

刘 萍,牛新湘,管力慧,等. 葡萄致腐菌灰葡萄孢及其拮抗菌贝莱斯芽孢杆菌的分离鉴定[J]. 江苏农业科学,2024,52(15):144-153.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.15.018

葡萄致腐菌灰葡萄孢及其拮抗菌贝莱斯芽孢杆菌的分离鉴定

刘 萍^{1,3,4}, 牛新湘^{2,5}, 管力慧^{1,3,4}, 杨红梅^{1,4,5}, 楚 敏^{1,4,5}, 包慧芳^{1,4}, 王 宁^{1,4,5},
詹发强^{1,4}, 林 青^{1,4}, 杨 蓉^{1,4}, 龙宣杞^{1,4}, 姜 恺^{1,4}, 史应武^{1,3,4,5}

(1. 新疆农业科学院微生物应用研究所, 新疆乌鲁木齐 830091; 2. 新疆农业科学院土壤肥料与农业节水研究所, 新疆乌鲁木齐 830091;
3. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆乌鲁木齐 830052; 4. 新疆特殊环境微生物实验室, 新疆乌鲁木齐 830091;
5. 农业农村部西北绿洲农业环境重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830091)

摘要:分离筛选出对葡萄致腐菌灰葡萄孢有较强拮抗作用的拮抗菌,丰富葡萄采后保鲜拮抗菌资源,以期对葡萄灰霉病的生物防治提供理论依据和奠定应用基础。利用组织块分离法在腐烂的葡萄果实中分离得到灰葡萄孢,梯度稀释法从葡萄园土壤中分离得到潜在拮抗菌,通过平板对峙及琼脂扩散法筛选出拮抗作用较强的生防菌,并通过形态学观察、生理生化测定、生物学鉴定确定其种属。通过对拮抗菌进行溶血性测定初步探索其是否对人体有溶血作用。分离得到的葡萄致腐菌通过形态学观察,病原菌 PH-23 菌丝初期呈灰白色,继续培养会逐渐转变为淡淡的青灰褐色,菌丝繁盛,孢子众多。对病原菌 PH-23 进行 ITS、 β -*tub* 序列分析,结合形态学特征确定其为灰葡萄孢。致病力测定结果表明,PH-23 接种后葡萄症状与葡萄灰霉病症状相符,腐烂严重。筛选得到对葡萄致腐菌 PH-23 拮抗作用较强的生防菌 TP-1,抑菌圈直径为 22.49 mm。通过形态学观察,菌体为杆状,芽孢呈椭圆形,大小为 $0.62\ \mu\text{m} \times 2.35\ \mu\text{m}$ 。TP-1 革兰氏染色阳性。生理生化鉴定结果初步认为 TP-1 为芽孢杆菌。基于 16S rDNA 基因、*rpoB* 基因、*gyrB* 基因序列分析确定其为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。拮抗菌 TP-1 的溶血性测定显示其对人体无溶血作用。拮抗菌 TP-1 对灰葡萄孢有较强的拮抗作用,在葡萄采后贮藏及生物保鲜中具有潜在的应用价值。

关键词:葡萄灰霉病;灰葡萄孢;生物防治;生理生化鉴定;拮抗菌

中图分类号:S436.631.1⁺9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)15-0144-09

葡萄是我国重要的水果,营养与经济价值颇高,果实汁多味美,且含有多种营养物质及生物活性物质^[1]。我国生产的葡萄主要以鲜食为主,相比其他生产大国 20% 的鲜食率,我国基本上有 70% 用于鲜食^[2]。早在 2002 年我国鲜食葡萄的产量就突破 200 万 t,一跃成为世界第一的鲜食葡萄生产大国。但葡萄由于具有鲜嫩柔软,皮薄肉厚,美味多汁,含水量、含糖量较高的特点,在采收及贮运销售过程中非常容易遭受病原菌侵染引起腐烂^[3]。其

中,由灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)引起的灰霉病是葡萄会面临的严重病害,因为与其他致腐菌相比,*Botrytis cinerea* 不仅具备适应性强、增殖速度快以及遗传变异大的特点,还拥有低温致病与潜伏侵染的优势^[4]。*Botrytis cinerea* 在 $-5\ ^\circ\text{C}$ 的低温下仍可存活生长,并产生较多的分生孢子,传播、繁殖,因此在适宜贮藏果实的温度 $0\ ^\circ\text{C}$ 中葡萄依然存在因 *Botrytis cinerea* 而腐烂变质的风险,葡萄一旦被 *Botrytis cinerea* 感染,通过分生孢子的传播,腐烂会迅速扩散,难以控制,进而导致葡萄产量损失严重^[2]。

目前,主要是以农业和化学防治的办法来预防控制葡萄灰霉病,但这些办法都存在一些缺陷。而利用拮抗菌进行生物防治,能够大大降低化学农药的使用率,治理农药残留的问题,与此同时还可预防病菌形成耐药性。尤其对已形成抗药性的病菌进行拮抗菌防治,不失为是一种有效解决抗药性的

收稿日期:2023-09-04

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金(编号:31860024);新疆维吾尔自治区重点研发项目(编号:2021B02004、2022B02053-2、2022A02005);国家重点研发计划(编号:2022YFD1400304)。

作者简介:刘 萍(1995—),女,河南信阳人,硕士研究生,从事食品生物技术研究。E-mail:1105898118@qq.com。

通信作者:史应武,博士,研究员,从事微生物生态与植物健康研究。E-mail:syw1973@126.com。

办法^[5]。因此,从玫瑰香葡萄腐烂的果实中分离得到致腐菌灰葡萄孢,并在从葡萄园土壤中分离得到的细菌中,利用平板对峙法筛选出对灰葡萄孢具有较好拮抗作用的拮抗菌,对其通过形态学观察、生理生化测定、生物学鉴定进行菌种鉴定,以期丰富葡萄灰霉病优良拮抗菌资源,为今后的菌剂研发提供选择,扩大葡萄灰霉病的防治途径。

1 材料与方法

1.1 试供材料

1.1.1 试供葡萄 玫瑰香葡萄,购自乌鲁木齐市沙依巴克区北园春水果市场。

1.1.2 试供土样 选择新疆石河子、昌吉、五家渠、博乐、库尔勒、哈密为采样点。于各采样点的葡萄园中使用 5 点取样法,用铲子将表层土移开,于距土壤表面 5~20 cm 处采样,将同一地区采集的土样混匀,装入采样袋带回。

