

西芹腐根浸提液处理后黄瓜枯萎病菌致弱机制

李杰, 云兴福, 高晓敏, 王勇, 钱程, 马立国

内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010019

摘要 室内条件下用西芹腐根乙醇、丙酮和蒸馏水浸提液, 连续5代处理黄瓜枯萎病菌, 测定处理后黄瓜枯萎病菌分泌的镰刀菌酸量和细胞壁降解酶活性及其与致病力的相关关系, 以揭示西芹腐根浸提液连续多代处理黄瓜枯萎病菌的致弱机制。结果表明, 各处理的致病力随接种代数的增加逐渐减小, 镰刀菌酸质量浓度和果胶酶活性随培养代数的增加逐代减少, 纤维素酶活性随培养代数的增加无明显的变化规律, β -葡萄糖苷酶活性随培养代数的增加逐代升高, 但均表现为处理低于对照。相关分析表明, 致病力与菌体分泌的镰刀菌酸质量浓度和果胶酶活性均表现为显著或极显著的正相关关系, 与纤维素酶活性相关性不显著; 与培养第3~5代 β -葡萄糖苷酶活性表现为显著或极显著的正相关关系。

关键词 西芹; 腐根浸提液; 镰刀菌酸; 细胞壁降解酶

中图分类号 S436.421.1

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.14.003

Attenuation Mechanism of Parsley Rotten Root Extract on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

LI Jie, YUN Xingfu, GAO Xiaomin, WANG Yong, QIAN Cheng, MA Ligu

College of Agriculture, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China

Abstract This paper investigates the attenuation mechanism of parsley rotten root extract on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (Foc.). Foc. was treated from the first to fifth generation with parsley rotten root extract prepared by ethanol, acetone, and distilled water. The excretive fusarium acid content and cell wall degradation enzyme activity were detected and their correlation with pathogenicity was studied. The results show that the pathogen's fusarium acid content and pectinase enzyme activity were significantly reduced with the increase of treated generations, the cellulose enzyme activity had no apparent change with the increase of treated generations, and the β -glycosidase enzyme activity increased with the increase of treated generations, but all were lower than those in the control group. Correlation analysis shows that there are significant or extremely significant positive correlation between pathogenicity and the pathogen's fusarium acid content, pectinase enzyme activity, and β -glycosidase enzyme activity, but there is no clear relationship between pathogenicity and the cellulose enzyme activity.

Keywords parsley; rotten root extracts; fusaric acid; cell wall degradation enzyme

黄瓜枯萎病(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)是由尖孢镰刀菌黄瓜专化型引起的一种土传病害, 病菌生活力

极强, 可在土壤中持续存活多年。近年来, 随着黄瓜生产的规模化、专业化和设施化的不断发展, 使得黄瓜枯萎病问题

收稿日期: 2013-12-23; 修回日期: 2014-04-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31160100); 内蒙古自治区应用技术与开发项目(20110711)

作者简介: 李杰, 博士研究生, 研究方向为西芹浸提液对黄瓜枯萎病菌的化感作用, 电子信箱: lmljt0106@sina.cn; 云兴福(通信作者), 教授, 研究方向为高寒地区蔬菜栽培及生理, 电子信箱: yxf5807@163.com

引用格式: 李杰, 云兴福, 高晓敏, 等. 西芹腐根浸提液处理后黄瓜枯萎病菌致弱机制[J]. 科技导报, 2014, 32(14): 24-30.

十分突出,发病程度也日趋严重。目前生产上对黄瓜枯萎病防治最有效的途径是嫁接技术,可以从根本上防治枯萎病,但是由于嫁接技术相对有难度,嫁接后管理繁琐,嫁接苗成活率低^[1]等原因,使得嫁接技术很难推广,所以到现在黄瓜枯萎病仍然是生产中的一大难题。利用化感作用对病原菌进行防治已经成为国内外的热点。林冬枝等^[2]研究表明,麦冬块根提取物中含有抑制稻瘟病菌生长的化学物质,并且能直接抑制稻瘟病菌发生和生长。贾俊英^[3]研究发现,西芹种子蒸馏水、乙醇、丙酮浸提液对黄瓜枯萎病菌均有化感作用,且浓度越大化感作用越明显,表现为化感作用的浓度效应。Da Silva 等^[4]用豇豆种子天然提取物处理豇豆枯萎病菌,发现能够抑制豇豆枯萎病菌菌落的大小,用豇豆天然提取物处理豇豆幼苗然后接种豇豆枯萎病菌,表现出枯萎病发病率低。

