

尹宝重,刘博燕,刘盼,等. 苹果树皮内生菌对苹果树腐烂病的防治效果[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):84-86.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.022

# 苹果树皮内生菌对苹果树腐烂病的防治效果

尹宝重<sup>1,3</sup>, 刘博燕<sup>2</sup>, 刘盼<sup>2</sup>, 张月辰<sup>1,3</sup>

(1. 河北农业大学植物保护学院, 河北保定 071001; 2. 河北科技学院, 河北保定 071001; 3. 河北农业大学农学院, 河北保定 071001)

**摘要:**从苹果树皮中分离出 1 株对苹果腐烂病病菌具有较好拮抗作用的内生细菌——B5014。该菌株对腐烂病病菌的抑菌率达 55.59%, 显著高于其他菌株;通过对菌株 B5014 发酵滤液进行不同浓度稀释后发现,随着浓度的不断降低,菌株 B5014 发酵滤液对腐烂病病菌菌丝生长、孢子萌发的抑制率不断下降;田间试验表明,在接种时间较短(10 d)时,B5014 细菌悬浮液原液处理可以与生产中常规使用的 80% 代森锰锌 800 倍液防效基本持平,但到接种 20 d 时,防效低于常规化学防治方法。

**关键词:**苹果树;腐烂病;内生细菌;防效

**中图分类号:** S436.611.1<sup>+</sup>1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0084-02

河北省是我国最重要的苹果产区之一,苹果树种植已是当地农业的主导产业之一。近年来,随着气候、环境、生产方式的变化,苹果腐烂病在河北省苹果种植区发生日趋严重,已经严重影响当地苹果产业的健康持续发展<sup>[1]</sup>。现阶段苹果腐烂病的防治主要以化学防治为主,不但污染环境,而且容易引起农药残留超标,影响果实品质。再加上很多地方对腐烂病的防治并没有统一的标准,随意加大药量和用药频率的问题突出,导致病原菌抗药性增强,形成恶性循环。因此,筛选经济高效、环境友好的拮抗菌,对进一步促进“低毒高效”的苹果腐烂病防控模式的构建,推进河北省草莓产业良性、健康发展都具有重要意义。

有关苹果腐烂病菌拮抗菌的筛选研究,前人进行过一些。比如,高克祥研究表明,内生螺旋毛壳菌 ND35 产生的抗生素能有效抑制苹果树腐烂病病菌的生长,且它产生的发酵液有助于愈伤组织的形成<sup>[2]</sup>;原犇犇也证明,灰色链霉菌的 1 个变种对苹果树腐烂病病菌菌丝生长有抑制作用<sup>[3]</sup>;展丽然提出,某些土壤中有一种放线菌,对腐烂病病菌具有拮抗作用<sup>[4]</sup>。类似的研究还有很多,但这些技术的筛选过程都比较长,而且拮抗效果往往不够稳定。内生真菌作为普遍存在于寄主植物中的真菌,能产生多种活性物质,可以起到抵御外来病原菌入侵的作用。本研究拟通过组织分离法和平板对峙试验从苹果树皮中分离和筛选内生细菌,研究其对苹果树腐烂病病菌的抑菌作用,为苹果腐烂病生物防治技术的进一步优化提供新的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

收稿日期:2016-07-06

基金项目:河北农业大学创新创业训练计划(编号:1009031)。

作者简介:尹宝重(1981—),男,河北沧州人,硕士,讲师,主要从事作物栽培学研究。E-mail: yinbaozhong@hebau.edu.cn。

通信作者:张月辰,博士,教授,博士生导师,主要从事植物生理学研究工作。E-mail: zhangyc1964@126.com。

(1)供试病原菌:苹果腐烂病病菌,由河北农业大学植物病理生态学实验室提供。

(2)供试植物材料:于 2015 年 12 月,从山东省烟台市、河北省石家庄市、甘肃省庆阳市等地选择 100 株 10~15 年生,腐烂病发生严重的植株,在它们健康的主干、主枝、侧枝、小枝、木质部等部位的树皮上采集获得。苹果品种为富士。

