

苹果轮纹病菌拮抗细菌筛选及田间应用初步研究

杨 华, 刘 志, 石 强

(辽宁省果树科学研究所, 辽宁 营口 115214)

摘 要: 在辽宁省果树科学研究所的育种园、优质果园及树木园采集土壤, 用稀释法分离纯化并用平板对峙法筛选出了对苹果轮纹病菌(*B. berengeriana* f. sp. *piricola*)有较强抑制作用的菌株。离体果菌株控果试验表明: 先喷菌液后刺伤接种轮纹病菌的防治效果为 73.5%, 相对较好; 田间试验表明: 菌剂 100 倍与 1:3:240 波尔多液交替使用采收期与贮藏期防治果实轮纹病效果均较好; 套袋果实轮纹病防效达 100%。

关键词: 苹果轮纹病菌; 拮抗细菌; 筛选; 田间应用

中图分类号: S 436.611.1⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)04-0160-04

苹果轮纹病菌(*Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*)属于子囊菌纲, 座囊菌目, 囊孢菌属^[1]。苹果轮纹病俗称水烂病、烂果病, 该病在美国、加拿大、日本和我国均有发生, 我国尤以辽宁、山东、河北发病严重。轮纹病寄主范围很广, 除苹果外还能为害梨、桃、李、杏等多种果树。

苹果轮纹病菌主要为害果实^[2]。发病初期在果面部分出现圆形、黑至黑褐色小斑, 逐渐扩大成轮纹状。随着症状的进一步发展, 病斑呈淡褐至黑褐色, 整个果实即变为水渍状软化腐烂。发病后期在病斑表面形成黑色小粒点状的分生孢子器, 偶尔从孢子器中溢出白色线头状孢子角。苹果轮纹病菌不仅侵染田间生长的苹

果, 引起 20%~30% 的烂果, 由于其潜伏侵染特性, 还可引起苹果采后腐烂, 成为贮藏期的重要病害, 严重影响果实的产质量, 给果农造成了很大的经济损失。

目前苹果轮纹病在生产上主要以化学药剂防治为主^[3], 采用化学药剂防治容易造成农药在土壤和作物上的残留, 对土壤、地下水、河流、湖泊造成污染, 尤其是给人类的生存、发展和健康带来危害。化学农药的广泛应用使公众越来越担心其安全性和对环境造成的污染问题; 同时, 化学农药的大量使用也使病菌对常用药剂产生了一定的抗药性, 使其防效不断下降。

生物防治对环境安全, 无残留无污染, 不杀伤天敌, 成为目前研究和开发的热点, 其中利用病原菌的拮抗细菌进行生物防治, 控制病害的危害是值得深入研究的一条新途径^[4]。无论是自然发生的生物防治现象还是用于生物防治的生物类型中, 细菌的作用是非常明显的。其主要优势在于: 细菌的种类和数量众多, 在果蔬根际和地上部大量存在; 细菌对病原菌的作用方式较广, 可以通过竞争、拮抗和寄生, 诱导果蔬产生抗性等方式对

第一作者简介: 杨华(1974-), 女, 硕士, 助理研究员, 现主要从事果树植保工作。E-mail: yanghua007@yahoo.com.cn.

基金项目: 农业科技跨越计划资助项目(农财发(2009)50); 公益性行业(农业)科研专项资助项目(nyhyzx07-055)。

收稿日期: 2009-11-20

Optimization of Cucumber Endobacteria *Bacillus subtilis* 504 Fermentation Medium

MIAO Ze-yan¹, ZHAO Kui-hua¹, LIU Chang-yuan¹, LIANG Chun-hao¹, WANG Hui¹, LV Guo-zhong²

(1. Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161; 2. Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600)

Abstract: SAS system was used to optimize the medium components for *Bacillus subtilis* 504. Firstly, the prime factors affecting yield of *Bacillus subtilis* 504 were selected by means of Plackett-Burman design; Then, a central composite design was used to optimize the prime factors and the results were shown in response surface plots. When the medium comprised glucose, KH₂PO₄, corn powder, soy bean powder, MnSO₄, K₂HPO₄, yield of *Bacillus subtilis* 504 could reach 2.22 10⁹ cfu/mL, which was 22.7% higher than the control.