将采集的土样分别过直径 2 mm 的筛网去除石块与杂根,将过筛后的各土样装入密封袋,4 ℃ 保存备用。

1.1.3 培养基 NA 培养基:氯化钠 1.5 g,牛肉浸粉 0.9 g,蛋白胨 3.0 g,琼脂 4.5 g,pH 值为 7.3 ± 0.1(25 ℃),蒸馏水溶解,加热玻璃棒搅拌以便充分溶解,终体积为 300 mL,121 ℃ 灭菌 15 min,备用。

NB 培养基:氯化钠 1.5 g,牛肉浸粉 0.9 g,蛋白胨 3 g,pH 值为 7.2 ± 0.2(25 ℃),蒸馏水溶解,加热玻璃棒搅拌以便充分溶解,终体积为 300 mL,121 ℃ 灭菌 15 min,备用。

PDB 培养基:葡萄糖 6.0 g,马铃薯浸粉 1.8 g,蒸馏水溶解,加热玻璃棒搅拌以便充分溶解,终体积为 300 mL,121 ℃ 灭菌 20 min,备用。

PDA 培养基:葡萄糖 6.0 g,马铃薯浸粉 1.8 g,琼脂 6.0 g,pH 值为 5.6 ± 0.2(25 ℃),蒸馏水溶解,加热玻璃棒搅拌以便充分溶解,终体积为 300 mL,121 ℃ 灭菌 20 min,备用。

1.1.4 其他材料 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒、Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、0.22 μm 有机滤膜、直径 6 mm 打孔器、玻璃珠、接种环、竹签。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离纯化 将玫瑰香葡萄置于温度为 25 ℃,相对湿度为 85% 的恒温气候箱中,自然发病。粗筛:采用组织块分离法。用 75% 乙醇对腐

烂变质的葡萄处理 30 s 进行表面消毒。消毒后无菌水冲洗去除乙醇残留,无菌滤纸吸除表面水分。使用无菌镊子及刀片将葡萄果皮与果肉分离,分别取 0.5 cm² 果皮与果肉置于 PDA 平板中,24 ℃ 恒温培养 2~5 d。纯化培养:无菌接种环取少量粗筛单菌落菌丝以无菌水稀释,取稀释液涂布于 PDA 平板,24 ℃ 恒温培养 2~5 d,重复以上操作至每 PDA 平板均为形态一致的单菌落。

1.2.2 病原菌形态学观察及致病力测定 用 6 mm 无菌打孔器于病原菌平板中选取单菌落打孔,获得病原菌菌饼,将菌饼倒置(培养基在上方)紧贴于 PDA 平板中央,24 ℃ 恒温培养 2~5 d。观察病原菌的形态特征。

对新鲜玫瑰香葡萄果实进行表面消毒,75% 乙醇处理 1 min,2% 次氯酸钠处理 30 s,自然晾干。将分离得到的病原菌返接到葡萄果实上,观察发病症状。

1.2.3 病原菌基因组 DNA 提取及分子生物学鉴定

病原菌基因组 DNA 的提取:用无菌打孔器(6 mm)对病原菌平板进行打孔,得到病原菌菌饼,取 15 个病原菌菌饼接种于 PDB 培养基中,容量为 500 mL、装液量为 100 mL,25 ℃、150 r/min 振荡培养 2 d,此为病原菌种子液。取病原菌种子液 1 mL,转接于 PDB 培养基中,容量为 500 mL、装液量为 200 mL,25 ℃、150 r/min 振荡培养 5 d,此为病原菌菌液。取病原菌菌液于 50 mL 离心管中,9 000 r/min 室温离心 20 min,收集病原菌菌体。将菌体用无菌滤纸充分吸除水分,利用液氮将病原菌菌体快速研磨至细腻均一的粉末状,取适量于 1.5 mL 无菌离心管中。按照 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒的指示说明提取 DNA,−20 ℃ 保存。

对病原菌的 ITS 基因片段进行扩增:引物序列为 ITS1(5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)、ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)。PCR 反应体系为 25 μL:2 × Taq PCR Green Mix 12.5 μL,上、下游引物各 0.5 μL,病原菌 DNA 1 μL,ddH₂O 10.5 μL。扩增条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min,48 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存^[6]。

对病原菌的 β-tub 基因片段进行扩增:引物序列为 β-tub-F1(5′-GGTAACCAAATCGGTGCTG GTTTC-3′)、β-tub-R1(5′-ACCCTCCGTGTACT GACCCTTGGC-3′)。PCR 反应体系为 25 μL:2 ×

Taq PCR Green Mix 12.5 μL , 上、下游引物各 0.5 μL , 病原菌 DNA 1 μL , ddH₂O 10.5 μL 。扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存^[7]。

扩增片段的序列分析及系统发育树的构建: 将 PCR 扩增产物进行凝胶电泳, 观察扩增片段大小。所用琼脂糖凝胶浓度为 1.5%, 取 PCR 扩增产物 5 μL , 以等量 ddH₂O 为空白对照, Maker E 为参照标准, 设定电压 90 V。电泳结束后于 EB 染料中染色 15 min, 自来水淋去染料残留, 凝胶成像分析仪观察扩增片段大小。将产生明显条带的 PCR 产物委托上海生工生物工程股份有限公司测序。利用 SepMan 软件对结果进行序列拼接, 然后在 NCBI 数据库中进行比对, 再利用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。

1.2.4 拮抗菌的分离纯化及筛选 将采集的土样以无菌水稀释至合适梯度, 取 100 μL 涂布于 NA 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 14 ~ 24 h。纯化培养: 无菌接种环取单菌落以无菌水稀释后, 取稀释液涂布于 NA 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 14 ~ 24 h, 纯化至每 NA 平板均为形态一致的单菌落。

采用平板对峙法进行拮抗菌的初筛。用无菌接种环取少量灰葡萄孢菌丝以无菌水稀释, 取稀释液涂布于 PDA 平板。待充分吸收后, 十字交叉选取 4 点, 均距平板中央 2.5 cm, 将纯化的单菌落点接于 4 点, 24 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 选出可产生明显抑菌圈的拮抗菌。

