

李建文,高易宏,吴 辉,等. 生防菌 BS04 防治辣椒疫病机制[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):151-153.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.046

# 生防菌 BS04 防治辣椒疫病机制

李建文,高易宏,吴 辉,江 翱,孙文秀

(长江大学生命科学学院,湖北荆州 434025)

**摘要:**从生防菌的根际定殖、防效和诱导防御酶活性 3 个方面探讨了生防菌 BS04 防治辣椒疫病的机制。结果表明,生防菌 BS04 能够在辣椒根际定殖,且定殖密度比较稳定,稳定维持在  $10^5$  CFU/g 以上;盆栽试验测定防治效果表明,生防菌 BS04 的培养液对辣椒幼苗期疫病有较明显的防治效果,防效达 85.81%;防御酶活性测定结果显示,接种辣椒疫霉菌后,辣椒叶片的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)和多酚氧化酶(PPO)的活性均显著提高并出现峰值,但生防菌 BS04 培养液和辣椒疫霉菌共同处理后,各种防御酶的活性有所降低,并表现出相对平缓的状态。

**关键词:**生防菌;辣椒疫病;防病机制;生物防治;防御酶

**中图分类号:**S436.418.1<sup>+</sup>9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)10-0151-03

辣椒疫病由辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)引起,是辣椒生长过程中发生比较严重的土传病害<sup>[1-3]</sup>。多年来,国内外学者使用化学药剂<sup>[4]</sup>、选育抗病品种<sup>[5]</sup>、生物防治<sup>[6]</sup>等措施不断加强对辣椒疫病的防治。但由于辣椒疫霉菌变异能力强,致病力分化明显,容易产生抗药性,采用化学药剂和选育抗病品种防治辣椒疫病存在极大的弊端。利用有益微生物防治

辣椒疫病成为首选的有效措施,越来越多的生防菌也受到了人们的关注。目前,已从土壤及植物等不同来源分离筛选到若干株对辣椒疫霉菌具有拮抗作用的生防菌<sup>[7-14]</sup>,但对其防病机制的研究还不够深入。笔者从辣椒根际土壤中分离筛选到对辣椒疫霉菌具有较强的抑制作用,且对其他几种病原菌具有拮抗作用的生防菌 BS04(待发表)。为进一步明确生防菌 BS04 对辣椒疫病的防治效果,本试验对该菌株在辣椒根际的定殖、对辣椒疫病的防效及对辣椒叶片防御酶的活性影响进行了研究,为更深入探讨其防病机制提供资料和奠定基础。

收稿日期:2014-10-09

基金项目:长江大学生创新创业训练计划(编号:2013024);烟草病虫害监测与治理重点开放实验室开放课题(编号:201204)。

作者简介:李建文(1990—),男,甘肃白银人,从事生物技术研究。

E-mail:lijianwen@163.com。

通信作者:孙文秀,博士,副教授,主要从事植物病害的生物防治。

E-mail:wxsun@yangtzeu.edu.cn。

笔者所在课题组前期研究结果<sup>[8]</sup>是一致的,可能是多杀菌素对辛硫磷增效的原因之一。至于 Spinosyn A 在活体条件下是通过何种方式抑制碱性磷酸酯酶的活性有待于进一步研究。

亚洲玉米螟的酯酶同工酶电泳酶带结果表明,在离体时 Spinosyn A 并不影响酯酶同工酶;在活体时,E6 受到一定程度的抑制。阿维菌素也同样对 E6 酶带有抑制作用,表明这 2 种大环内酯化合物都能抑该酶的活性。至于这个酶带具体是什么酶、有什么特点有待于进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Lee S H, Clark J M. Permethrin carboxylesterase functions as nonspecific sequestration proteins in the Hemolymph of Colorado potato beetle [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1998, 62(1): 51-63.
- [2] Zhu K Y, Gao J R. Kinetic properties and variability of esterases in organophosphate-susceptible and -resistant greenbugs, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae) [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1998, 62(2): 135-145.
- [3] 唐振华. 我国昆虫抗药性研究的现状及展望 [J]. 昆虫知识, 2000, 37(2): 97-103.

