

路兆军, 于晓丽, 苗杰, 等. 假单胞菌 PL-21 的鉴定及其拮抗 2 种苹果病原菌的作用[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(3): 808-811.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.03.033

假单胞菌 PL-21 的鉴定及其拮抗 2 种苹果病原菌的作用

路兆军¹, 于晓丽², 苗杰¹, 赵莹¹, 王淑惠¹, 陈丽英¹, 李保进¹

(1. 烟台市林业科学研究所, 山东烟台 264013; 2. 山东省烟台市农业科学研究院, 山东烟台 265500)

关键词: 假单胞菌; 生物防治; 苹果病原菌

中图分类号: S432.9⁺

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2021)03-0808-04

Identification of *Pseudomonas* sp. PL-21 and its antagonistic effect on two apple pathogens

LU Zhao-jun¹, YU Xiao-li², MIAO Jie¹, ZHAO Ying¹, WANG Shu-hui¹, CHEN Li-ying¹, LI Bao-jin¹

(1. Yantai Research Institute of Forestry, Yantai 264013, China; 2. Yantai Agricultural Sci & Tech Institute of Shandong Province, Yantai 265500, China)

Key words: *Pseudomonas* sp.; biological control; apple pathogens

无致病假单胞菌是一类分布广泛、资源丰富的革兰氏阴性菌, 目前已发现多种假单胞菌对植物的促生及防病作用明显, 具备开发成为生防制剂的潜力^[1-3]。其生防机制主要包括分泌噬铁素参与植物根际营养竞争、分泌抗生素类物质抑制病原菌生长、诱导植物产生系统抗病性等^[4-6]。苹果斑点落叶病、苹果褐斑病分别是由苹果链格孢强毒菌株(*Alternaria alternaria* f.sp. *mali*)、苹果盘二孢(*Marssonina coronaria* Davis) 侵染引起的病害, 这 2 种病害因显病时间长、扩散速度快、危害严重等特点逐渐成为苹果生产上的主要病害^[7-9], 病害大流行时, 两者与其他苹果早期落叶病极易形成复合侵染, 使果树叶片在 8-9 月即大量脱落, 影响苹果的产量和经济效益^[10-11]。

目前, 苹果斑点落叶病、褐斑病等苹果主要病害的防治主要依赖于化学农药, 其成本低廉且见效快, 但长期重复使用单一化学药剂带来的病原菌耐药性、果品农药残留, 危害人体健康及环境污染等问题日益突出^[12]。因此, 开发应用高效生防菌剂防治此类病害具有重要意义。本研究以从烟台市蓬莱区

苹果根际分离到的 1 株假单胞菌 PL-21 为对象, 明确其分类地位, 分析其对苹果斑点落叶病原菌等的抑菌活性及离体防效, 为今后相关病害生防制剂的开发与应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

假单胞菌 PL-21 分离自烟台市蓬莱区苹果根际, 由烟台市林业科学研究所实验室保存。苹果斑点落叶病原菌(*Alternaria alternaria* f.sp. *mali*)、苹果褐斑病原菌(*Marssonina coronaria* Davis)、苹果圆斑病原菌(*Phyllosticta solitaria*)、苹果轮斑病原菌(*Alternaria mali* Roberts) 由本实验室保存, 苹果轮纹病原菌(*Botryosphaeria dothidea*)、苹果炭疽病原菌(*Colletotrichum gloeosporioides*) 由烟台市农业科学研究院提供。马铃薯胡萝卜培养基(PCDA)^[13]用于病原菌的保存及拮抗菌株抑菌分析; 牛肉膏蛋白胨液体培养基(NB)用于拮抗菌株发酵、培养; 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(NA)用于拮抗菌株培养、保存。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株 PL-21 的鉴定 按照《常见细菌系统鉴定手册》^[14]和《伯杰氏细菌鉴定手册》^[15]的方法对菌株 PL-21 进行形态和生理生化特征鉴定。以 PL-21 总 DNA 为模板, 用细菌 16 S rDNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 进行

收稿日期: 2020-12-01

基金项目: 烟台市科技计划项目(2019MSGY114)

作者简介: 路兆军(1986-), 男, 河南安阳人, 硕士, 中级工程师, 主要从事林业有害生物防治工作。(E-mail) 435980661@qq.com

通讯作者: 李保进, (E-mail) ytlks123@163.com

PCR 扩增并由生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序。测序结果与 NCBI 数据库进行 BLAST 序列比对,下载同源性较高的相关菌株基因碱基序列,利用 MEGA 软件采用邻接法构建系统发育树。

