

油茶内生细菌 Y13 诱导油茶植株对炭疽病系统抗性研究

周国英, 宋光桃, 布婷婷, 李石磊, 赵莹, 王慧敏

(中南林业科技大学 经济林培育与保护教育部重点实验室, 湖南 长沙 410004)

摘要: 油茶内生细菌 Y13 发酵液可以诱导油茶叶片对炭疽病的系统抗性。Y13 诱导处理后, 植株叶内苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)和超氧化物歧化酶(SOD)活性明显增强。Y13 单独诱导、炭疽病菌单独接种和同时 Y13 和炭疽病处理诱导后各种防御酶活性较清水对照均有所提高, 同时 Y13 和炭疽病处理组诱导处理第 3 d PAL 活性达到最大, 为清水对照的 2.9 倍, 只接种 Y13 及炭疽病处理组 PAL 活性于第 5 d 达到高峰, 分别是对照组的 2.1 和 2.8 倍; POD 和 SOD 诱导后第 5 d 活性最高, 分别比对照增加了 15.5-29.5 及 8.5-20.5 个酶活性单位, 11 d 后仍比对照高; PPO 诱导后 3 d 达活性高峰, 7d 后迅速下降, 后趋于正常水平。活性氧(O_2^-)产生速率诱导后 1 d 最大, 比对照增加 80.6%, 随后下降, 10d 左右接近对照, Y13 单独诱导和同时 Y13 和炭疽病菌诱导均使 MDA 含量在第 1d 时迅速下降, 第 3d 左右比对照下降了 36%。

关键词: 内生细菌 Y13; 油茶炭疽病; 防御酶系; 诱导抗性

Induction effects of Endophytic Bacteria Y13 on the Resistance Associated Enzymes Activities in Camellia

ZHOU Guo-ying, SONG Guangtao, BU Ting-ting, ZHAO Ying, LI Shi-lei, DENG Xiao-jun

(Nonwood Forest Cultivation and Protection Key Laboratory of the Ministry of Education, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004)

Abstract: Systemic resistance in camellia leaves against anthracnose could be induced by endophytic bacteria Y13 strains in the camellia. After induction treatment of Y13, the activities of phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO) and superoxide dismutase (SOD) in the plant leaves increased obviously. Compared with control, the defense enzyme activity Vaccination Y13, anthrax bacteria and simultaneously inoculation Y13 and anthrax after induction treatment is improved, and the PAL activity of vaccination Y13 and anthrax reached their maximum 3 days after the treatment, and showed 2.9 fold higher more than the water control treatment. When only anthrax vaccine or Y13, the PAL activity reached a peak in 5 days, 1.7 and 2.3 fold higher more than the water control treatment respectively; the activity of POD and SOD after induction come to the highest in 5 days, increased of 15.5-29.5 and 8.5-20.5 units of one activity respectively, compared with the control treatment, and kept higher activities for more than 11 days; PPO activity reached its peak 3 days after the induction, but decreased rapidly 7 days later, and then tended to normal levels. O_2^- -production

rate reached its peak 1day after the induction,increased of 80.6%, compared with the control treatment,and then

tended to normal level 10 days latter. MDA content Vaccination Y13 Individually and simultaneously inoculation

Keywords: endophytic bacteria Y13; Colletotrichum gloeosporioide; defense enzymes ; induced resistance

油茶是我国特有的食用油料树种，亦是世界四大木本油料树种之一（雷治国等，2003），已有 2000 多年的利用和栽培历史。它适应性广，抗逆性强，主要生长在南方，以湖南、江西、广西为主，其中湖南省是国内最大的油茶产地和最大的茶油消费区。但在生产上，许多病害已严重危害油茶的生产。油茶炭疽病在我国油茶产区普遍发生，引起严重落果、落蕾、落叶、枝枯，甚至整株衰亡（袁嗣令等，1963）。病害落果率通常在 20%左右，严重时 40%以上。目前防治油茶病虫害仍以化学农药防治为主，但过多的使用不仅对人、畜的健康造成危害，而且对环境造成严重污染，破坏生态环境。同时，容易使病菌和害虫产生抗药性（RUSSELL, 1963；杨，1995）。生物防治具有安全、无毒、病原生物对其不易产生抗药性等优点，引起了众多研究者的关注，成为病虫害防治的研究热点。

