

# 冬枣黑斑病菌拮抗菌株的筛选鉴定及其对该病的防治作用

宋 聪<sup>1</sup>, 黄亚丽<sup>1\*</sup>, 谢晨星<sup>1,2</sup>, 贾振华<sup>1</sup>, 徐 文<sup>1,2</sup>

(1. 河北省科学院 生物研究所/河北省主要农作物病害微生物控制工程技术研究中心,河北 石家庄 050081;

2. 河北工业大学 化工学院,天津 300130)

**摘要:**为给冬枣(*Ziziphus jujube* Mill.)黑斑病的生物防治提供优良菌株资源,以冬枣黑斑病菌为靶标,从冬枣健果中进行拮抗微生物资源的筛选。利用梯度稀释法从健康冬枣果实表面分离出细菌397株,其中K5-4对冬枣黑斑病菌的抑菌效果最为明显,抑菌带宽度为10.06 mm,该菌的无菌发酵液也具有良好的抑菌活性。活体防病试验发现,该菌能够有效地抑制冬枣黑斑病的发生,浓度为 $1 \times 10^8$  cfu/mL时对黑斑病的防效为78.50%。该菌能够在冬枣果实中定殖,在接种后48 h内K5-4菌数增长为初始值的31.62倍,有无黑斑病病原菌存在对K5-4的定殖影响不大。通过形态学观察、生理生化试验以及16S rDNA序列同源性分析,鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),其在防治冬枣黑斑病上有较好的应用前景。

**关键词:**冬枣; 黑斑病; 细交链格孢; 生物防治; 解淀粉芽孢杆菌; 防效

**中图分类号:**S436.65      **文献标志码:**A      **文章编号:**1004-3268(2016)07-0071-05

## Screening and Control Effect Determination of Antagonistic Bacteria against Black Spot Disease of Jujube Fruit

SONG Cong<sup>1</sup>, HUANG Yali<sup>1\*</sup>, XIE Chenxing<sup>1,2</sup>, JIA Zhenhua<sup>1</sup>, XU Wen<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences/Microbial Control Engineering Technology Center of Main Crops Disease in Hebei Province, Shijiazhuang 050081, China; 2. College of Chemical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

**Abstract:** To provide excellent biocontrol strain resources against Dongzao (*Ziziphus jujube* Mill.) black spot disease, with the pathogen *Alternaria alternata* as target, antagonistic microbial resources were screened from healthy jujube fruit. A total of 397 bacteria were isolated and purified from healthy jujube fruit surface using dilution method. Strain K5-4 had the most obvious effect with 10.06 mm inhibition zone. Its sterile broth had a good antibacterial activity also. Treatment with  $1 \times 10^8$  cfu/mL cell suspension of K5-4 could control the black spot disease on Dongzao of 78.50%. K5-4 could colonize in Dongzao fruit with or without the presence of black spot pathogen, and within 48 h after inoculation the number of K5-4 was 31.62 times the initial value. By morphological observation, physiological and biochemical characterization and the analysis of the 16S rDNA sequence, this strain was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. The strain K5-4 has a good prospect in controlling black spot disease on jujube fruit.

**Key words:** *Ziziphus jujube* Mill.; black spot disease; *Alternaria alternata*; biocontrol; *Bacillus amyloliquefaciens*; control effect

收稿日期:2015-12-16

基金项目:河北省应用基础研究计划重点基础研究项目(15962904D);河北省科技条件建设项目(15963203D)

作者简介:宋 聪(1982-),女,河北石家庄人,助理研究员,硕士,主要从事植物病害的生物防治研究。

E-mail:songcong1982@126.com

\* 通讯作者:黄亚丽(1975-),女,河北肃宁人,副研究员,博士,主要从事植物病害的生物防治研究。

E-mail:huangyali2291@163.com

冬枣是我国稀有的优质晚熟鲜食枣果品种,以其丰富的营养、优良的品质备受消费者的青睐。黑斑病是冬枣上一种危害非常严重的病害,使枣果产量降低、品质下降、不耐贮存,严重影响了枣果的商品性<sup>[1-2]</sup>。该病害于 2003 年首次在河北、山东大面积发生,之后在全国冬枣产区均有发生,发病枣园的发病率在 20% 以上,病情严重者发病率可达 80%,给枣农造成巨大经济损失<sup>[3]</sup>。目前,对该病害的防治主要采取多次喷施化学农药,造成了化学农药的过量使用和严重的农药残留。寻求安全、经济、有效的冬枣黑斑病防治方法成为保证冬枣产业可持续发展的当务之急。

