

复合微生物菌剂对苹果再植病害的生防效果测定及拮抗菌株鉴定

赵璐 刘胜 胡同乐 王亚南 王树桐* 曹克强*

(河北农业大学植物保护学院, 保定 071001)

摘要: 为探究复合微生物菌剂对苹果再植病害的生防效果,以苹果砧木实生海棠幼苗为试材,通过盆栽试验测试了木美土里复合微生物菌剂对苹果再植病害的防治效果及对再植海棠的促生作用,然后对该菌剂的可分离微生物进行了分离纯化,并以尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 菌株 HS2 为靶标菌,测试分离获得的 10 株菌株的拮抗效果,并对拮抗效果显著的 1 株真菌菌株和 2 株细菌菌株进行种类鉴定。结果表明,木美土里复合微生物菌剂对苹果再植病害的防治效果达 87.78%;经该菌剂处理后,再植海棠苗的株高、茎粗、鲜重、干重及叶面积分别是对照处理的 1.51、2.00、5.74、5.21 和 2.83 倍,表明该菌剂有显著的促生作用。木美土里复合微生物菌剂对菌株 HS2 的抑制率达到 68.59%,并从中分离到 7 株真菌菌株,3 株细菌菌株。其中,拮抗效果高于 80.00% 的真菌菌株有 1 株,细菌菌株有 2 株。经鉴定,真菌菌株 MMTL-1 为哈茨木霉 *Trichoderma harzianum*;细菌菌株 BM-01 和 BM-03 均为解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*。

关键词: 复合微生物菌剂; 苹果再植病害; 生物防治; 哈茨木霉; 解淀粉芽胞杆菌

Determination for control effect of microbial manure against apple replant disease and the identification of antagonistic strain against *Fusarium oxysporum*

Zhao Lu Liu Sheng Hu Tongle Wang Yanan Wang Shutong* Cao Keqiang*

(College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei Province, China)

Abstract: To study the bio-control effect of compound microbial against apple replant disease, pot experiments were applied to evaluate the control effect of Kimidori microbial manure (KMM) against the apple replant diseases (ARD) and whether promoting plant growth of *Malus* seedlings. Ten microorganism strains isolated from KMM were tested *in vitro* for their antagonistic activity against *Fusarium oxysporum*, one of them was the inducing factor of ARD. The species with better inhibition rate were identified through morphology and molecular biology methods. The results showed that the control effect of KMM against ARD could reach 87.78%. Seedling growth was significantly promoted by KMM treatment. The plant height, stem diameter, fresh weight, dry weight and leaf area of KMM treatment increased 1.51, 2.00, 5.74, 5.21 and 2.83 times compare with that of the replant control. The inhibition rate of KMM against *F. oxysporum* HS2 was 68.59%. Seven fungal isolates and three bacterial strains were isolated from KMM. Among these isolates, one fungal isolate MMTL-1 with the inhibition rate over 80.00% was identified as *Trichoderma harzianum*. Both the two bacterial isolates BM-01 and BM-03 with the inhibition rate over 80.00% were identified as *Bacillus amyloliquefaciens*.

Key words: microbial manure; apple replant diseases; biological control; *Trichoderma harzianum*; *Bacillus amyloliquefaciens*

我国是全球最大的苹果种植国,自1992年产量超过美国之后,一直排名世界第一,种植面积和产量占世界苹果种植面积和产量的一半以上(刘婧,2009;赵玉山,2014)。但我国苹果的品种和树龄结构却并不合理,富士品种“一家独大”,而树龄在20年以上的果园占总种植面积的60%以上(姜远茂和葛顺峰,2016)。因此,近年来,我国已经开始对苹果种植结构和品种结构进行调整,导致苹果园种植模式更新加快和品种更新周期缩短,受制于可耕作土地的限制,苹果再植病害已经成为生产上的重要问题。在世界范围内,一般认为多种真菌如柱孢菌 *Cylindrocarpon* spp.、丝核菌 *Rhizoctonia* spp.、镰孢菌 *Fusarium* spp.、茎点霉 *Phoma* spp. 和几种卵菌如腐霉 *Pythium* spp. 和恶疫霉 *Phytophthora cactorum* 单独侵染或者复合侵染均能引起苹果再植病害(Braun,1995;Mazzola,1998)。邹庆甲等(2014)对分离自河北省不同地区苹果再植土壤中的21株病原真菌进行了鉴定,明确了镰孢菌属真菌是引起河北省苹果再植病害的主要致病菌,其中,尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* 分离频率最高,致病力最强。

