

芽孢杆菌 B96 - II 对芦笋茎枯病的防治及机制研究

马利平,郝变青,秦 曙,乔雄梧

(山西省农业科学院 山西省农药重点实验室,山西 太原 030031)

摘要:试验表明,芽孢杆菌 B96 - II 对芦笋茎枯病菌 (*Phomopsis asparagi* Sacc) 菌丝生长的抑制率为 89.62%,对孢子产生的抑制率为 99.65%;对芦笋茎枯菌的田间防治效果为 93.10%。研究表明,B96 - II 的拮抗蛋白对芦笋茎枯菌有明显的抑制活性;对芦笋的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)均有激活和诱导作用。B96 - II 处理后 30 d,芦笋组织的 SOD 活力较对照提高 254.98%,CAT 活力提高 81.84%,POD 活性提高 22.13%,PPO 活力提高 146.67%,PAL 活力提高 171.60%。

关键词:芦笋茎枯病;芽孢杆菌;拮抗蛋白;诱导抗性;保护酶

中图分类号:S436.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000 - 7091(2008)02 - 0180 - 05

Causal Study on Inhibition Effects of Antagonistic Bacillus Strain B96 - II to Asparagus Stem Blight

MA Li - ping,HAO Bian - qing,QIN Shu,QIAO Xiong - wu

(Shanxi Key Laboratory of Pesticide Science,Shanxi Academy of Agricultural Sciences,Taiyuan 030031,China)

Abstract:Antagonistic *Bacillus* strain B96 - II could effectively inhibit mycelia growth and spore germination of *Phomopsis asparagi* Sacc, pathogen of asparagus stem blight. The inhibition rates were 89.62% and 99.65% respectively. Field trials showed a control efficacy of 93.10%. Contents of 5 resistance related enzymes in asparagus plants were stimulated distinctly 30 d after treatment with B96 - II. Compared with untreated control sample, superoxide dismutase activity had an increase of 254.98%, such as 81.84% to catalase, 22.13% to peroxidase, 146.67% to polyphenoloxidase, and 171.60% to phenylalanin ammonialyase.

Key words:Asparagus stem blight; *Bacillus* sp; Antagonistic protein; Induced resistance; Protective enzyme

芦笋 (*Asparagus officinalis* L) 是营养价值和经济价值较高的世界十大名菜之一,在我国台湾、广东、广西、福建、浙江、江西、江苏、上海、安徽、湖北、四川、陕西、山西、山东、河北等地都有种植^[1]。芦笋茎枯病是芦笋生产上普遍发生和为害严重的病害,对该病的防治主要依赖于化学农药。化学农药对芦笋品质的影响及对环境的为害不言而喻,筛选开发具有明显防治效果的生防菌显得十分必要。作者利用本室筛选出的且中试发酵技术基本成熟的广谱拮抗菌 B96 - II^[2],对芦笋茎枯菌进行了室内抑菌试验和田间防治效果试验,取得了明显的效果。为进一步探明 B96 - II 对芦笋茎枯菌的防治机理,又进行了拮抗菌的抑菌物分析和对芦笋保护酶的诱导抗性研究。

1 材料和方法

1.1 菌株、试剂及仪器

芦笋茎枯病菌 (*Phomopsis asparagi* Sacc) 分离自山西省永济市田间芦笋茎枯病株。芽孢杆菌 B96 - II 为本室筛选出的广谱拮抗菌。所用试剂均购自太原市来宝生物工程有限公司。主要仪器有:JD500 - 2 型电子天平(沈阳龙腾);MLS - 3020 全自动灭菌锅(日本 SANYO Labo Autoclave 公司);HZQ - F160 振荡培养箱(哈尔滨 HDL^(R) APPARATUS 公司);3K15 高速冷冻离心机(德国 SIGMA 公司);OL YMPUS 0P70 显微镜(日本);75ZZ 紫外可见光栅分光光度计(北京光学仪器厂)。

收稿日期:2007 - 12 - 07

基金项目:山西省科技攻关项目(2006031033);山西省重点实验室开放基金项目(2006年)

