

文章编号:1001-6880(2016)6-0934-05

桃色顶孢霉代谢产物对绿豆白粉病的防治作用

林志伟, 张新, 肖亚静, 左豫虎, 于立河, 孙冬梅*

黑龙江八一农垦大学, 大庆 163319

摘要:应用桃色顶孢霉发酵液中蛋白粗提物、三唑酮处理感病绿豆叶片和植株, 比较分析病斑变化和综合病情指数, 并测定不同处理植株新生叶片中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)含量, 探究桃色顶孢霉发酵液粗提蛋白对绿豆白粉病的影响。结果表明, 喷施粗提蛋白的感病植株叶片的病斑变化明显, 且新生叶片鲜绿, 无白粉病菌侵染症状。与喷施无菌水的对照相比, 喷施粗提蛋白的感白粉病绿豆植株叶片CAT酶活性提高了71.70%, 差异显著, 而POD酶活性降低了8.45%, 且叶片MDA含量降低了29.81%。试验结果证实了桃色顶孢霉发酵液的蛋白粗提物对绿豆白粉病具有一定的防治效果, 并能影响到植物相关抗逆酶的活性。

关键词:桃色顶孢霉; 发酵液粗提蛋白; 绿豆白粉病; 病情指数; 抗逆酶

中图分类号: Q939.95

文献标识码: A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.6.020

Biological Control on Powdery Mildew of Mungbean by *Acremonium persicinum* Fermentation

LIN Zhi-wei, ZHANG Xin, XIAO Ya-jing, ZUO Yu-hu, YU Li-he, SUN Dong-mei*

Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China

Abstract: In order to study the relationship between the crude protein extract of fermentation of *Acremonium persicinum* and powdery mildew on mungbean, the disease index was calculated, and the activity of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT), the content of malondialdehyde (MDA) were all determined. The results showed that the disease index of leaves spraying by crude protein extract was the lightest and new leaves were no longer infected by powdery mildew. Compared with the treatment of spraying sterile water, CAT activity increased by 71.70% ($P < 0.05$) in the treatment of spraying crude protein, but POD activity decreased by 8.45% ($P < 0.05$), MDA content decreased by 29.81% ($P < 0.05$). The result confirmed a certain control effect of crude protein extracted from fermentation of *A. persicinum* on mungbean powdery mildew and on relative anti-resistance enzyme activities of mungbean.

Key words: *Acremonium persicinum*; crude protein of fermentation; mungbean; powdery mildew; disease index; anti-resistance enzyme activity

绿豆具有较高的营养价值和药用价值, 近年来, 国内外需求量逐年上升, 绿豆种植面积也逐年扩大^[1-3]。绿豆白粉病是由子囊菌门, 白粉菌目, 萍白粉菌(*Erysiphe polygoni* DC)引起的真菌性植物病害^[4,5]。绿豆白粉病主要危害绿豆的叶片、茎秆和荚。微生物繁殖速度快, 可以调节植株微生态环境、限制植物病原真菌的繁殖和抑制土传病害的发生。鉴于人们对绿色食品的需求和生物农药对环境良好的兼容性, 生物防治作为植物病害防治手段之一, 逐

渐被人们所关注。目前, 国内外已有以木霉等不同真菌作为生防菌防治土传病原真菌的相关研究主要研究集中在菌体或其代谢物上^[6-10], 但关于代谢蛋白的研究报道较少。本试验是以实验室分离获得的拮抗真菌——桃色顶孢霉(已申请专利)^[11,12]液体发酵后粗提蛋白作为生物农药, 测试了在人工转接白粉菌感病叶片条件下, 代谢蛋白对绿豆白粉病的作用效果, 并测定绿豆植物叶片的抗逆相关酶的变化, 为顶孢霉抑菌有效成分的确定及新型生物农药的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收稿日期:2015-10-23 接受日期:2016-04-15

基金项目:国家科技支撑计划(2014BAD07B05-06)

*通讯作者 Tel:86-459-6819182; E-mail:lzsdm@sohu.com

1.1.1 试验绿豆品种

密葵王,黑龙江八一农垦大学国家杂粮研究中心提供。

1.1.2 试验用微生物菌株及发酵粗蛋白获得

桃色顶孢霉,黑龙江八一农垦大学生命学院提供。桃色顶孢霉发酵蛋白粗提物制备:取活化桃色顶孢霉菌种接种于查氏培养基中,恒温振荡培养 10 d,培养条件为 28 °C、160 rpm。培养结束后过滤取上清液,按溶液量加入硫酸铵至饱和度为 20%,离心去除沉淀物后继续加入硫酸铵至饱和度为 80%,离心取沉淀物,溶解后重蒸馏水中透析 24 h,冷冻干燥至恒重。用蒸馏水按 1/1000 浓度稀释后备用。

