

西洋参和人参病原真菌菌体对放线菌 2 种水解酶的诱导

于妍华^a, 薛泉宏^b, 唐 明^c

(西北农林科技大学 a 生命科学学院, b 资源环境学院, c 林学院, 陕西杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】研究特定拮抗放线菌对西洋参人参土传病害病原真菌的接触抗菌机理。【方法】以 5 株西洋参、人参土传病害病原真菌菌体为惟一碳源,用液体培养及 3,5 二硝基水杨酸(DNS)法研究 5 株供试病原真菌对 9 株拮抗放线菌几丁质酶和纤维素酶合成的诱导作用;采用搭片法,观察 9 株拮抗放线菌与 5 株供试病原真菌菌丝间的相互作用。【结果】①以 5 株病原真菌菌体为惟一碳源时,可诱导 9 株拮抗放线菌合成几丁质酶和纤维素酶;9 株放线菌的几丁质酶和纤维素酶活性分别为 7.17~11.58 和 6.14~21.20 U,其中西洋参恶疫霉菌体对 9 株放线菌几丁质酶、纤维素酶合成的诱导作用强于其他病原真菌;②拮抗放线菌 Act11、Act13、Act24 及 D141 的菌丝与供试病原真菌菌丝接触时,对西洋参锈腐病菌、人参锈腐病菌菌丝有明显的溶解作用。【结论】以 5 株供试病原真菌菌体为惟一碳源时,可诱导 9 株拮抗放线菌合成几丁质酶和纤维素酶;供试拮抗放线菌与西洋参病原菌接触时的抗菌作用,是通过放线菌产生几丁质酶和纤维素酶,破坏细胞壁,使病原真菌菌丝溶解的方式完成的。

【关键词】 西洋参;人参;病原真菌;诱导酶;放线菌;几丁质酶;纤维素酶

【中图分类号】 S432.4⁺4;Q556

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)07-0110-07

Inductive effects of fungal pathogens of American Ginseng and Ginseng on chitinase and cellulase of antagonistic actinomycetes

YU Yan-hua^a, XUE Quan-hong^b, TANG Ming^c

(a College of Life Sciences, b College of Resources and Environment, c College of Forestry,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 Inhibitory mechanism of antagonistic actinomycetes fighting against fungal pathogens of soil-borne disease in American Ginseng and Ginseng was studied. 【Method】 The inductiveness was assessed by the activity of chitinase and cellulase, which were induced from 9 strains of antagonistic actinomycete by using 5 dried strains of fungal pathogens of American Ginseng and Ginseng as C-source in liquid culture medium and DNS measurement, and the mutual effects were observed between antagonistic actinomycetes and fungal pathogens of American Ginseng and Ginseng through the method of building pieces on plate. 【Result】 ① The activity of chitinase and cellulase, which was mainly distributed among 7.17—11.58 and 6.14—21.20 U, respectively, differed from 9 strains of antagonistic actinomycete induced from 5 strains of fungal pathogen of American Ginseng and Ginseng. The powder of *Phytophthora cactorum* could induce antagonistic actinomycetes to produce much more chitinase and cellulase. ② The mutual effects between mycelia of Act11, Act13, Act24 and *Cylindrocarpon destructans*, *Cylindrocarpon* sp., such as winding and decomposition, were observed distinctively. 【Conclusion】 The mycelia of 5 strains of fungal

* [收稿日期] 2010-12-06

[基金项目] 长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT748)

[作者简介] 于妍华(1984—),女,陕西铜川人,在读硕士,主要从事微生物资源利用研究。E-mail: independent_all@nwsuaf.edu.cn

[通信作者] 薛泉宏(1957—),男,陕西白水人,教授,主要从事微生物生态与资源利用研究。E-mail: xuequanhong@nwsuaf.edu.cn

pathogen of American Ginseng and Ginseng could induce 9 strains of antagonistic actinomycete to produce chitinase and cellulase; 9 strains of antagonistic actinomycete had inhibitory effects on the growth of 5 strains of fungal pathogen of American Ginseng and Ginseng by producing cell-wall degrading enzymes, such as chitinase and cellulase, which can promote mutual effects between mycelia, such as winding, decomposition.

Key words: American Ginseng; Ginseng; fungal pathogen; inducible enzyme; actinomycete; chitinase; cellulase

