

研究报告



短芽胞杆菌对香蕉采后炭疽病的防治

车建美 刘国红 刘波* 陈倩倩 陈梅春

福建省农业科学院农业生物资源研究所 福建 福州 350003

摘要:【背景】香蕉炭疽病是香蕉贮运过程中常见的病害,危害严重。【目的】评价短芽胞杆菌菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 的抗菌活性,并进行菌株鉴定。【方法】采用抑菌圈法和菌丝生长速率法对菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 的拮抗活性进行测定,采用香蕉果实回接法测定这 2 株菌对香蕉采后炭疽病病原菌的抗菌活性;根据菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 的形态观察、特异性鉴定和 16S rRNA 基因序列进行种属鉴定。【结果】菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 发酵上清液对香蕉炭疽病病原菌菌丝生长具有抑制作用,抑菌圈直径分别达到 15.30 mm 和 15.35 mm。随着菌株培养时间的延长,菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 发酵上清液抑菌效果也逐渐增强,培养 72 h 时,抑菌圈直径分别增大至 17.37 mm 和 20.96 mm。不同添加量发酵上清液对香蕉炭疽病病原菌生长均具有一定的抑制作用。当培养基中添加 50 mL 菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 的发酵上清液时,其抑菌率可分别达到 83.90% 和 85.84%。接种炭疽病病原菌 4 d 后,防治效果分别为 67.88% 和 54.55%,处理后香蕉果皮 β -1,3-葡聚糖酶活性均明显高于对照。对菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 进行形态学观察、特异性鉴定和 16S rRNA 基因种属鉴定的结果表明,这 2 株菌分别被鉴定为短短芽胞杆菌 (*Brevibacillus brevis*) 和人参土壤短芽胞杆菌 (*Brevibacillus panacihumi*)。【结论】菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 对香蕉采后炭疽病具有较好的防治效果,可作为采后病害防治微生物的材料。

关键词: 短短芽胞杆菌, 人参土壤短芽胞杆菌, 香蕉, 炭疽病

Control of banana postharvest anthracnose by *Brevibacillus* sp. strains

CHE Jian-Mei LIU Guo-Hong LIU Bo* CHEN Qian-Qian CHEN Mei-Chun

Institute of Agricultural Bio-Resources Research, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China

Abstract: [Background] Banana anthracnose caused by *Colletotrichum musae* is the main postharvest disease and causes significant economic losses. [Objective] Antifungal activities of *Brevibacillus* sp. strains FJAT-17214 and FJAT-10657 were evaluated. The strains were identified in further. [Methods] The antifungal activities of *Brevibacillus* sp. strains FJAT-17214 and FJAT-10657 were evaluated using the

Foundation items: Public Project of Fujian Province (2018R1017-8, 2019R1034-6); Natural Science Foundation of Fujian Province (2018J01035); Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (AGP2018-3); 2017–2019 Young Talents Trust Project of China Association for Science and Technology (2017QNRC001)

*Corresponding author: E-mail: fzliubo@163.com

Received: 12-10-2019; Accepted: 26-12-2019; Published online: 06-01-2020

基金项目: 福建省属公益项目(2018R1017-8, 2019R1034-6); 福建省自然科学基金(2018J01035); 福建省农业科学院项目(AGP2018-3); 中国科协青年人才托举工程 2017–2019 项目(2017QNRC001)

