

# 一株乳酸菌对番茄灰霉病的防效及对 几种防御酶活性的影响

闫艳华 王海宽 肖瑞峰 宗志友 沈发迪 孙瑶 戚薇\*

(天津科技大学 生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室 天津 300457)

**摘要:** 为了研究植物乳杆菌 IMAU10014 对番茄的促生长作用和对番茄灰霉病的生防效果以及对植株叶片几种防御酶活性的影响, 通过植物乳杆菌 IMAU10014 发酵液对番茄种子浸种的方法检测促生长作用以及对番茄苗的叶片喷雾和灌根的方法来测定其作为生防杀菌剂的意义。在菌液浓度为  $10^7$  CFU/mL, 对番茄浸种 6-8 h, 明显提高了种子发芽率及芽长, 发芽率达到 100%; 另外在番茄幼苗接种病原菌后, 再由植物乳杆菌 IMAU10014 做不同处理, 病情指数可由 47.22 分别降至 32.41 和 26.39 (防治效果分别达 31.36%和 44.11%); 与植物防御抗病相关的苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、过氧化物酶(POD)及多酚氧化酶(PPO)活力都有明显增加。植物乳杆菌 IMAU10014 作为生物农药防治灰霉病有很大的潜力。

**关键词:** 植物乳杆菌, 灰霉病, 植物防御酶, 生物防治

## Bio-control effects of a lactic acid bacteria on tomato *Botrytis* blight and its induction on defense-related enzymes

YAN Yan-Hua WANG Hai-Kuan XIAO Rui-Feng ZONG Zhi-You  
SHEN Fa-Di SUN Yao QI Wei\*

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The aim of this study was to investigate *Lactobacillus plantarum* IMAU10014's growth promotion effects on tomato, biocontrol efficacy on *Botrytis cinerea* caused disease and its induction effects on several defense-related enzymes. Seed-soaking with IMAU10014 was used for determining its growth promotion effects on tomato, and leaf spraying and root soaking inoculation were employed to determine its biocontrol effectiveness. Seed-soaking with IMAU10014 at concentrations of  $10^7$  CFU/mL for 6 to 8 h significantly increased seed germination rates and buds size. Seed germination

rate was 100%. Treatment of tomato seedlings with *L. plantarum* IMAU10014 reduced *B. cinerea* disease index from 47.22 to 32.41 and 26.39 (Biocontrol effect 31.36% and 44.11%), respectively. Significant induction of plant defense-related enzymes, including phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) was observed in tomato plants treated with *L. plantarum* IMAU10014. *L. plantarum* IMAU10014 has good potential as a biological pesticide to control Botrytis blight.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*, *Botrytis cinerea*, Plant defense-related enzymes, Biocontrol

乳酸菌因其悠久的历史 and 广泛的应用范围在食品工业中占有特殊地位, 目前有关乳酸菌抑菌的报道层出不穷<sup>[1-3]</sup>, 然而关于乳酸菌抗植物致病真菌的研究较少, 张洪波等<sup>[4]</sup>利用平板拮抗法筛选出的乳酸杆菌 Kx48, 在温室对柑橘溃疡病的防治效果达到 55.6%, 在重病果园中的防治效果为 47.7%。戚薇等<sup>[5]</sup>从 60 株乳酸菌中筛选出 9 株菌对番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、甜瓜疫霉菌(*Phytophthora drechsleri* Tucker)、苹果炭疽病菌(*Glomerella cingulata*)、灰葡萄孢霉菌(*Botrytis cinerea*)的生长均有抑制作用。

早期关于生防机制的研究大多集中在微生物间的互作, 而忽视了寄主植物的参与, 事实上一些非生物因子和生物因子都可以诱导植物抗病性的提高, 一些研究表明施用生防菌可以诱导植物抗病相关防御酶产生变化, 进而增强植物抗病能力<sup>[6-8]</sup>, 其中苯丙氨酸解氨酶(PAL)是植物体内苯丙烷类代谢的关键酶, 在植物正常生长发育和抵御病菌侵害过程中起重要作用<sup>[6]</sup>。过氧化物酶(POD)是植物体内普遍存在的一种还原酶<sup>[9-10]</sup>, 当植物在不良环境条件下或受到病原菌的侵染后, 其酶活性都会发生变化, 因此把 POD 酶活性的变化作为植物诱导抗病性的一个重要指标<sup>[11]</sup>。此外, 超氧化物歧化酶(SOD)和多酚氧化酶(PPO)等与植物诱导抗病性都具有密切关系。

