

林志伟,孙冬梅,迟 丽. 黄绿木霉菌发酵液对水稻防御酶的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):121-123.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.041

黄绿木霉菌发酵液对水稻防御酶的影响

林志伟¹, 孙冬梅¹, 迟 丽²

(1. 黑龙江八一农垦大学, 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 161000)

摘要:以黄绿木霉菌在马铃薯几丁质营养液中培养 96 h 获得的发酵滤液为试验药剂,进行室内稻瘟病菌孢悬液人工接种与防治处理,测定水稻植株各防御性关键酶的变化规律,研究黄绿木霉菌发酵液对水稻植株抗病性的诱导能力。结果表明,喷施发酵液的水稻植株,稻瘟病病斑比对照减小;不同处理间水稻植株酶活性变化不同,喷施发酵液并接种病菌的水稻植株各种防御酶活性峰值出现较早,接种 12 h,多酚氧化酶(PPO)含量是对照的 4 倍,苯丙氨酸解氨酶(PAL)含量比对照高 25%,绿原酸含量比对照高 60%;接种 48 h,过氧化物酶(POD)含量是对照的 8 倍。黄绿木霉菌几丁质发酵液具有抗御稻瘟病菌侵染和提高防御酶活性的作用。

关键词:黄绿木霉菌;几丁质;稻瘟病;防御酶;多酚氧化酶;苯丙氨酸解氨酶;过氧化物酶

中图分类号:S435.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)01-0121-03

几丁寡糖为功能型低聚糖,水溶性好且易被分散吸收,具有多种生理和生物学功能,尤其是可提高植物对病原菌的抵抗能力,启动和激发植物的防御系统^[1],目前已被广泛应用到农业生产领域^[2]。几丁寡糖可由几丁质通过酸解法、氧化法和酶解法降解产生^[3]。传统化学方法降解几丁质的反应条件难以控制,反应稳定性和重复性较差,易造成环境污染。利用生物发酵技术降解几丁质成为当前研究热点,至今,已发现包括细菌、真菌和植物^[4]在内的许多生物能产生几丁质降解酶。黄绿木霉菌(*Trichodema aureoviride*)对几丁质有较好

的降解能力^[5],对水稻纹枯病菌[*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk]、稻瘟病菌(*Pyricularia grisea*)、核盘菌[*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary]等有良好的应用潜能^[6-8]。有研究表明,微生物代谢产生的几丁寡糖可以诱导植物提高抗病能力^[9-12],但有关黄绿木霉菌代谢产物诱导抗病能力的产生还未见报道。研究黄绿木霉菌在含几丁质营养液中发酵所得滤液对水稻植株防御酶系的影响,探索黄绿木霉菌发酵几丁质产生几丁寡糖的利用途径,明确黄绿木霉菌防病作用机理,对开拓植物病害的生物防治资源具有重要意义。

收稿日期:2014-03-31

基金项目:黑龙江省齐齐哈尔市科技计划(编号:NYGG2010-09)。

作者简介:林志伟(1970—),男,黑龙江勃利人,硕士,副教授,主要从事植物病虫害综合防治技术研究。Tel:(0459)6819182;E-mail:lwzsdm@sohu.com。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌种黄绿木霉菌 T4、水稻稻瘟病菌 ZD1,由黑龙江八一农垦大学植物保护系提供;试验水稻品种为垦鉴稻 5 号,

[6] Larena I, Sabuquillo P, Melgarejo P, et al. Biocontrol of fusarium and verticillium wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under green house and field conditions[J]. Phytopathology, 2003, 151(9): 507-512.

[7] 肖松华, 刘剑光, 吴巧娟, 等. 高品质抗黄萎病棉花新种质的培育[J]. 中国棉花, 2007, 34(1): 12-14.

[8] 汪 敏, 焦 睿, 邢小萍, 等. 棉花黄萎病菌致病的分子机理[J]. 棉花学报, 2011, 23(3): 272-278.