本课题组通过连续多年的田间观察,发现前一年秋茬种植过西芹的畦子,后一年春茬种植黄瓜,黄瓜枯萎病发病率很低,而前一年秋茬未种植过西芹的畦子则后一年种植黄瓜的黄瓜枯萎病发生严重。根据这一现象,进行了西芹不同部位对黄瓜枯萎病菌化感作用的一系列研究,从而推测西芹腐根和腐根际区物存在对黄瓜枯萎病菌起抑制作用的物质^[5]。关于西芹浸提液处理后黄瓜植株对黄瓜枯萎病菌化感作用机制,已从黄瓜叶片内膜保护系统、可溶性物质、活性氧代谢^[6]和酚类物质、氮代谢物质含量变化^[7]等方面进行了系统的研究。在此基础上又利用西芹种子、鲜根浸提液处理黄瓜枯萎病菌,筛选出弱毒菌株^[8,9],并进行西芹种子、鲜根浸提液处理黄瓜枯萎病菌致弱机制和诱导抗性的研究^[10]。西芹腐根浸提液处理黄瓜枯萎病菌的致弱机制尚不明确,本实验利用培养基条件下西芹腐根乙醇、丙酮和蒸馏水浸提液连续多代处理黄瓜枯萎病菌,研究其分泌的镰刀菌酸质量浓度、细胞壁降解酶活性及其与致病力的相关关系,以揭示西芹腐根浸提液连续多代处理黄瓜枯萎病菌的致弱机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 腐根浸提液的制备

实验于2012年在内蒙古农业大学教学实习基地的日光温室内进行。供试菌种为黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*),购自中国农业科学院蔬菜花卉研究所。供试植物为津春四号黄瓜、美国西芹。

2011年3月日光温室定植西芹,11月将西芹地上部分收获,西芹根留在土壤中进行自然腐解。2012年3月随机挖取腐烂程度为干松,仍然保持根的原有形状的西芹腐根50个,用小毛刷轻轻刷去腐根上的泥土,装塑封袋带回实验室后用小毛刷将腐根上残留的泥土刷掉,称取50 g的腐根3份分别置于三角瓶中,按腐根与浸提剂1:4的比例分别加蒸馏水、80%乙醇、80%丙酮各200 mL,25℃条件下摇床振荡浸提(240 r/min)24 h,经4000 r/min离心10 min,取上清液并过

滤,第1次用定量滤纸过滤除滤渣,第2次经微孔滤膜(0.45 μm)过滤除菌,即得腐根不同溶剂浸提液母液,4℃保存备用。

1.1.2 产酶培养基的配制

平板制备:将各母液用无菌水稀释2倍作为处理浓度,取2 mL各浸提液置于培养皿中,加入18 mL熔融态的PDA培养基混匀后制成平板,即得乙醇浸提液、丙酮浸提液和蒸馏水浸提液3种处理。培养基中仅添加2 mL浸提剂(40%丙酮,40%乙醇,蒸馏水)制成的平板,即为乙醇对照、丙酮对照、蒸馏水对照,以培养基里不加任何物质的平板为总对照。

果胶酶培养液:KNO₃(2.0 g),KCl(0.5 g),FeSO₄(0.01 g),K₂HPO₄(1.0 g),MgSO₄·7H₂O(0.5 g),维生素B1(0.1 mg),L-天冬酰胺(0.5 g),柑桔果胶(Pectin,Sigma公司产品)(10.0 g),蒸馏水定容至1000 mL。121℃下灭菌25 min^[11]。

纤维素酶-β-葡萄糖苷酶培养液:KNO₃(2.0 g),KCl(0.5 g),FeSO₄(0.01 g),K₂HPO₄(1.0 g),MgSO₄·7H₂O(0.5 g),维生素B1(0.1 mg),L-天冬酰胺(0.5 g),羧甲基纤维素钠盐(Cx-Na)(10.0 g),蒸馏水定容至1000 mL。121℃下灭菌25 min^[12]。

理查德(Richard)培养液:MgSO₄·7H₂O(2.5 g),KH₂PO₄(5 g),KNO₃(10 g),FeSO₄(0.02 g),蔗糖(50 g),蒸馏水定容至1000 mL。121℃下灭菌30 min^[13]。

1.2 实验方法

1.2.1 致病力变化研究

接菌培养:无菌条件下,用直径0.6 cm的打孔器打取菌饼,用接种针将菌饼移入上述不同的培养基上,菌丝面向下,每皿一块放于平板中央,25℃恒温培养箱中培养,每处理重复5次。

连续多代处理培养:以上述含有西芹腐根不同浸提液的PDA平板接种黄瓜枯萎病菌后黑暗培养6 d长出的菌落为第1代,无菌条件下用打孔器打取第1代处理、对照和总对照菌饼,分别放入对应的添加西芹腐根各浸提液、浸提剂对照和空白的培养基上,置于恒温箱中黑暗培养,6 d后长出的菌落为第2代,以此类推培养至5代。

将每代培养6 d的各处理用无菌水洗下分生孢子,配制菌悬液。采用血球计数板显微镜下调孢子浓度为10⁶个/mL用于接种。黄瓜津春四号种子经消毒、浸种、催芽后,待胚根长约1 cm时,置于制备好的菌液中浸泡20 min,然后倾出菌液,将种子播于塑料钵内,每处理30株,3次重复。从开始发病时调查各处理的病情指数,每隔1 d调查1次,待对照病情趋于稳定时结束。黄瓜枯萎病苗期病情调查与分级标准参照周红梅等^[13]的胚根接种法。不同西芹浸提液处理黄瓜枯萎病菌致病力代际间变化,取每代第16天的病情指数作为分析对象。

1.2.2 分泌镰刀菌酸量测定

经西芹腐根浸提液连续多代处理后,每一代的处理和对照菌落,用直径0.6 cm的打孔器打取菌饼5片置于300 mL预先放有理查德(Richard)培养液的三角瓶中震荡培养12 h,将

