

姜内生细菌鉴定及对储藏期梨黑斑病菌丝抑制作用初探

梁魁景¹, 于占晶¹, 侯晓杰^{1*}, 刘海鹏¹, 王芳芳¹, 闫文莉², 桑梦琪³

(1. 衡水学院生命科学学院, 河北 衡水 053000; 2. 枣强县住房和城乡建设局, 河北 衡水 053100; 3. 衡水市桃城区农业农村局动物防疫站, 河北 衡水 053000)

摘要: 实验采用对峙培养法, 对姜果实内分离出来的6种内生细菌进行了其对贮藏期梨黑斑病菌菌丝的拮抗实验研究。结果表明: 经初筛和复筛, 4种姜内生细菌J₁、J₂、J₄和J₅对储藏期梨黑斑病菌均有拮抗作用。复筛第5天时拮抗率分别是6.20%、18.22%、54.19%和12.79%; 其中J₄的拮抗作用最为明显。在第7天时拮抗作用有所变化, 拮抗率分别为7.15%、1.73%、53.46%和6.49%, 但J₄的抑制作用依旧最为明显, J₄内生菌处理的梨黑斑病菌菌落直径始终与对照及其他处理间存在显著性差异, 且J₄的抑制作用保持稳定。通过形态观察、生理生化实验和16S rDNA序列分析, 将J₄菌株鉴定为枯草芽孢杆菌。实验结果为姜内生细菌J₄的开发利用提供了很好的基础理论研究。

关键词: 姜内生细菌; 鉴定; 梨黑斑病; 拮抗作用

中图分类号: S436.612

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)03-0113-04

Identification of Ginger Endophytic Bacteria and Preliminary Study on Inhibition of Pear Black Spot Mycelia in Storage Period

LIANG Kuijing¹, YU Zhanjing¹, HOU Xiaojie^{1*}, LIU Haipeng¹, WANG Fangfang¹, YAN Wenli², SANG Mengqi³

(1. College of Life Science, Hengshui College, Hengshui 053000; 2. Zaoqiang County Housing and Urban-Rural Development Bureau, Hengshui 053100; 3. Animal Epidemic Prevention Station of Taocheng District Agriculture and Rural Bureau, Hengshui City, Hengshui 053000, China)

Abstract: In the experiment, six kinds of endophytic bacteria isolated from ginger fruit were antagonized by the sputum culture method, and the antagonistic effect on the mycelium of *P. stipitis* was studied. The results showed that the four ginger endophytic bacteria J₁, J₂, J₄ and J₅ have antagonistic effects on the storing pear black spot disease during the initial screening and rescreening. The antagonistic rate at the 5th day of rescreening were 6.20%, 18.22%, 54.19% and 12.79%, respectively. The antagonistic effect of J₄ was the most obvious. At the 7th day, the antagonism changed, and the antagonism rates were 7.15%, 1.73%, 53.46% and 6.49%, respectively. However, the inhibitory effect of J₄ was still the most obvious. The colony diameter of *P. elegans* treated with J₄ endophyte had a significant difference with the control and other treatments respectively, and the inhibition of J₄ remains stable. The J₄ strain was identified as *Bacillus subtilis* by morphological observation, physiological and biochemical experiments and 16S rDNA sequence analysis. The experimental results provided a good basic theoretical study for the development and utilization of ginger endophytic bacteria J₄.

Key words: Ginger endophytic bacteria; Identification; Pear black spot; Antagonism

收稿日期: 2019-12-24

基金项目: 2020年度高层次人才科研启动基金(2020GC06); 河北省梨产业创新团队衡水试验技术推广站(HBCT2021210402); 衡水学院校级科研项目(2022ZR24)

作者简介: 梁魁景(1983-), 男, 讲师, 硕士, 主要从事园林植物病虫害防治等研究工作。

通讯作者: 侯晓杰, 女, 博士, 副教授, E-mail: houxiaojie23@163.com

梨黑斑病(pear black rot)是梨生长发育期间广泛发生的一种病害。最早于1933年就有报道, 韩国、日本及我国是梨黑斑病发生的重灾区^[1-2]。近年, 在法国也发现有梨黑斑病的发生^[3], 因此防治梨黑斑病已迫在眉睫。

