

枯草芽孢杆菌 BSD-2 诱导黄瓜抗灰霉病的作用研究

陈艳光, 尹淑丽, 刘洪伟, 张根伟, 程辉彩, 张丽萍

(河北省科学院 生物研究所, 河北 石家庄 050081)

摘 要:以枯草芽孢杆菌 BSD-2 为供试菌, 黄瓜品种“津春 4 号”为试材, 采用生理生化方法, 研究了 BSD-2 发酵液、抗菌肽及芽孢稀释溶液对叶片过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响; 采用电泳法测定 POD 同工酶和叶片胞间隙蛋白质的变化。结果表明: 处理后的酶活均在第 5 天达到高峰, 发酵液处理对酶活性的提高作用明显。POD 同工酶的变化不仅表现在同种同工酶表达量的改变, 同工酶种类也相应地增加, 叶片胞间隙蛋白电泳中出现大小约为 27 kDa 的新增蛋白条带, 并且发酵液处理第 11 天时新增蛋白出现表达量的积累。表明枯草芽孢杆菌 BSD-2 及其抗菌物质可以通过提高防御酶活性, 促进 POD 同工酶和胞间隙相关蛋白质的表达, 从而诱导黄瓜产生对灰霉病的抗性作用。

关键词:枯草芽孢杆菌 BSD-2; 灰霉病; 防御酶

中图分类号:S 476 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)12-0119-05

目前大多数的植物病害主要采用化学防治的方法, 但是随着人们环保意识的提高和对食品安全的关注, 生物防治因其具有环境友好、安全、高效等特点已成为当前植物病害防治的一种重要手段^[1]。利用有益微生物对植物病害进行生物防治已有很多报道, 其中枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)对黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)^[2]、黄瓜灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)^[3]、苹果轮纹病菌(*Phylospora piricola*)^[4]、棉花立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)^[5]、魔芋软腐病菌(*Erwinia carotovora*)^[6]等多种病原菌有明显的拮抗作用, 是生物防治中一种理想的生防菌。

诱导植物抗病性是生物防治的重要组成部分, 指的是在一些生物或非生物因子作用后, 植物体通过自身防御酶的合成和相关蛋白表达的变化而对病原菌产生的抗性现象。诱导作用能够促进过氧化物酶(peroxidase, POD)、多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)、苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等防御酶活性的提

高^[7]。POD 同工酶作为催化相同反应但是结构具有差异的一类过氧化物酶, 参与氧化自由基的清除, 种类的增多有利于酶联合作用的加强, 胞间隙作为植物抵抗外界侵害的重要防线, 能够在受到病原菌侵染时最先做出反应。因此, 胞间隙中蛋白的积累能够作为植物产生抗病性的重要标志。

黄瓜灰霉病菌是灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*), 主要依靠风雨、气流等方式进行传播, 可以造成黄瓜、番茄、菠菜、豌豆、蚕豆等 200 多种植物产生病害, 从而给农业带来巨大损失^[8-9]。当前研究主要集中在生防菌对植物病害的防治上, 但对生防菌及其抗菌物质诱导作用机制的综合研究报道较少。枯草芽孢杆菌 BSD-2 为前期筛选获得的 1 株生防菌, 对蔬菜灰霉病、叶霉病、黄枯萎病等多种植物病原真菌及念珠菌、金黄色葡萄球菌等有较强的抑制作用, 其分泌的分子量为 3.5 kDa 的代谢产物(抗菌肽)具有抑菌谱广、热稳定性、酸碱稳定性、光稳定性及储藏稳定性好等特点^[10]。盆栽试验已经证明 BSD-2 及其抗菌肽对黄瓜灰霉病有较好的防病效果。现利用枯草芽孢杆菌 BSD-2 及其抗菌物质处理黄瓜叶片, 分析叶片防御酶、同工酶以及叶片胞间隙液的变化, 以期探讨 BSD-2 对黄瓜植株的诱导抗病作用机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试灰霉病菌及枯草芽孢杆菌 BSD-2 为课题组保存; 供试黄瓜品种“津春 4 号”由天津科润黄瓜所提供。

