

DOI:10.3969/j.issn.2096-8248.2024.01.003

## 草莓灰霉病病原菌分离鉴定及拮抗微生物筛选\*

严浩,于佳乐,朱强,张悦,李安妮,李玉婷,夏艳秋

(江苏海洋大学 食品科学与工程学院,江苏 连云港 222005)

**摘要:**草莓灰霉病是草莓种植过程中的主要病害之一。通过对连云港市东海县和徐州市贾汪区草莓基地草莓灰霉病病原菌进行分离纯化,获得一株生长优势病原菌,命名为A03。经过形态学观察、分子生物学鉴定,鉴定其为灰葡萄孢属(*Botrytis cinerea*)富克葡萄孢盘菌(*Botryotinia fuckeliana*)。利用平板对峙生长法筛选出一株对A03具有拮抗作用的微生物,命名为ZXY-1,通过分子生物学鉴定为海洋解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。ZXY-1对A03抑菌圈半径达12.67 mm,ZXY-1发酵上清液对A03孢子萌发相对抑制率为58.92%,结果显示ZXY-1发酵液对草莓果具有明显的保鲜作用。海洋解淀粉芽孢杆菌ZXY-1在草莓种植和生长中具备应用潜力。

**关键词:**草莓灰霉病;拮抗菌;解淀粉芽孢杆菌;抑菌活性

**中图分类号:**Q939.95 **文献标志码:**A **文章编号:**2096-8248(2024)01-0016-08

**引用格式:**严浩,于佳乐,朱强,等.草莓灰霉病病原菌分离鉴定及拮抗微生物筛选[J].江苏海洋大学学报(自然科学版),2024,33(1):16-23.

## Isolation and Identification of Strawberry Gray Mold Pathogen and Screening of Antagonistic Microorganisms

YAN Hao, YU Jiale, ZHU Qiang, ZHANG Yue, LI Anni, LI Yuting, XIA Yanqiu

(School of Food Science and Engineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

**Abstract:** Strawberry gray mold is one of the important diseases in strawberry production. By isolating and purifying the pathogen of strawberry gray mold from strawberry bases in Donghai County, Lianyungang and Jiawang District, Xuzhou, a growth dominant pathogen A03 was obtained. After the morphological observation and molecular biological identification, it was identified as *Botryotinia fuckeliana*. A strain of ZXY-1 which had antagonistic effect on A03 was screened by plate confrontative growth method and identified as marine *Bacillus amyloliquefaciens* by molecular biology. ZXY-1 had inhibition radius of 12.67 mm on A03, and inhibition rate of ZXY-1 fermentation liquid on spore germination of A03 was 58.92%. The experiment showed that ZXY-1 fermentation liquid had obvious fresh-keeping effect on strawberry fruit. Therefore, marine *Bacillus amyloliquefaciens* ZXY-1 has the potential to be used in strawberry production.

**Key words:** strawberry gray mold; antagonistic microorganisms; *Bacillus amyloliquefaciens*; antibacterial activity

\* 收稿日期:2023-02-15;修订日期:2023-06-03

基金项目:江苏省政策引导类计划苏北科技专项(LYG-SZ201806);连云港市“521工程”专项(LYG52105-2018046)

作者简介:严浩(1996—),男,江苏宿迁人,硕士研究生,研究方向为生物防治、食品加工与安全等,(E-mail)414651169@qq.com。

通信作者:夏艳秋(1977—),女,江苏徐州人,讲师,研究方向为生物发酵、生物防治等,(E-mail)xyq78412@163.com。

草莓灰霉病是由半知菌亚门、丛梗孢目、丛梗孢科、葡萄孢属的灰葡萄孢菌侵染引起的植物病害,由于其繁殖速度快、宿主广泛<sup>[1]</sup>、适应性强、腐生性强,可以导致水果茎叶、果实的枯萎、腐烂<sup>[2]</sup>,严重影响草莓的产量和品质。江苏省是我国优质草莓主产区之一<sup>[3]</sup>。根据国家统计局相关统计,2018 年江苏省草莓种植总面积为 20 180 hm<sup>2</sup>,位列全国第一<sup>[4]</sup>。草莓生长中以及采收后极易感染灰霉病<sup>[5]</sup>。据报道,北方地区灰霉病发病率在 20%~40%,产量损失 8%~20%<sup>[6]</sup>,病菌防治存在困难,尤其在高温潮湿环境下,减产甚至高达 60%<sup>[7]</sup>,草莓果采后损失率达 89%<sup>[8]</sup>。

草莓灰葡萄孢菌的防治方法和措施种类繁多,目前灰霉菌防治主要依赖化学杀菌剂,但化学法杀菌不仅污染大、残留多,还存在多重抗药性问题<sup>[9]</sup>;碘法熏蒸同样存在污染严重、残留较大的问题,且会耗费大量人力物力<sup>[10]</sup>。随着微生物技术的快速发展,微生物制剂因具有绿色安全、简单高效等特性而被运用到草莓种植的其他过程中。从食用价值上看,病果防治意义不大,但病果却是病菌传染源。一旦发现病情需要及时清除病果,而清除过程不可避免会出现灰霉孢子扩散,喷洒微生物制剂后再移除病果可以有效减少损失。目前市场上缺乏成熟的灰霉病微生物制剂,而高抗灰霉病的草莓品种更是难求。筛选出实用高效的微生物制剂势在必行。

