

林丽飞,张敏,和平,等.精胺代谢对连作番茄根结线虫病及其土壤微生物的影响[J].江苏农业科学,2018,46(13):89-92.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.13.021

精胺代谢对连作番茄根结线虫病 及其土壤微生物的影响

林丽飞^{1,2},张敏¹,和平¹,罗巧育¹,胡先奇¹

(1. 云南农业大学省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室,云南昆明 650201;

2. 云南省农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室/红河学院,云南蒙自 661100)

摘要:通过盆栽试验,测定不同处理番茄的生长势、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,简称 SOD)活性、过氧化物酶(peroxidase,简称 POD)活性、丙二醛(malondialdehyde,简称 MDA)含量、过氧化氢酶(catalase,简称 CAT)活性及土壤的微生物种类及数量,探索精胺代谢对连作番茄根结线虫病的抑制机制,为探究番茄连作障碍防治方法提供科学依据。结果表明,不同浓度的精胺处理对连作番茄生长中根结线虫病的抑制作用不同,1.0 mmol/L 精胺处理后的病土对根结线虫有一定的抑制作用,连作番茄的超氧化物歧化酶活性、过氧化物酶活性及过氧化氢酶活性都达到了最大值,丙二醛含量则最低,说明 1.0 mmol/L 精胺能够提高番茄对根结线虫病的抗性。精胺处理可以增加土壤中细菌数量,减少真菌数量。

关键词:精胺代谢;番茄连作;根结线虫病;酶活性;土壤微生物

中图分类号: S436.412.1⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)13-0089-03

植物根结线虫病是由根结线虫(*Meloidogyne* spp.)引起的一种世界性病害,寄主超过 3 000 种,尤以茄科、葫芦科、十字花科等植物受害严重,蔬菜根结线虫病在我国南方、北方都能发生,且呈逐年加重趋势^[1]。尤其是南方根结线虫,由于其寄主范围广、致病性强、繁殖速度快、易传播扩散等特性,目前已成为世界各地蔬菜种植区最重要的病原物类群之一^[2]。在我国由于温室连作现象较严重,致使许多老龄温室南方根结线虫病害的发生尤为严重,一般每年造成的经济损失为 10%~15%,严重者损失可达 30%~40%,甚至绝产^[3]。土壤线虫、土壤微生物及植物均与连作引起的植物根结线虫病有关,但关于三者之间相互关系的研究较少,更少见精胺对番茄连作病土与三者关系影响的研究报道。连作病土对连作番茄的危害现象普遍存在,但对连作番茄的危害程度及对土壤微生物与土壤线虫的影响程度缺乏系统研究。

精胺(spermine,简称 Spm)是一种内源性物质,广泛存在于生物体内,自 20 世纪 60 年代美国耶鲁大学的学者提出多胺具有刺激生长和防止衰老的作用以来,越来越多的研究表明,多胺具有较强延缓植物叶片衰老的作用^[4]。它不仅可

直接与活性氧(reactive oxygen species,简称 ROS)反应,还可以通过提高抗氧化酶活性参与胁迫条件下 ROS 的清除,增强植物抗逆性^[5]。但有关精胺的研究和报道较少,尤其是其与南方根结线虫的相互作用目前还未见报道。本试验采用温室盆栽人工接种法研究精胺代谢物对连作番茄南方根结线虫病的抗性程度,重点考察精胺处理后的健康土壤及感病土壤对连作番茄根结线虫病发病程度及各种抗氧化酶活性的影响,并对土壤中的微生物数量进行初步研究,以期深入了解精胺代谢对连作番茄根结线虫病连作障碍发生的微生态机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试番茄种子由云南农业大学植物保护学院王扬老师惠赠,供试土壤于 2016 年 9 月采自云南农业大学温室,是上茬经不同浓度精胺处理的番茄根区土壤,经过贝尔曼法测定得到病土中的线虫密度为 4 000 条/kg,上茬的处理方法是对番茄苗叶面喷施精胺溶液,连续喷雾 5 d,第 6 天开始接种线虫,接种二龄线虫 1 000 头/株。试验中的精胺溶液设置 5 个浓度梯度处理,分别用 A、B、C、D、N、CK 表示,即 A:1.0 mmol/L Spm + 根结线虫;B:1.5 mmol/L Spm + 根结线虫;C:2.0 mmol/L Spm + 根结线虫;D:3.0 mmol/L Spm + 根结线虫;N:病土对照;CK:健康土壤对照;喷施时间是每天 09:00—10:00。

