

柑橘炭疽病菌的生物学特性及枯草芽胞杆菌对其的抑制作用

邹娟*, 姚卓, 尚永华

(怀化学院生命科学系, 民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 怀化 418000)

摘要 近5年来,湖南麻阳苗族自治县的柑橘种植园发生柑橘炭疽病。采集发病柑橘植株,分离其病原菌,从病原菌的培养性状和形态学特征、内转录区(ITS)序列分析和系统发育关系比较等方面对该病原菌进行了鉴定,并探索了枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)CGMCC 1.354 对其的抑制作用。结果表明:该地区柑橘炭疽病菌为盘长孢状刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporioides*)。枯草芽胞杆菌 CGMCC 1.354 对该病原菌具有较强的抑制作用,其分泌的抑菌物质能抑制柑橘炭疽病菌菌丝生长和孢子萌发。

关键词 柑橘炭疽病; 盘长孢状刺盘孢; 枯草芽胞杆菌; 抗菌活性

中图分类号: S 436.661.14 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.01.011

Biological characteristics of citrus pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* and the inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on the fungus

Zou Juan, Yao Zhuo, Shang Yonghua

(Key Laboratory of Research and Utilization of Ethnomedicinal Plant Resources of Hunan Province, Department of Life Sciences, Huaihua University, Huaihua 418000, China)

Abstract Anthracnose on citrus has occurred in Mayang Miao Autonomous County, Hunan Province in the recent five years. The pathogen causing citrus anthracnose was isolated from citrus orchards of Mayang Miao Autonomous County. Based on cultural and morphological characteristics, ribosomal DNA (rDNA) internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis and phylogenetic relationships with other species of *Colletotrichum*, the pathogen was identified as *Colletotrichum gloeosporioides*. *Bacillus subtilis* CGMCC 1.354 showed strong antagonistic activity against the pathogen, and the antifungal substance produced by *B. subtilis* CGMCC 1.354 strongly inhibited the hyphal growth and spore germination of *C. gloeosporioides*.

Key words citrus anthracnose; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Bacillus subtilis*; antagonistic activity

湖南省麻阳苗族自治县是该省柑橘的主产区,柑橘种植面积近 1.3 万 hm^2 ,年产量达 30 万 $\text{t}^{[1]}$ 。但是近 5 年来麻阳的柑橘炭疽病频繁发生并有加重的趋势。柑橘感染炭疽病后枝干、树叶和果实表面出现褐斑,易导致柑橘落叶、树干空洞和储藏期果实腐烂,直接影响果农的经济收益。据报道,广东省德庆县的名优柑橘品种和德庆贡柑大面积暴发过炭疽病,发病面积近 500 hm^2 ,果园损失达 2 000 万元以上,给当地农业生产造成了很大的经济损失^[2]。柑橘炭疽病又称褐斑病,病原菌为寄生真菌,该病菌在病树干或树皮

上越冬,来年春季环境适宜时,尤其是阴雨潮湿时,病菌借风、雨、露水和昆虫等传播到嫩梢、新叶和幼果上。在有伤口(冻伤、灼伤、其他伤口)或树势生长衰弱时,该病菌即可萌发侵入,形成柑橘树干、树叶和果实的炭疽病,而潜伏在果实中的病原菌在贮藏期易引发柑橘褐斑腐烂。

目前柑橘炭疽病的防治以化学药剂为主^[3-4],但农药在果实中的残留对人类健康存在潜在威胁,已成为全社会关注的问题。此外,杀菌剂的连续使用,可导致病原菌产生抗药性,使化学防治效果降低^[5]。因

收稿日期: 2014-11-25 修订日期: 2015-02-02

基金项目: 湖南省重点学科建设项目(201142);怀化学院科研项目(HHUY2014-03);湖南省教育厅科研项目(11C0988)

* 通信作者 E-mail: zoujuantone@163.com

此,在柑橘病害防治中,迫切需要寻找安全有效的防病新技术,以无毒高效的生物防治逐步取代化学杀菌剂。近年来,利用环境友好的生防菌防治植物真菌病害是国内外比较活跃的研究领域之一。生防枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)CGMCC 1.354 已广泛应用于微生物肥料和养殖水体净化^[6],本研究首次发现该菌株对柑橘炭疽病菌具有良好的拮抗性能。本文探讨了柑橘炭疽病菌的生物学特性和枯草芽孢杆菌 CGMCC 1.354 对柑橘炭疽病菌的拮抗性能,为柑橘炭疽病菌的生物防治以及枯草芽孢杆菌 CGMCC 1.354 对柑橘炭疽病菌的生防价值和实际应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)CGMCC1.354,购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(北京)。

