

枣缩果病拮抗菌的鉴定及其拮抗效应

武自强¹ 马荣^{1,3} 游崇娟¹ 梁英梅^{2*}

(1. 北京林业大学 林学院 北京 100083)

(2. 北京林业大学 标本馆 北京 100083)

(3. 新疆农业大学 林学与园艺学院林学院 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘 要:【目的】发掘有效生防菌株以控制枣缩果病,并探究生防菌株的拮抗特性。【方法】采用梯度稀释法和平板对峙法筛选出 2 株对枣缩果病菌细极链格孢(*Alternaria tenuissima*)具有显著拮抗作用的菌株 STO-12 和 STO-45,通过 PCR 扩增得到其 16S rRNA 基因序列,进行同源比对分析和分子系统树的构建,并结合形态学观察和生理生化实验对菌株进行鉴定。采用皿内对峙、显微观察及蛋白质抑菌试验等测定了菌株 STO-45 的拮抗效应。【结果】两拮抗菌株 STO-12 和 STO-45 均鉴定为枯草芽孢杆菌,但菌株 STO-12 能产生橘红色色素,且两菌株在大小、生理生化特征及系统发育关系上具有生理差异。这两株拮抗细菌的发酵液、发酵上清液及发酵滤液均对枣缩果病菌具有显著抑菌活性。STO-45 发酵滤液在 0.8% 的低体积浓度下即达到抑制中浓度,可使病原菌 *A. tenuissima* MY5 的菌丝及芽管部分畸形膨大,发酵液中的蛋白类物质可能是其拮抗物质之一。【结论】拮抗菌株 STO-12 和 STO-45 对枣缩果病的生物防治均具有潜在的应用价值,其抑菌机制及生物制剂的开发利用值得进一步研究。

关键词: 枣缩果病, 细极链格孢菌, 枯草芽孢杆菌, 鉴定, 抑菌率

Identification of antagonistic bacteria against *Alternaria tenuissima*, and its effect on antagonism

WU Zi-Qiang¹ MA Rong^{1,3} YOU Chong-Juan¹ LIANG Ying-Mei^{2*}

(1. College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

(2. Museum of Beijing Forestry University, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

(3. College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to screen and characterize antagonistic bacteria against *Alternaria tenuissima*, the causal agent of jujube shrinking fruit disease, and to study their antagonistic effects. [Methods] Serial dilutions and a dual culture technique were used for screening bacteria. The bacteria were identified based on morphological, physiological and biochemical features, and a phylogenetic analysis was conducted on an alignment of 16S rRNA gene sequences. Evaluation of the control activity and efficacy of fermentation filtrates against *A. tenuissima* was carried out by a dual

基金项目: 国家“十二五”科技支撑课题(No. 2012BAD19B08)

*通讯作者: Tel: 86-10-62336316; 信箱: liangym@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2014-10-20; 接受日期: 2014-12-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-01-22

culture assay, microscopic inspection and a spore germination test. Crude active proteins were separated by an ammonium sulfate method. **[Results]** Two strains of bacteria, STO-12 and STO-45, that were isolated and screened from the soil exhibited excellent inhibition against the fungal pathogen. Based on molecular, morphological, physiological and biochemical features, the two strains were identified as *Bacillus subtilis*. However, the two strains differed in the production of a pigment that was shorter in length in STO-12 than in STO-45. The fermentation filtrate, the supernatant and the cell-free filtrate of both strains exhibited excellent inhibition against the strain MY5 with a dual culture assay. Further effects of the cell-free filtrate of STO-45 on the pathogen included inhibition of germ tube and hyphal growth, and abnormally swollen or degraded hyphae and germ tubes. Crude active extracellular proteins of STO-45 isolated by an ammonium sulfate method proved to restrain the growth of hyphae. **[Conclusion]** Both STO-12 and STO-45 strains of *B. subtilis* have potential for the biological control of jujube shrinking fruit disease.

Keywords: Fruit shrink disease of *Ziziphus jujuba*, *Alternaria tenuissima*, *Bacillus subtilis*, Identification, Inhibition rate

枣树(*Ziziphus jujuba* Mill.)是我国最具代表性的民族果树之一,特别在山、沙、碱、贫地区对农民脱贫和财政自立中占有特殊的重要地位。目前,我国枣树占世界的99%左右。除黑龙江、吉林、西藏外,各省市、自治区均有栽培枣树。其中,新疆凭借其得天独厚的自然资源优势,建设有中国 and 世界上最大的优质枣生产基地。截至2011年底,新疆红枣种植面积已超过 3.3×10^5 hm²,产量超过30万t。红枣产业已成为新疆南疆果农致富增收的支柱产业^[1]。但自20世纪70年代以来,枣缩果病(Fruit shrink disease of *Z. jujuba*)在我国各大产枣区屡有发生。一般年份果实受害率为20%,严重年份高达70%以上,造成枣果品质降低、产量下降,直接制约枣营养价值和经济价值,严重威胁枣产业可持续发展,成为阻碍枣高产、稳产的毁灭性病害。尤其是2010年该病在新疆大暴发,果农损失惨重。因此,寻找高效防治枣缩果病病原菌的措施已成为枣产业亟待解决的难题。

枣缩果病又名枣铁皮病、枣黑斑病、枣干腰病、枣萎蔫果病、枣雾蔫病和枣褐腐病等。各地区对该病害的报道不尽相同,认为是由单一病原或两种以上病原混合侵染引起的,如王叶等^[2]报道,病原为 *Alternaria tenuissima*、*A. alternata*、*Fusicoccum aesculi* Corda 等[现拉丁名为 *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not.]、