Key words: cucumber endobacteria *Bacillus subtilis*; response surface method; optimization

病原菌产生影响;具有惊人的繁殖速度;许多细菌存在于果蔬根际和地上部,对果蔬的生态比较适宜;细菌大多可以人工培养,便于控制,在实践中易于操作;有些细菌不仅能防治病害而且可以增加果蔬产量^[5]。

试验从果园及树木园的土壤中分离获得了多株拮抗细菌,通过孢子萌发^[6]、平板抑菌及田间防治试验筛选出对苹果轮纹病菌有较强抑制作用的菌株,并制成菌剂进行田间及室内的初步药剂试验,为开发经济、高效、安全防治苹果轮纹病的新生物杀菌剂奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 培养基的配制

1.1.1 细菌分离采用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(NA) 牛肉浸膏 3~4 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5.3 g 琼脂 17~20 g, pH 7.2, 水 1 000 mL。

1.1.2 真菌分离采用 PDA 培养基 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g 水 1 000 mL。

1.2 供试病原菌

苹果轮纹病菌(*B. berengeriana* f. sp. *piricola*)从辽宁省果树所优质果园的病果上分离得到。

1.3 样品的采集

从2008年5月开始,从辽宁省果树科学研究所的优质果园、育种园、岳帅园及树木园等采集土样20份,装入干净的采样袋中密封,带回室内尽快分离。

1.4 拮抗细菌的分离和筛选

1.4.1 拮抗细菌的分离 用1/100天平称取10 g土样加入盛有100 mL无菌水的500 mL三角瓶中,放在振荡器上28℃,140 rpm振荡10 min,使土样均匀地分散在稀释液中成为土壤悬液。土壤分散后,静置30 min,然后吸取1 mL土悬液到9 mL稀释液中,依次按10倍法稀释,通常稀释到 10^6 ,用NA培养基进行分离。分离方法:每浓度各3个重复,分别取100 μ L于NA平板上,用灭菌玻璃棒涂布均匀,置于27~28℃培养箱中培养1~3 d,待长出菌落后,挑取形态、大小、色泽不同菌落,进行划线纯化,记录单菌落的形态特征及其数量。将纯化后的单菌落移至NA斜面培养基上,编号,28℃下培养2 d后移至4℃冰箱中保存备用。

1.4.2 拮抗细菌的筛选 将上述分离获得的各个细菌菌落分别转入NA斜面培养基,再采用稀释法将获得的所有细菌各菌株重新纯化,再重新转入NA斜面培养基,每个菌株保存3管,1管试验用,2管保存菌种用。拮抗细菌的筛选采用平板对峙法。初筛:在距培养皿中心相等距离的4个点上划线接种分离到的形态不同的细菌菌株,在26℃恒温培养箱中培养3 d后,在培养皿中央接入直径4 mm的轮纹病菌菌块,定期测量轮纹病菌向着细菌生长方向的半径,以病原菌纯培养为对照,计算抑制率。复筛:采用牛津杯法,先将苹果轮纹病菌株移

入马铃薯培养基的平板上25℃培养7 d,然后用灭菌水配制成孢子悬浮液(浓度为 5×10^6 个/mL)待用。将分离得到的细菌菌株分别接种于NA平板上均匀培养活化后,分别接入含有NA的液体培养基中,28℃,140 rpm下培养72 h,发酵液在3 000~4 000 rpm下离心10 min,取上清液待用。每个灭菌培养皿中倒入9 mL冷却至45℃的PDA,待凝固后,将轮纹病菌孢子悬浮液加入1 mL,用灭菌玻璃棒涂布均匀,每皿放入直径为6 mm的灭菌牛津杯,每杯分别加入上述4种拮抗菌上清液100 μ L。每皿3杯,3次重复。25℃培养72 h,观察记载结果。抑制率(%)=(对照病原菌的半径-病原菌向生防菌生长的半径)/对照病原菌的半径 $\times 100$ 。

1.5 拮抗细菌抗菌物质对孢子萌发的抑制作用测定

1.5.1 孢子液的制备 将苹果轮纹病菌(*B. berengeriana* f. sp. *piricola*)接种到PDA培养基平板(直径9 cm)上,在恒温培养箱中25℃培养7 d,在超洁净工作台上刮去菌丝体,然后放在黑光灯下培养7 d,待长出分生孢子后,用无菌水浸泡3~5 min,加1滴吐温20,用灭菌钩轻轻刮洗下孢子,脱脂棉或4层灭过菌的纱布过滤除去菌丝体,滤液即为孢子悬浮液,每个平板上大约制备20 mL孢子液,并将浓度调至为 5×10^6 个/mL左右,备用。

