

研究报告

## 芽孢杆菌拮抗苹果树腐烂病菌的筛选、鉴定及抑菌活性初探

豆雅楠 牛世全\* 豆建涛 赵丹 郑豆豆 周璇 王彦 朱学泰 孔维宝

(西北师范大学生命科学学院 甘肃 兰州 730070)

**摘要:**【背景】苹果树腐烂病发生面积广、危害严重,目前对于该病的防治以化学防治为主,但存在一定的弊端,因此迫切需要寻找一种对该病高效、安全的防治措施。【目的】从敦煌地区盐碱土壤中筛选出对苹果树腐烂病有良好抑制作用的芽孢杆菌菌株。【方法】采用平板对峙培养法和菌丝生长速率法对盐碱土中分离筛选的芽孢杆菌进行拮抗苹果树腐烂病菌的筛选,并对优良拮抗效果菌株进行离体组织防效测定、发酵培养基选择以及结合培养形态、生理生化及16S rRNA 基因序列分析进行菌种鉴定。【结果】初筛阶段菌株 7-2-1-2 对病原菌的抑制率为86.18%,复筛试验中发酵液对病原菌的抑制率为73.2%;在离体枝条创面涂抹菌株 7-2-1-2 发酵原液后,苹果树腐烂病菌的生长可被完全抑制;菌株 7-2-1-2 的最优生长培养基为 NBY 培养基;经初步鉴定,菌株 7-2-1-2 为枯草芽孢杆菌亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*)。【结论】菌株 7-2-1-2 对苹果树腐烂病有较好的生防效果,为该病生防菌剂的选择提供了必要的菌种资源。

**关键词:** 盐碱土壤, 芽孢杆菌, 苹果树腐烂病菌, 生物防治

## Screening, identification and preliminary study on biocontrol effect of antagonistic *Bacillus* against the pathogen of *Valsa mali* for apple tree

DOU Ya-Nan NIU Shi-Quan\* DOU Jian-Tao ZHAO Dan ZHENG Dou-Dou  
ZHOU Xuan WANG Yan ZHU Xue-Tai KONG Wei-Bao

(College of Life Sciences of Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

**Abstract:** [Background] Apple tree canker is widespread and dangerous. Currently, chemical control is the main way to prevent and cure it. However, there are some drawbacks. Therefore, it is urgent to find an effective and safe prevention and control measure. [Objective] In order to select *Bacillus* isolated in Saline-alkali soil from Dunhuang that showed significantly antagonistic effect on the *Valsa mali* growth. [Methods] The antifungal activities of selected *Bacillus* were investigated by dual culture assay and colony diameter assay, respectively. In addition, the control effect of antagonistic bacteria strains against *Valsa mali* in detached apple twigs *in vitro* and selection for

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (31260134)

\*Corresponding author: E-mail: sqniu@nwnu.edu.cn

**Received:** January 12, 2018; **Accepted:** March 21, 2018; **Published online** (www.cnki.net): April 11, 2018  
基金项目: 国家自然科学基金(31260134)

\*通信作者: E-mail: sqniu@nwnu.edu.cn

收稿日期: 2018-01-12; 接受日期: 2018-03-21; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-04-11

medium were determined and the antagonistic *Bacillus* was identified based on morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene phylogenetic analysis. **[Results]** The results revealed that strain 7-2-1-2 exhibited a strong antagonistic activity against *V. mali*, inhibiting significantly the germination of conidia and the growth of hyphae and especially the inhibitory rate of strain 7-2-1-2 was 86.18% and 73.2% in second screening. Strain 7-2-1-2 fermentation broth applied prior to wound inoculation of apple twigs with *V. mali* resulted in total inhibition of infection. The optimum growth medium of strain 7-2-1-2 was NBY. Strain 7-2-1-2 was identified as *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*. **[Conclusion]** These results indicated that the strain 7-2-1-2 promised to provide a new biological control method in containing apple canker.

**Keywords:** Saline-alkali soil, *Bacillus*, *Valsa mali* for Apple tree, Biocontrol

苹果树腐烂病菌属子囊类真菌,可引起苹果树腐烂病(Apple tree *Valsa* canker),在东亚地区该病害作为一种极具破坏性的疾病而普遍发生<sup>[1-2]</sup>。苹果树腐烂病菌引起的苹果树腐烂病致使树干、枝干、枝条发病,甚至蔓延至整棵果树<sup>[3]</sup>。由于该病具有反复性与破坏性,因此是限制中国<sup>[4]</sup>、日本<sup>[5]</sup>、韩国<sup>[6]</sup>等国家苹果产量的重要因素之一。尽管已经筛选出了一些对苹果树腐烂病有防治作用的杀菌剂<sup>[7]</sup>,但是由于该病原菌易定殖且在寄主的韧皮部与木质部扩增,使苹果树腐烂病很难通过化学杀菌剂防治<sup>[8]</sup>。此外,目前绝大部分苹果品种均易感染苹果树腐烂病菌,因此该病害很难通过合理选育抗病品种而得以防治<sup>[9-10]</sup>。

河西走廊属大陆性干旱气候,全年干燥少雨,气候严酷,其中敦煌地区中、重度盐碱地面积所占比重最大,分别为 34.98%和 51.23%<sup>[11]</sup>。该地区极端盐碱环境条件下的微生物由于长期自然选择的结果而得以生存,此外因生物进化的原因使得微生物具有特殊的基因类型、特殊的结构和生理功能,因而具有特殊的代谢类型和多样化的代谢产物,为微生物学研究提供了宝贵的微生物资源。

使用化学杀菌剂防治苹果树腐烂病所带来的环境污染问题违背了农业可持续的基本原则,因而生物防治被看作是最可取的做法。生物防治主要依据拮抗微生物种群之间的相互关系,其中以芽孢杆菌为代表的微生物资源已经成为防治该病害的重要手段<sup>[12]</sup>。生防芽孢杆菌可分泌多种抗菌物质并促进植物生长,诱导植株产生抗病性,此外芽孢杆菌

