

内生菌 XG-1 对西瓜枯萎病诱导抗性的研究

孙正祥, 王 丰, 周 焱*

(长江大学 农学院, 湖北 荆州 434025)

摘要: 以苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化氢酶(CAT) 4种防御酶的活性变化以及丙二醛(MDA)的含量变化作为指标, 研究内生菌 XG-1 对西瓜枯萎病的诱导抗性, 为阐明 XG-1 的作用机制及其开发应用提供理论依据。结果表明: 经内生菌 XG-1 菌悬液处理后, 西瓜苗叶片的 PAL、POD、PPO 及 CAT 活性均高于清水对照。同时接种 XG-1 菌悬液和西瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, FON) 的叶片, PAL 活性在接种后第 4 天、第 10 天出现 2 次高峰, 分别比对照增加 1.86 倍和 1.52 倍; POD 和 PPO 活性均在第 4 天达到最高峰, 分别比对照提高 52.6% 和 57.1%; CAT 活性在第 5 天时达到最高峰, 比对照提高 56.4%。同时接种 XG-1 菌悬液和枯萎病菌 FON 后, 西瓜苗叶片的 MDA 含量呈先下降后逐渐上升趋势, 第 4 天时达到最低值, 比对照下降 33.1%。由此可见, 诱导抗病性是菌株 XG-1 防治西瓜枯萎病的重要作用机制之一。

关键词: 西瓜枯萎病; 内生细菌; 诱导抗病性; 防御酶; 丙二醛

中图分类号: S436.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)03-0071-05

Induced Resistance of Endophyte XG-1 against *Fusarium* Wilt of Watermelon

SUN Zheng-xiang, WANG Feng, ZHOU Yi*

(College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

Abstract: This experiment studied the induced resistance of endophytic bacterium XG-1 against *Fusarium* wilt of watermelon by taking the content variation of MDA and the activity variation of four defense enzymes including PAL, POD, PPO and CAT as the indexes. The results showed that the activities of the four defense enzymes in leaves of watermelon plants treated by bacterial suspension of endophyte XG-1 were all higher than the control. After the leaves were treated by XG-1 bacterial suspension and *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON), the activity of PAL showed two peaks on the 4th day and the 10th day, 1.86 and 1.52 times higher than the control, respectively; the activities of POD and PPO both exhibited the peak on the 4th day, increased by 52.6% and 57.1%, respectively; the activity of CAT exhibited the peak on the 5th day, increased by 56.4%; MDA content firstly descended and then gradually ascended, falling to the lowest on the 4th day, dropped by 33.1%. The results suggest that induced resistance is one of the important mechanisms by strain XG-1 in control of watermelon *Fusarium* wilt.

Key words: *Fusarium* wilt of watermelon; endophyte; induced resistance; defense enzyme; MDA

西瓜枯萎病(*Fusarium* wilt of watermelon)又称死秧病, 是由尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, FON)引起的一种典型土传病害, 是西瓜种植上发生最普遍、危害最严重的病

害之一, 一般发病率为 10%~30%, 严重的达 80%~90%, 重茬地甚至造成绝产^[1]。西瓜枯萎病菌从土壤根系侵入, 引起维管束变褐坏死, 导致瓜秧枯死, 其厚垣孢子在土壤中可存活 10 a 之久, 严重

收稿日期: 2012-09-05

基金项目: 湖北省教育厅中青年项目(Q2011130)

作者简介: 孙正祥(1980-), 男, 湖北黄冈人, 讲师, 博士, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: sunzhengxiang9904@126.com

* 通讯作者: 周 焱(1972-), 男, 湖北钟祥人, 副教授, 博士, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: yiyizhou@yahoo.com.cn

影响西瓜产业的发展^[2]。目前,针对该病害尚未找到一种理想的农业防治和化学防治方法,生物防治所发挥的作用越来越受到人们的重视^[3]。植物诱导抗病性(induced resistance, IR)是利用物理、化学及生物的方法对植物预先处理,改变植物对病原菌的反应,使其产生局部或系统的抗性,是生防菌防治植物病害的重要作用机制之一,近年来对此研究十分活跃^[4-5]。苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)及过氧化氢酶(CAT)是与植物抗病代谢密切相关的几种酶,可以作为植物抗病的重要生化指标^[6-7]。内生细菌 XG-1 是本实验室(长江大学植物病理实验室)前期从西瓜植株根内分离筛选出的一株有效防治西瓜枯萎病的细菌,本研究在前期工作的基础上,拟对菌株 XG-1 诱导西瓜苗相关防御酶的活性变化进行测定,为阐明内生菌 XG-1 的作用机制及其开发应用提供重要理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试西瓜品种为常丰新西农八号。生防菌 XG-1、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, FON)由本实验室分离保存。PDA 培养基、NA 培养基和 NB 培养液的配方及制作参照陈天寿^[8]的方法。