植物病害的生物防治被认为是最有希望替代化学杀菌剂的方法之一并已经取得了较大的进展<sup>[4-6]</sup>。然而,由于冬枣的分布范围较小,规模化种植年限短,目前对冬枣病害生物防治的研究相对较少。国内相关的研究包括耿海峰等<sup>[7]</sup>从土壤中定向筛选了 1 株枯草芽孢杆菌,薛梦林等<sup>[8]</sup>从冬枣果面上分离出 1 株成团泛菌 B501,郭东起等<sup>[9]</sup>从冬枣果面上分离出 1 株美极梅奇酵母菌,这 3 株菌均对采后冬枣黑斑病菌具有较强的拮抗作用,并在室内条件下能够降低冬枣黑斑病的发生。进行更大范围的冬枣黑斑病菌拮抗微生物的筛选,为冬枣黑斑病生物防治储备更多的微生物资源,是加快冬枣病害生物防治进程的前提和基础。本研究以冬枣黑斑病菌为靶标,从冬枣健果中进行拮抗微生物资源的筛选,研究其对冬枣黑斑病病原菌的拮抗机制及防治效果,以期为冬枣黑斑病的采前、采后防治提供良好的微生物资源。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

样品采集:2013 年 8 月 5 日至 10 月 10 日即冬枣黑斑病的主要发病期内,在河北省沧州、石家庄、邯郸、邢台的冬枣发病果园,采集冬枣健康果实。

拮抗菌分离培养基:LB 培养基;平板对峙试验培养基:PDA 培养基。

冬枣黑斑病菌:细交链格孢 6-2a 为本研究中心分离鉴定并保存。

### 1.2 试验方法

1.2.1 冬枣健康果实表面细菌的分离 以从河北沧州、衡水、邯郸等地区冬枣园中采摘的健康冬枣果实为材料,用 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液在摇床上 100 r/min 摆 10 min,弃去洗液,再将果实放入磷酸缓冲液中,用超声波清洗器清洗 30 min,取洗液。将

洗液梯度稀释后,吸取稀释液 100 μL 到 LB 培养基上,涂布后 28 ℃ 培养 2~3 d,挑取形态各异的菌落进行纯化和保存。

1.2.2 冬枣黑斑病菌拮抗菌株的筛选 用打孔器打取直径为 3 mm 的细交链格孢 6-2a 菌块接种到 PDA 平板中央,采用十字交叉法将待测菌株点接在距平板中央 3 cm 处,28 ℃ 恒温培养 5 d 后,测量抑菌带宽度,以抑菌带为指标选择出拮抗作用较强的菌株。

1.2.3 不同处理方式的拮抗菌 K5-4 发酵液对细交链格孢的抑制作用测定 将拮抗菌 K5-4 在 LB 液体培养基中 28 ℃ 培养 2 d,之后将发酵液配制成拮抗菌 LB 发酵液( $1 \times 10^8$  cfu/mL)、拮抗菌无菌水悬液( $1 \times 10^8$  cfu/mL)、无菌发酵液(0.22 μm 滤膜过滤)、无菌发酵液热处理液(121 ℃,20 min)。在 PDA 平板中央接种直径为 3 mm 的细交链格孢菌块,距离接种菌块 3 cm 处按十字交叉法打 4 个直径为 5 mm 的洞,每个洞中分别加入上述 4 种拮抗菌处理液 100 μL。28 ℃ 恒温培养 5 d 后测量抑菌带的宽度。

1.2.4 拮抗菌 K5-4 无菌发酵液对冬枣黑斑病菌孢子萌发和菌丝生长的影响测定 用无菌水冲洗培养 6 d 的细交链格孢菌落获得孢子悬浮液,用血球计数板计数并调整孢子浓度为  $1 \times 10^6$  cfu/mL,分别将拮抗菌无菌发酵液和细交链格孢孢子悬浮液各 30 μL 加入凹玻片内,于 25 ℃ 在滤纸保湿培养皿中培养,每 8 h 镜检观察孢子萌发和菌丝生长情况。以 LB 液体培养基代替拮抗菌无菌发酵液为对照。