[9] 张桂寅, 吴立强, 李志坤, 等. 不同抗性品种对棉花黄萎病菌致病力的影响[J]. 棉花学报, 2012, 24(6): 529-534.

[10] Oktay E, Kemal B. Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions[J]. Biological Control, 2010, 53(1): 39-45.

[11] Xiao C L, Subbarao K V. Relationships between *Verticillium dahliae* inoculum density and wilt incidence severity, and growth of cauliflower[J]. Phytopathology, 1998, 88(10): 1108-1115.

[12] 李 斌. 烟草黑胫病菌拮抗放线菌的筛选[J]. 西南农业学报, 2012, 25(5): 1708-1713.

[13] Jian G L, Ma C, Zhang C L, et al. Advances in cotton breeding for resistance to *Fusarium* and *Verticillium* wilt in the last fifty years in

China[J]. Agricultural Sciences in China, 2003, 2(3): 280-288.

[14] 张冬冬, 李术娜, 郭晓军, 等. 一株棉花黄萎病拮抗芽孢细菌的分离鉴定及活性检测[J]. 棉花学报, 2012, 24(4): 358-362.

[15] 马 平, 李社增, 陈新华. 利用拮抗细菌防治棉花黄萎病[J]. 沈阳农业大学学报, 1999, 30(3): 390.

[16] 夏正俊, 顾本康, 吴嵩民, 等. 棉株植物内生菌诱导棉花抗黄萎病过程中同工酶活性的变化[J]. 江苏农业学报, 1997, 13(2): 36-38.

[17] 宋晓妍, 陈秀兰, 孙彩云, 等. 棉花黄萎病菌拮抗木霉的筛选及其抑菌机制的研究[J]. 山东大学学报: 理学版, 2005, 40(6): 98-102.

[18] 李社增, 鹿秀云, 马 平, 等. 防治棉花黄萎病的生防细菌 NCD-2 的田间效果评价及其鉴定[J]. 植物病理学报, 2005, 35(5): 451-455.

[19] 宋 春. 原生质体融合提高放线菌对枯、黄萎病的防治作用[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.

[20] 刘大群, 杨文香, 祁碧菽, 等. 拮抗链霉菌 Men-myc-93-63 及其发酵液对棉花黄萎病菌生长的影响[J]. 河北农业大学学报, 1999, 22(4): 79-82.

由黑龙江八一农垦大学农学院水稻中心提供。改良马铃薯几丁质发酵培养液为:马铃薯 200 g、葡萄糖 5 g、 K_2HPO_4 0.7 g、 KH_2PO_4 0.3 g、KCl 0.01 g、 $FeSO_4$ 0.01 g、 $MgSO_4$ 0.5 g、胶态几丁质 8 g,用蒸馏水定容至 1 000 mL,分装于 500 mL 三角瓶中。

1.2 试验方法

1.2.1 黄绿木霉菌的发酵培养及发酵滤液获得 将孢子浓度为 2.5×10^7 个/mL 的黄绿木霉菌孢子悬液,接种于改良马铃薯几丁质培养液中,28 ℃、120 r/min 恒温振荡培养 4 d;过滤除去菌体,即得木霉菌几丁质发酵滤液。

1.2.2 水稻植株栽培与处理方法 将垦鉴稻 5 号秧苗移栽于直径 25 cm、高 20 cm 的花盆中,按三角位置每盆插栽 3 穴,1 株/穴;每日观察花盆内水量,适当补水,保证水稻正常生长至孕穗期;在水稻孕穗期进行喷雾接种。试验设喷施发酵滤液不接种稻瘟病菌孢子悬液、喷施清水并接种稻瘟病菌孢子悬液、喷施发酵滤液 2 h 后接种稻瘟病菌孢子悬液、喷施清水不接种稻瘟病菌孢子悬液为空白对照共 4 个处理,接种稻瘟病菌孢子悬液浓度为 1.6×10^8 个/mL,于 16:00—17:00,使