一些初步的研究已证实，内生细菌在植物体内能够产生多种生物学作用，如固氮作用，促生长作用及对病虫害的防治作用等。周国英等（2008）在油茶体内分离出一种有效防治油茶炭疽病的内生细菌 Y13。拮抗细菌在防治植物病害方面，其作用方式不仅表现在营养和空间竞争，拮抗作用等方面，还表现在其诱导植物抗性方面（吴金平等，2009）。植物诱导抗性即和动物免疫功能类似的植物免疫，被认为是发觉植物内在抗性机制的一种新的病害治理对策。夏正俊等（1996）发现棉花内生细菌 73a 能够有效诱导棉花对大丽轮枝菌的抗性。杨海莲等（2000）研究认为植物根际促生细菌和内生细菌能够诱导水稻产生诱导水稻白叶枯病的诱导活性。周国英等（2010）研究认为油茶内生细菌解淀粉芽孢杆菌 F14 和枯草芽孢杆菌 Y13 对油茶炭疽病有显著的诱导效果，并且能够诱导油茶植株对炭疽病产生系统抗性，最大诱抗效果可达 64.5%。

目前有关油茶炭疽病的抗性诱导研究缺乏，在抗性机理研究方面也只是注重组织病理方面，缺乏系统的研究。本研究拟采用内生细菌 Y13 为诱导因子，在前期研究基础上，对 Y13 诱导油茶苗的相关防御酶的活性变化进行了测定，以期研究 Y13 油茶诱导抗性机制提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

拮抗细菌为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* Y13；油茶炭疽病病原菌 *Colletotrichum gloeosporioides*；均为中南林业科技大学森保实验室分离保存。

1.1.2 油茶苗

供试油茶苗为长林 166 品种 2 年生盆栽苗。

1.1.3 培养基、缓冲液及试剂

马铃薯葡萄糖琼脂培养基培养基(PDA)：马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL；牛肉膏蛋白胨液体培养基(NB)：牛肉膏 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 5.0 g、水 1 000 mL；

磷酸缓冲液 pH 6.8：

0.05M 磷酸缓冲液配制方法：母液 A+母液 B+蒸馏水定容至 400ml

母液 A：0.2M 磷酸二氢钠（27.8gNaH₂PO₄·H₂O 加蒸馏水配成 1000ml）

母液 B：0.2M 磷酸氢二钠（53.65gNa₂HPO₄·7H₂O 加蒸馏水配成 1000ml）

PH6.8PBS 缓冲液：母液 A51ml+母液 B49.5ml

试剂：聚乙烯吡咯烷酮，石英砂，愈创木酚，过氧化氢，邻苯二酚，L-苯丙氨酸，甲硫氨酸，氯化硝基四氮唑蓝，核黄素，硫代巴比妥酸，乙醇，三氯乙酸等均为国产分析纯。

1.2 接种取样

将生防菌 Y13 接种到 NB 培养基中，于 30 ℃、140r/min 振荡培养 72 h，并将发酵液稀释至 1×10⁸ cfu/ml，将 Y13 发酵液做以下 4 种处理：只接种 Y13 发酵液为处理一，只接油茶炭疽病为处理二，同时接 Y13 和炭疽病为处理三，清水对照为处理四。将培养好的 Y13 发酵液采用喷雾法接种油茶苗，喷湿油茶苗至水滴下为止，培养好的炭疽病原菌配成孢子悬浮液针刺接种茶苗，每处理 6 株，接种后保湿培养 24 h，每个处理分别在接种后 0 d、1 d、3 d、5 d、7 d、9 d、11 d、13 d 取样，进行各项生理指标测定，每份样品 0.5 g，3 次重复，置冰箱保存备用。