作者简介:马利平(1957 -),女,山西应县人,研究员,主要从事微生物农药研究及开发工作。

通讯作者:乔雄梧(1959 -),男,山西浑源人,研究员,主要从事农药残留研究工作。

1.2 B96 - II 对芦笋茎枯菌菌丝生长的抑制作用

采用生长速率法^[3]: 将 B96 - II 接入马铃薯液体培养基, 于 38 ℃, 175 r/min 振荡培养 48 h, 培养液与 45 ℃ 的 PDA 培养基按 1:200 混匀倒入平皿, 对照为同比例的空白培养液与 PDA 的混合培养基。将在 PDA 平皿 28 ℃ 培养 7 d 的芦笋茎枯菌, 用打孔器取直径为 0.4 cm 的菌片接入冷凝后平皿。每处理重复 5 次。然后将平皿置于 28 ℃ 温箱中培养, 分别在 3, 7, 14, 21, 28, 35 d 时, 以十字交叉法记录菌落直径, 以生长速率计算抑菌率。

1.3 B96 - II 对芦笋茎枯菌孢子产生的抑制作用

按 1:200 将 B96 - II 培养液与马铃薯液体培养基混和, 使体积为 70 mL, 装入 150 mL 三角瓶内, 对照为同比例的空白培养液, 分别接入培养 7 d、直径 0.4 cm 的芦笋茎枯菌菌片 10 枚, 每处理 3 次重复, 在 28 ℃, 150 r/min 的振荡培养箱培养 72 h, 每处理制一枚玻片, 在显微镜 10 ×40 倍视野下随机镜检 10 个视野, 统计茎枯菌孢子数及孢子变化情况。

1.4 B96 - II 拮抗蛋白提取及活性测定^[4]

将 B96 - II 拮抗菌接种在马铃薯液体培养基内, 水浴摇床 38 ℃, 175 r/min 培养 48 h, 静置 12 h, 4 ℃ 下 8 000 r/min 离心 15 min。取上清液, 加入不同饱和度硫酸铵 (25%, 45%, 65%, 85%), 4 ℃ 下沉淀过夜, 10 000 r/min 离心 15 min, 沉淀物用蒸馏水透析, 以此蛋白粗提液进行抑菌活性测定。制 PDA 平板, 每皿打直径为 0.8 cm 孔 2 个, 每孔滴入 60 μL 粗提液, 之后接入直径为 0.4 cm 的菌片, 置 28 ℃ 温箱培养, 在 3, 7 d 时测量菌落直径, 与对照比较计算抑菌率。

1.5 B96 - II 对芦笋茎枯病的田间防治

试验地点设在山西省太原市清徐县集义乡, 防治对象为 5 年生的绿芦笋, 以往发病率为 30% 左右。处理时间为采笋前半个月 (2007 年 4 月 20 日) 和采笋后半个月 (6 月 20 日)。处理方法及浓度: 用稀释 300 倍的 B96 - II 发酵液灌根, 每穴灌 500 mL, 对照药剂为 800 倍的 50% 复方多菌灵和空白处理。小区面积 60 m², 每处理重复 3 次。调查方法为随机抽样, 每小区调查 10 株, 计数总茎数和发病茎数, 与对照比较计算防治效果。

1.6 B96 - II 对芦笋体内酶活性的影响

为使处理间均匀一致, 本试验在室内进行。2006 年 4 月将大田培育 1 年的芦笋苗移栽在直径为 20 cm 的花盆内, 每盆 1 株, 土壤为均匀一致的自然中性土。2007 年 5 月 16 日, 将生长整齐一致的芦笋均剪掉顶部和侧枝, 每株保留 30 cm 高度的主枝 2~3 根。然后用 B96 - II 发酵液灌根处理, 每盆灌入 50

倍菌液 200 mL。对照为空白培养液, 置室内培养。每处理重复 3 次, 30 d 时进行保护酶活性测定。

1.6.1 超氧化物歧化酶 (SOD) 的测定 采用南京建成生物工程研究所研制的测定试剂盒。每处理称取芦笋组织 1 g, 加入生理盐水 6 mL 研碎; 4 000 r/min 离心 15 min, 上清液为酶粗提液; 测定管中加入: 试剂一 1 mL, 酶液 0.05 mL, 试剂二、三、四各 0.1 mL。对照管加入相同量的蒸馏水。摇匀, 置 37 ℃ 恒温水浴中保温 40 min, 各加入显色剂 2 mL, 放 10 min; 550 nm 处测 OD 值。