*通信作者: E-mail: fzliubo@163.com

收稿日期: 2019-10-12; 接受日期: 2019-12-26; 网络首发日期: 2020-01-06

methods of the inhibitory zone test and mycelium growth rate. Strains FJAT-17214 and FJAT-10657 were identified based on morphology, specific PCR detection and 16S rRNA gene sequence. **[Results]** Strains FJAT-17214 and FJAT-10657 had antagonistic activities against *C. musae*. The antagonistic activities of fermentation broth of these two strains increased with the extending of incubation time. The inhibition rates of *C. musae* by strains FJAT-17214 and FJAT-10657 reached to 83.90% and 85.84%, respectively, when 50 mL of fermentation supernatant was added to the medium. The inoculating experiments on banana showed that strains FJAT-17214 and FJAT-10657 could effectively inhibit the spread of *C. musae*, with the inhibition rates of 67.88% and 54.55%, respectively. In addition, the β -1,3-glucanase activities in the strains FJAT-17214 and FJAT-10657 treated banana fruits were significantly higher than that of the control. On the basis of the morphological features, specific detect and 16S rRNA gene sequence analysis, strains FJAT-17214 and FJAT-10657 were separately identified as *Brevibacillus brevis* and *Brevibacillus panacihumi*. **[Conclusion]** Strains FJAT-17214 and FJAT-10657 have strong control effects on banana postharvest anthracnose. It could be used as the biocontrol agents for banana postharvest storage.

Keywords: *Brevibacillus brevis*, *Brevibacillus panacihumi*, Banana, Anthracnose

香蕉炭疽病是香蕉采后贮运的主要病害之一,由芭蕉炭疽菌(*Colletotrichum musae*)引起,严重影响香蕉果实的外观和品质,缩短了采后贮运时间,给香蕉的采后贮藏、运输和销售造成巨大的经济损失^[1]。因此,研究和寻找有效安全的香蕉采后炭疽病的生物防治技术和方法,是解决香蕉采后贮运的重要方向之一。

短芽胞杆菌属资源丰富,主要包括短短芽胞杆菌(*Brevibacillus brevis*)、土壤短芽胞杆菌(*Brevibacillus agri*)、中孢短芽胞杆菌(*Brevibacillus centrosporus*)等 20 多种(<http://www.bacterio.cict.fr/b/Brevibacillus.html>)。短芽胞杆菌属菌株可形成抗逆性强的芽孢,提高了该属菌株的环境适应能力和与土著微生物的竞争力,这些优点都为其应用提供了便利^[2-4]。短芽胞杆菌属菌株应用范围非常广泛,主要包括生物防治^[5-7]、分泌表达外源蛋白的宿主^[8]、微生物保鲜^[9-10]、微生物降解^[11-14]和工业生产^[15-16]等。类短芽胞杆菌可以在聚乙烯表面形成生物膜,将其降解为二氧化碳^[17];侧孢短芽胞杆菌 AMCC100017 对马铃薯疮痂病的防效可达 70.51%^[7];侧孢短芽胞杆菌 ZQ2 对苹果病原真菌,如尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、苹果轮纹病菌(*Botryosphaeria dothidea*)等具有较好的抑制作用^[18];短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 对不同植物和动物病原菌具有很好

的抑制作用^[6],对龙眼、枇杷等果实具有较好的保鲜效果^[10,19]。然而,目前利用短芽胞杆菌属菌株对香蕉炭疽病进行防治的报道仍不多见。

本研究分离筛选了 2 株对香蕉炭疽病具有抑制作用的短芽胞杆菌菌株,开展这 2 株菌对香蕉采后炭疽病的防治效果研究以及对采后酶活性的影响,以为香蕉采后炭疽病的安全防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 均为本实验室分离并保存,其中 FJAT-17214 分离自武夷山采集的夏枯草根系土壤, FJAT-10657 分离自宁德市九都镇水质示范点采集的出水口水样。香蕉炭疽病病原菌 FJAT-31129 为本实验室分离并保存。

1.1.2 供试培养基

细菌培养采用 LB 液体培养基;真菌培养采用 PDA 培养基(马铃薯葡萄糖培养基)。

1.1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, BioTek 公司; dNTPs, 北京天根生物有限公司; 3000 bp Marker, Ferments 生物有限公司。凝胶成像仪, Gel Doc-It™ UVP 凝胶成像系统、PCR 仪、电泳仪, Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌菌体和发酵上清液对香蕉炭疽病菌生长的影响