第一作者简介:陈艳光(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为应用微生物。E-mail:lhwei1987@126.com

责任作者:张丽萍(1969-), 女, 硕士, 研究员, 研究方向为农业微生物。E-mail:lizzle-69@163.com

基金项目:河北省重点基础研究资助项目(13966503D); 河北省科学院重点资助项目(15302); 河北省科学院高层次人才资助项目(20150503LR62-11)。

收稿日期:2016-02-14

1.2 试验方法

试验共设 6 个处理,分别为清水处理(CK)、喷施发酵液后接种灰霉病菌(F)、喷施抗菌肽溶液后接种灰霉病菌(K)、喷施芽孢稀释溶液后接种灰霉病菌(Y)、接种灰霉病菌(H)、喷施 0.1% 的水杨酸溶液后接种灰霉病菌(S)。处理幼苗的第 1、第 2 片真叶,每个处理 60 盆,分别在接种灰霉菌继续保湿 24 h 后的 1、3、5、7、9、11 d 取处理后的第 3、4 片真叶进行各项指标的测定。

1.3 项目测定

1.3.1 相关防御酶的测定 过氧化物酶(POD)活性和多酚氧化酶(PPO)活性的测定参照仇艳肖^[11]的方法;苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性和超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定参照罗明等^[12]的方法。

1.3.2 同工酶的测定 POD 同工酶提取与电泳采用李玉红等^[13]的方法进行,分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%,进行 SDS-PAGE 电泳,上样量为 15 μL 。

1.3.3 细胞间隙蛋白质的测定 参照梁元凯^[14]的方法。将获得的黄瓜叶片用蒸馏水冲洗干净,浸入蒸馏水中真空抽气,每次 5 min,重复 3 次,至叶片呈水浸状,然后用蒸馏水冲洗 3 次,用吸水纸吸干叶片表面的水分后置于自制离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 15 min,获得叶片胞间隙液。获得的黄瓜叶片间隙液用 3 倍体积的 -20 $^{\circ}\text{C}$ 的丙酮过夜沉降,10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,收集沉淀,用 pH 6.8 的上样缓冲液溶解,煮沸离心后去上清液,进行 SDS-PAGE 电泳,分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%。

1.4 数据分析

试验数据采用 Microsoft Excel 2010 软件进行处理及制图。

2 结果与分析

2.1 BSD-2 及其抗菌物质诱导对黄瓜叶片防御酶活性的影响

2.1.1 BSD-2 及其抗菌物质诱导对黄瓜叶片 POD 活性的影响 过氧化物酶(POD)作为木质素合成的关键酶,同时是植物体内承担清除 H_2O_2 重要酶,能够增强对活性氧毒害的防御^[15]。由图 1 可知,枯草芽孢杆菌 BSD-2 及其抗菌物质处理后,叶片 POD 活性整体呈现出先上升后下降又上升的趋势。在接种第 1 天后,发酵液、抗菌素溶液、芽孢稀释溶液和对照处理的叶片 POD 活性均不断上升,第 5 天时各处理的酶活达到第 1 个高峰,其中发酵液、抗菌肽和芽孢稀释溶液处理分别是对照的 1.23、1.06、1.51 倍,第 7 天时酶活的下降有可能受到其它防御酶的协同作用的影响。芽孢稀释溶液相对于其它处理,诱导 POD 活性提高的作用显著,始终高于对照组。第 9 天后酶活性仍保持较高水平。POD 活性的变

