

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (6) :648 - 655; 4 June 2014  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.06.007

## 拮抗细菌 XM2 的鉴定及其对梨采后黑斑病的生防作用

张晓宇<sup>1, 2</sup>, 张永杰<sup>3</sup>, 张则君<sup>1</sup>, 张姝<sup>4</sup>, 韩巨才<sup>1\*</sup>, 刘慧平<sup>1</sup>

<sup>1</sup>山西农业大学农学院, 山西 太原 030801

<sup>2</sup>山西省农业科学院农产品贮藏保鲜研究所, 山西 太原 030031

<sup>3</sup>山西大学生命科学学院, 山西 太原 030006

<sup>4</sup>山西大学应用化学研究所, 山西 太原 030006

**摘要:**【目的】对从西梅 (*Prunus domestica* L.) 果实表面分离到拮抗细菌 XM2 进行鉴定, 研究其对链格孢 (*Alternaria alternata*) 引起的梨采后黑斑病的生防作用。【方法】根据形态特征、理化性质及 16S rDNA 序列比对分析, 鉴定 XM2 的种类; 在梨果伤口上进行活体 (*in vivo*) 的抑菌试验; 在显微镜下观察 XM2 对病原菌丝的影响。【结果】XM2 鉴定为成团泛菌 (*Pantoea agglomeran*); XM2 各种处理液对梨黑斑病防效均显著好于对照, 效果由强到弱依次是: 菌悬液、发酵液、过滤液和热杀死液, 其中, 菌悬液防效达 97.73%; XM2 使用浓度越大、病原菌接种浓度越低, 防效越好; XM2 接种时间相对早的处理防效显著优于相对时间晚的处理, 即预防效果优于治疗效果。菌株 XM2 可以较好的定殖于梨果伤口; 显微镜观察发现, XM2 可使病原菌丝部分断裂, 细胞内含物外溢, 扭曲变形。【结论】本文首次报道成团泛菌菌株 XM2, 其活菌体和代谢产物对梨采后黑斑病均有生防作用。

**关键词:** 梨, 采后, 黑斑病, 成团泛菌, 生物防治, 拮抗细菌

**中图分类号:** Q935      **文章编号:** 0001-6209(2014)06-0648-08

梨黑斑病是一种危害严重的世界性气传真菌病害, 由链格孢 (*Alternaria alternata*) 引起, 在梨果采前和采后均有发生。我国是梨种植和出口大国, 采后病原微生物的侵染造成采后腐烂损失严重<sup>[1]</sup>, 直接影响梨果贮运生产, 梨黑斑病的有效防治成为梨产业中亟待解决的问题。

使用化学杀菌剂控制水果的采后病害一直被认

为是最有效的控制方法<sup>[2]</sup>。然而, 随着病原菌抗药性的逐渐增加, 及人们对水果质量要求的提高和环保意识的加强, 果蔬采后生物防治方法作为一种控制采后病害的新途径, 逐渐为人们所认可, 并成为研究热点。

近年有不少关于梨黑斑病生物防治的研究报道。齐东梅等<sup>[3]</sup>筛选了一株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus*

**基金项目:** 山西省青年科技研究基金 (2011021031-2); 山西省科技攻关 (20110311013-1); 山西省留学基金 (2011-52); 山西省财政支持农业科技成果转化资金 (SCZZNCGZH201304)

\* 通信作者。Tel/ Fax: +86-354-6288679; E-mail: sxndhjc@163.com

**作者简介:** 张晓宇 (1979 -), 女, 山西原平人, 助理研究员, 硕士, 研究方向为果蔬采后生理、病理及采后病害生物防治研究。E-mail: xiaoyuzhang2005@163.com

**收稿日期:** 2013-11-17; **修回日期:** 2014-01-19

subtilis) H110, 其发酵液对梨采后黑斑病的防治率达到 86.6%。谢莉<sup>[4]</sup>从土壤中分离到金色链霉菌 (*Streptomyces aureus*) B-405, 其发酵液对梨黑斑病的抑制率为 67.4%。Benbow<sup>[5]</sup>等研究了隐球酵母属的 *Cryptococcus informominiatus* 和红酵母属的 *Rhodotorula glutinis* 对梨病害的抑菌效果, *Cryptococcus informominiatus* 和 *Rhodotorula glutinis* 在采收前 1 d 对梨进行处理, 能有效地控制梨的采后黑斑病。宋聪等<sup>[6]</sup>分离到一株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) J18, 梨果在菌悬液中浸果 30 s, 晾干后喷施接种链格孢菌, 梨黑斑病的发病率仅为 16.57%, 且菌株能在梨果上很好地定殖。

