

# 贮藏期苹果轮纹病拮抗菌的筛选研究

侯晓杰<sup>1</sup>, 梁魁景<sup>1</sup>, 丛日征<sup>2</sup>, 芦站根<sup>1</sup>

(1. 衡水学院 生命科学系, 河北 衡水 053000; 2. 河北农业大学 林学院, 河北 保定 071000)

**摘要:**以苹果、姜、蒜为试材, 采用对峙培养法研究了健康苹果果实、姜、蒜内的可培养内生细菌和健康苹果植株根际土壤微生物对苹果轮纹病的拮抗作用。结果表明: 根际土壤中分离到可培养细菌 9 种, 姜、蒜、苹果内分别分离到可培养菌株 5 种、3 种和 1 种; 对分离到的微生物进行拮抗性测定, 除土 2 对苹果轮纹病菌菌丝生长无抑制效果外, 其余菌株都对苹果轮纹病菌有抑菌效果, 且从根际土壤中分离到的微生物对苹果轮纹病菌具有拮抗性的所占比例较大, 为 44.4%; 其次为姜和蒜, 所占比例分别为 27.8% 和 16.7%。所有菌株中除蒜 1②, 土 1 和土 5 与对照比较抑菌效果差异不显著外, 其余菌株抑菌效果差异都显著。所有菌株中抑制效果最好的为姜 4, 其真菌菌落直径只有  $(30.78 \pm 0.49)$  mm, 其次为土 4, 真菌菌落直径为  $(35.12 \pm 0.13)$  mm。

**关键词:** 苹果轮纹病; 可培养内生菌; 根际土壤; 拮抗

**中图分类号:** S 661.109<sup>+</sup>.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2015)23-0115-05

苹果轮纹病病发部位常为枝干和果实, 常以皮孔为中心位置向四周扩散形成扁圆形水渍状、黑褐色或小溃疡斑, 直径约 10 mm, 青灰色, 病斑分布集中, 常使树皮凹凸不光滑, 故又称“粗皮病”<sup>[1]</sup>。冬季气温下降苹果轮纹病菌主要以菌丝体和分生孢子器的形式存在于植株染病部位, 等到春季气温上升分生孢子随雨水扩散、传播到果实和枝干表面, 通过皮孔进入植物体内感染树体, 而后潜伏, 等到近成熟期和贮存期发病<sup>[2]</sup>。苹果果实受害早期以果点为中心呈现浅褐色的圆形点状斑, 后颜色逐渐加深并向周围变褐扩展, 呈颜色深浅交错的同心圆状病斑, 病斑继续扩大进而引起果实腐烂<sup>[3]</sup>。

目前, 苹果轮纹病的防治常采用新兴技术与传统技术相结合的方法。新兴的生物防治技术虽然取得一定成果但由于技术、经济问题的限制并未大规模推广应用, 果农依旧采用加强栽培管理, 刮治病斑及化学药剂防治等传统的物理、化学方法进行防治。

距离植物根轴表面大约 1~2 mm, 受植物根系活动明显的影响, 并且在生物学性质、生态学性质和理化性质上不同于常见土体的那部分狭小区间称之为植物根际<sup>[4]</sup>。植物根际中常见的微生物有黄杆菌、假单胞菌、产碱杆菌和土壤杆菌等, 试验证明根际以外这些微生物数量常比根际中低几倍至几十倍<sup>[5]</sup>。大多数根际微生物对植物无害, 它们在根际的生命活动中, 增加植物对

矿质元素的吸收, 促进植物生长; 有些根际微生物通过代谢作用能防止病原微生物的滋生, 对植物有利。也有些根际微生物代谢产生有毒物质, 引起植物生理失衡, 不利于植物生长发育<sup>[6]</sup>。