1.2 供试西瓜苗与内生菌株 XG-1 的准备

1.2.1 西瓜苗的培养 挑选饱满的西瓜种子,用 0.1% HgCl₂ 消毒 3 min,灭菌水反复冲洗后,在 28 °C 恒温箱中浸泡 24 h,露白后 26 °C 催芽 2 d,待胚根长至 1 cm 左右,选取生长一致的种子播种于育苗盘中,待西瓜苗长至 3 片真叶期移栽。

1.2.2 内生菌 XG-1 菌悬液的制备 将 NA 平板上活化的 XG-1 单菌落移至 NB 培养液中,于 28 °C、160 r/min 条件下振荡培养 24 h,获得种子液,再按 1% 接种量接种到 NB 培养液中,培养发酵 72 h,用灭菌水稀释成 1.0×10⁹ cfu/mL 的菌悬液,备用。

1.3 试验处理及采样

1.3.1 盆栽土的准备 制作玉米砂培养基^[9],将 PDA 平板上活化的 FON 菌丝块接入,26 °C 下培养 10 d 后倒出,与灭菌土按 1:8 比例混合制成盆栽土,装入直径为 19 cm 的营养钵中,备用。

1.3.2 试验处理 将 3 片真叶期的西瓜苗移栽到营养钵中,每盆栽种 1 株,保持适宜温湿度。设置 4 个不同处理,每处理 25 株。①只接种菌株 XG-1:将西瓜苗移栽到装有灭菌土的营养钵中,每盆灌根

接种 XG-1 菌悬液 100 mL;②只接种病原菌 FON:将西瓜苗移栽到混有病原菌 FON 土的营养钵中;③同时接种生防菌 XG-1 和病原菌 FON(XG-1 + FON):将西瓜苗移栽到混有病原菌 FON 土的营养钵中,每盆灌根接种 XG-1 菌悬液 100 mL;④清水对照(CK):将西瓜苗移栽到装有灭菌土的营养钵中。

1.3.3 采样 分别于接菌处理后 1、2、3、4、5、7、10、15 d,随机抽取各处理西瓜苗同一部位叶片,置于 -70 °C 超低温冰箱中保存,备用。

1.4 粗酶液的提取

参照 Meyer 等^[10]的方法,称取西瓜叶片样品 1 g,剪碎,放入预冷的研钵中,加入 2 mL 提取液(0.1 mol/L pH 值 8.8 的硼酸钠缓冲液,其中含 5 mmol/L 巯基乙醇,1 mmol/L EDTA-Na₂)、0.1 g 聚乙烯吡咯烷酮及适量石英砂,冰浴中研磨匀浆,转入离心管,用 2 mL 提取液冲洗研钵及研棒,一并转入离心管中。4 °C 下振荡 5 min,12 000 r/min 离心 20 min,上清液即为酶粗提液,于 -20 °C 低温保存,备用。

1.5 酶活性及丙二醛含量的测定

1.5.1 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定 参照 Lee 等^[11]的方法加以改进,取粗酶液 100 μL,加入 2.4 mL 0.1 mol/L pH 值 8.8 的硼酸钠缓冲液,混匀后加入 1 mL 20 mmol/L 的 L-苯丙氨酸,测定起始 OD₂₉₀ 值,40 °C 水浴 30 min 后,加入 0.2 mL 2 mol/L 的 HCl 终止反应,测定反应后的 OD₂₉₀ 值,对照用缓冲液代替粗酶液,以每小时 OD₂₉₀ 变化 0.01 为 1 个酶活单位(U)。每个样品重复测定 3 次,取平均值,以下指标的测定相同。