挑取菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 单菌落于 20 mL LB 培养基中, 30 °C、170 r/min 培养 12 h 后, 取 1 mL 转接于 100 mL LB 培养基中, 30 °C、170 r/min 培养 48 h, 13 000 r/min 离心 2 min, 收集上清液备用。采用无菌水稀释菌体至 1×10^6 个/mL 作为孢子悬浮液。香蕉炭疽病病原菌 FJAT-31129 接入 PDA 培养基上培养 7 d, 加入 5 mL 无菌水, 轻轻刮取, 收集上清即为病原菌的孢子液, 采用无菌水调整孢子浓度至 1×10^6 个/mL。将炭疽病菌 FJAT-31129 孢子液与 PDA 培养基混合后, 制备成含有病原菌的平板, 采用 6 mm 打孔器进行打孔, 在孔中加入 50 μ L 拮抗菌菌体和发酵上清液, 以无菌水为对照, 30 °C 培养 48 h 后, 采用十字交叉法测量抑菌圈直径。试验重复 3 次。

1.2.2 不同培养时间发酵上清液对香蕉炭疽病菌生长的影响

挑取菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 单菌落于 20 mL LB 培养基中, 30 °C、170 r/min 培养 12 h 后, 取 1 mL 转接于 100 mL LB 培养基中, 30 °C、170 r/min 培养, 培养 2、8、16、24、32、48 和 72 h 时的菌株 FJAT-17214 发酵液 OD_{600} 分别为 0.09、0.73、2.32、2.07、1.74、1.57 和 1.60, 培养 2、8、16、24、32、48 和 72 h 时的菌株 FJAT-10657 发酵液 OD_{600} 分别为 0.08、0.44、2.12、1.95、1.67、1.61 和 1.58, 将不同培养时间发酵液 13 000 r/min 离心 3 min, 取上清液。抑菌圈直径测定同 1.2.1。

1.2.3 不同量发酵上清液对香蕉炭疽病菌生长的影响

挑取菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 单菌落于 20 mL LB 培养基中, 30 °C、170 r/min 培养 48 h 后, 取 1、5、10、20、50 mL 的发酵上清液于 200 mL PDA 培养基中, 混合后制备成含有拮抗菌的平板, 取 6 mm 炭疽病病原菌 FJAT-31129 菌饼于该平板上, 28 °C 培养 120 h 后, 采用十字交叉法测定菌饼直径, 计算抑菌率。试验重复 3 次, 以等量的无菌水为对照。

$$\text{抑菌率(\%)} = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径}} \times 100。$$

1.2.4 拮抗菌对香蕉炭疽病的防治效果

取外观整齐无病虫害的天宝香蕉洗净晾干, 用 75%酒精进行表面消毒。在果实中部针刺 $3 \times 3 \times 3$ mm 伤口 3 个, 每个处理 10 个香蕉, 接入 10 μ L 的 1×10^6 个/mL 炭疽病孢子悬浮液, 28 °C 培养 24 h 后, 将香蕉浸泡在培养 48 h 的菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 发酵上清液(稀释 10 倍)中 2 min 后晾干, 置于 28 °C 培养 4 d, 统计直径大于 3 mm 的病斑数量, 计算发病率。试验重复 3 次, 以无菌水处理为对照。

$$\text{防治效果(\%)} = \frac{\text{对照组发病率} - \text{处理组发病率}}{\text{对照组发病率}} \times 100。$$

1.2.5 拮抗菌对香蕉 β -1,3-葡聚糖酶活性的影响

从 1.2.4 处理果实伤口周围, 采用灭菌打孔器取直径约 6 mm 的果皮组织 1 g, 加入 10 mL 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液, 研磨后于 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用 5 mL 磷酸缓冲液提取沉淀 2 次, 合并上清液定容至 25 mL 作为粗酶液, 4 °C 保存备用。 β -1,3-葡聚糖酶活性测定方法参照黑银秀等^[20]的方法进行。以每分钟产生相当于 1 μ g 葡萄糖的还原糖所需的酶量为 1 个酶活力单位(U), 酶活力表示为 U/min。

