

## 生防菌株 1404 的鉴定及其对采后柑橘炭疽病的防治效果

汪茜<sup>1</sup>, 胡春锦<sup>2,3</sup>, 柯仿钢<sup>1</sup>, 黄思良<sup>4\*</sup>, 黎起秦<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 广西大学农学院, 南宁 530005)

(<sup>2</sup> 广西农业科学院微生物研究所, 南宁 530007)

(<sup>3</sup> 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007)

(<sup>4</sup> 南阳师范学院生命科学与技术学院, 南阳 473061)

**摘要:**【目的】柑橘是世界上重要的果树。由胶孢炭疽菌[*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.]引起的柑橘炭疽病是柑橘生产的主要病害。为开发对采后柑橘炭疽病有效的生防措施, 对从辣椒根际土壤中分离的一株生防细菌 1404 进行了鉴定, 并对其特性及生防效果进行了研究。【方法】根据菌株 1404 的形态特征、生理生化特性以及 16S rDNA 序列对其进行鉴定; 通过连续在人工培养基上转代培养, 测定该菌株拮抗活性的稳定性; 用果实刺伤接种法对采后柑橘炭疽病的防效进行测定。【结果】菌株 1404 与来自 GenBank 的短短芽孢杆菌[*Brevibacillus brevis* (Migula) Shida et al.]以 100% bootstrap 水平类聚一群。该菌株的形态特征及生理生化特性与 *Brevibacillus brevis* 相符。连续 4 次在人工培养基上转代培养, 菌株 1404 对柑橘炭疽病菌生长的抑制力没有发生明显改变。该生防菌对柑橘炭疽病的防治效果明显, 处理后第 20 天防效达到 64.9%。【结论】根据 16S rDNA 序列、形态特征、生理生化特性, 将菌株 1404 鉴定为短短芽孢杆菌。本文首次报道对柑橘采后炭疽病具有较好防效的生防菌 *Brevibacillus brevis*。

**关键词:** 柑橘炭疽病; 生防细菌; 16S rDNA; 短短芽孢杆菌

**中图分类号:** X172      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1208-10

我国是柑橘原产地和主产国之一, 近几十年来, 柑橘产业得到了迅猛发展, 柑橘已成为南方最大宗的果树, 为我国优势农作物之一。由胶孢炭疽菌[*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.]侵染引起的柑橘炭疽病(citrus anthracnose)是柑橘的主要病害之一, 该病害的病原菌寄主范围广, 可为害芸香科柑橘亚科的甜橙、柑、橘、柚、柠檬、佛手、金柑等所有的种和品种<sup>[1]</sup>。柑橘炭疽病菌可为害叶片、幼果、枝梢、果柄和果实, 不仅引起田间的叶斑、落叶、枯梢、落果, 而且可以引起在包括果实在内的植株各器官潜伏侵染, 潜伏于果实中的病原菌在贮藏期可引发炭疽病<sup>[2-3]</sup>。用乙烯催熟柑橘是生产上常用的

农艺措施, 可以改善果色, 提高卖相, 但乙烯催熟的柑橘果实容易诱发炭疽病<sup>[4-5]</sup>。目前柑橘炭疽病的防治以化学药剂为主<sup>[2, 6-9]</sup>, 但农药在果实中的残留对人类健康存在潜在威胁, 已成为全社会关心的问题。此外, 杀菌剂的连续使用, 也会导致病原菌产生抗药性从而降低化学防治效果<sup>[2, 10]</sup>。因此, 迫切需要寻求更安全有效的采后防病新技术, 以无毒高效的生物保鲜剂逐步取代化学杀菌剂在柑桔采后病害防治中的使用。利用环境友好的生防菌进行柑橘病害生物防治是近年国内外比较活跃的研究领域之一。

柑橘病害生物防治研究的重要基础工作之一是

**基金项目:** 广西农科院科技发展基金重点项目[2007007(Z)]; 广西科技基础平台建设基金项目(10-046-11)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-377-63513641; E-mail: silianguang@126.com

**作者简介:** 汪茜(1984-), 女, 湖北武汉人, 硕士研究生, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: wangqian589@126.com

**收稿日期:** 2010-02-01; **修回日期:** 2010-05-04

从不同环境中分离获取生防菌。近年来,国外已有报道对柑橘采后病害有较好防治作用的一些生防菌<sup>[12-15]</sup>。国内对地毯草黄单胞杆菌柑橘致病变种 [*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin] 引起的柑橘溃疡病<sup>[16-19]</sup>、青霉菌 [*Penicillium* spp.] 引起的采后柑橘果实腐烂<sup>[20-21]</sup>、胶孢炭疽菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.] 引起的柑橘炭疽病<sup>[22]</sup>进行了生物防治研究,获得了一些对柑橘病害有生防应用前景的拮抗微生物。作者从南宁市辣椒地根际土壤中分离获得了对包括柑橘炭疽病菌在内的多种植物病原菌表现较好拮抗作用的细菌菌株 1404,并对该菌株的分类鉴定、抑菌活性及其对采后柑橘炭疽病的防效进行了研究,以期为利用该菌株进行柑橘炭疽病生物防治打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** dNTP Mixture、引物 PF1、PR1 (上海生工生物工程技术服务有限公司);立式压力蒸汽灭菌器 LS-B35L 型 (江阴滨江医疗设备厂);TLG-16G 型离心机 (上海医用分析仪器厂);回转式恒温调速摇瓶柜 (上海智城分析仪器制造有限公司);HH·BH·600 电热恒温培养箱 (上海跃进医疗器械一厂)。

**1.1.2 供试菌株:** 生防菌 1404 为从广西南宁市辣椒地根际土壤中分离的柑橘炭疽病菌拮抗菌,经单菌落纯化后于 4℃ 冰箱中保存备用。供试植物病原菌有水稻白叶枯病菌 [*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Uyeda & Ishiyama) Swings]、柑橘溃疡病菌 [*Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye]、番茄青枯病菌 [*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.]、大白菜软腐病菌 (*Pectobacterium carotovora* pv. *carotovora* Dye)、柑橘炭疽病菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.]、水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn)、玉米大斑病菌 [*Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs]、玉米小斑病菌 [*Cochliobolus heterostrophus* (Dreschl.) Dreschl.]、茉莉白绢病菌 (*Sclerotium rolfsii* Sacc.)、辣椒炭疽病菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.] 菌株 A、香蕉炭疽病菌 [*Colletotrichum musae* (Berk. & Curt) Arx]、冬瓜疫霉 (*Phytophthora drechsleri* Tucker)、龙眼链格孢黑斑病菌 [*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler]、香蕉大灰斑病菌

