

曹丽亚,陈大欢,郭荣艳,等.多黏类芽孢杆菌 HT16 对梨采后黑斑病的抑制效果[J].江苏农业科学,2017,45(1):107-110.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.030

# 多黏类芽孢杆菌 HT16 对梨采后黑斑病的抑制效果

曹丽亚,陈大欢,郭荣艳,何丹丹,杨沫,霍耀星,韩俊华

(河北科技大学生物科学与工程学院,河北石家庄 050018)

**摘要:**研究了多黏类芽孢杆菌 HT16 对梨黑斑病菌(*Alternaria kikuchiana*)的抑制作用,并对其应用效果进行了评价。结果表明,多黏类芽孢杆菌 HT16 对梨黑斑病菌的体外抑制率为 53.2%,其粗提蛋白严重破坏了梨黑斑病菌的菌丝和孢子,显著抑制了梨采后黑斑病的发生,呈现出极大的应用潜力。

**关键词:**梨;黑斑病;多黏类芽孢杆菌;生物防治

**中图分类号:** TS201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0107-03

梨黑斑病是一种由链格孢菌(*Alternaria kikuchiana*)引起的世界性气传真菌病害,主要侵染叶片,造成大量落叶,也危害果实和新梢,严重危害果品的生产和储存。我国是梨种植和出口大国,梨产量约占世界总产量的 2/3,出口量约占世界总出口量的 1/6,梨的出口是增加国民生产总值、农民收入的重要途径。然而,病原微生物的侵染造成梨采后腐烂损失严重<sup>[1]</sup>。其中,黑斑病是梨采后的重要病害之一,严重时可使梨采后损失达 50% 以上,在我国和韩国都曾严重暴发<sup>[2]</sup>。近年,法国也发现有梨黑斑病的发生与危害<sup>[3]</sup>。目前,农业上主要使用化学杀菌剂来控制病害发生。然而,大量使用化学农药引起的病菌抗药性、食品中农药残留超标、环境污染等问题日益严重。因此,寻求高效、安全的生物杀菌制剂成为防治农作物、果蔬等病害的主要出路之一,也是近年来研究的热点<sup>[4-8]</sup>。

多黏类芽孢杆菌对植物具有非致病性,且细胞壁不含内毒素,对人畜无害,在产品开发中活菌数量高、性能稳定,是一种理想的生防菌。多黏类芽孢杆菌 HT16 是笔者所在实验室分离并保存的 1 株能有效抑制真菌病害的菌株。前期试验表明,该菌及发酵液对多种植物病原菌具有广谱的抑制作用,其抗菌物质为耐热、耐酸碱、耐紫外线的蛋白质<sup>[9]</sup>。本研究评价了多黏类芽孢杆菌 HT16 对梨黑斑病菌的抑制活性及对梨采后黑斑病的控制效果,并探讨其抑菌机理,为进一步深入研究其生防效果和开发微生物农药奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

供试梨为河北省赵县白梨(水晶梨)。供试生防菌株多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*) HT16 由笔者所在实

验室保存,梨黑斑病病原菌由河北农业大学植物保护学院提供。

仪器设备包括 BM-103CE 光学显微镜,上海比目仪器有限公司;YT-CJ-1N 超净工作台,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;SYQ-DSX-280B 不锈钢手提式,山东新华医疗器械厂;TCL-15B 离心机,上海安亭科学仪器厂;生化培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;pH211 酸度计,压力蒸汽灭菌锅等。

### 1.2 培养基

发酵培养基<sup>[10]</sup>:马铃薯 30%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.4%,蔗糖 1.5%, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,黄豆饼粉 0.1%,pH 值 6.5。PDA 培养基:葡萄糖 2%、马铃薯 20%、琼脂 2%、1 000 mL 蒸馏水,pH 值 6.5。PDB 培养基(种子培养基):葡萄糖 2%、马铃薯 20%、1 000 mL 蒸馏水,pH 值 6.5。

### 1.3 多黏类芽孢杆菌 HT16 对梨黑斑病病原菌的抑制活性

1.3.1 菌体抑制活性的测定 采用对峙法测定 HT16 对梨黑斑病病原菌的抑制活性。将梨黑斑病病原菌接种于 PDA 平板上,置于 25 ℃ 条件下培养 7 d。在平板培养物上用打孔器取直径 6 mm 的菌块,接种在另一 PDA 平板中央,将 HT16 菌株均匀接种于距平板边缘 20 mm 处的 4 个点上,28 ℃ 培养 7 d,采用十字交叉法测量病原菌直径,以不接种 HT16 的 PDA 平板作对照,参照文献<sup>[10]</sup>计算抑菌率,抑菌率 = (对照病菌直径 - 处理病菌直径 - 6 mm) / 对照病原菌直径 × 100%。每个处理作 3 个重复,该试验重复 3 次。

