

青霉菌发酵液对大豆幼苗生长及生理特性的影响

陶 波,张 健,韩玉军,王小琴,乔禹欣,祖永平

(东北农业大学 农学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:采用室内生理检测及生物化学方法,研究了青霉菌发酵液对大豆幼苗生长及生理特性的影响。结果表明:用一定浓度的青霉菌发酵液对大豆浸种和茎叶处理,大豆幼苗的生长呈明显上升趋势,处理后大豆的株高、根长、株鲜重和根鲜重均明显得到了提高,且生长状态好于对照,不同浓度处理间具有明显差异,在发酵液浓度为 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,效果最佳。尤其是对根鲜重的影响,促进率最高可达56.21%,同时增强了幼苗根系活力,最大可以提高57.82%,浸种和茎叶处理后,分别提高了叶绿素含量41.25%和15.40%;超氧化物歧化酶活性12.20%和11.70%;过氧化物酶31.33%和29.95%;过氧化氢酶活性42.8%和20.0%,这为发酵液在大豆田推广应用、提高大豆产量提供了重要理论依据。

关键词:青霉菌发酵液;大豆;根系活力;超氧化物歧化酶;过氧化物酶;过氧化氢酶

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.03.0399

Effect of *Penicillium* Fermented Liquid on Seedling Growth and Physiological Characteristics of Soybean

TAO Bo, ZHANG Jian, HAN Yu-jun, WANG Xiao-qin, QIAO Yu-xin, ZU Yong-ping

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In this paper, indoor physical test and biochemical methods were used to research the infuence of *penicillium* fermented liquid to soybean seedling growth and physiological characteristics. The results showed that after the soybean seed and foliage treated with the certain concentration fermented liquid treatment, soybean seedling growth was rising significantly, the plant height, root length, fresh weight and root fresh weight of soybean were significantly improved, and the growth status was better than control, and different concentrations had obvious differences. When the fermented liquid concentration get $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, the effect was the best. Especially the root fresh weight, promoted rate reached 56.21%, enhanced seedling root activity at the same time, the maximum could increase by 57.82%. After seed and foliage treatment, the increment of the chlorophyll content were 41.25% and 15.40% respectively, superoxide dismutase (SOD) were 12.2% and 11.70%, peroxidase were 31.33% and 29.95%, hydrogen peroxide enzyme activity were 42.8% and 20.0%. It provides important theoretical basis for fermented liquid application in soybean field and improving soybean yield.

Keywords: *Penicillium* fermented liquid; Soybean; Root activity; Superoxide dismutase(SOD); Peroxidase(POD); Catalase (CAT)

随着我国农业可持续发展,安全优质逐渐成为农业发展的要求,绿色环保成为了我国农药科研的主要方向,而其中生物农药因对人、畜低危险性,环境兼容性好,不易产生抗性等优点,在保护农作物安全,提高作物产量方面起到了举足轻重的作用,成为了21世纪的研究热点^[1-2]。与此同时,消费者对绿色食物的需求,也加速了化学农药的淘汰;生产力的提高、保存期限的延长及运输的改进,使生物农药得到了更广泛的应用^[3]。党的十八大报告第一次单篇讲述生态文明,第一次把未来生态文明建设的宏伟目标定为“美丽中国”,发展生态文明建设,必须守住“绿水青山”,所以安全性高、无污染、无公害的生物农药将成为新农药发展的目标^[4]。

利用微生物代谢产物对农作物进行安全保护

已成为当今农药研究的一个重要方向,同时对于微生物代谢产物的研究也成为国内外研究的重点。由于青霉菌的活性强,代谢产物活性高,目前国内外已经有科研工作者开始从事青霉菌代谢产物应用的研究,Guijarro等^[5]研究发现,由于青霉菌具有较强的适应性和生长能力,能够很好地控制褐腐病的发生。杨秀芳等^[6]对植物内分离出一种青霉菌FS11,将其次生代谢产物进行分离,研究结果表明在分离出物质中含有吡啶二胺类和一类结构特殊的生物碱,并通过试验验证了这些化合物具有较强的生物活性,具有抑菌,治疗肿瘤等作用等。青霉菌主要应用于医药、工业等方面,近年来,青霉菌在农业方面的应用日益扩大,中国农科院研究的“5406”是目前我国应用面积最广的植物生长促生