1.2 试验方法

1.2.1 盆栽试验处理

绿豆种子放入沸水中,搅拌使水温降至常温后,浸泡 12 h 后将水倒掉,温水冲洗后纱布保湿 20 °C 温箱培养 12 h,取已萌芽的种子,播种于 15 个花盆中,每盆 30 粒种子。播种后每隔 2 d 浇水 1 次,每次每盆浇水量相同。在 1 片复叶时,利用叶片转接方法,每盆放置白粉病叶 2 片,观察记录各盆植株发病情况。

1.2.2 感白粉病离体叶片处理

在接种的盆栽中选择发病一致的植株,取病斑大小相近,叶位相同的发病叶片,放于滤纸保湿的培养皿中。分别向病叶喷施无菌水、15% 三唑酮可湿性粉剂 1000 倍液和顶孢霉发酵液粗提蛋白 1000 倍液,每处理重复 6 次,5 d 后观察记录病斑面积变化情况^[7],并以病斑与叶片面积比例为病级计算叶片病情指数,比较防治效果。

1.2.3 盆栽防治白粉病处理

选择 1.2.1 中发病均匀的盆栽进行处理。将每盆绿豆苗分为 2 部分,中间用纸板遮挡,分别喷施无

菌水和顶孢霉发酵液蛋白粗提物 1000 倍液,喷施无菌水和 15% 三唑酮可湿性粉剂 1000 倍液,每处理 5 次重复。观察记录病叶病斑变化、植株病情指数变化和新生叶片染病情况。

叶片发病分级标准:0 无病斑;1 级病斑面积占整个叶片面积 5% 以下;3 级病斑面积占整个叶片面积 6~10%;5 级病斑面积占整个叶片面积 11~25%;7 级病斑面积占整个叶片面积 26~50%;9 级病斑面积占整个叶片面积 50% 以上。

$$\text{全株综合病情指数} = \sum \frac{\text{叶片发病级数} \times \text{该级叶片数}}{(\text{最高病级} \times \text{总叶数})}$$

1.2.4 不同处理对感病植株新生叶片相关抗逆酶的影响

在 1.2.3 处理的盆栽中,分别取喷施无菌水、蛋白粗提物、三唑酮的绿豆植株中相同叶位的新生叶片,分别称取 1 g 样品放入研钵中,加入 10 mL pH = 7.8 的磷酸缓冲液,冰浴研磨,匀浆倒入离心管中,4000 rpm,4 °C 下离心 20 min,取上清液,即为叶片粗酶液。将其倒入试管中,4 °C 下保存,比色法测定 SOD、POD 和 CAT 活力及 MDA 含量^[10]。

1.3 数据处理与分析

所得数据采用 Excel 和 SPSS13.0 软件进行显著性分析,选用方法为新复极差法。

2 结果与分析

2.1 不同处理对感病离体叶片病斑影响

在离体感白粉病绿豆叶片上喷施顶孢霉发酵液粗提蛋白及三唑酮后,对白粉病病斑的扩展速度均有抑制作用,其中以桃色顶孢霉粗提蛋白的防治效果最为显著。5 d 后喷施顶孢霉粗蛋白的处理叶片上白粉病斑明显减少(图 1)。

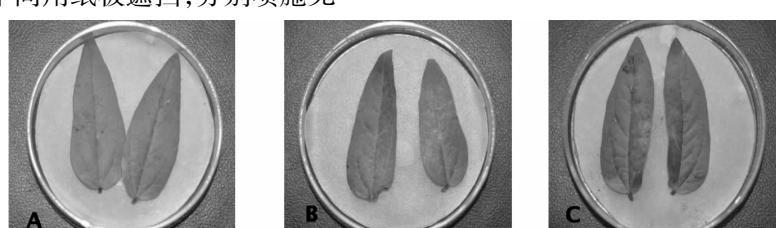


图 1 喷桃色顶孢霉发酵液蛋白粗提物(A)、喷无菌水处理(B)及喷三唑酮溶液处理(C)对白粉病离体叶片作用效果

Fig. 1 Effect of spraying crude protein of *A. persicinum* fermentation (A), sterile water (B) and triazolone (C) on powdery mildew leaves *in vitro*

比较病斑面积变化,顶孢霉处理的叶片病斑面积较处理 5 d 前下降了 29.86%;而无菌水处理的叶

片上白粉病斑则增加了 3.86%;三唑酮处理的病斑增长速度较无菌水处理有所减缓(表 1)。

表 1 不同处理对感病离体叶片病斑影响

Table 1 Effect of different treatment on lesion area of infected leaves *in vitro*