本文通过对连云港市东海县、徐州市贾汪区草莓基地进行调查采样,从种植基地灰霉病高发区病株中分离纯化出灰霉病主要致病菌,针对该区域草莓病害进行拮抗微生物的筛选并探索其生物防治作用效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

草莓病果等,由东海县庆博草莓种植专业合作社于连云港东海县、徐州贾汪区采样提供,每个地区随机选取 3~5 块大棚进行病果采集,共获得 30 份样品。病样置于自封袋中,及时进行病原菌分离,选择一株优势病原菌进行研究。

细菌培养基:LB 培养基。真菌培养基:PDA 培养基。孢子萌发液:PD 液体培养基。

### 1.2 主要试剂

石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇、乙醇、尿素、葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉等常用试剂均为分析纯,

购自国药集团。

### 1.3 主要设备

JY99-2D 超声波细胞破碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;IS-RDS3 恒温振荡器,上海珂淮仪器有限公司;SW-CJ-1F 超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;HH·B II·420-BS 电热恒温培养箱,上海博泰实验设备有限公司。

### 1.4 实验方法

1.4.1 草莓灰霉病菌的分离及鉴定 将新鲜采收的草莓病果用体积分数 75%乙醇浸泡 3 次,每次 5 min,充分研磨。取 10 g 草莓浆加入含 90 mL 无菌水和玻璃珠的三角瓶中,充分震荡,脱脂棉过滤,梯度稀释,涂布在含 100 μg/mL 链霉素的 PDA 平板上,分离单孢进行培养,25 °C 黑暗恒温培养 3 d。待菌落形成后,挑取边缘菌丝接种至新 PDA 培养基平板上进一步纯化培养。病原菌纯化后使用乳酸石碳酸棉蓝进行染色,观察并记录菌体的菌丝、分生孢子以及分生孢子梗的形态特征。将纯化后的灰霉菌试管保藏,低温送至上海生工生物技术有限公司检测。

1.4.2 拮抗微生物的分离、筛选及鉴定 拮抗微生物供试菌株来源于实验室保藏菌株,菌株分离自连云港高公岛海域盐碱地附近土样、水土混合样。分离方法:取采集样品 10.0 g,混合于含有玻璃珠和 90 mL 无菌水的锥形瓶中,充分振荡 20 min,取 1 mL 土壤悬浮液加入盛有 9 mL 无菌水的试管中,充分振荡,依次梯度稀释至 10<sup>-9</sup>;从 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup> 的试管中分别取 0.2 mL 于 LB 固体培养基上涂布,于 28 °C 恒温倒置培养 3 d,每个稀释度重复 3 次。挑选单菌落三区划线,得到的菌株通过平板对峙法<sup>[11]</sup>筛选灰霉菌拮抗菌株。

取直径为 13 mm 的“1.4.1”所得草莓灰霉病菌菌饼,置于 PDA 培养基平板(Φ90 mm)中央,平板划线分区,各区域分别点样上述所得分离菌株,采用对峙培养法,25 °C 培养 4~5 d,观察抑菌圈大小,用十字交叉法测量抑菌圈。

初筛、复筛得到的抑菌活性拮抗菌进行 LB 摇瓶发酵,培养条件为:37 °C,180 r/min 培养 24 h。在 PDA 平板上接种纯化后的草莓灰霉菌菌饼,周围均匀放置 3 个牛津杯,备用。发酵结束后,发酵液 4 °C,8 500 r/min 离心 15 min,在上述 PDA 平板牛津杯中加入上清液 100 μL,以添加 LB 培养基为空白对照。25 °C 暗光培养,待牛津杯周围形成明显抑菌圈时测量,采用十字交叉法测量抑菌圈半径,筛选出抑菌效果最佳的拮抗微生物菌株进行后续试验。

参考《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[12]</sup>,进行简单染色、革兰氏染色及芽孢染色,结合分子生物学技术鉴定拮抗微生物。

1.4.3 拮抗微生物有效抑菌物质的定性研究 在LB培养基中接种1%拮抗菌种子液,37℃,180 r/min发酵24 h,4℃,8 500 r/min离心15 min,分别取上清液、菌体超声破碎上清液进行活性预实验,确定胞内、胞外物质抑菌活性。使用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯对发酵上清液依次进行萃取,所得浸膏用甲醇溶解,对各分离相及乙酸乙酯萃余相分别进行抑菌试验,各萃取相有机溶剂以及甲醇作空白对照。

