

硫酸亚铁协同枯草芽孢杆菌对辣椒疫病抑制作用研究

杜公福, 李晓亮, 戚志强, 申龙斌, 韩旭,
秦于玲, 曹振木, 杨衍*

(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海口 570100)

摘要 采用平板抑制法测定钙、镁、硼、铁、硅 5 种元素对辣椒疫霉菌丝生长和孢子囊发育的影响,发现铁元素对辣椒疫霉菌丝生长和孢子囊的抑制作用随着浓度的增大而增强。根据初筛结果,选择螯合铁、硫酸铁、柠檬酸铁和硫酸亚铁 4 种不同铁化合物对辣椒疫霉菌丝进行抑制试验,发现硫酸亚铁抑制效果最显著。通过盆栽试验,从抑病率、生理指标等方面进行相关验证。选择性地给辣椒根外增施硫酸亚铁、硫酸亚铁混配枯草芽孢杆菌和单施枯草芽孢杆菌,试验结果如下,硫酸亚铁+枯草芽孢杆菌处理的辣椒植株发病率为 50%,病情指数为 16.67;枯草芽孢杆菌处理发病率为 70%,病情指数为 30.44;硫酸亚铁处理发病率为 75%,病情指数为 32.89;对照处理的辣椒植株发病率为 100%,病情指数为 72.22。在生理指标方面的表现为处理组显著提高了辣椒体内 SOD、CAT 活性,降低了 MDA 含量。试验结果表明,硫酸亚铁联合枯草芽孢杆菌对辣椒疫病的防控具有增效的作用。

关键词 硫酸亚铁; 枯草芽孢杆菌; 辣椒疫霉菌; 抑制作用

中图分类号: S 436.418 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2019379

Inhibitory mechanism of ferrous sulfate combined with *Bacillus subtilis* on *Phytophthora capsici*

DU Gongfu, LI Xiaoliang, QI Zhiqiang, SHEN Longbin, HAN Xu,
QIN Yuling, CAO Zhenmu, YANG Yan*

(Institute of Tropical Crops Genetic Resources, Chinese Academy of Tropical
Agricultural Sciences, Haikou 570100, China)

Abstract The inhibitory effects of five elements, *i.e.*, calcium, magnesium, boron, ferrum and silicon, on the mycelia and sporangia of *Phytophthora capsici* were studied by using plate inhibition method. It was found that the inhibitory effect of ferrum on the growth of mycelia and sporangia of *P. capsici* increased with increasing concentration. According to the preliminary screening results, four different ferrum compounds, including chelated iron, ferric sulphate, ferric citrate and ferrous sulfate, were selected to inhibit the bacteriophage of *P. capsici*, and the inhibitory effect of ferrous sulfate was found to be the most significant. In order to explore the effect of ferrous sulfate on the control of pepper blight and its effect on the defense enzyme activity in pepper, the pot experiment was conducted to verify the disease rate and physiological index. Selective application of ferrous sulfate and ferrous sulfate combined with *Bacillus subtilis* and *B. subtilis* was carried out. The test results were as followed: the incidence rate of pepper plants treated with ferrous sulfate + *B. subtilis* was 50%, with a disease index of 16.67; the incidence rate under *B. subtilis* treatment was 70%, with a disease index of 30.44; the incidence rate under ferrous sulfate treatment was 75%, with a disease index of 32.89, and the incidence rate in the control group was 100%, with a disease index of 72.22. The physiological indicators showed that the activity of SOD and

收稿日期: 2019-07-24 修订日期: 2019-10-07

基金项目: 农业农村部农业技术试验示范与服务支持项目;公益性行业(农业)科研专项(201503123-10);中国热带农业科学院基本科研业务费专项(1630032019019)

* 通信作者 E-mail:adu209209@163.com

CAT was significantly increased in the treatment group, while the content of MDA was significantly decreased in pepper. The results suggested that ferrous sulfate combined with *Bacillus subtilis* had a synergistic effect on the prevention and control of pepper blight.

Key words ferrous sulfate; *Bacillus subtilis*; *Phytophthora capsici*; inhibition

辣椒疫病是辣椒的一种毁灭性土传病害,严重威胁我国辣椒的生产,目前以化学药剂防治为主,频繁使用化学药剂及不合理用药导致病原菌产生抗药性,降低了防治效果,同时增加了环境压力,生产成本提高^[1-2]。当前,寻找能够减少化学农药施用的高效防控辣椒疫病的手段成为辣椒产业可持续健康发展的关键。相关研究表明,由于辣椒长期连作、不合理施用化学肥料等,导致土壤有机质含量偏低、部分辣椒生长必需矿质元素不足,这可能是辣椒疫病发生严重的主要原因^[3-4],因此,从营养角度去调控辣椒疫病的发生,是值得探索的一种非化学防治措施的新途径。

