

文章编号:1674-7054(2012)01-0062-04

接种生防菌和病原菌对香蕉抗枯萎病的诱导

薛玉潇^{1,2}, 贾慧升^{1,2}, 王国芬², 刘磊², 黄俊生²

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228;

2. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海南 儋州 571737)

摘 要: 使用2株生防枯草芽孢杆菌 A_{5-6} 、 C_{10-1} 和香蕉枯萎病病原菌 (Foc4), 以不同的接种方式对4~5叶香蕉组培苗进行根部接种, 以苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、过氧化物酶 (POD)、多酚氧化酶 (PPO) 这3种与植物抗病性密切相关的酶活性变化为指标, 研究植物产生抗性的时间和强度的变化趋势。结果表明, 经过生防菌 A_{5-6} 和 C_{10-1} 诱导处理的叶片 PAL、POD、PPO 的活性均高于对照 (CK), 生防菌和病原菌混合接种处理的 POD 和 PPO 酶活峰值高于生防菌和病原菌单独接种的处理。

关键词: 生防菌; 香蕉; 诱导抗性

中图分类号: S 668.1; S 603.4

文献标志码: A

香蕉枯萎病 (Fusarium Wilt of Banana) 又名香蕉巴拿马病 (Panama disease), 是由尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* Foc) 侵染而引起的一种毁灭性香蕉真菌病害, 属典型的土传病害^[1]。香蕉枯萎病的危害性巨大^[2], 目前尚未找到一种有效的化学防治方法, 生物防治所起的作用越来越受到人们的重视^[3]。近年来, 植物诱导抗病性 (induced resistance, IR) 及其机理的研究十分活跃^[4]。植物诱导抗病性就是利用物理的、化学的以及生物的方法预先处理植株, 改变植物对病害的反应, 使原来的感病反应产生局部或系统的抗性^[5-6]。苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、过氧化物酶 (POD) 以及多酚氧化酶 (PPO) 是与植物抗病代谢密切相关的3种酶^[7]。PAL 是植物次生代谢, 特别是苯丙烷途径的关键酶和限速酶, 与植物的抗病性直接相关, 该酶活性可以作为植物抗病性的一个生化指标^[8]。POD 活性的增加, 可促进木质素的合成, 木质素不仅形成抵御病原菌侵入植株的物理屏障产物, 酚类化合物经过 PPO 酶氧化形成的高毒性醌类化合物, 其对病原菌具有很强的毒害作用^[9-10]。香蕉体内 PPO、POD 和 PAL 活性的高低与其抗病反应有十分密切的关系^[11]。利用诱导因子激发植物自身的抗病性, 以达到控制植物病害的目的, 既不污染环境, 又有利于农业的可持续发展^[12-13]。笔者研究2株生防枯草芽孢杆菌 A_{5-6} 、 C_{10-1} 对香蕉组培苗防御酶系 PAL、POD、PPO 的活性影响, 旨在探索诱导香蕉对枯萎病产生抗性的条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试苗木 4~5叶巴西蕉袋装组培苗。

1.1.2 供试菌 对香蕉枯萎病病原菌具拮抗活性的枯草芽孢杆菌 A_{5-6} 和 C_{10-1} ; 病原菌为 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 4号生理小种 (Foc4)。

收稿日期: 2011-12-18

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研项目 (200903049)