采用琼脂扩散法复筛拮抗菌。将初筛的拮抗菌接种于 100 mL NB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min 振荡培养 14 ~ 20 h, 取菌液于 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 室温离心 10 min, 上清液用 0.22 μm 有机滤膜过滤, 即获得拮抗菌的无菌滤液。无菌接种环取少量病原菌以无菌水稀释, 取稀释液涂布于 PDA 平板。待稀释液充分吸收后, 十字交叉选取 4 点, 均距平板中央 2.5 cm 处用 6 mm 无菌打孔器打孔, 取 80 μL 拮抗菌无菌滤液注入孔中, 24 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 观察拮抗菌对病原菌的拮抗作用。

1.2.5 拮抗菌形态学观察及生理生化测定 形态学观察: 用无菌接种环取单菌落以无菌水稀释, 取稀释液涂布于 NA 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 14 ~ 24 h, 观察其形态特征。革兰氏染色, 显微镜下查看其菌体形态特征。

生理生化测定: 参考《常见细菌系统鉴定手册》进行^[8]。鉴定项目有: 氧化酶试验、V - P 试验、苯丙氨酸、酪蛋白水解、接触酶试验、酪氨酸、D - 甘露糖、淀粉水解、D - 阿拉伯糖、D - 甘露醇、H₂S 产气试验、明胶液化、柠檬酸盐、甲基红反应、L - 阿拉伯糖、吡啶试验、D - 木糖、硝酸盐还原、葡萄糖等。

1.2.6 拮抗菌基因组 DNA 提取及分子生物学鉴定

拮抗菌基因组 DNA 的提取: 用无菌接种环取拮抗菌单菌落, 接种于 100 mL NB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min 振荡培养 14 ~ 20 h, 获得拮抗菌菌液。取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 按照 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒的指示说明提取 DNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

对拮抗菌的 16S rDNA 基因片段进行扩增: 引物序列为 27F(5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') 和 1492R(5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3')。PCR 反应体系为 25 μL : 2 \times *Taq* PCR Green Mix 12.5 μL , 上、下游引物各 0.5 μL , 拮抗菌 DNA 1 μL , ddH₂O 10.5 μL 。扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存^[9]。

对拮抗菌的 *rpoB* 基因片段进行扩增: 引物序列为 *rpoB* - f(5' - AGGTCAACTAGTTCAGTATGGAC - 3'), *rpoB* - r(5' - AAGAACCGTAACCGGCAACTT - 3')。PCR 反应体系为 25 μL : 2 \times *Taq* PCR Green Mix 12.5 μL , 上、下游引物各 0.5 μL , 模板 DNA 1 μL , ddH₂O 10.5 μL 。扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 51 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存^[10]。

对拮抗菌的 *gyrB* 基因片段进行扩增: 引物序列为 *gyrB* UP - 1(5' - GAAGTCATCATGACCGTTCTG CAYGCNGGNGGNAARTTYGA - 3'), *gyrB* UP - 2r(5' - AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNA CRTCNCGRTCNGTCAT - 3')。PCR 反应体系为 25 μL : 2 \times *Taq* PCR Green Mix 12.5 μL , 上、下游引物各 0.5 μL , 拮抗菌 DNA 1 μL , ddH₂O 10.5 μL 。扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存^[11]。扩增片段的序列分析及系统发育树的构建同“1.2.3”节。

1.2.7 拮抗菌溶血性测定 将拮抗菌与金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 用无菌接种环同时于血平板上划线, 34 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。观察拮抗菌与金黄

色葡萄球菌的生长情况,以此判断拮抗菌是否具有溶血性:菌落周围出现透明溶血圈为 β 溶血,对人体有强致病力;菌落周围出现绿色晕圈为 α 溶血,对人体致病力弱;若菌株正常生长无反应,则为 γ 溶血,无溶血性。金黄色葡萄球菌为阳性对照菌株,对人体有强致病力,菌落周围会出现透明溶血圈。

2 结果与分析

2.1 病原菌形态学特征及致病力测定

由图 1 可知,在 PDA 平板中,病原菌菌丝初期呈灰白色,继续培养会逐渐转变为淡淡的青灰褐色,菌丝繁盛,孢子众多。灰霉病是葡萄贮藏期间易发且危害严重的腐烂病害,初步筛选出与灰葡萄孢相似的病原菌,将其命名为 PH-23。



图1 PH-23 在 PDA 平板中的形态

将 PH-23 接种到健康玫瑰香葡萄后,葡萄表皮出现白色丝绒状菌丝,后期菌丝转变为土灰色,孢子丰富易振落,果实皱缩凹陷,散发出土腥味。症状与葡萄灰霉病症状相符。

2.2 病原菌分子生物学鉴定

病原菌 ITS 片段鉴定结果见图 2 的 I-a 与 I-b,测序片段经比对后确定其 ITS 片段大小为 517 bp,与 PCR 扩增产物凝胶电泳图谱保持一致,说明试验结果可靠。基于 ITS 基因构建的系统发育树中病原菌 PH-23 与 *Botrytis cinerea* CLR15 (MK370693) 相似性为 100%。病原菌 β -tub 片段鉴定结果见图 2 的 II-a 与 II-b,测序片段经比对后确定其 β -tub 片段大小为 477 bp,与 PCR 扩增产物凝胶电泳图谱保持一致,说明试验结果可靠。基于 β -tub 基因构建的系统发育树中病原菌 PH-23 与 *Botrytis cinerea* ASF-Bc8 (MH208281) 相似性为 100%。综合以上试验结果最终将病原菌鉴定为灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*)。

2.3 拮抗菌的分离筛选

采用稀释涂布平板法与平板对峙法结合筛选出对 PH-23 有拮抗作用的菌株 81 株,琼脂扩散法复筛得到拮抗菌 46 株。由表 1 可知,据抑菌圈直径大小将拮抗菌划分为 5 个等级,其中抑菌圈直径 0~5 mm 表示拮抗效果很弱,共 19 株;6~10 mm 表示拮抗效果弱,共 6 株;11~15 mm 表示拮抗效果中等,共 10 株;16~20 mm 表示拮抗效果强,共 9 株;21~25 mm 表示拮抗效果很强,共 2 株。其中,拮抗效果很弱的菌株最多,占总菌株的 41.3%,拮抗效果很强的菌株仅占总菌株的 4.3%。