1.3 防御酶活性测定

粗酶液的提取参照童蕴慧等（2004）的方法：取上述待测样品一份（0.5 g 油茶叶片），加 0.1 g 聚乙烯吡咯烷酮（PVP）和 5 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液（pH 6.8）及少量石英砂冰浴研磨成匀浆，4 ℃，12 000 rpm 离心 20 min，上清液为粗酶液。苯丙氨酸解氨酶（PAL）、过氧化物酶（POD）、超氧化物歧化酶（SOD）和多酚氧化酶（PPO）活性测定参照张志良等（2004）、李合生（2003）、周琦（2001）和朱广廉（1990）的方法进行。

1.4 活性氧 (O₂⁻) 产生速率测定

样品处理同防御酶活性测定。O₂⁻产生速率测定参照汤章城等(1999)和王爱国等(1990)的方法进行。

1.5 丙二醛 (MDA) 含量测定

参照邹琦(2001)的方法,称取 0.5 g 叶片,加入少许石英砂和 10%的 TCA 8 mL,冰浴研磨,浸提液冷冻离心 10 min (10000 rpm),取上清液 2 mL 加入 0.6%硫代巴比妥酸 (TBA) 2 mL 混匀后,于沸水浴反应 20min,迅速冷却,离心。取上清液测定 532 nm、600 nm、和 450 nm、波长下的吸光度。用水作参比,计算公式:

$$\text{CMDA } (\mu\text{ mol/L}) = 6.45 (\text{OD}_{523} - \text{OD}_{600}) - 0.56\text{OD}_{450}$$

$$\text{MDA 含量 } (\mu\text{ mol/g FW}) = \text{CMDA} \times \text{样品提取液体积 (mL)} / \text{样品鲜重 (g)}$$

2 结果与分析

2.1 油茶体内 PAL 活性动态变化

不同处理后,油茶叶片 PAL 活性动态变化如图 1 所示:

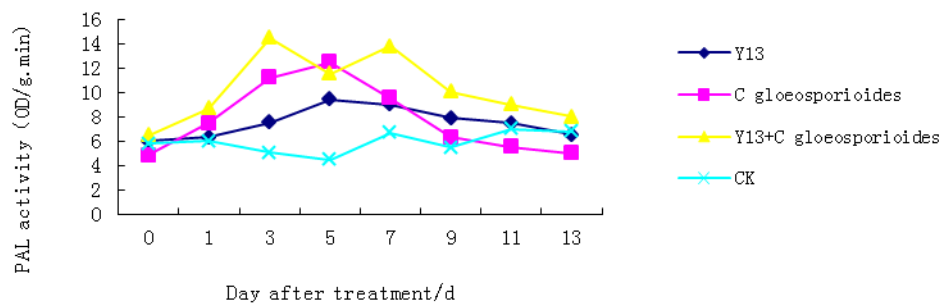


图 1 不同处理的 PAL 酶活性变化

Fig.1 change of PAL activity with different treatments in *Camellia oleifera* leaves

测定结果显示: Y13 发酵液诱导和炭疽病接种的处理, 均能诱导 PAL 活性升高, 第 1d 各处理组 PAL 活性均保持在相似的较低水平, 第 3d 各处理 PAL 活性逐渐上升, 同时 Y13 诱导和炭疽病处理组活性达到最高值, 为 CK 的 2.9 倍。Y13 处理和炭疽病菌处理第 5d PAL 活性达到最高值, 且接菌处理 > Y13 诱导, 分别为 CK 的 2.1 倍和 2.8 倍, 同时处理组活性稍有下降, 但仍处于较高水平, 第 5d 后 Y13 处理组和炭疽病菌处理组均有不同程度的下降, 接炭疽病菌处理下降速度较快, 第 7d 时同时接菌处理达到第二活性高峰, 且高于其他处理组, 第 11d 后各处理的 PAL 活性基本恢复到第 1d 的水平, 并不断缓慢降低, 并保持大

