

崔郑龙,柴秀娟,孔德真,等.棉花枯萎病菌拮抗内生菌的筛选和拮抗效果检测[J].江苏农业科学,2016,44(2):158-163.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.045

棉花枯萎病菌拮抗内生菌的筛选和拮抗效果检测

崔郑龙,柴秀娟,孔德真,王爱英

(石河子大学生命科学学院农业生物技术重点实验室,新疆石河子 832000)

摘要:从甘草、阿魏、苦豆子中筛选出4株对棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporium*)抑制效果较好的内生菌,通过其生理生化检测、16S rDNA序列分析进行鉴定;选择抑菌效果最好的拮抗菌A,分别测定其胞内、胞外分泌物的抑菌效果,并检测该菌株对棉花种子萌发和活性氧酶系统的影响。结果表明,拮抗菌A为解淀粉枯草芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),其胞内分泌物对枯萎病菌菌丝生长、产孢、孢子萌发的平均抑制率均高于胞外分泌物。拮抗菌A处理棉花可提高其成活率,但不引起植株系统诱导抗性。拮抗菌A的主要抑菌物质存在于细胞内,抑制产孢是其主要拮抗途径。

关键词:棉花枯萎病菌;拮抗菌;胞外分泌物;胞内分泌物;抑菌效果

中图分类号: S435.621.2⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0158-06

棉花枯萎病是棉花的主要病害之一,其病原菌为尖孢镰刀菌萎蔫专化型(*Fusarium oxysporium* f. sp. *vasinfectum*)。这种真菌在自然条件下很容易存活,主要通过土壤、种子、肥料进行传播^[1]。长期使用化学药剂控制土传性病害会提高种植成本,加重环境污染。轮作、晒土、深耕等方法虽能减少污染,但很难满足日益增长的生产需求^[2]。通过生物防治方法来控制棉花枯萎病,具有可持续性强、减少环境污染等优点,发展前景广阔。植物内生细菌和维管束中导致植物萎蔫的病原菌有相似的生态位,是生物防治的潜在资源。目前,研究人员已经从甘草^[3]、大蒜^[4]、香蕉^[5]、棉花^[6]、茶树^[7]等上百种植物中分离出具有抑制病原真菌作用的内生菌,但对于拮抗菌抑菌机理的研究仍然处于初步阶段。研究表明,植物内生菌主要通过生态位和营养的竞争、分泌抑菌物质、诱导寄主抗性来抑制植物病原菌生长。有些内生细菌产生的植物激素、磷酸盐、黄酮类物质、抗生素复合物、挥发性有机物可抑制病原菌定植,这也是细菌在植物体内竞争生存空间的一种有效

机制^[8-10]。植物产生化合物的不同将影响植物内生菌群落的差异,植物的防卫反应对其内生菌种群变化具有一定影响,是抵御相关真菌入侵的重要途径之一^[11]。优势菌株繁殖将通过激活植物防御反应,从而影响其他微生物的种群变化。乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)和苦豆子(*Sophora alopecuroides* Linn.)都属于多年生豆科草本植物,阿魏(*Ferula asafoetida*)属于多年生伞形科草本植物。龚明福等和毕江涛等已经分别从苦豆子、甘草中分离出了抑制枯萎病菌的内生菌,但研究较为初步^[12-13]。本研究中的甘草、阿魏、苦豆子采集于新疆维吾尔自治区石河子市。该地区属于半干旱地区,土壤盐碱化较为严重,从中筛选出抑制枯萎病菌的内生菌,选择抑制效果最好的拮抗菌A,分别检测胞外、胞内分泌物的抑菌效果及其对棉花种子萌发的影响,并测定处理后棉花叶片中多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的变化情况,旨在为阐明棉花枯萎病菌抗内生菌的抑菌机制和分离抑菌物质提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料及培养基

采用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(NA)分离纯化植物内生细菌,采用LB培养基富集拮抗菌,采用查氏一号培养基富集培养病原真菌,采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)作为拮抗性试验培养基。供试材料:乌拉尔甘草、阿魏、苦豆子采集

收稿日期:2015-01-19

基金项目:校企合作项目横向课题(编号:0257-5001601)。

作者简介:崔郑龙(1989—),男,硕士研究生,主要从事微生物资源研究。E-mail:1449006648@qq.com。

通信作者:王爱英,硕士,副研究员,主要从事植物基因工程与安全性评价、微生物资源筛选研究。E-mail:way-sh@126.com。

[9]张文斌,安德荣,任向辉.中国小麦黄矮病的发生及综合防控研究进展[J].麦类作物学报,2009,29(2):361-364.

[10]Fabre F,Kervarrec C,Mieuzet L,et al. Improvement of barley yellow dwarf virus-PAV detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods,2003,110(1):51-60.

[11]徐云,木德伟,梅红,等.迪庆青稞黄矮病和介体蚜虫发生规律及防治技术[J].植物保护学报,2003,30(2):219-220.

