

## 研究报告



## 嗜线虫致病杆菌抑制灰葡萄孢的效应

曹林青<sup>2</sup> 詹发强<sup>\*1</sup> 高宇洁<sup>2</sup> 侯新强<sup>1</sup> 包慧芳<sup>1</sup> 侯敏<sup>1</sup> 杨蓉<sup>1</sup> 王宁<sup>1</sup> 龙宣杞<sup>\*1</sup>

1 新疆农业科学院微生物应用研究所/新疆特殊环境微生物重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830091

2 新疆大学生命科学与技术学院 新疆 乌鲁木齐 830046

**摘要:**【背景】灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)是引起葡萄采后病害的主要病原菌之一,严重影响葡萄的贮期和品质,给葡萄产业带来极大损失。利用拮抗微生物抑制采后病原菌生长已逐渐成为防治葡萄采后灰霉病的重要手段。【目的】利用昆虫病原线虫共生细菌广谱高效的抑菌特性,从现有共生细菌资源中筛选对灰葡萄孢具有高拮抗作用的菌株,为葡萄采后灰霉病的抑制提供新的材料和研究方向。【方法】通过平板对峙培养法和菌丝生长速率法分离筛选拮抗共生细菌,并对优选的高效拮抗共生细菌进行 16S rRNA 基因序列进化分析,采用扫描电镜观察其对灰葡萄孢菌丝生长的影响,利用损伤接种法对红地球葡萄防治效果进行验证。【结果】初步分离筛选共获得 9 株拮抗菌,复筛与复测得到一株抑菌效果显著的共生细菌(命名为 ALL),经进化分析其为嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophila*),其 16S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号为 MW488402,与菌株 *Xenorhabdus nematophila* NC116 聚于同一分支,相似性达 99.79%。扫描电镜观察该菌株导致灰葡萄孢菌丝扭曲变形、表面皱缩、失水塌陷,该菌株发酵(36 h)上清液浓度为 1%时对灰葡萄孢菌丝抑制率达 44.5%。在葡萄常温防效实验中,与对照组比较,ALL 菌株发酵上清液对灰霉菌防治效果较好,3 d 后防效为 63.50%。【结论】本研究应用昆虫病原线虫共生细菌生物防治葡萄贮期灰霉病,筛选出一株高效拮抗灰葡萄孢的昆虫病原线虫共生细菌,而且其上清液对灰葡萄孢具有良好的抑制效果,为生物防治贮期葡萄灰霉病提供了新的生物材料和相关研究基础。

关键词: 昆虫病原线虫, 葡萄灰霉病, 共生细菌, 抑制率

**Foundation items:** Project of Renovation Capacity Building for the Young Sci-Tech Talents Sponsored by Xinjiang Academy of Agricultural Sciences in China (xjnkq-2019016); Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region in China (2019D01A62)

**\*Corresponding authors:** E-mail: ZHAN Faqiang: zfq\_xj@126.com; LONG Xuanqi: longxq\_xj@sina.com

**Received:** 03-02-2021; **Accepted:** 28-05-2021; **Published online:** 27-07-2021

**基金项目:** 新疆农业科学院青年科技骨干创新能力培养项目(xjnkq-2019016); 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2019D01A62)

**\*通信作者:** E-mail: 詹发强: zfq\_xj@126.com; 龙宣杞: longxq\_xj@sina.com

**收稿日期:** 2021-02-03; **接受日期:** 2021-05-28; **网络首发日期:** 2021-07-27

## The inhibitory effect of *Xenorhabdus nematophilus* on *Botrytis cinerea*

CAO Linqing<sup>2</sup> ZHAN Faqiang<sup>\*1</sup> GAO Yujie<sup>2</sup> HOU Xinqiang<sup>1</sup> BAO Huifang<sup>1</sup>  
HOU Min<sup>1</sup> YANG Rong<sup>1</sup> WANG Ning<sup>1</sup> LONG Xuanqi<sup>\*1</sup>

1 Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Xinjiang Key Laboratory of Special Environmental Microbiology, Urumqi, Xinjiang 830091, China

2 College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046, China

**Abstract:** [Background] *Botrytis cinerea* is one of the main pathogenic of grapes during postharvest, which seriously affects the storage period and quality of grapes and brings great losses to its industry. The use of antagonistic microorganisms to inhibit the growth of postharvest pathogens has gradually become an important method for the prevention and control of postharvest gray mold in grapes. [Objective] In order to provide new materials and research direction for the inhibition of *Botrytis cinerea* postharvest. Using the broad-spectrum and efficient antibacterial characteristics of entomopathogenic nematode symbiotic bacteria and screening high antagonistic effect on *Botrytis cinerea* from the symbiotic bacteria resources. [Methods] Antagonistic symbiotic bacteria were isolated and screened by plate confrontation culture method and mycelial growth rate method, and antagonistic symbiotic bacteria with highly effective, its 16S rRNA gene phylogeny analysis was carried out. The effect of antagonistic symbiotic bacteria on mycelial growth of *Botrytis cinerea* was studied by scanning electron microscope, and the control effect on Red Globe grape was verified by damage inoculation method. [Results] Nine strains had antagonism were isolated from 14 bacteria, that one of symbiotic bacteria (ALL) was obtained through rescreening and retesting with significant antibacterial effect. According to phylogeny analysis, it clustered in the same branch with strain *Xenorhabdus nematophila* NC116 and 99.79% homology, which was identified to *Xenorhabdus nematophila* (GenBank accession number: MW488402). The strain caused the *Botrytis cinerea* hyphae to distort, shrink and collapse by scanning electron microscopy observation. The inhibition rate of the growth of *Botrytis cinerea* hyphae reached 44.5%, When the supernatant concentration was 1% in medium after fermentation (36 h). Compared with the control group, the fermentation supernatant of strain ALL had a better control effect on *Botrytis cinerea*, and the control effect was 63.50% after 3 days at room temperature. [Conclusion] In this study, we used entomopathogenic nematode symbiotic bacteria to inhibit *Botrytis cinerea* for the first time during grapes storage, and one of entomopathogenic nematode symbiotic bacteria was screened with high efficiency against *Botrytis cinerea*, and its supernatant had good inhibitory effect on *Botrytis cinerea*. The research provided a new biomaterial and related basis for bio-control of *Botrytis cinerea* during grapes storage.

