

玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌生理指标的影响

马璐璐¹, 闫翠梅¹, 王芳芳¹, 王 丽¹, 张天雅¹, 齐永志^{1*}, 甄文超^{2*}

(1. 河北农业大学植物保护学院, 河北 保定 071001; 2. 河北农业大学农学院/河北省作物生长调控重点实验室, 河北保定 071001)

摘 要:为明确玉米秸秆腐解产物对假禾谷镰刀菌的影响, 采用生长速率法和涂布平板法分别测定玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌(*Fusarium pseudograminearum*)菌丝生长和孢子萌发的影响; 采用DNS法测定腐解液对该菌多聚半乳糖醛酸酶(PG)和果胶甲基半乳糖醛酸酶(PMG)活性; 采用Hoffman法测定多聚半乳糖反式消除酶(PGTE)和果胶甲基反式消除酶(PMTE)活性。结果表明: 玉米秸秆腐解0 d、7 d和14 d对菌丝生长和孢子萌发均表现低促高抑的作用, 浓度高于0.062 5 g·DW/mL腐解液处理均表现抑制作用, 且随腐解天数的增加抑制作用增强, 两者抑制率最高分别达100%和93.7%。腐解液对假禾谷镰刀菌PMTE和PGTE活性均表现抑制作用, 抑制率分别在1.2%~99.0%和6.6%~99.6%; 腐解7 d和14 d、浓度低于0.062 5 g·DW/mL腐解液处理, PG活性在8.787~10.420 U/mg, 与对照相比增幅在4.2%~22.2%; PMG活性在7.557~8.177 U/mg, 与对照相比增幅在2.3%~10.7%。该研究揭示了秸秆还田条件下小麦茎基腐病重发的原因。

关键词:玉米秸秆腐解液; 假禾谷镰刀菌; 菌丝生长; 孢子萌发; 细胞壁降解酶

中图分类号: S435.121.4⁺9

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)05-0051-05

Effects of Corn Straw Decomposed Liquid on Physiological Index of *Fusarium Pseudograminearum*

MA Lulu¹, YAN Cuimei¹, WANG Fangfang¹, WANG Li¹, ZHANG Tianya¹, QI Yongzhi^{1*}, ZHEN Wenchao^{2*}

(1. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001; 2. College of Agronomy, Hebei Agricultural University/Hebei Key Laboratory of Crop Growth Regulation, Baoding 071001, China)

Abstract: In order to clarify the effects of decomposed maize straw liquid on *F. pseudograminearum*, the growth rate method and coating plate method were used to determine the effect of corn straw decomposition solution on mycelial growth and spore germination of *F. pseudograminearum*. The activities of PG and PMG were determined by DNS method, and the activities of PGTE and PMTE were determined by Hoffman method. The results showed that 0, 7 and 14 days after decomposition of corn straw had low promoting and high inhibiting effects on mycelial growth and spore germination, and the treatments with the concentration higher than 0.062 5 g·DW/mL had inhibitory effects, and the inhibitory effect became stronger with the increase of decomposition days, with the highest inhibition rates of 100% and 93.7%, respectively. The decomposed maize straw liquid showed an inhibition on activities of PMTE and PGTE of *F. pseudograminearum*, and the inhibition rates were between 1.2% to 99.0% and 6.6% to 99.6%, respectively. The results showed that PG activity increased by 4.2%~22.2% and PMG activity increased by 2.3%~10.7% in the range of 8.787~10.420 U/mg and 7.557~8.177 U/mg, respectively, compared with the control, when the decomposition solution concentration was lower than 0.062 5 g·DW/mL for 7 and 14 days. This study reveals the causes of repeated occurrence of wheat crown rot under the condition of straw returning to field.