1.5.2 过氧化物酶(POD)活性测定 参照 Fu 等^[12]的方法加以改进,取粗酶液 50 μL,加入 2.95 mL 50 mmol/L pH 值 7.8 的磷酸钠缓冲液和 1 mL 25 mmol/L 的愈创木酚,混匀后 30 °C 水浴 15 min,再加入 1 mL 2.5% 的 H₂O₂,立即计时并测定 OD₄₇₀,转入冰浴加入 2.0 mL 20% 三氯乙酸终止反应。空白对照以缓冲液代替粗酶液,以每分钟 OD₄₇₀ 变化 0.01 为 1 个酶活单位(U)。

1.5.3 多酚氧化酶(PPO)活性测定 参照 Park^[13]的方法加以改进,取 100 μL 粗酶液,与 4.9 mL 含 20 mmol/L 邻苯二酚的磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH=6.8)混合。于 35 °C 水浴中反应 5 min 后,记录 398 nm 处的光密度值,对照以缓冲液代替粗酶液,以每分钟 OD₃₉₈ 值变化 0.01 为 1 个酶活单位(U)。

1.5.4 过氧化氢酶(CAT)活性测定 参照贾显

禄^[14]的方法,用 0.1 mol/L pH 值 7.0 的磷酸缓冲液将 0.6 mL 30% H₂O₂ 稀释到 100 mL 作底物,在 5 mL 试管中加入 1.0 mL 底物和 1.9 mL 双蒸水,于 25 °C 水浴中反应 1 min 后,加入 20 μL 粗酶液和 80 μL 0.1 mol/L pH 值 8 的硼酸钠缓冲液,以蒸馏水为对照测定 240 nm 处的 OD 值,每分钟测 1 次结果,连续测 5 次,以每分钟 OD₂₄₀ 降低 0.01 的酶量为 1 个酶活单位(U)。

1.5.5 丙二醛(MDA)含量的测定 参照商闯等^[5]的方法,在 10 mL 试管中加入 2 mL 粗酶液,再加入 3.5 mL 0.5% 的硫代巴比妥酸(TBA,溶于 20% 三氯乙酸,低温保存于棕色试剂瓶),沸水浴 30 min,然后移至装有冰块的大烧瓶中冷却。10 000 r/min 离心 10 min,取适量上清液测定 450、532、600 nm 处的 OD 值,根据公式:MDA 含量(μmol/g) = 6.45 × (OD₅₃₂ - OD₆₀₀) - 0.56 × OD₄₅₀, 计算 MDA 含量。

2 结果与分析

2.1 内生菌 XG-1 处理后西瓜苗叶片 PAL 活性的变化

图 1 显示,同时接种 XG-1 和 FON 的西瓜苗体内 PAL 活性明显升高,在接种后第 4 天和第 10 天 2 次达到活性高峰,分别比对照增加 1.86 倍和 1.52 倍。单独接种 XG-1 菌悬液和 FON 菌的西瓜苗体内 PAL 活性也升高,在第 5 天达到最大值,分别比对照增加 1.13 倍和 1.39 倍。

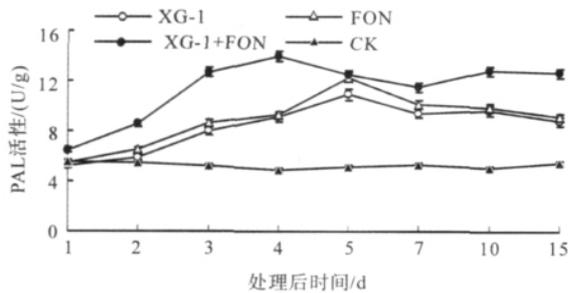


图 1 内生菌 XG-1 处理后西瓜苗叶片 PAL 活性的变化

2.2 内生菌 XG-1 处理后西瓜苗叶片 POD 活性的变化

从图 2 可看出,同时接种 XG-1 菌悬液和西瓜枯萎病菌 FON 后,西瓜幼苗体内 POD 活性迅速升高,第 4 天达到最高峰,比对照提高 52.6%。单独接种 XG-1 菌悬液和 FON 的西瓜苗体内 PAL 活性也是在第 4 天达到最大值,分别比对照提高 31.6% 和 30.6%。