于湖南省怀化市麻阳苗族自治县的柑橘种植园中,从发病的‘冰糖橙’、‘脐橙’、‘椪柑’采集果实、枝茎、叶片。

马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA):取新鲜去皮马铃薯 200 g 置 1 000 mL 蒸馏水中煮沸 30 min,纱布过滤。在滤液中加 20 g 琼脂,加热使琼脂完全溶化后用纱布过滤。滤液加 20.0 g 蔗糖完全溶解后,补足蒸馏水至 1 000 mL。

牛肉膏蛋白胨培养基(BP):牛肉浸膏 3.0 g/L,蛋白胨 10.0 g/L,NaCl 5.0 g/L,琼脂 20.0 g/L,pH 7.4~7.6。

LB培养基:胰蛋白胨10.0 g/L,酵母提取物5.0 g/L,NaCl 10.0 g/L,琼脂 20.0 g/L,pH 7.0~7.2。

1.2 病原真菌的分离

1.2.1 病原真菌分离与致病性鉴定

将采集到的发病柑橘植株如‘冰糖橙’、‘脐橙’、‘椪柑’的果实、枝茎、叶片用流水清洗样品表面的泥土渣渍,晾干水分。无菌条件下将试验材料放入 75%乙醇中浸泡 3 min,无菌水冲洗 4~5 次,再放入 0.1%升汞溶液中浸泡 1 min,无菌水冲洗 4~5 次,沥去多余水分。将处理过的样品病害处剪成小块,保留 3 mm×3 mm 的薄片,切去两端组织,接种于 PSA 培养基中,使部分组织嵌在培养基中,充分与培养基接触,放入 28℃恒温培养箱中培养 3~5 d。每日观察材料,待材料切口处长出菌丝后,及时挑取前端菌丝,转接至新鲜的 PSA 培养基中培养。

表面消毒效果的检查:将表面消毒的最后一遍清洗用过的无菌水按 0.1 mL/皿涂布于牛肉膏蛋白胨培养基上 37℃下培养 2 d 后无菌落长出,表明表面消毒彻底,已消除了样品表面的附生菌。

对实验室分离得到的病原真菌的纯培养物按照柯赫氏法则进行致病性鉴定,鉴定采用针刺接种法。将蘸有各菌株菌悬液的海绵置于培养皿中,将待接种的新生嫩叶置于海绵上,用针刺使叶片产生伤口,接种后用透明塑料袋保湿 4 d,观察是否产生典型的症状,并从表现症状的叶片上再分离培养病菌,以鉴定是否与原接种菌一致^[7]。

1.2.2 平板对峙检测

按李小俊的方法^[8],在直径 90 mm 的 LB 平板中心接种已活化的直径 8 mm 大小的炭疽病菌菌饼,在 LB 固体培养基的培养皿底部用记号笔垂直对称分为 4 个区域,然后将供试枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株 CGMCC 1.354 接种于十字方向相同距离处,此为处理组,以仅接种炭疽病菌菌饼的 LB 平板为对照组,每组处理 3 个重复。28℃培养 5 d。用十字交叉法测量炭疽病菌菌落直径大小,按下列公式计算供试枯草芽孢杆菌菌株 CGMCC 1.354 的抗菌活性:

抗菌活性(%)=[(对照组菌落直径-菌饼直径)-(处理组菌落直径-菌饼直径)]/(对照组菌落直径-菌饼直径)×100。

1.3 病原真菌的鉴定

1.3.1 病原真菌形态学鉴定

剪边长约 2 cm 的玻璃纸,经灭菌后贴于培养基上,在培养基中央接种病原菌,于 28℃培养箱中培养 4 d 后取玻璃纸于显微镜下观察菌丝体及孢子形态与着生方式。

1.3.2 分子生物学鉴定

病原真菌 ITS 区段通用引物的扩增与序列分析:采用玻璃纸 PSA 平板培养法收集病原真菌菌丝体,采用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒(生工生物工程上海有限公司),按照使用说明书提取其基因组 DNA,置于-20℃冰箱保存备用。选用真菌 ITS 扩增的通用引物 ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG)和 ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGC),对病原菌菌株进行 ITS 区段 PCR 扩增。反应在 25 μL 体系中进行,包括:1 μL dNTPs (2.5 mmol/L),0.2 μL *Taq* 酶(5 U/μL),2.5 μL 10×PCR buffer,0.5 μL primer ITS1(10 μmol/L),0.5 μL

primer ITS4 (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μL (约 20 ng/ μL) 基因组 DNA, 加 ddH₂O 至 25 μL 。扩增程序为: 94℃ 预变性 4 min; 进入循环: 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。反应结束后, 取 5 μL 扩增产物, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。于凝胶成像系统显影, 利用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物, 测序工作由生工生物工程(上海)有限公司完成。