矿质元素是植物正常生长发育所必需的,主要包括大量元素(氮、磷、钾),中量元素(钙、镁、硫)和微量元素(铁、锰、铜、锌、硼、钼、氯)等。矿质营养的均衡可以有效增强植株的抗病力,而且多数元素自身及其代谢物,或作为病原物营养,或对其产生毒害等作用从而直接影响病原物的侵染繁殖^[5]。这些矿质元素一方面可作为植物组织的构成成分或直接参与新陈代谢,另外还可改变植物的生长方式、形态和解剖学特性,改变生物化学特性来增强或减弱植物对病虫害的抵抗力,影响植物的生长和产量^[6-7]。已有研究指出,通过调控植物部分必需矿质营养,可有效缓解或控制番茄青枯病^[8-9]、柿子顶腐病^[10]和核桃腐烂病^[11]等病害的发生。但鲜有关于铁元素对辣椒疫霉抑制作用的研究报道。

本论文从营养角度对辣椒疫病的调控作用进行研究,通过筛选硼、钙、镁、铁、硅 5 种矿质元素,找出对辣椒疫病菌有较好抑制作用的元素,并进一步筛选其相关化合物对辣椒疫霉的抑制效果,在此基础上与生防菌联合施用进行对辣椒疫病防控试验,探索营养元素与生防菌协同防治病害方法,为辣椒疫病的绿色防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试试剂

硼砂:上海商玺伟康医药用品有限公司,含量 $\geq 99.5\%$,分析纯;氯化钙:国药集团化学试剂有限公

司,含量 $\geq 96.0\%$,分析纯;硫酸镁:国药集团化学试剂有限公司,含量 $\geq 99.0\%$,分析纯;硅酸钾:阿拉丁(Aladdin),含量 $\geq 96.0\%$,分析纯;硫酸亚铁:国药集团化学试剂有限公司,含量 $\geq 99.0\%$,分析纯;螯合铁:国药集团化学试剂有限公司,含量 $\geq 99.0\%$,分析纯;硫酸铁:国药集团化学试剂有限公司,含量 $21.0\% \sim 23.0\%$,分析纯;柠檬酸铁:上海展云化工有限公司,含量 $16\% \sim 19\%$,分析纯;多菌灵:四川润尔科技有限公司,50%可湿性粉剂;枯草芽孢杆菌水分散粒剂:湖北省生物农药工程研究中心提供,含量 1 000 亿 cfu/g。

1.2 供试材料

供试辣椒品种:‘久保田螺椒王’,淮北市久保田种业有限公司;育苗基质:辣椒育苗专用基质,海南文昌腾达生物科技有限公司;供试菌种:辣椒疫霉菌由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所蔬菜研究室提供。

PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,用蒸馏水定容至 1 L。

1.3 试验器材

垂直超净工作台(SW-CJ-IFD):苏州安泰空气技术有限公司;生化培养箱(BSP-250):上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;热空气消毒箱(GR-246):上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;电子天平[BSAZ201-CW(0.1 g)]:上海精密仪器仪表有限公司;自动压力蒸汽灭菌器(GR600A):上海博迅医疗生物仪器股份有限公司。

1.4 病原菌制备

菌饼准备:将辣椒疫霉菌株接种在 PDA 培养基上,置 25℃ 条件下培养,待菌落长至培养基的 2/3,使用直径 0.8 cm 的打孔器打取菌落边缘长势一致的菌饼备用。孢子悬浮液的制备:将试管保存的辣椒疫霉接种在 PDA 培养基上,并置于生化培养箱中 25℃ 黑暗条件下培养 3 d,光照条件下培养 7 d,待到产生孢子囊后,用无菌水洗刷菌丝并收集起来,然后用双层尼龙布过滤,将收集到的菌液置于 4℃ 冰箱中预冷 30 min,促使孢子囊释放游动孢子,取出预冷的菌液,转入 25℃ 生化培养箱静置 30 min,然后在显

显微镜(400×)下用血球计数板计算游动孢子的数量,用无菌水稀释至含有游动孢子浓度为 10^6 个/mL。

1.5 室内生物活性测定

供试元素药品:硼(硼砂)、钙(氯化钙)、镁(硫酸镁)、铁(柠檬酸铁)、硅(硅酸钾)等均为分析纯(AR),利用二次稀释法,待PDA培养基温度在45℃左右时,分别取1 mL不同矿质元素加入到已灭菌的29 mL的PDA培养基中,稀释到指定浓度(表1),轻微振荡摇匀混合,倒平板,静置待培养基凝固,然后取直径为0.8 cm的生长情况相同的辣椒疫霉菌饼倒置于培养皿中央,全程操作均在超净工作台里完成。每个处理设3个重复,在25℃生化培养箱中培养,7 d后采用十字交叉法测量菌落直径,以平均值代表菌落直径,通过Excel统计分析,计算出各浓度抑制率,然后置于生化培养箱光照环境下继续培养,7 d后用5 mL无菌水洗刷一个平板上的孢子囊,然后用移液枪吸取1 mL菌悬液置于显微镜(100×)下观察3个视野里的孢子囊数。

表1 矿质元素处理浓度¹⁾

矿质元素 Mineral element	系列浓度/mg·L ⁻¹ Series of concentrations					
钙 Calcium	200	300	450	700	1 050	1 200
铁 Ferrum	14	28	56	112	224	250
硼 Boron	20	30	60	90	120	150
镁 Magnesium	60	120	240	360	480	800
硅 Silicon	5	10	20	40	80	160

1) 最低浓度为植物在土壤中元素的缺乏临界值,最高浓度为毒害临界值^[9]。
The lowest concentration is the critical value for the lack of elements in the soil, and the highest concentration is the toxic threshold.