西洋参(*Panax quinquefolium* L.)、人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)均为五加科人参属多年生宿根性植物,有极高的药用及经济价值,但有极强的忌地性^[1]。西洋参和人参锈腐病、疫病及根腐病在参类种植过程中普遍发生、危害严重^[2-4],轻则导致减产,重则绝收,严重制约着参类产业的持续发展^[5]。西洋参、人参的药用部位为根系,使用化学农药会产生农药残留,影响药材安全性。筛选西洋参、人参拮抗放线菌并研究其抗菌机理,对无公害西洋参、人参栽培具有重要意义^[2,6]。在研究西洋参拮抗放线菌与病原真菌的相互作用时发现,拮抗放线菌与西洋参人参病原真菌接触时,可使真菌菌丝溶解,其可能与拮抗放线菌产生的胞壁水解酶有关,但对其机理缺乏深入研究。病原真菌的细胞壁以几丁质、纤维素为骨架,以 β -1,3-葡聚糖为主要填充物所组成,易被几丁质酶(Chitinase)、纤维素酶(Celulase)等水解酶分解,造成病原菌菌丝崩解^[7]。几丁质酶、纤维素酶是诱导酶^[8-9],其合成需要诱导剂。目前,关于病原菌对酶的诱导研究,主要集中在病原菌感染或病原菌产生的毒素对植物体产酶能力的影响等方面^[10-11],关于不同碳源诱导生防菌产酶的研究鲜有报道,而以西洋参和人参疫霉病菌、锈腐病菌及根腐病菌菌体为碳源,诱导拮抗放线菌合成几丁质酶、纤维素酶的研究尚无报道。本试验研究了以 5 株参类恶疫霉、锈腐病菌及根腐菌菌体为惟一碳源时,对放线菌几丁质酶、纤维素酶合成的诱导作用,拟从酶解角度探索 9 株拮抗放线菌对参类恶疫霉、锈腐病菌及根腐菌的接触抗菌机理,旨在为西洋参和人参土传病害生物防治研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 (1)供试放线菌。共 9 株,由西北农林科技大学资源环境学院微生物资源研究室从青藏高原分离的万余株放线菌中,采用皿内拮抗筛选试验得到,均对供试病原真菌有良好拮抗效果。

经 16S rDNA 序列测定,菌株 Act1、Act7、Act11、Act12、D141、D154 及 D220 分别为加州链霉菌(*Streptomyces californicus*)、球孢链霉菌(*Streptomyces globisporus*)、肉质链霉菌(*Streptomyces carnosus*)、密旋链霉菌(*Streptomyces pactum*)、球孢链霉菌球孢亚种(*Streptomyces globisporus* subsp. *globisporus*)、孔雀石刺链霉菌(*Streptomyces malachitospinus*)及绿淀粉酶链霉菌(*Streptomyces viridodiatstaticus*);菌株 Act13、Act24 均为链霉菌属未定种(*Streptomyces* sp.)。

(2)供试病原真菌。共 5 株,分别为西洋参锈腐病菌 1(*Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten, 编号 81782)、西洋参锈腐病菌 2(*Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten, 编号 81783)、西洋参恶疫霉(*Phytophthora cactorum* (Leb. et Cohn) Schrot, 编号 81805)、人参锈腐病菌(*Cylindrocarpon* sp., 编号 3. 3591)、人参根腐菌(*Neonectria radicola* (Gerlach & L. Nilsson) Mantiri & Samuels, 编号 r2),由西北农林科技大学资源环境学院微生物资源研究室提供。其中 81782 和 81783 为相同病原菌的不同菌株,选用其目的是探索同一菌种不同菌株在 2 种胞壁水解酶诱导上的差异。

1.1.2 培养基 PDA、高氏 1 号琼脂^[12]:分别为病原真菌、放线菌斜面活化的培养基。

1 号液体培养基:PDA 去琼脂,为病原真菌菌体制备的培养基。

2 号液体培养基:为拮抗放线菌几丁质酶、纤维素酶合成诱导的培养基,高氏 1 号培养基去琼脂,并用 10 g/L 供试病原真菌菌体粉代替可溶性淀粉。此外,以 10 g/L 可溶性淀粉为惟一碳源的高氏 1 号液体培养基作为对照(CK)。

1.1.3 试剂 N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)、几丁质均购自 Sigma 公司,其余常规试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 供试病原真菌菌体的制备 用竹签挑取适

量在 PDA 斜面活化好的 5 株供试病原真菌菌丝,分别接种到装有 200 mL 1 号液体培养基的 500 mL 盐水瓶中,28 ℃、150 r/min 摇床震荡培养 7 d。双层纱布过滤收集菌丝,并用自来水及去离子水先后多次冲洗至无残留培养液,80 ℃烘箱中烘干、称质量,用研钵研磨至细粉状。

1.2.2 供试生防菌几丁质酶、纤维素酶的诱导 用竹签挑取适量在高氏 1 号斜面培养基上活化好的供试放线菌,分别接种到装有 25 mL 已灭菌的 2 号液体培养基的 250 mL 盐水瓶中,28 ℃静置培养 8 d,培养期间,每天摇动数次。

酶液的制备:将培养好的发酵液粗滤后,用加有孔径 0.45 μm 微孔滤膜的砂芯抽滤装置过滤,收集滤液,将其装于无菌试管中,冷冻备用。

1.2.3 胶体几丁质的制备 取 10 g 几丁质溶于 400 mL 浓盐酸(4 ℃预冷)中,缓慢加热到 37 ℃,玻璃棒轻搅,控温,待几丁质完全溶解,4 ℃放置 24 h,用玻璃棉过滤至 2 000 mL 含体积分数 50 %乙醇的烧杯中,边加边剧烈搅拌,静置,待胶体几丁质析出后除去上清液,收集胶体几丁质,用蒸馏水冲洗至 pH 7.0,用蒸馏水定容至 1 000 mL,即得 10 g/L 的胶体几丁质,冷藏备用。