**Keywords:** entomopathogenic nematode, *Botrytis cinerea*, symbiotic bacteria, inhibition rate

葡萄灰霉病是由灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)引起的一种比较常见且危害严重的病害,由于葡萄采后的贮藏环境有利于灰葡萄孢的生长,每年造成葡萄采后的腐烂损失率达 30%以上<sup>[1]</sup>。目前对葡萄灰霉病的防治主要以化学防治为主,采收前施用仲丁胺、苯并咪唑类、多菌灵、乙霉威等化学杀菌剂,采后贮藏用 SO<sub>2</sub>熏蒸等控制病害的发生<sup>[2-3]</sup>,但化学防治葡萄灰霉病导致的农药残留、灰霉菌抗药性

提高以及环保、食品安全等问题日益严重。因此,葡萄灰霉病生物防治受到了越来越多的关注,成为近年来的研究热点之一。目前对葡萄灰霉病的生防菌研究主要包括生防细菌和生防酵母等,生防细菌如多粘类芽胞杆菌、枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌等<sup>[4-6]</sup>,生防酵母主要有毕赤酵母、清酒假丝酵母及膜醭假丝酵母等<sup>[7-9]</sup>。

昆虫病原线虫共生细菌属于肠杆菌科革兰

氏阴性菌,包含致病杆菌属(*Xenorhabdus*)和发光杆菌属(*Photorhabdus*)这 2 个属,分别与斯氏线虫科(*Steinernematidae*)和异小杆线虫科(*Heterorhabditidae*)的昆虫病原线虫互惠共生,共生细菌依靠线虫将其携带进入寄主昆虫体内并释放到昆虫体腔中,在昆虫血腔内大量繁殖并产生杀虫毒素,导致寄主昆虫迅速死亡;同时共生细菌为线虫生长、发育和繁殖提供理想的环境和合适的营养;共生细菌-线虫复合体对多种害虫具有强致病力,其中共生细菌起关键性作用;不同种或同种不同菌株可产生多种杀虫毒素蛋白,是目前已知细菌中具有杀虫毒素基因种类最多的细菌,共生细菌还能够产生多种抑菌、抗肿瘤等功能的代谢产物<sup>[10-13]</sup>。

国内外的许多研究表明,昆虫病原线虫共生细菌 *Xenorhabdus* spp.和 *Photorhabdus* spp.对植物病原菌的菌丝生长有较强的抑制效果,主要集中在生物防治番茄灰霉病、大豆疫霉病、辣椒疫霉病等<sup>[14-15]</sup>。其中,致病杆菌主要包括嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophila*)和伯氏致病杆菌(*Xenorhabdus bovienii*),均是生物高效防治植物病害的潜在细菌生防资源<sup>[16-20]</sup>,但目前利用昆虫病原线虫共生细菌生物防治采后葡萄贮期灰霉病的研究鲜有报道。

本研究以新疆红地球葡萄为材料,利用昆虫病原线虫共生细菌广谱高效的抑菌特性,从现有昆虫病原线虫共生细菌资源中筛选对葡萄灰霉病具有高拮抗作用的共生细菌并初步应用,以期葡萄采后灰霉病的生物防治提供新的生物材料和相关研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病原菌:灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* (GenBank 登录号: MT832025)属嗜低温型灰葡萄孢菌株,由新疆农业科学院农产品贮藏与加工研究所郑素慧副研究员惠赠。

供试葡萄:红地球葡萄,采集于昌吉州三工镇葡萄种植园。

营养肉汤培养基(NB):牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 5.0 g,蒸馏水 1 000 mL。共生细菌鉴别培养基(NBTA):牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 5.0 g,氯化三苯基四氮唑 0.040 g,溴麝香百里酚蓝 0.025 g,琼脂 18.0 g,蒸馏水 1 000 mL。营养琼脂培养基(NA):牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 5.0 g,琼脂 18.0 g,蒸馏水 1 000 mL。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯浸粉 3.0 g,葡萄糖 20.0 g,琼脂 14.0 g,蒸馏水 1 000 mL。以上培养基均  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

供试昆虫:大蜡螟(*Galleria mellonella*)老熟幼虫,本实验室繁殖保存。

供试共生细菌及芽孢杆菌见表 1。

表 1 供试共生细菌及芽孢杆菌  
Table 1 Test strains of symbiotic bacteria and *Bacillus*

菌株 Strains	简称 Abbreviation
嗜线虫致病杆菌 <i>Xenorhabdus nematophila</i> ALL	ALL
伯氏致病杆菌 <i>Xenorhabdus bovienii</i> BC-1	BC-1
伯氏致病杆菌 <i>Xenorhabdus bovienii</i> ZMBHW	ZMBHW
伯氏致病杆菌 <i>Xenorhabdus bovienii</i> YC	YC
伯氏致病杆菌 <i>Xenorhabdus bovienii</i> SCP	SCP
伯氏致病杆菌 <i>Xenorhabdus bovienii</i> B24	B24
伯氏致病杆菌 <i>Xenorhabdus bovienii</i> B8	B8
伯氏致病杆菌 <i>Xenorhabdus bovienii</i> SCM	SCM
伯氏致病杆菌 <i>Xenorhabdus bovienii</i> NAPAL	NAPAL
伯氏致病杆菌 <i>Xenorhabdus bovienii</i> TURKEY40-4	TURKEY40-4
伯氏致病杆菌 <i>Xenorhabdus bovienii</i> ZMHYL	ZMHYL
发光光杆状菌 <i>Photorhabdus luminescens</i> NLK	NLK
中温光杆状菌 <i>Photorhabdus temperata</i> POLAND	POLAND
中温光杆状菌 <i>Photorhabdus temperata</i> XY-4	XY-4
贝莱斯芽孢杆菌 <i>Bacillus velezensis</i> LYT5	LYT5

## 1.2 方法

### 1.2.1 共生细菌的分离

无菌操作台中,将由昆虫病原线虫致死的大蜡螟幼虫放入 75%的乙醇中,浸没 10 s 左右,无菌滤纸吸去多余的酒精,剪开腹足,接种针蘸取或挤出流出的液体至 NBTA 平板培养基上,28 °C 条件下暗培养 36–48 h,直至出现能够吸附蓝色且周围有透明圈的菌落,即为目标菌<sup>[21]</sup>。