1.2.5 拮抗菌 K5-4 对冬枣采后黑斑病的防治效果测定 从市场购买成熟度和大小一致的果实,用 2% NaClO 浸泡 2 min,再用自来水冲洗干净,晾干。用灭菌打孔器在果实腰部打 2 个直径 5 mm、深 5 mm 的伤口。分别向果实伤口处接种浓度为  $1 \times 10^8$  cfu/mL、 $1 \times 10^7$  cfu/mL、 $1 \times 10^6$  cfu/mL 的拮抗菌悬液 10 μL,以无菌水为对照,2 h 后接种浓度为  $1 \times 10^6$  cfu/mL 的黑斑病菌孢子悬液 10 μL。将果实放入 400 mm × 700 mm × 280 mm 塑料筐内,筐口封保鲜膜保湿,25 ℃ 放置。7 d 后测定果实的发病率和病斑直径,每处理 30 个果实,3 次重复,试验重复 2 次。

1.2.6 拮抗菌 K5-4 在冬枣果实中定殖能力测定

用移液枪分别吸取浓度为  $1 \times 10^8$  cfu/mL 拮抗菌悬液和浓度为  $1 \times 10^6$  cfu/mL 冬枣黑斑病菌孢子液 10 μL 接种于果实伤口内,以只接种拮抗菌悬液的处理为对照。将接种拮抗菌的果实置于 25 ℃ 下保湿贮藏,以接种后 1 h 测定的细菌数量为起始值,第

12小时进行第2次测定,以后每隔12 h测定一次,48 h后每隔24 h测定一次。测定方法为:用直径为5 mm打孔器从伤口处取直径5 mm、深5 mm的果肉组织,放入无菌研钵中加10 mL的无菌生理盐水(0.9% NaCl)研磨,匀浆后,用稀释平板法计数。每个处理10个果实,3次重复。

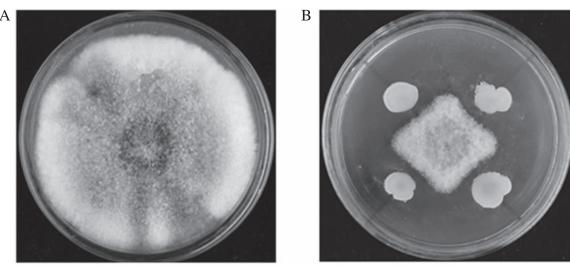
**1.2.7 拮抗菌K5-4的鉴定** 拮抗菌的形态和生理生化特征测定:将K5-4菌株在LB培养基上划线,28℃恒温培养2 d。依照Garrity等<sup>[10]</sup>的方法,对细菌分离物的菌落形态、菌体形态及生理生化性状进行测定。

菌株16S rDNA鉴定:利用细菌16S rRNA的高度保守性,对筛选到的拮抗细菌进行分子鉴定。引物为细菌16S rDNA的通用引物,Primer1:5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'; Primer2:5'-TACGGTTACCTTGTACGACTT-3'。以细菌单菌落为模板进行PCR扩增,反应体系为20 μL,反应条件:94℃5 min;94℃1 min,50℃1 min,72℃2 min,35个循环;72℃延伸10 min。对PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测,将条带正确的PCR产物送上海生工基因有限公司进行序列测定。测序完成后,将得到的序列在NCBI网站上进行BLAST分析,选取具有代表性的菌株,采用MEGA 4.0软件进行多序列同源性分析,并构建系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 冬枣黑斑病菌拮抗菌株的筛选