1.2.4 NAG 标准曲线的绘制 分别取 0.5 mg/mL NAG 标准液 0.00, 0.20, 0.40, 0.80, 1.20, 1.60, 2.00, 2.40 mL,置于 10 mL 容量瓶中,用 pH 4.6 乙酸缓冲液定容至刻度,充分摇匀。分别从各稀释度中吸取 2.5 mL 置于刻度试管中,依次加入 1 mL 2 mol/L NaOH、2 mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS),沸水浴显色 5 min 后立即用自来水冷却。以零管作参比,在波长 540 nm 处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,NAG 含量为横坐标绘制标准曲线。

1.2.5 几丁质酶活性的测定 采用 DNS 法^[13-15]。取 1 mL 酶液,加 1 mL 10 g/L 胶体几丁质,混匀后置于 37 ℃恒温水浴中反应 1 h,然后沸水浴中煮 10 min,终止反应。取出后用滤纸过滤,取 1 mL 滤液,依次加入 1.5 mL pH 4.6 醋酸缓冲液、1 mL 2 mol/L NaOH、2 mL DNS,沸水浴显色 5 min 后立即用自来水冷却。以钝化酶液为对照,在波长 540 nm 处测定吸光度,并根据标准曲线计算酶活性。每处理重复 3 次。

几丁质酶活性定义为:在 37 ℃下,1 mL 酶液 1 min 生成 1 μg N-乙酰氨基葡萄糖时所需酶量为 1 U。

1.2.6 纤维素酶活性的测定 采用 DNS 法^[12]。

纤维素酶活性定义为:在 40 ℃下,1 mL 酶液 1 min 生成 1 μg 葡萄糖时所需的酶量为 1 U。

1.2.7 放线菌对病原真菌菌丝的溶解作用 采用搭片法^[12]。在 PDA 固体培养基平皿上,用宽度为 7 mm 的无菌铝铲挖 2 道槽。用竹签挑取适量活化好的放线菌孢子,均匀涂于槽的一侧,24 h 后用竹签挑取适量活化好的病原真菌菌丝,均匀涂于槽的另一侧,用镊子取 3 片无菌盖玻片盖于槽上方。倒置培养 6~7 d 后,取出盖玻片,菌丝生长面朝上置于干净载玻片上,40 倍显微镜下观察菌丝间的相互作用并拍照。

1.2.8 数据计算与处理 用变异系数(Coefficient of Variation,记作“C·V”)表示不同株放线菌经病原真菌菌体诱导后所产酶的酶活性差异,或不同株病原真菌菌体对同一株放线菌酶合成的诱导能力差异,其计算公式为:

$$C \cdot V = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\%。$$

式中:S 为酶活性标准差, $\bar{x}$ 为酶活性平均值。

用 $\bar{X}_a$ 表示不同株放线菌经病原真菌菌体诱导后的酶活性均值, $\bar{X}_p$ 表示不同株病原真菌菌体所诱导的酶活性均值,其计算公式为:

$$\bar{X}_a(\bar{X}_p) = \frac{\sum x}{n}。$$

式中:x 为酶活性测量值,n 为放线菌或真菌株数。

2 结果与分析

2.1 供试病原真菌对放线菌几丁质酶合成的诱导作用

从表 1 可以看出,以 5 株病原真菌菌体为惟一碳源时,9 株供试放线菌发酵液中均有几丁质酶检出,表明供试病原真菌对供试放线菌的几丁质酶合成有诱导作用。不同病原真菌菌体的诱导能力不同,几丁质酶活性为 7.17~11.58 U,其中加入西洋参恶疫霉菌体粉时,放线菌 Act11、Act12 的几丁质酶活性均较高,分别为 11.20,11.58 U。

由表 1 可知,在以可溶性淀粉为惟一碳源的培养中(CK),供试放线菌的几丁质酶活性为 31.84~47.90 U,远高于以病原真菌菌体为惟一碳源的几丁质酶活性,表明淀粉可以诱导供试放线菌合成几丁质酶,且诱导作用大于真菌菌体粉,其原因尚不清楚。

从表 1 还可以看出,不同病原真菌诱导的几丁质酶活力差异不大。以 5 株病原真菌菌体为惟一碳

源时,9 株放线菌培养液的平均几丁质酶活性从高到低依次为西洋参恶疫霉(9.26 U)>西洋参锈腐病菌 1(8.43 U)>人参根腐菌(7.71 U)>西洋参锈腐病菌 2(7.70 U)>人参锈腐病菌(7.48 U),表明西洋参恶疫霉的诱导能力较强,其菌体诱导的几丁质酶活性变异系数也较高,为 14.3%,远高于其他病原真菌菌体,表明该病原真菌的诱导作用在不同