将拮抗效果很强的 2 株拮抗菌命名为 TP-1、TP-2,选用拮抗能力最强的 TP-1 开展后续试验,结果见图 3,TP-1 对 PH-23 拮抗作用明显,抑菌圈直径为 22.49 mm。

2.4 拮抗菌的形态学特征及生理生化特征

由图 4 可知,TP-1 在 NA 平板中菌落近圆形,表面自中间向四周呈花瓣状,光滑干燥,整体乳白色,不透明;其菌体为杆状,芽孢呈椭圆形,大小为 $0.62 \mu\text{m} \times 2.35 \mu\text{m}$;革兰氏染色阳性。拮抗菌 TP-1 及模式菌株生理生化鉴定结果见表 2,通过和枯草芽孢杆菌对比,初步认为 TP-1 为芽孢杆菌。

2.5 拮抗菌分子生物学鉴定

拮抗菌 16S rDNA 基因片段序列分析结果见图 5 的 III-a 与 III-b,扩增片段经比对后大小为 1 442 bp,与凝胶电泳图谱保持一致,说明试验结果可靠。基于 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树中拮抗菌与 *Bacillus velezensis* PgBe186 (MH211277) 相似性为 99.93%。拮抗菌 *rpoB* 基因片段序列分析结果见图 5 的 IV-a 与 IV-b,扩增片段经比对后大小为 1 195 bp,与凝胶电泳图谱保持一致,说明试验结果可靠。基于 *rpoB* 基因构建的系统发育树中拮抗菌与 *Bacillus velezensis* WLYS23 (CP055160) 相似性为 99.93%。拮抗菌 *gyrB* 基因片段序列分析结果见图 5 的 V-a 与 V-b,扩增片段经比对后大小为 1 148 bp,与凝胶电泳图谱保持一致,说明试验结果可靠。基于 *gyrB* 基因构建的系统发育树中拮抗菌与 *Bacillus velezensis* NN05 (MT119758) 相似性为 98.25%。综上,基于 16S rDNA 基因、*rpoB* 基因、*gyrB* 基因序列分析确定拮抗菌为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*)。

2.6 拮抗菌溶血性测定

由图 6 可知,在相同条件与时间培养下,金黄色

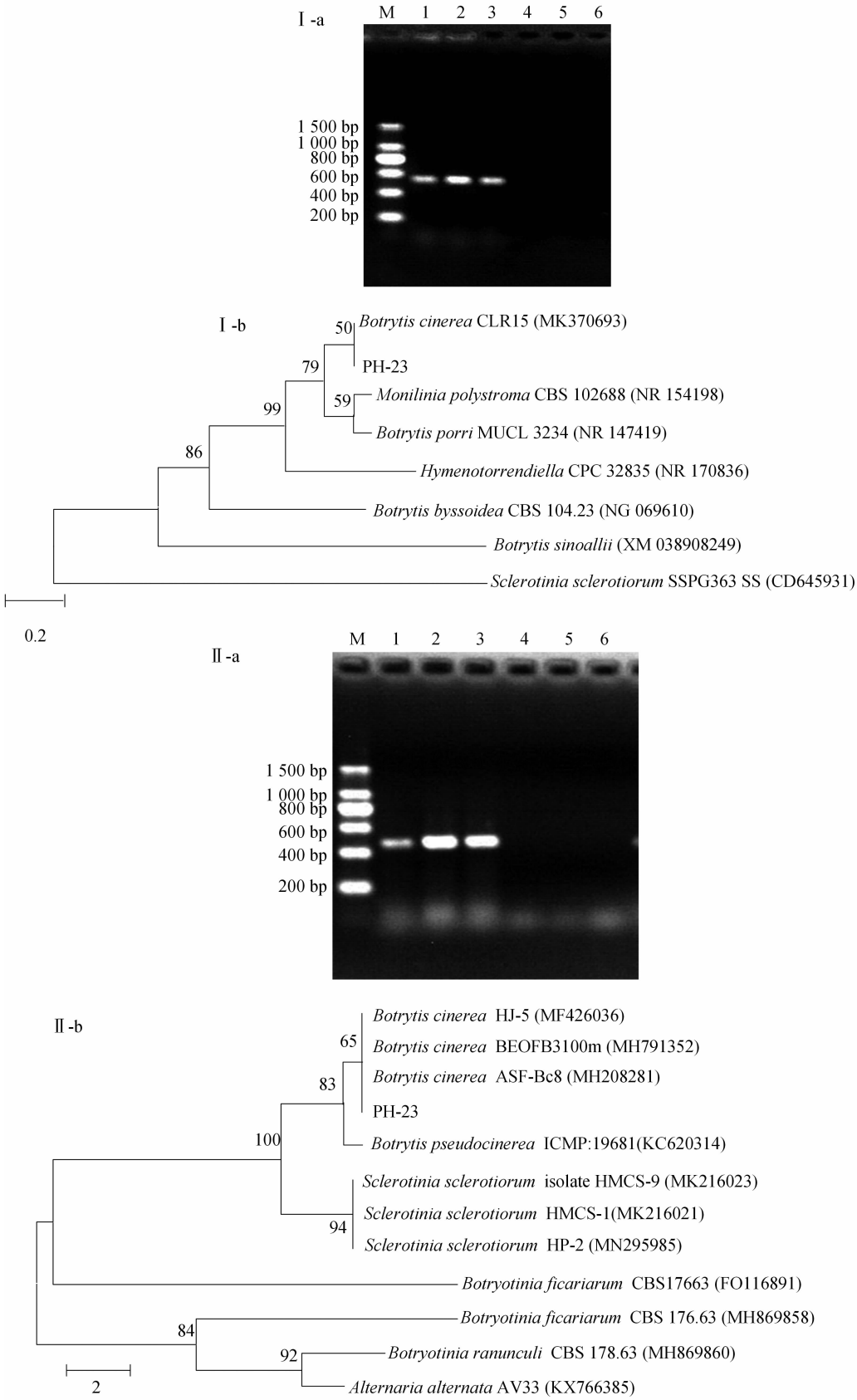


图2 病原菌分子生物学鉴定

表 1 46 株拮抗菌对 PH-1 的拮抗效果

拮抗效果	抑菌圈直径 (mm)	数量	比例 (%)
++++	21 ~ 25	2	4.3
+++	16 ~ 20	9	19.7
++	11 ~ 15	10	21.7
+	6 ~ 10	6	13.0
-	0 ~ 5	19	41.3

