

枯草芽孢杆菌 BS80-6 对苹果采后炭疽病的 控病效果及作用机制

檀根甲¹ 李增智^{1*} 刘淑芳¹ 王 钢² 黄有凯²

(1. 安徽农业大学 安徽省微生物防治重点实验室, 合肥 230036; 2. 合肥一中, 合肥 230036)

摘要: 为提高枯草芽孢杆菌的生防效果, 通过离子束诱变筛选出 BS80-6 菌株。利用生物测定方法研究 BS80-6 菌株及不同处理方法在不同贮藏温度下对采后苹果炭疽病的控制效果和作用机制。结果表明, BS80-6 能显著提高对苹果炭疽菌的抑制作用。枯草芽孢杆菌 BS80-6 对苹果果实炭疽病的防治效果以活菌液效果最好, 菌丝生长抑制率为 80.14%, 孢子萌发抑制率为 98.65%, 控病效果为 60.34%; 灭菌液和过滤液对苹果炭疽菌也有一定的抑制效果。贮藏温度明显影响 BS80-6 对苹果炭疽病的防治效果; 接种方式对控病效果影响显著, 先接拮抗菌再接病菌的防效好于先接病菌再接拮抗菌。

关键词: 苹果炭疽菌; 枯草芽孢杆菌 BS80-6; 生物防治; 控病机制; 防治效果

Mechanisms of action and efficacy of *Bacillus subtilis* BS80-6 active against postharvest anthracnose pathogen on apples

Tan Genjia¹ Li Zengzhi^{1*} Liu Shufang¹ Wang Gang² Huang Youkai²

(1. Provincial Key Lab of Micro Control of Anhui, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui Province, China; 2. No. 1 School of Hefei, Hefei 230036, Anhui Province, China)

Abstract: In order to improve biological control efficacy of *Bacillus subtilis* to apple anthracnose, by means of bioassay method, the mechanisms of action and efficacy of *Bacillus subtilis* strain BS80-6, screened by ion implantation, against apple anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* were studied *in vitro* and on apples, in different conditions. The results showed that BS80-6 was more effective against apple anthracnose. An application of a cell suspension (10^8 cells per mL) of the antagonist in artificial wounds of apples reduced growth of *C. gloeosporioides* after storage at different temperatures. The inhibitory actions of cell cultures to mycelium growth and to spores germination were 80.14% and 98.65%, respectively, and the control efficacy with cell cultures to the disease was 60.34% at room temperature. The cell culture of BS80-6 provided better control of apple anthracnose than culture filtrates and autoclaved cells. The store temperatures could affect the control efficacy, disease lesion expansion and formation of acrvulus, significantly. There was better control efficacy in fruits inoculated with spores after BS80-6 than before BS80-6.

Key words: *Colletotrichum gloeosporioides*; *Bacillus subtilis* BS80-6; biocontrol; mechanisms of action; control efficacy

基金项目:安徽省教育厅自然科学重点科研项目(KJ2007A095)

作者简介:檀根甲,男,1963年生,教授,研究方向为植病流行和病生理, email: tgj63@163.com, Tel: 0551-5786312

* 通讯作者(Author for correspondence), email: zzli@ahau.edu.cn

收稿日期:2007-08-21

近年来,病菌不断对农药产生抗性^[1],食品中农药残留危害人类健康,因此,生物防治方法普遍受到重视。生物防治技术被认为是最具发展潜力的防治方法,以有效微生物取代农药对水果进行采后处理,已显示出其巨大的应用前景^[2-3]。自 Gutter 等^[4]首次报道枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 对水果病原菌有拮抗作用以来,利用微生物进行果蔬采后生物防治的研究愈加活跃。枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 是土壤和植物微生态中的优势微生物种群,具有很强的抗逆能力和抗菌防病的作用^[5],可以防治多种果蔬上的多种病害。范青等^[6]利用从土壤中分离出来的枯草芽孢杆菌 B-912 控制采后柑橘果实青、绿霉病取得了很好的效果。何红等^[7]从辣椒体内分离到 1 株能在辣椒、白菜等植物体内定殖传导并对多种植物病原真菌具有较强拮抗作用、对辣椒、白菜、香蕉等炭疽病和蔬菜苗期立枯病具有良好防治效果的枯草芽孢杆菌。近年来,离子束作为新的诱变技术,在育种方面取得很大成功。离子注入除有能量沉积外,还有动量传递、质量沉积及电荷交换等效应,它不仅影响细胞的生理生化功能,还能引起细胞中遗传物质的改变。作者研究低能离子束注入诱变筛选的 BS80-6 枯草芽孢杆菌^[8]及不同的处理方法在不同贮藏温度下对采后苹果炭疽病的控制效果和作用机制,以期对苹果采后病害综合防治及水果保鲜、贮藏提供依据。