Key words: Decomposed corn straw liquid; *Fusarium pseudograminearum*; Mycelial growth; Spore germination; Cell wall degradation enzyme

收稿日期: 2019-12-27

基金项目: “十三五”国家重点研发计划(2017YFD0300906); 河北省自然科学基金(C2016204211); 河北省教育厅项目(ZD2016162)

作者简介: 马璐璐(1991-), 女, 在读硕士, 主要从事植病生态学研究。

通讯作者: 齐永志, 男, 博士, 副教授, E-mail: qiyongzhi1981@163.com

甄文超, 男, 博士, 教授, E-mail: wenchao@hebau.edu.cn

小麦茎基腐病(Wheat Crown Rot, WCR)是一种世界性土传病害,严重威胁小麦安全生产^[1]。该病是由一种或多种病原菌单独或复合侵染所致,引起小麦基部茎秆出现褐变症状,严重者后期形成白穗甚至不能抽穗^[2-3]。假禾谷镰刀菌是引起小麦茎基腐病发生的主要病原菌之一,2012年在河南省麦区首次被发现。近年来,假禾谷镰刀菌在我国大部分麦区的分离频率呈逐年上升趋势,但各区小麦茎基腐优势病原菌也存在一定差别^[4-5]。河北东南部、河南北部、山东北部和山西南部麦区均以假禾谷镰刀菌(*Fusarium pseudograminearum*)为主,其次是麦根腐离蠕孢菌(*Bipolaris sorokiniana*);而山东西部、江苏北部、安徽中北部麦区以禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)分离频率最高,河南中部和东部为上述两种菌混合侵染区^[6]。假禾谷镰刀菌和禾谷镰刀菌是中国小麦茎基腐病的主要病原菌^[7]。

秸秆还田是目前农业生产中秸秆资源利用的主要渠道,也是重要的增产技术措施。该作业方式提高了土壤有机碳含量,对农业可持续发展具有重要作用^[8]。但秸秆还田使秸秆中的病原菌直接还田,秸秆在土壤中释放的营养物质可为病原菌提供有利生存环境^[9-10]。研究表明,玉米秸秆腐解液对玉米大斑突脐孢菌菌丝生长表现抑制作用^[11]。玉米秸秆腐解液对小麦禾谷丝核菌菌核有不同程度的促进或抑制作用^[12]。花椒提取物处理后黑粉病的果胶酶和纤维素酶活性显著弱于对照^[13]。不同时期提取的腐解液对禾谷丝核菌、平脐蠕孢菌和禾顶囊壳小麦变种三种病原菌菌丝均有不同程度的抑制作用^[14]。

目前,关于玉米秸秆还田对假禾谷镰刀菌的影响研究较少。为明确玉米秸秆腐解产物对假禾谷镰刀菌的影响,本试验通过室内试验测定秸秆腐解液处理后假禾谷镰刀菌菌丝生长、孢子萌发、多聚半乳糖醛酸酶(PG)、果胶甲基半乳糖醛酸酶(PMG)、多聚半乳糖反式消除酶(PGTE)和果胶甲基反式消除酶(PMTE)活性的变化,可揭示秸秆还田条件下小麦茎基腐病重发的原因。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试病原菌:假禾谷镰刀菌(*F. pseudograminearum*),由河北农业大学植物保护学院植病生态学实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 试验时间与地点

试验于2017年3月到2017年11月在河北省保定市河北农业大学植病生态实验室进行。

1.2.2 玉米秸秆腐解液的制备

参照张承胤等方法^[14],将新鲜玉米秸秆自然风干,粉碎至5 cm,称取550 g秸秆置于密闭容器内,并加入5 L土壤稀释液(25 g土加入250 mL无菌水中,震荡摇匀后静置1 h,再取100 mL上清液加入6 L蒸馏水中即为土壤稀释液),于25 °C室温下腐解。分别于腐解0、7、14、21、35、49 d后提取腐解液(其中0 d代表腐解6 h的腐解液),腐解液先经3层纱布过滤2次,再经5 000 r/min离心25 min后,45 °C低压旋转蒸发浓缩至70 mL,得到5 g·DW/mL母液(5 g·DW/mL为1 mL水溶液中含5 g干秸秆的腐解物),再用无菌水依次稀释得2.5、1.25、0.625、0.312 5 g·DW/mL的腐解液,4 °C贮藏,备用。