放线菌中存在较大差异;而人参锈腐病菌菌体的几丁质酶活性变异系数仅为 2.81%,表示该病原真菌的诱导作用在不同放线菌间相差不大。西洋参锈腐病菌 1 和西洋参锈腐病菌 2 对放线菌诱导的几丁质酶活性平均值分别为 8.43 和 7.70 U,表明这 2 株菌的诱导能力有差异,即西洋参锈腐病菌同一菌种不同菌株诱导放线菌产几丁质酶的能力存在差异。

表 1 5 株病原真菌菌体对放线菌发酵液几丁质酶活性的诱导作用

Table 1 Induction on activity of chitinase in actinomycete fermented liquid by 5 strains of fungal pathogen of American Ginseng and Ginseng

放线菌编号 Actinomycete No.	CK	西洋参锈 腐病菌 1 <i>C. destructans</i> 1	西洋参锈 腐病菌 2 <i>C. destructans</i> 2	西洋参 恶疫霉 <i>P. cactorum</i>	人参锈腐病菌 <i>Cylindro- carpon</i> sp.	人参根腐菌 <i>N. radicicola</i>	$\bar{X}p$	$C \cdot V/\%$
Act1	32.42±0.14	9.68±0.17	8.39±0.11	8.04±0.02	7.30±0.05	8.16±0.62	8.31	10.41
Act7	39.33±0.44	8.25±0.19	7.17±0.02	9.21±0.92	7.29±0.02	7.18±0.04	7.82	11.49
Act11	34.14±0.30	8.56±0.79	7.44±0.02	11.20±0.42	7.88±0.44	7.57±0.13	8.53	18.22
Act12	34.72±0.10	8.54±0.36	7.43±0.06	11.58±0.88	7.65±0.29	9.26±0.22	8.89	18.79
Act13	35.61±0.26	9.30±0.26	8.29±0.11	7.87±0.04	7.27±0.06	7.22±0.04	7.99	10.71
Act24	38.08±0.17	7.74±0.20	8.16±0.08	9.07±0.64	7.29±0.11	7.22±0.06	7.90	9.60
D141	31.84±0.23	7.75±0.28	7.60±0.05	9.47±0.66	7.56±0.02	7.59±0.08	7.99	10.36
D154	39.29±0.17	8.26±0.25	7.37±0.02	8.44±0.78	7.49±0.11	7.51±0.13	7.81	6.35
D220	47.90±0.17	7.83±0.04	7.46±0.00	8.43±0.90	7.57±0.06	7.67±0.04	7.79	4.90
$\bar{X}a$	37.04	8.43	7.70	9.26	7.48	7.71	—	—
$C \cdot V/\%$	13.28	8.07	5.87	14.30	2.81	8.51	—	—

从表 1 还可看出,经不同病原真菌菌体诱导后,9 株放线菌的几丁质酶活性平均值差异不大,为 7.79~8.89 U,但不同病原真菌菌诱导的放线菌几丁质酶活性变异系数相差较大,为 4.90%~18.79%。

2.2 供试病原真菌对放线菌纤维素酶合成的诱导作用

5 株病原真菌菌体诱导处理放线菌发酵液的纤维素酶活性见表 2。

表 2 5 株病原真菌菌体对放线菌发酵液纤维素酶活性的诱导作用

Table 2 Induction on activity of cellulase in actinomyce fermented liquid by 5 strains of fungal pathogen of American Ginseng and Ginseng

放线菌编号 Actinomycete No.	CK	西洋参锈 腐病菌 1 <i>C. destructans</i> 1	西洋参锈 腐病菌 2 <i>C. destructans</i> 2	西洋参 恶疫霉 <i>P. cactorum</i>	人参锈腐病菌 <i>Cylindro- carpon</i> sp.	人参根腐菌 <i>N. radicicola</i>	$\bar{X}p$	$C \cdot V/\%$
Act1	18.59±0.76	7.47±0.09	7.07±0.09	6.82±0.86	7.80±0.09	7.93±0.42	7.42	6.36
Act7	15.37±0.66	8.48±0.07	8.44±0.11	10.66±0.08	10.63±0.07	11.56±0.39	9.95	14.21
Act11	17.61±0.18	7.03±0.54	7.37±0.13	14.31±0.20	6.83±0.49	6.87±0.41	8.48	38.49
Act12	18.88±0.07	9.18±0.93	8.32±0.47	14.48±0.89	7.92±0.55	8.04±0.08	9.59	28.98
Act13	5.81±0.21	11.04±0.75	9.34±0.31	9.14±0.44	8.21±0.99	9.55±0.14	9.46	10.82
Act24	19.07±0.73	7.97±0.11	9.05±0.08	17.19±0.92	8.27±0.17	10.18±0.88	10.53	36.26
D141	14.55±0.03	8.20±0.45	9.77±0.34	7.24±0.30	9.96±0.16	9.55±0.27	8.94	13.16
D154	13.29±0.48	7.81±0.19	7.52±0.28	8.07±0.13	7.60±0.28	7.77±0.28	7.75	2.75
D220	17.68±0.79	7.17±0.37	6.14±0.08	21.20±0.81	7.08±0.54	6.91±0.17	9.70	66.41
$\bar{X}a$	15.65	8.26	8.11	12.12	8.26	8.71	—	—
$C \cdot V/\%$	26.96	14.97	14.56	41.02	15.27	18.28	—	—

