

剑麻内生细菌 JM-3 对苹果腐烂病抑制作用的研究

张淑颖^{1,2}, 曲田丽³, 孙 阳⁴, 董向丽², 王彩霞², 李保华², 肖 春¹

(1. 云南农业大学 植保学院, 云南 昆明 650201; 2. 青岛农业大学 农学与植保学院, 山东 青岛 266109;

3. 青岛农业大学 化学与药学院, 山东 青岛 266109; 4. 青岛农业大学 生科院, 山东 青岛 266109)

摘要: 从剑麻叶片组织内分离获得 6 株内生细菌, 其中 JM-3 菌株对离体苹果枝条上苹果腐烂病菌的扩展致病有较好的抑制效果。JM-3 菌株在培养过程中能产生抑菌物质, 其无菌发酵滤液能抑制腐烂病菌菌丝的生长和分生孢子的萌发, 导致菌丝和芽管膨大畸形, 最终导致菌丝破裂、原生质外流。JM-3 菌株对多种果树和农作物病原真菌菌丝的生长都有明显的抑制作用。经 16S rDNA 序列分析和 RiboPrinter 分析, 鉴定菌株 JM-3 为枯草芽孢杆菌。

关键词: 内生细菌; 枯草芽孢杆菌; 苹果腐烂病

中图分类号: S436.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)04-0208-06

Inhibiting Effects of Endophytic Bacterial Strain JM-3 from *Agavesisalana Perrine* against *Valsa ceratosperma*

ZHANG Shu-ying^{1,2}, QU Tian-li³, SUN Yang⁴, DONG Xiang-li²,
WANG Cai-xia², LI Bao-hua², XIAO Chun¹

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China; 2. College of Agriculture and Plant Protection, Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China; 3. College of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China; 4. College of Life Sciences, Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China)

Abstract: Six isolates of endophytic bacterial strains were isolated from healthy leaves of *Agavesisalana Perrine* in which the strain JM-3 inhibited canker lesion expansion of *Valsa ceratosperma* on excised twigs significantly. The cell-free fermentation liquid of JM-3 inhibited mycelium growth and conidial germination of *Valsa ceratosperma*. The isolates produced anti-fungi substances, which caused malformation of mycelia and germ tubes. The malformed mycelium burst and protoplasm flow-out finally. JM-3 also showed clear inhibiting effect against mycelial growth of pathogen from several fruit trees and crop. JM-3 was identified as *Bacillus subtilis* based on 16S rDNA sequencing and RiboPrinter results.

Key words: Endophytic bacteria; *Bacillus subtilis*; *Valsa ceratosperma*

苹果腐烂病是世界各国苹果生产上的一种极为重要的病害, 近年来对苹果生产造成了巨大危害, 已成为苹果生产的严重障碍。它不仅危害苹果, 也危害海棠等苹果属植物。在我国, 苹果腐烂病俗称烂皮病、臭皮病、苹果癌症, 病害流行区主要在东北、华北、西北和山东等北方苹果产区, 其他省份也有分布。苹果腐烂病主要侵害苹果树的主干和主枝, 导致死枝、死树。

苹果腐烂病菌具有潜伏侵染的特点^[1], 正常的

苹果树皮表面的死组织或细胞团中带有潜伏病菌, 其侵入易而扩展难, 当寄主衰弱, 失去抗性时, 它便从潜伏状态转变为活跃状态而表现出强烈的致病性, 严重时引起主干、大枝以及整树枯死, 甚至造成毁园。一旦发病, 病原菌在表皮迅速蔓延, 其菌丝已深达木质部, 现今使用的化学药剂均因难以渗透进入木质部而有效控制病害^[2]。内生菌是植物病害生物防治的天然资源菌, 对人畜无毒无害、不污染环境, 可进入植物体内部各组织存活, 分泌活性物质有

收稿日期: 2013-05-12

基金项目: 现代农业产业技术体系项目(CARS-28); 山东省科技攻关计划项目(2010GNC10918); 国家自然科学基金项目(31000891; 31272001); 山东省“泰山学者”建设工程项目

