

黄绿木霉菌及其混剂对大豆菌核病的诱导抗性初探

孙冬梅¹, 林志伟¹, 迟丽², 肖翠红¹, 陈起强¹, 孙晓吉¹

(1. 黑龙江八一农垦大学 生命学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院, 黑龙江 齐齐哈尔 161001)

摘要: 采用人工接种方法, 测定拮抗菌剂对大豆菌核病的抗扩展能力及相关酶活性的影响, 同时研究黄绿木霉菌及其混剂对大豆菌核病的诱导抗性。结果表明: 离体试验中, 叶片接种后, 拮抗细菌和黄绿木霉菌及其混剂均可较好的抑制菌核病病斑的进一步扩展; 盆栽试验中, 黄绿木霉菌处理对大豆根、第1复叶、第3复叶的PAL、PPO、POD活性均有明显增强作用, 而解磷钾菌或拮抗细菌处理对PAL、PPO、POD活性的变化无明显影响, 化肥处理则降低PAL、PPO、POD活性; 有机肥处理对PAL活性有明显增强作用, 对PPO、POD活性无明显影响。

关键词: 大豆菌核病菌; 黄绿木霉菌; POD; PPO; PAL

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)01-0088-04

Preliminary Study on Induced Resistance by *Trichoderma Aureoviride* and Its Multiple Microbe on Soybean *Sclerotinia Sclerotiorum*

SUN Dong-mei¹, LIN Zhi-wei¹, CHI Li², XIAO Cui-hong¹, CHEN Qi-qiang¹, SUN Xiao-ji¹

(1. College of Life Science and Technology, Heilongjiang August First Reclamation University, Daqing 163319, Heilongjiang; 2. Qiqihaer Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihaer 161001, Heilongjiang, China)

Abstract: The induced resistance of different bio-control microorganism on *Sclerotinia sclerotiorum* was investigated. By means of artificial inoculation method, the anti-expansion capacity of antagonistic multiple microbe on soybean *Sclerotinia sclerotiorum* and the associated enzyme activities were measured. The *in vitro* experiment showed the restrain ability of antagonism bacterium and *Trichoderma aureoviride* on lesion expansion by *S. sclerotiorum* was significant. Pot experiment showed that the PAL, PPO and POD activity of the first compound leaf, the third compound leaf and roots of soybean treated by *Trichoderma aureoviride* were significantly enhanced, while these enzymes of soybean treated by phosphorus and potassium were less affected, and these associated enzyme activities of soybean treated by chemical fertilizers were reduced; When treated by organic fertilizer, PAL activity was increased, while PPO and POD activity had no significant change. Results suggest applying of *Trichoderma aureoviride* and its multiple microbe is effective in controlling soybean *Sclerotinia sclerotiorum*.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*; *Trichoderma aureoviride*; POD; PPO; PAL

生物防治是植物病害防治中一种有效的方法^[1]。近十几年来, 诱导抗性的研究也已成为一个十分活跃的领域。植物诱导抗性, 是指不同病原物、病原物的非亲和小种(株系)、弱毒株系、近似种及其处理物等因子产生的诱导抗性^[2-3]。在植物代谢的过程中, PAL、POD、PPO 是一类广泛存在于动物、植物和微生物内的酶, 是生物演化过程中建立起来的生物防御系统的关键酶, 参与植物防御性反应, 同时降低寄主植物内丙二醛(MAD)的产生, 提高抗病性。在诱导抗性作用机制方面, 大量研究表明, 寄主防御酶系、活性氧现象、病程相关蛋白(PR)及木质

素的积累是诱导抗性的重要表征^[4]。这些物质是诱导抗性信号途径中重要的中间产物或终产物, 在植物抗病过程中起重要作用。苯丙氨酸解氨酶(PAL)是莽草酸代谢途径的限速酶, 是酚类物质合成过程中的关键酶。过氧化物酶(POD)是木质素合成最常见的酶之一, 是细胞内重要的活性氧清除剂, 与植物的抗性密切相关^[5]。它在木质素生物合成的最后一步反应过程中通过催化H₂O₂分解而发挥作用。它可氧化交联细胞壁中木质素前体和结构蛋白, 氧化交联反应导致细胞壁增厚, 在结构上对病原菌侵袭形成机械屏障。多酚氧化酶(PPO)的主

