

## Disease-Resistance Induction in Cotton by Inoculation with Endophytic Bacteria Strains YBS106\*

Qinlan Guan<sup>1</sup>, Tianxing Lin<sup>1</sup>, Mingfu Gong<sup>#1,2</sup>

<sup>1</sup>School of Life Sciences, Leshan Normal University, Leshan

<sup>2</sup> Key Laboratory of Special Biological Resources in Mountain Emei, Leshan  
Email: 1508666836@qq.com, 182476903@qq.com, #gongmingfu98@163.com

Received: Feb. 16<sup>th</sup>, 2013; revised: Mar. 9<sup>th</sup>, 2013; accepted: Mar. 16<sup>th</sup>, 2013

**Abstract:** The induced resistance of *Serratia marcescens* strain YBS106 isolated from *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott tissue to cotton *Fusarium* and *Verticillium* wilt was studied by measuring the change of the activities of defense enzymes (POD, PPO) and the contents of pathogenesis-related biochemicals (MDA, Vc) in cotton leaf inoculation with YBS106, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae* and the control effects of strain YBS106 against to *F. oxysporum* and *V. dahliae* in pot tests. The results indicated that YBS106 effectively increased POD and PPO activities, also promoted concentration of MDA and Vc. When the *F. oxysporum* or *V. dahliae* used with YBS106, respectively, the induced activities of POD, PPO and concentration of Vc were higher than that of only used *F. oxysporum* or *V. dahliae*, but concentration of MDA were lower. The concentration of MDA and Vc peaked 5 days after the treatment while the activities of POD and PPO reached their maximum 10 days after the treatment. The relative anti-bacterial effects of strain YBS106 against to *F. oxysporum* and *V. dahliae* in pot tests when 100 day inoculated pathogen were 64.24% and 71.37%, which is related to changes consistent trend of the defense enzymes activity and related substances (MDA and Vc) content. Systemic resistance in cotton against to *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae* could be induced by the antagonistic bacteria *Serratia marcescens* strain YBS106.

**Keywords:** Endophytic Bacteria; Cotton; *Fusarium oxysporum*; *Verticillium dahliae*; Induced Resistance

## 内生细菌 YBS106 对棉花的诱导抗性研究\*

管岑澜<sup>1</sup>, 林天兴<sup>1</sup>, 龚明福<sup>#1,2</sup>

<sup>1</sup> 乐山师范学院生命科学院, 乐山

<sup>2</sup> 峨眉山特色生物资源重点实验室, 乐山

Email: 1508666836@qq.com, 182476903@qq.com, #gongmingfu98@163.com

收稿日期: 2013 年 2 月 16 日; 修回日期: 2013 年 3 月 9 日; 录用日期: 2013 年 3 月 16 日

**摘要:** 本实验以从一把伞南星(*Arisaema erubescens* (Wall.) Schott)组织分离到的内生细菌 YBS106 对三叶一心棉苗进行灌根诱导, 同时挑战接种棉花枯萎病菌或棉花黄萎病菌, 测定 YBS106 诱导对棉叶中抗性相关酶 POD 和 PPO 活性及与抗性相关的 MDA 和 VC 含量的影响, 同时测定 YBS106 对棉花枯、黄萎病的相对防效。结果表明, YBS106 诱导对 POD 和 PPO 活性及 MDA 和 Vc 含量均有显著影响。YBS106 能有效诱导棉叶中 POD 和 PPO 等防御酶活及 Vc 含量增加和 MDA 含量的减少, MDA 和 Vc 含量在诱导后第 5 天达到最高, POD 和 PPO 活性在诱导后第 10 天达到最高。病原菌挑战接种 100 天时, YBS106 对棉花枯萎病菌和黄萎病菌的相对防效分别为 64.24% 和 71.37%, 这与棉花系统抗性相关的防御酶活及相关物质(MDA 和 Vc)含量的变化趋势吻合。该结果表明 YBS106 诱导棉花产生了对棉花枯萎病菌和棉花黄萎病菌的系统抗性。