测序后的 ITS 区的扩增序列用 Clustal X 程序进行 rDNA 序列比对, 将本研究菌株的 DNA 序列与 GenBank 中刺盘孢的 ITS 序列进行同源性比较。然后用邻位加入法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, 系统进化树的测试方法为 bootstrap method, 重复次数为 1 000, 模型为 kimura 2-parameter, 其他参数为默认设置。

病原真菌 ITS 区段特异性引物的扩增: 分别用盘长孢状刺盘孢 (*C. gloeosporioides*) 特异性引物 CgInt; 5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3'/ITS4; 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 和尖孢炭疽菌 (*C. acutatum*) 的特异性引物 CaInt2; 5'-GGG-GAAGCCTCTCGCGG-3'/ITS4; 5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3' 对供试菌株基因组 DNA 进行 PCR 特异性扩增。反应体系为 25 μL , 除引物外其余各组分与其 ITS 区段通用引物扩增的体系相同。扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min; 进入循环, 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 75 s (CgInt/ITS4) 或 64℃ 退火 60 s (CaInt2/ITS4), 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。反应结束后, 取 5 μL 扩增产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并在凝胶成像系统中分析特异性产物片段的大小。

1.4 枯草芽胞杆菌菌株 CGMCC 1.354 抑菌物质的分离与抑菌特性

1.4.1 枯草芽胞杆菌菌株 CGMCC 1.354 抑菌物质的发酵与提取

将枯草芽胞杆菌菌株 CGMCC 1.354 接种到牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 30℃、120 r/min 振荡培养 36 h, 8 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 重复离心 2 次, 用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌获得无菌滤液。将无菌滤液涂布在 LB 培养平板上, 检测有无活菌体。用 3 倍体积 95% 乙醇沉淀上清, 4℃ 静止过夜。8 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀, 用 75% 乙醇洗涤沉淀, 并溶于 1 mol/L NaCl 溶液中。再

用 95% 乙醇抽提 2 次后溶解于 1 mol/L NaCl 溶液中。采用 HP20 大孔树脂提取抑菌物质。将预处理好的树脂用玻璃棒引流装柱, 并使柱中无气泡, 用玻璃棒引流粗提液至柱中, 静置吸附 2 h, 用蒸馏水洗去杂质后用 40% 乙醇洗脱, 并收集洗脱液。洗脱液经旋转蒸发浓缩至 1/5 体积, 再真空冷冻干燥获得抑菌物质, 编为 BAL-1, 备用。

1.4.2 BAL-1 对炭疽病菌的抑制作用

采用菌落直径法, 将冻干后的抑菌物质 BAL-1 配制成 1.0 g/L 溶液分别稀释至 1、1.25、1.67 和 2.5 倍, 然后按 1:3 与冷却至 50℃ 左右的 PSA 培养基混合制成平板, 抗菌活性物终浓度分别为 0.25、0.192、0.15 和 0.1 g/L, 冷却后取直径 8 mm 的炭疽病菌菌饼置入平板中央, 以蒸馏水代替抑菌物质的 PSA 培养平板作对照, 设 3 次重复, 28℃ 培养 5 d 后, 检测各处理菌落增长直径, 计算抗菌活性, 并在光学显微镜下观察菌丝形态。

1.4.3 BAL-1 的初步鉴定

脂类的鉴定采用苏丹Ⅲ染色法^[9], 称取苏丹Ⅲ干粉 0.1 g 加入 10 mL 95% 乙醇过滤后再加入 10 mL 甘油, 制成苏丹Ⅲ染液。加 1 滴 1% (W/V) 的抑菌物质 BAL-1 在载玻片上, 加入 2~3 滴苏丹Ⅲ染液, 染色 2 min 后在显微镜高倍镜下观察液滴中是否有橘黄色颗粒出现, 若有, 则含有脂类物质。蛋白质鉴定采用双缩脲法^[10], 在试管中加入 1.0 g/L 的抑菌物质 5 mL, 0.1 g/mL NaOH 1 mL, 振荡均匀后加入 0.01 g/mL CuSO₄ 溶液 2~3 滴, 放置 10 min 后观察试管中是否有紫红色产物出现, 若有则含蛋白质。糖类物质鉴定采用菲林试剂法^[11], 在试管中加入 1.0 g/L 的抑菌物质 BAL-1 20 mL, 加 6 mol/L 的 HCl 10 mL, 沸水浴回流水解 6 h, 冷却后加入菲林试剂并放入盛有 50~65℃ 水浴 2 min, 观察结果, 若试管中出现砖红色沉淀, 则含有糖类。