Phoma glomerata、*A. Yaliinficiens* R.G. Roberts 等,王军等^[3]报道是 *A. alternata*,林忠敏等^[4]报道为 *A. tenuis* [根据 Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>),该种是 *A. alternata* 的同种异名]和 *Phoma* sp.。为了明确新疆地区枣缩果病的病原菌,本课题组从感病枣果上分离并通过科氏法则验证了 *A. tenuissima* 和 *A. alternata* 均为病原菌,隶属于子囊菌门格孢腔菌目 Pleosporales。病原菌通过自然伤口侵染所致,导致果皮变色干缩,果肉海绵状坏死且味苦,枣果变小,果柄提前形成离层致使果实脱落,常常导致大面积的大幅度减产甚至绝收^[5-6]。

目前,随着病害综合防治方法的深入研究,通过物理、化学、生物防治及抗病种质筛选等方法防治枣缩果病呈多元化趋势。其中,选育高抗品种(如曙光2号)防治枣缩果病^[7-8],利用植物提取物(如万寿菊乙酸乙酯粗提物)抑制枣缩果病病原菌 *A. alternata* 等方法已见成效^[9],但存在生产周期较长,开发成本高等局限性。通过化学试剂防治枣缩果病在实际应用中最为普遍。但是,长期应用化学药剂会造成病原菌产生抗药性,导致药效降低、成本高、环境污染和果实农药残留等问题^[10-11]。21世纪人们的食品消费取向焦点集中在安全食品和生态环保产品,因此,将生物防治方法应用在枣缩果病防治中,不仅环保健康,而且不降低经济效益。近年来,

将微生物应用于枣病害防治已有报道。例如: 薛梦林^[12]筛选出了有效抑制采摘后冬枣病害的拮抗细菌和拮抗酵母菌。牛晓科^[13]发现采用龟裂链霉菌防治灰枣红点软腐病菌(*Botryosphaeria dothidea*)效果最好。Qin 等^[14]将罗伦隐球酵母(*Cryptococcus laurentii*)和醚菌酯结合使用, 可显著增强采摘后枣果褐腐菌(*Monilinia fructicola*)的防治效果, 上述研究成果为应用生物防治方法于枣缩果病提供了思路。目前, 生物防治枣缩果病的研究多针对于病原菌 *A. alternata*, 而尚未发现针对病原 *A. tenuissima* 的生防细菌的报道。因此本文以新疆枣缩果病病原 *A. tenuissima* MY5 为防治对象, 最终筛选、鉴定出能够有效抑制该病原菌的拮抗菌株, 并探究了其抑菌效果。运用生防制剂防治枣缩果病不仅有益于打造健康枣产品, 而且保护生态环境, 并有助于可持续发展综合防治。本研究为探索安全有效防治枣缩果病的措施及阐明菌株的拮抗机制奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试枣缩果病病原细极链格孢菌株 *Alternaria tenuissima* MY5 由本课题组从新疆和田地区墨玉北开发区的感病枣果上通过科氏法则分离获得, 并保存于北京林业大学省部共建森林培育与保护教育部重点实验室。

1.2 拮抗菌的分离和筛选

称取不同健康枣树根际土壤各 5 g, 分别用 50 mL 无菌水浸泡土壤, 于室温轻微振荡 24 h。取悬浊液 1 mL, 采用系列稀释法分离细菌, 24 h 内用划线法进行菌株纯化并保存。以枣缩果病菌株 *A. tenuissima* MY5 为目标测试菌, 通过平板对峙法^[12]筛选对测试菌有显著抑菌圈带的菌株作为待选拮抗菌保存备用^[15]。

1.3 拮抗菌的鉴定

1.3.1 菌体形态观察及生理生化特性测定: 参照《常见细菌系统鉴定手册》及《芽孢杆菌属》中介绍的方法, 观察菌株 STO-12 和 STO-45 的菌体

及菌落形态, 测定甲基红和 V-P 反应, 氧化酶及接触酶反应, 酪蛋白、淀粉及纤维素等的水解活性试验, 以及对多种糖类、柠檬酸盐及丙酸盐利用等试验^[16-17]。

1.3.2 拮抗菌 16S rRNA 基因序列测定及分析: 分别以菌株 STO-12 和 STO-45 的 DNA 为模板, 采用引物 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3')和 1387R (5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-3')^[18], 依据文献[19]所述方法, 对两菌株的 16S rRNA 基因分别进行 PCR 扩增。PCR 产物送英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序, 序列经 BioEdit 7.0.1 和 ClustalX 1.83 比对、校正和编辑后, 采用 PAUP* 4.0b10 中的最大简约法(Maximum parsimony analysis, MP)和 MrBayes 3.1.2 中的马尔可夫链蒙特卡尔法(Markov Chain Monto Carlo, MCMC)进行系统发育树的构建。外群选择参照文献[20-21]。

1.4 拮抗活性探究

1.4.1 拮抗菌株的发酵液、上清液及无菌滤液制备: 将拮抗菌株 STO-12 和 STO-45 的单菌落分别接种至 NB 培养基中, 28 °C、200 r/min 振荡培养 24 h 作为各自的种子液。将各种子液按 5% (体积比)的接种量分别转接至 LB 培养基中, 28 °C、200 r/min 振荡培养 72 h 后即得各菌株的发酵液, 随后将发酵液分别于 13 000 r/min 离心 10 min, 获得各菌株的离心上清液。取上清液用 0.45 μm 无菌滤膜分别过滤, 获得两拮抗菌株各自的无菌滤液^[22]。

1.4.2 拮抗菌抑菌活性测定: 通过平板对峙法, 分别检测菌株 STO-12 和 STO-45 的发酵液、离心上清液及无菌滤液对枣缩果病菌 *Alternaria tenuissima* MY5 的抑制效果。将 MY5 菌饼置于平板中央, 培养 1.5 d。同一皿内处理如下: 用打孔器在距菌落 2 cm 的四个方向各打一孔, 在 4 个孔内分别注入 LB 培养基(作为对照)、拮抗菌株的发酵液、离心上清液及无菌滤液各 20 μL。两菌株各处理分别设置 3 个重复。于 25 °C 培养, 连续观察各孔周围是否产生抑菌圈带^[23-24]。

