

梨采后黑斑病拮抗菌J18的鉴定及防治效果的初步研究

宋聪¹, 宋水山¹, 关军锋²

(1. 河北省科学院生物研究所, 河北石家庄 050051)

(2. 河北省农林科学院遗传生理所, 河北石家庄 050051)

摘要: 从国内16个省市自治区的果园梨果上和土样中分离筛选到对由链格孢霉*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler引起的梨采后黑斑病有明显抑制效果的拮抗菌J18, 经生理生化及分子生物学鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。梨果在拮抗菌J18菌悬液中浸果30 s, 晾干后喷施接种病原真菌链格孢霉, 处理后梨黑斑病的发病率仅为16.57%, 且能在梨果上很好的定殖; 将其分别与其他生防因子CaCl₂, 水杨酸(Salicylic acid, SA), 壳聚糖(Chitosan)复配后, 可降低拮抗菌的使用浓度, 显著提高生物拮抗菌的拮抗效果, 其中与2% CaCl₂和1%壳聚糖复配后的拮抗菌悬液其防效分别为72.81%和77.07%, 具有很好的应用前景。

关键字: 采后病害; 拮抗菌; 生物防治

文章编号: 1673-9078(2011)1-6-10

Identification of a Bacterial Strain *Bacillus subtilis* J18 and its Resistance to Pear *Alternaria* Rot Disease

SONG Cong¹, SONG Shui-shan¹, GUAN Jun-feng²

(1. Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

(2. Institute of Genetics & physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: A bacterial strain with a high ability of inhibiting alternaria rot disease on pear was isolated from the pear fruits and orchard soil collected from different area across China with *in vitro* and *in vivo* methods. By morphological observation, physiological and biochemical characterization and the analysis of the 16S rDNA sequence, this strain was identified as *Bacillus subtilis* J18. Pretreatment with 10⁸ CFU/mL cell suspension of *B. subtilis* J18 for 30s could decrease the incidence of alternaria rot on pear to 16.6% after inoculation with pathogenic fungi *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. Supplement with salicylic acid, CaCl₂ and chitosan resulted in a significant increase in biocontrol effect of *B. subtilis* J18. It also showed that the biocontrol effect of *B. subtilis* J18 on pear alternaria rot could reach up to 72.81% and 77.07% when combined with 2% CaCl₂ and 1% chitosan, respectively. These results revealed a potential application *B. subtilis* J18 as an antagonist for controlling the fruit postharvest diseases.

Key word: postharvest diseases; antagonist; biocontrol

我国是梨种植和出口大国, 仅鸭梨产量就占世界梨总产量的16.20%, 年创汇约2亿美元, 然而采后病原微生物的侵染造成采后腐烂损失严重^[1]。其中梨黑斑病是梨采后的重要病害之一, 发生严重时可使梨采后损失达50%以上, 研究表明, 引起梨采后黑斑病的病原菌是链格孢霉 [*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler]。最早日本报道有此病害的发生, 以后在我国和韩国都曾严重爆发^[2]。近年, 法国也发现有梨黑斑病的发生与危害^[3]。

目前控制梨采后损失的主要方法仍然以化学杀菌

剂和冷藏为主。但化学杀菌剂存在着抗药性和农药残留的问题。而冷藏虽然安全, 但容易产生冷害, 且成本极高, 对我国这样缺乏冷链设备的发展中国家来说, 普遍应用冷藏来控制梨果的腐烂还难以实现。因此, 生物防治尤其是拮抗菌的利用已经成为此类病害防治的重要内容之一。

2007年, 宋聪从重庆梨果和果园土壤中分离到1株假丝酵母 (*Candida sp.*), 1株柠檬形克勒克酵母 (*Kloeckera apiculata*), 一株蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)^[4]。谢丽从河北梨果园土壤中分离到链霉菌菌株B-105, 其发酵液控制梨黑斑病的发病率为28.5%^[5]。本文报道了从四川成都梨果园土样中分离到一株对梨采后黑斑病有明显拮抗作用的细菌, 并通过生理生化

收稿日期: 2010-09-06

作者简介: 宋聪 (1982-), 女, 硕士

通讯作者: 宋水山研究员; 关军锋研究员

特征和16S rDNA 序列分析, 鉴定其为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 进一步对其及其他生防因子复配对梨采后黑斑病的防治效果进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 培养基