虽然土壤熏蒸剂如溴甲烷、氯化苦、棉隆等都是控制苹果再植病害的有效药剂,但其高毒性以及对环境的毒害导致这些化学熏蒸剂日益受到抵制,其中溴甲烷已经在世界范围内被禁用。利用生物制剂替代化学熏蒸剂防治再植病害已经得到了越来越多的关注(Kandula et al.,2010)。目前,一些能拮抗病原真菌的菌株已被发现并用于防治苹果再植病害,如细菌中的芽胞杆菌 *Bacillus* spp.、假单胞菌 *Pseudomonas* spp.,真菌中的木霉 *Trichoderma*、丛枝菌根真菌以及放线菌中的链霉菌 *Streptomyces* 等(Manici et al.,2015;Forge et al.,2016)。Biro et al.(1998)发现枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* 及聚团肠杆菌 *Enterobacter agglomerans* 可用来防治苹果再植病害,减轻某些再植病害的症状;Catska & Hudska(1993)通过温室盆栽试验发现,根部接种放射形土壤杆菌 *Agrobacterium radiobacter* 可以减少苹果幼树的死亡,促进幼树生长;刘力伟等(2016)研究发现,荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 菌株 SS101 对不同苹果产区病原菌具有抑制作用,该菌株不但可以显著缓解再植病害的影响,而且具有促进生长和增产的效果。综合来看,目前关于苹果再植病害的生物防治大多停留在利用单一菌株进行防治的层面上,而且这些测试菌株绝大多数尚未获得商业化应用,还缺乏利用已商品化的生物菌剂防治该病害的报道。

木美土里复合微生物菌剂(Kimidori microbial manure,KMM)是一种复合型微生物生物肥料。该微生物菌剂在对苹果锈果病及腐烂病的防控中均表现出较好的效果(李丙智等,2013;胡清玉等,2015)。但该菌剂是否能够控制苹果再植病害还缺乏系统研究,且该菌剂的原始菌种从国外引进,其种类组成并不明确,作用机理也缺乏报道。本课题组自2012年开始在田间测试了木美土里复合微生物菌剂对苹果再植病害的防治效果,获得了显著的防治效果(未发表)。因此,本研究通过盆栽试验、室内对峙及拮抗菌株分离鉴定,在可控条件下研究木美土里复合微生物菌剂对苹果再植病害的防治效果,并明确该菌剂中的拮抗菌株,以期为进一步研究复合微生物菌剂的防病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物和菌株:八棱海棠 *Malus robusta* Rehd. 种子购自河北省怀来县好运八棱海棠苗木基地,温室条件下,在蛭石:营养土为1:1的培养基中培养至4叶期;苹果再植病害主要致病菌——尖孢镰刀菌菌株 HS2 由河北农业大学植物病害流行与综合防治实验室分离鉴定并保存(邹庆甲等,2014)。

供试肥料和药剂:木美土里复合微生物菌剂,陕西枫丹百丽生物科技有限公司,其中有效活菌数 ≥ 2.0 亿个/g;99.99%恶霉灵(hymexazol)原药,威海韩孚生化药业有限公司。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar,PDA)培养基:马铃薯200g、葡萄糖20g、琼脂粉15g、水1000mL;马丁氏培养基:KH₂PO₄1g、MgSO₄·7H₂O0.5g、蛋白胨5g、葡萄糖10g、琼脂15g、蒸馏水1000mL,此培养基1000mL加入1%孟加拉红水溶液3.3mL,使用前临时加入1%链霉素0.03mL;牛肉膏蛋白胨(beef peptone dextrose agar,BPDA)培养基:牛肉膏5g、蛋白胨10g、NaCl5g、琼脂15g、蒸馏水1000mL;玉米粉(corn meal agar,CMA)培养基:玉米粉200g、琼脂20g、蒸馏水1000mL(程丽娟和薛泉宏,2012)。

试剂及仪器:真菌基因组抽提试剂盒,北京全式金生物技术有限公司;细菌基因组抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;10×Loading Buffer、Ex Taq,日本TaKaRa公司;其余试剂均为国产分析纯。JA1003型电子分析天平,上海精密科学仪器有限公司;DYY-4型稳压稳流电泳仪,北京六一仪器

厂;RXZ型智能人工气候箱,宁波江南仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 KMM对苹果再植病害的生防效果测定

尖孢镰刀菌菌株HS2在PDA培养基上扩繁后在菌落边缘打取3个直径为6 mm的菌饼接种到CMA培养基上并于25℃培养,待菌丝长满基质时取出,放到通风橱中风干后备用。挑选长势一致的海棠幼苗,按质量比1%接种病原菌尖孢镰刀菌菌株HS2,每处理3次重复,每次重复9棵幼苗。接种1周后分别用KKM和恶霉灵进行处理。KKM处理方法为按质量比5%的用量施到口径16 cm×高14 cm的花盆中,然后浇水1 000 mL;恶霉灵原药按照说明书稀释4 000倍后取1 000 mL均匀浇灌于花盆中作为化学对照,以仅浇水1 000 mL作为空白对照,参照Krumholz et al.(2009)致病力分级标准进行调查,分级标准为:0级:健康植株,无症状;1级:整株无变黄叶片;2级:全株1/3及以下叶片变黄干枯;3级:1/3<全株叶片变黄干枯比例≤1/2;4级:1/2<全株叶片变黄干枯比例≤3/4;5级:全株3/4以上叶片干枯或死亡。待对照处理植株病级达到3级后统计各处理海棠苗的株高、茎粗、重量、叶面积等生长指标,以明确KKM对苹果再植病害的防治效果及对再植海棠的促生作用。死亡率=Σ死亡植株/Σ调查植株×100%;病情指数=Σ(病级×该病级株数)/(最高病级×调查株数)×100;防治效果=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数×100%。