### 1.2 试验设计与方法

1.2.1 内生细菌的分离与筛选 采用组织分离方法<sup>[5]</sup>,将采集的树皮用水洗净,剪至 0.2 cm<sup>2</sup> 左右,用 75% 乙醇、4% 次氯酸钠充分消毒后,无菌水清洗。将彻底消毒的树皮研磨成匀浆,无菌水稀释,均匀涂抹在 PDA 培养基平面上,长出菌落后采用划线法纯化培养。将纯化后获得的菌株采用对峙培养法对内生细菌进行筛选,将打好的直径为 4 mm 的苹果树腐烂病病菌菌饼放于 PDA 平板 2 侧,用接菌环蘸取待测细菌悬浮液在平板中央划线,放于培养箱中 27℃ 黑暗培养 4 d。统计抑菌带宽度,选取抑菌带最宽的 5 种细菌,分别测量病原菌向拮抗菌方向生长的长度和对照中病原菌生长的半径,以抑制率表示拮抗作用,选取抑制率最高的细菌进行室内和田间生物测定。抑制率 = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径] × 100%。

1.2.2 B5014 菌株对苹果树腐烂病病菌的抑菌效果 发酵滤液对苹果树腐烂病病菌菌丝生长的抑制效果:挑取 B5014 接入 NB 液体培养基中,30℃ 摇床培养 24 h(浓度约为 8 × 10<sup>9</sup> CFU/mL),5 000 r、20 min 离心 2 次,收集上清液去除杂菌,得无菌滤液。在 48℃ 下,将无菌发酵滤液混入灭菌 PDA 培养基中,混匀后倒平板。平板中央接种苹果树腐烂病病菌菌饼,27℃ 培养 48 h 后测量菌落直径。PDA 培养基中,无菌滤液最终稀释倍数分别为 20、100、200、1 000 倍,以加灭菌蒸馏水的处理为对照<sup>[6-7]</sup>。发酵滤液对苹果树腐烂病病菌分生孢子萌发的抑制效果:取 20 μL 病原菌分生孢子悬浮液置于无菌载玻片上,再量取 20 μL 上述过滤液滴入载玻片上的分生孢子悬浮液滴中<sup>[8]</sup>。保湿条件下 25℃ 静置,分别于 5、13 h 后,以 PD 培养液作为对照,观察病原菌分生孢子萌发情况。每个处理 4 次重复,每个重复 3 次试验。

1.2.3 田间防效试验 试验于 2012 年 5 月 10 日在河北省保定市河北农业大学苹果试验基地进行,供试树种为红富士,树龄 8 年,株行距 3 m×4 m。土壤 pH 值为 7.2,有机质含量为 1.28%,水肥条件良好。选取其中 10 年生、长势相近的苹果树,在主枝上用 6 mm 打孔器打孔并接种旺盛生长的链格孢属内生真菌菌饼,用保鲜膜包裹保湿,3 d 后去掉菌饼,再接种腐烂病菌菌饼,保湿 1 周后去掉保鲜膜,记作处理 A;以 80% 代森锰锌 800 倍液作为对照处理,在接种腐烂病菌菌柄的部位涂抹 80% 代森锰锌 800 倍液,用量为 20 mL/m<sup>2</sup>,记作处理 B;以不接内生真菌的处理为空白对照(CK),每个处理 3 次重复,每个重复 8 棵树。记录苹果树腐烂病的发生情况,统计发病率和病斑面积。发病率=病株数/总株数×100%;病斑面积=1/4×π×长径×短径。

