

郝蔚,王丽丽,景伟文,等. 接种落叶型黄萎病菌棉株的棉酚和单宁含量与抗病性的关系[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):147-151.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.042

接种落叶型黄萎病菌棉株的棉酚和单宁含量与抗病性的关系

郝蔚¹,王丽丽¹,景伟文²,李克梅¹,陈全家¹,李丹¹,顾爱星¹

(1. 新疆农业大学农学院/新疆自治区高校农林有害生物监测与安防重点实验室,新疆乌鲁木齐 830052;

2. 新疆农业大学化学工程学院,新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:建立了一种改进的棉酚和单宁含量高效液相色谱测定方法,确定该测定方法的优点和适用范围,通过室内用棉花黄萎菌孢子悬浮液对不同抗病性的 12 个棉花品种进行接菌,测定了叶片和根部棉酚和单宁的含量,并与未接菌的对应品种进行比较,研究不同棉花品种棉酚和单宁的含量与对落叶型黄萎病抗病性的关系,并且明确棉株不同组织中棉酚、单宁与品种抗病性的关系。结果表明,对该测定方法分析条件做了改进,试验精密度及重复性好(棉酚 $RSD = 1.06\%$,单宁 $RSD = 1.64\%$),准确度高(回收率为棉酚 $98\% \sim 102\%$,单宁 $98\% \sim 102.3\%$)。经过棉花黄萎病菌的诱导,棉酚含量比未经诱导高;未接菌根部棉酚平均含量比叶部棉酚平均含量高出 8.65% ,而接菌处理则高出 4.56% ;且抗病品种棉酚含量均高于感病品种,棉酚含量与棉花品种相对病情指数呈显著负相关(叶片未接菌 $r = -0.936$,叶片接菌处理 $r = -0.941$,根未接菌 $r = -0.991$,根接菌处理 $r = -0.939$)。未接菌叶部单宁平均含量比根部单宁平均含量高出 6.81% ,而在接菌处理下高出 1.90% 。未接菌的抗病品种叶部和根部的单宁含量均高于感病品种叶部和根部的单宁含量,单宁含量与相对病情指数呈显著负相关(叶片未接菌 $r = -0.992$,根未接菌 $r = -0.988$);而在接菌处理下呈现相反趋势,单宁含量与相对病情指数呈显著正相关(叶片接菌处理 $r = 0.980$,根接菌处理 $r = 0.874$)。

关键词:棉花;单宁;棉酚;抗病性;黄萎病;高效液相色谱法

中图分类号: S435.621.2⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0147-04

棉花黄萎病是一种土传维管束病害,广泛分布于世界各产棉国,对棉花的生产造成了严重影响。自 20 世纪 90 年代以来,我国棉花黄萎病持续暴发对棉花的危害和产量影响严重。棉花黄萎病(*Verticillium wilt*)被称为棉花“癌症”^[1],在生产中极具毁灭性。1935 年,棉花黄萎病传入中国,并逐渐在 478 个产棉县(市)蔓延^[2]。新疆是我国主要产棉区,近年来黄萎病发生严重^[3]。由于棉花黄萎病菌能够以微菌核的形式长期存活于土壤中,因此防治困难,目前仍无有效的防治方法^[4-5]。当黄萎病菌侵染^[6]棉株,会引起棉株发生一系列生理生化反应^[7-8]。研究表明,黄萎病菌侵染棉花后,毒素作用使得病原菌可以在寄主体内蔓延、扩展,棉花为了抵抗病菌的侵害,自身的生理生化代谢会向着有助于产生抗病物质的方向发展。植物次生代谢是植物在进化过程中对环境适应的结果,植物受到病原菌侵染后,会有小分子的抗性物质,用以增强自身的抵抗力。棉酚和单宁等次级代谢产物对棉花的抗病有一定影响,棉花受病原菌侵染后,体内棉酚和单宁含量明