1.2.2 KMM菌悬液对菌株HS2的拮抗效果测定

在25℃下培养病原菌尖孢镰刀菌菌株HS2,5 d后在菌落边缘打取直径为6 mm的菌盘,在PDA平板一侧接入病原菌菌盘。称取10 g KKM加入到盛有90 mL灭菌水的三角瓶中,摇匀、静置,取上清液即为KKM菌悬液。在另一侧相距病原菌菌盘4 cm处放置1个牛津杯,其中加入200 μL KKM菌悬液。将培养皿置于25℃黑暗恒温培养箱中培养,以分别放置200 μL的无菌水、恶霉灵原药10倍稀释液的牛津杯作为空白对照和化学对照,每个处理4次重复。待空白对照病原菌菌丝长满皿时,测量各处理的菌落半径和抑菌带宽度,计算KKM菌悬液对菌株HS2的抑制率。抑制率=(对照菌落半径-处理菌落半径)/对照菌落半径×100%。

1.2.3 KMM可培养微生物的分离和纯化

称取1 g KKM加入到盛有100 mL灭菌水的三角瓶中,将三角瓶置于摇床上以120 r/min振荡30 min,得到稀释倍数为 10^{-2} 的悬浮液,吸取1 mL加入到装

有9 mL灭菌水的小烧杯中,制成稀释倍数为 10^{-3} 的稀释液,如此依次稀释到 10^{-6} 。取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 这4个梯度的稀释液各20 μL分别涂布到马丁氏平板和BPDA平板上,每个稀释度3次重复。将马丁氏平板和BPDA平板分别置于25℃和37℃恒温培养箱中黑暗培养。

真菌的纯化:挑取马丁氏平板培养10 d左右的真菌菌落尖端菌丝,接种到新的马丁氏平板上,待长出单菌落后通过反复多次挑取尖端菌丝,进行纯化培养,直到得到纯的单菌落。细菌的纯化:将在BPDA平板培养7 d左右的细菌菌落进行多次划线培养,获得单菌落。将纯化后的菌株进行编号,并于4℃保存备用。

1.2.4 纯化菌株的拮抗效果测定

将1.2.3中分离纯化的菌株,真菌采用平板对峙法、细菌采用滤纸片法分别与病原菌尖孢镰刀菌菌株HS2进行对峙培养,每个处理3次重复,以只接种菌株HS2的PDA平板作为对照,待对照菌落长满培养皿,测量对峙病原菌半径,计算抑制率,计算方法同1.2.2,同时测量抑菌带宽度。对于抑制率高于80.00%的菌株进一步开展种类鉴定。

1.2.5 拮抗菌株的种类鉴定

形态特征鉴定:观察PDA平板上拮抗菌株的菌丝形态及生长情况,在显微镜下观察5个视野,共测量100个分生孢子;观察生长于BPDA平板上的拮抗细菌菌落形态,鉴定拮抗细菌群体形态特征,并通过革兰氏染色观察拮抗细菌个体形态特征,参考东秀珠和蔡妙英(2001)方法进行鉴定。

生理生化特征测定:参考东秀珠和蔡妙英(2001)方法进行测定。采用硝酸盐还原试验、耐盐性培养(2%、5%、7%、10%)试验、明胶液化、淀粉水解试验、乙酰甲基甲醇试验(V-P反应)、碳水化合物利用试验(D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-甘露醇)等进行拮抗细菌的生理生化测定。

拮抗真菌菌株的分子鉴定:采用转录间隔区(ITS)序列进行鉴定。刮取覆盖PDA平板上培养的真菌新鲜菌丝,按照基因组抽提试剂盒说明书进行DNA提取。采用ITS通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行PCR扩增。25 μL反应体系:10×Buffer(缓冲液)2.5 μL、25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μL、2.5 mmol/L dNTP 1.5 μL、5 U/μL Taq 0.2 μL、10 μmol/L ITS1 2.0 μL、10 μmol/L ITS4 2.0 μL、DNA模板2.0 μL,补ddH₂O至25 μL。扩增程序:94℃预

变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 51°C 退火 40 s, 72°C 延伸 90 s, 30 个循环; 72°C 延伸 7 min, 最后于 4°C 保存。

拮抗细菌菌株的分子鉴定: 采用 *gyrB* 基因序列进行鉴定。按照 DNA 抽提试剂盒说明书提取 DNA 并检测, 对具有特异性 DNA 条带的样品进行 PCR 扩增, 引物为 UP1f (5'-GAAGTCATCATGACCGT-TCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3') 和 UP2r (5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNCAC-RTCNGCRTCNGTCAT-3')。25 μL 反应体系: DNA 模板 1 μL、10 μmol/L UP1f 0.5 μL、10 μmol/L UP2r 0.5 μL、5 U/μL *Taq* 酶 0.3 μL、10×Buffer (缓冲液) 2.5 μL、10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 补 ddH₂O 至 25 μL。扩增程序: 95°C 预变性 4 min; 95°C 变性 1 min, 58°C 退火 1 min, 72°C 延伸 2 min, 进行 34 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min, 4°C 临时保存。