### 1.3.2 不同处理液抑菌活性的测定

1.3.2.1 HT16 发酵液的制备 将 24 h 种龄的 HT16 种子培养液以体积分数为 10% 的接种量转接到液体发酵培养基中,置于 30 ℃ 培养箱中,186 r/min 振荡培养 72 h,备用。

1.3.2.2 HT16 菌悬液的制备 将培养 24 h 的 HT16 种子培养液,以 8 000 r/min 离心 10 min,弃上清,菌体沉淀以无菌水清洗 2 次,离心,最终以无菌生理盐水调节菌体浓度 1 亿 CFU/mL 左右,备用。

1.3.2.3 蛋白粗提液的制备 将上述 HT16 发酵液以 8 000 r/min 离心 10 min,取上清,用 6 mol/L HCl 调 pH 值至 2.5,并用 80% 硫酸铵沉淀,4 ℃ 静置过夜;然后在 4 ℃ 条件下,10 000 r/min 离心 15 min,弃上清液;沉淀用 1/20 发酵液

收稿日期:2015-12-16

基金项目:河北科技大学大学生科技创新基金;河北科技大学五大平台开放基金(编号:SW12)。

作者简介:曹丽亚(1991—),女,河北深州人,研究方向为食品质量与安全。E-mail:18231192853@163.com。

通信作者:韩俊华,博士,副教授,研究方向为食品生物技术与食品安全。E-mail:teach2003@126.com。

体积的磷酸盐缓冲液(pH 值 7.2)溶解,装入透析袋,透析过夜;用固体聚乙二醇 2000 进行浓缩,浓缩至原体积的 1/5,作为 HT16 发酵液的粗提蛋白,备用。

1.3.2.4 不同处理液抑菌活性的测定 将 100  $\mu\text{L}$  梨黑斑病原菌的孢子悬液(孢子浓度约 10 万个/mL)均匀涂布于 20 mL PDA 培养基上,晾干后,放入牛津杯,分别加入上述不同处理液,28  $^{\circ}\text{C}$  培养 2 d,观察测量抑菌圈大小。

#### 1.4 多黏类芽孢杆菌 HT16 对梨黑斑病发病率的抑制

选取个体均匀、表面无明显损伤且未发病的梨果实,以 2% 次氯酸钠进行表面消毒,并以水清洗,晾干备用。

在梨果实的腰部两侧进行无菌刺伤接种,伤口大小约为 3 mm(直径)×3 mm(深)。向伤口中注入 100  $\mu\text{L}$  上述不同处理液,以无菌水作为对照。晾干后再向同一个伤口上接种 50  $\mu\text{L}$  梨黑斑病原菌的孢子悬液(孢子浓度约为 10 万个/mL),室温下晾干后,将果实放入有隔层的纸箱内,并在纸箱外套上塑料袋使其保持相对湿度(90±5)%,置于 28  $^{\circ}\text{C}$  下贮藏。每隔 24 h 观察 1 次,记录病斑直径并计算发病率。

发病率 = 发病果个数/调查个数 × 100%。

#### 1.5 多黏类芽孢杆菌 HT16 的抑菌机理

1.5.1 HT16 对梨黑斑病原菌孢子萌发的影响 将 2 mL 梨黑斑病原菌的孢子悬液(孢子浓度约为 10 万个/mL)加入到灭菌的 2 mL PDB 培养基中,同时接种 500  $\mu\text{L}$  上述蛋白粗提液,以不加蛋白粗提液的作为对照,28  $^{\circ}\text{C}$  下 150 r/min 振荡培养 14 h,在显微镜下观察孢子萌发情况。

孢子萌发率 = 萌发孢子个数/观察孢子个数 × 100%。

1.5.2 HT16 对梨黑斑病原菌菌丝生长的影响 将 500  $\mu\text{L}$  梨黑斑病原菌的孢子悬液(孢子浓度 10 万个/mL 左右)加入到灭菌的 50 mL PDB 培养基中,于 28  $^{\circ}\text{C}$  下 150 r/min 振荡培养 24 h,加入 500  $\mu\text{L}$  蛋白粗提液,继续培养 8 h,在扫描电镜下比较菌丝的生长情况<sup>[11]</sup>。以不加蛋白粗提液的作为对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 多黏类芽孢杆菌 HT16 对梨黑斑病原菌的抑制效果

