

树木伯克霍尔德氏菌 DHR18 诱导橡胶树抗病性相关防御酶分析

罗佑红^{1,2}, 赵欣阳^{1,2}, 蔡海滨², 孟祥佳^{1,2}, 周 燚^{1*}, 涂 敏^{2*}

1. 长江大学农学院, 湖北荆州 434000; 2. 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南海口 571101

摘 要: 为探究树木伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia arboris*) DHR18 诱导橡胶树对胶孢炭疽菌优势种 (*Colletotrichum siamense*) 的抗性, 以橡胶树苗 GT1 为材料, 检测不同浓度的树木伯克霍尔德氏菌 DHR18 发酵液处理以及 DHR18 与胶孢炭疽菌 CH-1 协同处理下橡胶树叶片中多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、过氧化物酶 (peroxidase, POD)、苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 5 种防御相关酶的活性变化。结果表明: 经 3 个浓度 (1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 CFU/mL) 的 DHR18 发酵液处理后, 橡胶树叶片中 CAT、POD、PAL、SOD 和 PPO 活性均高于对照, 其中 1×10^7 CFU/mL 浓度处理的 5 种防御酶活性最高, 防御酶活峰值分别为 1 009.14、29 138.67、110.24、902.42、148.00 U/g, 分别是对照的 2.68 倍、3.35 倍、1.88 倍、3.97 倍、4.51 倍。树木伯克霍尔德氏菌 DHR18 与胶孢炭疽菌 CH-1 协同处理下, 先喷施 DHR18 处理组的 5 种防御酶活性均高于其他处理组, 显著高于对照, 其 CAT、POD、PAL、SOD 和 PPO 活性峰值分别为 1 230.85、45 504.67、117.53、1342.17、134.40 U/g, 分别是对照的 4.56 倍、3.10 倍、2.04 倍、3.28 倍、5.98 倍; 菌株 DHR18 对胶孢炭疽菌的平板抑制率为 71.56%, 在橡胶树苗上对胶孢炭疽病预防效果为 81.79%, 防治效果为 44.35%。研究结果表明, 树木伯克霍尔德氏菌 DHR18 可促使橡胶树防御相关酶的活性提高, 诱导橡胶树产生系统抗性, 诱导抗病性可能是树木伯克霍尔德氏菌 DHR18 拮抗胶孢炭疽病的原因之一。

关键词: 伯克霍尔德氏菌; 橡胶树; 胶孢炭疽菌; 诱导抗病性; 防御酶

中图分类号: S794.1 文献标志码: A

Induction of Resistance-related Defensive Enzymes in *Hevea brasiliensis* by *Burkholderia arboris* DHR18

LUO Youhong^{1,2}, ZHAO Xinyang^{1,2}, CAI Haibin², MENG Xiangjia^{1,2}, ZHOU Yi^{1*}, TU Min^{2*}

1. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434000, China; 2. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: The study was aimed to explore the resistance to *Colletotrichum siamense*, dominant specie of rubber tree induced by *Burkholderia arboris* DHR18. The enzyme activity changes on the treatments of different concentrations of DHR18 fermentation broth and co-treatments of DHR18 with *C.siamense* CH-1 using rubber clone GT1 were studied. Five defensive enzymes including catalase (CAT), peroxidase (POD), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), and superoxide dismutase (SOD) were assayed. Results indicated that treatments with 1×10^8 CFU/mL, 1×10^7 CFU/mL, 1×10^6 CFU/mL of DHR18 fermentation broth showed significant higher activities of CAT, POD, PAL, SOD and PPO in rubber leaves compared to the control group. The enzyme activities with broth concentration 1×10^7 CFU/mL were the highest. The activity peak of the five enzymes was 1 009.14, 29 138.67, 110.24, 902.42 and 148.00 U/g, respectively, which was 2.68, 3.35, 1.88, 3.97 and 4.51 times of the control group, respectively. Under the co-treatments of *B. arboris* DHR18

收稿日期 2024-03-08; 修回日期 2024-04-15

基金项目 国家重点研发计划专项 (No. 2023YFD1200204); 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2021XDNY291)。

作者简介 罗佑红 (1997—), 男, 硕士, 研究方向: 植物病害生物防控。*通信作者 (Corresponding author): 周 燚 (ZHOU Yi), E-mail: zhoyi@yangtzeu.edu.cn; 涂 敏 (TU Min), E-mail: tm_tumin@163.com。

and *C. siamense* CH-1, treatment group inoculated with DHR18 fermentation broth before inoculated with CH-1, the enzyme activities were higher than other co-treatment groups, and significantly higher than that of the control group. Activity peak of CAT, POD, PAL, SOD and PPO was 1 230.85, 45 504.67, 117.53, 1 342.17 and 134.40 U/g, respectively. They were 4.56, 3.10, 2.04, 3.28 and 5.98 times that of the control group, respectively; The plate inhibition rate of strain DHR18 against *C. siamense* was 71.56%, the preventive effect against *C. siamense* on rubber saplings was 81.79%, and the control effect was 44.35%. The results showed that *Burkholderia arboris* DHR18 could promote the activity of defense-related enzymes in rubber trees and induce systemic resistance in rubber trees. The induced resistance may be one of the reasons for the control of *C. siamense* by *B. arboris* DHR18.

Keywords: *Burkholderia arboris*; *Hevea brasiliensis*; *Colletotrichum siamense*; induced systemic resistance; defensive enzyme

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.10.014

天然橡胶是一个国家至关重要的战略资源以及不可替代的工业原料,而全世界 98%的天然橡胶是由橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)生产^[1]。橡胶树种植受到独特的地域和气候限制,其中影响橡胶产量的重要因素之一是生物胁迫^[2]。炭疽病是橡胶树生产中的重要病害,胶孢炭疽菌复合群中的 *Colletotrichum siamense* 是我国植胶区的田间优势致病种,通过侵染橡胶树的枝条、花、叶等组织,造成叶片枯萎和落叶,最终导致严重减产^[3]。目前,主要防治方法是使用化学药剂,由于橡胶树属高大乔木,在防治过程中使用药剂比较单一、药量大、易发生漂移,且化学药剂在防治时存在抗药性、防治成本高和环境污染等问题^[4-5]。因此,急需一种绿色环保、经济安全的手段来防治橡胶树炭疽病。