收稿日期: 2009-09-02

基金项目: 黑龙江省高校骨干教师资助项目(1152G023)。

第一作者简介: 孙冬梅(1970-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为应用微生物。E-mail: sdmlzw@126.com。

要功能是将酚类物质氧化成对病原物毒性更强的醌类物质。醌和单宁对病原菌菌丝的生长有毒害作用,且醌类化合物是细胞形成木质素的单体物质^[6-7]。该试验所使用的拮抗菌均由作者前期分离获得,并在大豆上表现出良好的抗病效果^[8-9],通过拮抗菌的诱导处理,分析拮抗菌对大豆防御酶系的影响,为其防治植物病害提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

仪器设备:分光光度计,离心机,研钵,打孔器,石英砂。菌株:黄绿木霉,核盘菌拮抗细菌,菌核病核盘菌,解磷、钾细菌均为实验室保存。试剂:0.05 mol·L⁻¹ pH 6.8 硼酸缓冲液;0.05 mol·L⁻¹ pH 7.8 硼酸缓冲液;0.02 mol·L⁻¹ 苯丙氨酸(用 0.1 mol·L⁻¹ 硼酸缓冲液配制);5 mmol·L⁻¹ 巯基乙醇硼酸缓冲液;2% H₂O₂;0.05 mol·L⁻¹ 愈创木酚;0.1 mol·L⁻¹ 儿茶酚;5 mol·L⁻¹ HCl 溶液;0.02 mol·L⁻¹ 苯丙氨酸(用 1.0 mol·L⁻¹ pH 8.8 硼酸缓冲液配制);PVP。培养基:PDA 培养基(28℃,培养丝核菌 3 d,备用);牛肉膏蛋白胨培养基(34℃培养解磷钾菌,备用)。

1.2 试验设计

1.2.1 离体叶片接种试验 取一长好的木霉菌的平板加 100 mL 无菌水配成黄绿木霉菌孢子原液(孢子浓度为 10¹¹·mL⁻¹),对各拮抗菌作如下处理:取黄绿木霉菌孢子原液 50 mL,加无菌水 50 mL;取黄绿木霉菌孢子原液和核盘菌拮抗细菌菌液各 25 mL,加无菌水 50 mL;取拮抗细菌菌液 50 mL,加无菌水 50 mL;对照(100 mL 无菌水)。

取生长一致的大豆第 2 复叶按照以上处理喷施后,放入平板中,每个平板放 3 片,3 次重复。12 h 后用接种针接上生长在 PDA 培养基上的直径为 3.5 mm 的核盘菌琼脂块,记录侵染情况。

1.2.2 大豆诱导试验 取黑土、黄土、草碳土各半袋,过筛,混均。分成 7 份,土壤处理方法如下:(A)磷细菌 10 mL + 钾细菌 10 mL + 拮抗细菌 20 mL + 清水 160 mL;(B)拮抗细菌液 40 mL + 木霉孢子悬液 10 mL + 清水 150 mL;(C)拮抗细菌液 40 mL + 清水 160 mL;(D)磷细菌 10 mL + 钾细菌 10 mL + 拮抗细菌 20 mL + 木霉孢子悬液 10 mL + 清水 150 mL;(E)二铵 1.5 g + 尿素 0.5 g + 氯化钾 0.5 g + 200 mL 清水;(F)有机肥 4 g + 清水 200 mL;(G)喷入清水

200 mL。共 7 个处理。装入(直径 20 cm)花盆中,每处理 3 次重复,每盆播种完好的豆种,出苗后均匀保留 5 株。观察盆内土壤情况,均匀补充清水,保持盆土含水量适度。待大豆开花前,第 4 复叶用接种针划开一小口,然后接上 PDA 核盘菌菌丝块。测定根、第 1、3 片复叶的 PAL、POD、PPO 活性。