显增加,因而推测棉酚和单宁对棉花抗病性有一定的作用。

棉花黄萎病一直是我国棉花抗病遗传育种领域植物病理学研究的重点。从棉花生产需求出发,分离并鉴定与棉花抗黄萎病有关的次级代谢产物,探明抗性生理生化机制^[9],不但有利于病理学和棉花遗传育种学的发展完善,而且对创制抗病高产种质、棉花抗病育种工作和提高病害综合防治成效都具有重要的理论和实践意义。

目前对于落叶型黄萎病棉花的次级代谢产物含量与抗病性关系的报道较少,对于次级代谢产物变化规律与抗病程度的关系研究有待深入研究,探明棉花对黄萎病抗性机制,对该病的抗病育种和防治工作具有重要意义。本研究用落叶型黄萎病菌侵染不同抗病性的棉花品种,采用人工接种落叶型黄萎病菌后,在苗期测定叶片和根部棉酚及单宁含量,通过研究棉花黄萎病棉株的棉酚和单宁含量与抗黄萎病性的关系,为棉花黄萎病的抗病性鉴定提供依据。笔者所在课题组根据文献^[10],结合实验室条件对已发表文献报道方法做了一些改进,建立测定棉酚和单宁的方法,使用高效液相色谱法(HPLC)对棉花叶片和根部的次级代谢产物棉酚和单宁进行分离和测定,分析了落叶型黄萎病菌侵染前后棉株体内棉酚和单宁含量的变化,以探讨棉酚和单宁与落叶型黄萎病菌棉花抗病性的关系,以为黄萎病的综合防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试棉花为盆栽棉花(冀 668、辽棉 18 号、新海 13 号、军

收稿日期:2015-01-20

基金项目:新疆研究生科研创新项目(编号:xjau-2013-yjsky-);新疆维吾尔自治区科学技术厅高技术项目(编号:201111117);棉花生物学国家重点实验室开放课题(编号:CB2014A05)。

作者简介:郝蔚(1989—),女,陕西麟游人,硕士研究生,主要从事棉花抗病育种研究。E-mail:982733172@qq.com。

通信作者:顾爱星,博士,副教授,硕士生导师,主要从事作物转基因、微生物资源利用和抗病虫分子克隆的研究。Tel:(0991)8763825;E-mail:guai_xing@sina.com。

海 1 号、新海 30 号、新海 1 号、川 243、大铃棉、硕丰 1 号、108 夫、军棉 1 号、K222)。供试棉花黄萎病菌株为落叶型棉花黄萎病菌 V76(由美国南部平原棉花研究所提供)。

1.2 仪器与试剂

岛津 LC-20AB 型高效液相色谱仪,SPD-M20A 检测器,色谱柱:C₁₈柱(5 μm,4.6 mm×150 mm),超声清洗器,振荡器,离心机,粉碎机。

棉酚标准样品购自 Sigma 公司(95%,规格 20 mg),单宁标准样品购自 Sigma 公司(95%,规格 20 mg),丙酮(天津市光复科技发展有限公司),甲醇(天津市光复科技发展有限公司),无水乙醇(天津市光复科技发展有限公司),以上均为分析纯;甲醇(色谱纯);磷酸(优级纯)。

1.3 方法

1.3.1 样品的处理 称取棉株的不同组织,粉碎并过 40 目筛,取样品 0.1 g 左右(精确至 0.000 1 g)置于 100 mL 容量瓶中,以 70% 丙酮稀释定容到 50 mL,振荡溶解后静置 1 h,放超声清洗器中 30 min,静置片刻,取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,测定棉酚时进样 10 μL。

取棉株的不同组织,粉碎并过 40 目筛,取样品 0.1 g 左右(精确至 0.000 1 g)加入提取剂(丙酮水 1:1 溶液 60 mL),置于超声清洗器中 30 min,取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,测定单宁时进样 10 μL。