[*Curvularia lunata* (Wakker) Boedijin]、香蕉叶缘枯斑病菌 (*Alternaria musae* Bour. et Bat)、杨桃炭疽病菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.] 菌株 B。以上供试植物病原菌均由广西农业科学院微生物研究所保存、提供。

**1.1.3 培养基:** 供试细菌菌株的活化与保存均使用牛肉膏蛋白胨琼脂 (NA) 培养基<sup>[23]</sup>,需液体培养时使用牛肉膏蛋白胨汁 (NB, 不加琼脂的 NA)。供试真菌的培养与保存均使用马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基。

### 1.2 菌株 1404 的抑菌活性研究

**1.2.1 菌株 1404 对柑橘炭疽菌的拮抗作用及其抑菌谱:** 采用平板对峙法,将菌株 1404 在 PDA 平板 (直径 9 cm) 上划线,距划线 4 cm 处接种培养 7 d 的供试病原真菌菌饼 (直径 5 mm), 25-28℃ 培养,以仅接种供试病原真菌菌饼的 PDA 平板为对照,每处理 3 个重复,待对照菌落刚长满皿时测量柑橘炭疽病菌等供试植物病原真菌的菌落生长直径,按下式计算真菌抑制率。

真菌抑制率 (%) =

$$\frac{\text{对照菌落净生长距离} - \text{处理菌落净生长距离}}{\text{对照菌落净生长距离}} \times 100$$

菌株 1404 对供试植物病原细菌的抑制作用采用抑菌圈法<sup>[18]</sup>进行测定,其对植物病原细菌的抑制率按下式计算。

$$\text{细菌抑制率} (\%) = \frac{\text{抑菌圈直径}}{\text{培养皿直径}} \times 100$$

本实验使用的培养皿直径为 90 mm。

**1.2.2 菌株 1404 发酵液的抑菌活性检测:** 将菌株 1404 移到 NB 液体培养基中,于 30℃ 下 190 r/min 震荡培养 3 d。发酵液分别设 A (发酵原液)、B (发酵原液经 121℃ 高温灭菌处理 20 min)、C (将发酵原液用 2795 × g 离心得到上清液经 0.45 μm 细菌过滤器过滤) 3 种处理<sup>[24]</sup>,每处理各取 15 μL 加至无菌滤纸片 (直径 6 mm) 上,以灭菌水为空白对照,采用对峙法,以柑橘炭疽病菌为指示菌测定不同类型发酵液的抗菌活性。

### 1.3 温度对菌株 1404 生长的影响

将菌株 1404 移到 NB 培养基中,置于 4℃、7℃、10℃、13℃、16℃、19℃、22℃、25℃、28℃、31℃、34℃、37℃、40℃、43℃、46℃、49℃ 恒温箱中培养 3 d,测 OD 值<sup>[26]</sup>,每处理 3 个重复。

### 1.4 pH 值对菌株 1404 生长的影响

NB 培养基灭菌后,将 pH 值调至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0。将拮抗菌株

1404 接入不同 pH 的 NB 培养液中,摇床 (30℃ 170 r/min)培养 3 d,测 *OD* 值<sup>[26]</sup>,每处理 3 个重复。

1.5 菌株 1404 抑菌力的稳定性检测

将菌株 1404 在 NA 斜面培养基上连续转接培养 8 次,每隔 15 d 转接 1 次,30℃ 培养 24 h,用平板对峙法测其对柑橘炭疽病菌抑菌力的稳定性。

1.6 菌株 1404 对采后柑橘炭疽病的防效试验

取新鲜柑橘果实,先用解剖刀在果实腰部刺一伤口 (3 mm × 3 mm),在伤口处用接种 20 μL 的浓度为 10<sup>8</sup>cfu/mL 的菌株 1404 菌体悬浮液,以灭菌水为空白对照,200 mg/L 的咪鲜胺药液作阳性对照,处理的果实放到塑料盒内,于室温贮藏 24 h,再接种 20 μL 的浓度为 10<sup>4</sup>个孢子/mL 的柑橘炭疽病菌分生孢子悬浮液,将塑料盒套上塑料袋保湿,于 28℃ 下贮藏,于接种病原菌后的第 7 天、第 14 天与第 20 天分别调查柑橘果实炭疽病的发生情况。每处理 3 个重复,每重复 15 个果实。

- 柑橘果实发病程度分级标准:
- 0 级 —— 无病;
  - 1 级 —— 病斑占果表面积的 5 % 以下;
  - 3 级 —— 病斑占果表面积的 6 % - 10 % ;
  - 5 级 —— 病斑占果表面积的 11 % - 25 % ;
  - 7 级 —— 病斑占果表面积的 26 % - 50 % ;
  - 9 级 —— 病斑占果表面积的 51 % 以上;

病情指数 =

$$\frac{\sum (\text{各级腐烂果数} \times \text{该级代表值})}{\text{总数} \times \text{最高级代表值}} \times 100$$

防效 (%) =  $\frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100$

1.7 菌株 1404 的鉴定

菌株 1404 的形态特征及生理生化性状分析按照文献[26]进行。

分子鉴定参照谭小艳等人的方法<sup>[17]</sup>,以裂解法提取的菌株 1404 的 DNA 为模板,用 16S rDNA 通用引物 PF1 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 PR1 (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') 对 DNA 模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (75 μL) 为: dNTP Mixture 37.5 μL, PF1、PR1 各 2.5 μL, Template DNA 2.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 30 μL。PCR 反应条件为:94℃ 3 min、30 个扩增循环 (94℃ 55 s、50℃ 50 s、72℃ 1 min10 s),72℃ 10 min。反应结束后,取 5 μL 反应液与 1 μL 6 × Loading buffer 溶液混匀后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。纯化后的 PCR 扩增产物

送上海生工生物工程技术有限公司直接测序,用 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 网页上的 BLAST 程序进行同源性比较,并用软件 *MEGA* version 4.0<sup>[27]</sup> 将菌株 1404 与来自 GenBank 的相关细菌一起构建基于 16S rDNA 序列的系统发育树。