**关键词:** 内生细菌; 棉花; 棉花枯萎病菌; 棉花黄萎病菌; 诱导抗性

\*基金项目: 乐山师范学院科研项目(编号: Z1160 和 Z1223), 四川省教育厅项目(编号: 12ZA240)。

#通讯作者。

## 1. 引言

与抗病性相关的植物防御酶(如多酚氧化酶 PPO、过氧化物酶 POD 等)的变化或诱导产生是植物遭到病原生物及逆境因子作用后维护其正常生长发育最重要的一种生理生化防御机制<sup>[1-5]</sup>。PPO 通过催化木质素及醌类化合物形成, 构成保护性屏蔽而使细胞免受病菌的侵害<sup>[4]</sup>; POD 在木质素生物合成的最后一步反应过程中催化  $H_2O_2$  分解而发挥作用<sup>[5]</sup>。丙二醛(MDA)是膜脂过氧化分解的终产物之一, 植物组织中 MDA 的含量可以反映植物遭受病原生物及逆境因子伤害的程度<sup>[6]</sup>。抗坏血酸(Vc)是植物体内的一种抗氧化剂, 可直接清除  $O^{2-}$  和 HO, 并通过抗坏血酸氧化酶使  $H_2O_2$  转化为水, 当植物遭受病原生物及逆境因子伤害时, 可降低活性氧物质对植物的毒害, 使植物细胞保持正常生理功能<sup>[7]</sup>。

本课题组从一把伞南星(*Arisaema erubescens* (Wall.) Schott)组织中分离到一株对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *staphylococcus aureus*, MRSA)具有高拮抗活性的内生细菌 YBS106, 经鉴定为粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*), 该菌可以产生活性产物抑制 MRSA 的生长。本试验通过测定 YBS106 对棉花苗体内过氧化物酶 POD、多酚氧化酶 PPO 活性及 MDA、Vc 含量的变化情况, 研究其对棉花系统抗性的诱导作用, 为生防菌的开发与应用提供理论基础。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 试验材料

棉花新陆早 35 号和军海一号从市场购买, 其中新陆早 35 号用于枯萎病实验, 军海一号用于黄萎病实验。*S. marcescens* YBS106 由本课题组从 *A. erubescens* 中分离获得, 棉花枯萎病致病菌(*Fusarium oxysporum*)和棉花黄萎病致病菌大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Klebahn)从感病棉花植株中分离获得。

### 2.2. 培养基

实验中用到的培养基及配方见表 1。

### 2.3. 接种前的准备

挑取一环在 NA 平板上生长良好的 YBS106 接种

Table 1. The medium used in the experiment  
表 1. 实验中用到的培养基

培养基	NA	NB	PDA
牛肉膏(g)	3	3	
蛋白胨(g)	10	10	
NaCl(g)	5	5	
琼脂(g)	20		20
水(L)	1	1	1
pH	7.0-7.2	7.0-7.2	
马铃薯(g)			200
葡萄糖(g)			20

注: NA 为牛肉膏蛋白胨培养基, NB 为牛肉膏蛋白胨培养液, PDA 为马铃薯培养基。

于 NB 培养液中, 30℃、200 r/min 培养 48 h, 加入无菌水稀释成浓度为  $10^8$  CFU/mL 的拮抗细菌发酵液。棉花枯萎病菌和棉花黄萎病菌接于 PD 培养液中, 25℃、200 r/min 培养 72 h, 稀释制成  $10^6$  CFU/mL 浓度的孢子悬浮液。

### 2.4. 接种处理

待棉苗长至三叶一心时用  $10^8$  CFU/mL 的拮抗细菌发酵液灌根接种, 2 d 后用  $10^6$  CFU/mL 浓度的病原真菌孢子悬浮液灌根进行挑战接种, 分别于挑战接种病原真菌后第 0、5、10、15、20 天取样测定棉叶中的过氧化物酶 POD 和多酚氧化酶 PPO 的活性, 同时测定棉叶中丙二醛 MDA 和抗坏血酸(Vc)的含量。以无菌 NB 培养液灌根为对照, 每处理重复三次, 每重复 100 株。各处理分别为: 只接种无菌 NB 培养液(CK)、只接种(YBS106)、只接种棉花枯萎病菌(MK)、只接种棉花黄萎病菌(MH)、接种 YBS106 后挑战接种棉花枯萎病菌(YBS106-MK)、接种 YBS106 后挑战接种棉花黄萎病菌(YBS106-MH)。