1.4.4 拮抗微生物的初步应用 孢子萌发试验<sup>[13]</sup>:分别采用发酵上清液(处理A)、萃余相(处理B)、PD培养液(CK)处理孢子悬液,25℃培养7 d的灰霉菌PDA平板上加入5 mL PD液体培养基,刮取孢子,用四层纱布过滤菌丝,制成孢子悬浮液,用PD液体培养基调整孢子浓度至40倍显微镜每视野20孢子左右。在无菌载玻片上滴加10 μL孢子悬浮液,添加过0.22 μm滤膜各试样10 μL,缓慢盖上无菌盖玻片,避免产生气泡,置于培养皿中,滴加少量无菌水保湿,置于25℃恒温恒湿培养箱中培养,每4 h观察一次,计算孢子萌发率及抑制率。

$$\text{萌发率} = \frac{\text{萌发数}}{\text{总数}} \times 100\%$$

$$\text{抑制率} = \frac{\text{总数} - \text{萌发数}}{\text{总数}} \times 100\%$$

菌丝生长:对峙培养结合插片法观察菌丝生长形态变化情况。

采后草莓防病保鲜试验:取新鲜饱满、大小一致的草莓果实,75%酒精消毒后在草莓表面挖取0.1 cm<sup>3</sup>,在伤口处以表1方式处理接种试样,草莓C样液先接种50 μL拮抗菌发酵上清液,以接种LB培养基为对照,静置2 h后接种50 μL灰霉菌孢子悬浮液,接种后草莓放置于恒温恒湿培养箱培养,观察草莓采后果实颜色、伤口处霉变情况。

表1 草莓果实侵染试验及发酵液拮抗作用验证

Table 1 Strawberry fruit infection test and antagonism verification of fermentation fluid

样液	草莓 A	草莓 B	草莓 C
孢子悬浮液	+	-	+
LB培养基	-	+	-
拮抗菌发酵上清液	-	-	+

注:“+”表示添加50 μL该溶液,“-”表示不添加该溶液。A、B、C分别为孢子悬浮液组、对照组、拮抗菌发酵液处理组。

## 2 结果与分析

### 2.1 草莓灰霉病菌的分离及鉴定

2.1.1 草莓灰霉病菌的分离 通过病体组织分离得到一株草莓灰霉病生长优势病原菌,命名为A03,平板培养形态见图1。草莓灰霉病菌在PDA平板菌落为白色不透明辐射绒毛状,菌丝体发达,边缘不规则,后期逐渐变为灰色,7 d后形成圆形或椭圆形黑色菌核。

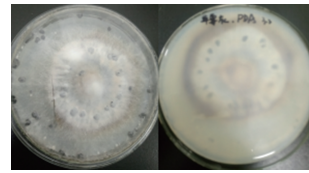
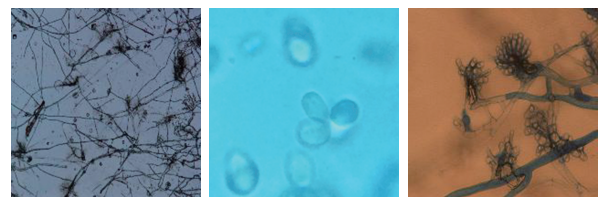


图1 草莓灰霉病菌A03平板产生黑色菌核

Fig. 1 Black sclerotia produced by strawberry gray mold A03 plate

2.1.2 草莓灰霉病菌的鉴定 预实验表明,草莓灰霉病菌A03在25℃恒温培养条件下生长较快。将A03菌饼置于PDA平板25℃培养6 d后,在40×10倍下镜检观察基内菌丝、分生孢子、孢子梗。如图2所示,草莓灰霉病菌的菌丝细、直、长,有横隔(图2a);分生孢子为透明单胞,呈椭圆形(图2b);分生孢子梗细长有色,近顶部呈二叉状分枝,孢子梗粗壮,分生孢子梗顶部细胞膨大,呈球形,孢子梗上分生孢子聚集成葡萄穗状,无色或灰色,卵圆形单胞(图2c)。



a 菌丝 b 孢子 c 孢子梗

图2 培养6 d后的草莓灰霉病菌镜检结果

Fig. 2 Microscopic examination results of strawberry gray mold pathogen after 6 days of cultivation

草莓灰霉病菌经上海生工DNA测序,序列结果分析为519 bp,符合预期。在NCBI网站使用BLAST程序对草莓灰霉病菌ITS基因序列与其他真菌基因序列的同源性和亲缘关系进行系统发育分

析,构建系统进化树如图 3 所示。结果表明,菌株 CMHM A03 与 *Botrytis cinerea* FK-S53 (O Q259533.1) 亲缘关系最近,序列相似度达 66%。根

据生物学特征以及序列比对结果鉴定草莓灰霉病菌为灰葡萄孢属(*Botrytis cinerea*)中的富克葡萄孢盘菌(*Botryotinia fuckeliana*)。

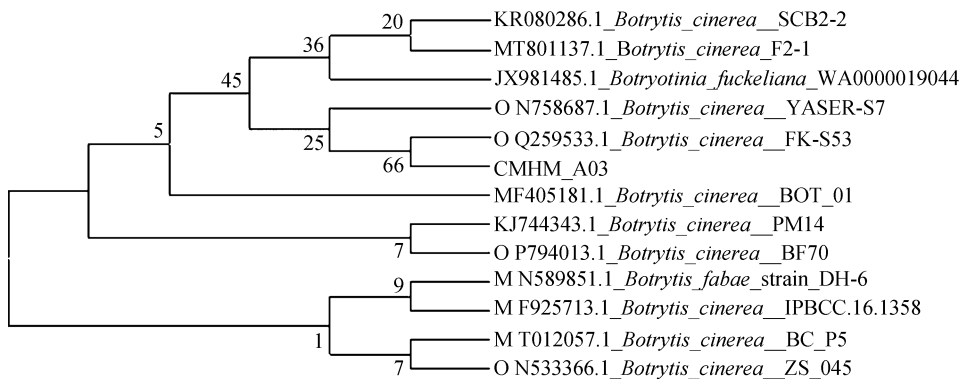


图 3 草莓灰霉病菌系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of strawberry gray mold pathogen