2 结果和分析

2.1 菌株 1404 的抑菌活性

2.1.1 菌株 1404 对柑橘炭疽菌的拮抗作用及其抑菌谱:菌株 1404 对柑橘炭疽病菌生长的抑制率达到 100 %。在测定的 10 种植物病原真菌中,该菌株对 8 种病真菌原菌的生长抑制率为 38. 1% - 79. 6%,对 2 种植物病原真菌 (水稻纹枯病菌,茉莉白绢病菌) 的生长无抑制作用 (表 1)。在供试几种植物病原细菌中,大白菜软腐病菌 (*Pectobacterium carotovora* pv. *carotovora*) 对该拮抗菌最敏感,抑制率 (26. 1%) 在 5 % 水平上显著高于其它 3 种细菌 (*Ralstonia solanacearum*、*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*、*Xanthomonas campestris* pv. *citri*);番茄青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 对该接抗菌的敏感性最低,抑制率 (19. 2%) 在 5% 水平上显著低于所有供试细菌;同属于黄单胞杆菌属的水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 和柑橘溃疡病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) 对拮抗菌 1404 的敏感性居中,它们的抑制率处于同等水平。

表 1 生防菌株 1404 对供试植物病原真菌的抑制作用

Table 1 Inhibition of strain 1404 against the fungal phytopathogens

Fungal phytopathogen	Inhibition rate / % <sup>a</sup>
<i>Rhizoctonia solani</i>	0 hH
<i>Exserohilum turcicum</i>	75. 3 bB
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	61. 3 eDE
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> strain A <sup>†</sup>	46. 7 fF
<i>Sclerotium rolfsii</i>	0 hH
<i>Colletotrichum musae</i>	78. 6 aA
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> strain B <sup>†</sup>	63. 8 dD
<i>Curvularia lunata</i>	38. 1 gG
<i>Phytophthora drechsleri</i>	72. 1 cC
<i>Alternaria musae</i>	60. 5 eE
<i>Alternari alternata</i>	79. 6 aA

<sup>a</sup>The lowercases and capital letters represent the significance levels of difference at 5 % and 1 % , respectively. <sup>†</sup>the strain causing chili anthracnose. <sup>\*</sup>the strain causing star fruit tree anthracnose.

表 2 生防菌株 1404 对供试植物病原细菌的抑制效果

Table 2 Inhibitory effect of strain 1404 against the bacterial phytopathogens

Bacterial phytopathogen	Inhibition rate / % <sup>a</sup>
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	21.7 bB
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	22.2 bB
<i>Ralstonia solanacearum</i>	19.2 cC
<i>Pectobacterium carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	26.1 aA

<sup>a</sup> The lowercases and capital letters represent the significance levels of difference at 5% and 1% , respectively.

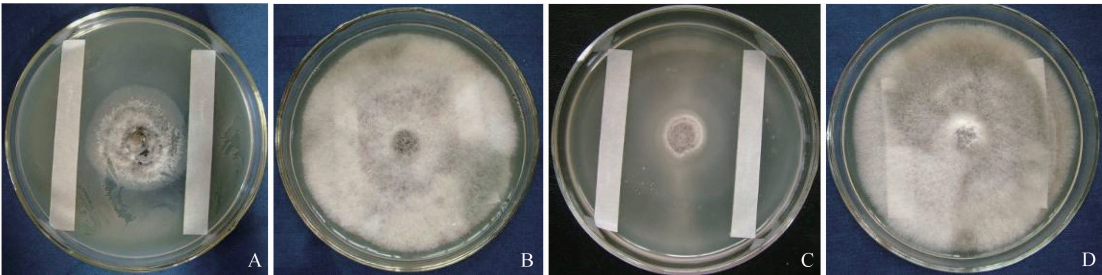


图 1 不同处理对菌株 1404 发酵滤液抑制柑橘炭疽病菌活性的影响

Fig.1 Effect of different treatments on suppressive activity of the strain 1404 fermentation fluid against citrus anthracnose pathogen. A: original fermentation fluid; B: high-temperature-sterilized treatment; C: bacterium-free treatment; D: sterilized water ( control ).

2.2 温度对菌株生长的影响

温度对 1404 菌株生长影响较大,该菌在 16 – 46℃ 范围内都能生长,在 49℃ 下不生长,适宜生长温度为 25 – 43℃ ,最适生长温度为 34℃ (表 3),说明该菌为相对高温菌。

表 3 温度对菌株 1404 生长的影响

Table 3 Effect of temperature on growth of strain 1404				
Temperature /℃	OD <sub>625</sub>			
	1	2	3	Average <sup>a</sup>
4	-0.0020	-0.0018	-0.0019	-0.0019hG
7	-0.0038	-0.0015	-0.0027	-0.0027 hG
10	-0.0018	-0.0007	-0.0015	-0.0013 hG
13	-0.1471	-0.1587	-0.1521	-0.1526iH
16	0.1526	0.1829	0.1729	0.1695gF
19	0.2918	0.2945	0.2896	0.2920fE
22	0.5681	0.5191	0.5532	0.5468eD
25	0.6621	0.6969	0.6732	0.6744dC
28	0.4641	0.5229	0.5127	0.4999eD
31	0.7358	0.8120	0.7943	0.7807bcBC
34	0.9869	0.9732	0.9937	0.9846aA
37	0.8571	0.8297	0.8635	0.8501bB
40	0.7654	0.7346	0.6998	0.7333cdC
43	0.7322	0.6987	0.7125	0.7145cdC
46	0.8302	0.6449	0.6734	0.7162cdC
49	-0.0856	-0.0676	-0.0591	-0.0708hiGH

<sup>a</sup> The lowercases and capital letters represent the significance levels of difference at 5% and 1% , respectively.