生物防治是通过利用有益微生物或其代谢物来防治植物病害,已经成为病害防控中一种可持续和有效的方法^[6-7]。生物防治剂不仅可以直接抑制植物病原体的生长来减少对植物的侵染,还能诱导植物的系统抗性,引发植物广泛的防御反应,对多种病原体有着长期的防治效果^[8]。众多研究表明,生防菌可以通过诱导植物相关防御酶的升高,从而增强植物的抗性^[9]。内生耐盐芽孢杆菌 Cal.l.30 和 Cal.f.4 可以诱导番茄对灰葡萄孢的系统抗性,从而有效防治番茄灰霉病^[10]。罗氏假单胞菌 GC-7 处理的植物根系中过氧化氢酶(catalase, CAT)、多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)、苯丙氨酸解氨酶(phenylalanin ammonialyase, PAL)等防御相关酶的活性显著增加,从而增强植物抗性^[11]。

伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* sp.)是一种能有效防治多种植物病害的生防菌,与植物有着密切的共生关系,而且伯克霍尔德氏菌产生的一些次级代谢产物,对大部分植物病原真菌有明显抑制作用。此外,可以通过诱导植物防御相关酶

活性的升高来增强对植物病原菌的抗性^[12]。已有研究发现,越南伯克霍尔德氏菌 C12 通过诱导水稻防御相关酶活性(CAT、PAL、SOD、PPO 和 POD)的升高,从而增强水稻的抗病性^[13];吡咯伯克霍尔德氏菌 S17-377 可诱导水稻防御相关酶活性变化,有 3 种防御相关酶的活性增强,说明伯克霍尔德氏菌可以增强水稻对水稻纹枯病的抗性^[14]。本实验室前期分离得到 1 株对橡胶树胶孢炭疽菌有较强拮抗作用的树木伯克霍尔德氏菌(*B. arboris*),本研究系统测定了不同浓度树木伯克霍尔德氏菌 DHR18 发酵液以及 DHR18 与胶孢炭疽菌协同处理下橡胶树叶片中 CAT、POD、PAL、SOD 和 PPO 活性变化,初步探索树木伯克霍尔德氏菌诱导橡胶树对胶孢炭疽菌的抗性机理,以期橡胶树炭疽病的绿色防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

树木伯克霍尔德氏菌株 DHR18 及橡胶树胶孢炭疽菌 CH-1 均由中国热带农业科学院橡胶研究所种质资源实验室分离、鉴定及保存,其中树木伯克霍尔德氏菌 DHR18 分离自中国热带农业科学院试验场(海南儋州)橡胶树根病区;橡胶树胶孢炭疽菌 CH-1 分离自国家橡胶种质资源圃(儋州)。

供试橡胶种苗品种为 GT1,挑选叶部生长健康、苗长 35 cm,胸径和株高等长势均一的具 1 篷叶淡绿期叶片的种子苗,设置 DHR18 发酵液喷施 3 个浓度处理,以及病原菌与生防菌协同喷施 3 个处理,每个处理使用种子苗 20 株,每个处理重复 5 次,所有种子苗均由国家橡胶种质资源圃提供。

1.2 方法

1.2.1 DHR18 发酵液及胶孢炭疽菌 CH-1 孢子悬浮液制备 挑取 DHR18 单菌落于 100 mL LB 培

培养基中，在恒温摇床（180 r/min，28 ℃）中培养 24 h，将 DHR18 发酵液浓度调节至 1×10^8 CFU/mL 作为原液，用无菌水稀释得到 1×10^7 CFU/mL 和 1×10^6 CFU/mL 浓度的稀释液。胶孢炭疽菌 CH-1 接种在 PDB 培养基中，在恒温摇床（180 r/min，28 ℃）中培养 3 d 待用。炭疽菌接种：参考蔡志英等^[15]的方法，用孢子悬浮液（ 1×10^6 个/mL）接种，预先用无菌昆虫针刺伤橡胶叶片，孢子悬浮液用喷雾器均匀喷施，直到橡胶叶片挂满水滴为止，每个处理重复 3 次；空白对照喷施适量无菌水，套袋保湿。

1.2.2 不同浓度的 DHR18 发酵液处理橡胶树 参考唐文等^[16]的方法，共设置 3 个浓度的 DHR18 发酵液诱导处理（表 1），包括 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 CFU/mL 处理，以 LB 培养基为对照，取 10 mL 不同浓度的 DHR18 发酵液和对照喷洒植株叶面，

每个处理重复 5 次。分别于处理后的 24、48、72、96、120 h，取位置相同的橡胶树叶片，用于防御酶的活性测定。

表 1 不同浓度的 DHR18 处理		
Tab. 1 Treatment methods of DHR18 at different concentrations		
组别 Group	菌液浓度 Bacterial concentration (CFU·mL ⁻¹)	处理方式 Treatment method
T ₁	1×10^6	喷施
T ₂	1×10^7	喷施
T ₃	1×10^8	喷施
CK		喷施

1.2.3 DHR18 与 CH-1 协同处理橡胶树 共设置 4 个处理，处理方式如表 2 所示。样品采集和处理与 1.2.2 相同。

表 2 DHR18 与 CH-1 协同处理		
Tab. 2 Co-treatment methods of DHR18 and CH-1		
组别 Group	处理方式 Treatment method	具体操作 Concrete operation
T ₄	先接病原菌	先喷施胶孢炭疽菌孢子悬浮液（ 1×10^6 个/mL），24 h 后喷施 DHR18 发酵液（ 1×10^7 CFU/mL）
T ₅	先接生防菌	先喷施 DHR18 发酵液（ 1×10^7 CFU/mL），24 h 后喷施胶孢炭疽菌孢子悬浮液（ 1×10^6 个/mL）
T ₆	只接病原菌	先喷施 LB 液体培养基，24 h 后喷施胶孢炭疽菌孢子悬浮液（ 1×10^6 个/mL）
CK	喷施等量 LB 培养基	喷施等量 LB 液体培养基

1.2.4 橡胶树防御酶活性测定 将 1.2.2 和 1.2.3 中采集的橡胶树叶片，使用酶活试剂盒（索莱宝科技有限公司）测定 POD、SOD、CAT、PAL 和 PPO 活性。按照试剂盒说明书中步骤加入试剂，在相应的波长下测定其吸光值，并按照试剂盒的公式计算其酶活力。

1.3 数据处理

实验数据采用 Excel 2016 软件进行统计、整理，采用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行统计分析。

