

青霉素对苹果腐烂病菌分泌果胶酶活力的影响

马 强, 乔国彪, 庄 霞, 张晓伟

(内蒙古农业大学, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:为有效控制苹果树腐烂病,通过对不同浓度青霉素处理后的感病植株的病原菌的果胶酶和人工培养的病原菌的果胶酶活性的测定。结果表明:不同浓度青霉素液处理对 PA 液中病原菌分泌果胶酶活性没有直接的抑制作用;不同浓度青霉素液对感病树上病原菌分泌果胶酶活性有显著的抑制作用,其中经 1.2×10^4 U/L 的青霉素液处理后的抑制效果最明显,处理 35 d 时,感病树体的病组织中果胶酶活性比 CK 下降了 82 %。

关键词:青霉素;苹果树腐烂病;果胶酶;活力

中图分类号:S436.611 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)03-0096-03

Study on Penicillin Affect Activeness on Pectolases of Pathogens of Apple Tree Canker

MA Qiang, QIAO Guo-biao, ZHUANG Xia, ZHANG Xiao-wei

(Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: In order to reduce the apple trees canker effectively, the research compared the activity of pectolases of pathogens under different concentration penicillin which cultivated between sicken trees and PA. Result showed that the activity of pectolases of pathogens in sicken trees was restrained significantly, whereas the activity of pectolases of pathogens in PA was not effected. The best concentration of penicillin was 1.2×10^4 U/L, and the pectolases of pathogens in sicken trees reduced 82 % under this concentration.

Key words: Penicillin; Apple tree canker; Pectolases; Activeness

果树腐烂病俗称烂皮病,是中国北方果树主要病害之一,危害十分严重,而且范围广泛,严重阻碍了北方果树的发展^[1-4]。虽然前人对此病的防治进行过不少的研究,但一直没有得到有效地控制^[5-8]。

抗生素类农药由于具有高渗透性、对人畜无害、对果品无污染及促进果树生长等作用,成为生物防治的新热点。辛亚芬等^[9]从 *Populus tomentosa* 上分离到一株对苹果树腐烂病菌有较好拮抗作用的 *Chaetomium spirale* 菌株 ND35,皿内对峙培养试验表明其可以强烈的抑制腐烂病菌菌丝的生长,温室接种试验表明,用 ND35 处理的果树,腐烂病的发生率明显的要较用其他方法处理的果树低。Abes 等^[10]从菌株 672 - AV2 的滤液中分离到一种对苹果腐烂病菌有较强抗性的抗生素-K76,并用纸碟法研究表明其对病原菌有较强的抑制作用。

青霉素是分子中含有青霉烷,能破坏细菌的细

胞壁并在细菌细胞的繁殖期起杀菌作用的一类抗生素,是第一种能够治疗人类疾病的抗生素。近年来,国内外的植物生理学工作者逐步发现了青霉素对高等植物代谢及生长发育的影响。可以认为青霉素也是一种新的生长促进型植物生长调节剂。马锋旺等发现,青霉素对苹果、梨、杏等果树的花粉萌发具有明显的促进作用^[11]。相关人员经过摸索与实践,发现青霉素对苹果树腐烂病有极好的防治效果^[12,13]。所以本试验对此进行了研究,测定了青霉素对苹果树腐烂病病原菌的果胶酶活性的影响。

1 材料和方法

1.1 供试材料

7~8 年生的金红苹果树,取自内蒙古园艺示范园区,1998 年栽植,8 年树龄,行距 3 m,株距 2 m,共计 450 株。发生腐烂病株 250 株,2005 年新发病株

收稿日期:2009-02-24

基金项目:内蒙古科技攻关项目(20060202)

作者简介:马 强(1964-),男,内蒙古赤峰人,副教授,硕士生导师,主要从事果树生理和果树病理研究工作。

率为 20.5 %。

取田间发病后正在腐烂扩展中的苹果树枝,在研钵中磨碎,加入病皮重量 0.5 倍的清水,用双层纱布滤出汁液。将此汁液在 PA 液中培养 20 d 后,过滤出病菌培养待用。

医用青霉素为华北制药厂生产。

1.2 PA 培养液的配制、分装和灭菌

将洗净后去皮的马铃薯(200 g)切成 1 cm 见方,加水 1 000 mL 煮沸 30 min,用纱布滤去马铃薯将滤液过滤到烧杯中,加水补足 1 000 mL,然后加糖(葡萄糖 15 g),搅拌均匀,使加入的葡萄糖完全溶化,然后分装到已准备好的三角瓶中。将三角瓶放置高压锅中灭菌(121 ℃,25 min)。