菌,因为可以产生玉米素和激动素,所以能够促进植物生长,调节植物代谢水平,保护植物免受不良因素的影响^[7],目前该菌种已经实现产业化生产,并广泛应用于多种经济作物上^[8]。但目前国内外对于青霉菌的研究仍处于初级阶段,对于青霉菌资源的开发仍应不断深入。

本试验的发酵液是由青霉菌的代谢产物加工而成,前期先制备青霉菌种子液,然后再最适碳源、氮源、转速、温度、pH、接菌量、培养时间条件下培养,最后用机械法打碎加入一些蛋白酶制得发酵液,然后结合室内生理检测及生物化学方法,研究了不同浓度青霉菌发酵液浸种和液喷处理对大豆幼苗生长和生理特性的影响,为该发酵液在大豆田推广应用提供了重要理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种 4400 由黑龙江省农业科学院提供。青霉菌发酵液由东北农业大学农药研究所提供。

1.2 仪器

H-1600RW 微型台式高速冷冻离心机(上海利鑫离心机有限公司);MGC-300A 智能光照培养箱(上海一科学仪器有限公司),JA3003B 电子天平(上海越平科学仪器有限公司),DKS-24 电热恒温水浴锅(中新医疗仪器有限公司),TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.3 方法

1.3.1 青霉菌发酵液浸种处理 挑选整齐、均匀、饱满的大豆种子,浸于浓度分别为 2.5、5.0、7.5、10.0、20.0 g·L⁻¹ 5 个浓度的青霉菌发酵液水溶液中,对照用清水处理,先于 25℃ 光照培养箱中避光浸种 12 h,然后播种于塑料盆中,每盆 6 粒种子,4 次重复,放入温度为(25±1)℃ 的温室内培养,定期观察、浇水,在大豆幼苗生长到第三片三出复叶时,

测量大豆株高、根长、株鲜重和根鲜重,并采用氮蓝四唑法^[9]、紫外吸收法^[9]、愈创木酚法^[9]、乙醇提取法^[10]和 TTC(氯化三苯基四氮唑)的改良法^[7] 分别测定大豆叶片的超氧化物歧化酶活性(SOD)、过氧化氢活性(CAT)、叶绿素含量、过氧化酶活性(POD)和大豆根系活力。

1.3.2 青霉菌发酵液茎叶处理 挑选整齐、均匀、饱满的大豆,浸于清水中,于 25℃ 光照培养箱中避光浸种 12 h,催芽 24 h 至露白,选择发芽一致的大豆种子播种于塑料盆中,每盆 6 粒种子,4 次重复,放入温度为(25±1)℃ 的温室内培养。分别配制 2.5、5.0、7.5、10.0、20.0 g·L⁻¹ 青霉菌发酵液。待大豆长到第一片三出复叶时喷施不同浓度的青霉菌发酵液,继续放入温度为(25±1)℃ 的温室内培养,定期观察、浇水,大豆生理、生化指标的测定方法同浸种处理。

1.4 数据分析

采用 Excel、DPS 软件进行分析处理,差异显著性采用 Duncan 新复极差法。

2 结果与分析

2.1 青霉菌发酵液对大豆幼苗生长的影响

青霉菌发酵液对大豆幼苗的生长具有较大的影响(表 1),在发酵液浸种和茎叶处理后,大豆幼苗的生长呈明显上升趋势,处理后大豆的株高、根长、株鲜重和根鲜重均明显得到了提高,且生长状态好于对照,不同浓度处理间具有明显差异,在发酵液浓度为 5 g·L⁻¹ 时,发酵液浸种处理对大豆株高、根长、株鲜重和根鲜重的促进率最高,达到 28.51%、43.95%、49.58% 和 56.21%,同时发酵液茎叶处理对大豆株高、根长、株鲜重和根鲜重的促进率最高,达到 17.38%、37.59%、47.94% 和 53.16%,生长状态明显优于其它浓度的对照,说明在一定浓度范围内发酵液浸种和茎叶处理均对大豆幼苗有明显的促进作用。