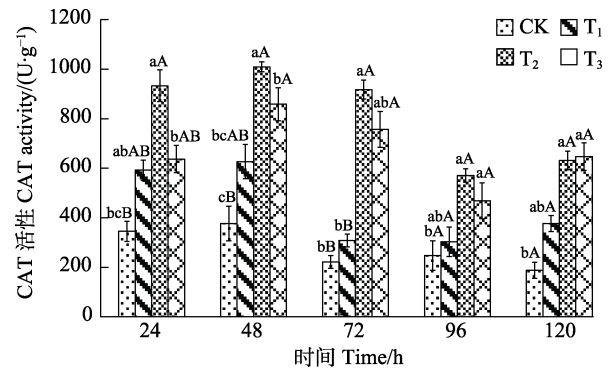
2 结果与分析

2.1 不同浓度 DHR18 发酵液处理对橡胶树防御酶活性的影响

2.1.1 过氧化氢酶活性变化 经不同浓度 DHR18 发酵液处理后，橡胶树叶片中 CAT 活性均高于 CK。其中，T₂、T₃ 处理的 CAT 活性呈先升高后降低再升高的趋势，且在 48 h 时达到峰值，其活性分别为 1009.14 U/g 和 858.79 U/g，为 CK 的 2.68 倍和 2.29 倍，均极显著高于 CK（ $P < 0.01$ ）；而 T₁ 的 CAT 活性在 48 h 后下降并趋于稳定，但在

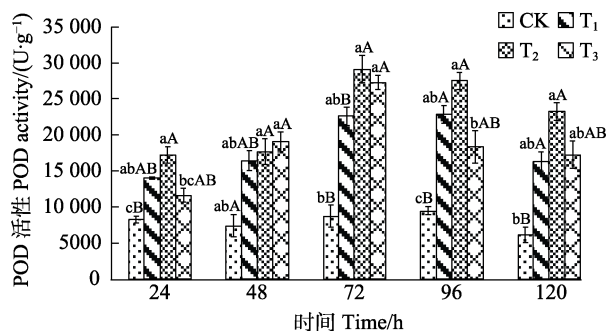
同时的酶活性均高于 CK（图 1）。

2.1.2 过氧化物酶活性变化 如图 2 所示，经不同浓度 DHR18 发酵液喷施叶片处理后，处理组叶



不同小写字母表示处理间差异显著（ $P < 0.05$ ），不同大写字母表示处理间差异极显著（ $P < 0.01$ ）。
Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$), different capital letters indicate extremely significant difference among treatments ($P < 0.01$).

图 1 不同浓度 DHR18 发酵液处理橡胶树叶片 CAT 活性变化
Fig. 1 CAT activity changes in rubber leaves after treatment with different concentration of DHR18 fermentation broth



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$), 不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P<0.01$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$), different capital letters indicate extremely significant difference among treatments ($P<0.01$).

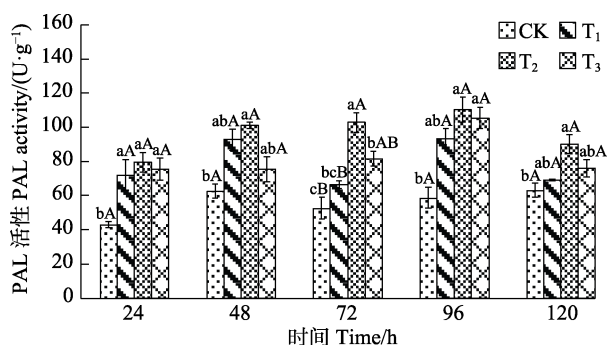
图 2 不同浓度 DHR18 发酵液处理橡胶树叶片
POD 活性变化

Fig. 2 POD activity changes in rubber leaves after treatment with different concentration of DHR18 fermentation broth

片 POD 活性均呈先升高后降低的趋势, 并且活性在相同时间均高于 CK。在 72 h 时, 每个处理组叶片 POD 活性达到峰值, 此时 T₂ 和 T₃ 处理的 POD 酶活性达到 29 138.67、27 276.67 U/g, 分别是 CK 的 3.35 倍和 3.13 倍, 均极显著高于 CK ($P<0.01$)。

2.1.3 苯丙氨酸解氨酶活性变化 如图 3 所示, T₂ 处理的 PAL 活性呈先升高后降低的趋势, 在 96 h 时, 其 PAL 活性达到峰值 110.24 U/g, 是 CK 的 1.88 倍, 显著高于 CK ($P<0.05$)。T₁ 处理的 PAL 活性呈先升高后降低再升高的趋势。在 48 h 和 96 h 时出现峰值, 叶片 PAL 活性分别为 92.72 U/g 和 93.43 U/g, 均高于 CK。T₂ 处理效果最明显, 在相同时间, 其处理的叶片 PAL 活性均高于其他浓度。

2.1.4 超氧化物歧化酶活性变化 如图 4 所示,

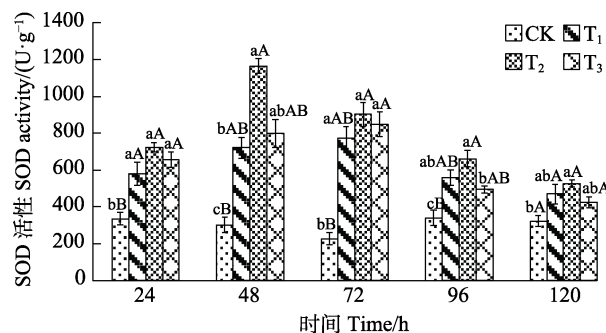


不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$), 不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P<0.01$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$), different capital letters indicate extremely significant difference among treatments ($P<0.01$).

图 3 不同浓度 DHR18 发酵液处理橡胶树叶片
PAL 活性变化

Fig. 3 PAL activity changes in rubber leaves after treatment with different concentration of DHR18 fermentation broth



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$), 不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P<0.01$)。

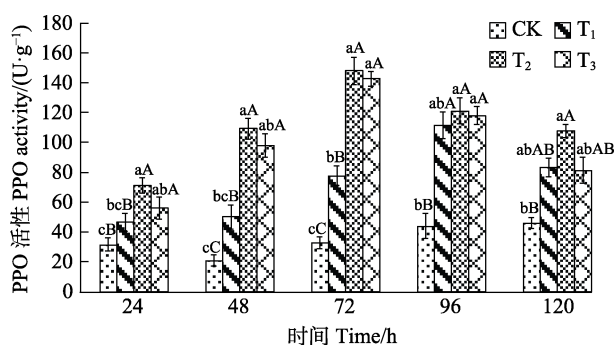
Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$), different capital letters indicate extremely significant difference among treatments ($P<0.01$).