用手执式喷雾器在水稻植株上方均匀喷雾;分别将每盆水稻用有机玻璃罩保湿 36 h,除去有机罩,每日观察水稻叶片病斑出现情况;处理结束后 12、24、48、72、96、122、144 h,剪取水稻最上部 2 张叶片,立即用天平称质量,并按文献[13]方法测定水稻叶片过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)及绿原酸等指标。

2 结果与分析

2.1 黄绿木霉菌几丁质发酵滤液对水稻稻瘟病的控制作用 试验结果表明,在水稻植株接种稻瘟病菌并保湿,各水稻植株叶片上均有稻瘟病病斑出现,病斑出现的时间和病斑数量没有差别,病斑均为典型的稻瘟病急性病斑,病斑较小;喷施发酵滤液的植株,稻瘟病病斑周围的黄色晕圈不明显,而只接种病原菌的水稻叶片,病斑周围有明显的黄色晕圈,病斑向两端延伸明显(表 1)。经发酵滤液处理的水稻叶片发病程度减轻,一定程度上抑制了病原菌生长,限制了病原菌对水稻叶片的危害。

表 1 喷施黄绿木霉菌几丁质发酵液对稻瘟病斑的影响

| 处理 | 病斑长直径 (mm) | 病斑短直径 (mm) | 黄晕宽度 (mm) |
|----------------------|---------------|---------------|--------------|
| 喷施清水并接种稻瘟病孢子悬液 | 3.62a | 0.84a | 0.45a |
| 喷施发酵液 2 h 后接种稻瘟病孢子悬液 | 1.12b | 0.65a | 0.12b |

2.2 黄绿木霉菌几丁质发酵滤液对水稻抗病关键酶活性的影响

2.2.1 过氧化物酶的活性变化 植物体内过氧化物酶活性与植物抗病性呈正相关^[14]。试验结果表明,未喷施发酵滤液而接种稻瘟病菌的水稻新叶,POD 酶在接种 12~72 h 内与对照在同一水平范围波动,72 h 后发生变化,96 h 时 POD 酶活性大幅跃升,并在 96~144 h 维持一个较高水平;喷施发酵滤液后接种病菌的水稻植株,叶片 POD 酶活性在 12~48 h 内提高幅度很大,24 h 时 POD 酶活性是对照的近 7 倍,48 h 达到近 8 倍水平,48 h 后开始下降,但叶片酶活水平仍略高于对照(图 1)。这是由于病原菌侵染水稻植株叶片后,水稻植株对病原菌产生了抗逆反应^[15],施用发酵滤液,在一定程度上使叶片 POD 酶活性提高且抗逆反应提前,有利于保护植物免受病原菌进一步侵染^[16]。

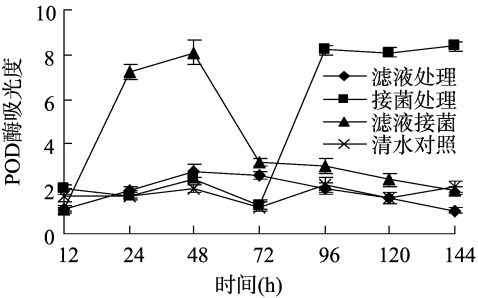


图1 水稻叶片POD酶活的变化趋势

2.2.2 多酚氧化酶的活性变化 PPO 是一类广泛分布于植物体内能催化多酚类氧化成醌类的质体金属酶,其活性提高有助于提高植物的抗病性^[17-18],对病原菌侵染起到一定限制

作用。试验结果表明,仅接种稻瘟病病菌的水稻叶片,12 h 时 PPO 酶活性几乎为 0,48 h 达到最高值,后逐渐下降;清水对照组,水稻叶片 PPO 酶活性在 12~144 h 较低,而仅喷施滤液的叶片,PPO 酶活性在 12 h 有显著提高,并持续至 72 h,72~144 h 后稍有下降,但仍高于清水对照组(图 2),这说明喷施滤液可提高植物的抗病性。