1.6 不同铁化合物对辣椒疫霉抑制试验

利用二次稀释法,配制不同浓度梯度铁化合物,待PDA培养基温度在45℃左右取1 mL不同浓度铁化合物加入到已灭菌的29 mL的PDA培养基中,稀释到指定浓度(表2),轻微振荡摇匀混合,倒平板,静置待培养基凝固,然后取直径为0.8 cm的生长情况相同的辣椒疫霉菌饼倒置于培养皿中央,全程操作均在超净工作台里完成。上述平板置于25℃生物培养箱中黑暗条件下培养,5 d后观察菌丝生长情况,并用十字交叉法测量菌落直径,计算抑制率。

表2 不同铁化合物对辣椒疫霉抑制浓度处理

Table 2 Treatment concentrations of different iron compounds

处理 Treatment	系列浓度/mg·L ⁻¹ Series of concentration							
柠檬酸铁 Ferric citrate	7	14	28	56	112	224	250	300
硫酸铁 Ferric sulfate	7	14	28	56	112	224	250	300
螯合铁 Chelated iron	7	14	28	56	112	224	250	300
硫酸亚铁 Ferrous sulfate	7	14	28	56	112	224	250	300
多菌灵 carbendazim	100	—	—	—	—	—	—	—
无菌水 Sterile water	—	—	—	—	—	—	—	—

1.7 硫酸亚铁对辣椒疫病防治效果

在PDA培养基中活化辣椒疫霉,25℃黑暗条件下培养3 d,光照条件下培养7 d,随后刷取孢子囊,放入4℃冰箱30 min后转入25℃生化培养箱静置30 min,在显微镜下利用血球计数板计数,将游动孢子数浓度调节为 10^6 个/mL备用。用最适浓度水平的最佳铁化合物进行灌根,设置4个处理:1 000亿cfu/g枯草芽孢杆菌水分散粒剂500倍(25 mL)、1 000亿cfu/g枯草芽孢杆菌水分散粒剂500倍+硫酸亚铁224 mg/L(25 mL)、硫酸亚铁224 mg/L(25 mL)、无菌水(25 mL)。采用灌根方式施药,枯草芽孢杆菌+硫酸亚铁处理按各自浓度1:1混配,即配即用。

施药方法:辣椒生长至5片真叶期开始进行第1次施药,施药量25 mL/株,以后每隔3 d施药1次,共施药3次,第3次施药后24 h灌根接种辣椒疫霉菌10 mL/株。每个处理20株,4次重复。接菌后第9天调查病情指数,同时取各个处理辣椒叶片,用于检测各个处理超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量。

1.8 病情调查及酶活测定

辣椒疫病调查分级^[12]:0级:无病;1级:幼苗根茎部轻微水渍状变褐,叶片不萎蔫或可恢复性萎蔫;2级:幼苗根茎部变水渍状褐色,发病部位长度1~2 cm,叶片不可恢复性萎蔫,下部叶片偶有脱落;3级:幼苗根茎部变水渍状褐色,发病部位长度超过2 cm,叶片明显萎蔫或落叶明显;4级:幼苗根茎部变水渍状褐色,并且茎秆有缢缩现象,除生长点外全部落叶或植株萎蔫;5级:植株枯死。

防御酶系、丙二醛的测定:在室内辣椒疫病发病初期(接种处理后9 d),随机取3盆辣椒苗,取其从上往下数第3片真叶作为待测鲜样品,将其洗净后用于过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)活

性和丙二醛(MDA)含量的测定。参考文献[13],CAT 采用紫外吸收法、SOD 采用 NBT 光还原法、MDA 采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法。

1.9 数据处理与分析

采用 Excel 2003 对试验数据进行基本处理,计算抑制率、发病率和病情指数。采用 DPS 软件进行方差分析(显著性差异水平 $P<0.05$)。

菌落抑制率 =

$$\frac{\text{对照菌落平均直径} - \text{处理菌落平均直径}}{\text{对照菌落平均直径}} \times 100\%;$$

发病率 =

$$\frac{\text{发病株数}}{\text{调查总株数}} \times 100\%;$$

病情指数 =

$$\frac{\sum (\text{各级病株数} \times \text{各病级值})}{\text{调查总株数} \times \text{最高级值}} \times 100。$$

2 结果与分析

2.1 矿质元素对辣椒疫霉菌丝的抑制率

矿质元素钙、铁、硼、镁、硅对辣椒疫霉菌丝在 PDA 培养基上的生长抑制作用差异较大(如表 3 所示)。钙对辣椒疫霉菌丝生长的抑制作用随着钙浓度的增大而增强,但总体抑制效果不明显。钙浓度为 1 200 mg/L 时对辣椒疫霉生长量的抑制率仅为 14.31%。铁对辣椒疫霉菌丝生长的抑制作用随着浓度的增大而增强,当铁浓度为 250 mg/L 时对辣椒疫霉生长量的抑制率为 60.31%。硼对辣椒疫霉的抑制作用不明显,硼的浓度为 20~150 mg/L 时,其对辣椒疫霉菌丝生长的抑制率无显著差异;镁对辣椒疫霉的抑制作用不明显,镁的浓度为 60~