姜蒜是人们喜爱的调味品, 是家庭烹调菜肴不可少的香辛料, 近年来姜蒜的应用已不仅仅只局限在生活调料品上, 在食品保鲜、防腐、制药、抑制腐败菌等方面发挥着越来越广泛的角色。宫春波等<sup>[7]</sup>通过研究证明了鲜姜汁能抑制食物中常见的腐败菌, 可以作为一种新型的防腐材料应用于食品、饮料生产中。陈洪生<sup>[8]</sup>研究证明了大肠杆菌、葡萄球菌、假单胞菌等细菌生长繁殖过程中均会受到大蒜水提取物不同程度的抑制。目前, 作为微生物的重要研究领域之一, 植物内生菌的应用越来越普遍, 不论在植物病虫害防治, 还是研究新型农药以及农业、牧业生产领域都得到了广泛应用。

自然界中普遍存在着某些微生物在生长发育过程中通过生理代谢作用产生某些物质或者由于微生物本身的生物学特征影响病原物正常生长的现象。在国内, 陈祥贵等<sup>[9]</sup>通过试验得出蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)对真菌引起的植物病害有较好的防治效果; 范青等<sup>[10]</sup>研究发现核果类果实软腐病病菌的增殖扩散受到季也蒙假丝酵母(*Candida guilliermondii*)以及柠檬形克勒克酵母(*Kloeckera apiculata*)很强的抑制; 枯草芽孢杆菌在自然界广泛存在<sup>[11]</sup>, 而研究发现苹果轮纹病菌增殖明显受到由木霉、枯草芽孢杆菌、荧光假单胞菌等组成的复合生物制剂的抑制, 从而应用生产活动能有效减少贮存期苹果烂果病的发生<sup>[12]</sup>。黄海东等<sup>[13]</sup>通过试验得到枯草芽孢杆菌 B-903 能有效的抑制苹果轮纹病菌的扩散增

**第一作者简介:** 侯晓杰(1981-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事园林植物教学与科研等工作。E-mail: houxiaojie23@163.com.

**基金项目:** 衡水市科学技术研究与发展计划资助项目(14064); 河北省高等学校青年拔尖人才计划资助项目(BJ201406)。

**收稿日期:** 2015-08-19

殖,进而降低苹果果实烂果率。陈亮等<sup>[14]</sup>研究发现辣椒体内存在的内生细菌对植物病原菌具有很明显抑制作用、并能一定程度上起到病害防治效果。邓振山等<sup>[15]</sup>筛选的拮抗细菌和具有生物防治作用的放线菌均能对苹果轮纹病菌起到拮抗作用。乔红萍等<sup>[16]</sup>研究表明,小麦的内生细菌对其根部病原菌具有明显的抑制作用。

我国是世界第一大水果生产国<sup>[17]</sup>,水果采后腐烂损失严重已经对果农造成巨大经济损失。经试验调查得到有害微生物的侵染尤其是苹果轮纹病菌的侵染是造成苹果果实采后腐烂巨大损失的主要原因之一。苹果果实轮纹病是我国苹果贮藏危害最严重的病害之一。目前,化学杀菌剂处理仍然是我国控制水果采后损失的主要方法。但长期使用杀菌剂,病原菌随时间的推移往往抗药性加大,杀菌剂的杀菌效果减弱。另一方面用药量不断加大导致化学物残留较多直接威胁人类健康<sup>[18]</sup>。研究一种经济、适用、安全的新方法、新技术已成为重中之重。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

健康苹果购自超市,生姜、大蒜购自菜市场(图1),健康苹果植株根际土壤,苹果轮纹病菌由衡水学院生命科学系微生物实验室保存,试验用培养基为PDA培养基(马铃薯200 g、琼脂10~12 g、葡萄糖20 g、蒸馏水1 000 mL)和营养琼脂培养基(营养琼脂粉4.2 g、蒸馏水100 mL)。

YXQ-LS-70A 高压灭菌锅、SK2002 美的电磁炉、BBS-V800 超净工作台、AG823LC7-NCH1 美的微波炉、LRH-70F 生化培养箱。



图1 试验材料

Fig.1 The materials used in test

### 1.2 试验方法

1.2.1 苹果、姜、蒜研磨液的制备 将苹果、生姜和大蒜去外表皮,分别在无菌的环境中,用75%的酒精棉球擦拭其表面,晾干。用灭菌的解剖刀和镊子去除表皮(注意不要污染内部组织),挑取内部组织0.1 g,放入灭菌的研钵中加1 mL 无菌水充分研磨,静置。

