

研究报告

桃褐腐病菌拮抗性内生细菌的筛选及其抑病效果

侯旭¹ 张国庆¹ 胡晓² 刘悦萍^{1,3*}

(1. 北京农学院生物科学与工程学院 北京 102206)

(2. 北京农学院植物科学与技术学院 北京 102206)

(3. 北京林果业生态环境功能提升协同创新中心 北京 102206)

摘要:【目的】从桃树根部组织中分离、筛选能够防治桃褐腐病害的内生拮抗菌,从细胞学水平探究其抑制机理。【方法】采用平板对峙法筛选对桃褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)有拮抗作用的内生细菌,调查内生拮抗菌的形态学及生理生化特性,通过细菌 16S rRNA 基因测序分析菌株的系统发育学特征。通过果实离体实验检测内生拮抗菌的抗菌效果,使用电子显微镜观察受抑制的桃褐腐病菌菌丝、孢子的形态以及细胞内部结构变化。【结果】从桃树根部组织中复筛分离得到的 3 株内生细菌对桃褐腐病防效高且稳定,经鉴定 3 株细菌均为枯草芽孢杆菌。果实离体试验表明,3 株内生细菌均明显抑制了桃褐腐病的发生。通过电子显微镜观察,发现受拮抗菌抑制的桃褐腐病菌的菌丝明显变细、杂乱且打结缠绕成团,孢子普遍干瘪变大、破裂,细胞质外渗。【结论】从桃树根部组织中得到的 3 株内生细菌对桃褐腐病菌的生长均有明显的抑制作用,可以作为防治桃褐腐病的新选择,具有进一步研究价值。

关键词: 桃, 桃褐腐病菌, 内生细菌, 筛选, 生物防治

Screening and inhibitory effect of antagonistic endophytic bacteria in peach against *Monilinia fructicola*

HOU Xu¹ ZHANG Guo-Qing¹ HU Xiao² LIU Yue-Ping^{1,3*}

(1. College of Biological Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

(2. Plant Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

(3. Beijing Collaborative Innovation Center for Eco-environmental Improvement with Forestry and Fruit Trees, Beijing 102206, China)

Abstract: [Objective] Antagonistic endophytic bacteria against *Monilinia fructicola* were screened from the roots of peach trees. The inhibitory mechanism was studied at cellular level. [Methods] The

Foundation item: Science and Technology Innovation Service Ability Construction-Collaborative Innovation Center-Eco-environmental Improvement with Forestry and Fruit Trees (No. CEFF-PXM2016_014207_000038); 2015 “Vegetable Basket” New Production and Operation of the Main Part, Scientific and Technological Capacity to Enhance the Project

*Corresponding author: E-mail: cauping@sina.com

Received: November 24, 2016; **Accepted:** March 15, 2017; **Published online** (www.cnki.net): April 06, 2017

基金项目: 科技创新服务能力建设-协同创新中心-林果业生态环境功能提升协同创新中心项目(No. CEFF-PXM2016_014207_000038); 2015 “菜篮子”新型生产经营主体科技能力提升工程项目

*通讯作者: E-mail: cauping@sina.com

收稿日期: 2016-11-24; **接受日期:** 2017-03-15; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-04-06

confront-culture method was adopted to screen endophytic bacteria against *M. fructicola*. The obvious features of antagonistic strains were determined by cell morphological observation, physiological and biochemical characteristics. Strains were identified by 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis. The effect of biological control was tested through the experiment of fruits *in vitro*. The change of mycelia, spore morphology and the internal structure of cells was observed under electron microscope. **[Results]** By secondary screening, three strains had obvious and stable effect antagonist *M. fructicola*, these strains were identified as *Bacillus subtilis*. The experiment of fruits *in vitro* showed that the three strains inhibited the growth of *M. fructicola* obviously. Results of microscopic analysis show that the mycelia inhibited by the antagonistic bacteria were obviously attenuated, with severe disorder, twining and knotting. Most spores were shriveled, enlarged and rupture. In cells of the pathogen inhibited by the antagonistic bacteria, the phenomena of cytoplasm exosmosis, protoplast shrinkage and condensation, and a large amount of cavities were observed. **[Conclusion]** The three strains of the endophytic bacteria screened from the roots of peach trees had effective inhibitory on the growth of *M. fructicola*, these strains could be served as new resources against *M. fructicola*.