表 1 发酵液对大豆第三片三出复叶时期生长的影响

Table1 Effect of fermentation broth on the growth of third piece ternately compound soybean leaf					
处理	浓度	株高	根长	根鲜重	株鲜重
Treatment	Concentration/(g·L ⁻¹)	Plant height/cm	Root length/cm	Root fresh weight/g	Plant fresh weight/g
浸种 Seed Soaking	CK	11.33±1.01 c	20.00±1.36 f	4.02±0.39 e	2.38±0.22 e
	2.5	12.77±1.39 b	24.37±0.88 d	5.42±0.46 c	3.06±0.16 d
	5.0	14.56±1.13 a	28.79±0.70 a	6.28±0.45 a	3.56±0.22 a
	7.5	14.24±1.18 a	26.77±1.23 b	5.87±0.32 b	3.38±0.26 b
	10.0	14.11±1.40 a	25.53±0.72 c	5.34±0.33 c	3.07±0.45 c
	20.0	13.46±0.75 ab	22.29±1.37 e	4.66±0.57 d	2.88±0.34 cd

续表 1

处理	浓度	株高	根长	根鲜重	株鲜重
Treatment	Concentration/(g·L ⁻¹)	Plant height/cm	Root length/cm	Root fresh weight/g	Plant fresh weight/g
茎叶喷施 Foliage spraying	CK	11.39 ± 0.78 d	19.26 ± 1.13 e	3.95 ± 0.25 c	2.19 ± 0.37 e
	2.5	12.69 ± 0.57 ab	22.89 ± 0.60 c	4.43 ± 0.38 b	2.75 ± 0.36 bc
	5.0	13.37 ± 0.93 a	26.50 ± 0.80 a	6.05 ± 0.41 a	3.24 ± 0.19 a
	7.5	13.06 ± 0.50 a	24.17 ± 0.49 b	5.36 ± 0.27 a	3.01 ± 0.29 ab
	10.0	12.30 ± 0.79 bc	23.63 ± 0.96 bc	4.87 ± 0.28 b	2.63 ± 0.27 cd
	20.0	11.70 ± 0.85 cd	21.19 ± 1.04 d	4.56 ± 0.42 b	2.42 ± 0.26 de

表中小写字母代表 5% 显著水平,下同。
The lowercase indicate the difference at 5% level, the same below.

2.2 青霉菌发酵液对大豆根系活力的影响

青霉菌发酵液浸种处理和茎叶处理都能提高大豆幼苗的根系活力,且效果显著(图 1 和 2),各处理均明显高于对照,随着发酵液浓度的增加,根系活力先升高后降低,在浓度为 5.0 g·L⁻¹时发酵液浸种和茎叶处理对大豆幼苗叶片根系活力影响达到最大值,根系活力分别提高了 37.18% 和 57.82%。

2.3 青霉菌发酵液对大豆叶绿素含量的影响

发酵液浸种处理和茎叶处理对大豆叶片叶绿素含量有较大影响,处理后大豆幼苗的叶绿素含量增加明显(图 3 和 4),且随着浓度的增加呈先升高后降低的趋势,当浓度为 5.0 g·L⁻¹时叶绿素含量达到最大值。发酵液浸种处理和茎叶处理后,大豆叶绿素含量分别提高了 41.25% 和 15.4%。