病原真菌培养基为 PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, 水 1000 mL。

拮抗菌分离纯化培养基为 LB 固体培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 琼脂 15 g, 水 1000 mL。

1.2 供试病原菌及其孢子悬液的制备

供试病原菌为本实验室已分离保存的梨链格孢霉 [*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler]。将病原菌在 PDA 培养基上 27 °C 培养 7~14 d, 充分孢子化, 用含 0.05% 的吐温 80 无菌水制成孢子悬液。血球计数板计配浓度为 1×10^4 个/mL。

1.3 拮抗菌的分离及其菌悬液的制备

1.3.1 果实及叶片表面微生物的分离

从河北赵县、晋县、辛集等地果园采摘大小、成熟度相近且未发病的雪花梨果实, 参考 Janisiewicz^[6] 的方法, 分别用 0.05 M 的磷酸缓冲液在摇床上 100 r/min 振摇 10 min, 弃去洗液, 再将果实、叶片分别放入磷酸缓冲液中, 在超声波清洗器中清洗 30 min, 取洗液。将洗液梯度稀释 (10、100、1000 倍), 在 27 °C PDA 培养基上培养 2~3 d, 挑取菌落, 纯化培养。

1.3.2 土壤微生物的分离

分别从全国 16 个省市自治区采集各类土壤样品, 称取 10 g 土壤, 溶解于 100 mL 无菌水, 制成悬液。将此悬液梯度稀释 (10^3 、 10^4 、 10^5 倍), 于 PDA 培养基上 27 °C 培养 2~3 d, 挑取细菌单菌落, 纯化培养。

1.3.3 拮抗菌悬液的制备

取纯化后的菌株接种在 50 mL (250 mL 三角瓶) LB 液体培养基中, 37 °C、150 r/min 摇床培养 24 h。取菌液 6000 r/min 离心 7 min, 弃上清, 无菌水反复清洗 3 次, 血球计数板计配成浓度为 1×10^8 cfu/mL 的菌悬液。

1.4 拮抗菌的筛选

1.4.1 *in vitro* 初筛

采用平板对峙法, 在均匀涂布病原菌悬液的 PDA 平板培养基上用直径 10 mm 的打孔器打孔, 孔内接种 20 μ L 菌悬液。25 °C 培养 7 d 后观察抑菌圈的大小。每个处理 6 个平板, 实验重复 3 次。

1.4.2 *in vivo* 复筛

从冷库中取贮藏 1 个月后无病无伤, 大小和成熟度相似的新鲜雪花梨果实, 2% 的 NaClO 溶液表面消毒后, 清水洗净, 自然晾干。在果实腰部用打孔器打 4 个直径为 4 mm \times 3 mm (深) 的孔, 每孔注入 20 μ L 的拮抗菌细胞悬液, 2 h 后接种病原菌孢子悬液 20 μ L。晾干后将果实装入塑料盆内, 塑料薄膜封口保持 95% 的湿度, 在室温下贮藏, 7 d 后统计果实的发病率和病斑直径。每个处理 6 个果实, 实验重复 3 次。

1.5 拮抗菌的鉴定

筛选到的细菌参照文献^[1,7,8]的方法进行生理生化鉴定。

利用细菌 16S rRNA 的高度保守性, 对筛选到的拮抗菌进行分子鉴定^[6]。引物为细菌 16S rDNA 的通用引物: Primer1: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'; Primer2: 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3', 采用细菌单菌落为模板直接进行 PCR 扩增, 反应体系为 20 μ L, 反应条件: 94 °C 5 min、94 °C 1 min、50 °C 1 min、72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 经纯化后由上海生工基因有限公司进行序列测定。

1.6 拮抗菌的拮抗效果及其与其他生防因子复配的效果

1.6.1 不同浓度拮抗菌的防治效果

从冷库中取贮藏一个月后无病无伤, 大小和成熟度相似的雪花梨果实, 分别在浓度为 1×10^6 cfu/mL, 1×10^7 cfu/mL, 1×10^8 cfu/mL 的 J18 菌悬液中浸果 30 s, 将果实装入塑料盆内, 2 h 后喷施病原菌孢子悬液 50 mL, 晾干后用塑料薄膜封口保持 95% 的湿度, 在室温下贮藏 30 d。每处理 30 个果实, 试验重复 3 次。以只喷施病原菌孢子悬液的处理为对照。统计梨果的发病率。