800 mg/L 时,其对辣椒疫霉菌丝生长的抑制率变化不明显。硅对辣椒疫霉菌菌丝生长的抑制率也随浓度的增大而增大。硅浓度在 160 mg/L 时,对辣椒疫霉的抑制作用较好,抑制率达 25.95%。

2.2 矿质元素对辣椒疫霉菌孢子囊的抑制率

矿质元素钙、铁、硼、镁、硅对辣椒疫霉在 PDA 培养基上的孢子囊的产生有显著的抑制作用(表 3)。钙对辣椒疫霉孢子囊产生的抑制作用随着钙浓度的增大而增强,抑制效果明显。当钙浓度达到 450 mg/L 时明显抑制孢子囊的产生,孢子囊平均数为 24.3 个/mL,CK 平均数为 43.3 个/mL,当浓度达到 1 200 mg/L 时,不产生孢子囊。铁对辣椒疫霉孢子囊产生的抑制作用随着铁浓度的增大而增强,抑制效果明显。当铁浓度达到 56 mg/L 时明显抑制孢子囊的产生,孢子囊平均数为 19.3 个/mL,当浓度达到 250 mg/L 时,不产生孢子囊。硼对辣椒疫霉孢子囊产生的抑制作用随着硼浓度的增大而增强,抑制效果明显。低浓度硼(20、30 mg/L)促进孢子囊的产生,但当硼浓度达到 60 mg/L 时明显抑制孢子囊的产生,孢子囊平均数为 14.3 个/mL,当浓度达到 150 mg/L 时,孢子囊平均数仅为 4.0 个/mL。硅对辣椒疫霉孢子囊的产生抑制作用随着硅浓度的增大而增强,抑制效果明显。硅浓度为 5 mg/L 时,孢子囊平均数为 40.3 个/mL,低于 CK,硅浓度为 20 mg/L 时,孢子囊平均数为 9.3 个/mL,硅浓度达到 160 mg/L 时不产生孢子囊。

表 3 矿质元素对辣椒疫霉菌丝及孢子囊的抑制情况¹⁾

Table 3 Inhibition of different mineral elements on myceli and sporangia of <i>Phytophthora capsici</i>				
矿质元素 Mineral element	浓度/mg · L ⁻¹ Concentration	菌落直径/cm Diameter of colonies	菌丝抑制率/% Inhibition rate of mycelia	孢子囊数量/个 · mL ⁻¹ Number of sporangia
钙 Calcium	200	8.18±0.27	(6.29±1.84)f	(48.3±2.26)b
	300	7.73±0.51	(11.47±6.87)cdef	(46.0±2.67)b
	450	7.93±0.06	(9.16±0.05)cdef	(24.3±3.29)cde
	700	7.73±0.29	(11.44±2.92)cdef	(17.3±3.73)efg
	1 050	7.58±0.13	(13.17±1.02)cde	(2.3±3.32)gh
	1 200	7.48±0.10	(14.31±0.99)c	(0.0±0.00)h
铁 Ferrum	14	8.10±0.32	(7.63±0.81)def	(78.0±5.06)a
	28	8.13±0.19	(8.20±1.31)def	(44.7±5.06)b
	56	8.13±0.32	(8.96±1.98)cdef	(19.3±1.17)efg
	112	8.08±0.19	(13.55±1.34)cd	(16.7±1.18)efgh
	224	6.28±0.29	(28.06±2.24)b	(2.7±1.25)gh
	250	3.47±0.35	(60.31±4.57)a	(0.0±0.00)h

续表 3 Table 3(Continued)

处理 Treatment	浓度 mg · L ⁻¹ Concentration	菌落直径/cm Diameter of colonies	菌丝抑制率/% Inhibition rate of mycelia	孢子囊数量/个 · mL ⁻¹ Number of sporangia
硼 Boron	20	8.05±0.06	(7.82±0.66)def	(90.3±6.89)a
	30	8.03±0.19	(8.01±0.54)def	(52.3±11.49)b
	60	8.10±0.23	(7.25±0.66)ef	(14.3±5.57)efgh
	90	8.03±0.12	(8.01±1.09)def	(20.7±5.88)def
	120	7.97±0.09	(8.78±0.51)cdef	(15.3±2.15)efgh
	150	7.83±0.25	(10.30±0.73)cdef	(4.0±1.07)fgh
镁 Magnesium	60	8.10±0.33	(7.25±0.56)ef	(41.0±1.20)bc
	120	8.10±0.13	(7.25±0.53)ef	(45.0±3.29)b
	240	8.10±0.22	(7.24±1.01)def	(42.7±1.25)b
	360	7.83±0.18	(10.30±2.13)cdef	(47.7±0.62)b
	480	7.63±0.16	(12.60±0.62)cde	(52.0±2.15)b
	800	7.95±0.32	(8.97±0.61)cdef	(78.0±4.49)b
硅 Silicon	5	8.10±0.20	(8.20±0.87)def	(40.3±1.07)bc
	10	8.10±0.27	(11.46±3.33)cdef	(37.3±5.35)bcd
	20	8.10±0.17	(7.25±0.66)ef	(9.3±0.59)efgh
	40	8.10±0.12	(7.25±0.65)ef	(8.3±1.65)efgh
	80	7.90±0.20	(9.54±0.65)cdef	(8.0±2.16)efgh
	160	6.47±0.24	(25.95±1.25)b	(0.0±0.00)h
CK	—	8.73±0.11		(43.3±3.03)b