本课题组从 77 株乳酸菌中筛选出抗真菌活性较高的植物乳杆菌 IMAU10014, 前文报道了其能抑制多种植物病原真菌, 具有成为生物杀菌剂(Biofungicides)的潜力<sup>[12]</sup>。本试验通过温室盆栽防治番茄灰霉病菌试验及鉴定植物相关抗病酶活变化, 进一步验证了植物乳杆菌 IMAU10014 的抗真菌

活性, 旨在为实现开发其为生物杀菌剂提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试菌株: 植物乳杆菌 IMAU10014, 来自内蒙古农业大学“乳品生物技术与工程”教育部重点实验室。

指示真菌: 灰葡萄孢霉菌(*Botrytis cinerea*), 来自天津植物保护研究所。

供试番茄品种: 粉蝶。

### 1.2 培养基

(1) 乳酸菌活化培养基: MRS 培养基, 加 2%琼脂即为 MRSA 固体培养基<sup>[13]</sup>。

(2) 指示真菌培养基: PDA 培养基<sup>[14]</sup>。

### 1.3 植物乳杆菌 IMAU10014 菌株发酵液及灰葡萄孢病原菌液的制备

取少量保存于 15%甘油内的活菌于 MRS 琼脂平板上划线, 在 37 °C 培养箱活化, 挑取单菌落接种于种子培养基(MRS)内, 37 °C 恒温培养 24 h, 然后按 3%接种量接种于发酵培养基(MRS)内, 37 °C 恒温培养 48 h 后即得到乳酸菌发酵液原液。

取培养 7 d 的灰葡萄孢菌, 用 0.025%的吐温 80 溶液洗下孢子, 配成灰葡萄孢菌孢子悬浮液, 并调整孢子浓度为  $1.0 \times 10^6$  /mL。

### 1.4 植物乳杆菌 IMAU10014 发酵液浸种对番茄种子发芽的影响

把消毒后的种子放到 20 °C-30 °C 的清水中, 使水浸没种子, 不断搅动, 把漂浮在水上的瘪种子去掉, 取乳杆菌 IMAU10014 的发酵培养液 10 mL (菌液浓度为  $10^7$  CFU/mL) 浸泡番茄种子, 分别浸泡

2、4、6、8、10、12 h, 然后将种子分别放置于铺有双层滤纸的灭菌平皿中, 每天向平皿中加 3 mL 无菌水保湿催芽(25 °C–28 °C), 72 h 调查番茄种子发芽率及芽长。

### 1.5 番茄苗温室培养

将催芽后的种子播种于直径 10 cm 的花盆中, 然后置于 25 °C, 相对湿度 90% 的温室内培养。

### 1.6 植物乳杆菌和病原菌处理

待 1.5 培养的番茄苗为 4–5 叶时, 开始进行各个处理, 每个处理 5 株, 4 次重复, 处理 7 d 后调查发病情况。

(1) 用手持塑料喷雾器将灰霉菌液均匀喷洒在番茄植株叶片正反两面 24 h 后, 再将 IMAU10014 发酵液均匀喷雾于番茄植株叶片正面与背面, 测定 IMAU10014 发酵液对灰霉菌菌的拮抗作用。

(2) 接种灰霉病原菌 24 h 后, 喷雾发酵液[接种与喷雾方法同(1)], 同时灌根 30 mL 发酵液。

(3) 接种灰霉病原菌 24 h 后, 喷清水作对照的处理(接种与喷雾方法同(1))。

### 1.7 病情指数分析

调查番茄叶片发病情况, 计算病情指数和防治效果。植株叶片的发病情况分级标准<sup>[15]</sup>如下: 0 级为无病斑; 1 级为病斑面积占整个叶面积的 5% 以下; 3 级为病斑面积占整个叶面积的 6%–10%; 5 级病斑面积占整个叶面积的 11%–25%; 7 级病斑面积占整个叶面积的 26%–50%; 9 级病斑面积占整个叶面积的 50% 以上。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{病叶数} \times \text{相对级数})}{100 / (\text{调查总叶数} \times 9)}$$