由图 1 可以看出,多黏类芽孢杆菌 HT16 对梨黑斑病原菌表现出很强的抑制效果,其抑制率为 53.2%。多黏类芽孢杆菌 HT16 的不同处理液对梨黑斑病原菌的生长也表现出不同的抑制作用(图 2)。其中,HT16 粗提蛋白的抑菌效果最显著,抑菌圈直径达到 17.6 mm。HT16 菌悬液和发酵液对梨黑斑病原菌的抑菌圈直径分别为 10.4、14.7 mm。

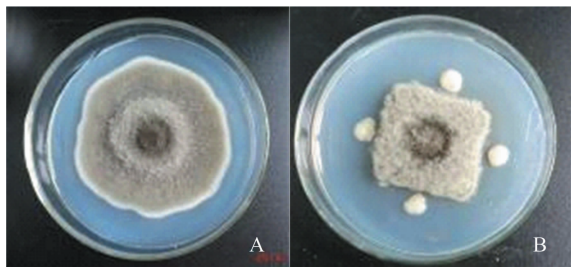
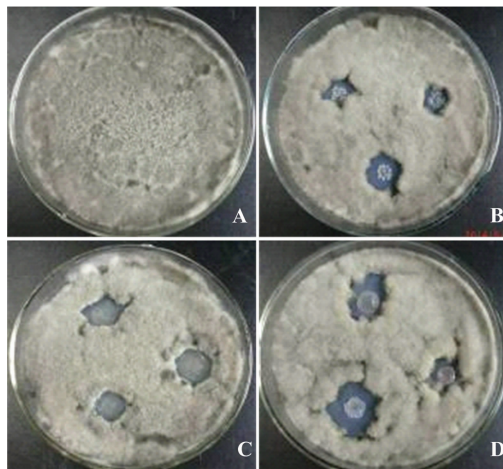


图1 多黏类芽孢杆菌 HT16 对梨黑斑病原菌的抑制效果 HT16

### 2.2 多黏类芽孢杆菌 HT16 对梨黑斑病发病率的影响

对健康的梨果实进行刺伤,接种不同的处理液后,接种黑



A—对照; B—发酵液; C—蛋白粗提液; D—菌悬液

图2 不同处理液对梨黑斑病原菌的体外抑制效果

斑病原菌,再进行贮藏,结果如图 3、图 4 所示。由图 3 可以看出,多黏类芽孢杆菌 HT16 的发酵液、菌悬液、蛋白粗提液对梨黑斑病原菌均有不同程度的抑制效果,处理组的梨黑斑病发病率明显低于对照。在保存的第 2 天,对照和菌悬液组的梨发病率达到 100%,发酵液处理组的梨发病率为 83.3%,而蛋白粗提液处理的梨果实未发病。保存到第 12 天,对照的梨黑斑病病斑直径达到 39.61 mm,而发酵液组、菌悬液组、蛋白粗提液组的梨黑斑病病斑直径分别为 36.53、35.17、0 mm。由此可以看出,粗提蛋白抑菌效果最好,无发病状况。菌悬液处理后的伤口梨黑斑生长旺盛,发酵液处理组虽有伤口腐烂但无梨黑斑菌丝出现。可见,发酵液比菌悬液处理组更能抑制梨黑斑病原菌的生长,这与体外抑菌结果一致。

### 2.3 多黏类芽孢杆菌 HT16 的抑菌机理

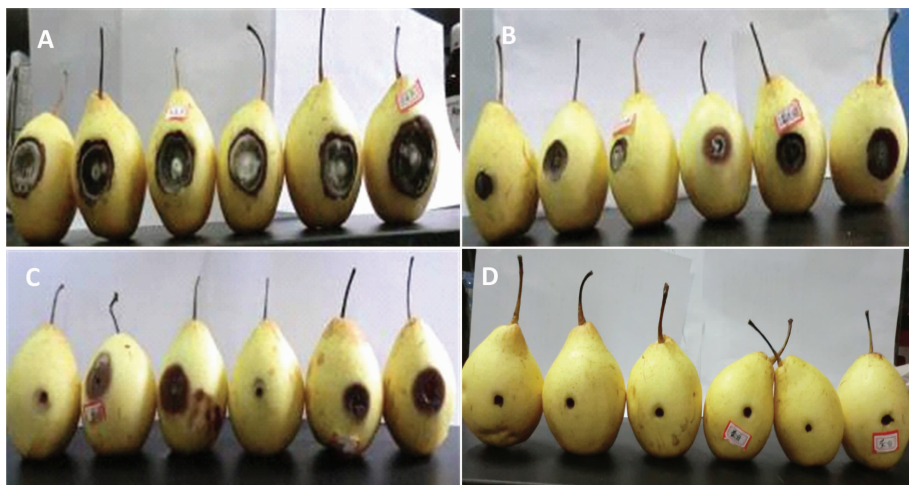
2.3.1 对孢子萌发的影响 多黏类芽孢杆菌 HT16 蛋白粗提液对梨黑斑病原菌孢子萌发的影响如图 4 所示。由图 4-A 中可以看出,梨黑斑的对照组孢子已经萌发,经测定其萌发率为 96.67%,并生长出菌丝,而图 4-B 中的孢子未萌发并且有消融现象出现。