1.3.2 色谱条件 棉酚色谱柱 C₁₈柱(5 μm,4.6×150 mm),柱温 25 ℃,流动相为甲醇-体积分数 1% 磷酸溶液(90:10,V/V),流速 1.0 mL/min,检测波长 254 nm,进样量 10 μL。

单宁色谱柱 C₁₈柱(5 μm,4.6×150 mm),柱温 22 ℃,流动相为甲醇和水(体积比 80:20),流速为 0.5 mL/min,检测波长 265 nm,进样量 10 μL。

1.3.3 取叶方法 接菌 15 d 后,棉花表现出明显症状后开始取样,09:00 开始取第 1 张真叶,去除叶脉后剪碎混匀,称取 0.5 g,续取 3 d。每次测定采用随机取样方式,所有指标数据均为 3 次重复。

1.3.4 数据处理 采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行统计分析。计量资料均以“均数±标准偏差($\bar{x} \pm s$)”表示,进行方差分析。各因素之间采用线性回归方程进行相关分析。指标间相关性采用相关系数 *r* 值表示;*P*<0.05 表示有显著性统计学意义。

1.3.5 棉种处理 挑选饱满的棉籽,首先用 75% 乙醇清洗 2 次,每次 35 s,其次用 30% H₂O₂ 浸泡 4~5 h 后,用无菌水摇动清洗 2~3 遍,放入智能培养箱,在无菌水中浸泡催芽 12 h,选露白的棉籽播种于装有灭菌花卉用土的塑料花盆中,每个品种播种 4 个花盆,灭菌土覆盖 2~3 cm 铺平压紧,花盆口覆盖 1 层地膜保湿,每个花盆种植 5 粒种子,播种后将花盆置于托盘内^[11-12],播种后进行常规的温室管理,昼温 30 ℃,夜温 25 ℃,相对湿度 50%,光照各 12 h,第 3 张真叶展平时进行人工接菌。

1.3.5 病原菌的培养及接种方法 菌液的配制在新疆农业大学生物楼制作完成,将落叶型黄萎菌 V76 接入 PDA 液体培养基,放入振荡培养箱使之繁殖生长 72 h 后,3 层灭菌纱布过滤,用显微镜直接计数法计算菌液中孢子含量为 2×10⁶~3×10⁶ 个/mL,4 ℃冷藏备用。

切根蘸菌法:等棉株长到 2~3 张真叶时接菌,剪刀灭菌后剪掉塑料花盆底部^[13-14],并将露出的棉苗须根剪掉 1~3 mm,放入盛有 40 mL 孢子悬液的培养皿中,菌液浓度为 2×10⁶~3×10⁶ 个/mL,放回托盘中,不接菌的以无菌水浸泡作为对照,接菌 40 min 后在托盘中灌满清水,保持高湿状态 48 h,温度 25 ℃。以后常规浇水。

1.3.6 病级分类 0 级:健株,叶片无病状;1 级:有 25% 及以下的叶片表现症状,即叶片出现叶肉变黄或呈现不规则形的黄色病斑;2 级:26%~50% 的叶片表现病状,病斑颜色大部分变为黄色或黄褐色,叶片边缘略有卷枯现象;3 级:51%~75% 的叶片表现病状,少数病叶凋落;4 级:76% 及以上的叶片表现病状,多为褐色掌状枯斑,严重时叶片大量脱落,甚至棉株枯死。病情指数按下列公式计算:病情指数=(Σ各级病叶数×相应病级)/(总叶数×最高病级)×100;相对病情指数=校正系数 *K*×鉴定材料病情指数;校正系数 *K*=50/感病对照品种实际病指,50 为规定感病对照的标准病指。抗病性分级标准详见表 1。

表 1 棉花抗黄萎病分级标准

抗病类型	相对病情指数(%)
I(免疫)	0
HR(高抗)	0.1~10.0
R(抗)	10.1~20.0
T(耐抗)	20.1~35.0
S(感病)	>35.0