[12]相建业,冯崇川.小麦黄矮病预测预报[J].植物保护学报,1994(1):73-77.

[13]刘双清.大麦黄矮病毒三种株系的特异性检测及PAV株系的群体遗传变异[D].长沙:湖南农业大学,2008.

[14]杨菲,吴茂森,陈华民,等.我国不同地区麦蚜携带BYDV-GAV比率的差异[J].植物保护,2012,38(2):117-119.

[15]于祥泉.陕西省小麦黄矮病抗病性调查及流行株系检测[D].杨凌:西北农林科技大学,2010.

[16]张秦风,朱象三.关于小麦黄矮病的研究进展[J].陕西农业科学,1995(2):1-4.

[17]刘乾.甘肃省天水市麦蚜发生规律及小麦种植模式对其种群数量的影响[D].兰州:甘肃农业大学,2010.

于石河子大学北区试验田,棉花品种为新陆早 7 号,棉花枯萎病病原菌、棉花种子由石河子大学生命科学学院农业生物技术重点实验室提供。

1.2 植物内生菌的分离

分别选取甘草、阿魏、苦豆子主茎基部向上 10~15 cm 的茎段、向下 10~15 cm 的根段以及健康饱满的叶片,分别用 75% 乙醇浸泡 30 s,1% HgCl_2 浸泡 3 min,无菌水冲洗 4~5 遍,用无菌滤纸吸干水分。将根和茎切成 5 mm 长小段,叶片剪成条状,分别接种在 NA 平板中,每板 5 个,28 ℃ 培养 2~3 d。将生长出的细菌进行纯化培养,保存待用。

1.3 棉花枯萎病拮抗菌的筛选

初筛:将棉花枯萎病病原菌在查氏一号液体培养基中活化培养 3 d,沾取菌体悬浮液接种在 PDA 平板中央,28 ℃ 培养 3 d。挑取分离到的甘草内生菌接种在枯萎病菌菌落的四周,每个平板接种 4 个点,28 ℃ 培养 3~5 d,选取周围有明显抑菌圈的细菌进行复筛。光学显微镜下观察枯萎病菌形态结构变化。复筛:将培养 3 d 的枯萎病菌培养液用 4 层纱布过滤,用显微计数法测定其孢子浓度。在 PDA 平板中加入 200 μL 枯萎病菌的孢子悬液,涂布均匀。平板中间打直径 5 mm 的孔并封住孔底。将初筛的生防菌在 NA 液体培养基中 28 ℃ 培养 48 h,取 40 μL 生防菌发酵液置于孔内(无菌水为对照)。每处理重复 3 次,4 ℃ 存放 16 h,28 ℃ 培养 3~5 d 后测量抑菌圈大小。

1.4 4 种拮抗菌的鉴定

1.4.1 生理生化检测 4 种拮抗菌的生长曲线、最适 pH 值、糖发酵、淀粉水解试验、革兰氏染色试验^[14]。

1.4.2 拮抗菌的 16S rDNA 鉴定 采用 CTAB 法^[15]提取拮抗菌 DNA,采用细菌 16S rDNA 的通用引物扩增引物, F5'-AGAGTTTGATCTCTGGCTCAG-3', R5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3'。PCR 反应体系:DNA 模板 3 μL , 10 × PCR buffer 2.5 μL , 2.5 mmol/L dNTPmix 2 μL , 相应的引物 10 $\mu\text{mol/L}$ 各 1 μL , *Taq* DNA 聚合酶 5 U/ μL 0.5 μL , ddH₂O 16 μL 。PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 7 min,4 ℃ 保温 24 h。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析,委托华大基因公司进行测序。序列 GenBank 数据库分析比对,运用 ClustalX 2.0、MEGA 5.10 软件建立系统发育树。

1.5 拮抗菌 A 胞外、胞内分泌物对枯萎病菌的影响

1.5.1 拮抗菌 A 胞外、胞内分泌物的制备 选择拮抗效果最好的拮抗菌 A 置于 LB 培养基中,28 ℃ 200 r/min 分别培养 6、9、12、15、18 h,测量菌液在 600 nm 处的吸光度,确定其浓度。取 40 mL 菌液于 50 mL 试管中,6 000 r/min 离心 10 min。上清液过滤除菌(0.22 μm),得到含有胞外分泌物的溶液。沉淀中加入 10 mL 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 7.2),充分混匀,冰浴超声波破碎细胞,得到含有胞内分泌物的溶液。将含有胞外、胞内分泌物的溶液涂布于 LB 平板上,确定无活菌体存在。

1.5.2 胞外、胞内分泌物对枯萎病菌菌丝生长的影响 将含有胞外、胞内分泌物的溶液分别稀释 1、10、100 倍,各取 100 μL 稀释液与融化的 PDA 培养基混匀于平板中。完全凝固后,用 0.5 cm 的打孔器取枯萎病菌菌饼放于平板正中央。