Keywords: Peach, *Monilinia fructicola*, Endophytic bacteria, Screen, Biological control

桃(*Prunus persica* L.)属于蔷薇科(Rosaceae)李属(*Prunus*)桃亚属(*Amygdalus*)植物,在我国有3 000多年的栽培历史,是重要的果树资源。桃褐腐病(Peach brown rot)又名菌核病或花腐病,主要发生部位为果实、枝梢、叶和花,其中对果实的危害最为严重,是影响产量最严重的真菌病害之一^[1]。目前,我国发现的桃褐腐病原菌共3个种,分别是*Monilinia fructicola*、*Monilinia mumeicola*和*Monilinia yunnanensis*。其中,*M. fructicola*是引起我国桃褐腐病害的优势种,几乎所有的桃产区均有分布,在北京、陕西和云南等地桃园尤为严重^[2]。病原菌一般自幼果期潜伏侵入,生长后期至采收后贮存期间发病,遇高温多雨则病害加重,引起80%–100%的果实腐烂脱落,对果农造成严重经济损失^[3]。

目前桃褐腐病的防治主要以化学防治为主,药物有三唑类(DMI)、二甲酰亚胺类(DCF)等,其中主要使用DMI类杀菌剂中的三唑酮。研究表明,三唑酮会刺激人体角膜、皮肤,影响食品安全^[4]。三唑酮一般在果实生长后期喷施,施药后遇雨则防治效果几乎丧失,过量喷施又会增加成本且污染桃果实表面降低其商品价值。目前欧洲已有禁止在核果类果实采收后喷洒一切化学杀菌剂的规定,也限制了化学药物对桃果实褐腐病的防治^[5]。另外,随着化学药物的

长期使用会引发抗药性,国外已有*M. fructicola*对DMI、DCF类杀菌剂产生抗药性的报道^[6-7]。

植物内生菌(Endophyte)是指全生活史或生活史中的某一阶段寄生于植物组织中,并对植物本身不造成明显可见病害及功能改变的微生物^[8-9]。研究显示,果树中的许多物质都会参与内生防菌的生长并发挥拮抗作用,而对于其中能够与宿主植物互惠共生、协同进化的内生菌,其既能在宿主植物中稳定定殖,代谢产物又更易被植物本身内环境系统接受^[10]。因此使用内生菌作为生防菌更具有防效稳定的优点,目前此类研究已成为植物保护和微生物学等多学科领域的热点^[11]。此外,内生菌还能产生丰富的代谢产物,具有促生长、抗逆、改善果实风味等作用,使得其研究既具有理论研究的价值,又有较大的应用潜力^[12-14]。

本研究拟从桃树组织中筛选防治桃褐腐病的内生防菌,通过抑菌实验检测其防治效果。显微观察具有抑菌效果的内生菌对桃褐腐病原菌菌丝、孢子生长以及细胞内部结构的影响,为桃褐腐病的生物防治提供新的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

桃树根部样品采自北京平谷西鹿角村桃园。随

机选取 4 棵健康、优质高产的 10 年树龄“大久保”桃树,以树干为圆心,半径 30 cm 的圆形范围内,随机取距离地表 15 cm 深的直径约 2 cm–3 cm 的侧根组织,每棵树选 5 支,4 °C 保存下运回实验室,立即进行菌株分离。

供试菌株:桃褐腐病原真菌,即美澳型核果链核盘菌(*M. fructicola*)分离自北京平谷桃园,鉴定并保存于北京农学院生物科学与工程学院实验室。

1.2 主要试剂和仪器

次氯酸钠、戊二醇、磷酸缓冲液、钼酸、无水乙醇、叔丁醇、丙酮,国药集团化学试剂有限公司;Spurr 包埋树脂、醋酸铀、柠檬酸铅,北京新兴百瑞技术有限公司;烘箱(WGLL-30BE),泰斯特公司;冷冻干燥仪(VFD-21S),日本维尔德公司;扫描电镜(TS-5136SB)、透射电镜(H-7650),德国莱卡公司。

1.3 内生菌的分离

使用无菌水冲洗掉附着在桃树根部组织样品表面的泥土,依次用 75%乙醇、5%次氯酸钠进行表面灭菌,之后用无菌水反复冲洗样品 3 次,取最后冲洗的无菌水涂布在培养基表面以检测表面灭菌效果。将处理后的样品嵌入牛肉膏蛋白胨培养基(g/L:牛肉膏 3.0,蛋白胨 10.0,NaCl 5.0,琼脂 20.0)中,35 °C 暗环境下培养 12–24 h 后,通过平板划线法分离得到内生细菌单菌落。使用牛肉膏蛋白胨培养基在试管中保存内生细菌并置于 4 °C,准备下一步实验。

1.4 内生菌的筛选

初筛:以桃褐腐病原菌作为目标菌,采用三点对峙培养法进行筛选^[15]。针对内生细菌,在每板培养基中心接种活化的桃褐腐病原菌块(直径 5 mm),并在距离其 3 cm 处接种 3 种不同的桃树内生细菌,每组重复 3 次,对照组不接种。实验以抑菌半径大于 5.0 mm 为筛选标准,31 °C 下暗培养 7 d,观察并记录结果。

复筛:使用三点对峙法对初筛得到的内生菌进行重复筛选,以抑菌圈半径 10.0 mm 以上视为有拮抗作用,每种菌重复 3 次。31 °C 下暗培养 7 d,观察记录结果并拍照,按公式计算抑菌率^[16]:

抑菌率(%)=(对照菌落直径–处理菌落直径)/(对照菌落直径–菌饼直径)×100。

1.5 内生菌的鉴定

参照常规方法对拮抗细菌菌株进行形态学特征观察,基于 16S rRNA 基因的分子鉴定和部分生理生化指标的测定,由 MEGA 7.0 构建分子系统发育树^[17–18]。基于以上方法进行综合判断,鉴定分离菌株的分类地位。

1.6 接种内生菌对桃褐腐病的防治效果

检测内生菌的防治效果使用创伤感染法^[3]。自北京平谷同一十年生“大久保”品系桃园中,随机选取 16 个生长健康、发育成熟期的桃果实(280±10 g),采后置于 4 °C 保存,带回实验室后立即用沾有 75%酒精的棉球轻轻擦拭果实表面,继而用沾有无菌水的棉球重复擦拭果实 3 次。在无菌环境下选取两点,用直径 0.5 cm 的打孔器打孔 0.5 cm 深,造成人工创口。3 株内生拮抗细菌分别以 1%的接种量在 35 °C、150 r/min 条件下摇瓶培养 48 h 制成菌液。将桃果实的创口分别浸泡在 3 种菌液中 5 min,再将桃褐腐病原菌块放入创口作为实验组,以创口中只放入桃褐腐病原菌块的桃果实作为对照组,每组重复 4 次。把处理后的 16 个桃果实放置在 31 °C、湿度 60%的环境下暗培养 3 d,记录结果。

1.7 桃褐腐病原菌菌体的观察

每种细菌取 3 个对峙实验平板作为重复,选择其上桃褐腐病菌菌落边缘位置生长受到内生细菌抑制的菌体作为实验组,取 3 个生长天数与实验组相同的正常生长的桃褐腐病原菌平板,选择其菌落边缘位置的菌体作为对照组,分别用小刀切取 3 个 3 mm³ 正方体样品,经常规方法制样完成后,使用扫描电镜观察。

每种细菌取 3 个对峙实验平板作为重复,选择其上桃褐腐病菌菌落边缘位置生长受到内生细菌抑制的菌体作为实验组,取 3 个生长天数与实验组相同的正常生长的桃褐腐病原菌平板,选择其菌落边缘位置的菌体作为对照组,分别用小刀切取 3 个 2 mm³ 的正方体样品,使用常规方法制样,超

薄切片后经醋酸铀和柠檬酸铅染色、晾干, 使用透射电镜观察。

2 结果与分析

2.1 桃褐腐病内生拮抗细菌的分离和筛选

从桃树根部组织中共分离得到内生菌 266 株, 根据其平板上的生长特征, 去除相似菌株, 最终得到内生细菌 56 株。经过初筛, 对桃美澳型褐腐病原菌生长有抑制作用的内生细菌有 8 株。复筛后选出其中防治效果显著, 抑菌距离达 10 mm 以上的 3 株内生细菌编号为 XJ-14、XJ-15 和 XJ-16 (图 1 B、C 和 D), 抑菌率分别为 64.1%、52.1% 和 54.9%。

2.2 桃褐腐病内生拮抗细菌的鉴定

形态学观察发现, XJ-14 菌株杆状, 菌落呈淡黄色、不透明、表面隆起且光滑干燥; XJ-15 菌株杆状, 菌落呈奶白色、不透明、表面隆起且褶皱干燥; XJ-16 菌株短杆状, 菌落呈白色、不透明、产红褐色色素, 表面隆起且光滑干燥。经测序获得 3 个菌株的部分 16S rRNA 基因序列, GenBank 登录号分别为 KY229866、KY233433 和 KY229867, 经系统发育树分析, 确定 3 株内生细菌均为芽孢杆菌属, 且与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)亲缘相似性高达 99% (发育树略)。生理生化各项检测(表 1)中 3 株内生细菌结果一致, 其中 V-P 测定、吡啶检测结果与地衣芽孢杆菌不同; 水解淀粉、吡啶检测和产气结果与特基拉芽孢杆菌不同。与伯杰氏细菌

鉴定手册对比, 确定 3 株内生拮抗细菌为 *B. subtilis*。

2.3 桃果实离体抑菌实验

在 31 °C、湿度 60% 的环境下暗培养 3 d, 对照组发病率达 100%, 创口附近染病组织呈深褐色圆形, 发病区域平均直径 4.0 cm, 且表面有白色至灰褐色病原菌菌丝及成簇的分生孢子群(图 2A)。第 3 天时, 同时接种 XJ-14 和桃褐腐病菌的桃果实发病率为 62.5%, 创口周围发病组织直径平均 0.8 cm (图 2B); 同时接种 XJ-15 和桃褐腐病菌的桃果实发病率为 75%, 发病组织直径平均 3.5 cm (图 2C); 同时接种 XJ-16 和桃褐腐病菌的桃果实发病率为 62.5%, 发病组织直径平均 1.5 cm (图 2D); 3 个实验组果实创口附近桃褐腐病菌菌丝及分生孢子均不明显。

