

苹果树腐烂病拮抗细菌菌株 BJ1 的鉴定及其抑菌作用

王彩霞¹ 张清明² 李桂舫¹ 董向丽¹ 李保华^{1*}

(1. 青岛农业大学农学与植物保护学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 青岛 266109; 2. 青岛农业大学化学与药学院, 青岛 266109)

摘要: 为开发对苹果树腐烂病有效的生防措施,对从山东栖霞苹果果园根际土壤中分离的63株细菌进行了筛选,获得有显著拮抗作用的菌株 BJ1。采用玻片法和对峙培养法测定 BJ1 对苹果树腐烂病菌孢子萌发和菌丝生长的抑制作用及其抑菌谱,根据菌株 BJ1 的形态特征、生理生化特性及 16S rDNA 序列对其进行鉴定,并用离体枝条烫伤接种法对腐烂病的防效进行测定。菌株 BJ1 对腐烂病菌的抑制率为 78.38%,其发酵滤液的抑菌率达到 70.54%;BJ1 可显著降低腐烂病菌分生孢子的萌发率,致使菌丝畸形、分支增多及细胞质外渗;该菌株对常见的 8 株果树病原真菌具有显著的拮抗作用。经鉴定,菌株 BJ1 属于微嗜酸寡氧单胞菌 *Stenotrophomonas acidaminiphila*。BJ1 不同稀释倍数的发酵滤液均对苹果树腐烂病有明显的抑制作用,其稀释 50 倍发酵滤液的防效仍可达 81.06%,表明该菌株具有良好的生防潜力。

关键词: 苹果树腐烂病菌;拮抗细菌;抑菌机制;16S rDNA 鉴定

Identification of the antagonistic bacteria BJ1 and its antifungal activity against *Valsa ceratosperma*

Wang Caixia¹ Zhang Qingming² Li Guifang¹ Dong Xiangli¹ Li Baohua^{1*}

(1. Key Lab of Integrated Crop Pest Management of Shandong Province, College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong Province, China; 2. College of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong Province, China)

Abstract: In order to develop an effective biocontrol measure against apple tree canker caused by *Valsa ceratosperma*, 63 bacterium strains were isolated and screened from the soil around the cultured apple root in Qixia, Shandong Province. The strain BJ1 which had significantly antagonistic effect on *V. ceratosperma*, was obtained using flat confrontation culture method. The inhibition rates of BJ1 and its fermentation supernatant were 78.38% and 70.54%, respectively. The antagonistic spectrum and the inhibitory efficiency of BJ1 on the conidial germination and hyphal growth of *V. ceratosperma* were investigated. The results showed that BJ1 could significantly reduce the conidial germination rate and induce alterations on mycelia morphology, such as deformity, branch increasing and cytoplasm exosmosis. In addition, BJ1 showed obvious antifungal activities on several fruit tree pathogenic fungi, such as *Sclerotinia laxa*, *Phomopsis perniciosa* and *V. leucostoma*. Based on the morphologic, physiological, biochemical characteristics

基金项目: 现代农业产业技术体系(CARS-28),山东省科技攻关计划(2010GNC10918),国家自然科学基金(31000891,31272001),山东省“泰山学者”建设工程

作者简介: 王彩霞,女,1977年生,副教授,研究方向为果树病理学, E-mail: wangcx0806@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: baohuali@qau.edu.cn, Tel: 0532-88030480

收稿日期: 2012-05-06

and 16S rDNA sequence analysis, the strain BJ1 was defined as *Stenotrophomonas acidaminiphila*. The strain BJ1 fermentation supernatants with different dilution time exerted obvious inhibitory efficiency on *V. ceratosperma* growth in detached apple twigs. The control efficiency could reach 81.06% when the supernatant was diluted by fifty times. These results indicated that the strain BJ1 promised to provide a new biological control method in containing apple canker.