## 2.2 草莓灰霉病菌拮抗微生物的筛选及鉴定

2.2.1 草莓灰霉病菌拮抗微生物的筛选 采用平板对峙生长法对分离到的菌株进行初筛,初步筛选出有抑菌活性的菌株共计 27 株,保藏备用。抑菌效果如图 4 所示,其中 ZXY-1, M2 ZXC-2, ZXC-5-1, 抗 1 和海 LB B5 抑菌效果较佳,其抑菌圈半径分别为 12.67, 12.60, 12.00, 12.00, 11.70 mm。对上述 5 株菌株进行终筛,终筛结果如图 5 所示,终筛抑菌效果如图 6 所示。菌株 ZXY-1 抑菌效果最佳,24 h 发酵液上清液抑菌半径达(10.44±0.43)mm,生长速度快,发酵生产周期相对较短,故选择 ZXY-1 进行后续试验。

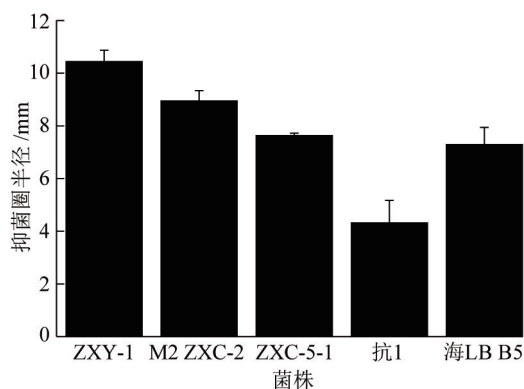


图 5 拮抗微生物终筛试验结果

Fig. 5 Results of end screening test on antagonistic microorganisms

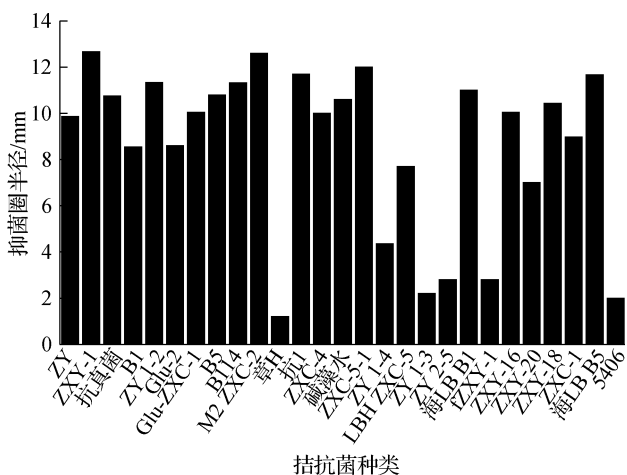


图 4 拮抗微生物复筛试验结果

Fig. 4 Results of re-screening test on antagonistic microorganisms

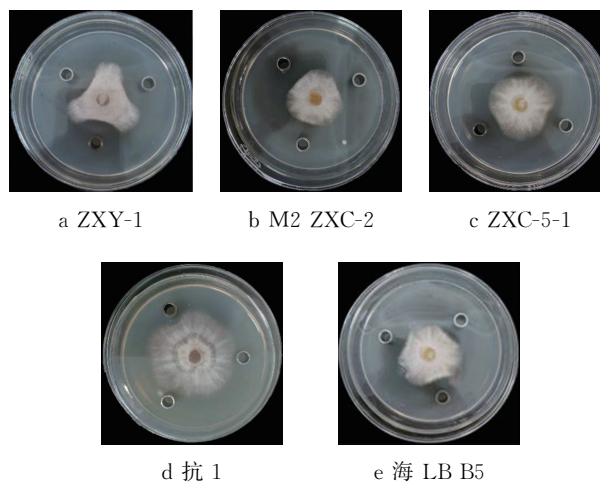


图 6 拮抗微生物终筛抑菌效果

Fig. 6 Bacteriostatic effect of antagonistic microorganisms

2.2.2 草莓灰霉病菌拮抗微生物的鉴定 对拮抗效果最佳的细菌 ZXY-1 进行平板形态、染色形态观察以及系统发育树比对。在 LB 培养基平板上三区划线接种 ZXY-1 菌株,37 °C 下培养,观察菌落平板形态。生长 1 d 菌落圆形扁平、光滑湿润(图 7a),3 d 后中心为苍白色四周呈现乳白色(图 7b),7 d 后变干(图 7c),边缘粗糙凸起;ZXY-1 菌株生长速度快,易挑起。