### 1.2.2 共生细菌发酵液的制备

将共生细菌于 NA 培养基平板上进行活化,28 °C 条件下培养 24–36 h,挑取单菌落于 NBTA 鉴别培养基上继续培养 24–48 h,挑取蓝色单菌落于 NB 肉汤培养基中,于 28 °C、160 r/min 条件下培养 36 h。取 1%的接菌量接入 NB 培养基中继续培养 36 h,4 °C 保存备用。

### 1.2.3 灰葡萄孢拮抗共生细菌的定性筛选

采用平板对峙培养法<sup>[22]</sup>,将纯化后的灰葡萄孢制成直径为 5 mm 的菌饼,置于 PDA 培养基平板中央,距离病原菌 25 mm 处的 4 个垂直点接上供试共生细菌菌株,每个处理重复 3 次,置于生化培养箱中培养,温度为 28 °C。

### 1.2.4 灰葡萄孢拮抗共生细菌的定量复测

将共生细菌种子液在 28 °C、160 r/min 摇床中培养 36 h,按照 1%的接种量接入 NB 培养基中,在相同条件下(28 °C、160 r/min)继续发酵培养 36 h,于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,经 0.22 μm 的微孔滤膜除菌得到无菌上清液。以 1:100 的比例将上清液与冷却至 42 °C 左右的 NA 培养基混匀倒平板,待平板晾干后,将灰葡萄孢菌饼倒置放在 NA 培养基中央,每个处理 3 个重复,25 °C 条件下观察培养。待空白对照菌丝生长至培养皿边缘时用十字交叉法测量菌落直径,按照以下公式计算其抑制率:抑制率(%)=(对照组菌块直径-试验组菌块直径)/(对照组菌块直径-菌饼直径)×100。

### 1.2.5 共生细菌对灰葡萄孢 MT832025 菌丝生长抑制的扫描电镜观察

用已灭菌的竹签挑取对灰葡萄孢 MT832025

有明显抑制作用的 ALL 菌株边缘组织和正常组织的菌丝,用已灭菌的刀片切成 1 cm×3 cm 的薄片,放置于电镜固定液戊二醛溶液中,4 °C 保存,由武汉塞维尔生物科技有限公司进行镜检,以下为扫描电镜观察步骤:

(1) 取材固定:新鲜组织确定取材部位,1–3 min 内取样,组织块面积不超过 3 mm<sup>2</sup>,用 PBS (pH 7.2–7.4)轻轻漂洗将样本表面的污渍等去掉,做好标记,迅速投入电镜固定液室温固定 2 h;(2) 固定好的样品经 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗 3 次,每次 15 min;(3) 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)配制 1%锇酸室温避光固定 1–2 h;(4) 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗 3 次,每次 15 min;(5) 脱水:组织依次加入 30%→50%→70%→80%→90%→95%→100%→100%酒精,每次 15 min,乙酸异戊酯 15 min;(6) 干燥:将样本放入临界点干燥仪内进行干燥;(7) 样本导电处理:将样本紧贴于导电碳膜双面胶上,放入离子溅射仪样品台上进行喷金 30 s 左右;(8) 扫描电子显微镜下观察采图。

### 1.2.6 不同培养时间的抑菌效果

将备好的 14 h 种子液以 1%的比例接入 NB 肉汤培养基中,分别在 28 °C、160 r/min 摇床中发酵培养 12、24、36、48、60 h 后,将得到的不同时间的培养液用 0.22 μm 过滤器过滤除菌,按照 1.2.4 的方法与 NA 培养基混匀,平板晾干后,将灰葡萄孢菌饼倒置于 NA 培养基中央,25 °C 条件下培养观察,待空白对照菌丝生长至培养皿边缘时用十字交叉法测量菌落直径,计算其抑制率。

### 1.2.7 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育学分析

#### (1) 共生细菌基因组 DNA 的提取

根据天根生化科技(北京)有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒要求提取菌体总 DNA:取适量细菌培养液于灭菌 EP 管中,10 000 r/min 离心 1 min,弃上清,收集菌体;加入 200 μL 缓冲液 GA,振荡至菌体彻底悬浮,再加入 20 μL 蛋白酶 K 混匀,然后加入 220 μL 缓冲液 GB,振荡 15 s,70 °C 放置 10 min;加 220 μL 无水乙醇,振荡 15 s,混匀

后将样品转移至收集管内的吸附柱中, 12 000 r/min 离心 30 s, 弃废液; 加入 500  $\mu$ L 缓冲液 GD, 12 000 r/min 离心 30 s, 弃废液; 加入 600  $\mu$ L 漂洗液 PW, 12 000 r/min 离心 30 s, 重复一次, 弃废液; 将吸附柱放入收集管内 12 000 r/min 离心 2 min, 弃废液; 将吸附柱置于室温放置 20–30 min, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液; 将吸附柱放入新的无菌 EP 管中, 悬空滴加 50  $\mu$ L 洗脱缓冲液 TE, 室温放置 2 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 将溶液收集至离心管中。

## (2) 16S rRNA 基因扩增及序列分析

以提取的细菌基因组 DNA 为模板, 使用细菌 16S rRNA 通用引物 27F (5'-TCCTCCGCTTATTG ATATGC-3') 和 1492R (5'-CAAACTTGGTCATTAG AGGA-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 1 $\times$ Taq PCR Green Mix 预混液 25  $\mu$ L, 引物 27F 和 1492R (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 23  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 54  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。结束后用 2.0% 琼脂糖电泳检测 PCR 扩增产物, 送至北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司测序。PCR 产物序列提交至 GenBank 数据库, 获得登录号。BLAST 进行序列比对, 以搜索得到的同源序列为依据, 下载其同属近缘菌种的 16S rRNA 基因序列, 运用 MEGA 7.0 程序构建系统发育树, 采用邻接法(Neighbor-Joining Method), 系统树的检验用 Bootstrap 1 000 次重复。以普罗维登斯菌(*Providencia vermicola*)为外群。

### 1.2.8 ALL 菌株对红地球葡萄的常温防治效果

(1) *Botrytis cinerea* MT832025 孢子悬浮液的制备

参考邓惠文等<sup>[23]</sup>的方法进行灰葡萄孢 MT832025 孢子悬浮液的制备。将已长出菌丝的菌株转接到新的 PDA 培养基上, 25  $^{\circ}$ C 培养 5 d, 用体积分数为 0.05% 的吐温-80 冲洗平板, 收集孢子悬液, 并用血球计数板计数, 最终将孢子悬浮液浓度稀释至  $3\times 10^5$  个/mL。