采用稀释涂平板的方法从冬枣果实表面分离出细菌397株,平板对峙试验结果表明,其中菌株K5-4对冬枣黑斑病菌的拮抗作用最好,抑菌带宽度为10.06 mm(图1)。



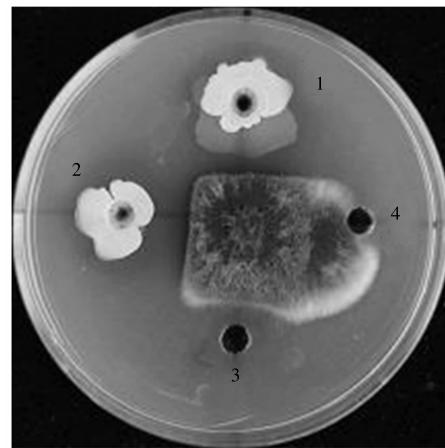
A. 对照(无拮抗菌对峙); B. K5-4 对峙

图1 菌株K5-4在PDA平板上对冬枣黑斑病菌的抑制效果

### 2.2 拮抗菌K5-4对冬枣黑斑病菌的抑制机制

**2.2.1 不同方式处理的拮抗菌K5-4发酵液对冬枣黑斑病菌的拮抗效果** 不同处理的拮抗菌发酵液在平板上对冬枣黑斑病菌的抑菌效果不同(图2),其中K5-4发酵液、K5-4无菌水悬液以及无菌发

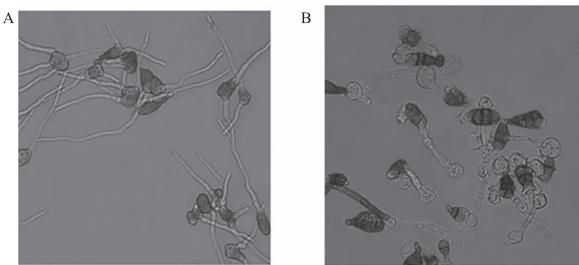
酵液对冬枣黑斑病菌均有较强的抑菌效果,抑菌带宽度分别为10.2 mm、9.4 mm和10.0 mm。经过121℃处理的K5-4无菌发酵液对冬枣黑斑病菌的抑制作用则完全消失。说明菌株K5-4能够抑制冬枣黑斑病菌的生长,其抑菌可能存在多种机制,包括营养竞争和分泌抑菌活性物质,而该物质在高温处理的情况下会失去抑菌活性。



1. K5-4 发酵液( $1 \times 10^8$  cfu/mL); 2. K5-4 无菌水悬液( $1 \times 10^8$  cfu/mL); 3. K5-4 无菌发酵液( $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤);  
4. 热处理的 K5-4 无菌发酵液( $121^\circ\text{C}, 20\text{ min}$ )

图2 不同方式处理的K5-4发酵液对冬枣黑斑病菌的抑菌效果

**2.2.2 拮抗菌K5-4无菌发酵液对冬枣黑斑病菌孢子萌发和菌丝生长的影响** 显微观察发现,K5-4对冬枣黑斑病菌孢子萌发和菌丝生长具有明显影响。在无拮抗菌发酵液的情况下,冬枣黑斑病菌孢子在8 h时开始萌发,长出芽管,之后伸长成菌丝并形成菌丝团,菌丝粗细均匀、生长良好,细胞形态长而均匀(图3A)。用K5-4无菌发酵液处理冬枣黑斑病菌,孢子能够萌发,但萌发时间延长到16 h,芽管顶端异常膨大,菌丝生长速度减缓(图3B)。



A. 对照(培养基); B. K5-4 发酵液  
图3 K5-4对冬枣黑斑病菌孢子萌发和菌丝生长的影响(2 d)

### 2.3 拮抗菌K5-4对冬枣黑斑病的防治作用

**2.3.1 不同浓度拮抗菌对冬枣黑斑病的防治作用** 由表1可知,与对照相比,3个浓度的拮抗菌处理

均能降低冬枣黑斑病的发生，并能够控制病斑的扩展。其中浓度为  $1 \times 10^8$  cfu/mL 的拮抗菌 K5-4 发酵液对冬枣黑斑病发病率的抑制作用最为明显，防病效果达到 78.50%，比对照的病斑直径小 7.58 mm。浓度为  $1 \times 10^7$  cfu/mL、 $1 \times 10^6$  cfu/mL 的 K5-4 发酵液也能够显著抑制冬枣黑斑病的发生，但防效略低于高浓度处理。

表 1 不同浓度拮抗菌 K5-4 对冬枣黑斑病的防治效果

发酵液浓度/(cfu/mL)	发病率/%	病斑直径/mm
$1 \times 10^8$	21.50d	7.13c
$1 \times 10^7$	38.77c	8.30bc
$1 \times 10^6$	51.36b	8.39b
对照	100.00a	14.71a

注：同列不同字母表示差异显著 ( $P \leq 0.05$ )。

### 2.3.2 拮抗菌 K5-4 在果实伤口的生长动态

K5-4 在接种初期的 48 h 内处于定殖和繁殖阶段，前 12 h 内迅速生长，48 h 时达到最高值，冬枣每个伤口内的菌数为  $9.77 \times 10^7$  cfu，是初始值的 31.62 倍。之后随着时间的延长，拮抗菌的数量开始下降，96 h 后基本维持在一个稳定的水平(图 4)。由图 4 还可以看出，接种 K5-4 发酵液的同时接种细交链

