

杂交竹抗梢枯病诱导因子筛选及其持续期研究

何倩倩, 刘雨欣, 方馨玫, 朱天辉, 譙天敏, 韩 珊, 李姝江*

(四川农业大学林学院, 成都 611130)

摘要 本文利用病原毒素同源异质的特点诱导杂交竹抗病潜力, 筛选出抗梢枯病的最佳诱导因子并排除其对病原菌的直接作用, 经琼脂玻片萌发法测定 3 种诱导因子(温度灭活毒素、蛋白酶降解毒素和细胞壁成分)对杂交竹梢枯病病原菌暗孢节菱孢菌孢子萌发的抑制作用, 结果显示经过 60℃ 灭活毒素浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 处理的孢子萌发效果最为理想。通过最佳诱导因子对杂交竹不同品种诱导持续期进行测定, 采用针刺法先接种诱导因子后挑战接种病原菌, 1~40 d 内观察抗感品种对诱导因子响应的差异, 症状上杂交竹 8# 的感病程度重于 3# 和 6#, 40 d 时叶片和枝干变黄干枯, 病情指数结果表明, 3 个杂交竹品种接种诱导因子后感病程度降低, 诱抗效果显示杂交竹 6# 的诱抗指数高于 3# 和 8#。以上结果证明诱导因子使不同杂交竹品种均产生了一定的抗性且抗性越强的品种诱导抗性越好。

关键词 杂交竹梢枯病; 暗孢节菱孢菌; 诱导因子; 抗病性; 孢子萌发

中图分类号: S 763.1, S 436.8 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018053

Screening of inducing factors of *Bambusa pervariabilis* $\times$ *Dendrocalamopsis grandis* against *Arthrrium phaeospermum* and their duration

HE Qianqian, LIU Yuxin, FANG Xinmei, ZHU Tianhui, QIAO Tianmin, HAN Shan, LI Shujiang

(College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract By the homologous heterogeneity of pathogenic toxins, the resistance potential of *Bambusa pervariabilis* $\times$ *Dendrocalamopsis grandis* was induced; the optimum inducing factor was screened and the direct effect was excluded. The inhibitory effects of three factors (inactivated toxin by temperature, degraded toxin by protease and cell wall component) on spore germination of *Arthrrium phaeospermum*, the pathogen of *B. pervariabilis* $\times$ *D. grandis* blight, were determined by agar slide germination method. The results showed that the spore germination effect of the toxin treated at 60℃ at the concentration of 40 $\mu\text{g/mL}$ was the best. The induction durations of different varieties of *B. pervariabilis* $\times$ *D. grandis* were determined through the optimum inducing factor; the needling method was used to inoculate the inducing factor first and then the pathogen within 40 days to observe the response difference between the resistant and susceptible varieties to the inducing factor. The results showed that *B. pervariabilis* $\times$ *D. grandis* #8 was more susceptible than #3 and #6, with the yellowish and withered leaves and branches at 40 d. The disease indices of the three varieties were decreased after inoculation of the inducing factor, and the induced resistance effect of *B. pervariabilis* $\times$ *D. grandis* #6 was higher than those of #3 and #8. These results indicated that the inducing factor could induce certain resistance in different varieties of *B. pervariabilis* $\times$ *D. grandis*, and the stronger the original resistance, the better the induced resistance.

Key words *B. pervariabilis* $\times$ *D. grandis* blight; *Arthrrium phaeospermum*; inducing factor; resistance; spore germination

激发子可诱导植物自身抗性, 安全性好且抗性较为稳定, 持效期长, 能对多种真菌、细菌和病毒病害起到抵抗作用。生物源诱导因子是来源于寄主植物或由病原物与寄主植物互作后产生的能激发寄主

植物防卫反应的物质, 赵继红等^[1]按生物化学结构不同将其主要分为寡聚糖、蛋白类激发子、糖蛋白。Ye 等^[2]研究发现, 先接种 TMV 或烟草霜霉病菌 *Peronospora tabacina* 均可提高烟草对这两种病的

收稿日期: 2018-01-30 修订日期: 2018-03-25

基金项目: 中国博士后基金(2016M602705)

* 通信作者 E-mail: lishujiangsumer@163.com

抗性。从真菌细胞壁、微生物代谢产物以及植物细胞壁等处分离得到的激发子(elicitor)也能与活菌一样诱导植物产生抗病反应。赵继红等^[3]通过体外抑菌试验及对植物幼苗活体生物测定证明了灰霉菌菌丝体提取物的防病效果可达 55.6%。胡景江等^[4]研究了杨树溃疡病菌细胞壁裂解物—低聚糖对杨树细胞相关抗病指标的诱导作用。李云锋等^[5]的研究发现,接种稻瘟菌细胞壁来源的糖蛋白稻瘟菌激发子 CSBI 能诱导亲和性与非亲和性互作品种与抗病相关酶的活性增加。李洪连等^[6]报道,从诱抗菌菌丝细胞壁中获取的激发子,与活的诱抗菌一样能诱导黄瓜产生对炭疽病的抗病反应。因为生物源诱导因子与自然环境相容性好,因此是研究的热点。在非生物源诱导因子方面,研究比较多的为水杨酸(SA)及其衍生物、茉莉酸(JA)及其衍生物。郭红莲等^[7]用不同非生物作为诱抗剂,结果表明水杨酸的诱抗效果最好。宾金华等^[8-10]用茉莉酸甲酯作为诱抗剂来处理烟草对抗炭疽病,明显提高了幼苗内过氧化物酶、苯丙氨酸解氨酶等的含量。因此这些物质也能诱导植物产生对抗病害的能力。除此之外一些物理因素如冷冻处理、高温处理以及紫外光照射等都能够引起植保素的产生和累积,诱导植物产生抗病性。Kubo 等^[11]利用非生物因素高温处理作为诱导因子使温室中黄瓜的抗病能力得到了增强。李宝聚等^[12]通过高温(40~50℃)预先对黄瓜幼苗处理 1~2 h,不同程度地诱导了黄瓜幼苗对黑星病 *Cladosporium cucumerinum* 的抗性。Dean 等^[13]发现通过机械损伤、干冰或电磁效果等方法不同程度诱导了烟草对霜霉病的抗性。因此,诱导抗性在目前众多植物病害控制中最具有应用潜力。