1 材料与方法

1.1 培养液的制备

经离子束诱变野生型菌株 BS-CK 筛选获得枯草芽孢杆菌 BS80-6 (*Bacillus subtilis*, BS80-6)。将 BS80-6 在 NA 斜面上活化 24 h,配成 1×10^8 的菌悬液,取 500 μL 接入装有 50 mL NB 培养液的三角瓶中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 120 h,以野生型枯草芽孢杆菌 BS-CK 为对照。制备成以下三种处理液:培养的活菌液(细菌浓度为 10^8 cfu/mL)、过滤液(培养液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,滤液在 8 000 r/min 离心机上离心 30 min,上清液即为过滤液)、高压灭菌液(滤液经 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 30 min)。

1.2 病菌菌碟及孢子悬浮液的制备

从自然发病的苹果果实上分离炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*,在装有 20 mL PDA 培养基、直径 90 mm 的培养皿上,25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 5 天,用打孔器制成直径为 6 mm 的菌碟或用无菌水制成浓度为 $1 \times$

10^5 个/mL 分生孢子悬浮液。

1.3 BS80-6 的处理液对苹果炭疽菌的抑菌作用

将上述过滤液和高压灭菌液分别按终浓度配成 10、100 和 500 倍的稀释液,活菌液调整浓度为 10^8 cfu/mL 进行平板抑菌试验,按比例加入 35 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 的 PDA 培养基中,冷凝后接种病菌菌碟,27 $^{\circ}\text{C}$ 下培养,每处理 3 次重复,以野生型菌株 BS-CK 和不加培养液的处理为对照,4 天后测量菌落直径,计算抑菌率。

1.4 BS80-6 处理液对苹果炭疽菌孢子萌发的抑制作用和菌丝形态的影响

将过滤液、高压灭菌液分别配制成 10、100 和 500 倍的稀释液,活菌液浓度调整为 10^8 cfu/mL,取 PDA 平板上培养 4 天的苹果炭疽菌,用无菌水配制孢子悬浮液(10^5 个/mL),取 20 μL 滴加在凹玻片上,滴加 20 μL 不同稀释倍数的发酵液,混匀后置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h,以无菌水处理为对照,每处理 4 次重复,每重复镜检 200 个孢子的萌发率,并计算拮抗菌处理液对苹果炭疽病菌分生孢子萌发的抑制率。

将苹果炭疽病菌菌碟 5 块和 50 μL 的拮抗菌悬浮液(1×10^8)同时接入 100 mL 的培养液中,以只接无菌水和未经注入枯草芽孢杆菌的培养液为对照,重复 3 次。28 $^{\circ}\text{C}$ 下震荡培养 4 天,显微镜下观察菌丝形态的变化。

1.5 BS80-6 对苹果寄主主要防御酶活性的影响

过氧化物酶(POD)活性测定:取健康和接种后 1 ~ 9 天的苹果组织 1 g,加入 3 mL 0.2 mol/L 醋酸缓冲液(pH = 5.0),再加入少许 1% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和石英砂,冰浴研磨匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 20 min,取上清液置于冰箱中保存。

POD 酶活性测定:参照李靖等^[9]的方法,略有改动。反应检测液:0.2 mol/L 醋酸缓冲液(pH = 5.0) 1.95 mL、0.1% 愈创木酚 1 mL、酶液 0.1 mL、0.08% H_2O_2 溶液 1 mL。加入 H_2O_2 室温反应 60 s 后在 470 nm 波长下测 OD 值。对照将 H_2O_2 改为蒸馏水。每隔 30 s 读取各管光吸收值,共读 3 min。酶活单位 = $\Delta\text{OD}_{470}/\text{g}/\text{min}$ 。

多酚氧化酶(PPO)活性测定:取健康和接种后 1 ~ 9 天的苹果组织 1 g,加入 3 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH = 6.8),再加入少许 1% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和石英砂,冰浴研磨匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 20 min,取上清液置于冰箱中保存。