处理 Treatment	病斑面积 Lesion area (cm ²)		
	初始病斑面积 Origin lesion area	5d 后病斑面积 Lesion area after five day	平均变化率 Average rate of change (%)
发酵液粗蛋白 Crude protein of fermentation	3.48 ^{aA} ± 1.80	1.39 ± 0.27	-29.86 ^{aA}
无菌水 Sterile water	2.65 ^{aA} ± 0.66	2.92 ± 0.97	3.86 ^{bB}
三唑酮(农药) Triazolone	2.76 ^{aA} ± 0.59	2.92 ± 0.60	2.86 ^{bB}

注:表中数据为 6 次重复的平均值,同列数据后不同大、小写字母分别表示差异达极显著水平($P < 0.01$)和显著水平($P < 0.05$)。

Note: The data in the table for each processing is the average value of 6 times, the different uppercase and lowercase letters in the same column indicated extremely significant difference ($P < 0.01$) and significant difference ($P < 0.05$).

2.2 不同处理对感病植株发病情况影响

利用无菌水、三唑酮和顶孢霉粗蛋白处理已发病的绿豆植株后,对比同一盆中不同处理的植株症状变化,发现植株叶片上喷施发酵液粗蛋白和三唑酮后病斑明显减少,5 d 后通过病情指数变化率对

比顶孢霉粗蛋白与三唑酮的防治效果,发现二者作用相近(表 2)。持续观察 2 周,发现经粗蛋白处理的植株新生叶片上没有病斑出现,叶片鲜绿,有光泽;而三唑酮处理的植株,新生叶片上有病斑显现(图 2)。

表 2 不同处理对盆栽感病植株发病情况影响

Table 2 Effect of different treatments on incidence of susceptible plants in pot

处理 Treatment	初始病指数 Origin disease index	5d 后病指数 Disease index after five days	平均变化率 Average rate of change (%)
发酵液粗蛋白 Crude protein of fermentation	0.55aA ± 0.03	0.63 ± 0.01	1.14 aA
三唑酮 Triazolone	0.37bAB ± 0.08	0.47 ± 0.08	1.43 bA
无菌水 Sterile water	0.34bB ± 0.05	0.49 ± 0.05	2.14 abA

注:表中数据为 5 次重复的平均值,同列数据后不同大、小写字母分别表示差异达极显著水平($P < 0.01$)和显著水平($P < 0.05$)。

Note: The data in the table for each processing is the average value of 5 times, the different uppercase and lowercase letters in the same column indicated extremely significant difference ($P < 0.01$) and significant difference ($P < 0.05$).



图 2 感病盆栽植株喷施粗蛋白与三唑酮防治效果

Fig. 2 Control efficiency of crude protein and triazolone on infected plants in pot

注:图 A 为喷施三唑酮与无菌水处理,其中 a 为喷施三唑酮后发病叶片,b 为喷施无菌水后发病叶片;图 B 为喷施粗蛋白与无菌水处理,其中 a 为喷施粗蛋白后叶片,b 为喷施无菌水后发病叶片

Note: (A) spraying triazolone and sterile water, (a) indicated the un-infected leaves after spraying triazolone, (b) indicated the infected leaves after spraying sterile water; (B) spraying crude protein and sterile water, (a) indicated the un-infected leaves after spraying crude protein, (b) indicated the infected leaves after spraying sterile water

2.3 不同处理对感病植株新生叶片相关抗逆酶的影响

通过测定各处理感病植株新生叶片中 SOD、POD、CAT 酶活性及 MDA 含量发现,喷施三唑醇的感白粉病绿豆植株叶片 SOD 酶活性比无菌水处理

升高了 22.23%,但喷施顶孢霉粗蛋白的处理与无菌水处理在 SOD 酶活性上差异不显著(图 3A);与无菌水处理相比,喷施顶孢霉粗蛋白的感白粉病绿豆植株叶片 POD 酶活性降低了 8.45%,但喷施三唑酮溶液的处理 POD 酶活性提高了 5.82%(图

3C);与无菌水处理相比较,喷施三唑酮溶液后感病绿豆植株叶片CAT活性无显著差异,而喷施顶孢霉粗蛋白的感白粉病绿豆植株叶片CAT酶活性提高了71.70% (图3D);与无菌水处理相比,喷施顶孢霉粗蛋白与三唑酮溶液的感病绿豆植株叶片中