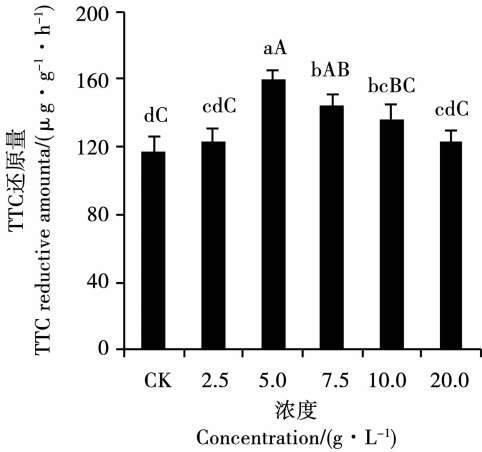


图 1 发酵液浸种处理对大豆根系活力影响
Fig. 1 Effects of seed soaking with fermentation liquid on root activity of soybean

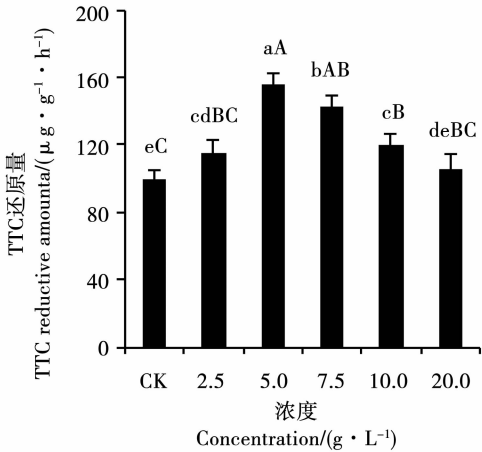


图 2 发酵液茎叶处理对大豆根系活力影响
Fig. 2 Effects of foliage spraying with fermentation liquid on root activity of soybean

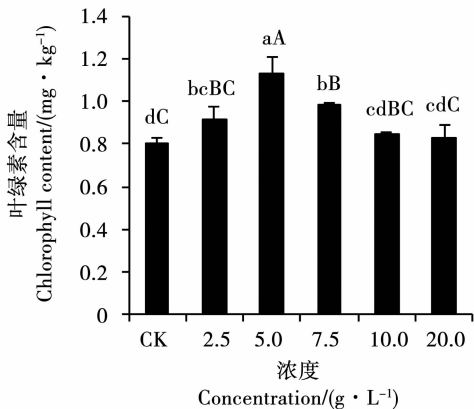


图 3 发酵液浸种处理对大豆叶绿素含量影响
Fig. 3 Effects of seed soaking with fermentation liquid on chlorophyll contert of soybean

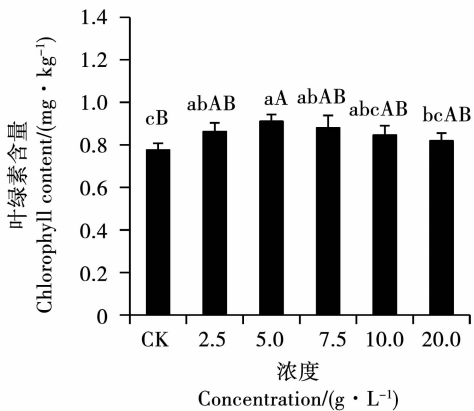


图 4 发酵液茎叶处理对大豆叶绿素含量影响
Fig. 4 Effects of foliage spraying with fermentation liquid on chlorophyll content of soybean

2.4 青霉菌发酵液对大豆过氧化物酶活力的影响

青霉菌发酵液浸种处理和茎叶处理都能够提高大豆叶片 POD 活力,且效果显著(图 5 和 6),各处理均明显高于对照,POD 活力随着发酵液浓度的增加先升高后逐渐降低,在浓度为 5.0 g·L⁻¹时发酵液浸种和茎叶处理对大豆幼苗叶片 POD 活力影响达到最大值,分别提高了 31.33% 和 29.95%。