2.3 pH 值对菌株 1404 生长的影响

pH 值对 1404 菌株生长有明显影响,该菌在 pH 4.0 – 12.0 范围内都能生长,当 pH 为 4.0 和 12.0

2.1.2 菌株 1404 发酵液的抑菌活性:以柑橘炭疽菌为指示菌,测定 3 种不同处理的发酵液(发酵原液,发酵液经高温灭菌处理,发酵液离心经细菌过滤器得到的上清液)的生物活性。从图 1 可以看出:菌株 1404 发酵原液经 121℃ 高温处理 20 min 后不表现拮抗活性(图 1-B);无菌上清液的拮抗活性(图 1-C)比发酵原液强(图 1-A)。试验结果表明,高温可以使菌株 1404 发酵液中的抑菌活性物质失活。

时基本不生长,其中 pH 5.0 – 7.0 较适宜,最适 pH 6.0 (表 4),可见该菌适宜在中性条件下生长。

表 4 pH 值对菌株 1404 生长的影响

Table 4 Effect of pH value on growth of strain 1404				
pH value	OD <sub>625</sub>			
	1	2	3	Average <sup>a</sup>
3.0	0	0	0	0gG
4.0	0.0309	0.0298	0.0356	0.0321fgFG
5.0	0.6557	0.6922	0.6698	0.6726bB
6.0	0.9170	0.9076	0.9274	0.9173aA
7.0	0.6533	0.6651	0.6599	0.6954bB
8.0	0.3102	0.3577	0.3426	0.3368cC
9.0	0.2775	0.2798	0.3154	0.2909dCD
10.0	0.2446	0.2532	0.2701	0.2560deDE
11.0	0.2375	0.2398	0.2278	0.2350eE
12.0	0.0487	0.0521	0.0457	0.0488fF

<sup>a</sup> The lowercases and capital letters represent the significance levels of difference at 5 % and 1 % , respectively.

2.4 菌株 1404 抑菌力的稳定性

菌株 1404 在 NA 上连续移植培养对柑橘炭疽病菌的抑菌作用检测结果表明,移植 4 次后下降不明显,7 次后明显下降,但对柑橘炭疽病菌的抑制率仍不低于 78 % (表 5)。

2.5 菌株 1404 对采后柑橘炭疽病的防效

接种后的柑橘果实在常温下存放 20 d,对照果实的病情指数达到 44.1,拮抗菌 1404 悬浮液处理的柑橘果实炭疽病病情指数为 15.6,两者在 5 % 水平上差异极显著(表 6)。从防效来看,接种后的柑

橘果实在常温下存放 7 d,菌株 1404 处理与咪鲜胺处理对采后柑橘炭疽病的防效无显著差异,随着存放时间的延长至 20 d,两者防效在 5% 水平上出现显著差异,说明菌株 1404 对柑橘炭疽病抑制的持效期不及咪鲜胺,但柑橘果实贮藏 20 d 后菌株 1404 处理区的防效仍达到了 64.9%,咪鲜胺处理区的防效为 85.7%(表 7,图 2)。

表 5 生防菌株 1404 抑菌活性的稳定性

Table 4 Stability of the antagonistic activity of strain 1404	
Transfer time	Inhibition rate/%
1	90.12aA
2	87.31abABC
3	84.34abABC
4	89.45aA
5	86.12bC
6	88.68aAB
7	84.79bBC
8	78.97cD

The lowercases and capital letters represent the significance levels of difference at 5 % and 1 % , respectively.

表 6 菌株 1404 处理后柑橘采后炭疽病的病情指数

Table 6 Disease index of citrus postharvest anthracnose after strain 1404 application			
Treatment	Disease index <sup>a</sup>		
	7 d	14 d	20 d
Strain 1404	3.5 bB	8.5 bB	15.6 bB
Prochloraz	3.3 bB	4.2 bB	6.3 cB
CK	14.8 aA	27.8 aA	44.1 aA

<sup>a</sup>The lowercases and capital letters represent the significance levels of difference at 5 % and 1 % , respectively.

表 7 菌株 1404 对柑橘采后炭疽病的防治效果

Table 7 Efficacy of strain 1404 in controlling citrus postharvest anthracnose			
Treatment	Control efficacy <sup>a</sup>		
	7 d	14 d	20 d
Strain 1404	74.0 aA	69.5 bB	64.9 bB
Prochloraz	77.6 aA	84.7 aA	85.7 aA

<sup>a</sup>The lowercases and capital letters represent the significance levels of difference at 5 % and 1 % , respectively.



图 2 菌株 1404 对柑橘采后炭疽病的抑制效果

Fig. 2 Inhibitory effects of citrus postharvest anthracnose by strain 1404 (A, control; B, strain 1404; C, prochloraz).

2.6 菌株 1404 的鉴定

菌株 1404 的菌体杆状,长 2.9 μm – 3.6 μm,宽 0.7 μm – 0.9 μm;产芽孢,有荚膜,周生鞭毛,革兰氏染色阳性;在 NA 平板上 28℃ 培养 2 d,菌落乳白色(图 3),圆形,光滑,扁平,边缘整齐,不透明,无粘性,不产生可溶性色素,无臭味;可利用碳源为葡萄糖、甘露糖、L-阿拉伯糖、木糖醇;不可利用的碳源为麦芽糖、可溶性淀粉、D-半乳糖、菊糖、海藻糖、乳糖;可利用的氮源为 L-赖氨酸、L-胱氨酸、L-组氨酸、L-

半胱氨酸、硝酸铵、尿素,不可利用 DL-天冬氨酸(表 8);硫化氢试验、吡啶产物、明胶液化、接触酶和好氧性等反应阳性;淀粉水解、甲基红(M. R.)、吐温 80、D-葡萄糖、氧化酶等反应阴性(表 9);该生防细菌可在 2 % ,但不可在高于 3 % 的氯化钠溶液中生长(表 9)。

对菌株 1404 的 16S rDNA 序列进行 PCR 扩增,产物经纯化后测序,得到的片段长度为 1446 个碱基序列(GenBank 接受号为 GU361113)。对该菌株的



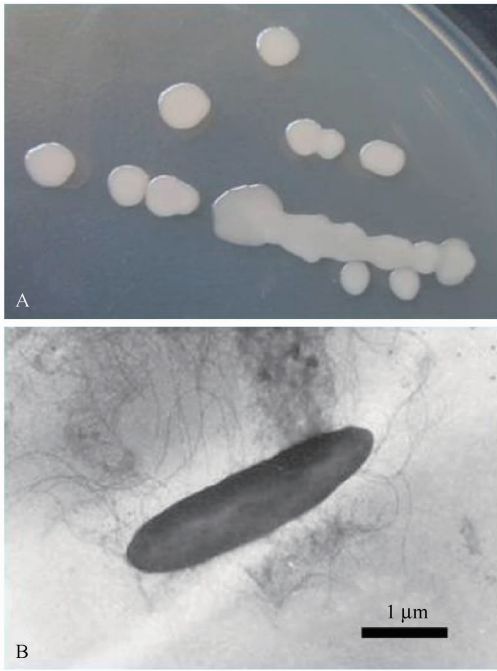


图 3 菌株 1404 的形态特征  
Fig.3 Morphological characteristics of strain 1404.  
A:colonies;B;bacterial body (10000 × ).