1.2.2 苹果、姜、蒜组织内可培养内生细菌的分离 分别吸取苹果、生姜、蒜研磨液上层物质100  $\mu$ L 加到营养琼脂培养基平板上,涂匀,置于28℃生化培养箱中培养。

1.2.3 根际土壤的采集和处理 用取样铲在距健康苹果植株干基20 cm 范围内,0~15 cm 深度取土样,抖去浮土,采集苹果根际土壤样品,样品采集后立即放4℃保存,24 h 内进行土壤微生物的分离。

1.2.4 根际土壤微生物的分离 采用梯度稀释法。称

取处理好的土壤0.5 g 于10 mL 无菌试管中,加入5 mL 蒸馏水,震荡摇匀静置3 min,吸取上层溶液0.5 mL 加入到另一无菌试管内,加入4.5 mL 蒸馏水,摇匀静置,依次进行稀释,共5次。分别吸取第3、4、5次稀释的上清液100  $\mu$ L 分别加到营养琼脂培养基平板上,涂匀,吹干,置于生化培养箱中28℃下培养。

1.2.5 苹果、姜、蒜可培养内生菌以及根际土壤可培养微生物的纯化 真菌:待培养基上长出菌落后,真菌根据菌落形状、质地、颜色等的差异,分别挑取不同菌落各组织块边缘菌丝转接至新鲜PDA平板上,反复纯化获得纯培养。细菌:平板划线法。在无菌操作台中,取平滑接种环在酒精灯上灼烧至烧红,然后在酒精灯旁冷却,将以冷却接种环深入培养皿中沾取少许待分离菌种,取划线培养皿,左手打开一条小缝,右手迅速将接种环深入划3~5扇形,旋转平板120°继续画扇形,划满平板为止,盖上皿盖注意防止滑坡培养基。然后重复上述过程进行其它菌种纯化。

1.2.6 植物内生细菌及根际土壤微生物对苹果轮纹病菌菌丝生长抑制试验 采用平板对峙法。分别将分离得到的内生细菌纯化培养后制备菌悬液,同时制备PDA培养基平板,在每个平板外围放置3个滤纸片,其上加入50  $\mu$ L 内生细菌菌悬液,后将苹果轮纹病菌的菌落块倒置于平板中心位置,并置于培养箱内培养,观察其抑菌效果。每处理3次重复。同时用无菌水作为对照(真菌拮抗性试验采用将滤纸片换成真菌菌落块的方法进行)。

### 1.3 项目测定

分别将苹果、姜、蒜分离到的内生菌采用抑制苹果轮纹病菌菌丝生长法进行拮抗性测定,以测量苹果轮纹病菌菌落直径的大小来探究各内生菌对苹果轮纹病菌的抑菌作用。

### 1.4 数据分析

用Excel 软件对数据进行处理及作图,用SPSS 16.0 软件进行方差分析,差异显著性水平为5%( $P<0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果、姜、蒜组织可培养内生菌的分离

采用组织分离法,分别将苹果、姜、蒜研磨液涂于营养琼脂平板上,72 h 后观察苹果、姜、蒜内生细菌的生长状况。由图2可知,姜、蒜、苹果研磨液中初步分离得到多株内生菌,肉眼通过形态特征的差别初步选出姜内生真菌2种和内生细菌4种、蒜内生细菌3种、苹果内生细菌3种,用于苹果轮纹病菌的拮抗性测定。

### 2.2 根际土壤可培养微生物的分离

采用梯度稀释法进行分离。分别将各稀释浓度上清液涂于营养琼脂平板上,72 h 后观察微生物的生长状况。由图3可知,根际土壤稀释液中含菌量最多,在营养琼脂平板上培养分离后通过肉眼观察形态特征的差别,初步选出11种细菌用于拮抗性测定。