2.3.2 对菌丝生长的影响 在扫描电镜下观察了 HT16 处理梨黑斑菌丝生长的形态,结果如图 5 所示。图 5-B-1、图 5-B-2 为粗提蛋白处理后菌丝状况。由此可以看出,蛋白粗提液处理的梨黑斑菌丝扭曲并且萎缩,菌丝外表皮有脱落现象,菌丝变成畸形状态,且有断裂现象。而正常的菌丝光滑、均匀(图 5-A-1、图 5-A-2)。

## 3 结论与讨论

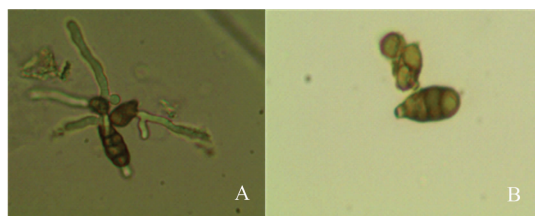
对峙法和牛津杯法的结果均显示,多黏类芽孢杆菌 HT16 对梨黑斑病原菌链格孢菌有显著的抑制作用。HT16 菌悬液、发酵液和粗提蛋白对梨采后黑斑病均表现出一定的抑制效果。其中,粗提蛋白的效果最显著。扫描电镜和电子显微镜观察发现,粗提蛋白处理过的病原菌孢子基本不萌发,并有消融现象,且菌丝扭曲、萎缩,菌丝外表皮出现脱落和断裂。这些结果显示了多黏类芽孢杆菌 HT16 作为生防细菌的可行性。

HT16 菌株发酵过程中产生的粗提蛋白对梨采后黑斑病的防治效果非常显著,抑菌机制试验也证实了粗提蛋白对梨



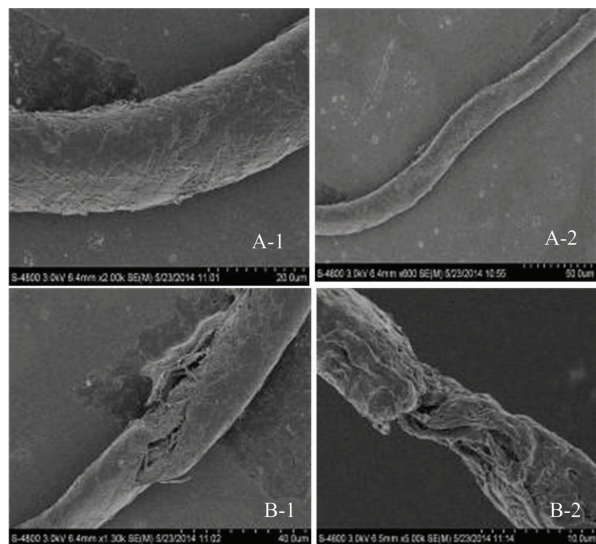
A—对照; B—菌悬液; C—发酵液; D—蛋白粗提液

图3 不同处理液对梨采后黑斑病的抑菌效果



A—对照组; B—处理组

图4 HT16 蛋白粗提液对孢子萌发的抑制作用



A—对照组; B—蛋白粗提液处理组

图5 蛋白粗提液对菌丝生长的影响

黑斑及其孢子和菌丝的抑制作用。近年来,利用微生物自身的拮抗、竞争作用及其产生的抗菌蛋白防治果蔬采前和采后病原真菌的报道很多。其中,枯草芽孢杆菌 H110 的粗提蛋白对梨采后因青霉菌和黑斑病菌引起的腐败表现出很好的抑制效果<sup>[10]</sup>。周防震将番茄表面分离到的酵母菌 L-1-6 和 H-2 用于控制番茄的腐败,菌悬液处理后的番茄腐烂率、失水率和总损耗均显著降低,对采后番茄的根腐病及早疫病病害的控制也起到了显著效果<sup>[12]</sup>。Wichitea 等报道,分离自土壤中的枯草芽孢杆菌对柑橘类水果由青霉引起的病害抑制效果显著<sup>[13]</sup>。Arun 等发现,毕赤酵母和假丝酵母对炭疽病菌有防治