1.2.6 拮抗菌的鉴定

参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作方法提取菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 的基因组 DNA, 采用短芽胞杆菌属特异性引物 Brev174F (5'-AG ACCGGGATAACATAGGGAACTTAT-3')和 1377R (5'-GGCATGCTGATCCGCGATTACTAGC-3')^[21]进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L): 模板 DNA (20 ng/ μ L) 1 μ L, Brev174F 和 1377R 引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, dNTP 混合液(10 mmol/L) 0.5 μ L, *Taq* 酶(2.5 U) 0.3 μ L, $10 \times$ Buffer 2.5 μ L, ddH₂O 18.7 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1.5 min, 72 °C 1.5 min, 25 个循环; 72 °C 5 min。预计目的片段大小为 1 200 bp 左右, 根据 PCR 产物电泳条带

的有无, 确定测定菌株是否属于短芽胞杆菌属。

以菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 的基因组 DNA 为模板, 采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-ACGGCTACCTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L): 模板 DNA (20 ng/ μ L) 1 μ L, 27F 和 1492R 引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, dNTP 混合液(10 mmol/L) 0.5 μ L, *Taq* 酶(2.5 U) 0.3 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, ddH₂O 18.7 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。将 PCR 产物送至上海博尚生物有限公司进行测序, 测序结果递交 GenBank 获取登录号, 将获得的序列在 NCBI 的 GenBank 中进行同源性比对, 采用 MEGA 7.0 进行系统发育树的构建。

1.2.7 数据处理

采用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 17.0 进行数据统计分析, Duncan 氏法进行多重比较, 结果用平均值 \pm 标准差表示, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌不同处理液对香蕉炭疽病菌生长的影响

2.1.1 菌体和发酵上清液的影响

通过测定培养 48 h 的抑菌圈直径发现, 2 株菌的菌体和发酵上清液对香蕉炭疽病病原菌 FJAT-31129 的抑菌效果不同(表 1)。菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 的菌体悬浮液(1×10^6 个/mL)同无菌水

表 1 拮抗菌菌体和发酵上清液对香蕉炭疽病的抑菌效果
Table 1 Inhibitory effects of cells and fermentation supernatant of antibacterial on banana anthracnose (mm)

处理	菌体	发酵上清液
Treatment	Cells	Fermentation supernatant
FJAT-17214	0	15.30 \pm 0.74a
FJAT-10657	0	15.35 \pm 0.66a
对照 CK	0	0 b

注: 同列不同小写字母表示处理组间差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different small letters in the same column meant significant difference at 0.05 level among treatments.

对照一样, 对香蕉炭疽病病原菌无抑菌效果, 而发酵上清液对其具有明显的抑菌效果($P < 0.05$), 抑菌圈直径分别为 15.30 mm 和 15.35 mm。

2.1.2 不同培养时间发酵上清液的影响

培养 2 h 和 4 h 的拮抗菌发酵上清液同对照处理一样, 对香蕉炭疽病病原菌 FJAT-31129 无抑制效果。随着培养时间的延长, 菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 发酵上清液的抑菌效果逐渐增强(表 2 和图 1)。培养 16 h 的菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 发酵上清液的抑菌圈分别为 13.30 mm 和 12.13 mm; 培养 72 h 时, 抑菌圈直径分别增大至 17.37 mm 和 20.96 mm。

2.1.3 不同量发酵上清液的影响

不同量拮抗菌发酵上清液对香蕉炭疽病病原菌 FJAT-31129 的生长均具有一定的抑制作用。1 mL 菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 发酵上清液对病原菌 FJAT-31129 的抑菌率分别为 12.17%和 10.99%; 随着添加量的增加, 2 株拮抗菌的抑菌率显著增高($P < 0.05$), 5 mL 菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 发酵上清液的抑菌率分别提高到 80.02%和 80.71%; 当培养基中添加 50 mL 菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 的发酵上清液时, 其抑菌率可分别达到 83.90%和 85.84% (图 2)。

2.2 拮抗菌对香蕉炭疽病的防治效果

由表 3 可以看出, 接种香蕉炭疽病病原菌 FJAT-31129 后, 菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 发