### 2.5. 测定指标

POD 和 PPO 酶活的测定: 称取棉花叶片 0.1 g, 加  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$  5 mL, 于研钵中研磨成匀浆, 以  $10,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 收集上清液保存在冷处, 所得残渣再用  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$  5 mL 提取一次, 合并两次上清液。取比色皿两只, 于一只中加入反应混合液 3 mL、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mL 作为校零对照, 另一只中加入反应混合液 3 mL、上述酶液 1 mL(如酶活性

过高可适当稀释), 立即启动秒表, 于分光光度计 470 nm (PPO 酶活性测定在 420 nm) 波长下测量 OD 值, 每隔 30 s 读数一次, 以每分钟表示酶活性大小, 即以每克鲜叶重每分钟 OD<sub>470</sub> 增加 0.01 为一个 POD 酶活性单位, 以每克鲜叶重每分钟 OD<sub>420</sub> 增加 0.01 为一个 PPO 酶活性单位。

MDA 含量的测定: 称取剪碎的棉花叶片 1 g, 加入 2 mL 10% TCA 和少量石英砂, 研磨至匀浆, 再加 8 mL TCA 进一步研磨, 匀浆在 4000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 上清液为样品提取液。吸取离心的上清液 2 mL (对照加 2 mL 蒸馏水), 加入 2 mL 0.6% TBA 溶液, 混匀物于沸水浴上反应 15 min, 迅速冷却后再离心。取上清液测定 532、600 和 450 nm 波长下的吸光值。按公式 MDA 的浓度( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) = 6.45(OD<sub>532</sub> - OD<sub>600</sub>) - 0.56OD<sub>450</sub>, 可直接求得样品提取液中 MDA 的浓度, 根据植物组织的重量计算测定样品中 MDA 的含量: MDA 含量( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) = MDA 浓度( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) × 提取液体积(mL)/植物组织鲜重(g)。

Vc 含量的测定: 绘制 Vc 含量的校准曲线。称取洁净棉叶 100 g, 加入 100 mL 浸提剂, 放入组织捣碎机中捣成匀浆。称取 10 g 浆状样品, 用浸提剂将样品移入 100 mL 容量瓷中稀释至刻度, 摇匀, 澄清。样液测定: 移取 0.5 mL 提取液, 置于 10 mL 比色管中, 用 2% 偏磷酸稀释至刻度后摇匀。以蒸馏水为参比, 在波长 243 nm 处用 1 cm 石英皿测定其吸光度。待测研处理样液测定: 分别吸取 0.5 mL 澄清透明提取液, 加入 6 滴 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液, 置于 10 mL 比色管中混匀, 在室温放置 40 min 后, 加入 2% 偏磷酸稀

释至刻度后摇匀。以蒸馏水为参比, 在波长 243 nm 处测定吸光度。由待测样品与待测碱处理样品的吸光值之差查校准曲线, 即可计算出样品中 Vc 的含量。

出现病株后, 观察记录发病株数, 植株可见明显枯萎或黄萎症状, 即记为发病株, 共观察至接种病原菌 100 d。

病情严重度分级如下:

- 0 级 = 无症状, 植株健康;
- 1 级 = 1~2 片子叶局部发病;
- 2 级 = 子叶及一片真叶局部发病;
- 3 级 = 二片真叶发病或脱落仅剩心叶;
- 4 级 = 植株生长点或全株枯死。

发病率、病情指数及防效计算公式如下:

$$\text{发病率}(\%) = \frac{\Sigma \text{病株数}}{\text{调查总株数}} \times 100\%$$

$$\text{病情指数} = \frac{\Sigma(\text{每个病级的植株数} \times \text{级别数})}{100/\text{总植株数} \times \text{最高级别数}}$$

$$\text{相对防效}(\%) = \frac{(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数})}{100/\text{对照病情指数}} \times 100\%$$