1) 同列数据后不同小写字母表示经 Tukey 法检验,在 0.05 水平上差异显著。下同。
Values followed by different lowercase letters in a column indicate significant difference at the 0.05 level by Tukey test among treatments. The same below.

2.3 不同铁化合物对辣椒疫霉的抑制效果

试验结果表明,不同铁化合物(螯合铁、柠檬酸铁、硫酸铁和硫酸亚铁)对辣椒疫霉的抑制效果有差异。接菌后第 5 天,在 224 mg/L 浓度下螯合铁、柠檬酸铁、硫酸铁、硫酸亚铁和多菌灵、无菌水处理的菌落平均直径分别为(6.85±0.19)、(3.85±0.38)、(1.44±0.14)、(0.67±0.15)cm 和(6.94±0.25)、(7.08±0.22)cm;抑制率分别为(3.27±0.86)%、

(45.68±3.98)%、(79.70±1.28)%、(90.52±1.94)%、(2.00±0.80)%。在浓度 224 mg/L 下,硫酸亚铁处理的抑制率最高,且与螯合铁、柠檬酸铁处理的抑制率达显著差异。随着硫酸亚铁浓度增加,抑制率也相应提高,但在 224、250 mg/L 和 300 mg/L 浓度下,三者抑制率差异不显著,但与其他处理达显著差异。综合不同浓度抑制率比较,硫酸亚铁对辣椒疫霉的抑制效果最佳(表 4,图 1)。

表 4 不同铁化合物对辣椒疫霉的抑制效果

Table 4 Inhibition effects of different iron compounds on *Phytophthora capsici*

处理 Treatment	系列浓度/mg · L ⁻¹ Series of concentration	菌落直径/cm Diameter of colonies	抑制率/% Inhibition rate of mycelia
螯合铁 Chelated iron	7	(7.03±0.18)a	(0.70±0.26)g
	14	(7.02±0.28)a	(0.82±0.80)g
	28	(6.96±0.18)a	(1.60±0.07)g
	56	(6.87±0.15)abc	(2.91±0.90)g
	112	(6.86±0.24)abcd	(3.13±0.64)g
	224	(6.85±0.19)ab	(3.27±0.86)g
	250	(6.83±0.17)abcd	(3.46±0.92)g
	300	(6.67±0.07)abcd	(5.78±1.46)g
柠檬酸铁 Ferric citrate	7	(6.91±0.28)ab	(2.35±1.39)g
	14	(6.79±0.08)abcd	(4.09±0.98)g
	28	(6.89±0.08)ab	(2.65±0.09)g
	56	(6.74±0.26)abcd	(4.76±2.81)g
	112	(6.36±0.1)bcde	(10.12±0.88)fg
	224	(3.85±0.38)fg	(45.68±3.98)de
	250	(4.11±0.09)f	(41.91±2.05)e
	300	(1.43±0.38)h	(79.86±4.66)c

续表 4 Table 4(Continued)

处理 Treatment	系列浓度/mg · L ⁻¹ Series of concentration	菌落直径/cm Diameter of colonies	抑制率/% Inhibition rate of mycelia
硫酸铁 Ferric sulfate	7	(6.87±0.23)ab	(2.87±1.55)g
	14	(6.97±0.18)a	(1.50±0.33)g
	28	(6.92±0.14)abcd	(1.99±0.25)g
	56	(5.77±0.52)e	(18.22±2.95)f
	112	(6.29±0.84)cde	(11.18±1.98)fg
	224	(1.44±0.14)h	(79.70±1.28)bc
	250	(0.99±0.15)hi	(86.04±7.09)abc
	300	(0.59±0.08)ij	(91.59±0.68)ab
硫酸亚铁 Ferrous sulfate	7	(6.92±0.14)ab	(1.95±0.46)g
	14	(6.99±0.08)a	(1.24±0.39)g
	28	(6.85±0.21)abcd	(2.46±0.89)g
	56	(6.18±0.15)de	(12.43±2.14)fg
	112	(3.26±0.10)g	(53.90±1.26)d
	224	(0.67±0.15)ij	(90.52±1.94)ab
	250	(0.61±0.58)ij	(91.32±13.16)a
	300	(0.11±0.17)j	(98.46±2.72)a
多菌灵 carbendazim	100	(6.94±0.25)abcd	(2.00±0.80)g
无菌水 Sterile water	—	(7.08±0.22)a	—