1.2.2 菌株 PL-21 的抗菌活性分析 采用平板对峙法^[16]测定菌株 PL-21 对苹果斑点落叶病原菌等的拮抗活性,以不接种 PL-21 的平板作对照,28 ℃ 恒温培养 5~8 d,3 次重复。采用菌丝生长速率法^[17]测定菌株 PL-21 无菌发酵滤液对苹果斑点落叶病原菌等的抗菌活性:将菌株 PL-21 活化后按 2% 的体积比接入含 100 ml 发酵培养基的 250 ml 三角瓶中,30 ℃、200 r/min 振荡培养 72 h 即得发酵液,发酵液经 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液用 0.22 μm 的微孔滤器过滤除菌后得到发酵滤液。发酵滤液按 1:50 的体积比与 50 ℃ 左右已灭菌的 PCDA 培养基混匀后倒平板,用 6 mm 打孔器打取活化好的指示菌菌饼置于平板中央,以未加发酵滤液的平板为对照,28 ℃ 恒温培养 5~8 d,3 次重复。抑菌率计算公式:抑菌率(%)=(对照病原菌菌落直径-处理病原菌菌落直径)/对照病原菌菌落直径×100%。

1.2.3 菌株 PL-21 发酵滤液对指示菌孢子萌发的抑制作用 苹果斑点落叶病原菌、苹果褐斑病原菌在 PCDA 平板上培养 10 d 后,用无菌水冲洗菌落配制成孢子悬液,按 1:1 (体积比)分别将 100%、60%、20% 的发酵滤液与 1 ml 1×10⁴ 个的 2 种病原菌孢子悬液混合,使发酵液终体积分数为 50%、30%、10%,以 NB 培养液按同样比例与 2 种病原菌孢子悬液混合作对照,28 ℃ 培养,6 h、12 h、24 h 后镜检,芽管长度超过分生孢子小端直径 50% 视为萌发,3 次重复,计算孢子萌发抑制率^[18]。

1.2.4 菌株 PL-21 发酵滤液对指示菌的离体防效 采用平皿叶片法^[19]进行菌株 PL-21 的离体防效试验。清洗干净健康苹果新叶后用 75% 酒精浸泡 10 s,无菌水冲洗并置于超净台晾干,在 PL-21 发酵滤液中浸渍 1 h,超净台内晾干,以在 NB 培养液中浸渍 1 h 为对照。处理结束 24 h 后用手术刀擦伤苹果新叶,配制含量为 1 ml 1×10⁶ 个的苹果斑点落叶病原菌、苹果褐斑病原菌孢子悬液,每个叶片上滴 60 μl 孢子悬液并涂抹均匀后保湿培养,每个处理 20 张叶片,3 次重复。10 d 后按照病情分级标准进行调查和统计防效^[20]。病情指数和防治效果公式如下:病情指数(%)=Σ(本级代表值×本级叶数)/(最高发病级代表值×调查总叶数)×100%;防治效果(%)=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数×100%。

1.2.5 数据处理 利用 SPSS 22.0 软件进行数据的统计分析,采用 Duncan's 新复极差法进行多重比较及显著性分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 菌株 PL-21 的形态特征

菌株 PL-21 在 NA 平板上生长 24 h 后,形成近圆形、乳

白色至淡黄色菌落,边缘较为规则,中央稍隆起,不透明,菌体杆状,革兰氏阴性。

2.2 菌株 PL-21 的生理生化特征

菌株 PL-21 的生理生化试验结果表明,该菌为好氧菌,硝酸盐还原试验无颜色变化,可液化明胶试管培养基,葡萄糖发酵反应无气泡产生及颜色变化,淀粉水解反应不产生水解圈,在加入 2% 氯化钠的平板上可正常生长但不能在加入 5% 氯化钠的平板上生长,在牛肉膏蛋白胨琼脂平板上于 4 ℃ 条件下可缓慢生长。参考《常见细菌系统鉴定手册》,菌株 PL-21 与假单胞菌的特征基本相似。

2.3 菌株 PL-21 的 16 S rDNA 序列分析

PCR 扩增 16 S rDNA 碱基序列及测序结果表明,菌株 PL-21 的 16 S rDNA 碱基序列长度为 1 435 bp,将该序列提交到 GenBank 数据库,获得登录号 GenBank NO. MT378354。将该序列与 GenBank 数据库收录的代表菌株的 16 S rDNA 碱基序列进行 BLAST 比对,结果与假单胞菌属的几个种的碱基序列相似度达 99% 以上。用 MEGA5 构建系统发育树,结果发现菌株 PL-21 与假单胞菌 AAS-156 (KY810664.1) 聚类在一个分支上。结合形态观察、生理生化测定及系统发育分析结果,初步确定菌株 PL-21 为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)。

2.4 假单胞菌 PL-21 及其发酵滤液的抗菌活性

经平板对峙法分析假单胞菌 PL-21 的抗菌活性,结果表明,PL-21 对 6 种病原菌具有不同程度的拮抗活性,其中对苹果斑点落叶病原菌、苹果圆斑病原菌、苹果轮斑病原菌的抑菌带宽度分别为 2.70 cm、1.72 cm、1.23 cm,对苹果褐斑病原菌、苹果轮纹病原菌、苹果炭疽病原菌的抑菌带宽度分别为 0.87 cm、0.95 cm、0.33 cm。