表 8 生防菌株 1404 对碳、氮源的利用

Table 8 Utilization of different compounds by strain 1404			
Carbon source	Utilization <sup>a</sup>	Nitrogen source	Utilization <sup>a</sup>
Glucose	+	L-lysine	+
Maltose	-	L-cystine	+
Soluble amylum	-	DL-aspartic acid	-
D-galactose	-	L-histidine	+
Inulin	-	L-cysteine	+
Mannose	+	Ammonium nitrate	+
L-arabinose	+	Urea	+
Xylitol	+	Ammonium sulphate	+
Trehalose	-	Ammonium chloride	+
Lactose	-		

<sup>a</sup> “+” and “-” represent positive and negative reactions, respectively.

表 9 生防菌株 1404 的生理生化反应

Table 9 Physiological and biochemical reactions of strain 1404			
Item tested	Reaction <sup>a</sup>	Item tested	Reaction <sup>a</sup>
Starch hydrolysis	-	Oxidase	-
M. R.	-	Contact enzyme	+
H <sub>2</sub> S test	+	Aerobic	+
Indole product	+	Growth in 2% NaCl	+
Tween 80	-	Growth in 3.5% NaCl	-
Sodium hydrolysis	-	Growth in 5% NaCl	-
D-glucose	-	Growth in 7% NaCl	-
Gelatin liquefaction	+	Growth in 10% NaCl	-

<sup>a</sup> “+” and “-” represent positive and negative reactions, respectively.

16S rDNA 序列用 Blast 软件与 GenBank 中已有序列进行同源性比较,结果发现其与短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*) 有 99 % 的最大同源性。用软件

MEGA version 4.0 将菌株 1404 与来自 GenBank 的 44 株细菌一起构建基于 16S rDNA 序列的系统发育树(图 4)结果显示三大群:菌株 1404 与 7 株随机选自 GenBank 的 *Brevibacillus brevis* 在 100% bootstrap 水平上相聚一群;20 株产生芽孢的 *Bacillus* spp. 在 99% bootstrap 水平上独聚一群;不产生芽孢的 19 株细菌在 100% bootstrap 水平上另聚一群。该系统树支持菌株 1404 与 *Brevibacillus brevis* 为同一分类单元的成员。菌株 1404 的形态学及生理生化反应特征与短短芽孢杆菌 *Brevibacillus brevis* 相符<sup>[26]</sup>,结合基于 16S rDNA 序列的系统发育树分析结果,将菌株 1404 鉴定为短短芽孢杆菌 *Brevibacillus brevis*。

3 结论和讨论

通过对菌株 1404 的 16S rDNA 序列对比结果表明,该菌株与短短芽孢杆菌有 99 % 的最大同源性,且在建立的系统发育树中,菌株 1404 与 7 株随机选自 GenBank 数据库的短短芽孢杆菌 *Brevibacillus brevis* 在 100 % bootstrap 水平上独聚一群(图 4),表明菌株 1404 与 *Brevibacillus brevis* 在分子水平上为同一分类单元的成员。此外,菌株 1404 的形态学特征和生理生化反应与 *Brevibacillus brevis* 相符<sup>[26]</sup>。本研究中对菌株 1404 的鉴定在菌体形态特征、生理生化反应及 16S rDNA 序列对比上得到了统一,支持将该拮抗菌鉴定为 *Brevibacillus brevis* 的结论是可靠的。

自然界中存在丰富的微生物资源,开展柑橘病害生物防治研究的最重要基础工作之一就是获取具有各种不同生物学特性的生防微生物。国内外研究人员已经分离获得了一些重要生防微生物,如抑制青霉菌(*Penicillium* spp.)及其所致的柑橘腐烂的德巴利汉氏酵母菌(*Debaryomyces hansenii*)<sup>[12]</sup>、出芽短梗霉(*Aureobasidium pulluans*)<sup>[12]</sup>、柠檬形克勒克酵母(*Kloeckera apiculata*)<sup>[28-29]</sup>、罗伦隐球酵母(*Cryptococcus laurentii*)<sup>[30]</sup>、绿粘帚霉(*Gliocladium virens*)<sup>[21]</sup>、木霉(*Trichoderma* spp.)<sup>[21]</sup>、洋葱伯克霍尔德氏菌 [*Burkholderia cepacia* (=*Pseudomonas cepacia*)]<sup>[12]</sup>、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)<sup>[12, 31]</sup>、梭子蟹酵母菌(*Candida oleophila*)<sup>[32]</sup>、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)<sup>[14]</sup>、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)<sup>[11, 15, 25]</sup>;抑制细交链孢菌(*Alternaria alternata* = *Alternaria citri*)、白地