1.4.4 温度、pH 和金属离子对 BAL-1 的抗菌活性的影响

温度对 BAL-1 抗菌活性的影响: 将 1.0 g/L 的抑菌物质装入 6 个无菌 50 mL 三角瓶中, 分别置于 20、40、60、80、100、121℃ 下处理 30 min, 然后按 1:3 与冷却至 50℃ 左右的 PSA 培养基混合制成平板, 冷却凝固后, 接种直径 8.0 mm 的炭疽病菌菌饼于平板中央, 以加蒸馏水代替抑菌物质的平板作对照, 计算抗菌活性。

pH 对 BAL-1 抗菌活性的影响: 将 1.0 g/L 的

抑菌物质调节 pH 至 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 后置 4℃ 下静置 8 h, 再将其 pH 调回 7.0, 然后按 1:3 与冷却至 50℃ 左右 PDA 培养基混合制成平板, 冷却凝固后, 接种直径 8.0 mm 的炭疽病菌菌饼于平板中央, 以加蒸馏水代替抑菌物质的平板作对照, 计算抗菌活性。

金属离子对 BAL-1 抗菌活性的影响: 将灭菌干燥后的 NaCl (Na^+)、 MgCl_2 (Mg^{2+})、KCl (K^+)、 CaCl_2 (Ca^{2+})、 ZnCl_2 (Zn^{2+}) 和 FeCl_3 (Fe^{3+}) 分别溶解于 1.0 g/L 的抑菌物质溶液中, 至金属离子浓度为 0.05 mol/L。然后按 1:3 与冷却至 50℃ 左右 PDA 培养基混合制成平板, 金属离子终浓度为 0.012 5 mol/L。冷却凝固后, 接种直径 8.0 mm 的炭疽病菌菌饼于平板中央, 以加蒸馏水代替抑菌物质的平板作对照, 计算抗菌活性。

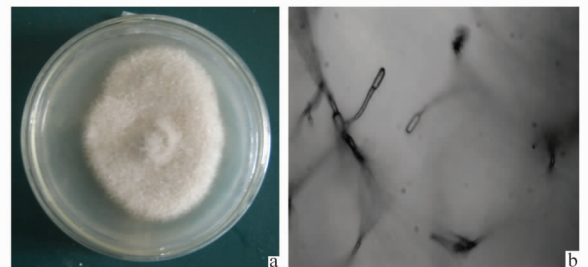
2 结果与分析

2.1 柑橘炭疽病菌的分离鉴定

将从柑橘茎、叶、果实炭疽病病斑处分离到的供试菌株接种至健康柑橘嫩叶的带伤表皮上, 室温下保湿 4 d, 接种后柑橘嫩叶出现了与炭疽病相似的病斑, 重新分离获得了与供试菌株形态相同的菌落, 因而证实了供试菌株对柑橘的致病性, 并将该菌株编号为 spb1。spb1 菌株在 PSA 培养基上生长较快, 7 d 可长满直径 90 mm 的培养皿。菌落圆形, 气生菌丝呈白色, 绒状, 茂密, 后期菌丝颜色逐渐变深呈灰褐色, 培养皿背面呈黑褐色 (图 1a); 分生孢子黏孢团呈灰褐色, 刚毛少, 直立, 分生孢子梗短小, 基部淡褐色, 有分枝, 梗无隔膜; 分生孢子无色, 单胞, 圆柱形, 顶端钝, 基部稍尖, ($12\sim 18$) $\mu\text{m}\times(4\sim 6)\mu\text{m}$; (图 1b); 附着胞扁球形, 褐色, 大小 ($6\sim 15$) $\mu\text{m}\times(4\sim 9)\mu\text{m}$ 。这些形态特征与陆家云^[12]和王震等^[13]描述的盘长孢状刺盘孢 (*C. gloeosporioides*) 的形态特征吻合。

用引物 ITS1 和 ITS4 对病原真菌 rDNA 的 ITS 区段 PCR 扩增, 获得长约为 600 bp 的 DNA 片段, 序列经过 Clustal X 比较排列后, 提交到 GenBank 中, 获得序列登录号为 KP036394。登陆 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 将该序列与核酸数据库 BLAST 比对, 显示该病原真菌与 GenBank 中已登录的盘长孢状刺盘孢 (*C. gloeospori-*