撑×绿杂交竹梢枯病是严重影响杂交竹生长的重要病害,导致其枯死的病原为暗孢节菱孢菌 *Arthrrium phaeospermum* (Corda) M. B. Ellis。有关竹类梢枯病的研究较多,而杂交竹梢枯病大多集中于发病规律和症状、病原菌、培养基筛选等^[14],对诱导抗病性方面诱导因子的筛选及寄主植物分泌物特性的研究较少。仅李姝江等^[15-17]以杂交竹梢枯病菌—暗孢节菱孢菌为对象,对其毒素致病组分进行确定,通过毒素粗提透析与浓缩以及对致病毒素进行分离、纯化和序列分析、致病力测定等确定了纯毒素的基本性质。本研究在此纯毒素基础上从温度灭活毒素、毒素经不同蛋白酶降解及细胞壁成分对暗

孢节菱孢的抑制作用这三个方面来筛选最佳诱导因子,并结合室外持续期测定病情指数及其诱抗效果,筛选出最佳诱导因子,同时也能排除灭活毒素对病原菌的直接影响。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试杂交竹品种:杂交竹 3#(中抗)、杂交竹 6#(抗病)、杂交竹 8#(感病),栽植于四川农业大学温室大棚。

供试真菌:暗孢节菱孢菌 *Arthrrium phaeospermum* (Corda) M. B. Ellis,分离于杂交竹梢枯病竹,由四川农业大学森林保护实验室提供。

该菌株纯化毒素由四川农业大学森林保护学实验室提供,将纯化后的蛋白毒素用无菌蒸馏水稀释成 10、20、40、80 μg/mL 溶液。

1.2 主要试剂和仪器

苏静安泰 SW-CJ-2FD 型超净工作台;LDZX-40BI 立式自动电热压力蒸汽灭菌锅;BX51 显微镜,奥林巴斯株式会社;BSG-800 程控光照培养箱,上海博讯实业有限公司;DELTA-320 pH 计,北京联合科力科技有限公司;“U”形玻棒;血球计数板;载玻片;葡萄糖;琼脂。

1.3 诱导因子筛选

孢子悬浮液的制作:取 25℃ 培养 5~7 d 的 *A. phaeospermum* 活化菌株斜面,加入 5 mL 无菌水,用接种环将分生孢子刮下,使其悬浮,将菌悬液在旋涡振荡仪上振荡 10 min,转入三角瓶(含玻璃珠)中,置于摇床 150 r/min 振荡 30 min,用灭菌脱脂棉(或双层纱布)过滤得到孢子悬浮液,适量移入 1.5 mL 离心管中,滤液用血球计数板计数。

1.3.1 温度灭活毒素对暗孢节菱孢的抑制作用

采用玻片萌发法^[18]测定温度灭活毒素对孢子萌发的抑制作用。纯毒素分别经 20、40、60、80、100℃ 处理 15 min,而后分别配制毒素终浓度为 10、20、40、80 μg/mL 的病菌孢子悬浮液(孢子浓度数量级为 10⁷),用 1 mmol/L NaOH 调节 pH 至 6.8。于无菌环境中取洁净的载玻片,在灭菌并冷却至 50℃ 左右的 2% 水琼脂培养基中蘸一下,待凝成薄层后,去掉一面琼脂培养基,将有琼脂培养基的一面朝上,平放在培养皿的“U”形玻棒上,再将配制的病菌孢子悬浮液涂抹在培养基上,盖上盖玻片和培养皿。培养皿于 25~

28℃保湿培养,以无菌水为对照,分别在 5、10 和 24 h 后测定孢子萌发率,每处理观测 100~300 个孢子。

1.3.2 毒素经不同蛋白酶降解后对暗孢节菱孢的抑制作用

采用玻片萌发法测定毒素经蛋白酶降解后对孢子萌发的抑制作用。纯毒素分别经胰蛋白酶、糜蛋白酶、羧肽酶 A(羧肽酶 B)、蛋白酶 K 处理 20 h^[19](最终酶浓度为 1 mg/mL),然后分别配制毒素终浓度为 10、20、40、80 μg/mL 的病菌孢子悬浮液,用 1 mmol/L NaOH 调节 pH 至 6.8。按 1.3.1 方法测定孢子萌发率。

1.3.3 细胞壁成分对暗孢节菱孢的抑制作用

暗孢节菱孢菌细胞壁成分提取:菌种转管活化接种在 PDA 培养皿中,于 25℃培养箱中培养,挑取经 PDA 培养 5 d 后的菌块;打孔后接种于 200 mL 已灭菌的 PD 培养液中,将培养 7 d 的培养液用 4 层灭菌纱布在超净台中过滤得到菌丝体,然后用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0)洗涤 3 次,再悬浮于磷酸盐缓冲液(含 0.5% Triton-100)中,200 r/min 匀浆 3~5 min,中间每隔 1 min 间歇 1 次;随后 4 000 r/min 离心 10 min,取沉淀用乙醇洗涤,再次对其进行离心并用去离子水洗涤,最后按 1 g 沉淀加 10 mL 蒸馏水的比例将沉淀悬浮于去离子水中,于 121℃高温水解 2 h,冷却后 11 200 r/min 离心 20 min,上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,收集滤液即为细胞壁成分,低温保存。

配制细胞壁成分终浓度为 10、20、40、80 μg/mL 的病菌孢子悬浮液,1 mmol/L NaOH 调节 pH 至 6.8。按 1.3.1 方法测定孢子萌发率。

1.4 最佳诱导因子的效果

根据室内试验的筛选结果,选取最佳诱导因子进行诱导抗病性持续期测定,比较最佳因子对不同品种的诱导效果。设置两组处理:一组为先接种无菌水后接种菌悬液处理(a),对照为先接种诱导因子后接种 *A. phaeospermum* 菌悬液处理(b);另一组为先接种最

佳诱导因子后再接种无菌水处理(c),对照为仅接种无菌水处理(d)。通过前人对诱导处理和挑战接种间隔时间对诱抗效果影响的研究,确定最佳诱导效果间隔时间为 3~7 d^[22],因此选择第 3 天挑战接种。调节诱导因子溶液 pH 至 6.8,加 0.05%吐温 80 备用。选择长势均一的杂交竹上部嫩枝 8 条进行喷雾涂布处理,以溶液布满嫩枝不下流为宜,套袋保湿 12 h,第 2、3 天各重复处理 1 次,以确保诱导因子能够被植株有效吸收。以无菌水为对照。每个品种分别处理 15 株,于最后一次处理后的第 1、3、5 天^[20]针刺接种暗孢节菱孢菌(针刺部位在嫩枝顶端节叉处,不刺穿为宜),伤口处滴一滴菌液,约 0.05 mL;套袋保湿,于接种后 1、3、5、10、15、20、25、30、35、40 d 调查发病情况,按照下列方法计算病情指数及其诱抗效果^[21]。病情分级标准:0 级:无枯萎;1 级:25%以下枝枯;2 级:25%~50%(包含 25%和 50%)枝枯;3 级:50%~75%枝枯(包含 75%);4 级:75%以上枝枯^[15]。