化表明,BSD-2 及其相关物质能够影响黄瓜叶片中 POD 的表达,诱导抗病性的提高。

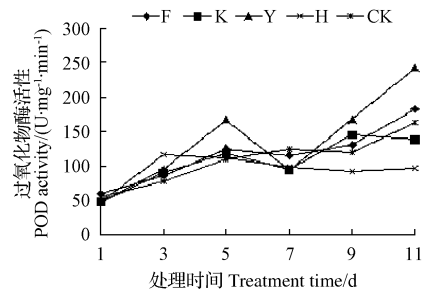


图 1 POD 活性的变化

Fig. 1 Change of POD activity

2.1.2 BSD-2 及其抗菌物质诱导对黄瓜叶片 PPO 活性的影响 多酚氧化酶(PPO)可以促进醌类等氧化酚类化合物的合成。醌类物质比酚类对病原菌的毒性高,能钝化病原菌的蛋白、酶和核酸,从而抑制病原菌的生长和扩展^[16]。由图 2 可知,接种灰霉病菌后,喷施发酵液与抗菌肽的 PPO 活性变化显著,在第 5 天迅速达到峰值,分别为 190、170 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,为对照处理的 3 倍以上。芽孢稀释溶液处理后的酶活在第 3 天时升高后下降,但始终高于对照处理。第 11 天发酵液和抗菌素处理的 PPO 活性大幅度提高,出现另 1 个高峰,而芽孢稀释溶液的酶活保持稳定,且高于对照处理。诱导过程中,发酵液处理相对于其它处理的诱导作用显著,表明 BSD-2 与其所产抗菌物质的联合作用效果,酶活变化也表明了 BSD-2 及其抗菌物质能够影响多酚氧化酶基因的表达。

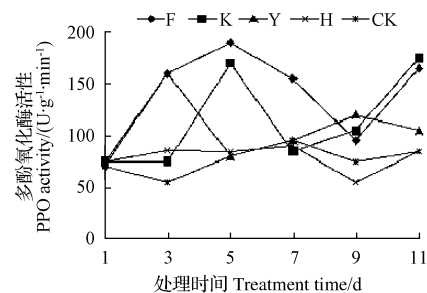


图 2 PPO 活性的变化

Fig. 2 Change of PPO activity

2.1.3 BSD-2 及其抗菌物质诱导对黄瓜叶片 PAL 活性的影响 苯丙氨酸解氨酶(PAL)是植物体生物合成途径中苯丙烷代谢途径的关键酶,与植物的抗逆境胁迫和抗病性呈正相关,在植物的生长发育和抵御病原菌侵害过程中起着重要作用^[17]。由图 3 可知,利用发酵液、抗菌肽、芽孢稀释溶液处理黄瓜叶片后,各处理的 PAL 活性第 3 天迅速上升,并在第 5 天到达了 1 个峰值,分别是对照组的 1.68、1.67、1.68 倍,发酵液的酶活提高较为显

著。PAL 活性在经过第 7 天的下降后又迅速提高,达到了另 1 个酶活高峰,分别为对照组的 1.72、1.17、1.12 倍。说明 BSD-2 及其抗菌物质均能够诱导 PAL 的提高,促进对病原菌有害物质的合成,从而提高植株的抗病性。

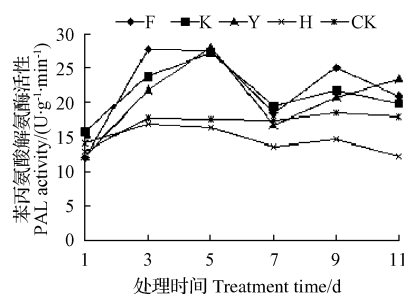


图 3 PAL 活性的变化

Fig. 3 Change of PAL activity

2.1.4 BSD-2 及其抗菌物质诱导对黄瓜叶片 SOD 活性的影响 超氧化物歧化酶(SOD)可以催化反应 $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$, H_2O_2 能够刺激其它防御酶的合成^[18]。由图 4 可知,枯草芽孢杆菌 BSD-2 及其抗菌物质提高了 SOD 活性,进而降低活性氧水平,有利于识别病原菌感染形成初始抗性。发酵液、抗菌素、芽孢稀释溶液处理后酶活的变化呈相同的趋势,即第 3 天酶活上升,发酵液处理的酶活上升较为显著。在第 5 天活性达到高峰,酶活性分别为 5.77、5.616、5.414 $U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$,是对照处理的 1.31、1.28、1.23 倍,随后始终保持稳定且较高的酶活性。对照组的酶活始终保持平稳,