1.5 拮抗特性

为进一步深入研究无菌滤液的拮抗特性,以下试验以菌株 STO-45 为代表设计。

1.5.1 无菌滤液的抑菌率测定:将菌株 STO-45 的无菌滤液分别按以下体积浓度:0.1%、0.2%、0.4%、0.5%、0.8%、1.0%、2.0%与温热的 PDA 培养基混合倒平板,并用 LB 培养基与 PDA 混合作为对照(CK)。将测试菌菌饼分别接种于各处理平板中央后,于 25 °C 培养 7 d,观察不同体积浓度滤液抑菌效果,测量菌落直径并计算抑菌率^[22,25-26],计算公式如下:平均菌落直径(cm)=[菌落直径-菌饼直径(0.5 cm)]/处理数;抑菌率(%)=[(CK 平均菌落直径-处理组平均菌落直径)/CK 平均菌落直径]×100%。

1.5.2 无菌滤液对测试菌 MY5 菌丝的影响:将 0.5%无菌滤液与 PDA 培养基混匀倒平板,挑取测试菌 MY5 菌丝,以载玻片培养法,用滤纸保湿培养皿在 25 °C 培养,2 d 后镜检观察。以未接菌的 LB 培养基代替无菌滤液为对照^[27-30]。

1.5.3 滤液对测试菌 MY5 孢子萌发的影响:用无菌水冲洗测试菌 MY5 菌落获得孢子悬浮液,分别将无菌滤液和 MY5 孢子悬浮液各 30 μL 加入凹玻片内,采用载玻片培养法,于 25 °C 培养在滤纸保湿培养皿中,2 d 后镜检观察。以无菌 LB 培养基代替无菌滤液为对照^[27-30]。

1.6 蛋白粗提液抑菌活性测定

在 60 mL STO-45 发酵上清液中,边搅拌边加入固体硫酸铵至 40%、50%饱和度,于 4 °C 静置 24 h 后,12 000 r/min 离心收集沉淀。用上清液体积 1/20 的 0.02 mol/L PBS 缓冲液(pH 6.8)溶解沉淀后,置于透析袋(截留分子量 8 000-14 000)中。将透析袋放入相同浓度的 PBS 缓冲液中透析 36 h 后,取透析液 12 000 r/min 离心 20 min,在超净工作台中用 0.45 μm 无菌滤膜过滤上清液得蛋白粗提液。采用牛津杯法测定蛋白粗提液抑菌活性:将测试菌 MY5 菌饼置于 9 cm PDA 平板中央,

25 °C 培养 2 d 后,在距菌饼 2 cm 的两对称点各放置牛津杯并分别注入 200 μL 无菌蛋白粗提液,25 °C 培养 7 d,以 200 μL PBS 缓冲液代替蛋白粗提液为对照^[31-33]。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌筛选

用平板对峙法最终筛选出两株拮抗菌株,编号为 STO-12 和 STO-45,其对目标测试菌 *Alternaria tenuissima* MY5 表现出明显抑制作用(图 1),平均抑菌带宽分别为 7.9 mm 和 6.6 mm。

2.2 拮抗菌 STO-12 和 STO-45 的培养及生理生化特性

菌株 STO-12 的菌体大小为(0.8-1.2) μm×(1.1-2.0) μm,革兰氏染色阳性(图 2A)。兼性好氧,杆状。在营养琼脂(NA)平板上生长 24 h 后,菌落橘红色,粘稠,不透明,多数菌落中央轻微隆起,有褶皱,边缘光滑。

菌株 STO-45 的菌体大小为(0.5-0.8) μm×

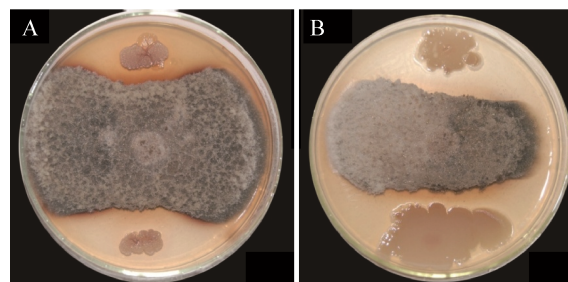


图 1 拮抗菌株 STO-12 (A)和 STO-45 (B)分别对测试菌 MY5 的抑菌带(25 °C, 7 d)

Figure 1 Inhibition zones of STO-12 (A) and STO-45 (B) against *Alternaria tenuissima* MY5 (25 °C, 7 d)

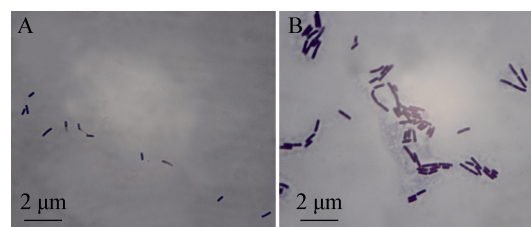


图 2 菌株 STO-12 (A)及菌株 STO-45 (B)菌体形态

Figure 2 Thalli shape of STO-12 (A) and STO-45 (B) strains

(2.0–3.1) μm, 革兰氏染色阳性(图 2B)。好氧, 杆状, 芽孢中生。在 NA 平板上生长 24 h 后, 菌落为白色, 粘稠, 不透明, 多数表面干燥光滑, 边缘圆滑。

两拮抗菌株的生理生化特征试验结果基本一致, 其中 V-P 试验、接触酶反应均为阳性, 根据东秀珠、蔡妙英等研究^[16-17], 将两菌株初步鉴定到芽孢杆菌属。生理生化特征试验显示(表 1): 两菌株 VP 试验、硝酸盐还原试验、明胶液化试验均表现为阳性, 能够水解酪蛋白、淀粉、纤维素及果胶, 均能利用葡萄糖、甘露醇等多种糖类物质, 都能利用柠檬酸盐; 但两菌株在生理生化上还具有一定差异: 菌株 STO-12 的氧化酶活性、吲哚试验及丙氨酸利用试验表现为阴性; 而菌株 STO-45 甲基红试验表现为阴性。