1.5.2 拮抗细菌发酵液的制备 将拮抗细菌种子液接种于优化培养基(淀粉20 g,蛋白胨20 g,NaCl 5.0 g pH 7.0 琼脂20 g,水1 000 mL)中,28℃下140 rpm的摇床上培养3 d,用于下面的抑菌作用测定。

1.5.3 抗菌物质对孢子萌发的抑制作用测定 将拮抗细菌No.1发酵液在3 000~4 000 rpm下离心10 min,取上清液分别稀释浓度为5、10、20、30、40、50、100、200、400倍待用。分别量取0.25 mL上述上清液液和0.5 mL上述分生孢子悬浮液加入指形管(1 cm \times 7.5 cm)中,将指形管放入25℃培养箱中培养。每个处理重复3次。对照加相同体积的无菌水。分别在24 h时测定孢子的萌发率。孢子的萌发是以芽管的长度约超过孢子宽度1倍时做为标准。观察时于载玻片上盖上盖玻片,在显微镜下观察计数,每个处理及对照观察计数时计3~5个视野的总孢子数,孢子总数应在200左右,计算萌发率和抑制率。

$$\text{萌发率}(\%) = \frac{\text{调查孢子部数} - \text{未萌发孢子}}{\text{调查孢子总数}} \times 100,$$

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{调查孢子总数} - \text{萌发孢子数}}{\text{调查孢子总数}} \times 100.$$

1.6 拮抗细菌对果实轮纹病的控制作用

1.6.1 菌株离体果控病试验 在田间选取大小、成熟度基本一致的苹果果实,按下述3种方式处理:①先喷布 1×10^8 个/mL菌株可湿性菌剂200倍液,24 h后刺伤接种轮纹病菌 1×10^6 个/mL孢子悬液。②先喷布轮纹病

菌 1×10^6 个/mL 孢子悬液, 24 h 后刺伤喷布 1×10^8 个/mL 菌株可湿性菌剂 200 倍液。③先喷无菌水, 24 h 后刺伤接种轮纹病菌 1×10^6 个/mL 孢子悬液。以上处理每个果面刺伤 4 处, 放到 $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保温保湿 5 d 后观察刺伤点发病情况, 调查病情指数, 计算防治效果。防治效果(%)=(对照区病情指数-处理区病情指数)/对照区病情指数 $\times 100$ 。

1.6.2 菌剂田间防治试验 将拮抗细菌发酵液与助剂按一定比例混合, 做成可湿性粉剂, 进行田间药效试验。试验在辽宁省果树所优质果园 12 a 生富士苹果树上进行。土壤为棕壤, pH 7, 水肥条件中等, 株产 40 kg 左右。共设 8 个处理: ①菌剂 100 倍与 1:3:240 波尔多液交替; ②菌剂 200 倍与 1:3:240 波尔多液交替; ③菌剂 300 倍液与 1:3:240 波尔多液交替; ④50%多菌灵 800 倍液与 1:3:240 波尔多液交替; ⑤常规喷药; ⑥清水; ⑦花后喷多菌灵套袋; ⑧花后喷菌剂 100 倍套袋。单株小区, 重复 5 次, 顺序排列, 对照树两边设保护行。全年喷 5 次药, 喷药日期为 5 月 26 日, 6 月 9、24 日, 7 月 22 日, 8 月 7 日。常规喷药处理分别为 6 月 9 日多菌灵 800 倍、21 日中生菌素 200 倍, 7 月 8 日大生 M-45 800 倍, 7 月 22 日多菌灵 800 倍、8 月 7 日 1:3:240 波尔多液。果实采收期每处理调查 500 个轮纹病发病果实, 计算防效; 果实采收时每处理采 500 个未发病果实贮藏 1 个月 后调查发病果数, 计算防效。

$$\text{田间病果率}(\%) = \frac{\text{病果数}}{\text{总果数}} \times 100$$
$$\text{贮藏期病果率}(\%) = \frac{\text{病果率}}{\text{入贮总果数}} \times 100$$
$$\text{防治效果}(\%) = \frac{\text{对照病果率} - \text{处理病果率}}{\text{对照病果率}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌分离、筛选结果

通过分离筛选从样品中分离到 78 株菌株, 其中树木园分离到 50 株菌株, 但对苹果果实轮纹病没有拮抗作用; 在生产园如优质果园、育种园和岳帅园共分离到 28 株, 其中对苹果果实轮纹病有拮抗作用的菌株 17 株, 筛选有效率达到 60.7%。从分离菌的拮抗能力来看, 不同细菌菌株对轮纹病菌的拮抗能力差异较大。根据抑菌带宽度大小, 17 株拮抗细菌可分为 3 类: 第 1 类拮抗性较强, 抑菌带宽度 $> 10.0\text{ mm}$, 共 4 株占 23.5%; 第 2 类拮抗性中等, 抑菌圈直径 $5.0\sim 10.0\text{ mm}$, 共 5 株占 29.4%; 第 3 类拮抗性较弱, 抑菌圈直径 $1.0\sim 5.0\text{ mm}$, 共 8 株占 47.1%。