且低于诱导组,表明 BSD-2 及其抗菌物质均对超氧化物歧化酶的表达具有促进作用。

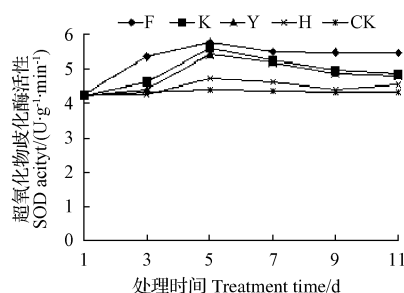
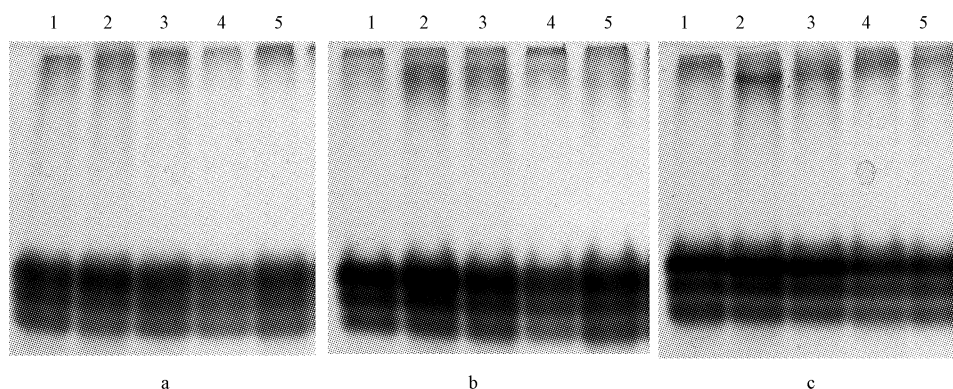


图 4 SOD 活性的变化

Fig. 4 Change of SOD activity

2.2 BSD-2 及其抗菌物质诱导对黄瓜叶片同工酶的影响

POD 同工酶是催化相同反应但是结构具有差异的一类过氧化物酶,受到遗传和外界条件的影响^[19]。如图 5 所示,第 3 天时发酵液、抗菌素以及芽孢稀释溶液与对照处理的同工酶条带没有明显差异。发酵液、抗菌肽处理 5 d 后,诱导了 POD 同工酶表达量增加以及新增同工酶条带,并且第 7 天时发酵液处理的同工酶出现积累,表明发酵液与抗菌素对 POD 同工酶具有诱导作用,其中发酵液的诱导作用更加显著,芽孢稀释溶液与对照处理的条带并无明显变化。POD 同工酶表达量的增加有利于氧化自由基的清除,种类的增多有利于酶联合作用的加强,能够作为诱导抗病作用的重要机制。



注:a、b、c 分别代表第 3 天、第 5 天、第 7 天的电泳结果;1、2、3、4、5 泳道分别表示清水、发酵液、抗菌肽溶液、芽孢稀释溶液、灰霉病菌处理。

Note:a,b,c represent the electrophoresis results of the third,fifth,seventh day, respectively;1,2,3,4 and 5 represent the water,fermentation liquor,anti-bacterial peptide,spore dilute solution and grey mould control treatment, respectively.