oides) 序列的同源性均在 99% 以上。利用 MEGA4.1 软件的 NJ (neighbor-joining) 聚类分析法, 构建了该病原菌株与王震等^[13]报道的同源性在 99% 以上 10 个柑橘炭疽病菌 (其在 GenBank 序列登录号分别为: GU108948、GU108949、GU108950、GU108951、GU108952、GU108953、GU108954、GU108955、GU108956 和 GU108957) 和 3 个柑橘花后落果病菌 (*C. acutatum*) 菌株 (序列登录号: AF090853、FJ972610、GU059863) 的系统发育树 (图 2), 结果表明, spb1 菌株与已报道的上述 10 株柑橘炭疽病菌以 100% 的相似度聚类在一起, 而 3 个柑橘花后落果病菌则以较远的亲缘关系处于系统发育树的外围。ITS 区段的特异性引物检测结果表明, *C. gloeosporioides* 的特异性引物 CgInt/ITS4 能从 spb1 菌株的基因组 DNA 中扩增出约为 500 bp 的特异性条带, 而用尖刺盘孢 (*C. acutatum*) 特异性引物 CaInt2/ITS4 未能扩增出相应的 DNA 条带 (图 3)。综合以上证据, 表明本研究的病原真菌 spb1 菌株属于盘长孢状刺盘孢 (*Colletotrichum gloeosporioides*)。



a: PSA培养基上生长5 d的spb1菌落; b: spb1菌株的菌丝和分生孢子(400×)
a: The culture of strain spb1 grown on PSA medium for 5 days; b: Micrograph of mycelia and conidia of strain spb1 (400×)

图 1 柑橘炭疽病菌 spb1 菌株的菌落和分生孢子形态

Fig. 1 Colonies and conidia of strain spb1 causing citrus anthracnose

2.2 平板对峙检测

平板对峙试验表明, 枯草芽胞杆菌 CGMCC 1.354 对柑橘炭疽病菌 spb1 菌株具有明显的拮抗作用。该细菌除了产生明显的抑菌带外, 对病菌菌落生长有明显的抑制作用, 表现在菌落边缘和抑菌带接触部位的菌丝生长缓慢, 而正常生长的菌落铺展平板呈圆形扩展。镜检发现受抑制的病菌菌丝顶端、中部等部位膨大呈泡状, 部分前端膨胀泡破裂、消解, 内含物外溢, 菌丝因枯草芽胞杆菌的致畸作用而停止生长 (图 4)。观察发

现炭疽病菌的孢子虽能萌发,但萌发产生的芽管粗短、扭曲、畸形,不能进一步生长为菌丝体。

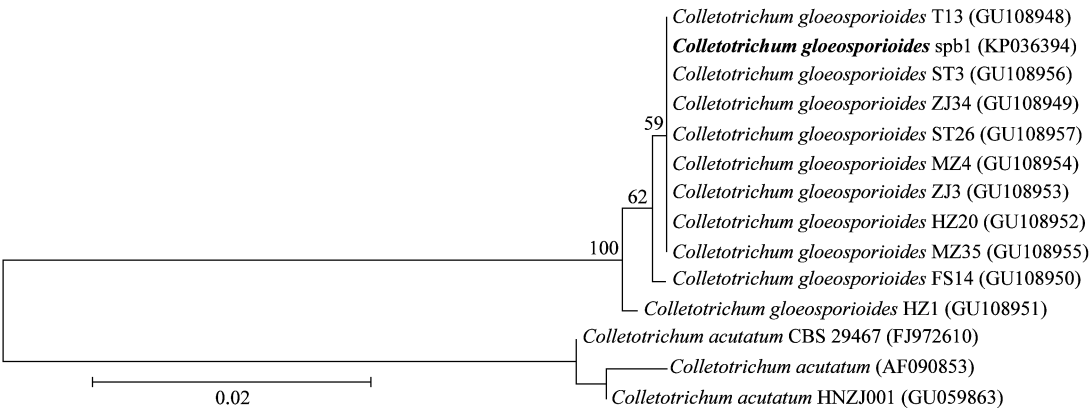
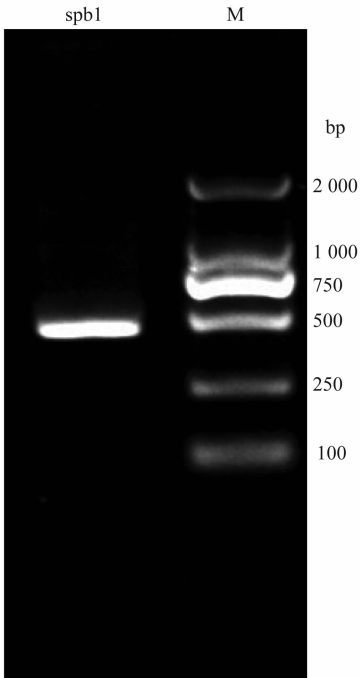