作用,能显著降低辣椒炭疽及其他病害的发病率<sup>[14]</sup>。细菌 P-FS08 所产生的拮抗蛋白对果蔬和粮食作物致病真菌也表现出广谱的抑菌作用,可使病原菌菌丝断裂、原生质体浓缩<sup>[15]</sup>。但对于多黏类芽孢杆菌 HT16 对梨黑斑的防治未见报道。

为使菌株真正在生产中应用,达到有效防治果蔬采前和采后病害的目的,在后续研究中还将对该菌株及其产生的抗菌物质进行安全性评价,同时联合农业相关企业尝试开发该微生物制剂,探讨该菌株与其他物质如壳聚糖、水杨酸等<sup>[16-17]</sup>的联合使用效果和使用方式,并进行田间药效试验,以为生物农药的研发和应用提供理论基础和实际参考,为果蔬病害的生物防治及食品安全提供保障。

#### 参考文献:

- [1] 杨晓蕾,钱国良,范加勤,等. 梨黑斑病菌拮抗细菌的筛选鉴定及其拮抗活性的研究[J]. 南京农业大学学报,2014,37(1):68-74.
- [2] Simmons E G. Alternaria themes and variations[J]. Mycotaxon, 1993,48:109-140.
- [3] Baudry A, Morziesier J P, Larue P. First report of Japanese pear black spot caused by Alternaria Kikuchiana in France[J]. Plant Disease, 2001,19(4):19-22.
- [4] 赵爽,刘伟成,裴季燕,等. 多黏类芽孢杆菌抗菌物质和防病机制之研究进展[J]. 中国农学通报,2008,24(7):347-350.
- [5] 陈雪丽,王光华,金剑,等. 多黏类芽孢杆菌 BRF-1 和枯草芽孢杆菌 BRF-2 对黄瓜和番茄枯萎病的防治效果[J]. 中国生态农业学报,2008,16(2):446-450.
- [6] Liu W W, Mu W, Zhu B Y, et al. Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens[J]. Agricultural Sciences in China, 2008,7(9):1104-1114.
- [7] 王宏,常有宏,陈志谊. 梨黑斑病原菌生物学特性研究[J]. 果树学报,2006,23(2):247-251.
- [8] Zhang H Y, Ma L C, Wang L, et al. Biocontrol of gray mold decay in peach fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid and their effects on postharvest quality parameters[J]. Biological Control, 2008,47(1):60-65.
- [9] 毛亮,周怡,张婷婷,等. 多黏性芽孢杆菌 HT16 抗真菌物质



张金萍, 蒋 萍. 新疆杨树叶纹斑病病原菌分离及致病性测定[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(1): 110–113.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.031

# 新疆杨树叶纹斑病病原菌分离及致病性测定

张金萍, 蒋 萍

(新疆农业大学林学与园艺学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

**摘要:**2014—2015 年通过实地考察、采集病叶标本并采用常规的组织分离方法对病叶中的病原菌进行分离, 对分离物培养纯化, 并观察其形态特征, 为确定这些分离物是否为杨树叶纹斑病的致病菌, 根据柯赫氏法则进行分离物的致病性测定及再分离试验。结果表明, 相同症状的病叶可以分离出多个不同的菌株, 由于不同菌株的致病性强弱不一, 使得在不同的接种条件下, 不同菌株对健康杨树叶片的致病性差异显著, 潜育期及发病率均不相同, 根据 ArcGIS 软件对病叶进行分级, 统计病情指数, 并进行 LSD 检验, 判断出强致病菌。通过再分离试验得到原致病菌, 在显微镜下对强致病菌进行形态学鉴定, 初步判定为链格孢属(*Alternaria* sp.) 真菌。