图 4 不同浓度 DHR18 发酵液处理橡胶树叶片
SOD 活性变化

Fig. 4 SOD activity changes in rubber leaves after treatment with different concentration of DHR18 fermentation broth

经不同浓度 DHR18 发酵液喷施叶片处理后, 处理组叶片 SOD 活性呈先升高后降低的趋势, 且其活性在相同时间均高于 CK。T₂ 处理的 SOD 活性在 48 h 达到峰值 1164.89 U/g, 是 CK 的 3.83 倍, 极显著高于 CK ($P<0.01$)。T₁ 和 T₃ 处理的 SOD 活性在 72 h 达到峰值, 分别为 774.93 U/g 和 848.18 U/g, 是 CK 的 3.41 倍和 3.73 倍, 显著 ($P<0.05$) 和极显著高于 CK ($P<0.01$)。

2.1.5 多酚氧化酶的活性变化 由图 5 可知, T₁、T₂ 和 T₃ 处理的 PPO 活性呈先升高后降低的趋势, 其活性在相同时间均高于 CK。T₂、T₃ 处理的 PPO 活性在 72 h 时分别达到峰值 148.00 U/g 和 142.80 U/g, 是 CK 的 4.51 倍和 4.35 倍。T₁ 处理的 PPO 活性在 96 h 时达到峰值 (111.60 U/g)。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$), 不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P<0.01$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$), different capital letters indicate extremely significant difference among treatments ($P<0.01$).

图 5 不同浓度 DHR18 发酵液处理橡胶树叶片
PPO 活性变化

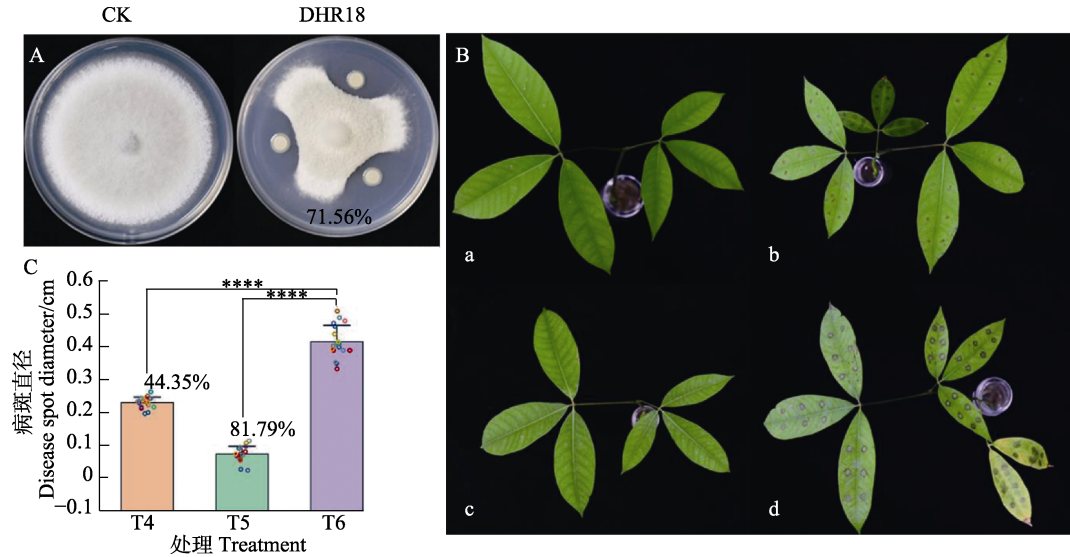
Fig. 5 PPO activity changes in rubber leaves after treatment with different concentration of DHR18 fermentation broth

经不同浓度 DHR18 发酵液处理的叶片 PPO 活性在峰值时均极显著高于 CK ($P<0.01$)。

2.2 菌株 DHR18 对胶孢炭疽病的防治效果

如图 6 所示, 菌株 DHR18 在平板上对橡胶树胶孢炭疽菌 CH-1 表现出明显的抑制效果, 抑制

率为 71.56%。按照表 2, 使用 DHR18 与 CH-1 协同处理橡胶树幼苗, 72 h 后, CK 的叶片未发病, T_5 处理 (先接生防菌) 的防治效果为 81.79%, T_4 处理 (先接病原菌) 的防治效果为 44.35%, 均显著高于 T_6 处理 (只接病原菌) ($P<0.0001$)。



A: 对胶孢炭疽菌的拮抗性; B: 在橡胶树苗上对 *C. siamense* 炭疽病的防治效果, a: CK, b: 先接病原菌, c: 先接生防菌, d: 只接病原菌; C: 根据病斑直径计算防效, ****表示差异极显著 ($P<0.0001$)。
A: Antagonistic activity against *C. siamense*; B: Control effect on *C. siamense* induced anthracnose in rubber saplings; a: CK; b: First inoculation of *C. siamense*; c: First inoculate biocontrol bacteria; d: Only *C. siamense*; C: Biocontrol efficiency calculated based on the lesion diameter of *C. siamense*; **** represents extremely significant difference ($P<0.0001$).

图 6 菌株 DHR18 对橡胶树叶片胶孢炭疽病的防治效果

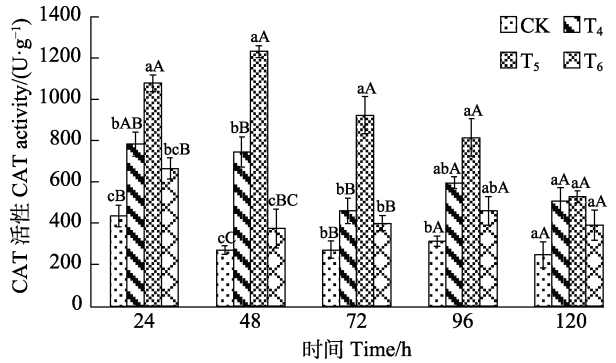
Fig. 6 Control effect of DHR18 strain on rubber leaves *C. siamense*