2.3 16S rRNA 基因序列分析

从基于最大简约法构建的 16S rRNA 基因系统发育树(TL=4520, CI=0.344, RI=0.517, RC=0.277, HI=0.656; 图 3)可以发现: 菌株 STO-12、STO-45 与模式菌株枯草芽孢杆菌(HE852781)聚类在同一大分支内(支持率 100% MP, 1.00 BPP), 支持该菌株为枯草芽孢杆菌。但两菌株在大分支内部形成独立分支(支持率 98% MP, 1.00 BPP), 说明该生防菌株与模式菌株不完全相同, 且两菌株之间存在差异。

结合两菌株的培养特性、形态及生理生化特征和系统发育关系, 对照《常见细菌鉴定手册》及《芽孢杆菌属》^[14-15], 最终确定两菌株均为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* Cohn。

2.4 拮抗菌抑菌活性及抑菌效果测定

通过杯碟法试验结果可以明显看出: 与对照相比(图 4 中 CK), 拮抗菌 STO-12 和 STO-45 的发酵液(图 4 中 a)、离心上清液(图 4 中 b)及发酵滤液(图 4 中 c)均对测试菌 MY5 具有明显抑制活性。其中, 上清液抑菌效果最优, 滤液抑菌效果相对较弱。

因两菌株均为枯草芽孢杆菌, 且由结果 2.1 可知, 菌株 STO-45 抑菌效果稍优于菌株 STO-12, 所以后期抑菌特性研究均选用菌株 STO-45 为试验对象。

发酵滤液浓度梯度平皿抑制试验结果(图 5)进一步验证了拮抗菌 STO-45 的发酵产物具有抑菌物质, 对测试菌 MY5 的菌落生长有一定抑制效果。随着菌株 STO-45 发酵滤液浓度依次增加(0.1%<0.2%<0.4%<0.5%<0.8%<1.0%<2.0%), 测试菌 MY5 菌落平均直径逐渐减小(图 5 中 b–h), 且 MY5 菌落产孢现象越来越明显。说明拮抗菌 STO-45 发酵滤液能够明显阻碍 *A. tenuissima* MY5 菌丝生长, 并促使其产生分生孢子。

对上述平皿抑制试验的结果分析发现(图 6): 测

表 1 菌株 STO-12 和 STO-45 的生理生化特征					
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of STO-12 and STO-45					
指标 Index	结果 Results		指标 Index	结果 Results	
	STO-12	STO-45		STO-12	STO-45
氧化酶 Oxidase	–	+	纤维素水解 Cellulose hydrolysis	+	+
接触酶 Catalase	+	+	果胶水解 Pectin hydrolysis	+	+
甲基红试验 Methy-red reaction	+	–	葡萄糖发酵产酸 Acid from glucose	+	+
V-P 试验 V-P reaction	+	+	甘露醇利用 Utilization of mannitol	+	+
吲哚试验 Indol reaction	–	+	麦芽糖利用 Utilization of maltose	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	乳糖 Utilization of lactose	+	+
酪蛋白水解 Casein hydrolysis	+	+	蔗糖 Utilization of sucrose	+	+
明胶液化 Gelatin hydrolysis	+	+	柠檬酸盐利用 Utilization of citrate	+	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	+	丙酸盐利用 Utilization of propionate	–	+

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

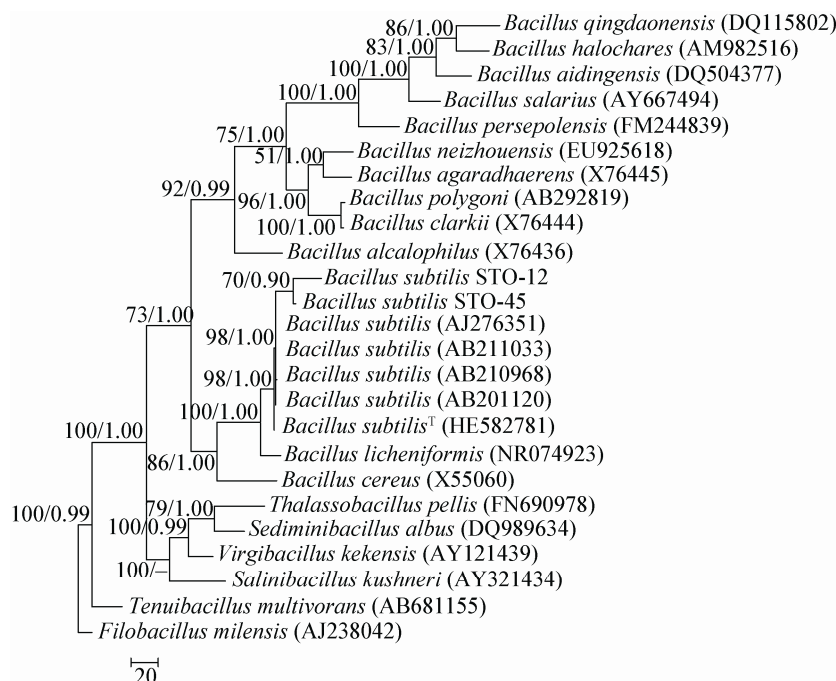


图3 菌株 STO-12 和 STO-45 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank.