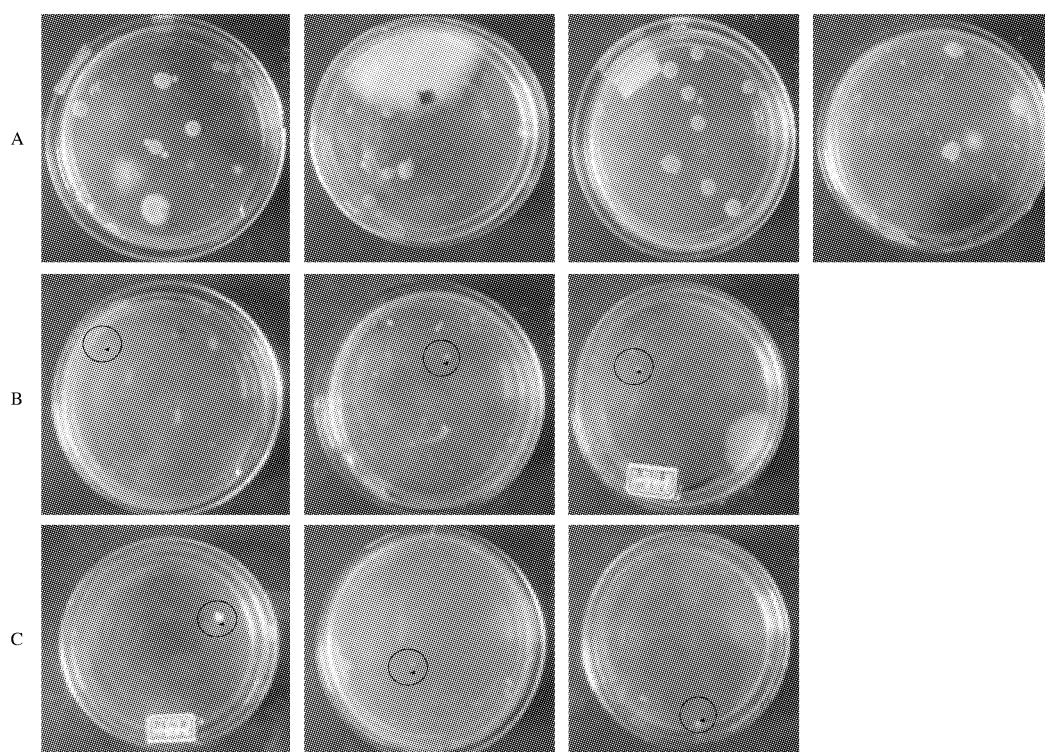


图2 姜(A)、蒜(B)、苹果(C)内微生物的分离

Fig. 2 Isolation of microorganisms in ginger(A), garlic(B) and apple(C)

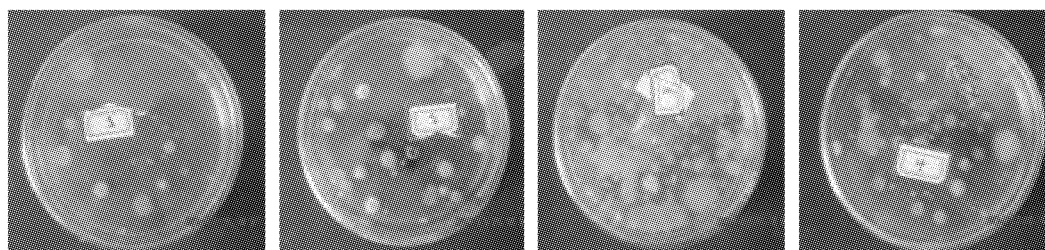


图3 根际土壤微生物的分离

Fig. 3 Isolation of microorganisms in rhizosphere soil

植物材料及根际土壤微生物分离结果表明,植物材料中的内生菌数量及种类远远少于根际土壤,因此把土壤作为筛选病原菌拮抗微生物的主要材料。

### 2.3 苹果、姜、蒜内生菌对苹果轮纹病菌菌丝生长抑制研究

试验中轮纹病菌菌落直径越小,表示抑菌效果越好。各分离菌的抑菌效果见表1。

由表1、图4可知,从姜、蒜、苹果、根际土壤中共分离到试验用拮抗菌株18种,除土2对苹果轮纹病菌菌丝生长无抑制效果外,其余17种菌株都对苹果轮纹病菌有抑菌效果。而且,从根际土壤中分离到的微生物对苹果轮纹病菌具有拮抗性的所占比例较大,为44.4%;其次为姜和蒜,所占比例分别为27.8%和16.7%,健康苹果中分离到的内生细菌对轮纹病菌具有拮抗性的菌株