梨黑斑病又名裂果病, 是梨的三大病害之一, 梨黑斑病是储藏期的一种重要病害^[4], 由真菌的链格孢[*Alternaria alternate*(Fr.)Keissl]侵染引起^[5]。

该病主要危害梨树果实、叶片和新梢。当梨树果实遭受病害,病斑处会产生龟裂,容易引起梨树果实脱落。感病果实无商品价值。所以把握梨树果实黑斑病发生的规律,积极防治梨果实黑斑病的发生和蔓延,对于提高梨的产量和品质具有重要意义^[6]。目前对于防治梨黑斑病的主要方法以化学药剂为主,但化学药品存在着抗药性和农药残留等问题,对人和自然环境构成严重威胁。而生物防治具有的安全、高效、环境友好的特性恰好符合人类社会发展的要求。因此,筛选出高效和对自然环境安全的新型生物药剂,进而制备高效的生防菌剂,具有重要经济与社会价值。孔阳等^[7]研究 *alternariol* 对白菜黑斑病菌、苹果腐烂病菌和葡萄炭疽病菌的抑制率大于阳性对照,对于番茄灰霉和黄瓜枯萎病菌抑制作用与阳性相当,对供试的两种革兰氏阴性菌和两种革兰氏阳性菌抑制作用整体优于阳性对照;邓进超等研究筛选得到的 ATB4 菌株经鉴定为甲基营养型芽孢杆菌,对人参锈腐病菌有较强的抑制效果,并且其具有广谱抗菌性,对人参立枯病菌、人参根腐病菌、人参灰霉病菌、人参菌核病菌和人参疫病菌都有较好的抑制效果^[8]。近年来,国内外已报道链霉菌、酵母菌和枯草芽孢杆菌对梨黑斑病有一定的抑制作用,但大多是从梨树根际土壤中分离获得,在实际的生产中难以大规模应用^[9]。姜内生细菌防治梨黑斑病未见报道,内生细菌作为植物病害防治的天然资源菌具有广阔的应用与发展前景。分离得到6株细菌,筛选出一株对梨黑斑病菌具有强拮抗活性的菌株。通过形态观察和序列分析,对菌株分类地位进行初步分析鉴定,并对其生防潜力进行了探索。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株

姜内生细菌:编号为 J₁、J₂、J₃、J₄、J₅ 和 J₆^[10],储藏期梨黑斑病病菌(*Alternaria alternate*),均由衡水学院园林植物学实验室保存。

1.1.2 培养基

NA 培养基用于活化姜内生细菌;PDA 培养基用于活化梨黑斑病病菌。

1.2 室内毒力测定

1.2.1 储藏期梨黑斑病病菌及姜内生细菌的活化培养

采用平板涂布法,将-20℃冰箱保存的不同种姜内生细菌接种至 NA 平板,每细菌接种 2~3

皿,27℃恒温生化培养箱内倒置培养 48 h,备用。

采用菌丝块生长法,挑取 4℃冰箱保存的贮藏期梨黑斑病病菌边缘部分(0.5 cm×0.5 cm,活力最为旺盛的菌丝)接种至 PDA 培养基平板上,于 27℃生化培养箱中倒置培养 3~5 d 后备用。

1.2.2 姜内生细菌对储藏期梨黑斑病病菌的拮抗作用初筛

采用对峙培养法。用打孔器制作直径为 0.6 cm 的梨黑斑病菌菌饼,接种至 PDA 平板中心(菌丝向下),用接种环蘸取姜内生细菌在距离病原菌菌饼中心约 3 cm 外画一个闭合正方形菌线。每种姜内生菌为一处理,每处理重复 3 次,同时设空白对照。将处理好的培养皿置于 27℃生化培养箱中倒置培养,7 d 后观察结果,采用十字交叉法测量梨黑斑病菌生长直径,与对照做比较分析,从而筛选出对梨黑斑病菌生长有抑制作用的内生细菌,完成初选。计算抑菌率公式:

菌丝生长抑制率(%)=[(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径]×100

1.2.3 姜内生细菌对储藏期梨黑斑病病菌的抑菌试验

姜内生细菌菌悬液的配制:将培养 48 h 后的姜内生细菌加入 1 mL 无菌水,漩涡振荡器震荡均匀后利用 721 型可见分光光度计测定其 OD 值,使其全部调整为 1,从而使实验所用内生细菌的浓度大致相同接种:采用滤纸片法,制作直径 0.6 cm 的梨黑斑病菌菌饼,接种于 PDA 平板中心(菌丝向下),在距离病原菌中心 3 cm 处放置无菌滤纸片 3 个,形成等边三角形,每滤纸片接种 10 μL 内生细菌菌悬液,每处理 3 次重复,对照采用无菌水代替细菌菌悬液。将各处理置于 27℃生化培养箱中倒置培养,7 d 后观察结果,采用十字交叉法测量梨黑斑病菌生长直径,统计结果并分析后筛选出对梨黑斑病病菌拮抗效果明显的内生细菌。

1.3 J₄菌株的鉴定

1.3.1 形态特征鉴定

对拮抗效果明显的姜内生细菌分别进行菌落(培养皿上菌落的大小、正反面颜色、边缘形状等)及菌体(大小、芽孢的有无等)形态特征的观察。

1.3.2 生理生化特性鉴定

好氧性测定、革兰氏染色、接触酶反应、乙酰甲基甲醇实验、乙酰甲基甲醇实验、柠檬酸盐的利用、甲基红实验和氧化酶反应等^[9]。

1.3.3 J₄菌株的 16S rDNA 测序

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒制备

总 DNA 模板,根据原核生物保守序列通用引物 7F1540R (CAGAGTTTGATCCTGGCTAGGAGGTGATCCAGCCGCA) 和 27F1492R (AGTTTGATCMTGGCTCAGGGTTACCTTGTACGACTT)。PCR: 反应体系: Template (基因组 DNA 20–50 ng/ μ l) 0.5 μ L; 10 \times Buffer (with Mg^{2+}) 2.5 μ L; dNTP (各 2.5 mM) 1 μ L; 酶 0.2 μ L; F (10 μ M) 0.5 μ L; R (10 μ M) 0.5 μ L; 加双蒸 H_2O 至 25 μ L。PCR 循环条件: 首先 94 $^{\circ}C$ 预变性 4 min; 然后 94 $^{\circ}C$ 45 s, 55 $^{\circ}C$ 45 s, 72 $^{\circ}C$ 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}C$ 修复延伸 10 min; 4 $^{\circ}C$ 延伸保存。SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒, PCR 引物直接测序。由上海生工基因公司完成测序, 将测定的序列用软件在 GenBank 中与已知的 16S rDNA 进行同源性比较。

1.4 数据分析

用 Excel 2013 软件统计数据及作图, SPSS 16.0 软件进行数据分析 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 姜内生细菌对储藏期梨黑斑病菌的拮抗作用初筛结果

采用对峙培养法, 对培养 7 d 的病原菌菌落直径进行测量、记录和整理。实验中梨黑斑病菌菌落生长的直径越小, 表示该内生细菌的抑菌作用越好。各内生细菌的抑菌效果见表 1。

由表 1 可知, 姜内生细菌 J_1 、 J_2 、 J_4 和 J_5 处理的病原菌直径小于对照 (CK) 直径, 且与对照具有显

表 1 姜内生细菌对储藏期梨黑斑病菌拮抗作用初选结果

内生细菌	菌落直径(cm)	抑制率(%)
J_1	5.22 \pm 0.53b	32.21
J_2	5.93 \pm 0.09b	22.99
J_3	7.75 \pm 0.28a	0
J_4	1.97 \pm 0.03c	74.55
J_5	5.83 \pm 0.09b	24.29
J_6	7.87 \pm 0.09b	0
对照(CK)	7.70 \pm 0.03a	-

注: 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

著性差异, 表明姜内生细菌 J_1 、 J_2 、 J_4 和 J_5 这 4 种内生细菌都对储藏期梨黑斑病菌具有一定的拮抗作用, 其抑制率分别为 32.21%、22.99%、74.55%、24.29%, J_4 与其他内生细菌之间具有显著性差异, 所以 J_4 的抑菌作用最强。 J_1 、 J_2 和 J_5 内生细菌对梨黑斑病的抑制作用无显著性差异。内生细菌 J_3 对储藏期梨黑斑病菌没有拮抗作用。根据表中数据可得抑制率排序为: $J_4 > J_1 > J_5 > J_2$ 。

