

研究报告

桃褐腐病菌的分离鉴定及其生物防治

张翠芳, 王帅, 汪诗瑶, 宋文芳, 张雨青, 葛柯良, 孙一方, 段艳欣*,
黄永红*

青岛农业大学 园艺学院, 山东 青岛 266109

张翠芳, 王帅, 汪诗瑶, 宋文芳, 张雨青, 葛柯良, 孙一方, 段艳欣, 黄永红. 桃褐腐病菌的分离鉴定及其生物防治[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2639-2651.

ZHANG Cuifang, WANG Shuai, WANG Shiyao, SONG Wenfang, ZHANG Yuqing, GE Keliang, SUN Yifang, DUAN Yanxin, HUANG Yonghong. Isolation, identification, and biocontrol of *Monilinia fructicola*[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2639-2651.

摘要:【背景】桃褐腐病是桃树重要病害之一, 其严重危害花、枝条、叶片和果实, 给桃树种植业带来了巨大的经济损失。【目的】明确桃褐腐病病原菌的种类, 探究其生物学特性并研究防御假单胞菌(*Pseudomonas protegens*) QNF1 对褐腐病的抑制作用, 为桃褐腐病的科学正确防控提供理论依据。【方法】以贮藏期发病的桃果实为试材, 从致病果实中分离病原菌, 根据柯赫氏法则验证其致病性。同时, 结合形态学和分子生物学手段鉴定病原菌种类, 深入探究其生物学特性。采用体外培养和体内接种试验系统研究防御假单胞菌 QNF1 对桃果实致病菌的抑制作用及其对病原菌菌丝结构的破坏情况。【结果】从发病桃果实中分离到病原菌菌株 HF, 菌落颜色为棕褐色或灰白色, 产生大量白色孢子, 呈同心轮状; 病原菌菌丝结构大多数为典型的二叉状分枝, 少数不分枝, 菌丝间互相交错; 分生孢子为无色单孢, 呈卵圆形或近圆形; 病原菌接种健康桃果实, 其致病性与自然发病果实一致。根据 ITS 和 18S rRNA 基因测序结果构建了系统发育树, 表明该菌株属于美澳型核果链核盘菌(*Monilinia fructicola*)。该病原菌在 pH 5.0–11.0 均可生长, 弱酸性环境生长情况最佳, 菌丝生长最佳温度为 20–28 °C。进一步试验表明, 防御假单胞菌 QNF1 发酵液可导致桃褐腐病菌菌丝结构发生断裂、膨大等异常变化, 对桃果实褐腐病发生的抑制率可高达 88.17%。【结论】分离出桃褐腐病病原菌, 并对其进行鉴定、生物学特性及生物防治研究, 进而为制定科学防控策略提供重要的科学依据, 对于促进桃产业的健康可持续发展具有重要意义。

关键词: 桃褐腐病; rDNA-ITS; 生物学特性; 生物防治

资助项目: 山东省自然科学基金(ZR2020MC136, ZR2020MC143, ZR2024MC056); 山东省良种工程项目(2020LZGC007); 山东省大学生创新创业训练计划(S202310435252)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2020MC136, ZR2020MC143, ZR2024MC056), the Agricultural Seed Project of Shandong Province (2020LZGC007), and the College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program of Shandong Province (S202310435252).

*Corresponding authors. E-mail: HUANG Yonghong, gstshh@126.com; DUAN Yanxin, dyxdyx2007@163.com

Received: 2024-09-28; Accepted: 2024-10-18; Published online: 2024-11-15

Isolation, identification, and biocontrol of *Monilinia fructicola*

ZHANG Cuifang, WANG Shuai, WANG Shiyao, SONG Wenfang, ZHANG Yuqing, GE Keliang, SUN Yifang, DUAN Yanxin*, HUANG Yonghong*

College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

Abstract: [Background] Peach brown rot, one of the major diseases of peach plants, seriously jeopardizes the flowers, branches, leaves, and fruits, causing great economic losses to the peach industry. [Objective] Identify the pathogenic fungus causing peach brown rot, investigate its biological characteristics, and study the inhibitory effect of *Pseudomonas protegens* QNF1 on the pathogen, and provide theoretical basis for the scientific and precise prevention and control of peach brown rot. [Methods] The pathogenic fungus causing peach brown rot was isolated from the diseased peach fruits, and its pathogenicity was tested according to Koch's postulates. We employed morphological and molecular biological methods to identify the pathogen fungus and characterized its biological properties. *In vitro* culture and *in vivo* inoculation experiments were carried out to investigate the inhibitory effect of QNF1 on *Monilinia fructicola* and its damage to the mycelial structure. [Results] The isolated strain HF had colonies with a brown or gray-white color, producing a large number of white spores in a concentric ring. The mycelial were mostly typical binary branching, with a few unbranched, and intertwined with each other. The conidia were colorless single spores that were oval or nearly round. The pathogenicity on healthy peach fruits was consistent with that of naturally diseased fruits. The phylogenetic tree constructed based on the ITS and 18S rRNA gene sequencing indicated that HF belonged to *M. fructicola*. The pathogen could grow at pH 5.0–11.0, with robust growth in a weakly acidic environments, and the optimal temperature for mycelial growth was 20–28 °C. Further experiments showed that QNF1 could cause abnormal changes in the mycelial structure of the brown rot fungus, such as breakage and swelling, and the inhibition rate of brown rot on peach fruits reached up to 88.17%. [Conclusion] The study isolated and identified the peach brown rot pathogen and carried out research on its biological characteristics and biocontrol, providing important scientific basis for the precise prevention and control of the disease, which is of great significance for promoting the healthy and sustainable development of the peach industry.

Keywords: peach brown rot; rDNA-ITS; biological characteristics; biocontrol

桃褐腐病作为一种在中国广泛分布的病害, 已在中国各大桃种植区域, 包括北京、山东、四川、云南等在内的 16 个省市均有病例记录^[1]。桃褐腐病可危害桃、李、杏、樱桃等核果类果树, 其侵害对象主要为花、叶片、枝条及果实, 特别是在果实达到成熟阶段及采后贮藏期间, 该病的影响尤为显著, 发病症状严重, 传染力强且腐烂速度快^[2-6]。在全球范围内, 侵

染并引发核果类及仁果类果树褐腐病的病原真菌种类多样, 主要包括以下 6 种关键致病真菌: 美澳型核果链核盘菌(*Monilinia fructicola*)、云南链核盘菌(*Monilinia yunnanensis*)、果生链核盘菌(*Monilinia fructigena*)、核果链核盘菌(*Monilinia laxa*)、梅生链核盘菌(*Monilinia mumecola*), 以及多子座链核盘菌(*Monilinia polystroma*)^[7-10]。其中, 尹良芬^[11]报道的 *M. fructicola*、*M. yunnanensis*

和 *M. mumeicola* 是目前中国桃褐腐病病原菌的主要种类。而李志伟等^[12]报道的山东省内的病原菌种主要包含 *M. fructicola*、*M. yunnanensis* 和 *M. polystroma*。纪兆林等^[13]认为不同桃褐腐病原菌菌落颜色、生长速度、孢子形态及产孢量等有很大差异,其病原菌致病能力也有差异,目前针对山东省桃褐腐病害生物学特性的相关研究较少,主要集中在病原菌种群鉴定分类,因此,明确病原菌种类及其基本生物学特性,对防治策略的制定、药剂的精准筛选、病程的有效缩短及防控效率的提升均具有重要意义。