1.2.3 玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌菌丝生长和孢子萌发影响的测定

1.2.3.1 菌丝生长测定

分别取10 mL不同腐解时期各浓度的腐解液加入90 mL PDA培养基中,得腐解液终浓度为0.5、0.25、0.125 g(模拟生产实际秸秆全量还田,9 000 kg/hm²)、0.062 5、0.031 25 g·DW/mL的PDA培养基,灭菌后,培养基冷却至40~50 °C时倒平板,以加入等体积无菌水做对照。无菌条件下,用直径5 mm打孔器在培养4 d的假禾谷镰刀菌菌落边缘打取菌饼,分别接种于含腐解液的PDA平板上,每浓度处理3次重复;25 °C黑暗培养3 d后,采用十字交叉法测量各菌落直径,按下式计算抑菌率:抑菌率(%)=100×[(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径]。

1.2.3.2 孢子萌发测定

将上述假禾谷镰刀菌菌饼接种至含45 mL CMC培养基的100 mL三角瓶中,每瓶5个菌饼;25 °C,160 r/min恒温振荡器中培养72 h后,用3层无菌纱布过滤除去菌丝,将滤液在4 000 r/min离心10 min,弃上清液;将孢子重悬于离子水中,调节孢子悬浮液浓度为1.0×(10⁵~10⁶)个/mL,4 °C保存。

分别取100 μL不同腐解时期各浓度的腐解液,与900 μL孢子悬浮液混合均匀,以加入等量无菌水为对照,每处理3次重复。用移液枪吸取100 μL含腐解液的孢子悬浮液滴入WA平板上,最后用无菌涂布器涂匀,于25 °C培养箱中保湿培养。当对照孢子萌发率达90%以上时,分别观察

各浓度处理孢子萌发(以芽管长度超过孢子短半径视为萌发)情况,统计不同时期不同浓度腐解液的WA平板上孢子萌发数,计算孢子萌发抑制率:孢子萌发率(%)=100×(已萌发的分生孢子数/总孢子数),抑制率(%)=100×[(对照孢子萌发率-腐解液处理孢子萌发率)/对照孢子萌发率]。

1.2.4 玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌细胞壁降解酶活性影响的测定

1.2.4.1 假禾谷镰刀菌粗酶液的制备

分别取5 mL不同时期不同浓度腐解液加入含有45 mL Marcus培养液^[15]的三角瓶中,得到含腐解液终浓度为0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 g·DW/mL的Marcus培养液。每浓度处理3次重复,每重复3瓶,以加入等体积无菌水做对照。121 °C湿热灭菌20 min。每瓶接入5个假禾谷镰刀菌菌饼;28 °C,120 r/min振荡培养6 d后,8 000 r/min离心5 min,取上清即得粗酶液,4 °C保存。

1.2.4.2 假禾谷镰刀菌细胞壁降解酶活性测定

采用紫外-可见分光光度法测定细胞壁降解酶活性。PG和PMG活性测定采用二硝基水杨酸试剂(DNS),在540 nm处测定OD值。30 °C条件下每分钟每毫克酶蛋白催化底物释放1.0 μg还原糖为1个酶活性单位。按Hoffman方法在232 nm处测定PGTE和PMTE活性。30 °C条件下每分钟每毫克酶蛋白催化底物释放1.0 μmol不饱和醛为1个酶活性单位^[16]。