PPO 酶活性测定也参照李靖等^[9]的方法,略有

改动。在小试管中依次加入 0.02 mol/L 邻苯二酚溶液 1.5 mL、0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH = 6.8) 1.5 mL、酶液 0.01 mL; 另取一小试管, 加前两种溶液, 不加酶液, 作为对照。30 °C 反应 2 min, 398 nm 波长下测吸光值 OD。以每分钟 OD₃₉₈ 变化 0.01 为一个单位。

1.6 BS80-6 对苹果炭疽病的防治效果和分生孢子盘形成的影响

选择外观整齐, 无病虫危害的红富士苹果果实, 70% 的酒精表面消毒, 用灭菌的牙签在果实上均匀刺 3 mm × 5 mm 深的伤口, 分别接种 20 μL 10⁸ cfu/mL 的拮抗菌菌悬液和 1 × 10⁵ 个/mL *C. gloeosporioides* 孢子悬浮液。该试验按接种方式设两个处理, 方式一: 先接病原菌孢子悬浮液 12 h 后再接拮抗菌菌悬液。方式二: 先接拮抗菌菌悬液 12 h 后再接病原菌孢子悬浮液。每处理 10 个果实, 重复 3 次。以喷清水和只接病菌及未经离子注入的枯草芽孢杆菌为对照。晾干后将各处理的苹果分别在室温、10 °C 及先在 10 °C 下放置 10 天后再于室温下放置 (变温处理)。保持 95% 的相对湿度, 于第 2 天开始调查, 分别记载果实始病时间、统计发病率、测量病斑直径并计算各拮抗菌菌株的防治效果, 观察分生孢子盘的发育情况、计算分生孢子盘发育指数。室温下计

算接种 13 天的防效, 变温下计算接种 20 天的防效, 低温下计算接种 30 天的防效。分生孢子盘发育分级^[10]如下: 0 级指未形成分生孢子盘; 1 级表示出现黑色分生孢子盘; 2 级指分生孢子盘颜色加深, 但不成轮纹状排列; 3 级表示出现深褐色分生孢子盘且成轮纹状排列。

针刺接种法进行苹果活体测定, 方法同上。试验设先接拮抗菌处理液 12 h 后再接病原菌孢子悬浮液和先接病原菌孢子悬浮液 12 h 后再接拮抗菌处理液两种接种方式。分别测量苹果病斑直径, 计算防治效果。以接清水和病菌孢子悬浮液的苹果为对照, 每处理 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 BS80-6 处理液对苹果炭疽菌菌丝的抑制作用

BS80-6 的各处理液间差异显著, 其中活菌液 (10⁸ cfu/mL) 的抑菌效果最好, 抑制率为 80.14%; 其次为过滤液; 高压灭菌液效果最差。起生防作用的主要是活菌液, 未经离子注入诱变的 BS-CK 菌株活菌液抑制率为 71.26%, 与 BS80-6 相比较, 抑菌效果达显著差异 ($P < 0.05$), 说明离子注入诱变的菌株 BS80-6 抑菌效果显著提高 (表 1)。

表 1 拮抗菌处理液对苹果炭疽菌的抑菌效果

Table 1 Inhibition effect of antagonist culture treated on *Colletotrichum gloeosporioides*

处理 Treatment	菌落直径 (cm) Lesion diameter	菌丝抑制率 (%) Hypha inhibition percentage	孢子萌发抑制率 (%) Conidial germination inhibition percentage
CK	4.28 a		
BS80-6 灭菌液 500 倍 Autoclaved cells 500 ×	3.62 b	15.42 a	2.30 f
BS80-6 灭菌液 100 倍 Autoclaved cells 100 ×	3.15 c	26.40 b	5.63 f
BS80-6 灭菌液 10 倍 Autoclaved cells 10 ×	2.52 d	41.12 c	12.32 e
BS80-6 过滤液 500 倍 Culture filtrate 500 ×	3.13 c	26.87 b	21.25 d
BS80-6 过滤液 100 倍 Culture filtrate 100 ×	2.30 ef	46.26 cd	32.25 d
BS80-6 过滤液 10 倍 Culture filtrate 10 ×	1.58 f	63.08 e	45.32 c
BS80-6 活菌液 10 ⁸ cfu/mL Living cell culture 10 ⁸ cells per mL	0.85 h	80.14 g	98.65 a
BS-CK 灭菌液 500 倍 Autoclaved cells 500 ×	3.68 b	14.02 a	2.10 f
BS-CK 灭菌液 100 倍 Autoclaved cells 100 ×	3.38 c	21.03 b	4.23 f
BS-CK 灭菌液 10 倍 Autoclaved cells 10 ×	3.12 c	27.10 b	11.35 e
BS-CK 过滤液 500 倍 Culture filtrate 500 ×	3.30 c	22.90 b	22.32 d
BS-CK 过滤液 100 倍 Culture filtrate 100 ×	2.55 d	40.42 c	28.65 d
BS-CK 过滤液 10 倍 Culture filtrate 10 ×	1.77 f	58.65 e	42.32 c
BS-CK 活菌液 10 ⁸ cfu/mL Living cell culture 10 ⁸ cells per mL	1.23 g	71.26 f	89.45 b