因能在不良环境条件下形成抗逆、耐热的芽孢而使得微生物菌剂便于储存和运输<sup>[13]</sup>。目前芽孢杆菌被广泛应用于植物病害防治工作:王卫雄等<sup>[14]</sup>从苹果树的根际土壤和枝条中分离得到了 2 株对苹果树腐烂病菌有较好生防活性的芽孢杆菌,分别为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),为苹果树腐烂病生物制剂的开发提供了材料。马荣等<sup>[15]</sup>从新疆阿克苏地区发病枝条的病健交界处分离得到一菌株 xj019,经分子生物学鉴定结合形态学与生理生化特性分析,确定菌株 xj019 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),该菌株对新疆苹果树腐烂病菌具有较好的抑制作用,其拮抗效果达到 87%。Zhang 等<sup>[16]</sup>从黄瓜老茎中分离得到一株解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)菌株 GB1,结果显示菌株 GB1 可有效控制苹果树腐烂病菌的生长,另外还发现菌株 GB1 可在枝条伤口处形成生物膜,同时产生具抗菌活性的代谢产物。

虽然芽孢杆菌对于植物病害的防治有巨大的潜力,能否作为苹果树腐烂病的生防制剂却知之甚少,加之直接从盐碱土壤中分离芽孢杆菌用于苹果树腐烂病的生防研究目前还未见报道,因此本研究从敦煌地区盐碱土壤中分离筛选得到了一株对苹果树腐烂病菌有较好拮抗效果的芽孢杆菌菌株 7-2-1-2,并对其进行形态学、生理生化和 16S rRNA 基因鉴定,测定了其发酵滤液对病原菌菌丝的生长抑制情况和离体防效测定,评估了其作为生防制剂的潜力,为苹果树腐烂病的生物防治提供了新的菌株资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 材料来源

分离得到芽孢杆菌的土样采集自敦煌地区盐碱土壤。

苹果树腐烂病菌(*V. mali*)、马铃薯茄链格孢菌(*Alternaria solani*)、茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium xylarium*)、油菜立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)，均为研究室保藏。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

Omega DNA 提取试剂盒，广州飞扬生物工程有限公司；牛肉膏蛋白胨培养基(NB)、马铃薯葡萄糖培养基(PDB)，广东环凯微生物科技有限公司；其他试剂均为分析纯试剂。电热恒温培养箱，上海博讯实业有限公司医疗设备厂；离心机，驭诺实业(上海)有限公司；大容量恒温振荡器，江苏太仓市实验设备厂；可见分光光度计，上海元析仪器有限公司。

#### 1.1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(NA/NB)、金氏 B 培养基(KB)、营养肉汤酵母膏培养基(NBY)<sup>[17]</sup>，马铃薯葡萄糖培养基(PDA/PDB)、LB<sup>[18]</sup>，肉汁胨培养基(BP)<sup>[19]</sup>。

### 1.2 芽孢杆菌的分离筛选与纯化

菌株分离采用稀释平板涂布法<sup>[20]</sup>。取 5 g 盐碱土壤加入盛有 45 mL 无菌水和少量玻璃珠的三角瓶中，充分振荡混匀后 80 °C 水浴 30 min 制成土壤悬液。采用 10 倍稀释法<sup>[21]</sup>在无菌条件下配置  $10^{-2}$ – $10^{-5}$  系列土壤稀释液，分别取不同梯度土壤稀释液 0.2 mL 涂布于 NA 培养基上，每个浓度梯度 3 个重复，于 37 °C 恒温培养箱中倒置培养 24 h，根据菌落形态特征挑取单菌落进行平板划线，直至平板上长出单一的菌落。

纯化采用平板划线法，将纯化好的菌株保存于 NA 斜面培养基备用。

### 1.3 生防芽孢杆菌的筛选

#### 1.3.1 初筛

初筛采用平板对峙培养法<sup>[14]</sup>，在 PDA 平板中

心位置接种倒置的苹果树腐烂病菌的菌饼，距离中心等距离处(2 cm)接种供试芽孢杆菌，每个菌株 3 次重复，以只接种病原菌为对照，于 28 °C 恒温培养箱倒置培养 3–5 d，待对照菌落刚好长满整个平板时，测量抑菌带的长度，计算抑菌率。选取抑菌率大于 80% (抑菌带半径>3.6 cm)的芽孢杆菌进入复筛，计算公式如下：

$$\text{抑菌率(\%)} = \frac{\text{对照菌落半径} - \text{试验菌落半径}}{\text{对照菌落半径} - \text{菌饼半径}} \times 100 \quad (1)$$

#### 1.3.2 复筛

(1) 发酵滤液制备：将已活化好的芽孢杆菌接入 LB 液体培养基中，28 °C、180 r/min 恒温振荡培养 18 h，收集发酵液，5 000 r/min 离心 10 min，取上清，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤 2 次去除菌体即得发酵滤液。

(2) 芽孢杆菌拮抗性的测定：采用菌丝生长速率法<sup>[22]</sup>，取已制备好的发酵原液与冷却至 50 °C 左右的 PDA 培养基于三角瓶中混匀，倒入灭菌培养皿中，待培养基凝固后在平板中央接种靶标病原菌( $d=8$  mm)，以加入无菌水的 PDA 培养基作为对照，每处理 3 个重复，于 28 °C 恒温培养箱倒置培养 3–5 d，待对照菌落刚好长满整个平板时，采用十字交叉法测量菌落直径，按照公式(1)计算拮抗菌株抑制率。筛选出对靶标病原菌抑制作用最强的菌株。

选取对靶标病原菌抑制作用最强的菌株进行广谱性测定，检测其对马铃薯茄链格孢菌(*Alternaria solani*)、茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium xylarium*)以及油菜立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的抑制作用。采用平板对峙培养法对供试病原菌进行抑菌率的测定，方法同 1.3.1，计算抑菌率。

### 1.4 拮抗芽孢杆菌发酵培养基的优化

选取 6 种不同的液体培养基(NB、PD、LB、KB、BP、NBY)进行拮抗菌株的发酵培养，方法同 1.3.2，按照公式(1)计算拮抗菌株对靶标病原菌的抑制率，选用最优培养基进行后续试验。