防治效果(%) = (对照病指 - 处理病指) × 100 / 对照病指。

### 1.8 植株样品粗酶液的制备及酶活性测定

在病原菌处理 24 h 后开始取样, 每隔 2 d 取一次, 连续取样 7 次, 测定不同处理叶片中相关抗病酶活的变化。

**1.8.1 粗酶液的制备:** 粗酶液制备方法采用 Chen 等的方法<sup>[7]</sup>。

**1.8.2 抗病相关酶活测定:** 苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性测定采用 Lee 等的方法<sup>[16]</sup>, 过氧化物酶(POD)的活性测定采用 Fu 等的方法<sup>[17]</sup>, 多酚氧化酶(PPO)的活性测定采用 Park 的方法<sup>[18]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物乳杆菌 IMAU10014 发酵液浸种对番茄种子发芽的影响

用菌液浓度为  $10^7$  CFU/mL 的拮抗细菌发酵液分别对番茄种子浸泡 2、4、6、8、10、12 h 后, 发酵液浸种发芽率为 90%–100%, 清水浸种发芽率为 86%–100%, 然后进行催芽, 各处理番茄的芽长均比清水对照长, 浸泡 6–8 h 处理的效果最好(图 1)。

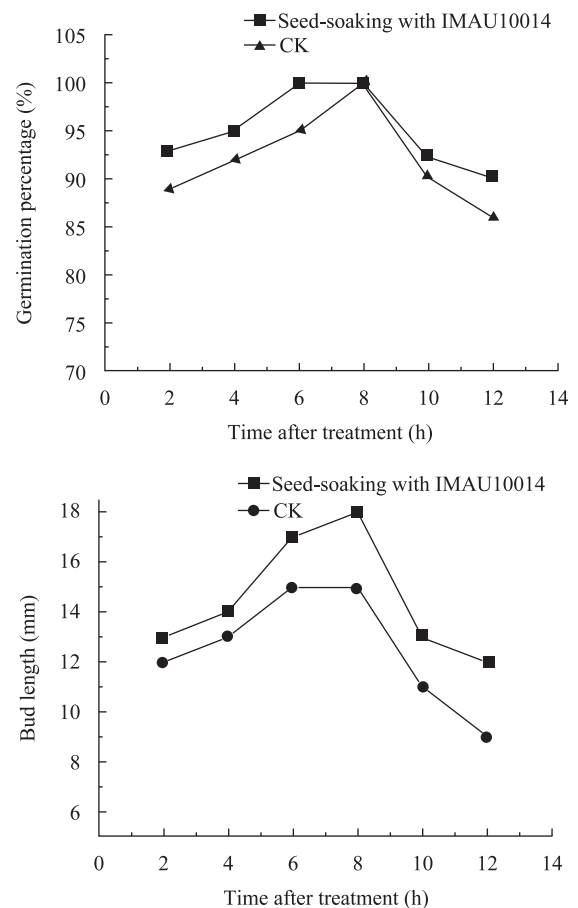


图 1 植物乳杆菌 IMAU10014 发酵液浸种不同时间后番茄种子的发芽率和芽长度

Fig. 1 The effect of seed-soaking with *Lactobacillus plantarum* IMAU10014 with different time

### 2.2 温室番茄灰霉病性状

未经乳酸菌发酵液处理的番茄植株, 受害叶片由叶缘向内呈 V 字形扩展, 病斑初呈水渍状, 后呈浅灰色至黄褐色, 叶片表面生少量褐色霉层。发病番茄植株与经生防菌处理后同期番茄植

