

亚磷酸钾对马铃薯晚疫病病原菌的作用机理

林 敏¹ 王荣波¹ 陈庆河^{1,2} 刘裴清¹ 李本金^{1*} 翁启勇^{1,2*}

(1. 福建省农业科学院植物保护研究所, 福建省作物有害生物监测与治理重点实验室, 福州 350013;

2. 福建农林大学, 闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室, 福州 350002)

摘要: 为明确亚磷酸钾对马铃薯晚疫病病原菌的作用机理, 通过菌丝生长速率法和显微观察技术研究亚磷酸钾对马铃薯晚疫病病原菌菌丝生长和游动孢子释放的影响, 并分别采用半定量反转录-聚合酶链锁反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)及生物化学技术分析亚磷酸钾处理后马铃薯叶片防御基因表达、氧化酶活性以及可溶性蛋白含量的变化情况。结果表明, 亚磷酸钾对马铃薯晚疫病病原菌菌丝生长和游动孢子释放均有明显的抑制作用, 其抑制中浓度 EC_{50} 分别为24.03 $\mu\text{g/mL}$ 和5.99 $\mu\text{g/mL}$ 。接种晚疫病菌并经亚磷酸钾溶液处理的马铃薯叶片防御基因 $PR1$ 、 $PR2$ 表达量显著上调, 接种8 d时表达量为银法利处理和清水对照的1.97~5.12倍; 同时, 过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)酶活性增强, 其峰值分别达534.29、281.13和68.84 U/mg, 为银法利处理和清水对照的1.18~3.52倍; 可溶性蛋白含量也随之增加, 峰值(0.85 mg/mL)分别为银法利处理和清水对照的1.85倍和3.15倍。表明亚磷酸钾可通过直接抑菌作用和诱导植物产生抗病反应从而达到防治病害的目的。

关键词: 亚磷酸钾; 晚疫病病原菌; 防御基因; 氧化酶活性; 可溶性蛋白含量

Action mechanism of potassium phosphite against potato *Phytophthora infestans*

Lin Min¹ Wang Rongbo¹ Chen Qinghe^{1,2} Liu Peiqing¹ Li Benjin^{1*} Weng Qiyong^{1,2*}

(1. Fujian Key Laboratory for Monitoring and Integrated Management of Crop Pests, Institute of Plant Protection,

Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, Fujian Province, China; 2. State Key Laboratory of

Ecological Pest Control for Fujian and Taiwan Crops, Fujian Agriculture and Forestry University,

Fuzhou 350002, Fujian Province, China)

Abstract: In order to explore the action mechanism of potassium phosphite against potato *Phytophthora infestans*, the method of mycelium growth rate and microscopic observation were used to detected the effect for mycelium growth and zoospore release of *P. infestans* treated with potassium phosphite, and the expression of defense genes, oxidase activity and soluble protein content in the treated leaves of potato were analyzed by RT-PCR and biochemical method, respectively, after being inoculated with *P. infestans* and application of the potassium phosphite. The results showed that potassium phosphite could inhibit the mycelium growth and zoospore release of *P. infestans*, and the EC_{50} values were 24.03, 5.99 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The expression of resistance related genes, including $PR1$ and $PR2$, were significantly increased by 1.97–5.12 times than CK (infinito and water treatment), after application of potassium phosphite. The activity of peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were increased, the specific value of that were 534.29, 281.13, 68.84 U/mg, with 1.18–3.52 times than CK, and the soluble protein concentration were also increased, the specific value of that were 0.85 mg/mL,

基金项目: 福建省属公益类科研院所基本科研专项(2015R1024-2, 2016R1023-1), 福建省农业科学院植物保护科技创新团队(STIT2017-1-8)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: lbenjin@126.com, wengqy@faas.cn

收稿日期: 2017-05-03

with 1.85 and 3.15 times than CK (infinito and water treatment), respectively. In conclusion, the potassium phosphite may against the pathogen of oomycetes by direct inhibition and induced resistance of host.

Key words: potassium phosphite; *Phytophthora infestans*; defense genes; oxidase activity; soluble protein content

由致病疫霉 *Phytophthora infestans* 引起的马铃薯晚疫病是一种毁灭性的世界病害,在我国各地均有发生和流行,一般年份减产 10%~30%,重者可达 50% 以上,甚至绝收,严重威胁着马铃薯生产(黄冲和刘万才,2016)。防治该病主要依靠培育抗病品种和施用化学药剂,但由于晚疫病病原菌遗传变异迅速,已出现能克服现有全部抗病基因的菌株,且该病原菌属于卵菌,没有细胞甲壳素和麦角固醇,单独使用杀菌剂防治效果差,致使难以完全有效地控制该病,因此寻找一种利用生物或非生物因素防治病原菌侵染的途径至关重要。