传统化学防治虽能有效控制桃褐腐病害蔓延,但长期应用必然会出现对生态安全的负面影响,同时加剧了病原菌对化学药剂的抗药性进化^[12]。因此,开发高效、环保、绿色、生态的桃褐腐病防控技术已成为该病害防控领域的研究热点与前沿方向。生物防治由于其无污染,无害的特点,越来越多的生防内生菌被发现研究并用于生产。已有研究表明,从植物根际分离出的内生菌地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) W10^[14]、在桃树根部分离的 3 株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和桃树根际土壤分离的龙舌兰芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*)均对桃果实褐腐病具有良好的抑制作用^[15]。

2022 年 9 月,山东省潍坊市安丘市石埠子镇一桃园内发现了严重且疑似桃褐腐病的病害,病果率高达约 60%,经济损失巨大。本试验从发病桃果实上分离纯化致病菌,检测其致病性,通过形态学观察和分子生物学手段明确该病原菌的种类,并在此基础上深入研究其生物学特性,探究防御假单胞菌(*Pseudomonas protegens*) QNF1 对该病菌的抑制作用及其对桃果实病害发生的防控效果,以期为桃果实病害防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品

在山东省潍坊市安丘市石埠子镇桃园内随

机采收健康‘金秋红蜜’桃果实样本作为试验材料,于实验室常温贮藏。贮藏过程中,发现果实腐烂且腐烂斑扩展速度极快,取发病后的果实进行病原菌的分离、纯化、鉴定。内生菌防御假单胞菌 QNF1 由课题组前期从韭菜根中分离筛选并保存于本实验室^[16]。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基和马铃薯葡萄糖肉汤(potato dextrose broth, PDB),青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

1.3 主要试剂和仪器

DNA 试剂提取盒,北京索莱宝生物科技有限公司。PCR 扩增反应试剂:Phanta SE Super-Fidelity DNA Polymerase,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;引物 ITS1 (5'-TCCGTAG GTGAACCTGCGG-3')、ITS4 (5'-TCCTCCGCTT ATTGATATGC-3')^[17]、18S rRNA 基因通用引物 NS1 (5'-GTATCATATGCTTGTCTC-3')与基因测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

全自动智能活细胞荧光显微成像系统,赛默飞世尔科技公司;恒温振荡培养箱,天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司;恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司。

1.4 病原菌的分离及纯化

参考周芳^[18]的方法并对培养条件和培养时长进行了修改。本试验操作方法如下:从已发病桃果实病斑部位挑取菌丝放在含有 PDA 培养基($d=9\text{ cm}$)中,于 28 °C 恒温培养箱倒置暗培养,每间隔 3 d 取菌落边缘菌丝转接至新的 PDA 培养基中,重复 4–5 次然后获得纯化的病原菌。

1.5 病原菌的形态学鉴定

在 PDA 培养基($d=9\text{ cm}$)上铺上无菌玻璃纸,将纯化的病原菌菌块($d=0.7\text{ cm}$)放入培养皿中,放置于 28 °C 恒温培养箱中暗培养。培养 4 d 后采集菌落边缘区域的菌丝使用全自动智能活细胞荧光显微成像系统(40×)观察菌丝结构,并拍照。

参考 Qiu 等^[19]方法并对培养条件和培养时长进行修改。本试验操作方法如下: 取一个菌饼($d=0.7$ cm)置于 100 mL PDB 培养基内, 28 °C、180 r/min 暗培养 3 d 后经一层无菌纱布过滤即得到孢子液体, 3 000 r/min 离心 10 min 收集孢子, 用无菌水清洗孢子 2–3 次, 然后用无菌水稀释孢子, 将孢子液浓度稀释为 1×10^4 CFU/mL, 使用全自动智能活细胞荧光显微成像系统(40 $\times$)观察孢子形态结构并拍照。

1.6 病原菌致病性的验证

采用离体接种方法验证病原菌的致病性。选取大小一致、无明显病斑的健康桃果实‘金秋红蜜’, 用浓度为 1.5% 的 NaClO 溶液将桃果实表面浸泡 1 min, 无菌蒸馏水冲洗 3 次, 风干备用, 将果实分为 5 组, 在桃果实的表面一侧中心部位使用无菌牙签造成圆形小口(直径 0.5 cm, 深 0.2 cm), 将纯化后的病原菌菌饼($d=0.5$ cm) (1×10^6 CFU/mL)分别接种于伤口处, 对照组接种同等大小的 PDA 培养基, 每天观察记录拍照, 直至对照组果实表面一侧完全腐烂, 每组处理组 3 个重复, 试验重复 3 次。

1.7 病原菌分子生物学鉴定

在 PDA 培养基($d=9$ cm)中铺上无菌玻璃纸, 取纯化后的病原菌菌饼($d=0.7$ cm)放入含有玻璃纸的 PDA 培养基中, 28 °C 倒置暗培养 6 d 后刮取菌丝, 磨样。使用 DNA 试剂盒提取病原菌的 DNA, 采用通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增。反应体系(25 μ L): DNA 模板 1 μ L, 2 $\times$ Phanta SE Buffer 12.5 μ L, Phanta SE Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 9 μ L。PCR 反应条件参考 PCR 扩增说明书(Phanta SE Super-Fidelity DNA Polymerase)。扩增产物经 1% 琼脂凝胶电泳检测后进行 rDNA-ITS 双向测序; 18S rRNA 基因采用通用引物 NS1 进行单向测序, 均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对, 采用邻近法设置 bootstrap 值 1 000 构建系统发

育树并分析其亲缘关系。

1.8 桃褐腐病菌的生物学特性

参考罗倩等^[20]的方法, 更改温度和 pH 梯度。在分离获得的 5 个菌株中菌株 HF-4 的孢子产生能力显著低于其他菌株, 在后续的试验中被剔除, 鉴于这 5 个菌株均归属于同一物种, 所以统一选用菌株 HF-2 进行后续研究。将纯化后的桃褐腐病菌菌饼($d=0.7$ cm)接入 PDA 培养基($d=9$ cm)中央, 将其分别置于 4、12、20、28、37 °C 恒温黑暗倒置培养, 7 d 后采用十字交叉法测定菌斑直径, 测定的菌斑直径包含接入菌饼大小, 每组重复 3 个; 使用浓度 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 将 PDA 培养基的 pH 值调为 5.0、6.0、7.0、9.0、11.0, 将菌饼($d=0.7$ cm)置于上述 5 个处理过的 PDA 培养基($d=9$ cm)的中央, 在 28 °C 恒温培养箱中倒置培养 7 d, 7 d 后采用十字交叉法测定菌斑直径, 测定的菌斑直径包含接入菌饼大小, 各处理 3 个重复, 试验重复 3 次。