## 1.5 优势生防菌株鉴定

**培养与形态特征观察:** 将经筛选得到的优势芽孢杆菌点接于 NA 和 PDA 培养基中, 于 37 °C 恒温培养箱中倒置培养 24 h, 观察芽孢杆菌在不同培养基上的菌落生长情况, 同时对拮抗菌株进行芽孢染色和革兰氏染色, 利用光学显微镜观察菌株的形态特征。

**生理生化特性分析:** 结合分子鉴定结果和形态鉴定的初步结果, 确定拮抗菌株所在属, 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》和《常见细菌鉴定手册》对拮抗菌株进行生理生化特性鉴定。

**分子生物学鉴定:** 将菌株 7-2-1-2 接种于 LB 培养液中, 28 °C、180 r/min 振荡培养过夜, 吸取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 室温 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。采用细菌 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。菌株 16S rRNA 基因片段采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(30  $\mu$ L): 模板 DNA 4.0  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 引物各 1  $\mu$ L, 2.5  $\mu$ mol/L 2 $\times$ Taq Master-mix 15  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 9  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 57 °C 1 min, 72 °C 2 min, 25 个循环; 72 °C 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 检测合格的 PCR 产物送至金唯智生物科技有限公司测序。

## 1.6 拮抗菌株发酵液对苹果树腐烂病原菌的抑制作用测定

### 1.6.1 无菌发酵滤液对苹果树腐烂病原菌菌丝生长的抑制作用测定

采用 1.3.2 的方法制备发酵滤液, 将发酵滤液与冷却至 50 °C 左右的 PDA 培养基按照体积比为 20%、10%、5%、2%、1%、0.5%混匀, 分别倒入无菌培养皿内。待培养基凝固后在平板中央接种靶标病原菌( $d=8$  mm), 以加入无菌水的 PDA 培养基作为对照, 每重复 3 皿, 于 28 °C 恒温培养箱倒置培养 3–5 d, 待对照菌落刚好长满整个平板时, 采用十字交叉法测量菌落直径, 按照公式(1)计算拮抗菌株抑制率。挑取各处理及对照菌丝在光学显微镜

下观察其形态是否发生变化。

### 1.6.2 拮抗菌株发酵液对离体苹果树腐烂病枝条的防效测定

采用离体枝条接种法<sup>[23]</sup>对 1.3 筛选出的优势芽孢杆菌进行活体抑菌试验。选取品种为“红富士”的健康果树枝条, 用无菌水洗净晾干, 75%酒精消毒 10 min、无菌水冲洗 3 次、晾干, 剪成 15 cm 长小段, 两端石蜡封口, 用直径为 5 mm 的打孔器在枝条中间打孔并涂抹 500  $\mu$ L 稀释倍数为 0、20、50、100、200 倍的拮抗菌株的发酵滤液, 晾干, 以涂抹无菌水为对照, 在打孔处接种苹果树腐烂病菌( $d=5$  mm), 每个健康枝条一个接种点, 3 个重复, 覆灭菌湿脱脂棉于菌饼后置于经酒精消毒且铺有灭菌湿纱布的白瓷盘中, 保鲜膜封口, 置于光/暗(12/12 h)交替环境下, 28 °C 保湿培养, 观察并记录枝条的发病情况, 7 d 后测量病斑长度, 计算防治效果, 参照公式(2)。

$$\text{防治效果(\%)} = \frac{\text{对照病斑面积} - \text{处理病斑面积}}{\text{对照病斑面积}} \times 100 \quad (2)$$

## 1.7 拮抗菌株抗菌谱测定

采用平板对峙培养法, 方法同 1.3.1, 以马铃薯茄链格孢菌、茄腐镰刀菌、尖孢镰刀菌、油菜立枯丝核菌为靶标菌, 测定拮抗菌株的抗菌谱及抗菌能力。

## 1.8 数据分析

试验数据利用 SPSS 17.0 软件进行方差分析和 Duncan 多重比较( $P<0.05$ ) 计算所有均值的标准误; 测序结果与 NCBI 数据库进行核酸序列比对, 采用邻接法(Neighbor-Joining)利用 MEGA 6.0 构建系统发育树。

# 2 结果与分析

## 2.1 生防芽孢杆菌的筛选

### 2.1.1 生防芽孢杆菌的初筛结果

本研究从供试的 9 个盐碱土样中共分离得到 289 株芽孢杆菌。对各土壤类型中芽孢杆菌的数量研究表明(图 1), 戈壁共分离得到 67 株芽孢杆菌, 占所分离总菌数的 23.2%; 过渡带分离得到 71 株芽

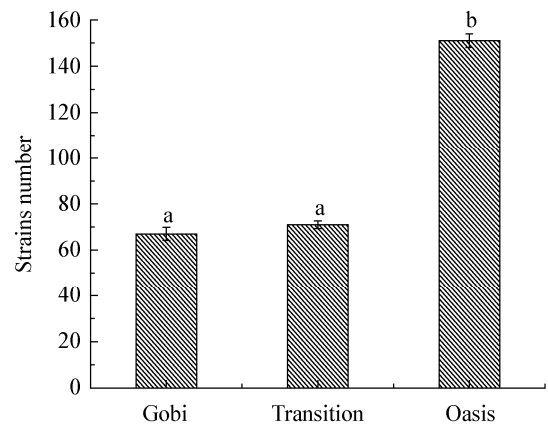


图 1 不同土壤类型所分离芽孢杆菌  
Figure 1 Schematis diagram of *Bacillus* isolated from different saline-alkali soil type  
注：图中不同小写字母表示经 Duncan's 新复极差法检验在  $P<0.05$  水平差异显著。  
Note: Different lowercase letters in the figure show the significantly different at  $P<0.05$  lever by Duncan's new multiple range test, respectively.