Key words: *Valsa ceratosperma*; antagonistic bacteria; inhibition mechanism; 16S rDNA identification

黑腐皮壳菌 *Valsa ceratosperma* 引起的苹果树腐烂病是一种毁灭性病害,该病在我国苹果产区发生普遍,可造成果树主干及整树死亡,甚至毁园^[1-2]。自1916年苹果树腐烂病在辽宁省南部地区发现以来,已有过几次大流行,造成了严重的经济损失^[3-4]。随着我国苹果种植结构和栽培制度的调整,腐烂病已成为限制我国苹果产业发展的主要原因。2008年,国家苹果产业技术体系调查显示,全国范围内苹果树腐烂病的总体发生率为52.7%,部分地区发病率高达85%以上^[4]。2011年,山东烟台苹果产区腐烂病再次严重发生,本课题组调查发现,旺盛结果期的苹果树具有新病疤的病株率为68.20%,死株率为2.76%^[5]。

苹果是多年生木本植物,迄今为止尚未发现有效的抗腐烂病品种^[6-7]。生产上对于苹果树腐烂病的防控主要依靠化学防治,长期大量使用化学杀菌剂不仅使果园生态环境恶化和给食品安全带来极大隐患,而且容易导致病原菌抗药性菌株的出现,因此,寻求对环境友好且高效的防治方法已成为亟待解决的问题。自20世纪80年代以来,生物防治作为一种安全、有效的防治措施越来越受到人们的关注。高克祥等^[8]、Xin & Shang^[9]、邓振山等^[10]先后报道哈茨木霉 *Trichoderma harzianum*、深绿木霉 *Trichoderma atroviride* 和螺旋毛壳 *Chaetomium spirale* 对苹果树腐烂病菌具有重寄生或拮抗作用;郜佐鹏等^[11]研究发现,多种植物内生放线菌对苹果树腐烂病有一定的防治效果。此外,展丽然等^[12]在土壤样品中筛选到1株对腐烂病菌具有拮抗作用的放线菌 Z-6,初步鉴定为链霉菌属 *Streptomyces* 的金色类群 *Aureus*。但利用拮抗细菌防治该病的研究尚未见报道,为此,作者开展了苹果树腐烂病拮抗细菌的筛选、鉴定及抑菌机制研究,以期对苹果树腐烂病生防制剂的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:苹果树腐烂病菌 *Valsa ceratosperma*、

梨树腐烂病菌 *V. ambiens*、桃树腐烂病菌 *V. leucostoma*、苹果炭疽病菌 *Glomerella cingulata*、苹果轮纹病菌 *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*、苹果霉心病菌 *Trichothecium roseum*、梨褐腐病菌 *Monilinia fructigena*、桃褐腐病菌 *Sclerotinia laxa*、樱桃干腐病菌 *Phomopsis perniciososa*,均采集自山东省胶东半岛商品果园,经单菌丝或单孢分离后保存。

培养基:拮抗细菌的分离和培养采用营养琼脂(NA)培养基,液体培养采用营养肉汤(NB)培养基,病原菌培养及拮抗试验采用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,以上培养基均按常规方法进行配置。

供试药剂:10%苯醚甲环唑(difenoconazole)可湿性粉剂,先正达(苏州)作物保护有限公司生产。

1.2 细菌菌株的分离与拮抗菌株的筛选

1.2.1 细菌菌株的分离与纯化

土样采自山东省苹果主产区栖霞苹果园的根际,经风干后过筛。称取样品10g放入装有玻璃珠和90mL无菌水的三角瓶中,充分振荡30min,使样品与无菌水混合均匀制得样品悬液。然后在无菌条件下吸取1mL样品悬液注入盛有9mL无菌水的试管中,制成 10^{-1} 稀释液,以此类推制成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 样品稀释液。分别吸取0.1mL各稀释液,在NA培养基平板上采用稀释涂布法分离细菌菌株,30℃培养24h。根据形态、颜色、透明度、边缘等,挑取形状差异明显的菌落。平板划线挑取单菌落进行纯化并编号,4℃保存备用^[13]。

1.2.2 苹果树腐烂病菌拮抗菌株的筛选

采用传统的对峙培养法进行初筛^[14],将活化好的腐烂病菌菌落用打孔器制成直径约6mm的菌饼,接种在PDA平板(直径90mm)中央,同时将待筛选的细菌菌株,点接于距平板中心25mm处的4个角点上,以不接种细菌菌株的平皿作为对照,置于25℃培养箱培养,待对照组菌落长满平板,观察并记录有无抑菌带产生并测量处理病原菌菌落直径,计算抑菌率。重复上述步骤3次,筛选出对腐烂病菌有明显拮抗作用的细菌菌株进行复筛。