1.9 内生菌 QNF1 对桃褐腐病菌菌丝结构的影响

培养皿($d=9$ cm)中倒入 10 mL PDA 固体培养基, 凝固后铺上玻璃纸, 加入 100 μ L 浓度为 1×10^{10} CFU/mL 的 QNF1 发酵液, 并用涂布器涂抹均匀, 晾干后在中央接种一枚桃褐腐病菌菌饼($d=0.7$ cm), 封板, 以涂抹等量液体 LB 为对照。将培养皿置于 28 °C 培养箱, 倒置暗培养 3 d。用刀子在菌落边缘部分裁剪出一个边长为 1 cm 的小正方形, 随后铺在载玻片上, 滴 40 μ L 无菌水, 盖上盖玻片, 使用全自动智能活细胞荧光显微成像系统(40 $\times$)进行观察, 拍照。试验重复 3 次。

1.10 内生菌 QNF1 对桃果实褐腐病的防控作用

选取大小一致、无明显病斑的健康桃果实用 1.5% NaClO 溶液浸渍 5 min, 用无菌蒸馏水洗涤 3 次, 风干备用。将桃果实实于 QNF1 发酵液(1×10^{10} CFU/mL)中浸泡 10 min, 以浸泡无菌 LB 液体培养基 10 min 为对照, 2 组均置于室温下风干。

在桃果实一侧中心造成圆形伤口(直径 0.3 cm, 深 0.2 cm), 在伤口处接种桃褐腐病菌菌块($d=0.3$ cm)。将 2 组处理桃果实分别放在 2 个塑料盒中, 并置于常温下培养 4 d, 每组处理 10 个果实, 试验重复 3 次。每天观察果实发病情况, 评价内生菌 QNF1 对桃果实褐腐病发生的防控效果。

1.11 数据分析

采用 MEGA X64 软件构建系统发育树, 采用 DPS 9.01 统计软件分析差异显著性, 采用 Excel 2019 统计数据, 采用 Prism Graphpad 9.0 和 Photoshop 2020 作图。

2 结果与分析

2.1 病原菌在桃果实上的病害症状

自然发病果实病斑初期表面呈深棕褐色, 表皮变薄、易烂, 发病中心部位并伴有水流出, 随贮藏时间延长, 病斑面积逐渐向外扩展(图 1A); 发病中后期, 病斑中部出现大量灰白色孢子, 病斑边缘仍呈棕褐色(图 1B), 与前人发表的 *M. fructicola* 症状相似^[21]。

2.2 病原菌的形态特征

将分离纯化后的 HF 病原菌接种于 PDA 培养基内, 在 28 °C 恒温暗培养, 观察病原菌形态特征。如图 2A 和图 2B 所示, 分离得到病原菌 HF, 菌落颜色呈现棕褐色或灰白色, 产生大量白色孢子, 后变棕褐色, 菌落分布呈同心环状;

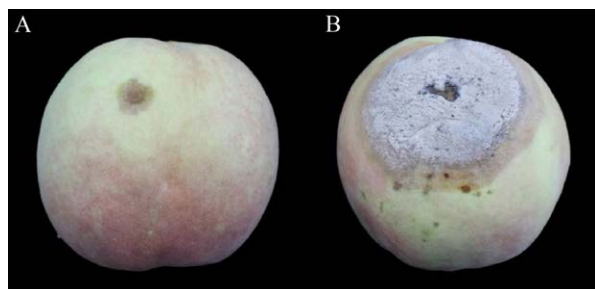


图 1 桃果实自然发病情况 A: 发病初期的果实; B: 发病中后期的果实。

Figure 1 Natural incidence of brown rot in peach fruit. A: Early infected fruit; B: Diseased fruit at the middle and late stages of infection.

该病原菌菌丝结构大多数呈二叉状‘Y’字形, 少数不分枝, 互相交错, 呈不规则形状(图 2C); 分生孢子为单孢且无色, 形状呈卵圆形或近圆形(图 2D)。病原菌形态学鉴定结果与纪兆林等^[13]报道的桃褐腐病菌菌丝结构及孢子形状的描述基本一致。

2.3 病原菌的致病性

根据科赫氏法则, 果实在接种致病菌第 2 天后除接种菌株 HF-4 外其他果实伤口部位明显腐烂, 3 d 后伤口处病斑面积逐渐增大且伴有白色孢子出现, 而接种菌株 HF-4 的果实仅在伤口部位有微量孢子产生(图 3)。第 4 天时, 接种其他菌株的果实病斑处产生大量孢子并蔓延至果实整个侧面, 接种菌株 HF-4 的果实产孢量不多, 但病斑面积与接种其他菌株的果实无明显差别(图 3)。该致病菌导致果实腐烂速度极快, 均与田间果实自然发病的症状一致, 因此认为这 5 个菌株(HF-1、HF-2、HF-3、HF-4、HF-5)均为自然发病的致病菌。

2.4 病原菌的系统发育树分析

利用通用引物 ITS1 和 ITS4 对 HF-1、HF-2、HF-3、HF-4、HF-5 病原菌的 DNA 进行 PCR 扩增得到单一 DNA 片段, 大小为 510 bp (图 4A), 测序得到的序列与 NCBI 已知的基因序列进行 BLAST 同源性检索, 下载 15 条与待测菌株相似度为 98% 以上的菌株序列构建系统发育树。基于 rDNA-ITS 序列, 菌丝测序序列与 *M. fructicola* H-1 (GenBank 登录号为 ON262112.1) 亲缘关系相近(图 4B); 基于 18S rRNA 基因序列结果, 菌丝测序序列与 *M. fructicola* AFTOL-ID279 (GenBank 登录号为 AY544724.1) 亲缘关系相近(图 5)。综上所述, 菌株 HF-1、HF-2、HF-3、HF-4、HF-5 为 *M. fructicola*。

2.5 pH 及温度对桃褐腐病菌生长的影响

将长满桃褐腐病菌 HF 的菌饼($d=0.7$ cm)置于不同 pH 的培养基于 28 °C 恒温培养箱黑暗培养 7 d, 结果表明(图 6), 桃褐腐病菌 HF 在 pH 5.0–11.0 之间均能生长, 尤其在 pH 6.0 时生长