注: +++++ 表示很强; +++ 表示强; ++ 表示中; + 表示弱; - 表示很弱。

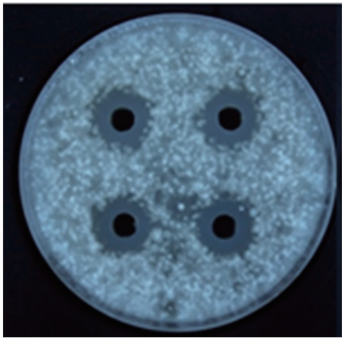


图3 TP-1 对 PH-23 的拮抗作用

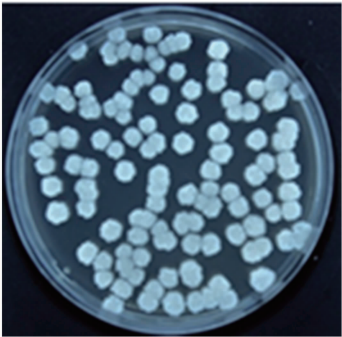


图4 TP-1 在 NA 板中的菌落形态

葡萄球菌周围出现明显溶血圈,为 β 溶血,与金黄色葡萄球菌性质一致。而拮抗菌周围无变化,为 γ 溶血,说明拮抗菌对人体无溶血作用。

3 讨论与结论

葡萄在运输和销售过程中由于自身特性,极易受到外界的机械损伤及致腐菌感染带来严重的经济损失,因此采后做好葡萄的防腐保鲜工作是必不可少的。葡萄灰霉病是葡萄最为常见且危害极大的采后病害之一,病原菌灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 不仅能够感染葡萄,还同样能够作用于菜品、树类以及花草^[12-13],危害极大。灰葡萄孢能够形成菌核与分生孢子,使其传播迅速且可在作物残留物中长

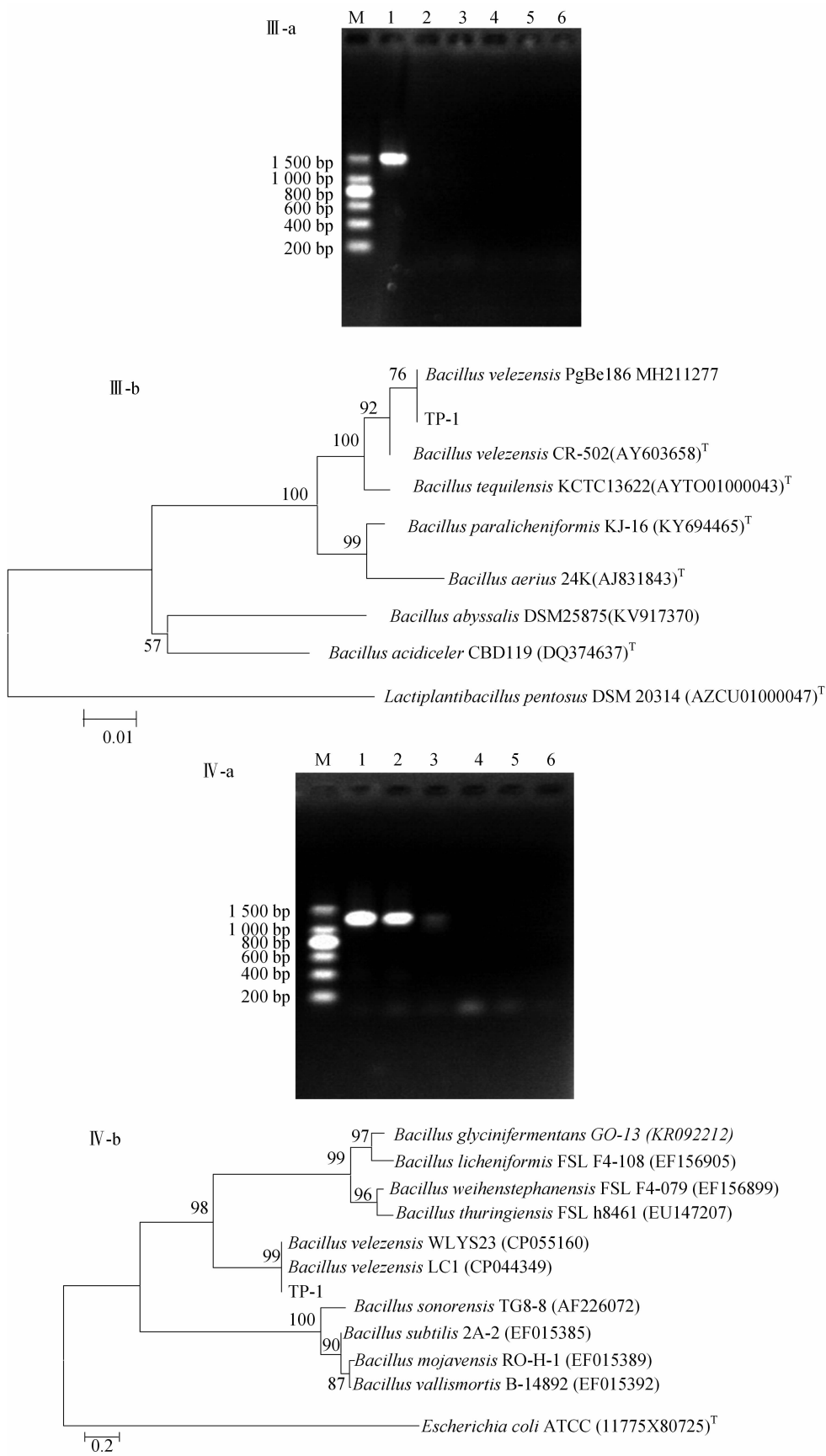
表 2 拮抗菌 TP-1 及其模式菌株的生理生化结果

项目	鉴定结果	
	1	2
氧化酶试验	+	+
V-P 试验	+	+
苯丙氨酸	-	-
酪蛋白水解	+	+
接触酶试验	+	+
酪氨酸	-	+
D-甘露糖	+	+
淀粉水解	+	+
D-阿拉伯糖	-	-
D-甘露醇	+	-
H ₂ S 产气试验	-	-
明胶液化	+	+
柠檬酸盐	+	+
甲基红反应	+	-
L-阿拉伯糖	+	+
吡啶试验	-	-
D-木糖	+	+
硝酸盐还原	+	+
D-葡萄糖	+	+