作者简介: 张淑颖(1980-), 女, 山东文登人, 在读博士, 主要从事病虫害生物防治研究。

通讯作者: 李保华(1961-), 男, 山东潍坊人, 教授, 博士, 主要从事植物病害流行病学研究。

效抑制病原菌生长繁殖,是目前解决苹果腐烂病理想的防治策略,具有重要的开发应用前景。

1 材料和方法

1.1 拮抗菌株的分离与筛选

自青岛农业大学校园内采集健康剑麻叶片,清洗晾干,用酒精和次氯酸彻底消毒表面,切取 5 mm × 5 mm 小块组织,接种于 NA 培养基上,28 ℃ 黑暗培养 48 ~ 72 h,挑取菌落,纯化后用于拮抗菌的筛选。

将从富士苹果腐烂病斑分离、纯化,并在青岛农业大学流行学实验室保存的苹果腐烂病菌菌株活化后,接种到 PDA 平板的中央,在菌饼四周,与菌饼等距离处接种从剑麻组织内分离获得的细菌菌株,每皿 3 个接种点,以不接种细菌菌株的处理为对照。在 28 ℃ 黑暗条件下,将苹果腐烂病菌与细菌菌株对峙培养,72 h 后测量苹果腐烂病菌落边缘至细菌菌落边缘空白带,即抑菌带的宽度。全部试验,在不同时间重复 3 次。根据抑菌带的有无及宽度,筛选出对苹果腐烂病菌有拮抗作用的细菌菌株,用于苹果枝条上的抑菌试验。

将筛选出的对苹果腐烂病菌有拮抗作用的细菌菌株在 NB 中进行液体培养,获得菌株的发酵液。选取直径约 1 cm 生长健壮的苹果树健康枝条,截成 30 cm 长的枝段,用自来水冲洗和 75% 酒精进行表面消毒后,用直径 5 mm 打孔器打除枝条表皮,每个枝条分上、中、下,用打孔器打 3 个伤口,滴入 60 μL 细菌菌株发酵菌液。6 h 后在滴加发酵液的圆孔处,接种苹果腐烂病菌的菌饼,用塑料膜包扎。然后,置于 25 ℃ 恒温箱中保湿培养,10 d 后解除包扎膜,检查记录接种伤口是否发病,并测量病斑长度。全部试验在不同时间重复 3 次^[3-4]。

1.2 JM-3 菌株对苹果腐烂病菌的抑菌效果

发酵滤液对苹果腐烂病菌菌丝生长的抑制效果:将 JM-3 菌株接种到 NB 液体培养基中,在 30 ℃ 培养箱中,以 170 r/min 振荡培养 72 h。取发酵上清液经 0.2 μm 微孔滤膜过滤,即获得无菌发酵滤液。在 48 ℃ 下,将无菌发酵滤液混入灭菌 PDA 培养基中,混合均匀后倒平板。平板中央接种苹果腐烂病菌菌饼,27 ℃ 培养 48 h 后测量菌落直径。PDA 培养基中,无菌滤液的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。本试验在不同时间重复 3 次。

发酵滤液对苹果腐烂病菌分生孢子萌发的抑制效果:将 JM-3 的无菌发酵滤液混入灭菌 PD 液体培养液中,获得稀释 2.5, 10, 50 倍的发酵滤液。在滤

液中加入在大麦培养的苹果腐烂病菌的新鲜分生孢子,使孢子浓度达 1×10^6 个/mL。28 ℃ 下培养 24 h,显微镜下检查统计各处理中腐烂病菌分生孢子的萌发率,以 PD 培养基中孢子萌发率为对照,计算 JM-3 发酵滤液对苹果腐烂病菌分生孢子萌发的抑制率。全部试验重复 3 次。