2.4 硫酸亚铁协同枯草芽孢杆菌对辣椒疫病的防治效果

在接种后第 9 天进行发病情况调查(表 5),硫酸亚铁+枯草芽孢杆菌处理的辣椒植株发病率为 50%,病情指数为 16.67;枯草芽孢杆菌处理发病率为 70%,病情指数为 30.44;硫酸亚铁处理发病率为 75%,病情指数为 32.89;对照辣椒植株发病率为 100%,病情指数为 72.22。试验结果表明,硫酸亚铁联合枯草芽孢杆菌对辣椒疫病的防控具有增效作用。

为 70%,病情指数为 30.44;硫酸亚铁处理发病率为 75%,病情指数为 32.89;对照辣椒植株发病率为 100%,病情指数为 72.22。试验结果表明,硫酸亚铁联合枯草芽孢杆菌对辣椒疫病的防控具有增效作用。

表 5 不同处理辣椒植株疫病发病情况

Table 5 Effects of different treatments on the occurrence of Phytophthora blight of pepper

处理 Treatment	调查株数/株 Investigated number of plants	发病株数/株 Number of diseased plants	发病率/% Disease incidence	病情指数 Disease index
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	20	14	70	30.44±1.71
枯草芽孢杆菌+硫酸亚铁 <i>Bacillus subtilis</i> +ferrous sulfate	20	10	50	16.67±1.31
硫酸亚铁 Ferrous sulfate	20	15	75	32.89±2.84
无菌水 Sterile water	20	20	100	72.22±1.12

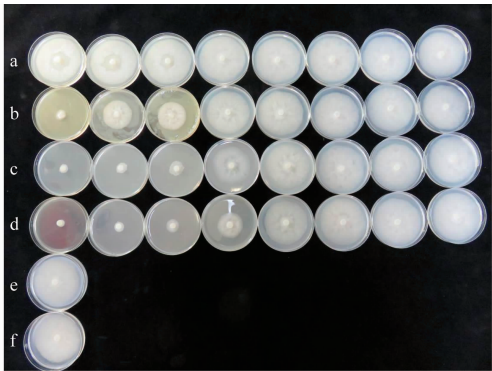
2.5 硫酸亚铁协同枯草芽孢杆菌对辣椒体内酶活性的影响

单独施硫酸亚铁或枯草芽孢杆菌及其混施处理后辣椒体内 CAT 活性均有所提高。硫酸亚铁混配枯草芽孢杆菌处理辣椒 CAT 的活性最高,是对照的 3.03 倍,与其他处理差异显著,但与枯草芽孢杆菌处理差异不显著;其次是枯草芽孢杆菌,是对照的 2.29 倍,与硫酸亚铁处理差异不显著;但与对照差异显著;硫酸亚铁处理与对照差异显著(图 2)。

单独施硫酸亚铁、枯草芽孢杆菌及其混施可促进感染疫病辣椒体内 SOD 的表达。其中硫酸亚铁

混配枯草芽孢杆菌处理 SOD 活性最高,是对照的 4.92 倍,与其他处理差异显著;硫酸亚铁和枯草芽孢杆菌处理,两者间无显著差异,但两者与对照差异均显著,分别为对照的 3.96、4.24 倍(图 2)。

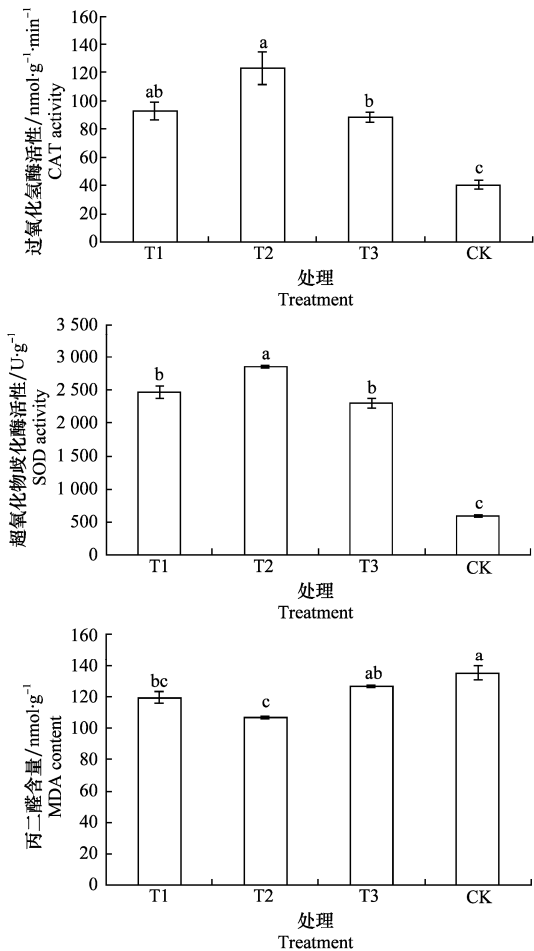
施硫酸亚铁、枯草芽孢杆菌及其混施处理后辣椒体内 MDA 含量均低于对照处理,说明灌根处理的辣椒生理状态均优于对照,使其 MDA 含量降低;硫酸亚铁混配枯草芽孢杆菌处理 MDA 含量最低,比对照处理降低 0.22 倍;硫酸亚铁和枯草芽孢杆菌处理分别比对照低 0.07 和 0.12 倍,两者间差异不显著(图 2)。



a: 螯合铁处理; b: 柠檬酸铁处理; c: 硫酸铁处理; d: 硫酸亚铁处理; e: 无菌水处理; f: 多菌灵处理
a: Chelated iron treatment; b: Ferric citrate treatment; c: Ferric sulfate treatment; d: Ferrous sulfate treatment; e: Sterile water treatment; f: Carbendazim treatment