抑菌率(%) = [(对照病原菌直径 - 处理病原菌直径) / (对照病原菌直径 - 6)] × 100

初筛得到的菌株接种于 80 mL NB 培养基中, 180 r/min, 26 °C 恒温振荡培养 48 h。取发酵液在 4 °C 条件下, 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后 4 °C 保存备用。在 PDA 平板中央接种直径为 6 mm 的苹果树腐烂病菌菌饼, 在距培养皿边缘 15 mm 处对称放置灭菌的牛津杯, 每杯内滴加 200 μL 初筛菌株的发酵滤液, 以加入等体积无菌 NB 培养液的处理作为对照, 每重复 3 皿, 25 °C 暗培养 3 天后测量处理菌落直径并计算其抑菌率。

选取对苹果树腐烂病菌具有较高活性的拮抗细菌菌株 BJ1 进行广谱性测定, 采用上述对峙培养法, 对 8 种供试果树病原真菌进行抑菌率测定, 每个处理 3 次重复, 25 °C 恒温培养, 定期测量抑菌圈直径, 计算抑菌率。

1.3 拮抗菌株 BJ1 对腐烂病菌的抑制作用

采用玻片法观察菌株 BJ1 对分生孢子萌发的影响, 切取带有成熟腐烂病菌分生孢子器的苹果树皮组织保湿, 待分生孢子角溢出后, 用 5% 富士苹果汁制备成浓度为 10⁶ 个/mL 的孢子悬浮液备用。将 BJ1 发酵滤液按 5、10、20 和 40 倍的稀释比例分别与孢子悬浮液混匀, 各取 25 μL 滴在载玻片中央, 并置于装有 1% 水琼脂的培养皿中密封, 25 °C 恒温保湿 36 h 后显微镜下观察孢子萌发情况, 每处理重复 5 个玻片。

菌株 BJ1 对菌丝形态的影响采用对峙培养法, 将活化的腐烂病菌菌饼接种于 PDA 平板中央, 拮抗菌株 BJ1 点接于四周后 25 °C 恒温对峙暗培养, 观察在 JB1 菌落和腐烂病菌菌落之间产生的抑菌带, 5 天后挑取受抑制的腐烂病菌菌丝, 在光学显微镜下观察拮抗菌株对腐烂病菌菌丝形态的影响, 以未接种拮抗菌的腐烂病菌菌丝作为对照。

1.4 菌株 BJ1 的鉴定

形态及生理生化特征鉴定: 测定方法参阅东秀珠和蔡妙英^[13]的《常见细菌系统鉴定手册》进行。

16S rDNA 序列测定及系统发育分析: 采用 CTAB 法提取细菌基因组 DNA^[15], 以细菌 16S rDNA 通用引物^[16] 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 对 DNA 模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系 (50 μL) 为: PCR Master Mix 25 μL、引物各 2 μL、模板 DNA 1 μL、ddH₂O 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C

预变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 纯化后的 PCR 产物送交上海生工生物工程技术有限公司测序。将测序得到的序列采用 NCBI 数据库中的 BLAST 软件与 GenBank 中的核酸序列进行比对分析, 检索同源性高的菌株用于系统发育分析。采用 Clustal X 进行多重比对后, 利用 MAGE 5.0 软件的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树, 1 000 次随机抽样, 计算自引导值 (Bootstrap), 以评估系统发育树的置信度。

1.5 菌株 BJ1 对离体苹果腐烂病的抑制作用

采集青岛农业大学试验田 1~2 年生富士苹果枝条, 剪取 30 cm 长、粗细一致的枝段, 75% 乙醇溶液消毒后用无菌水反复冲洗。先用电烙铁烫伤离体枝条, 分别接种 50 μL 拮抗细菌 BJ1 的细胞培养液 (约 10⁷ CFU/mL) 和不同稀释倍数的发酵滤液, 室温晾干后再接种 100 μL 腐烂病菌的孢子悬浮液 (10⁶ 个/mL), 用保鲜膜密封保湿 48 h。每个枝条接种 3 个点, 每处理重复 5 个枝条, 以接种无菌水和苯醚甲环唑药剂的枝条作为对照, 试验重复 3 次。于 25 °C 恒温 100% 相对湿度下暗培养, 14 天后测量病斑大小, 按照椭圆面积公式计算病斑面积和防治效果^[11]。