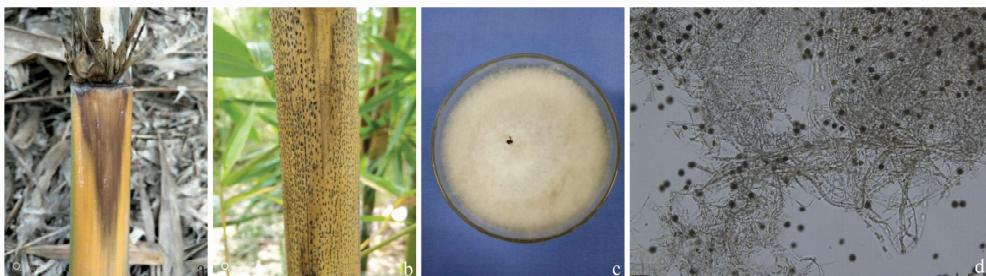
病情指数 = $[\sum(\text{各病级数} \times \text{病枝数}) / (\text{总枝数} \times \text{发病最重的病级数})] \times 100$;

诱抗效果 = $[(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数}] \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 杂交竹梢枯病害症状及病原菌形态特征

暗孢节菱孢菌 *Arthriniun phaeospermum* (Corda) M. B. Ellis 为杂交竹梢枯病的病原菌,感病的杂交竹竹梢的某一节或某一枝条的节杈处出现褐色舌形或菱形病斑且在枝干上生成分生孢子器。该病原菌在 PDA 培养基上气生菌丝发达,棉絮状,初为白色,后逐渐变为灰白色,菌落底部可呈褐色。显微镜下该病原菌的孢子为暗褐色,分生孢子单细胞,圆形、椭圆形或透镜状(橄榄形),以圆形为多,而透镜状(橄榄形)分生孢子中间有 1 条无色的发芽缝。



a: 发病症状; b: 分生孢子器; c: 在 PDA 培养基上菌落特征; d: 显微镜下孢子及菌丝

a: Symptom; b: Gregarious pycnidia; c: Morphological characters on PDA; d: Spores and mycelia under microscope

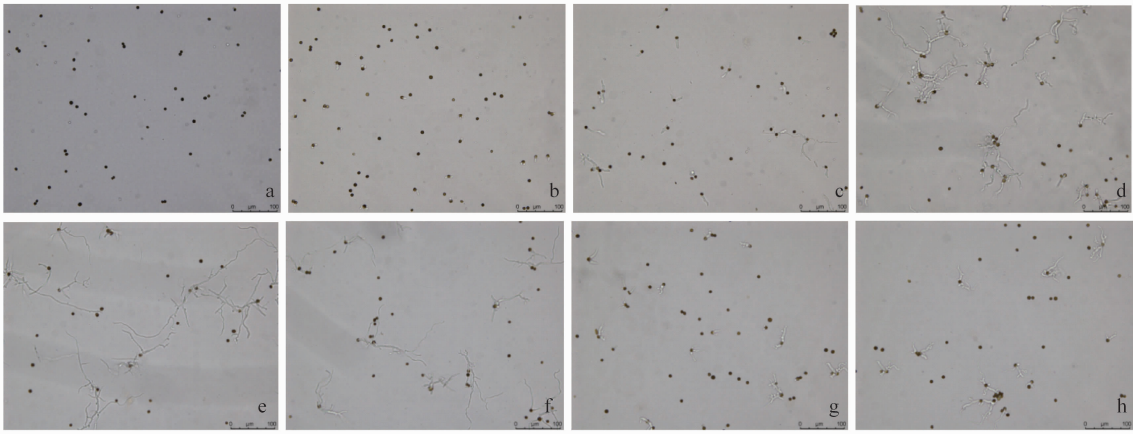
图 1 杂交竹梢枯病症状和病原菌形态特征

Fig. 1 Symptoms of *B. pervaribilis* × *D. grandis* blight and morphology of *Arthriniun phaeospermum*

2.2 诱导因子的筛选

通过玻片萌发法对 3 种诱导因子处理后的孢子萌发进行不同时间段观察,以清水作为对照,发现 5 h 时对照和经过诱导处理的孢子萌发存在一定的差异,且 24 h 时差异较明显。分生孢子在清水中 5 h

已经开始萌发,且萌发力较强。萌发时孢子端略开口,从各个端口长出菌丝状的芽管甚至有 3~4 条芽管的,在 24 h 已基本萌发完全。而处理组在 5~10 h 也开始萌发但萌发较慢,24 h 清水中和温度灭活的孢子芽管均较长且开始分叉(图 2)。



a~d: 清水分别处理0、5、10和24 h; e: 用60℃灭活的纯毒素处理24 h; f: 用80℃灭活的纯毒素处理24 h; g: 用糜蛋白酶降解的纯毒素处理24 h; h: 病原菌细胞壁提取物处理24 h
a~d: Spores of *Arthrinium phaeospermum* treated with sterile water for 0, 5, 10 and 24 h, respectively; e: Inactivated purified toxin treated at 60℃ for 24 h; f: Inactivated purified toxin treated at 80℃ for 24 h; g: Purified toxin degraded by chymotrypsin for 24 h; h: Cell wall extracts treated for 24 h

图 2 暗孢节菱孢菌的孢子萌发形态

Fig. 2 The morphology of germinated spores of *Arthrinium phaeospermum*

2.2.1 温度灭活毒素对暗孢节菱孢菌的抑制作用

毒素经过不同温度灭活后设置梯度浓度,在 5、10 h 和 24 h 观察孢子萌发率。由表 1 可见,毒素在经过 60℃及以上温度处理后,几个梯度浓度下的孢子 5 h 时均已萌发,甚至部分处理萌发率达到了 50%,10 h 时已经萌发约 70%,24 h 萌发率为 70%~84.3%;而毒素经过 40℃及以下温度处理后,5 h 时仅有 30%左右的孢子萌发,10 h 时萌发约 50%~60%,24 h 达到 56.3%~82.0%。毒素在 20℃和 40℃处理下不同浓度作为诱导因子对孢子萌发均有