亚磷酸盐作为一种新型植物诱抗剂,已成功用于由多种病原菌如栎树猝死病菌 *P. ramorum* (Garbelotto et al., 2007)、樟疫霉 *P. cinnamomi* (Shearer et al., 2010)、霜霉 *Peronospora manshurica* (Silva et al., 2011)、尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* (周佳一等, 2016) 等引起的病害防治,尤其对卵菌病害有明显的防治效果 (Dalio et al., 2014)。亚磷酸盐被植物吸收后,转移到木质部和韧皮部,具有在植株体内持续时间长、对环境无污染等特点,因此成为当前防治疫病的主要措施。Thao et al. (2008) 研究认为,亚磷酸盐防治病害的机制包括抑制病原菌菌丝生长和产孢等直接保护寄主的功效以及刺激植物体内抗病物质的产生和积累等间接功效。Wilkinson et al. (2001a, b) 曾报道,高浓度亚磷酸盐具有直接抑制病原菌的作用。Coffey & Bower (1984)、Coffey & Joseph (1985) 研究了不同浓度亚磷酸盐对抑制病原菌菌丝生长和孢子形成及对产生的合子、厚垣孢子、孢子囊和游动孢子释放的影响。研究表明,低浓度亚磷酸盐在提高植物抗毒素产生的同时能增加活性氧产生,干扰寄主植物的防御通路 (Guest, 1984; Smillie et al., 1989; Daniel & Guest, 2006)。Jones & Dangl (2006) 研究发现,亚磷酸盐通过诱导植物产生活性氧、增加可溶性蛋白及激素水杨酸 (salicylic acid, SA) 信号传导等来抵制病原菌侵染。Guest & Bompeix (1990) 发现低浓度亚磷酸盐能够产生间接作用,是因为亚磷酸盐产生化学作用之后激发病原菌释放代谢物,从而增强宿主防御反应。目前,亚磷酸钾已被

广泛用于卵菌病害的防治 (Dercks & Buchenauer, 1987), 但是其诱导马铃薯对晚疫病产生抗性的机理尚不明确。

本研究测定不同浓度亚磷酸钾对马铃薯晚疫病病原菌菌丝生长和游动孢子释放的影响,并分析亚磷酸钾处理后植株体内水杨酸信号传导中防御相关基因 *PR1*、*PR2* 的表达、过氧化物酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等氧化酶活性及可溶性蛋白含量的变化情况,旨在为制定马铃薯晚疫病新防控策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和马铃薯种薯:马铃薯晚疫病病原菌菌株 A118, 由本实验室保存。马铃薯品种为中薯 3 号, 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所选育。

黑麦培养基:黑麦 60 g、琼脂 17 g、蒸馏水 1 000 mL。

供试药剂:银法利,由治疗性杀菌剂氟吡菌胺 (fluopicolide) 和强内吸传导性杀菌剂霜霉威盐酸盐 (propamocarb hydrochloride) 复配而成,拜耳作物科学(中国)有限公司。

试剂及仪器:亚磷酸、氢氧化钾,国药集团化学试剂有限公司;Trizol 试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;逆转录试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司;POD、SOD、CAT 活性及蛋白含量测定试剂盒,南京建成生物科技有限公司。NanoDrop2000C 型超微量紫外可见分光光度计,美国 Thermo Scientific 公司;PowerPac Universal 型电泳仪、CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪、Gel Doc XR 型凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司;Wisdom6500 型酶标仪,美国 Wisdom 公司;MIR-554-PC 型低温恒温培养箱,松下健康医疗器械株式会社。

1.2 方法

1.2.1 孢子囊悬浮液制备及亚磷酸钾溶液配制

将在黑麦培养基上培养 10 d 的马铃薯晚疫病病原菌移至经表面消毒的新鲜感病薯块上,恢复其致病力,产生更多孢子囊。10 d 后,从薯块上挑取菌丝用蒸馏水配成晚疫病病原菌孢子囊悬浮液,将悬浮

液中的孢子囊数调至约 5×10^4 个/mL, 4℃冰箱内静置 2~4 h 后用于接种。

用无菌水配制 1 g/L 亚磷酸钾母液, 使用 1 mol/L KOH 将其 pH 调至 6.3, 再用无菌水将母液配制成 5、10、25、50、100、125、150 $\mu\text{g/mL}$ 共 7 个浓度的溶液。

1.2.2 亚磷酸钾对病原菌菌丝生长和孢子释放的影响

将在黑麦培养基中 20℃ 下培养 15 d 的马铃薯晚疫病病原菌, 用直径 5 mm 打孔器沿菌落边缘同一圆周打取菌饼, 将菌饼菌丝面朝下接种于 7 个亚磷酸钾浓度处理的黑麦培养基平板中央, 以无菌水处理为空白对照, 置于 20℃ 低温恒温培养箱中培养。待对照菌落长至平板边缘时, 采用十字交叉法测定不同处理的菌落增长直径, 即菌落直径减去菌饼直径, 每个处理重复 3 次, 取平均值。根据公式计算各浓度亚磷酸钾处理下的菌丝生长抑制率, 菌丝生长抑制率 = (对照菌落增长直径 - 处理菌落增长直径) / 对照菌落增长直径 $\times 100\%$ 。