**关键词:**杨树叶纹斑病; 病原菌分离; 致病性测定; 链格孢属

**中图分类号:** S763.15 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0110-04

杨树是杨柳科杨属(*Populus* L.) 落叶乔木的通称, 全属共有 100 多个品种, 其中有 50 多种分布在我国, 主要栽种于我国西部各省。在北疆的额尔齐斯河流域、南疆的塔里木河流域以及天山南北坡的河谷中分布着大面积的杨树原始林<sup>[1-2]</sup>, 杨树也是新疆地区绿化造林的重要树种之一。国内外报道的有关杨树叶部坏死斑类的病害主要有褐斑病(*Marssonina brunnea*)<sup>[3]</sup> (别称黑斑病)、灰斑病(*Coryneum populinum*)、皱叶病(*Eriophyes dispar*)<sup>[4]</sup>、角斑病(*Cercospora populina*)<sup>[5]</sup>、叶缘枯病(*Macrophoma* sp.)<sup>[6]</sup>、花叶病(CMV)、黑星病(*Fusicladium tremulae*)、叶枯病(*Alternaria alternata*)<sup>[7]</sup>、斑枯病(*Septoria*)等, 其中叶枯病别称叶纹斑病(*Alternaria*)<sup>[8-9]</sup>。徐素琴等 1984 年对黑龙江省森林植物园、辽宁省盖县杨树研究所的病叶中的病原菌进行分离培养、鉴定, 确

定病原菌为细极链格孢(*Alternaria tenuis*), 但未作病原菌的致病性测定<sup>[10]</sup>。1979 年赵震宇首次报道了新疆杨树叶纹斑病的病原菌为细链格孢菌, 但未对病原菌进行分离及致病性测定<sup>[11]</sup>。黄毅 2010 年对采自东北林业大学林场的杨树叶枯病病样中的病原菌也进行了分离培养、鉴定, 确定病原菌为 [*A. alternata* (Fr.) Keissl], 但未作病原菌的致病性测定<sup>[5]</sup>。因此, 本研究通过对新疆杨树叶纹斑病病叶中的病原菌分离培养、纯化及致病性测定, 为进一步对杨树叶纹斑病的病原菌进行鉴定及确认其分类地位提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

杨树病叶于 2014 年 5 月至 2015 年 9 月采自乌鲁木齐市、石河子市、沙雅县、阿拉尔市、玛纳斯县等地区。

### 1.2 病原菌分离培养

采用组织分离法<sup>[12]</sup>, 取病健交界处组织, 切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块, 放入无菌的烧杯中, 用 0.1% 氯化汞溶液消毒 60 s, 然后用无菌水漂洗 3 次, 最后用无菌滤纸吸去多余的水分, 将病块组织移入 PDA 培养基平板上, 每皿放 5 块, 3 次重复, 以健康叶片组织作对照, 放入 25 ℃ 光照恒温培养箱中培

收稿日期: 2015-12-04

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技计划(编号: 201231110); 新疆维吾尔自治区森林培育重点学科资助项目。

作者简介: 张金萍(1988—), 女, 新疆塔城人, 硕士研究生, 研究方向为植物病理学。E-mail: 1491352390@qq.com。

通信作者: 蒋 萍, 博士, 副教授, 研究方向为植物病虫害防治。E-mail: xj661105@sina.cn。

的分离及特性研究[J]. 食品科技, 2009, 34(10): 2-9.

[10] 齐东梅, 惠 明, 梁启美, 等. 枯草芽孢杆菌 H110 对苹果梨采后青霉病和黑斑病的抑制效果[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(2): 171-174.

[11] 张 伟, 艾启俊, 吴小虎. 鹿蹄草素对两种果品致腐真菌的抑菌作用及其扫描电镜观察[J]. 食品科技, 2008, 33(1): 182-185.

[12] 周防震. 番茄采后病害拮抗酵母菌的筛选和应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.

[13] Wichitra L P, Samerchai C. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2008, 48: 113-121.

[14] Chanchaichavivat A R P. Identification of yeast strains from fruits,

vegetables: potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*) [J]. Biological Control, 2007, 42(3): 326-335.

[15] 石志琦, 胡梁斌, 于淑池, 等. 细菌 P-FS08 的鉴定及其对几种植物病原真菌的拮抗作用[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(3): 48-52.

[16] Meng X H, Qin G Z, Tian S P. Influences of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* combined with postharvest chitosan coating on postharvest diseases and quality of table grapes in storage[J]. LWT - Food Science and Technology, 2010, 43(4): 596-601.

[17] 崔 旻, 李 健, 曹建康, 等. 葡萄籽提取物、壳聚糖及其复合处理对鸭梨贮藏品质的影响[J]. 食品工业科技, 2009, 30(1): 282-285.