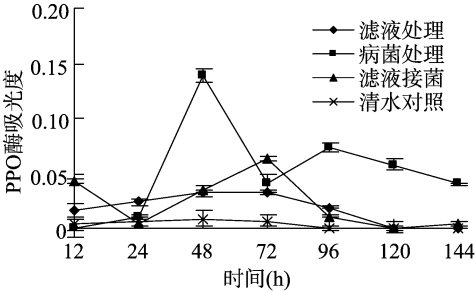


图2 水稻叶片PPO酶活的变化趋势

2.2.3 苯丙氨酸解氨酶的活性变化 PAL 是植保素、木质素和酚类化合物合成的关键酶,与系统获得抗性表现存在相关性。试验结果表明,不同处理水稻叶片,在 PAL 酶活达到高峰后均呈逐渐下降趋势;PAL 初期变化趋势与 PPO 相似,12 h 时,各处理水稻叶片 PAL 表现出明显差异,仅喷施滤液和喷施滤液 2 h 后接种的水稻叶片,其 PAL 酶活性比清水对照和只接种病菌分别高 25% 和 10%;仅接种病菌的水稻叶片,其 PAL 活性在接种 120 h 后有所升高(图 3)。这进一步表明,喷施滤液对植株抗病性的提高有促进作用。

2.2.4 绿原酸的活性变化 绿原酸能够清除自由基,具有抑制 IAA 氧化酶对植物生长素的破坏^[19],在植物抗病方面起着

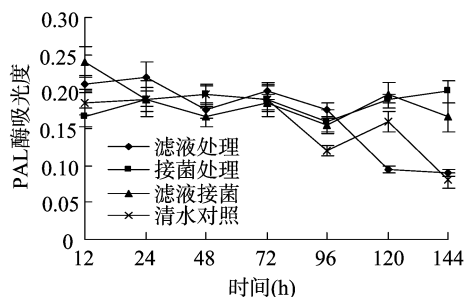


图3 水稻叶片 PAL 酶活的变化趋势

特殊作用。由图 4 可见,仅喷施发酵滤液,12 h 时叶片绿原酸含量显著高于清水对照,高出 60% 以上;只接种稻瘟病菌的水稻叶片,绿原酸含量在 144 h 达到最高值,此时,仅喷施发酵滤液的叶片,其绿原酸含量与清水对照相近。

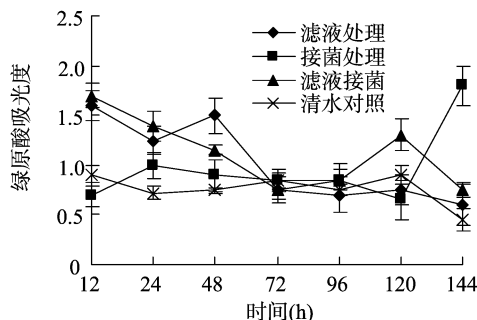


图4 水稻叶片绿原酸含量的变化趋势

3 结论

过氧化物酶是植物体内普遍存在且活性较高的一种酶,是植物体内的保护酶之一,可以清除细胞内的 H_2O_2 ,与植物呼吸作用、光合作用、生长素氧化及木质素形成等有关,其活性可以反映某一时期植物体内的代谢及抗性变化^[14]。苯丙氨酸解氨酶是植物体内苯丙烷代谢途径的关键酶,其活性高低控制着植物体内多种次生酚类化合物、类黄酮植保素、木质素等抗菌物质的合成,在植物次生代谢和抗病代谢中具有重要的作用^[20-21]。多酚氧化酶是一类广泛存在于植物体内的含铜金属酶类,与作物的褐化有关,可以提高植物对病原菌的抗性^[22-23]。本研究结果表明,当水稻叶片受稻瘟病菌胁迫后,黄绿木霉菌几丁质发酵滤液能够诱导激活水稻叶片内 PAL、PPO、POD 等几种抗病关键酶的活性,使酶活力有所提高,且叶片内绿原酸含量也得到显著提高。黄绿木霉菌几丁质发酵滤液对稻瘟病具有一定的防治作用。

参考文献:

- [1] van der Holst P P G, Schlaman H R M, Spaink H P. Proteins involved in the production and perception of oligosaccharides in relation to plant and animal development[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2001, 11(5): 608-616.
- [2] 王 扬, 姜永江, 杨文鸽. 酶法制备几丁寡糖和壳寡糖研究现状与进展[J]. 东海海洋, 2001, 19(4): 40-45.