防治效果(%) = [(对照病斑面积 - 处理病斑面积) / 对照病斑面积] × 100

1.6 数据分析

采用 SAS 8.0 进行数据统计, 用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性分析 ($P < 0.05$), 用 Sigma Plot 软件作图并进行分析。

2 结果与分析

2.1 苹果树腐烂病菌拮抗细菌菌株的筛选

从供试土壤样品中共得到 63 株细菌菌株, 经平板对峙培养初筛和液体发酵复筛获得 5 株对苹果树腐烂病菌有较强拮抗活性且稳定性好的菌株。在 PDA 平板对峙试验中, 这 5 株细菌均对腐烂病菌菌丝产生明显的抑菌作用, 靠近拮抗菌一侧的菌丝生长速度减缓或停止, 其中菌株 BJ1 的拮抗作用最好, 抑菌率可达 78.38%。复筛试验显示, 菌株 BJ1 发酵滤液对腐烂病菌的抑制作用最佳, 抑菌率为 70.54%, 显著高于其它 4 个菌株, 且与其菌体的抑菌率没有显著差异 (图 1)。因此, 选取拮抗细菌 BJ1 作进一步研究。

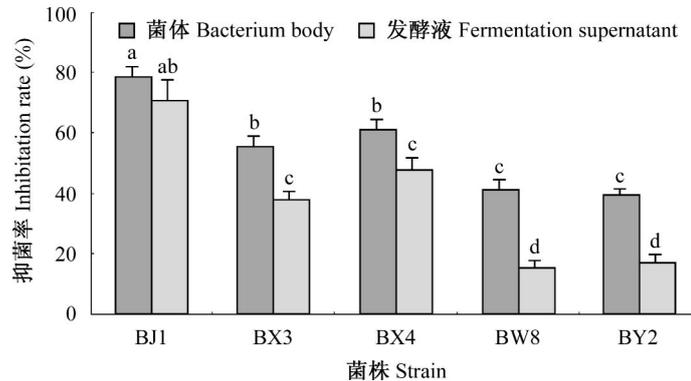


图1 拮抗细菌对苹果树腐烂病菌的抑制作用

Fig. 1 The inhibitory efficiency of antagonistic bacteria on *Valsa ceratosperma*

注:图中数据为平均值±标准差,不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著(Duncan氏新复极差法)。Note: The data are mean ± SD. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.2 菌株 BJ1 对 8 种果树病原真菌的抑制作用

菌株 BJ1 对供试病原菌均有不同程度的抑制作用,抑菌率在 33.97% ~ 63.73% 之间,表现出良好

的广谱性。其中,对桃褐腐病菌、樱桃干腐病菌和桃树腐烂病菌的抑菌率均在 60% 以上,显著高于其它供试病原菌(表 1)。

表 1 拮抗细菌菌株 BJ1 对 8 种病原真菌的抑制作用

Table 1 The inhibitory efficiency of antagonistic bacteria BJ1 on eight fungal pathogens

| 病原菌 Pathogen | 抑菌率(%) Inhibition rate | 病原菌 Pathogen | 抑菌率(%) Inhibition rate |
|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 桃褐腐病菌 <i>S. laxa</i> | 63.73 ± 5.45 a | 苹果轮纹病菌 <i>B. berengeriana</i> | 49.86 ± 2.35 bc |
| 樱桃干腐病菌 <i>P. perniciosus</i> | 62.42 ± 4.32 a | 苹果炭疽病菌 <i>G. cingulata</i> | 45.92 ± 1.02 c |
| 桃树腐烂病菌 <i>V. leucostoma</i> | 61.78 ± 2.73 a | 苹果霉心病菌 <i>T. roseum</i> | 45.67 ± 4.57 c |
| 梨树腐烂病菌 <i>V. ambiens</i> | 52.09 ± 4.63 b | 梨褐腐病菌 <i>M. fructigena</i> | 33.97 ± 1.39 d |

注:表中数据为平均数±标准差,同列数据后不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著(Duncan氏新复极差法)。Note: Data in the table are mean ± SD. Data followed by different letters in the same column indicate significant differences at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.3 菌株 BJ1 对苹果树腐烂病菌生长发育的影响