1.3 测定项目与方法

酶液的制备:取 0.5 g 新鲜大豆叶片,蒸馏水冲洗干净,用滤纸吸干表面水分,置于冰浴的研钵中,加入少量的石英砂及 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 7.8 含 1% PVP)研磨提取,研磨后再补加 8 mL 缓冲液。匀浆,用纱布过滤后于 12 000 r·min⁻¹ 冷冻离心 10 min,上清液为酶粗提液,用于测定 PPO、PAL、POD 活性。POD 活性测定:采用愈创木酚法测定。PAL 活性及 PPO 活性测定参考文献[5]。

1.4 数据分析

用 DPS 3.1 进行数据处理分析。

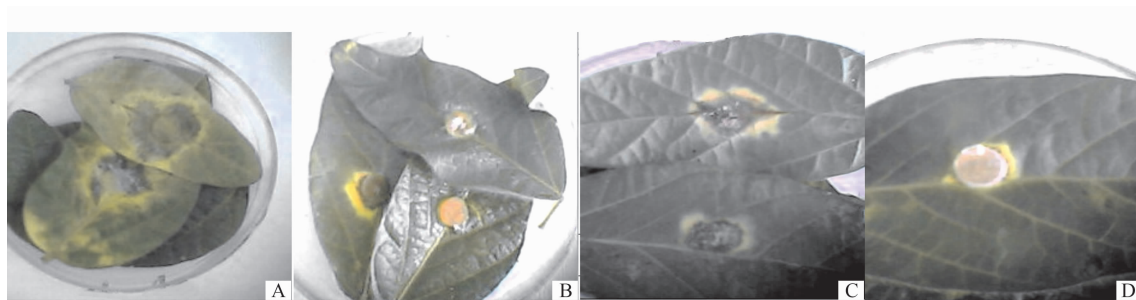
2 结果与分析

2.1 拮抗菌对核盘菌的抑制效果

离体叶片接菌后每隔 12 h 记录侵染情况(图 1)。接菌 24 h 后,对照和木霉孢子处理开始出现叶片退绿、变黄现象;接菌 60 h 后拮抗细菌和木霉孢子混合处理与拮抗细菌单独处理的叶片开始出现退绿、变黄,但变黄的病斑非常小,且不明显。表明混合处理与拮抗细菌单独处理对核盘菌的侵染具有很强的抑制作用。从病斑的扩展速度来看,木霉孢子处理组比对照组速度慢且病斑小,而混合处理与拮抗细菌单独处理的大豆叶片上的病斑变化非常小,几乎不扩展。

2.2 不同处理对大豆防御酶系的影响

2.2.1 不同处理对大豆 PAL 活性影响 接菌 48 h 后,测定苯丙氨酸解氨酶活。从图 2 看出,施用化肥对大豆根部诱导 PAL 活性影响不显著,却能降低叶片的 PAL 活性;有机肥、拮抗菌和木霉孢子对大豆的诱导抗性有提高作用,多菌种的混合更有利于诱导抗性的增强。如处理 A、B、C、D、F 与对照相比,第 3 复叶的 PAL 活性分别提高 6.22%、19.13%、13.95%、20.74%、19.82%,其中以处理 D 提高幅度最明显,而处理 E 的 PAL 活性则降低了 21.35%,差异均达显著水平。



A. 对照,未添加拮抗菌剂;B. 喷入拮抗菌与黄绿木霉后,接种菌核病菌;C. 只喷黄绿木霉菌孢子悬液后,接种菌核病菌;D. 只喷拮抗菌菌剂后接种菌核病菌

A. CK; B, C and D indicate the infection of *Sclerotinia sclerotiorum* after treated with Antagonism *Bacillus* spp. and *Trichoderma* sp., *Trichoderma* sp. and Antagonism *Bacillus* spp., respectively.