明显的抑制作用,80 μg/mL 的浓度抑制效果突出。毒素在 100℃灭活下不同浓度作为诱导因子孢子萌发率均与对照相近,且不同处理孢子萌发率不存在显著差异。在 60℃处理下 20、40 μg/mL 均与对照萌发率接近,特别是40 μg/mL 的 5、10 h 和 24 h 孢子萌发率分别为 51.3%、70.6%和 84.3%与对照仅相差 0.8、1.9 和 1.2 百分点,5 h 时萌发率甚至高于对照。而 10、80 μg/mL 浓度下抑制作用较大,孢子萌发率低于 40 μg/mL,因此选用最佳因子为毒素在 60℃下灭活且浓度为 40 μg/mL。

表 1 纯毒素经不同温度灭活后对孢子萌发的影响¹⁾

Table 1 Effects of the purified toxins inactivated by different temperatures on spore germination

20℃灭活毒素 Purified toxin inactivated at 20℃				40℃灭活毒素 Purified toxin inactivated at 40℃			
毒素浓度/ μg · mL ⁻¹ Toxin concentration	孢子萌发率均值/% Average spore germination rate			毒素浓度/ μg · mL ⁻¹ Toxin concentration	孢子萌发率均值/% Average spore germination rate		
	5 h	10 h	24 h		5 h	10 h	24 h
10	(28.3±1.5)cC	(60.0±3.0)cB	(78.3±2.5)cA	10	(32.0±2.6)cC	(52.3±2.5)cB	(61.7±4.7)bA
20	(33.0±2.6)bC	(61.7±2.9)bcB	(82.0±4.0)bA	20	(34.0±2.0)bcC	(59.0±1.7)bA	(56.3±3.5)cB
40	(28.3±2.1)cC	(64.0±3.6)bB	(77.3±3.1)cA	40	(38.0±2.0)bC	(62.3±4.6)bA	(60.0±4.6)bB
80	(32.0±2.0)bC	(56.0±2.7)dB	(58.0±3.5)dA	80	(29.7±1.5)dC	(49.3±4.6)dB	(64.7±3.8)bA
CK	(50.5±3.3)aC	(72.5±4.8)aB	(85.5±3.5)aA	CK	(50.5±3.3)aC	(72.5±4.8)aB	(85.5±3.5)aA

续表 1 Table 1(Continued)

60℃灭活毒素 Purified toxin inactivated at 60℃				80℃灭活毒素 Purified toxin inactivated at 80℃			
毒素浓度/ μg·mL ⁻¹ Toxin concentration	孢子萌发率均值/% Average spore germination rate			毒素浓度/ μg·mL ⁻¹ Toxin concentration	孢子萌发率均值/% Average spore germination rate		
	5 h	10 h	24 h		5 h	10 h	24 h
10	(42.0±4.0)bC	(64.7±3.0)bB	(70.0±3.0)bA	10	(52.0±3.6)aC	(68.3±1.5)bB	(77.7±3.1)bA
20	(49.7±3.5)aC	(69.3±3.8)aB	(81.6±4.7)aA	20	(48.0±2.0)cC	(71.0±1.0)aB	(73.6±3.2)bcA
40	(51.3±4.2)aC	(70.6±2.1)aB	(84.3±3.2)aA	40	(48.7±2.1)cC	(66.3±4.5)cB	(70.0±1.7)cA
80	(44.0±2.6)bC	(65.3±2.1)bB	(73.3±2.1)bA	80	(46.3±3.5)cC	(68.0±2.6)bB	(71.0±1.7)cA
CK	(50.5±3.3)aC	(72.5±4.8)aB	(85.5±3.5)aA	CK	(50.5±3.3)bC	(72.5±4.8)aB	(85.5±3.5)aA

100℃灭活毒素 Purified toxin inactivated at 100℃			
毒素浓度/μg·mL ⁻¹ Toxin concentration	孢子萌发率均值/% Average spore germination rate		
	5 h	10 h	24 h
10	(54.0±3.0)aC	(71.3±3.2)aB	(76.7±3.8)aA
20	(52.7±4.0)aC	(70.7±2.1)aB	(82.0±2.0)aA
40	(48.0±4.0)aC	(73.3±2.1)aB	(82.0±2.7)aA
80	(50.0±3.5)aC	(67.7±0.6)aB	(83.7±3.8)aA
CK	(50.5±3.3)aC	(72.5±4.8)aB	(85.5±3.5)aA

1) CK: 清水培养。表中萌发率均为 6 次重复的平均值, 同列数据后不同小写字母表示同一时间不同浓度在 $P<0.05$ 水平上差异显著; 同行数据后不同大写字母表示同一浓度不同时间在 $P<0.05$ 水平上差异显著(LSD 测验)。下同。
CK: Sterile water culture. Data are the mean of six repetitions. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$) between different concentrations determined by LSD test. Different capital letters in the same row indicate significant difference ($P<0.05$) between different time points at the same concentration determined by LSD test.

2.2.2 毒素经不同蛋白酶降解后对暗孢节菱孢的抑制作用

由表 2 可见, 毒素经过 4 种不同蛋白酶处理后在同一时间段不同浓度处理与对照有显著差异, 且随着浓度的升高抑制效果更加明显。毒素经过胰蛋白酶、K 蛋白酶、羧肽酶处理作为诱导因子配制梯度

浓度, 均为浓度 20 μg/mL 的孢子萌发效果较好, 尤其在 10 h 时胰蛋白酶处理的与对照仅差 5.2 百分点, 但在 24 h 时差距达到了 10.2 百分点。而糜蛋白酶处理下浓度 10 μg/mL 的孢子萌发效果较好, 24 h 时孢子的萌发率高于其他 3 种酶处理下的, 但也只达到 76.0%, 与对照 85.5% 差异显著。

表 2 纯毒素经不同蛋白酶降解后对孢子萌发的影响
Table 2 Effects of purified toxins degraded by different proteases on spore germination

胰蛋白酶处理 Purified toxin is degraded by trypsin				K 蛋白酶处理 Purified toxin is degraded by K protease			
毒素浓度/ μg·mL ⁻¹ Toxin concentration	孢子萌发率均值/% Average spore germination rate			毒素浓度/ μg·mL ⁻¹ Toxin concentration	孢子萌发率均值/% Average spore germination rate		
	5 h	10 h	24 h		5 h	10 h	24 h
10	(42.3±3.5)cC	(64.3±2.5)bB	(73.3±2.9)bA	10	(42.0±2.0)bC	(64.7±4.6)bB	(70.7±1.2)bA
20	(40.0±4.0)cC	(67.3±2.3)bB	(75.3±2.3)bA	20	(43.0±4.4)bC	(64.0±4.0)bB	(72.7±1.2)bA
40	(44.0±2.0)bC	(62.3±2.1)bcB	(68.3±3.1)bcA	40	(39.3±0.6)cC	(67.3±3.1)bB	(72.0±3.5)bA
80	(43.3±3.1)bcC	(60.7±1.2)cB	(66.3±2.9)cA	80	(38.7±1.2)cC	(62.0±2.0)cB	(67.7±2.5)cA
CK	(50.5±3.3)aC	(72.5±4.8)aB	(85.5±3.5)aA	CK	(50.5±3.3)aC	(72.5±4.8)aB	(85.5±3.5)aA