经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 然后分别将具有 ITS 序列目的条带、*gyrB* 阳性克隆条带的 PCR 产物送北京华大基因有限公司进行测序。将测序所得序列与 GenBank 中所有已报道的序列进行 BLAST 比对, 根据比对结果获得相似性高的菌株序列, 用 Mega 6 软件以邻接法构建系统发育树, 确定该菌株

的种属类别。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析, 应用最小显著差数 (LSD) 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 KMM 对苹果再植病害的生防效果

盆栽试验结果表明, KMM 处理对尖孢镰刀菌菌株 HS2 引起的苹果再植病害防治效果达 87.78%, 显著优于化学对照 (恶霉灵) 及空白对照 (表 1)。在对再植海棠苗的生长促进方面, KMM 处理的叶面积为 10.36 cm², 显著优于空白对照和恶霉灵对照的 3.66 cm² 和 4.43 cm², 是后二者的 2.83 倍和 2.34 倍。KMM 处理的海棠苗株高可达 14.12 cm, 茎粗为 0.20 cm, 分别为空白对照的 1.51 倍和 2.00 倍, 为恶霉灵对照的 1.53 倍和 2.00 倍, 均差异显著; KMM 处理的干、鲜重均显著高于空白对照和恶霉灵对照, 分别是空白对照的 5.74 倍和 5.21 倍, 恶霉灵对照的 4.67 倍和 4.29 倍, 后二者之间在植株的叶面积、株高、茎粗、干重及鲜重等生长指标上均无显著差异。表明 KMM 对海棠苗的生长促进作用显著。

表 1 木美土里复合微生物菌剂对再植盆栽八棱海棠的防病促生作用

Table 1 The control and growth-promoting effect of Kimidori microbial manure against replant disease of *Malus robusta* in pot experiment

处理 Treatment	叶面积 (cm ²) Leaf area	株高 (cm) Plant height	茎粗 (cm) Stem diameter	干重 (g) Dry weight	鲜重 (g) Fresh weight	死亡率 (%) Mortality of seedlings	防治效果 (%) Control efficacy
空白对照 Blank CK	3.66±0.20 b	9.33±0.26 b	0.10±0.00 b	0.27±0.01 b	0.14±0.05 b	63.33±2.48 a	-
木美土里 KMM	10.36±0.35 a	14.12±0.45 a	0.20±0.00 a	1.54±0.09 a	0.73±0.06 a	7.37±0.54 b	87.78±5.74 a
恶霉灵 Hymexazol	4.43±0.18 b	9.24±0.24 b	0.10±0.00 b	0.33±0.02 b	0.17±0.05 b	59.26±3.64 a	5.55±0.25 b

表中数据为平均数±标准误。同列不同字母表示经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

2.2 KMM 菌悬液对菌株 HS2 的拮抗效果

KMM 中的微生物菌群能有效抑制尖孢镰刀菌菌株 HS2 的生长, 抑制率可达 68.59%, 与恶霉灵对照处理的 66.81% 无显著差异, 且形成 0.3 cm 的抑菌圈, 说明抑菌效果较好。

2.3 KMM 可培养微生物的拮抗效果

从 KMM 中共分离到 7 个真菌分离物和 3 个细菌分离物, 可培养真菌和细菌的含量分别为 1.70×10^4 CFU/g 和 1.84×10^6 CFU/g。对分离微生物的抑菌试验结果表明, 所有可培养微生物对尖孢镰刀菌菌株 HS2 均有抑制效果, 抑制率为 48.89%~82.22%, 其中菌株 MMTL-1、BM-01 和 BM-03 的抑制率均超

过 80.74% (表 2), 下一步将对这 3 株菌进行生理生化特性测定及种类鉴定。

2.4 拮抗菌株的鉴定

2.4.1 形态学鉴定结果

菌株 MMTL-1 在 PDA 培养基上菌落为白色, 菌丝粗而长, 长势迅速, 菌落较大, 分生孢子近球形至椭圆形, 成熟分生孢子呈浅绿色, 大小为 $2.5 \sim 3.5 \mu\text{m} \times 2.1 \sim 3.0 \mu\text{m}$ (图 1-A~C), 表现出木霉属的特征。菌株 BM-01 (图 1-D) 和 BM-03 (图 1-E) 的菌落表面粗糙, 典型的火山口状, 不透明, 污白色或微黄色, 较干燥, 边缘不整齐; 菌株 BM-01 (图 1-F) 和 BM-03 (图 1-G) 均为革兰氏阳性菌, 菌体杆状, 芽孢较小, 椭圆或柱

状芽孢,位于菌体中央或稍偏,形成芽孢,表明菌株 BM-01和BM-03具有典型的芽胞杆菌属特征。

表2 木美土里复合微生物菌剂分离菌株对尖孢镰刀菌菌株 HS2的抑制效果

Table 2 Inhibitory effect of culturable microorganisms from Kimidori microbial manure against *Fusarium oxysporum* strain HS2