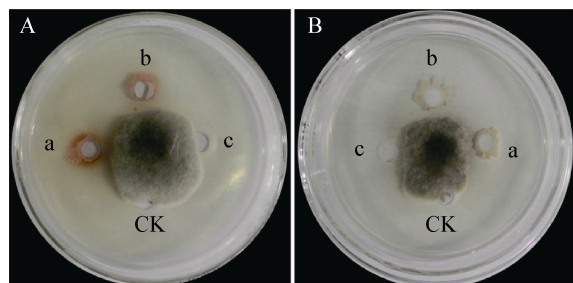


图4 拈抗菌 STO-12 (A)和 STO-45 (B)发酵产物对测试菌 MY5 的抑制活性(25 °C, 3 d)

Figure 4 Inhibition activity of fermentation production of STO-12 (A) and STO-45 (B) against MY5 (25 °C, 3 d)

注: CK: LB 培养基对照; a: 发酵液对峙处理; b: 上清液对峙处理; c: 无菌滤液对峙处理。

Note: CK: Control; a: Fermentation broth; b: Culture supernatant; c: Cell-free filtrate.

试菌 MY5 菌落直径与 STO-45 无菌滤液浓度呈反比, 即无菌滤液对菌株 MY5 抑制效率与滤液浓度呈正比。与对照相比, 仅 0.1% 的滤液浓度就有 10.04% 的抑菌率, 且 1%、2% 浓度的滤液抑菌率达

90% 以上; 无菌滤液对菌株 MY5 生长抑制中浓度 (IC_{50}) 约为 0.8%。

2.5 STO-45 滤液对测试菌 MY5 抑制显微观察

显微观察发现 STO-45 无菌滤液对测试菌 MY5 菌丝及芽管均具有明显致畸作用(图 7)。对照组 MY5 的菌丝粗细均匀、生长良好, 细胞形态长而均匀(图 7A), 用 STO-45 无菌发酵滤液处理后, 菌丝生长受到抑制, 隔膜增多、变短加粗(图 7C、D), 明显膨胀(图 7B、D), 甚至破裂(图 7B)。

经无菌滤液处理后, 测试菌 MY5 孢子萌发率虽无明显变化, 但是芽管无法像正常芽管一样(图 8A)生长而呈现异常膨大(图 8B-D)。

2.6 拈抗菌 STO-45 粗蛋白抑菌活性测定

粗蛋白抑菌活性测定结果(图9)发现: 对照组菌落正常生长(图9A), 而处理组中, 在含有经硫酸铵饱和度40 (图9B)和硫酸铵饱和度50 (图9C)盐析获得的粗蛋白的牛津杯周围, 形成了明显抑菌带, 并且测试菌MY5菌落产生大量孢子, 并导致孢子无法

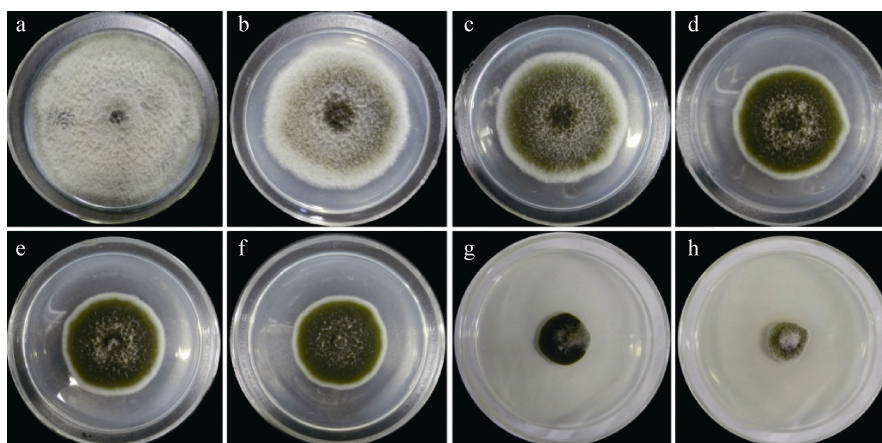


图5 不同浓度 STO-45 无菌滤液对病原菌 MY5 的抑菌率(25 °C, 7 d)

Figure 5 Inhibition rate against *Alternaria tenuissima* MY5 by cell-free filtrate of different concentration (25 °C, 7 d)

注: a: LB培养基对照; b-h: 拮抗菌STO-45滤液占培养基体积浓度0.1%、0.2%、0.4%、0.5%、0.8%、1.0%、2.0%。

Note: a: Control; b-h: treat with 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.5%, 0.8%, 1.0%, 2.0% cell-free filtrate.

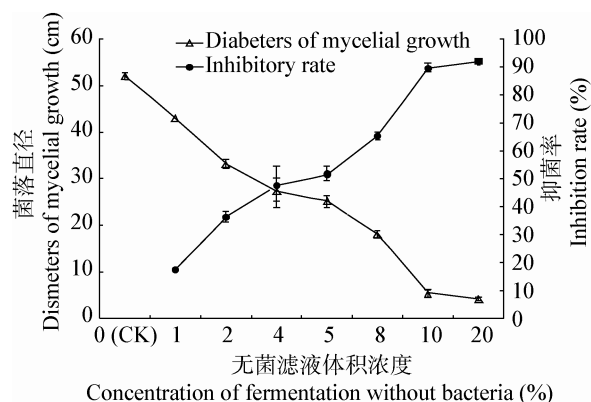


图6 不同浓度拮抗菌 STO-45 无菌滤液对病原菌 MY5 的抑菌率

Figure 6 Inhibition rate against MY5 by different concentration of cell-free filtrate of the strain STO-45

正常萌发成菌丝。结果表明, 菌株 STO-45 发酵液中的蛋白质对测试菌 MY5 的生长具有明显抑制作用, 含有抑菌物质, 但这两种硫酸铵饱和度和盐析获得的粗蛋白抑菌效果差异不明显。

3 结论与讨论

近年来, 枣缩果病严重制约产枣区经济发展, 用生防制剂防治枣缩果病也偶有报道, 如王军等^[34]发现枯草芽孢杆菌发酵液蛋白能够抑制冬枣缩果病病原 *Alternaria alternata* (Fr) Keissler。但是, 目前应用生防细菌防治枣缩果病病原菌 *A. tenuissima*

