

藤黄灰链霉菌 Pear-2 的拮抗性以及对梨果实防御相关酶的诱导效应

The antagonistic activity of *Streptomyces luteogriseus* Pear-2 and its induction of defense-related enzyme activities in pear

孙平平 崔建潮 贾晓辉 佟 伟 王文辉*

(中国农业科学院果树研究所, 辽宁 兴城 125100)

Sun Pingping Cui Jianchao Jia Xiaohui Tong Wei Wang Wenhui*

(Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng 125100, Liaoning Province, China)

由灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 引起的梨灰霉病是梨果储藏中危害严重的病害, 不仅影响果实品质, 还可造成严重经济损失 (Romanazzi et al., 2016)。生物防治作为环保、安全的方法日益受到重视。链霉菌因其种类繁多、代谢产物丰富、作用方式多样等优点, 已成为重要的生物防治微生物资源, 但其在梨灰霉病生物防治中的研究应用较少 (孙平等, 2016)。因此, 本研究以灰葡萄孢为供试病原菌, 筛选具有应用潜力的链霉菌菌株, 初步揭示该菌的生防机制, 以期对果实病害防治提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试果实及病原菌: 黄冠梨于 2015 年 9 月采自河北省晋州市。梨灰霉菌、梨轮纹病菌 *Botryosphaeria berengeriana*、梨褐腐病菌 *Monilinia fructigena*、梨黑斑病菌 *Alternaria alternata*、梨青霉病菌 *Penicillium expansum*、苹果霉心病菌 *Cladosporium tenuissimum* 均由本课题组分离、纯化、鉴定和保存。

试剂及仪器: 高氏培养基、POD、CAT、 β -1,3-葡聚糖酶、O₂ 测定试剂盒, 上海索桥生物科技有限公司; 其它分子试剂, 宝生物工程 (大连) 有限公司; CX31RBSF 倒置相差显微镜, 日本奥林巴斯公司; 2720 Thermal Cycler PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司; DYY-5 电泳仪, 北京六一仪器厂; FR980 凝胶成像仪, 上海复日科技仪器有限公司; TU-1901 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司。

1.2 方法

链霉菌分离及活性测定: 2015 年 9 月在中国农业科学院果树研究所国家梨种质资源圃采集梨树根

际土壤, 利用平板稀释法分离土壤中的链霉菌。纯化的单菌落转入高氏培养基, 采用平板对峙法对获得的链霉菌进行活性初筛。参照 Sadeghian et al. (2016) 方法对初筛菌株进行活体防效测定, 每株菌株重复 3 次, 每次重复 5 个果实, 抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 $\times$ 100%。同时, 采用平板对峙法测定初筛菌株对供试 6 种病原菌的抑菌谱, 以不接种链霉菌作对照, 待对照菌落长满平板时观察并记录抑菌效果。

活性菌株鉴定: 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取活性菌株的总 DNA, 并利用通用引物 7F (CAGAGTTTGATCCTGGCT) 和 1540R (AGGAGGTGATCCAGCCGCA) 扩增 16S rDNA 序列, 引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司提供。25 μ L PCR 反应体系: Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L, 50 ng/ μ L DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 补至 25 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个扩增循环; 72 $^{\circ}$ C 1 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测、分离, 回收后送交生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。测序结果经拼接和校正后提交 GenBank, 通过 BLASTn 程序进行一致性检测, 应用 MEGA 5.0 软件构建进化树, 确定其分类地位。在分子鉴定基础上再对活性菌株的菌落特征、孢子形态及养分利用等特性进行分析。

菌株 Pear-2 对果实防御酶系活性测定: 用 2% 次氯酸钠对黄冠梨消毒后, 利用直径 5 mm、深 3 mm 的打孔器刺伤果实, 在伤口处接种直径 6 mm 的活性菌饼或高氏培养基 (对照), 20 $^{\circ}$ C 保湿培养。于 0、1、2、3、4、5 d 后揭掉菌饼, 取伤口周围梨果肉, 保存于 -80 $^{\circ}$ C

备用。POD、CAT与 β -1,3-葡聚糖酶活性以及 O^- 含量均严格按照试剂盒说明进行测定,重复3次。

1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 19.0软件进行统计分析,用 t 测验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 活性菌株的分离、筛选及抑菌谱

从梨树根际土壤中分离、纯化出20株链霉菌,命名为Pear-1~Pear-20,其中Pear-2等5株菌株对梨灰霉菌的抑菌圈大于2.2 mm。接种9 d后经菌株Pear-2处理的皇冠梨病斑直径为9.7 mm,对照为26.3 mm,抑制率达63.1%。抑菌谱测定结果显示菌株Pear-2对6种病原菌均表现出显著的拮抗活性。

2.2 菌株Pear-2的鉴定

菌株Pear-2测序结果经拼接和校正后提交GenBank,登录号为KY977410。BLAST比对结果显示,Pear-2与链霉菌属的多个种相似性达到99%。与相似性较高的16个代表菌株构建系统发育进化树,发