致相似的活性水平。

2.2 油茶体内过氧化物酶 (POD) 活性动态变化

不同处理后，油茶叶片过氧化物酶活力动态变化如图 2 所示：

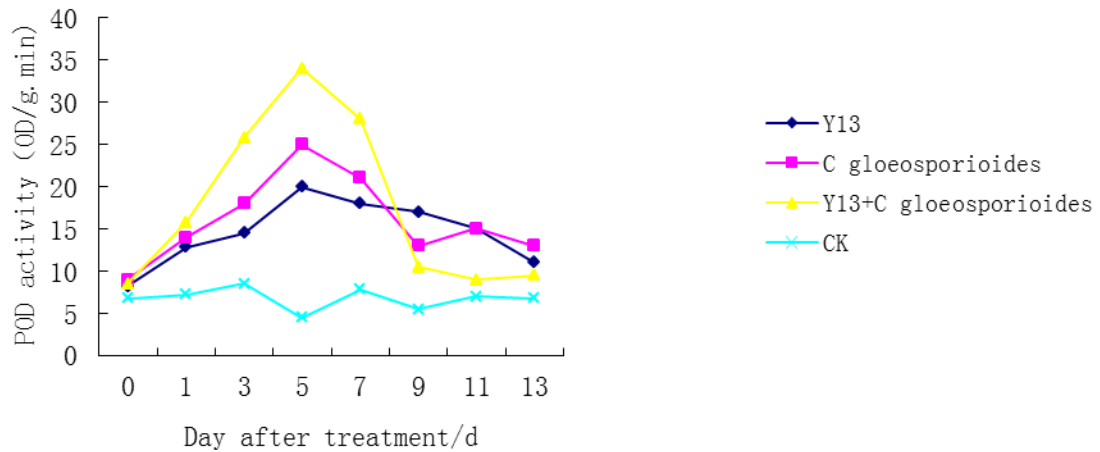


图 2 不同处理的 POD 酶活性变化

Fig.2 change of POD activity with different treatments in *Camellia oleifera* leaves

实验结果表明，各处理组均能引起油茶叶片中 POD 酶活增强。第 1d 各处理组 POD 活性逐渐上升，第 3dPOD 活性开始较快增加，第 5dY13 诱导、接炭疽病菌及 Y13 和炭疽病同时处理 POD 活性均达到最大值，POD 活性大小依次为同时接 Y13 和炭疽病菌>炭疽病菌>Y13 诱导>CK，分别为对照的 7.5、5.5、4.4 倍。随后各处理的 POD 活性开始下降，在第 13d 降低到正常水平。从趋势线走势上看，同时接种炭疽病菌和 Y13 的趋势线最高，有最高峰点，其次是只接炭疽病处理，再次是只接种 Y13 的处理，无明显最高峰值，但始终高于 CK，13 d 后与 CK 持平。

2.3 油茶体内超氧化物歧化酶 (SOD) 活性动态变化

不同处理后油茶叶片 SOD 活性变化趋势如图 3 所示：

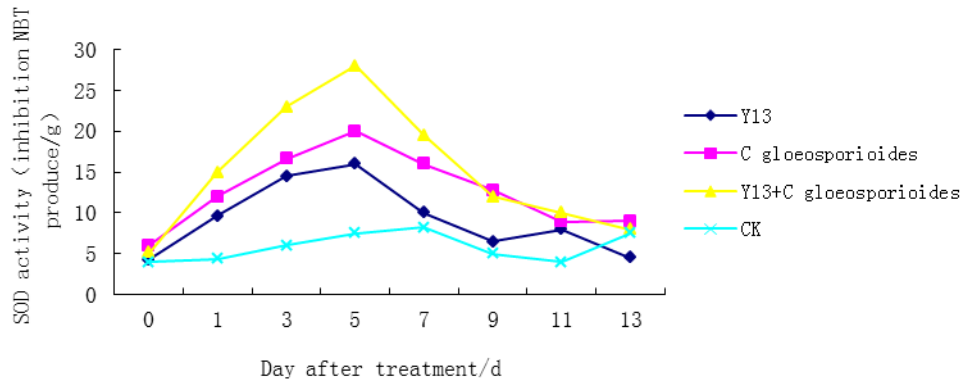


图3 不同处理的 SOD 酶活性变化

Fig.3 change of POD activity with different treatments in *Camellia oleifera* leaves