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株和培养基

供试菌株 BS04 为笔者所在实验室从辣椒根际土壤中分

- [4] 赵善欢. 昆虫毒理学 [M]. 北京: 农业出版社, 1993.
- [5] Salgado V L. The mode of action of spinosad and other insect control products [J]. Down to Earth, 1997(52): 35-44.
- [6] Watson G B. Actions of insecticidal spinosyns on aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2001, 71(1): 20-26.
- [7] 王光峰, 张友军, 柏连阳, 等. 多杀菌素对甜菜夜蛾多酚氧化酶和羧酸酯酶的影响 [J]. 农药学报, 2003, 5(2): 40-46.
- [8] 徐志红, 蒋志胜. Spinosyn A 对家蝇 GSTs 的影响及其对辛硫磷的增效作用 [J]. 贵州农业科学, 2007(6): 62-63, 65.
- [9] 周大荣, 王玉英, 刘宝兰, 等. 玉米螟人工大量繁殖研究: I. 一种半人工饲料及其改进 [J]. 植物保护学报, 1980, 7(2): 113-122.
- [10] 邱明生, 王进军, 赵志模, 等. 辐射对亚洲玉米螟体内几种水解酶活力的影响 [J]. 植物保护学报, 1999, 26(4): 319-323.
- [11] 慕立义. 植物化学保护研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 162-163.
- [12] Matsumura F, Ghiasuddin S M. Characteristics of DDT-sensitive Ca-ATPase in the axonic membrane [M] // Narahashi T. Neurotoxicology of Insecticides and Pheromones. New York: Plenum Press, 1979: 245-257.

离获得的对辣椒疫霉菌等多种植物病原菌具有较强拮抗作用的生防细菌。经形态、生理生化特性和 16S rDNA 序列分析, 鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。辣椒疫霉菌为笔者所在实验室保存。

牛肉膏蛋白胨培养基(NA)用于培养菌株 BS04, 马铃薯葡萄糖培养基(PDA)用于培养辣椒疫霉菌, 胡萝卜培养基(CA)用于辣椒疫霉菌产孢。

1.2 抗卡那霉素突变株的筛选

将 BS04 菌株接种到 NA 培养基平板上, 待长出菌落后用紫外线照射 30 s, 再将其转接到卡那霉素浓度为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 μg/mL 的 NA 平板上, 直到筛选出抗 2.0 μg/mL 卡那霉素并对病原菌的拮抗作用保持不变的 BS04 突变株。

1.3 BS04 菌株在辣椒根际的定殖

将卡那霉素抗性 BS04 突变株接种至卡那霉素 2.0 μg/mL 的 NA 液体培养基中, 28 ℃, 200 r/min 振荡培养 24 h, 配制成浓度为  $2 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液。将生长至 6 叶期的辣椒幼苗在上述菌悬液中浸根 1 h 后移栽至盆钵中, 温室中管理, 每隔 7 d 取样检测 BS04 菌株在辣椒根际的定殖情况。测定方法如下: 轻轻拔出辣椒幼苗, 清水冲洗根部, 并用吸水纸吸去根表水, 剪下根系, 称质量, 研磨, 无菌水稀释, 涂在含有卡那霉素的 NA 培养基平板上, 28 ℃ 培养 48 h 后计算菌落的数量。

1.4 BS04 菌株对辣椒疫病的防效

选取 6 叶期的健康辣椒幼苗 60 株, 每盆(直径 10 cm)1 株, 平均分为 2 组。一组将浓度为  $2 \times 10^8$  CFU/mL 的 BS04 菌悬液 20 mL 浇灌到栽有辣椒幼苗的盆钵中, 7 d 后采用灌根法接种辣椒疫霉菌游动孢子悬浮液( $5 \times 10^3$  个/mL)10 mL; 另一组以无菌水处理为对照, 7 d 后用辣椒疫霉菌游动孢子悬浮液( $5 \times 10^3$  个/mL)10 mL 灌根。10 d 后调查病情指数, 参照 Hartman 的方法进行辣椒疫病病情分级, 并计算防治效果。