## (2) 共生细菌菌株在常温防病效果的测定

参考李丽梅等<sup>[24]</sup>的方法略有修改。红地球葡萄的处理<sup>[25]</sup>: 挑选大小、成熟度一致的果粒, 用剪刀将葡萄果粒从叶茎上剪下, 防止葡萄果粒干枯, 每个葡萄果粒上留有 5 mm 的果梗<sup>[26]</sup>。将红地球葡萄果粒浸到无菌的 1% 次氯酸钠溶液中 2 min, 然后用无菌水冲洗, 在无菌操作台中晾干。

活体筛选: 待葡萄果粒表面无水分残留时, 用无菌竹签刺破果实赤道部位<sup>[27]</sup>, 伤口直径 1.50 mm、深 5 mm。处理组: 每一处伤口加入 10  $\mu$ L 无菌发酵上清液, 2 h 后加入 10  $\mu$ L 灰葡萄孢孢子悬浮液( $3\times 10^5$  个/mL); 对照组: 每一伤口加入 10  $\mu$ L 无菌水, 2 h 后加入 10  $\mu$ L 灰葡萄孢孢子悬浮液( $3\times 10^5$  个/mL)。将以上 2 组处理在室温(25  $^{\circ}$ C)下放置 1 h, 待果实风干至伤口边缘无流动菌液后置于聚乙烯保鲜盒中, 用保鲜膜进行密封, 以 25  $^{\circ}$ C、93% 湿度恒温保湿培养, 3–7 d 后测量伤口病斑大小和发病率, 每个处理 3 个平行, 每个平行 10 个果粒。

发病率(%)=果实病孔数/接种总孔数 $\times 100$ ;

防治效果(%)=(对照组菌丝平均直径-处理组菌丝平均直径)/(对照组菌丝平均直径-刺孔直径) $\times 100$ 。

## 1.3 数据处理

采用 Excel 2010 计算数据, 利用 SPSS 22.0 进行数据统计分析, 使用 Duncan 多重比较检验法进行显著性分析( $P<0.05$  为差异显著)。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌株的初筛效果

将共生细菌菌株进行拮抗筛选, 初步得到 9 株共生细菌(图 1)具有较好的拮抗作用, 分别命名为: BC-1、ALL、ZMBHW、YC、SCP、B24、B8、NAPAL、LYT5。对峙平板上靠近拮抗菌生长一侧的灰葡萄孢菌丝边缘出现明显易辨的黑色抑菌痕迹, 菌丝生长状态明显较弱, 缓慢稀疏, 未能铺满培养皿, 说明拮抗菌 ALL 菌株在 PDA 平



图1 不同共生细菌菌株对灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)的拮抗作用

Figure 1 Antagonistic effects of different symbiotic bacteria strains on *Botrytis cinerea*

Note: 1: BC-1; 2: ALL; 3: ZMBHW; 4: YC; 5: SCP; 6: B24; 7: B8; 8: NAPAL; 9: LYT5

板上可能分泌了某些能够对病原菌产生有效杀伤抑制作用的抗菌类物质,可以有效减弱灰霉菌的生长态势和生命活力。

## 2.2 拮抗菌株的复测效果

对初筛拮抗菌株进行复筛与复测,结果如图2所示,结果表明,不同菌株上清液对灰葡萄孢拮抗效果差异较大,ALL菌株上清液对灰葡萄孢的抑菌率最高,为31.98%,而且显著高于其他共生细菌;其次为BC-1、ZMBHW和B24,其抑菌率分别为19.12%、17.85%和15.55%;B8、LYT5和NAPAL抑制率相对较低,最高仅达10.51%、10.03%和9.25%;YC的抑菌活性相对最弱,为6.36%。

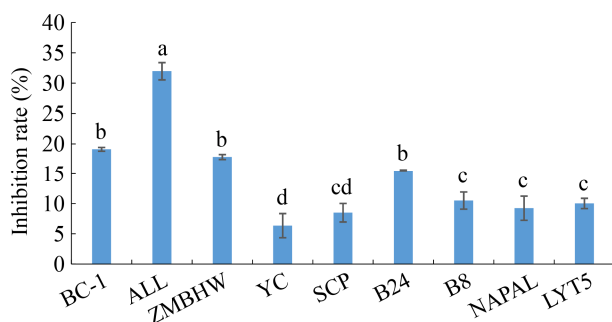


图2 不同菌株对灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)的抑制作用

Figure 2 Inhibition of different strains on *Botrytis cinerea*

注: 不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Note: The different lowercase letter means significant difference ( $P < 0.05$ )

## 2.3 扫描电镜下观察灰霉菌丝

利用扫描电镜对灰葡萄孢正常生长菌丝和受抑制菌丝进行观察,如图3A所示,正常灰葡萄孢菌丝表面光滑,伸展良好。如图3B所示,共生细菌菌株ALL的代谢物致使菌丝扭曲变形,表面皱缩,失水塌陷。

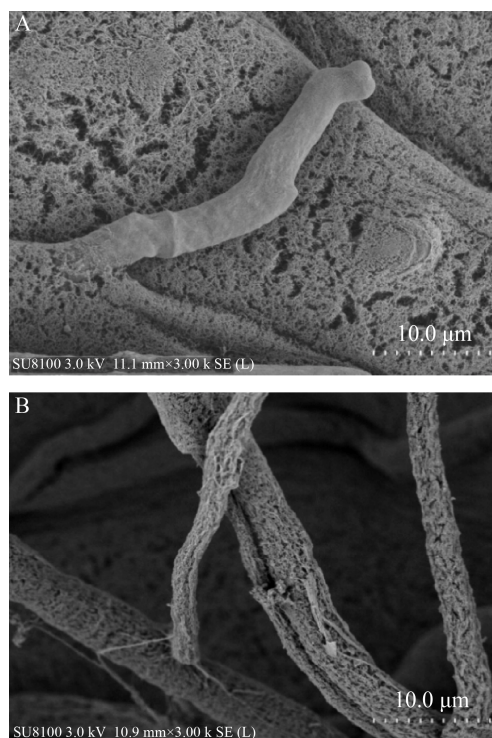


图3 扫描电镜观察拮抗菌 ALL 菌株对灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)的抑制作用(3 000×)