图 1 不同铁化合物处理对辣椒疫霉的抑制效果

Fig. 1 Inhibition effects of different iron compound treatments on *Phytophthora capsici*



T1: 施枯草芽孢杆菌处理; T2: 施硫酸亚铁+枯草芽孢杆菌处理; T3: 施硫酸亚铁处理; CK: 无菌水处理; 柱上不同字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)
T1: Treatment with *Bacillus subtilis*; T2: Treatment with ferrous sulfate + *Bacillus subtilis*; T3: Treatment with ferrous sulfate; CK: Sterile water treatment. Different letters over the bars indicate significant difference at 0.05 level

图 2 不同处理对辣椒 CAT、SOD 和 MDA 活性的影响

Fig. 2 Effects of different treatments on the activities of CAT, SOD and MDA enzymes in infected pepper plants

3 结论与讨论

辣椒是我国重要的蔬菜作物,由于长期连作,土壤养分失衡,导致辣椒疫病发生呈加重趋势,已成为我国辣椒上最为重要的病害之一。对我国菜地土壤研究发现,水田改菜地后土壤 pH、有机质含量、C/N 比及无定形铁含量均显著降低^[14-15]。加上土壤酸化使用石灰改良,大量使用石灰,可造成土壤元素流失^[1],进一步降低了土壤中可溶性铁的含量,使铁由易吸收的二价铁转为难吸收的三价铁。铁是植物生长发育所必需的矿质营养元素,作为酶、激素、维生素和核酸的组成部分,维持着生命的正常代谢过程,是生命的核心。对植物体本身来讲,酶活性的高低与植株对养分的吸收、干物质的积累、产量的提高和品质的改善都息息相关^[16]。近年来国家倡导减少化学农药使用,本研究初步筛选出硫酸亚铁对辣椒疫霉有较好的抑制作用,用其防治植物病害具有无毒无害的优点。

本试验系统研究了钙、镁、硼、铁、硅 5 种元素对辣椒疫霉菌丝和孢子囊的抑制效果,发现铁对辣椒疫霉菌丝生长和孢子囊的抑制作用随着浓度的增大而增强。根据初筛结果,选择螯合铁、硫酸铁、柠檬酸铁和硫酸亚铁 4 种不同铁化合物对辣椒疫霉菌丝进行抑制试验,发现硫酸亚铁抑制效果最显著,在 224 mg/L 浓度下硫酸亚铁对辣椒疫霉菌丝生长抑制率达 90.52%,抑制效果优于其他铁化合物。相关研究表明,铁元素与一些植物病害具有相关性关系,例如小麦锈病、香蕉炭疽病和花生枯萎病等^[17-19]都会受到铁的抑制作用。Dimarcos 等^[20]通过 Ferrozine 试验发现铁能减少真菌发生,在对成熟期叶的分析时发现病害症状减轻的叶中铁含量高于症状没有减轻的叶。另有研究表明通过荧光假单胞菌含铁细胞对铁的竞争可抑制萝卜镰刀菌^[21]。铁可以减轻多种病害的发生,但是关于铁对辣椒疫病的防控国内外却少有研究。

在盆栽试验中,硫酸亚铁协同枯草芽孢杆菌可以减轻辣椒疫病的发病程度,具有增加防效作用。在生理指标方面表现为显著提高了感病辣椒体内 SOD、CAT 活性和降低 MDA 含量,而这些 SOD、CAT 等防御酶在植物抵抗病原物入侵过程中扮演着重要角色,同时也反映了植物本身的生长状态^[22-23],因此本研究中硫酸亚铁及其混配枯草芽孢

杆菌能增强辣椒对辣椒疫霉菌侵染的抵抗。研究表明,铁通常通过影响植物的生长模式、植物形态和解剖结构的改变,特别是化学组成的变化,来提高或降低植物对病原体的耐性或抗性^[24],铁是生理代谢中一些氧化酶以及光合作用系统氧还蛋白的组成成分,同时能激活合成抗菌物质过程中酶的活性,提高植物体内抗菌物质含量,增加作物的抗病性^[17],例如铁缺乏导致番茄植株叶绿素含量降低致使幼叶发生萎黄病,同时过氧化氢酶活性降低,使作物抗病性降低^[25];Nautiyal 等^[26]通过喷施高浓度铁肥发现菠菜叶中叶绿素含量、过氧化氢酶活性很快恢复,多酚氧化酶活性降低,作物抗病性相应提高;另外铁还是产生抗真菌外细胞酶,如镰刀尖孢菌产生的果胶甲酯酶、花生叶斑病菌产生的外源葡聚糖酶的基础组成,缺铁时这些酶的合成受阻^[17],导致植物抗病性降低。本试验仅从对辣椒疫霉菌抑制、控病和防御酶活方面进行了初步的探索,但关于硫酸亚铁影响辣椒疫霉菌的分子作用机理还有待进一步研究,后期完善该研究结果可为解释铁调控土壤微生态、增强抗菌活性效应提供理论依据,为营养调控辣椒疫病提供技术支持。