1.6.2 过氧化氢酶 (CAT) 的测定 运用紫外分光法, 采用南京建成生物工程研究所研制的 Catalase CAT 测定试剂盒。每处理称取芦笋组织 1 g, 加入生理盐水 10 mL 研碎; 4 000 r/min 离心 15 min, 上清液为酶粗提液; 0.05 mL 酶液加到在 25 ℃ 预温的 3 mL 底物液中 (OD 值 0.524), 立即在 240 nm 处测吸光度 (OD₁), 1 min 后再测吸光度 (OD₂)。蛋白含量测定用考马斯亮蓝法, 采用南京建成生物工程研究所研制的试剂盒。所有操作均在 4 ℃ 以下进行。

1.6.3 过氧化物酶 (POD) 活性的测定^[5] 每处理称取芦笋组织 1 g, 加入 5 mL 0.1 mol/L Tris - HCl 缓冲液 (pH8.5) 研碎; 4 000 r/min 离心 5 min, 上清液为酶粗提液; 取酶液 0.5 mL + 3 mL 反应混合液反应 5 min, 在 470 nm 处测吸光度。

1.6.4 多酚氧化酶 (PPO) 活力测定^[6] 每处理称取芦笋组织 1 g, 加入冰丙酮 2 mL 研碎; 加 2 mL 0.025 mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.2), 磁力摇动 30 min, 12 000 r/min 离心 30 min, 留上清液为酶粗提液; 以儿茶酚为底物, 在 1 cm 的比色杯中加入 2.75 mL 0.025 mol/L 磷酸缓冲液、0.1 mL 0.15 mol/L 儿茶酚溶液混匀, 室温放置 3 min, 加入 0.1 mL 的酶液, 5 s 后在 420 nm 处测吸光度。酶活性以每分钟吸光度改变 0.001 所需酶量为 1 个活力单位。

1.6.5 苯丙氨酸解氨酶活性测定^[7] 称取每处理的芦笋组织 1 g, 加入 6 mL 浓度为 5 mmol/L 的巯基乙醇的硼酸缓冲液和 0.5 g 聚乙烯吡咯烷酮, 研碎; 10 000 r/min 离心 15 min, 上清液为酶粗提液; 取酶液 1 mL, 0.02 mol/L 苯丙氨酸 1 mL, 蒸馏水 2 mL, 反应液在恒温水浴中保温 30 min; 在 290 nm 处测 OD。吸光度变化 0.01 所需酶量为 1 个活力单位。

2 结果和分析

2.1 B96 - II 对芦笋茎枯菌菌落生长的抑制作用

经测定, B96 - II 对芦笋茎枯菌菌丝具有明显的生长抑制作用, 处理内菌丝生长缓慢, 7 d 的菌落直

径为 0.99 cm,而对照皿内菌丝生长快而茂密,7 d 菌落直径达 7.45 cm。经 14,21,28,35 d 的记录统计, B96 - II 处理后菌丝生长速率为 0.11 cm/d,对照为 1.06 cm/d,与对照相对抑制率达 89.62 % (表 1)。

表 1 B96 - II 对芦笋茎枯菌菌落生长的抑制作用

Tab.1 Inhibition effect of antagonistic strain B96 - II on colony growth of *P. asparagi*

处理 Treatment	菌落直径/ cm Diameter of hyphostoma						长速率/ (cm/ d) Growth rate	抑制率/ % Inhibition rate
	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d		
B96 - II	0.67	0.99	1.58	2.45	3.68	4.00	0.11	89.62
Control	3.21	7.45	14.90	22.35	29.80	37.25	1.06	-

注:对照内菌丝 8 d 已长全皿,之后的数值为理论值。

Note: The mycelium bestrewed in culture dish after 8 d in control, after that, the number was theory number.