图 5 同工酶的电泳结果

Fig. 5 Electrophoresis result of POD isoenzymes

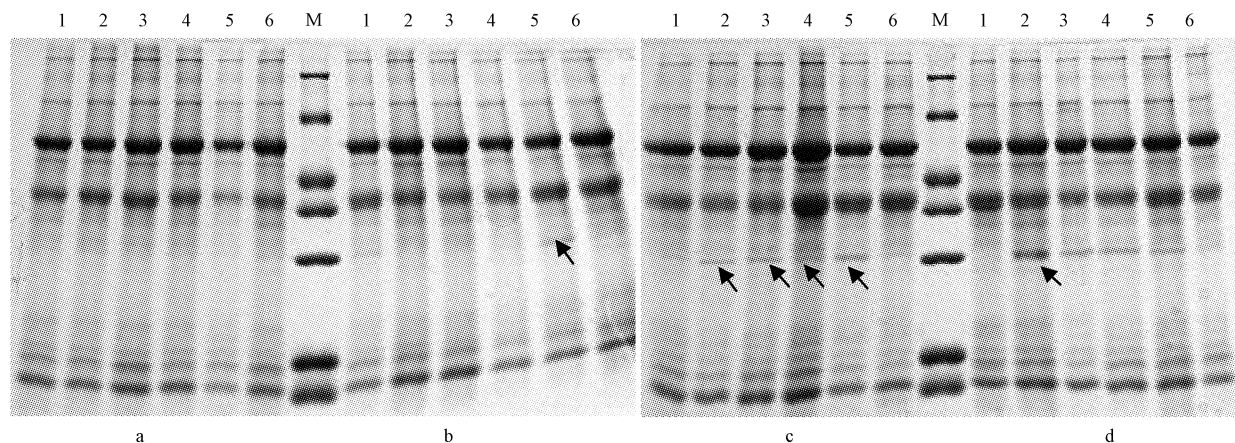
2.3 BSD-2 及其抗菌物质诱导对黄瓜叶片细胞间隙蛋白质的影响

提取发酵液、抗菌肽、芽孢稀释溶液以及 0.1% 水杨酸处理和对照处理的叶片胞间隙蛋白质,进行蛋白质的

SDS-PAGE 电泳分析。如图 6 所示,第 5 天时,各处理的蛋白质条带无明显变化;第 7 天,0.1% 水杨酸处理最先出现新增条带,蛋白大小约为 27 kDa,发酵液、抗菌肽、芽孢稀释溶液的新增条带出现有一定滞后性;第 9 天,

同样的条带出现在发酵液、抗菌素和芽孢稀释溶液处理的蛋白图谱中,芽孢处理的蛋白积累有所增加;第11天,发酵液处理的新增蛋白质有所积累,表达量增加,而对照处理后未发现明显的蛋白质变化。结果表明,枯草芽

孢杆菌 BSD-2 及其抗菌物质处理能够诱导叶片胞间隙蛋白与抗病相关蛋白质的表达,发酵液的诱导作用较为突出。



注:1和6分别代表清水对照、灰霉病菌对照;2、3、4、5分别代表发酵液、抗菌肽、芽孢稀释溶液、水杨酸处理;M代表Marker;箭头所指表示新增蛋白质条带;a、b、c、d分别代表第5天、第7天、第9天、第11天的电泳结果。

Note:1 and 6 represent the water, grey mould control group;2,3,4 and 5 represent the fermentation liquor, antibacterial peptide, spore dilute solution, salicylic acid treatment;M represents the Marker;arrows mean the new protein bands;a,b,c,d represent the electrophoresis results of the fifth, seventh, ninth, eleventh day.

图6 黄瓜叶片细胞间隙蛋白的变化

Fig. 6 Change of proteins in cucumber leaf intercellular space

3 讨论与结论

芽孢杆菌、假单胞菌、放线菌和部分真菌等生防菌能够对植物病害的病原菌产生抑制作用,并且能够通过诱导植物体中抗病相关物质的变化,提高植物的抗病能力^[20-22]。因此,研究诱导抗病的作用机制对促进生物防治具有重要的意义。植物在诱导后抗病相关防御酶的变化是抗病作用的重要机制之一,在植物抗病发挥着重要的作用。已有研究报道生防菌能够激发防御酶从而诱导植物抗性的产生。王勇等^[23]研究发现蜡质芽孢杆菌 AR156-诱导的植物细胞防卫反应,提高植物防御相关酶活使其产生对辣椒青枯病的广谱抗性。高伟等^[24]研究海洋芽孢杆菌 B-9987 活菌原液对番茄植株进行诱导,处理后植株的苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化酶(PPO)及超氧化物歧化酶(SOD)等活性显著增加,在一定程度上反映了植株抗性的增强。该研究中 BSD-2 的发酵液、抗菌肽和芽孢稀释溶液诱导处理后,叶片中的 POD、PAL、PPO、SOD 的活性明显上升,高于对照处理。陈刘军等^[25]研究发现菌株 AR156 处理提高了水稻植株 SOD、PAL、POD 和 CAT 等防御酶活性,对水稻纹枯病具有良好的防病效果。邱思鑫等^[26]的研究发现,内生芽孢杆菌 BT2 菌液处理后,植株对辣椒疫病的防效效果可达到 60% 以上,能够诱导辣椒 SOD 和 POD 活性增强,与该试验结果相似。