牛肉膏蛋白胨培养基:3.0 g 牛肉膏,10.0 g 蛋白胨,5.0 g NaCl,15.0~25.0 g 琼脂,1 000 mL 水,pH 值为 7.4~7.6。

PDA 培养基:1 000 mL 20% 马铃薯浸出液,10~20 g 葡萄糖,17~20 g 琼脂。

收稿日期:2017-09-29

基金项目:教育部高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20135302110003);云南省应用基础研究项目(编号:2009ZC131M);第一批红河学院中青年学术带头人后备人才项目(编号:2010PY0104);红河学院硕士点植物保护一级学科建设项目;云南省红河州人民政府生物创新办委托项目。

作者简介:林丽飞(1978—),女,云南建水人,博士研究生,副教授,主要从事植物寄生线虫与病害的复合侵染研究。E-mail:llf_biology2@126.com。

通信作者:胡先奇,博士,教授,博士生导师,主要从事植物线虫病害的研究。E-mail:Xqhoo@126.com。

1.2 试验方法

将番茄种子用 70% 乙醇消毒 30 s,再用 5% 次氯酸钠溶液消毒 2 min,用无菌水清洗 3 次。将消毒后的种子播于育苗盘中,约 1 个月后,当番茄苗长出 3~4 张真叶时,移栽到上茬经过不同浓度 Spm 处理的番茄根区土壤里,每个处理 5 次重复。

1.3 连作番茄生理指标的测定

1.3.1 番茄叶片抗氧化酶活性测定 移栽 30 d 后,取温室中番茄植株的根及叶片,清洗干净,测定番茄生长势,统计根结数量,计算根结指数,计算方法参照文献[6~7];并测定过氧化物酶(peroxidase,简称 POD)活性、过氧化氢酶(catalase,简称 CAT)活性、丙二醛(malondialdehyde,简称 MDA)含量、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,简称 SOD)活性,测定方法参照文献[8~9]。

1.3.2 土壤根际微生物数量的测定及微生物统计 测定方法参照文献[10],收集 5 株植株的栽培土壤,混匀后采用四分法取 1 kg 土壤,装入无菌塑料袋带回实验室,于 4℃ 冰箱保存。准确称取 10 g 待测土壤样品,放入装有 90 mL 无菌水并放有小玻璃珠的 250 mL 三角瓶中,用手或置摇床上振荡 20 min,使微生物分散,静置 20~30 s,即可得到 10^{-1} 稀释液;连续稀释,制成 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 等一系列稀释菌液,然后将稀释菌液涂至盛有培养基的平板上,将涂抹好的平板平放于桌上 20~30 min,使菌液渗透入培养基内,然后将平板倒置,于 25~28℃ 黑暗培养,至长出菌落后进行计数,测定土壤中细菌、真菌的数量,微生物计数采用传统的方法进行,从接种后的 5 个稀释度中选择一个合适的稀释度进行计数。选择时注意同一稀释度各个重复的菌数相差不能太悬殊。每皿 30~300 个细菌菌落为宜;每皿 10~100 个真菌菌落为宜。如果菌落很多,可将其分成 2~4 等份进行计数。细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基进行培养,真菌采用 PDA 培养基进行培养。

2 结果与分析

2.1 不同处理水平对连作番茄生理的影响

由表 1 可知,在南方根结线虫侵染和精胺处理后,番茄的

生长会受到抑制,与健康土壤对照相比,株高受到影响。不同浓度的精胺处理对连作番茄根结线虫病有一定的影响,其中 1.0 mmol/L 精胺处理后,番茄的茎粗最大,为 0.73 cm,此时根结数量最少,最大根结直径最小。

表 1 不同处理对连作番茄生长势的影响

处理	株高 (cm)	茎粗 (cm)	根长 (cm)	根质量 (g)	根结数量 (个)	最大根结直径 (cm)
A	39.50	0.73	14.50	10.20	20.75	0.03
B	36.00	0.58	13.80	11.70	65.80	0.05
C	51.70	0.64	12.80	12.50	40.20	0.04
D	49.00	0.72	17.00	16.90	50.20	0.04
N	39.10	0.66	14.80	10.90	41.40	0.08
CK	46.90	0.66	12.40	15.30	0.00	