孢杆菌，占所分离总菌数的 24.6%；绿洲共分离得到 151 株芽孢杆菌，占所分离总菌数的 52.2%。综合以上数据分析，不同盐碱土壤类型中，芽孢杆菌数量的关系是：绿洲>过渡带>戈壁。

初筛结果表明，通过平板对峙培养法从供试的 289 株芽孢杆菌中筛选出了 121 株对苹果树腐烂病菌有不同程度抑菌效果的芽孢杆菌，占总分离菌数的 41.87% 其中抑菌率大于 85% 的芽孢杆菌共 21 株，占所分离芽孢杆菌的 7.27%，结果如表 1 所示。

2.1.2 生防芽孢杆菌的复筛结果

采用菌丝生长速率法对初筛中抑菌率大于 85% 的 21 株生防芽孢杆菌进行复筛，结果表明其中 3 株芽孢杆菌的发酵滤液对靶标菌的生长有较好的抑制作用，而菌株 7-2-1-2 对苹果树腐烂病菌的抑菌活性明显优于其他菌株，其抑菌率达到 73.2% (图 2)。结合初筛和复筛的结果，将菌株 7-2-1-2 作

表 1 芽孢杆菌拮抗苹果树腐烂病菌的初步筛选结果

Table 1 Preliminary screening results of *Bacillus* strains for antagonism against *Valsa mali* for apple tree

菌株编号 Strain code	抑菌带 Inhibition belt (cm)	抑菌率 Inhibition ratio (%)
11-4-4	3.73±0.067cdef	91.05±1.627cdef
17-2-2	3.83±0.067efgh	93.49±1.627efgh
17-2-3	3.67±0.067bcde	89.43±1.627bcde
B6-2-1-2	3.67±0.033bcde	89.43±0.813bcde
7-2-1-1	3.67±0.033bcde	89.43±0.813bcde
7-2-1-2	3.53±0.033a	86.18±0.810a
7-2-1-3	3.77±0.033efgh	91.87±0.813defg
7-2-1-4	3.93±0.033gh	95.93±0.813gh
7-2-1-6	3.87±0.033fgh	94.31±0.813fgh
7-2-1-7	3.57±0.033bc	86.99±0.810bc
7-2-2-5	3.97±0.033h	96.75±0.813h
7-2-3-2	3.93±0.033gh	95.93±0.813gh
7-2-3-4	3.83±0.033efgh	93.49±0.813efgh
7-3-2-3	3.67±0.033bcde	89.43±0.813bcde
10-3-1-1	3.60±0.058bcd	87.80±1.406bcd
10-4-2-2	3.67±0.033bcde	89.43±0.813bcde
11-2-3-4	3.73±0.033cdef	91.05±0.813cdef
17-2-1-7	3.67±0.167bcde	89.43±4.063bcde
17-2-2-1	3.67±0.033bcde	89.43±0.813bcde
17-2-2-9	3.93±0.033gh	95.93±0.813gh
11-2-2-14	3.53±0.033ab	86.18±0.810ab

注：抑菌带=对照菌落半径-试验菌落半径；同列数据后不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在  $P<0.05$  水平差异显著。  
Note: Inhibition belt=Control colony radius-Test colony radius; Different lowercase letters in the same column show the significantly different at  $P<0.05$  lever by Duncan's new multiple range test, respectively.

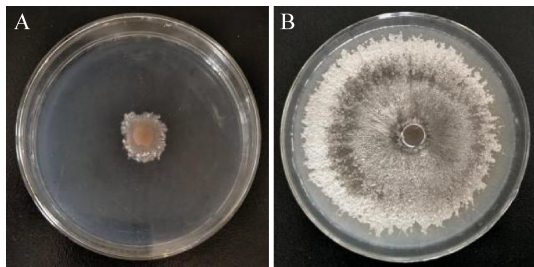


图2 拮抗菌株的复筛结果图

Figure 2 The picture of antagonistic *Bacillus* against *V. mali* by second screening

注: A: 菌株 7-2-1-2; B: 对照.

Note: A: Strain 7-2-1-2; B: Control.

为生防芽孢杆菌用于后续研究。

## 2.2 培养基的选择

在不同的发酵培养基中, 菌株经 28 °C 恒温振荡培养 18 h 后, 制备发酵滤液, 观察其对靶标菌的抑菌作用, 菌株 7-2-1-2 在不同的发酵培养基中发酵培养后, 其无菌发酵滤液对靶标菌的抑制率有所不同, 结果表明培养基对菌株的抑菌作用有一定的影响, 从而导致其对靶标菌的抑制率有一定的差异, 其中在 KBA 培养基中发酵培养后菌株的抑制作用相对较弱, 其抑菌率为 31.30%, 而在 NBY 培养基中菌株的抑制作用较强, 其抑菌率达到 90.65%, 依据抑菌率的大小, 菌株 7-2-1-2 在不同培养基中发酵培养后其抑菌作用的强弱为 NBY>

LB>PD>NB>BP>KB (图 3)。综上所述, 将 NBY 培养基作为菌株 7-2-1-2 发酵培养的最优培养基。

## 2.3 拮抗芽孢杆菌 7-2-1-2 的初步鉴定

### 2.3.1 菌落培养形态特征

菌株 7-2-1-2 革兰氏染色为阳性。在 NA 培养基上菌落呈圆形, 无色透明液滴状, 表面光滑且有光泽, 边缘规则不扩散(12–18 h); 培养后期颜色较为暗淡, 边缘不整齐(24 h); 培养时间延长至 36 h 时, 菌落边缘不规则, 呈放射状, 菌落颜色不透明, 有粘性(图 4A、B、C)。在 PDA 培养基上菌落近