多数生防菌在发酵时可产生多种次生代谢产物来抑制植物病原菌的生长。菌丝生长速率测定结果表明,假单胞菌 PL-21 的发酵滤液对苹果斑点落叶病原菌、苹果褐斑病原菌的抑制率较高,分别为 59.4%、65.22%,对苹果轮纹病原菌、苹果圆斑病原菌、苹果轮斑病原菌的抑制率次之,对苹果炭疽病原菌的抑制率最低,仅为 7.46%。

2.5 PL-21 发酵滤液对指示菌孢子萌发的抑制作用

终体积分数为 50%、30%、10% 的 PL-21 发酵滤液均可抑制指示菌孢子萌发,相同的时间内抑制率随体积分数增大而升高,同体积分数抑制率随时间延长而降低,终体积分数为 50% 的发酵滤液 24 h 时对苹果斑点落叶病原菌、苹果褐斑病原菌孢子萌发的抑制率分别为 60.6%、71.7%。

2.6 PL-21 发酵滤液对指示菌的离体防效

经 PL-21 发酵滤液处理后,叶片上苹果斑点落叶病斑、苹果褐斑病斑呈褐色、边缘清晰且面积明显小于对照,叶片仍然呈绿色;对照组叶片病斑逐渐变大后呈褐色或黑褐色且连成片状,根据病情分级标准对防效试验的定量统计结果显示,处理组病情指数明显降低,分别比对照降低

40.37%、50.37%, PL-21 发酵滤液可显著降低苹果叶片的发病程度, 离体防效分别为 54.50%、63.55% (表 1)。

表 1 菌株 PL-21 发酵滤液的离体防效

Table 1 Control efficiency of fermentation filtrate on detached leaves

指示菌	处理	病情指数 (%)	防治效果 (%)
苹果斑点落叶病病原菌 (<i>A. alternata</i>)	CK	74.07±1.70a	—
	菌株 PL-21 发酵液	33.70±1.28b	54.50±3.22
苹果褐斑病病原菌 (<i>M. coronaria</i>)	CK	79.26±0.64a	—
	菌株 PL-21 发酵液	28.89±1.92b	63.55±2.59

同一列中同一指示菌数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究通过形态观察、生理生化指标测定及 16 S rDNA 碱基序列分析, 初步判定从苹果根际中分离的 PL-21 为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)。假单胞菌作为拮抗微生物已被应用于多种植物病害的生物防治^[21], 如娄海博等^[22]分离的荧光假单胞菌 SN15-2 对番茄青枯病的防效可达 46.58%, 董国菊等^[23]发现荧光假单胞菌 P-72-10 可显著抑制烟草疫霉菌菌丝生长, 且对烟草黑胫病也有良好的控病效果。本研究首次明确了假单胞菌 PL-21 对 6 种苹果病原菌的广谱拮抗活性, 进一步拓宽了假单胞菌的生防应用范围; 其发酵滤液对苹果斑点落叶病原菌、苹果褐斑病病原菌菌丝抑制率分别高达 59.40%、65.22%, 结合唐远江^[24]、宁爽^[25]的研究结果分析, 可能是 PL-21 分泌的抗生素、纤维素酶等代谢产物对病原菌生长具有毒力效应, 随后的孢子萌发试验验证了这一推测: PL-21 发酵滤液对苹果斑点落叶病原菌、苹果褐斑病病原菌孢子萌发的抑制作用随发酵滤液体积分数升高而升高, 50% 发酵滤液在 24 h 对 2 种病原菌孢子萌发的抑制率分别为 60.6%、71.7%。由于生防菌株在实际应用中需要克服植物表面诸如湿度、营养、微生物等多种因素才能发挥效能^[20], 本研究测定了 PL-21 发酵滤液对苹果斑点落叶病、苹果褐斑病的离体叶片防效, 结果分别为 54.50%、63.55%, 这与拮抗试验结果和孢子萌发试验结果具有一致性, 进一步验证了 PL-21 的生防潜力。

PL-21 及其发酵滤液对苹果常见病害的广谱抑菌特性, 特别是对苹果斑点落叶病原菌、苹果褐斑病病原菌的高拮抗活性和较好的离体防效, 丰富了相关病害生物防治的微生物资源及技术储备。在后续试验中, 一方面需结合抗菌物质合成基因分析、蛋白质质谱分析等手段明确 PL-21 的抗菌代谢产物类型, 另一方面, 由于假单胞菌作为一类常见的植物根际促生菌, 对植物具有明显的促生作用^[26-28], 还需验证 PL-21 的果园防效及其对苹果的促生效果, 为相关生防制剂