2.2 B96 - II 对芦笋茎枯菌孢子的抑制作用

显微观察发现, B96 - II 对芦笋茎枯病菌的孢子产生和形成具有强烈的抑制作用。培养 3 d 后, B96 - II 视野内孢子稀少, 偶见 2~3 个, 平均为 2.47 个/视野。对照视野内孢子多而密, 每视野平均达 709.33 个。与对照比较, 孢子产生抑制率为 99.65 %。另外发现, B96 - II 处理后孢子变形, 膨大或破裂者居多, 萌发的稀少, 对照孢子正常且部分已经萌发 (图 1, 2)。

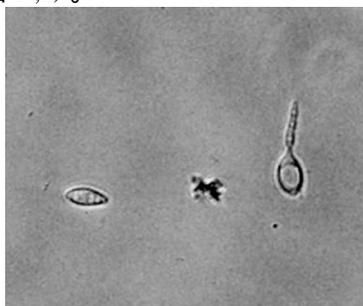


图 1 B96 - II 对茎枯菌孢子的影响

Fig.1 Effect of B96 - II on spore germination of *P. asparagi*

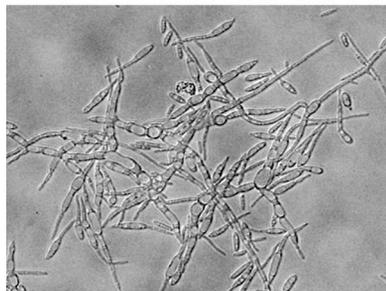


图 2 对照内茎枯菌孢子

Fig.2 Normal spore germination of *P. asparagi* in control

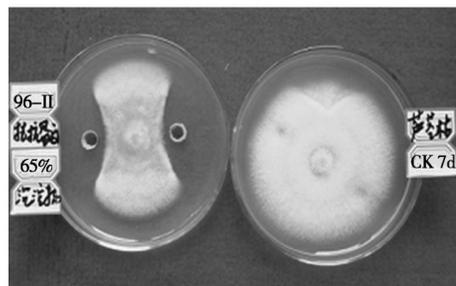


图 3 B96 - II 拮抗蛋白对茎枯菌的活性的抑制效果

Fig.3 Inhibition of the *P. asparagi* colony by protein from B96 - II fermentation

2.3 B96 - II 拮抗蛋白对芦笋茎枯菌的抑制效果

经活性测定, 25 % , 45 % , 65 % , 85 % 硫酸铵浓度所得沉淀物对芦笋茎枯病菌均有抑菌活性, 其中 65 % 沉淀的拮抗蛋白活性最大, 7 d 菌落直径为 2.8 cm, 对照为 7.2 cm, 抑制率为 61.11 % (图 3)。

2.4 B96 - II 对芦笋茎枯病的田间防治效果

经 7 月 20 日调查, B96 - II 处理后茎枯病明显降低, 平均病茎率为 1.40 % , 多菌灵处理为 5.37 % , 对照达 20.29 %。另外, B96 - II 对芦笋的促生效果也十分明显, 田间眼观效果: B96 - II 处理区芦笋植株高大茂密, 对照区芦笋低矮稀疏。经测量在植株高度、每株茎数、每茎鲜重 3 个指标上 B96 - II 较对照大大提高 (表 2)。

2.5 B96 - II 对芦笋组织 SOD 活力的效果

在 550 nm 处测定显示, B96 - II 的 OD 值明显低于对照, 说明形成的亚硝酸盐减少, 对超氧阴离子自由基有专一的抑制作用, 即 SOD 活力增高了 (表 3)。

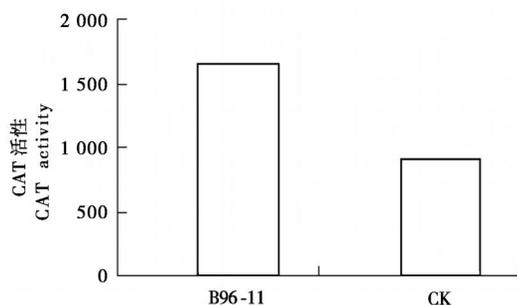


图 4 B96 - II 对芦笋 CAT 活力的影响

Fig4. Catalase activity after treatment with B96 - II

2.6 B96 - II 对芦笋 CAT, POD, PPO, PAL 4 种酶活性的诱导效果

B96 - II 处理后 30 d 测定, 芦笋中 CAT, POD, PPO, PAL 4 种酶活性均有明显的激活作用。其中 CAT 活力为 1 660.26 U/ g Hb, 较对照的 915.38 U/ g Hb 提高 81.84 % (图 4); POD 活性为 2 583.0 OD_{470nm}/ (min mg), 较对照的 POD 值 2 115.0 OD_{470nm}/ (min mg) 提高 22.13 % (图 5); PPO 活力 10 360 AU/ (g min), 对照为 4 200 AU/ (g min), 相比对照提高 146.67 % (图 6); 组织中的 PAL 活力为 9 914.4 μg/ mL, 对照为 3 650.4