1.3 数据分析

采用Excel 2013进行数据统计绘图,利用SPSS 17.0软件进行Duncan氏新复极差法比较各处理间差异显著性。

2 结果与分析

2.1 玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌菌丝生长的影响

0、7、14 d提取的腐解液对假禾谷镰刀菌菌丝生长均表现出低促高抑作用,0.031 25、0.062 5 g·DW/mL腐解液对假禾谷镰刀菌菌丝生长均表现促进作用,14 d 0.031 25 g·DW/mL腐解液对假禾谷镰刀菌菌丝生长促进作用最强,比对照提高17.6%;21 d 0.031 25 g·DW/mL腐解液对假禾谷镰刀菌菌丝生长表现促进作用,比对照提高6.7%,其余浓度表现抑制作用;35 d和49 d提取的腐解液对假禾谷镰刀菌菌丝生长均表现出抑制作用,秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌的抑制作用随天数的增加和浓度的提高而增强,49 d 0.5 g·DW/mL腐解液抑制率

最高,达100.0%(图1)。

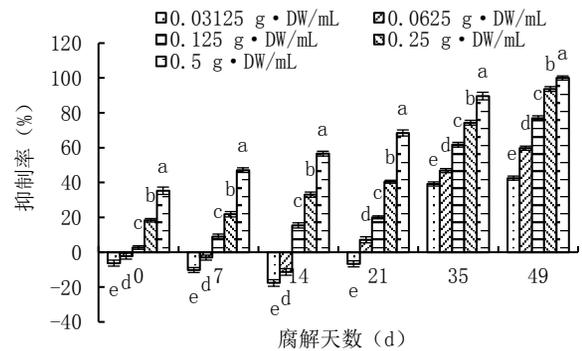


图1 玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌菌丝生长的影响

2.2 玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌孢子萌发的影响

0、7、14 d提取的腐解液对假禾谷镰刀菌孢子萌发均表现出低促高抑的作用,0.031 25、0.062 5 g·DW/mL腐解液对假禾谷镰刀菌孢子萌发均表现促进作用,孢子萌发率比对照提高2.0%~5.7%,其余浓度表现抑制作用;21、35、49 d提取的腐解液对假禾谷镰刀菌孢子萌发均表现出抑制作用,秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌孢子萌发的抑制作用随着天数的增加和浓度的提高而增强,49 d 0.5 g·DW/mL腐解液抑制率最高,达93.7%(图2)。

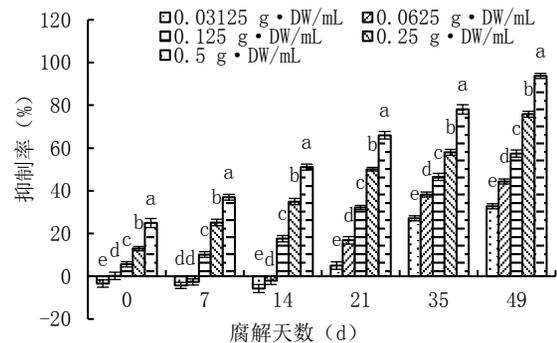


图2 玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌孢子萌发的影响

2.3 玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌细胞壁降解酶的影响

2.3.1 腐解液对多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性的影响

0.031 25 g·DW/mL腐解7 d、14 d和21 d时,腐解液均显著提高假禾谷镰刀菌PG活性,14 d处理活性最高,达10.81 U/mg,比对照提高22.2%;0.062 5 g·DW/mL腐解7 d、14 d时腐解液均提高假禾谷镰刀菌PG活性,14 d提取的腐解液处理PG活性最高,比对照提高16.1%;0 d 0.031 25、0.062 5 g·DW/mL腐解液对假禾谷镰刀菌PG活性影响不显著;0.125、0.25、0.5 g·DW/mL的腐解液均显著降低了PG活性,抑制率最高可达78.4%(图3)。