### 3. 结果与分析

#### 3.1. YBS106 诱导下棉叶中 POD 活性

YBS106 诱导对棉叶中 POD 活性的影响见图 1。从图 1 可知, 在第 0 天各处理 POD 活性非常接近, 第 10 天前逐渐增强, 接种了拮抗菌或病原菌的处理其 POD 活性均比对照要高, 增幅快。只接种拮抗菌的处理第 10 天以后 POD 活性逐渐下降, 第 15 天以后和对照处于相同水平。挑战接种了病原菌的 4 个处

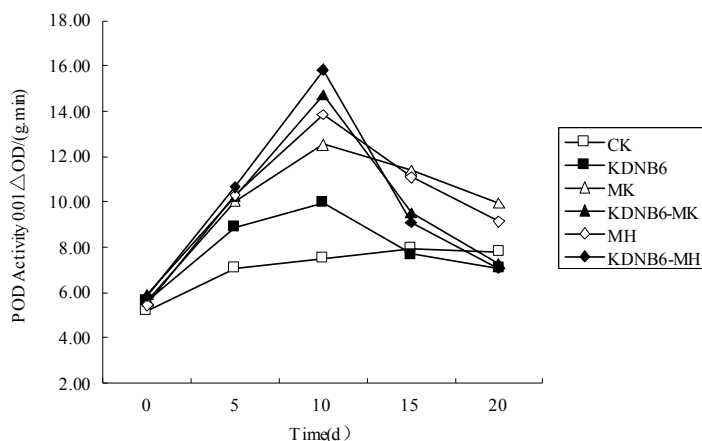


Figure 1. Activity of POD in cotton leaves induced by antagonistic bacteria YBS106  
图 1. YBS106 诱导下棉叶中 POD 活性

理其 POD 活性在第 10 天达到最高, 随后下降, 其中接种了拮抗菌的 2 个处理比只接病原菌的 2 个处理 POD 活性升高和下降的速度都要快。

### 3.2. YBS106 诱导下棉叶中 PPO 活性

YBS106 诱导对棉叶中 PPO 活性的影响见图 2。从图 2 可知, 在第 0 天各处理 PPO 活性非常接近, 第五天普遍增强, 接种了拮抗菌或病原菌的处理其 PPO 活性均比对照要高。只接种拮抗菌的处理第 5 天以后 PPO 活性逐渐下降, 第 10 天以后趋于平稳, 略高于对照。挑战接种了病原菌的 4 个处理其 PPO 活性在第 10 天达到最高, 随后下降, 其中接种了拮抗菌的 2 个处理比只接病原菌的 2 个处理 PPO 活性升高和下降的速度都要快。

### 3.3. YBS106 诱导下棉叶中 MDA 含量

YBS106 诱导对棉叶中 MDA 含量的影响见图 3。

从图 3 可知, 在第 0 天各处理 MDA 含量近乎相同, 第五天普遍增加, 接种了拮抗菌或病原菌的处理其 MDA 含量均比对照要高。对照和只接种拮抗菌其 MDA 含量波动范围不大。只挑战接种了病原菌的 2 个处理第 10 天前 MDA 含量逐渐增加, 10 天以后逐渐下降, 15 天以后趋于平稳。接种了拮抗菌并挑战接种病原菌的 2 个处理第 5 天 MDA 含量达到最高, 随后逐渐下降, 20 天以后其 MDA 含量降至对照水平。

### 3.4. YBS106 诱导下棉叶中 Vc 含量

YBS106 诱导对棉叶中 Vc 含量的影响见图 4。从图 4 可知, 在第 0 天各处理 Vc 含量近乎相同, 第五天普遍增加, 接种了拮抗菌或病原菌的处理其 Vc 含量均比对照要高。对照和只接种拮抗菌其 Vc 含量比较稳定, 变化不大。挑战接种了病原菌的 4 个处理第 5 天前 Vc 含量逐渐增加, 然后逐渐下降, 其中接种了拮抗菌并挑战接种病原菌的 2 个处理 Vc 含量的上升