本实验室从西梅 (*Prunus domestica* L.) 果实表面分离、纯化到的具有防病活性的细菌菌株 XM2。本文报道利用形态特征、生理生化性质及 16S rDNA 序列比对分析对菌株 XM2 进行鉴定, 并研究不同的处理方法对采后梨黑斑病的生防作用, 为进一步开发应用该菌株奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

**1.1.1 供试菌株:** XM2 从山西省太原市金滩村西梅果实表面分离并纯化得到; 梨采后黑斑病原真菌链格孢菌 (*Alternaria alternata*) 由山西省农业科学院农产品贮藏保鲜研究所采后病理实验室提供; 供试标准成团泛菌 (*Pantoea agglomeran*) 菌株由中国普通微生物菌种保藏管理中心购得; 供试梨果采收于山西省太原市清徐县, 果实硬度 14.76 kg/cm<sup>2</sup>, 可溶性固形物含量 32.5%, 总酸含量 0.63%。

**1.1.2 供试培养基:** 马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基: 葡萄糖 20 g, 马铃薯 200 g, 琼脂粉 18 g, 蒸馏水 1000 mL; 马铃薯葡萄糖 (PDB) 培养基: PDA 不加琼脂; 溶菌肉汤 (LB) 培养基: 酵母粉 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂粉 18 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.4 - 7.6。

**1.1.3 试剂和主要仪器:** DNA 提取、引物均购自北京生工生物工程公司, 其他常规试剂均为国产分析纯。使用的显微镜为奥林巴斯 BX53 显微镜。

### 1.2 菌株 XM2 的鉴定

**1.2.1 形态特征和生理生化性状:** LB 平板上分别划线接种, 28℃ 恒温培养 3 - 5 d, 观察平板菌落形

态, 革兰氏染色、芽孢染色、鞭毛染色, 观察其基本形态。参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[7]</sup> 和《伯杰细菌鉴定手册(第八版)》<sup>[8]</sup> 对菌株 XM2 和标准菌株进行生理生化性状测定。

**1.2.3 16S rDNA 序列分析:** 用溶菌酶法从菌体中提取基因组 DNA, 采用通用引物<sup>[9]</sup> 进行 16S rDNA 扩增, 得到目的基因片段, PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后与 pGEM-Teasy 载体 (Promega 公司) 连接, 经限制性内切酶酶切鉴定后送测序公司测序。将得到的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的核酸数据进行 BLAST 比对, 搜索得到与其同源性最高的相关序列, 确定菌株分类地位<sup>[10]</sup>。

### 1.3 菌株 XM2 对梨黑斑病的生防效果

**1.3.1 XM2 不同处理菌液对梨黑斑病的生防效果:** 将 XM2 发酵液分别配制成发酵原液 (浓度  $1 \times 10^6$  cfu/mL)、过滤液 (经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤)、菌悬液 (培养原液离心后, 弃上清, 经灭菌水清洗 2 次, 浓度  $1 \times 10^6$  cfu/mL)、热杀死液 (培养原液在 121℃ 下高压灭菌 20 min), 对照 1 为无菌水, 对照 2 为灭菌的培养基液。上述 6 种处理液分别取 30  $\mu$ L 接种于梨果伤口 (3 mm  $\times$  3 mm), 晾干后, 分别取  $1 \times 10^5$  个孢子/mL 梨黑斑病菌孢子液 15  $\mu$ L 接种于梨果伤口, 晾干, 套袋保湿, 25℃ 恒温培养 7 d, 统计发病情况。每个处理 10 个梨果, 重复 3 次<sup>[11]</sup>。梨果实发病程度分级标准<sup>[12]</sup>: 0 级: 无病; 1 级: 病斑占果表面积的 1% 以下; 3 级: 病斑占果表面积的 2% - 3%; 5 级: 病斑占果表面积的 4% - 6%; 7 级: 病斑占果表面积的 7% - 10%; 9 级: 病斑占果表面积的 11% 以上。