羧肽酶处理 Purified toxin is degraded by carboxypeptidase				糜蛋白酶处理 Purified toxin is degraded by chymotrypsin			
毒素浓度/ μg·mL ⁻¹ Toxin concentration	孢子萌发率均值/% Average spore germination rate			毒素浓度/ μg·mL ⁻¹ Toxin concentration	孢子萌发率均值/% Average spore germination rate		
	5 h	10 h	24 h		5 h	10 h	24 h
10	(42.0±2.0)cdC	(62.0±2.0)bcB	(68.7±3.1)bcA	10	(42.0±4.4)bcC	(61.3±2.3)cB	(76.0±3.6)bA
20	(43.0±1.0)bcC	(65.0±3.0)bB	(72.7±4.2)bA	20	(48.0±2.0)bC	(62.3±4.0)bB	(72.0±2.0)bcA
40	(44.0±1.0)bC	(60.0±3.0)cB	(67.0±2.6)cA	40	(42.7±3.2)bC	(64.7±2.3)bB	(74.7±4.0)bA
80	(41.3±2.5)dC	(56.7±2.9)dB	(62.3±2.1)dA	80	(38.0±4.0)bcC	(61.7±2.9)bcB	(71.7±2.9)cA
CK	(50.5±3.3)aC	(72.5±4.8)aB	(85.5±3.5)aA	CK	(50.5±3.3)aC	(72.5±4.8)aB	(85.5±3.5)aA

2.2.3 细胞壁成分对暗孢节菱孢的抑制作用

从表 3 可以看出细胞壁成分对孢子萌发的影响,随着时间的延长孢子萌发率的差异越来越明显。20 $\mu\text{g/mL}$ 处理相比其他浓度萌发效果较好,在 10 h 和 24 h 时萌发率分别达到 60.0%、69.3%,与对照 72.5%、85.5%相差 12.5 百分点和 16.2 百分点,且同一时间段随着浓度的提高孢子萌发率显著降低。

表 3 不同浓度细胞壁成分对孢子萌发的影响

Table 3 Effects of different cell wall extracts on the spore germination of *Arthrinium phaeospermum*

处理浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Concentration of cell wall extracts	孢子萌发率均值/% Average spore germination rate		
	5 h	10 h	24 h
10	(43.0 $\pm$ 3.0)bC	(58.3 $\pm$ 2.1)bB	(67.0 $\pm$ 3.6)bA
20	(40.0 $\pm$ 4.0)bC	(60.0 $\pm$ 1.0)bB	(69.3 $\pm$ 1.5)bA
40	(33.0 $\pm$ 3.0)cC	(51.7 $\pm$ 4.9)cB	(60.0 $\pm$ 3.5)cA
80	(37.0 $\pm$ 4.6)cC	(51.3 $\pm$ 0.6)cB	(59.7 $\pm$ 3.8)cA
CK	(50.5 $\pm$ 3.3)aC	(72.5 $\pm$ 4.8)aB	(85.5 $\pm$ 3.5)aA

通过玻片萌发法观察诱导因子对病原菌暗孢节菱孢菌孢子萌发的影响,发现 3 种诱导因子对孢子萌发均有一定的抑制作用。在毒素经过温度灭活作为诱导因子组中,萌发效果较好的为经过 60℃ 灭

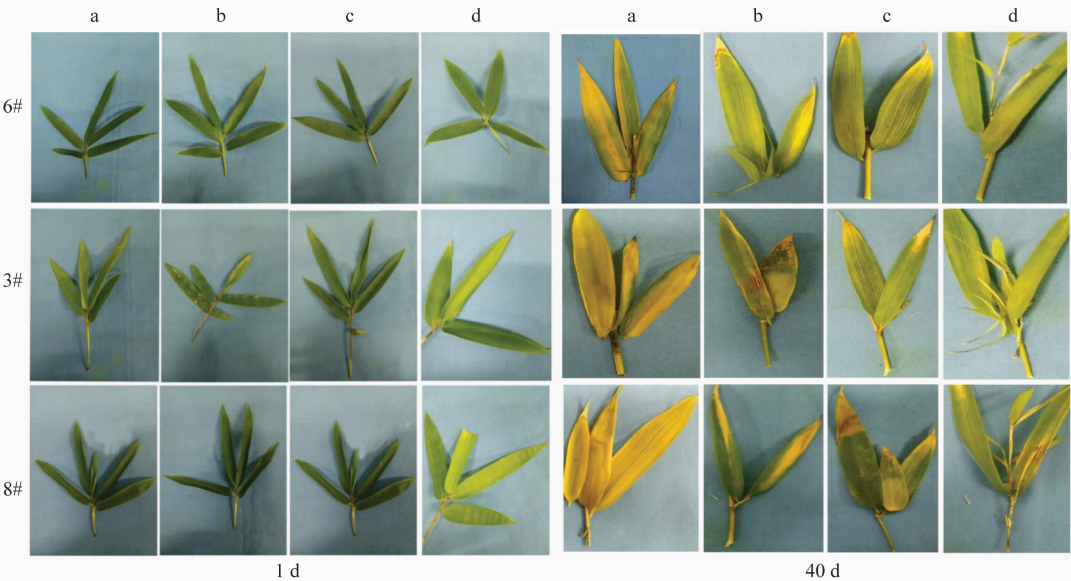
活、毒素浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 处理,其 24 h 时的萌发率为 84.3%。在毒素经过 4 种蛋白酶降解作为诱导因子组中,萌发效果较好的为糜蛋白酶处理下毒素浓度 10 $\mu\text{g/mL}$,24 h 时的萌发率为 76.0%。在细胞壁成分作为诱导因子组中 20 $\mu\text{g/mL}$ 的孢子萌发效果较好,24 h 时的萌发率为 69.3%。

从以上结果可以看出,不同蛋白酶对毒素处理和细胞壁提取物不同浓度处理对病原菌暗孢节菱孢菌的孢子萌发均有抑制作用,温度灭活处理 80℃ 和 40℃ 及以下温度对孢子萌发也有抑制作用,而 100℃ 温度处理孢子萌发与对照不存在显著差异。因此,最终选择经过 60℃ 灭活毒素,浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 作为最佳诱导因子。