病菌培养液过滤,耐酸漏斗真空抽滤,除去孢子和菌丝体,得到无菌的培养滤液。将50 mL培养滤液倒入500 mL的分液漏斗内,加20 mL乙酸乙酯,萃取3次。将3次的萃取液合并,40℃真空旋转蒸发将上清液干燥,全部干燥物溶解在5 mL无水乙醇中,活性炭脱色后,即为镰刀菌酸粗制品溶液^[14]。

以美国Sigma公司的镰刀菌酸为标准,用752紫外可见分光光度计测定不同浓度(0、5、10、15、20、40 μg/mL)下标准镰刀菌酸的紫外吸收图谱(268 nm)及OD值,绘制镰刀菌酸浓度的标准曲线;采用标准加入法对粗提液中的镰刀菌酸进行定量测定;采用无水乙醇将镰刀菌酸粗制品溶液稀释至适当浓度,然后在分光光度计上测定^[14]。

1.2.3 分泌细胞壁降解酶活性测定

黄瓜枯萎病菌产酶培养:无菌条件下,分别取经西芹腐根浸提液连续多代处理后,每代各处理和对照菌落,移至事先灭菌的50 mL理查德(Richard)培养液中,每个三角瓶接种5块菌饼(直径0.6 cm),于26℃恒温振荡培养箱培养6 d后,将病菌培养液用定量滤纸过滤,除去孢子和菌丝体,4℃下10000 r/min离心15 min,上清液即为待测酶液^[15]。果胶酶活性测定参照李忠福等^[16]的方法;纤维素酶活性测定参照Mandels等^[12]的方法;β-葡萄糖苷酶活性测定参照石延霞等^[17]的方法。

1.2.4 数据分析

病情指数调查:

$$\text{病情指数} = \frac{[\sum(\text{病情级值} \times \text{该级病情株数})]}{(\text{病情最高级数} \times \text{总株数})} \times 100\%$$

以病情指数作为鉴别菌株致病力强弱的依据。

数据处理及作图应用Excel 2003软件完成,采用SPSS 17.0软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同处理黄瓜枯萎病菌致病力代际间变化

如表1所示,接种不同浸提液处理的黄瓜枯萎病菌,病菌的代际间致病力有所不同。各处理的致病力随接种代数的增加均表现为逐渐减小的变化规律,表明浸提液对黄瓜枯萎病存在致弱作用。腐根乙醇、丙酮和蒸馏水浸提液处理的黄瓜枯萎病菌病情指数最大值均出现在第1代,分别为43.00%、35.50%和50.33%,最小值均出现在第5代,分别为4.17%、3.33%和19.17%。乙醇、丙酮和蒸馏水浸提液处理病菌致病力代际间差异显著。西芹腐根乙醇、丙酮浸提液处理的黄瓜枯萎病菌在第5代出现致病力<15%的菌株。

表1 不同西芹浸提液处理黄瓜枯萎病菌致病力代际间变化(接种后16 d)

Table 1 Intergenerational variation of pathogenicity of *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* under treatment of different extracts after subculture for 16 d

接种代数	病情指数/%						
	乙醇浸提液	乙醇对照	丙酮浸提液	丙酮对照	蒸馏水浸提液	蒸馏水对照	总对照
1	43.00 ^{Aa}	54.17 ^{Aa}	35.50 ^{Aa}	50.83 ^{Aa}	50.33 ^{Aa}	57.17 ^{Aa}	58.67 ^{Aa}
2	33.17 ^{Bb}	49.83 ^{Bb}	27.50 ^{Bb}	45.17 ^{Bb}	49.67 ^{Aa}	48.67 ^{Bb}	53.17 ^{Bb}
3	20.33 ^{Cc}	34.17 ^{Cc}	15.67 ^{Cc}	38.33 ^{Cc}	39.17 ^{Bb}	38.17 ^{Cc}	50.00 ^{Cc}
4	9.5 ^{Dd}	26.67 ^{Dd}	13.83 ^{Dd}	29.17 ^{Dd}	35.83 ^{Cc}	30.17 ^{Dd}	48.33 ^{Cc}
5	4.17 ^{Ee}	19.17 ^{Ee}	3.33 ^{Ee}	18.33 ^{Ee}	19.17 ^{Dd}	20.83 ^{Ee}	45.00 ^{Dd}

注:表中小写字母表示0.05水平差异显著,大写字母表示0.01水平差异显著。

2.2 不同处理黄瓜枯萎病菌分泌的镰刀菌酸量变化

图1为经西芹腐根乙醇、丙酮、蒸馏水浸提液连续多代处理后,不同处理黄瓜枯萎病菌分泌的毒素含量变化。腐根浸提液连续处理后继代培养5代过程中,黄瓜枯萎病菌分泌的毒素呈现逐代降低的趋势,都表现为处理显著低于对照。

西芹腐根乙醇浸提液处理第1~5代镰刀菌酸质量浓度分别是2.589、2.467、2.036、1.963、1.768 μg/mL,与浸提剂对照相比分别降低了9.76%、10.78%、24.00%、17.00%、18.41%,与总对照相比分别降低了27.72%、26.75%、38.04%、36.00%、38.95%;西芹腐根丙酮浸提液处理第1~5代镰刀菌酸质量浓