2.3 DHR18 与 CH-1 协同处理对橡胶树相关防御酶活性的影响

2.3.1 氧化氢酶活性变化 生防菌 DHR18 和 CH-1 共同处理后橡胶树的相关防御酶 CAT 活性有显著变化, 3 种不同处理组 CAT 活性在同时间均高于 CK。其中, T_5 处理的 CAT 活性呈先升高后降低的趋势, 在 48 h 时达到峰值 (1230.85 U/g), 极显著高于其他处理 ($P<0.01$), 是 CK 的 4.56 倍; T_4 处理的 CAT 活性呈先降低后升高再降低的趋势, 在 48 h 极显著高于 CK ($P<0.01$) (图 7)。

2.3.2 过氧化物酶活性变化 DHR18 与 CH-1 协同处理下, 3 种处理组的 POD 活性均高于 CK, 在同时间均达显著水平 ($P<0.05$), 其中, T_5 的 POD 活性在 48 h 时达到峰值 (45 504.67 U/g), 是 CK 的 3.10 倍; T_4 和 T_6 处理的 POD 活性在 72 h 时达到峰值 (30 249.33、33 875.33 U/g), 分别为 CK 的 2.14 倍和 2.40 倍。3 种不同处理在 POD 活性峰值时均极显著高于 CK ($P<0.01$) (图 8)。

2.3.3 苯丙氨酸解氨酶活性变化 由图 9 可知,



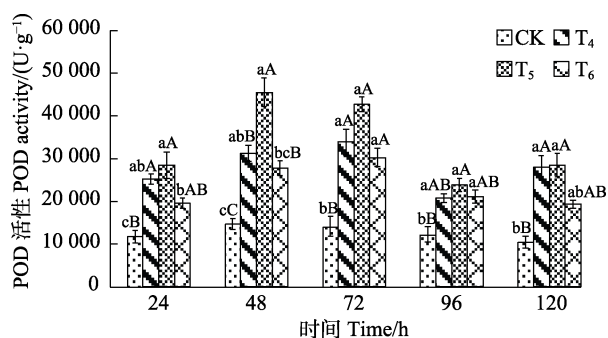
不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$), 不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P<0.01$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$), different capital letters indicate extremely significant difference among treatments ($P<0.01$).

图 7 DHR18 和 CH-1 协同处理橡胶树叶片 CAT 活性变化

Fig. 7 Changes of CAT activity in rubber leaves after DHR18 and CH-1 synergistic treatment

T_5 处理的 PAL 活性总体呈先升高后降低的趋势, 在同时间均高于 CK, 72 h 时与 CK 差异显著 ($P<0.05$), 在 48 h 时达到峰值 (117.53 U/g),

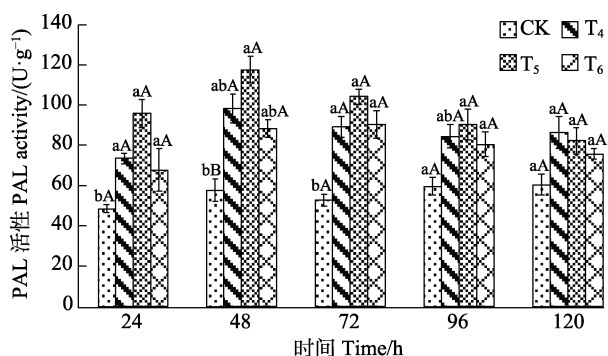


不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P < 0.01$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$), different capital letters indicate extremely significant difference among treatments ($P < 0.01$).

图 8 DHR18 和 CH-1 协同处理橡胶树叶片
POD 活性变化

Fig. 8 Changes of POD activity in rubber leaves after DHR18 and CH-1 synergistic treatment



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P < 0.01$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$), different capital letters indicate extremely significant difference among treatments ($P < 0.01$).

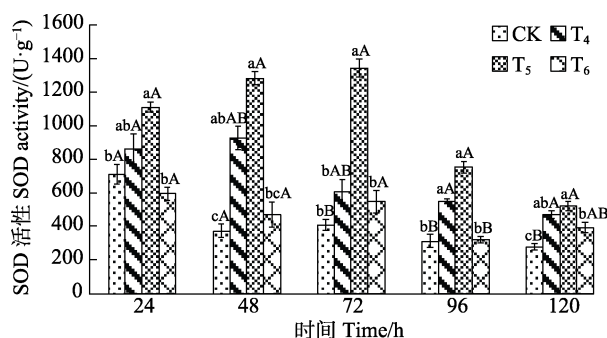
图 9 DHR18 和 CH-1 协同处理橡胶树叶片
PAL 活性变化

Fig. 9 Changes of PAL activity in rubber leaves after DHR18 and CH-1 synergistic treatment

是 CK 的 2.04 倍, 极显著高于 CK ($P < 0.01$); T_4 和 T_6 处理的 PAL 活性变化不明显, 活性保持在 85.00 U/g 左右, 在 72 h 显著高于 CK ($P < 0.05$)。

2.3.4 超氧化物歧化酶活性变化 由图 10 可知, T_5 处理的 SOD 活性在 72 h 极显著高于 CK ($P < 0.01$), SOD 活性达 1342.17 U/g, 是 CK 的 3.30 倍; T_4 的 SOD 活性呈先升高后降低的趋势, 在 48 h 达到峰值, 活性为 924.49 U/g, 是 CK 的 2.47 倍, 显著高于 CK ($P < 0.05$); T_6 的 SOD 活性在 24 h 时低于 CK, 与 CK 无显著差异。

2.3.5 多酚氧化酶活性变化 由图 11 可知, T_5 的 PPO 活性呈先升高后降低的趋势, 在同时间均

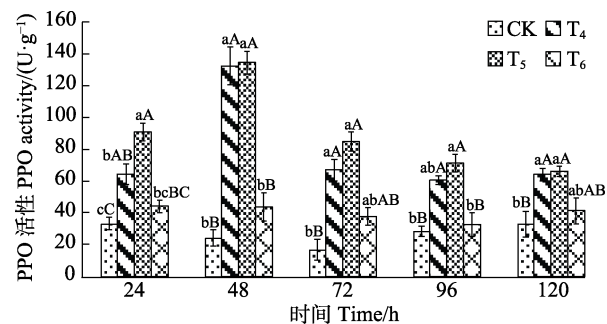


不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P < 0.01$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$), different capital letters indicate extremely significant difference among treatments ($P < 0.01$).