2.3 室外持续期病情指数和诱导效果比较

2.3.1 杂交竹不同品种诱导后的症状

通过图 3 得出,接种后,经过 40 d 持续观察,3 个不同杂交竹品种的症状表现均不同。对于 3 个不同杂交竹品种,杂交竹 8# 的感病程度高于其他两个品种。从 a 组来看杂交竹 8# 的叶片几乎全部变黄枯萎枝干也全部干枯,3# 叶片大多数变黄枯萎但枝干仅干枯少部分,而 6# 仅有少数叶片变黄枝干未见干枯。b 和 c 组病情指数均有降低,但 8# 的叶片变黄枯萎程度依然高于 3# 和 6#。



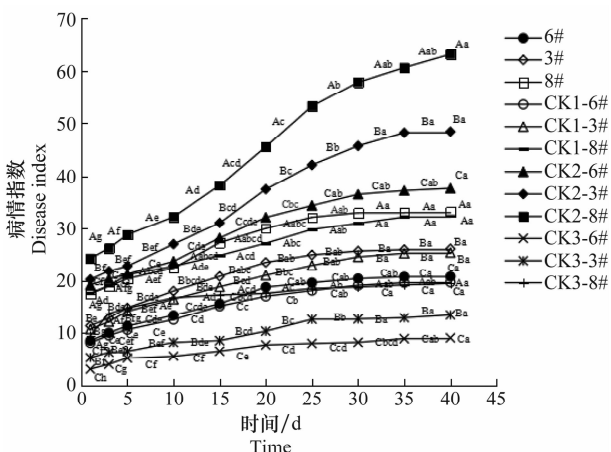
a: 无菌水和菌悬液处理; b: 最佳诱导因子和 *A. phaeospermum* 菌悬液处理; c: 最佳诱导因子和无菌水处理; d: 仅无菌水处理
a: Inoculated with sterile water first and then *A. phaeospermum* suspension (water+*A. phaeospermum*); b: Inoculated with the best induction factor first and then *A. phaeospermum* suspension (AP-Toxin+*A. phaeospermum*); c: Inoculated with the best induction factor first and then sterile water (AP-Toxin+water); d: Treated with only sterile water

图 3 3 个杂交竹品种不同处理的症状图

Fig. 3 Symptoms of three *B. perversa*×*D. grandis* varieties under different treatments

2.3.2 杂交竹不同品种不同处理诱导后的病情指数

从图 4 中变化动态得知,CK2 组上升的趋势高于处理组 1、CK1 和 CK3,1~10 d 缓慢上升,10~30 d 上升的幅度变大,30~40 d 上升的幅度又开始减缓。CK2 中杂交 6# 的病情指数在 40 d 时增加到了 37.69,而杂交 3# 增加到了 48.38,杂交 8# 增加的最高,达到了 63.15。图中也看出 CK2-8 整个观察时间段折线一直处于最高。3#、6# 和 8# 对应的折线变化趋势与 CK1-3#、CK1-6# 和 CK1-8# 相近,1~30 d 有缓慢的上升趋势,30~40 d 趋于稳定。3#、6#、8# 在 40 d 时病情指数分别为 25.42、19.71 和 32.43,相比 CK2 低了 17.98、22.96、30.72。CK1 的 3 个杂交竹品种 40 d 时与 CK2 相比病情指数也分别低了 16.88、22.26 和 29.9。而 CK3 整个时间段变化不明显波动,幅度也不大,病情指数也最低,3#、6# 和 8# 分别为 13.46、9.08 和 19.49。



CK1-6、CK1-3、CK1-8 分别代表先接种最佳诱导因子后再接种无菌水的病情指数变化,CK2-6、CK2-3、CK2-8 分别代表先接种无菌水后再接种病原菌孢子悬浮液的病情指数变化,6#、3#、8# 分别代表先接种最佳诱导因子后再接种病原菌孢子悬浮液的病情指数变化,CK3-6、CK3-3、CK3-8 分别代表仅接种无菌水的病情指数变化

CK1-6, CK1-3, and CK1-8 indicate the disease index changes of bamboo varieties No. 3, 6, and 8 inoculated with the optimum inducing factor first and then sterile water; CK2-6, CK2-3, and CK2-8 indicate the disease index changes of bamboo varieties No. 3, 6, and 8 inoculated with the sterile water and then *A. phaeospermum* suspension; No. 3, 6, and 8 bamboo varieties indicate the disease changes inoculated with optimum inducing factor first and then *A. phaeospermum* suspension; CK3-6, CK3-3, and CK3-8 indicate the disease index changes of bamboo varieties No. 3, 6, and 8 inoculated with only sterile water

图 4 不同杂交竹品种不同处理后的病情指数变化动态

Fig. 4 Dynamic responses of disease indexes in three

B. pervariabilis × *D. grandis* varieties under different treatments

2.3.3 杂交竹不同品种诱导后的诱抗效果

通过图 5 可看出 10~25 d 期间 3 条直线都是升高趋势,25~40 d 趋于稳定,这可能是开始病原菌

对寄主植物造成一定的伤害,后诱导激发了寄主植物自身的抗性,增强了对逆境的能力。抗性品种的诱抗指数折线图整个时间段一直高于感病品种。从 6# 的诱抗效果动态变化来看,1~10 d 折线先降低,10~20 d 有缓慢的上升趋势,20~40 d 稳定,此时的诱抗指数稳定在 49.23% 左右。3# 诱抗指数在 1~5 d 从 46.97% 降到了 38.12%,5~25 d 又升高到了 46.99%,30~40 d 稳定在 48.53% 左右。8# 在 1~5 d 诱抗指数稳定于 26.92% 左右,10~35 d 有较大幅度的上升,平均值达到了 47.10%。总之,杂交 6# 的折线在整个时间段均高于杂交 3# 和杂交 8#,而杂交 8# 相对于杂交 6#、杂交 3# 两个品种折线波动幅度变化更大,尤其在 5~25 d 呈直线上升趋势,杂交 6# 诱导处理后变化幅度最小。