图 2 NJ 法构建的基于菌株 spb1 (KP036394)和柑橘其他刺盘孢 ITS 序列的系统发育树
Fig. 2 The phylogenetic dendrogram of the strain spb1 (KP036394) and other strains of *Collectotrichum* spp. constructed by using neighbor-joining (NJ) method based on the ITS sequences



M: DL2000 DNA 分子量标记
M: DL2000 DNA molecular weight marker

图 3 特异性引物 CgInt/ITS4 对 spb1 菌株的 PCR 扩增
Fig. 3 PCR amplification results of strain spb1 using specific primer pair of CgInt/ITS4

2.3 抑菌物质 BAL-1 的初步鉴定与抑菌性能

2.3.1 抑菌物质 BAL-1 的鉴定

200~400 nm 紫外扫描(图 5)显示抑菌物质 BAL-1 在 220 nm 左右和 270 nm 左右有较大的吸收峰,表明 BAL-1 可能含蛋白类物质。双缩脲反应呈紫色,进一步证实 BAL-1 中含有蛋白质类物质。斐林试剂法有砖红色的沉淀生成,证明该抑菌水解

物含还原糖类。苏丹Ⅲ染色未发现橘黄色颗粒出现,初步判断该 BAL-1 无脂类物质。

2.3.2 温度、pH 和金属离子对 BAL-1 的抗菌活性的影响

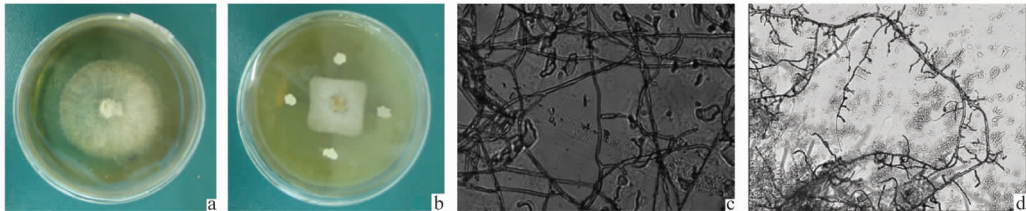
抑菌物质 BAL-1 浓度对柑橘炭疽病菌 spb1 菌丝生长的影响见表 1。由表 1 可知,同一 BAL-1 浓度下,炭疽病菌菌丝的生长直径数值波动较小,数值稳定,具有统计分析意义。在 5 个 BAL-1 梯度浓度处理下,当 BAL-1 浓度低于 0.15 g/L 时,抗菌活性差异不显著,BAL-1 浓度为 0.192 和 0.25 g/L 时的抗菌活性有明显差异,且当 BAL-1 浓度达 0.25 g/L 时,抗菌活性最高(71.96%)。总体看来,BAL-1 对柑橘炭疽病菌 spb1 菌丝生长有较强的抑制作用,且随 BAL-1 浓度的增大抑制作用增强。

表 1 BAL-1 浓度对抗菌活性的影响¹⁾

Table 1 Effects of BAL-1 concentration on antagonistic activity

终浓度/g·L ⁻¹	增长直径/cm	方差	抑制率/%
Final concentration	Increased diameter	Variance	Inhibitory rate
CK	(5.90±0.16)aA	0.052 5	—
0.10	(5.03±0.12)aA	0.030 8	17.06
0.15	(4.60±0.11)abA	0.025 8	25.49
0.192	(3.92±0.14)bAB	0.040 8	38.82
0.25	(2.23±0.14)cB	0.040 8	71.96

1) 表中“增长直径”数据为平均值±标准误,数据后标有不同小写字母表示经多重比较后差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。
Data of increased diameter are mean±SE; different lowercase and uppercase letters indicate significant difference at the 0.05 level and extremely significant difference at the 0.01 level, by multiple range test.



a: *C. gloeosporioides* spb1在培养平板上的菌落形态; b: *C. gloeosporioides* spb1受*B. subtilis* CGMCC 1.354抑制的菌落形态; c: *C. gloeosporioides* spb1的菌丝和孢子在显微下的正常形态; d: *C. gloeosporioides* spb1的菌丝和孢子受*B. subtilis* CGMCC 1.354分泌物抑制的显微图(400×)
a: Colony of *C. gloeosporioides* spb1 in culture plate; b: Colony of *C. gloeosporioides* spb1 inhibited by *B. subtilis* CGMCC 1.354 in culture plate; c: Mycelia and conidia of *C. gloeosporioides* spb1(400×); d: Mycelia and conidia of *C. gloeosporioides* spb1 inhibited by *B. subtilis* CGMCC 1.354 (400×)