菌株 Strain	类型 Type	数量 ($\times 10^3$ CFU/g) Colony-forming unit	占各自类型的比例 (%) Percentage of each type	抑制率 (%) Inhibition rate
MMTL-1	真菌 Fungi	1.67	9.82	81.48 \pm 9.63 a
MMTL-2	真菌 Fungi	11.00	64.71	58.52 \pm 5.19 b
MMTL-3	真菌 Fungi	0.67	3.94	62.96 \pm 7.07 b
MMTL-4	真菌 Fungi	1.67	9.82	57.04 \pm 6.06 b
MMTL-5	真菌 Fungi	1.33	7.82	48.89 \pm 1.28 c
MMTL-6	真菌 Fungi	0.33	1.94	48.89 \pm 2.57 c
MMTL-7	真菌 Fungi	0.33	1.94	60.00 \pm 5.88 b
BM-01	细菌 Bacteria	840.00	45.65	82.22 \pm 1.28 a
BM-02	细菌 Bacteria	520.00	28.26	71.11 \pm 0.00 a
BM-03	细菌 Bacteria	480.00	26.09	80.74 \pm 1.48 a

表中数据为平均数 \pm 标准误。同列不同字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean \pm SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

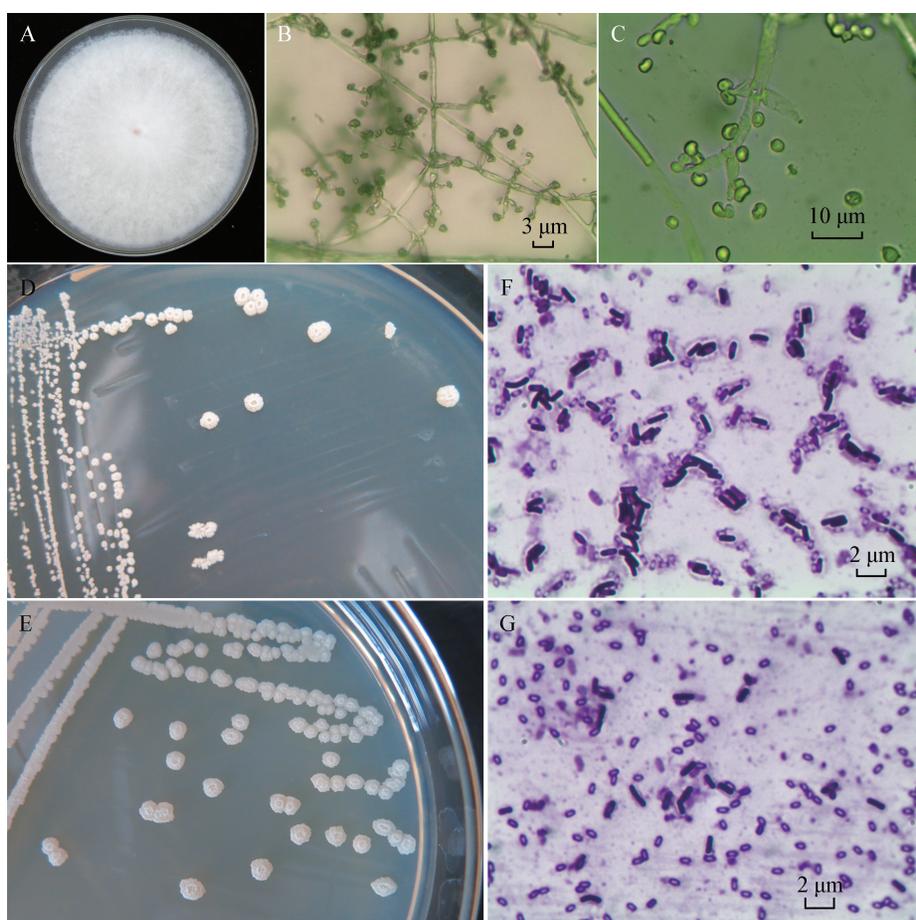


图1 拮抗菌株 MMTL-1、BM-01和BM-03的菌落形态和镜检形态

Fig. 1 Colony and microscopic morphology of strains of MMTL-1, BM-01 and BM-03

A: 菌株 MMTL-1的菌落; B~C: 分别为菌株 MMTL-1的40 \times 和100 \times 显微镜下的分生孢子; D~E: 分别为菌株 BM-01和BM-03的菌落; F~G: 分别为菌株 BM-01和BM-03的芽孢。A: Colony of strain MMTL-1; B~C: conidiophores of strain MMTL-1 at 40 \times and 100 \times microscopes respectively; D~E: colonies of strains BM-01 and BM-03 respectively; F~G: spores of strains BM-01 and BM-03 respectively.