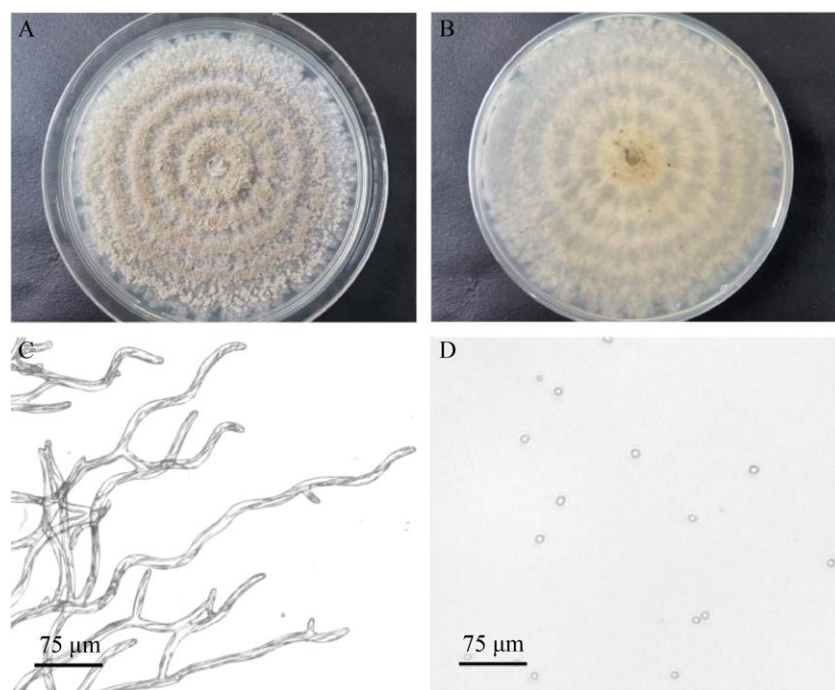


图2 病原菌的菌落形态 A: 菌落正面; B: 菌落反面; C: 病原菌菌丝形态; D: 病原菌孢子形态。
Figure 2 The colony morphological characteristics of fungal pathogen. A: Clony frontal characters; B: Colony backside characters; C: Mycelial morphology; D: Conidial morphology.

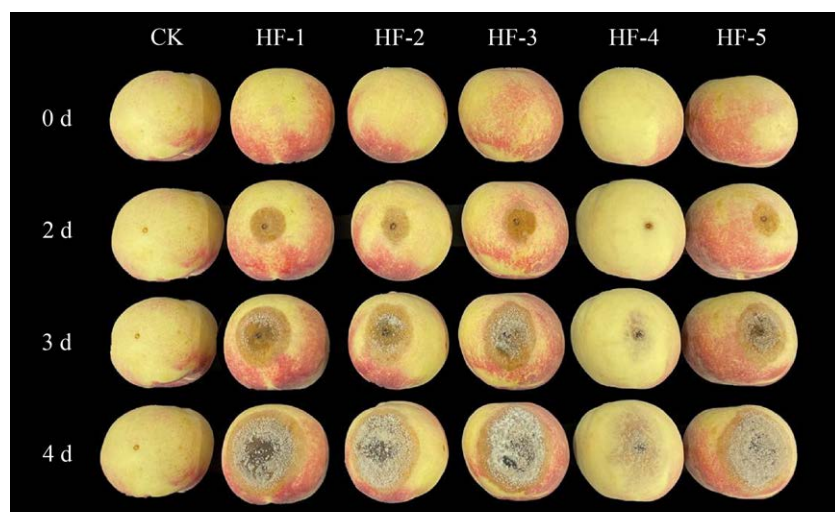


图3 分离的病原菌接种桃果实发病情况
Figure 3 Disease incidence of isolated fungal pathogen inoculated into peach fruits.

情况最佳, 当 pH 低于 6.0 时, 生长速度降低; 同样, 随着 pH 值不断升高, 桃褐腐病菌 HF 生长速度也逐渐下降。综上所述, 桃褐腐病菌 HF 在弱酸性的培养条件下生长速度最快。

不同温度条件下菌丝生长情况不同, 将桃褐腐病菌 HF 菌饼($d=0.7$ cm)置于 4、12、20、28、37 °C 温度条件下培养 7 d (图 7)。在 20–28 °C 生长速度最佳, 产孢量最多; 随着温度降低,

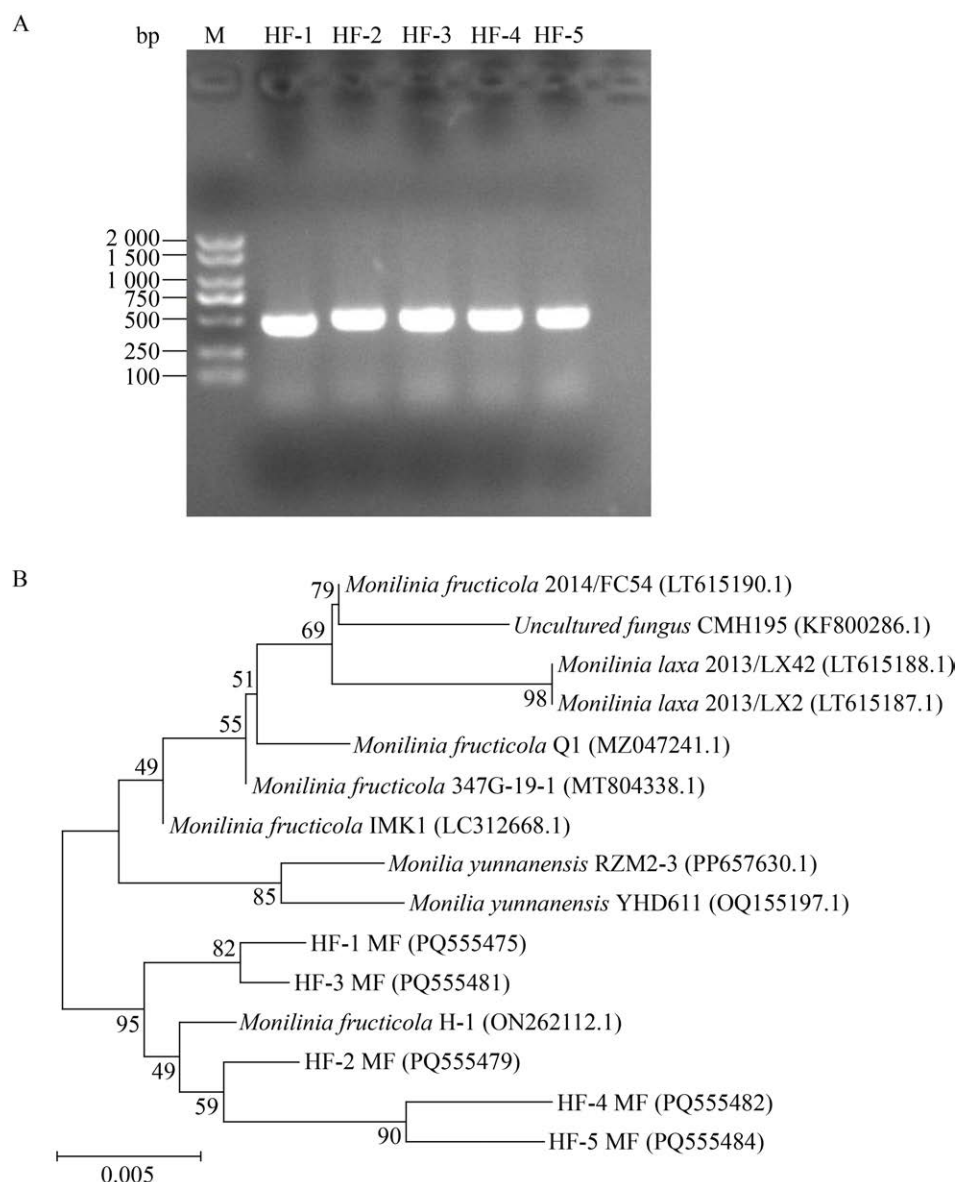


图 4 病原菌 rDNA-ITS 分子生物学鉴定 A: ITS PCR 扩增产物; B: 基于 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树。括号内数值为菌株在 GenBank 中登录号; 分支点上数字为重复 1 000 次自展值; 标尺 0.005 为核苷酸替换率。

Figure 4 rDNA-ITS molecular identification of fungal pathogen. A: ITS PCR amplified product; B: Phylogenetic tree based on rDNA-ITS sequences; Numbers in brackets are GenBank accession numbers; Numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on 1 000 replications; The scale bar indicates 0.005 substitutions per nucleotide position.