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

$$\text{防治效果} = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100$$

**1.3.2 XM2 不同接种浓度对梨黑斑病的生防效果:** 将 XM2 菌悬液浓度分别配制成  $1 \times 10^8$  cfu/mL、 $1 \times 10^6$  cfu/mL、 $1 \times 10^4$  cfu/mL, 梨黑斑病菌孢子浓度分别配制成  $1 \times 10^6$  个孢子/mL、 $1 \times 10^5$  个孢子/mL、 $1 \times 10^4$  个孢子/mL, 将不同浓度的菌悬液各取 30  $\mu$ L 加入梨果伤口, 晾干后接种不同浓度病原孢子液 15  $\mu$ L; 对照 1 为先加 30  $\mu$ L 无菌水, 晾干后接种不同浓度病原孢子液 15  $\mu$ L; 对照 2 为先加 30  $\mu$ L 无菌培养基液, 晾干后接种不同浓度病原孢

子液 15  $\mu\text{L}$ 。晾干,套袋保湿,25 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 7 d,统计发病情况(方法同 1.3.1)。每个处理 10 个梨果,重复 3 次。

**1.3.3 XM2 不同接种时间对梨黑斑病的生防效果:**在接种 15  $\mu\text{L}$  浓度为  $1 \times 10^5$  个孢子/mL 的梨黑斑病菌(*A. alternata*) 病原孢子液前(24、12、4 h)、同时(0 h) 和后(4、12、24 h) 的不同时间分别接种 30  $\mu\text{L}$  浓度为  $1 \times 10^8$  cfu/mL 拮抗细菌 XM2 菌悬液;对照 1 为先接种 30  $\mu\text{L}$  无菌水,3 h 后接种病原孢子液;对照 2 为先接种 30  $\mu\text{L}$  无菌培养基液,3 h 后接种病原孢子液。晾干,套袋保湿,25 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 7 d,统计发病情况(方法同 1.3.1)。每个处理 10 个梨果,重复 3 次。

#### 1.4 菌株 XM2 在梨果伤口上的生长动态

取 30  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^8$  cfu/mL 的 XM2 发酵液于果实伤口内,1 h 后测定的细菌数为起始值(0 h)。将接种 XM2 的果实分别保湿贮于 28、20、4 和 0 $^{\circ}\text{C}$  下。每处理 10 个果实,试验重复 3 次。28 $^{\circ}\text{C}$  下的每天测 1 次,20 $^{\circ}\text{C}$  下的每 3 天测 1 次,4 $^{\circ}\text{C}$  和 0 $^{\circ}\text{C}$  下的每 6 天测 1 次。测定方法是用无菌打孔器从伤口处取直径和深都为 10 mm 的果肉组织,放于已加 1.0 mL 的 0.05 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液的无菌研钵内,研磨后用稀释平板法记数。将所得拮抗菌的 cfu 转化成 lgcfu。

#### 1.5 XM2 发酵液对梨黑斑病菌菌丝形态的影响

将梨黑斑病孢接于 50 mL PDB 培养基中静置培养,待长为均匀的菌丝悬浮液。加入  $1 \times 10^8$  cfu/mL XM2 发酵液 1.0 mL,对照加入等量的无菌水,72 h 后在光学显微镜下观察菌丝形态变化。

## 2 结果

### 2.1 XM2 菌株的鉴定

**2.1.1 形态特征及生理生化性状:**菌株 XM2 革兰氏阴性菌,短杆状,大小为 (0.5 - 0.9)  $\mu\text{m} \times$  (1.0 - 2.5)  $\mu\text{m}$ ,有鞭毛,具有运动性(图 1)。在 LB 培养基平板上好氧培养 24 - 48 h 后,产生表面光滑、凸起、半透明、边缘整齐、直径为 2.0 - 3.0 mm 的黄色菌落。

菌株 XM2 为兼性厌氧菌,生长 pH 范围为 5.7 - 7.5,生长温度范围为 4 - 40 $^{\circ}\text{C}$ ,NaCl 浓度范围 0% - 7%。其它生理生化指标如表 1 所示。

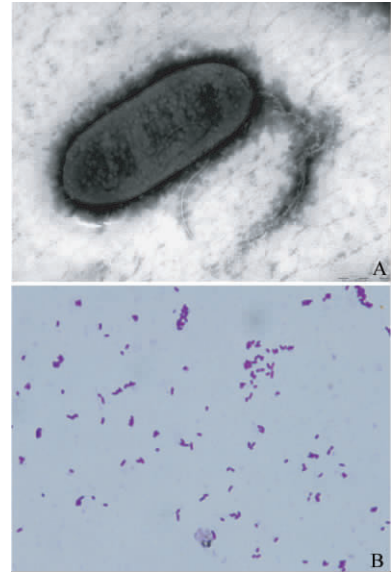


图 1. 50000 倍和 100 倍菌株 XM2 形态特征

Figure 1. Morphological characteristics of XM2. A: Observed under transmission electron microscope (magnification = 50000  $\times$ ); B: observed under oil immersion lens (magnification = 100  $\times$ ).