每个菌株胞内外分泌物重复 3 次,以加入无菌水为对照,28 ℃ 培养 4 d,测量枯萎病菌菌落的直径,计算抑制率。

1.5.3 胞外、胞内分泌物对枯萎病菌产孢的影响 将枯萎病菌菌丝块接种于 PDA 培养基中央,28 ℃ 培养至菌落直径达 4.5 cm,挖除周围培养基,分别取上述胞外、胞内分泌物稀释液 20 mL 倒入平板处理 20 min(无菌水为对照),倾去溶液,28 ℃ 继续培养 3~5 d 至孢子产生,每平板用 10 mL 无菌水将孢子洗下,4 层纱布过滤得孢子悬浮液,显微观察记录孢子数,并计算产孢抑制率。

1.5.4 胞外分泌物与胞内分泌物对枯萎病菌孢子萌发的影响 取 50 μL 上述胞外、胞内分泌物稀释液置于凹玻片凹槽中(无菌水作为对照),加入 50 μL 枯萎病菌孢子悬浮液,混合后用盖玻片盖严,28 ℃ 恒温培养。分别在 0、4、8、12、16、20、24、28 h 镜检孢子萌发情况,测量孢子的长度。每样品重复 4 次,每次重复检查 5 个视野,记录数据并计算孢子萌发的平均长度。

1.6 拮抗菌 A 对棉花的影响

1.6.1 拮抗菌 A 对棉花种子萌发的影响 采用 70% 乙醇清洗棉花种子 30 s,无菌水冲洗 3~4 次,每次 5 min,分装于平板中,每个平板 30 粒种子。取 20 mL 拮抗菌 A 培养液浸泡种子 10 min(无菌水作对照),倾去培养液,无菌水清洗 3 次,每次 20 mL。25 ℃ 恒温保湿培养,3 d 后调查种子萌发率。

1.6.2 棉花活性氧酶系统分析 按照草炭土、珍珠岩、蛭石为 2:1:1 的比例配制土壤,将棉花枯萎病菌孢子悬液(30 mL/盆)混合在土壤中(蒸馏水作对照)。将棉花种子用 70% 乙醇表面消毒 30 s,用蒸馏水冲洗 3~4 次,每次 5 min,用拮抗菌 A 培养液浸泡种子 10 min(无菌水作对照),倾去培养液,清洗 3 次,室温(23 ℃)浸泡 24 h,播种在直径为 20 cm 的营养钵中,每钵播种 10 粒,常规管理。播种后第 20 天计算成活率,之后每盆补加拮抗菌 A 培养液 10 mL 于土壤中,菌液浓度为 10^6 CFU/mL,以蒸馏水作为对照。播种后第 40 天、第 50 天、第 60 天、第 70 天分别测定 POD、PPO、PAL 活性^[16]。

2 结果与分析

2.1 棉花枯萎病拮抗菌的分离和筛选

分离得到来自甘草、阿魏、苦豆子不同植株部位的内生细菌共计 25 株,其中有 11 株来自甘草,5 株来自阿魏,9 株来自苦豆子。筛选得到 7 株对枯萎病菌有抑制作用的内生菌,选择了 4 株抑菌效果较好的菌株进行复筛(表 1)。显微观察抑菌圈附近的菌丝形态,发现有明显的变形(图 1)。菌株 A 初筛的抑菌效果最佳,抑菌圈直径为 26.96 mm,与其他菌株差异显著。菌株 B 在复筛中表现出较大的抑菌圈,但和 A 菌株抑菌圈直径无显著差异。