Figure 3 The inhibition effect of strain ALL on *Botrytis cinerea* with scanning electron microscope observation (3 000×)



## 2.4 ALL 菌株在 12–60 h 内的菌丝抑制率

ALL 菌株 12–60 h 的抑制作用由图 4 和图 5 可以看出, ALL 菌株在不同发酵时间的发酵上清液对灰葡萄孢呈现的抑制作用不同。在 36 h 时, ALL 菌株发酵上清液对灰葡萄孢的抑制率最高, 达到 44.49%, 显著高于 12、24、48 和 60 h。12 h 时, ALL 菌株发酵上清液对灰葡萄孢的抑制率最低, 仅为 12.96%。

## 2.5 ALL 菌株 16S rRNA 基因序列进化分析

ALL 菌株的 16S rRNA 基因经测序后序列长 1 422 bp, 获得在 GenBank 的序列登录号为 MW488402, 在 NCBI 中通过 BLAST 比对, 进化树分析(图 6)表明 ALL 菌株与 *Xenorhabdus nematophila* strain NC116 (FJ860890.1)相似性为 99.79%, 进化距离最近, 初步表明 ALL 菌株为嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophila*) strain NC116 (FJ860890.1)的近似种。

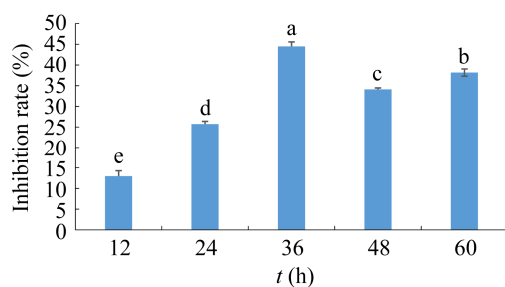


图 4 不同发酵时间的 ALL 发酵上清液对灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*)抑制率

Figure 4 Inhibition rate of strain ALL fermentation supernatants at different fermentation times on *Botrytis cinerea*

注: 不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Note: The different lowercase letter means significant difference ( $P < 0.05$ )

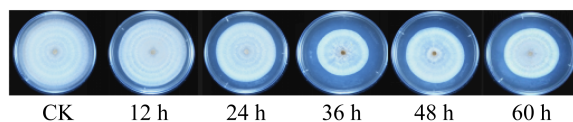


图 5 不同时间 ALL 菌株发酵上清液对灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*)菌丝生长的抑制效果

Figure 5 Inhibition of the fermentation supernatant of strain ALL at different times on the growth of *Botrytis cinerea* hyphae

## 2.6 拮抗菌对葡萄灰霉病的防治效果

图 7A 为损伤接种灰葡萄孢后对红地球果实的效果图, 可以看到灰葡萄孢菌丝在果实上均有覆盖, 而且菌丝直径较大, 部分果实出现软烂等现象; 图 7B 为损伤接种灰葡萄孢拮抗菌的效果图, 可以看出加入拮抗菌后灰葡萄孢菌丝明显受到抑制。表明该菌株在常温损伤接种实验中能够显著抑制灰葡萄孢在葡萄上的生长。

由表 2 可知对照组 3 d 后的发病率达 93.3%, 而加拮抗菌的发病率为 56.7%。在第 4 天之后对照组与处理组发病率之间差距较小。由表 3 分析可知, 拮抗菌处理后在第 3 天防治效果较为明显, 达 63.50%; 在第 7 天防治效果最小, 随着时间的延长, 防治效果变低。

## 3 讨论与结论

本研究表明, 嗜线虫致病杆菌 ALL 菌株可有效抑制灰葡萄孢菌丝的生长, 从而能够有效降低葡萄采后贮期腐烂率, 提高葡萄采后贮藏品质。杨怀文等<sup>[28]</sup>研究了嗜线虫致病杆菌发酵液对致病疫霉(*Phytophthora infestans*)菌丝生长有很强的抑制作用, 0.15%浓度的发酵液对菌丝生长的抑制率达 68.1%。张园等<sup>[29]</sup>研究发现嗜线虫致病杆菌 HB310 发酵上清液浓度为 10%时对苹果灰霉病原菌 *Botrytis cinerea* 菌丝抑制率为 30.35%。本实验研究 1%浓度的嗜线虫致病杆菌 ALL 菌株发酵上清液对葡萄灰霉病的抑制率达 44.5%, 显示出嗜线虫致病杆菌 ALL 菌株具有较好的葡萄灰霉病生物防治潜能。本研究发现, 嗜线虫致病杆菌 ALL 菌株的抑菌效果显著高于植物真菌病害高效生防细菌贝莱斯芽孢杆菌(LYT-5)<sup>[30]</sup>的抑菌效果, 分析原因认为有可能是产生的抑菌物质不同或相同抑菌物质其产量和活性存在较大差异。Gualtieri 等<sup>[31]</sup>研究发现从嗜线虫致病杆菌 F1 菌株中分离到由 5 个组分组成的富含赖氨酸的环脂肽家族(PAX), 它们对植物病原真菌有强烈的抑制活性。Mahmood 等<sup>[32]</sup>研究发现对嗜线虫致病杆菌 19061 菌株纯化后, 重