作者简介: 薛玉潇 (1986-) 女, 河南焦作人, 海南大学农学院 2009 级硕士研究生。

通信作者: 黄俊生, 研究员, 主要从事热带作物生物技术。E-mail: H888111@126.com; 0898-23300187

1.2 方法

1.2.1 生防菌对香蕉组培苗的接种处理^[4]及采样方法 在菌株 A_{5-6} 和 C_{10-1} 活化平板上取 1 个单菌落接种 LB 液体培养基 30 ℃ 培养 24 h, 离心后收集菌体, 无菌水清洗 3 次, 梯度稀释法稀释菌落浓度至 10^6 / mL。采用孢子悬浮液法, 将无菌水注入长满 Foc4 的 PDA 平板中, 洗去病原菌孢子, 用血球计数板计数后稀释成菌落浓度为 10^6 / mL 的孢子悬浮液, 在超净工作台上, 使用无菌水彻底清洗无菌香蕉组培苗的根部, 每瓶 10 株并加入不同的菌液进行浸根接种处理: ① A_{5-6} 菌液 20 mL · 瓶⁻¹, ② C_{10-1} 菌液 20 mL · 瓶⁻¹, ③ A_{5-6} 菌液 20 mL · 瓶⁻¹, 12 h 后加入稀释的 Foc4 孢子悬浮液 2 mL, ④ C_{10-1} 菌液 20 mL · 瓶⁻¹, 12 h 后加入稀释的 Foc4 孢子悬浮液 2 mL, ⑤ Foc4 孢子悬浮液 20 mL · 瓶⁻¹, ⑥ 无菌水 20 mL · 瓶⁻¹。

分别于接种后的第 1、3、5、7、9 天, 用消毒剪刀剪取顶端香蕉叶片, 液氮冷冻后于 -80 ℃ 冰箱保存, 用于酶粗液制备。

1.2.2 酶粗液提取和酶活测定方法^[15-17]

1.2.2.1 酶粗提液的制备 称取 0.5 g 叶片, 放入预冷的研钵, 加入 1.5 mL 硼酸钠缓冲液 (0.2 mmol · L⁻¹, pH8.8, 内含 5 mmol · L⁻¹ 巯基乙醇, 1 mmol · L⁻¹ EDTA), 冰浴研磨成匀浆, 用 1.5 mL 硼酸钠缓冲液冲洗研钵、研棒, 一并转入离心管, 涡旋约 30 s, 在 4 ℃ 下静置 30 min, 取出, 然后在 14 000 r · min⁻¹, 4 ℃ 下高速离心 20 min, 上清液即为苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、过氧化物酶 (POD)、多酚氧化酶 (PPO) 的粗提液, -40 ℃ 冰柜保存。

1.2.2.2 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性测定 取酶粗提液 0.1 mL, 加 2.4 mL 硼酸钠缓冲液 (0.1 mol · L⁻¹, pH8.8), 摇匀后加入以此硼酸钠缓冲液配制 0.02 mol · L⁻¹ 的 L-苯丙氨酸 1 mL 混匀, 测定起始 OD_{290} 值。在 40 ℃ 水浴中反应 15 min, 放入冰浴中终止反应, 以 1 mL 水代替底物进行同样的反应作对照, 测定反应后的 OD_{290} 。以每小时 OD_{290} 变化 0.01 为 1 个酶活力单位 U, 每个样品重复 3 次。

1.2.2.3 过氧化物酶 (POD) 活性测定 取酶粗提液 50 μ L, 加入 2.95 mL (0.05 mol · L⁻¹, pH7.8) 的磷酸钠缓冲液、0.025 mol · L⁻¹ 的愈创木酚 1 mL, 摇匀后 30 ℃ 预热 3 min, 再加入 $\varphi=2.5\%$ 的 H_2O_2 1 mL, 立即计时并测定 OD_{470} , 每分钟读数 1 次, 读 3 min 内的变化值。用以上磷酸钠缓冲液作对照, 所加试剂和测定管相同, 每处理重复 3 次。以每分钟 OD_{470} 变化 0.01 为 1 个酶活性单位 U。

1.2.2.4 多酚氧化酶 (PPO) 活性测定 取 50 μ L 酶粗提液加入比色杯中, 与 2.95 mL 含 0.02 mol · L⁻¹ 邻苯二酚的磷酸缓冲液 (0.1 mol · L⁻¹, pH6.8) 混合。于 30 ℃ 水浴中反应 2 min 后, 立即计时并测定 OD_{398} , 每 2 min 测定 1 次, 重复测定 3 次。以不加酶液而加同体积的提取缓冲液作空白对照。以每分钟 OD_{398} 变化 0.01 为 1 个酶活性单位 U。