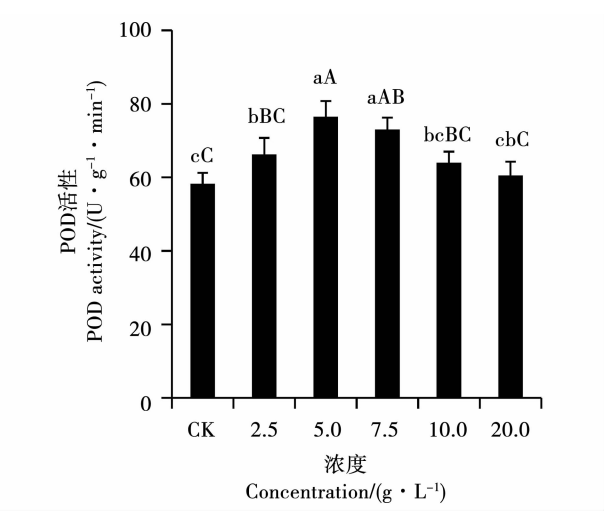


图 5 发酵液浸种处理对大豆 POD 活性影响
Fig. 5 Effects of seed soaking with fermentation liquid on POD activity of soybean

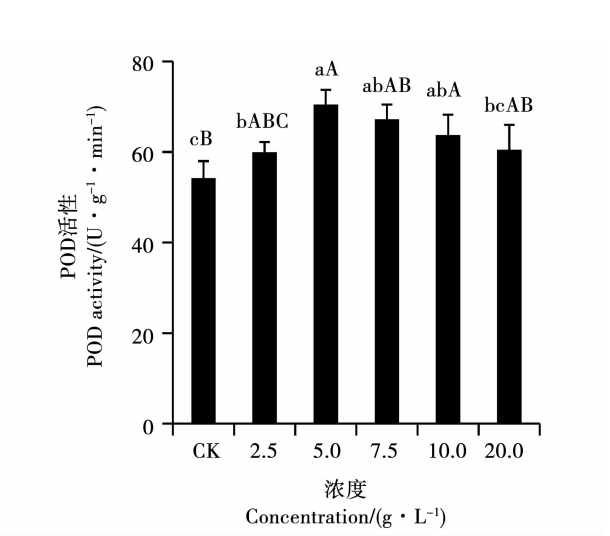


图 6 发酵液茎叶处理对大豆 POD 活性影响
Fig. 6 Effects of foliage spraying with fermentation liquid on POD activity of soybean

2.5 青霉菌发酵液对大豆超氧化物歧化酶活力的影响

青霉菌发酵液浸种处理和茎叶处理能够明显提高大豆叶片 SOD 活力,且效果显著(图 7 和 8),各处理均明显高于对照,在 2.5 ~ 5.0 g·L⁻¹浓度范围内 SOD 活力随着发酵液浓度的增加逐渐升高,在

5.0 ~ 20.0 g·L⁻¹浓度范围内 SOD 活力变化随着发酵液浓度的增加逐渐降低,在浓度为 5.0 g·L⁻¹时发酵液浸种和茎叶处理对大豆幼苗叶片 SOD 活力影响达到最大值,分别提高了 12.2% 和 11.7%。

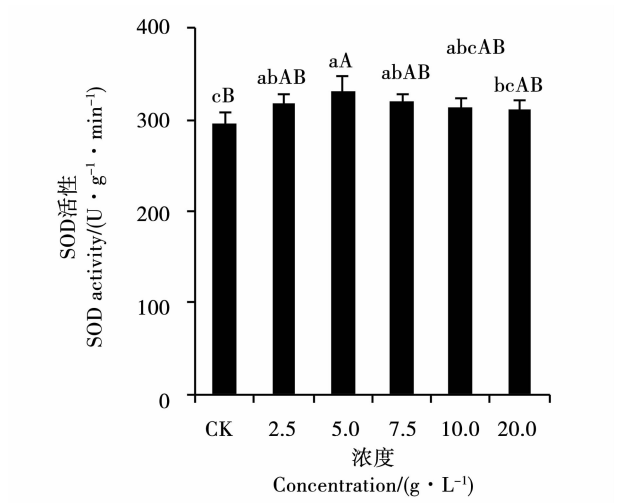


图 7 发酵液浸种处理对大豆 SOD 活性影响
Fig. 7 Effects of seed soaking with fermentation liquid on SOD activity of soybean