1.6.2 拮抗菌在果实表面定殖测定

随机挑选处理过的梨果, 取表面 2 cm \times 2 cm 大小的果皮 20 片, 放入无菌的生理盐水中, 振荡 30 min, 将振荡后的生理盐水 80 °C 水浴 20 min, 然后采用平板菌落计数法计算 7 d、10 d、15 d、20 d、25 d、30 d 每 cm² 果皮上的活芽孢数。

1.6.3 拮抗菌与其他生物防治因子复配

取无病无伤, 大小和成熟度相似的新鲜雪花梨果实, 分别在浓度为 2% CaCl₂, 2 mmol/L 水杨酸, 1% 壳聚糖溶液 (用 1% 乙酸溶液溶解) 配成浓度为 1×10^7 cfu/mL 拮抗菌悬液中浸果 30 s, 将果实装入塑料盆内, 2 h 后喷施病原菌孢子悬液 50 mL, 晾干后用塑料薄膜封口保持 95% 的湿度, 在室温下贮藏 30 d。以 1×10^8

cfu/mL 的 J18 菌悬液,以只喷施病原菌孢子悬液的处理为对照,比较各生防因子与 1×10^7 cfu/mL 拮抗菌悬液复配后,接种在梨果上 30 d 后的发病情况。每处理 30 个果实,试验重复 3 次。

病果分级标准:

0 级: 无病斑; 1 级: 病斑直径 ≤ 1.0 cm; 2 级: 病斑直径 1.1~2.0 cm; 3 级: 病斑直径 2.1~3.0 cm; 4 级: 病斑直径 3.1~4.0 cm; 5 级: 病斑直径 ≥ 4.1 cm。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级腐烂数} \times \text{该级代表数})}{\text{总数} \times \text{最高级代表数}}$$

$$\text{防效}(\%) = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100\%$$

1.7 统计分析

实验数据应用 DPS 软件进行邓肯氏多重差异统计分析。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的分离筛选

从果实表面、土壤中共分离到 218 株细菌。其来源和编号如下表:

表1 分离得到的菌株

Table 1 Stains isolated from fruits and soil

来源	编号	来源	编号
河北辛集(梨果)	A1-22	天津	I1-9
河北赵县(梨果)	B1-10	四川成都	J1-20
河北保定(梨果)	C1-13	新疆乌鲁木齐	K1-18
河北石家庄市	D1-7	山东蓬莱	L1-19
河南洛阳	E1-13	湖南常德	M1-9
江苏南京	F1-11	广西桂林	N1-16
重庆	G1-14	湖北武汉	O1-10
北京	H1-13	海南三亚	P1-12

2.1.1 in vitro 筛选



图1 拮抗菌在 PDA 平板上抑制链格孢霉产生的抑菌圈

Fig.1 Inhibition of *Alternaria alternata* on PDA plates by the antagonists

注: 左: 对照(无菌水); 右: 拮抗菌。

用分离到的 218 株菌分别对病原菌进行抑菌试

验。如图 1, 筛选抑菌圈直径大的, 抑制效果好的拮抗菌株。

共筛选到 8 株菌对病原菌表现出明显的抑菌效果(见表 2)。

表 2 分离的拮抗菌在 PDA 平板上对病原菌的抑制效果

Table 2 Inhibition of alternaria rot on PDA plates by the isolated microorganisms

菌株名	抑菌圈直径/mm
B4	13.78c
C1	13.39cd
E7	12.22d
F3	13.33cd
F7	13.56cd
H1	14.11c
J15	20.06b
J18	28.44a
CK	0e