将马铃薯晚疫病病原菌孢子囊悬浮液与 7 个浓度亚磷酸钾溶液混合, 4℃ 冰箱内静置 4 h, 促使游动孢子释放, 以无菌水处理为空白对照, 每个处理重复 3 次。显微镜下镜检孢子囊总数和空孢子囊数, 每个重复镜检 150 个孢子囊, 计算孢子囊释放率和亚磷酸钾对游动孢子释放的抑制率。孢子囊释放率 = 空孢子囊数 / 孢子囊总数 $\times 100\%$, 抑制率 = (对照孢子囊释放率 - 处理孢子囊释放率) / 对照孢子囊释放率 $\times 100\%$ 。

将亚磷酸钾浓度值转换成对数值 x , 相应抑制率转换成概率值 y , 利用 DPS 7.05 软件计算抑制菌丝生长和游动孢子释放的有效中浓度 EC_{50} 。

1.2.3 马铃薯接种及药剂试验

于 2014—2015 年在福建省福州市晋安区进行马铃薯接种及药剂试验, 根据 Liu et al. (2016) 及药剂推荐使用浓度确定本试验的药剂浓度, 设 3 个处理, 即清水、0.75 mL/L 银法利和 1 g/L 亚磷酸钾, 每个处理小区长为 4.0 m、宽为 2.5 m, 面积为 10 m^2 , 小区随机排列, 重复 3 次, 分别于接种病原菌后 48 h 进行喷施。具体试验方法: 用 5 mg/L 赤霉素溶液将马铃薯种薯消毒 5 min 后置于沙床上, 在种薯四周盖上含水量较高的细沙土, 待种薯发芽后播种, 行距 60 cm、株距 25 cm, 保持密度在 60 000 株/ hm^2 左右。播种后定期浇水管理, 待马铃薯叶片长至 6~8 片时, 于每棵苗周围接种 20 mL 已配好的晚疫病病原菌孢子囊悬浮液, 48 h 后分别进行喷施清水、银法利和亚磷酸钾处理。

1.2.4 马铃薯叶片总 RNA 的提取及 PCR 反应

马铃薯叶片总 RNA 的提取: 根据预试验结果, 马铃薯植株接种晚疫病菌后第 8 天防御信号通路基因 *PR1* 和 *PR2* 表达量最高, 因此在接种后第 1 天和第 8 天进行取样。每个处理随机选取 30 株马铃薯, 每株马铃薯采集新鲜、完整、大小基本一致的 10 片马铃薯叶片, 将相同处理的叶片装入同一自封袋并标记, 迅速带回实验室, -80℃ 条件下保存待用。将采集到的每株马铃薯叶片选取 50~100 mg 作为待测叶片组织, 用液氮研磨成无颗粒的粉末后移到已加入 1 mL Trizol 的 1.5 mL 离心管中, 参照试剂盒说明书, 采用一步法提取组织总 RNA, 用超微量紫外可见分光光度计检测其浓度和纯度。

逆转录反应: 参照逆转录试剂盒说明书进行。反应体积 10 μL , 逆转录反应条件: 37℃ 逆转录反应 15 min; 98℃ 逆转录酶失活反应 5 min。将 RNA 逆转录为 cDNA 并将浓度稀释至 50 ng/ μL , 置于 -70℃ 冰箱保存。根据 NCBI 已经发表的晚疫病病原菌基因序列, 利用软件 Primer Premier 5.0 设计逆转录 PCR 的内参引物 StPR1F/StPR1R 和目的片段引物 StPR2F/StPR2R。StPR1F: 5'-CATGAACATATGGTACGTGGAA-3', StPR1R: 5'-CCTAAAGCAAATGGGGTTG-3'; StPR2F: 5'-TATCATCAGCAGGGTTGCAAA-3', StPR2R: 5'-TCGCGAAAAATGCTATTCTAGG-3'。

逆转录 PCR 反应及扩增: 20 μL 反应体系: SYBR qPCR Mix 10 μL 、上下游引物各 1 μL 、cDNA 模板 1 μL , 不足部分由无菌超纯水补足。在实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增, 扩增条件: 95℃ 预变性 1 min; 95℃ 变性 0.1 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 40 个循环。