所占比例最小,为5.6%。

由图5可知,所有菌株中除蒜1②,土1和土5与对照比较抑菌效果差异不显著外,其余菌株抑菌效果差异都显著( $P < 0.05$ )。

由图6可知,所有菌株中抑制效果最好的为姜4(图6A),其真菌菌落直径为 $(30.78 \pm 0.49)$ mm,其次为土4(图6D),姜6(图6B)、土7(图6C),其真菌菌落直径分别为 $(35.12 \pm 0.13)$ 、 $(37.23 \pm 0.09)$ 、 $(38.86 \pm 0.32)$ mm。

### 3 结论与讨论

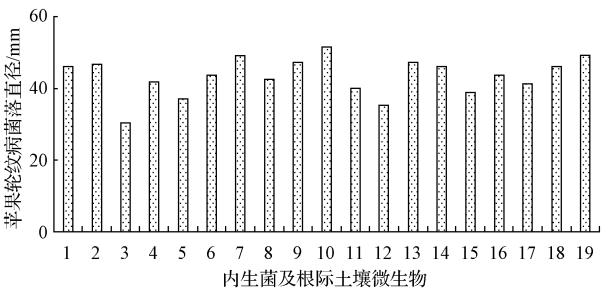
菌丝生长抑制试验表明,姜内可培养内生细菌和苹果根际土壤中的1种细菌都对苹果轮纹病有明显的拮抗效果,这为进一步筛选在采后苹果贮藏防治苹果轮纹病奠定基础。

在后续试验中,首先对有抑制效果的内生细菌还要

表 1 苹果、姜、蒜内生细菌以及土壤微生物对苹果轮纹病菌菌丝生长抑制结果

Table 1 Inhibition result of microorganisms isolated from apple, ginger, garlic and soil against apple ring spot

材料	编号	内生菌编号	轮纹病菌落直径/mm			
			重复 1	重复 2	重复 3	平均值 $\bar{x} \pm s$
姜	1	姜 1	47.02	46.30	46.40	46.57±0.15c
	2	姜 3	46.69	47.48	46.69	46.95±0.21c
	3	姜 4	30.55	31.56	30.22	30.78±0.49j
	4	姜 5	41.60	42.55	41.96	42.04±0.23e
	5	姜 6	37.45	36.89	37.36	37.23±0.09h
	6	蒜 1①	42.99	44.20	43.69	43.63±0.37d
蒜	7	蒜 1②	49.30	50.20	48.43	49.31±0.78b
	8	蒜 2	42.34	42.75	42.55	42.55±0.04e
	9	土 1	47.40	48.89	47.15	47.81±0.89c
	10	土 2	49.83	53.44	52.64	51.97±3.59a
根际土壤	11	土 3	40.08	40.13	39.61	39.94±0.08g
	12	土 4	35.48	34.75	35.12	35.12±0.13i
	13	土 5	47.49	47.82	47.66	47.66±0.03c
	14	土 6	45.76	47.36	46.56	46.56±0.64c
	15	土 7	38.85	38.87	38.86	38.86±0.32h
	16	土 8	42.80	44.51	43.66	43.66±0.73d
	17	土 9	40.57	41.82	41.20	41.20±0.39f
	18	苹 2	44.86	47.67	46.27	46.27±1.97c
无菌水	19	CK	50.30	48.60	49.45	49.45±0.72



注:1~19 同表 1 的编号。  
Note:1—19 are same as Table 1.