分生孢子萌发抑制率 = (对照萌发率 - 处理萌发率) / 对照萌发率 × 100%

JM-3 对苹果离体枝条腐烂病菌扩展的影响:选取直径约 1 cm、长度 30 cm 的苹果树健康枝条,表面消毒后,用直径 5 mm 打孔器打除枝条表皮,每个枝条等距离 3 个打孔部位,然后滴加 40 μL JM-3 的无菌发酵滤液、过滤后的菌体悬浮液和发酵全液,以苯醚甲环唑(4 μg/mL)为药剂对照,NB 培养液为空白对照^[5]。伤口处理 24, 48, 72 h 后接种苹果腐烂菌饼,用塑料膜包扎后置于 25 ℃ 恒温培养箱中培养 10 d 后,解除包扎膜,观察接种点的发病情况,并测量病斑扩展的最大长度。分析 JM-3 对苹果枝条上腐烂病菌扩展的抑制效果。全部试验重复 3 次,每次每处理 3 个枝条。

JM-3 菌株对其他植物病原真菌的抑菌效果:将青岛农业大学植物病害流行学室保存的 12 种主要果树和农作物的病原真菌活化后,接种于 PDA 平板中央。在病原菌接种点周围接种 JM-3 菌株,每皿共接种 4 个点,离真菌接种点的距离相等。28 ℃ 下培养 120 h,观察测量抑菌圈的宽度。全部试验在不同时间重复 3 次,每次每种病原菌接种 2 皿。

1.3 JM-3 菌株的抑菌机制

JM-3 菌株对峙培养 3.5 d 后,取腐烂病菌菌落边缘的菌丝,以纯净水作负载剂在显微镜下观察菌丝的形态变化,并照相。

取在不同浓度的 JM-3 无菌滤液中培养 24 h 的苹果腐烂病菌分生孢子,制片在显微镜下观察孢子的形态变化,并照相。

1.4 JM-3 菌株的鉴定

形态观察:用划线法将 JM-3 的纯化菌株接在 NA 平板培养基上,30 ℃ 下培养 1 d,观察菌落的形态、颜色等特征。挑取菌体,涂布制片,革兰氏染色,显微镜下观察菌体的形态特征^[6]。

16S rDNA 测序:以 27f(5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3') 和 1492r(5'-GGTACCTTGTTACGACT T-3') 为 PCR 扩增引物,扩增全长的 16S rDNA 基因。PCR 反应体系(50 μL):10 pmol 模板 DNA,引物 27f 和 1492r 各 0.2 μmol,1 μL dNTP,5 μL *Taq* 反应缓冲液,0.25 μL *Taq* 酶,加水至 50 μL。PCR

反应参数: 预变性 98 ℃ 5 min; 95 ℃ 35 s, 55 ℃ 35 s, 72 ℃ 90 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 8 min。PCR 产物电泳纯化, 送生工生物工程(上海)有限公司测序, 获得 16S rDNA 序列, 通过 Blast 在 GenBank 上检索序列相似性, 将其序列与其高同源性(>99%)的已知菌株 16S rDNA 序列在 Mega 5.0 软件中进行分析。

基因指纹鉴定: 基因指纹鉴定采用杜邦 Ribo-Printer® 全自动微生物基因指纹鉴定系统完成。从培养皿中挑取单菌落, 在缓冲液中悬浮并加热灭活, 将之转移到仪器中自动检测^[7-8]。

1.5 数据分析

采用 SAS 9.0 进行数据统计, 用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株的分离与筛选效果

2009 年从剑麻叶片的组织内共分离获得 6 株菌落形态特征不同的细菌菌株, 通过平板对峙培养, 发现其中的 3 株对苹果腐烂病菌有明显的抑菌效果, 分别命名为 JM-1、JM-2 和 JM-3。3 个菌株与苹

果腐烂病菌对峙培养 72 h 后, 抑菌直径分别为 8.1, 7.9, 7.5 mm。将 3 个菌株的发酵液滴加到苹果枝条上用打孔器打出的圆形伤口中, 然后接种苹果腐烂病菌, 10 d 后苹果腐烂病斑的长度分别为 35.2, 37.5, 4.3 mm, 与对照相比, JM-1、JM-2 和 JM-3 的抑菌率分别为 8.9%, 2.8%, 88.9% (表 1), 其中 JM-3 的发酵液能显著的抑制苹果腐烂病菌在枝条上的生长扩展(图 1)。本研究对 JM-3 的生防潜能作进一步评价。