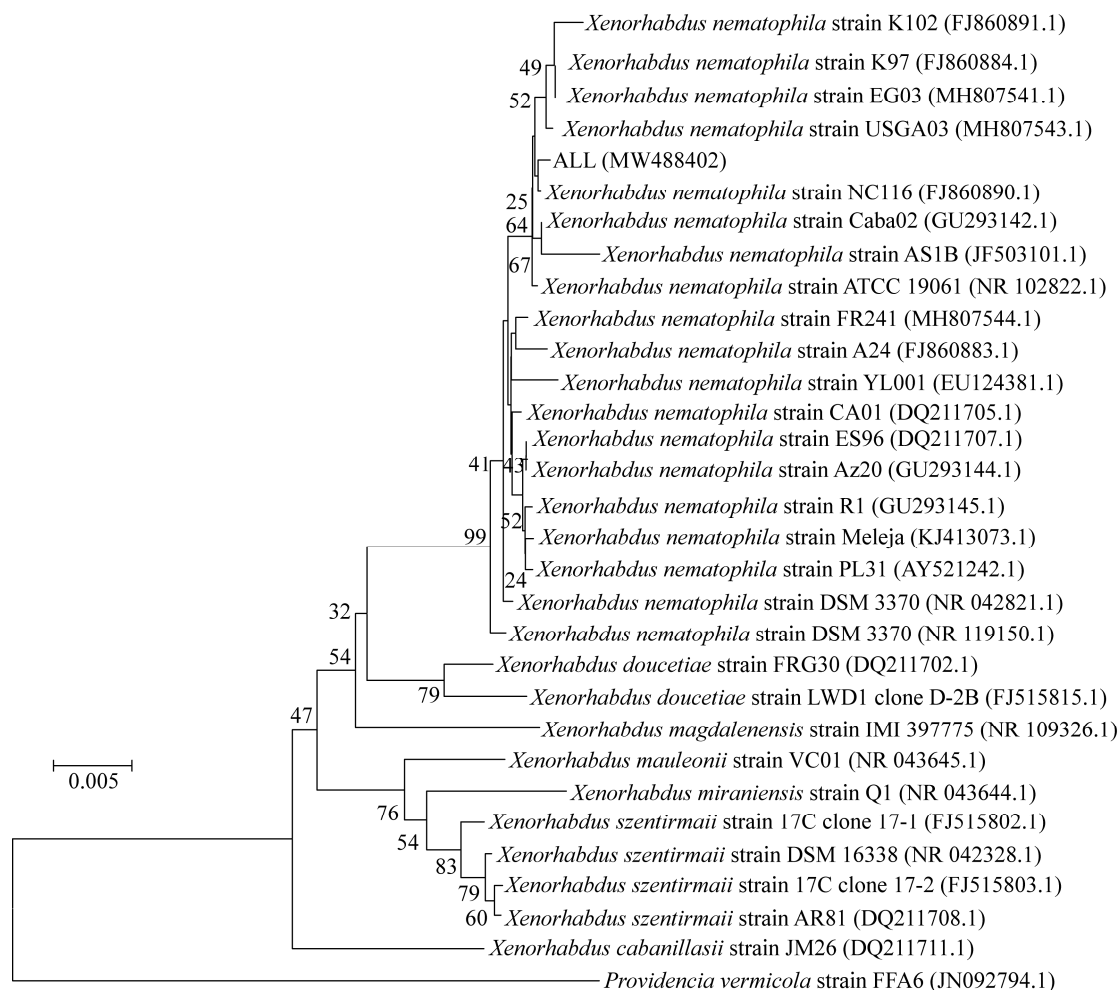


图 6 ALL 菌株基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 6 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain ALL

注：以普罗维登斯菌(*Providencia vermicola*)为外群，系统树的检验用 Bootstrap 1 000 次重复。括号内的数字为 GenBank 登录号；进化树节点的数值表示 Bootstrap 值；比例尺为 0.5% 的序列差异

Note: *Providencia vermicola* was used as outgroups. Sequence divergence values of 0.5% were indicated as bootstrap values. Number in parenthesis represented GenBank accession number; Number at nodes presented bootstrap percentages (based on 1 000 sampling); Bar: 0.005 represented sequence divergence



图 7 ALL 菌株在果实上对葡萄灰霉病的防治效果

Figure 7 The inhibition effect of the strain ALL on the fruit of gray mold

注：A：灰葡萄孢对照组；B：ALL 菌株处理组

Note: A: The control group of *Botrytis cinerea*; B: The treat group of strain ALL



表 2 3-7 d 内处理组与对照组的发病率  
Table 2 Incidence rate of treatment group and control group within 3-7 days

时间 Time (d)	对照组发病率 Incidence rate of control group (%)	处理组发病率 Incidence rate of treatment group (%)
3	93.3	56.7
4	100.0	86.7
5	100.0	90.0
6	100.0	90.0
7	100.0	90.0

表 3 3-7 d 内处理组与对照组菌丝生长情况  
Table 3 The growth of hyphae in the treatment group and the control group within 3-7 days

时间 Time (d)	病斑直径 Lesion diameter (mm)		防治效果 Control effect (%)
	对照组 Control group	处理组 Treatment group	
3	5.39±1.62	2.92±1.00	63.50
4	5.76±1.26	4.25±1.29	35.45
5	9.61±1.72	7.02±2.31	31.94
6	11.1±2.18	8.56±2.73	26.46
7	13.8±2.85	10.6±3.28	26.02

注: 对照组: 无菌水+病原菌; 处理组: 拮抗菌+病原菌  
Note: Control group: Sterile water + Pathogenic bacteria; Treatment group: Antagonistic bacteria + Pathogenic bacteria

组纯化蛋白具有外显蛋白和内壳蛋白酶活性,可以有效抑制尖孢镰刀菌和链格孢的生长。李凤麟<sup>[33]</sup>研究发现,从嗜线虫致病杆菌 SN313 分离纯化得到的化合物吩嗪-1-羧酸对灰葡萄孢、辣椒疫霉菌、立枯丝核菌具有一定的抑制作用。本研究观察不同培养时间的发酵液(ALL 菌株)对灰葡萄孢菌丝的抑制结果发现,在 12-60 h 不同时间段中,菌丝抑制率呈现先上升后下降的趋势,并在发酵培养 36 h 时抑制率最高。原因可能是培养初期摇瓶内菌体浓度暂时未达到最高值,随着时间的延长,菌体浓度升高,次生代谢产物大幅积累,从而抑菌活性显著提高;随着培养基内有限的营养和空间被用完,出现抑制率降低的情况。通过扫描电镜观察嗜线虫致病杆菌 ALL 菌株对灰葡萄孢抑制后的菌丝形态观察发现,灰葡萄孢菌丝扭曲变形,表面皱缩,失水塌陷,这与刘霞<sup>[34]</sup>研究菌株 *X. nematophila* YL001

药液处理灰葡萄孢菌丝的显微结构变化结果基本一致,进一步说明抑菌活性物质的目标位点可能在菌丝细胞壁上,通过损坏细胞壁结构而进一步影响细胞内其他结构的完整性,但其究竟是由于影响了细胞壁几丁质合成酶的活性而使细胞壁的形成受阻,还是由于细胞壁其他物质异常而导致的细胞壁合成受阻,或是由于能量供应不足而导致合成受阻,还需要在后续试验中进一步研究其作用途径和机理。在常温活体保鲜试验中,处理组与对照组相比有明显的防治效果,但随着储藏时间的延长,防治效果越来越低。原因可能是拮抗菌发酵上清液注射浓度较低(接菌量 1%的上清液),注射量较少,仅为 10 μL,拮抗菌发酵上清液中的抑菌代谢产物随着应用时间的延长其含量和活性逐渐降低;同时也有部分可能是能够诱导葡萄果实自身抗性酶增加或抗性酶活性增强的拮抗菌发酵上清液相关代谢产物浓度逐渐降低,导致对灰霉病的防治效果有所降低,需要在后续菌株代谢产物分离鉴定及其对葡萄果实诱导抗病性等方面做深入研究来揭示。