测定结果显示：各处理在第 1d SOD 活性都迅速升高，同时进行 Y13 诱导和炭疽病菌接种处理组 SOD 活性上升速度最快，其次是炭疽病菌接种处理，在第 5d 各处理组 SOD 活性达到高峰，Y13、Cgl 及 Y13+Cgl 处理分别高于 CK 处理 113%、166% 和 273%，随后开始下降，至第 13d 左右各处理组酶活性仍稍高于 CK 处理。

2.4 油茶体内多酚氧化酶（PPO）活性的动态变化

不同处理方式处理油茶苗后，PPO 活性动态变化趋势如图 4 所示：

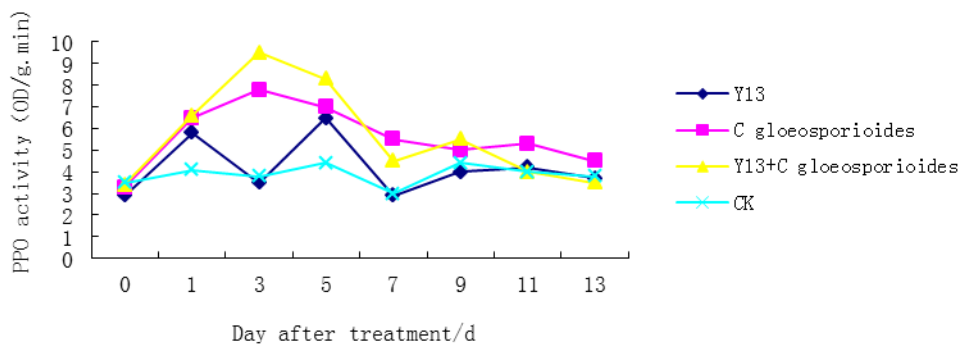


图4 不同处理的 PPO 酶活性变化

Fig.4 change of POD activity with different treatments in *Camellia oleifera* leaves

测定结果显示：Y13 诱导处理 PPO 活性变化趋势呈现上升-下降-再上升的变化，无规律可循，在第 1 d 和第 5 d 有峰值，分别为对照的 1.4 和 1.5 倍，到 10 d 后和对照持平；只接种炭疽病菌的处理和同时接种炭疽病及 Y13 的处理 3 d 之内 PPO 活性迅速上升，3~5 d 到达最高峰，分别为对照的 2.0 和 2.5 倍，到第 5 d 迅速下降，同时接种 Y13 和炭疽病菌下降较

快，但仍为对照的 1.6 和 1.9 倍，第 10d 后恢复到正常水平。

2.5 油茶体内活性氧 (AOX) 产生速率变化

不同处理方式处理油茶苗后，AOX 产生速率动态变化趋势如图 5 所示：

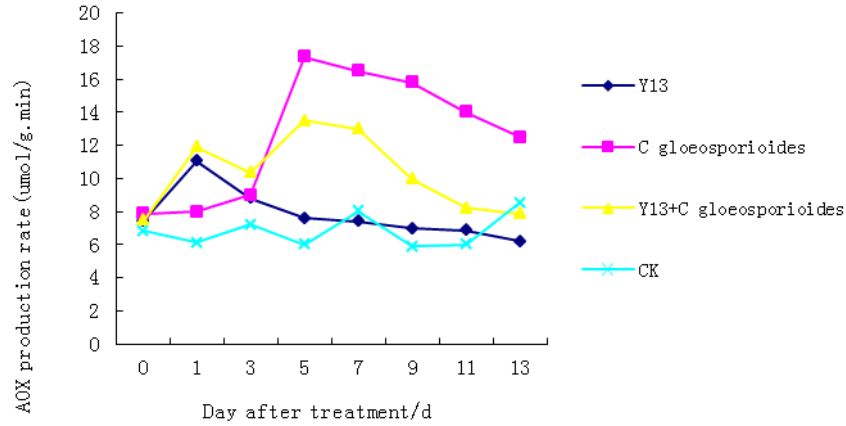


图 5 不同处理的 AOX 产生速率变化

Fig.5 change of AOX production with different treatments in *Camellia oleifera* leaves