2.3.1 对腐烂病菌分生孢子萌发的影响

菌株 BJ1 发酵滤液对腐烂病菌分生孢子的萌发有明显的抑制作用,可显著降低腐烂病菌分生孢子的萌发率。此外,显微观察发现,未经处理的腐烂病菌分生孢子萌发后芽管粗壮,粗细均匀且生长迅速(图 2-a);而经 BJ1 菌株发酵滤液处理后,腐烂病菌分生孢子及芽管明显畸形,分生孢子萌发 36 h 后芽管很短(图 2-b、c)或分生孢子显著膨大,芽管不能继续伸长(图 2-d),有些芽管伸长后顶端膨大(图 2-e),抑菌物质浓度越高,其分生孢子和芽管的畸形越严重。

2.3.2 对腐烂病菌菌丝形态的影响

显微观察受抑制的腐烂病菌顶端菌丝和对照顶端菌丝,发现病原菌菌丝受菌株 BJ1 抑制后表现出

异常形态。对照腐烂病菌菌丝粗细均匀、分枝较少,顶端菌丝生长笔直且略细(图 3-a);而与拮抗菌株 BJ1 对峙培养 3 ~ 5 天后,病原菌菌丝颜色明显加深,菌丝顶端显著膨大,有的菌丝分支增多,甚至多条菌丝聚集融合在一起,部分菌丝细胞质外渗(图 3-b、c)。表明菌株 BJ1 代谢所产生的拮抗物质对苹果树腐烂病菌菌丝生长具有显著的抑制作用。

2.4 拮抗菌株 BJ1 的鉴定

2.4.1 形态特征及生理生化特性

在 NA 培养基上 BJ1 菌落呈淡黄色,中央突起,边缘光滑,菌落圆形且紧贴培养基,湿润、不透明,菌体呈杆状、不产芽胞。BJ1 的适宜生长温度为 26 ~ 32 °C,好氧,耐盐性差(不能耐受质量分数为 5% 的氯化钠),接触酶反应呈阳性,能还原硝酸盐、液化明胶,可利用葡萄糖、蔗糖及甘露醇等碳源。革兰氏

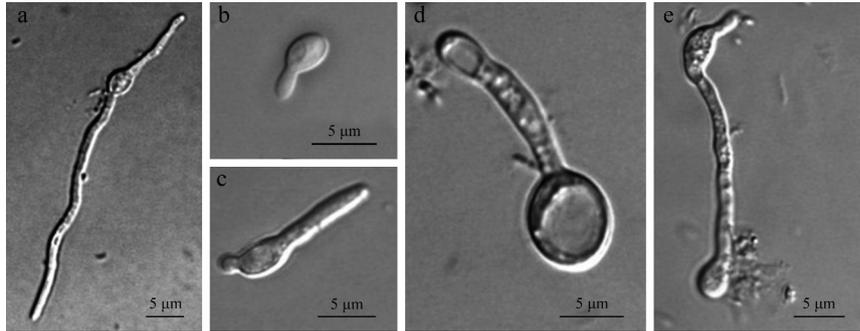


图2 菌株 BJ1 发酵滤液对苹果树腐烂病菌分生孢子萌发的影响

Fig. 2 Inhibition of BJ1 fermentation supernatant on conidia germination of *Valsa ceratosperma*

注: a: 25℃下保湿培养 36 h 后正常萌发的分生孢子; b~e: 25℃下在不同浓度 BJ1 的发酵滤液中培养 36 h 后的分生孢子, 孢子芽管短, 末端膨大。Note: a: The natural germinated conidia of *V. ceratosperma* after 36 h incubation at 25℃; b~e: the germinated conidia after 36 h incubation in BJ1 fermentation supernatant of 4 concentrations, show the inhibited tubs and the enlarged end.