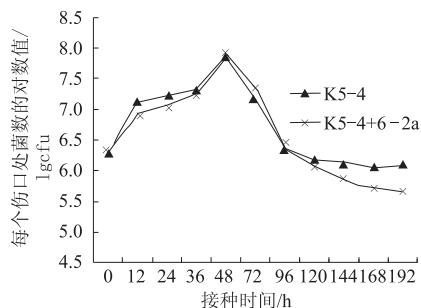


图 4 拮抗菌 K5-4 在冬枣伤口的生长动态

格孢，拮抗菌在冬枣伤口的定殖情况与只接种 K5-4 处理基本相同，只是在后期 K5-4 的菌数略有降低。

### 2.4 拮抗菌 K5-4 的鉴定结果

#### 2.4.1 拮抗菌 K5-4 菌落形态及生理生化特征

菌株 K5-4 在 LB 培养基上为淡黄色菌落，表面干燥且粗糙，边缘不整齐。革兰氏染色呈阳性，短杆菌状、两端钝圆，单个、成对或成串出现；有芽孢，芽孢囊不膨大，芽孢椭圆形，中生到次端生。通过测定细菌 K5-4 的生理生化特征(表 2)，初步确定 K5-4 菌株属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。

表 2 K5-4 的生理生化特征

测试项目	菌株 K5-4	测试项目	菌株 K5-4
NaCl 耐受度(2% NaCl)	+	酪朊水解	+
NaCl 耐受度(5% NaCl)	-	酪氨酸水解	-
pH 值 5.7 培养基上生长	+	葡萄糖	+
接触酶	+	甘露醇	+
明胶液化	+	麦芽糖	+
淀粉水解	+	木糖	-
厌氧生长	+	蔗糖	+
V. P 反应	+	乳糖	-
H <sub>2</sub> S 产生试验	-	半乳糖	-
硝酸盐还原	+	阿拉伯糖	+
柠檬酸盐利用	-		

注：+ 表示可生长或阳性反应，- 表示不可生长或阴性反应。

2.4.2 拮抗菌 K5-4 的分子生物学鉴定 将拮抗菌 K5-4 16S rDNA 的测序结果在 NCBI 网站上进行同源性分析，发现它与解淀粉芽孢杆菌有较高的同源性，并聚合在同一个分支(图 5)。结合 K5-4 菌落形态及生理生化特征，确定该菌株的分类地位为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

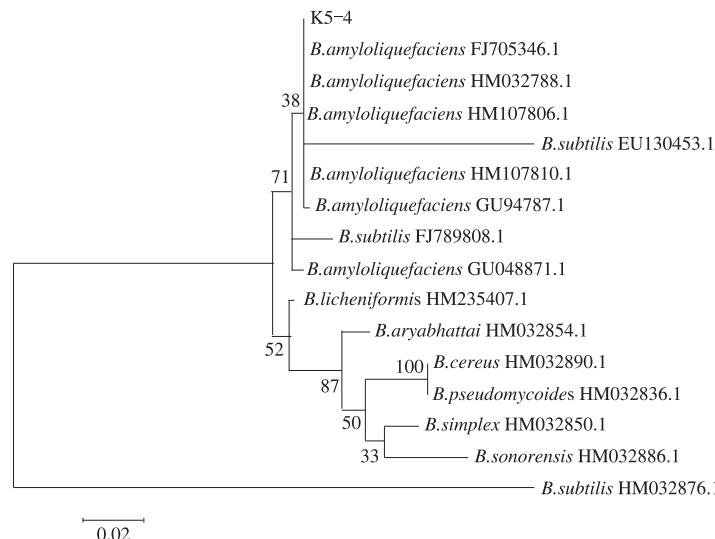


图 5 K5-4 的系统发育树

### 3 结论与讨论

黑斑病是冬枣重要病害之一,对冬枣的产量及贮存危害较大,利用生物防治的方法既能有效防控病害发生又不造成农药残留,是目前冬枣病害有效防治的研究热点。已有利用枯草芽孢杆菌、成团泛菌进行冬枣采后黑斑病防治的相关研究,其中成团泛菌 B501 的浓度为  $1 \times 10^7$  cfu/mL 时,对冬枣伤口黑斑病菌的抑制率达到 80% 以上<sup>[8]</sup>。耿海峰等<sup>[7]</sup>从土壤中筛选出 11 株对冬枣细交链格孢病菌、多隔镰孢霉和美澳核果褐腐串珠霉具有较好抑制作用的拮抗菌,其中枯草芽孢杆菌 B26 的抑菌效果最为显著,对冬枣采后黑斑病和烂果病防效显著。