图 4 柑橘炭疽病菌的菌落、菌丝和孢子形态

Fig. 4 Colonies, mycelia and conidia of *Collectotrichum gloeosporioides* spb1

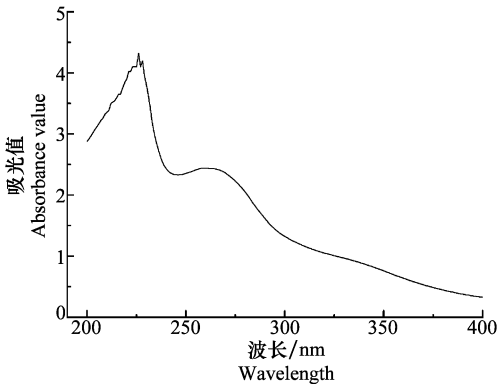


图 5 BAL-1 在 200~400 nm 下的吸光值

Fig. 5 200—400 nm light absorption value of BAL-1

从图 6 可知,在经 60℃ 以下温度处理 30 min 后,BAL-1 对柑橘炭疽病菌 spb1 菌丝生长的抑制作用随温度的升高而增强,当温度达到 60℃ 时,抗菌活性达到峰值(86.3%),其后随温度的进一步升高抗菌活性显著下降,当温度达到 121℃ 时,几乎丧失抗菌活性。这可能是由于 BAL-1 含有多糖骨架,因而具备一定高温耐受性,即在 60℃ 以下都具有良好的抗菌活性;同时因其 BAL-1 中含有蛋白,过高温度使蛋白质变性而导致 BAL-1 活性丧失。温度对 BAL-1 抗菌活性的影响进一步验证了 BAL-1 中含有糖蛋白。类似情况常见于温度对枯草芽胞杆菌所产抗菌蛋白活性影响的研究中^[14-15]。

BAL-1 在 pH 为 7.0 时抗菌活性最强(89.8%),酸性或者碱性条件都不利于其对柑橘炭疽病菌(*C. gloeosporioides*)spb1 的抑制作用,在 pH 低于 6 或者高于 8 时,BAL-1 对柑橘炭疽病菌的抑制作用都显著下降至 65% 以下,当 pH 低于 5 或者高于 9 时几乎丧失抗菌活性。由此表明:在偏酸和偏碱条件下,BAL-1 易变性失活。这可能是由于 BAL-1 中的

蛋白在较高浓度的 H⁺ 或 OH⁻ 条件下空间结构发生变化而失去对柑橘炭疽病菌 spb1 抗菌活性。在抗菌蛋白类的研究中已有类似报道^[15-17]。

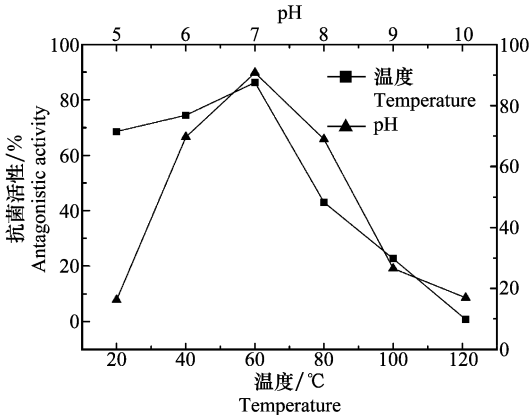


图 6 温度和 pH 对 BAL-1 抗菌活性的影响

Fig. 6 Effects of temperature and pH on the antagonistic activity of BAL-1

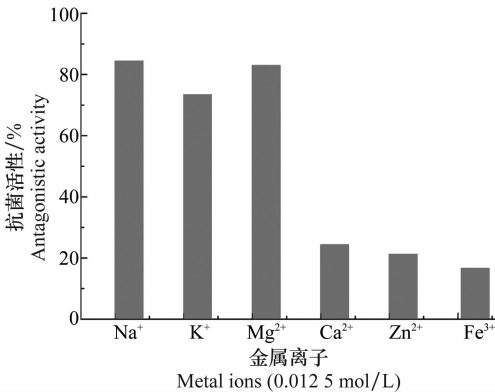


图 7 金属离子对 BAL-1 抗菌活性的影响

Fig. 7 Effects of metal ions on the antagonistic activity of BAL-1

金属离子对 BAL-1 抗菌活性的影响如图 7 所示。Na⁺ 和 Mg²⁺ 能提高 BAL-1 对柑橘炭疽病菌

spb1 的抑制作用, K^+ 对该 BAL-1 活性影响不明显。而 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 的存在会降低 BAL-1 对柑橘炭疽病菌 spb1 抑制作用。因此在生防过程中可适当增加钠盐和镁盐来提高菌剂对柑橘炭疽病菌的防控能力。