注: 同列后字母相同表示差异不显著 (Duncan 氏新复极差法)。下同。Note: Values in the same column followed by the same letter are not statistically different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). The same as below.

2.2 BS80-6 处理液对苹果炭疽菌孢子萌发的抑制作用

高压灭菌液和过滤液对孢子萌发的抑制率随稀释倍数的增加逐渐降低,且明显低于活菌液,高压灭菌液抑菌作用最小。BS80-6 和 BS-CK 对苹果炭疽菌孢子萌发的抑制率分别为 98.65% 和 89.45% (表 1),说明活细胞与抗菌物质共同作用对孢子萌发的抑制效果最好,离子注入诱变的菌株对病菌孢子萌

发的抑制率明显提高。

2.3 BS80-6 活菌液对苹果炭疽菌菌丝形态的影响

BS80-6 和苹果炭疽菌共同液体培养下,菌丝多处断裂、菌丝体顶端膨大、细胞内含物溢出、原生质开始凝集(图 1)。说明 BS80-6 菌株在培养过程中可向培养基中分泌抑制苹果炭疽病菌的抗生物质,造成菌丝形态的变化。

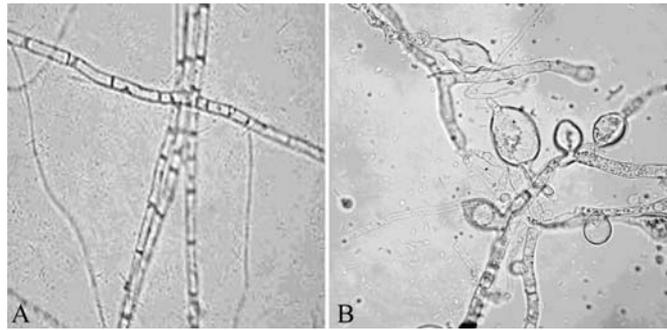


图 1 拮抗菌对苹果炭疽病菌菌丝形态的影响

Fig. 1 Effect of antagonistic bacterium on hyphae

Note: A. CK (normal hyphae); B. BS80-6 treated hyphae (in NB).

2.4 BS80-6 对苹果主要防御酶活性的影响

接种拮抗菌 + 病原菌的苹果果实,POD 活性从第 2 天开始上升,第 5 天达到最高峰,其峰值约为对照的 2.5 倍。只接种病原菌的苹果果实,POD 活性先降后升,第 5 天达最高峰时酶活约为对照的 2 倍,低于接种拮抗菌 + 病原菌和只接种 BS80-6 的苹果果实(图 2)。说明接种病原菌和接种拮抗菌均能诱

导寄主 POD 的活性提高,但接种拮抗菌诱导水平高于接种病原菌。

只接种病原菌、只接种 BS80-6 和接种拮抗菌 + 病原菌的苹果果实 PPO 变化趋势基本一致,均先升后降,接种拮抗菌的果实酶活显著高于只接种病原菌的果实。对照苹果果实 PPO 活性无明显变化,一直处在较低的水平(图 2)。