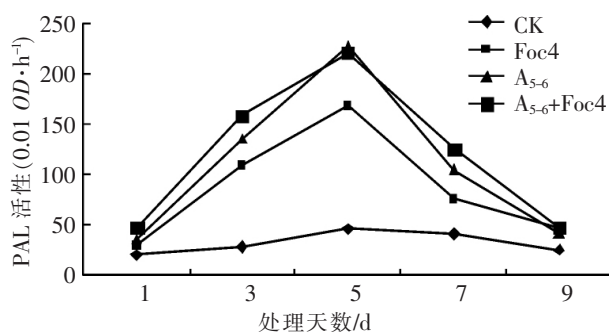


图1 接种 A_{5-6} 和香蕉枯萎病菌后香蕉组培苗叶片 PAL 活性

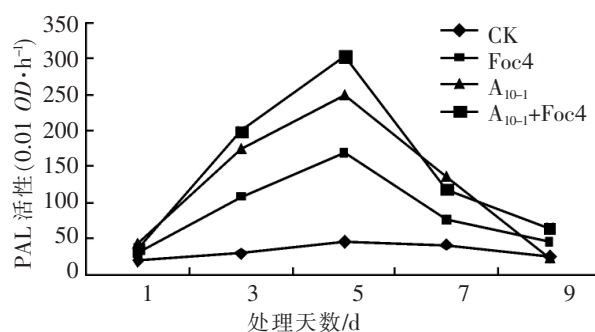


图2 接种 C_{10-1} 和香蕉枯萎病菌后香蕉组培苗叶片 PAL 活性

2 结果与分析

2.1 接种生防菌和香蕉枯萎病菌对香蕉组培苗苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性的诱导 试验结果 (见图 1 和图 2) 显示, 不同的处理接种后, 在第 3 天即表现上升趋势, 持续上升至第 5 天, PAL 活性均达到最高峰。

值,到第7天 PAL 活性回落,接种9天以后, PAL 活性接近接种初期水平。其中,对照组(CK)在接种后第5天 PAL 活性有微弱的上升趋势,推断可能是水培方式引起了植物的应激反应,使得植物的生理代谢发生了变化。其他的接种处理在接种第5天时表现出一致的活性高峰, A_{5-6} 和 C_{10-1} 单独接种的处理在第5天时分别为 225.65 和 245.46,约为 CK 水平(45.47)的 5 倍,为病原菌 Foc4 单独处理的活性水平(168.80)的 1.3 倍,表现出强的诱导能力,而 $C_{10-1} + \text{Foc4}$ 的处理在第5天检测的蕉苗 PAL 活性更高,达 302.27,推测这 2 种菌在互作过程中有新的物质分泌而导致了植物更强的防御体系的表达。

2.2 接种生防菌和香蕉枯萎病菌对香蕉组培苗过氧化物酶(POD)活性的诱导 试验结果(见图3和图4)显示,接种后,对照处理的 POD 活性在第3天无变化,但第5天有轻度上升趋势并持续至第9天,推测原因同图1所示,可能是组培苗对水培方式的适应性变化。生防菌 A_{5-6} 和 C_{10-1} 接种的处理在第5天有上升趋势,第7天 POD 活性达到最高峰值,约为对照的 3.5 倍,病原菌处理的 1.3 倍。这证明这 2 株生防菌在一定条件下能够有效地诱导香蕉植株 POD 的活性提高,以及诱导植物防御反应的开启。2 株菌与病原菌混合接种的处理, POD 活性在第7天达到最高峰值,且略高于生防菌单独处理。这也证明这种接种处理对香蕉 POD 活性有较好的诱导作用。