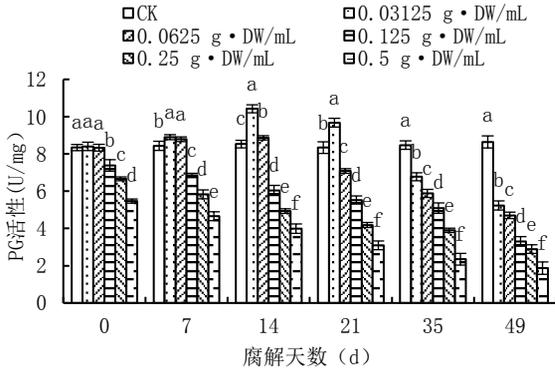


图3 玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌PG活性的影响

2.3.2 腐解液对果胶甲基半乳糖醛酸酶(PMG)活性的影响

7 d和14 d提取的腐解液对假禾谷镰刀菌PMG活性均表现出低促高抑作用,0.031 25 g·DW/mL均显著提高假禾谷镰刀菌PMG活性,14 d处理活性最高,达8.177 U/mg,比对照提高10.7%;7 d 0.062 5 g·DW/mL提高假禾谷镰刀菌PMG活性,比对照提高6.7%;21 d、35 d和49 d提取的腐解液对假禾谷镰刀菌PMG活性均表现抑制作用,抑制作用随浓度提高而提高,抑制率16.1%~87.5%(图4)。

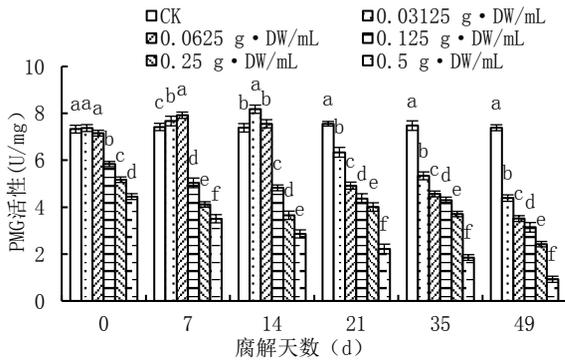


图4 玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌PMG活性的影响

2.3.3 腐解液对多聚半乳糖醛酸反式消除酶(PGTE)活性的影响

腐解液处理后假禾谷镰刀菌PGTE活性均显著低于对照(图5),假禾谷镰刀菌PGTE活性随着腐解液处理浓度的提高和腐解天数的增加而降低。49 d 0.5 g·DW/mL的腐解液处理PGTE活性最低,为0.017 U/mg,比对照降低99.6%。

2.3.4 腐解液对果胶甲基反式消除酶(PMTE)活性的影响

腐解液处理后假禾谷镰刀菌PMTE活性均显著低于对照(图6),假禾谷镰刀菌PMTE活性随着腐解液处理浓度的提高和腐解天数的增加而降低。49 d 0.5 g·DW/mL的腐解液处理PGTE活性最低,为0.256 U/mg,比对照降低88.0%。