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离与筛选

通过对峙试验的筛选,共获得 125 株细菌,其中抑制率较高的有 7 种,所选的 7 种抑菌效果较好菌株的抑菌带宽度均在 12 mm 以上(表 1)。其中,抑菌带最宽的是 B5014,达 16.4 mm,显著高于其他菌株。菌株 B5014 菌落半径仅为 13.1 mm,显著低于其他菌株。从抑制率来看,所选 7 个菌株的抑制率均超过了 40%,其中菌株 B5014 最高,达 55.59%,且在 0.05 水平上显著高于其他菌株。

表 1 拮抗菌的筛选结果			
菌株编号	抑菌带宽度 (mm)	菌落半径 (mm)	抑制率 (%)
B0131	13.4±0.02b	16.1±0.08bc	45.42±0.09b
B0181	13.9±0.01b	15.6±0.09bc	47.12±0.12b
B1022	12.3±0.03b	17.2±0.04a	41.69±0.23b
B1101	14.6±0.02b	14.9±0.02c	49.49±0.08b
B1209	14.2±0.05b	15.3±0.08bc	48.14±0.11b
B5014	16.4±0.07a	13.1±0.06d	55.59±0.14a
B3005	14.3±0.02b	15.2±0.07bc	48.47±0.09b
CK	0.0	29.5	—

注:表中数据为平均值±标准误。同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。表 2 同。

表 3 田间接种内生细菌 B5014 对苹果树腐烂病的防治作用							
处理	接种点数 (个)	接种腐烂病菌 10 d			接种腐烂病菌 20 d		
		病斑数(个)	病斑面积(cm <sup>2</sup> )	防效(%)	病斑数(个)	病斑面积(cm <sup>2</sup> )	防效(%)
A	30	3.3	1.36b	79.4a	4.1	2.01c	77.5b
B	30	2.6	1.27b	80.8a	3.5	1.68b	81.2a
CK	30	19.8	6.61a		25.9	8.92a	

注:A 代表 B5014 细菌悬浮液原液;B 代表 80% 代森锰锌 800 倍液。

3 结论与讨论

苹果树腐烂病是目前苹果生产中非常严重的病害之一,针对腐烂病的防治问题也一直属于苹果生产中的热点问题。但由于目前生产中大量采用化学方法进行防治,导致果实中农药残留高,环境也因此受到很大影响。所以,开发一些环境友好型的技术、方法就成为目前苹果树腐烂病防治中的重要研究方向。本研究在苹果树皮中筛选出对苹果树腐烂病具有较好拮抗效果的内生细菌 B5014,经过对它的发酵滤液进行

2.2 内生细菌 B5014 对苹果树腐烂病病菌的抑菌效果

由表 2 可知,B5014 发酵滤液对苹果树腐烂病病菌菌丝生长和孢子萌发具有明显的抑制效果,且这种抑制效果随着发酵滤液浓度的降低而降低。从 B5014 不同浓度发酵滤液对苹果树腐烂病病菌菌丝抑制情况来看,随着发酵滤液浓度降低,腐烂病病菌菌落直径不断增大,到稀释 500 倍时,其菌落直径已达到 23.1 mm,与对照差异不显著;稀释 20 倍时,B5014 发酵滤液对腐烂病病菌菌丝抑制率最高,达 85.1%,显著高于其他浓度梯度。从 B5014 不同浓度发酵滤液对苹果树腐烂病孢子萌发情况来看,稀释 500 倍时,发酵滤液对病原菌孢子的抑制作用已经很弱,孢子萌发率已经达到 61.8%,与对照无显著差异。发酵液稀释 20 倍时,对病原菌孢子的抑制作用非常强,抑制率为 100%,显著高于其他处理。