图1 不同处理对核盘菌的抑制效果

Fig. 1 Restrain effects of different treatment

2.2.2 不同处理对大豆 PPO 活性影响 从图3看出,不同处理不同部位的 PPO 酶活性变化趋势相似。其中以黄绿木霉菌孢子混合拮抗细菌与解磷、钾菌对大豆根部 PPO 活性的诱导效果较强,而化肥则有抑制作用;拮抗细菌对大豆根部 PPO 酶活性影响不显著,进一步表明多菌种的混合更有利于诱导抗性的增强。如处理 B、D、F 与对照相比,大豆根部 PPO 酶活分别提高了 1.86%、14.34% 和 37.89%,且差异显著;而处理 A、C、E 与对照相比无显著差异;处理 B、D、F 第1复叶的 PPO 活性则分别较对照提高了 12.39%、13.45%、5.95%,而处理 E 则降低了 7.13%。

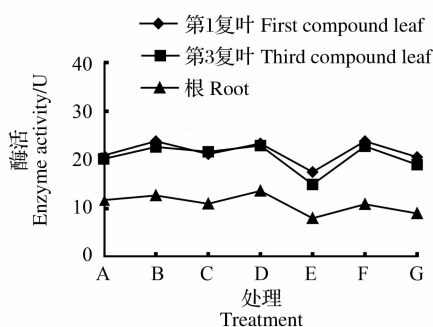


图2 不同处理对大豆 PAL 活性影响

Fig. 2 Effect of different treatment on soybean PAL enzyme activity

2.2.3 不同处理对大豆 POD 活性影响 施用化肥和有机肥对大豆根部和叶部诱导 POD 活性影响不显著,而拮抗细菌和木霉菌孢子对大豆的诱导抗性有提高作用,并且多菌种的混合更有利于诱导抗性的增强。如处理 B、D 与对照相比,大豆根部 POD 酶活分别提高了 22.04%、34.68%;第3复叶的 POD 酶活分别提高了 15.68%、23.64%;处理 D 与对照相

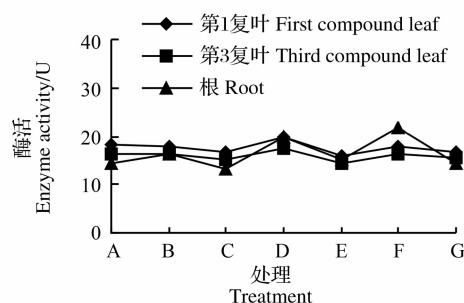


图3 不同处理对大豆 PPO 活性影响

Fig. 3 Effect of different treatment on soybean PPO enzyme activity

比,第1复叶的 POD 的活性提高了 21.20%,而处理 E、F 的根部 POD 酶活与对照相比差异不显著。同时表明木霉菌孢子的施用对大豆根部、叶部的 POD 酶活性均有显著提高作用。

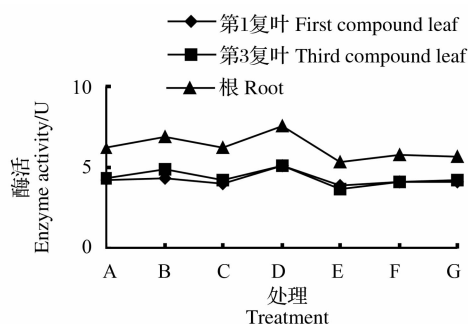


图4 不同处理对大豆 POD 活性影响

Fig. 4 Effect of different treatment on soybean POD enzyme activity

3 结论与讨论

离体叶片试验表明拮抗细菌有较好的抑制核盘菌叶片病斑扩大的效果。测定不同防御酶活性变

化的试验表明,施用黄绿木霉菌及其混剂的土壤中栽培的大豆,接种病原菌后防御酶系的活性有增强现象,而施用化肥的处理,大豆根部及叶片的 PAL、PPO 活性与对照相比下降,但对 POD 活性影响不显著。