度分别为2.646、2.387、1.962、1.763、1.598 μg/mL,与浸提剂对照相比分别降低了8.63%、11.10%、17.70%、22.23%、18.14%,与总对照相比分别降低29.13%、40.29%、42.52%、44.82%、44.82%;西芹腐根蒸馏水浸提液处理第1~5代镰刀菌酸质量浓度分别为3.026、2.953、2.864、2.824、2.728 μg/mL,与浸提剂对照相比分别降低了为3.38%、1.96%、3.28%、1.88%、1.45%,与总对照相比分别降低15.52%、12.32%、12.84%、7.92%、5.80%。经过西芹腐根乙醇、丙酮和蒸馏水浸提液处理的黄瓜枯萎病菌分泌的镰刀菌酸量减少,说明在浸提液连续处理过程中,黄瓜枯萎病菌分泌的毒素越来越少。

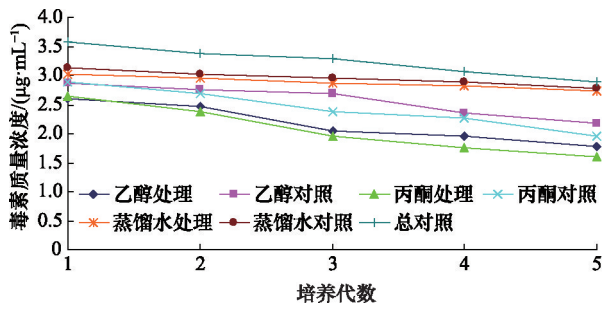


图1 西芹腐根浸提液连续处理后不同处理黄瓜枯萎病菌分泌的镰刀菌酸量变化

Fig. 1 Content variation of fusarium acid produced by *F. oxysporium* f. sp. *cucumerinum* under different treatments with parsley rotten root extracts continuously

2.3 不同处理病菌分泌的细胞壁降解酶活性变化

2.3.1 果胶酶活性变化

图2为西芹腐根乙醇、丙酮、蒸馏水浸提液连续多代处理后,不同处理黄瓜枯萎病菌分泌的果胶酶活性变化。经腐根浸提液连续处理后继代培养5代过程中,黄瓜枯萎病菌分泌的果胶酶活性成逐代降低的趋势,均表现为处理显著低于对照。

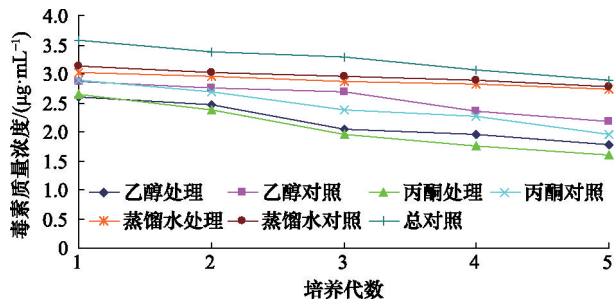


图2 西芹腐根浸提液连续处理后不同处理黄瓜枯萎病菌分泌的果胶酶活性变化

Fig. 2 Activity variation of pectase produced by *F. oxysporium* f. sp. *cucumerinum* under different treatments with parsley rotten root extracts continuously

西芹腐根乙醇浸提液处理第1~5代果胶酶活性分别是3.687、3.462、2.967、2.576、1.778 U/(g·min),与浸提剂对照相比分别降低了8.65%、10.43%、21.34%、20.93%、40.01%,与总对照相比分别降低了37.18%、35.60%、43.68%、50.67%、65.23%;西芹腐根丙酮浸提液处理第1~5代果胶酶活性分别为3.567、3.066、2.967、2.284、1.565 U/(g·min),与浸提剂对照相比分别降低了10.02%、18.50%、18.73%、26.89%、45.49%,与总对照相比分别降低了39.22%、42.97%、43.68%、56.26%、69.39%;西芹腐根蒸馏水浸提液处理第1~5代果胶酶活性分别为5.368、5.468、5.254、5.135、4.883 U/(g·min),与浸提剂对照相比分别降低了4.86%、-2.67%、0.17%、1.17%、2.96%,与总对照相比分别降低了8.54%、-1.712%、0.27%、1.67%、4.50%。

2.3.2 纤维素酶活性变化

图3为西芹腐根乙醇、丙酮、蒸馏水浸提液连续多代处理后,不同处理黄瓜枯萎病菌分泌的纤维素酶活性变化。腐根浸提液连续处理后继代培养5代过程中,黄瓜枯萎病菌分泌的纤维素酶活性无明显变化规律。

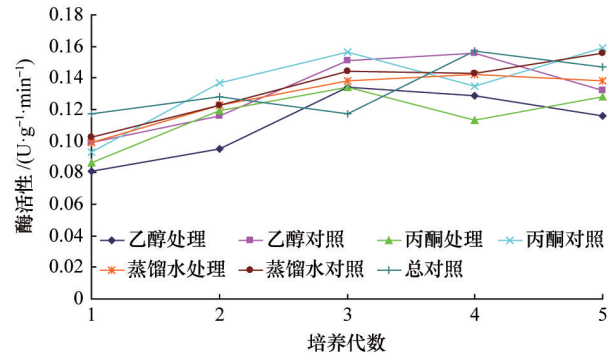


图3 西芹腐根浸提液连续处理后不同处理黄瓜枯萎病菌分泌的纤维素酶活性变化

Fig. 3 Activity variation of cellulase produced by *F. oxysporium* f. sp. *cucumerinum* under different treatments with parsley rotten root extracts continuously