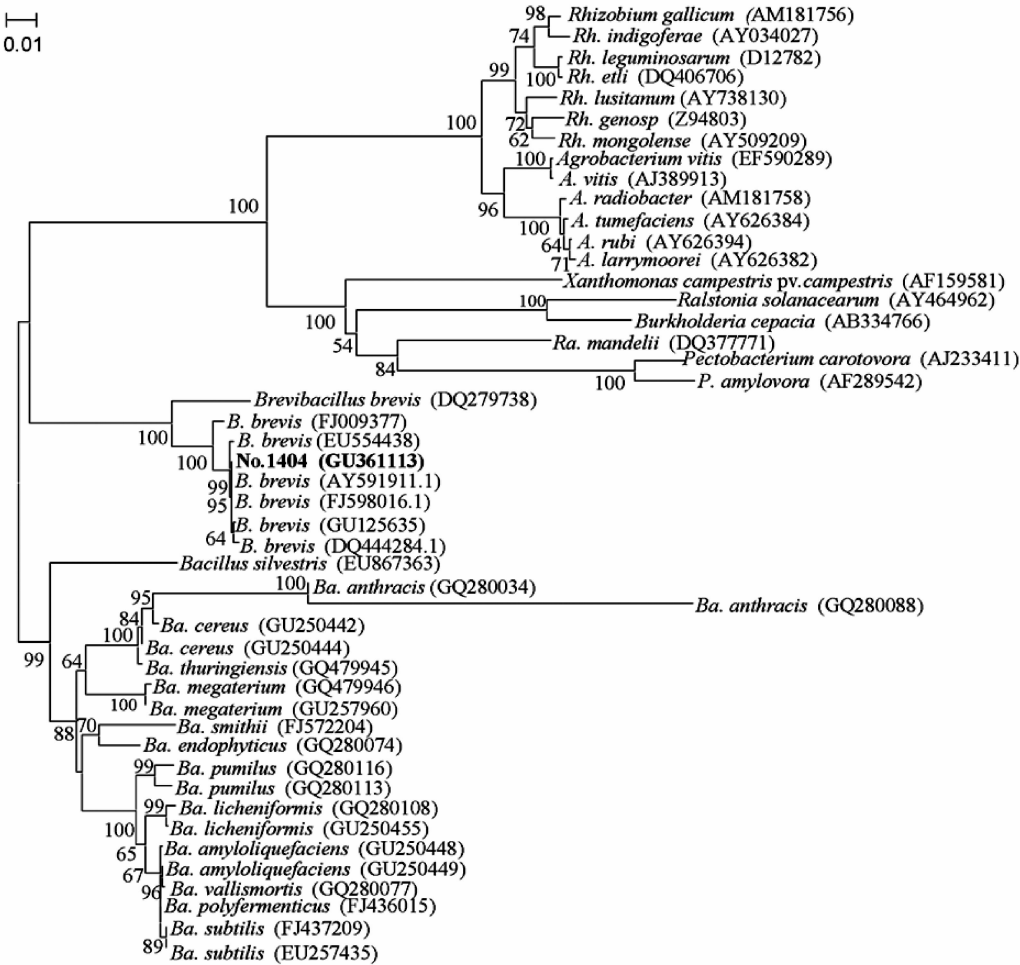


图 4 基于 16S rDNA 序列同源性的菌株 1404 的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence homology of strain 1404 with the related bacteria derived from GenBank database. The numbers in parentheses represent the sequence accession numbers in GenBank. The numbers in each branch points denote the percentages supported by bootstrap. The scale bar represents 0.01 substitutions per nucleotide position.

霉 (*Geotrichum candidum*) 及指状青霉 (*Penicillium digitatum*) 引起的柑橘采后病害的 *Bacillus subtilis*<sup>[13]</sup>; 抑制 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin 引起的柑橘溃疡病的 *Burkholderia cepacia*<sup>[19]</sup>、鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)<sup>[17]</sup>、*Bacillus subtilis*<sup>[18]</sup> 和类短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus parabrevis*)<sup>[16]</sup>。袁红旭等人从柑橘果实内分离获得了对柑橘炭疽病有抑制作用的两株短短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*) 细菌 (G1, G16) 和两株乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 细菌 (G10, G13), 但均未对其种作出鉴定<sup>[22]</sup>。前人分离获得的对柑橘病原真菌与病原细菌有抑制作用的生防菌中, 以枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 居多<sup>[11, 13, 16, 18, 25]</sup>, 作者也获得了对柑橘炭疽病有防治效果的 *Bacillus subtilis* (未发表), 表明枯草芽孢杆菌为最常见的柑橘病害的生防菌。短短芽孢杆菌 *Brevibacillus brevis*

在其它作物病害的生物防治中已有报道<sup>[34-40]</sup>, 本研究发现该菌对柑橘采后炭疽病有生防效果为首次报道。

拮抗菌 1404 去除菌体的发酵液对柑橘炭疽病菌有较强的抑菌活性 (图 1-C), 而高温处理后的发酵液没有抗菌活性。该结果表明该拮抗菌的代谢产物中有抗菌物质存在, 且该抗菌物质在高温下容易失活或分解。抗菌谱测定结果表明, 拮抗菌 1404 对柑橘炭疽病菌有拮抗作用, 但对 *Rhizoctonia solani* 与 *Sclerotium rolfsii* 无抑制作用 (表 1), 这与袁红旭等人报道的一株分离自柑橘果皮组织的 *Brevibacillus* 属细菌 G1 对柑橘炭疽病菌有拮抗作用, 而对 *Rhizoctonia solani* 与 *Sclerotium rolfsii* 无抑制作用的结果<sup>[22]</sup> 相似。由于用于测定抗菌谱的植物病原菌种类不完全相同, 因此无法判断 1404 与 G1<sup>[22]</sup> 所产生的抗菌物质在抗菌谱上是否完全一致。

陈莉等报道从棉花根际土壤分离的一株 *Brevibacillus brevis* (A57) 对 *Rhizoctonia solani* 有拮抗活性<sup>[36]</sup>; 易有金等从烟草茎内分离的两株 *Brevibacillus brevis* 对植物病原细菌 *Ralstonia solanacearum* 有拮抗活性<sup>[40]</sup>。前人报道的生防菌 *Brevibacillus brevis* 菌株<sup>[36, 40]</sup>, 在抗菌谱上均不同于本研究分离获得的菌株 1404。由此得知, 自然界 *Brevibacillus brevis* 种群在抗菌物质的产生上有丰富的遗传多样性, 是重要的生防菌资源物种之一。