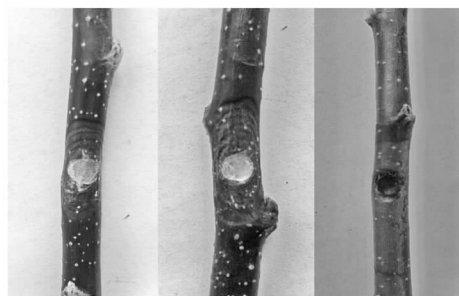


图 1 JM-1、JM-2 和 JM-3 对苹果枝条上苹果腐烂病菌生长扩展的抑制效果

Fig. 1 Inhibiting effects of JM-1, JM-2 and JM-3 on lesion expansion caused by *V. ceratosperma* on apple twigs

表 1 剑麻内生不同细菌菌株对苹果腐烂病菌的抑菌效果

Tab. 1 Inhibiting effects of different isolates of endophytic bacteria from *Agavesisalana* Perrine against growth of *V. ceratosperma*

抑制指标 Inhibiting index	剑麻内生细菌对苹果腐烂病菌的抑制效果 Inhibiting effects						CK
	JM-1	JM-2	JM-3	JM-4	JM-5	JM-6	
PDA 上抑菌圈直径/mm							
Diameter of inhibiting zone on PDA	8.1 ± 0.2	7.9 ± 0.1	7.5 ± 0.2	0	0	0	0
枝条上病斑扩展长度/mm							
Length of lesions on twigs	35.2 ± 1.4	37.5 ± 1.5	4.3 ± 0.6	—	—	—	38.6 ± 2.7
对病斑扩展的抑制率/%							
Inhibiting ratio of lesion expansion	8.9a	2.8a	88.9b	—	—	—	—

注: 不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。表 2~4 同。

Note: Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's multiple range test. The same as Tab. 2-4.

2.2 JM-3 对苹果腐烂病菌抑菌效果

对菌丝生长的抑制效果: JM-3 发酵滤液对苹果腐烂病菌的生长有明显的抑制效果, 且随着稀释倍数的增加, 抑菌效果降低。在添加不同浓度 JM-3 发酵滤液的培养基上, 培养 48 h 的苹果腐烂病菌的菌落直径有显著的差异。在稀释 20, 100, 200 倍的发

酵滤液培养上, 苹果腐烂病菌的菌落直径分别为 8.3, 22.7, 23.3 cm, 与对照有显著差异($P < 0.05$); 在稀释 1000 倍的发酵滤液培养基上, 苹果腐烂病菌的菌落直径为 27.0 cm, 与对照无显著差异(表 2)。结果表明, JM-3 的发酵滤液稀释 200 倍后仍对苹果腐烂病菌的菌丝生长有明显的抑制效果。

表 2 不同浓度的 JM-3 发酵滤液对苹果腐烂病菌菌丝生长的抑制效果

Tab. 2 Inhibiting effects of cell-free fermentation liquid of JM-3 at different concentration against mycelial growth of *V. ceratosperma*

抑制情况 Inhibition	不同稀释倍数的发酵滤液对腐烂病菌菌丝生长的抑制效果 Inhibiting effects				CK
	20 ×	100 ×	200 ×	1000 ×	
菌落直径/mm Diameter of Colonies	8.3 ± 0.3a	22.7 ± 0.3b	23.3 ± 0.3b	27.0 ± 0.6c	27.7 ± 0.3c
抑制率/% Inhibiting ratio of growth	69.9	18.1	15.7	2.4	0

对分生孢子萌发的抑制效果: JM-3 的发酵滤液对苹果腐烂病菌分生孢子的萌发有明显的抑制作用。在 5 倍稀释液中, 苹果腐烂病菌分生孢子的萌发率 23.3% , 发酵液对分生孢子萌发的抑制率为 65.7%; 当发酵滤液稀 10 倍后, 对苹果腐烂病菌的分生孢子的萌发仍有显著的抑制效果(表 3)。