本研究前期进行了河北省沧州、衡水、邯郸、邢台等地的罹病冬枣果实采集,并依据柯赫氏法则鉴定出河北省冬枣主要的黑斑病病原菌为细交链格孢,因此以该病原菌为靶标,进行了拮抗菌株的筛选。在拮抗菌的筛选过程中,首先用磷酸缓冲液对冬枣表面进行了洗涤,之后用超声波洗液进行枣面定殖微生物的分离,以期能筛选出在冬枣上有良好定殖能力的菌株。通过平板对峙法筛选出 1 株能够显著抑制冬枣黑斑病菌生长的菌株,其对冬枣黑斑病菌的抑菌带宽度为 10.06 mm。该菌的无菌发酵液也具有良好的抑菌活性,说明 K5-4 能够分泌抑制微生物生长的活性物质。利用不同浓度的 K5-4 菌株进行冬枣黑斑病的活体防病试验,发现该菌能够有效地抑制冬枣黑斑病,而且其防病效果与浓度呈正比,在  $1 \times 10^8$  cfu/mL、 $1 \times 10^7$  cfu/mL 和  $1 \times 10^6$  cfu/mL 3 个浓度下对冬枣黑斑病的防效分别为 78.50%、61.23%、48.64%,说明在中、高浓度下可以达到较好的生防效果。

本研究还测定了 192 h 内 K5-4 在冬枣果实上的定殖能力,结果表明,K5-4 能够在冬枣内定殖,在接种后的 48 h 内拮抗菌迅速生长繁殖,菌数增加为初始菌数的 31.62 倍,有无黑斑病病原菌存在对 K5-4 菌数基本无影响,说明该菌具有良好的空间和营养竞争能力,使其在合适的生态位迅速生长繁殖,为其生防能力的发挥奠定基础。经过形态、生理生化及分子生物学鉴定,该拮抗菌株为解淀粉芽孢杆菌。有报道证明,解淀粉芽孢杆菌的一些菌株可以有效地抑制不同细菌、真菌引起的植物病害,并成为继枯草芽孢杆菌之后应用最多的一种拮抗微生物

菌种,已有多种解淀粉芽孢杆菌的生防菌剂在生产上使用,并取得了良好的生防效果<sup>[11-12]</sup>。

通过该菌株在试验中的防治效果可以推测其在防治田间冬枣黑斑病和采后冬枣黑斑病中具有很好的应用前景,值得深入研究。筛选和鉴定拮抗菌株只是冬枣黑斑病生物防治研究的一部分,拮抗菌最佳培养条件、活性物质的理化性质以及田间防效需要进一步试验和研究。

#### 参考文献:

- [1] 吴玉柱,季延平,刘会香,等.冬枣黑斑病病原菌的鉴定[J].中国森林病虫,2005,24(2):1-3.
- [2] 常慧红.冬枣黑斑病菌生物学特性的研究[J].林业实用技术,2013(1):45-46.
- [3] 宗淑萍.河北省黄骅市冬枣果实黑点病的研究[D].保定:河北农业大学,2006.
- [4] Raupach G S, Kloepfer J W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens[J]. Phytopathology, 1998, 88:1158-1164.
- [5] Hubbard J P, Harman G E, Hadar Y. Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seeds [J]. Phytopathology, 1983, 73:655-659.
- [6] Bressan W. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes [J]. Biocontrol, 2003, 48(2): 233-240.
- [7] 耿海峰,张丽珍,牛伟.冬枣采后病害拮抗菌的筛选和鉴定[J].食品科学,2010,31(9):150-155.
- [8] 薛梦林,张力群,张继澍,等.拮抗菌 B501 的鉴定及其对采后冬枣黑斑病的抑制效果[J].中国生物防治,2008,24(2):122-127.
- [9] 郭东起,赵萍,侯旭杰.冬枣采后病害生物防治用拮抗酵母菌的筛选[J].保鲜与加工,2011,11(6):6-9,13.
- [10] Garrity G M, Bell J A, Lilburn T G. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. 2nd ed. New York: Heidelberg Springer-Verlag, 2004.
- [11] 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.
- [12] 付泓润,马桂珍,葛平华,等.海洋微生物及其代谢产物在植物保护上的研究与应用进展[J].河南农业科学,2013,42(6):7-12.