1.5 BS04 菌株处理后辣椒叶片 SOD、POD、PPO 和 PAL 酶活性测定

选取室内盆栽的 6 叶期健康辣椒苗, 设如下 4 个处理: ①喷雾接种 BS04 菌株培养液(含菌量约为  $10^8$  CFU/mL); ②喷雾 BS04 菌株培养液(浓度同①)和辣椒疫霉菌游动孢子悬浮液( $10^3$  个/mL); ③喷雾接种辣椒疫霉菌游动孢子悬浮液( $10^3$  个/mL); ④清水。每个处理重复 3 次。分别于处理后 1、2、3、4、5、6、7 d 取样, 制得过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)和多酚氧化酶(PPO)的粗酶液, -20 ℃ 保存备用。SOD 活性测定采用 NBT 光还原法<sup>[15]</sup>; POD 活性测定采用愈创木酚法<sup>[15]</sup>; PPO 活性测定采用邻苯二酚法<sup>[15]</sup>; PAL 活性测定采用分光光度法<sup>[16]</sup>。

2 结果与分析

2.1 BS04 菌株在辣椒根际的定殖

采用菌液浸根的方法对生防菌 BS04 在辣椒根际的定殖情况进行分析, 结果(表 1)表明, BS04 菌株能够在辣椒根际定殖, 且定殖密度比较稳定, 处理后 7 d 时定殖密度是  $5.89 \times 10^5$  CFU/g, 处理后 35 d 时定殖密度是  $5.12 \times 10^5$  CFU/g, 均稳定维持在  $10^5$  CFU/g 以上。

2.2 BS04 菌株对辣椒疫病的防治效果

表 1 BS04 菌株在辣椒根际的定殖情况

测定时间(d)	定殖密度( $10^5$ CFU/g)
7	$5.89 \pm 0.02a$
14	$5.66 \pm 0.02ab$
21	$5.82 \pm 0.03ab$
28	$5.58 \pm 0.02a$
35	$5.12 \pm 0.01a$

注: 同列不同小写字母表示水平差异显著( $P < 0.05$ )。

盆栽试验结果(表 2)表明, 生防菌 BS04 的培养液对辣椒幼苗期疫病有较明显的防治效果。辣椒幼苗在接种病原菌后 7 d 开始发病, 根茎部出现变黑症状, 10 d 后调查病情指数及防效, 发现无菌水处理的辣椒幼苗全部发病, 甚至死亡; 而生防菌 BS04 处理后的辣椒幼苗仍有大量存活, 表现轻微发病, 防效达到 85.81%。

表 2 BS04 菌株对辣椒疫病的防治效果

组别	病情指数	防治效果
试验组	9.58	85.81%
对照组	67.54	

2.3 BS04 菌株处理后辣椒叶片 SOD、POD、PAL 和 PPO 酶活性的变化

采用不同方式处理辣椒幼苗后, 其叶片各防御酶活性的测定结果见图 1。由图 1 可见, 用 BS04 培养液和清水处理后, 辣椒叶片各防御酶活性的变化相对比较平稳; 而单独接种病原菌和接 BS04 培养液后再接种病原菌的 2 个处理, 除 SOD 酶活性变化较平缓外, 其他 3 种防御酶活性出现较大变化。此外, SOD、POD 和 PAL 3 种酶活性变化的趋势基本相同, 而 PPO 酶活性的变化则与其不同。与采用 BS04 培养液和清水处理相比较, 单独接种病原菌和 BS04 + 病原菌的处理表现出较高的防御酶活性。研究发现, 单独接种病原菌后辣椒叶片的防御酶活性比 BS04 + 病原菌处理后的活性要高一些, 这可能与只接种病原菌能够诱导酶活性的提高, 而生防菌 BS04 可以抑制病原菌的生长导致酶活性降低有一定的关系。同时发现, SOD、POD 和 PAL 3 种防御酶在接种病原菌和 BS04 + 病原菌处理后 3 d 时酶活性达到峰值, 而 PPO 酶活性则与之不同, 在处理 5 d 时达到最高点, 然后随时间推移不断降低。