2.2 不同处理对连作番茄超氧化物歧化酶的影响

由图 1 可知,与健康土壤对照相比,其他处理的超氧化物歧化酶活性均有所增加,说明喷施精胺能够提高番茄的超氧化物歧化酶活性,且当精胺浓度为 1.0 mmol/L 时,处理后连作番茄的超氧化物歧化酶浓度增加得最多,能够有效提高番茄对根结线虫病的抗性。这一结果与卢树昌等的研究结果^[11]基本一致。

2.3 不同处理对连作番茄过氧化物酶活性的影响

过氧化物酶在植物体内包括组成型表达和诱导表达,其中诱导表达的诱导因子非常广泛,既有生物类激发子(如各类病原物的侵染等),也有高温、冷冻、干旱、风力、重金属离子、机械损伤等非生物类激发子^[12]。由图 2 可知,根结线虫侵染后,对连作番茄过氧化物酶活性的影响不大,而经过喷施 1.0 mmol/L 精胺后,番茄的过氧化氢酶活性明显增强。说明在南方根结线虫胁迫下精胺能够提高连作番茄的抗逆性。

2.4 不同处理对连作番茄丙二醛含量的影响

由图 3 可知,在南方根结线虫侵染后,丙二醛的含量明显增加,不同浓度的精胺处理对番茄丙二醛含量的影响较大,健康土壤对照的番茄丙二醛含量比其他处理组低,其中 1.0 mmol/L 精胺代谢能够明显降低膜脂过氧化程度。说明精胺处理对连作番茄根结线虫病有一定的抑制作用。

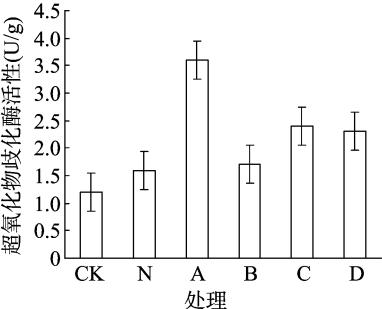


图1 不同处理对连作番茄超氧化物歧化酶活性的影响

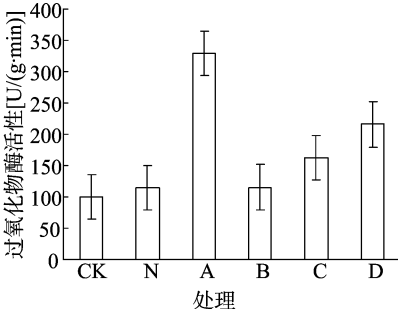


图2 不同处理对连作番茄过氧化物酶活性的影响

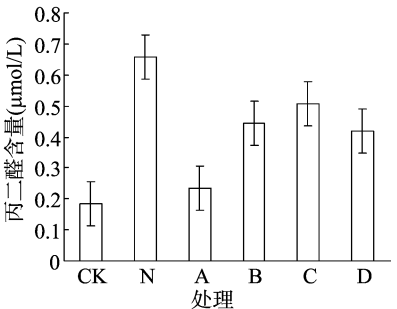


图3 不同处理对连作番茄丙二醛含量的影响

2.5 不同处理组对连作番茄过氧化氢酶活性的影响

由图 4 可知,与健康土壤对照相比,南方根结线虫处理后,番茄的过氧化氢酶活性下降。经过不同浓度的精胺处理后,过氧化氢酶活性变化差异较大,随着精胺浓度的增加,过氧化氢酶活性呈下降趋势,即当精胺浓度为 1.0 mmol/L 时,过氧化物酶活性最大,为 9.25 U/(g·min),当精胺浓度为

3.0 mmol/L 时,过氧化氢酶活性最低,为 1.75 U/(g·min)。这与陈金锋等的研究结果^[13]相似。

2.6 不同处理组对土壤细菌数量的影响

土壤生物群落结构的变化可以作为土壤变化的早期预警生态指标^[14]。由图 5 可知,健康土壤对照处理番茄根区土壤中细菌总数是 1.78×10^6 CUF/g, A、B 处理土壤中的细菌数