表 2 不同浓度的 B5014 发酵滤液对苹果树腐烂病病菌菌丝生长和孢子萌发的抑制效果				
稀释 倍数 (倍)	病原菌菌丝		病原菌孢子	
	菌落直径 (cm)	抑制率 (%)	孢子萌发率 (%)	抑制率 (%)
20	3.6±0.8d	85.1±1.9a	0.0±0.0f	100.0±1.8a
50	20.3±0.7d	15.8±1.8b	16.3±0.5e	76.0±2.1b
100	21.4±0.9c	11.2±0.7c	39.4±1.1d	42.0±1.8c
300	22.3±1.1b	7.5±0.8d	48.6±1.2c	28.4±1.5d
500	23.1±0.8ab	4.1±0.3e	61.8±1.5ab	9.0±0.9e
CK	24.1±0.8a	0.0±0.0f	67.9±1.4a	0.0±0.0f

2.3 内生细菌 B5014 防治苹果树腐烂病的田间试验结果

表 3 是内生细菌 B5014 防治苹果树腐烂病的田间药效试验结果。由表 3 可知,在 2 个时间段的观测中,B5014 细菌悬浮液原液处理的病斑面积均显著低于空白对照,且接种腐烂病菌 10 d 时与 80% 代森锰锌 800 倍液处理差异不显著。从防效来看,在接种腐烂病菌 10、20 d 时,B5014 细菌悬浮液原液处理的防效分别可达 79.4%、77.5%。由此可知,在接种时间较短的时候,B5014 细菌悬浮液原液处理可以与生产中常规使用的 80% 代森锰锌 800 倍液防效基本持平,但随着病菌接种时间的延长,防效则低于常规化学防治方法。

不同浓度梯度稀释后发现,不同稀释倍数的发酵滤液对腐烂病病菌菌丝生长和孢子萌发的抑制作用有显著差异。这为进一步研究该菌株的抑菌机制及作相关鉴定都提供了一定的参考。同时,田间试验也表明,应用 B5014 细菌悬浮液,对苹果树腐烂病的防效比生产中常规使用的 80% 代森锰锌 800 倍液要低一些。推测这可能与未将 B5014 菌株加工成剂型,影响其功能的有效发挥有关。因此,接下来将进一步对 B5014 的发酵工艺进行优化,以使其更好地在苹果树腐烂病防治中发挥功效。

韦荣昌,唐 其,白隆华. 田七炭疽病病原的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):86-88.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.023

# 田七炭疽病病原的分离与鉴定

韦荣昌<sup>1</sup>, 唐 其<sup>1,2</sup>, 白隆华<sup>1</sup>

(1. 广西药用植物园,广西南宁 530023; 2. 湖南农业大学园艺园林学院,湖南长沙 410128)

**摘要:**炭疽病是田七生长发育过程中一种严重的病害,为明确引起炭疽病的病因,从引起田七叶片穿孔和褐化的样本上分离病原,对病原进行致病性测定,对显微形态和 rDNA ITS 分子进行鉴定。结果表明,2 种田七炭疽病病原分别为人参炭疽菌(*Colletotrichum panacicola*)和胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)。

**关键词:**田七;炭疽病;人参炭疽菌;胶孢炭疽菌;病原鉴定;发生规律;病害防治

**中图分类号:**S435.675 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)10-0086-03

田七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 别称三七、山漆、金不换、南方神草等,为五加科 (Araliaceae) 人参属 (*Panax*) 多年生草本植物,主要以根和根茎入药<sup>[1]</sup>。田七为我国著名的传统中药,是人参属植物中皂苷类分子多样性最丰富、含量最高、最有医疗保健价值以及最具有开发利用前景的药材<sup>[2]</sup>,在中枢神经系统、血液系统、心脑血管系统以及免疫系统等方面具有较好的生理活性<sup>[3-7]</sup>,广泛应用于药品、食品、保健品和化妆品中。然而,由于独特的生态环境及严重的连作障碍,导致田七病害发生种类多、发病重<sup>[8]</sup>。2014—2015 年,笔者在广西壮族自治区南宁市各地田七病害的田间调查中发现了造成田七叶片穿孔和褐化的 2 种病害,导致叶片大量脱落,严重影响药材的质量和产量。本研究通过病原分离和鉴定,确认人参炭疽菌 (*Colletotrichum panacicola*) 和胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*) 侵染田七是造成其叶片穿孔和褐化的主要原因,为进一步系统研究该病的发生规律及其病害防控提供参考。