的开发利用奠定基础。

参考文献:

- [1] 杨海君, 谭周进, 肖启明, 等. 假单胞菌的生物防治作用研究 [J]. 中国生态农业学报, 2004, 12(3): 158-161.
- [2] 常琳, 肖琦, 童蕴慧, 等. *gacS* 基因在荧光假单胞菌 FD6 防治番茄灰霉病中的功能分析 [J]. 园艺学报, 2014, 41(4): 681-686.
- [3] 谯天敏, 张静, 赵芳, 等. 铜绿假单胞菌发酵条件优化及抗菌物质研究 [J]. 南京林业大学学报, 2014, 38(5): 45-50.
- [4] 王平, 李慧, 肖明, 等. 荧光假单胞菌株 P13 分泌铁载体抑制油菜菌核病菌 [J]. 上海师范大学学报, 2010, 39(2): 200-203.
- [5] 章茂林. 拮抗细菌 SU8 抑菌活性与抑菌物质提取及其理化性质初步研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
- [6] DANDURISHVILI N, TOKLIKISHVILI N, OVADIS M, et al. Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants [J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(1): 341-352.
- [7] 魏毅. 苹果斑点落叶病防治药剂的筛选 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [8] 董向丽, 高月娥, 李保华, 等. 苹果褐斑病在山东半岛中部的周年流行动态 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(3): 479-487.
- [9] 陈亮, 宋鹏, 陈五岭, 等. 苹果早期落叶病广谱拮抗菌株的筛选、鉴定与抑制作用研究 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(16): 292-296.
- [10] 寿园园, 李春敏, 赵永波, 等. 苹果早期落叶病的发生、防治及相关研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(20): 9519-9521.
- [11] 何劲, 雷邦星, 宋贞福, 等. DEB-2 菌株对贵州苹果早期落叶病原的毒力效应 [J]. 西南农业学报, 2014, 27(2): 652-657.
- [12] 李海飞, 赵政阳, 梁俊, 等. 苹果农药残留研究进展 [J]. 果树学报, 2005, 22(4): 381-386.
- [13] 赵华. 苹果褐斑病病原学、组织细胞学和化学防治研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [14] 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.
- [15] HOLT J G, KRIEG N R, SNEATH P H, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [16] 豆雅楠, 牛世全, 豆建涛, 等. 芽孢杆菌拮抗苹果树腐烂病菌的筛选、鉴定及抑菌活性初探 [J]. 微生物学通报, 2018, 45(12): 2684-2694.
- [17] 王蓓, 牛世全, 达文燕, 等. 河西走廊盐碱土壤中抗立枯丝核菌的放线菌筛选 [J]. 生物技术通报, 2014(1): 156-160.
- [18] 郝晓娟, 刘波, 谢关林, 等. 短链芽孢杆菌 JK-2 菌株对番茄枯萎病的抑菌作用及其小区防效 [J]. 中国生物防治, 2007, 23(3): 233-236.
- [19] 方中达. 植物病害研究法 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [20] 田永永. 苹果褐斑病的生物防治技术研究 [D]. 西安: 西北大

- 学, 2011.
- [21] KRAVCHENKO L V, MAKAROVA N M, AZAROVA T S, et al. Isolation and phenotypic characterization of plant growth-promoting rhizobacteria with high antiphytopathogenic activity and root-colonizing ability[J]. Mikrobiologiya, 2002, 71(4): 521-525.
- [22] 姜海博, 王晓冰, 陈俊, 等. 拮抗青枯劳尔氏菌的荧光假单胞菌 SN15-2 分离鉴定及其生防能力分析[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(3): 12-18.
- [23] 董国菊, 马冠华, 肖崇刚, 等. 荧光假单胞菌拮抗菌株对烟草疫霉的抑菌机制及控病效果[J]. 植物保护学报, 2012, 39(2): 115-120.
- [24] 唐远江. 缺陷假单胞菌 HD13 (*Pseudomonas diminuta*) 抗植物病原真菌及其活性组分的研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2016.
- [25] 宁爽. 内生假单胞菌 BTa14、Bar25 促生抗病作用及机理的研究[D]. 烟台: 烟台大学, 2019.
- [26] GOHEL N M, CHAUHAN H L. Integrated management of leaf and neck blast disease of rice caused by *Pyricularia oryzae*[J]. African Journal of Agricultural Research, 2015, 10(19): 2038-2040.
- [27] 祝腾辉, 罗香文, 李聪, 等. 啉氧菌酯降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 南方农业学报, 2019, 50(6): 1256-1262.
- [28] 沙月霞, 张昂, 伍顺华, 等. 防治稻瘟病假单胞菌的筛选及效果评价[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(2): 249-257.

(责任编辑: 陈海霞)