2.2 相同浓度下姜内生细菌对储藏期梨黑斑病菌拮抗作用强弱比较

经初筛后将对梨黑斑病菌有拮抗作用的内生细菌 J_1 、 J_2 、 J_4 、 J_5 在同一浓度下比较四种内生细菌的拮抗作用, 找出抑制效果最好的内生细菌, 实验第 5 天和第 7 天时分别进行观察及数据统计, 结果见表 2。

统计第 5 天和第 7 天的梨黑斑病菌落直径发

表 2 相同浓度下姜内生细菌对储藏期梨黑斑病菌拮抗作用

内生细菌	第 5 天		第 7 天	
	菌落直径平均值(cm)	抑制率(%)	菌落直径平均值(cm)	抑制率(%)
J_1	4.03 \pm 0.10a	6.20	7.15 \pm 0.25a	7.15
J_2	3.52 \pm 0.13a	18.22	7.57 \pm 0.03a	1.73
J_4	1.97 \pm 0.06b	54.19	3.58 \pm 0.14b	53.46
J_5	3.75 \pm 0.13a	12.79	7.20 \pm 0.10a	6.49
对照(CK)	4.30 \pm 0.46a	-	7.70 \pm 0.06a	-

现, 姜内生细菌 J_4 与对照及其他内生细菌之间有显著性差异, 第七天其直径为 (3.58 \pm 0.14) cm, 抑菌率为 53.46%, 表明 J_4 细菌对梨黑斑病菌菌丝具有明显的抑制作用, 这与初筛结果相一致, 其他内生细菌之间抑制作用无显著性差异。

2.3 J_4 拮抗菌株的鉴定

2.3.1 形态特征鉴定

经 NA 培养基平板培养及光学显微镜 100 \times 油镜下对 J_4 内生细菌进行了菌落及菌体的观察, 结

果见图 1。

J_4 内生细菌的菌落近似圆形, 正反两面均为乳白色, 边缘光滑, 有光泽, 不透明, 平铺, 大小为 (0.2~0.4) mm \times (0.4~0.6) mm。 J_4 细菌的大小为 (1.2~1.8) μ m \times (4.4~5.2) μ m, 不产芽孢, 无荚膜, 周生鞭毛。

2.3.2 生理生化特性鉴定

由表 3 可以看出, J_4 内生细菌好氧, 接触酶反应、V-P 实验阳性, 硝酸盐还原阳性, 丙酸盐利用

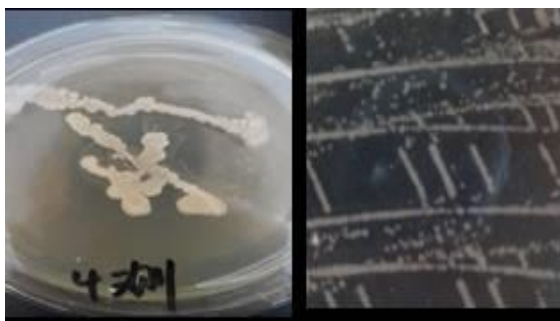


图1 J₄内生细菌在NA培养基上的菌落形态及划线形态图

表3 J₄内生细菌的生理生化特性检测结果

鉴别特征	结果
好氧性	+
革兰氏反应	-
接触酶反应	+
V-P反应	+
柠檬酸盐利用	-
甲基红实验	-
氧化酶反应	-
硝酸盐还原反应	+
丙酸盐利用	+
明胶液化	-
淀粉水解反应	+
1%NaCl	+
2%NaCl	+
耐盐性 5%NaCl	+
7%NaCl	+
10%NaCl	+
葡萄糖发酵产酸	-
H ₂ S产生实验	+
运动性	-

注: +为阳性, -为阴性

阳性,可以水解淀粉,可以产生H₂S,在1%~10%的NaCl中皆可以正常生长。

2.3.3 16S rDNA序列测定

将拮抗J₄ 16S rDNA细菌的PCR产物测序结果在NCBI上进行同源性分析,发现它与枯草芽孢杆菌(GenBank: DQ290002)具有极高的同源性,同源性达到99%。结合J₄的细胞形态、生理生化特征确定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