2.4 内生细菌对桃褐腐病菌拮抗作用的扫描电镜观察

使用扫描电镜观察正常生长的桃褐腐病菌菌丝体, 菌丝整体饱满且表面光滑, 粗细均匀, 平均直径约 3 μm (图 3A)。与对照组菌丝相比, 受到内生拮抗细菌抑制的桃褐腐病菌菌丝长势弯曲, 有明显变细、相互缠绕打结的现象。3 个实验组中大部分菌丝干瘪皱缩成片状且粗细不均, 内容物基本消失(图 3B、C 和 D)。观察显示正常生长的桃褐腐病菌分生孢子一般呈柠檬状, 表面光滑且饱满充盈, 长约 7 μm –9 μm , 宽约 5 μm –7 μm (图 3E)。受到内生拮抗细菌抑制的桃褐腐病菌病原菌的分生孢子严重畸形, 表面粗糙不平, 且明显干瘪变大(图 3F、G 和 H)。

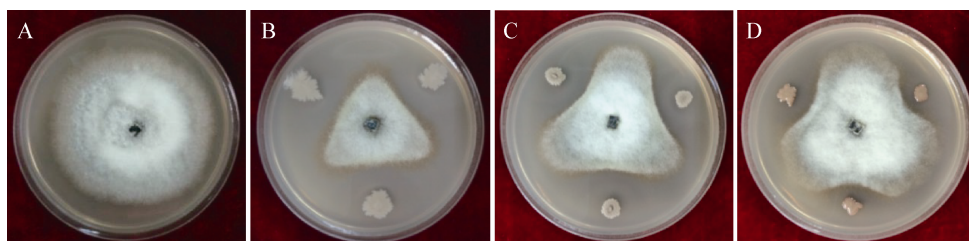


图 1 3 株内生细菌对桃褐腐病原菌生长的抑制效果

Figure 1 Inhibitory effect of three endophytic bacteria strains on growth of *M. fructicola*

注: A: PDA 平板上生长 6 d 的褐腐病原菌; B: 接种 XJ-14 生长 6 d 后的褐腐病原菌; C: 接种 XJ-15 生长 6 d 后的褐腐病原菌; D: 接种 XJ-16 生长 6 d 后的褐腐病原菌。

Note: A: *M. fructicola* growth for 6 days on PDA medium; B: *M. fructicola* inoculated with XJ-14 growth for 6 days; C: *M. fructicola* inoculated with XJ-15 growth for 6 days; D: *M. fructicola* inoculated with XJ-16 growth for 6 days.

表 1 3 株内生拮抗细菌的生理生化特性
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of three antagonistic endophytic bacteria strains

项目 Items	XJ-14	XJ-15	XJ-16	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	地衣芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i>	特基拉芽孢杆菌 <i>B. tequilensis</i>
革兰氏染色 Gram staining	+	+	+	+	+	+
V-P 测定 V-P test	+	+	+	+	-	+
芽孢 Spore	+	+	+	+	+	+
明胶液化 Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	+
淀粉水解 Starch hydrolysate	+	+	+	+	+	-
吲哚反应 Indole test	+	+	+	+	-	-
硝酸盐还原 Nitrate reductase	+	+	+	+	+	+
丙二酸利用 Malonate utilization	-	-	-	-	-	-
接触酶 Catalase test	+	+	+	+	+	+
产气 Aerogenesis	-	-	-	-	-	+
2% NaCl	+	+	+	+	+	+
5% NaCl	+	+	+	+	+	+
7% NaCl	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	+	+	+	+	+	+
葡萄糖产生 Glucose yield	+	+	+	+	+	+
厌氧生长 Anaerobic growth	-	-	-	-	-	-

注：+：阳性；-：阴性。
Note: +: Positive; -: Negative.

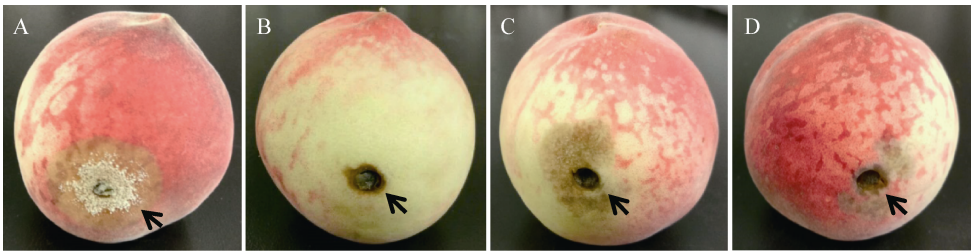


图 2 离体桃果实接种内生拮抗菌对桃褐腐病的抑制效果

Figure 2 Inhibitory effects of peach fruit *in vitro* inoculated with antagonistic endophyte bacteria against *M. fructicola*