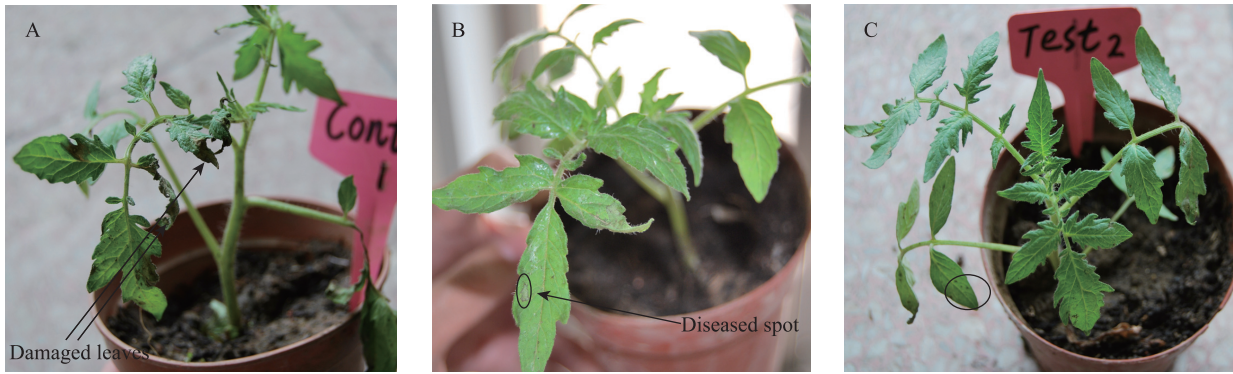


图 2 发病番茄植株与经植物乳杆菌 IMAU10014 处理后同期番茄植株性状

Fig. 2 The trait of infected tomato and processed tomato with *Lactobacillus plantarum* IMAU10014 at the same period

株对比见图 2。A 为接种灰霉病原菌后喷清水作对照的番茄植株，叶片发病情况很严重，部分已经腐烂。B 为接种病原菌后再进行 IMAU10014 发酵液喷雾的植株，只有少量叶片上出现水渍状病斑及叶尖受损。C 为接种病原菌后再进行 IMAU10014 发酵液喷雾结合灌根处理的番茄植株，防治效果明显，只有少量需肉眼仔细看叶片才能发现的微小病斑。

### 2.3 植物乳杆菌 IMAU10014 对温室番茄灰霉病的防治结果

各组处理 7 d 后，番茄叶片的发病情况调查结果见表 1。可以看出参试的各处理对番茄灰霉病均有一定的防效。植物乳杆菌菌株 IMAU10014 发酵液的 2 个不同处理的防效均较高，分别为 31.36%、44.11%，发酵液喷雾结合灌根处理对灰霉菌的抑制作用好于仅喷雾的处理。

表 1 防治番茄叶期灰霉病药效试验结果			
Table 1 Biocontrol efficacy on tomato <i>Botrytis</i> blight			
处理 Treatment	浓度 Concentration (CFU/mL)	病情指数 Disease index	防治效果 Biocontrol effect (%)
IMAU10014 发酵液 (喷雾)	1×10 <sup>7</sup>	32.41	31.36
Spray with IMAU10014			
IMAU10014 发酵液 (喷雾+灌根)	1×10 <sup>7</sup>	26.39	44.11
Spray and root-soak with IMAU10014			
清水对照(喷雾)	—	47.22	—
Spray with water			

### 2.4 植物乳杆菌 IMAU10014 对诱导番茄抗病性相关酶活性的影响

**2.4.1 对苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的影响：**番茄叶片接种灰霉菌后用植物乳杆菌 IMAU10014 发酵液处理，PAL 酶活力明显高于其他处理，在接种后第 5 天出现高峰，并在下降以后趋于平缓，而对照没有明显变化(图 3)。

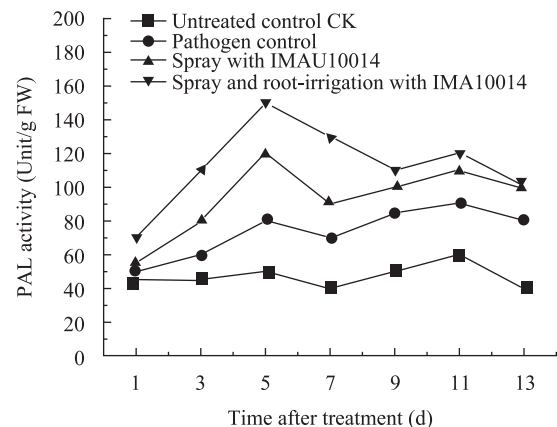


图 3 不同处理番茄叶片中 PAL 酶活力的变化

Fig. 3 Changes of PAL activity in tomato leaves of different treatment

**2.4.2 对过氧化物酶(POD)活性的影响：**POD 酶活力测定结果表明(图 4)，接种病原菌后由 IMAU10014 发酵液处理过的植株叶片中 POD 酶活力出现快速的增高，在处理结束 5 d 后进入基本平稳期，但仍明显高于只接种病原菌的处理和没有接种病原菌的空白对照，在没有进行任何处理的空白