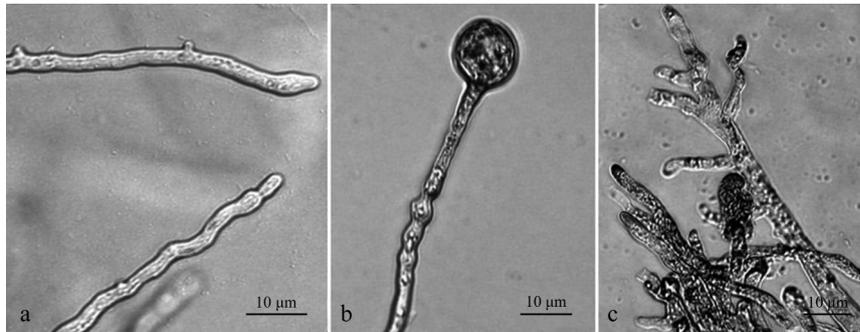


图3 拮抗菌株 BJ1 对苹果树腐烂病菌菌丝形态的影响

Fig. 3 Inhibition of antagonistic bacteria BJ1 on mycelial morphology of *Valsa ceratosperma*

注: a: 正常菌丝; b~c: 对峙培养 5 天后的畸形菌丝。Note: a: Normal mycelia of *V. ceratosperma*; b~c: deformed mycelia of *V. ceratosperma* inhibited by BJ1.

染色、乙酰甲基甲醇(V-P)、水解淀粉试验均为阴性。

2.4.2 16S rDNA 序列分析

序列分析表明, BJ1 的 16S rDNA 长度为 1 464 bp, 登录号 JQ247581。与 GenBank 中的序列比对显示, BJ1 与微嗜酸寡氧单胞菌 *Stenotrophomonas acidaminiphila* 的同源性最高, 相似值均在 99% 以上。用软件 MEGA version 5.0 将菌株 BJ1 与来自 GenBank 的 10 株细菌一起构建基于 16S rDNA 序列的系统发育树(图 4), BJ1 与 *S. acidaminiphila* 聚在一个分支。结合形态特征和生理生化特性分析结果, 将 BJ1 鉴定为微嗜酸寡氧单胞菌 *S. acidaminiphila*。

2.5 菌株 BJ1 对离体枝条腐烂病的防治效果

菌株 BJ1 细胞培养液和不同稀释倍数的发酵滤液均对腐烂病有显著的抑制作用, 病斑长度和病斑面积显著低于无菌水对照。细胞培养液和发酵滤液对腐烂病的防治效果相当, 且与稀释 10 倍的发酵滤液

和农药对照在防效上没有显著差异, 随着发酵滤液稀释倍数的进一步增大, 其对腐烂病的抑制作用逐渐降低, 当发酵滤液稀释 100 倍时防治效果不足 60%。各处理组接种 14 天后的病斑长度和病斑面积较接种 7 天时均略有增加, 但其防治效果没有降低, 稀释 50 倍发酵滤液的防治效果仍可达 81.06% (表 2)。

3 讨论

本研究从苹果果园根际土壤中筛选到 1 株对苹果树腐烂病菌具有显著拮抗作用的细菌 BJ1, 经菌落形态观察、生理生化鉴定以及 16S rDNA 序列分析, 最终确定菌株 BJ1 为微嗜酸寡氧单胞菌 *S. acidaminiphila*。

植物根际生存大量的微生物, 并且在长期的进化过程中, 它们与植物之间建立了密切的关系, 其中一些微生物能对病原菌产生抑制作用^[17]。目前, 从根际土壤中筛选到的生防细菌应用较多的有

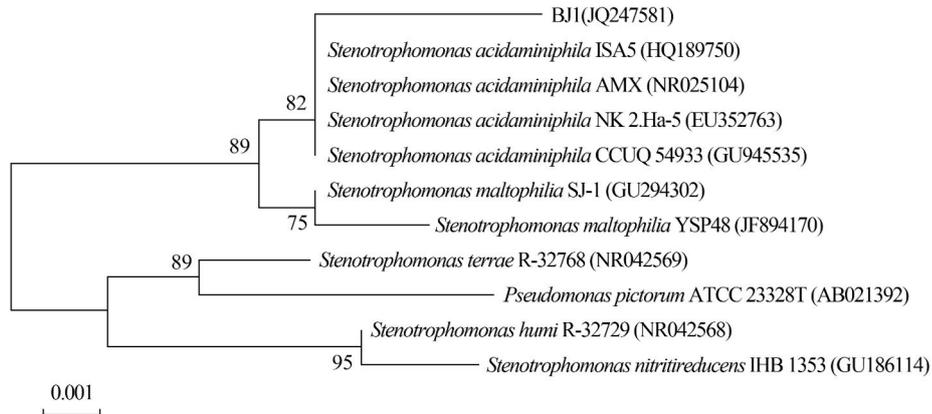


图4 依据 16S rDNA 序列构建的菌株 BJ1 与相关菌株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of stain BJ1 and related strains based on 16S rDNA