2.4.2 细菌BM-01和BM-03的生理生化鉴定结果

细菌菌株BM-01、BM-03能发酵葡萄糖、麦芽糖,硝酸盐还原反应生成红色化合物,可水解淀粉,明胶液化呈阳性,L-阿拉伯糖、甘露醇呈阳性,脂酶测定、甲基红试验、吲哚反应呈阴性,V-P测定能生成红色化合物。菌株BM-01不能利用乳糖,在加入2%~10% NaCl的BPDA培养基上能生长;菌株BM-03能利用乳糖,在加入10% NaCl的BPDA培养基上不能生长。表明菌株BM-01和BM-03的生理生化特征与芽胞杆菌属细菌接近。

2.4.3 分子生物学鉴定结果

从菌株MMTL-1基因组DNA中扩增出约500 bp的ITS片段,经过序列对比与哈茨木霉 *Trichoderma harzianum*、黄绿木霉 *T. aureoviride*、非洲哈茨木霉 *T. afroharzianum* 等菌株ITS序列的相似度都在99.00%以上,选取10株相似度较高的木霉菌ITS序列与待测菌株MMTL-1的ITS序列构建系统发育树,发现MMTL-1菌株与哈茨木霉位于一个分支上,相似度最高(图2)。结合形态鉴定结果,将菌株MMTL-1鉴定为哈茨木霉 *T. harzianum*。

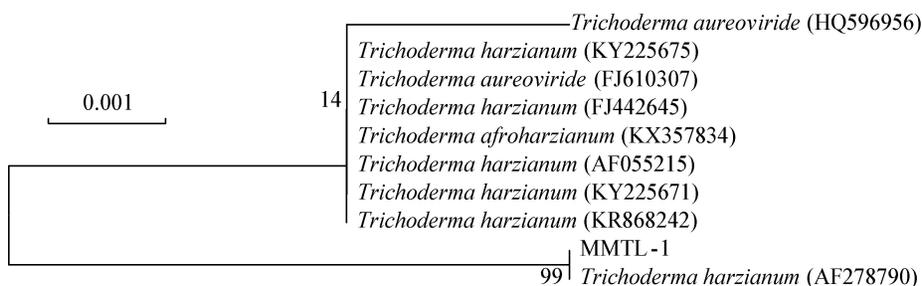


图2 基于ITS序列构建菌株MMTL-1与其相关菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of strain MMTL-1 and other related strains based on the ITS sequences

菌株BM-01和BM-03的 *gyrB* 扩增片段约为1 200 bp,经过序列比对发现与解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*、甲基营养型芽胞杆菌 *B. methylotrophicus*、贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis* 等菌株的 *gyrB* 序列相似度都在98.00%以上,选取12株相似

度较高的芽胞杆菌 *gyrB* 序列与待测菌株BM-01、BM-03的 *gyrB* 序列构建系统发育树,发现菌株BM-01和BM-03与解淀粉芽胞杆菌位于一个分支上,相似度最高(图3)。结合形态和生理生化鉴定结果,将菌株BM-01和BM-03鉴定为解淀粉芽胞杆菌。

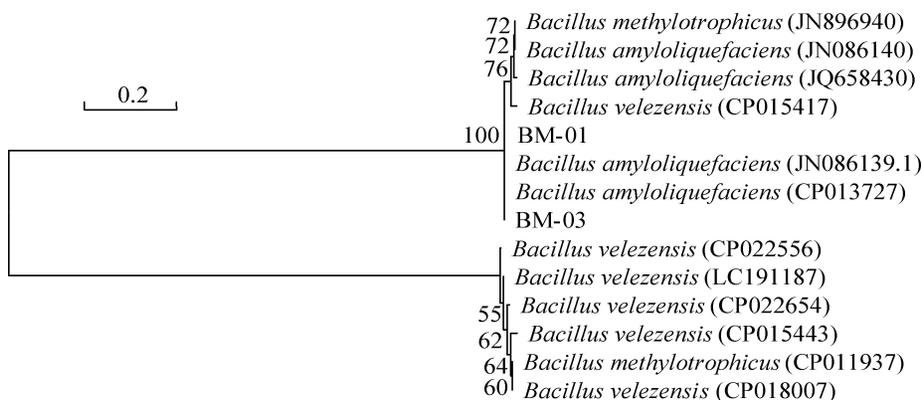


图3 基于 *gyrB* 基因序列构建菌株BM-01和BM-03与其相关菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of strains BM-01, BM-03 and other related strains based on the *gyrB* gene sequences

3 讨论

目前,关于苹果再植病害的生防效果指标缺乏统一的标准,田间试验中多将新枝伸长长度、干重、茎粗增量、株高及果实中各物质含量作为测量指标(Manici et al., 2013; Liu et al., 2014)。本研究选择株高、茎粗、干重、鲜重及叶面积等生长势指标来反

映木美土里复合微生物菌剂对苹果再植病害的生防效果,结果表明该菌剂对海棠苗的株高、茎粗、重量、叶面积等生长指标均有促进作用,且对苹果再植病的防治效果显著,显著优于常用于防治土传病害的化学药剂恶霉灵(庄敬华等,2005),这在生产中较罕见。分析可能的原因有2个,一是盆栽土壤环境相对于大田比较简单,有利于木美土里复合微生物菌