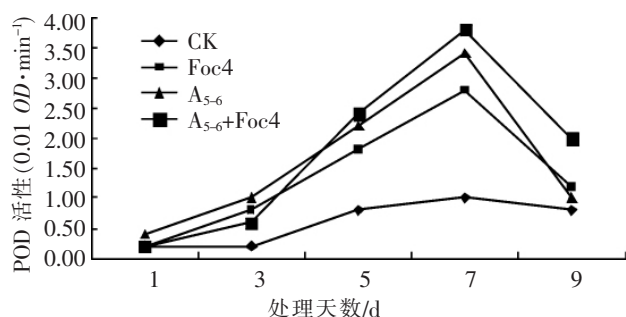


图3 接种 A_{5-6} 和香蕉枯萎病菌后香蕉组培苗叶片 POD 活性

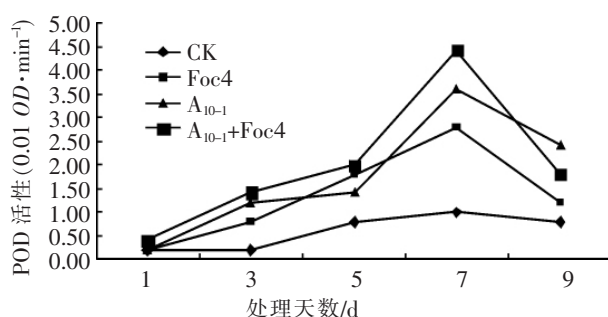


图4 接种 C_{10-1} 和香蕉枯萎病菌后香蕉组培苗叶片 POD 活性

2.3 接种生防菌和香蕉枯萎病菌对香蕉组培苗多酚氧化酶(PPO)活性的诱导 由图5和图6可见,香蕉组培苗经生防菌接种后第7天,各种处理 PPO 的活性变化不大,在第7天2株生防菌与病原菌单独接种的处理活性开始有上升趋势,并在第7~9天迅速上升。在第9天, A_{5-6} 和 C_{10-1} 单独接种的处理 PPO 活性高达 4.79 和 4.44,约为对照的 3 倍,而2株生防菌与病原菌相继混合接种的处理在第9天 PPO 活性为 5.26 和 5.69,均优于生防菌单独接种,此结果与2.2中对 POD 活性诱导的结果相似。这证明这种接种方式可能是对植物防御酶活性诱导更有潜力的接种方式。

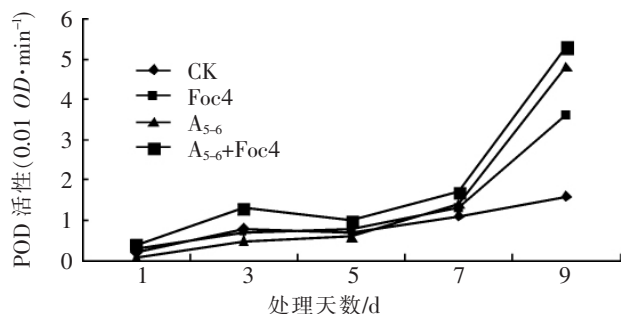


图5 接种 A_{5-6} 和香蕉枯萎病菌后香蕉组培苗叶片 PPO 活性

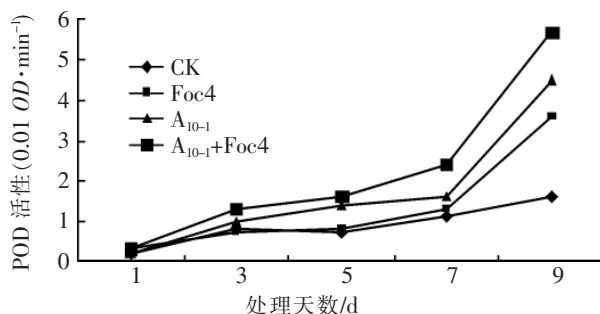


图6 接种 C_{10-1} 和香蕉枯萎病菌后香蕉组培苗叶片 PPO 活性

3 讨论

试验结果表明:(1)在一定时期,经过2株生防枯草芽孢杆菌的处理,香蕉3种防御酶活性均高于CK,证明接种生防菌 A_{5-6} 和 C_{10-1} 能够诱导植物防御酶系活性提高。此结论与前人的研究和试验预期相