收稿日期:2015-12-10

基金项目:广西壮族自治区科技攻关项目(编号:桂科重 1355001-1);广西壮族自治区自然科学基金(编号:2013GXNSFAA019207、2014GXNSFAA118254);广西壮族自治区药用植物园青年基金(编号:桂药基 201106);广西壮族自治区卫生计生委委员会自筹课题(编号:ZZ014236)。

作者简介:韦荣昌(1983—),男,广西梧州人,博士,助理研究员,主要从事生药学研究。Tel: (0771) 2443056; E-mail: wrc830612@163.com。

## 参考文献:

- [1] 贾世隆. 陇东苹果生产中存在的问题及可持续发展对策[J]. 甘肃农业科技,2002(2):23-24.
- [2] 高克祥. 内生真菌 *Chaetomium spirale*, *Stagonospora* sp. 与病原菌、寄主植物相互作用的机制[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2005.
- [3] 原彝彝. 几种林木病原菌拮抗放线菌的筛选及其活性物质研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2007.
- [4] 展丽然. 苹果腐烂病菌拮抗放线菌的筛选、鉴定及发酵条件的优

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源及症状描述

标本来源于广西药用植物园田七种植基地,通过田间自然感病和人工接种发病叶片进行症状描述。

### 1.2 病原菌的分离纯化及致病性测定

选取染病田七叶片,在病健结合组织处切取 0.5 cm 小块,依次用 75% 乙醇浸泡 30 s,0.1% 氯化汞消毒 2 min,灭菌水漂洗 3~5 次,置于 PSA 培养基上 26℃ 恒温培养,待菌丝长出后挑取菌落的边缘进行纯化,通过单孢分离纯化后的菌落,得到纯培养分离物。待分离获得的菌株经单孢纯化后,保存于 PSA 培养基斜面上,置于 4℃ 冰箱中贮存,备用。

依据针刺接种法进行病原菌致病性测定,在健康的田七叶片上接种纯培养的分离物(菌丝块),置于 26℃ 的恒温培养箱内保湿培养,3 次重复,以未接种的健康田七叶片作对照,定期观察叶片的发病情况。对接种发病的叶片进行病原菌再分离,观察分离得到的病原菌是否与接种菌株相同。

### 1.3 形态学鉴定

对 PSA 平板上的病原菌菌落特征及产孢情况进行观察分析,同时对分生孢子进行革兰氏染色,显微测定分生孢子盘、分生孢子梗长以及分生孢子的大小。

### 1.4 分子生物学鉴定

1.4.1 DNA 提取 采用易润华等的方法<sup>[9]</sup>,用 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取病原菌基因组 DNA。

1.4.2 rDNAITS 区的扩增及测序 以 ITS1 (5'-TCCGTAG

化[D]. 保定:河北农业大学,2008.

- [5] 黄海东,杨红澎,王 玉,等. 云雾龙胆内生菌的分离鉴定及抗菌活性分析[J]. 微生物学通报,2010,37(7):1017-1021.
- [6] Xin Y F, Shang J J. Bio-control trials of *Chaetomium spirale* ND35 against apple canker[J]. Journal of Forestry Research, 2005, 16(2): 121-124.
- [7] 王 磊,邵佐鹏,黄丽丽,等. 防治苹果腐烂病杀菌剂的室内筛选[J]. 植物病理学报,2009,39(5):549-554.
- [8] 张淑颖,曲田丽,孙 阳,等. 剑麻内生细菌 JM-3 对苹果腐烂病抑制作用的研究[J]. 华北农学报,2013,28(4):208-213.