从表 2 可以看出,5 株病原真菌菌体对 9 株供试放线菌纤维素酶合成有不同程度的诱导作用,纤维素酶活性为 6.14~21.20 U,同一放线菌不同病原真菌处理间存在一定差异。5 种病原菌中,以西洋参恶疫霉菌体为惟一碳源时,平均纤维素酶活性和变异系数分别为 12.12 U 和 41.02%,表明西洋

参恶疫霉对 9 株放线菌纤维素酶合成的诱导能力较强,且在不同放线菌间存在较大差异。在以可溶性淀粉为惟一碳源的培养液(CK)中,供试放线菌的纤维素酶活性为 5.81~19.07 U,除 Act13 外,其余 8 株放线菌由淀粉诱导的纤维素酶活性均明显高于 5 株病原真菌菌体,其原因尚不清楚。用西洋参锈腐

病菌 1 和西洋参锈腐病菌 2 诱导时,放线菌发酵液的纤维素酶活性均值分别为 8.26 和 8.11 U,表明西洋参锈腐病菌同一菌种不同菌株对放线菌产纤维素酶的诱导能力差异不大。

从表 2 还可以看出,经 5 株病原真菌菌体诱导后,9 株放线菌的纤维素酶活性平均值为 7.42~10.53 U,表明不同放线菌菌株纤维素酶活性差异不大,但不同放线菌菌株的纤维素酶活性变异系数存在较大差异,为 2.75%~66.41%,其中 D154 的

纤维素酶活性变异系数最低,而 D220 最高,表明不同病原真菌对 D154 纤维素酶合成的诱导作用差异不大,但对 D220 的纤维素酶合成存在明显差异。西洋参恶疫霉菌体对 D220 的诱导作用最强,其纤维素酶活力高达 21.20 U,约为西洋参锈腐病菌 2 的 3.5 倍。