符合,进一步证明了生防菌作为生物诱导因子能够有效地诱导植物的抗病性^[5-6]。(2)在 3 种防御酶 (PAL, POD, PPO) 活性达到峰值期间: 生防菌和病原菌相继混合接种处理 > 生防菌单独接种处理 > 病原菌单独接种处理 > CK。由此证明: 病原菌和生防菌 A_{5-6} , C_{10-1} 都能诱导香蕉的系统抗性,而生防菌和病原菌相继混合接种对 POD 和 PPO 有更强的诱导效果。这证明生防菌和病原菌以一定比例混合接种的方式也是一种很有潜力的诱导方式。由此可以考虑使用生防菌和病原菌非致病生理小种混合作为香蕉抗性诱导剂进行进一步的研究。(3)经过生防菌处理 3 种防御酶的活性开始发生变化的时间和变化的幅度各不相同, PAL 的活性在第 3 天有明显的升高趋势,第 5 天达到高峰, POD 的活性在接种后也立即表现出上升趋势,但在第 9 天才达到最高峰。PPO 的活性在接种前后 7 d 都没有明显的变化趋势,到第 9 天才出现活性猛增。这些酶活性高峰出现时间的异同,可能与其在植物中防御反应起作用的时间有关,也可能跟诱导其活性升高的诱导剂的选择相关。

国内外的研究证明,香蕉植株的 PAL, POD 和 PPO 等防御酶系的活性与香蕉对枯萎病的抗性密切相关^[18],所以在香蕉苗期,通过高效的诱导因子诱导这些防御酶系活性提高,对于香蕉组培苗在移植期间有效地抵抗枯萎病病原菌的侵染和在体内的繁殖都具有重要的意义。试验结果表明,植物的防御酶在外界诱导因子的作用下,不同的酶对外界的诱导有不同的表达时间,这对于在田间进行生物防治时,生防菌施入的周期和时间有重要的参考意义。施入时间、施入周期和强度的控制,对于提高植物整体防御酶系的活性和维持其高活性状态以达到实现对枯萎病的有效抗性均有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] PLOETZ R C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense [J]. Phytopathology 2006, 96(6): 653-656.
- [2] 王振中. 香蕉枯萎病及其防治研究进展 [J]. 植物检疫 2006(3): 198-200.
- [3] 杨秀娟, 杜宜新, 甘林, 等. 香蕉枯萎病生物防治和抗病育种研究进展 [J]. 中国果树 2008(6): 42-44.
- [4] 孙丽华, 宋刚, 云兴福. 黄瓜霜霉病诱导抗性的研究进展 [J]. 内蒙古农业大学学报 2007 28(3): 306-308.
- [5] 郑莉, 梁建根, 施跃峰. 生防菌 ZJH-10 对黄瓜灰霉病诱导抗性的研究 [J]. 中国农学通报 2009 25(3): 197-201.
- [6] 陈志谊, 许志刚, 陆凡, 等. 拮抗细菌 B-196 对水稻植株的抗性诱导作用 [J]. 西南农业学报 2001, 14(2): 44-48.
- [7] ZHAO H C, ZHAO H, WANG B C, et al. Effect of local stress induction on resistance-related enzymes in cucumber seedling [J]. Colloids Surf B Biointerfaces. 2005, 43(1): 37-42.
- [8] PELLEGRINI L, ROHFRTSEH O, FRITIG B, et al. Phenylalanine ammonialyase in tobacco [J]. Plant Physiology, 1994, 106(3): 877-886.
- [9] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学 [M]. 北京: 科学出版社 2001: 770-807.
- [10] RAY H, DOUCHES D S, HAMMERSCHMIDT R. Transformation of potato with cucumber peroxidase: Expression and disease response [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology 1998, 53: 93-103.
- [11] KAVINO M, KUMAR N, DAMODARAN T, et al. Biochemical markers as a useful tool for the early identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense, race 1 resistance banana clones [J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection 2009, 42(11): 1069-1078.
- [12] 陈芳, 慕小倩, 梁宗锁, 等. 水杨酸对附子叶斑病的诱导抗性及其作用机理研究 [J]. 西北农业学报 2007, 16(2): 245-249.
- [13] 马春红, 李运朝, 董文琦, 等. 低浓度玉米小斑病菌 T 毒素对玉米叶片苯丙氨酸解氨酶活性的诱导研究 [J]. 华北农学报 2007 22(1): 40-43.
- [14] 游春平, 肖爱萍, 傅志岸, 等. 拮抗细菌对香蕉枯萎病的防治效果 [J]. 仲恺农业技术学院学报 2005, 18(4): 16-20.
- [15] 杨述省. 生防菌 JK-2 粗毒素活性物质分析及对香蕉枯萎病诱导抗性的研究 [D]. 福州: 福建农林大学 2009.
- [16] 牛晓磊. 辣椒疫病生防菌剂作用效果及其诱导抗性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学 2005.
- [17] 董玉红. 蔬菜抗炭疽病诱导物的筛选及诱导抗性生化机理研究 [D]. 南京: 南京农业大学 2000.
- [18] KOEPPER J W, TUZUN S, KUC J A. Proposed definitions related to induced disease resistance [J]. Biocontrol Science and Technology, 1992, 2(4): 349-351.