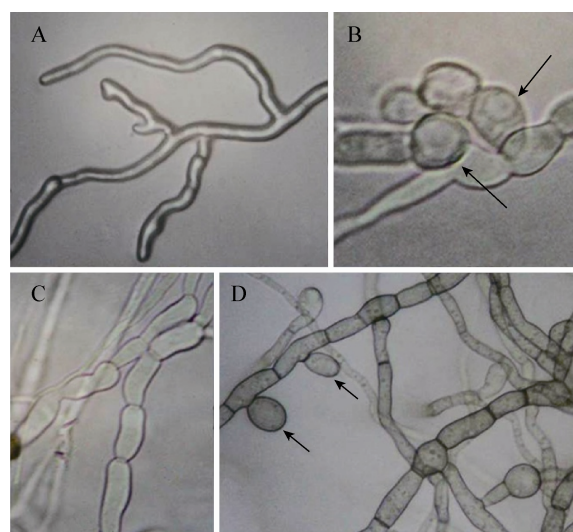


图7 拮抗菌 STO-45 发酵滤液对菌株 MY5 菌丝的影响 (400×, 2 d)

Figure 7 Effects of cell-free filtrate of the strain STO-45 on the hypha of MY5 (400×, 2 d)

注: A: 对照; B-D: 拮抗菌STO-45发酵滤液处理后MY5菌丝形态(箭头标示菌丝膨大或破裂部分)。

Note: A: CK; B-D: Treat with cell-free filtrate the strain STO-45 (the arrows directed abnormally swollen or degraded hyphae).

相关研究尚未有报道。因此, 本研究以枣缩果病病原菌株 *A. tenuissima* MY5 为目标测试菌, 从新疆健康根际土壤中筛选出两株具有较好应用潜力的拮抗菌株 STO-12 和 STO-45, 经鉴定两菌株均为枯草芽孢杆菌。经多次传代培养进行拮抗试验证明, 两菌

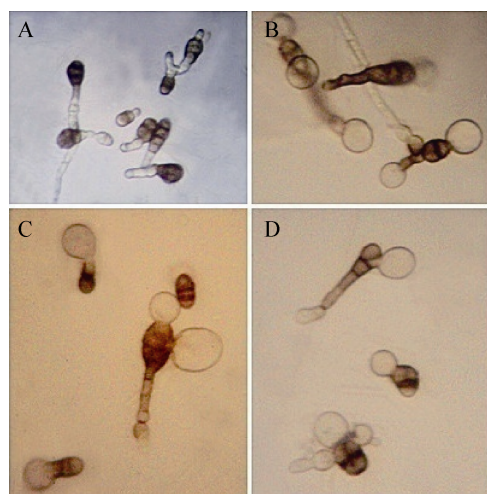


图8 拮抗菌 STO-45 发酵滤液对菌株 MY5 孢子萌发的影响(400×)

Figure 8 Effects of cell-free filtrate STO-45 without bacteria on the spore germination of MY5 (400×)

注: A: 对照; B-D: 拮抗菌 STO-45 发酵滤液处理后 MY5 孢子形态。

Note: A: CK; B-D: Treat with cell-free filtrate of the strain STO-45.

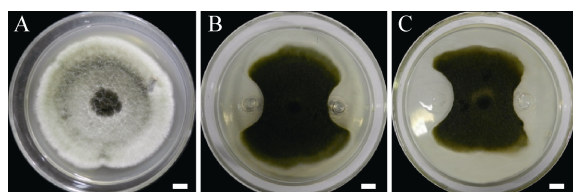


图9 拮抗菌 STO-45 蛋白粗提液对测试菌 MY5 的抑制活性(25 °C, 7 d)

Figure 9 Inhibition activity of crude protein of the strain STO-45 against *Alternaria tenuissima* MY5 (25 °C, 7 d)

注: A: 对照; B: 硫酸铵饱和浓度40%获得的粗蛋白与 MY5 对峙试验; C: 硫酸铵饱和浓度50%获得的粗蛋白与 MY5 对峙试验。

Note: A: CK; B: Saturation of ammonium sulfate was 40% for precipitating antifungal protein; C: Saturation of ammonium sulfate was 50% for precipitating antifungal protein.

株对测试菌 MY5 均表现出稳定的拮抗性。

枯草芽孢杆菌广泛分布于环境中, 可以通过竞争作用、抗生作用、溶菌作用以及促进植物生长等几个方面来达到抑制病原菌扩展、发展及暴发, 进而达到防治病害的目的^[35-37]。本研究在利用拮抗菌 STO-12、STO-45 分别与测试菌 MY5 的对峙试验中发现, 两拮抗菌株均能产生明显抑菌圈带, 该现象

说明拮抗菌 STO-12 和 STO-45 均能够分泌抑菌物质, 表现出抗生作用。而且, 经 STO-45 无菌发酵滤液处理的测试菌 MY5 的菌丝生长受到显著抑制: 细胞分隔缩短, 菌丝和芽管膨大, 并出现畸变及破裂现象。结果充分表明该菌株可以分泌破坏真菌细胞壁结构成分的抑菌物质, 从而抑制真菌生长和繁殖。

在将拮抗菌株开发成生物制剂过程中, 对其发酵产物抑菌活性及抑菌效果的测定至关重要。本试验发现拮抗菌 STO-12 和 STO-45 的发酵液、离心上清液及发酵滤液对测试菌 MY5 均具有明显抑制活性, 其抑菌效率由强至弱依次为离心上清液、无菌滤液、发酵液。说明拮抗菌 STO-12 和 STO-45 的抑菌物质主要为无菌滤液的代谢产物。上清液中含有少量菌体能够继续产生抑菌物质, 因此其抑菌效果比无菌滤液效果强, 但发酵液中主要为拮抗菌菌体, 抑菌物质含量少, 且由于其处于新环境中, 代谢产物分泌量少。此外, 拮抗菌株 STO-45 无菌发酵滤液抑菌效率与浓度有关, 浓度越大, 抑菌效果越强。然而菌株 STO-45 滤液能够在 0.8% 的低体积浓度对测试菌 MY5 的平均抑菌率达 50%, 说明拮抗菌株 STO-45 发酵产物具有高效抑菌效率。该结论与 He 等^[25]和 Chan 等^[26]研究结果相似, 为进一步确定开发生物农药施用浓度标准、检测不同浓度抑菌物质对病原菌的抑制效率, 提供了抑制中浓度值参考。