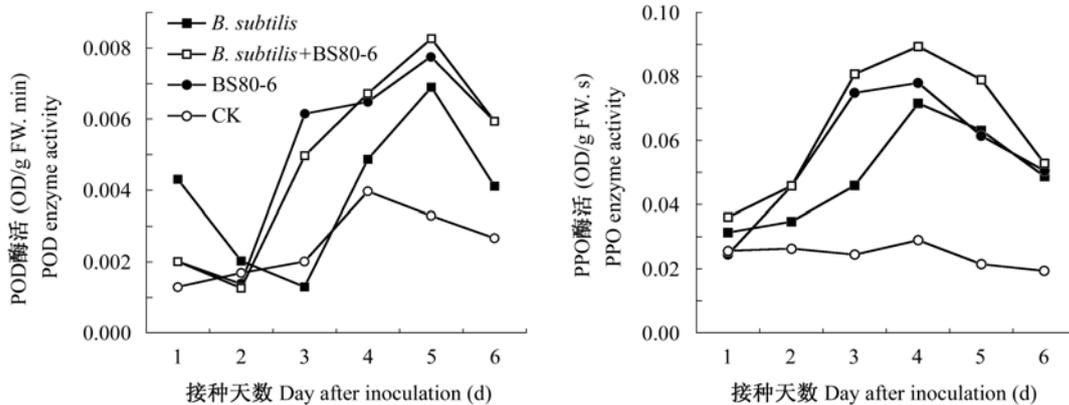


图 2 枯草芽孢杆菌处理后苹果果实中 POD 和 PPO 活性的变化

Fig. 2 Changes of POD and PPO activities in apple fruits with the treatment of *Bacillus subtilis*

2.5 BS80-6 对苹果炭疽病菌分生孢子盘形成的影响

BS80-6 和 BS-CK 对分生孢子盘形成、发育、扩展均有一定的抑制作用,但 BS80-6 对分生孢子盘的

影响明显高于 BS-CK。在 3 种温度的处理中,方式二对分生孢子盘的影响大于方式一。同时,低温对分生孢子盘形成、发育也有抑制作用(表 2)。

表 2 枯草芽孢杆菌 BS80-6 在不同温度下对苹果炭疽菌分生孢子盘发育指数的影响

Table 2 Effect of BS80-6 on acervulus index of apple anthracnose

处理 Treatment	室温 Room temperature		变温 Changed temperature		低温 Low temperature	
	方式一 Type I	方式二 Type II	方式一 Type I	方式二 Type II	方式一 Type I	方式二 Type II
	BS80-6	0.39 c	0.22 c	0.56 b	0.26 b	0.28 a
BS-CK	0.56 b	0.39 b	0.50 b	0.28 b	0.33 a	0.11 b
CK	0.83 a	0.83 a	0.61 a	0.61 a	0.33 a	0.33 a

注: 方式一: 先接病菌再接拮抗菌; 方式二: 先接拮抗菌再接病菌。Note: Type I: Inoculating antagonistic bacteria after inoculating pathogen; Type II: inoculating antagonistic bacteria before inoculating pathogen.

2.6 BS80-6 处理液对苹果炭疽病的控病效果

两种接种方式均表明 BS80-6 与 BS-CK 的防效差异显著, 且离子注入诱变筛选的菌株防效明显提

高, BS80-6 活菌液的防效分别为 55.53% 和 60.34%, BS-CK 活菌液的防效分别为 39.90% 和 48.08%。其防效均高于高压灭菌液和过滤液(表 3)。

表 3 拮抗菌处理液对苹果炭疽病的防治效果

Table 3 Control effect of antagonist treated liquids on apple anthracnose

处理 Treatment	先接病菌再接拮抗菌 Inoculating antagonistic bacteria after inoculating pathogen		先接拮抗菌再接病菌 Inoculating antagonistic bacteria before inoculating pathogen	
	病斑直径(cm) Lesion diameter	防效(%) Control effect	病斑直径(cm) Lesion diameter	防效(%) Control effect
	病原菌 Pathogen	4.16		4.16
灭菌液 Autoclaved cells BS-CK	2.98	28.36 d	2.93	29.57 d
灭菌液 Autoclaved cells BS80-6	2.60	37.50 bc	2.57	38.22 c
活菌液 Living cell culture BS-CK	2.50	39.90 bc	2.16	48.08 b
过滤液 Culture filtrate BS80-6	2.40	42.31 b	2.13	48.80 b
过滤液 Culture filtrate BS-CK	2.23	46.39 b	2.27	45.43 b
活菌液 Living cell culture BS80-6	1.85	55.53 a	1.65	60.34 a