西芹腐根乙醇浸提液处理第1~5代纤维素活性分别为0.081、0.095、0.134、0.129、0.116 U/(g·min),与浸提剂对照相比分别降低了18.45%、18.19%、11.22%、17.31%、12.12%,与总对照相比分别降低了30.83%、25.78%、-14.43%、17.83%、21.09%;西芹腐根丙酮浸提液处理第1~5代纤维素酶活性分别为0.086、0.119、0.134、0.113、0.128 U/(g·min),与浸提剂对照相比分别降低了7.68%、13.05%、14.31%、16.38%、19.50%,与总对照相比分别降低了26.56%、7.03%、-14.43%、28.03%、12.93%;西芹腐根蒸馏水浸提液处理第1~5代纤维素酶活性分别为0.099、0.123、0.144、0.143、0.156 U/(g·min),与浸提剂对照相比分别降低了3.83%、0.02%、4.36%、0.73%、13.04%,与总对照相比分别降低了15.46%、3.91%、-17.84%、9.55%、6.12%。

2.3.3 β-葡萄糖苷酶活性变化

图4为西芹腐根乙醇、丙酮、蒸馏水浸提液连续多代处理后,不同处理黄瓜枯萎病菌分泌的β-葡萄糖苷酶活性变化。经腐根浸提液连续处理后,继代培养5代过程中,黄瓜枯萎病菌分泌的β-葡萄糖苷酶活性成逐代增加的趋势,都表现为处理显著低于对照。

西芹腐根乙醇浸提液处理第1~5代β-葡萄糖苷酶活性分别为0.212、0.308、0.347、0.421、0.458 U/(g·min),与浸提剂对照相比分别降低了20.60%、8.24%、11.93%、8.08%、10.89%,与总对照相比分别降低了30.44%、29.52%、29.90%、27.54%、30.92%;西芹腐根丙酮浸提液处理第1~5代β-葡萄糖苷酶活性分别为0.222、0.289、0.336、0.388、0.438 U/(g·min),

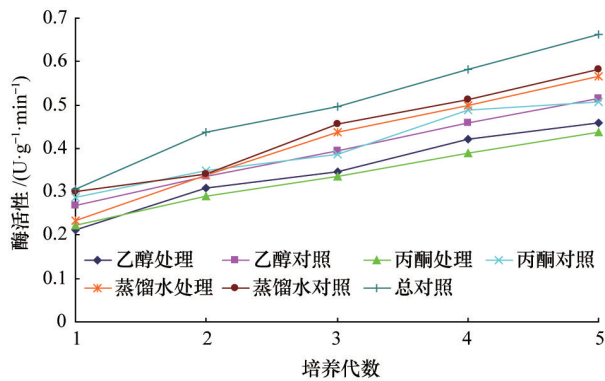


图4 西芹腐根浸提液连续处理后不同处理黄瓜枯萎病菌分泌的 β -葡萄糖苷酶活性变化

Fig. 4 Activity variation of β -glucosidase produced by *F. oxysporium* f. sp. *cucumerium* under different treatments with parsley rotten root extracts continuously
与浸提剂对照相比分别降低了 22.92%、17.10%、12.95%、20.69%、13.44%，与总对照相比分别降低了 27.16%、33.87%、32.12%、33.22%、33.94%；西芹腐根蒸馏水浸提液处理第 1~5

代 β -葡萄糖苷酶活性分别是 0.233、0.341、0.457、0.512、0.582 U/(g·min)，与浸提剂对照相比分别降低了 22.14%、0.68%、4.13%、2.53%、2.58%，与总对照相比分别降低了 23.55%、22.43%、11.52%、14.11%、14.48%。除第 1 代处理与总对照间差值为乙醇 > 丙酮 > 蒸馏水外，其余几代均为丙酮 > 乙醇 > 蒸馏水。

2.4 不同处理黄瓜枯萎病菌的致病力与其分泌的毒素及细胞壁降解酶的关系

表 2 列出了西芹腐根浸提液连续多代处理黄瓜枯萎病菌后，每一代黄瓜枯萎病菌的致病力与其分泌的镰刀菌酸质量浓度、果胶酶活性、纤维素酶活性和 β -葡萄糖苷酶活性的相关性。1~5 代的黄瓜枯萎病菌分泌的镰刀菌酸质量浓度和果胶酶活性与 1~5 代黄瓜枯萎病菌致病力显著或极显著相关，且均表现为正相关。只有第 1 代纤维素酶活性与 1~5 代黄瓜枯萎病菌致病力极显著或显著正相关，其他均表现不相关或负相关。第 1 代和第 2 代的 β -葡萄糖苷酶活性与第 1 代和第 2 代菌的致病力不存在相关关系，3~5 代酶活性与致病力显著或极显著的正相关。