表 2 拮抗细菌 BJ1 对离体苹果枝条腐烂病的防治效果

Table 2 Control efficiency of antagonistic bacteria BJ1 on detached twigs inoculated with *Valsa ceratosperma*

| 处理 Treatment | 病斑长度 (cm) Lesion length | | 病斑面积 (cm ²) Lesion area | | 防治效果 (%) Control efficiency | |
|--|-------------------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| | 接种后 7 天 7 d after inoculation | 接种后 14 天 14 d after inoculation | 接种后 7 天 7 d after inoculation | 接种后 14 天 14 d after inoculation | 接种后 7 天 7 d after inoculation | 接种后 14 天 14 d after inoculation |
| 细胞培养液 Cell culture | 0.36 ± 0.04 c | 0.67 ± 0.07 d | 0.10 ± 0.01 d | 0.24 ± 0.02 e | 91.65 ± 2.08 a | 94.70 ± 1.97 a |
| 发酵滤液原液 Fermentation supernatant | 0.41 ± 0.08 c | 0.65 ± 0.03 d | 0.11 ± 0.02 d | 0.23 ± 0.03 e | 90.49 ± 3.16 a | 94.97 ± 2.15 a |
| 发酵滤液稀释 10 × Supernatant dilution 10 × | 0.39 ± 0.06 c | 0.88 ± 0.11 d | 0.10 ± 0.03 d | 0.46 ± 0.04 d | 91.47 ± 3.52 a | 92.36 ± 1.87 a |
| 发酵滤液稀释 50 × Supernatant dilution 50 × | 0.96 ± 0.18 b | 1.28 ± 0.29 c | 0.37 ± 0.06 c | 0.86 ± 0.04 c | 68.51 ± 3.85 b | 81.06 ± 4.34 b |
| 发酵滤液稀释 100 × Supernatant dilution 100 × | 1.18 ± 0.13 b | 1.97 ± 0.23 b | 0.52 ± 0.05 b | 1.84 ± 0.14 b | 56.22 ± 2.61 c | 59.66 ± 2.78 c |
| 苯醚甲环唑 Difenoconazole | 0.42 ± 0.12 c | 0.54 ± 0.09 d | 0.13 ± 0.04 d | 0.19 ± 0.06 e | 89.42 ± 3.91 a | 96.32 ± 3.64 a |
| 无菌水 CK | 1.54 ± 0.19 a | 3.98 ± 0.34 a | 1.18 ± 0.15 a | 4.56 ± 0.34 a | — | — |

注:表中数据为平均数 ± 标准差。同列数据后不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著 (Duncan 氏新复极差法)。Note: Data in the table are mean ± SD. Data followed by different letters in the same column indicate significant differences at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

芽胞杆菌 *Bacillus* sp.、假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 等^[13, 18-19], 微嗜酸寡氧单胞菌在自然界广泛分布, 有关该菌在农药、毒素等污染物降解利用方面的研究较多^[20-21]。本研究结果表明, 微嗜酸寡氧单胞菌 BJ1 对多种果树病原真菌具有显著的抑制作用。

拮抗细菌对病原菌的作用方式主要是抑制真菌分生孢子的萌发和菌丝生长, 以及导致病原菌菌丝畸形, 如顶端膨大、分支增多、细胞质外渗等^[22-23], 这在本研究中也得到证实。菌株 BJ1 的无菌发酵滤液可有效防治腐烂病, 显著抑制腐烂病菌分生孢子

萌发和菌丝生长, 表明该菌株在发酵过程中产生了抑菌活性物质, 由此可见该菌株具有潜在的生防应用价值。本研究利用有拮抗活性的细菌代谢产物有效防治苹果树腐烂病, 为该类病害的防治提供了新的思路, 但有关菌株 BJ1 抗菌活性物质的提取鉴定、抑菌机制及其田间防治效果等还有待深入研究。