表 2 拮抗菌不同培养时间上清液对香蕉炭疽病的抑菌效果
Table 2 Inhibitory effects of different fermentation time supernatant of antibacterial on banana anthracnose (mm)

Time (h)	FJAT-17214	FJAT-10657
2	0.00d	0.00c
8	0.00d	0.00c
16	13.30 \pm 0.76c	12.13 \pm 1.25c
32	14.53 \pm 0.31b	14.57 \pm 1.60bc
48	15.21 \pm 0.85b	15.37 \pm 0.73b
72	17.37 \pm 0.46a	20.96 \pm 2.66a

注: 同一列不同小写字母表示处理组间差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different small letters in the same column meant significant difference at 0.05 level among treatments.

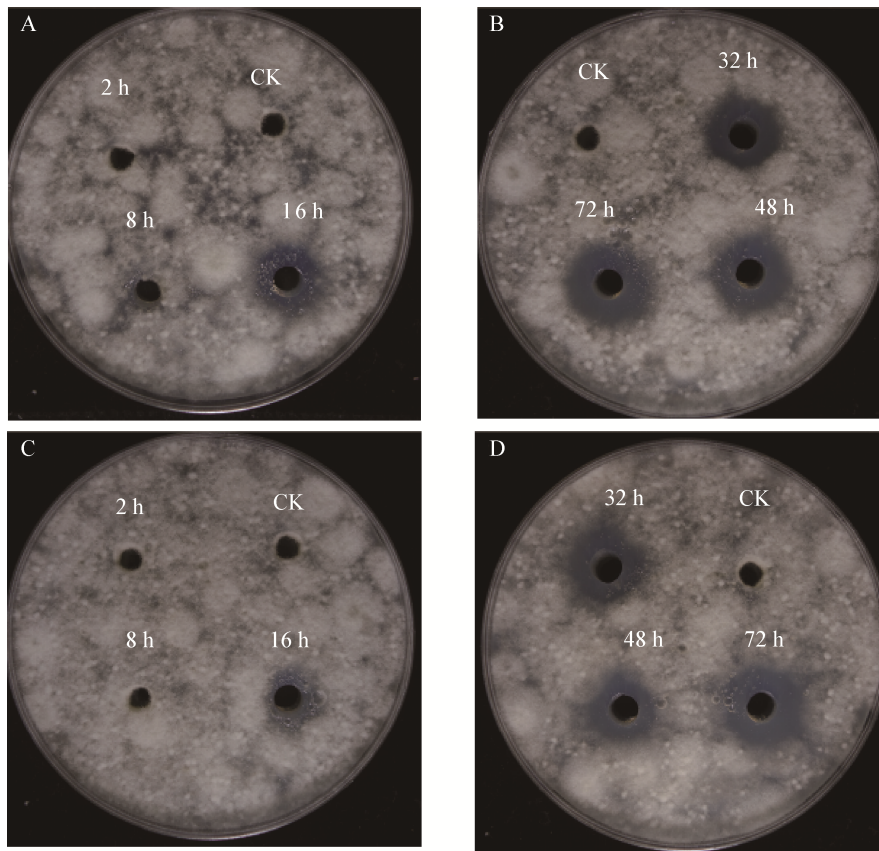


图 1 拮抗菌不同培养时间上清液对香蕉炭疽菌的抑菌圈

Figure 1 Inhibition zones of different fermentation time supernatant of antibacterial on banana anthracnose

注: A、B: 菌株 FJAT-17217; C、D: 菌株 FJAT-10657.

Note: A, B: The strain of FJAT-17217; C, D: The strain of FJAT-10657.