注:1 表示 TP-1;2 表示模式菌株 *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* NRRL B-23049T。+ 表示阳性反应; - 表示阴性反应。

时间存活,加之可低温生存使其有效防治变得困难^[14]。当前人们常用的化学试剂防控葡萄灰霉病虽然有效,但长期使用化学试剂所带来的的农药残留、农药抗性以及环境的污染问题不容忽视^[15]。因此采用生物防治的办法“以菌治菌”备受人们的青睐,相较于以往的化学农药,生物防治从大自然甚至植物本身分离出拮抗菌,不仅具有对人与环境友好、不易产生抗性、来源广泛、毒性低、有助于保护生物多样性等多种优点,且可靶向性防治,高效安全^[16-18]。因此,积极扩充拮抗菌资源对高效的生物防治菌剂的开发应用有重要的基础意义。

本研究从贮藏腐烂的玫瑰香葡萄中以组织块分离法得到致腐真菌,将其命名为 PH-23,通过形态学观察与致病力测定初步确认其为灰葡萄孢,而后通过 ITS、 β -tub 基因片段进行序列分析将其鉴定为灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*),ITS 序列在种内不同菌株之间会高度保守,但是在种间则会表现出较大差异,因此 ITS 序列对于属内种间的系统学研究有较大的应用价值。 β -tub 则是一种重要的管家基因,常被用作种系发育的深层分析标记^[19]。从不同



Ⅲ 为 16S rDNA 序列分析结果；Ⅳ 为 *rpoB* 序列分析结果；Ⅴ 为 *gyrB* 序列分析结果

图5 拮抗菌分子生物学鉴定

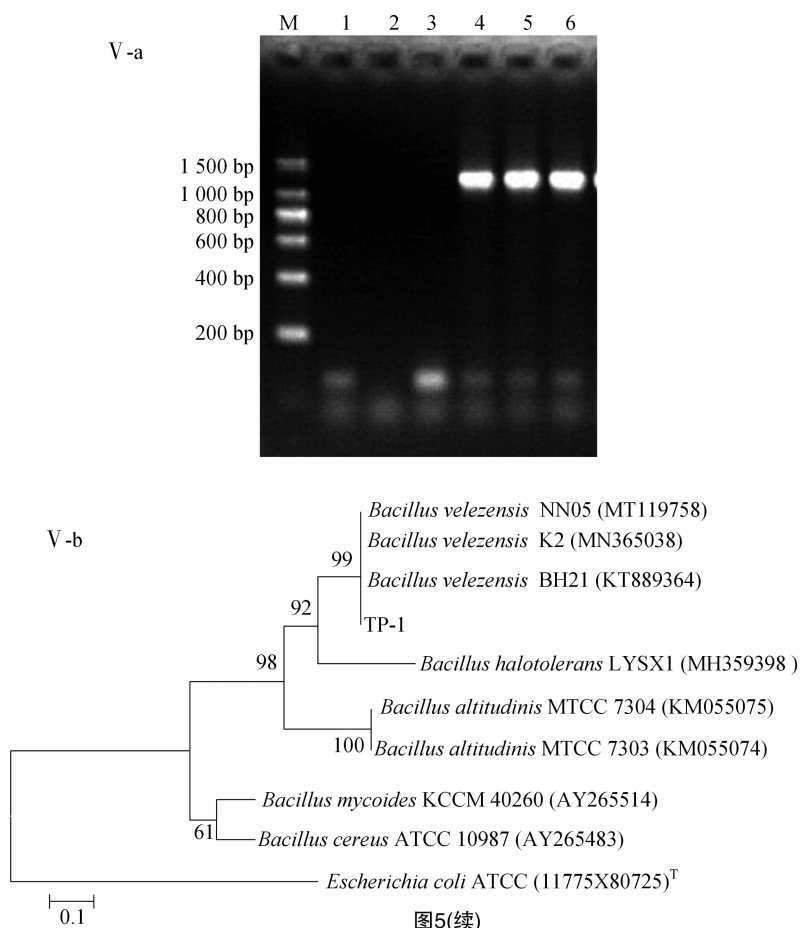


图5(续)

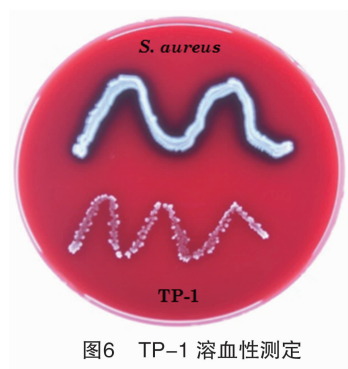


图6 TP-1 溶血性测定

因序列分析手段与其他核酸分析技术结合使用可更精准地鉴别菌株,现今常用蛋白编码基因辅助芽孢杆菌属的分类鉴定,如 *gyrB* 是促旋酶(*gyrase*)的 β 亚单位基因,是管家基因,在细菌的近缘物种区分鉴定方面,比 16S rDNA 更有分辨率,常用于细菌种水平的鉴定^[25-28]。王天力等将 16S rRNA 基因序列与 *gyrB* 基因序列进行比较分析,结果显示属于枯草芽孢杆菌群的各种、亚种的 *gyrB* 基因相似性为 75%~95%,区分效果要比 16S rRNA 更好^[29]。而 *rpoB* 基因是编码 RNA 聚合酶的 β 亚基,负责 RNA 的合成。2009 年, Ki 等分离得到 20 个芽孢杆菌,分别来自不同的海洋环境,利用 16S rDNA 与 *rpoB* 基因分析鉴定其多样性,分析结果显示以 *rpoB* 基因分析构建的系统发育树比 16S rDNA 基因分析构建的系统发育树大 4.5 倍^[30],说明 *rpoB* 基因可以很好地区分鉴定芽孢杆菌菌种。