注：A：接种桃褐腐病菌 3 d 的桃果实，发病率 100%，染病区域直径 4.0 cm，可观察到菌丝及分生孢子；B：接种 XJ-14 的桃果实，发病率 62.5%，染病区域直径 0.8 cm；C：接种 XJ-15 的桃果实，发病率 75%，染病区域直径 3.5 cm；D：接种 XJ-16 的桃果实，发病率 62.5%，染病区域直径 1.5 cm。

Note: A: The peach fruits inoculated with *M. fructicola* for 3 days, the incidence was up to 100%, the diameter of infected areas is 4.0 cm, mycelia and conidium can be observed; B: The peach fruits inoculated with *M. fructicola* and XJ-14 simultaneously for 3 days, the incidence was 62.5%, the diameter of infected areas is 0.8 cm; C: The peach fruits inoculated with *M. fructicola* and XJ-15 simultaneously for 3 days, the incidence was 75%, the diameter of infected areas is 3.5 cm; D: The peach fruits inoculated with *M. fructicola* and XJ-16 simultaneously for 3 days, the incidence was 62.5%, the diameter of infected areas is 1.5 cm.

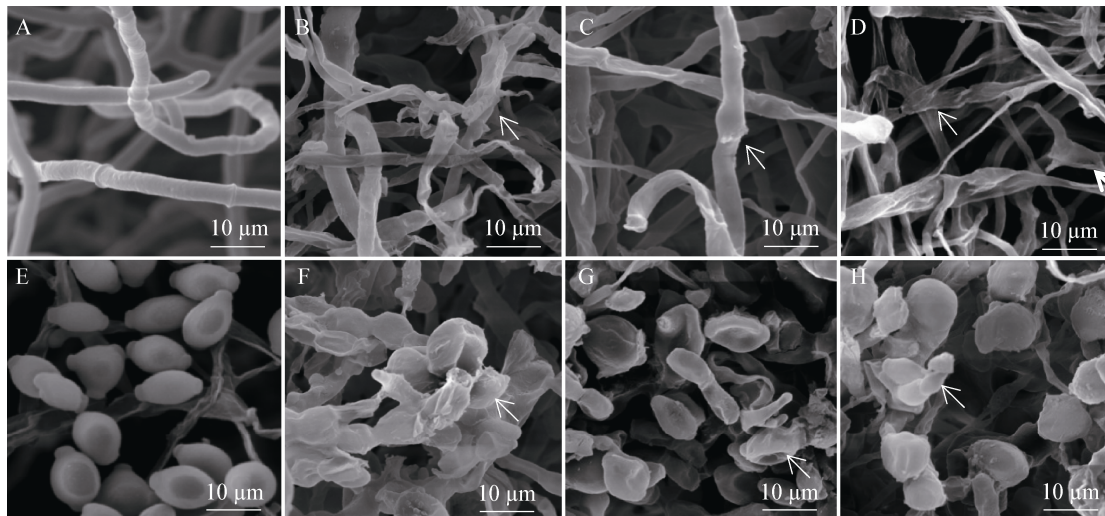


图3 内生拮抗菌对桃褐腐病菌菌丝及分生孢子的影响

Figure 3 Effect of antagonistic endophyte bacteria on the mycelia and conidium of *M. fructicola*

注: A: 正常生长的桃褐腐病菌菌丝, 长势舒展, 粗细均匀, 表面光滑整体饱满; B: 受到 XJ-14 抑制的桃褐腐病菌菌丝; C: 受到 XJ-15 抑制的桃褐腐病菌菌丝; D: 受到 XJ-16 抑制的桃褐腐病菌菌丝; E: 正常生长的桃褐腐病菌分生孢子呈柠檬状, 表面光滑且内部充盈; F: 受到 XJ-14 抑制的桃褐腐病菌分生孢子; G: 受到 XJ-15 抑制的桃褐腐病菌分生孢子; H: 受到 XJ-16 抑制的桃褐腐病菌分生孢子。

Note: A: The normal mycelia of the *M. fructicola* are stretch and uniform, surface are smooth and plump; B: The mycelia of *M. fructicola* inhibited by XJ-14; C: The mycelia of *M. fructicola* inhibited by XJ-15; D: The mycelia of *M. fructicola* inhibited by XJ-16; E: The normal conidium of the *M. fructicola* are lemon-shaped, surface is smooth and cellular content is enrichment; F: The conidium of *M. fructicola* inhibited by XJ-14; G: The conidium of *M. fructicola* inhibited by XJ-15; H: The conidium of *M. fructicola* inhibited by XJ-16.