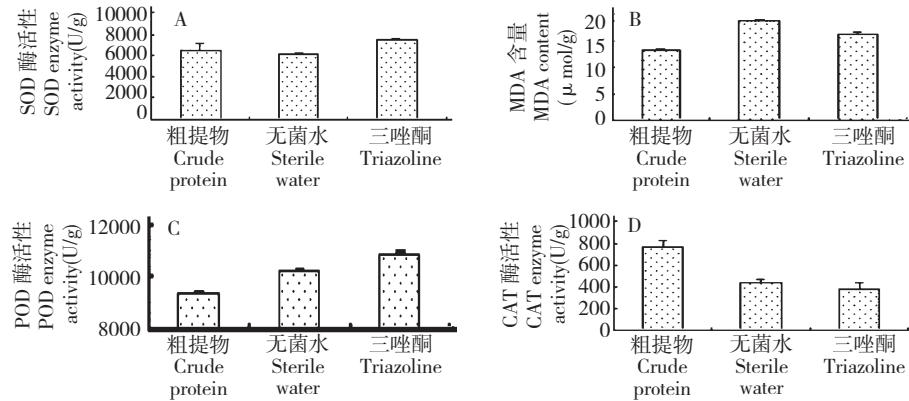


图3 不同处理对SOD(A)、POD(C)、CAT(D)酶活性及MDA含量(B)的影响

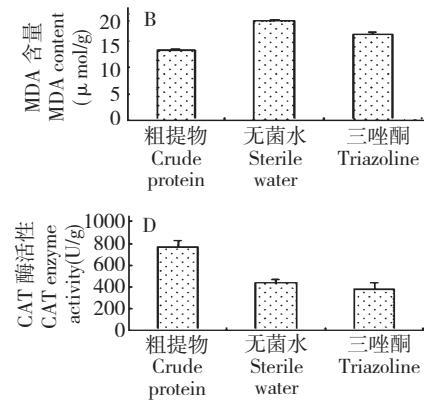
Fig. 3 Effect of different treatmentS on SOD (A) ,POD (C) ,CAT (D) enzyme activities and content of MDA (B)

3 讨论与结论

董雪梅等通过测定顶孢霉发酵液对玉米圆斑病菌生长和发育的影响证实,顶孢霉发酵液对病原菌具有较好的抑制作用,并且可以提高玉米等作物植株的抗氧化酶的活性^[12]。实验通过研究顶孢霉代谢粗提物与绿豆白粉病菌的相互作用时发现,顶孢霉粗蛋白对白粉菌孢子萌发及菌丝生长均有明显的抑制作用。在对患有白粉病的绿豆植株叶片上喷施顶孢霉粗蛋白、无菌水以及三唑酮溶液时,可以明显的观察到喷施顶孢霉粗蛋白的带病植株叶片的病情最轻,并且新生叶片鲜绿,观察不到白粉病斑。通过大量的研究表明,植物抗逆酶的诱导产生机制与植物胁迫抗性的机制密切相关^[11],SOD、CAT、POD是植物体内抗氧化酶促防御系统中3个主要酶类,SOD是植物体内重要的抗逆酶之一,通过清除植物体内的超氧阴离子而保护植物免受病原菌或逆境的侵害POD通过催化各种过氧化物或有机过氧化物而减少对植物体内各种有机物或无机物的氧化作用。CAT主要通过清除植物体内H₂O₂而彻底清除O₂⁻对植物的氧化损伤。MDA是植物脂质过氧化最终分解产物,反映细胞膜受活性氧和自由基损害程度的大小。

当植物遭受胁迫时超氧化物歧化酶活性增加,从而降低减轻活性氧的伤害,保持和修复细胞膜,并

MDA含量分别降低了29.81%和14.63%,均达显著水平,且两者之间也存在显著差异,说明与三唑酮相比,桃色顶孢霉粗蛋白可以显著降低膜脂过氧化程度,降低绿豆感白粉病叶片MDA的含量(图3B)。



且能够抑制膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量的积累。本研究中与喷施无菌水的处理相比,喷施三唑酮溶液的感白粉病绿豆植株叶片SOD酶活性提高了22.23%,喷施顶孢霉粗蛋白的绿豆感白粉病植株叶片POD酶活性降低了8.45% ($P < 0.05$),喷施顶孢霉粗蛋白的绿豆感白粉病植株叶片CAT酶活性提高了71.70% ($P < 0.05$);喷施顶孢霉粗蛋白的绿豆感病植株叶片MDA含量降低了29.81% ($P < 0.05$),说明桃色顶孢霉粗蛋白对绿豆白粉病有一定的防治作用,其具有抗病情扩展的能力,且抗逆效果相对稳定,因而该发酵液粗蛋白提取物可能成为防治绿豆白粉病的新型生物资源,值得深入研究。以上研究结果为在生产实践中进一步利用该菌株及其发酵液提供了理论依据。

参考文献

- Yue YL (岳永亮), Ren YZ (任毓忠), Zhang L (张莉), et al. Identification of the pathogen causing mung bean *Vorticillium* wilt in Xinjiang. *Xinjiang Agric Sci* (新疆农业科学), 2015, 52: 1477-1480.
- Wang MH (王明海), Xu N (徐宁), Bao SY (包淑英), et al. Nutritional components and medical value of *Vigna radiata* L. Wilczek. *Mod Agric Sci Tech* (现代农业科技), 2012, 6: 341-342.

(下转第859页)