该研究分析了 BSD-2 发酵液与抗菌肽处理后叶片中 POD 同工酶变化,表达量发生改变的同时出现新增条带,说明 BSD-2 对 POD 同工酶具有一定的诱导作用。姜云等^[27]研究表明,喷施凯地菌素可诱导番茄植株体内 PPO 同工酶产生新的谱带,与该研究结果相似。同工酶是植物体内较为活跃的酶类,在植物中的表达受到遗传和外界环境的影响^[28],同工酶的变化被认为是寄主对病原物侵染的一种重要的保卫反应,能够提高植物的抗病能力。植物胞间隙作为抵御病原菌侵染的一道重要防线,胞间隙物质能够在诱导后首先发生变化,其中蛋白质的积累可以作为植物诱导抗病性的表现。新增蛋白质首先出现在 0.1% 的水杨酸处理,与诱导抗病性中的信号转导有一定的关系。BSD-2 及其抗菌物质处理对胞间隙蛋白的影响分析表明,图谱中新增 1 条大小约为 27 kDa 蛋白条带,蛋白表达量增加,与李玉红等^[13]的结果相似,但是诱导后蛋白的变化不同,这可能是不同诱导对蛋白的调控存在差异所致。

在前期的盆栽试验中,发酵液、抗菌肽以及芽孢稀释溶液的诱导具有很好的防病效果,该研究表明,BSD-2 的诱导抗病作用是其生物防治的一个重要机制,为 BSD-2 及其抗菌物质更好的应用于黄瓜灰霉病的防治提供了基础,但诱导防御酶和相关蛋白的内在调控以及分子机制,仍有待于进一步的系统研究。