在 12 °C 时, 菌丝生长速度减慢, 几乎没有孢子产生; 当温度为 4 °C 时, 菌丝有极少量生长; 当温度升高达到 37 °C 时, 菌丝没有生长。综上所述, 菌丝在 20–28 °C 的培养温度范围内展现

出最佳的生长趋势。

2.6 内生菌 QNF1 导致桃褐腐病菌的异常生长

在正常生长条件下, 桃褐腐病菌 HF 菌丝

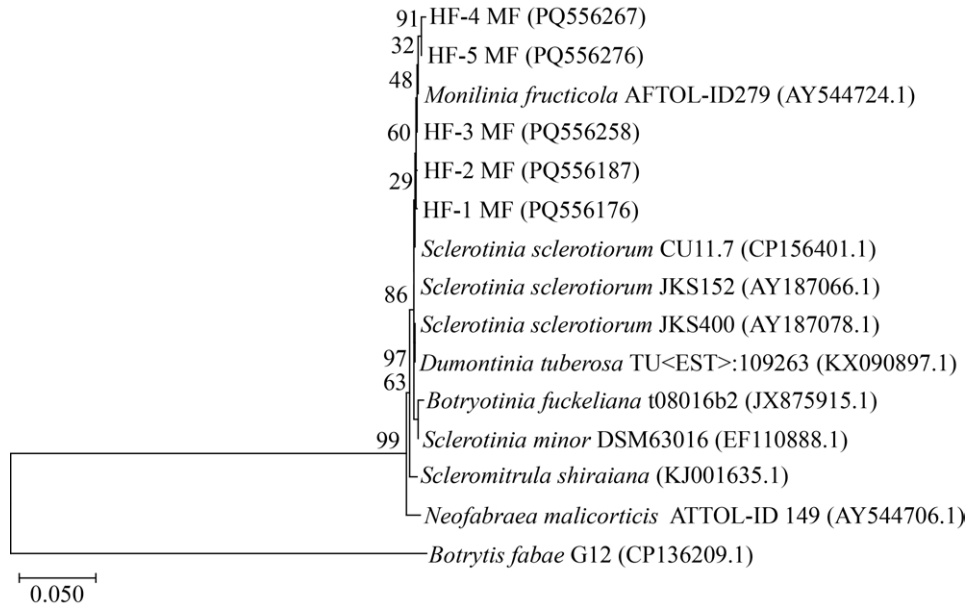


图5 基于18S rRNA基因序列构建的病原菌系统发育树 括号内数值为菌株在GenBank中登录号；分支点上数字为重复1 000次自展值；标尺0.050为核苷酸替换率。

Figure 5 Phylogenetic tree of pathogen *M. fructicola* based on 18S rRNA gene sequences. Numbers in brackets are GenBank accession numbers; Numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on 1 000 replications; The scale bar indicates 0.050 substitutions per nucleotide position.

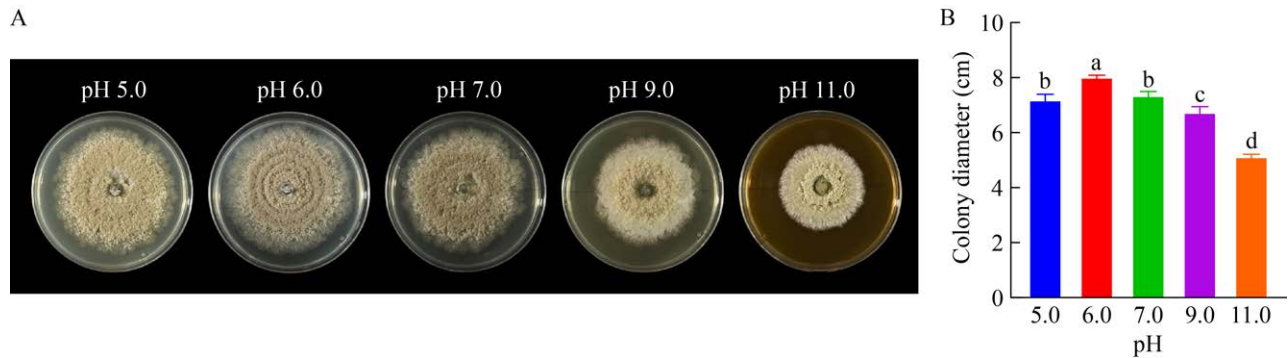


图6 pH对桃褐腐病原菌菌丝生长的影响 A:不同pH条件下生长7 d的菌落; B:不同pH条件下生长7 d的菌斑直径。不同小写字母表示差异显著,下同。

Figure 6 Effect of pH on mycelia growth of pathogen *M. fructicola*. A: Colonies growing at different pH values for 7 days; B: The diameter of plaque growing at different pH values for 7 days. Different lowercase letters indicate significant differences, the same below.

结构呈连续、光滑且无间断的形态(图8A)。而经QNF1发酵液(1×10^{10} CFU/mL)处理3 d后的桃褐腐病菌HF菌丝其内部结构发生了显著的异常变化,处理后的菌丝体出现明显的断裂现象,菌丝体被分割成不规则的块状结构,打破了其原有的

完整性和连续性(图8B)。此外,部分节间区域还观察到了菌丝膨大的现象,这可能是由于细胞壁受损、细胞内压力变化或代谢异常等原因所致。

综上所述,QNF1发酵液处理显著改变了桃褐腐病菌HF菌丝体的正常生长状态,导致



图 7 温度对桃褐腐病原菌菌丝生长的影响 A: 不同温度生长 7 d 的菌落; B: 不同温度生长 7 d 的菌斑直径。

Figure 7 Effect of temperature on mycelia growth of pathogen *M. fructicola*. A: Colonies growing at different temperatures for 7 days; B: Diameter of plaque growing at different temperatures for 7 days.