表 3 不同浓度的 JM-3 发酵滤液对苹果腐烂病菌孢子萌发的抑制效果

Tab. 3 Inhibiting effects of cell-free fermentation liquid of JM-3 at different concentration against conidial germination of *V. ceratosperma*

抑制情况 Inhibition	不同稀释倍数的发酵滤液对分生孢子萌发的抑制效果 Inhibiting effects				CK
	10 ×	50 ×	100 ×	500 ×	
萌发率/% Germination ratio of conidia	0 ± 0a	23.3 ± 0.9b	55.3 ± 0.9c	65.3 ± 1.9d	68.0 ± 0.6d
抑制率/% Inhibiting ratio against germination	100	65.7	18.7	4.0	—

对苹果枝条上病斑扩展的抑制作用: 用 JM-3 的发酵液、菌体悬浮液和发酵滤液处理苹果离体枝条上的伤口后 24 h 接种苹果腐烂病菌菌饼。10 d 后 JM-3 菌体悬浮液处理伤口上的病斑长度为 49.4 mm , 与对照无显著差异, 表明 JM-3 的菌体对苹果腐烂病菌在枝条上的扩展没有明显的抑制效果。JM-3 发酵液和发酵滤液处理伤口上的苹果腐烂病斑长度分别为 16.6、25.7 mm , 显著短于对照 47.8 mm ($P < 0.05$) , 与苯醚甲环唑处理的伤口没有显著差异, 表明 JM-3 发酵液和发酵滤液都对苹果腐烂病菌在苹果枝条上的扩展有显著的抑制效果, 但 JM-3 发酵液和无菌发酵滤液之间无显著差异(表 4) 。表明 JM-3 的菌体本身对苹果腐烂病菌无拮抗作用, 而其发酵液, 即菌体在生长发育过程中分泌到体外的物质对苹果腐烂病菌有抑制作用。

表 4 JM-3 菌体悬浮液、发酵液和发酵滤液

对离体苹果枝条腐烂病菌扩展抑制作用

Tab. 4 Inhibiting effect of fermentation liquid, cell suspension and cell-free fermentation liquid on lesion expansion of *V. ceratosperma* on excised apple twigs

处理 Treatments	病斑长度/mm Means of lesion lengths
发酵液 24 h Fermentation liquid of 24 h	16.6 ± 0.9ab
菌体悬浮液 24 h Cell suspension liquid of 24 h	49.4 ± 2.3d
发酵滤液 24 h Cell-free fermentation liquid of 24 h	25.7 ± 2.3ab
发酵液 48 h Fermentation liquid of 48 h	22.3 ± 2.1ab
菌体悬浮液 48 h Cell suspension liquid of 48 h	49.1 ± 2.7d
发酵滤液 48 h Cell-free fermentation liquid of 48 h	21.1 ± 1.7ab
发酵液 72 h Fermentation liquid of 72 h	25.2 ± 1.9ab
菌体悬浮液 72 h Cell suspension liquid of 72 h	44.8 ± 2.5cd
发酵滤液 72 h Cell-free fermentation liquid of 72 h	17.6 ± 1.6ab
苯醚甲环唑 Difenoconazole	13.1 ± 1.4a
无菌水 Sterile water	47.8 ± 2.4d

用 JM-3 菌体悬浮液、发酵液和发酵滤液处理离体苹果枝条伤口后 48、72 h 接种苹果腐烂病菌形成苹果腐烂病斑的长度与 24 h 后接种无显著差异

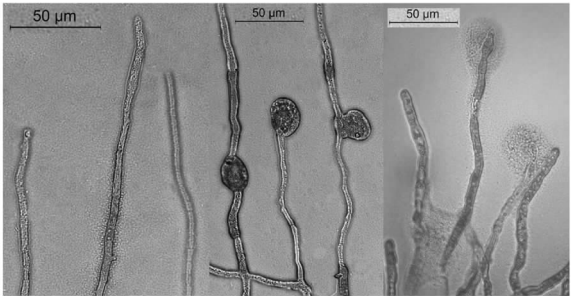
(表 4) 。表明 JM-3 产生的抑菌物质在自然条件下保存 72 h , 其抑菌效果并没有降低。