对苹果轮纹病菌有较强抑制作用的 4 株细菌进行测定, No. 2 抑菌圈直径为 10.1 mm 对孢子萌发无抑制效果; No. 3 抑菌圈直径为 10.7 mm , 对孢子萌发抑制率

为 81.0%; No. 5 对苹果轮纹病菌抑制作用较明显, 直径为 11.1 mm , 但对孢子萌发抑制率为 20.0%; No. 1 对苹果轮纹病菌抑菌作用很明显, 抑菌圈直径为 12.7 mm , 而且对孢子萌发抑制率为 90%, 因此选出 No. 1 为拮抗菌株, 进一步做初步鉴定。

表 1 拮抗细菌的筛选结果

样品	总株数	抑菌圈小于 5 mm		抑菌圈 5~10 mm		抑菌圈 10 mm	
		株数	百分比/%	株数	百分比/%	株数	百分比/%
优质果园	20	4	20	3	15	4	20
育种园	5	2	40	2	20	0	0
岳帅园	3	2	66.6	0	0	0	0
树木园	50	0	0	0	0	0	0
总数	78	8	47.1	5	29.4	4	23.5

2.2 拮抗细菌抗菌物质对孢子萌发的抑制作用测定

从表 3 可以看出, 拮抗菌无菌液随着稀释倍数的增加, 抑菌率逐渐降低。稀释 5 倍时, 抑制率为 93%, 稀释 400 倍时, 抑制率为 25%。此外, 当抑制率为 50% 时, 无菌液的稀释倍数为 100 倍, 因此可初步断定其 EC_{50} 为 100 倍。

表 2 4 株拮抗细菌对苹果轮纹病菌的抑菌作用

菌株	抑菌圈直径	差异显著性*	孢子萌发抑制率/%	差异显著性*
No. 2	10.1	d	0	d
No. 3	10.7	c	81.0	b
No. 5	11.1	b	20.0	c
No. 1	12.7	a	90.0	a

注: 相同字母表示差异不显著。

表 3 No. 1 无菌液抑菌测定

稀释 倍数	孢子 萌发率/%	抑制率 /%	稀释 倍数	孢子 萌发率/%	抑制率 /%
CK	100	0	40	35	65
5	7	93	50	40	60
10	17	83	100	50	50
20	22	78	200	69	31
30	28	72	400	75	25

2.3 菌株离体果控病试验

由表 4 可知, 先喷拮抗细菌菌株菌液后刺伤接种轮纹病菌的防治效果为 73.5%, 而先接种轮纹病菌后刺伤喷拮抗细菌菌株菌液的防治效果为 38.02%, 前者防效显著高于后者, 说明先喷拮抗细菌菌株菌液可优先利用伤口的外渗营养, 阻止病菌孢子的侵入, 并可杀死病菌, 从而达到防治病害的目的。

表 4 菌株的离体果防治试验结果

处理	调查总数	发病率/%	防效/%
I	40	52.5	38.02b
II	40	22.5	73.5a
III	40	85	

注: I 接种轮纹病菌后刺伤喷; II 喷 No. 1 后刺伤接种轮纹病菌; III 先喷无菌水后刺伤接种轮纹病菌。

2.4 菌剂田间防治试验

结果见表 5。常规喷药和 50%多菌灵 800 倍液与 1:3:240 波尔多液交替防效明显, 都在 90% 以上, 但菌

剂 100 倍与 1 : 3 : 240 波尔多液交替的防效也接近 90%, 与常规喷药的效果差异不显著; 菌剂 200 倍与 1 : 3 : 240 波尔多液交替和菌剂 300 倍与 1 : 3 : 240 波尔多液交替的防效稍差一些, 显著低于常规喷药和 50% 多菌灵 800 倍液与 1 : 3 : 240 波尔多液交替防效, 但也在 80% 以上, 花后 1 周喷杀菌剂(多菌灵和菌剂)套袋的, 果实轮纹病防效均为 100%。果实采收贮藏 1 个月 后防效结果与果实采收时表现趋势一致。