$\mu\text{g}/\text{mL}$, 提高 171.60% (图 7)。

表 2 B96 - II 的芦笋茎枯病的田间防治效果

Tab.2 Efficacy of B96 - II to *P. asparagi* in field trial

处理 Treatment	总茎数 Stems investigated	高/茎/cm Height	鲜重/茎/g Fresh weight	病茎数 Stems infected	发病率/% Incidence	防治效果/% Efficacy
B96 - II	286	126.85	63.88	4	1.40	93.10
多菌灵 Carbendazim	205	126.13	53.05	11	5.37	73.53
空白对照 Control	138	100.05	18.91	28	20.29	-

表 3 B96 - II 对芦笋组织 SOD 酶活力的影响

Tab.3 Effects of B96 - II on SOD in Asparagus

处理 Treatment	OD _{595 nm}	蛋白质/(mg/L) Prot	OD _{550 nm}	SOD /(U/mg prot)	提高/% Increase
B96 - II	0.684	463.0	0.332	52.75	254.98
Control	0.685	466.4	0.385	14.86	-

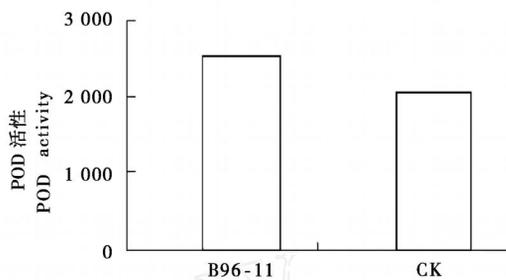


图 5 B96 - II 对芦笋 POD 活力的影响

Fig.5 Peroxidase activity after treatment with B96 - II

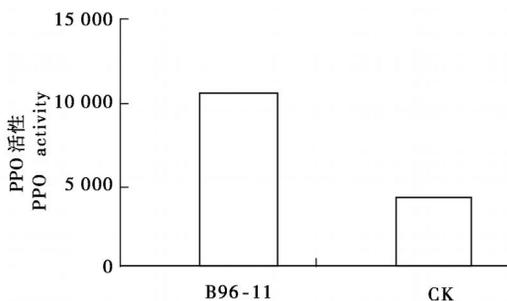


图 6 B96 - II 对芦笋 PPO 活力的影响

Fig.6. Polyphenoloxidase activity after treatment with B96 - II

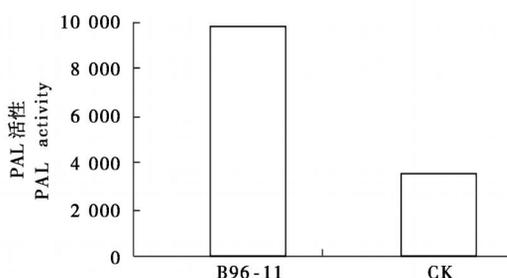


图 7 B96 - II 对芦笋 PAL 活力的影响

Fig.7. Phenylalanin ammoniolyase activity after treatment with B96 - II

3 讨论

试验表明,芽孢杆菌 B96 - II 对芦笋茎枯病有较好的抑制作用,尤其田间的灌根处理防效更好,仅 2 次处理防治效果即达 93.10%。B96 - II 对芦笋茎枯菌的抑制及防治有两方面的原因:

第一,B96 - II 的代谢物 - 拮抗蛋白对茎枯菌菌丝的生长和孢子的产生起到了直接的抑制作用。国外报道的枯草芽孢杆菌抑菌机制主要是在抑制孢子萌发上^[8],本研究显微观察发现,B96 - II 主要是对孢子形成和产生起到了强烈的抑制作用,正常情况,将生长 7 d 的茎枯菌菌片在摇床培养 3 d,孢子可大量形成,每视野 700 ~ 800 个,在 B96 - II 存在情况下,孢子显著减少;