图 4 内细菌及土壤微生物对苹果轮纹病菌抑制效果

Fig. 4 Inhibition result of microorganisms isolated in the test against apple ring spot

进行其形态特征、生物学特性及分子生物学的鉴定。同时研究姜内可培养内生细菌和真菌以及根际土壤中细菌对轮纹病有拮抗作用的成分,分析是内生菌本身的生物学特征还是其代谢产物的作用对轮纹病有抑制效果,找到其抑菌机理,并且研究不同浓度拮抗菌溶液对苹果轮纹病的抑菌效果。

直径											
(α=0.05)											
菌种	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tukey法 姜4	3	30.776 7	35.116 7	37.233 3 38.860 0	38.860 0 39.940 0	39.940 0 41.196 7	41.196 7 42.036 7 42.546 7	42.036 7 42.546 7 43.626 7 43.6567	46.266 7 46.560 0 46.573 3 46.953 3	47.656 7 47.813 3	47.656 7 47.813 3 49.310 0 49.450 0
土4	3										
姜6	3										
土7	3										
土3	3										
土9	3										
姜5	3										
蒜2	3										
蒜11	3										
土8	3										
苹2	3										
土6	3										
姜1	3										
姜3	3										
土5	3										
土1	3										
蒜12	3										
对照	3										
土2	3										51.803 3

均数相似的显示在同一处。Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
a.计算均数用的是调和平均数差值=3.000。 a.Uses harmonic mean sample size=3.000.

图 5 苹果、姜、蒜内生细菌以及土壤微生物对苹果轮纹病菌菌丝生长抑制效果显著性分析

Fig. 5 Significance analysis of inhibition results of microorganisms isolated in the test against apple ring spot

该试验证明了姜内可培养内生细菌和根际土壤中细菌对苹果轮纹病菌丝的生长抑制效果,但并未对苹果、姜和蒜内组织研磨液以及其不可培养内生细菌及其它种类的内生菌对苹果轮纹病的抑菌效果进行试验,植物内不可培养内生菌占其体内内生菌群的主要地位,所以,研究苹果、姜和蒜研磨液以及其内不可培养内生细菌等对苹果轮纹病的抑菌作用也是今后的研究方向。

苹果果实轮纹病成为我国苹果贮藏为害最严重的病害。化学杀菌剂处理仍然是我国控制水果采后损失的主要方法。但长期使用杀菌剂,一方面容易导致病原菌抗药性的产生,防治效果减弱。另一方面用药量不断加大导致化学物残留较多直接威胁人类健康。而物理方法的防治只是简单的预防,治标不治本。生物防治作为防治苹果轮纹病的最优方式,但是由于技术以及经济



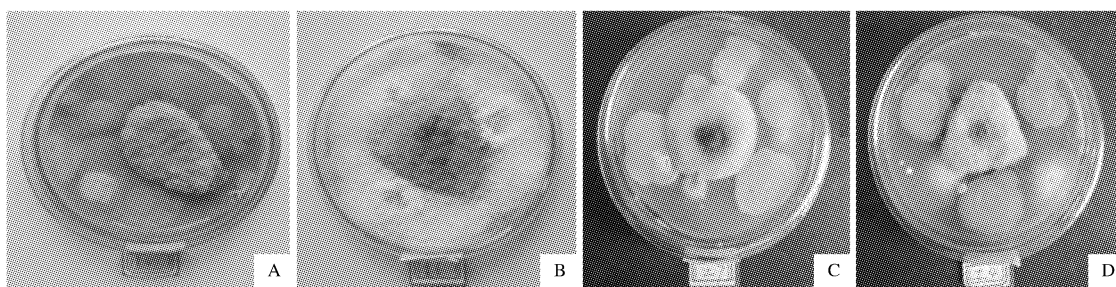


图6 4株分离菌抑菌效果

Fig. 6 Inhibition effect of 4 isolated microorganisms on apple ring spot

原因并未大规模投入生产。研究经济、高效生物制剂已成为苹果病害防治的首要选择。而研究苹果、姜、蒜内生菌以及苹果果树根际土壤中微生物对苹果轮纹病的拮抗筛选作用便是其中一部分,具有广阔的市场前景。