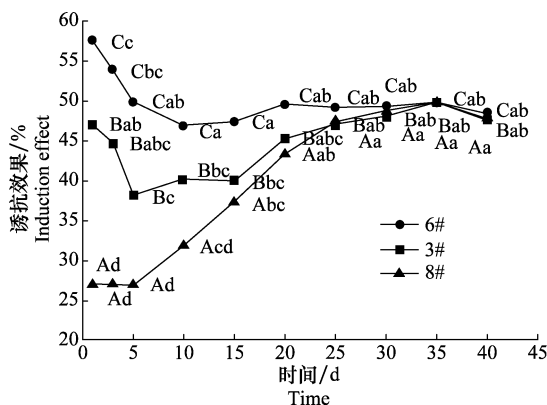


图 5 不同杂交竹品种诱抗效果变化动态

Fig. 5 Dynamic responses of induction effect in three

B. pervariabilis × *D. grandis* varieties

通过图 4 病情指数比较得知,3 个不同杂交竹品种在 4 种不同处理方式中均呈现 CK3 植株的病情指数最低,CK2 的病情指数最高。处理组 1 的病情指数低于 CK2,表明诱导因子使植株抗性增加。而图 5 诱抗效果比较得出,杂交竹 6# 整个时间段的诱抗平均值达到了 50.16%,高于杂交竹 3# 和 8#,说明抗性品种对诱导因子的响应更明显。

3 结论与讨论

3.1 不同诱导因子对病原菌孢子萌发影响不同

诱导因子又称为诱抗剂、激发子,是靠诱导物获得抗性。它与自然获得抗性具有相同的抗病谱,且诱导产生的抗性与自然产生的抗性和机理是相同的,诱导物本身对病原物没有直接杀伤作用,是能够诱发植物产生抗病防卫反应的物质^[22]。葛银林、李

洪连、李开本等^[23-27]的研究表明,激发子是能够诱导植物产生抗病反应(或植保素)的特殊物质,而 Mayama、Ehrenshaft、Moussatos、章元寿、董金皋等^[28-32]的研究结果说明毒素可以作为激发子增加植物体内的抗病物质,起着与受体间相互识别的作用。本试验选用温度灭活的毒素、经过不同蛋白酶处理的毒素和病原菌细胞壁成分作为 3 种诱导因子,对诱导因子设置不同浓度梯度,采用玻片萌发法^[18]观察其对病原菌孢子萌发的影响。经过细胞壁成分处理的孢子在 5 h 时平均萌发率为 16.25%,经过蛋白酶处理毒素后的孢子平均萌发率为 18.29%,经过温度灭活处理毒素的孢子萌发率为 19.09%,与对照相比孢子萌发率均低于清水中的萌发率,但经过温度灭活处理毒素的孢子萌发率更接近清水中孢子萌发率,而相比 5 h 时细胞壁成分对病原菌有明显的抑制作用。10 h 同样温度灭活毒素与清水中孢子萌发率接近,因此最佳诱导因子选用温度灭活的毒素。

确定选用温度作为最佳诱导因子后,对温度设置梯度 20、40、60、80、100℃ 分别对毒素灭活,进而观察不同温度灭活后对病原菌孢子萌发的影响。由表 1 可知 100℃ 灭活毒素后观察病原菌孢子萌发率均与清水对照差异不显著,可能毒素已经全部失活,20、40、80℃ 灭活毒素孢子萌发率与清水存在显著差异,而 60℃ 灭活毒素在 20、40 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下孢子萌发率与清水不存在显著差异,孢子萌发效果较好,毒素浓度 10、80 $\mu\text{g/mL}$ 处理孢子萌发率与清水存在显著差异,因此选用 60℃ 作为最佳温度。

对纯毒素经过 60℃ 灭活后设置梯度浓度 10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$,观察不同浓度对病原菌孢子萌发的作用。在这 4 个不同浓度梯度中 40 $\mu\text{g/mL}$ 与清水对照不存在显著差异且萌发效果最好,因此 40 $\mu\text{g/mL}$ 为最佳浓度处理。

综上所述,选出的最佳诱导因子为纯毒素经过 60℃ 灭活处理、毒素浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.2 不同杂交竹品种诱导抗病性存在差异

Dean、Okuno、冉隆贤、蔡新忠、李红玉等^[13,33-37]的研究表明,在一定的浓度范围内诱导因子与抗性寄主植物的诱导抗病性效果存在正相关关系,抗性越强的品种诱导抗病性越好。刘亚光^[38]等研究认为灰斑病菌和粗毒素对抗病品种诱导作用强于感病品种。王敬文等^[39]研究 PAL 在抗马铃薯晚疫病中的作用发现,无论病原菌还是病原菌毒素处理, PAL

的活性大小与品种抗病性呈正相关。因此对于大多数情况而言,在最佳诱导因子的诱导作用下,抗性品种的诱导抗性要高于感病品种且在一定的时间段后,诱导效应不再增强而趋于稳定。然而对于不同的寄主植物诱导抗病性也存在差异,前人的研究大部分都是针对农作物、经济作物等的幼苗期进行诱导处理的,本试验所选定的研究对象是禾本科植物—杂交竹。

本试验用室内试验筛选的最佳诱导因子作用于不同杂交竹品种,观察接种后 1~40 d 的病情指数和诱抗效果。从不同杂交竹品种病情指数和诱抗指数的变化图(图 4、5)可看出,经过最佳诱导因子诱导后,各品种病情指数和诱抗效果存在差异。3 个不同抗性品种在 1~40 d 的诱抗指数平均值分别为杂交竹 6# 50.16%,杂交竹 3# 44.77%,杂交竹 8# 38.64%,结果与前人的研究相似^[18,31-35]。杂交竹 6# 和 3# 在诱导后 1~5 d 诱抗指数有降低的趋势,5 d 之后开始上升,25~40 d 趋于稳定,此时诱抗指数为 48.45%。杂交竹 8# 对诱导因子反应较为缓慢,1~5 d 没有变化,5 d 之后迅速呈直线上升,最终稳定时的诱抗指数为 47.54%。杂交竹 8# 感病品种呈直线上升可能是因为诱导因子对某些生化物质的诱导速度快于抗病品种,但最终的诱抗效果依然是抗病品种高于感病品种。

参考文献

- [1] 赵继红,孙淑君,李建中.植物诱导抗病性与诱抗剂研究进展[J].植物保护,2003,29(4):7-10.
- [2] YE X S, PAN S Q, KUC J. Activity isozyme pattern, and cellular localization of peroxidase as related to systemic resistance of tobacco to blue mold (*Peronospora tabacina*) and to Tobacco mosaic virus [J]. Phytopathology, 1990, 80(12): 1295-1299.
- [3] 赵继红,李建中.灰霉菌菌丝体提取物诱导番茄抗病性的初步研究[J].河南农业科学,2003(10):55-56.
- [4] 胡景江,刘志龙,文建雷.溃疡病菌低聚糖激发子诱导杨树细胞抗病机制的初步研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2003,31(4):145-148.
- [5] 李云锋,王振中,贾显禄.稻瘟菌激发子 CSBI 诱导水稻防御性相关酶的活性变化[J].作物学报,2004,30(6):613-617.
- [6] 李洪连,王守正,王金生,等.诱抗菌激发子诱导黄瓜产生对炭疽病的抗性[J].植物生理学报,1993,19(4):320-324.
- [7] 郭红莲,陈捷,高增贵,等.不同诱抗剂诱导玉米对灰斑病的抗性及其与 PAL 的关系[J].沈阳农业大学学报,2000,31(5):465-467.
- [8] 宾金华,潘福焱.茉莉酸甲酯对烟草幼苗抗炭疽病的影响[J].热带亚热带植物学报,1997,5(4):21-26.