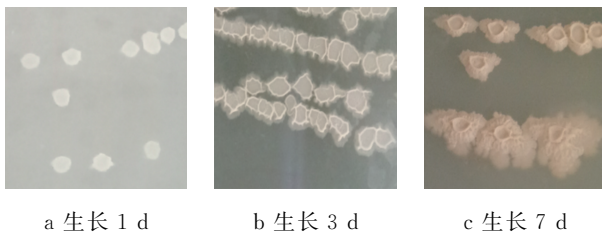
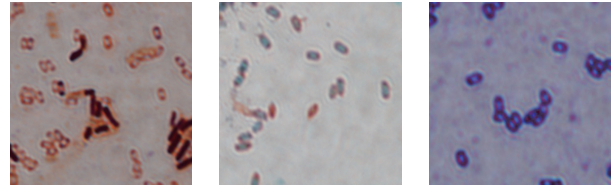


图 7 ZXY-1 的平板菌落特征

Fig. 7 Characteristics of plate colony of ZXY-1

对细菌 ZXY-1 进行革兰氏染色、芽孢染色、简单染色,观察染色显微形态(图 8)发现,其为革兰氏

阳性菌,显微形态为短杆状,两端圆润;菌体长度约有 3~4  $\mu\text{m}$ ;产芽孢,芽孢为卵圆形;芽孢位于菌体中央、芽孢生长方式为两端延长,芽孢形成后菌体不膨大。



a 革兰氏染色 b 芽孢染色 c 简单染色

图 8 ZXY-1 的革兰氏染色、芽孢染色和简单染色结果

Fig. 8 ZXY-1 Gram staining, spore staining, and simple staining

拮抗微生物 ZXY-1 的 PCR 产物送样上海生工测序,序列结果分析为 1 422 bp,符合预期。在 NCBI 网站使用 BLAST 程序对 ZXY-1 的 16S rDNA 基因序列与其他细菌基因序列的同源性和亲缘关系进行系统发育分析,构建简单的系统进化树如图 9 所示。

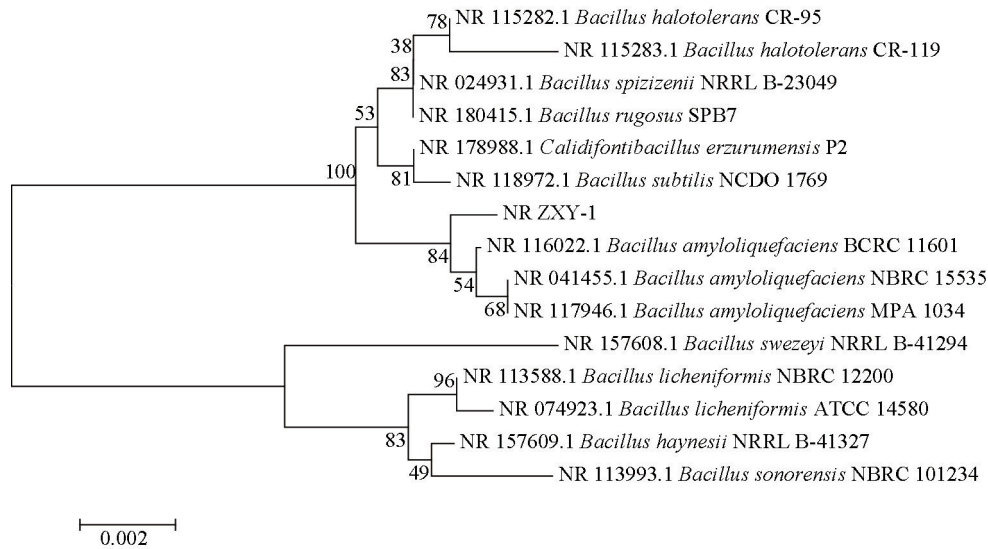


图 9 ZXY-1 系统发育分析

Fig. 9 Phylogenetic analysis of ZXY-1

根据生物学特征以及序列比对结果,可判断其为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

### 2.3 草莓灰霉病菌拮抗微生物的初步应用

2.3.1 拮抗微生物发酵液有机溶剂萃取物活性 预实验发现细胞体(细胞内容物或细胞结构成分)无抑菌效果,ZXY-1 有效抑菌物质为细胞发酵产物

(胞外分泌物),故采用发酵上清液分级萃取,粗提物用甲醇溶解。图 10 粗提物抑菌实验结果表明,乙酸乙酯萃取相以及萃余相均有抑菌效果,其他有机溶剂萃取物以及甲醇对照无抑菌效果,乙酸乙酯能够将抑菌活性物质部分萃取,萃余相抑菌活性更高,说明活性物质极性略高于乙酸乙酯。