3 结论与讨论

3.1 结论

本试验采用对峙培养法对姜的6种内生细菌进行实验,找出对储藏期梨黑斑病病菌具有拮抗作用的细菌,实验表明,J₁、J₂、J₄和J₅对梨黑斑病均

有抑制作用,抑制率分别为32.21%、22.99%、74.55%和24.29%。方差分析结果表明以上4种内生细菌和对照相比均有显著性差异,且J₄与其他3种细菌也有显著性差异。再比较在相同浓度下J₁、J₂、J₄和J₅对梨黑斑病病菌的抑制程度,找出拮抗性最强的细菌,结果J₄的抑制作用最强,且具有一定的稳定性。结合细胞形态、生理生化特征和16S rDNA测序将J₄内生细菌确定为枯草芽孢杆菌。以期作为生物农药来开发,使其有效预防和减缓储藏期梨黑斑病的发生和蔓延。

3.2 讨论

目前植物病害的防治主要采用化学防治的方法,化学农药的滥用是影响人类健康和环境恶化的重要原因^[11]。大量研究发现,生物药剂在防治植物病害方面具有不可替代的作用^[12]。虽然内生细菌是植物病害生物防治的天然资源菌,在植物病害防治方面具有不可比拟的优点,具有广阔的开发利用价值。但是用内生细菌菌剂作生防依然存在一定的局限性^[13-14]。研究发现,许多内生菌能帮助植物抵抗病虫害,提高植物的抗逆性,是具有较大潜力的微生物新资源^[15-16]。如周旋旋从枫杨茎干分离得到枯草芽孢杆菌菌株FY-3,该菌有较好拮抗病原菌的效果^[17];龙良鲲等试验表明,番茄菌株能拮抗青枯病菌^[18];王万能等从烟草的根部分离得到防治烟草黑胫病的内生细菌^[19]等。纵观对内生细菌的研究报道,只是单纯分离、纯化、种类鉴定及室内病害防效测定等。将植物内生细菌作为生防因子用于植物病害防治应有更深入的研究,还需要从各个方面考量。

参考文献:

- [1] Simmons, Emory G. *Alternaria* themes and variations[J]. Mycotaxon, 1993, 48: 109-140.
- [2] 张志铭, 宋福, 孙淑贞, 等. 河北鸭梨黑斑病病原菌的鉴定[J]. 植物检疫, 2003, 17(4): 212-214.
- [3] Chand Goyal T, Spotts R A. Biological control of postharvest diseases of apple and pear under Semicommercial and commercial conditions using three saprophytic yeasts[J]. Biological Control, 1997, 10: 207-209.
- [4] 孙连波. 梨黑斑病生防细菌的筛选、鉴定及其生防活性的初步研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [5] 古玉, 张敏, 王跃进, 等. 梨黑斑病菌AK-毒素的研究进展[J]. 植物检疫, 2007, 21(1): 35-38.
- [6] 史光翊. 我国水果业的发展和几点建议[J]. 果树科学, 1998, 15(2): 97-102.
- [7] 孔阳, 马养民, 王佳运, 等. 一株烟曲霉抗植物病原菌活性次生代谢产物的研究[J]. 东北农业科学, 2019, 44(3): 34-38.

(下转第160页)

响应面都具有最高点,并且响应面的坡度表现为先逐渐上升后下降的趋势,每组等高线近似椭圆,可以得出每组中两个交互因素的相互作用对麸炒北苍术多糖得率的影响较大,表明选择提取时间、液料比和提取温度作为试验因素较为合理。

3.4 优化工艺验证

对回归方程求解,得到多糖得率达到最大值时的提取条件为:提取时间 67.62 min,液料比 25:1,提取温度 88.96 °C,多糖得率达到 3.57%,考虑试验条件限制及操作方便,将提取因素修正为:提取时间 68 min,液料比 25:1,提取温度为 89 °C,此条件下麸炒北苍术多糖得率为 3.65%。与响应面优化的最佳提取工艺条件下得出的得率理论值相差不超过 0.08%。结果表明利用响应面法优化麸炒北苍术多糖的提取工艺具有可行性。