第二,B96 - II 对芦笋保护酶具有积极的激活和诱导作用,在 B96 - II 灌根后的 30 d 测定,SOD, CAT, POD, PPO, PAL 5 种酶活性有大幅度增高,SOD, CAT 均为植物体内担负清除活性氧类(AOS)的重要防御酶系统,前者能催化植物体内过量的 O_2 - 歧化形成 H_2O_2 ,而后者则能催化 H_2O_2 还原成 H_2O ,在生物 AOS 代谢中处于重要地位^[9]。POD, PPO 是植物体内普遍存在的 2 种酶类,二者活性的高低与植物抗病性的强弱密切相关^[10]。健康植物体内含有大量的酚类化合物,如绿原酸、单宁酸、儿茶酚和原儿茶酚等,这些酚类物质对病原菌具一定的毒性。植物感病或受伤后,在多酚氧化酶的催化下氧化成毒性更强的醌类物质。这些醌类物质对病原菌的磷酸化酶、纤维素酶等的活性有明显的抑制作用。苯丙氨酸解氨酶、肉桂酸 - 4 - 羟化酶和 4 - 香豆酸 - CoA 联结酶(4CL)是苯丙烷代谢途径的关键酶,异类黄酮植保素、木质素以及多种次生酚类抗病物质都是通过苯丙烷代谢途径合成的。因此,这 3 个酶特别是苯丙氨酸

解氨酶的活性与植物的抗病反应直接相关^[11]。B96 - II对芦笋来说是一种外在因子,处理芦笋后体内的5种酶活性显著提高,说明该菌能诱导激活芦笋体内的相关酶。

研究认为,微生物生防作用的机制主要有:竞争作用、拮抗作用、寄生或捕食、交叉保护和诱导植物抗病性等方面。一种微生物作用机制可以有多种,不同微生物作用机制可能有所不同。芽孢杆菌的作用机制以竞争、拮抗和诱导植物抗病性为主^[12]。通过对B96 - II拮抗蛋白的提取分析及对5种抗性酶的测定初步表明,芽孢杆菌B96 - II对芦笋茎枯菌的防治机制主要为拮抗作用和对植物的诱导抗性。

参考文献:

- [1] 叶琪明.我国芦笋茎枯病研究现状[J].植物保护,1991(1):30 - 32.
- [2] 马利平,乔雄梧,高芬.B96 - II对3种枯萎病的防治效果及拮抗物质初步分析[J].华北农学报,2006,21(4):99 - 102.
- [3] 陈年春.农药生物测定技术[M].北京:北京农业大学出版社,1990:161 - 168.
- [4] 童有仁,马志超,陈卫良.枯草芽孢杆菌B034拮抗蛋白的分离纯化及特性分析[J].微生物学报,1999,39(4):339 - 343.
- [5] 华中农业大学植物科学技术学院.过氧化物酶活性的测定[EB/OL].现代植物生理学教学网站(<http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/zwsl/syzd>),2004.
- [6] 华中农业大学植物科学技术学院.多酚氧化酶活力测定[EB/OL].现代植物生理学教学网站(<http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/zwsl/syzd>),2004.
- [7] 华中农业大学植物科学技术学院.苯丙氨酸解氨酶活性测定[EB/OL].现代植物生理学教学网站(<http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/zwsl/syzd>),2004.
- [8] 谢栋,彭憬,王津红,等.枯草芽孢杆菌抗菌蛋白X98III的纯化与性质[J].微生物学报,1998,38(1):13 - 19.
- [9] 曾永三,王振和.豇豆与锈菌互作中的活性氧代谢研究[J].植物病理学报,2004,34(2):146 - 153.
- [10] 孙艳,杨淑英.水杨酸诱发黄瓜幼苗对霜霉病抗性的研究[J].植物病理学报,2004,34(2):187 - 189.
- [11] 李合生.现代植物生理学[M].北京:高等教育出版社,2006:365.
- [12] 陈中义,张杰,黄大.植物病理生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J].植物病理学报,2003,33(2):97 - 103.