表 2 西芹腐根浸提液连续处理后黄瓜枯萎病菌致病力与病菌分泌的毒素和细胞壁降解酶的相关关系

Table 2 Correlation analysis between pathogen's pathogenicity and its toxin, cell wall degrading enzyme after continuous treatment with parsley rotten root extracts

指标	代数	病情指数				
		第 1 代	第 2 代	第 3 代	第 4 代	第 5 代
镰刀菌酸	1	0.796*	0.798*	0.914**	0.918**	0.871*
	2		0.874*	0.940**	0.920**	0.906**
	3			0.941**	0.925**	0.936**
	4				0.917**	0.906**
	5					0.858*
果胶酶活性	1	0.812*	0.792*	0.853*	0.895**	0.789*
	2		0.821*	0.845*	0.843*	0.798*
	3			0.863*	0.888*	0.830*
	4				0.878**	0.817*
	5					0.870*
纤维素酶活性	1	0.830*	0.851*	0.910**	0.920**	0.911**
	2		0.505	0.624	0.625	0.653
	3			-0.088	-0.160	0.013
	4				0.703	0.874*
	5					0.739
β -葡萄糖苷酶活性	1	0.693	0.799*	0.870*	0.890**	0.874*
	2		0.728	0.863*	0.786*	0.821*
	3			0.943**	0.944**	0.901**
	4				0.911**	0.920**
	5					0.892**

注：*表示 0.05 水平下相关，**表示 0.01 水平下相关，-表示负相关。

3 讨论

镰刀菌酸属于镰刀菌萎蔫毒素,具有强烈的致萎作用,是镰刀菌引起多种植物病害的重要致病因子^[18]。曹永军等^[19]研究表明,镰刀菌酸的产量与寄主病情指数呈极显著正相关($R=0.9326$),香蕉枯萎病菌菌株间产镰刀菌酸能力的不同是导致其致病力出现分化的主要原因之一。周凯南等^[20]指出,尖孢镰刀菌分泌的镰刀菌酸对寄主有致萎作用,其致萎能力的强弱与致病力正相关。本实验在培养基条件下用西芹腐根浸提液连续5代处理黄瓜枯萎病菌后,各处理的致病力随接种代数的增加均表现为逐渐减小的变化规律,已经由黄瓜枯萎病菌的强致病力菌株逐步变为弱致病力菌株。对西芹腐根乙醇、丙酮和蒸馏水浸提液处理黄瓜枯萎病菌菌体分泌的镰刀菌酸质量浓度进行测定,并对其与致病力的相关性进行分析,结果表明,受西芹腐根浸提液连续5代作用后,随继代培养代数的增加,不同处理黄瓜枯萎病菌分泌的镰刀菌酸质量浓度表现为逐代减小,且均表现为处理低于对照,这一结论与钱程^[10]研究结果一致。分析原因可能为,西芹腐根浸提液连续多代处理抑制了镰刀菌酸的分泌,使其质量浓度的积累减少,对黄瓜枯萎病菌的产毒能力具有致弱作用,致病力下降;与各代不同处理黄瓜枯萎病菌的致病力进行相关分析,不同处理病菌的致病力与其培养过程中菌体分泌的镰刀菌酸量表现为显著或极显著的正相关关系。

细胞壁是植物抵御病原菌侵入的天然屏障,病原菌不仅可以通过消化细胞壁获得营养物质,还可通过分泌细胞壁降解酶降解细胞壁,从而侵入寄主细胞并在组织内定殖和扩展蔓延。病原真菌在侵染寄主植物的过程中分泌一系列细胞壁降解酶。细胞壁降解酶的分类方式有多种,其中根据酶作用的底物,细胞壁降解酶可分为果胶酶、纤维素酶、半纤维素酶、角质酶和其他酶类(如蛋白酶、淀粉酶和磷脂酶)等^[21]。 β -葡萄糖苷酶作为一种细胞壁降解酶,能够破坏细胞壁结构,使病原菌易于侵入。目前,细胞壁降解酶在植物病菌致病过程中的作用已基本得到认可。陈夕军等^[22]测定了果胶酶和纤维素酶及其组合对水稻叶片细胞膜损伤和组织浸解的作用,结果发现,果胶酶和纤维素酶无论是单独处理还是混合处理,对水稻叶片都具有显著的细胞膜损伤和组织浸解的作用,发现组织浸解及细胞膜损伤与细胞壁降解酶的浓度正相关。Cano-Canchola等^[23]用玉米黑粉菌接种玉米后,强致病力菌株产生的细胞壁降解酶活性较高,而弱致病力菌株及健康玉米组织中则低很多。王纯利等^[14]报道了西瓜枯萎病菌致病力与 β -1,4葡萄糖苷酶活性的关系研究,结果证明不同供试菌株分泌的 β -1,4葡萄糖苷酶活性与致病力存在显著相关性。Li等^[24]研究表明瓜枝孢的强致病菌株产生的纤维素酶和果胶酶活性显著高于弱毒菌株,形成生理生化上的差异。钱凌玉^[25]研究表明致病性强弱不同的核盘菌菌株间产聚甲基半乳糖醛酸酶(PMG)、多聚半乳糖醛酸酶(PG)和纤维素酶(Cx)的能力存在明显差异,其中产Cx的能力与其致病力显著正相关。