2 结果与分析

2.1 方法学评价

2.1.1 重复性测定 选择同一个品种称取 6 份样品各 0.1 g 于具塞离心管中,加入提取单宁和棉酚溶剂,超声-振荡提取后离心,取上清液过滤后进行测定,考察试验的精密度,结果棉酚 *RSD* 为 1.06%(表 2),单宁 *RSD* 为 1.64%(表 3),表明试验的重复性及仪器的精密度良好。

表 2 棉酚 HPLC 法重复性的测定

样品号	棉酚含量(%)
1	5.98
2	5.95
3	5.90
4	5.89
5	5.85
6	5.81
<i>RSD</i> (%)	1.06

表 3 单宁 HPLC 法重复性的测定

样品号	单宁含量(%)
1	5.12
2	5.11
3	5.05
4	5.00
5	4.95
6	4.92
<i>RSD</i> (%)	1.64

2.1.2 回收率试验 称取同一个品种样品 3 份,每份 0.1 g,

按上述确定的条件进行提取和测定,通过峰面积计算出样液中棉酚和单宁的浓度,在提取液中分别加入棉酚和单宁标准液(实际量为 1、2、3 mg/L)进行测定,通过峰面积计算出加标后浓度,计算回收率,所得回收率棉酚为 98% ~ 102%,单宁为 98% ~ 102.3% (表 4、表 5)。

表 4 棉酚回收率的测定 (HPLC)

样液浓度 (mg/L)	标液浓度 (mg/L)	加标后浓度 (mg/L)	回收率 (%)
5.51	1	6.49	98
	2	7.50	100
	3	8.59	102

表 5 单宁回收率的测定 (HPLC)

样液浓度 (mg/L)	标液浓度 (mg/L)	加标后浓度 (mg/L)	回收率 (%)
4.75	1	5.73	98.0
	2	6.74	99.5
	3	7.82	102.3

2.2 不同棉花品种的相对病情指数和抗性级别

可由表 6 可知,抗病材料 3 份,占 25%;耐病材料 5 份,占 41.67%;感病材料 4 份占 33.33%。

2.3 12 个棉花品种的棉酚含量

由表 7 可见,最高抗病性品种是冀 668,最低抗病性品种

表 7 12 个棉花品种棉酚含量

序号	品种	叶片棉酚含量 (%)		根棉酚含量 (%)	
		未接菌处理	接菌处理	未接菌处理	接菌处理
1	冀 668	5.98 ± 0.02a	7.32 ± 0.05a	7.45 ± 0.04a	7.92 ± 0.08a
2	辽棉 18 号	5.76 ± 0.02b	7.21 ± 0.09ab	7.54 ± 0.06ab	7.59 ± 0.02a
3	新海 13 号	5.85 ± 0.01c	7.04 ± 0.11abc	7.32 ± 0.03bc	7.32 ± 0.01b
4	军海 1 号	5.45 ± 0.02d	6.95 ± 0.16bc	7.21 ± 0.1c	7.34 ± 0.04c
5	新海 30 号	5.32 ± 0.02e	6.86 ± 0.16cd	6.98 ± 0.2d	7.19 ± 0.06c
6	新海 1 号	5.33 ± 0.02ef	6.62 ± 0.25de	5.63 ± 0.01e	6.92 ± 0.04d
7	川 243	5.12 ± 0.02f	6.63 ± 0.24e	5.32 ± 0.06f	6.71 ± 0.02e
8	大铃棉	5.01 ± 0.12g	6.42 ± 0.28ef	5.43 ± 0.19g	7.90 ± 0.01f
9	硕丰 1 号	4.98 ± 0.02h	6.49 ± 0.26fg	4.52 ± 0.1h	6.35 ± 0.11g
10	108 夫	5.25 ± 0.05h	6.04 ± 0.07g	4.43 ± 0.04r	6.12 ± 0.10g
11	军棉 1 号	4.65 ± 0.01r	6.50 ± 0.03h	3.67 ± 0.06j	6.34 ± 0.09h
12	K222	4.54 ± 0.05j	5.33 ± 0.1r	3.21 ± 0.09k	5.33 ± 0.10r
平均值		5.27	6.62	5.73	6.92