注: 单因素方差分析, $p \leq 0.05$, 不同字母表示差异显著。

2.1.2 in vivo 筛选

图 2 为抑制效果明显的拮抗菌 J18 在梨果上接种 7 d 后抑制病斑直径的扩大和不发病的情况。

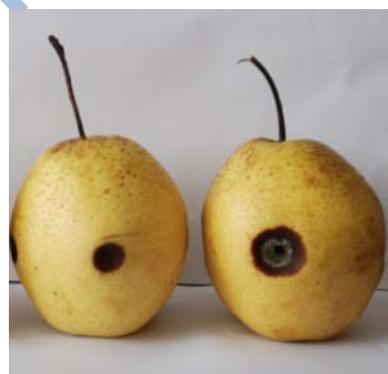


图 2 分离的拮抗菌对梨黑斑病的抑制

Fig.2 Inhibition of alternaria rot of pears by the isolated microorganisms

注: 左: J18; 右: 对照(无菌水)。

通过统计水果的发病率和病斑直径, 评价各株拮抗菌对梨黑斑病的抑制效果, 结果见表 3。对照梨果 7 d 后已全部发病, 而从四川成都果园内采取的土样分离的 J18 对梨黑斑病都表现出显著的抑制作用 ($p \leq 0.05$), 发病率仅为 19.44%, 抑制率为 77.78%。接种其他菌株的梨果的发病率均在 40%以上, 但病斑直径都小于只接种水的空白实验。

2.2 拮抗菌 J18 的鉴定

在显微镜下观察, 菌株 J18 大小约为 $0.6 \times 2.7 \mu\text{m}$, 有芽孢, 芽孢位置中生或近中生, 有鞭毛。在液体牛

肉膏蛋白胨中生长良好。菌落乳白色，无光泽，近圆形，边缘不整齐，菌落隆起，表面粗糙有褶皱；经革兰氏染色，J18 为革兰氏阳性菌。具体生理生化指标如表 4。

表 3 分离的拮抗菌对雪花梨黑斑病的抑制

Table 3 Inhibition of alternaria rot of pears by the isolated microorganisms

菌株名	病斑直径/mm	发病率/%	抑制率/%
B4	24.33c	44.45c	49.40b
C1	26.42b	65.28b	24.24c
E7	27.25b	68.05b	21.01c
F3	24.33c	54.17bc	36.55bc
F7	19.58d	55.56bc	37.18bc
H1	15.25e	44.45c	49.49b
J15	11.67f	41.67c	51.54b
J18	6.75g	19.44d	77.62a
CK	30.25a	87.5a	

注：单因素方差分析， $p \leq 0.05$ ，不同字母表示差异显著。



图 3 J18 菌落形态和革兰氏染色结果

Fig.3 Colony and Gram staining of strain J18

综合分析细菌J18的形态特征和生理生化特征，初步鉴定细菌J18为芽孢杆菌属的枯草芽孢杆菌。

将细菌J18 16S rDNA的PCR产物测序结果在NCBI上进行同源性分析，发现它与枯草芽孢杆菌有极高的同源性。利用DNAMAN将测序结果与同源性相近的8个菌株进行多重序列比较，并做进化树分析，进一步确定其分类地位为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

表 4 J18 的生理生化特征

Table 4 Physiological and biochemical characters of J18

测试项目	菌株 J18	测试项目	菌株 J18
2% NaCl	+	甲基红反应	-
NaCl 耐 5% NaCl	+		
受度 7% NaCl	+		
10% NaCl	+	酪氨酸水解	-
pH 5.7 培养基生长	+	葡萄糖	+
接触酶	+	果糖	+
明胶液化	+	甘露醇	+
淀粉水解	+	麦芽糖	+
溶菌酶抗性	+	木糖	+
V.P 反应	+	V.P 中的 pH 值	7.5
V.P 中的 pH 值	7.5	蔗糖	+
硝酸盐还原	+	山梨醇	+
柠檬酸盐利用	+	鼠李糖	-
丙酸盐利用	-	乳糖	-
脲酶试验	-	半乳糖	-
卵磷脂酶	-	阿拉伯糖	+
吲哚试验	-	酪氨酸水解	-
H ₂ S 产生试验	-	柠檬酸盐	-

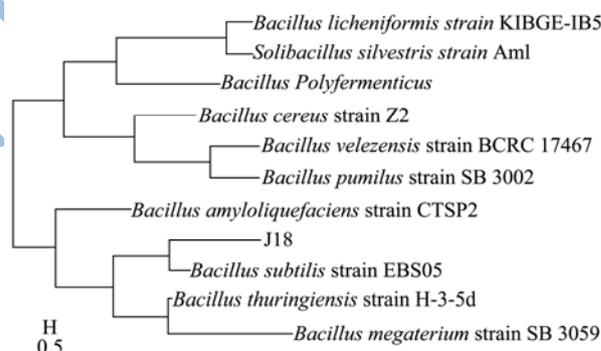


图 4 J18 16S rDNA 的进化树分析

Fig.4 Phylogenetic tree of J18 16S rDNA

2.3 拮抗菌的拮抗效果及其与其他生防因子复配的效果

2.3.1 不同浓度拮抗菌的防治效果

表 5 不同浓度 J18 菌悬液对梨黑斑病的抑制效果

Table 5 Inhibition effect of strain J18 suspension with different concentration on alternaria rot