剂中的拮抗微生物发挥作用;二是木美土里复合微生物菌剂不仅含有微生物,其作为肥的功效也相当显著,具有促进幼苗生长的作用,这与刘旭等(2010)的研究结果一致。

本研究通过对分离所得拮抗菌株的ITS/*gyrB*序列进行分析,并结合形态特征观察来判断该菌株的归属。拮抗菌株所表现出的形态特征及其相应的序列分析所得结果基本一致。表明依据形态特征、分子序列分析对该菌株进行分类鉴定,其结果是可信的(孙卓和杨利民,2015;周登博等,2016)。本研究筛选到的3株拮抗菌被鉴定为哈茨木霉与解淀粉芽胞杆菌,木霉菌作为一种生防菌已广泛应用于防治各类植物病害(Forge et al., 2016),芽胞杆菌是土壤微生物生态的一种优势种群,能形成具有较强抗逆能力的芽孢,有利于其在生物有机肥的生产、加工及在土壤环境中存活、定殖与繁殖(梅新兰等,2010),表明通过本试验鉴定筛选到的拮抗菌的方法准确可信,且此结果与木美土里复合微生物菌剂防病促生的特性相一致。

本研究在前期开展了大田试验的基础上,在盆栽海棠幼苗上通过可控试验进一步明确了木美土里复合微生物菌剂对再植病害的生防效果,并对菌剂中的几种可分离微生物进行了分离培养和室内拮抗效果测试,进而对拮抗效果较好的3株菌株进行了鉴定。这一研究思路与常见研究思路有所不同。已有研究报道多数是从筛选微生物菌株入手,通过大量筛选微生物,获得拮抗作用较强的微生物菌株,然后针对该菌株开展较为深入的理论研究。但是这些菌株离生产应用还相距甚远,很多菌株因不能用于生产制剂或田间试验防治效果不稳定(张瑜,2007),而在经过大量研究后被放弃,浪费了人力物力。本研究选用的微生物菌剂已经在生产中得到较为广泛的应用,这就解决了菌株的实用性问题。同时,市场上的菌剂多种多样,但这些菌剂多以肥料进行登记,对再植病害的防治效果难以确定,推广应用存在很大的隐患。而本研究明确了木美土里复合微生物菌剂对再植病害的防治效果,有助于其推广应用,也为在苹果生产中制定切实可行的再植病害解决方案提供了技术和物质储备。此外,木美土里复合微生物菌剂的菌种从国外引进,其种类组成并无报道,本试验对可分离菌株进行了分离和鉴定,对于明确其菌种组成并获得高效拮抗菌株,进而为下一步深入开发并最终形成自主创新的复合微生物菌剂奠定了理

论基础。

参考文献 (References)

- Biro B, Magyar K, Varady GY, Kecskes M. 1998. Specific replant disease reduced by PGPR rhizobacteria on apple seedlings. *Acta Horticulturae*, 477: 75-81
- Braun PG. 1995. Effects of *Cylindrocarpon* and *Pythium* species on apple seedlings and potential role in apple replant disease. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 17(4): 336-341
- Catska V, Hudská G. 1993. Use of *Agrobacterium radiobacter* for biological control of apple replant disease. *Acta Horticulturae*, 324: 67-72
- Cheng LJ, Xue QH. 2012. *Laboratory manual of microbiology* (2nd edition). Beijing: Science Press (in Chinese) [程丽娟, 薛泉宏. 2012. 微生物学实验技术(第2版). 北京: 科学出版社]
- Dong XZ, Cai MY. 2001. *Handbook of systematic identification of common bacteria*. Beijing: Science Press, pp. 349-388 (in Chinese) [东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, pp. 349-388]
- Forge T, Neilsen G, Neilsen D. 2016. Organically acceptable practices to improve replant success of temperate tree-fruit crops. *Scientia Horticulturae*, 200: 205-214
- Hu QY, Liu LW, Liu X, Dang JM, Fan JY, Wang ST, Cao KQ. 2015. Evaluation of the effect of Kimidori bioorganic fertilizer on the control of apple canker disease. *China Fruits*, (4): 52-55 (in Chinese) [胡清玉, 刘力伟, 刘欣, 党建美, 范军印, 王树桐, 曹克强. 2015. 木美土里生物菌肥对苹果树腐烂病的防治作用评价. 中国果树, (4): 52-55]
- Jiang YM, Ge SF. 2016. A coup for apple orchard to "rejuvenate" by improving the soil and reducing the fertilizer. *Farmers Daily*, 10-20(7) (in Chinese) [姜远茂, 葛顺峰. 2016. 苹果园“返老还童”改土减肥有妙招. 农民日报, 10-20(7)]
- Kandula DRW, Jones EE, Horner IJ, Stewart A. 2010. The effect of *Trichoderma* bio-inoculants on specific apple replant disease (SARD) symptoms in apple rootstocks in New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, 39(4): 312-318
- Krumholz MR, Klein RI, McKee CF, Offner SSR, Cunningham AJ. 2009. The formation of massive star systems by accretion. *Science*, 323(5915): 754-757
- Li BZ, Wang YJ, Wang XL. 2013. The effect of Kimidori fertilizer on the control of apple scar skin and canker disease. *Yantai Fruits*, (3): 10-12 (in Chinese) [李丙智, 王洋娟, 王晓琳. 2013. 木美土里防控苹果花脸及腐烂病的效果试验. 烟台果树, (3): 10-12]
- Liu ET, Wang GS, Li YY, Shen X, Chen XS, Song FH, Wu SJ, Chen Q, Mao ZQ. 2014. Replanting affects the tree growth and fruit quality of Gala apple. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(8): 1699-1706
- Liu J. 2009. The international competition ability research of China apple industry. Master Thesis. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese) [刘婧. 2009. 中国苹果产业国际竞争力研究. 硕士