对其他病原菌的拮抗作用: 与其他病原真菌对峙培养结果表明, JM-3 对苹果炭疽病、轮纹病等多种果树、农作物的病原菌都有抑制效果(表 5) , 抑菌谱广泛。

表 5 JM-3 菌株对部分植物病原菌菌丝生长的抑制作用

Tab. 5 Antagonistic activity of JM-3 against several pathogenic mycelial growth

病原菌 Pathogens	抑菌圈半径/mm Radius of inhibiting zone
苹果炭疽病 <i>Glomerella cingulate</i>	7.1
苹果轮纹病 <i>Botryosphaeria dothidea</i>	7.8
苹果霉心病 <i>Alternaria alternate</i>	12.6
拟茎点霉菌 <i>Phomopsis brevistylospora</i>	7.9
玉米纹枯 <i>Rhizoctonia solani</i>	7.2
玉米弯孢 <i>Curvularia lunata</i>	11.4
玉米圆斑 <i>Bipolaris carbonum</i> Wilson	8.5
牡丹叶斑病 <i>Cladosporium paeoniae</i>	9.8
棉花枯萎病 <i>Fusarium oxysporum</i>	8.4
小麦赤霉病 <i>Fusarium graminearum</i>	9.0
青霉菌 <i>Penicillium expansum</i>	5.5



左. 对照; 中. 培养 3 d; 右. 培养 5 d
Left. Control; Middle. 3 days; Right. 5 days

图 2 在 JM-3 发酵滤液中培养不同时间的苹果腐烂病菌菌丝形态

Fig. 2 The mycelial morphology of *V. ceratosperma* cultured in cell-free fermentation liquid of JM-3 at different concentration and different days

2.3 JM-3 抑菌机理的初步探讨

显微观察发现(图2):正常菌丝细长,分支少。在发酵滤液中3 d后,菌丝分支增多,膨大变粗或畸形,末端膨大,或从菌丝侧壁突起,培养5 d后膨大或突出部分破裂,原生质外露。菌丝顶端膨大、破裂,预示抑菌物质影响菌丝细胞壁的生长和发育。



左. 对照; 中. 10 倍液; 右. 5 倍液; 箭头. 未萌发的分生孢子。
Left. Control; Middle. 10 times dilution; Right. 5 times dilution;
Arrow. Conidial disgermination.

图3 不同浓度 JM-3 发酵滤液对苹果
腐烂病菌分生孢子萌发的影响

Fig.3 Inhibiting effects of cell-free fermentation liquid
of JM-3 at different concentration against conidial
germination of *V. ceratosperma*

JM-3 发酵滤液的 10 倍液液中,培养 24 h 的苹果腐烂病菌分生孢子芽管长度只有正常萌发孢子的 1/3 ~ 1/2,而且有少量孢子端部膨大。在 5 倍液液中,腐烂病菌的分生孢子只是膨大,不产生芽管或产生很短的芽管。在 2 倍液液中,没有发现膨大的分生孢子。在不加 JM-3 发酵滤液的培养液中,苹果腐烂病菌分生孢子萌发时,体积先膨大,体积是原孢子

的几十倍,然后再萌发产生芽管。苹果腐烂病菌分生孢子的芽管很长,培养 96 h 后,芽管的长度是孢子长度 20 ~ 30 倍。在 50 倍液液中,苹果腐烂病菌孢子的萌发基本上看不出异常变化(图3)。