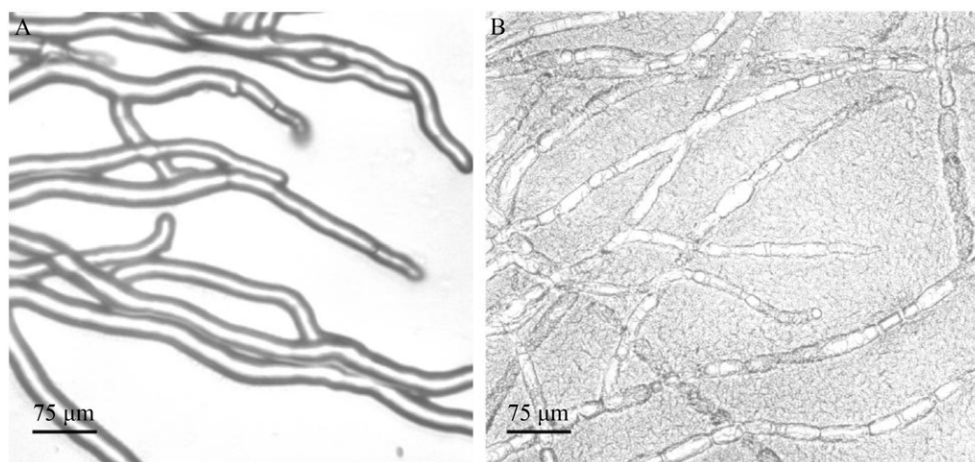


图 8 QNF1 发酵液对桃褐腐病原菌菌丝结构的影响 A: 正常生长的菌丝结构; B: QNF1 处理的菌丝结构。

Figure 8 Effect of QNF1 fermentation broth on mycelial structure of pathogen *M. fructicola*. A: Normal mycelium structure; B: Mycelial structure treated with QNF1.

其内部结构发生断裂、膨大等异常变化,进而影响了菌丝体的整体结构和功能。

2.7 内生菌 QNF1 能有效抑制桃果实褐腐病的发生

果实用内生菌 QNF1 浸泡处理后接种褐腐病菌 HF 菌饼,如图 9A 所示,第 1 天对照组果实(无菌 LB 液体培养基浸泡)与处理组(内生菌 QNF1 浸泡)果实接种部位无明显差异。从第 2 天开始,对照组果实接种部位出现明显的病斑,

随后呈现出显著的扩展趋势,并伴有大量白色病原菌孢子产生,而经过内生菌 QNF1 处理的果实,其接种部位随时间变化并不明显,仅在伤口边缘观察到微量的白色孢子。至接种后第 4 天,对照组果实的病斑平均直径高达 4.51 cm,表现出严重的病害症状(图 9B);而内生菌 QNF1 处理的果实,其病斑平均直径仅为 0.51 cm,说明褐腐病菌 HF 能被内生菌 QNF1 显著抑制,抑制率高达 88.17% (图 9C)。

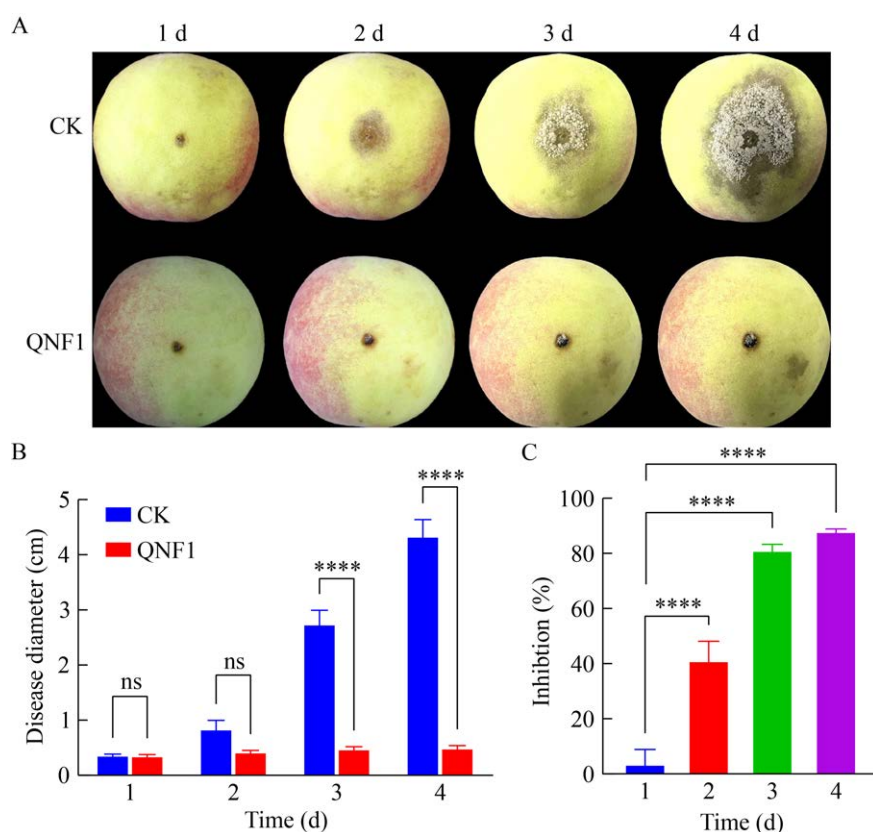


图9 QNF1发酵液对桃果实褐腐病的防治作用 A: 对照和QNF1处理果实的发病情况; B: 不同处理桃果实病斑直径比较; C: QNF1对桃果实褐腐病菌的抑制率。ns: 无统计学差异。

Figure 9 Inhibitive effect of QNF1 fermentation broth on brown rot of peach fruit. A: Disease incidence of control and QNF1 treated fruits; B: Disease diameter of peach fruit under different treatments; C: Inhibition rate of QNF1 against *M. fructicola* in peach fruit. ns: No statistical difference. ****: $P < 0.0001$.

3 讨论

桃褐腐病菌不仅危害果实,同时也危害花、枝条、叶片,是桃产业中最具挑战性的病害之一^[22]。李志伟等^[12]报道 *M. fructicola*、*M. yunnanensis* 和 *M. polystroma* 是山东省内桃褐腐病主要菌种,在不同菌株间其菌丝的生长速率、产孢量和致病力方面存在较大差异,因此,明确导致桃果实发病的致病菌种是具有必要性的。本研究选取山东省潍坊市安丘市石埠子镇一桃园的病害桃果实,通过病原菌的形态学、分子生物学鉴定出该果园桃果实的致病菌为 *M. fructicola*,该菌株形态与尹良芬^[11]、李志伟等^[12]及周芳^[18]对 *M. fructicola* 的菌落形态描述基本一致。该病原

菌 *M. fructicola* 对桃果实具有极强的侵染能力,导致果实发病腐烂速度异常迅速,健康桃果实接种该病原菌(1×10^6 CFU/mL) 4 d后,病斑面积可达整个果实的1/2,导致果实严重腐烂。纪兆林等^[13]认为不同产区来源 *M. fructicola* 间菌落形态略有差异,不同环境条件对褐腐病菌株生长情况也有差异,但各菌株生长的总体趋势一致,25 °C是该菌株的最适生长温度。Angeli等^[23]也认为不同种间菌株存在着明显的生物学特性差异,从巴西地区分离出的 *M. laxa* 菌株最适生长温度是19.8 °C,而 *M. fructicola* 菌株生长最佳温度为24.5 °C。本试验分离得到的 *M. fructicola* 在20–28 °C的温度范围内,其生长情况最佳,生长能力旺盛,与前人研究结果基

本一致。通过 pH 值对菌丝生长的影响分析, 该病原菌能够在 pH 5.0–11.0 的范围内生长, 尤其在弱酸性的培养条件下显示出最佳的生长状态, 与从樱桃中分离出的褐腐病菌生物学特性^[20]基本一致。