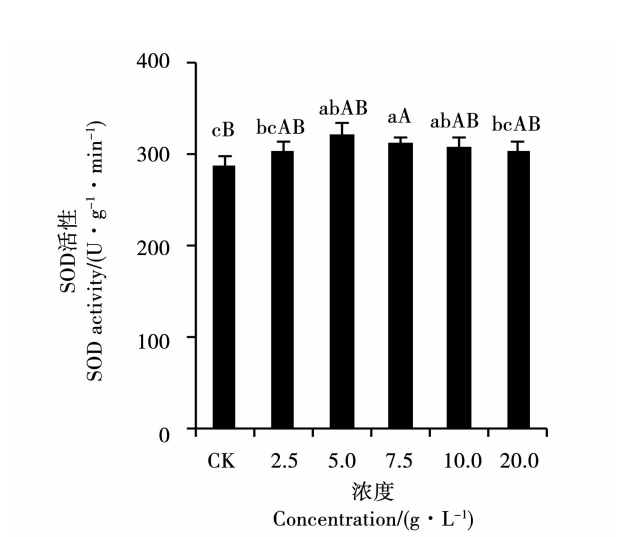


图 8 发酵液茎叶处理对大豆 SOD 活性影响
Fig. 8 Effects of foliage spraying with fermentation liquid on SOD cutivity of soybean

2.6 青霉菌发酵液对大豆过氧化氢酶活力的影响

青霉菌发酵液浸种处理和茎叶处理能够明显提高大豆叶片 CAT 活力,且效果显著(图 9 和 10),在 2.5 ~ 5.0 g·L⁻¹浓度范围内 CAT 活力随着发酵液浓度的增加逐渐升高,在 5.0 ~ 20.0 g·L⁻¹浓度范围内 CAT 活力变化随着发酵液浓度的增加逐渐降低,在浓度为 5.0 g·L⁻¹时发酵液浸种和茎叶处理对大豆幼苗叶片 CAT 活力影响达到最大值,分别提高了 42.8% 和 20.0%。

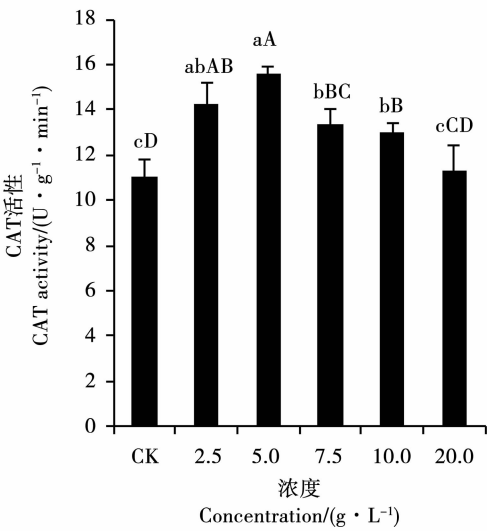


图9 发酵液浸种处理对大豆CAT活性影响
Fig. 9 Effects of seed soaking with fermentation liquid on CAT activity of soybean

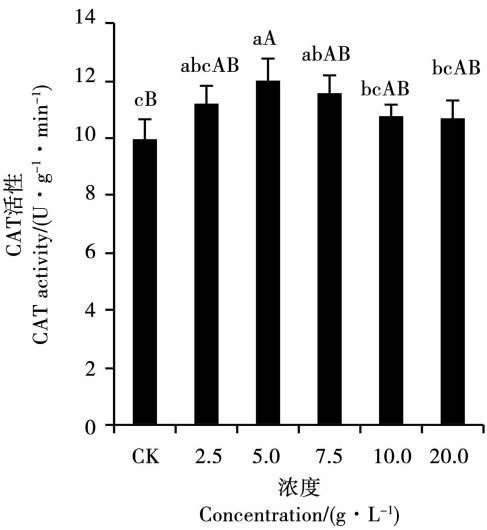


图10 发酵液茎叶处理对大豆CAT活性影响
Fig. 10 Effects of foliage spraying with fermentation liquid on CAT of soybean