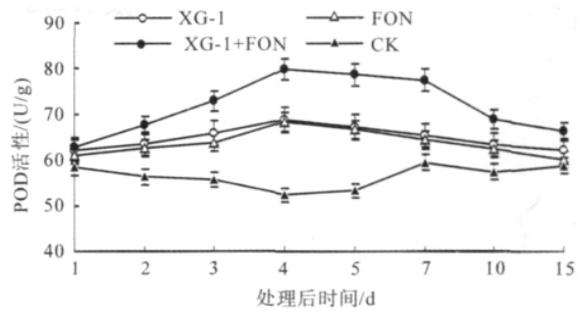


图 2 内生菌 XG-1 处理后西瓜苗叶片 POD 活性的变化

2.3 内生菌 XG-1 处理后西瓜苗叶片 PPO 活性的变化

从图 3 可以看出,同时接种内生菌 XG-1 菌悬液和病原菌 FON 后,西瓜苗体内 PPO 的活性明显高于对照和其他处理,第 4 天时达到最高峰,比对照增加 57.1%。单独接种 XG-1 菌悬液和 FON 菌的西瓜苗体内 PPO 活性也高于对照,同样在第 4 天达到最高峰,分别比对照增加 34.3% 和 32.7%。

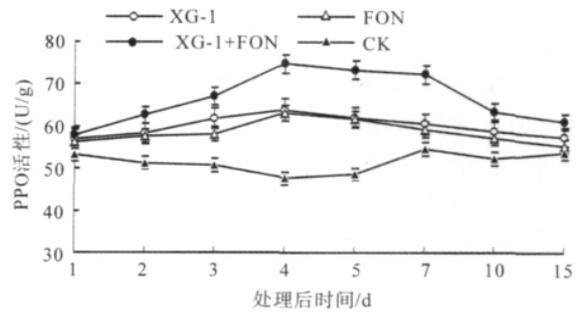


图 3 内生菌 XG-1 处理后西瓜苗叶片 PPO 活性的变化

2.4 内生菌 XG-1 处理后西瓜苗叶片 CAT 活性的变化

从图 4 可看出,同时接种内生菌 XG-1 菌悬液和病原菌 FON 后,西瓜苗体内 CAT 的活性明显高于对照和其他处理,第 5 天时达到最高峰,比对照提高 56.4%。单独接种 XG-1 和 FON 菌的西瓜苗体内 PPO 活性也高于对照,同样在第 5 天达到最高

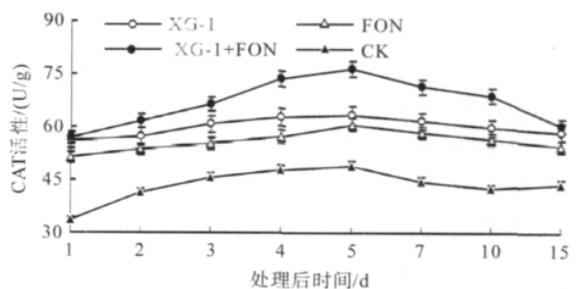


图 4 内生菌 XG-1 处理后西瓜苗叶片中 CAT 活性的变化

值,比对照分别提高 29.4%和 24.2%。

2.5 内生菌 XG-1 处理后西瓜苗叶片 MDA 含量的变化

从图 5 可看出,同时接种内生菌 XG-1 和 FON 菌后,西瓜苗叶片的 MDA 含量呈先下降后逐渐上升趋势,第 4 天时达到最低值,比对照下降 33.1%。单独接种 XG-1 和 FON 菌的西瓜苗体内 MDA 含量分别在第 4 天和第 2 天达到最低值,比对照下降 26.1%和 18.8%。