2.2 4 株拮抗菌的生长特性

A、B、C、D 的生理生化检测结果表明,4 株拮抗菌的最适 pH 值都偏酸性,A、B、C 为革兰氏阳性菌,D 为阴性菌(表 2)。

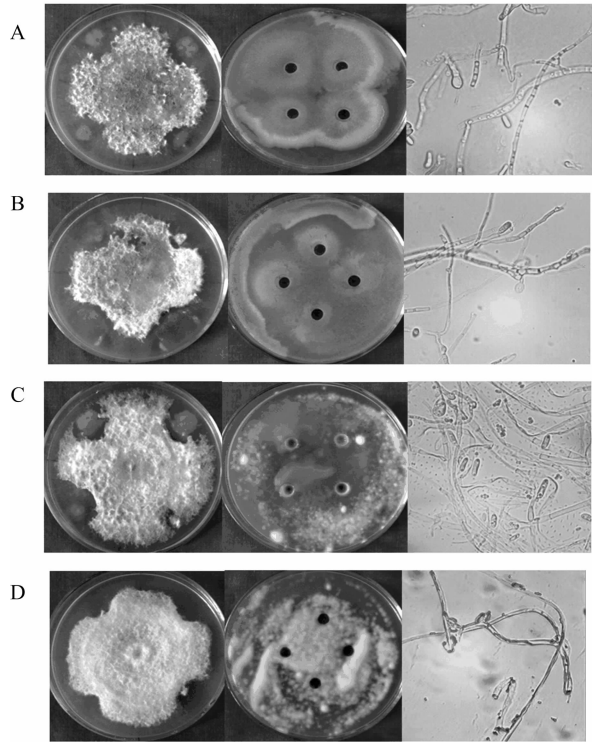
2.3 拮抗菌的 16S rDNA 鉴定

菌株 A、B、C、D 的 16S rDNA 序列通过邻位相接法建立的系统发育树(图 2)。A 与 *Bacillus amyloliquefaciens* 较相似,遗传距离为 1.972。B 与 *Bacillus tequilensis* 较相似,遗传距离为 0.009。C 与 *Bacillus* sp. 较相似,遗传距离为 1.970。D 与

表 1 棉花枯萎病拮抗菌平板抑菌试验

菌株	抑菌圈直径 (mm)		来源
	初筛	复筛	
F	0.16 ± 0.40d		苦豆子 (根)
E	1.00 ± 0.92d		苦豆子 (根)
D	6.72 ± 1.06d	0.36 ± 0.14c	阿魏 (根)
C	18.96 ± 1.48c	21.86 ± 5.94b	阿魏 (根)
B	21.16 ± 1.58b	55.80 ± 4.52a	乌拉尔甘草 (根)
A	26.96 ± 1.70a	54.54 ± 4.50a	乌拉尔甘草 (叶)

注:表中数据为平均值 ± 标准误,同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),下表同。



A、B、C、D 分别代表 4 株拮抗菌的抑菌情况,其中左图为初筛结果,中图为复筛结果,右图为镜检结果(放大倍数10×40)

图1 4 株拮抗菌对枯萎病菌的抑菌效果

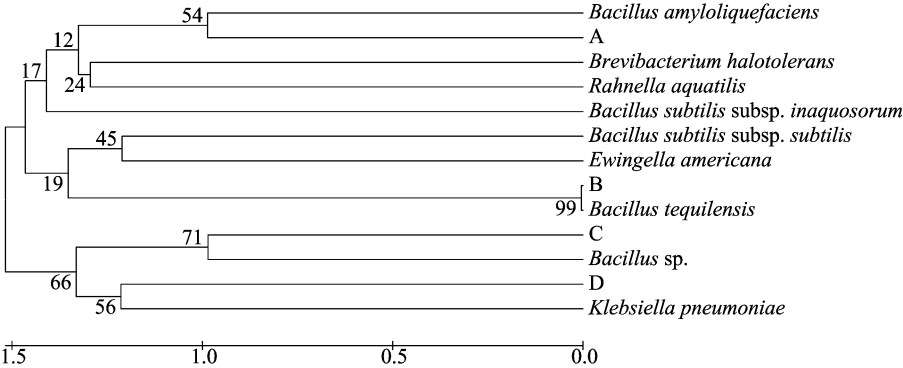


图2 4 株拮抗菌的 16S rDNA 系统发育树

表 2 4 株拮抗菌生理生化性质检测

生化试验名称	A	B	C	D
蔗糖	+	+	+	+
乳糖	-	-	-	+
葡萄糖	+	+	+	+
淀粉	+	+	-	+
最适 pH 值	5.0	4.0	4.0	5.0

Klebsiella pneumoniae 较相似,遗传距离为 2.428。

2.4 拮抗菌 A 胞外、胞内分泌物对枯萎病菌的影响

2.4.1 胞外、胞内分泌物对枯萎病菌菌丝生长的影响 拮抗菌 A 胞外、胞内分泌物对枯萎病菌菌丝生长的平均抑制率分别为 8.55%、9.41% (图 3-a)。抑制率随着菌液浓度的增加而增加,富集 18 h 的胞外分泌物对菌丝生长的抑制率达 27.60%;富集 15 h 的胞内分泌物抑制率达 32.93% (图 3-a、图 3-b)。胞外、胞内分泌物的最大抑制率均出现在细菌生长的稳定期。

2.4.2 胞外、胞内分泌物对枯萎病菌产孢的影响 拮抗菌 A 胞外、胞内分泌物对枯萎病菌产孢的平均抑制率分别为 26.32%、40.14% (图 4)。胞外分泌物的抑制率在对数期中后期有一定下降,在稳定期达最大值,富集 18 h 的胞外分泌物抑制率达 72.29%;胞内分泌物的抑制率在对数期早期显著增加并达到最大值,对数期中后期逐渐稳定,稳定期有所回落,富集 9、15 h 的胞内分泌物抑制率达 88.81%。

2.4.3 胞外、胞内分泌物对枯萎病菌孢子萌发的影响 孢子萌发长度随培养时间的增加而增加 (图 5-a),富集 9 h 的胞外分泌物在孢子萌发 24 h 时抑制率最大,达到 23.15%;富集 15 h 的胞内分泌物在孢子萌发 28 h 时抑制率最大,达到 26.09%。显微观察发现,胞外、胞内分泌物处理枯萎病菌后,部分孢子在萌发时,出现了菌丝畸形、断裂的现象,其中胞内分泌物处理后变化比较明显 (图 5-b)。