参考文献

- [1] 刘晓光,高克祥,康振生,等.生防菌诱导植物系统抗性及其生化和细胞学机制[J].应用生态学报,2007,18(8):1861-1868.
- [2] CAO Y,ZHANG Z,LING N,et al. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots[J]. Biology and Fertility of Soils,2011,47(5):495-506.
- [3] TOURE Y,ONGENA M,JACQUES P,et al. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple[J]. Journal of Applied Microbiology,2004,96(5):1151-1160.
- [4] 赵白鸽,孔建.枯草芽孢杆菌 B-903 对苹果轮纹菌的抑菌作用及其对病害的控制效果[J].植物病理学报,1997,27(3):213-214.
- [5] 孙瑶,马平,朱宝成,等.棉花黄萎菌拮抗菌 BDT-25 的鉴定及抗菌蛋白产生条件研究[J].华北农学报,2006,21(6):119-123.
- [6] 李智洋,郑兰娟,李亚男.枯草芽孢杆菌抗菌蛋白的性质及对魔芋软腐病菌的抑制作用[J].湖北农业科学,2008,47(1):55-57.
- [7] QIU Z B,LIU X,TIAN X J,et al. Effects of CO₂ laser pretreatment on drought stress resistance in wheat[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology Biology,2007,90(1):17-25.
- [8] WILLIAMSON B,TUDZYNSKI B. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease[J]. Mol Plant Pathol,2007,8(5):561-580.
- [9] ROSSLENBROICH H J,STUEBLER D. *Botrytis cinerea* history of chemical control and novel fungicides for its management[J]. Crop Prot,2000,19(6):557-561.
- [10] 胡瑞萍,张铎,张丽萍,等.枯草芽孢杆菌 BSD-2 一种抗菌肽的分离纯化与鉴定[J].华北农学报,2011,26(6):201-206.
- [11] 仇艳肖.黄瓜灰霉病高效拮抗菌的筛选鉴定及其作用研究[D].石家庄:河北师范大学,2012.
- [12] 罗明,陈金焕,张祥林,等.内生细菌和几种诱抗剂对哈密瓜叶片防御酶活性的影响[J].中国生物防治,2007,23(3):250-254.
- [13] 李玉红,陈鹏,程智慧,等.草酸和 BTH 对黄瓜幼苗霜霉病抗性和胞间隙病程相关蛋白的诱导[J].植物病理学报,2006,36(3):238-243.
- [14] 梁元凯.霜霉菌或乙烯利处理诱导黄瓜叶片胞间隙几丁质酶累积变化的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2011.
- [15] 刘永锋,李美荣,陈志谊,等. YD4-6 和 NV11-4 菌株抑菌活性及诱导水稻防御性相关酶活性变化[J].微生物学通报,2010,37(12):1753-1759.
- [16] 刘喜存,刘红彦,倪云霞,等.不同化学诱抗剂对金银花叶片防御酶系的影响[J].植物保护,2009,35(2):75-77.
- [17] 雍道敬,王彩霞,李桂舫,等.内生放线菌 A-1 对苹果果实轮纹病的防效及防御性酶活性的影响[J].植物保护学报,2014,41(3):335-341.
- [18] 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.
- [19] 梁元凯,陈鹏,李玉红.黄瓜叶片胞间隙几丁质酶与抗霜霉菌侵染关系的研究[J].西北植物学报,2011,31(12):2473-2478.
- [20] van LOON L C,BAKKER P. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria[M]//PGPR: Biocontrol and biofertilization. Springer Netherlands,2006:39-66.
- [21] RYU C M,FARAG M A,HU C H,et al. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology,2004,134(3):1017-1026.
- [22] XU Z,SHAO J,LI B,et al. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation[J]. Applied and Environmental Microbiology,2013,79(3):808-815.
- [23] 王勇,周冬梅,郭坚华.蜡状芽孢杆菌 AR156 对辣椒的防病促生机制研究[J].植物病理学报,2014,44(2):195-203.
- [24] 高伟,田黎,张久明.海洋芽孢杆菌 B-9987 菌株对番茄灰霉病和早疫病的作用机制初探[J].植物保护,2010,36(1):55-59.
- [25] 陈刘军,俞仪阳,王超,等.蜡质芽孢杆菌 AR156 防治水稻纹枯病机理初探[J].中国生物防治通报,2014,30(1):107-112.
- [26] 邱思鑫,何红,阮红椿,等.内生芽孢杆菌 BZ 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.
- [27] 姜云,吴元华,丁艳丽,等.凯地菌素对番茄防御酶系、同工酶及病程相关蛋白诱导的研究[J].农药,2005,44(5):202-204,207.
- [28] 高丽娟,张玉星.水杨酸对梨 SOD,PPO 同工酶和 NPR1 表达的影响[J].园艺学报,2013,40(1):41-48.

Induced Resistance of Cucumber Against *Botrytis cinerea* by *Bacillus subtilis* BSD-2

CHEN Yanguang, YIN Shuli, LIU Hongwei, ZHANG Genwei, CHENG Huicai, ZHANG Liping
(Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050081)

Abstract: Taking *Bacillus subtilis* BSD-2 as test bacteria, the cucumber variety 'Jinchun No. 4' as test material, the effects of fermented liquid, antibacterial peptides, spore dilute solution of BSD-2 on the activities of POD, PPO, PAL, SOD in cucumber leaves were determined by using physiological and biochemical methods. The changes of POD isozyme and leaf intercellular space proteins were also analyzed by SDS-PAGE. The result showed that the activities of POD, PPO, PAL and SOD in cucumber leaves increased significantly after the treatments of fermented liquid, antibacterial peptide and spore dilute solution, then reached the peak on the fifth day. POD isozyme expression increased both in amount and kinds. SDS-PAGE analysis suggested that a new 27 kDa protein was expressed. All above showed that *B. subtilis* BSD-2 and its antibacterial substance could improve the defense enzymes activities, and promote the expression of the POD isozyme and intercellular space related proteins, and induce resistance of cucumber to grey mould.

Keywords: *Bacillus subtilis* BSD-2; grey mould; defense enzyme