另外, 抑菌酶类在抑菌蛋白物质中占有很大比重。据报道, 枯草芽孢杆菌能够产生几丁质酶(或几丁质酶类似物)、纤维素酶、葡聚糖酶等多种物质, 从而对多种真菌细胞壁起到破坏作用^[38-39]。本研究通过蛋白粗提液对 MY5 的抑制试验, 结果表明: 菌株 STO-45 能够分泌蛋白类抑菌物质。研究发现, *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908 所产生的蛋白类物质及 *Paenibacillus ehimensis* KWN38 产生的酶类物质使病原菌丝畸变甚至破裂^[27-28]。本研究枯草芽孢杆菌菌株 STO-45 滤液同样能够导致 *A. tenuissima* MY5 菌丝的畸变或破裂, 且其致畸作

用更显著。同时,其滤液导致测试菌芽管畸形膨大。结合抑菌效率结果分析得出:菌株 STO-45 的发酵滤液抑制测试菌 MY5 菌丝的同时,诱导测试菌产生孢子而孢子无法正常萌发,进而导致测试菌 MY5 无法正常生长和扩展。由此推测,菌株 STO-45 分泌的抑菌蛋白类物质有可能作用在测试菌 MY5 的细胞壁上,但其具体作用机制有待进一步研究。

本研究结果表明拮抗菌株 STO-12 和 STO-45 具有潜在的研究价值,为其在后期拮抗机理的深入研究奠定了基础。同时,为把拮抗菌株 STO-45 开发成菌剂及蛋白类生防制剂,从而应用于枣缩果病的生防实践创造了先决条件和契机。

参 考 文 献

- [1] Ma R, Zhang CY, Liu Y, et al. Laboratory fungicide screening for *Alternaria* sp. black spot pathogen on jujube in Xinjiang[J]. *Agrochemicals*, 2012, 51(10): 767-770 (in Chinese)
马荣, 张传燕, 刘玉, 等. 新疆红枣黑斑病菌的室内杀菌剂筛选[J]. *农药*, 2012, 51(10): 767-770
- [2] Wang Y. The identification of pathogen fungi causing Jujube fruit diseases and diversity of *Alternaria* pathogens[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2013 (in Chinese)
王叶. 枣果实病原真菌的鉴定及链格孢属病原真菌多样性研究[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2013
- [3] Wang J, Xin YC. Jujube black spot pathogen isolation and identification[J]. Qingdao Agricultural University (Natural Science Edition), 2007, 24(1): 21-23 (in Chinese)
王军, 辛玉成. 冬枣黑斑病原的分离与鉴定[J]. *青岛农业大学学报: 自然科学版*, 2007, 24(1): 21-23
- [4] Lin ZM, Zhao XJ, Zhao ZJ, et al. Isolation and identification of jujube fruit black spot[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2001, 29(1): 74-77 (in Chinese)
林忠敏, 赵晓军, 赵子俊, 等. 红枣果实黑斑病的病原分离和鉴定[J]. *山西农业科学*, 2001, 29(1): 74-77
- [5] Song TL, Wang WJ, Liu MJ, et al. Advances in research on Chinese jujube fruit shrink disease[C]. Beijing: China Forestry Publishing, 2013: 236-239 (in Chinese)
宋韬亮, 王文江, 刘孟军, 等. 枣缩果病研究进展[C]. 北京: 中国林业出版社, 2013: 236-239
- [6] Zhang CH, Liu MJ, Zhou JY, et al. Advances in research on Chinese jujube fruit shrink disease[J]. *Hebei Journal of Forestry and Orchard Research*, 2008, 23(1): 62-65, 81 (in Chinese)
张朝红, 刘孟军, 周俊义, 等. 枣缩果病研究进展[J]. *河北林果研究*, 2008, 23(1): 62-65, 81
- [7] Wang LH, Wang ZL, Yang ZJ. 'Shuguang2': a new resistance against jujube fruit shrink disease of jujube[J]. *The Journal of Hebei Forestry Science and Technology*, 2012(5): 107-108 (in Chinese)
王丽华, 王振亮, 杨振江. 抗缩果病枣新品种-曙光2号的选育[J]. *河北林业科技*, 2012(5): 107-108
- [8] Zhang CH, Liu MJ, Kong DC, et al. Diversification of resistance to fruit shrink disease in Chinese jujube germplasm[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2011, 12(5): 539-545 (in Chinese)
张朝红, 刘孟军, 孔得仓, 等. 枣种质缩果病抗性多样性研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(5): 539-545
- [9] Meng X, Hu JJ, Ji WR, et al. Studies on the stability of the extract from the roots of *Tagetes erecta* on fruit shrink disease of *Ziziphus jujube*[J]. *Plant Protection*, 2013, 39(2): 72-76 (in Chinese)
孟翔, 胡俊杰, 冀卫荣, 等. 万寿菊根乙酸乙酯粗提物对枣缩果病的抑菌稳定性研究[J]. *植物保护*, 2013, 39(2): 72-76
- [10] Forget G. Pesticides and the third world[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1991, 32(1): 11-31
- [11] Wang WQ, Zhang XF, Han XY, et al. Drug resistance of vegetable diseases and its countermeasure in North China[J]. *China Vegetables*, 2010(23): 20-23 (in Chinese)
王文桥, 张小风, 韩秀英, 等. 我国北方蔬菜病害抗药性问题及治理对策[J]. *中国蔬菜*, 2010(23): 20-23
- [12] Xue ML. Biological control of postharvest diseases of jujube fruit using antagonist[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest Agriculture & Forestry University, 2006 (in Chinese)
薛梦林. 拮抗菌对冬枣采后病害的生物防治[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2006
- [13] Niu XK. Identification of the pathogen causing fruit soft rot in *Ziziphus jujube* and its control[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2009 (in Chinese)
牛晓科. 灰枣红点软腐病原鉴定及其防治研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2009
- [14] Qin GZ, Tian SP. Biocontrol of postharvest diseases of jujube fruit by *Cryptococcus laurentii* combined with a low dosage of fungicides under different storage conditions[J]. *Plant Disease*, 2004, 88(5): 497-501
- [15] Zhou DQ. Laboratory Manual of Microbiology[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1986: 40-42 (in Chinese)
周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 40-42
- [16] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial Identification System Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 349-398 (in Chinese)
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: 349-398
- [17] Cai MY, Liu YT, Zhan LK, et al. *Bacillus*[M]. Beijing: Agriculture Press, 1983: 19-108 (in Chinese)
蔡妙英, 刘聿太, 战立克, 等. 芽孢杆菌属[M]. 北京: 农业出版社, 1983: 19-108
- [18] Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, et al. Design and evaluation