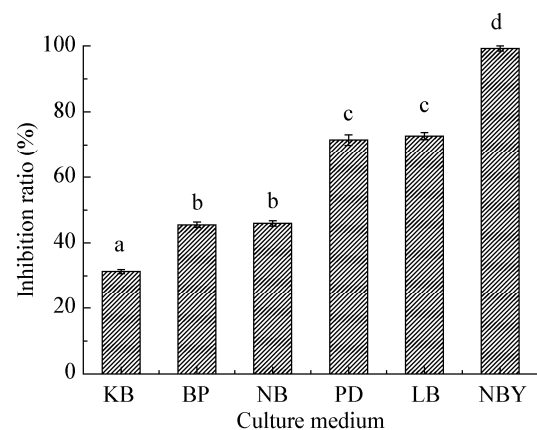


图3 不同培养基对菌株 7-2-1-2 抑菌率的影响

Figure 3 Effect of different medium on inhibition ratio of 7-2-1-2

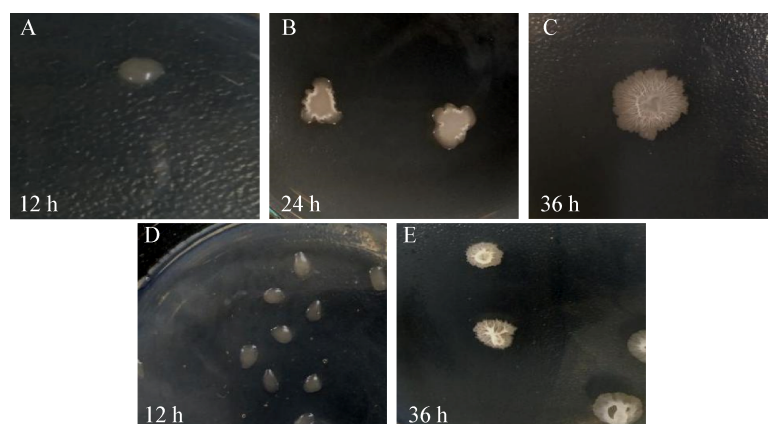


图4 菌株 7-2-1-2 不同时期的菌落形态图

Figure 4 The pictures of colony morphology of 7-2-1-2 for various periods

注: A、B、C: NA 培养基; D、E: PDA 培养基.

Note: A, B, C: NA; D, E: PDA.

似圆形，表面光滑，隆起，边缘整齐(12–18 h)；培养 36 h 后，菌落变大，表面有皱纹且隆起，边缘呈圆锯齿形，同时菌落有粘附性(图 4D、E)。在斜面上划线培养呈丝状生长，在液体培养基中生长时，液体浑浊且有菌膜，即呈浮膜状。

2.3.2 生理生化结果

鉴于分子鉴定的结果，参照《伯杰氏细菌鉴定手册》和《常见细菌鉴定手册》，生理生化和碳氮

源利用结果如表 2 所示。

2.3.3 PCR 检测及 16S rRNA 基因序列分析

对菌株 7-2-1-2 的 16S rRNA 基因片段进行 PCR 扩增，并将 PCR 产物测序，测序结果表明该区段的长度为 1 437 bp，综合比对结果显示：菌株 7-2-1-2 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, KM273782)的同源性最近且相似性为 99% (图 5)。

表 2 拮抗芽孢杆菌菌株 7-2-1-2 的生理生化特性

Table 2 The physiological biochemical characters of antagonistic *Bacillus* strain 7-2-1-2

生理生化特性 Physiological and biochemical	菌株 7-2-1-2 Strain 7-2-1-2	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
革兰氏染色 Gram staining	+	+
接触酶 Contact enzyme	+	+
柠檬酸利用 Citrate utilization	+	+
V-P 测定 V-P test	+	+
M-R 测定 M-R test	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+
乳糖发酵实验 Lactose fermentation experiment	–	–
碳源利用 Carbon utilization	+	+
氮源利用 Nitrogen utilization	+	+
Growth in 1% NaCl	+	+
Growth in 2% NaCl	+	+
Growth in 5% NaCl	+	+
Growth in 7% NaCl	+	+
Growth in 10% NaCl	+	+

注：+：阳性；–：阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

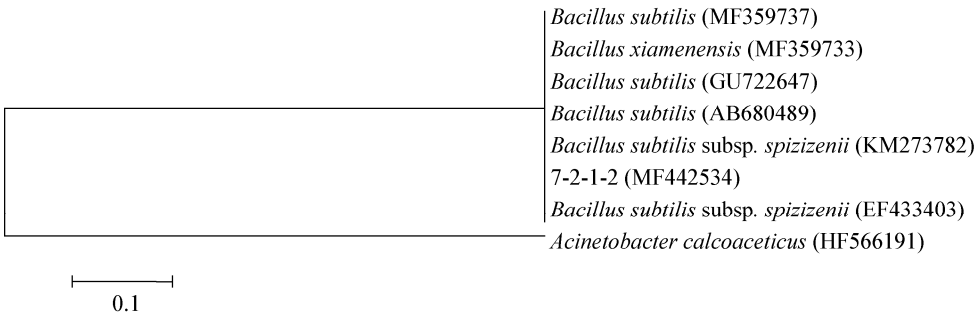


图 5 菌株 7-2-1-2 的系统发育树

Figure 5 Evolutional tree of strain 7-2-1-2

注：Bootstrap 次数设置为 1 000，邻接法构建系统发育树；括号中为相关细菌的 GenBank 的登录号；尺标表示每个核苷酸位点上的 0.1 替换值。

Note: The number at branch nodes are the percentage bootstrap support based on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resample data sets; The numbers in parentheses represent the sequence accession numbers in GenBank; The scale bar corresponds to 0.1 substitutions per nucleotide position.