3 讨论

植物病害生物防治是指利用有益微生物和微生物代谢产物对农作物病害进行有效防治的技术和方法。其防病机制主要包括分泌抗菌物质、竞争生态位和营养物质、诱导系统抗性 & 促进植株生长增强植株抗逆性 4 个方面。研究表明, 菌株能否在宿主植物体内或根际土壤中定殖, 对生防菌的防病效果具有重要影响<sup>[17]</sup>。更多学者认为诱导植物获得系统抗性在生防菌的防病过程中起主要作用<sup>[18]</sup>, 并进行了大量研究。枯草芽孢杆菌作为目前研究较多、应用较为广泛的生防菌, 对其防病机制的研究报道较多, 但对土传病害辣椒疫病的防病机制系统研究较少。

本试验结果表明, 生防菌 BS04 对辣椒疫霉菌具有较强拮抗作用, 能够明显抑制菌丝生长, 并在辣椒根际稳定定殖, 对辣椒疫病也有较高的防治效果。本试验中采用单独接种辣椒疫霉菌和 BS04 + 辣椒疫霉菌处理后, 均较好地诱导了辣椒

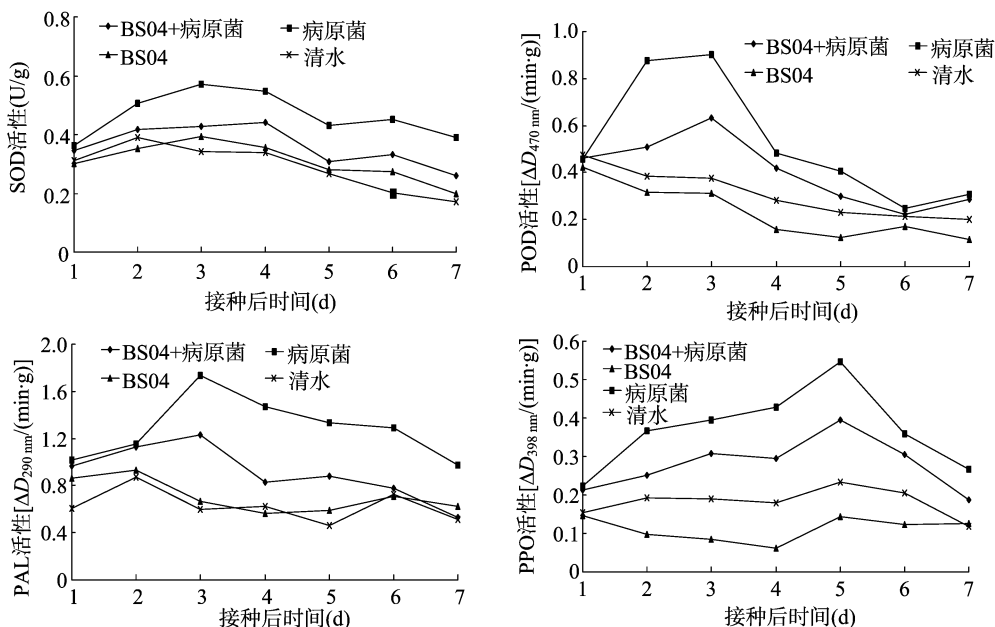


图1 BS04 菌株处理后辣椒叶片 SOD、POD、PAL 和 PPO 的活性

幼苗叶片内 SOD、POD、PAL 和 PPO 防御酶的活性,这与前人的研究结果<sup>[19-20]</sup>基本一致。SOD 和 POD 是细胞内清除活性氧的保护酶,同时 POD 可催化酚类物质的前体聚合成木质素,增强寄主的抵抗力。PAL 是酚类物质、植保素和木质素合成的关键酶,病原菌侵染后会激发寄主植物的 PAL 活性提高。PPO 可以将酚类物质氧化形成醌类物质,对外来的病原菌产生抑制作用。试验结果表明,上述防御酶活性的增强,提示了辣椒抗病性的提高,但也发现生防菌 BS04 和辣椒疫霉菌混合接种后辣椒叶片防御酶活性比仅接种病原菌要低一些,这可能与 BS04 菌株和病原菌相互作用有一定的关系,具体原因还有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 周启明,李林英,杨淑华. 辣椒疫病的调查研究[J]. 中国蔬菜, 1984(1): 40-43.
- [2] Hwang B K, Kim C H. Phytophthora blight of pepper and its control in Korea[J]. Plant Dis, 1995, 79: 221-227.
- [3] Hausbeck M K, Lamour K H. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges[J]. Plant Disease, 2004, 88(12): 1292-1303.
- [4] 李 帅,王满意,王红学,等. N-(3,5-二甲氧基-4-烷氧基苯乙基)扁桃酰胺类杀菌剂的设计合成及杀菌活性[J]. 农药学报, 2012, 14(1): 17-23.
- [5] 曾 莉,曹必好,徐小万,等. 辣椒抗疫病遗传与育种的最新研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(12): 174-177.
- [6] 杨琦瑶,索雅丽,郭荣君,等. 枯草芽孢杆菌 B006 对黄瓜枯萎病菌和辣椒疫霉菌的抑制作用及其抗菌组分分析[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(2): 235-242.
- [7] 尹敬芳,张文华,李健强,等. 辣椒疫病生防菌的筛选及其抑菌机制初探[J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 88-94.