2.7 BS80-6 在不同条件下对苹果炭疽病的控病效果

两种接种方式和不同贮藏温度下, BS80-6 的防效均显著高于对照($P < 0.05$)。先接种拮抗菌再接

种病菌的防效好于先接种病菌再接拮抗菌; 低温下 BS80-6 的防效达 69.66%, 高于室温和变温条件下的防效(表 4)。

表 4 不同温度下 BS80-6 对苹果炭疽病防治效果的影响

Table 4 Control effect of BS80-6 to apple anthracnose at different temperatures

处理 Treatment	先接病菌再接拮抗菌 Inoculating antagonistic bacteria after inoculating pathogen			先接拮抗菌再接病菌 Inoculating antagonistic bacteria before inoculating pathogen		
	室温下防效(%) Control effect at room temperature	变温下防效(%) Control effect at changed temperature	低温下防效(%) Control effect at low temperature	室温下防效(%) Control effect at room temperature	变温下防效(%) Control effect at changed temperature	低温下防效(%) Control effect at low temperature
	BS80-6	45.81 a	54.42 a	49.21 a	60.34 a	62.52 a
BS-CK	28.41 b	34.22 b	29.97 b	20.73 b	43.29 b	41.89 b

3 讨论

通过离子注入选育的枯草芽孢杆菌 BS80-6 与对照菌株 BS-CK 相比,能显著提高对苹果炭疽菌的抑制作用。离子注入生物体具有质量沉积和能量双重效应^[11],其机制尚需进一步阐明。

孔建等^[12]认为枯草芽孢杆菌主要是通过产生抗菌素抑制病菌生长。本研究结果表明,灭菌液和过滤液对苹果炭疽菌在 PDA 和苹果果实上的侵染也有一定的抑制效果,进一步证明了枯草芽孢杆菌通过产生抗菌素抑制病菌^[3-4]。枯草芽孢杆菌 BS80-6 对苹果果实炭疽病的防治效果以活菌液最好,这可能与活菌在伤口处不断繁殖产生抗菌素或争夺营养,从而更好地抵御真菌的入侵有关。

贮藏温度显著影响 BS80-6 对苹果炭疽病的防治效果。因此,针对水果采后低温贮藏环境,选择对低温适应性强的拮抗菌是增强生物防治效果的一种有效途径^[2]。

接种方式对控病效果影响显著,先接拮抗菌再接病菌的防效好于先接病菌再接拮抗菌,其原因可能是接拮抗菌后在苹果伤口处形成繁殖群体、产生抑菌物质,使病菌孢子萌发受到抑制。

参考文献(References)

[1] Spotts R A, Cervantes L A. Populations, pathogen city and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp. and *Mucor piriformis* in packinghouses. *Plant Disease*, 1986, 70: 106 -

108

- [2] Wilson C L, Pusey P L. Potential for biological control of post-harvest. *Plant Disease*, 1985, 69: 375 - 378
- [3] Wilson C L, Chalutz E. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonist yeasts and bacteria. *Science Horticulture*, 1989, 40: 105 - 112
- [4] Gutter Y, Littauer F. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* against citrus fruit pathogens. *Bulletin of Research Council Israel*, 1953, 33(1): 192 - 197
- [5] 赵白鸽,孔建,王文夕. 枯草芽孢杆菌 B-903 对苹果轮纹病的抑菌作用及其对病害的控制效果. *植物病理学报*, 1997, 27(3): 213 - 214
- [6] 范青,田世平,李永兴,等. 枯草芽孢杆菌 B-912 对采后柑桔果实青、绿霉病的抑制效果. *植物病理学报*, 2000, 31(4): 333 - 336
- [7] 何红,蔡学清,关雄,等. 辣椒内生枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) BS-2 和 BS-1 防治辣椒炭疽病研究. *植物病理学报*, 2003, 33(2): 170 - 173
- [8] 刘淑芳,檀根甲,李娜,等. 苹果采后炭疽病高效拮抗菌的筛选与应用. *安徽农业大学学报*, 2007, 34(1): 111 - 116
- [9] 李靖,利容千,袁文静. 黄瓜感染霜霉病菌叶片中一些酶活性的变化. *植物病理学报*, 1991, 21(4): 277 - 283
- [10] Biggs A R. Effects of calcium salts on apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp. *Plant Disease*, 1999, 83(11): 1001 - 1005
- [11] 叶枝青,姚建铭. 离子注入选育高效植物病原真菌拮抗菌 JA. *激光生物学报*, 2001, 10(4): 293 - 297
- [12] 孔建,王同贵. 枯草芽孢杆菌 B-903 菌株抗菌物质对植物病原真菌的抑制作用. *植物病理学报*, 1995, 25(1): 69 - 72