现菌株Pear-2与藤黄灰链霉菌*Streptomyces luteogriseus*聚合在一个分支上,其16S rDNA序列与藤黄灰链霉菌ZG728(GQ985454)、NBRC13402(AB184379)相似性达100%。菌株Pear-2在高氏培养基上生长旺盛,具有链霉菌属特有的气味,气生菌丝金黄色至灰黄粉色,基内菌丝黄棕色,孢子卵圆形至长圆形;可利用半乳糖、葡萄糖、乳糖等糖源;明胶液化,牛奶不凝固,可水解淀粉,不能利用纤维素。最终确定菌株Pear-2为藤黄灰链霉菌。

2.3 菌株Pear-2对梨果防御酶系活性的影响

经Pear-2处理后皇冠梨的POD、CAT、 β -1,3-葡聚糖酶活性与 O^- 含量测定结果显示,处理4 d后皇冠梨的POD活性达对照的14.6倍;处理3 d后的CAT活性达对照的15.0倍;处理1~5 d后 β -1,3-葡聚糖酶活性为8.16~10.02 $U \cdot kg^{-1} FW \cdot s^{-1}$,均高于对照; O^- 含量为116.36~259.26 $\mu mol/kg FW$,低于对照(表1)。说明菌株Pear-2具有诱导梨果防御酶系活性表达提高从而减缓果实衰老的能力。

表1 菌株Pear-2对皇冠梨防御酶活性及 O^- 含量的影响

Table 1 Effect of strain Pear-2 on the activities of defense enzymes and O^- accumulation in Huangguan pears

时间 Time (d)	POD ($U \cdot kg^{-1} FW \cdot s^{-1}$)		CAT ($U \cdot kg^{-1} FW \cdot s^{-1}$)		β -1,3-葡聚糖酶 β -1,3- glucanase ($U \cdot kg^{-1} FW \cdot s^{-1}$)		O^- ($\mu mol/kg FW$)	
	CK	Pear-2	CK	Pear-2	CK	Pear-2	CK	Pear-2
0	264.19±65.39	264.19±65.39	5.38±1.86	5.38±1.86	6.60±1.26	6.60±1.26	125.86±16.83	125.86±16.83
1	347.21±26.15	528.37±130.74	12.91±5.59	96.85±3.43*	5.30±0.10	8.32±0.75*	236.06±50.11	117.16±7.67*
2	309.47±107.01	2 000.26±284.94*	13.99±3.73	80.71±0.00*	6.19±0.56	9.27±1.14*	236.03±42.22	141.81±13.51
3	135.87±59.91	1 585.11±196.11*	13.99±6.72	209.86±16.14*	6.19±0.16	8.16±1.81	357.86±45.30	259.26±37.14*
4	98.13±13.07	1 434.15±284.94*	12.91±3.23	123.76±11.96*	5.92±0.71	8.17±0.00	285.36±12.30	116.36±2.12*
5	150.96±34.59	339.67±113.22	16.14±3.23	113.00±12.29*	5.85±0.03	10.02±0.00*	320.16±33.54	178.06±82.23

表中数据为平均数±标准差。*表示经 t 测验法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. * indicates significant difference at $P<0.05$ level by t test.

3 讨论

李一青等(2008)对藤黄灰链霉菌的生防机制研究主要集中在其活性物质上,还未从诱导抗性的角度探讨其生防机制。本试验结果显示,菌株Pear-2不仅对病原菌具有拮抗活性,同时还能诱导提高果实防御酶的活性,且减少 O^- 含量的积累,说明Pear-2抑菌谱广、作用机制多样,具有开发潜力,其生物学特性、发酵条件、次生代谢产物分离及活性测定等方面还值得进一步研究。

参考文献 (References)

Li YQ, Liu SF, Li MG, Zhao JY, Li JR, Wen ML. 2008. Separation and identification of oligomycins A and C from *Streptomyces luteogriseus* ECO 00001 and their bioactive properties. *Journal of Plant Protection*, 35(1): 47–50 (in Chinese) [李一青, 刘树芳, 李铭刚,

赵江源, 李家瑞, 文孟良. 2008. 藤黄灰链霉菌ECO 00001菌株中寡霉素A和C的分离鉴定及其活性. *植物保护学报*, 35(1): 47–50]

Romanazzi G, Smilanick JL, Feliziani E, Droby S. 2016. Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology & Technology*, 113: 69–76

Sadeghian M, Bonjar GHS, Sirchi GRS. 2016. Post harvest biological control of apple bitter rot by soil-borne actinomycetes and molecular identification of the active antagonist. *Postharvest Biology & Technology*, 112: 46–54

Sun PP, Jia XH, Cui JC, Tong W, Wang WH. 2016. Selection, identification and characterization of actinomycetes L-30 for the biocontrol of pear gray mold. *Acta Horticulturae Sinica*, 43(12): 2335–2346 (in Chinese) [孙平平, 贾晓辉, 崔建潮, 佟伟, 王文辉. 2016. 梨灰霉病拮抗放线菌L-30的筛选、鉴定及作用机制研究. *园艺学报*, 43(12): 2335–2346]

(责任编辑:王 璇)