表 1. 菌株 XM2 和标准菌株的生理生化特征

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of XM2 and type culture strain

characteristics	result	
	XM2	type culture strain
glucose	+	+
L-arabinose	+	+
sucrose	+	+
trehalose	-	-
rhamnose	+	+
xylose	+	+
starch	-	-
mannitose	+	+
inositol	-	-
mannitol	+	+
gelatin liquification	-	-
indole production	-	-
H <sub>2</sub> S production	-	-
utilization of citrate	+	+
phenylalanine deaminase	+	+
lysine deaminase	-	-
catalase test	+	+
oxidase test	-	+
arginine dihydrolase	-	-
nitrate reduction	+	+
KOH test	-	-
litmus milk	alkaline concretion	alkaline concretion
methyl red test	-	-

+ : Positive; - : Negative.

**2.1.3 16S rDNA 序列测定:** PCR 扩增得到菌株 XM2 的 16S rDNA 片段, 测序长度为 1386 bp, 在 GenBank 中的序列登录号为 KF150143。将 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的序列进行 BLAST 比对, 结果表明, 菌株 XM2 与泛菌属 *Pantoea* 中的成团泛菌 (*P. agglomerans*) 的同源性达到 99.8%, 结合形态特征和生理生化指标, 确定菌株 XM2 为成团泛菌 (*P. agglomerans*)。

**2.2 XM2 对采后梨黑斑病的生防效果**

**2.2.1 XM2 不同处理液对梨黑斑病的防病效果:**

接种于伤口处的 XM2 各种处理液对梨黑斑病菌均有保护作用 (表 2), 防病效果由强到弱依次是: 菌悬液、发酵液、过滤液和热杀死液。菌悬液防效最高, 达到 97.73%, 热杀死液的防效仅为 56.82%, 说明 XM2 菌株菌体细胞的防病最好, 代谢产物次之。

**2.2.2 XM2 不同接种浓度对梨黑斑病的防病效果:**

接种 XM2 菌悬液的梨果伤口, 其病情指数低于各自对照 ( $P = 0.05$ ); XM2 菌悬液使用浓度越大, 病原菌接种浓度越低, 其防效越好。相同菌悬液浓度

时, 防效随病原菌浓度的增大而减小; 相同病原菌浓度时, 防效随菌悬液浓度的增大而增大。梨黑斑病原孢子低浓度 ( $1 \times 10^4$  cfu/mL) 时, XM2 菌悬液可以有效抑制病害发生, 3 个浓度的防效均在 95% 以上, 且差异不显著 ( $P = 0.05$ ); 梨黑斑病原孢子高浓度 ( $1 \times 10^6$  cfu/mL) 时, XM2 菌悬液只能降低病害的发生程度, 3 个浓度的防效均在 40% 以下, 且差异不显著 (表 3)。

表 2. 菌株 XM2 不同处理液对采后梨黑斑病的影响

Table 2. Effect of black spot in pear fruits from various treatments of XM2

treatments	disease index	control effect / %
suspension	2.22 d	97.73 a
cell culture	12.22 c	87.50 b
culture filtrate	17.78 c	81.82 b
autoclaved culture	42.22 b	56.82 c
control 1	97.78 a	-
control 2	97.71 a	-

Different small letters represent significant difference at 0.05 level among treatments. The same below.

表 3. XM2 不同浓度菌悬液对采后梨黑斑病的影响

Table 3. Effect of black spot in pear fruits treated by various concentration of XM2 suspension

concentration of <i>A. alternata</i> spores/mL	disease index			control efficacy / %				
	control 1	control 2	1 × 10 <sup>4</sup> cfu/mL	1 × 10 <sup>6</sup> cfu/mL	1 × 10 <sup>8</sup> cfu/mL	1 × 10 <sup>4</sup> cfu/mL	1 × 10 <sup>6</sup> cfu/mL	1 × 10 <sup>8</sup> cfu/mL
1 × 10 <sup>4</sup>	92.22 a	93.67 a	4.44 b	3.33 b	1.11 c	95.19 a	96.39 a	98.8 a
1 × 10 <sup>5</sup>	100 a	100 a	42.22 b	26.67 b	4.44 c	57.78 c	73.33 b	95.56 a
1 × 10 <sup>6</sup>	100 a	100 a	66.67 b	62.22 b	60.0 b	33.33 c	37.78 c	40 c