结合菌落形态特征、生理生化特性及 16S rRNA 基因序列分析, 将菌株 7-2-1-2 初步鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*)。

2.4 菌株 7-2-1-2 对苹果树腐烂病菌的防效测定

2.4.1 发酵滤液对苹果树腐烂病菌的抑制作用

试验结果表明, 不同稀释倍数下, 菌株 7-2-1-2 的发酵滤液对苹果树腐烂病菌的抑制作用如图 6 所示, 随着发酵滤液稀释倍数的增加, 对苹果树腐烂病菌菌丝的抑制率也随之减小。稀释 5 倍的发酵液几乎能够完全抑制病原菌菌丝的生长, 抑制率达 94.31%; 稀释 20 倍时, 抑制率为 73.98%; 而当发酵液稀释倍数为 50 时, 其抑制率不到 60%, 降为 56.91%; 发酵滤液稀释 100 倍时, 其对菌丝的生长抑制作用较弱, 当发酵液的稀释倍数增加到 200 时, 完全失去了对病原菌菌丝的生长抑制作用。

2.4.2 菌株 7-2-1-2 对苹果树腐烂病离体枝条防效测定结果

如图 7 所示, 不同稀释倍数的菌株 7-2-1-2 发酵滤液对苹果树腐烂病菌有明显不同程度的抑制作用, 病斑面积和防治效果均显著低于对照组。由表 3 可看出, 随着发酵滤液稀释倍数的不断增加, 病斑面积不断扩大, 加入原液的离体枝条的病斑面

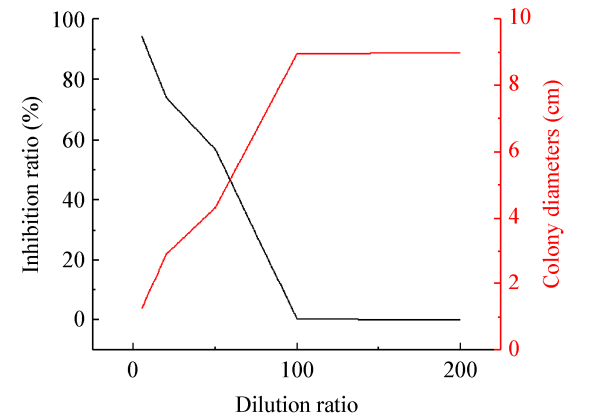


图 6 菌株 7-2-1-2 的发酵滤液对苹果树腐烂病菌的抑制作用  
Figure 6 Inhibiting effect of fermentation liquid of strain 7-2-1-2 against mycelia growth of *V. mali* for apple tree

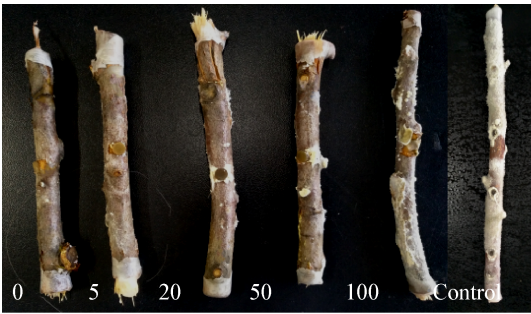


图 7 菌株 7-2-1-2 对苹果树腐烂病离体枝条防效效果  
Figure 7 Control efficiency of *Bacillus* strain 7-2-1-2 on detached twigs inoculated with *V. mali* for apple tree

积与加入稀释 5 倍发酵液的病斑面积相差较小, 病斑面积为 93.53%, 发酵液的稀释倍数为 50 时, 病斑面积为 15.75 cm<sup>2</sup>, 防治效果大于 60%为 62.67%, 而当稀释倍数增加至 100 倍时, 防效降为 18.68%, 稀释至 200 倍时, 发酵滤液失去了对病原菌的生长抑制作用。

2.5 菌株 7-2-1-2 对 4 种病原菌的抑菌作用

平板对峙培养法结果表明, 菌株 7-2-1-2 对供试的 4 种病原菌均具有较好的抑菌作用, 由表 4 可看出, 其对病原菌的抑制率均大于 60%, 其中对茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)与尖孢镰刀菌(*Fusarium xoyosporum*)的抑制效果明显大于其他 2 株供试的病原菌。

表 3 菌株 7-2-1-2 对苹果树腐烂病离体枝条防效效果  
Table 3 Control efficiency of *Bacillus* strain 7-2-1-2 on detached twigs inoculated with *V. mali* for apple tree

稀释倍数(倍)	病斑面积	防效结果
Dilution time	Scab area (cm <sup>2</sup> )	Control efficiency (%)
0	0	100
5	2.73±0.249b	93.53±0.591d
20	3.75±0.2b	91.12±0.473d
50	15.75±0.76c	62.67±1.801c
100	34.32±0.641d	18.68±1.518b
Control	41.96±0.798e	0

注: 同列数据后不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在  $P<0.05$  水平差异显著。  
Note: Different lower case letters in the same column show the significantly different at  $P<0.05$  level by Duncan's new multiple range test, respectively.



表 4 菌株 7-2-1-2 对病原菌的拮抗效果

Table 4 The antagonism of 7-2-1-2 to pathogenens

Pathogens	病斑面积 Scab area (cm <sup>2</sup> )	防效结果 Control efficiency (%)
马铃薯茄链格孢菌 <i>Alternaria solani</i>	0.77±0.33b	64.10±2.56a
茄腐镰刀菌 <i>Fusarium solani</i>	0.53±0.33a	86.28±1.96c
尖孢镰刀菌 <i>Fusarium xoyosporum</i>	0.53±0.33a	88.23±1.67c
油菜立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	0.80±0.023b	75.00±1.15b

注：同列数据后不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在  $P<0.05$  水平差异显著。

Note: Different lower case letters in the same column show the significantly different at  $P<0.05$  level by Duncan's new multiple range test, respectively.