本实验结果表明,在培养基条件下受西芹腐根浸提液连续5代作用后,随继代培养代数的增加,不同处理的黄瓜枯萎病菌分泌的果胶酶活性不同,表现为逐渐减小,且表现为处理低于对照。不同处理黄瓜枯萎病菌分泌的纤维素酶活性不同,随继代培养代数的增加,纤维素酶活性无明显变化规律,但均表现为处理低于对照。不同处理的黄瓜枯萎病菌分泌的 β -葡萄糖苷酶活性不同,随继代培养代数的增加, β -葡萄糖苷酶活性逐代升高,均表现为处理低于对照。西芹腐根浸提液连续多代处理后,不同处理黄瓜枯萎病菌菌体分泌的果胶酶活性、纤维素酶活性及 β -葡萄糖苷酶活性均表现为处理低于对照,分析原因,西芹腐根浸提液的连续多代作用抑制了黄瓜枯萎病菌分泌的细胞壁降解酶的积累,对黄瓜枯萎病菌分泌细胞壁降解酶的能力具有致弱作用。利用每一代的果胶酶活性、纤维素酶活性及 β -葡萄糖苷酶活性3个指标同各代不同处理黄瓜枯萎病菌的致病力建立相关分析,结果表明,西芹腐根浸提液连续多代处理后,不同处理黄瓜枯萎病菌的致病力与其培养过程中分泌的果胶酶活性表现为显著或极显著正相关关系;与纤维素酶活性相关性不显著;与 β -葡萄糖苷酶活性总体上表现显著或极显著的正相关关系。

4 结论

经西芹腐根浸提液连续5代处理后,黄瓜枯萎病菌致病力,随培养代数的增加逐代降低;黄瓜枯萎病菌分泌的镰刀菌酸质量浓度减少,果胶酶活性、纤维素活性和 β -葡萄糖苷酶活性降低。西芹腐根浸提液连续5代处理后,每一代不同浸提液处理的致病力与黄瓜枯萎病菌分泌的镰刀菌酸质量浓度、果胶酶活性和 β -葡萄糖苷酶活性显著正相关。在筛选黄瓜枯萎病菌的弱致病力菌株时,以选择病菌致病力为确定指标,还可选择镰刀菌酸含量逐代降低、果胶酶活性逐代降低和 β -葡萄糖苷酶活性逐代升高作为筛选黄瓜枯萎病菌弱致病力菌株的参考指标。

参考文献(References)

- [1] 张国华. 盆栽下西芹根物质对黄瓜枯萎病菌的化感作用及其对相关酶的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008.
Zhang Guohua. Allelopathy of extract and rhizosphere in root of west celery on *Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumerinum* and the effect of related enzymes in fotted condition[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2008.
- [2] 林冬枝, 董彦君, 续荣治. 麦冬块根提取物对稻瘟病菌丝及苗期稻瘟病发生的抑制效果[J]. 中国农学通报, 2009, 25(9): 220-223.
Lin Dongzhi, Dong Yanjun, Xu Rongzhi. Inhibitory effects of extracts from dwarf lilyturf (*Ophiopogon japonicus* K.) roots on rice blast fungus and rice blast disease at seedling stage[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(9): 220-223.
- [3] 贾俊英. 西芹种子浸提液对黄瓜枯萎病菌的化感作用[J]. 生态学杂志, 2011, 30(7): 1473-1478.
Jia Junying. Allelopathy of parsley seed extracts on *Fusarium*