2.4 JM-3 的鉴定

JM-3 菌株的菌体杆状,周生鞭毛,革兰氏染色呈阳性,产芽孢,好氧或兼性厌氧。在平板上菌落灰白色,圆形或近圆形,边缘不整齐,凸起,表面干燥,不透明(图4)。



图4 JM-3 在 NA 培养基上的菌落形态

Fig.4 The growth of strain JM-3 in NA medium

对 JM-3 16S rDNA 序列测定结果发现 JM-3 菌株与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)同源性均达到 99% 以上。

经 RiboPrinter 鉴定,所测试 JM-3 菌株的 4 个样品都为枯草芽孢杆菌(图5)。根据 16S rDNA 测序结果和 RiboPrinter 鉴定结果,结合形态学、生理生化特性,将 JM-3 菌株鉴定为枯草芽孢杆菌,学名为 *Bacillus subtilis*。

	Sample Number	Label	DuPont ID Label	RiboPrint™ Pattern				
				1 kbp	5	10	15	50
1	433-116-S-1	1	<i>Bacillus subtilis</i>					
2	433-116-S-2	2	<i>Bacillus subtilis</i>					
3	433-116-S-3	3	<i>Bacillus subtilis</i>					
4	433-116-S-4	4	<i>Bacillus subtilis</i>					

图5 RiboPrinter 基因指纹鉴定结果

Fig.5 Results of gene finger mark in RiboPrinter

3 结论与讨论

剑麻生性强健,耐寒、耐旱、耐湿、耐瘠薄,抗病虫。本研究从剑麻叶片组织内分离获得 6 株内生细菌,其中 1 个菌株命名为 JM-3,对离体苹果枝条上苹果腐烂病菌的扩展致病有较好的抑制效果。JM-3 菌株在培养过程中能产生抑菌物质,其无菌发酵滤液能抑制苹果腐烂病菌菌丝的生长和分生孢子的萌发,导致菌丝和芽管膨大畸形,最终导致菌丝破裂、

原生质外流。JM-3 菌株对多种果树和农作物病原真菌菌丝的生长都有明显的抑制作用。

目前,细菌鉴定常采用 16S rDNA 序列分析,当序列同源性大于 97% 时,可以认定 2 株细菌属于同一个属,通过后续的生理生化分析可以进一步鉴定至种。但 16S rDNA 基因测序技术在菌株层面上的分辨率较低。RiboPrinter 系统通过检测 16S rDNA、23S rDNA、5S rDNA 和间隔序列杂交信号而得出基因指纹特征,与数据库比对得出鉴定结果。Ribo-

Printer 数据库目前涵盖 6950 种菌种的杂交图谱, 数据库较为全面, 对常见细菌的检测非常准确^[9]。枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌的 16S rDNA 同源性序列达到 99% 以上, 难以将两者区分。RiboPrinter 可以明确区分 *B. amyloliquefaciens* 与 *B. subtilis* 菌株^[10-11]。本研究虽测定了 JM-3 的 16S rDNA 序列, 仍难以确定其属于哪个种, 经 RiboPrinter 鉴定, 将 JM-3 菌株鉴定为枯草芽孢杆菌。

枯草芽孢杆菌是自然界广泛存在的、对人畜无毒无害、不污染环境、对农业生态系统安全、能分泌多种抗菌素和酶, 对许多植物病原生物具有拮抗作用的非病原微生物, 符合现代社会对农业生产及有害生物综合防治的要求和农业的可持续发展战略目标^[12-16]。国内外许多利用枯草芽孢杆菌开发的生物农药已投入市场。美国迄今有 4 株枯草芽孢杆菌生防菌株获得商业生产许可, 分别是 GB03、MB1600、QST713、FZB24。我国利用枯草芽孢杆菌防治植物病害应用的商品制剂有亚宝、百抗、麦丰宁、纹曲宁等。