由图 5 可以看出，Y13 诱导处理后，油茶叶片内的活性氧第 1d 升高，比对照高 80.6%，后急剧下降，到第 3d 仍比对照高 22.2%，后缓慢下降，第 7d 时与对照相近。炭疽病菌单独接种处理开始时缓慢上升，3d 后急剧上升，第 5d 达到高峰，比 CK 组提高了 189%，后缓慢降低，但持续处在较高水平，显著高于其他各处理组。同时接种 Y13 及炭疽病菌处理在第 1d 缓慢上升，和 Y13 单独诱导处理相似，第 3d 有所下降，第 5d 又达到一个高峰值，随后又逐渐下降，第 10d 左右与对照接近。

2.6 油茶体内丙二醛 (MDA) 含量变化

不同处理方式处理油茶苗后，MDA 含量动态变化趋势如图 6 所示：

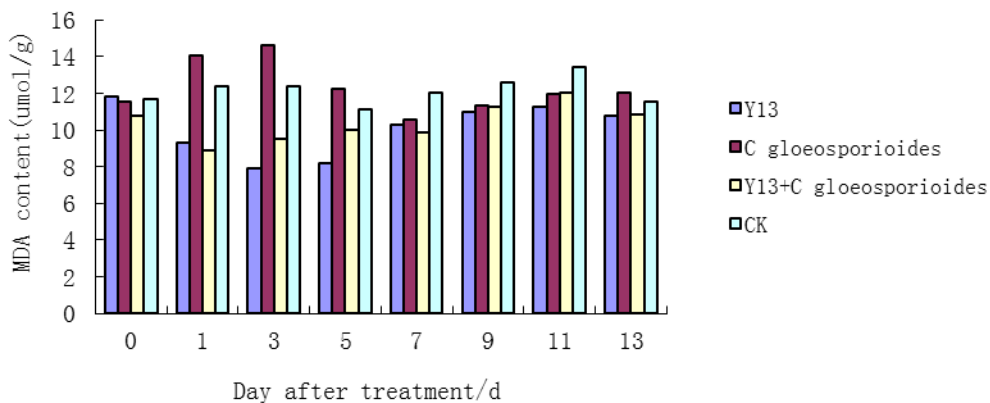


图 6 不同处理的 MDA 含量变化

Fig.6 change of MDA content with different treatments in *Camellia oleifera* leaves

丙二醛 (MDA) 是细胞通透性指标, 是细胞膜脂过氧化的最终产物, 其含量的高低可作为膜脂过氧化程度的标志。由图 6 可知, 与对照相比, Y13 诱导处理后, 油茶体内 MDA 含量呈下降趋势, 第 1d 迅速下降, 至第 3d 比对照低 36%, 第 7d 后开始上升, 到第 13d 左右与 CK 持平。炭疽病菌单独接种处理第 1d 开始快速上升, 到第 3d 上升到最高值, 比 CK 增加了 18.2%, 第 5d 开始下降, 第 13d 与 CK 处理接近。同时 Y13 诱导和炭疽病菌接种处理的 MDA 含量变化趋势与 Y13 单独诱导相似。以上结果表明, Y13 单独诱导和同时进行 Y13 和炭疽病菌接种均可使油茶体内的 MDA 含量显著降低, 因此, Y13 菌株可减少炭疽病菌感染后植株体内 MDA 含量, 减轻病菌对寄主细胞膜的破坏作用, 从而减轻或抑制病害的发生。

3 讨论

植物在受到病菌的侵害或在正常代谢反应情况下, 都会产生 O_2^- 和 H_2O_2 等活性氧物质, 活性氧物质的过多积累会造成膜脂过氧化, 破坏细胞膜的完整性, MDA 的含量是脂膜过氧化程度的指标。研究表明, 过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)和超氧化歧化酶(SOD)等几种抗病相关酶都与植物寄主的抗病反应密切相关。SOD 等是细胞内活性氧物质的清除剂, 增强体内酚类物质的氧化作用, 增强细胞壁木质化, 阻止病菌的侵入, 提高寄主的抗病性。Y13 诱导处理后, 油茶植株体内 PAL、POD、SOD 和 PPO 等防御酶活性显著增加, 表明这些防御酶在拮抗细菌诱抗过程中起重要作用。Jetiyano 等(1995)研究认为植物早期防御反应包括增强氧化酶活性, 增加 SOD 活性, 提高木质化程度等, 这些都与菌株 SE49 诱导抗病性有关。