**2.2.3 XM2 不同接种时间对梨黑斑病的防治效果:**

XM2 菌悬液在不同相对接种时间下对梨黑斑病均有防效, 拮抗菌和病原孢子的接种时间影响防治效果, 菌悬液接种时间相对早的处理防效显著优于相对时间晚的处理 ( $P = 0.05$ ), 即预防效果优于治疗效果。随着菌悬液相对接种时间的推迟, 防效呈下降趋势。提前 24 h 接种菌悬液的处理防效最高, 达到 94.94%; 同时接种菌悬液和病菌液的处理防效已降到 70.85%; 菌悬液相对病菌液晚接种的处理, 防效均在 50% 左右, 且差异不显著 (表 4)。

表 4. XM2 和病原孢子接种时间对梨黑斑病的影响

Table 4. Effect of inoculation time of XM2 and *A. alternata* spores on black spot of pear fruits

inoculation time	disease index	control effect / %
B 24h	5 d	94.94 a
B 12h	12.22 c	87.64 b
B 4h	17.56 c	82.24 b
0	28.89 c	70.85 b
A 4h	46.33 b	53.15 c
A 12h	46.78 b	52.69 c
A 24h	48.89 b	50.56 c
control 1	98.89 a	-
control 2	98.33 a	-

A represents inoculation XM2 after the pathogen. B represents inoculation XM2 before the pathogen.

**2.3 菌株 XM2 在梨果伤口上的生长动态**

在 28、20、4 和 0°C 下, 菌株 XM2 在梨果伤口呈先增长后平稳的繁殖趋势, 均能在伤口较好定植

(图 2)。XM2 在伤口起始数均为  $2.7 \times 10^7$  cfu/mL, 28°C 下接种 1 d 时, 伤口菌数是起始的  $3 \times 10^8$  -

$2.7 \times 10^9$  倍,接种 4 d 时,伤口菌数达到最大值,是起始的  $3 \times 10^{16} - 1.27 \times 10^{18}$  倍,接种 12 d 时,伤口菌数仍是起始菌数的  $1.3 \times 10^{10} - 4 \times 10^{11}$  倍;20℃ 下接种 3 d 时,伤口菌数达到最大,是起始菌数的  $3 \times 10^{14} - 1.25 \times 10^{15}$  倍,12 d 之后保持平稳,接种 36 d 时,伤口菌数是起始菌数的  $6 \times 10^9 - 1 \times 10^{11}$  倍;4℃ 下接种 6 d 时,伤口菌数达到最大,之后基本维持水平,接种 66 d 时,伤口菌数是起始菌数的  $3.2 \times 10^{12} - 5 \times 10^{10}$  倍;0℃ 下伤口菌数增长幅度不大,低温抑

制病原菌生长的同时也抑制了拮抗菌的生长<sup>[13]</sup>,但到第 66 d 时,仍能保持  $1.08 \times 10^8 - 5.4 \times 10^8$  cfu/mL,是起始的 4 - 20 倍。

## 2.4 对病原菌菌丝形态的影响

在 PDB 培养基中,对照链格孢菌菌丝生长旺盛,分布均匀;而处理菌丝皱缩成团,分布不均匀。显微镜观察发现,对照菌丝均匀、粗壮、表面光滑;处理菌丝部分断裂,细胞内含物外溢,扭曲变形,集结成团(图 3)。

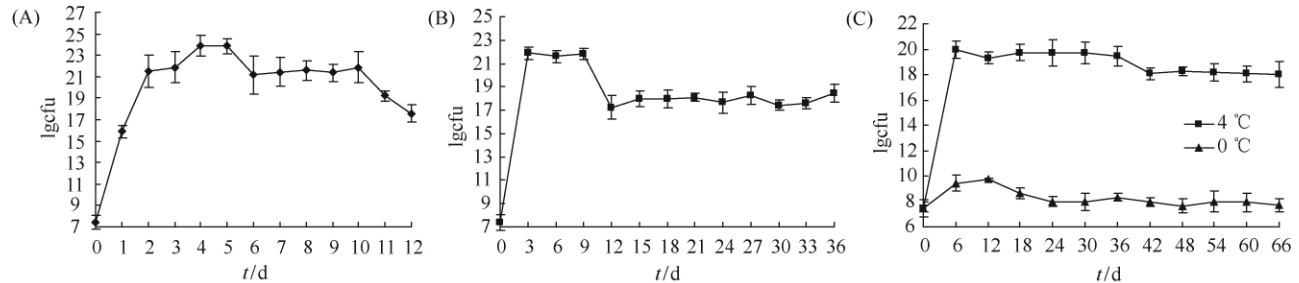


图 2. 28℃ (A)、20℃ (B)、4℃和 0℃ (C) 下 XM2 在梨果伤口上的生长动态

Figure 2. Population dynamics of XM2 in wounds of pear fruits incubated at 28°C (A), 20°C (B), 4°C and 0°C (C).