1.2.5 马铃薯叶片相关酶提取及氧化酶活性测定

酶液的提取: 分别在接种前和接种后第 2、4、6、8、10 天进行取样, 每个处理随机选取 30 株马铃薯, 每株马铃薯采集新鲜、完整、大小基本一致的 10 片马铃薯叶片, 将相同处理的叶片装入同一自封袋并标记, 迅速带回实验室, -80℃ 条件下保存待用。将采集到的每株马铃薯叶片准确称取 0.5 g 放入预冷的研钵中, 加入 0.1 mol/L pH 7.0~7.4 的磷酸缓冲液 4.5 mL, 冰浴条件下机械研磨成匀浆液, 3 500 r/min 离心 10 min 后, 取上清液作为待测酶液, 置于 -20℃ 冰箱中储藏备用。

酶活性的测定: 按照南京建成生物科技有限公司试剂盒测定 POD、SOD、CAT 活性, 具体操作步骤

按说明书进行,用酶标仪分别在420、550和405 nm下测定光密度值,每个处理重复3次,取平均值。

1.2.6 马铃薯可溶性蛋白含量的测定

酶液的提取:使用经过遇冷处理的生理盐水代替磷酸缓冲液,其余方法同1.2.5。蛋白含量测定:按照南京建成生物科技有限公司试剂盒测定蛋白含量,具体操作步骤按使用说明书进行,用酶标仪在595 nm下测定光密度值,每个处理重复3次,取平均值。

1.3 数据分析

分别采用Excel 2003和DPS 7.05进行数据统计和方差分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 亚磷酸钾对菌丝生长和孢子释放的抑制作用

不同浓度亚磷酸钾对晚疫病病原菌菌丝生长均有一定的抑制作用,且随着亚磷酸钾浓度的增加,抑制效果越来越明显,当浓度为5、10、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 时,抑制率分别为26.97%、39.02%、51.03%、59.57%,当浓度大于100 $\mu\text{g/mL}$ 时,抑制率均在60.00%以上,当浓度为150 $\mu\text{g/mL}$ 时,抑制效果最明显,达到77.73%。亚磷酸钾抑制菌丝生长的 EC_{50} 为24.03 $\mu\text{g/mL}$,表明亚磷酸钾对马铃薯晚疫病病原菌菌丝生长有明显的抑制效果(图1)。

亚磷酸钾对晚疫病病原菌游动孢子释放具有很强的抑制作用,当亚磷酸钾浓度为5、10、25 $\mu\text{g/mL}$ 时,抑制率分别为40.30%、64.97%、84.47%,当浓度大于50 $\mu\text{g/mL}$ 时,游动孢子释放抑制率均达90.00%以上,当浓度为125 $\mu\text{g/mL}$ 时,其抑制率达到98.87%,

孢子囊绝大部分未释放游动孢子(图1)。亚磷酸钾抑制晚疫病病原菌游动孢子释放的有效中浓度 EC_{50} 为5.99 $\mu\text{g/mL}$,明显低于抑制菌丝生长的有效中浓度,说明相对于抑制菌丝生长,亚磷酸钾更能有效抑制游动孢子的释放。

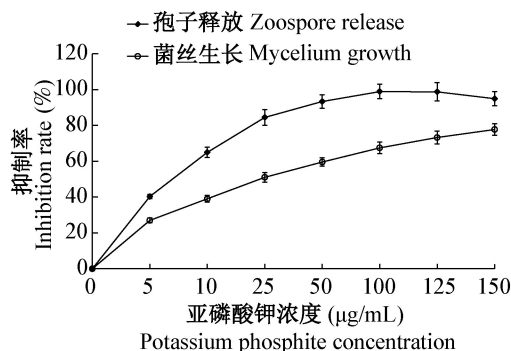


图1 不同浓度亚磷酸钾对马铃薯晚疫病病原菌菌丝生长和游动孢子释放的影响

Fig. 1 Effect of potassium phosphite with different concentrations on mycelial growth and zoospore release of *Phytophthora infestans*

图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。Data are mean $\pm$ SE.

2.2 亚磷酸钾对植物防御基因PR表达的影响

亚磷酸钾、银法利和清水处理8 d时马铃薯叶片的PR1基因均有极显著表达($P<0.01$),表达量分别为1 d时的2.38、1.41和1.69倍,而且亚磷酸钾处理的PR1基因表达水平极显著高于银法利和清水处理($P<0.01$),其表达量分别为银法利和清水处理的1.97倍和2.03倍,说明亚磷酸钾有助于植物防御基因PR1的上调表达,起到一定的防御作用(图2)。