对照的植株叶片中 POD 酶活力没有明显变化,活力最低。

**2.4.3 对多酚氧化酶(PPO)活性的影响:**没有接种病原菌的空白对照的番茄叶片的 PPO 酶活力基本没有变化。由于植物在受到外界病原菌刺激后,会增加自身防御功能,接种病原菌后 1-5 d, PPO 酶活力有明显提高。经过生防菌处理的番茄, PPO 酶活力在第 5 天均出现峰值,且明显高于仅接种病原菌和空白对照(图 5)。这些结果表明灰霉菌侵染后,施用 IMAU10014 发酵液能诱导植物 PPO 酶活力进一步提高,进而增强植物的抗病能力。

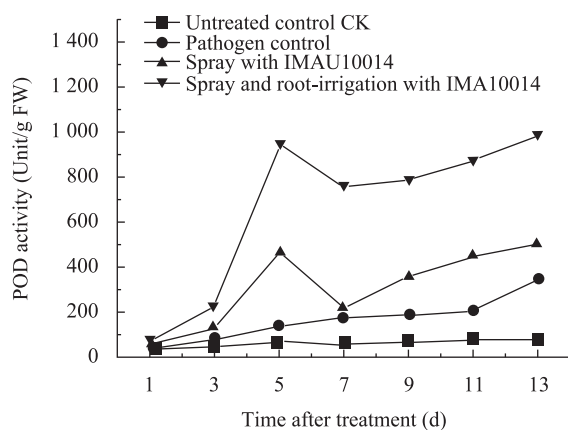


图 4 不同处理番茄叶片中 POD 酶活力的变化  
Fig. 4 Changes of POD activity in tomato leaves of different treatment

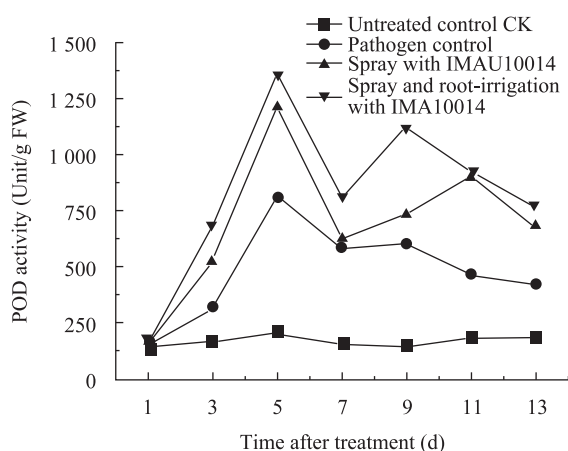


图 5 不同处理番茄叶片中 PPO 酶活力的变化  
Fig. 5 Changes of PPO activity in tomato leaves of different treatment

### 3 结论与讨论

通过植物乳杆菌 IMAU10014 不同时间浸泡番茄种子,浸泡 8 h 番茄出芽情况最好,表明了生防菌有一定的促生长特性。通过温室盆栽试验,接种番茄灰霉菌后经植物乳杆菌 IMAU10014 发酵液处理,在一定程度上控制了番茄幼苗灰霉病的病情指数及发病率,防治效果达到 44.11%。

PAL 与一些重要的次生物质如木质素、异黄酮类植保素、黄酮类色素等合成密切相关,当 PAL 活性增强时,植株的抗病害能力就会增强<sup>[6]</sup>。POD 催化脂肪族、芳香族和酚类物质的氧化,是木质素合成的关键酶,其活性的增加标志着木质素的加速合成和抗性的产生<sup>[8]</sup>,是与植物抗病能力相关的重要酶。PPO 能将酚类物质氧化成对病原菌有毒的醌类物质<sup>[8]</sup>,增强植物对病原菌侵害的屏障作用,因此 PPO 被普遍认为是重要的植物保护酶类。通过检测施用乳酸菌发酵液后番茄不同生长时期与诱导植物抗病性密切相关的植株酶活力(PAL、POD 和 PPO)变化的结果表明,植物乳杆菌 IMAU10014 发酵液处理后几种防御酶活力均有所上升,使番茄生长初期诱导植株产生了更高的抗病酶活力,增强了植物的抗病能力,进一步说明了其作为生防农药有很好的应用前景。