2.3 生防放线菌对病原真菌菌丝的溶解作用

生防放线菌对病原真菌菌丝的溶解作用和抑制作用分别见图 1 和表 3。

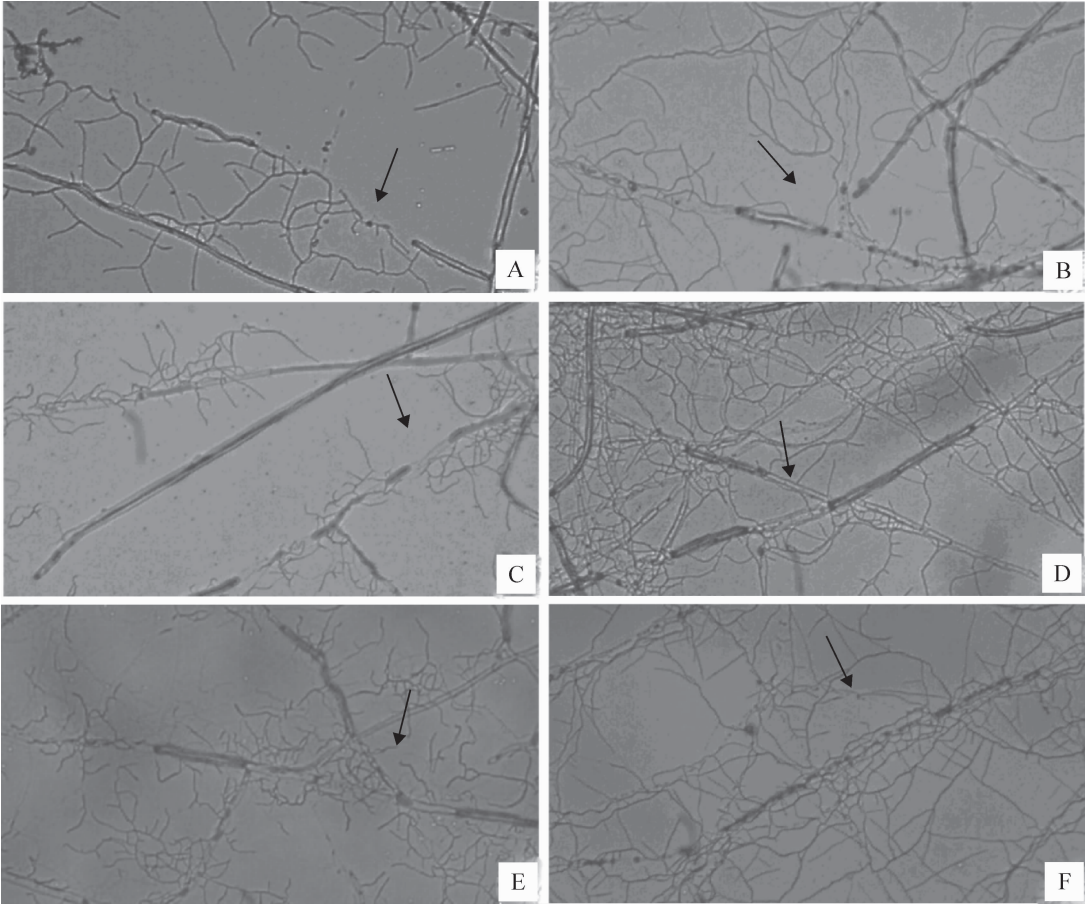


图 1 生防放线菌对病原菌菌丝的溶解作用(×40)
A. Act11-81782;B. D141-81782;C. Act24-3.3591;D. D141-81783;E. Act24-81783;F. Act13-81783

Fig. 1 Inhibitory effects of antagonistic actinomycetes on mycelium of fungal pathogen of American Ginseng and Ginseng (×40)

表 3 生防放线菌对西洋参和人参病原真菌菌丝的抑制作用(7 d)

Table 3 Inhibitory effects of antagonistic actinomycetes on mycelium of fungal pathogen of American Ginseng and Ginseng (7 d)

放线菌编号 Actinomycete No.	西洋参锈腐病菌 1 <i>C. destructans</i> 1	西洋参锈腐病菌 2 <i>C. destructans</i> 2	人参锈腐病菌 <i>Cylindrocarpon</i> sp.
Act11	++	+	+
Act13	+	++	++
Act24	+	++	++
D141	++	++	+

注: ++表示缠绕溶解作用显著;+表示有缠绕溶解作用。
Note: ++represents winding and rupture obviously;+represents winding and rupture.

从图 1、表 3 可以看出,几丁质酶和纤维素酶活性较高的放线菌株 Act11、Act13、Act24 及 D141 的菌丝与西洋参锈腐病菌、人参锈腐病菌菌丝接触时,其菌丝可缠绕在病原真菌菌丝上,并使其发生不同程度的溶解,其中 Act11、Act24 和 D141 的溶解作用明显,表明放线菌对病原真菌菌丝有溶解作用,该作用与病原真菌细胞壁组分诱导放线菌合成几丁质酶、纤维素酶有关。分析显微镜下的菌丝溶解现象与酶活性测定结果的相关性表明,供试放线菌与病原真菌接触时产生的主要抗菌作用是通过酶解作用完成的,即病原真菌细胞壁中的几丁质、纤维素诱导放线菌合成几丁质酶和纤维素酶,这些水解酶再溶解真菌菌丝,抑制真菌侵染,导致病原真菌死亡。接触时是否产生抗生素,尚待进一步研究证实。

3 结论与讨论

本研究结果表明,供试病原真菌能诱导供试放线菌合成几丁质酶和纤维素酶;当供试放线菌与病原菌菌丝接触后,放线菌通过分泌几丁质酶、纤维素酶等真菌细胞壁降解酶,使病原真菌菌丝溶解,抑制病原真菌的进一步侵染,从酶解角度揭示了生防放线菌对特定病原真菌的接触抗菌机理。

目前,关于参类锈腐病、疫病及根腐病等土传根部病害的微生物防治已有研究,但多集中在生防真菌^[2,6,16-18]、细菌^[4,19-20]及放线菌^[21-22]的筛选上,尚未见以参类土传根部病害病原真菌菌体为碳源时对生防菌水解酶合成诱导研究,仅有少量在其他病原真菌上的类似研究。如马桂珍等^[8]采用不同碳源诱导链孢粘帚霉 HL-1-1 产几丁质酶,结果表明,以病原菌核盘菌菌核为碳源时,几丁质酶的合成量最大,以葡萄糖为碳源时,未检测到几丁质酶的活性。柳良好等^[9]研究了以纯几丁质和水稻纹枯病菌细胞壁为惟一碳源诱导哈茨木霉 NF9、TC3 及 P1 产几丁质酶,结果表明,诱导处理几丁质酶活均高于非诱导的阳性对照,并且纯几丁质的诱导能力显著低于病原真菌细胞壁的诱导能力。邵红涛等^[23]研究了生防木霉菌 *Trichoderma* MM35 分泌的胞外酶对大豆根腐病病原菌的拮抗作用,发现以病原菌菌丝为惟一碳源,可诱导生防木霉菌分泌几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶;在土壤中接种 *Trichoderma* MM35、*F. oxysporum* 及 *R. solani* 后均能检测出以上 2 种酶的活性;向含有不同病原菌的土壤中接种生防木霉后,土壤中以上 2 种酶的活性不同。可知,现有类似研究主要集中在用病原真菌菌体诱导生防真菌合成几丁