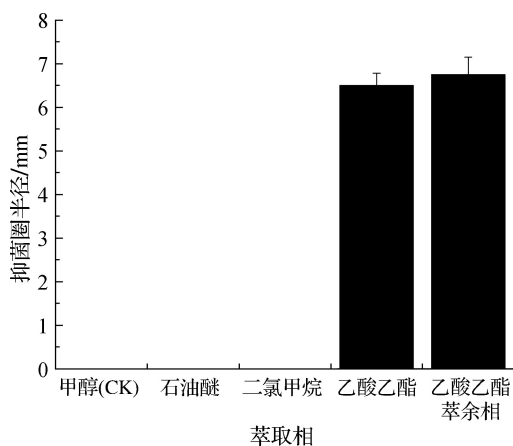


图 10 发酵液有机溶剂萃取物活性

Fig. 10 Activity of organic solvent extracts from fermentation broth

2.3.2 发酵液对孢子萌发的抑制作用 在孢子悬浮液中加入不同浓度发酵上清液,以空白液体培养基作对照,观察发酵液对孢子的影响。如图 11 所示,CK 孢子开始萌发时(图 11a),原发酵液处理组(图 11b)孢子萌发受抑制,孢子收缩,细胞内容物出现皱缩、空洞;CK 孢子萌发 36 h 芽管细长呈豆芽状(图 11c),体积分数 25% 发酵液处理组孢子萌发率低,芽管短粗(图 11d),拮抗菌发酵液对灰霉孢子萌发有较强的抑制作用。

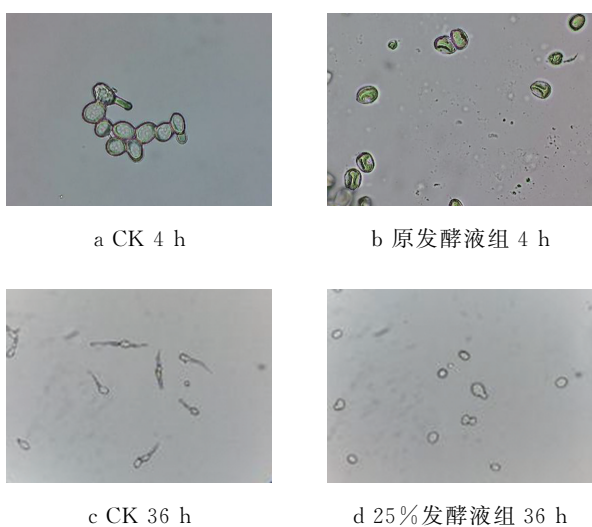


图 11 灰霉菌孢子受抑制前后

Fig. 11 Inhibition of gray mold pathogen spores

在对照组孢子萌发率达到 90% 以上时(约 8 h 后)观察其他组孢子萌发情况。由表 2 可知,对照组孢子率为 92.31% 时,上清液组、萃余相组对孢子萌

发相对抑制率达到 58.92% 和 41.32%,表明 ZXY-1 对草莓灰霉菌孢子萌发具有抑制作用。

表 2 孢子萌发实验结果

项目	处理 A 发酵上清液	处理 B 萃取相	对照 PD
萌发率	35.00	50.00	92.31
处理校正萌发率	37.92	54.17	100
相对萌发抑制率	58.92	41.32	

2.3.3 拮抗微生物对菌丝生长的抑制作用 挑取平板对峙生长受抑制(抑菌圈)菌丝,水镜片法观察受抑制菌丝,插片法观察对照组菌丝。如图 12 所示,处理组 b 菌丝隔膜收缩,菌丝体扭曲变形(图 12b),处理组 c 扭曲程度更大,呈绳索状(图 12c)。受抑制菌丝部分膨大,菌丝端部萎缩缢裂,表明发酵液对草莓灰霉菌病菌菌丝有抑制作用。

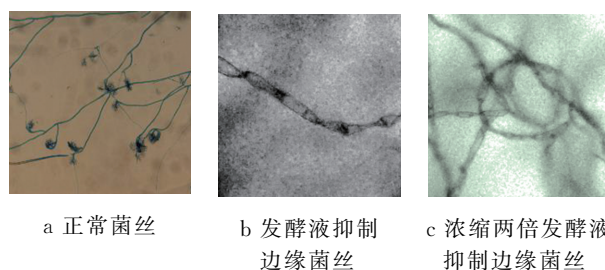
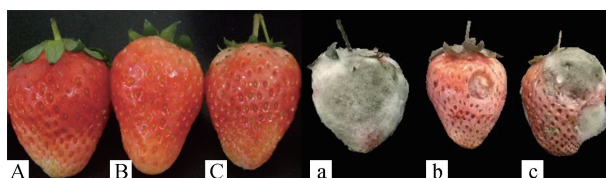


图 12 草莓灰霉菌受抑制前后菌丝的显微特征

Fig. 12 Microscopic characteristics of mycelium of strawberry gray mold pathogen

2.3.4 致病性侵染试验及发酵液防病作用 致病性侵染试验及发酵液防病作用试验结果如图 13 所示,A 组为致病性侵染验证,C 组为发酵液防病保鲜效果实验。



注:A,B,C 为处理前果实;a,b,c 为处理 2 d 后果实。

图 13 侵染验证与发酵液拮抗效果

Fig. 13 Infection verification and antagonistic effect of fermentation fluid

B 组未接种灰霉菌孢子悬浮液,A,C 组接种 50

$\mu\text{L}$  孢子悬浮液, C 组还添加了拮抗菌 ZXY-1 发酵液。a 组的病害症状与分离病株病害症状一致, 分离纯化的草莓灰霉病菌可以诱发草莓果实灰霉病症; 接种了 ZXY-1 发酵液的草莓具有一定防病能力, 对照组 a 草莓长满灰霉菌时, c 组草莓灰霉菌霉变面积约为 1/3; a 组在接种后 1 d 开始霉变, c 组在第 2 d 开始有褐变斑块, 第 3 d 开始霉变, ZXY-1 发酵液可以有效延缓草莓灰霉病发病时间 1~2 d。