注:同列数据后不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 12 个棉花品种的单宁含量

由表 8 可见,叶片和根部、未接菌和接菌处理间单宁的含量均存在显著差异 ($P < 0.05$);在未接菌情况下叶部单宁平均含量比根部单宁平均含量高出 6.81%,而在接菌处理下高出 1.90%。接菌后所有品种的单宁含量比接菌前都有所增加。无菌处理的抗病品种单宁含量均高于感病品种,而在接菌处理下趋势相反。

2.5 12 个棉花品种相对病情指数与其不同组织棉酚和单宁含量的关系

无论是在根部还是叶片,在接菌处理和未接菌处理中,棉酚含量与品种的相对病情指数呈负相关。抗病性越差,相对病情指数越高,棉酚的含量越小。在未接菌的叶部和根部,单宁含量与品种的相对病情指数呈负相关,相对病情指数越高,

表 6 不同棉花品种的相对病情指数和抗性级别

编号	品种	相对病情指数	抗性级别
1	冀 668	15.72	R(抗)
2	辽棉 18 号	16.58	R(抗)
3	新海 13 号	18.92	R(抗)
4	军海 1 号	20.19	T(耐)
5	新海 30 号	21.50	T(耐)
6	新海 1 号	29.15	T(耐)
7	川 243	31.18	T(耐)
8	大铃棉	31.63	T(耐)
9	硕丰 1 号	46.26	S(感)
10	108 夫	48.02	S(感)
11	军棉 1 号	50.00	S(感)
12	K222	55.85	S(感)

是 K222。在叶片和根部、未接菌和接菌处理间棉酚的含量均存在显著差异 ($P < 0.05$),在未接菌情况下根部棉酚平均含量比叶部棉酚平均含量高出 8.65%,而在接菌处理下高出 4.56%。抗病品种无论叶部和根部接菌前酚类物质含量均高于感病品种,而且根部的含量高于叶部的含量,接菌后所有品种叶部的酚类物质含量都比接菌前有所增加,抗病性高的品种酚类物质含量显著高于抗病性低的品种,由此表明棉酚含量与品种抗病性有关。

单宁含量越小;而在接菌处理的叶部和根部,单宁含量与品种的相对病情指数呈正相关。

3 讨论

通过查找文献发现,测定棉酚和单宁的方法有紫外分光光度法和液相色谱法,液相色谱法优于紫外分光光度法,故笔者对液相色谱法进行了改进,并用重复性和回收试验进行了方法学评价,棉酚的 RSD 为 1.06%,单宁的 RSD 为 1.64%;棉酚回收率为 98% ~ 102%,单宁的为 98.0% ~ 102.3%。采用高效液相色谱法测定含量,样品处理方法省时简便、取样少、分离效果比较好、结果可靠。本方法对流动相进行了改进,前人用多种试剂作为复合流动相,而本研究都是应用单一试剂,方便快捷,精密度高,结果准确可靠。