- oxysporium* f. sp. *cucumerinum*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2011, 30(7): 1473-1478.
- [4] Da Silva J A, Pegado C M A, Ribeiro V V, et al. Effect of natural extracts on the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* in cowpea seeds[J]. Cienciae Agrotecnologia, 2009, 33: 611-616.
- [5] 曹阳. 西芹腐根及根际区物浸提液对黄瓜枯萎病菌化感作用的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- Cao Yang. The study on the allelopathy of extracts of the rotten root and the rhizosphere zone rot soil of parsley on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2009.
- [6] 贾俊英. 西芹种子浸提液对黄瓜枯萎病菌化感作用及其机理的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2011.
- Jia Junying. Studies on allelopathy and mechanism of the extract solution of the parsley seed on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2011.
- [7] 包妍妍. 西芹根际区物浸提液处理后黄瓜叶片内酚类物质、氮代谢物质含量的变化[J]. 科技导报, 2013, 31(4): 60-66.
- Bao Yanyan. Changes of phenol and nitrogen metabolites contents in cucumber leaves treated with the extracts of celery root soil[J]. Science & Technology Review, 2013, 31(4): 60-66.
- [8] 钱程, 高晓敏, 包妍妍, 等. 西芹种子浸提液处理后黄瓜枯萎病菌弱毒菌株的筛选[J]. 生态学杂志, 2013, 32(1): 82-90.
- Qian Cheng, Gao Xiaomin, Bao Yanyan, et al. Screening of attenuated strains for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* after treated with parsley seed extracts[J]. Chinese Journal of Ecology, 2013, 32(1): 82-90.
- [9] 钱程, 云兴福, 高晓敏, 等. 西芹鲜根浸提液作用后黄瓜枯萎病菌弱毒菌株的筛选[J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(5): 606-614.
- Qian Cheng, Yun Xingfu, Gao Xiaomin, et al. Screening of virulence-attenuated strains for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* after treatment with parsley fresh root extract[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2013, 21(5): 606-614.
- [10] 钱程. 西芹浸提液处理黄瓜枯萎病菌弱毒菌株的筛选及其诱导抗性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013.
- Qian Cheng. Study on the screening of attenuated strains for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and induced resistance on cucumber wilt after treated with parsley extracts from fresh root, rhizosphere soil and seed[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2013.
- [11] Marcus L, Barash I, Sneh B, et al. Purification and characterization of pectolytic enzymes produced by virulent and hypovirulent isolates of *Rhizoctonia solani*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1986, 29: 325-326.
- [12] Mandels M, Hontz L, Nystrom J, et al. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1974, 16: 1471-1493.
- [13] 周红梅, 毛爱军, 张丽蓉, 等. 黄瓜枯萎病接种方法及抗性遗传的研究[J]. 华北农学报, 2010, 25(4): 186-190.
- Zhou Hongmei, Mao Aijun, Zhang Lirong, et al. Research on inoculation method and the inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* on cucumber[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2010, 25(4): 186-190.
- [14] 王纯利, 王冬梅, 黄炜, 等. 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研究[J]. 新疆农业大学学报, 2000, 23(1): 1-6.
- Wang Chunli, Wang Dongmei, Huang Wei, et al. Study on the relationship between the fusaric acid, β -Glucosidase activity and the pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveumun* watermelon[J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2000, 23(1): 1-6.
- [15] 董汉松, 王智发. 烟草赤星病菌致病力分化与弱毒株抗性诱导作用的研究[J]. 植物保护学报, 1992, 19(1): 87-90.
- Dong Hansong, Wang Zhifa. Pathogenicity differentiation of *Alternaria alternata* and induced resistance of tobacco to brown spot by weak virulence strains[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 1992, 19(1): 87-90.
- [16] 李忠福, 徐建国. 分光光度法测定果胶酶活性方法的研究[J]. 黑龙江医药, 2002, 15(6): 428-431.
- Li Zhongfu, Xu Jianguo. Determination of pectinase activity by spectrophotometry[J]. Heilongjiang Medical Journal, 2002, 15(6): 428-431.
- [17] 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[J]. 园艺学报, 2003, 30(4): 465-466.
- Shi Yanxia, Li Baoju. The relation of pathogenesis action by *Pseudoperonospora cubensis* and two sort of zym in cucumber[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2003, 30(4): 465-466.
- [18] 蒋荷, 曹莎, 王丽君, 等. 黄瓜枯萎病研究进展及其综合防治[J]. 中国植保导刊, 2012, 32(11): 13-17.
- Jiang He, Cao Sha, Wang Lijun, et al. Research progress on cucumber *Fusarium wilt* and its integrated control[J]. Chian Plant Protection, 2012, 32(11): 13-17.
- [19] 曹永军, 程萍, 喻国辉, 等. 香蕉枯萎病菌菌株致病力分化及其原因研究[J]. 热带作物学报, 2011, 32(8): 1532-1536.
- Cao Yongjun, Cheng Ping, Yu Guohui, et al. Pathogenic differentiation of different *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* strains[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(8): 1532-1536.
- [20] 周凯南, 张立修, 吕士恩, 等. 西瓜枯萎病菌致病力的测定[J]. 山东农业大学学报, 1990(1): 43-46.
- Zhou Kainan, Zhang Lixiu, Lü Shien, et al. The determination of watermelon wilt pathogen pathogenicity[J]. Journal of Shandong Agricultural University, 1990(1): 43-46.
- [21] 董章勇, 王振中. 植物病原真菌细胞壁降解酶的研究进展[J]. 湖北农业学报, 2012, 51(21): 4697-4700.
- Dong Zhangyong, Wang Zhenzhong. Research progress of fungal cell wall-degrading enzyme[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2012, 51(21): 4697-4700.
- [22] 陈夕军, 张红, 徐敬友, 等. 水稻纹枯病胞壁降解酶的产生及致病作用[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(2): 24-28.
- Chen Xijun, Zhang Hong, Xu Jingyou, et al. Cell wall degrading enzymes produced by *Rhizoctonia solani* and their pathogenicity to rice plants[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2006, 22(1): 24-28.
- [23] Cano-Canchola C, Acevedol, Ponce-Noyolap, et al. Induction of lytic by the interaction of *Ustilago waltkei* mays tissues[J]. Fungal Genetics and Biology, 2000, 29(3): 145-151.
- [24] Li B J, Peng X W, Liu X L, et al. Study on attenuation mechanism of an avirulent strain in a melon[J]. Jagric Biotech, 2000, 10(S3): 85-87.
- [25] 钱凌玉. 四川省核盘菌对多菌灵抗性检测及致病机理研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2009.
- Qian Lingyu. Studies on resistance to carbendazim and pathogenicity of *Sclerotinia sclerotium* in Sichuan[D]. Yaan: Siehuan Agricultural University, 2009.

(责任编辑 王媛媛)