本研究从 14 株不同种属昆虫病原线虫共生细菌以及 1 株贝莱斯芽孢杆菌中初筛筛选出 9 株有抑菌效果的菌株,复筛筛选出 1 株有显著抑菌作用的共生细菌,经鉴定为嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophila*),其 16S rRNA 基因序列在 GenBank 的登录号为 MW488402。该菌株发酵 36 h 的上清液浓度为 1%时,对灰葡萄孢菌丝抑制率达 44.5%。在葡萄常温防效实验中,与对照组比较,ALL 菌株发酵上清液对灰葡萄孢防治效果较好,3 d 后防效为 63.50%。本研究首次应用昆虫病原线虫共生细菌生物防治葡萄贮期灰霉病,其上清液对灰葡萄孢具有良好的抑制效果,具有较好的生防潜能。在此研究基础上,后续研究将进一步聚焦抑菌活性物质的分离纯化、鉴定以及相关代谢产物的发酵条件优化。本研究为生物防治贮期葡萄灰霉病提供了新的生物材料和相关研究基础。

## REFERENCES

- [1] Luo L, Wang QH, Zhao HX, Zhang DP, Liu Y. Screening of bio-control strain against *Botrytis cinerea* and preliminary research on its antagonistic mechanisms[J]. China Brewing, 2017, 36(4): 93-98 (in Chinese)  
罗琳, 王其慧, 赵海霞, 张殿朋, 刘娅. 葡萄灰霉病生防菌株的筛选及其拮抗机理初探[J]. 中国酿造, 2017, 36(4): 93-98
- [2] Carter MQ, Chapman MH, Gabler F, Brandl MT. Effect of sulfur dioxide fumigation on survival of foodborne pathogens on table grapes under standard storage temperature[J]. Food Microbiology, 2015, 49: 189-196
- [3] Gabler FM, Mercier J, Jiménez JI, Smilanick JL. Integration of continuous biofumigation with *Muscador albus* with pre-cooling fumigation with ozone or sulfur dioxide to control postharvest gray mold of table grapes[J]. Postharvest Biology and Technology, 2010, 55(2): 78-84
- [4] Santiago R, Huiliñir C, Cottet L, Castillo A. Microbiological characterization for a new wild strain of *Paenibacillus polymyxa* with antifungal activity against *Botrytis cinerea*[J]. Biological Control, 2016, 103: 251-260
- [5] Rotolo C, De Miccolis Angelini RM, Dongiovanni C, Pollastro S, Fumarola G, Di Carolo M, Perrelli D, Natale P, Faretra F. Use of biocontrol agents and botanicals in integrated management of *Botrytis cinerea* in table grape vineyards[J]. Pest Management Science, 2018, 74(3): 715-725
- [6] Boubakri H, Hadj-Brahim A, Schmitt C, Soustre-Gacougnolle I, Mliki A. Biocontrol potential of chenoodeoxycholic acid (CDCA) and endophytic *Bacillus subtilis* strains against the most destructive grapevine pathogens[J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2015, 43(4): 261-274
- [7] Luo L, Zhou LX, Liu Y. Preliminary probe on antagonistic mechanisms of the *Pichia pastoris* G5 against *Botrytis cinerea*[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(9): 210-215 (in Chinese)  
罗琳, 周玲璇, 刘娅. 毕赤酵母 G5 拮抗葡萄灰霉病机理初探[J]. 生物技术通报, 2017, 33(9): 210-215
- [8] Garrido CC, Usall J, Torres R, Teixidó N. Effective control of *Botrytis* bunch rot in commercial vineyards by large-scale application of *Candida sake* CPA-1[J]. BioControl, 2017, 62(2): 161-173
- [9] Kasfi K, Taheri P, Jafarpour B, Tarighi S. Identification of epiphytic yeasts and bacteria with potential for biocontrol of grey mold disease on table grapes caused by *Botrytis cinerea*[J]. Spanish Journal of Agricultural Research, 2018, 16(1): e1002
- [10] Bowen D. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*[J]. Science, 1998, 280(5372): 2129-2132
- [11] Duchaud E, Rusniok C, Frangeul L, Buchrieser C, Givaudan A, Taourit S, Bocs S, Boursaux-Eude C, Chandler M, Charles JF, et al. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(11): 1307-1313
- [12] Bowen D, Blackburn M, Rocheleau T, Grutzmacher C, Ffrench-Constant RH. Secreted proteases from *Photorhabdus luminescens*: separation of the extracellular proteases from the insecticidal Tc toxin complexes[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 30(1): 69-74
- [13] Xiao Y, Yang XF, Yang HW. Advances in antimicrobial metabolites of the symbiotic bacteria associated with entomopathogenic nematodes[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2011, 27(4): 553-558 (in Chinese)  
肖尧, 杨秀芬, 杨怀文. 致病杆菌和发光杆菌抗菌代谢产物研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(4): 553-558
- [14] Yu H. The bacteriostasis of secondary metabolites of pathogenic *Xenorhabdus bovienii* SN84 on three kinds of plant pathogenic fungus[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2017 (in Chinese)  
俞晗. 致病杆菌 *Xenorhabdus bovienii* SN84 次生代谢产物对三种植物病原真菌抑菌作用的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2017
- [15] Fang XL, Zhang MR, Tang Q, Wang YH, Zhang X. Inhibitory effect of *Xenorhabdus nematophila* TB on plant pathogens *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea* *in vitro* and *in planta*[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 4300
- [16] Furgani G, Böszörményi E, Fodor A, Máthé-Fodor A, Forst S, Hogan JS, Katona Z, Klein MG, Stackebrandt E, Szentirmai A, et al. *Xenorhabdus* antibiotics: a comparative analysis and potential utility for controlling mastitis caused by bacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(3): 745-758
- [17] Böszörményi E, Ersek T, Fodor A, Fodor AM, Földes LS, Hevesi M, Hogan JS, Katona Z, Klein MG, Kormány A, et al. Isolation and activity of *Xenorhabdus* antimicrobial compounds against the plant pathogens *Erwinia amylovora* and *Phytophthora nicotianae*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(3): 746-759
- [18] Fodor A, Fodor AM, Forst S, Hogan JS, Klein MG, Lengyel K, Sáringer G, Stackebrandt E, Taylor R, Lehoczyk É. Comparative analysis of antibacterial activities of *Xenorhabdus* species on related and non-related bacteria *in vivo*[J]. Journal of Microbiology & Antimicrobials, 2010, 2(4): 36-46
- [19] Hazir S, Shapiro-Ilan DI, Bock CH, Hazir C, Leite LG, Hotchkiss MW. Relative potency of culture supernatants of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. on growth of some fungal phytopathogens[J]. European Journal of Plant Pathology, 2016, 146(2): 369-381
- [20] Fang XL, Li ZZ, Wang YH, Zhang X. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of *Xenorhabdus bovienii* YL002 against *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea*[J].