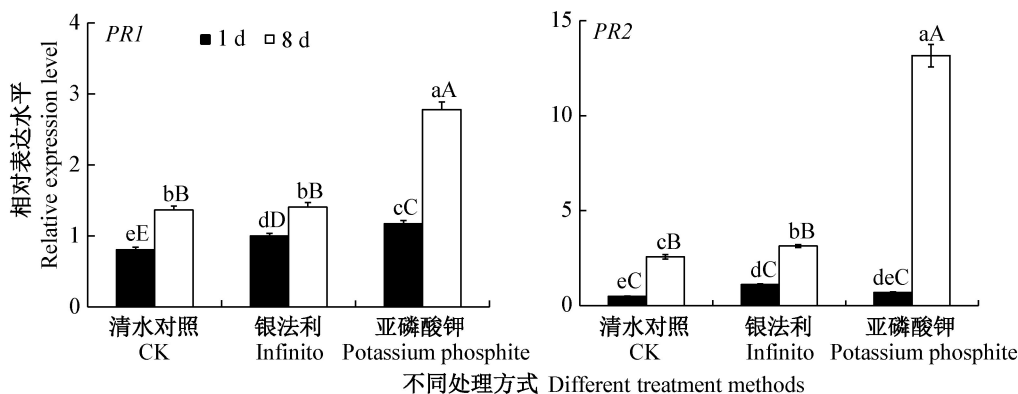


图2 亚磷酸钾对晚疫病菌侵染的马铃薯叶片PR1和PR2基因表达的影响

Fig. 2 Effect of potassium phosphite on the PR1 and PR2 gene expression in potato leaves upon *Phytophthora infestans* infection

图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。同色柱上不同大、小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.01$ 或 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean $\pm$ SE. Different uppercase or lowercase letters on the bars indicate significant difference at $P<0.01$ or $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

亚磷酸钾、银法利和清水处理1 d时 $PR2$ 基因表达量较低,8 d时3个处理马铃薯叶片的 $PR2$ 基因均有极显著表达($P<0.01$),表达量分别为1 d时的19.08、2.82和5.24倍,而且亚磷酸钾处理的 $PR2$ 基因表达水平极显著高于银法利和清水处理($P<0.01$),其表达量分别为银法利和清水处理的4.21倍和5.12倍,说明亚磷酸钾能显著促进植物防御基因 $PR2$ 的表达,起到相当重要的防御作用(图2)。

2.3 亚磷酸钾对植物抗病相关酶活性的影响

亚磷酸钾能有效提高植物POD活性。接种晚疫病病菌后,亚磷酸钾、银法利和清水处理马铃薯叶片中POD活性随即开始升高,且均在接种第6天时达到峰值,分别为534.29、342.86、291.44 U/mg,且亚磷酸钾处理的POD活性峰值分别为银法利和清水的1.56倍和1.83倍,之后3个处理POD活性开始下降,在接种第10天时亚磷酸钾处理的POD活性降至与银法利和清水处理接近。与银法利和清水处理相比,亚磷酸钾能更迅速地使马铃薯对晚疫病病原菌做出反应,使其POD活性提高并进一步诱导植物产生抗性(图3-A)。

亚磷酸钾处理能增强SOD活性,从而增强植株抗性。接种晚疫病病菌后前2 d,亚磷酸钾和清水处理的马铃薯叶片SOD活性升高,而银法利处理的SOD活性则下降;接种后第2~8天,3个处理马铃薯叶片的SOD活性都呈稳步上升趋势,且亚磷酸钾和清水处理的SOD活性于接菌后第8天均达到峰值,分别为281.13、222.64 U/mg,且亚磷酸钾处理的SOD活性分别为银法利和清水的1.18倍和1.26倍,银法利处理的SOD活性于接菌后第10天达到峰值,为237.74 U/mg,在整个过程中亚磷酸钾处理的马铃薯叶片SOD活性始终高于银法利和清水处理(图3-B)。

亚磷酸钾能提高CAT活性,进而促进植物产生抗病性反应。接种晚疫病病菌后,亚磷酸钾处理的马铃薯叶片中CAT活性随即开始升高,且在接种第6天时达到峰值,为68.84 U/mg,分别为银法利和清水处理的1.18倍和3.52倍,第6~10天CAT活性逐渐下降,最后稳定在一定水平,银法利处理的CAT活性也呈现先升高达到峰值后逐渐降低的趋势,而清水处理的CAT活性呈现起伏,没有明显的变化规律(图3-C)。