3 讨论

湖南麻阳苗族自治县的柑橘炭疽病是由病原菌盘长孢状刺盘孢 (*C. gloeosporioides*) 所引起的, 病原菌通过菌丝生长和孢子萌发产生的芽管侵入寄主导致发病。枯草芽胞杆菌 CGMCC 1.354 已广泛应用于微生物肥料和养殖水体净化^[6]。本研究首次发现该菌对柑橘炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*) 的生长具有较强的抑制作用, 其分泌的抑菌物质能抑制病原菌 *C. gloeosporioides* 菌丝生长和孢子萌发, 并使部分孢子萌发畸形, 可减弱 *C. gloeosporioides* 对柑橘的侵染能力, 起到较好的防控作用。枯草芽胞杆菌 CGMCC 1.354 的抗菌粗提物经鉴定含有糖蛋白, 其抗菌活性在 pH 为 7.0 时最高; 温度在 60℃ 以下时, 均具有良好的抗菌活性, 但过高的温度易使其抗菌活性降低甚至失活; Na^+ 和 Mg^{2+} 可以明显增强其抗菌活性, 而 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{3+} 会抑制抑菌物质的活性。因此枯草芽胞杆菌 CGMCC 1.354 不仅可应用于微生物肥料还能通过添加一定浓度的钠盐和镁盐来提高菌剂对柑橘炭疽病菌的防控能力, 且抑菌物质在 pH 6~8 范围内均具有良好的抗菌活性并对高温具较好的耐受能力, 不需低温保存, 便于储存和运输, 具潜在的开发价值和应用前景。但如果要应用于生产实践, 还需进一步的活体试验和深入研究, 分析该枯草芽胞杆菌在柑橘植株上的生存能力, 观察该菌株对柑橘植株的影响和活体条件下对柑橘炭疽病菌的抗菌效果, 才能保证其防效。

参考文献

[1] 黄黎, 张蓉. 全县柑橘总产量预计达 30 万吨[EB/OL]. (2010-11-12)[2014-11-11]. <http://www.mayang.gov.cn/Item/11625.aspx>.

[2] 彭埃天, 陈玉托, 宋晓兵, 等. 德庆贡柑炭疽病的发生与防治初探[J]. 广东农业科学, 2008(2): 58-60.

[3] Lee S, Hong J C, Jeon W B, et al. The salicylic acid-induced protection of non-climacteric unripe pepper fruit against *Colletotrichum gloeosporioides* is similar to the resistance of ripe fruit [J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(10): 1573-1580.

[4] Saiz-Urra L, Bustillo-Perez A J, Cruz-Monteagudo M, et al. Global antifungal profile optimization of chlorophenyl derivatives against *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum gloeosporioides* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(11): 4838-4843.

[5] 陈丽锋, 邓伯勋, 闵晓芳, 等. 柑橘黑色蒂腐病菌的分离鉴定及生物学特性[J]. 植物保护, 2007, 33(6): 48-51.

[6] 曹凤明, 沈德龙, 李俊, 等. 应用多重 PCR 鉴定微生物肥料常用芽胞杆菌[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 651-656.

[7] 龙珑, 宋水林, 李霖, 等. 江西峡江椪柑果梗炭疽病原鉴定[J]. 中国果树, 2012(3): 55-57.

[8] 李小俊, 成丽霞, 吴彦彬, 等. 拮抗菌抗菌谱及发酵液拮抗能力测定的新方法[J]. 生物技术, 2007, 17(1): 55-58.

[9] 宋安东, 冯冲, 王凤芹, 等. 生物油脂高产菌株筛选方法研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(3): 383-388.

[10] 刘邻渭, 陶健, 毕磊. 双缩脲法测定荞麦蛋白质[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 258-261.

[11] 赵光华, 马红芳, 田山林. 费林试剂法测定香菇等食用菌中总糖含量研究[J]. 饲料博览, 2010(11): 39-41.

[12] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 454-459.

[13] 王震, 杨媚, 杨迎青, 等. 广东省柑橘炭疽病原菌的形态与分子鉴定[J]. 菌物学报, 2010, 29(4): 488-493.

[14] Senol M, Nadaroglu H, Dikbas N, et al. Purification of chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum* [J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2014, 13: 35.

[15] 刘世会, 赵德刚. 温度、pH 对杜仲抗真菌蛋白抗菌活性的影响[J]. 山地农业生物学报, 2008, 27(4): 330-334.

[16] 胡新文, 郭建春, 郑学勤. 抗真菌蛋白 Rs-AFPs 生物学特性的研究[J]. 热带作物学报, 1998, 19(2): 36-42.

[17] 宋永燕, 李平, 郑爱萍, 等. 生防细菌 LM-3 的鉴定及其抗菌蛋白的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2006, 43(5): 1110-1115.

(责任编辑: 田 喆)