3 结论与讨论

作为我国重要的经济作物,大豆产量的提高将对我国经济发展具有重要的作用。大豆幼苗生长的好坏是大豆产量高低的体现,幼苗优质和强壮可以提高大豆的产量,POD、SOD、CAT都是防御酶,这些酶活性的提高能够提高抗逆能力。所以该青霉菌发酵液可以作为一种能诱导大豆幼苗抗逆能力增强的生物农药进行研究,这将对今后提高大豆产量具有重要意义。

目前生物农药中发展较为迅速的主要是微生物农药,这类生物农药主要是能够用来杀虫、灭菌、除草以及调节植物生长的微生物的活体或者是代

谢产物^[11]。在自然界中,微生物资源丰富,繁殖力极强且遗传变异性极高,因此,微生物农药具有良好的未来发展方向,成为生物农药研究的主体^[12]。而且与化学农药相比,不仅对病、虫、草害具有良好的防治效果,同时具有安全、环保、无残留、加工工艺简单的特点,可以直接利用可再生的农副资源生长二次加工,并且可以采用现代生物技术手段对产生菌及其发酵工艺进行改造,改进微生物农药的性能和品质,从而简化加工工艺和降低加工成本,所以微生物农药成为首选生物农药类型^[13]。苏云金芽孢杆菌是国内外研究最深入、应用范围最广的一种微生物农药,它是一类具有较强杀虫作用的微生物^[14],根据其生物学特性已制成多种制剂,广泛应用于农业生产中。我国微生物农药研究主要集中在杀虫剂和杀菌剂上,对植物生长促生菌的研究较少,而且研究内容多在试验条件下,难以推广。李明等^[15]研究发现多种霉菌的代谢产物中含有大量的糖类、多肽等物质,不仅可以促进种子的萌发和幼苗的生长,还能提高幼苗内源激素水平。林茂松等^[16]发现淡紫拟青霉发酵液的蛋白组分,可以促进植物的代谢,调节植物的生长。本试验研究的青霉菌来源于土壤,经过多年筛选而得,对环境不带来二次污染问题,安全、便捷,因此,在农业生产中应用此青霉菌发酵液具有较强的可行性。

本试验利用青霉菌代谢产物,研究结果表明,发酵液具有较强的活性,在发酵液浸种和茎叶处理后,大豆幼苗的生长发生了明显的变化。在适宜浓度的发酵液处理下,大豆幼苗生长表现出明显优势,根系吸收矿物质元素的能力、根脱氢酶能力和组织内部的运输能力都得到了明显的提高,处理后大豆的株高、根长、株鲜重和根鲜重均明显得到了提高,不同浓度处理间具有明显差异,在发酵液浓度为5.0 g · L⁻¹时,效果最佳。尤其是对根鲜重的影响,促进率最高可达56.21%,同时增强了幼苗根系活力,最大可以提高57.82%,浸种和茎叶处理后,分别提高了叶绿素含量41.25%和15.4%;超氧化物歧化酶活性12.2%和11.7%;过氧化物酶31.33%和29.95%;过氧化氢酶活性42.8%和20.0%,这为发酵液在大豆田推广应用、提高大豆产量提供了重要理论依据。

参考文献

[1] 祖永平, 徐玲莉, 焦梓洲, 等. 生健剂对玉米幼苗生长及生理特性的影响[J]. 作物杂志, 2014(1): 85-88. (Zhu Y P, Xu L L, Jiao Z Z, et al. The influence of growth agent to the physiological characteristics of maize seedlings[J]. Crops, 2014(1): 85-

88.)

[2] Brar S K, Verma M, Tyagi R D, et al. Concurrent degradation of dimethyl phthalate (DMP) during production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 171(1): 1016-1023.

[3] 王珂, 韩广泉, 候红燕, 等. 我国生物农药发展探讨[J]. 现代农业科技, 2015(2): 149-150. (Wang K, Han G Q, Hou H Y, et al. Biological pesticide development in our country [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2015 (2): 149-150.)