图 3. 显微镜下观察病原菌丝形态

Figure 3. Mycelial morphology of *A. alternata* under microscope A: control (magnification = 60 ×). B: treatment (magnification = 60 ×). C: treatment (magnification = 40 ×).

## 3 讨论

研究发现,成团泛菌在植物中普遍存在,且可以有效抑制不同的真菌和细菌引起的植物病害<sup>[14]</sup>。成团泛菌 E325 已作为商业化产品,用于果园中苹果和梨的火疫病生物防治<sup>[15]</sup>;成团泛菌 EPS125 可减少杏、油桃等果实采后发生褐腐病和软腐病的几率<sup>[16]</sup>;成团泛菌 IK-147 对引发黄瓜菌核病的病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib.) 有抑制作用<sup>[17]</sup>。成团泛菌 XJ01 的发酵上清液对黄瓜褐斑病菌 (*Corynespora cassicola*) 的生长有显著的拮抗作用<sup>[18]</sup>;成团肠杆菌对在水果上由解淀粉欧文氏菌

(*Erwinia amylovora*) 引起的火疫病具有一定的防治效果<sup>[19]</sup>。成团肠杆菌对丁香假单胞菌丁香致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) 引起的小麦粒疫病防治效果达 45% - 70%<sup>[20]</sup>。

本试验鉴定的成团泛菌 XM2 发酵液的各种处理均能抑制梨采后黑斑病,接种菌悬液的处理抑病效果显著优于其他处理,说明成团泛菌 XM2 的抑菌机理是菌体和代谢产物共同的作用,既存在营养与空间的竞争,又有对病原菌菌丝的破坏作用。这一结论对以前的研究结论做了补充, Mukhopadhyay<sup>[21]</sup> 发现成团泛菌对立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 的拮抗作用是由其分泌的代谢物所致;Chernin<sup>[22]</sup> 的研究表明,成团肠杆菌 IC1270 的抑菌机理是不仅产生

降解病原真菌细胞壁的几丁质酶,而且能分泌硝吡咯菌素;而薛梦林<sup>[23]</sup>在研究成团泛菌 B501 对冬枣黑斑病 (*Alternaria alternata*) 的试验中发现,菌株的生防能力取决于菌体,而不是代谢产物。

成团泛菌 XM2 的防病效果与浓度有关,拮抗菌浓度越大、病原菌接种浓度越低,其防效越好,这与 Nunes 等<sup>[24]</sup>的研究结果一致,Nunes 发现,  $8 \times 10^7$  cfu/mL 的成团泛菌 CPA2 可以有效抑制灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 和扩展青霉菌引起的苹果病害;Maclaughlin<sup>[25]</sup>发现,成团泛菌的防病效果与浓度成正比;田世平等<sup>[26]</sup>在研究丝孢酵母 (*Trichosporon* sp.) 对苹果采后病害防治时也得到一致的结果。

关于成团泛菌接种时间与防治效果的研究还未见报道,范青等<sup>[11]</sup>人在研究丝孢酵母 (*Trichosporon* sp.) 对苹果采后灰霉病和青霉病抑制效果时发现,酵母菌和病菌孢子的接种时间与生物防治效果有关,先接种拮抗菌的抑菌效果显著地好于同时或后于病菌接种的效果,与本试验的结果一致。

Roberts<sup>[27]</sup>认为,如果拮抗菌可以在伤口快速增长,说明它可以很快利用伤口的营养,有助于它与病原菌的营养竞争。低温贮藏是果品保鲜常用手段,所以菌株能否在较低的温度下生存是能否作为拮抗菌的重要前提。本试验中的菌株 XM2 不但能在 28℃ 和 20℃ 迅速定殖于梨果伤口,而且能在 4℃ 和 0℃ 下定殖于梨果伤口,接种 66 d 时的菌数是接种数的  $3.2 \times 10^{12} - 5 \times 10^{10}$  倍和 4 - 20 倍,表明 XM2 能很快适应伤口的生境,比病原菌抢先抢占生态位,为其很好发挥拮抗作用打下基础。该拮抗菌株能否跟其他的果蔬贮藏保鲜措施如气调贮藏、自发气调贮藏、杀菌剂等相结合,尚需要进一步研究。