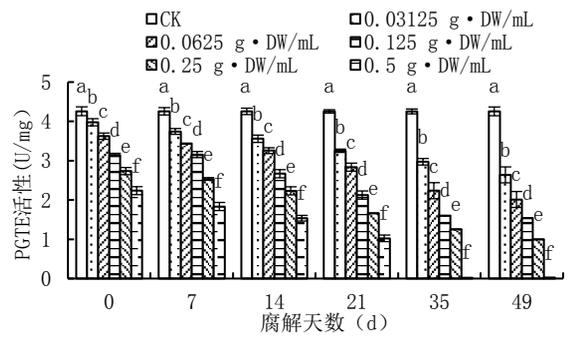


图5 玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌PGTE活性的影响

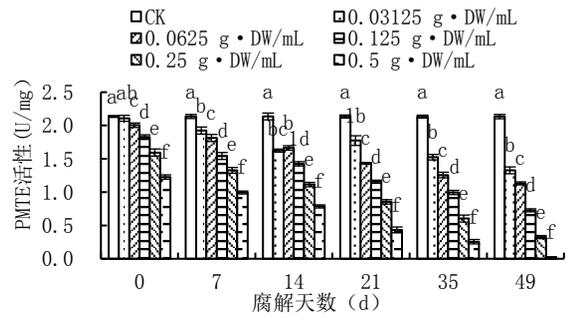


图6 玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌PMTE活性的影响

3 结论与讨论

秸秆还田是提高土壤有机质含量、改善土壤结构的重要措施之一,但也不可忽视玉米秸秆对作物生长的抑制作用和玉米秸秆腐解对病害发生的影响^[17]。本试验中0 d、7 d和14 d提取的玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌菌丝生长和孢子萌发表现出低促高抑的作用,35 d对菌丝生长和孢子萌发均表现抑制作用。郭晓源等^[11]研究发现,玉米秸秆腐解10 d和20 d时,0.031 25 g·DW/mL腐解液对玉米大斑病孢子萌发表现促进作用,其他浓度腐解液均明显抑制孢子萌发,且抑制率随浓度的提高而增大。张承胤等^[14]认为秸秆腐解7 d和14 d时对小麦全蚀病原菌菌丝生长表现低促高抑的作用。本试验结果与以上结果相似。

大部分病原菌通过分泌植物细胞壁降解酶危害寄主植物^[15]。因此,通过提高植物抵抗细胞壁降解酶能力或抑制病原菌细胞壁降解酶表达量,可以防治或减轻病害的发生。本试验研究表明,玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌PMTE和PGTE活性均表现一定的抑制作用,且随着腐解天数的增加和腐解液浓度的提高酶活抑制作用增强,与陈捷等^[18]研究的作物腐解产生的酚类物质均明显抑制腐霉菌PGTE活性结果一致。玉米秸秆腐解

7 d和14 d时,对假禾谷镰刀菌PG和PMG活性均表现低促高抑的作用,其余时间腐解液均表现抑制作用。不同腐解时间、不同浓度腐解液对假禾谷镰刀菌细胞壁降解酶的活性影响存在明显差异,究其原因可能是腐解液中的物质种类或浓度不同所致;此外,秸秆还田条件下,小麦茎基腐病重发的原因可能与秸秆腐解液或腐解物对致病菌PG和PMTE活性的促进作用相关。

玉米秸秆腐解液或秸秆还田土壤中主要含有42种化学物质^[12]。本研究结果表明,玉米秸秆腐解液对假禾谷镰刀菌菌丝生长、孢子萌发和细胞壁降解酶活性表现不同程度的促进和抑制作用。究竟何种物质抑制或促进假禾谷镰刀菌的生长需要进一步深入研究。

参考文献:

[1] Poole G J, Smiley R W, Walker C, et al. Effect of climate on the distribution of *Fusarium* spp. causing crown rot of wheat in the Pacific Northwest of the United States[J]. *Phytopathology*, 2013, 103(11): 1130-1140.

[2] 邓渊钰,孙海燕,李 伟,等.小麦茎基腐镰孢菌致病力的快速测定[J]. *麦类作物学报*, 2016, 36(11): 1547-1552.

[3] Scherm B, Balmas V, Spanu F, et al. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2013, 14(4): 323-341.

[4] 杨 云,贺小伦,胡艳峰,等.黄淮麦区主推小麦品种对假禾谷镰刀菌所致茎基腐病的抗性[J]. *麦类作物学报*, 2015, 35(3): 339-345.

[5] 张德珍,李鹏昌,陈晓霞,等.山东省小麦根腐病原菌的分离鉴定[J]. *植物保护学报*, 2016, 43(2): 233-240.

[6] 周海峰.黄淮麦区小麦茎基腐病原鉴定及其致病性研究[D].郑州:河南农业大学, 2014.

[7] 张向向,孙海燕,李 伟,等.我国冬小麦主产省小麦茎基腐镰孢菌的组成及其致病力[J]. *麦类作物学报*, 2014, 34

(2): 272-278.

[8] 王 幸,邢兴华,徐泽俊,等.耕作方式和秸秆还田对黄淮海夏大豆产量和土壤理化性状的影响[J]. *中国油料作物学报*, 2017, 39(6): 834-841.

[9] 陈梦云,李晓峰,程金秋,等.秸秆全量还田与氮肥运筹对机插优质食味水稻产量及品质的影响[J]. *作物学报*, 2017, 43(12): 1802-1816.