1.3 试剂的配置

DNS 试剂:用 400 mL 蒸馏水溶解 3.15 g 3,5-二硝基水杨酸,逐步加入 200 mL NaOH(0.5 mol/L),再加入 91 g 酒石酸钾钠 $4\text{H}_2\text{O}$ 、2.5 g 苯酚、2.5 g 无水亚硫酸钠,温水浴(不超过 48 ℃),不断搅拌,直至溶液清澈透明。用蒸馏水定容至 1 000 mL,保存在棕色瓶中。贮存期为 180 d。

pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液:取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.62 g、 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 21.01 g,分别定容到 1 000 mL,按 10.3:9.7 混合即可。

底物:称取 1.00 g 果胶(Sigma 公司),用 pH5.0 的缓冲液搅拌,溶解,用缓冲液定容至 100 mL。存放在 0~4 ℃ 冰箱里,有效期 3 d。

1.4 处理设置

先将青霉素用蒸馏水配制成 0.8×10^4 、 1.0×10^4 、 1.2×10^4 、 2.0×10^4 、 3.0×10^4 U/L 不同浓度的青霉素待用。I、II、III、IV、V 分别代表 0.8×10^4 、 1.0×10^4 、 1.2×10^4 、 2.0×10^4 、 3.0×10^4 U/L 青霉素,CK 代表清水对照处理,每处理设 5 次重复。酶活性隔 7 d 测定 1 次。

1.5 酶活力单位

U:1 毫升酶液在 50 ℃、pH5.0 的条件下,1 分钟分解果胶产生 1 毫克半乳糖醛酸为一个酶活单位。

酶活力计算: $X = [(A_{\text{甲}} - A_{\text{乙}}) \times \text{Dr} \times 5] / (K \times t)$

式中 $A_{\text{甲}}$ 为酶样吸光度; $A_{\text{乙}}$ 为酶空白样的吸光度; K 为标准曲线斜率; 5 为测定酶活时取了反应液的 $1/5$; Dr 为稀释倍数; t 为反应时间(min)。

1.6 酶活力的测定

于甲、乙两支试管中分别加入果胶底物 5 mL,在 50 ℃ 水浴中预热 5 min; 于甲、乙管中分别加 4 mL 磷酸-柠檬酸缓冲液,甲管中加入 1 mL 稀释酶液,立即摇匀,在 50 ℃ 水浴中准确反应 30 min,

立即给乙管中加 1 mL 稀释酶液,立即放入沸水浴中煮沸 5 min,终止反应,冷却; 分别取甲、乙管中反应液 2 mL 于两支试管中,再分别给甲、乙管加 2 mL 蒸馏水,5 mL DNS 试剂,混合,沸水浴煮沸 5 min,取出,立即冷却。以标准空白为基准调零,在 540 nm 处测吸光度^[14]。

1.7 数据分析方法

采用 DPS 辅助统计软件,利用新复极差法进行统计。

2 结果与分析

2.1 不同浓度青霉素液对 PA 液中病源菌分泌果胶酶活性的影响

病原菌在 PA 培养液中培养,经不同浓度青霉素液处理后,隔 7 d,测定病源菌分泌果胶酶的活性,如图 1 所示:病原菌在培养液中培养 0~21 d,果胶酶的活性逐渐增强,21~35 d 果胶酶活性增加不太明显;不同浓度青霉素液处理间的差异不明显($P > 0.05$)。果树腐烂病病原菌在 PA 培养液中能够分泌出果胶酶,其活性在培养 20 d 左右最强,可达 62.3 U/(g·min);不同浓度的青霉素液处理,对病原菌分泌果胶酶的影响相对于 CK 没有显著的差异($P > 0.05$),说明青霉素对果树腐烂病病原菌分泌果胶酶没有直接的抑制作用。

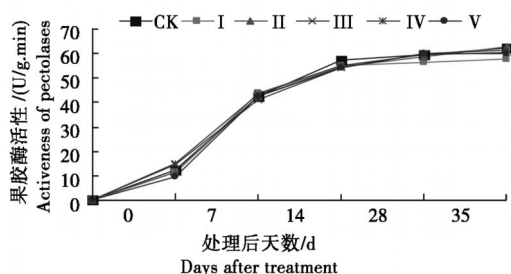


图 1 不同浓度青霉素液对病菌培养滤液中果胶酶活性的作用

Fig. 1 Effect of pectolase activity in the germ nutrient fluid after different concentration penicillin