柑橘真菌性病害是影响柑橘生产与保鲜的重要因子。目前常见的主要柑橘采后病害有由 *Penicillium digitatum* (Per. :Fr.) Sacc 引起的柑橘青霉病 (green mould)、意大利青霉 (*Penicillium italicum* Wehmer) 引起的柑橘绿霉病 (blue mould)、可可毛色二孢 [*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.] 引起的色二孢蒂腐病 (Diplodia stem-end rot)、柑橘间座壳 (*Diaporthe citri* F. A. Wolf) 引起的拟茎点霉蒂腐病 (Phomopsis stem-end rot)、*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. 引起的炭疽病 (anthracnose)、*Geotrichum citri-aurantii* E. E. Bulter 引起的酸腐病 (sour rot)、棕榈疫霉 [*Phytophthora palmivora* (E. J. Butler)] 或烟草疫霉 (*Phytophthora nicotiana* Breda de Haan) 引起的褐腐病 (brown rot)、*Alternaria alternata* 引起的链格孢蒂腐病 (*Alternaria* stem-end rot)<sup>[2]</sup>。由于各种病原真菌的生物学特性差异甚大, 一项成功的柑橘采后病害的生物防治实践, 要求所用的生防菌具有较宽的抑菌谱。目前国外已商业化生产的生防制剂在防病谱上还存在缺陷, 如: *Aspire* (*Candida oleophila*) 和 *BioSave*<sup>TM</sup> (*Pseudomonas syringae*) 对柑橘青霉效果好, 但对色二孢或拟茎点霉蒂腐病无效<sup>[32]</sup>。本研究从分离自辣椒地根际土壤的拮抗菌 1404 除对供试两种植物病原真菌 (*Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*) 无拮抗作用外, 对其余供试的 9 种植物病原真菌和 4 种植物病原细菌均显示不同程度的抑菌活性 (表 1 与表 2)。*Rhizoctonia solani* 与 *Sclerotium rolfsii* 的寄主范围虽广, 但没有报道表明这两种土传真菌是影响柑橘贮藏保鲜的生物因子。在本研究中, 拮抗菌 1404 处理区对柑橘炭疽病贮藏 20 d 的防效达 64.9 % (表 7), 处理区中其它真菌性病害 (青霉病、绿霉病、蒂腐病等) 也比对照明显减轻 (数据未示), 尽管该拮抗菌与目前在柑橘保鲜上效果最好的化学药剂之一——咪鲜胺相比仍有差距 (表 7), 但作者认为, 菌株 1404 具备较宽的抗菌谱 (表 1

与表 2), 又产生芽孢, 抗逆性强, 在柑橘采后病害防治中不失为一株有较好开发应用前景的生防菌, 今后随着培养与施用条件的进一步优化, 提高该生防菌防效的潜力还是存在的。然而, 生防菌不等于无毒性, 生产上利用活菌体与利用代谢产物的方法和途径等也各不相同, 因此, 菌株 1404 要最终在生产上推广应用, 还面临许多问题需要深入研究, 包括代谢产物的毒性检测, 生防菌培养条件的优化及其制剂化、活性代谢产物的纯化与鉴定等。

## 参考文献

- [1] 赖传雅. 农业植物病理学 (华南本). 北京: 科学出版社, 2003: 266-270.
- [2] Zhang JX, Timmer LW. Preharvest application of fungicides for postharvest disease control on early season tangerine hybrids in Florida. *Crop Protection*, 2007, 26 (7): 886-893.
- [3] Takunaka Y, Ohira I. Latent infection of anthracnose on *Citrus* in Japan. *Reports of the Tottori Mycological Institute*, 1973, 10: 693-702.
- [4] Brown GE. Anthracnose, a serious decay of degreened 'Robison' tangerines. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 1975, 88: 308-311.
- [5] Brown GE. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. *Phytopathology*, 1975, 65: 404-409.
- [6] 赵国富, 王洪祥, 林荷芳. 阿米西达防治柑橘炭疽病的试验. 广西园艺 (*Guangxi Gardening*), 2004, 15 (3): 17-18.
- [7] 许文耀, 林成辉. 溴菌腈·多菌灵混剂对柑橘炭疽病的防治效果. 福建农林大学学报 (自然科学版) [*Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*], 2002, 31 (4): 459-462.
- [8] 李鸿筠, 姚廷山, 刘浩强, 雷慧德, 田文华, 钱克明. 25% 啞菌酯悬浮剂对柑橘病害防治试验. 农药科学与管理 (*Pesticide Science and Administration*), 2006, 25 (8): 27-30.
- [9] 黄钧如, 黄立新. 2002 年南丰蜜橘炭疽病大发生原因及防治措施. 植保技术与推广 (*Plant Protection Technology and Extension*), 2003, 23 (3): 22-23.
- [10] Holmes CJ, Eckert JW. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology*, 1999, 89: 716-721.
- [11] 詹喜. 枯草芽孢杆菌对柑橘采后病害的生物防治及其机理研究. 浙江大学博士论文, 2006.
- [12] Wilson CL, Chalutz E. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeast and bacteria. *Scientia Horticulturae*, 1998, 40: 105-112.