Record of *Chelonus formosanus* Sonan of *Chelonus* Panzer from China

JI Xun-cong , YUE Jian-jun , QIN Shuang , CHEN Hai-yan

(Institute of Agricultural Environment and Plant Protection , Hainan Academy of Agricultural Sciences/ Hainan

Key Laboratory for Plant Pest and Disease Control , Haikou 571100 , China)

Abstract: *Chelonus formosanus* Sonan of *Chelonus* Panzer was recorded in Hainan Island , China , and its specimens with the description , distribution , host records and characteristic graph are placed available in the Institute of Agricultural Environment and Plant Protection , Hainan Academy of Agricultural Sciences.

Key words: Hymenoptera; Braconidae; Cheloninae; *Chelonus* Panzer; *Chelonus formosanus* Sonan; Hainan Island

(上接第 65 页)

Induction of banana *Fusarium* Wilt disease with biocontrol bacteria and pathogen by inoculation

XUE Yu-xiao^{1 2} , JIA Hui-sheng^{1 2} , WANG Guo-fen² , LIU Lei² , HUANG Jun-sheng²

(1. College of Agronomy , Hainan University , Haikou 570228 , China; 2. Environment and Plant Protection Institute ,

Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences , Danzhou 571737 , China)

Abstract: Banana vitroplants of 4—5 leaves were inoculated in different ways with two biocontrol bacteria *Bacillus subtilis* strains A₅₋₆ and C₁₀₋₁ and the banana *Fusarium* wilt pathogen (Foc4) to observe their changes of polyphenol oxidase (PPO) , peroxidase (POD) and phenylalanine ammonialyase (PAL) activities in leaves , which are related to plant tolerance to the disease. The PPO , POD and PAL activities in the leaves of the banana plants were determined by using the physiological and biochemical methods. The banana plants inoculated with the strains A₅₋₆ and C₁₀₋₁ separately showed higher leaf PPO , POD and PAL activities than those inoculated with the sterile water control , and the banana plants inoculated with mixture of the biocontrol bacteria and Foc4 pathogen had higher leaf PPO , POD and PAL activities than those inoculated with Foc4 alone.

Key words: banana; *Fusarium* wilt; *Bacillus subtilis*; induced tolerance