CK	发病率/%		
	1×10 ⁶ cfu/mL	1×10 ⁷ cfu/mL	1×10 ⁸ cfu/mL
100a	90.28b	73.97c	16.57d

注：单因素方差分析， $p \leq 0.05$ ，不同字母表示差异显著。

对比三个浓度的处理效果，1×10⁸ cfu/mL 的 J18 菌悬液处理 30 d 后对梨采后黑斑病的抑制效果最显

著, 发病率仅为 16.57%, 而 1×10^6 cfu/mL 和 1×10^7 cfu/mL 浓度的 J18 菌悬液对梨黑斑病的抑制效果较差。

2.3.2 拮抗菌在果实表面定殖情况

统计拮抗菌 J18 7~30 d 在梨果实表面的定殖情况发现 (见图 5), 芽孢数在 7~15 d 时变化不大, 第 15 d 起, 芽孢数急剧减少, 这也是梨果腐烂最严重的时期。

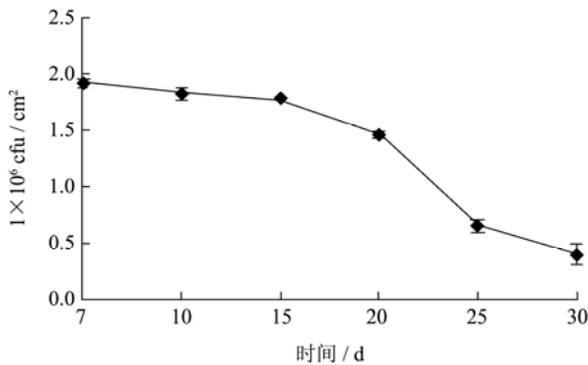


图 5 接种 7~30 d 拮抗菌 J18 在果实表面定殖情况

Fig.5 Quantity of live spores on the surface of pear in 7 to 30 days

2.3.3 低浓度拮抗菌 J18 与其它生防因子配合使用对梨黑斑病的抑制效果

如图 6, 降低拮抗菌的使用浓度后, 10^7 cfu/mL 的拮抗菌剂对梨采后病害的防效显著低于 10^8 cfu/mL 的防效。但低浓度拮抗菌 (1×10^7 cfu/mL) 与 2% CaCl_2 , 2 mmol/L SA 和 1% 壳聚糖复配浸果后, 其防效大大提高, 其中 J18 1×10^7 cfu/mL 分别与 2% CaCl_2 和 1% 壳聚糖复配浸果后的防效显著高于只接种 1×10^8 cfu/mL 的拮抗菌, 分别达到 72.81% 和 77.07%。

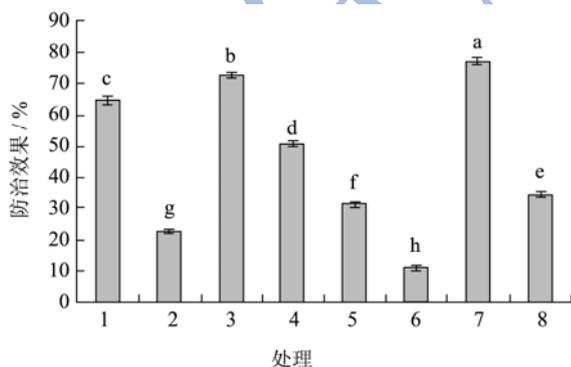


图 6 不同处理对梨黑斑病的抑制作用

Fig.6 Effect of different treatments on Alternaria rot of pear fruits

注: 1: J18 1×10^8 cfu/mL, 2: J18 1×10^7 cfu/mL, 3: J18 1×10^7 cfu/mL + 2% CaCl_2 , 4: 2% CaCl_2 , 5: J18 1×10^7 cfu/mL + 2 mmol/L SA, 6: 2 mmol/L SA, 7: J18 1×10^7 cfu/mL + 1% Chitosan, 8: 1% Chitosan. 单因素方差分析, $p \leq 0.05$, 不同字母表示差异显著。