- [13] Singh V, Deverall BJ. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Transactions of the British Mycological Society*, 1984, 83: 487-490.
- [14] Huang Y, Wild BL, Morris SC. Postharvest biological control of *Penicillium digitatum* decay on citrus fruit by *Bacillus pumilus*. *Annals of Applied Biology*, 1992, 120:367-372.
- [15] Obagwu J, Korsten L. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hotwater. *Postharvest Biology and Technology*. 2003, 28: 187-194.
- [16] 谭小艳,黄思良. 柑橘溃疡病生防菌 Bp27 的研究. 中国生物防治 ( *Chinese Journal of Biological Control* ), 2005, 21(增刊): 145-151.
- [17] 谭小艳,黄思良,任建国,晏卫红,岑贞陆. 柑桔溃疡病生防细菌 Bt8 的研究,微生物学报 ( *Acta Microbiologica Sinica* ), 2006, 46(2): 292-296.
- [18] 谭小艳,黄思良,晏卫红,任建国,岑贞陆. 柑橘溃疡病菌的拮抗细菌 Bv10 的研究. 广西农业生物科学 ( *Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science* ), 2006, 25(3): 229-234.
- [19] 谭小艳,黄思良,任建国,晏卫红,岑贞陆. 柑桔溃疡病内生拮抗细菌 Bc51 的研究. 植物病理学报 ( *Acta Phytopathologica Sinica* ), 2007, 37(1): 9-17.
- [20] 秦文,叶华智,叶劲松. 柑橘青霉病的分离、筛选及防病效果的研究. 四川省食品与发酵 ( *Sichuan Food & Fermentation* ), 2001, (2): 14-18.
- [21] 文成敬,陈文瑞. 柑橘青绿霉病生物防治研究. 西南农业学报 ( *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* ), 1995, 8(3): 80-84.
- [22] 袁红旭,陈勇明,何财能. 拮抗炭疽病的柑橘内生细菌的分离与筛选. 果树学报 ( *Journal of Fruit Science* ), 2005, 22(5): 511-513.
- [23] 方中达. 植病研究方法. 北京:高等教育出版社,1998.
- [24] 徐雪莲. 果蔬采后病害拮抗菌的筛选及研究. 华中农业大学博士论文,2004.
- [25] 张静,龚萌,袁宇,杨浩,陆燕蓉,程惊秋. 枯草芽孢杆菌 PY-1 对柑橘采后病害的生物防治. 现代预防医学 ( *Modern Preventive Medicine* ), 2008, 35(5): 858-865.
- [26] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社,2001:58-61.
- [27] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis ( MEGA ) software version 4. 0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [28] 龙超安,邓伯勋,何秀娟. 柑橘青、绿霉病高效拮抗菌 34-9 的筛选及其特性研究. 中国农业科学 ( *Scientia Agricultura Sinica* ), 2005, 38 ( 12 ): 2434-2439.
- [29] Long CA, Deng BX, Deng XX. Commercial testing of *Kloeckera apiculata*, isolate 34-9, for biological control of postharvest diseases of citrus fruit. *Annals of Microbiology*, 2007, 57(2): 203-207.
- [30] Zhang HY, Zheng XD, Xi YF. Biological control of postharvest blue mold of oranges by *Cryptococcus laurentii* ( Kufferath ) Skinner. *Biological Control*, 2005, 50 (2): 331-342.
- [31] Bull CT, Wadsworth ML, Sorensen KN, Takemoto JY, Austin RK, Smilanick JL. Syringomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons. *Biological Control*, 1998, 12 (2): 89-95.
- [32] Brown GE, Chambers M. Evaluation of biological products for the control of postharvest diseases of Florida citrus. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 1996, 109: 278-282.
- [33] Droby S, Chalutz E, Wilson CL, Wisniewski M. Characterization of biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journal of Microbiology*, 1989, 35 (8): 794-800.
- [34] Edwards SG, Seddon B. *Brevibacillus brevis* as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on protected Chinese cabbage. Recent Advances in *Botrytis* Research. Proceedings of the 10<sup>th</sup> International *Botrytis* Symposium. Netherlands: Backhuys Publisher, 1992: 267-271.
- [35] Chandell S, Allan EJ, Woodward S. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on tomato by *Brevibacillus brevis*. *Journal of Phytopathology*, 2009, ( Published online; <http://www3.interscience.wiley.com/journal/123190175/abstract> ).
- [36] 陈莉,缪卫国,刘海洋,努尔孜亚. 短短芽孢杆菌 A57 对棉花主要病原真菌的拮抗机理. 西北农业学报 ( *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* ), 2008, 17(4): 149-155.
- [37] Edwards SG, Seddon B. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 91(4): 652-659.
- [38] Zhang X, Zhang B X, Zhang Z, Shen W F, Yang C H, Yu G Q, Zhao Y H. Survival of the biocontrol agents *Brevibacillus brevis* ZJY-1 and *Bacillus subtilis* ZJY-116 on the spikes of barley in the field. *Journal of Zhejiang University Science*, 2005, 6B(8): 770-777.
- [39] 郝晓娟,刘波,谢关林,葛慈斌,林抗美. 短短芽孢杆菌 JK-2 菌株对番茄枯萎病的抑菌作用及其小区防效. 中国生物防治 ( *Chinese Journal of Biological Control* ), 2007, 23(3): 233-236.
- [40] 易有金,尹华群,罗宽,刘学端,刘二明. 烟草内生短短芽孢杆菌的分离鉴定及对烟草青枯病的防效. 植物病

理学报 (*Acta Phytopathologica Sinica*), 2007, 37 (3): 301-306.

菌 ZJY-1 抑菌作用的初步研究. 浙江林学院学报 (*Journal of Zhejiang Forestry College*), 2007, 24(1): 91-95.

[41] 张昕, 张立钦, 马良进, 林海萍, 毛胜凤, 张炳欣. 生防

# Characterization of a bacterial biocontrol strain 1404 and its efficacy in controlling postharvest citrus anthracnose

Qian Wang<sup>1</sup>, Chunjin Hu<sup>2, 3</sup>, Fanggang Ke<sup>1</sup>, Siliang Huang<sup>4\*</sup>, Qiqin Li<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China)  
(<sup>2</sup> Microbiology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)  
(<sup>3</sup> Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab, Nanning 530007, China)  
(<sup>4</sup> College of Life Sciences and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

**Abstract:**[ **Objective**] Anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. is a main disease in citrus production. To develop an effective biocontrol measure against citrus postharvest anthracnose, we screened antagonistic microbes and obtained a bacterial strain 1404 from the rhizospheric soil of chili plants in Nanning city, Guangxi, China. The objectives of the present study were to: (1) identify and characterize the antagonistic bacterium; and (2) to evaluate the efficacy of the antagonistic strain in controlling citrus postharvest anthracnose disease. [ **Methods**] Strain 1404 was identified by comparing its 16S rDNA sequence with related bacteria from GenBank database, as well as analyzing its morphological, physiological and biochemical characters. The antagonistic stability of the strain 1404 was determined by continuously transferring it on artificial media. The effect of the strain on suppressing citrus anthracnose at postharvest stage was tested by stab inoculation method. [ **Results**] The 16S rDNA of strain 1404 was amplified with primers PF1 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') and PR1 (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') and its sequence submitted to GenBank (accession number: GU361113). Strain 1404 clustered with the GenBank-derived *Brevibacillus brevis* strains in the 16S-rDNA-sequence-based phylogenetic tree at 100 % bootstrap level. The morphological traits, physiological and biochemical characters of strain 1404 agreed with that of *Brevibacillus brevis*. Less change in the suppressive ability of antagonist against growth of *Colletotrichum gloeosporioides* was observed during four continuous transfers on artificial media. The average control efficacy of the strain was 64.9 % against the disease 20 days after the antagonist application. [ **Conclusion**] Strain 1404 was identified as *Brevibacillus brevis* based on its morphological traits, physiological and biochemical characters as well as 16S rDNA sequence analysis. The antagonist was approved to be a promising biocontrol agent. This is the first report of *Brevibacillus brevis* as an effective antagonist against citrus postharvest anthracnose disease.

**Keywords:** citrus anthracnose; antagonistic bacterium; 16S rDNA; *Brevibacillus brevis*

( 本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of Sciences and Technology Development Foundation from Guangxi Academy of Agricultural Sciences [2007007(Z)] and the Foundation for Fundamental Platform Construction of Guangxi Scientific Research (10-046-11)

\* Corresponding author. Tel/Fax: + 86-377-63513641; E-mail: silianghuang@126.com

Received: 1 February 2010/ Revised: 4 May 2010