图 10 DHR18 和 CH-1 协同处理橡胶树叶片
SOD 活性变化

Fig. 10 Changes of SOD activity in rubber leaves after DHR18 and CH-1 synergistic treatment



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P < 0.01$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$), different capital letters indicate extremely significant difference among treatments ($P < 0.01$).

图 11 DHR18 和 CH-1 协同处理橡胶树叶片
PPO 活性变化

Fig. 11 Changes of PPO activity in rubber leaves after DHR18 and CH-1 synergistic treatment

高于 CK, 且在 48 h 时达到峰值, 为 134.40 U/g, 是 CK 的 5.6 倍; T_4 的 PPO 活性在 48 h 时达到峰值, 为 134.40 U/g, 是 CK 的 5.51 倍, 均极显著高于对照 CK ($P < 0.01$); T_6 的 PPO 活性变化不明显, 未出现明显的峰值, 活性略高于 CK。

3 讨论

过氧化氢酶 (CAT) [17]、过氧化物酶 (POD) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 是植物主要的活性氧清除酶, 可消除因病害侵染或逆境胁迫产生过多的活性氧, 从而避免对自身造成损伤 [18]; 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 可催化苯丙氨酸合成酚类化合物, 而酚类化合物是植物多种次生代谢产物的中

间产物,对植物抗病虫害有重要作用^[19];多酚氧化酶(PPO)是一类金属蛋白酶,可以催化多种生化反应,调节生理功能,与植物抗逆抗病等息息相关^[20]。这些防御相关酶活性对于植物的抗病性具有重要决定作用,也是评价植物抗性水平的重要参考标准^[21-22]。

研究表明,生防菌通过诱导和增强一系列防御相关酶活性,从而提高植物的系统抗病能力,是其重要的抗病机制之一^[23-24]。CHEN 等^[25]研究发现植物乳杆菌 CM-3 可以通过增加葡萄 POD、PPO、CAT 和 PAL 的活性来增强葡萄的抗病能力。邹强等^[26]用生防贝莱斯芽孢杆菌 TP-1 处理后葡萄的 APX、PPO 和 PAL 活性提高,增强了对灰霉菌的抗性。本研究中,生防菌 DHR18 显著提高橡胶树中 CAT、POD、SOD、PAL 和 PPO 五种防御酶活性,增强了橡胶树的抗性,其中多酚氧化酶的变化最为明显,最高可以达到对照的 4.51 倍。陈秀香等^[27]研究发现,经枯草芽孢杆菌 FC21 的 10 倍稀释液处理后的植株叶片中 CAT、POD、SOD 活性最高,生防菌诱导的防御相关酶活性与菌液浓度不呈正相关。本研究发现 10^7 CFU/mL 浓度的 DHR18 发酵液对橡胶树防御诱导效果最好,可作为伯克霍尔德氏菌 DHR18 防治炭疽病的浓度参考。因此,本研究结果表明,树木伯克霍尔德氏菌 DHR18 能诱导橡胶树体内 CAT、POD 和 SOD 酶活增强来清除过量活性氧;能诱导 PAL 和 PPO 酶活性促使橡胶树产生抗菌物质等,从而提高橡胶树系统抗性。

植物在受到病原物侵染后,活性氧作为植物抵御和延缓病原物侵染的第一道物理屏障,在第一时间反应并影响活性氧消除酶的合成酶基因的表达,从而增加 CAT、POD 和 SOD 等的活性继而实现解毒作用,更好地应对各种胁迫,其体内防御酶活性也会上升^[28]。感染病原物后,活性氧消除酶普遍呈先上升后下降的变化趋势。耿莉娜等^[29]的研究发现烟草的抗病品种 Beinhart1000-1 在接种赤星病菌后,POD、PAL、SOD 活性明显高于对照,呈先升高后降低的变化趋势。本研究中,在接种炭疽病 CH-1 后,橡胶树的 SOD 和 PAL 活性无明显变化,可能与植株品种抗病性有关。罗富方等^[30]研究发现在青枯病胁迫下,烤烟再接种印度梨形孢,其 4 种防御酶(PAL、PPO、POD 和 SOD)活性增加均高于对照,且呈先升高后降低的趋势。本研究中 DHR18 和 CH-1 协同处理下,

处理组的防御酶(CAT、POD、SOD、PAL 和 PPO)活性均有提高,主要呈先上升后下降的趋势;协同处理的 CAT、SOD 和 PPO 酶活性在 24、48、72 h 显著高于其只接病原菌的酶活,表明伯克霍尔德氏菌 DHR18 在橡胶树受到炭疽病菌侵染过程中会增强其活性氧清除系统,并促进合成抗病物质,从而增强植株的抗病能力。唐文等^[16]先喷施枯草芽孢杆菌 Czk1 后接种病原菌处理的 5 种防御相关酶(CAT、POD、PAL、SOD 和 PPO)活性升高,显著高于其他处理。本研究橡胶树受到炭疽病侵染前喷施 DHR18 发酵液,对防御酶活性影响最大,5 种防御酶活性高于其他处理组,更有利于诱导抗病性。本研究发现,先喷施生防菌伯克霍尔德氏菌 DHR18 再接种病原菌处理组的 POD 活性比只接病原菌和先接病原菌处理组的更快达到峰值,在 48 h 时显著高于其他处理组,能更快引起植物的防御反应;周东兴等^[31]研究发现贝莱斯芽孢杆菌 DX-25 与番茄枯萎病互作的情况下可以更快地引起植株番茄的抗性反应,与本研究结果相似。

在本研究中,生防菌 DHR18 发酵液可促使叶片中 CAT、POD、PAL、SOD 和 PPO 酶活性上升,诱导橡胶树产生系统抗性, 1×10^7 CFU/mL 浓度对橡胶树的诱导效果最好。研究结果初步明确了树木伯克霍尔德氏菌具有诱导抗病性,为探索伯克霍尔德氏菌诱导抗病性提供了部分理论依据。