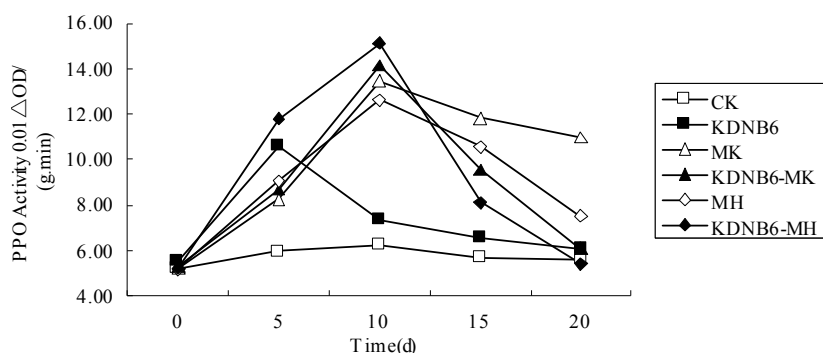


Figure 2. Activity of PPO in cotton leaves induced by antagonistic bacteria YBS106  
图 2. YBS106 诱导下棉叶中 PPO 活性

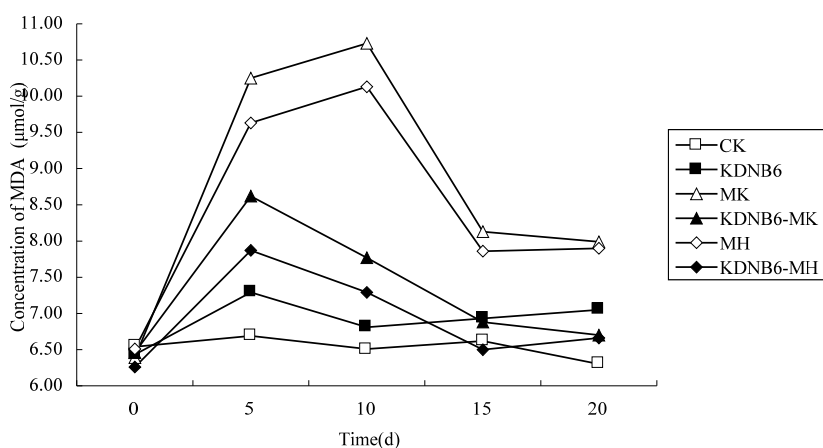


Figure 3. Concentration of MDA in cotton leaves induced by antagonistic bacteria YBS106.  
图 3. YBS106 诱导下棉叶中 MDA 含量

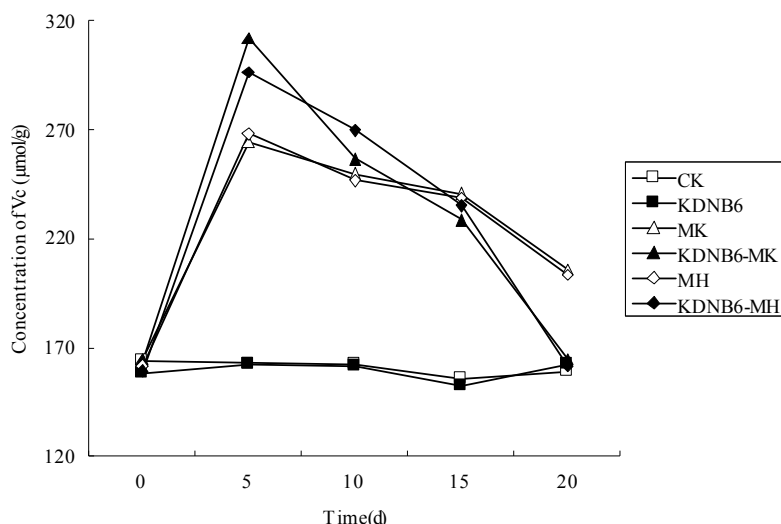


Figure 4. Concentration of Vc in cotton leaves induced by antagonistic bacteria YBS106  
图 4. YBS106 诱导下棉叶中 Vc 含量