本研究分离筛选所得的 TP-1 对 PH-23 有较好的拮抗作用,抑菌圈直径为 22.49 mm,溶血性试验表明对人体无溶血作用,说明 TP-1 具有发展为高效防治葡萄灰霉病生物菌剂的潜力。前人的研

葡萄园土壤中以稀释涂布平板法与琼脂扩散法结合分离筛选出对 PH-23 有明显拮抗作用的一株拮抗菌,抑菌圈直径为 22.49 mm,并将其命名为 TP-1。通过形态特征、生理生化特性初步认定其为芽孢杆菌,再通过 16S rDNA、*rpoB* 和 *gyrB* 等 3 个基因的序列结合分析将其鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。16S rDNA 基因是细菌分离鉴定常用的通用型引物,可在所有细菌中稳定表达,具有高度保守性。但也存在一定不足,对于亲缘关系较近细菌之间的鉴定,16S rDNA 分辨率不高,可能会出现不精确的鉴定结果^[20-24]。将 16S rDNA 基

究表明,芽孢杆菌属是极具研究开发潜力的生防菌,主要是由于该属可以产生多种抑制植物病原菌的抗生素和形成抗药性强的内生孢子^[31]。贝莱斯芽孢杆菌的代谢产物中就包含多种抗菌物质,如淀粉环素、杆菌素、蜂毒素、表面蛋白活性剂等物质,可抑制多种病原菌生长,拮抗作用明显,具有较大的研究价值^[32]。如孙平等研究发现,贝莱斯芽孢杆菌 L-1 对梨灰霉及青霉病菌有较好的抑制作用^[33];杨胜清研究发现,贝莱斯芽孢杆菌 S6 对番茄早疫病病原菌和灰霉病原菌有明显的拮抗作用且对常见病原菌有较广的抑制作用^[34]。前人的研究充分展现了贝莱斯芽孢杆菌的生防潜力,而本研究仅仅开始了第 1 步,TP-1 对 PH-23 详细的拮抗机理及其防治效果尚未开展研究,有待进一步试验,积极探索安全、有效、可持续的葡萄灰霉病生物防治之路。

综上所述,本研究从贮藏腐烂的葡萄果实中分离得到致病真菌 PH-23,通过观察形态特征及 ITS β -tub 基因序列分析将其鉴定为灰葡萄孢。从 21 份葡萄园土壤中分离筛选出对 PH-23 有明显拮抗作用的拮抗菌 TP-1,通过观察形态特征、生理生化特性及 16S rDNA、rpoB、gyrB 基因序列分析将其鉴定为贝莱斯芽孢杆菌。溶血性试验表明拮抗菌 TP-1 不具备溶血作用,在葡萄采后贮藏及生物保鲜中具有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] 宋开艳,阿米尼古丽·再那吉,冯宏祖,等. 南疆葡萄采后致病菌分离鉴定及拮抗菌的筛选[J]. 新疆农业科学,2011,48(5): 871-876.
- [2] 李 静. 伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia contaminans* B-1 对玫瑰香葡萄采后病害生防潜力研究[D]. 太原:山西大学,2016.
- [3] 秦 丹,石雪晖,胡亚平,等. 葡萄采后贮藏保鲜研究进展[J]. 保鲜与加工,2006(1):9-12.
- [4] 李丽梅. 果蔬保鲜生物拮抗菌的筛选及剂型研究[D]. 天津:天津科技大学,2018.
- [5] 韩 君,范怀峰,王海娜,等. 防治灰霉病药剂的开发进展[J]. 农药研究与应用,2011,15(3):5-10.
- [6] 徐云飞,祁依佳,温思思,等. 浙贝母黑斑病致病菌的分离鉴定及分子检测[J]. 浙江中医药大学学报,2020,44(2):111-118.
- [7] 白飞荣,姚 粟,凌 空,等. 黄曲霉和米曲霉的多相鉴定方法[J]. 微生物学通报,2018,45(1):215-226.
- [8] 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.
- [9] 杨 迪,杜婵娟,张 晋,等. 香蕉枯萎病拮抗菌贝莱斯芽孢杆菌的筛选鉴定及其生物学特性[J]. 中国生物防治学报,2021,37(1):165-171.
- [10] Qiu Z C, Lu X M, Li N Y, et al. Characterization of garlic endophytes isolated from the black garlic processing [J]. *MicrobiologyOpen*,2018,7(1):e00547.
- [11] Nochi Z, Sahebkhietari N, Kharaziha P, et al. Comparison of 16S rRNA, 23S rRNA and *gyrB* genes sequences in phylogenetic relationships of *Shigella* isolates from Iran [J]. *Annals of Microbiology*,2009,59(3):615-622.
- [12] Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease[J]. *Molecular Plant Pathology*,2007,8(5):561-580.
- [13] Shlezinger N, Goldfinger N, Sharon A. Apoptotic-like programmed cell death in fungi: the benefits in filamentous species[J]. *Frontiers in Oncology*,2012,2:97.
- [14] Wedge D E, Smith B J, Quebedeaux J P, et al. Fungicide management strategies for control of strawberry fruit rot diseases in Louisiana and Mississippi [J]. *Crop Protection*, 2007, 26(9): 1449-1458.
- [15] 黄 曦,许兰兰,黄荣韶,等. 枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展[J]. 生物技术通报,2010(1):24-29.
- [16] 郭 荣. 我国生物农药的推广应用现状及发展策略[J]. 中国生物防治学报,2011,27(1):124-127.
- [17] 朱昌雄,蒋细良,姬军红,等. 我国生物农药的研究进展及对未来发展建议[J]. 现代化工,2003,23(7):1-4.
- [18] 黄运霞. 生物农药的研究与应用概述[J]. 农药市场信息,2000(3):14-15.
- [19] 张俊楠. 两株盐生海芦笋内生真菌分离鉴定及其次级代谢产物研究[D]. 南京:南京农业大学,2015.
- [20] 刘朝军,沈定霞. 16S rDNA 序列测定在细菌鉴定中的应用[J]. 军医进修学院学报,2011,32(7):774-776,779.
- [21] Hall L, Doerr K A, Wohlfel S L, et al. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003,41(4):1447-1453.
- [22] Olsen G J, Larsen N, Woese C R. The ribosomal RNA database project[J]. *Nucleic Acids Research*,1991,19(S1):2017-2018.
- [23] 安 然,易图永,肖启明,等. *gyrB* 基因在细菌分类和检测中的应用[J]. 江西农业学报,2010,22(4):18-20,24.
- [24] Kumar A, Asthana M, Gupta P, et al. 16SrRNA sequencing of dye decolorizing bacteria isolated from soil[J]. *Bioinformation*,2015,11(1):1-5.
- [25] 朱碧春,顾 丽,李 正,等. 南极土壤芽孢杆菌的分离鉴定及其防治玉米细菌性褐腐病的研究[J]. 南京农业大学学报,2017,40(4):641-648.
- [26] 郝云婕,韩素贞. *gyrB* 基因在细菌系统发育分析中的应用[J]. 生物技术通报,2008(2):39-41.
- [27] Kasai H, Watanabe K, Gasteiger E, et al. Construction of the *gyrB* database for the identification and classification of bacteria [J]. *Genome Informatics Workshop on Genome Informatics*, 1998, 9: 13-21.
- [28] 侯晓丽,曹清毅,潘泓草,等. 霍乱弧菌和副溶血弧菌分离株的 *gyrB* 基因系统发育分析[J]. 微生物学报,2006,46(6):884-889.