参考文献

- [1] 孙永帅,田维敏,翟德利,杨永平.我国橡胶树育种的技术瓶颈与创新建议[J].中国科学院院刊,2024,39(1): 191-197.
SUN Y S, TIAN W M, ZHAI D L, YANG Y P. Technological bottlenecks and innovative developments for rubber tree breeding in China[J]. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2024, 39(1): 191-197. (in Chinese)
- [2] RAMOS V M, DEMARCO D, SOUZA C D C I, FREITAS D T D C. Laticifers, latex, and their role in plant defense[J]. Trends in Plant Science, 2019, 24(6): 553-567.
- [3] LIU X B, LI B X, CAI J M, ZHENG X L, FENG Y L, HUANG G X. Colletotrichum species causing anthracnose of rubber trees in China[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1-14.
- [4] 贺春萍,樊兰艳,吴贺,梁艳琼,吴伟怀,李锐,郑服丛.枯草芽孢杆菌 Czk1 脂肽物质对橡胶树炭疽病和白粉病的抑制效果研究[J].中国农业科技导报,2023,25(6): 126-

134.
HE C P, FAN L Y, WU H, LIANG Y Q, WU W H, LI R, ZHENG F C. Study on inhibitory effect of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* Czk1 on anthracnose and powdery mildew of rubber tree[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2023, 25(6): 126-134. (in Chinese)
- [5] 李岚岚, 戴利铭, 施玉萍, 刘一贤, 蔡志英. 橡胶树生防内生菌解淀粉芽孢杆菌的理化特性及田间防效[J]. 热带农业科技, 2023, 46(4): 54-60.
LI L L, DAI L M, SHI Y P, LIU Y X, CAI Z Y. Physico-chemical characteristics and field control effect of endophytic bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* in rubber tree[J]. Tropical Agricultural Science & Technology, 2023, 46(4): 54-60. (in Chinese)
- [6] RAYMAEKERS K, PONET L, HOLTAPPELS D, BERCKMANS B, CAMMUE A P B. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management—a review[J]. Biological Control, 2020, 144: 104240.
- [7] WANG M Y, ZHANG Y K, CAI H B, ZHAO X Y, ZHU Z F, YAN Y C, YIN K, CHENG G Y, LI Y S, CHEN G Y, ZOU L F, TU M. A new biocontrol agent *Bacillus velezensis* SF334 against rubber tree fungal leaf anthracnose and its genome analysis of versatile plant probiotic traits[J]. Journal of Fungi, 2024, 10(2): 158.
- [8] ANDLEEB Z, ANANT N R, MUKESH M, PRASHANT S. Efficiency of microbial bio-agents as elicitors in plant defense mechanism under biotic stress: a review[J]. Current Research in Microbial Sciences, 2021, 2: 100054.
- [9] CHEN F, WANG M, ZHENG Y, LUO J M, YANG X R, WANG X L. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(4): 675-684.
- [10] C T P, EIRINIEVANGELIA T, COSTAS D, KALLIMACHOS N, ANTONIOS Z, ANASTASIA V, PANAGIOTIS K. Compatible consortium of endophytic *Bacillus halotolerans* strains Cal.l.30 and Cal.f.4 promotes plant growth and induces systemic resistance against *Botrytis cinerea*[J]. Biology, 2023, 12(6): 779.
- [11] YE S, YAN R, LI X W, LIN Y F, YANG Z H, MA Y H, DING Z. Biocontrol potential of *Pseudomonas rhodesiae* GC-7 against the root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* through both antagonistic effects and induced plant resistance[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1025727.
- [12] CIMERMANCIC P, MEDEMA H M, CLAESEN J, KURITA K, BROWN W C L, MAVROMMATIS K, PATI A, GODFREY A P, KOEHRSEN M, CLARDY J. Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic geneclusters[J]. Cell, 2014, 158(2): 412-421.
- [13] MENG X J, RUDOVIKO M G, CAO S, WANG L Q, CHENG S, TAN L T, SUN Z X, ZHOU Y. Isolation, identification, and biocontrol mechanisms of endophytic *Burkholderia vietnamiensis* C12 from *Ficus tikoua* Bur against *Rhizoctonia solani*[J]. Biological Control, 2023, 178: 105132.
- [14] WANG L Q, LI X T, RUDOVIKO M G, ZHENG T W, MENG X J, SUN Z X, ZHOU Y. Biocontrol efficacy of *Burkholderia pyrrocinia* S17-377 in controlling rice sheath blight[J]. Biological Control, 2023, 187: 105368.
- [15] 蔡志英, 林春花, 翟李刚, 蔡吉苗, 李超萍, 李博勋, 王延丽, 黄贵修. 橡胶树重要品系对胶孢炭疽菌抗性评价[J]. 植物保护, 2013, 39(6): 110-115.
CAI Z Y, LIN C H, ZHAI L G, CAI J M, LI C P, LI B X, WANG Y L, HUANG G X. Evaluation of resistance of 46 rubber tree clones to *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Plant Protection, 2013, 39(6): 110-115. (in Chinese)
- [16] 唐文, 梁艳琼, 许沛冬, 张驰成, 吴伟怀, 郑肖兰, 贺春萍, 易克贤. 枯草芽孢杆菌 Czk1 诱导橡胶树抗病性相关防御酶系研究[J]. 南方农业学报, 2016, 47(4): 576-582.
TANG W, LIANG Y Q, XU P D, ZHANG C C, WU W H, ZHENG X L, HE C P, YI K X. Induction of resistance-related defensive enzymes in *Hevea brasiliensis* by *Bacillus subtilis* Czk1[J]. Journal of Southern Agriculture, 2016, 7(4): 576-582. (in Chinese)
- [17] 祝文慧, 秦溥, 赵岩, 殷辉, 任璐, 周建波. 两种芽孢杆菌对苗期土传辣椒疫病的防控作用[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(5): 1235-1243.
ZHU W H, QIN P, ZHAO Y, YIN H, REN L, ZHOU J B. Prevention and control effect of two *Bacillus* Strains on soil-borne *Phytophthora capsici* in seedling stage[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2023, 39(5): 1235-1243. (in Chinese)
- [18] 庞学群, 黄雪梅, 李军, 张昭其. 热水处理诱导香蕉采后抗病性及其对相关酶活性的影响[J]. 农业工程学报, 2008(2): 221-225.
PANG X Q, HUANG X M, LI J, ZHANG Z Q. Hot water dipping induced resistance to disease *Colletotrichum musae* on banana fruits and its effect on related enzymes[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2008(2): 221-225. (in Chinese)
- [19] 黄小贞, 赵德刚. 植物苯丙氨酸解氨酶表达调控机理的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2017, 45(4): 16-20.
HUANG X Z, ZHAO D G. Research progress in regulation and control mechanism of phenylalanine lyase in plant[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2017, 45(4): 16-20. (in Chinese)