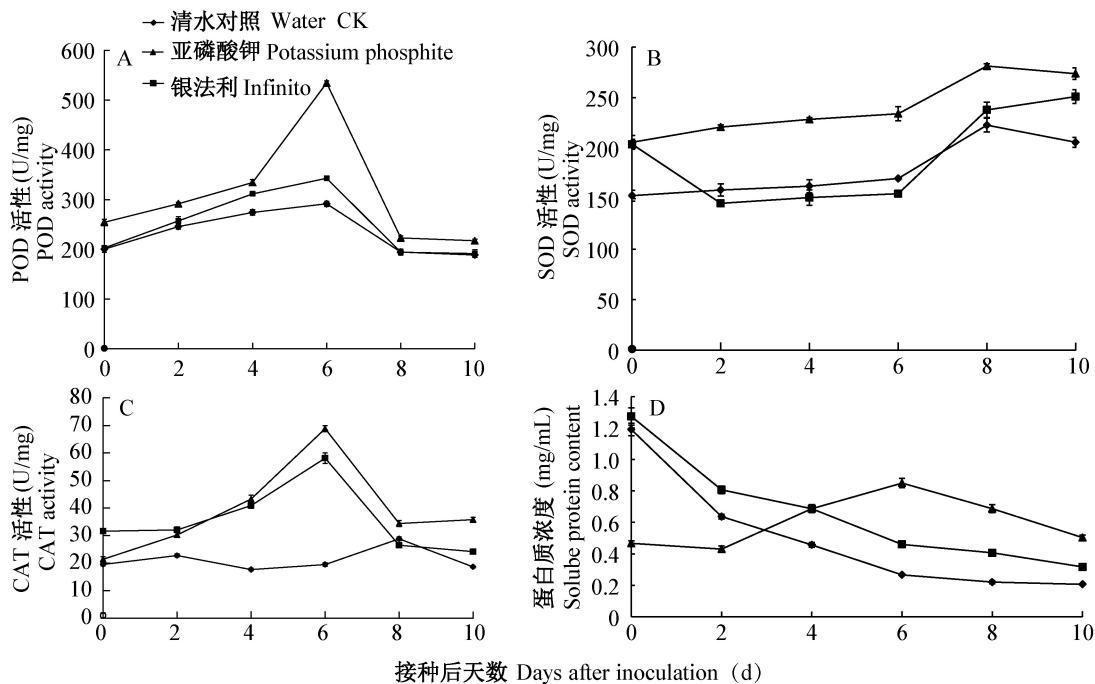


图3 不同处理对马铃薯叶片POD(A)、SOD(B)、CAT(C)活性及可溶性蛋白含量(D)的影响

Fig. 3 Effects of different treatments on POD (A), SOD (B), CAT (C) activities and soluble protein content (D)

图中数据为平均数±标准误。Data are mean±SE.

2.4 亚磷酸钾对马铃薯叶片可溶性蛋白含量的影响

亚磷酸钾处理能提高马铃薯叶片中可溶性蛋白含量。接种晚疫病病菌前,亚磷酸钾、银法利和清水处理的马铃薯叶片可溶性蛋白含量分别为0.47、1.27

和1.19 mg/mL。接种后10 d内,银法利和清水处理的马铃薯叶片中可溶性蛋白含量均呈下降趋势,而亚磷酸钾处理的马铃薯叶片可溶性蛋白含量则呈先上升后下降的趋势,且于接种第6天达到峰值,

为 0.85 mg/mL, 分别为银法利和清水处理的 1.85 倍和 3.15 倍, 虽然接种 6 d 后亚磷酸钾处理的马铃薯叶片可溶性蛋白含量逐渐下降, 但是直至接种第 10 天时其含量依然高于银法利和清水处理(图 3-D)。

3 讨论

不同病原菌对亚磷酸盐的敏感性不同。Fenn & Coffey (1984) 和 Dercks & Buchenauer (1987) 通过观察亚磷酸盐抑制菌丝生长情况对多种疫霉进行敏感性分析, 发现柑桔褐腐疫霉 *P. citrophthora*、柑桔生疫霉 *P. citricola*、樟疫霉 *P. cinnamomi*、恶疫霉 *P. cactorum*、致病疫霉、辣椒疫霉 *P. capsici* 对亚磷酸盐敏感, 但是大雄疫霉 *P. megasperma* 对亚磷酸盐敏感性低。Coffey & Joseph (1985) 研究结果表明, 柑桔生疫霉在孢子囊形成和合子产生阶段比樟疫霉对亚磷酸盐更敏感。本研究结果表明亚磷酸钾抑制马铃薯晚疫病病原菌菌丝生长的 EC_{50} 为 24.03 $\mu\text{g/mL}$, 然而 Coffey & Bower (1984) 报道亚磷酸盐抑制苎麻疫霉 *P. boehmeriae*、恶疫霉和大雄疫霉菌丝生长 EC_{50} 分别为 40.6、67.1 和 91.2 $\mu\text{g/mL}$, 表明晚疫病病原菌对亚磷酸盐很敏感。本研究还发现亚磷酸钾抑制晚疫病病原菌游动孢子释放的 EC_{50} 为 5.99 $\mu\text{g/mL}$, 相对于抑制菌丝生长, 亚磷酸钾能更有效地抑制游动孢子的释放, 表明亚磷酸钾在防治马铃薯晚疫病方面有很大的应用潜力。