2.5 内生拮抗菌对桃褐腐病菌细胞超微结构的影响

通过透射电镜观察发现, 正常生长的桃褐腐病菌病原菌的细胞质充满整个细胞(图 4A)。生长受到 3 株内生拮抗菌抑制的病原菌细胞均被观察到有

明显的细胞质外渗现象, 细胞中的残留物质收缩凝聚成团, 形成大量空腔。受到内生细菌 XJ-14 与 XJ-15 抑制的桃褐腐病菌病原菌细胞壁有增厚现象。此外, 视野中还观察到仅剩细胞壁的空细胞, 以及游离的无壁细胞质(图 4B、C 和 D)。

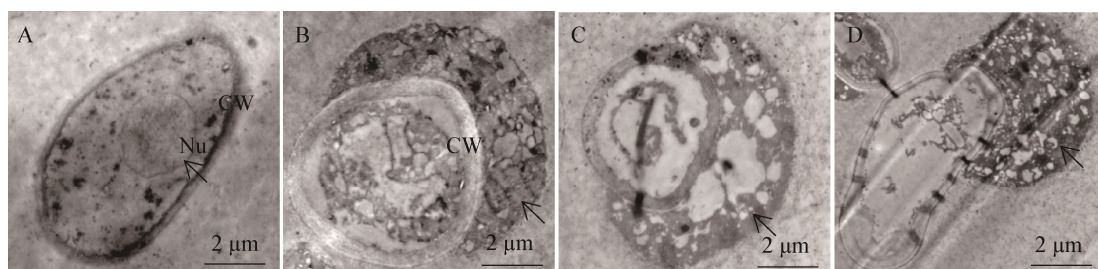


图4 内生拮抗菌对桃褐腐病菌细胞超微结构的影响

Figure 4 Effect of antagonistic endophyte bacteria on the ultrastructure of the *M. fructicola* cells

注: A: 正常的桃褐腐病菌细胞; B: 受到 XJ-14 抑制的桃褐腐病菌细胞; C: 受到 XJ-15 抑制的桃褐腐病菌细胞; D: 受到 XJ-16 抑制的桃褐腐病菌细胞。Nu: 细胞核; CW: 细胞壁。

Note: A: The normal cell of *M. fructicola*; B: The cell of *M. fructicola* inhibited by XJ-14; C: The cell of *M. fructicola* inhibited by XJ-15; D: The cell of *M. fructicola* inhibited by XJ-16. Nu: Cell nucleus; CW: Cell wall.

3 讨论

本研究从桃树根部组织中共分离得到 3 株对桃褐腐病菌生长有明显抑制作用的内生细菌, 平均抑菌半径均在 11 mm 以上, 根据形态学、生理生化检测及分子鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。枯草芽孢杆菌作为生防菌具有防病效果好、易定殖、营养要求低、对人畜安全和不造成环境污染等优点, 其自身可产生并向胞外分泌多种有抑制真菌生长以及细菌活性的代谢产物, 这在果树的生物防治研究中常有报道, 因此我国农业部已将枯草芽孢杆菌列为免安全鉴定的一级菌种^[19]。内生菌广泛存在于植物各部分组织中, 在植株中接种经过筛选的有益内生菌后, 其不但能够在植株中稳定定殖、上下传导, 且不影响对植株的有益效果^[20-21]。目前从内生菌中筛选有生防作用的枯草芽孢杆菌防治植物病害的研究相对较少, 卜春亚等^[22]从草莓的根中分离筛选到一株对多种植物病原菌有较好抑制效果的内生枯草芽孢杆菌, 其对草莓根腐病菌的抑菌带宽度为 9.8 mm。刘冰等^[23]采用离体叶片法从柑橘中筛选得到的枯草芽孢杆菌, 其代谢产物稳定不易分解, 能够抑制柑橘溃疡病原菌孢子的萌发。Ju 等^[24]从苹果幼苗中分离得到一株内生枯草芽孢杆菌, 发现其对 *Fusarium* sp. 病原菌具有拮抗作用, 且防治效果稳定。Gao 等^[25]得到的内生枯草芽孢杆菌对小麦白粉病菌菌丝生长的抑制作用高达 90.97%。

本研究的平板抑菌实验和果实回接抑菌实验结果显示, 内生细菌 XJ-14、XJ-15 及 XJ-16 在培养皿和桃果实上, 对桃褐腐病病原菌菌丝体的生长及孢子的形成均表现出明显的抑制效果; 扫描电子显微镜和透射电子显微镜观察结果中, 3 株内生细菌对桃褐腐病菌菌丝体与孢子有显著的致畸作用, 对其细胞质也有凝聚作用, 视野中有细胞质外渗和中空的细胞以及游离的细胞质。黎军英等^[26]使用壳聚糖处理桃褐腐病菌菌丝, 发现病原菌胞内细胞质有外渗的现象, 此发现与本实验结果相似。在观察中未发现拮抗菌的芽孢或菌体, 这表明 3 株内生拮抗