- [20] 吴梦露, 李鹏, 于文清, 黄文慧, 熊佳诗, 许诺, 汪文俊, 方子剑, 刘文志. 水稻防御酶与其抗病性关系研究进展[J]. 分子植物育种, 2024, 22(7): 2413-2420.
- WU M L, LI P, YU W Q, HUANG W H, XIONG J S, XU L, WANG W J, FANG Z J, LIU W Z. Advances in the research of relationship between defensive enzymes and disease resistance in rice[J]. Molecular Plant Breeding, 2024, 22(7): 2413-2420. (in Chinese)
- [21] 吴应海, 李安定, 张丽敏, 彭熙, 蔡国俊, 张孙健. 不同百香果品种对茎基腐病的抗性鉴定及防御酶活性研究[J]. 农业与技术, 2022, 42(20): 1-6.
- WU Y H, LI A D, ZHANG L M, PENG X, CAI G J, ZHANG S J. Identification of resistance and defense enzyme activity of different passion fruit species to stem rot[J]. Agriculture and Technology, 2022, 42(20): 1-6. (in Chinese)
- [22] LV X, MA H H, LIN Y, BAI F L, GE Y H, ZHANG D F, LI J R. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* C10 against *Trichothecium roseum* and its application in promotion of defense responses in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(9): 3703-3711.
- [23] SHRIDHAR A D, SANGEETA P, EYARKAI V N, KISHORE G R, RAJBIR S, KALYANI S, KUMAR R V. Exploitation of microbial antagonists for the control of post-harvest diseases of fruits: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(9): 1498-1513.
- [24] PRIYANKA G, TRIDIP P, RATUL S. Systemic resistance induced by plant growth-promoting rhizobacteria in *Bhut Jolokia* (*Capsicum chinense* Jacq.) suppressed the collar rot disease[J]. Scientia Horticulturae, 2024, 324: 112625.
- [25] CHEN C, ZHANG X H, WEI X, ZHU Y J, CHEN W, HAN Y L. Postharvest biological control of *Botrytis cinerea* and the mechanisms underlying the induction of disease resistance in grapes by *Lactobacillus plantarum* CM-3[J]. Biological Control, 2022, 172, 104982.
- [26] 邹强, 牛新湘, 刘萍, 杨红梅, 楚敏, 王宁, 林青, 包慧芳, 詹发强, 张雨萌, 王静怡, 佐长庚, 姜恺, 史应武. 拮抗葡萄灰霉病贝莱斯芽孢杆菌的生长特征及对相关防御酶活性的影响[J]. 食品工业科技, 2023, 44(15): 126-133.
- ZOU Q, NIU X X, LIU P, YANG H M, CHU M, WANG N, LIN Q, BAO H F, ZAN F Q, ZHANG Y M, WANG J Y, ZUO C G, LOU K, SHI Y W. Growth characteristics of *Bacillus velezensis* antagonistic to *botrytis cinerea* and its effects on related defense enzyme activities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(15): 126-133.
- [27] 陈秀香, 王学涛, 马金秀, 田永强, 李昭煜. 生防菌 FC21 对番茄灰霉病的防效及其促生作用[J]. 北方园艺, 2022 (12): 29-33.
- CHEN X X, WANG X T, MA J X, TIAN Y Q, LI Z Y. Control effect of biocontrol strains FC21 against tobacco grey mould and its growth-promoting[J]. Northern Horticulture, 2022(12): 29-33. (in Chinese)
- [28] SHANDILYA Z M, TANTI B. Comparative biochemical, histochemical and expression analysis of SOD gene in a few traditional rice varieties under aluminium toxicity and phosphorous deficiency in Assam, India[J]. Vegetos, 2020, 33(3): 145-157.
- [29] 耿莉娜, 龙艳玲, 徐宸, 汪代斌, 赵敏, 胡军华. 感染赤星病后不同烟草品种叶片防御酶的变化[J]. 西南大学学报 (自然科学版), 2018, 40(10): 19-24.
- GENG L N, LONG Y L, XU C, WANG D B, ZHAO M, HU J H. Changes in activities of defensive enzymes in the leaves of different tobacco varieties infected by the pathogen of tobacco brown spot[J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2018, 40(10): 19-24. (in Chinese)
- [30] 罗富方, 王潇笛, 韦朝贵, 刘胜传, 许本波, 孙文秀. 青枯病胁迫下印度梨形孢诱导‘云烟 87’抗性的初步探索[J/OL]. 分子植物育种, [2023-01-31]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=4wkQyJAcIEepBwGyzAD1Mj5OgqOOexpNbS4YRdXzV0OMxE31IS-eVIqE6BFhMI3K-Q6HdwEWRhLTdYlKgQa-zXvo2xXpohEjxYcqyzArkWoyAiN9BiDr-XQAu2FOgzTI_dGrIlZxfGWEdXDn1KYMqURTBODDPKJ_rRsNJtKeb6yFq78s2RMgcWnZpTnjI-4IO1pJ22rGls=&uniplatform=NZKPT&language=CHS.
- LUO F F, WANG X D, WEI C G, LIU S C, XU B B, SUN W X. Preliminary exploration on piriformospora indica induced resistance to ‘Yunyan 87’ under bacterial wilt stress[J/OL]. Molecular Plant Breeding, [2023-01-31]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=4wkQyJAcIEepBwGyzAD1Mj5OgqOOexpNbS4YRdXzV0OMxE31IS-eVIqE6BFhMI3K-Q6HdwEWRhLTdYlKgQa-zXvo2xXpohEjxYcqyzArkWoyAiN9BiDr-XQAu2FOgzTI_dGrIlZxfGWEdXDn1KYMqURTBODDPKJ_rRsNJtKeb6yFq78s2RMgcWnZpTnjI-4IO1pJ22rGls=&uniplatform=NZKPT&language=CHS. (in Chinese)
- [31] 周东兴, 王恩泽, 刘多, 金聪敏, 李欣, 姜珊, 白皓天. 番茄枯萎病生防细菌的筛选及对植株防御酶活性的影响[J]. 生态学杂志, 2020, 39(5): 1753-1760.
- ZHOU D X, WANG E Z, LIU D, JIN C M, LI X, JIANG S, BAI H T. Screening of biocontrol bacteria against tomato wilt and the effect on defense enzyme activity of plants[J]. Chinese Journal of Ecology, 2020, 39(5): 1753-1760. (in Chinese)