Machinandiarena et al. (2012) 研究结果表明, 亚磷酸盐能通过诱导 SA 和茉莉酸/乙烯信号通路中相关防御基因表达来提高马铃薯对晚疫病病原菌侵染的抗性。PR 基因是 SA 防御信号通路中的主要控制基因。Guest & Bompeix (1990) 认为, 亚磷酸盐诱导马铃薯叶片产生防御反应时, SA 作为已知的植物防御反应信号分子能够使 SA 和 PRs 基因有较高的表达。本研究证明亚磷酸钾的使用极显著增强了防御基因 *PR1*、*PR2* 的上调表达, 这与 Molina et al. (1998) 使用亚磷酸盐增加拟南芥 *Arabidopsis thaliana* *PR1* 基因的上调表达, 从而抑制寄生霜霉 *Peronospora parasitica* 侵染的结果一致。

植物抗病性与植物体内的相关防御酶活性密切相关, 其中涉及的防御酶包括 POD、SOD 和 CAT 等(宋瑞芳等, 2007; 韩媛媛等, 2013)。植物体内的 POD、SOD 和 CAT 能及时清除正常代谢过程或逆境胁迫下产生的过多活性氧, 使植物细胞免遭氧化损伤, 在植物与病原物交互作用过程中, 植物通过调节相关防御酶活性的变化来诱导植物产生抗病反应

(孙翠红等, 2015a, b)。本研究结果表明, 接种晚疫病病原菌的马铃薯经亚磷酸钾溶液处理后 POD、SOD、CAT 活性均呈现先升高后降低的趋势, 说明喷施亚磷酸钾可在短时间内提高被晚疫病病原菌侵染的马铃薯叶片中相关防御酶的活性, 进而提高马铃薯植株的抗病性。该结果与亚磷酸盐处理被棕榈疫霉 *P. palmivora* 和樟疫霉侵染的拟南芥后酶活性增加的结果一致 (Daniel & Guest, 2006; Eshraghi et al., 2011)。

植物体内的可溶性蛋白大多数是参与各种代谢的酶类, 可溶性蛋白含量是一个重要的生理生化指标。本研究结果显示, 接种晚疫病病原菌的马铃薯经亚磷酸钾处理后可溶性蛋白含量迅速升高, 且于接种第 6 天时达到峰值, 然后逐渐下降, 但是直至接种第 10 天时可溶性蛋白含量仍高于银法利处理和清水对照, 这可能是因为亚磷酸钾能够诱导植物抗性相关蛋白的增加, 因此喷施亚磷酸钾可以在一定程度上提高被晚疫病病原菌侵染的马铃薯叶片中可溶性蛋白含量, 增强马铃薯植株的免疫力, 从而减轻植物被病原菌侵染的程度。

亚磷酸钾是否抑制马铃薯晚疫病其它信号通路尚未深入探讨, 在大田生产中的应用技术也需进一步研究。

参考文献 (References)

- Coffey MD, Bower LA. 1984. *In vitro* variability among isolates of eight *Phytophthora* species in response to phosphorous acid. *Phytopathology*, 74: 738–742
- Coffey MD, Joseph MC. 1985. Effects of phosphorous acid and fosetyl-Al on the life cycle of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola*. *Phytopathology*, 75(9): 1042–1046
- Dalio RJD, Fleischmann F, Humez M, Osswald W. 2014. Phosphite protects *Fagus sylvatica* seedlings towards *Phytophthora aplurivora* via local toxicity, priming and facilitation of pathogen recognition. *PLoS ONE*, 9(1): e87860
- Daniel R, Guest D. 2006. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67(3/4/5): 194–201
- Dercks W, Buchenauer H. 1987. Comparative studies on the mode of action of aluminium ethyl phosphite in four *Phytophthora* species. *Crop Protection*, 6(2): 82–89
- Eshraghi L, Anderson J, Aryamanesh N, Shearer B, McComb J, Hardy GESJ, O'Brien PA. 2011. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 60(6): 1086–1095