- [8] 马晓飞,刘长远,赵奎华,等. 辣椒疫病生防菌株鉴定及抗病机理研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(10): 136-141.
- [9] 何延静,刘海明,胡洪波,等. 一株拮抗辣椒疫霉的假单胞菌的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 2006, 46(4): 516-521.
- [10] 梅新兰,赵青云,谭石勇,等. 辣椒疫病拮抗菌株筛选、鉴定及其防效[J]. 应用生态学报, 2010, 21(10): 2652-2658.
- [11] 袁树忠,周明国. 辣椒疫病生物防治菌株的筛选与定殖[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版, 2006, 27(4): 93-97.
- [12] 杨瑞先,陶玉凤,宋美仙,等. 银杏内生细菌防治辣椒疫病研究[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(4): 552-559.
- [13] Lim J H, Kim S D. Biocontrol of phytophthora blight of red pepper caused by *Phytophthora capsici* using *Bacillus subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 formulations[J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2010, 53(6): 766-773.
- [14] Lee K J, Kamala - Kannan S, Sub H S, et al. Biological control of *Phytophthora blight* in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(7): 1139-1145.
- [15] 高俊凤. 植物生理学技术(四)[M]. 西安:世界图书出版西安公司, 2000.
- [16] 薛应龙. 植物生理学实验手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1985: 138-139.
- [17] 郭坚华,龚龙英,祁红英,等. 三个拮抗菌株对辣椒青枯病的作用机制[J]. 中国生物防治, 2003, 19(1): 6-10.
- [18] van Peer R, Niem ann G J, Schippers B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium wilt* of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417[J]. Phytopathology, 1991, 81: 728-734.
- [19] 柳 凤,欧雄常,何 红,等. 红树内生细菌 RS261 防治辣椒疫病机理的初步研究[J]. 植物病理学报, 2010, 40(1): 74-80.
- [20] 邱思鑫,何 红,阮宏椿,等. 内生芽孢杆菌 TB2 防治辣椒疫病效果及其机理初探[J]. 植物病理学报, 2004, 34(2): 173-179.