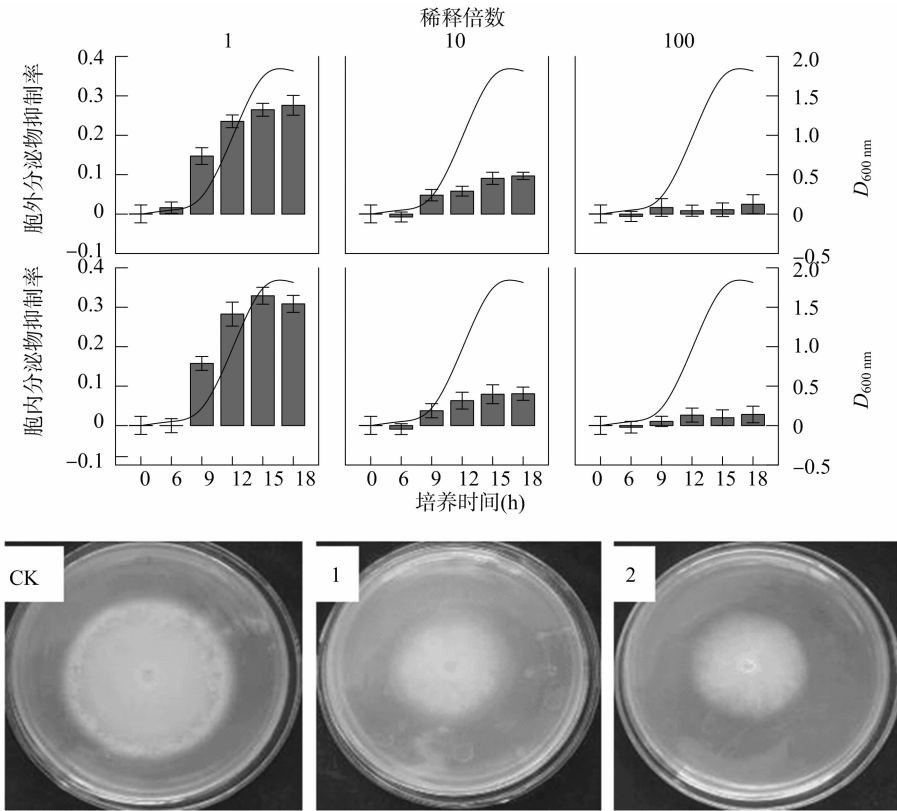
2.5 拮抗菌 A 对棉花生长的影响

2.5.1 拮抗菌 A 对棉花种子萌发的影响 拮抗菌 A 处理对棉花种子湿质量、干质量、发芽率并无显著影响,但对其成活率具有显著影响 (表 3)。单独用拮抗菌 A 处理过的种子成活率增至 48.33%,单独用枯萎病菌处理的种子成活率下降至

35.83%,均与对照差异显著。拮抗菌 A 与枯萎病菌共同作用时,棉苗的成活率与对照一致。

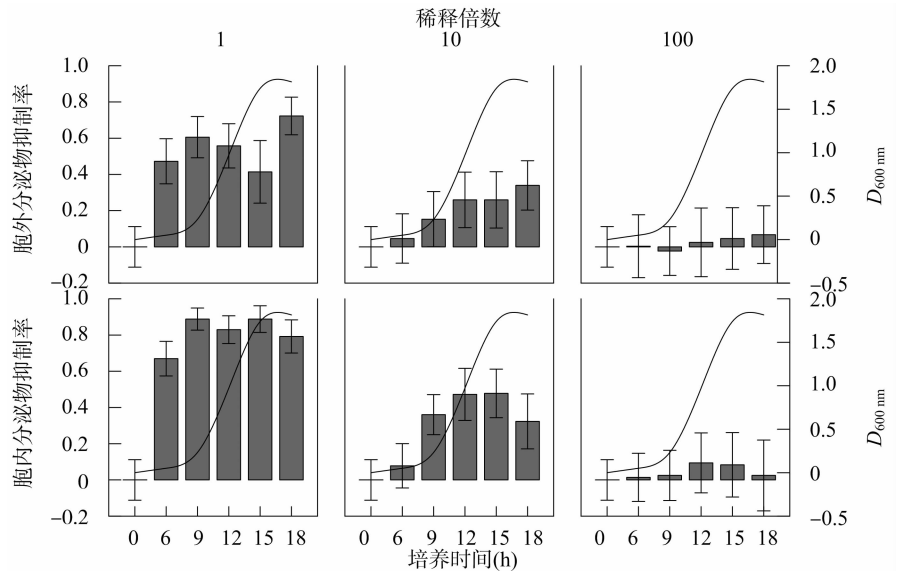
2.5.2 棉花 POD、PPO、PAL 分析 棉花播种 40 d,共同用拮

抗菌 A 和枯萎病菌处理组的 PAL 活性显著提高,单独用 A 或枯萎病菌处理的棉花 PAL 活性也与对照差异显著。其他处理下 PAL、POD、PPO 活与对照差异不显著 (表 4)。