在生物防治领域内, 当前被深入探索并应用于实践的内生菌资源, 主要涵盖了木霉属(*Trichoderma*)家族中的哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)与绿色木霉(*Trichoderma viride*), 芽孢杆菌属(*Bacillus*)分类下的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)及苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*), 以及假单胞菌属(*Pseudomonas*)中的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)等多个菌种^[24–28]。这些内生菌微生物通过调控病原菌菌丝的生长、抑制孢子的萌发等生物学过程, 有效抑制病原真菌的侵染, 从而达到防治植物真菌病害的目的^[29]。前人研究结果表明, 韭菜对苹果轮纹病的发生有很强的抑制作用, 并能显著抑制香蕉枯萎病菌和甘蓝枯萎病菌的发生^[30–32]。实验室前期从韭菜根系中分离到了防御假单胞菌 QNF1, 进一步研究表明其对苹果果实轮纹病的发生有较好的抑制作用, 抑制率与对照相比最高减少了 66.05%^[33]。本试验结果表明, 菌株 QNF1 显著破坏了桃褐腐病菌的菌丝结构, 并且在桃果实中能显著抑制该病原菌的生长, 抑制率高达 88.17%, 相较于前人的研究结果, 菌株 QNF1 对桃褐腐病菌生长展现出了更强的抑制能力。本试验为桃褐腐病病原菌的防治提供了一定的理论依据, 但其具体生防机制有待进一步探究。

4 结论

本试验从发病桃果实上分离纯化出了桃褐腐病菌, 验证了其致病性, 结合形态学和分子生物学鉴定的结果, 该病原菌为 *M. fructicola*; 并进一步研究了该病原菌的生物学基本特性, 病原菌可以在 pH 5.0–11.0 内生长, 特别在弱酸性的培养条件下生长状态最佳。此外, 该病原

菌在低温条件(4 °C)下虽有微量孢子产生, 但菌落生长并不明显, 于较低温度(12 °C)时生长速率显著减缓, 无孢子产生, 当温度提升至 37 °C 时无法生长, 相比之下, 在温度于 20–28 °C 范围内, 该病原菌的菌落生长达到最佳状态; 进而验证了防御假单胞菌 QNF1 对桃褐腐病菌丝结构具有破坏作用, 并且在桃果实中能显著抑制褐腐病菌的生长, 具有较好的防治效果。

作者贡献声明

张翠芳: 数据分析、撰写文章; 王帅: 数据收集; 汪诗瑶: 结果分析; 宋文芳: 开展试验与数据收集; 张雨青: 数据收集; 葛柯良: 图片调整; 孙一方: 数据收集; 段艳欣: 文章写作与修改指导、提供资源; 黄永红: 研究指导。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 王青, 任杰群, 图尔罕·麦麦提伊敏, 陈国康, 党婷婷, 罗朝喜, 马冠华. 核果类果树褐腐病在重庆的发生与防治初报[J]. 植物保护, 2021, 47(6): 271–276, 284. WANG Q, REN JQ, TUERHAN·Maimaitiyimin, CHEN GK, DANG TT, LUO CX, MA GH. Preliminary study on the incidence and control of brown rot on stone fruit trees in Chongqing[J]. Plant Protection, 2021, 47(6): 271–276, 284 (in Chinese).
- [2] CHEN MJ, JIA F, CHEN S, ZHENG Y, HU Y, LIU WN, LIU CY, SUN XC, LU JW, CHEN GK, MA GH. *Streptomyces virginiae* XDS1–5, an antagonistic actinomycete, as a biocontrol to peach brown rot caused by *Monilinia fructicola*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2024, 104(12): 7514–7523.
- [3] JIA F, CHEN MJ, LIU CY, CHEN S, LIU WN, HUANG KZ, SUN XC, MA GH, CHEN GK. *Streptomyces rapamycinicus* HCD1–10: an effective biocontrol actinomycetes against postharvest Chinese flat peach brown rot caused by *Monilinia fructicola*[J]. Scientia Horticulturae, 2024, 327: 112836.
- [4] SHI YY, ZHANG S, ZHANG JH, WANG XR, HE Y, HAN XD, SONG ZY, SHI JY. The volatile components from *Bacillus cereus* N4 can restrain brown rot of peach fruit by inhibiting sporulation of *Monilinia fructicola* and inducing disease resistance[J]. Postharvest Biology and Technology, 2024, 210: 112755.
- [5] XU YY, WEI YY, JIANG S, XU F, WANG HF, SHAO