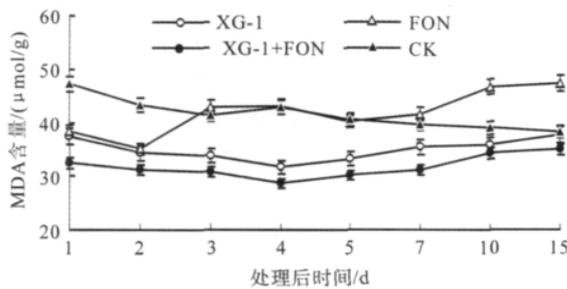


图 5 内生菌 XG-1 处理后西瓜苗叶片 MDA 含量的变化

3 结论与讨论

近年来,生防菌在诱导植物抗病性方面的作用备受关注,国内外研究表明,参与植物体内多种生理代谢过程的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、多酚氧化酶(PPO)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)等系列保护酶,与植物的防卫反应及抗病性密切相关,通常用作衡量植物体内防卫反应的重要指标^[15]。PAL 和 PPO 与植物体内酚类物质和木质素的形成有关,是获得系统抗性的关键调节酶^[16]。POD 和 CAT 与植物体内活性氧的清除密切相关,与植物的抗病性呈正相关。Liang 等^[17]在黄瓜根部挑战接种生防菌 L8 和猝倒病病原菌,发现黄瓜幼苗猝倒病的发病率降低,根部和叶片中 POD、CAT、PPO 和 PAL 活性比对照显著升高。Vanitha 等^[18]报道,在番茄根际接种荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)增强了番茄对青枯病的抗性,PPO、PAL 等防御酶活性显著提升,且通过 RT-PCR 方法发现,相关防御酶合成基因的表达水平显著升高。

本试验结果显示,对西瓜苗同时接种内生菌 XG-1 和枯萎病菌 FON 后,叶片 PAL、POD、PPO 及 CAT 等防御酶活性比单独接种 FON 有所提高,表明诱导抗病作用是内生菌 XG-1 的重要作用机制之一。菌株 XG-1 及病原菌 FON 处理西瓜苗后,叶片 PAL、POD、PPO 及 CAT 等 4 种酶的变化趋势较为一致,活性高峰及低谷出现的时间比较接近,推

测与所诱导的抗性信号传递顺序和强度有关。

MDA 作为膜脂过氧化作用的最终产物,其含量高低可反映细胞膜脂过氧化的程度,与细胞膜的损害程度呈正相关^[19]。李文英^[20]等研究报道,施用植物根际促生菌(PGPR)的香蕉叶片中,MDA 含量显著低于只接种病原菌 FOC4 的叶片,降低了 4.4%~10.6%。本研究结果显示,同时接种内生菌 XG-1 和病原菌 FON 后西瓜苗叶片的 MDA 含量低于单独接种 FON 的叶片,表明内生菌 XG-1 处理可减缓病原菌 FON 侵染幼苗造成的细胞膜受损程度,增强西瓜植株对枯萎病的抗病性。

参考文献:

- [1] Fravel D, Olivain C, Alabouvette C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol[J]. *New Phytologist*, 2003, 157: 493-502.
- [2] Zhang Z, Zhang J, Wang Y. Molecular detection of *F. oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 249: 39-47.
- [3] Ozaktan H, Bora T. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melon* is by the formulations of *Fluorescent pseudomonas* [J]. *Journal of Turkish Phytopathology*, 2000, 29(23): 133-149.
- [4] Chen F, Wang M, Zheng Y, et al. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579 [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(4): 675-684.
- [5] 商闯, 贾银锁, 马春红, 等. HMC 毒素培养滤液对专化寄主玉米叶片诱导抗病性及相关酶的影响[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(12): 4307-4313.
- [6] Zhao H C, Zhao H, Wang B C, et al. Effect of local stress induction on resistance-related enzymes in cucumber seeding [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2005, 43(1): 37-42.
- [7] Pellegrini L, Rohfritseh O, Fritig B, et al. Phenylalanine ammonialyase in tobacco [J]. *Plant Physiology*, 1994, 106(3): 877-886.
- [8] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [9] 岳菊, 刘邮洲, 张荣胜. 西瓜枯萎菌拮抗细菌的筛选、鉴定及防效测定[J]. *中国生物防治学报*, 2011, 27(3): 428-432.
- [10] Meyer G, Capieau K, Buchala A, et al. Nanogram amount of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activates the systemic acquired resistance pathway in bean [J]. *Mol*

Plant Microbe Interact, 1999, 12: 405-410.