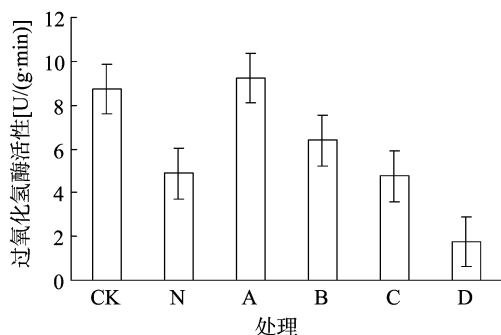


图4 不同处理对连作番茄过氧化物酶活性的影响

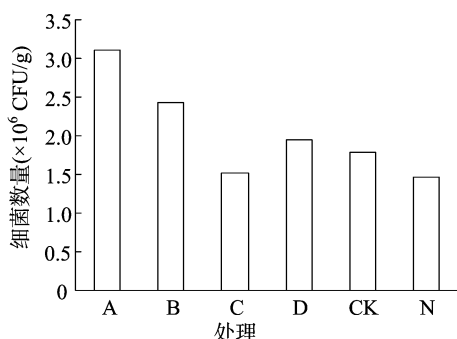


图5 不同处理对连作番茄土壤细菌数量的影响

量较多,分别为 3.10×10^6 、 2.43×10^6 CFU/g,土壤细菌数量最少的是 N 处理,为 1.46×10^6 CFU/g。可见不同处理对根际土壤中细菌数量的影响不同。A 处理土壤中细菌总量最多,其次是 B 处理,C、D 处理的土壤中细菌数量与 CK、N 处理相差不大。

2.7 不同处理组对土壤真菌数量的影响

由图 6 可知,经过不同处理后番茄根际土壤真菌数量的变化趋势与细菌不同。CK 处理的土壤中真菌数量为 8.5×10^3 CFU/g, N 处理的土壤中真菌数量为 6.9×10^3 CFU/g, A 处理的土壤中真菌数量为 4.6×10^3 CFU/g, B 处理的土壤中真菌数量为 2.8×10^3 CFU/g, CK 与各处理之间的土壤中真菌数量差异较明显。

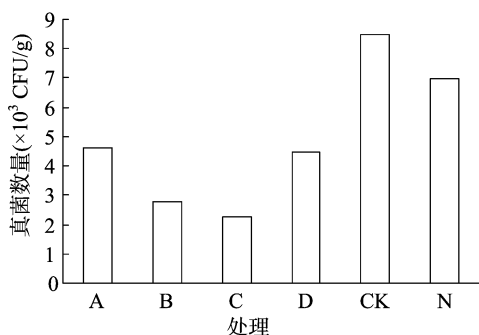


图6 不同处理对连作番茄土壤真菌数量的影响

3 讨论与结论

3.1 精胺代谢对连作番茄根结线虫病的生长势的影响

经过不同处理后,从南方根结线虫对连作番茄生长势的影响来看,N 处理番茄根系上的根结直径最大,为 0.08 cm; A 处理的番茄根结数量最少,为 20.75 个,此时形成的根结最大

直径仅为 0.03 cm,茎粗最大,因此,从连作番茄的长势和抑制根结的形成来看,A 处理的土壤对连作番茄根结线虫病的抑制效果较好。

3.2 精胺代谢对连作番茄根结线虫病几种抗氧化酶活性的影响

番茄感染南方根结线虫病之后,超氧化物歧化酶活性与健康土壤对照相比有所增强,喷施精胺能够提高番茄的超氧化物歧化酶活性,当精胺浓度为 1.0 mmol/L 时,超氧化物歧化酶浓度增加得最多,能够有效提高番茄对根结线虫病的抗性。根结线虫侵染后,番茄的过氧化物酶活性升高,1.0、3.0 mmol/L 精胺处理后,番茄的过氧化物酶活性明显增强。本研究结果表明,在南方根结线虫侵染后,精胺浓度不同对番茄丙二醛含量影响较大,健康土壤对照的番茄丙二醛含量比其他处理组低,精胺处理后的土壤栽培的番茄丙二醛含量比 N 处理低,说明精胺处理对连作番茄根结线虫病有一定的抑制作用。南方根结线虫处理后,与 CK 相比,番茄的过氧化氢酶活性降低,经过不同浓度精胺处理后的过氧化氢酶活性与 CK 组差异明显,当精胺浓度为 3.0 mmol/L 时,过氧化氢酶活性最低,为 1.75 U/g。在植物与病原物互作过程中,这些过氧化物酶活性的升高可能是由于合成了对细胞有毒的产物,也可能由于诱导植物细胞壁发生了改变,形成物理屏障物,引起细胞死亡,抑制病原菌侵染,从而参与了植物的抗病作用。

