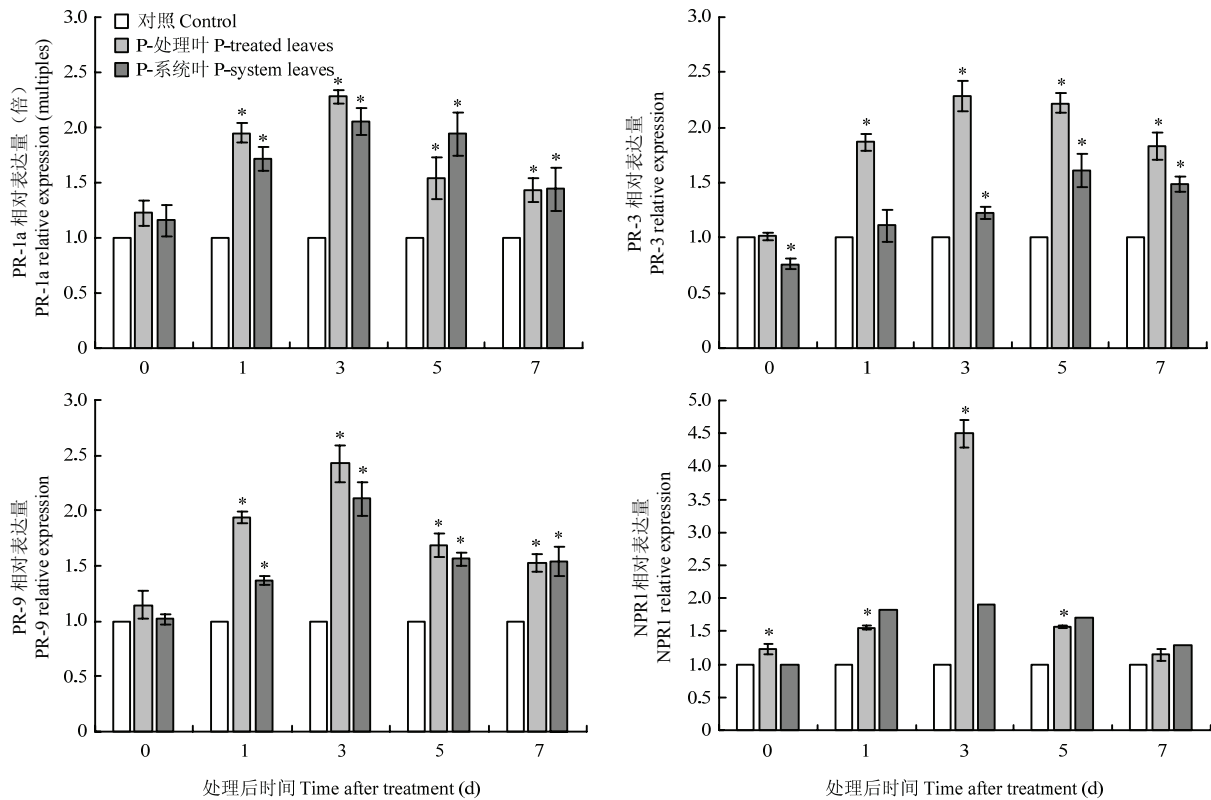


图6 诱抗粗蛋白处理后黄瓜叶片中抗病相关基因的表达

Fig. 6 Induction of disease-resistance-related genes expression in cucumber leaves treated by the crude protein elicitor

化以及 *PR-1a*、*PR-3*、*PR-9* 和 *NPR1* 等抗病相关基因的表达情况结果表明，SOD、POD、PPO 和 PAL 等防御酶的活性较对照都有不同程度的提高，MDA 含量较对照有明显下降， H_2O_2 的含量呈现先迅速上升后下降的趋势，*PR-1a*、*PR-3*、*PR-9* 和 *NPR1* 等抗病相关基因的表达与对照相比有明显上调。表明该诱抗粗蛋白可以通过激活植物自身防御酶活性，提高抗病相关基因表达量，来增强植物的抗病防御能力。

通过检测 SA 信号通路的标志基因 *PR-1a* 和 JA/ET 信号通路的标志基因 *PR-3* 的表达情况，推测该诱抗粗蛋白诱导黄瓜抗病性的产生可能是通过 SA 信号通路和 JA/ET 信号通路协调起作用，如果要证实这一点，还需要进一步研究诱抗粗蛋白的作用机理，为研发生防放线菌源的生物蛋白农药提供基础。

参考文献

- [1] 张易. 灰葡萄孢蛋白激发子 BcSp11 诱导番茄抗病机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [2] 刘孟洁. 稻瘟菌蛋白激发子 MoHrip2 结构与功能及互作蛋白研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [3] Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1997, 48(1): 251-275.
- [4] 闫艳华, 王海宽, 肖瑞峰, 等. 一株乳酸菌对番茄灰霉病的防效及对几种防御酶活性的影响[J]. 微生物学通报, 2011, 38(12): 1801-1806.
- [5] 田华. 烟草炭疽菌 *Colletotrichum destructivum* 诱抗蛋白及其作用分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [6] 邱德文. 我国植物免疫诱导技术的研究现状与趋势分析[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 10-14.
- [7] Liu D Q. Biological control of *Streptomyces scabies* and other plant pathogens[D]. USA: The University of Minnesota, 1992.
- [8] 冯龙, 魏娇洋, 陈英化, 等. 玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 营养型片剂的研制及应用[J]. 河北农业大学学报, 2014, 37(5): 77-81.
- [9] 赤国彤, 李亚宁, 孟庆芳, 等. Men-myc-93-63 生物制剂防治瓜类白粉病药效试验[J]. 湖南农业科学, 2011(23): 89-91.
- [10] 张艳杰, 魏学军, 寇宏达, 等. 玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 抗南方根结线虫相关酶活性及其防效[J]. 西北农业学报, 2013, 22(4): 184-190.
- [11] 郭景红, 甄丹妹, 韩兴, 等. 玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 胞外分泌蛋白对黄瓜白粉病的诱导抗性初报[J]. 中国植保导刊, 2018, 38(5): 5-9.

- [12] 张艳. 生防菌株 Men-myco-93-63 发酵工艺优化研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2006.
- [13] Marcos F, González C, Brito N. BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host[J]. *New Phytologist*, 2011, 2(192): 483-495.
- [14] Alizadeh H, Behboudi K, Ahmadzadeh M, *et al.* Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14.[J]. *Biological Control*, 2013, 65(1): 14-23.
- [15] Shores M, Yedidia I, Chet I. Involvement of jasmonic acid/Ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203[J]. *Phytopathology*, 2005, 95(1): 76-84.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [17] 朱红英. 控释肥料在玉米上的应用效应研究[D]. 青岛: 山东农业大学, 2004.
- [18] 王宁波. 解淀粉芽胞杆菌 NC6 蛋白激发子 PeBA1 的分离鉴定及功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [19] 王颢潜. 侧孢短芽胞杆菌 A60 激发子 PeBL1 鉴定和基因功能的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [20] 王炳楠, 王双超, 檀贝贝, 等. 大丽轮枝菌蛋白激发子 PevD1 诱导的烟草对烟草花叶病毒(TMV)系统获得性抗性及其分子机制[J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(2): 188-195.