内生细菌 Y13 作为在油茶病害防治中发挥重要作用的生防因子, 具有诱导抗病性的特点。本试验表明, 喷施 Y13 发酵液后, 可以诱导油茶植株内 PAL、POD、SOD 和 PPO 与抗病性相关的酶类活性大幅度提高, 从而增强了植物防病能力, 抵御了病原菌侵入扩展, 有效控制病害, 从而使得 MDA 含量处于较低水平。研究还显示, 同时接种 Y13 和炭疽病菌对油茶植株内 PAL、POD、SOD 和 PPO 活性影响比单一接种 Y13 和病原菌大, 可能由于拮抗菌和病原菌都可以诱导这些酶的活性。这也验证了诱导因子的抗性诱导作用与逆境压力有关 (王万能等, 2010)。

内生细菌用作生防菌作为一个新的研究领域, 与其它根际细菌相比, 能够存在于植物内部, 有相对稳定的生存环境, 更有利于其发挥诱导因子的作用, 因而用不引起植物产生病症的内生细菌作为诱导子诱导植物自身的抗病性在生物防治上具有广阔的前景。本实验进行了

内生细菌 Y13 对油茶诱导抗性酶活性的相关研究, 诱导抗性过程中的信号传递是怎样的复杂过程, 还需做更深入的研究。

参考文献

- 雷治国, 黄永芳, 何会蓉. 2003. 油茶及其种质资源研究进展[J]. 经济林研究, 21(4): 123-125.
- 李合生. 2003. 植物生理生化实验原理与技术[M]. 北京: 高等教育出版社.
- 汤章城, 王国强, 史益敏, 等. 1999. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社.
- 童蕴慧, 郭桂萍, 徐敬友, 等. 2004. 拮抗细菌诱导番茄植株抗灰霉病机理研究[J]. 植物病理学报, 34(6): 507-511.
- 王爱国, 罗广华. 1990. 植物的超氧化物自由基与经氨反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯 26(6): 55-57.
- 王万能, 全学军, 肖崇刚. 2010. 植物诱导抗性的机理和应用研究进展[J]. 湖北农业科学, 49(1): 204-206.
- 吴金平, 宋志红, 向发云, 等. 2009. 拮抗细菌在植物病害生物防治中的抗病机理[J]. 湖北农业科学, 9(9): 2286-2288.
- 夏正俊, 顾本康, 吴蔼民. 1996. 植物内生及根际土壤细菌诱导棉花对大丽轮枝菌抗性的研究[J]. 中国生物防治, 12(1): 7-10.
- 杨海莲, 孙晓璐, 宋未. 2000. 植物根际促生细菌和内牛细菌的诱导抗病性的研究进展[J]. 植物病理学报, 30(2): 106-110.
- 杨谦. 1995. 植物病原菌抗药性概论[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社.
- 袁嗣令, 张能唐, 翁月霞, 等. 1963. 油茶炭疽病的研究[J]. 植物保护学报, 2(3): 253-261.
- 张志良, 翟伟. 2004. 植物生理学实验指导(第3版)[M]. 高等教育出版社.
- 周国英, 卢丽俐, 刘君昂, 等. 2008. 油茶炭疽病拮抗内生细菌的筛选[J]. 湖南农业大学学报, 12(6): 698-700.
- 周国英, 陈彧, 刘君昂, 等. 2010. 拮抗细菌诱导油茶植株抗炭疽病研究[J]. 中国森林病虫, 29(3): 1-3.
- 周琦. 2001. 植物生理实验指导[M]. 北京: 中国农业大学出版社.
- 朱广廉, 钟海文, 张海琴. 1990. 植物生理学实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 37-40.
- Jetiyanon K, Wei G. 1995. Induced systemic resistance (ISR) of cucumber by stem injection and seed treatment with PGPR[J]. Phytopathology, 85: 114-147.
- RUSSELL P.E.. Fungicide resistance: occurrence and management [J]. J Agric Sci, 1995, 124: 317-323.