[4] 邱德文. 生物农药及植物免疫诱抗剂的现状趋势[J]. 农资与市场·营销版, 2014(1): 22-26. (Qiu D W. The status of biological pesticide and plant immune induced resistant agent [J]. Agricultural Materials and Market·Marketing, 2014(1): 22-26.)

[5] Guijarro B, Melgarejo P, Torres R, et al. Effects of different biological formulations of *Penicillium frequentans* on brown rot of peaches [J]. Biological Control, 2007, 42(1): 86-96.

[6] 杨秀芳, 徐小娜, 张弘弛, 等. 无花果植物内生真菌 FS11 次生代谢产物化学成分的分与鉴定 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(6): 1369-1371. (Yang X F, Xu X N, Zhang H C, et al. Isolation and identification of the secondary metabolites from endophytic fungi *Ficus carica* of FS11 [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2012, 23(6): 1369-1371.)

[7] 白宝璋, 金锦子, 白崧, 等. 玉米根系活力 TTC 测定法的改良 [J]. 玉米科学, 1994, 2(4): 45-47. (Bai B Z, Jin J Z, Bai S, et al. Improvement of TTC method determining root activity in corn [J]. Maize Science, 1994, 2(4): 45-47.)

[8] 胡丽可, 胡袁亮, 胡咏梅, 等. 连作辣椒大棚施用 5406 抗生素肥的效果 [J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(3): 61-65. (Hu L, Hu Y L, Hu Y M, et al. Effects of 5406 antibiotic fertilizer on greenhouse of continuous cropping *Capsicum annuum* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2016, 35(3): 61-65.)

[9] 郝再彬, 苍晶, 徐仲. 植物生理实验技术 [M]. 哈尔滨: 哈尔滨出版社, 2002. (Hao Z B, Cang J, Xu Z. Plant physiology experiment technology [M]. Harbin: Harbin Press, 2002.)

[10] 李得孝, 郭月霞, 员海燕, 等. 玉米叶绿素含量测定方法研究 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(6): 153-155. (Li D X, Guo Y X, Yuan H Y, et al. Determined methods of chlorophyll from maize [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(6): 153-155.)

[11] 袁兵兵, 张海青, 陈静. 微生物农药研究进展 [J]. 山东轻工业学院学报, 2010, 24(1): 46-49. (Yuan B B, Zhang H Q, Chen J. Research advance on microbial pesticide [J]. Journal of Shandong Institute of Light Industry, 2010, 24(1): 46-49.)

[12] 宋仲容, 高志强, 何家洪, 等. 农药研究现状及应用评述 [J]. 农机化研究, 2007(7): 10-13. (Song Z R, Gao Z Q, He J H, et al. A review of researching present situation and application of pesticides [J]. Journal of Agricultural Mechanization, 2007 (7): 10-13.)

[13] 张兴, 马志卿, 李广泽, 等. 生物农药评述 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(2): 142-147. (Zhang X, Ma Z Q, Li G Y, et al. A review of biopesticide [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 2002, 30(2): 142-147.)

[14] Kaaya G P, Hassan S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control [J]. Experimental & Applied Acarology, 2000, 24(12): 913-926.

[15] 李明, 马启全, 赵洪军, 等. 微生物源抗逆剂对玉米根系内源激素含量影响 [J]. 黑龙江农业科学, 2012(8): 47-49. (Li M, Ma Q Q, Zhao H J, et al. Effect of micro-derived hardiness agent on endogenous hormones content in maize roots [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2012(8): 47-49.)

[16] 林茂松, 沈纪冬, 文玲, 等. 淡紫拟青霉代谢产物生物测定和生理活性物质分析 [J]. 江苏农业学报, 1999, 15(4): 226-228. (Lin M S, Shen J D, Wen L, et al. Bioassay of physiological activities of metabolic product of *Paecilomyces lilacinus* [J]. Journal of Jiangsu Agricultural, 1999, 15(4): 226-228.)