参考文献 (References)

- [1] 陈策. 苹果树腐烂病发生规律和防治研究. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009: 9-17

- [2] 陈策,李美娜,史秀琴,等. 苹果树腐烂病(*Valsa mali* Miyabe et Yamada) 侵染时期研究. 植物病理学报,1987,17(2): 65-68
- [3] 樊民周,张王斌,安德荣. 陕西苹果树腐烂病病原菌的鉴定. 西北农业学报,2004,13(3):60-61
- [4] 曹克强,国立耘,李保华,等. 中国苹果树腐烂病发生和防治情况调查. 植物保护,2009,35(2):114-117
- [5] 王彩霞,董向丽,张振芳,等. 2011年烟台苹果产区腐烂病发病情况调查与原因分析. 植物保护,2012,38(3): 136-138
- [6] Abe K, Kotoda N, Kato H, et al. Resistance sources to *Valsa* canker (*Valsa ceratosperma*) in a germplasm collection of diverse *Malus* species. Plant Breeding, 2007, 126(4): 449-453
- [7] Abe K, Kotoda N, Kato H, et al. Genetic studies on resistance to *Valsa* canker in apple: genetic variance and breeding values estimated from intra- and inter-specific hybrid progeny populations. Tree Genetics and Genomes, 2011, 7(2): 363-372
- [8] 高克祥,刘晓光,郭润芳,等. 木霉菌对五种植物病原真菌的重寄生作用. 山东农业大学学报,2002,33(1):37-42
- [9] Xin Y F, Shang J J. Bio-control trials of *Chaetomium spirale* ND35 against apple canker. Journal of forestry research, 2005, 16(2): 121-124
- [10] 邓振山,赵龙飞,张薇薇,等. 银杏内生真菌的分离及其对苹果腐烂病病原菌的拮抗作用. 西北植物学报,2009,29(3):608-613
- [11] 郜佐鹏,柯希望,韦洁玲,等. 七株植物内生放线菌对苹果树腐烂病的防治作用. 植物保护学报,2009,36(5): 410-416
- [12] 展丽然,张克诚,冉隆贤,等. 苹果腐烂病菌拮抗放线菌的分离与鉴定. 河北林果研究,2008,23(2):182-186
- [13] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社,2001
- [14] 贾凤安,陈亮,陈立,等. 大棚甜瓜三种主要真菌病害拮抗细菌的筛选与鉴定. 植物保护学报,2010,37(6): 505-510
- [15] 柳凤,欧雄常,何红,等. 红树内生细菌AmS2菌株对芒果炭疽病菌的抑制作用. 植物保护学报,2010,37(5): 453-458
- [16] Chen L, Chen W L. Genome shuffling enhanced antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and tolerance to chemical fungicides in *Bacillus subtilis* BS14. Journal of Food, Agriculture & Environment, 2009, 7(2): 856-860
- [17] Kilian M, Steiner U, Krebs B, et al. FZB24 *Bacillus subtilis* - mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 2000, 53(1): 72-93
- [18] Watanabe T, Tsukamoto T, Shirata A. Potential of an antagonistic bacterium isolate obtained from *Lentinus lepideus* basidiospores as a biocontrol agent. Mycoscience, 2000, 41: 79-82
- [19] 汪雪静,卜春亚,靳永胜,等. 草莓根腐病菌拮抗细菌的分离与鉴定. 园艺学报,2011,38(9):1657-1666
- [20] Dwivedi S, Singh B R, Al-Khedhairi A A, et al. Isolation and characterization of butachlor-catabolizing bacterial strain *Stenotrophomonas acidaminiphila* JS-1 from soil and assessment of its biodegradation potential. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(1): 54-60
- [21] 李现尧,刘晓文,史全良. 一株微囊藻毒素降解辅助菌的分离和鉴定. 微生物通报,2010,37(3):473-478
- [22] 林福呈,李德葆. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S9对植物病原真菌的溶菌作用. 植物病理学报,2003,33(2): 174-177
- [23] 刘任,韩静君,游春平,等. 稻瘟病菌拮抗细菌 bio-2 的抑菌作用及其鉴定. 植物保护学报,2011,38(1):91-92