### 3 讨论与结论

苹果树腐烂病造成苹果产量的严重下降致使果农过度依赖杀菌剂进行病害防治。然而，化学药剂的过度使用加剧了环境污染的步伐，同时危害食品安全。基于此，通过拮抗微生物进行生物防治已成为研究者们共同青睐并积极探讨的热点课题<sup>[12,24-25]</sup>，相比于化学药剂所带来的高毒性、高残留以及致病菌易产生抗药性等特点，生防细菌尤其是芽孢杆菌具有诸多优点<sup>[22]</sup>，如产生抗紫外、耐热耐干燥的芽孢，抵抗不良环境而便于生物制品的制备及运输<sup>[26-27]</sup>。相较于自然条件下普通微生物而言，在盐碱土壤这种极端环境条件下微生物具有特殊的生理结构、代谢方式及遗传特性等，具备普通微生物所不具备的或缺少的功能<sup>[28]</sup>，因此，本研究重点从盐碱土壤中分离芽孢杆菌，挖掘这类特殊的微生物资源对 *V. mali* 潜在的生防潜力，发现了一株对 *V. mali* 有较好生防效果的芽孢杆菌。

关于苹果树腐烂病的生物防治方面，王彩霞等<sup>[29]</sup>从苹果园根际土壤中分离出一株对苹果树腐烂病有显著拮抗作用的菌株 BJ1，菌株 BJ1 初步鉴定为微嗜酸寡氧单胞菌 *Stenotrophomonas acidaminiphila*，其发酵滤液对苹果树腐烂病菌的菌丝及分生孢子均有很好的抑制作用；Zhang 等<sup>[16]</sup>从黄瓜老茎中分离出一株对苹果树腐烂病有较强抗病性的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)菌株 GB1，连续 2 年的田间试验及小面积应用，取得了稳定的防治效果，其控制苹果腐烂病的效果高达

90%。初步的抑菌机理研究结果表明，GB1 主要是通过产生蛋白酶和潜在的抗生素类物质来杀死病原真菌，其可定殖于苹果韧皮部和木质部并能加速苹果伤口的愈合；王卫雄等<sup>[14]</sup>从苹果树的根际土壤和枝条中分离得到了 2 株对苹果树腐烂病菌有较好生防活性的芽孢杆菌，分别为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)，离体枝条防效测定结果表明生防菌株的发酵滤液对苹果树腐烂病的抑制作用随着稀释倍数的增加而降低，原液的生防效果最好，与本研究结果一致。

本研究以苹果树腐烂病菌(*V. mali*)为防治对象，从敦煌地区盐碱土壤中筛选分离得到了一株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株 7-2-1-2，并对其生防效果及发酵最优培养基进行了初步的研究，通过平板对峙培养法及菌丝生长速率法发现菌株 7-2-1-2 对 *V. mali* 有较好的抑菌效果，说明菌株 7-2-1-2 能够产生对病原菌菌丝生长有抑制作用的活性物质，进而表明该菌对苹果树腐烂病有潜在的生防潜力；*V. mali* 在含有菌株 7-2-1-2 发酵滤液的培养基上菌落形态发生变化，此外其发酵滤液对于苹果树离体发病枝条也有明显的抑菌效果。菌株 7-2-1-2 能够抑制 *Alternaria solani*、*Fusarium solani*、*Fusarium xoyosporum*、*Rhizoctonia solani* 等多种病原菌的生长，表明该菌可产生多样化的抑制植物病原菌生长的活性物质<sup>[26,30-31]</sup>。