[10] 白 伟,张立祯,逢焕成,等.秸秆还田配施氮肥对东北春玉米光合性能和产量的影响[J]. *作物学报*, 2017, 43(12): 1845-1855.

[11] 郭晓源,景殿玺,周如军,等.玉米秸秆腐解液酚酸物质含量检测及对玉米大斑病菌的影响[J]. *玉米科学*, 2016, 24(4): 166-172.

[12] QI Yongzhi, ZHEN Wenchao, LI Haiyan. Allelopathy of decomposed maize straw products on three soilborn diseases of wheat and the analysis by GC-MS[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2015, 14(1): 88-97.

[13] 莫熙礼,吴彤林,李松克,等.黑粉病菌对苜蓿生长及其细胞壁降解酶活性变化的影响[J]. *贵州农业科学*, 2015, 43(7): 80-82, 87.

[14] 张承胤,代 丽,甄文超.玉米秸秆还田对小麦根部病害化感作用的模拟研究[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(5): 298-301.

[15] 杨 媚,杨迎青,郑 丽,等.水稻纹枯病菌细胞壁降解酶组分分析、活性测定及其致病作用[J]. *中国水稻科学*, 2012, 26(5): 600-606.

[16] 高增贵,陈 捷,高洪敏,等.玉米茎腐病菌产生的细胞壁降解酶种类及其活性分析[J]. *植物病理学报*, 2000, 30(2): 148-152.

[17] 李 晶,赵先龙,乔天长,等.秸秆腐解液对玉米幼苗的生理效应及酚酸类化感成分的检测[J]. *核农学报*, 2015, 29(9): 1799-1805.

[18] 陈 捷,高洪敏,吴友三.酚类物质和代谢对瓜果腐霉菌产生的细胞壁降解酶活性的影响[J]. *植物病理学报*, 1996, 26(2): 76-81.

(责任编辑:王 昱)

(上接第34页)

[13] 张嘉园,亢 玲,桂安胜,等.小麦品系XN6426抽穗期相关基因的检测与定位[J]. *麦类作物学报*, 2016, 39(11): 1433-1439.

[14] 张 政,牛胤全,张 东,等.小麦抽穗期和开花期形状的全基因组关联分析[J]. *作物杂志*, 2019(1): 44-49.

[15] 王校辉.河南省平顶山市耕地土壤养分状况及聚类分析[J]. *东北农业科学*, 2021, 46(3): 37-40.

[16] 刘俊美,单长卷.硒对镉胁迫下玉米幼苗生理特性的影响[J]. *东北农业科学*, 2020, 45(3): 1-5.

[17] 刘 庆,田 侠,史衍玺.外源硒矿粉对玉米硒累积及矿物质元素吸收的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2016, 22(2): 403-409.

[18] 郝玉波,刘华琳,慈晓科,等.施硒对两种类型玉米硒元素分配及产量、品质的影响[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(2):

411-418.

[19] 蒋方山,张海军,吕连杰,等.叶面喷施亚硒酸钠对黑粒小麦籽粒硒含量、产量及品质的影响[J]. *麦类作物学报*, 2018, 38(12): 1496-1503.

[20] 孔凡丽,张恩萍,曹庆军,等.硒的生理功能及在主要作物中的吸收富集[J]. *东北农业科学*, 2020, 45(6): 115-118.

[21] 张胜男,聂兆君,赵 鹏,等.磷硫配施对冬小麦硒吸收及转运的影响[J]. *中国农业科技导报*, 2020, 22(5): 137-144.

[22] Sanghun L, James J D, Howard J W. Selenite adsorption and desorption in selected south Dakota soils as a function of pH and other oxyanions[J]. *Soil Science*, 2011, 176(2): 73-79.

[23] 朱建明,梁小兵,凌宏文,等.环境中硒存在形式的研究现状[J]. *矿物岩石地球化学通报*, 2003, 22(1): 75-81.

(责任编辑:刘洪霞)