条形图表示拈抗菌A对枯萎病菌菌丝生长的影响，抑制率对应左侧纵坐标；线形图表示拈抗菌A的生长曲线，600 nm下吸光度对应右侧纵坐标；横坐标为拈抗菌A的富集时间。CK为无菌水处理枯萎病菌后的菌丝生长情况；1为富集18 h的胞外分泌物处理枯萎病菌后的菌丝生长情况；2为富集15 h后的胞内分泌物处理枯萎病菌后的菌丝生长情况

图3 拈抗菌 A 胞外、胞内分泌物对枯萎病菌菌丝生长的影响



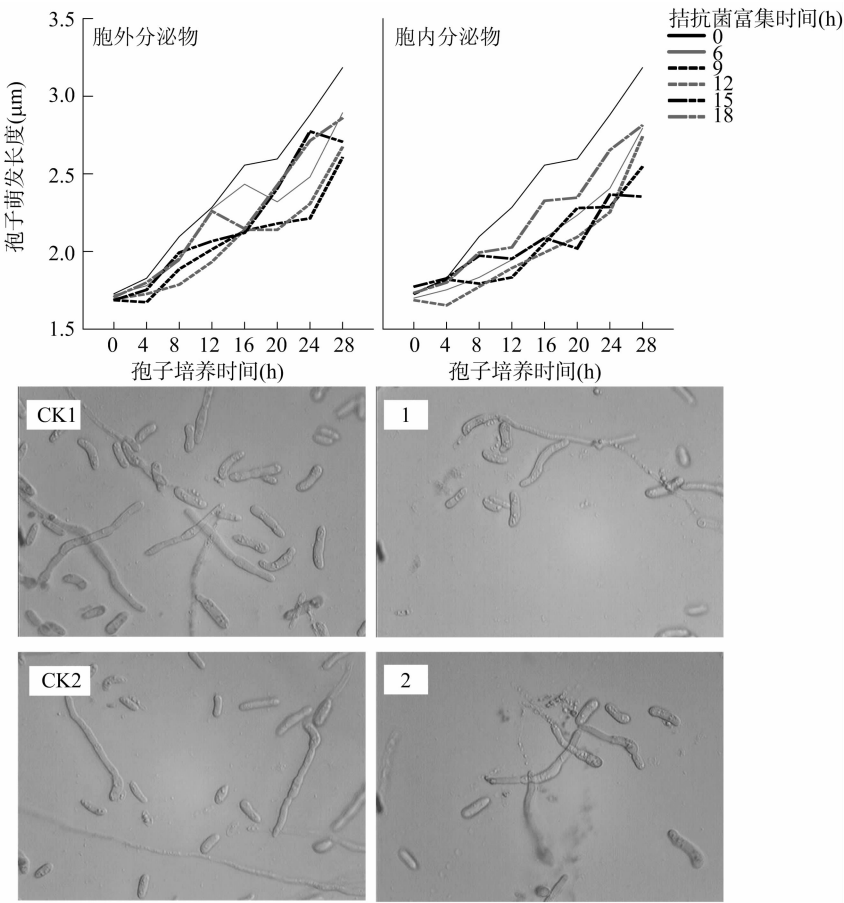
条形图表示对枯萎病菌产孢的影响，抑制率对应左侧坐标；线形图表示拈抗菌 A 的生长曲线，其 600nm 下的吸光度值对应右侧坐标；横坐标为拈抗菌的富集时间

图4 拈抗菌 A 胞外、胞内分泌物对枯萎病菌产孢的影响

3 结论与讨论

目前应用较多的生防细菌主要有芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞杆菌属 (*Pseudomonas*)、土壤放射杆菌 (*Agrobacterium*

radiobacter) 等。其中芽孢杆菌属具有抗逆性强、抗菌谱广等特点,是植物微生态体系中的优势微生物种群,是理想的植物病害生防细菌来源之一^[17]。本研究得到的抑菌效果最好的拈抗菌A为解淀粉枯草芽孢杆菌,分离自甘草的叶片,它增



线形图表示拮抗菌A胞外、胞内分泌物对枯萎病菌孢子萌发长度的影响。1为富集9 h的胞外分泌物在孢子萌发24 h的抑制情况；CK1为无菌水处理孢子萌发24 h；2为富集15 h的胞内分泌物在孢子萌发28 h的抑制情况；CK2为无菌水处理孢子萌发28 h