内生菌防病机制有拮抗作用、与病菌竞争生态位和营养物质、寄生作用、促进寄主植物生长、提高寄主植物的抗逆能力、诱导植物产生抗性^[17-18]。通过以上试验, 初步断定: 枯草芽孢杆菌在测试 10 d 内对苹果腐烂病的作用机制是分泌拮抗物质抑制离体枝条腐烂病斑扩展, 其作用效果与农药苯醚甲环唑(4 $\mu\text{g/mL}$) 没有显著差异。芽孢杆菌产生的抗菌物质可以分为两大类, 一类是由非核糖体合成的 iturin、surfactin、fengycin 等, 另一类是由核糖体合成的抗菌蛋白。JM-3 无菌发酵滤液经硫酸铵沉淀的蛋白有良好的抑菌效果(已测), 判定 JM-3 能产生抗菌蛋白抑制病原菌生长。如果 JM-3 可在苹果树内生定殖, 可将其直接喷洒或浇灌 JM-3 预防苹果腐烂病, 如若不能内生定殖, 则可将其产生的抗菌蛋白涂抹腐烂病斑以抑制其扩展。但该拮抗蛋白成分鉴定、能否在苹果树内生定殖及田间防护效果有待于进一步评估。

参考文献:

- [1] 刘福昌, 陈策, 史秀琴, 等. 苹果腐烂病菌潜伏侵染研究[J]. 植物保护学报, 1979(3): 1-8.
- [2] 柯希望. 苹果腐烂病菌在树皮组织内的扩展观察[D].

杨陵: 西北农林科技大学 2009.

- [3] XIN Ya-fen, SHANG Jin-jie. Bio-control trials of *Chaetomium spirale* ND35 against apple canker [J]. Journal of Forestry Research, 2005, 16(2): 121-124.
- [4] 王磊, 郜佐鹏, 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.
- [5] 王磊. 苹果腐烂病防治新药剂和拮抗菌的研究[D]. 杨陵: 西北农林科技大学 2007.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[K]. 北京: 科学出版社 2001: 364-370.
- [7] 姜艳彬, 王海, 侯东军. 两种快速细菌菌种鉴定方法的比较[J]. 中国测试, 2010, 36(5): 41-44.
- [8] 李倩, 代敏, 段广才, 等. 幽门螺杆菌 16S rDNA 指纹图和 PCR-RFLP 基因分型研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(1): 72-75.
- [9] 范一灵, 蒋波, 房蕊, 等. 药品无菌检查中微生物污染的鉴定和污染溯源分析[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(6): 1067-1072.
- [10] 王军华. 芽孢杆菌 Q-42 的鉴定及其抗菌活性物质的研究[D]. 大连: 大连理工大学 2006.
- [11] Suihko M L, Stackebrandt E. Identification of aerobic mesophilic bacilli isolated from board and paper products containing recycled fibres [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(1): 25-34.
- [12] 谢凤行, 张峰峰, 周可, 等. 利用原生质体融合技术构建植酸酶、纤维素酶枯草芽孢杆菌工程菌的研究[J]. 天津农业科学, 2010, 16(5): 21-24, 37.
- [13] 杨秀荣, 刘水芳, 孙淑琴, 等. 生防细菌防治土传病害的研究进展[J]. 天津农业科学, 2008, 14(4): 38-42.
- [14] 杨丽荣, 全鑫, 刘玉霞, 等. 农用微生物杀菌剂研究进展[J]. 河南农业科学, 2009(9): 131-134.
- [15] 田兆丰, 刘伟成, 董丹, 等. 生防枯草芽孢杆菌 Kct99 的 GFP 标记及其在甘蓝根部的定殖示踪[J]. 华北农学报, 2012, 27(6): 53-57.
- [16] 胡瑞萍, 张铎, 张丽萍, 等. 枯草芽孢杆菌 BSD-2 一种抗菌肽的分离纯化与鉴定[J]. 华北农学报, 2011, 26(6): 201-206.
- [17] 王美琴, 卢海波, 赵立娟, 等. 核桃内生菌 HT3 对番茄和黄瓜的促生作用[J]. 山西农业科学, 2013, 41(2): 130-132, 139.
- [18] 田宏先, 崔林, 孙振. 内生菌对马铃薯环腐病的田间防效及增产作用[J]. 山西农业科学, 2002, 30(1): 73-75.