陈淑童,刘 芮,陈魏锋,等. 堆肥对烟草黑胫病的防效及作用机理研究[J]. 江苏农业科学,2024,52(15):153-159.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.15.019

堆肥对烟草黑胫病的防效及作用机理研究

陈淑童¹, 刘 芮², 陈魏锋³, 杨自东³, 李 振¹, 张 鑫¹, 陈芊如¹, 尤祥伟¹, 李义强¹, 沈广材²

(1. 中国农业科学院烟草研究所, 山东青岛 266101; 2. 云南省烟草公司保山市公司, 云南保山 678000;

3. 云南省烟草公司大理州公司洱源县分公司三营烟站, 云南洱源 671200)

摘要:为明确堆肥对烟草黑胫病的生防效果,进而揭示其抑菌防病机理,以蘑菇渣、浒苔粉、玉米秸秆、凹凸棒和生物炭按照不同组合制备的 4 种堆肥为研究对象,采用菌丝生长速率法分析堆肥浸提液对烟草黑胫病菌的抑制效果,并进一步通过扫描电镜观察菌体超微结构;采用盆栽试验,考察 4 种堆肥对烟草黑胫病的防治效果,并从烟草植物防御酶活性、土壤理化性质和土壤酶活性的角度揭示防治机理。结果表明,4 种堆肥浸提液原液对病原菌菌丝生长均有明显的抑制作用,最高抑制率达 85.54%,且电镜结果显示菌丝体受到严重破坏,而高温灭菌液几乎无抑制效果。盆栽试验结果表明,堆肥处理显著促进了烟株的生长发育,最大叶长、最大叶宽和最大叶面积显著增加;降低了烟草黑胫病的发生率和病情指数,其中堆肥 A(蘑菇渣+浒苔粉+秸秆+凹凸棒)和 AB(蘑菇渣+浒苔粉+秸秆+凹凸棒+生物炭)防效可达 100%;改善了土壤理化性质和土壤酶活性,有效提高土壤 pH 值、速效磷含量、速效钾含量,提升土壤脲酶和酸性磷酸酶活性。综上所述,堆肥处理可通过抑制病原菌生长、改善土壤理化性质和调节土壤酶活性,有效控制烟草黑胫病的发生。

关键词:堆肥;烟草黑胫病;盆栽试验;生物防治;作用机理

中图分类号:S435.72 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)15-0153-07

烟草黑胫病是由土传卵菌寄生疫霉烟草致病变种(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)引起的维管束病害^[1]。该病在众多烟区均有发生,不仅造成了严重的损失且防治难度较大。过去多年中,选

育抗病品种、轮作和施用化学杀菌剂等已被广泛证明其防治的有效性,然而,随着现代化农业要求升级,这些措施的局限性逐渐显现,亟待寻求一种更加环保、高效的防治策略^[2]。

土壤有机改良可以在目前集约化的耕作制度下,通过有效影响土壤微生物群落结构来提高土壤肥力,进而实现防治病害和改良土壤的双重功能^[3]。作为土壤改良的主要策略之一,堆肥处理不仅可以绿色无害化处理有机废弃物,还可以防控土传病害,对于经济可持续健康发展具有重要意义^[4-5]。已有大量研究表明,堆肥及其浸提液可以

收稿日期:2023-09-01

基金项目:中国烟草总公司云南省公司重大项目(编号:2023530000241017)。

作者简介:陈淑童(2001—),女,山东潍坊人,硕士研究生,研究方向为植物病害检疫与防治研究。E-mail:stchen0531@163.com。

通信作者:沈广材,男,硕士,助理农艺师,主要从事烟叶生产研究。E-mail:sgczdy910@163.com。

[29] Wang L T, Lee F L, Tai C J, et al. Reclassification of *Bacillus axarquensis* Ruiz - Garcia et al. 2005 and *Bacillus malacitensis* Ruiz - Garcia et al. 2005 as later heterotypic synonyms of *Bacillus mojavensis* Roberts et Al. 1994 [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57 (Pt 7): 1663 - 1667.

[30] Ki J S, Zhang W, Qian P Y. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 77 (1): 48 - 57.

[31] Cavaglieri L, Orlando J, Etcheverry M. In vitro influence of bacterial mixtures on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1

production; effect of seeds treatment on maize root colonization [J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 41 (5): 390 - 396.

[32] Palazzini J M, Dunlap C A, Bowman M J, et al. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles [J]. Microbiological Research, 2016, 192: 30 - 36.

[33] 孙平平, 崔建潮, 贾晓辉, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 L-1 对梨灰霉和青霉病菌的抑制作用评价及全基因组分析 [J]. 微生物学报, 2018, 58 (9): 1637 - 1646.

[34] 杨胜清. 贝莱斯芽孢杆菌 S6 的鉴定、发酵条件优化及其生防作用研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2017.