### 3 讨论

连云港市东海县和徐州市贾汪区筛选得到的草莓基地灰霉病生长优势病原菌, 经形态学和分子生物学鉴定及致病性测定, 鉴定为灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*)。

目前, 对灰霉病具有防治效果的微生物有真菌、链霉菌、细菌、酵母, 其中研究与应用较为广泛的真菌有木霉、酵母等<sup>[14]</sup>。蒋妮等<sup>[15]</sup>筛选的棘孢木霉 F2 菌株发酵液稀释 5 倍对灰霉菌菌丝生长抑制率为 92.6%、对孢子萌发的抑制率为 82.6%; 罗琳等<sup>[16]</sup>用毕赤酵母 G5 对灰霉病离体试验, 发现对灰霉菌丝的最高抑制率为 80.20%。此外, 放线菌在灰霉病防治上表现也比较出色, 放线菌菌剂 Mycostop 中含有武夷菌素、磷氮霉素、白肽霉素、变构霉素等抗生素, 室内和田间试验均表明其防治效果较高<sup>[17]</sup>。在拮抗细菌方面防治应用最为广泛, 涉及芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、多黏芽孢杆菌、短体芽孢杆菌等近 10 种细菌<sup>[18]</sup>。

本文筛选到的高效拮抗菌海洋解淀粉芽孢杆菌 ZXY-1 对草莓灰霉病优势病原菌有明显抑制作用。解淀粉芽孢杆菌 ZXY-1 与草莓灰霉病菌平板对峙生长抑菌圈半径达 12.67 mm, 对草莓灰霉菌 A03 孢子萌发相对抑制率为 58.92%; 赵慧军等<sup>[19]</sup>从草莓病果、草莓植株根际土壤分离到枯草芽孢杆菌 HZ12 对草莓灰霉病菌抑菌直径达 21.6 mm; 吕婷<sup>[20]</sup>从宁波番茄根际土壤筛选出甲基营养型芽孢杆菌 LM-N 对番茄灰霉病菌抑菌圈直径达 23.58 mm。

在筛选方法上, 灰霉病菌拮抗菌的筛选方法目前主要为平板对峙生长法、孢子萌发率法<sup>[21]</sup>, 还有 Jiang 等<sup>[22]</sup>创新性地通过水解酶活性的强弱表征植物病害生防菌生物防效。其中平板对峙生长法能够直观表现拮抗效果, 适用于拮抗微生物普筛、初筛; 而孢子萌发率对抑菌浓度表征更精确; 当然, 酶法更

为精确、更加高效, 有望成为良好的筛选方法。

抑菌机理方面, 目前研究发现, 芽孢杆菌的抗病机制主要有与致病菌竞争营养物质和空间、分泌脂肽类化合物、有机酸、水解酶和其他抑菌物质、诱导植物产生抗性<sup>[23]</sup>。de Meyer 等<sup>[24]</sup>报道铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和哈茨木霉 T39 能诱导菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 产生水杨酸使其获得对灰霉病的抗性。Daulagala 等<sup>[25]</sup>采用假单胞菌诱导产生几丁质酶, 增强大白菜对灰葡萄孢的抗性。本实验观察抑菌物质作用后的菌丝和孢子发现, 处理组菌丝扭曲、膨大、畸形和有孔洞, 抑菌过程使得菌丝体内物质外泄, 而具体的抑菌机理需要进一步考证。ZXY-1 发酵液乙酸乙酯相有抑菌活性; Maung 等<sup>[23]</sup>从贝莱斯芽孢杆菌 CE 100 乙酸乙酯粗提得到马尿酸甲酯, 对番茄灰霉病菌抑菌率达 79.26%;

生防菌工业化应用生产不仅需要良好的防病效果, 还要具备广泛的应用场景。解淀粉芽孢杆菌是公认的植物病原真菌的生防细菌<sup>[26]</sup>, 其应用广泛。而应用场景又主要在于微生物的定殖能力, 本文筛选的拮抗菌为解淀粉芽孢杆菌, 其具有良好的定殖能力<sup>[27-28]</sup>。目前国内登记用于防治灰霉病的生物制剂有枯草芽孢杆菌、甲基营养型芽孢杆菌可湿性粉剂、多抗霉素和 20% $\beta$ -羽扇豆球蛋白多肽水剂<sup>[29-32]</sup>。

下一步将继续从拮抗菌发酵培养基的优化、抑菌活性物质的分离纯化、抑菌物质对灰葡萄孢菌的抑制作用机理和安全性能、抑菌物质对草莓防病保鲜等方面进行深入研究, 以期更好地指导生产应用。