图5 拮抗菌 A 胞外、胞内分泌物对枯萎病菌孢子萌发长度的影响

表 3 拮抗菌 A 对棉花种子萌发的影响

处理	湿质量(g)	干质量(g)	发芽率(%)	成活率(%)
A	0.184 ± 0.022a	0.083 ± 0.003a	66.88a	48.33a
A + F	0.196 ± 0.024a	0.081 ± 0.003a	64.38a	45.83b
F	0.193 ± 0.013a	0.082 ± 0.003a	65.83a	35.83c
CK	0.197 ± 0.023a	0.084 ± 0.003a	65.00a	45.83b

殖速度快,富集 12 h 菌浓度可达 10⁸ CFU/mL,枯萎病菌达到这一浓度需要在相同条件下富集 72 h,这使得拮抗菌 A 能够在植物中占据优势地位。

枯草芽孢杆菌的生防作用机制多样,主要有竞争、拮抗、溶菌、诱导植物抗病性和促进植物生长等^[18]。已经有学者从拮抗内生菌发酵液中分离出了抑制枯萎病菌的物质,这些抑菌物质主要包括化合物^[19]、脂肽^[2]、糖类^[20]、蛋白^[21],这些物质的分泌对于拮抗菌在植物中占据有利地位起到了关键作用。枯草芽孢杆菌分泌产生的抑菌蛋白对植物病原菌抑制作用机制包括抑制病原菌孢子产生、萌发,导致菌丝畸形,细胞壁溶解和原生质泄露。本研究从抑制枯萎病菌菌丝生长、产孢、孢子萌发 3 个方面检测胞外、胞内分泌物的抑菌活性,发现其抑制产孢的作用较为明显。虽然通过显微观察发现胞内、胞外分泌物也能引起菌丝畸形、孢子萌发迟缓,但抑制率

表 4 棉花 POD、PPO、PAL 酶活性测定结果

棉花培养时间(d)	PAL(U/g)			
	A	A + F	F	CK
40	2.82 ± 0.57bc	4.13 ± 0.78a	2.99 ± 0.55bc	1.96 ± 0.28d
50	2.00 ± 0.34a	2.46 ± 0.57a	1.64 ± 0.37a	2.25 ± 0.19a
60	2.60 ± 0.31a	2.23 ± 0.27a	2.09 ± 0.19a	2.73 ± 0.58a
70	2.73 ± 0.44a	2.90 ± 0.58a	2.50 ± 0.20a	2.74 ± 0.71a

棉花培养时间(d)	POD(U/g)			
	A	A + F	F	CK
40	7.28 ± 0.81a	9.85 ± 1.83a	8.08 ± 1.46a	5.83 ± 0.85a
50	2.46 ± 0.88a	4.96 ± 1.52a	3.68 ± 0.65a	2.73 ± 0.82a
60	3.24 ± 0.73a	5.82 ± 0.84a	4.04 ± 0.75a	3.64 ± 0.98a
70	3.56 ± 0.59a	5.07 ± 0.99a	4.18 ± 0.60a	3.84 ± 1.24a

棉花培养时间(d)	PPO(U/g)			
	A	A + F	F	CK
40	1.33 ± 0.43a	1.54 ± 0.33a	1.33 ± 0.52a	1.71 ± 0.30a
50	1.67 ± 0.81a	1.72 ± 0.47a	1.68 ± 0.58a	1.63 ± 0.44a
60	1.71 ± 0.53a	1.71 ± 0.25a	1.71 ± 0.44a	1.69 ± 0.43a
70	1.70 ± 0.33a	1.76 ± 0.37a	1.62 ± 0.41a	1.71 ± 0.32a

远远低于对产孢的抑制率,因此抑制产孢可能是胞内、胞外分泌物的主要抑制途径。此外,同种细菌在不同的生长时期,其胞内各种酶的活性、营养需求及代谢产物均有一定差异。细

菌在接近稳定期时,次生代谢产物开始积累^[22]。本研究的最佳抑制率出现在对数期,且胞内分泌物在抑制菌丝生长、产孢、孢子萌发 3 个方面均高于胞外分泌物,可能意味着这种抑菌物质并非拮抗菌 A 的最终代谢产物。对数期抑菌物质的合成有助于细菌提前占据优势,抑制枯萎病菌的发展。

植物抗病性反应可以通过植物体内活性氧酶的活性变化来反映,这些酶包括 PPO、POD、PAL、超氧化物歧化酶(SOD)、 β -1,3-葡聚糖酶等^[23]。很多拮抗菌通过激活植物防御反应,从而在植物中占领生存空间,这种机制提高了植物对于病原菌的抵御能力。枯草芽孢杆菌 TR21 可诱导香蕉防御反应,枯草芽孢杆菌 B29、解淀粉芽孢杆菌 K103 均可诱导黄瓜防御反应^[24-26]。并非所有拮抗菌都能引起植物的防御反应。本研究测定了 POD、PPO、PAL 3 种酶在拮抗菌 A 处理棉花种子后的酶活变化情况,发现棉花播种 40 d,共用拮抗菌 A 和枯萎病菌处理组的 PAL 活性显著提高,单独用拮抗菌 A 或枯萎病菌处理的棉花 PAL 活性也与对照差异显著,其他处理下 PAL、POD、PPO 活性与对照差异不显著。可以推测拮抗菌 A 并没有引起棉花的系统诱导抗性,可见引起植物系统诱导抗性并不是拮抗菌 A 的主要抑制途径。