质酶或葡聚糖酶,尚无以病原真菌菌体为惟一碳源诱导生防放线菌合成几丁质酶和纤维素酶的报道,更无以西洋参、人参土传根部病害病原真菌菌体为碳源,诱导生防放线菌合成几丁质酶和纤维素酶的研究。本试验为生防放线菌对人参、西洋参土传根部土传病害防治机理研究提供了新证据。

本研究中,同一菌种不同菌株西洋参锈腐病菌 1 和西洋参锈腐病菌 2 对供试放线菌几丁质酶、纤维素酶合成的诱导作用差异较小。这可能与不同菌株的菌体及胞壁成分差异有关,但详细机制尚不清楚。

另外,以可溶性淀粉为惟一碳源的对照处理中,供试放线菌合成的几丁质酶活性远大于以病原真菌菌体为惟一碳源处理;纤维素酶活性(除 Act13 外)也表现出了相同的趋势,其原因可能与真菌菌体中可利用碳源的数量及质量有关。病原真菌菌体中除了几丁质、纤维素及其他多糖等含碳物质外,还有蛋白质、核酸等物质,其成分远比淀粉复杂。当加入相等质量的病原真菌菌体粉和淀粉时,纯淀粉中的含碳物质数量多于菌体,对菌体生长量有影响,即可能通过促进放线菌的生长等途径增加几丁质酶和纤维素酶的合成量,表现为酶的活性增强,其机理尚待研究。

【参考文献】

- [1] 严雪瑞,傅俊范. 柱孢属真菌和参类锈腐病的研究历史与现状 [J]. 沈阳农业大学学报,2002,33(1):71-75.
Yan X R, Fu J F. A summary of researches on cylindrocarpon and panax root rust-rot [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2002, 33(1): 71-75. (in Chinese)
- [2] 王 慧,傅俊范,潘争艳. 人参锈腐病菌拮抗菌的筛选及其耐药性测定 [J]. 江苏农业科学,2008(3):111-114.
Wang H, Fu J F, Pan Z Y. The selection and their resistance measurement of antagonistic microbes against the pathogens of rootrust rot of Ginseng [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2008 (3): 111-113. (in Chinese)
- [3] 赵曰丰. 我国人参疫病的研究进展 [J]. 植物保护,1995(4):33-35.
Zhao Y F. Progress on blight of Ginseng in China [J]. Plant Protection, 1995(4): 33-35. (in Chinese)
- [4] Lee B D, Park H. 枯草杆菌 B-4228 对人参根腐病的抑制作用 [J]. 人参研究,2005(4):48.
Lee B D, Park H. Inhibitory effects of bacillus subtilis B-4228 against ginseng root rust-rot [J]. Ginseng Research, 2005(4): 48. (in Chinese)
- [5] 赵曰丰. 人参西洋参忌地形成机制 [J]. 特产研究,2001(1):40-45.
Zhao Y F. The mechanism of forming replant obstacle of Gin-