表 5 菌株田间防治试验结果

处理	采收期			贮藏期		
	调查数	烂果率 / %	防效 / %	调查数	烂果率 / %	防效 / %
I	500	1.3	89.6b	494	1.5	90.25b
II	498	1.8	85.6c	497	2.3	85.1c
III	497	2.1	83.2d	495	3.5	77.3d
IV	493	0.61	94.3a	494	0.9	94.2a
V	493	1.22	90.4b	494	1.2	92.2a
VI	496	12.5		496	15.4	
VII	493		100.0	457	100	
VIII	498		100.0	500	100	

注 I: 菌剂 100 倍与 1 : 3 : 240 波尔多液交替; II: 菌剂 200 倍与 1 : 3 : 240 波尔多液交替; III: 菌剂 300 倍与 1 : 3 : 240 波尔多液交替; IV: 50% 多菌灵 800 倍液与 1 : 3 : 240 波尔多液交替; V: 常规喷药; VI: 清水(对照); VII: 花后喷多菌灵套袋; VIII: 花后 喷菌剂 100 倍套袋。

3 讨论

园艺植物病害是果品和蔬菜生产上的重大自然灾害, 长期以来主要依靠化学农药来控制病害的发生, 但是大量连续不合理地使用化学农药, 引发了严重的农药残留、环境污染和病害抗药性问题, 极大地威胁着民众的健康。为了解决上述问题, 多年以来人们一直在寻找一种安全、有效无污染的植物病害防治方法。近年来, 随着科学的进步和人民生活水平的提高, 人们对无污染

环境和无公害食品的要求日益高涨, 开发和利用有益微生物防治植物病害的方法受到了广泛的关注。

有报道指出波尔多液是防治苹果果实轮纹病较好的药剂, 试验与波尔多液交替使用的几组药剂组合也证明这一点。多菌灵与波尔多液交替防效明显, 是生产上防治果实轮纹病优良的药剂组合。菌剂 100 倍与波尔多液交替防效结果也较好, 是防治果实轮纹病良好的安全药剂, 如果与苹果套袋相结合, 既可降低农药残留, 又可以生产出无公害绿色果品。

目前, 利用细菌的生物防治的研究开展得较多, 但成功地生产上大批量推广使用的商品制剂还较少, 这其中一个主要的原因还是由于很多的细菌菌株对病害的防治效果还达不到生产的防治要求, 试验研究中无论是 No. 1 菌株发酵液离体果试验, 菌株发酵液的保护作用好用于治疗作用, 但也只达到 73.5%, 而在田间防治试验中, 必须使用高浓度, 并且与化学药剂相结合, 才能达到较好的效果, 所以有必要进行生防制剂的作用机制及田间使用技术研究。

参考文献

[1] 邱强. 原色苹果病虫图谱[M]. 3 版. 北京: 中国科学技术出版社, 2000.

[2] 高艳敏, 沈永波, 王宝申, 等. 辽宁省苹果枝干轮纹病和粗皮病发生情况调查[J]. 中国果树, 2006(5): 50-53.

[3] 刘宽弟, 王怀振. 富士苹果轮纹病防治研究[J]. 中国果树, 1990(1): 33-34.

[4] 程亮, 游春平, 肖爱萍. 拮抗细菌的研究进展[J]. 江西农业大学学报, 25(5): 732-737.

[5] 何礼远. 细菌在植物病害生物防治上的应用研究进展[J]. 生物防治通报, 1985, 8(1): 18-31.

[6] 方中达. 植病研究方[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.

Preliminary Study of Screening and Field Application of Antagonistic Bacteria of *Botryosphaeria berengeriana* f. *piricola* in Apple Fruit

YANG Hua LIU Zhi SHI Qiang
(Liaoning Province Institute of Pomology, Yingkou, Liaoning 115214)

Abstract: The strain were isolated from fields of orchard and tree garden in the Liaoning Province Institute of Pomology by means of dilutedness. The result of antagonistic examination in vitro indicated that the stain showed a better inhibition to pathogens of *Botryosphaeria berengeriana* f. *piricola*. with the flat-confronting method. The test that strain controls apple ring rot in lab indicated that: it gets such a good result reversely that sparying strain liquid before stabbing apple and inoculating pathogens of *Physalospora piricola*, was 73.5%; The field experiment made clear that alternative application of bacterium preparation and Bordeaud can effectively prevent infected by *Physalospora piricola* during picking time and in storage. Bagging can prevent the infection of *Physalospora piricola* was 100%.

Key words: *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*; antagonistic bacteria; screening; field application