4 结论

本研究在单因素试验的基础上,通过 Box-Behnken 响应面法对麸炒北苍术多糖的提取条件进行了优化,发现 3 个因素对多糖得率的影响大小依次为:提取次数>提取时间>液料比;建立多糖得率的回归模型,该模型优化的多糖提取条件为:提取时间 68 min,液料比 25:1,提取温度 89 °C,多糖得率达到 3.65%,与理论值相近,表明

该模型合理可靠,拟合程度良好,具有可行性。

参考文献:

- [1] 杜庆山. 中药苍术炮制方法及理论研究进展[J]. 中国药物警戒, 2012, 9(7): 58-59.
- [2] 肖春萍, 夏炎, 张强. 吉林省不同产地北苍术的质量评价研究[J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(5): 62-63.
- [3] 孟利娜, 许静, 南楠, 等. 正交试验优化超声法提取北苍术多糖的工艺研究[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 457-460.
- [4] 塔西斯, 张洁, 杭永付, 等. 北苍术炮制前后水提液和多糖部位保肝作用比较研究[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 45-47.
- [5] 于森, 王冰, 付叶珊, 等. 响应面法优化刺五加根废弃物多糖提取工艺的研究[J]. 中草药, 2019, 50(7): 1610-1613.
- [6] 王广慧, 李士慧, 梁婷, 等. 响应面优化超声波辅助复合酶法提取杏鲍菇黄酮[J]. 东北农业科学, 2018, 43(1): 46-48.
- [7] 王玉梅. 红缘拟层孔菌多糖提取工艺的响应面优化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(1): 116-122.
- [8] 刘涛, 王清, 夏新奎, 等. 响应面法优化地骨皮多糖提取工艺[J]. 西华大学学报(自然科学版), 2019, 38(2): 53-54.
- [9] 焦迎春, 余梅, 张燕, 等. 超声波辅助提取柴达木大肥菇多糖工艺优化及其抗缺氧活性研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(1): 114-115.
- [10] 王晓辉, 王贵鹏, 张庆芳, 等. 抗灰霉病解淀粉芽孢杆菌的发酵条件优化[J]. 吉林农业科学, 2015, 40(2): 72-75.

(责任编辑:王昱)

(上接第 116 页)

- [8] 邓进超, 关一鸣, 吴连举, 等. 人参锈腐病菌拮抗菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 东北农业科学, 2017, 42(3): 31-38.
- [9] 宋聪, 宋水山, 关军锋. 梨采后黑斑病拮抗菌 J18 的鉴定及防治效果的初步研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(1): 6-10.
- [10] 侯晓杰, 梁魁景, 丛日征, 等. 贮藏期苹果轮纹病拮抗菌的筛选研究[J]. 北方园艺, 2015(23): 115-119.
- [11] 李继兵. 五株芽孢杆菌新种的分离纯化及其鉴定研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- [12] 邓年方. 大肉姜乙醇提取物的抑菌作用研究[J]. 北方园艺, 2013(5): 98-99.
- [13] 窦瑞木. 植物内生菌及其防病作用研究进展[J]. 河南农业科学, 2008, 19(6): 56-62.
- [14] 李长松. 拮抗细菌生物防治植物土传病害的研究进展[J].

生物防治通报, 1992, 8(4): 168-172.

- [15] 卢占慧. 人参内生菌群落多样性及拮抗菌株的抑菌作用研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.
- [16] 任慧爽, 徐伟芳, 王爱印, 等. 桑树内生细菌多样性及内生拮抗活性菌群的研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(1): 36-45.
- [17] 周旋旋. 枫杨内生菌抑菌与促生作用初探[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2008.
- [18] 龙良鲲, 肖崇刚, 窦彦霞. 防治番茄青枯病内生细菌的分离与筛选[J]. 中国蔬菜, 2003(2): 21-23.
- [19] 王万能, 肖崇刚. 烟草内生菌 118 防治黑胫病的机理研究[J]. 西南农业大学学报, 2003, 25(1): 28-31.

(责任编辑:刘洪霞)