- [11] Lee H J, Park K H, Shim J H, *et al.* Quantitative changes of plant defense enzymes in biocontrol of pepper (*Capsicum annuum* L.) late blight by antagonistic *Bacillus subtilis* HJ927[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 15(5): 1073-1079.
- [12] Fu J M, Huang B R. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress[J]. Environmental and Experimental Botany, 2001, 45(2): 105-114.
- [13] Park Y S. Carbon dioxide-induced flesh browning development as related to phenolic metabolism in 'Nikitaka' pear during storage[J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 1999, 40: 567-570.
- [14] 贾显禄. 小麦与小麦秆锈菌互作及非亲合机制研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 1997.
- [15] Muthukumar A, Eswaran A, Sangeetha G. Induction of systemic resistance by mixtures of fungal and endophytic bacterial isolates against *Pythium aphanidermatum* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2011, 33: 1933-1944.
- [16] Avdiushko S A, Ye X S, Kuc J. Detection of several enzymatic activities in leaf prints of cucumber plants [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1993, 42: 441-454.
- [17] Liang J G, Tao R X, Zhang X. Induction of resistance in cucumber against seedling damping-off by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) *Bacillus megaterium* strain L8[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(36): 6920-6927.
- [18] Vanitha S C, Umesha S. *Pseudomonas fluorescens* mediated systemic resistance in tomato is driven through an elevated synthesis of defense enzymes[J]. Biologia Plantarum, 2011, 55(2): 317-322.
- [19] 宋鸣凤, 郑重, 葛秀春. 活性氧及膜脂过氧化在植物一病原物互作中的作用[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(5): 377-385.
- [20] 李文英, 彭智平, 杨少海, 等. 植物根际促生菌对香蕉幼苗生长及抗枯萎病效应研究[J]. 园艺学报, 2012, 39(2): 234-242.

(上接第 65 页) 土壤微生物量 C 既是土壤有机质和土壤养分转化和循环的动力, 也是土壤中活性的有效成分, 土壤微生物量 N 含量则是土壤微生物对 N 素矿化与固定持续作用的综合反映^[13-14], 说明土壤微生物对 N 素的固定持续作用主要取决于土壤微生物本身的生物量大小。生物肥中所含有的活性菌体在适宜温度、水分条件下会迅速繁殖, 不仅起着激活土著微生物的作用, 同时还增加土壤外源微生物数量, 有利于加速土壤养分的分解、转化和释放, 从而改善土壤环境和微生物区系。但是不同的生物肥因其具有独特的特性, 因此对土壤水分、温度条件有不同的响应。

参考文献:

- [1] 沈德龙. 农业行业标准: NY 884—2004《生物有机肥》[S]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [2] 沈德龙, 曹凤明, 李力. 我国生物有机肥的发展现状及展望[J]. 中国土壤与肥料, 2007(6): 1-4.
- [3] 赵雪梅. 国内生物肥应用研究进展[J]. 赤峰学院学报: 自然科学版, 2007, 23(3): 28-30.
- [4] 邓接楼. 生物有机肥对蔬菜产量及经济效益的影响[J]. 长江蔬菜学术版, 2009(12): 57-58.
- [5] 沈德龙, 曹凤明, 李力. 我国生物有机肥的发展现状及展望[J]. 中国土壤与肥料, 2007(6): 1-4.
- [6] 王艾平, 邓接楼. 生物有机肥对水稻产量和品质影响的研究[J]. 作物杂志, 2006(5): 28-30.
- [7] 李梦梅, 龙明华, 黄文浩, 等. 生物有机肥对提高番茄产量和品质的机理初探[J]. 中国蔬菜, 2005(4): 18-20.
- [8] Joergensen R G, Schmaedeke F, Windhorst K, *et al.* Biomass and activity of microorganisms in a fuel oil contaminated soil [J]. Soil Biol Biochem, 1995, 27(9): 1137-1143.
- [9] 吴金水. 土壤微生物生物量测定方法及其应用[M]. 北京: 气象出版社, 2006: 109-130.
- [10] 国秀丽. 温度和水分对土壤碳、氮转化影响的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2003.
- [11] 李云玲. 不同土壤水分条件下生物菌肥施用效果的影响[D]. 太谷: 山西农业大学, 2004.
- [12] Chen A L, Wang K R, Xie X L. Effects of fertilization system and nutrient recycling on microbial biomass C, N, and P in a red-dish paddy soil [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2005, 24: 1094-1099.
- [13] 李世清, 李生秀. 有机物料在维持土壤微生物体氮库中的作用[J]. 生态学报, 2001, 21(1): 136-142.
- [14] 赵俊晔, 于振文, 李延奇, 等. 施氮量对土壤无机氮分布和微生物量氮含量及小麦产量的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2006, 12(4): 466-472.