2.2 不同浓度青霉素液对感病树上病原菌分泌果胶酶活性的影响

经不同浓度青霉素处理后,感病树上病组织中的果胶酶活性(图 2)。对照(CK)病组织中果胶酶活性高于 PA 培养液,20 d 左右时活性可达 135.1 U/(g·min)。经数据分析在 $P < 0.01$ 的水平上,经不同浓度青霉素处理的果胶酶活性与 CK 相比均有显著差异,其中 1.2×10^4 U/L 处理的差异最显著,且与另四组处理相比也有显著差异。但是, 0.8×10^4 、 1.0×10^4 、 2.0×10^4 、 3.0×10^4 U/L 四组处理之间无显著差异。这说明青霉素液在感病树上对病原

菌分泌的果胶酶有抑制作用,但抑制程度不同。其中经 1.2×10^4 U/L 的青霉素液处理后的抑制效果最明显,处理 35 d 时,感病树体的病组织中果胶酶活性比 CK 下降了 82 %。

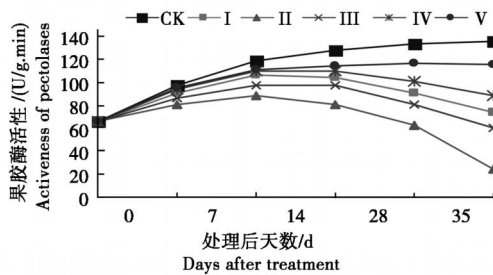


图2 不同浓度青霉素液处理对
果树烂皮中果胶酶活性的影响

Fig. 2 The effect of pectolase activity after different
concentration penicillin fluid treating to apple rotten bark

3 讨论

本试验测定了青霉素对苹果树腐烂病病原菌果胶酶活性的影响,试验结果表明青霉素可以显著降低病原菌果胶酶的活性。这一结果即拓展了青霉素的应用领域,也为苹果树腐烂病在生物防治方面提供了新的方法。但微生物在防治植物病害方面仍存在一些困难,还需要进一步的研究。

参考文献:

[1] 刘桂芬,朱淑贤,崔景彬. 苹果腐烂病的发生及防治措施[J]. 内蒙古农业科技,1999(增刊):112.
[2] 田林森,苏清源. 防治腐烂病是发展果树生产的保障[J]. 内蒙古农业科技,2001(增刊):133-134.

[3] 尹继平,陈金良,张 举,等. 苹果树腐烂病防治技术[J]. 内蒙古农业科技,1998(6):46.
[4] 孙 平,福巴彦,鄂志强,等. 果树腐烂病发病动态观察[J]. 内蒙古农业科技,1991(5):29-30.
[5] 孟晶岩,王贤萍,安 鸣. 10种植物组织不同浸出物对苹果腐烂病菌的抑制作用[J]. 华北农学报,2005,20(4):85-88.
[6] 孙 平,福巴彦,鄂志强,等. 防治果树腐烂病的药剂筛选试验研究[J]. 内蒙古农业科技,1991(4):26-28.
[7] 孙 平,福巴彦,鄂志强,等. 苹果树腐烂病治疗新方法-病斑周围局部扒皮法[J]. 内蒙古农业科技,1991(6):30-31.
[8] 王黎胜,王淑海,张海军,等. 果树腐烂病药剂防治研究初报[J]. 内蒙古农业科技,1989(1):33-35.
[9] Xin Ya-fen, Shang Jir-jie, Bio-control trials of Chaetomium spirale ND35 against apple canker[J]. Journal of forestry research,2005,16(2):121-124.
[10] Abe Y, Shimazu A, Seto H, Propanosine (K76), a new antibiotic active against Valsa ceratosperma, the pathogen of apple canker disease[J]. Agriculture and Biological Chemistry,1983,47(11):2703-2705.
[10] 马锋旺,张淑红,韩清芳. 多效唑和青霉素对几种果树花粉萌发的影响[J]. 植物生理学通讯,1993,29(6):427-429.
[12] 庄 霞,马 强,刘晓燕. 青霉素处理苹果树腐烂病 SOD、POD、PAL、PPO 的变化[J]. 内蒙古农业科技,2008(4):54-56.
[13] 朱建华. 青霉素对几种作物种子发芽率和幼苗生长的影响[J]. 植物生理学通讯,1995,31(5):344-346.
[14] 张 飞. 果胶酶活力的测定方法研究[J]. 西北农业学报,2004,13(4):134-137.