目前,关于化学物质诱导大豆植株抗病性已有相关报道,多数的研究结果都是在叶面喷施化学物质后接种病原菌,测定诱导相关酶类的活性变化,在不同的品种上,都有相应的酶活性增强现象;在黄瓜等蔬菜作物上,通过灌根后接种菌核病菌,测定几种诱导酶类的活性,也得到了相似的结果^[10-11]。该研究采用的方法是向土壤施用混合菌剂,在叶面接种菌核病菌后测定的相关酶活性变化,在对诱导酶类的刺激作用方面也得到了相类似的结果,施用拮抗菌剂后可以促进相关酶活性的提高。不同试验结果表明,拮抗物质无论是叶面还是根部施用,均在一定程度上刺激了植物自身的抗逆性能,提高相应酶的活性。

参考文献

- [1] Kalogiannis S, Tjamos S E, Stergiou A, et al. Selection and evaluation of phyllosphere yeasts as biocontrol agents against grey mould of tomato[J]. European Journal of Plant Pathology, 2006, 116(1): 69-76.
- [2] 翁启勇, 李开本. 诱导植物系统抗性研究进展[J]. 福建农业学报, 1998, 13(4): 24-28. (Weng Q Y, Li K B. Study and progress in induction of systemic resistance of plant[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 1998, 13(4): 24-28.)
- [3] 王莉. BTH 诱导黄瓜和番茄对主要病害的抗性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005: 12-17. (Wang L. Benzothiadiazole-Induced resistance in cucumber and tomato against primary diseases[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2005: 12-17.)
- [4] 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. 诱导抗病性机制的研究[J]. 植物病理学报, 1993, 23(4): 327-330. (Li H L, Wang S Z, Wang J S, et al. A preliminary study on the induced resistance of cucumber against *Colletotrichum lacenarium*(anthracnose) II. On the mechanism of induced resistance[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1993, 23(4): 327-330.)
- [5] 刘润进, 沈崇尧, 李怀方, 等. VA 菌根对大丽轮枝菌于棉花体内 PR 蛋白的诱导作用[J]. 植物病理学报, 1993, 23(2): 162-165. (Liu R J, Shen C Y, Li H F, et al. Induction of pathogenesis-related proteins in cotton seedlings by vam fungi and *Verticillium dahliae*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1993, 23(2): 162-165.)
- [6] 连玲丽. 芽孢杆菌的生防菌株筛选及其抑病机理[D]. 福州: 福建农林科技大学, 2007: 10-20. (Lian L L. Screening of biocontrol strains of *Bacillus* spp. and their mode of action on plant disease[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2007: 10-20)
- [7] Shivanna M B, Meera M S. Plant growth promoting fungi induced systemic resistance in cucumber[J]. Advanced in Biological Control of Plant Disease, 1996, 30(3): 175-184.
- [8] 孙冬梅, 杨谦, 张军政. 黄绿木霉诱变菌株对大豆根腐病镰刀菌的拮抗[J]. 大豆科学, 2005, 24(3): 171-175. (Sun D M, Yang Q, Zhang J Z. Antagonism of *Trichoderma aureoviride* mutant strain against *Fusarium* spp. the pathogen of soybean root rot[J]. Soybean Science, 2005, 24(3): 171-175.)
- [9] 孙冬梅, 杨谦, 宋金柱. 黄绿木霉菌代谢产物对大豆菌核病核盘菌的抑菌能力研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(6): 691-695. (Sun D M, Yang Q, Song J Z. Study on the restrain *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma aureoviride* metabolite[J]. Natural Product Research and Development, 2005, 17(6): 691-695.)
- [10] 刘亚光, 赵滨, 马超. 水杨酸和壳聚糖诱导大豆对灰斑病的抗性[J]. 大豆科学, 2008, 27(2): 296-230. (Liu Y G, Zhao B, Ma C. Induction effect of Salicylic acid and Chitosan on frogeye leaf spot in soybean[J]. Soybean Science, 2008, 27(2): 296-230.)
- [11] 郑莉, 梁建根, 施跃峰. 生防菌 ZJH-10 对黄瓜灰霉病诱导抗性的研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(3): 197-201. (Zhen L, Liang J G, Shi Y F. Study on induced resistance of biocontrol bacteria ZJH-10 to cucumber grey mould[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(3): 197-201.)