参考文献

- [1] 陈卫平, 杨阳, 谢天, 等. 中国农田土壤重金属污染防治挑战与对策[J]. 土壤学报, 2018, 55(2): 1-11.
- [2] 刘青, 李升, 梁才康, 等. 贵州地区木霉菌分离鉴定及对辣椒疫霉的拮抗作用[J]. 微生物学通报, 2019, 46(4): 741-751.
- [3] 周倩. 连作对线辣椒矿质元素吸收的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- [4] 张政兵. 辣椒疫霉菌生物学特性及辣椒疫病的化学防治研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2004.
- [5] 伍烨. 矿质元素(铜、铁、钙、锌)对黄瓜白粉病发生及其生理生化特性的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2008.
- [6] 田永强, 黄雨萍, 张正. 矿质元素缺失或不平衡与植物病害发生关系研究进展[J]. 中国农学通报, 2016, 32(21): 174-176.
- [7] COOLONG T, MISHRA S, BARICKMAN C, et al. Impact of supplemental calcium chloride on yield, quality, nutrient status, and postharvest attributes of tomato [J]. Journal of Plant Nutrition, 2014, 37(14): 2316-2330.
- [8] 陈玉婷, 林威鹏, 范雪滢, 等. 硅介导番茄青枯病抗性的土壤定量蛋白质组学研究[J]. 土壤学报, 2015, 50(1): 162-173.
- [9] 王芳, 杨笑笑, 李振轮, 等. 矿质元素硼钙镁铁对番茄青枯菌生长及致病力的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(12): 77-80.

- [10] 徐阳, 邓全恩, 吴开云, 等. 矿质元素与“恭城水柿”顶腐病发生研究[J]. 四川农业大学学报, 2018, 36(3): 365-371.
- [11] 冯雷, 徐万里, 薛宏宏, 等. 矿质元素对核桃腐烂病害程度的影响[J]. 经济林研究, 2017, 35(4): 49-56.
- [12] 何烈干, 周银生, 陈学军, 等. 辣椒种质资源抗疫病性及发病速度分析[J]. 江西农业大学学报, 2017, 39(4): 691-698.
- [13] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [14] YANG Yang, WANG Meie, CHEN Weiping, et al. Cadmium accumulation risk in vegetables and rice in southern China: Insights from solid-solution partitioning and plant uptake factor [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(27): 5463-5469.
- [15] ZHANG Qiu, LI Zhongwu, HUANG Bin, et al. Effect of land use pattern change from paddy soil to vegetable soil on the adsorption-desorption of cadmium by soil aggregates [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(3): 2734-2743.
- [16] 付连刚. 叶菜类蔬菜的富铁机理及其影响因素研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2005.
- [17] 张福锁. 环境胁迫与植物营养[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993: 336-352.
- [18] GRAHAM R D. Effects of nutrient stress on susceptibility of plants to disease with particular reference to the trace elements [J]. Advances in Botanical Research, 1983, 10: 221-276.
- [19] GRAHAM R D, WEBB M J. Micronutrient and disease resistance and tolerance in plants [M]//Soil Science Society of America, Micronutrient in Agriculture, 1991: 329-370.
- [20] DIMARCO S, OSTI F, MAZZULLO A, et al. How iron could be involved in esca fungi development [J]. Phytopathologia Mediterranea (Italy), 2001, 40(S1): 449-452.
- [21] LEEMAN M, DEN-OUDE F M, VAN-PELT J A, et al. Iron availability affects induction of systemic resistance to fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens* [J]. Phytopathology, 1996, 86(2): 149-155.
- [22] 刘菲. 核黄素激活烟草方位反应和诱导对两种土传病害的抗病性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.
- [23] 丁传雨, 乔焕英, 沈其荣, 等. 生物有机肥对茄子青枯病的防治及其机理探讨[J]. 中国农业科学, 2012, 45(2): 239-245.
- [24] HMARSHNER. 高等植物的矿质营养学[M]. 李春俭, 等译. 北京: 中国农业大学出版社, 2001.
- [25] BISHT S S, NAUTIYAL B D, SHARMA C P, et al. Biochemical changes under iron deficiency and recovery in tomato [J]. Indian Journal of Plant Physiology, 2002, 7(2): 183-186.
- [26] NAUTIYAL N, CHATTERJEE C. Iron application ameliorates copper toxicity effects in Spinach [J]. Indian Journal of Plant Physiology, 2002, 7(2): 198-200.

(责任编辑: 田 喆)