- XF. Preparation and characterization of tea tree oil solid liposomes to control brown rot and improve quality in peach fruit[J]. LWT, 2022, 162: 113442.
- [6] 李世访, 陈策. 桃褐腐病的发生和防治[J]. 植物保护, 2009, 35(2): 134-139.
- LI SF, CHEN C. Incidence and management of the peach fruit brown rot[J]. Plant Protection, 2009, 35(2): 134-139 (in Chinese).
- [7] 朱小琼, 段维军, 胡勐郡, 国立耘. 核果和仁果褐腐病原菌研究进展[J]. 菌物学报, 2022, 41(3): 331-348.
- ZHU XQ, DUAN WJ, HU MJ, GUO LY. Research progress on brown rot pathogens of stone and pome fruit[J]. Mycosystema, 2022, 41(3): 331-348 (in Chinese).
- [8] TRAN TT, LI H, NGUYEN DQ, SIVASITHAMPARAM K, JONES MGK, WYLIE SJ. Spatial distribution of *Monilinia fructicola* and *M. laxa* in stone fruit production areas in Western Australia[J]. Australasian Plant Pathology, 2017, 46(4): 339-349.
- [9] 胡勐郡. 中国桃褐腐病菌及其抗药性相关研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- HU MJ. Species characterization and fungicide resistance in peach brown rot fungi *Monilinia* spp. in China[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [10] van LEEUWEN GCM, BAA YEN RP, HOLB IJ, JEGER MJ. Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*[J]. Mycological Research, 2002, 106(4): 444-451.
- [11] 尹良芬. 中国核果/仁果类果树褐腐病菌种群结构及 *cytb* 基因的遗传进化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- YIN LF. Characterization of populations of *Monilinia* spp. on stone and pome fruits in China and genetic evolution of the *cytb* genes[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [12] 李志伟, 汪少丽, 刘保友, 杜建峰, 王英姿. 山东桃褐腐病原菌种群鉴定及致病性分析[J]. 果树学报, 2023, 40(2): 327-339.
- LI ZW, WANG SL, LIU BY, DU JF, WANG YZ. Population identification and pathogenicity analysis of peach brown rot pathogens in Shandong province[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 40(2): 327-339 (in Chinese).
- [13] 纪兆林, 谈彬, 朱薇, 董京萍, 朱峰, 徐敬友, 童蕴慧. 我国不同产区桃褐腐病原鉴定与分析[J]. 微生物学通报, 2019, 46(4): 869-878.
- JI ZL, TAN B, ZHU W, DONG JP, ZHU F, XU JY, TONG YH. Identification and analysis of the peach brown rot pathogens from different peach-growing areas in China[J]. Microbiology China, 2019, 46(4): 869-878 (in Chinese).
- [14] JI ZL, HE HW, ZHOU HJ, HAN F, TONG YH, YE ZW, XU JY. The biocontrol effects of the *Bacillus licheniformis* W10 strain and its antifungal protein against brown rot in peach[J]. Horticultural Plant Journal, 2015, 1(3): 131-138.
- [15] CHANG HT, YANG HQ, HAN T, WANG F, LIU YP. Study on the optimal antagonistic effect of a bacterial complex against *Monilinia fructicola* in peach[J]. Open Life Sciences, 2020, 15(1): 890-901.
- [16] 刘俊萍. 韭菜内生菌防御假单胞菌防控采后苹果轮纹病的研究[D]. 青岛: 青岛农业大学, 2023.
- LIU JP. Study on the prevention and control of postharvest apple fruit ring rot by endophytic bacteria *Pseudomonas protegens*[D]. Qingdao: Qingdao Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [17] 吴悦妮, 冯凯, 厉舒桢, 王朱珺, 张照婧, 邓晔. 16S/18S/ITS 扩增子高通量测序引物的生物信息学评估和改进[J]. 微生物学通报, 2020, 47(9): 2897-2912.
- WU YN, FENG K, LI SZ, WANG ZJ, ZHANG ZJ, DENG Y. In-silico evaluation and improvement on 16S/18S/ITS primers for amplicon high-throughput sequencing[J]. Microbiology China, 2020, 47(9): 2897-2912 (in Chinese).
- [18] 周芳. 山西省褐腐病菌种群结构及致病性研究[D]. 太谷: 山西农业大学, 2015.
- ZHOU F. Population structure and pathogenicity of *Monilinia* in Shanxi Province[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [19] QIU JE, ZHAO LN, JIANG SL, ABISO GODANA E, ZHANG XY, ZHANG HY. Efficacy of *Meyerozyma caribbica* in the biocontrol of blue mold in kiwifruit and mechanisms involved[J]. Biological Control, 2022, 173: 105000.
- [20] 罗倩, 张凤英, 兰世超, 张莹, 向准, 胡晓娜. 樱桃褐腐病菌鉴定及生物学特性研究[J]. 北方园艺, 2023(24): 24-29.
- LUO Q, ZHANG FY, LAN SC, ZHANG Y, XIANG Z, HU XN. Identification and biological characteristics of cherry brown rot[J]. Northern Horticulture, 2023(24): 24-29 (in Chinese).
- [21] 王准, 李文君, 魏春艳, 李海滨, 刘丽玲, 高明, 高越, 刘金华. 从进境桃中分离美澳型核果褐腐病菌的检疫鉴定[J]. 中国口岸科学技术, 2021, 3(6): 4-9.
- WANG Z, LI WJ, WEI CY, LI HB, LIU LL, GAO M, GAO Y, LIU JH. Isolation and identification of *Monilinia fructicola* (winter) honey from imported peach[J]. China Port Science and Technology, 2021, 3(6): 4-9 (in Chinese).
- [22] HILBER-BODMER M, BÜNTER M, PATOCCHI A. First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on apricot in a Swiss orchard[J]. Plant Disease, 2010, 94(5): 643.
- [23] ANGELI SS, de MIO LLM, AMORIM L. Comparative analysis of *Monilinia fructicola* and *M. laxa* isolates from Brazil: monocyclic components of peach brown rot[J]. Ciência Rural, 2017, 47(6): e20160300.
- [24] 马广民. 哈茨木霉和地衣芽孢杆菌对梨锈病的田间防治效果[J]. 中国果树, 2024(5): 111-115.
- MA GM. Field control effects of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus licheniformis* on pear rust[J]. China Fruits, 2024(5): 111-115 (in Chinese).
- [25] 廉华, 刘静依, 张静, 马光恕, 姜海洋, 蒋细良, 李梅. 绿色木霉对甜瓜立枯病防治效果及其生理机制初探[J]. 中国生物防治学报, 2024, 40(4): 905-913.
- LIAN H, LIU JY, ZHANG J, MA GS, JIANG HY, JIANG XL, LI M. Control effect and physiological mechanism of *Trichoderma viride* against melon damping-off[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2024, 40(4): 905-913 (in Chinese).
- [26] 李燕, 欧婷, 焦文莲, 张克瑶, 刘晓姣, 谢洁. 桑树内生枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其对桑椹菌核病的生防机理[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3253-3268.
- LI Y, OU T, JIAO WL, ZHANG KY, LIU XJ, XIE J.

- Isolation and identification of an endophytic *Bacillus subtilis* from mulberry and preliminary exploration of its biocontrol mechanisms against mulberry fruit sclerotiniase[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(9): 3253-3268 (in Chinese).
- [27] ISLAM MN, ALI MS, CHOI SJ, HYUN JW, BAEK KH. Biocontrol of *Citrus* canker disease caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* using an endophytic *Bacillus thuringiensis*[J]. *Plant Pathology Journal*, 2019, 35(5): 486-497.
- [28] 梅小飞, 王智荣, 阚建全. 荧光假单胞菌防治果蔬病害的研究进展[J]. *微生物学报*, 2019, 59(11): 2069-2082.
MEI XF, WANG ZR, KAN JQ. Advances in research for controlling fruits and vegetables diseases by using *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(11): 2069-2082 (in Chinese).
- [29] AN BJ, DU DC, HUANG ZD, PU ZX, LV J, ZHU L, LIU SM, ZHANG LP, CHEN GQ, LU LM. Biocontrol of *Citrus* fungal pathogens by lipopeptides produced by *Bacillus velezensis* TZ01[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1471305.
- [30] 付静, 孙梦, 刘俊萍, 梅眉, 黄永红. 韭菜挥发物对采后贮藏期苹果轮纹病的防控作用[J]. *植物保护学报*, 2022, 49(3): 975-982.
- FU J, SUN M, LIU JP, MEI M, HUANG YH. Control efficacy of Chinese leek volatiles on postharvest ring rot of apple fruits[J]. *Journal of Plant Protection*, 2022, 49(3): 975-982 (in Chinese).
- [31] 黄永红, 魏岳荣, 李春雨, 左存武, 易干军. 韭菜对香蕉枯萎病 4 号生理小种的抑制作用及对香蕉枯萎病的防控研究[J]. *果树学报*, 2011, 28(5): 857-862.
HUANG YH, WEI YR, LI CY, ZUO CW, YI GJ. Suppressive effect of Chinese leek on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4 and *Fusarium* wilt disease[J]. *Journal of Fruit Science*, 2011, 28(5): 857-862 (in Chinese).
- [32] 曾凤, 黄永红, 凌键, 茆振川, 谢丙炎, 杨宇红. 韭菜水提液对甘蓝枯萎病菌抑制作用初探[J]. *中国蔬菜*, 2016(1): 60-63.
ZENG F, HUANG YH, LING J, MAO ZC, XIE BY, YANG YH. Primary Studies on Inhibitory Effect of Water Extracts from *Allium tuberosum* on *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* in cabbage[J]. *China Vegetables*, 2016(1): 60-63 (in Chinese).
- [33] HUANG YH, LIU JP, LI JH, SHAN XY, DUAN YX. Endophytic bacterium *Pseudomonas protegens* suppresses mycelial growth of *Botryosphaeria dothidea* and decreases its pathogenicity to postharvest fruits[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1069517.