- Fenn ME, Coffey MD. 1984. Studies on the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid. *Phytopathology*, 74: 606–611
- Garbelotto M, Schmidt DJ, Harnik TY. 2007. Phosphite injections and bark application of phosphite+pentabark™ control sudden oak death in coast live oak. *Arboriculture & Urban Forestry*, 33(5): 309–317
- Guest DI. 1984. Modification of defense responses in tobacco and capsicum following treatment with fosetyl-Al [aluminiumtris (o-ethyl phosphonate)]. *Physiological Plant Pathology*, 25(2): 125–134
- Guest DI, Bompeix G. 1990. The complex mode of action of phosphonates. *Australasian Plant Pathology*, 19(4): 113–115
- Han YY, Chang YW, Yao S, Mao N, Ji ZL. 2013. The defense enzyme activity in transgenic truncated *hpal_{ko}* gene tobacco. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 41(22): 9197–9199, 9334 (in Chinese) [韩媛媛, 常亚文, 姚舒, 毛念, 纪兆林. 2013. 转截短 *hpal_{ko}* 基因烟草抗病防御酶活性分析. *安徽农业科学*, 41(22): 9197–9199, 9334]
- Huang C, Liu WC. 2016. Occurrence characteristics and monitoring advice of potato late blight in China in recent years. *Plant Protection*, 42(5): 142–147 (in Chinese) [黄冲, 刘万才. 2016. 近几年我国马铃薯晚疫病流行特点分析与监测建议. *植物保护*, 42(5): 142–147]
- Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323–329
- Liu PQ, Li BJ, Lin M, Chen GL, Ding XL, Weng QY, Chen QH. 2016. Phosphite-induced ROS production, and ethylene and ABA biosynthesis, mediate the control of *Phytophthora capsici* in pepper (*Capsicum annuum*). *Functional Plant Biology*, 43(6): 563–574
- Machinandiarena MF, Lobato MC, Feldman ML, Daleo GR, Andreu AB. 2012. Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology*, 169(14): 1417–1424
- Molina A, Hunt MD, Ryals JA. 1998. Impaired fungicide activity in plants blocked in disease resistance signal transduction. *Plant Cell*, 10(11): 1903–1914
- Shearer BL, Fairman RG, Grant MJ. 2010. Effective concentration of phosphite in controlling *Phytophthora cinnamomi* following stem injection of *Banksia* species and *Eucalyptus marginata*. *Forest Pathology*, 36(2): 119–135
- Silva OC, Santos HAA, Dalla PM, May LL. 2011. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. *Crop Protection*, 30(6): 598–604
- Smillie R, Grant BR, Guest D. 1989. The mode of action of phosphite: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. *Phytopathology*, 79(9): 921–926
- Song RF, Ding YL, Gong CR, Xu GH, Han XZ. 2007. Research advances in relationship between tobacco resistance and protective enzymes activity. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 23(5): 309–314 (in Chinese) [宋瑞芳, 丁永乐, 宫长荣, 徐光辉, 韩晓哲. 2007. 烟草抗病性与防御酶活性间的关系研究进展. *中国农学通报*, 23(5): 309–314]
- Sun CH, Xu CL, Zhao MQ, Huang YJ, Zhang L, You FF, Zhou FY. 2015a. Synthesis of silver nanoparticles using quaternized oligochitosan derivative and its induced resistance against TMV in tobacco plant. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 17(4): 391–400 (in Chinese) [孙翠红, 徐翠莲, 赵铭钦, 黄元炯, 张露, 尤方芳, 周伏叶. 2015a. 壳寡糖季铵盐衍生物纳米银的合成及其诱导烟株抗烟草花叶病毒活性. *农药学报*, 17(4): 391–400]
- Sun CH, Xu CL, Zhao MQ, Wang Y, Fu PP, Chen FY. 2015b. The inhibitory effects of chitooligosaccharides and its derivatives on *Tobacco mosaic virus (TMV)*. *Chinese Tobacco Science*, 36(2): 87–92 (in Chinese) [孙翠红, 徐翠莲, 赵铭钦, 王莹, 付培培, 陈发元. 2015b. 壳寡糖及其衍生物抗烟草花叶病毒机理的初步研究. *中国烟草科学*, 36(2): 87–92]
- Thao HTB, Yamakawa T, Shibata K, Sarr PS, Myint AK. 2008. Growth response of komatsuna (*Brassica rapa* var. *peruviridis*) to root and foliar applications of phosphite. *Plant Soil*, 308: 1–10
- Wilkinson CJ, Holmes JM, Dell B, Tynan KM, McComb JA, Shearer BL, Colquhoun IJ, Hardy GESJ. 2001a. Effect of phosphite on in planta zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 50(5): 587–593
- Wilkinson CJ, Shearer BL, Jackson TJ, Hardy GESJ. 2001b. Variation in sensitivity of western Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi* to phosphite *in vitro*. *Plant Pathology*, 50(1): 83–89
- Zhou JY, Liu YH, Wang YN, Qi QQ, Wang Y, Lai TF, Zhou T. 2016. Effects of boric acid, cinnamon oil and potassium phosphite on the development of postharvest disease *Fusarium oxysporum*. *Journal of Hangzhou Normal University (Natural Science Edition)*, 15(2): 149–155 (in Chinese) [周佳一, 刘雅红, 王娅妮, 戚琴芹, 汪莹, 赖童飞, 周婷. 2016. 硼酸、肉桂油及亚磷酸钾对采后病原菌 *Fusarium oxysporum* 生长发育的影响. *杭州师范大学学报(自然科学版)*, 15(2): 149–155]

(责任编辑:张俊芳)