鉴于菌株 7-2-1-2 对 *V. mali* 的良好抑菌效果，

接下来我们将对其抗菌的活性产物的提取、抑菌机制以及田间防效进行研究及评估, 进一步探讨其作为苹果树腐烂病生防菌剂的可能性。

## REFERENCES

- [1] Abe K, Kotoda N, Kato H, et al. Resistance sources to *Valsa* canker (*Valsa ceratosperma*) in a germplasm collection of diverse *Malus* species[J]. *Plant Breeding*, 2007, 126(4): 449-453
- [2] Adams GC, Roux J, Wingfield MJ. *Cytospora* species (*Ascomycota*, *Diaporthales*, *Valsaceae*): introduced and native pathogens of trees in South Africa[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2006, 35(5): 521-548
- [3] Ke XW. Histocytology and transcriptomics studies on infection of *Malus domestica* Cv. Fuji by *Valsa mali*[D]. Xi'an: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2013 (in Chinese)  
柯希望. 黑腐皮壳侵染苹果的组织细胞学及转录组学研究[D]. 西安: 西北农林科技大学博士学位论文, 2013
- [4] Wang L, Zang R, Huang LL, et al. The investigation of apple tree *Valsa* canker in Guanzhong region of Shaanxi Province[J]. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry* (Natural Science Edition), 2005, 33(S1): 98-100 (in Chinese)  
王磊, 臧睿, 黄丽丽, 等. 陕西省关中地区苹果树腐烂病调查初报[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2005, 33(S1): 98-100
- [5] Abe K, Kotoda N, Kato H, et al. Genetic studies on resistance to *Valsa* canker in apple: genetic variance and breeding values estimated from intra- and inter-specific hybrid progeny populations[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2011, 7(2): 363-372
- [6] Lee DH, Lee SW, Choi KH, et al. Survey on the occurrence of apple diseases in Korea from 1992 to 2000[J]. *Plant Pathology Journal*, 2006, 22(4): 375-380
- [7] Wang L, Gao ZP, Huang LL, et al. Screening fungicide for pathogen inhibition and disease control of apple tree *Valsa* canker[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2009, 39(5): 549-554 (in Chinese)  
王磊, 郜佐鹏, 黄丽丽, 等. 防治苹果树腐烂病杀菌剂的室内筛选[J]. *植物病理学报*, 2009, 39(5): 549-554
- [8] Yin ZY, Ke XW, Huang DX, et al. Validation of reference genes for gene expression analysis in *Valsa mali* var. *mali* using real-time quantitative PCR[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(9): 1563-1571
- [9] Bessho H, Soejima J, Tsuchiya S. Screening methods of apple trees for resistance to *Valsa* canker[A]//*Progress in Temperate Fruit Breeding*[M]. Netherlands: Springer, 1994: 49-52
- [10] Liu XY, Lyu S, Wang Y, et al. Evaluation of resistance of *malus* germplasms to apple canker (*Valsa ceratosperma*)[J]. *Journal of Fruit Science*, 2011, 28(5): 843-848 (in Chinese)  
刘欣颖, 吕松, 王忆, 等. 苹果种质资源对苹果树腐烂病抗性评价[J]. *果树学报*, 2011, 28(5): 843-848
- [11] Guo SQ, Cui ZT, Fu QM. Idea and suggestions on saline-alkali soil status quo and managements in Gansu province[J]. *Chinese Journal of Agricultural Resources and Regional Planning*, 2013, 34(4): 75-79 (in Chinese)
- [12] Jacobsen BJ, Zidack NZ, Larson BJ. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases[J]. *Phytopathology*, 2004, 94(11): 1272-1275
- [13] Pérez-García A, Romero D, de Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(2): 187-193
- [14] Wang WX, Xu BL, Xue YY, et al. Identification and antifungal activity of the antagonistic bacteria of *Cytospora* spp.[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2014, 22(10): 1214-1221 (in Chinese)  
王卫雄, 徐秉良, 薛应钰, 等. 苹果树腐烂病拮抗细菌鉴定及其抑菌作用效果测定[J]. *中国生态农业学报*, 2014, 22(10): 1214-1221
- [15] Ma R, Liu XL, Wang XW, et al. Screening and identification of the antagonistic bacteria apple canker in Xinjiang[J]. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2015, 38(2): 136-139 (in Chinese)  
马荣, 刘晓琳, 王晓炜, 等. 新疆苹果树腐烂病拮抗细菌的筛选与初步鉴定[J]. *新疆农业大学学报*, 2015, 38(2): 136-139
- [16] Zhang JX, Gu YB, Chi FM, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* GB1 can effectively control apple *Valsa* canker[J]. *Biological Control*, 2015, 88: 1-7
- [17] Schaad NW. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria[M]. Guiyang: Guizhou People's Publishing House, 1986 (in Chinese)  
Schaad NW. 植物病原细菌鉴定实验指南[M]. 贵阳: 贵州人民出版社, 1986
- [18] Sun Y. Laboratory Manual for Microbiology[M]. Xi'an: Shaanxi Normal University General Publishing House Co. LTD., 2015: 154-157 (in Chinese)  
孙燕. 微生物学实验指导[M]. 西安: 陕西师范大学出版总社, 2015: 154-157
- [19] Wang JF, Qi KB, He YM. Experimental Course of Genetics[M]. Beijing: Higher Education Press, 2008: 131 (in Chinese)  
王金发, 戚康标, 何炎明. 遗传学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 131
- [20] Zhang XZ, Xu JH, Li SP. Isolation, screening and preliminary identification of plant pathogenic fungi biocontrol strains of *Bacillus* spp.[J]. *Soils*, 2005, 37(1): 85-88 (in Chinese)  
张晓舟, 徐剑宏, 李顺鹏. 植物生防芽孢杆菌的分离筛选与初步鉴定[J]. *土壤*, 2005, 37(1): 85-88
- [21] Wang AJ, Chai ZX, Li JH, et al. Screening and identification of antagonistic *Bacillus* strains against pathogens of fusarium dry rot and black scurf in potato[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2013, 29(4): 586-594 (in Chinese)  
王爱军, 柴兆祥, 李金花, 等. 马铃薯干腐病菌和黑痣病菌拮抗芽孢杆菌的筛选及鉴定[J]. *中国生物防治学报*, 2013, 29(4): 586-594
- [22] Wang B, Niu SQ, Da WY, et al. Screening of *Actinomyces* on Antagonism to *Rhizoctonia solani* Isolated from Saline-alkali Soils in Hexi Corridor[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014(1): 156-160 (in Chinese)

- 王蓓, 牛世全, 达文燕, 等. 河西走廊盐碱土壤中抗立枯丝核菌的放线菌筛选[J]. 生物技术通报, 2014(1): 156-160
- [23] Wei JL, Huang LL, Gao ZP, et al. Laboratory evaluation methods of apple *Valsa* canker disease caused by *Valsa ceratosperma sensu* Kobayashi[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2010, 40(1): 14-20 (in Chinese)
- 韦洁玲, 黄丽丽, 郜佐鹏, 等. 苹果树腐烂病室内快速评价方法的研究[J]. 植物病理学报, 2010, 40(1): 14-20
- [24] Noble R, Coventry E. Suppression of soil-borne plant diseases with composts: A review[J]. Biocontrol Science & Technology, 2005, 15(1): 3-20
- [25] Sharma RR, Singh D, Singh R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review[J]. Biological Control, 2009, 50(3): 205-221
- [26] Piggot PJ, Hilbert DW. Sporulation of *Bacillus subtilis*[J]. Current Opinion in Microbiology, 2004, 7(6): 579-586
- [27] Tiago I, Teixeira I, Silva S, et al. Metabolic and genetic diversity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from composted municipal sludge on poly- $\epsilon$ -caprolactones[J]. Current Microbiology, 2004, 49(6): 407-414
- [28] Niu SQ, Long Y, Li HY, et al. Microbial diversity in saline alkali soil from Hexi Corridor analyzed by Illumina MiSeq high-throughput sequencing system[J]. Microbiology China, 2017, 44(9): 2067-2078 (in Chinese)
- 牛世全, 龙洋, 李海云, 等. 应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析河西走廊地区盐碱土壤微生物多样性[J]. 微生物学通报, 2017, 44(9): 2067-2078
- [29] Wang CX, Zhang QM, Li GF, et al. Identification of the antagonistic bacteria BJ1 and its antifungal activity against *Valsa ceratosperma*[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2012, 39(5): 431-437 (in Chinese)
- 王彩霞, 张清明, 李桂舫, 等. 苹果树腐烂病拮抗细菌菌株 BJ1 的鉴定及其抑菌作用[J]. 植物保护学报, 2012, 39(5): 431-437
- [30] Ongena M, Jourdan E, Adam A, et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(4): 1084-1090
- [31] Niu HJ, Li H, Wang NN, et al. Isolation and purification of antifungal protein from *Bacillus subtilis* E1R-j against *Valsa mali*[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2016, 44(9): 135-142 (in Chinese)
- 牛焕杰, 李辉, 王娜娜, 等. 苹果树腐烂病菌拮抗枯草芽孢杆菌 E1R-j 抗菌蛋白的分离纯化[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2016, 44(9): 135-142

## 征订启事

### 欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012 年至 2017 年以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连续 6 年获得“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

**欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买**, 2019 年每册定价 80 元, 全年 960 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413