Table 2. The control effects of strain YBS106 against to *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae* in pot tests (100 d)  
表 2. YBS106 接种盆栽防治棉花枯萎病的效果(100 天)

处理 Test	病情指数 Disease index			相对防效 Relative control effect (%)		平均防效 Mean control effect (%)	
	1	2	3	1	2	3	
YBS106-MK	21.24	31.35	19.56	61.41	56.24	75.06	64.24
MK	82.65	87.59	94.62				
YBS106-MH	14.75	41.52	15.72	78.54	52.69	82.89	71.37
MH	93.29	94.21	98.61				
YBS106	0	0	0				
CK	0	0	0	-	-	-	-

和下降速度均比只接种病原菌的 2 个处理要快。

### 3.5. YBS106 接种对棉花枯萎病防治效果的影响

从盆栽实验结果来看(表 2), YBS106 接种对棉花枯萎病均有较好的防治效果, 至接种棉花枯萎病菌 100 d 时对棉花枯萎病菌和萎蔫病菌的相对防效分别为 64.24%和 71.37%, 但对不同病菌的防治效果存在差异。

## 4. 结论与讨论

YBS106 是本课题组从一把伞南星中分离到的一株对 MRSA 具有高拮抗活性的内生细菌, 经鉴定为粘质沙雷氏菌(*S. marcescens*), 该菌主要通过产生活性产物抑制 MRSA 的生长。本研究结果表明, YBS106 除

了对病原性细菌有抑制作用外, 还能诱导棉花产生系统抗性, 其抗菌活性范围较广。利用内生细菌的诱导抗性, 有望成为棉花枯、萎蔫病生物防治的重要措施。

YBS106 虽然是从一把伞南星组织中分离获得的, 但与棉花也能形成较和谐的关系, 只接种拮抗菌对棉花各项指标影响不是很大, 应该是这种和谐关系的体现, 但 YBS106 是否是通过定殖到棉花组织中起作用, 还需要通过实验加以证实。

同时接种拮抗菌 YBS106 和病原菌的处理的棉叶中 POD 和 PPO 等防御酶活及 Vc 含量增加和减少的速度比只接种病原菌的要快, 在最高点时均高于只接种病原菌的处理棉叶, 而 MDA 含量趋势刚好相反, 这一结果与刘永锋等<sup>[2]</sup>用 YD4-6 和 NV11-4 菌株诱导水稻防御性相关酶活性变化趋势一致。该结果表明 YBS106 诱导后 POD、PPO 等防御酶及 Vc 等物质对

诱导抗性起重要作用,大大提高了棉花对病原菌的抗性,这种抗性的提高能够通过 MDA 含量的变化反应出来。YBS106 接种对棉花枯萎病菌和黄萎病菌均有较好的防治效果,这与棉花系统抗性相关的防御酶活及相关物质(MDA 和 Vc)含量的变化趋势吻合,这也说明 YBS106 接种诱导棉花产生了系统抗性。

## 参考文献 (References)

- [1] A. L. John. Plant immunisation; From myth to SAR. *Pesticide Science*, 1999, 55: 193-196.
- [2] 刘永锋, 李美荣, 陈志谊, 于俊杰, 刘邮洲, 聂亚锋, 罗楚平. YD4-6 和 NV11-4 菌株抑菌活性及诱导水稻防御性相关酶活性变化[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(12): 1753-1759.
- [3] L. Sticher, B. Mauchmani and J. P. Betraux. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 1997, 35: 235-270.
- [4] S. Schneider, W. UIMch. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1994, 45: 291-304.
- [5] F. B. Abeles, C. L. Biles. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Plant Physiology*, 1991, 95(1): 269-273.
- [6] 肖永森, 王正直, 郭百川. 百叶枯病菌对杂交稻幼苗叶片中活性氧清除剂的影响[J]. *作物学报*, 1998, 24(1): 118-122.
- [7] 来玉宾. 茶树内生细菌 TL2 分离鉴定及抗病机理的研究[D]. 福建农林大学硕士学位论文, 2006.