表 8 12 个棉花品种单宁含量

序号	品种	叶片单宁含量(%)		根单宁含量(%)	
		未接菌处理	接菌处理	未接菌处理	接菌处理
1	冀 668	5.12 ± 0.03a	5.13 ± 0.05k	4.98 ± 0.11a	5.02 ± 0.07k
2	辽棉 18 号	5.01 ± 0.03a	5.13 ± 0.02k	4.82 ± 0.06a	5.12 ± 0.04j
3	新海 13 号	5.09 ± 0.01b	5.23 ± 0.03j	4.64 ± 0.06b	5.20 ± 0.02r
4	军海 1 号	4.85 ± 0.04c	5.19 ± 0.03r	4.56 ± 0.07bc	5.31 ± 0.03h
5	新海 30 号	4.75 ± 0.02d	5.45 ± 0.01h	4.41 ± 0.12c	5.39 ± 0.04g
6	新海 1 号	4.51 ± 0.02e	5.65 ± 0.03g	4.49 ± 0.04d	5.29 ± 0.10g
7	川 243	4.39 ± 0.02f	5.71 ± 0.03f	4.01 ± 0.11de	5.69 ± 0.02f
8	大铃棉	4.32 ± 0.02g	5.79 ± 0.02e	4.02 ± 0.11e	5.52 ± 0.03e
9	硕丰 1 号	3.74 ± 0.01h	6.01 ± 0.03cd	3.42 ± 0.02f	6.19 ± 0.01cd
10	108 夫	3.64 ± 0.02r	6.00 ± 0.02c	3.32 ± 0.16f	5.01 ± 0.03c
11	军棉 1 号	3.47 ± 0.03j	6.31 ± 0.01b	3.42 ± 0.12g	6.41 ± 0.02b
12	K222	2.98 ± 0.02k	6.83 ± 0.04a	2.65 ± 0.10h	7.01 ± 0.03a
平均值		4.34	5.70	4.06	5.69

注同表 7。

表 9 12 个棉花品种对黄萎病抗病性与其不同组织棉酚和单宁含量的相关性

物质	处理	回归方程	r	P 值
棉酚含量	叶片未接菌	$y = -27.316x + 175.043$	-0.936	0.000
	叶片接菌	$y = -22.763x + 181.720$	-0.941	0.000
	根未接菌	$y = -8.833x + 81.661$	-0.991	0.000
	根接菌	$y = -15.802x + 140.427$	-0.939	0.000
单宁含量	叶片未接菌	$y = -19.814x + 117.049$	-0.992	0.000
	叶片接菌	$y = 25.547x - 114.592$	0.980	0.000
	根未接菌	$y = -18.975x + 108.159$	-0.988	0.000
	根接菌	$y = 17.039x - 64.277$	0.874	0.000

抗病性是由相对病情指数来表达的,相对病情指数越低抗病性越高,相对病情指数越高抗病性越低。无论是在根部还是叶片,在未经黄萎病菌诱导和接菌处理中,棉酚含量与品种的相对病情指数都呈负相关。单宁在未经黄萎病菌诱导时含量与品种的相对病情指数呈负相关,而接菌后单宁含量呈正相关。感病品种单宁含量对落叶型黄萎病菌反应明显,感病品种接菌后,单宁含量激增;无菌处理的抗病品种单宁含量均高于感病品种,而在接菌处理下趋势相反,可能是感病品种启动防卫反应产生大量的单宁。棉酚含量在接菌前后的变化趋势相近,因此苗期不接菌即可测定棉酚含量判定品种(系)抗性的指标,这样可以简化测定步骤,节约测定时间。

本试验测得接菌前后根部棉酚含量高于叶部,可能是因为根部先接触病菌,反应比叶部明显,说明使用根部作为测定次级代谢产物的试验材料更具有代表性。沈其益认为棉根中棉酚的含量高与抗病菌侵入及根内扩展密切相关^[6]。而单宁接菌前后叶部含量高于根部,可能是因为单宁与棉酚诱发部位不同。吕金殿等研究发现在同一品种中,无论是棉酚还是单宁含量,接菌处理均比未接菌的含量高^[15]。本研究得出接菌后的棉酚和单宁含量均有所升高,由此说明病原菌可以刺激植物本身产生小分子的抗性物质,用来增强自身的抵抗力。

棉酚和单宁是棉花植株内重要的次生性物质,对棉花病害表现出较好的抗性。本研究用强致病落叶型黄萎病菌侵染棉花,并在苗期测定棉花单宁的含量,探讨棉花初期强致病力病菌侵染下次级代谢产物的含量与抗病性的关系。