## 参考文献

- [1] Holt JG. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9<sup>th</sup> Eds. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 1994: 29.
- [2] Liu B, Wang YJ, Xu L, Zhan GP, Song F, Zhe CM. Study on fungicides for the control of *Alternaria alternata* on pear fruit. *Plant Quarantine*, 2007, 21 (3): 137-139. (in Chinese)
- 刘波,王跃进,徐亮,詹国平,宋福,哲春梅.几种杀菌剂对梨黑斑病菌抑制作用研究.植物检疫,2007,21(3): 137-139.
- [3] Qi DM, Hui M, Liang QM, Niu TG. Postharvest

biological control of blue mold and black spot on apple-pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) fruit by *Bacillus subtilis* H110. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2005, 11 (2): 171-174. (in Chinese)

齐东梅,惠明,梁启美,牛天贵.枯草芽孢杆菌 H110 对苹果梨采后青霉病和黑斑病的抑制效果.应用与环境生物学报,2005,11(2):171-174.

- [4] 谢莉.梨黑斑病拮抗放线菌的选育及其抗菌物质研究.河北师范大学硕士学位论文,2008.
- [5] Benbow JM, Sugar D. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant Diseases*, 1999, 9: 839-843.
- [6] Song C, Song SS, Guan JF. Identification of a bacterial strain *Bacillus subtilis* J18 and its resistance to pear *Alternaria* rot disease. *Modern Food Science and Technology*, 2011, 27 (1): 6-10. (in Chinese)
- 宋聪,宋水山,关军锋.梨采后黑斑病拮抗菌 J18 的鉴定及防治效果的初步研究.现代食品科技,2011,27(1):6-10.
- [7] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册.北京:科学出版社,2001:94.
- [8] 布坎南,吉本斯.伯杰细菌鉴定手册.中国科学院微生物研究所.第八版.北京:科学出版社,1984:382-462.
- [9] Dong X, Xin Y, Jian W. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov. isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50: 119-125.
- [10] Francois J, Julie D. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*, 1998, 23 (10): 403-405.
- [11] Fan Q, Tian SP, Xu Y. Effects of *Trichosporon* sp. on biocontrol efficacy of grey and blue mold on postharvest apple. *Scientia Agricultura Sinica*, 2001, 34 (2): 163-168. (in Chinese)
- 范青,田世平,徐勇.丝孢酵母对苹果采后灰霉病和青霉病抑制效果的影响.中国农业科学,2001,34(2): 163-168.
- [12] Wang Q, Hu CJ, Ke FG, Huang SL, Li QQ. Characterization of a bacterial biocontrol strain 1404 and its efficacy in controlling postharvest citrus anthracnose. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (9): 1208-1217. (in Chinese)
- 汪茜,胡春锦,柯仿钢,黄思良,黎起秦.生防菌株 1404 的鉴定及其对采后柑橘炭疽病的防治效果.微生物学

报,50(9):1208-1217.