3 结论

关于植物病害生防菌的筛选, 大多数是根据在平板生防菌对病原菌的拮抗效果进行筛选。然而, 在某些情况下, 平板拮抗作用与其防病效果之间并不存在必然相关性。平板拮抗效果明显的应在防病效果上进行验证。本研究首先在平板上对分离到的 218 个菌株的拮抗效果进行 *in vitro* 初筛, 得到拮抗效果明显的 8 个菌株, 进一步在梨果实上进行防病效果实验, *in vivo* 筛选得到一株防病效果最明显的拮抗菌 J18, 这种筛选方法可能更准确有效。

利用传统生理生化特性分析, 结合分子生物学方法对拮抗菌 J18 的分类地位进行了研究, 确定 J18 为枯草芽孢杆菌, 定名为枯草芽孢杆菌 J18。以往文献有几例梨黑斑病生防菌株的筛选报道, 但筛选到一株对雪花梨黑斑病有明显防病效果的枯草芽孢杆菌较少见报道。

由于生防菌的特性和植物病害的复杂性, 很难期望仅有一种拮抗菌就可以彻底防治病害。因此, 常常将拮抗菌与其他增效因子复配以减少拮抗菌用量, 降低成本, 提高防效。钙可以提高果实硬度, 减轻生理损伤, 阻止病菌侵入; 也可以抑制果实衰老。钙处理梨果实可以降低果实发病率, 防效可达 50.89% (图 5)。如果 10^7 cfu/mL 菌悬液与 2% CaCl_2 复配可使防效提高到 72.81%, 防效优于 10^8 cfu/mL 菌悬液处理。水杨酸 (SA) 作为植物防卫反应的信号分子可提高植物抗病、抗逆能力, 但对梨黑斑病的控制无明显效果。据报道, 壳聚糖处理能够控制多种果实上因灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*), 扩展青霉 (*Penicillium expansum*), 指状青霉 (*Penicillium digitatum*) 和意大利青霉 (*Penicillium italicum*) 引起的腐烂, 对主要苹果, 梨和柑橘的一系列商品化处理证实, 壳聚糖能有效地控制果实的自然腐烂^[9], 研究表明壳聚糖处理番茄能够降低腐烂^[10]。单独使用壳聚糖对梨黑斑病的防效不明显, 但与 10^7 cfu/mL 菌悬液复配可使防效达到 77.07%, 表明 Ca^{2+} 、壳聚糖对拮抗菌的防效具有增效作用。

下一步有必要深入研究分离到的这株拮抗菌的抑菌谱。为使这株拮抗菌更稳定的作用于果蔬采后病原菌, 有必要深入研究其作用机理, 进一步提高抑菌效价, 为果蔬采后病害的生物防治奠定基础。

参考文献

[1] Holt J G, Gibbons N E, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [M]. 9th Edition. Baltimore: The williams and

- Wickins Company. 1994
- [2] Simmons Emory G. *Alternaria* themes and variations [J]. Mycotaxon, 1993, 48: 109-140
- [3] Baudry A, Morzieres J P, Larue P. First report of Japanese pear black spot caused by *Alternaria Kikuchiana* in France [J]. Plant-Disease, 2001, 19(4): 19-22
- [4] 宋聪,李正国,边万平等.果实采后病害拮抗菌的筛选及鉴定[J].西南师范大学学报,2007,32(2):76-81
- [5] 谢丽,张铎,张丽萍,等.拮抗梨黑斑病菌的链霉菌的筛选及鉴定[J].河北师范大学学报,2008,32(4):526-528
- [6] Janisiewicz W J. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures [J]. Phytopathology, 1988, 78: 194-198
- [7] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001
- [8] 张纪忠.微生物分类学[M].上海,复旦大学出版社,1990
- [9] El Ghaouth A. Use of elicitor to control postharvest diseases in fruits and vegetables. Diseases Resistance in Fruits. Proceeding of an international workshop held at Chiang Mai. Thailand. 1997, 18-21. May. 131-135.
- [10] El Ghaouth A, Ponnampalam R, Castaigne F, et al. Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes [J]. Hort Science, 1992, 27(9): 1016-1018