随着蔬菜种植面积的扩大,由灰葡萄孢菌所致的灰霉病已上升为蔬菜的主要病害之一。从苗期到成熟期均可感染灰霉病,防治一直以化学药剂为主,但化学药剂长期使用引起的抗药性、农药残留及环境污染问题受到人们越来越多的关注<sup>[19-21]</sup>。所以开发新型的天然拮抗微生物以及作用机理独特且对人畜和生态环境无害的生防杀菌剂是农药发展的重要方向<sup>[22]</sup>。植物乳杆菌 IMAU10014 来自于中国新疆酸马奶酒,安全可靠且不会对植物和环境造成污染,本文通过盆栽试验初步确定了植物乳杆菌 IMAU10014 对番茄灰霉病有一定的防治效果。拮抗微生物的利用在生物防治中占有举足轻重的位置,但是生防因子受环境因素的影响较大,对使用技术



的要求也往往较高,对于生物防治存在的缺陷,可用现代生物技术和基因工程的方法对生防因子进行改造,不断改进其性能和提高产品质量<sup>[23]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, et al. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(9): 4084–4090.
- [2] Ström K, Schnürer J, Melin P. Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 246(1): 119–124.
- [3] Coloretti F, Carri S, Armaforte E, et al. Antifungal activity of *lactobacilli* isolated from salami[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 271(2): 245–250.
- [4] 张洪波, 巢进, 王跃强, 等. 柑橘溃疡病拮抗菌的分离筛选及其田间防效[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2007, 33(5): 605–607.
- [5] 戚薇, 颜虎, 魏玉洁, 等. 干酪乳杆菌 IMAU10041 抗甜瓜枯萎病菌的作用及理化性质[J]. 天津科技大学学报, 2011, 26(3): 12–15.
- [6] 李世贵, 吕天晓, 顾金刚, 等. 施用木霉菌诱导黄瓜抗病性及对土壤酶活性的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2010(2): 75–78.
- [7] Chen F, Wang M, Zheng Y, et al. 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.
- [8] 庄敬华, 高增贵, 杨长城, 等. 绿色木霉菌 T23 对黄瓜枯萎病防治效果及其几种防御酶活性的影响[J]. 植物病理学报, 2005, 35(2): 179–183.
- [9] Parish RW. The intracellular location of phenol oxidase in stem of spinach beet (*Beta vulgaris* L.)[J]. Z Pflanzenphysiol, 1972, 66: 176–188.
- [10] Raa J. Cytochemical localization of peroxidase in plant cells[J]. Physiol Plant, 1973, 28(1): 132–133.
- [11] 权威, 于卓, 王月华, 等. 蒙古冰草×航道冰草杂种 F4 代株系同工酶分析[J]. 草地学报, 2006, 14(1): 14–19.
- [12] Wang HK, Yan H, Shi J, et al. Activity against plant pathogenic fungi of *Lactobacillus plantarum* IMAU10014 isolated from Xinjiang koumiss in China[J]. Ann Microbiol, 2011, DOI: 10.1007/s13213-011-0209-6.
- [13] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 85–86.
- [14] 杜连祥. 工业微生物学实验技术[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992: 278.
- [15] 农业部农药检定所生测室. 农药田间药效试验准则[M]. 北京: 中国标准出版社, 1993: 45–51.
- [16] Lee HJ, Park KH, Shim JH, et al. Quantitative changes of plant defense enzymes in biocontrol of pepper (*Capsicum annuum* L.) late blight by antagonistic *Bacillus subtilis* HJ927[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 15(5): 1073–1079.
- [17] Fu JM, Huang BR. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress[J]. Environmental and Experimental Botany, 2001, 45(2): 105–114.
- [18] Park YS. Carbon dioxide-induced flesh browning development as related to phenolic metabolism in ‘Niiitaka’ pear during storage[J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 1999, 40: 567–570.
- [19] 丁中, 刘峰, 慕六义. 不同抗性型灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 对不同作用机制杀菌剂的敏感性研究[J]. 农药学报, 2001, 3(4): 59–63.
- [20] Bollen GJ, Scholten C. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen[J]. European Journal of Plant Pathology, 1971, 77(3): 83–90.
- [21] 祁之秋, 王英姿, 夏天敏, 等. 拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌的抑菌活性研究[J]. 河南农业科学, 2007(12): 80–82.
- [22] Schulz B, Boyle C, Draeger S, et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites[J]. Mycol Res, 2002, 106(9): 996–1004.
- [23] 陈琪, 丁克坚, 高智谋. 拮抗微生物对灰葡萄孢菌的生物防治作用及其应用前景[J]. 安徽农业科学, 2004, 32(4): 778–780.