4 结论

抗病品种的棉酚含量均高于感病品种相应组织中的含量,根组织内的含量又高于叶片。接种棉花黄萎病菌叶片或根部棉酚含量比不接菌略有上升,抗病品种增长幅度显著高于感病品种。棉酚含量与棉花品种相对病情指数呈显著负相关。

未接菌抗病品种单宁含量显著高于感病品种,接菌之后呈相反趋势。叶片组织内的含量显著高于根组织。经黄萎病菌侵染后,棉苗组织中单宁含量比未接菌均有显著提高。

参考文献:

[1] 许宗弘. 棉花枯黄萎病研究现状及展望[J]. 知识经济,2010 (16):132.

[2] 马 存. 棉花枯萎病和黄萎病的研究[M]. 北京:中国农业出版社,2007.

[3] 袁立文,胡醒友,何海芬. 棉花黄萎病在石河子棉区发病重的原因分析[J]. 新疆农垦科技,2010(4):35-36.

[4] 简桂良,卢美光,仇家山,等. 棉花黄萎病防治策略[J]. 中国植保导刊,2004,24(4):29-30.

[5] 李凤瑞,史加亮,杨秀凤. 棉花抗黄萎病研究进展及前景展望[J]. 山东农业科学,2009(9):57-59.

[6] 沈其益. 棉花病害——基础研究与防治[M]. 北京:科学出版社,1992.

[7] Mace M E, Stipanovic R D, Bell A A. Toxicity and role of terpenoid phytoalexins in *Verticillium wilt* resistance in cotton[J]. Physiological Plant Pathology,1985,26 (2):209-218.

孙 勇,曹小迎,蒋继宏,等. 华北大黑鳃金龟幼虫肠道菌的分离及对农药的降解[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):151-153.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.043

华北大黑鳃金龟幼虫肠道菌的分离及对农药的降解

孙 勇¹,曹小迎¹,蒋继宏¹,张先道²

(1. 江苏师范大学江苏省药用植物生物技术重点实验室,徐州 221116;2. 江苏师范大学生命科学学院,徐州 221116)

摘要:采用 4 种培养基对金龟幼虫肠道内微生物进行分离培养,并通过 16S rRNA 测序进行初步鉴定,将分离获得的菌株接种于含辛硫磷和毒死蜱的基础盐培养基上,初步测定对肠道内微生物降解农药的能力。结果表明,选用的 4 种培养基中,淀粉-酪素培养基获得的微生物数量最多,羧甲基纤维素钠培养基次之,甘油天门冬氨酸培养基最差。对 13 株有代表性的菌株进行测序分析,初步鉴定这些微生物分属 9 个属,在分离筛选的菌株中随机挑选供试的 28 株菌株中,在以毒死蜱(浓度 100 mg/L)为唯一碳源的基础盐培养基中,能形成菌落的菌株为 8 株,在以辛硫磷为唯一碳源的基础盐培养基中,能形成菌落的菌株为 19 株,表明肠道中有一些微生物对农药有降解作用,其中对辛硫磷降解作用优于毒死蜱,说明在防治华北大黑鳃金龟时,毒死蜱防治效果可能优于辛硫磷。

关键词:华北大黑鳃金龟;肠道微生物;分离;农药降解

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0151-03

我国农药使用技术水平和农药的利用率都比较低,而更多的农药在施用后则进入了土壤、水体和空气中,对非靶标生物和各个生态因子产生了严重影响,最终导致了农产品品质低劣和农药残留超标^[1-2]。长期大量使用农药使害虫产生一定的抗药性,因此要想杀死害虫就得加大药量,害虫的抗药性不断增强,农药使用量不断加大,就会形成恶性循环,环境污染问题日益严重,国家环保局也发布:农药残留污染已被列为环境污染重点治理的工程之一,因此解决农药污染问题势在必行。生活在这些农药环境中的微生物,为了自身生存,与这些污染源一直在进行着斗争,随着时间的推移,它们之间形成了一种协同进化关系,这些微生物具备了降解和利用这些污染源的机制。农药生物修复是利用特定的生物吸收、转化、清除或降解农业生态环境中农药污染,实现农业生态环境净化、生态功能恢复的生物措施。而且已有大量研究表明细菌、真菌、放线菌、藻类等微生物对农药有很好的降解作用^[3-10],它们大多数来自土壤微生物类群。华北大黑鳃金龟为鞘翅目鳃