3.3 精胺代谢对连作番茄根结线虫病土壤微生物的影响

连作会导致微生物区系发生改变,土壤病原真菌数量增加,有益拮抗菌数量减少,由细菌型土壤向真菌型土壤转化;土壤病菌基数增加,根际土壤中放线菌密度降低等一系列不良影响的发生,严重影响了番茄的生长发育,从而导致大幅度减产甚至绝收^[15]。土壤中存在着大量的微生物,在一定程度上土壤微生物群落调节着土壤乃至整个生态系统的功能。土壤微生物以细菌的种类和数量最多^[16]。细菌在土壤营养元素循环、有机物质的形成和分解、肥力的保持和提高、生态环境的改善、植物的生长发育和作为病虫害防治等方面均起着极其重要的作用^[17]。本研究结果表明,精胺及其代谢物对番茄连作中根结线虫病有一定的抑制作用。

本研究结果表明,精胺在番茄短期连作中能够促进土壤中细菌数量增加,真菌数量减少,番茄叶片中各种酶活性逐渐上升,番茄生长势良好,并且能够减少植物根结线虫病害的发生,提高土壤肥力,使微生态环境向良性方向发展,这为将来的研究提供一个参考和方向,对茄科植物的生产实践也具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] 杨国栋,周宝利,毕晓华,等. 不同番茄砧木的抗南方根结线虫特性及对土壤生物学活性的影响[J]. 沈阳农业大学学报,2015,46(5):526-531.
- [2] Yeates G W. Effect of plants on nematode community structure[J]. Annual Review of Phytopathology,1999,37:127-149.
- [3] 杨宝君. 15 种根结线虫病害的病原鉴定[J]. 植物病原学报,1984,14(2):107-112.
- [4] Alcázar R, Altabella T, Marco F, et al. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance[J]. Planta, 2010,231(6):1237-1249.

李彩虹,杨志辉,张 岱,等. 马铃薯枯萎病拮抗菌的筛选与鉴定[J]. 江苏农业科学,2018,46(13):92-95.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.13.022

马铃薯枯萎病拮抗菌的筛选与鉴定

李彩虹,杨志辉,张 岱,赵冬梅,潘 阳,朱杰华

(河北农业大学植物保护学院,河北保定 071000)

摘要:从河北省、内蒙古自治区及贵州省等地的 16 个马铃薯试验田采集根际土样,分离得到 288 株芽孢杆菌菌株。经筛选得到 6 株对尖孢镰刀菌马铃薯专化型具有较强拮抗作用的菌株 NZ-4、NZ-5、NZ-6、HC-Z-18、HC-Y-5 和 HC-Y-16,其抑菌带宽度均达到 6.6 mm 以上,抑菌圈直径均大于 20.0 mm。根据它们的菌落和菌体形态特征及 *gyrB* 基因序列分析,将其鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。抑菌谱测定结果表明,拮抗菌株 NZ-4 对马铃薯炭疽病和疮痂病、小麦根腐病等病原菌也具有很强的拮抗作用。

关键词:马铃薯枯萎病;拮抗芽孢杆菌;抑菌谱;筛选;鉴定;生物防治

中图分类号: S435.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)13-0092-04

马铃薯枯萎病是由茄病镰刀菌、尖孢镰刀菌、串珠镰刀菌、雪腐镰刀菌、接骨镰刀菌 5 种不同的镰刀菌寄生所引起的一种真菌土传病害^[1],分布广泛,在我国各种植区均有发生,发病率达 15%~45%^[2]。近年来,随着马铃薯主粮化战略的实施,马铃薯种植面积逐年扩大,由此带来的连作重茬导致马铃薯枯萎病日益加重,一般造成减产 30%,严重时可造成 78% 的植株死亡,直接影响了马铃薯产量及其经济效益,严重制约了我国马铃薯产业的发展^[2-3]。