- seng and American ginseng [J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2001(1): 40-45. (in Chinese)
- [6] 张爱华, 周国兴, 杨庭疆, 等. 4 株木霉对人参疫病菌、西洋参锈腐病菌的拮抗作用 [J]. 特产研究, 2008(3): 34-36.
Zhang A H, Zhou G X, Yang T J, et al. Antagonism of *Trichoderma* against the pathogens of blight of panax ginseng and rootrust rot of American ginseng [J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2008(3): 34-36. (in Chinese)
- [7] 赵阿娜, 丁万隆. 利用拮抗微生物防治中药材土传病害研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(7): 485-487.
Zhao A N, Ding W L. Progress on the control of medicinal plants soil-borne disease by anti-microorganism [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2005, 30(7): 485-487. (in Chinese)
- [8] 马桂珍, 高会兰, 张拥华, 等. 链孢粘帚霉几丁质酶的诱导及其抗真菌活性研究 [J]. 微生物学通报, 2007, 34(5): 905-908.
Ma G Z, Gao H L, Zhang Y H, et al. Chitinases induced from *Gliocadium catenulatum* HL-1-1 and their antagonistic activity against plant pathogenic fungi [J]. Microbiology Bulletin, 2007, 34(5): 905-908. (in Chinese)
- [9] 柳良好, 徐 同. 哈茨木霉几丁质酶诱导及其对水稻纹枯病菌的拮抗作用 [J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 359-363.
Liu L H, Xu T. Induced chitinases from *Trichoderma harzianum* strains and their antagonistic activity against rice sheath blight pathogen [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(4): 359-363. (in Chinese)
- [10] 左豫虎, 康振生, 杨传平, 等. β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性与大豆对疫霉根腐病抗性的关系 [J]. 植物病理学报, 2009, 39(6): 600-607.
Zuo Y H, Kang Z S, Yang C P, et al. Relationship between activities of β -1,3-glucanase and chitinase and resistance to phytophthora root rot in soybean [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2009, 39(6): 600-607. (in Chinese)
- [11] 高鸣宇, 蒋 萍, 李 冠. 新疆甜瓜经疫霉菌毒素诱导后酶活性的变化 [J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(4): 256-258.
Gao M Y, Jiang P, Li G. Study on the changes of several enzyme-activities of Xinjiang melon induced by *Phytophthora melonis* Toxin [J]. Plant physiologic communications, 1998, 34(4): 256-258. (in Chinese)
- [12] 程丽娟, 薛泉宏. 微生物与实验技术 [M]. 西安: 世界图书出版社, 2000.
Cheng L J, Xue Q H. Experimental techniques of microbiology [M]. Xi'an: World Publishing Corporation, 2000. (in Chinese)
- [13] 邓小雁, 朱建兰. Dh 菌株胞外蛋白酶及几丁质酶的活性测定 [J]. 西北农业学报, 2006, 15(5): 128-131, 135.
Deng X Y, Zhu J L. Assay of activity of extracellular proteases and chitin of Dh strain [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2006, 15(5): 128-131, 135. (in Chinese)
- [14] 夏国庆, 董志扬, 苗雪霞, 等. 几丁质酶产生菌的筛选和酶的一般性质 [J]. 农业生物技术学报, 1997, 5(1): 79-82.
Xia G Q, Dong Z Y, Miao X X, et al. Some properties of the chitinase from *Aspergillus* sp. F-817 [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 1997, 5(1): 79-82. (in Chinese)
- [15] 马丽娜, 高俊明, 李 欣. 盾壳酶产几丁质酶培养条件的研究 [J]. 山西农业大学学报, 2006, 26(4): 229-331, 334.
Ma L N, Gao J M, Li X. Study on culturing condition of chitinase produced by *Coniothyrium Minutans* [J]. Journal of Shanxi Agricultural University, 2006, 26(4): 229-331, 334. (in Chinese)
- [16] 任守让, 王瑞霞. 对人参锈腐病菌的拮抗真菌及其防病效果 [J]. 吉林农业大学学报, 1998, 20(增刊): 120.
Ren S R, Wang R X. Controlling effects of antagonistic fungi to cylindrocarpon destructans in Ginseng [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 1998, 20(Suppl): 120. (in Chinese)
- [17] 胡丽云, 庞金钊, 刘文芝, 等. 西洋参真菌病害的生物防治 [J]. 生物技术, 2005, 15(6): 76-78.
Hu L Y, Pang J Z, Liu W Z, et al. Biological control of American ginseng with fungus disease [J]. Biotechnology, 2005, 15(6): 76-78. (in Chinese)
- [18] 王 慧, 傅俊范, 周如军, 等. 木霉菌 ECT-01-2 对人参锈腐病菌的拮抗作用 [J]. 河南农业科学, 2008(2): 66-69.
Wang H, Fu J F, Zhou R J, et al. Antagonism of *Trichoderma* sp. ECT-01-2 against Ginseng rust rot pathogens [J]. Henan Agricultural Science, 2008(2): 66-69. (in Chinese)
- [19] 吴连举, 杨依军, 武 侠, 等. 利用土壤拮抗性微生物防治人参锈腐病 [J]. 中国生物防治, 1999, 15(4): 166-168.
Wu L J, Yang Y J, Wu X, et al. Studies on the control of *Cylindrocarpon destructans* of Ginseng by soil antagonistic microbes [J]. Chinese Journal of Biological Control, 1999, 15(4): 166-168. (in Chinese)
- [20] 傅俊范, 史会岩, 周如军, 等. 人参锈腐病生防细菌的分离筛选与鉴定 [J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(2): 136-139, 144.
Fu J F, Shi H Y, Zhou R J, et al. Isolation screening and identification of antagonistic bacteria against Ginseng rusted root disease [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2010, 32(2): 136-139, 144. (in Chinese)
- [21] 马凤茹, 邢云章, 李晓红. “五四零六”激抗剂防治人参锈腐病的研究 [J]. 特产研究, 1993(2): 1-2.
Ma F R, Xing Y Z, Li X H. Studies on controlling ginseng rusted rot by 5406 shock resistance [J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 1993(2): 1-2. (in Chinese)
- [22] 杨 阳, 何随成, 张 丽. 抗人参真菌病害的链霉菌的摇瓶发酵试验 [J]. 微生物学杂志, 2002, 2(3): 56-58.
Yang Y, He S C, Zhang L. Shaker flask fermentation experiment of *Streptomyces* of anti-fungal disease of ginseng used in ginseng production [J]. Journal of Microbiology, 2002, 2(3): 56-58. (in Chinese)
- [23] 邵红涛, 许艳丽. 木霉菌(胞外水解酶)拮抗大豆根腐病原菌的机制研究 [J]. 大豆科学, 2006, 25(6): 429-433.
Shao H T, Xu Y L. Assessment of production of extracellular enzymes by *Trichoderma* spp. for control of soybean root rot pathogens (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*) [J]. Soybean Science, 2006, 25(4): 429-433. (in Chinese)