金龟科昆虫,分布在我国东北、华北、西北等地区,主要危害杨、柳、榆、桑、核桃、苹果、刺槐、栎等林木叶片,幼虫危害阔、针叶树根部及幼苗;幼虫栖息在土壤中,取食萌发的种子,造成缺苗断垄;将根茎、根系咬断,使植株枯死,且伤口易被病菌侵入,引起其他病害发生。华北大黑鳃金龟幼虫生活在土壤中,且长期接触化学农药(辛硫磷和毒死蜱是常见的用来杀灭大黑鳃金龟的化学农药),肠道内可能含有一些能降解农药的微生物,因此我们分离了华北大黑鳃金龟幼虫肠道中微生物,采用 16S rRNA 序列分析进行了初步鉴定,并就农药降解能力进行了初步筛选。

1 材料与方法

1.1 供试材料

华北大黑金龟鳃幼虫:取冬眠期幼虫。

1.2 培养基

TNYE 培养基:酵母膏 0.25 g, K₂HPO₄ 0.5 g, 琼脂 15.0 g, pH 值为 7.2, NaCl 10%, 水 1 L, pH 值 7.2。

淀粉-酪素培养基:葡萄糖 5 g, 可溶性淀粉 5 g, 蛋白胨 2 g, 酵母膏 1 g, CaCO₃ 2 g, 琼脂 15 g, pH 值 7.2, NaCl 10%, 水 1 L, pH 值 7.2。

甘油天门冬氨酸培养基:甘油 10 g, L-天冬氨酸 1 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ 0.1 g, 琼脂 15 g, pH 值 7.2, NaCl 10%, 水

收稿日期:2015-03-26

基金项目:江苏师范大学省药用植物生物技术实验室开放课题(编号:KLBMP1305)。

作者简介:孙 勇(1977—),男,江西高安人,硕士,讲师,从事应用微生物学研究。E-mail:sunyong23@jsnu.edu.cn。

通信作者:蒋继宏,教授。Tel:(0516)83403515;E-mail:jhjiang@jsnu.edu.cn。

[8]刘立新. 科学施肥新思维与实践[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2008.

[9]孔垂华. 21 世纪植物化学生态学前沿领域[J]. 应用生态学报, 2002,13(3):349-353.

[10]景伟文,逄晓南,陈燕勤,等. 棉叶中棉酚的快速提取与测定方法研究[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(4):498-502.

[11]王省芬,马峙英. 一种新的棉花黄萎病抗性鉴定方法[J]. 棉花学报,2002,14(4):231-233.

[12]Bolek Y, Bell A A, El Z M. Reaction of cotton cultivars and an F₂

population to stem inoculation with isolates *Verticillium dahliae*[J]. J Phytopathology, 2005, 15(3):269-273.

[13]彭 珊,吕学莲,高峰,等. 一种新的棉花黄、枯萎病快速接种方法的研究[J]. 棉花学报,2008,20(3):174-178.

[14]马 平, Huang H C, 李社增,等. 一种新的棉花黄萎病快速接种技术及其在病原菌致病力和寄主抗病性鉴定上的应用[J]. 植物病理学报,2004,34(6):536-541.

[15]吕金殿,甘 莉,阎龙飞. 棉花黄萎病菌毒素的纯化与特性研究[J]. 植物病理学报,1991,21(2):129-133.