菌向胞外环境中分泌了有抑制桃褐腐病菌生长效果的代谢产物。而代谢产物的种类及可能的抑菌机制是本研究进一步探究的目标。前人发现枯草芽孢杆菌抑制真菌生长的机制包括产生抑菌代谢产物、重寄生作用以及竞争作用^[27-28], 其中产生的抑菌物质包括抗菌蛋白、抗菌肽和多糖等^[29]。叶云峰等^[30]发现番茄内生枯草芽孢杆菌胞外分泌的代谢产物为蛋白质, 其对玉米小斑病菌菌丝有致畸效果。枯草芽孢杆菌 CPA-8 产生的脂肽类抗菌物质 Fengycin 能够防治桃褐腐病^[31-32]。此外, 对病原菌有抑制作用的常见菌类代谢产物还包括生物碱^[33]、萜类^[34]和甾体类^[35]等相关小分子化合物, 已有许多文献进行了报道。

基于现有的研究结果, 为了进一步阐明 3 株内生细菌的抑菌机理, 本研究将进一步通过实时荧光定量聚合酶链反应、高通量测序等手段验证内生拮抗菌在桃果中的定殖能力, 并对其有效抑制桃褐腐病菌生长的代谢产物抑菌机理进行深入探讨, 为研发防治桃褐腐病的生物制剂提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] Li SH. Peach Science[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013: 385-387 (in Chinese)
李绍华. 桃树学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013: 385-387
- [2] David B, McLaughlin. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi[M]. Kew Surrey: Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi Edition, 2008(3): 418
- [3] Li SF, Chen C. Incidence and management of the peach fruit brown rot[J]. Plant Protection, 2009, 35(2): 134-139 (in Chinese)
李世访, 陈策. 桃褐腐病的发生和防治[J]. 植物保护, 2009, 35(2): 134-139
- [4] Baggio JS, de Afonseca Lourenço S, Amorim L. Eradicant and curative treatments of hexanal against peach brown rot[J]. Scientia Agricola, 2014, 71(1): 72-76
- [5] Casals C, Teixidó N, Viñas I, et al. Control of *Monilinia* spp. on stone fruit by curing treatments. Part II: the effect of host and *Monilinia* spp. variables on curing efficacy[J]. Postharvest Biology and Technology, 2010, 56(1): 26-30
- [6] Yin LF, Hu MJ, Jin X, et al. Progress in molecular mechanisms of fungicide resistance in peach brown rot fungi *Monilinia* spp.[J]. Plant Protection, 2010, 36(5): 28-32 (in Chinese)
尹良芬, 胡劲郡, 金鑫, 等. 桃褐腐病菌抗性分子机理研究进展[J]. 植物保护, 2010, 36(5): 28-32
- [7] Yin LF, Wang F, Zhang Y, et al. Evolutionary analysis revealed the horizontal transfer of the *Cyt b* gene from Fungi to Chromista[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2014, 76: 155-161
- [8] Deng MY, Wang BC, Yang ZC, et al. The application of techniques of molecular biology in classification and identification of endophytes[J]. Amino Acids & Biotic Resources,