### 参考文献

- [1] 百度百科. 苹果轮纹病[EB/OL]. <http://wapbaike.baidu.com/view/230696.html>.
- [2] LI G X, SHEN Y B. Study on the infection mechanism of apple ring rot disease [J]. Journal of Fruit Trees, 2007, 24(1): 16-20.
- [3] 荔克让, 张华, 李晓云. 苹果果实轮纹病及其防治[J]. 中国沙漠, 2000, 7(20): 184-186.
- [4] 王光华. 生防细菌产生的拮抗物质及其在生物防治中的作用[J]. 应用生态学报, 2004, 15(6): 1100-1104.
- [5] 百度百科. 根际微生物[EB/OL]. <http://wapbaike.baidu.com/view/446359.html>.
- [6] 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: 25-27.
- [7] 宫春波, 杨伟, 刘永红, 等. 鲜姜汁抑菌效果的测定[J]. 中国调味品, 2005(9): 50-53.
- [8] 陈洪生. 大蒜素提取条件的优化及其抑菌活力的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(4): 87-89.
- [9] 陈祥贵, 裴炎, 彭红卫. 蜡状芽孢杆菌 S-1 菌株抗真菌物质的分离纯化[J]. 四川工业学院学报, 2002(2): 60-63.
- [10] 范青, 田世平, 蒋爱丽, 等. 采摘后果实病害生物防治拮抗菌的筛选和分离[J]. 中国环境科学, 2001, 21(4): 313-316.
- [11] 鄂华. 非寄主植物内生菌防治桉树青枯病研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
- [12] 汪茜, 胡春锦. 真菌病害拮抗菌的筛选及其对多种植物病原真菌的拮抗活性测定[J]. 广西农业科学, 2010, 41(7): 675-678.
- [13] 黄海东, 李晓燕, 杨红鹏, 等. 龙胆内生菌的分离鉴定及其对苹果腐烂病菌的拮抗作用[J]. 食品工业科技, 2012(6): 217-218.
- [14] 陈亮, 刘君丽. 丁香菌酯对苹果树腐烂病的防治[J]. 农药, 2009, 4(6): 402-404.
- [15] 邓振山, 赵龙飞, 王薇薇, 等. 银杏内生真菌的分离及其对苹果腐烂病原菌的拮抗作用[J]. 西北植物学报, 2009, 29(3): 608-613.
- [16] 乔红萍, 宏丽丽, 康振生. 小麦内生细菌及其对根部主要病原真菌的抑制作用[J]. 应用生态学报, 2006, 17(3): 690-694.
- [17] 史光瑚. 我国水果业的发展和几点建议[J]. 果树科学, 1998, 15(2): 97-102.
- [18] 侯保林, 王江柱, 朱杰华, 等. 苹果果实轮纹病的发生和防治[J]. 中国果树, 1998(2): 42-43.

## Study on the Inhibitory Action of Apple Ring Spot in the Storage Period

HOU Xiaojie<sup>1</sup>, LIANG Kuijing<sup>1</sup>, CONG Rizheng<sup>2</sup>, LU Zhangen<sup>1</sup>

(1. Department of Life Science, Hengshui University, Hengshui, Hebei 053000; 2. College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000)

**Abstract:** Apple, garlic and ginger were used as test materials, the confrontation culture method was adopted to study the antagonism effect from culturable endophytic bacteria within healthy apple fruit, ginger, garlic, and the rhizosphere soil microorganisms in healthy apple plant for the apple ring spot. The results showed that, nine kinds of bacteria in rhizosphere soil can be cultured; the number of strains isolated from ginger, garlic and apple was 5, 3 and 1, respectively. All of the isolated microorganisms except 'soil-2' obtained from soil had the inhibition ability and isolates from the rhizosphere soil had greater proportion of antagonism, 44.4%; followed by ginger and garlic, the proportion was 27.8% and 16.7%. All strains except 'garlic 1 ②', 'soil-1' and 'soil-5' had significant difference comparing with CK. The 'ginger 4' had the best inhibitory effect, the diameter of fungal colonies was only  $(30.78 \pm 0.49)$  mm, 'soil-4' was following, fungal colony diameter was  $(35.12 \pm 0.13)$  mm.

**Keywords:** apple ring spot; culturable endophytic bacteria; rhizosphere soil; rivalry