- of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(2): 795-799
- [19] Liang YM, Zhang LQ, Wang YC, et al. Airborne microorganism pollution and its assessment in certain municipal solid waste landfill[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2010, 19(5): 1073-1077 (in Chinese)
梁英梅, 张立秋, 王跃超, 等. 垃圾填埋场空气微生物污染及评价[J]. 生态环境学报, 2010, 19(5): 1073-1077
- [20] Hassan MA, Haroun BM, Amara AA, et al. Production and characterization of keratinolytic protease from new wool-degrading *Bacillus* species isolated from Egyptian ecosystem[J]. Biomed Research International, 2013: 175012
- [21] Didari M, Amoozegar MA, Bagheri M, et al. *Alteribacillus bidgolensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake, and reclassification of *Bacillus persepolisensis* as *Alteribacillus persepolisensis* comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(11): 2691-2697
- [22] Xie ZH, Gao J, Wang JY, et al. Isolation and identification of an antagonistic bacterium against *Rhizoctonia solani*, the causing agent of rice sheath blight[J]. Microbiology China, 2012, 39(4): 477-485 (in Chinese)
谢宗华, 高健, 王金玉, 等. 一株水稻纹枯菌拮抗细菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2012, 39(4): 477-485
- [23] Chernin L, Ismailov Z, Haran S, et al. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(5): 1720-1726
- [24] Edward EJ, King WS, Teck SLC, et al. Antagonistic activities of endophytic bacteria against *Fusarium* wilt of black pepper (*Piper nigrum*)[J]. International Journal of Agriculture & Biology, 2013, 15(2): 1814-9596
- [25] He L, Zhou GY, Lu LL, et al. Isolation and identification of endophytic bacteria antagonistic to *Camellia oleifera* anthracnose[J]. African Journal of Microbiology Research, 2009, 3(6): 315-318
- [26] Chan YS, Wong JH, Fang EF, et al. An antifungal peptide from *Phaseolus vulgaris* cv. brown kidney bean[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2012, 44(4): 307-315
- [27] Kim PI, Chung KC. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 234(1): 177-183
- [28] Naing KW, Anees M, Kim SJ, et al. Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups[J]. Annals of Microbiology, 2014, 64(1): 55-63
- [29] Fan XJ, Huang W, Qiu SX, et al. Isolation and identification of endophytic bacterial strains from *Ginkgo biloba* and their antimicrobial activities[J]. Microbiology China, 2013, 40(9): 1638-1648 (in Chinese)
范晓静, 黄未, 邱思鑫, 等. 银杏内生细菌的分离鉴定及抑菌活性初探[J]. 微生物学通报, 2013, 40(9): 1638-1648
- [30] Zhang YQ, Lai HX, Wei XM, et al. Screening and identification and antagonism research of two biocontrol *Bacillus* strains[J]. Microbiology China, 2014, 41(2): 281-289 (in Chinese)
张艳群, 来航线, 韦小敏, 等. 两株生防芽孢细菌筛选、鉴定及拮抗研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(2): 281-289
- [31] Cui TB, Chai HY, Jiang LX. Isolation and partial characterization of an antifungal protein produced by *Bacillus licheniformis* BS-3[J]. Molecules, 2012, 17(6): 7336-7347
- [32] Chen ZT, Ao JQ, Yang WC, et al. Purification and characterization of a novel antifungal protein secreted by *Penicillium chrysogenum* from an Arctic sediment[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2013, 97(23): 10381-10390
- [33] Huang HY, Wu ZQ, Tian CM, et al. Identification and characterization of the endophytic bacterium *Bacillus atrophaeus* XW2, antagonistic towards *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Annals of Microbiology, 2014. DOI: 10.1007/s13213-014-0974-0
- [34] Wang J, Chen AX, Xin YC. Inhibition effect of crude protein in fermentation liquor of XL12 *Bacillus subtilis* strain on *Alternaria alternata* of black spot in jujube[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2011, 39(2): 114-116 (in Chinese)
王军, 陈爱香, 辛玉成. 枯草芽孢杆菌 XL12发酵液蛋白对冬枣黑斑病原的抑制效果[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(2): 114-116
- [35] Chen Y, Cao S, Chai Y, et al. A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants[J]. Molecular Microbiology, 2012, 85(3): 418-430
- [36] Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, et al. Biosurfactants: potential applications in medicine[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 57(4): 609-618
- [37] Desbois AP, Smith VJ. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(6): 1629-1642
- [38] Bharathi R, Vivekananthan R, Harish S, et al. Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies[J]. Crop Protection, 2004, 23(9): 835-843
- [39] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions[J]. Molecular Microbiology, 2005, 56(4): 845-857