目前,马铃薯枯萎病的防治措施主要以农业防治和化学药剂拌种为主,但由于该病为土传病害,其病原菌抗逆性强且对植株为系统性侵染,使用药剂防治效果较差,使用药剂进行

大面积的土壤处理可行性较小^[3]。在缺乏有效化学药剂和抗病品种的前提下,利用拮抗菌防治枯萎病是防治途径之一,并且生防菌对环境、生态和人类健康安全,具有改善环境、获得长期效益作用,符合现阶段植物病害控制的发展方向^[4]。

芽孢杆菌可以形成耐高温、辐射、高酸碱等逆境的芽孢,能够产生脂肽类和蛋白类等抗真菌物质,具有广谱抗真菌活性和良好的稳定性,越来越为人们所关注。普遍认为芽孢杆菌生防机制主要有营养和空间位点竞争、抗菌物质产生、溶菌作用、诱导植物抗病性等^[5]。目前,利用芽孢杆菌有益菌株拮抗植物镰刀菌病害的研究已有较多报道,如黄瓜枯萎病^[6]、香蕉枯萎病^[7]、西瓜枯萎病^[8]以及马铃薯干腐病^[9]等,但针对马铃薯枯萎病开展的拮抗芽孢杆菌筛选的研究尚不多见,因此,进一步筛选出适合我国不同区域的芽孢杆菌菌株对于防治马铃薯枯萎病具有重要意义。

本研究从 16 个马铃薯枯萎病发生地块的健康植株根际分离筛选出 6 株对马铃薯枯萎病病原菌有极强抗性的芽孢杆菌菌株,并对其中 NZ-4 菌株的抑菌谱进行了测定,旨在为马铃薯枯萎病的生物防治以及生防菌剂的开发提供科学依据。

收稿日期:2017-01-19

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-10-P12);河北省保定市科研项目(编号:16S02)。

作者简介:李彩虹(1991—),女,山西太原人,硕士研究生,主要从事植物病原真菌与真菌病害研究。E-mail:1033070276@qq.com。

通信作者:朱杰华,博士,教授,主要从事马铃薯病害方面的研究。E-mail:Zhujiehua356@126.com。

[5] Zhang W P, Jiang B, Li W G, et al. Polyamines enhance chilling tolerance of cucumber (*Cucumis sativus* L.) through modulating antioxidative system [J]. Scientia Horticulturae, 2009, 122 (2): 200-208.

[6] 鄢小宁,林茂松,刘亮山. 南方根结线虫拮抗链霉菌的筛选和鉴定[J]. 中国生物防治,2004,20(3):202-205.

[7] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:农业出版社,1979.

[8] 邹 琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,1995:30-32.

[9] 胡 玮. 钾对番茄部分抗性生理指标的影响及其对根结线虫的防治效果[D]. 北京:中国农业科学院,2010.

[10] 尹淑丽,麻耀华,张丽萍,等. 不同生防菌对黄瓜根际土壤微生物数量及土壤酶活性的影响[J]. 北方园艺,2012(1):10-14.

[11] 卢树昌,刘慧芹,王小波,等. 几种药剂对土壤根结线虫的防效及对番茄根系生理性状的影响[J]. 湖北农业科学,2012,51

(1):70-73.

[12] 蒋选利,李振岐,康振生. 过氧化物酶与植物抗病性研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2001,29(6):124-129.

[13] 陈金峰,王宫南,程素满. 过氧化氢酶在植物胁迫响应中的功能研究进展[J]. 西北植物学报,2008,28(1):188-193.

[14] 杨树泉,沈 向,毛志泉,等. 环渤海湾苹果产区老果园与连作果园土壤线虫群落特征[J]. 生态学报,2010,30(16):4445-4451.

[15] 张海春,张 浩,胡晓辉. 不同间作模式对温室连作番茄产量、土壤微生物和酶的影响[J]. 西北农业学报,2016,25(8):1218-1223.

[16] 张晓玲,潘振刚,周晓锋,等. 自毒作用与连作障碍[J]. 土壤通报,2007,38(4):781-784.

[17] Nolhr H F, Woece C R. Secondary structure of 16S ribosomal RNA [J]. Science, 1981, 212(4493):403-411.