- [13] Tronsmo A. Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. *Transactions of the British Mycological Society*, 1978, 71: 469-471.
- [14] Shen DL, Feng YJ, Song W. Biological function diversity of *Enterobacter agglomerans* and its newest advance in classification. *Journal of Microbiology*, 2002, 22 (1): 40-42. (in Chinese)  
沈德龙,冯永君,宋未.成团肠杆菌的生物功能多样性及其分类最新进展.微生物学杂志,2002,22(1):40-42.
- [15] Pusey PL, Stockwell VO, Reardon CL. Antibiosis activity of *Pantoea agglomerans* biocontrol strain E325 against *Erwinia amylovora* on apple flower stigmas. *Phytopathology*, 2011, 101(10): 1234-1241.
- [16] Frances J, Bonaterra A, Moreno MC. Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*. *Postharvest Biology and Technology*, 2006, 39(3): 299-307.
- [17] Onaran A, Yanar Y. Screening bacterial species for antagonistic activities against the *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary causal agent of cucumber white mold disease. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(12): 2223-2229.
- [18] Huang HD, Li XY, Yang HP, Lu XZ, Liu C. Identification of endophyte XJ01 and antagonism on the *Corynespora cassiicola*. *Acta Agriculturae Boreali Sinica*, 2012, 27(4): 158-162. (in Chinese)  
黄海东,李晓雁,杨红澎,卢显芝,刘畅.内生菌XJ01的分离鉴定及其对黄瓜褐斑病菌的拮抗作用.华北农学报,2012,27(4):158-162.
- [19] Saygili H. Laboratory and field trials with selected microorganisms as biocontrol agents for fire blight. *Acta Horticulturae*, 1999, 655-661.
- [20] Braun KA. Biological control of *Pseudomonas syringae* v. *syringae*, the causal agent of basal kernel blight of barley by antagonistic *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology*, 2000, 90(4): 368-375.
- [21] Mukhopadhyay K. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. *Mycopathologia*, 1996, 134: 151-159.
- [22] Chernin L. Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. *Current Microbiology*, 1996, 32: 208-212.
- [23] Xue ML, Zhang LQ, Zhang JS, Tang WH. Identification of bacterial strain B501 and its biocontrol activity against black spot on jujube fruits. *Chinese Journal of Biological Control*, 2008, 24(2): 122-127. (in Chinese)  
薛梦林,张力群,张继澍,唐文华.拮抗菌B501的鉴定及其对采后冬枣黑斑病的抑制效果.中国生物防治,2008,24(2)122-127.
- [24] Nunes C, Usall J, Teixido N, Fons E, Vinas I. Postharvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden Delicious apples. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92(2): 247-255.
- [25] Maclaughlin RJ, Wilson CL, Droby S. Biological control of postharvest diseases of grape, peach and apple with yeasts *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. *Plant Disease*, 1992, 76: 470-473.
- [26] Tian SP, Fan Q, Xu Y, Wang Y. Effects of *Trichosporon* sp. in combination with calcium and fungicide on biocontrol of postharvest diseases in apple fruits. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(5): 501-505. (in Chinese)  
田世平,范青,徐勇,汪沂.丝孢酵母与钙和杀菌剂配合对苹果采后病害的抑制效果.植物学报,2001,43(5): 501-505.
- [27] Roberts RG. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology*, 1990, 80: 526-530.

# Identification of *Pantoea agglomeran* XM2 with biocontrol activity against postharvest pear black spot

Xiaoyu Zhang<sup>1,2</sup>, Yongjie Zhang<sup>3</sup>, Zejun Zhang<sup>1</sup>, Shu Zhang<sup>4</sup>, Jucai Han<sup>1\*</sup>,  
Huiping Liu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China

<sup>2</sup>Farm Product Storage and Freshening Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, Shanxi Province, China

<sup>3</sup>College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi Province, China

<sup>4</sup>Institute of Applied Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi Province, China

**Abstract:** [Objective] We isolated the bacterial strain XM2 from prunes (*Prunus domestica* L.) fruit surface. XM2 was identified and tested as an antagonist for postharvest biological control of black spot disease (*Alternaria alternata*) on pear fruits. [Methods] Strain XM2 was identified according to its morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis. Inhibition tests were performed in wounds of pear fruits using different types of XM2 inocula, different concentration and inoculation time of XM2 and *A. alternata*. Effect of XM2 on mycelia morphology of *A. alternata* was observed under microscope. [Results] Strain XM2 was identified as *Pantoea agglomeran*. Biological control of XM2 against black spot disease was significantly better than the control, and the best inhibitory was observed when inoculated with suspension (97.73% of control effect). Higher XM2 concentration and lower *A. alternata* concentration showed better inhibitory effect. Similarly, the earlier inoculation of XM2 than *A. Alternata*, the better inhibitory effect on disease development. Microscopic observation found that XM2 broke part of the mycelia, making cell contents spilled and hyphae distorted. [Conclusion] *Pantoea agglomeran* XM2 has the potential as an effective antagonist against postharvest pear blank spot disease.

**Keywords:** pear, postharvest, *Alternaria alternate*, *Pantoea agglomerans*, biological control, antagonistic bacterium

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Research Science Youth Fund of Shanxi (2011021031-2), by the Scientific and Technological Project of Shanxi (20110311013-1), by the Overseas Fund Project of Shanxi (2011-52) and by the Agricultural Science and Technology Achievements Transformation Fund of Shanxi Provincial Finance (SCZZNCGZH201304)

\* Corresponding author. Tel/ Fax: +86-354-6288679; E-mail: sxndhjc@163.com

Received: 17 November 2013/Revised: 19 January 2014