- 学位论文. 杨凌:西北农林科技大学]
- Liu LW, Liu LY, Hu TL, Wang YN, Wang ST, Cao KQ. 2016. Biocontrol effect of *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 against apple replant disease. *Journal of Plant Protection*, 43(5): 812–818 (in Chinese) [刘力伟, 刘丽媛, 胡同乐, 王亚南, 王树桐, 曹克强. 2016. 荧光假单胞菌 SS101 对苹果再植病害的生防效果. *植物保护学报*, 43(5): 812–818]
- Liu X, Shao XH, Mao XY, Shan JM. 2010. Effects of EM bio-organic fertilizer on growth and soil characteristics of sweet corn. *Jiangsu agricultural sciences*, (1): 301–302 (in Chinese) [刘旭, 邵孝侯, 毛欣宇, 单建明. 2010. EM 生物有机肥对甜玉米生长发育及土壤特性的影响. *江苏农业科学*, (1): 301–302]
- Manici LM, Kelderer M, Caputo F, Mazzola M. 2015. Auxin-mediated relationships between apple plants and root inhabiting fungi: impact on root pathogens and potentialities of growth-promoting populations. *Plant Pathology*, 64(4): 843–851
- Manici LM, Kelderer M, Franke-Whittle IH, Ruhmer T, Baab G, Nicoletti F, Caputo F, Topp A, Insam H, Naef A. 2013. Relationship between root-endophytic microbial communities and replant disease in specialized apple growing areas in Europe. *Applied Soil Ecology*, 72: 207–214
- Mazzola M. 1998. Elucidation of the microbial complex having a causal role in the development of apple replant disease in Washington. *Phytopathology*, 88(9): 930–938
- Mei XL, Zhao QY, Tan SY, Xu YC, Shen B, Shen QR. 2010. Screening, identification, and biocontrol effect of antagonistic bacteria against *Phytophthora capsici*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 21(10): 2652–2658 (in Chinese) [梅新兰, 赵青云, 谭石勇, 徐阳春, 沈标, 沈其荣. 2010. 辣椒疫病拮抗菌株筛选、鉴定及其防效. *应用生态学报*, 21(10): 2652–2658]
- Sun Z, Yang LM. 2015. Screening and identification of antagonistic bacteria against *Panax ginseng* pathogeny fungus. *Journal of Plant Protection*, 42(1): 79–86 (in Chinese) [孙卓, 杨利民, 2015. 人参病原菌拮抗菌的分离筛选与鉴定. *植物保护学报*, 42(1): 79–86]
- Zhang Y. 2007. Control effect of bio-product Kangdi 3 on replant diseases of strawberry. Master Thesis. Baoding: Agricultural University of Hebei (in Chinese) [张瑜. 2007. 生物制剂康地3号对草莓再植病害的防治作用研究. 硕士学位论文. 保定: 河北农业大学]
- Zhao YS. 2014. A brief analysis of apple industry development in China. *Scientific Planting*, (9): 5–7 (in Chinese) [赵玉山. 2014. 我国苹果产业发展浅析. *科学种养*, (9): 5–7]
- Zhou DB, Jing T, Zhang XY, Qi DF, Chen YF, Wang F. 2016. Screening and antibacterial activity of antagonistic bacteria against banana *Fusarium* wilt disease. *Journal of Plant Protection*, 43(6): 913–921 (in Chinese) [周登博, 井涛, 张锡炎, 起登凤, 陈宇丰, 王飞. 2016. 香蕉枯萎病拮抗菌筛选及其抑菌活性. *植物保护学报*, 43(6): 913–921]
- Zhuang JH, Gao ZG, Chen J, Huang YQ, Xu S. 2005. Determination of virulence of 5 fungicides against *Trichoderma* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Protection*, 31(3): 84–86 (in Chinese) [庄敬华, 高增贵, 陈捷, 黄艳清, 徐韶. 2005. 5种杀菌剂对木霉菌及尖孢镰刀菌的毒力测定. *植物保护*, 31(3): 84–86]
- Zou QJ, Wang ST, Liang KJ, Wang YN, Hu TL, Han ZQ, Cao KQ. 2014. Suspected pathogenic *Fusarium* spp. isolated from apple orchard soils in Hebei Province. *Mycosystema*, 33(5): 976–983 (in Chinese) [邹庆甲, 王树桐, 梁魁景, 王亚南, 胡同乐, 韩之琪, 曹克强. 2014. 河北省苹果园根际土壤中疑似致病镰孢菌种类. *菌物学报*, 33(5): 976–983]

(责任编辑:李美娟)