- [9] 宾金华, 潘瑞灿. 茉莉酸甲酯诱导烟草幼苗抗病与过氧化物酶活性和木质素含量的关系[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(2): 160-164.
- [10] 宾金华, 姜胜, 黄胜琴, 等. 茉莉酸甲酯诱导烟草幼苗抗炭疽病与 PAL 活性及细胞壁物质的关系[J]. 植物生理学报, 2000, 26(1): 1-6.
- [11] KUBO M, SATO T. Utilization of high temperature stress as plant resistance activators for control of summer greenhouse cucumber diseases [J]. Acta Horticulturae, 2002, 588: 171-174.
- [12] 李宝聚, 彭霞薇, 王福建, 等. 高温诱导黄瓜抗黑星病研究[J]. 园艺学报, 2001, 28(2): 177-179.
- [13] DEAN R A, KUC J. Rapid lignification in response to wounding and infection as a mechanism for induced systemic protection in cucumber [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1987, 31: 69-81.
- [14] 朱天辉, 黄宗超, 高强章, 等. 撑 X 绿杂交竹梢枯病病原及发生规律研究[J]. 中国森林病虫, 2009, 28(2): 10-12.
- [15] 李姝江. 杂交竹梢枯病菌蛋白毒素及其精确作用机制研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2013.
- [16] LI S J, ZHU T H. Purification of the toxin protein Pc from *Arthrinium phaeospermum* and its effect on the defence enzymes of *Bambusa pervariabilis* × *Dendrocalamopsis grandis* varieties [J]. Forest Pathology, 2014, 44(2): 96-106.
- [17] LI S J, ZHU T H, ZHU H M Y, et al. Purification of protein AP-toxin from *Arthrinium phaeospermum* causing blight in *Bambusa pervariabilis* × *Dendrocalamopsis grandis* and its metabolic effects on four bamboo varieties [J]. Phytopathology, 2013, 103(2): 135-145.
- [18] 黄昌华. 用琼脂玻片法测定孢子萌发率[J]. 植物保护, 1993(3): 36-37.
- [19] 卢丹, 徐晴, 江凌, 等. 生物酶降解真菌毒素的研究进展[J]. 生物加工过程, 2018, 16(2): 49-56.
- [20] LI S J, ZHU T H. Biochemical response and induced resistance against anthracnose (*Colletotrichum camelliae*) of camellia (*Camellia pitardii*) by chitosan oligosaccharide application [J]. Forest Pathology, 2013, 43: 67-76.
- [21] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [22] 黄艳娜. 外源性水杨酸诱导山茶对灰斑病抗性的研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2006.
- [23] 葛银林, 李德葆. 植物抗病性的诱导、机制、分子生物学研究进展[J]. 中国生物防治, 1995, 11(3): 134-141.
- [24] 李洪连, 王守正, 袁红霞, 等. 植物诱导抗病性研究的现状与展望[J]. 河南农业大学学报, 1994, 28(3): 219-229.
- [25] 李洪连, 王守正, 王金生, 等. 黄瓜对炭疽病诱导抗性的初步研究 II. 诱抗抗病机制的研究[J]. 植物病理学报, 1993, 23(4): 327-332.
- [26] 李开本, 陈福如, 翁启勇, 等. 木霉菌对黄瓜生长及过氧化物酶影响初报[C]//中国植物保护研究进展. 北京: 中国科学技术出版社, 1996: 288-292.
- [27] 李开本, 翁启勇, 陈庆河, 等. 健株作物根际微生物优势种对黄瓜生长影响初报[C]//中国植物保护研究进展. 北京: 中国科学技术出版社, 1996: 285-287.
- [28] MAYAMA S, TANI T, UENO T, et al. The purification of victorin and its phytoalexin elicitor activity in oat leaves [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1986, 29: 1-8.
- [29] EHRENSHAFT M, UPCHURCH R G. Host protein(s) induces accumulation of the toxin cercosporin and mRNA in a phytopathogenic strain of *Cercospora kikuchii* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1993, 43(2): 95-107.
- [30] MOUSSATOS V V, YANG S F, WARD B, et al. AAL-toxin induced physiological changes in *Lycopersicon esculentum* Mill: roles for ethylene and pyrimidine intermediates in necrosis [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1994, 44(6): 455-468.
- [31] 章元寿. 植物病原真菌毒素的研究现状[J]. 真菌学报, 1991, 10(3): 169-181.
- [32] 董金皋. 玉米大斑病菌 HT-毒素 I 的提纯、结构鉴定及致病活性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 1998.
- [33] OKUNO T, NAKAYAMA M, OKAJIMA N, et al. Systemic resistance to downy mildew and appearance of acid soluble proteins in cucumber leaves treated with biotic and abiotic inducers [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 2009, 57(2): 203-211.
- [34] 冉隆贤, 谷文众, 吴光金. 水杨酸诱导桉树抗青枯病的作用及相关酶活性变化[J]. 林业科学研究, 2004, 17(1): 12-18.
- [35] 蔡新忠, 郑重, 宋凤鸣. 水杨酸对水稻幼苗抗瘟性的诱导作用[J]. 植物病理学报, 1996, 26(1): 7-12.
- [36] 柳建良, 黄小丹, 傅焱栋, 等. 水杨酸对芒果炭疽病的诱导抗性作用[J]. 热带亚热带植物学报, 1998, 6(3): 245-248.
- [37] 李红玉, 郭金魁, 周功克. 水杨酸诱导黄瓜抗黑星病抗性的部位差异和时效性[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(6): 640-642.
- [38] 刘亚光. 大豆灰斑病菌毒素组分、致病性及其诱导抗性的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2002.
- [39] 王敬文, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究——II 苯丙氨酸解氨酶在抗马铃薯晚疫病中的作用[J]. 植物生理学报, 1982, 8(1): 35-42.

(责任编辑: 田 喆)