- [3] 乔兴忠, 李永娟, 汤熙翔. 发酵法产酶生产几丁寡糖的工艺研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2010, 49(2): 251-255.
- [4] 竺国芳, 赵鲁杭. 几丁寡糖和壳寡糖的研究进展[J]. 中国海洋药物, 2000, 19(1): 43-46.
- [5] 林志伟, 张海燕, 孙冬梅, 等. 黄绿木霉菌菌株几丁质酶发酵条件的研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(9): 5043-5044.
- [6] 林志伟, 靳学慧. 四种木霉菌对稻瘟病菌作用能力的比较研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2006, 18(4): 8-12.
- [7] 孙冬梅, 林志伟. 黄绿木霉发酵液对水稻纹枯病菌作用的研究[J]. 植物保护, 2009, 35(4): 83-86.
- [8] 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.
- [9] 戚益平, 何逸建, 许煜泉. 根际细菌诱导的植物系统抗性[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(3): 273-278.
- [10] 王淑霞, 张丽萍, 黄亚丽, 等. 哈茨木霉 Tr-92 诱导黄瓜对灰霉病系统抗性的研究[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(2): 242-247.
- [11] 黄艳青, 庄敬华, 高增贵, 等. 木霉菌诱导甜瓜抗枯萎病相关防御反应酶系的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(5): 546-549.
- [12] Olson H A, Benson D M. Induced systemic resistance and the role of binucleate *Rhizoctonia* and *Trichoderma hamatum* 382 in biocontrol of botrytis blight in geranium[J]. Biological Control, 2007, 42(2): 233-241.
- [13] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [14] 葛秀春, 宋凤鸣, 郑 重. 稻瘟菌感染后水稻幼苗活性氧的产生与抗病性的关系[J]. 植物生理学报, 2000, 26(3): 227-231.
- [15] 马国华, 王铨茂. 水稻品种过氧化物酶活性和木质素含量与抗稻瘟病菌的关系[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(4): 264-267.
- [16] 孙万春, 薛高峰, 张 杰, 等. 硅对水稻防御性关键酶活性的影响及其与抗稻瘟病的关系[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(5): 1023-1028.
- [17] 贺立红, 宾金华. 高等植物中的多酚氧化酶[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(4): 340-345.
- [18] 赵伶俐, 范崇辉, 葛 红, 等. 植物多酚氧化酶及其活性特征的研究进展[J]. 西北林学院学报, 2005, 20(3): 156-159.
- [19] 郭秋娟, 金邦荃, 陈和平. 绿原酸生物活性与提取方法的研究进展[J]. 食品工业科技, 2009, 30(8): 346-348.
- [20] 向妙莲, 何永明, 付永琦, 等. 茉莉酸甲酯对水稻白叶枯病的诱导抗性及相关防御酶活性的影响[J]. 植物保护学报, 2013, 40(2): 97-101.
- [21] Latha P, Anand T, Ragupathi N, et al. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and zimmu leaf extract against *Alternaria solani* [J]. Biological Control, 2009, 50(2): 85-93.
- [22] 张智慧, 聂燕芳, 何 磊, 等. 外源茉莉酸甲酯诱导水稻抗瘟性相关防御酶和内源水杨酸的变化[J]. 植物病理学报, 2010, 40(4): 395-403.
- [23] 黄凤莲, 戴良英, 罗 宽. 药剂诱导水稻幼苗抗寒机制研究[J]. 作物学报, 2000, 26(1): 92-97.