参考文献:

- [1] 赵 帅,杜春梅,田长彦. 黄瓜枯萎病综合防治研究进展[J]. 中国农学通报,2014(7):254-259.
- [2] Wang X, Liang G. Control efficacy of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain BZ6-1 against peanut bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*[J]. Biomed Research International, 2014, 12: 1-11.
- [3] 刘建利,曹君迈,马文平. 宁夏乌拉尔甘草内生菌鉴定及甜瓜采后病害病原拮抗菌的筛选[J]. 干旱地区农业研究, 2011, 29(1): 252-256.
- [4] 韦智钟,刘梦雅,李 真,等. 大蒜内生菌的分离及其抑菌作用的研究[J]. 黑龙江农业科学, 2013(12): 5-9.
- [5] 胡 伟,赵兰凤,张 亮,等. 香蕉枯萎病生防菌 AF11 的鉴定及其定殖研究[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(3): 387-393.
- [6] 周 斌,杨廷宪,王斌先,等. 棉花内生拮抗菌 *Paenibacillus xylanilyticus* YUPP-1 抗黄萎病研究[J]. 棉花学报, 2012, 24(1): 71-77.
- [7] Aimé S, Alabouvette C, Steinberg C, et al. The endophytic strain *Fusarium oxysporum* Fo47: a good candidate for priming the defense responses in tomato roots[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2013, 26(8): 918-926.
- [8] Khan Z, Kim S G, Jeon Y H, et al. A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses root-knot nematode[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(8): 3016-3023.
- [9] Minerdi D, Bossi S, Gullino M L, et al. Volatile organic compounds: a potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(4): 844-854.
- [10] Ryan R P, Germaine K, Franks A, et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 278(1): 1-9.
- [11] Saunders M, Kohn L M. Evidence for alteration of fungal endophyte community assembly by host defense compounds[J]. The New Phytologist, 2009, 182(1): 229-238.
- [12] 龚明福, 韩 松, 李 超, 等. 苦豆子根瘤内生细菌分离及其对棉花枯萎病的生物防治效果测定[J]. 微生物学通报, 2011, 38(6): 865-870.
- [13] 毕江涛, 王小霞, 陈卫民, 等. 甘草内生真菌分离及其抑菌活性初探[J]. 草业科学, 2013, 30(3): 357-364.
- [14] 范秀容, 沈 萍. 微生物学实验[M]. 北京: 人民教育出版社, 1980: 275-276.
- [15] 王 娜. 棉花黄萎病、枯萎病拮抗细菌的筛选及相关抗病基因的克隆[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [16] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 415-416.
- [17] 李姝江, 朱天辉, 谯天敏, 等. 松烂皮病内生拮抗细菌的筛选、生防效果及华山松的生理响应[J]. 植物保护学报, 2014, 41(5): 569-577.
- [18] 黄海婵, 裴娟萍. 枯草芽孢杆菌防治植物病害的研究进展[J]. 浙江农业科学, 2005(3): 213-215, 219.
- [19] Xu Y, Zhong J J. Significance of oxygen supply in production of a novel antibiotic by *Pseudomonas* sp. SJT25[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(19): 9167-9174.
- [20] El Hadrami A, Adam L R, El Hadrami I, et al. Chitosan in plant protection[J]. Marine Drugs, 2010, 8(4): 968-987.
- [21] 孙 瑶, 李宝庆, 马 平. 棉花黄萎菌拮抗细菌 BDT-25 抑菌蛋白的分离纯化[J]. 河北农业科学, 2011, 15(6): 42-45, 49.
- [22] 张晓云, 李宝庆, 郭庆港, 等. 生防枯草芽孢杆菌 CAB-1 抑菌蛋白产生条件及其稳定性研究[J]. 中国农业科技导报, 2011, 13(2): 59-64.
- [23] 林陈强, 李占飞, 张 慧, 等. 枯草芽孢杆菌 CS16 诱导香蕉抗病性相关防御酶系的研究[J]. 福建农业学报, 2013, 28(6): 570-574.
- [24] 喻国辉, 周 林, 程 萍, 等. 枯草芽孢杆菌 TR21 对香蕉抗病相关基因表达的诱导作用[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(1): 152-156.
- [25] 张先成, 张云湖, 赵晓宇, 等. 枯草芽孢杆菌 B29 菌株对黄瓜植株的诱导抗性[J]. 武夷科学, 2009, 25(12): 24-29.
- [26] 张 宝. 解淀粉芽孢杆菌抗菌脂肽 *Bacillomycin* L 的纯化鉴定及抑菌机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.