- Journal of Applied Microbiology, 2011, 111(1): 145-154
- [21] Zhan FQ, Buka O, Hou M, Yang R, Long XQ. Preliminary identification of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis bacteriophora* strain Nileke) and its symbiotic bacteria in Xinjiang[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2015, 52(2): 244-251 (in Chinese)  
詹发强, 布卡·欧尔娜, 侯敏, 杨蓉, 龙宣杞. 新疆嗜菌异小杆线虫及其共生细菌的初步鉴定研究[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(2): 244-251
- [22] Ma LL, Tai LM, Xu YL, Li CJ, Han XH. A study on the antifungal activity of *Photorhabdus* sp. NJ[J]. Plant Protection, 2008, 34(3): 25-29 (in Chinese)  
马丽丽, 台连梅, 许艳丽, 李春杰, 韩新华. 发光杆菌 NJ 菌株的抑菌活性研究[J]. 植物保护, 2008, 34(3): 25-29
- [23] Deng HW, Bi Y, Ge YH, Ren YL, Liu YY. Induction of phenylpropanoid metabolic activity in muskmelon fruit by postharvest BTH treatment and challenge inoculation with *Trichothecium roseum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(1): 323-326 (in Chinese)  
邓惠文, 毕阳, 葛永红, 任亚琳, 刘瑶瑶. 采后 BTH 处理及粉红单端孢(*Trichothecium roseum*)挑战接种对厚皮甜瓜果实苯丙烷代谢活性的诱导[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 323-326
- [24] Li LM, Liu X, Li XH, Yang HY, Zhao YT. Study on the wound pathogenicity of *Aspergillus niger* and its antagonistic bacteria screening of postharvest red globe grapes at room temperature[J]. Food Research and Development, 2020, 41(15): 35-39 (in Chinese)  
李丽梅, 刘霞, 李喜宏, 杨鸿远, 赵亚婷. 常温下黑曲霉对刺伤红提葡萄的致病规律研究及拮抗菌筛选[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(15): 35-39
- [25] Yu S. Screening of biocontrol antagonistic yeasts of diseases of postharvest fruits and vegetables[D]. Ji'nan: Master's Thesis of Shandong Polytechnic University, 2010 (in Chinese)  
于帅. 果蔬采后病害生物防治型酵母菌的筛选[D]. 济南: 山东轻工业学院硕士学位论文, 2010
- [26] Liu J. Studies on non-sulfur dioxide postharvest techniques of table grapes[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2008 (in Chinese)  
刘进. 葡萄采后非硫防腐保鲜技术的研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2008
- [27] Li L. Postharvest biological control of Lingwu long jujube fruits by yeast[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2009 (in Chinese)  
李莉. 酵母菌对灵武长枣采后病害的生物防治研究[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2009
- [28] Yang HW, Zhang ZM, Yang XF, Jian H. Antibiosis of *Xenorhabdus nematophilus* metabolites against *Phytophthora infestans*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2000, 16(3): 111-113 (in Chinese)  
杨怀文, 张志铭, 杨秀芬, 简恒. 嗜线虫致病杆菌代谢物对马铃薯晚疫病菌的抑制作用[J]. 中国生物防治, 2000, 16(3): 111-113
- [29] Zhang Y, Nangong ZY, Wang QY, Wen X. Study on antimicrobial activity of symbiotic bacteria of *Xenorhabdus nematophila* HB310 against five apple pathogens[J]. Northern Horticulture, 2012(20): 123-126 (in Chinese)  
张园, 南宫自艳, 王勤英, 文旭. 嗜线虫致病杆菌 HB310 对五种苹果病原菌抑菌活性的影响[J]. 北方园艺, 2012(20): 123-126
- [30] Zhan FQ, Hou XQ, Yang WQ, Yang R, Hou M, Zhang HT, Long XQ, Cui WD. Isolation and identification of antagonistic bacteria against *Fusarium* wilt tomato[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2011, 48(9): 1649-1654 (in Chinese)  
詹发强, 侯新强, 杨文琦, 杨蓉, 侯敏, 张慧涛, 龙宣杞, 崔卫东. 番茄枯萎病菌拮抗菌的分离与初步鉴定[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(9): 1649-1654
- [31] Gualtieri M, Aumelas A, Thaler JO. Identification of a new antimicrobial lysine-rich cyclolipopeptide family from *Xenorhabdus nematophila*[J]. The Journal of Antibiotics, 2009, 62(6): 295-302
- [32] Mahmood S, Kumar M, Banerjee N, Sarin NB. Evaluation of antifungal activity of A novel chitinase protein from *Xenorhabdus nematophilus*[J]. Plant Archives, 2018, 18(1): 235-241
- [33] Li FL. The research on the secondary metabolites from *Xenorhabdus nematophila* SN313 and their inhibitive activity against plant pathogenic fungi[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2018 (in Chinese)  
李凤麟. 嗜线虫致病杆菌 SN313 次生代谢产物及其抑制植物病原真菌活性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2018
- [34] Liu X. Studies on the metabolite and antifungal activity of *Xenorhabdus nematophilus* YL001 from entomopathogenic nematodes[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A & F University, 2006 (in Chinese)  
刘霞. 昆虫病原线虫共生菌 YL001 菌株的代谢产物及其抑菌活性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2006