- 2006, 28(3): 9-14 (in Chinese)
邓墨渊, 王伯初, 杨再昌, 等. 分子生物学技术在植物内生菌分类鉴定中的应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(3): 9-14
- [9] Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(10): 895-914
- [10] Ryan RP, Germaine K, Franks A, et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 278(1): 1-9
- [11] Li CH, Shi L, Han Q, et al. Biocontrol of verticillium wilt and colonization of cotton plants by an endophytic bacterial isolate[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(3): 641-651
- [12] Mandyam KG, Jumpponen A. Mutualism-parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 5: 776
- [13] Strobel G, Daisy B, Castillo U. Novel natural products from rainforest endophytes[A]//Zhang LX, Demain AL. Natural Products[M]. Totowa, NJ: Humana Press, 2005: 329-351
- [14] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67(4): 491-502
- [15] Liu JX, Ma Z, Shentu XP, et al. Isolation and identification of antagonistic actinomycetes and their application in the biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(6): 1123-1130 (in Chinese)
刘金秀, 马正, 申屠旭萍, 等. 黄瓜枯萎病拮抗放线菌筛选及其生防作用鉴定[J]. 园艺学报, 2012, 39(6): 1123-1130
- [16] Liu CY, Xu RR, Ji HL, et al. Isolation, screening and identification of an endophytic fungus and the detection of its antifungal effects[J]. Journal of Plant Protection, 2015, 42(5): 806-812 (in Chinese)
刘彩云, 许瑞瑞, 季洪亮, 等. 一株生防内生真菌的分离筛选、鉴定及抑菌特性[J]. 植物保护学报, 2015, 42(5): 806-812
- [17] Buchana RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th Edition. Beijing: Science Press, 1984: 382-533 (in Chinese)
布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984: 382-533
- [18] Liu ZG, Cui BY, Wang M, et al. Gene genetic evolution of 16S rDNA for *Brucella* strains[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2015, 31(8): 700-703
- [19] Chen C. A review of antibacterial peptides produced by microorganism[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(7): 59-63 (in Chinese)
陈琛. 微生物源抗菌肽研究概况[J]. 生物技术通报, 2010(7): 59-63
- [20] Yang HF, Xue YR, Yu XY, et al. Colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* CC09 in wheat leaf and its biocontrol effect on powdery mildew disease[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(4): 481-488 (in Chinese)
杨洪凤, 薛雅蓉, 余向阳, 等. 内生解淀粉芽孢杆菌 CC09 菌株在小麦叶部的定殖能力及其防治白粉病效果研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(4): 481-488
- [21] Huang QZ, Lu NH, He H, et al. Colonization and promotion growth of mangrove endophytic bacteria AiL₃ in soybean[J]. Soybean Science, 2014, 33(2): 223-227 (in Chinese)
黄勤知, 卢乃会, 何红, 等. 红树内生细菌 AiL₃ 在大豆体内的定殖与促生作用研究[J]. 大豆科学, 2014, 33(2): 223-227
- [22] Bu CY, Sun Y, Zhang TW, et al. Isolation and antagonistic character analysis of endophytic bacteria from the strawberry[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2014, 20(2): 300-304 (in Chinese)
卜春亚, 孙晔, 张天蔚, 等. 一株草莓根腐尖孢镰刀菌拮抗内生细菌的分离鉴定及抑菌特性[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(2): 300-304
- [23] Liu B, Song SL, Liu XL, et al. Screening, identification of bio-control endophytic bacterium against citrus canker and stability of its bioactive metabolites[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2015, 27(12): 2152-2158 (in Chinese)
刘冰, 宋水林, 刘晓丽, 等. 柑橘溃疡病生防内生细菌的筛选、鉴定及其活性代谢产物的稳定性[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(12): 2152-2158
- [24] Ju RC, Zhao YH, Li JY, et al. Identification and evaluation of a potential biocontrol agent, *Bacillus subtilis*, against *Fusarium* sp. in apple seedlings[J]. Annals of Microbiology, 2014, 64(1): 377-383
- [25] Gao XN, Gong YF, Huo YX, et al. Endophytic *Bacillus subtilis* strain E1R-J is a promising biocontrol agent for wheat powdery mildew[J]. Biomed Research International, 2015, 2015: 462645
- [26] Li JY, Li HY. Antifungal activity of chitosan on *Monilinia fructicola*[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2002, 21(2): 138-140 (in Chinese)
黎军英, 李红叶. 壳聚糖对桃褐腐病菌的抑菌作用[J]. 电子显微学报, 2002, 21(2): 138-140
- [27] Compant S, Clément C, Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(5): 669-678
- [28] Li J, Yang Q. Research progress on biocontrol *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(1): 106-111 (in Chinese)
李晶, 杨谦. 生防枯草芽孢杆菌的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(1): 106-111
- [29] Gul S, Rahman MU, Ajmal M, et al. Effects of carbon and nitrogen sources on production of proteases by *Bacillus subtilis* ic-5[J]. Bangladesh Journal of Botany, 2015, 44(2): 285-292
- [30] Ye YF, Li QQ, Yuan GQ, et al. Optimization of culture medium and fermentation conditions for high production of antimicrobial substance by *Bacillus subtilis* strain B47[J]. Microbiology China, 2011, 38(9): 1339-1346 (in Chinese)
叶云峰, 黎起秦, 袁高庆, 等. 枯草芽孢杆菌 B47 菌株高产抗菌物质的培养基及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1339-1346
- [31] Yáñez-Mendizábal V, Zerrouh H, Viñas I, et al. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis*, CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides[J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 132(4): 609-619
- [32] Yáñez-Mendizábal V, Usall J, Viñas I, et al. Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit[J]. Biocontrol Science and Technology, 2011, 21(4): 409-426
- [33] Zheng CJ, Li L, Zou JP, et al. Identification of a quinazoline alkaloid produced by *Penicillium vinaceum*, an endophytic fungus from *Crocus sativus*[J]. Pharmaceutical Biology, 2011, 50(2): 129-133
- [34] Singh MP, Janso JE, Luckman SW, et al. Biological activity of guanacastepene, a novel diterpenoid antibiotic produced by an unidentified fungus CR115[J]. The Journal of Antibiotics, 2000, 53(3): 256-261
- [35] Liu HQ, Han JC, Zhao TC, et al. Screening, identification and bio-control of antagonistic endophytic bacteria from fruit trees[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(2): 335-342 (in Chinese)
刘慧芹, 韩巨才, 赵廷昌, 等. 果树内生拮抗细菌的筛选鉴定及其生防作用研究[J]. 园艺学报, 2014, 41(2): 335-342