### 参考文献:

- [1] BOONEN M, GALLACE N, BYLEMANS D, et al. Covered soilless strawberry production in the field by raised substrate beds[J]. Acta Horticulturae, 2017, 1156: 537-541.
- [2] 陈忠宪, 姚环宇, 张学明, 等. 草莓灰霉病的发生与防治措施[J]. 吉林农业, 2018(20): 68-69.
- [3] 夏艳秋, 郑宇慧, 严浩, 等. 江苏省连云港市草莓根腐病原菌的分离及鉴定[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(2): 85-90.
- [4] 常向阳, 葛悦. 江苏省草莓生产投入现状分析[J]. 中国蔬菜, 2021(9): 7-11.
- [5] VANTIG L, LESHEM Y, MASAPHY S. Resistance response enhancement and reduction of *Botrytis cinerea* infection in strawberry fruit by *Morchella conica* mycelial extract[J]. Postharvest Biology and Technol-

- ogy, 2021, 175: 111470.
- [6] 付志峰. 设施蔬菜灰霉病的发生及综合防治[J]. 湖北农机化, 2020(24): 72-73.
- [7] 王凌宇, 廖晓兰. 草莓灰霉病的防治研究进展[J]. 湖南农业科学, 2015(6): 142-144.
- [8] BENT J N, NAUJA L J, PETER H, et al. Fungicide resistance in botrytis in danish strawberry production [J]. *Erwerbs-Obstbau*, 2021, 63(1): 1-6.
- [9] 陈乐, 苗则彦, 孙柏欣, 等. 灰霉病菌抗药性研究进展[J]. 中国植保导刊, 2020, 40(4): 21-30.
- [10] 朱孔华, 李本良, 廖开志, 等. 草莓灰霉病的发生与防治[J]. 农业科技通讯, 2009(9): 215.
- [11] 朱林, 张莹, 郑晓薇, 等. 向日葵菌核病拮抗菌的筛选、鉴定及防效测定[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4688-4695.
- [12] 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: 349.
- [13] 杨红. 丁香精油对冬枣防病保鲜效应与机理研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2006.
- [14] 童蕴慧, 纪兆林, 徐敬友, 等. 灰霉病生物防治研究进展[J]. 中国生物防治, 2003, 19(3): 131-135.
- [15] 蒋妮, 白丹宇, 宋利沙, 等. 棘孢木霉 F2 菌株对三七灰霉病的生物防治作用[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 94-97.
- [16] 罗琳, 周玲璇, 刘娅. 毕赤酵母 G5 拮抗葡萄灰霉病机理初探[J]. 生物技术通报, 2017, 33(9): 210-215.
- [17] 沈寅初. 农用抗生素研究开发新进展[J]. 植保技术与推广, 1997, 17(6): 35-37.
- [18] 马晨, 周欣玥, 王全. 番茄灰霉病生物防治的研究进展[J]. 园艺与种苗, 2018(2): 61-62.
- [19] 赵慧军, 贾国军, 吴雄斌, 等. 草莓灰霉病拮抗菌的诱变筛选和有效抑菌成分分析研究[J]. 兰州职业技术学院学报, 2022, 38(1): 79-81.
- [20] 吕婷. 番茄灰霉病拮抗菌筛选及复合生物海藻液肥研制[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [21] LIU Xiaoping, WANG Jiye, GOU Ping, et al. *In vitro* inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 119(3): 223-229.
- [22] JIANG Chunhao, LIAO Mengjie, WANG Hongkai, et al. *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea* [J]. *Biological Control*, 2018, 126: 147-157.
- [23] MAUNG C E, LEE H G, CHO J Y, et al. Antifungal compound, methyl hippurate from *Bacillus velezensis* CE 100 and its inhibitory effect on growth of *Botrytis cinerea* [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(9): 159.
- [24] DE MEYER G, BIGIRIMANA J, ELAD Y, et al. Induced systemic resistance in *Trichoderma harianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea* [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1998, 104(3): 279-286.
- [25] DAULAGALA P P, ALAN E J, DAULAGLA P P, et al. L-form bacteria of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, induce chitinases and enhance resistance to *Botrytis cinerea*, infection in Chinese cabbage [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2003, 62(5): 253-263.
- [26] DIMKIC I, JANAKIEV T, PETROVIC M, et al. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms—a review [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2022, 117: 101754.
- [27] 代玉立, 潘月敏, 樊森, 等. 枯草芽孢杆菌 RSS-1R 菌株在油菜植株和土壤中的定殖以及对微生物种群数量的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2017, 44(4): 709-715.
- [28] ZHANG Nan, WU Kai, SHEN Yifei, et al. Investigation of the colonization patterns of plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 on banana roots [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2014, 37(6): 59-65.
- [29] 中国农药信息网. 防治对象: 灰霉病 [EB/OL]. (2023-02-05) [2023-02-13]. <http://www.chinapesticide.org.cn/zgnyxxw/zwb/dataCenter>.
- [30] 侯凯丽, 冯宇航, 杨从军. 枯草芽孢杆菌 WR 菌株对番茄灰霉病的生防潜力 [J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2023, 40(1): 30-34.
- [31] 史洪丽, 李腊, 郭翠梅, 等. 番茄灰霉病生防菌株 TL1 的分离、鉴定及其生防能力分析 [J]. 园艺学报, 2023, 50(1): 79-90.
- [32] 李腊, 史洪丽, 余婷婷, 等. 番茄灰霉病生防内生细菌 BR-1 的筛选鉴定及其生防性能分析 [J]. 农业生物技术学报, 2022, 30(8): 1594-1605.