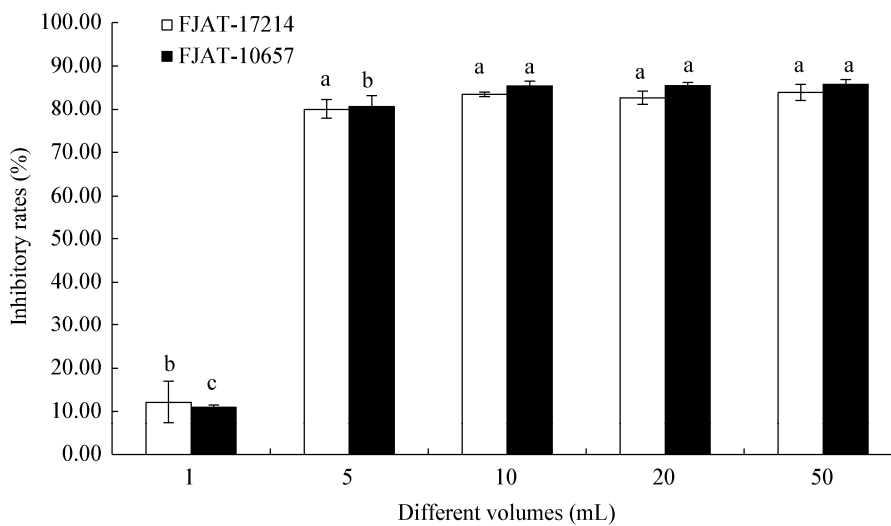


图 2 拮抗菌不同量上清液对香蕉炭疽病的抑菌效果

Figure 2 Inhibitory effects of different volume fermentation supernatant of antibacterial on banana anthracnose

注: 不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验, 在 $P < 0.05$ 水平差异显著.

Note: Different lowercase letters show the significantly different at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test, respectively.

表 3 2 株拮抗菌对香蕉炭疽病的防病效果

Table 3 Control efficiency of two antibacterial against banana anthracnose

处理	发病率	防治效果
Treatment	Disease incidence (%)	Control efficiency (%)
FJAT-17214	27.78±4.82b	67.88±4.69a
FJAT-10657	38.89±2.69b	54.55±3.70a
对照 CK	86.11±2.51a	—

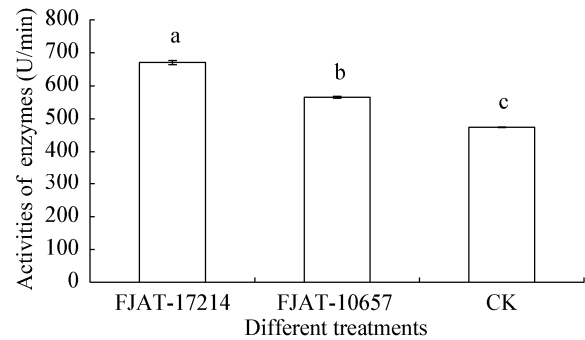
注：同列不同小写字母表示处理组间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different small letters in the same column meant significant difference at 0.05 level among treatments.

酵上清液可以明显地抑制病原菌病斑的扩展。接种炭疽病原 4 d 后，对照处理发病率为 86.11%，菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 处理后的发病率分别为 27.78% 和 38.89%，防治效果分别为 67.88% 和 54.55%。菌株 FJAT-17214 的防治效果略高于菌株 FJAT-10657，但二者的防治效果差异不显著($P<0.05$)。

2.3 拮抗菌对香蕉 β -1,3-葡聚糖酶活性的影响

菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 处理香蕉果实 4 d 后，香蕉果皮 β -1,3-葡聚糖酶活性则均显著高于对照($P<0.05$)(图 3)，分别达到 670.65 U/min 和

图 3 不同处理对香蕉 β -1,3-葡聚糖酶活性的影响Figure 3 Effect of different treatments on the activities of β -1,3-glucanase

注：不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验，在 $P<0.05$ 水平差异显著。

Note: Different lowercase letters show the significantly different at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test, respectively.

565.09 U/min，而且菌株 FJAT-17214 处理后酶活性显著高于菌株 FJAT-10657 处理。

2.4 菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 的鉴定

菌株 FJAT-17214 在 LB 培养基上培养 48 h 后，菌落表面湿润，乳白色，略有凸起，边缘规则(图 4A)。透射电镜观察表明，菌株 FJAT-17214 细胞为

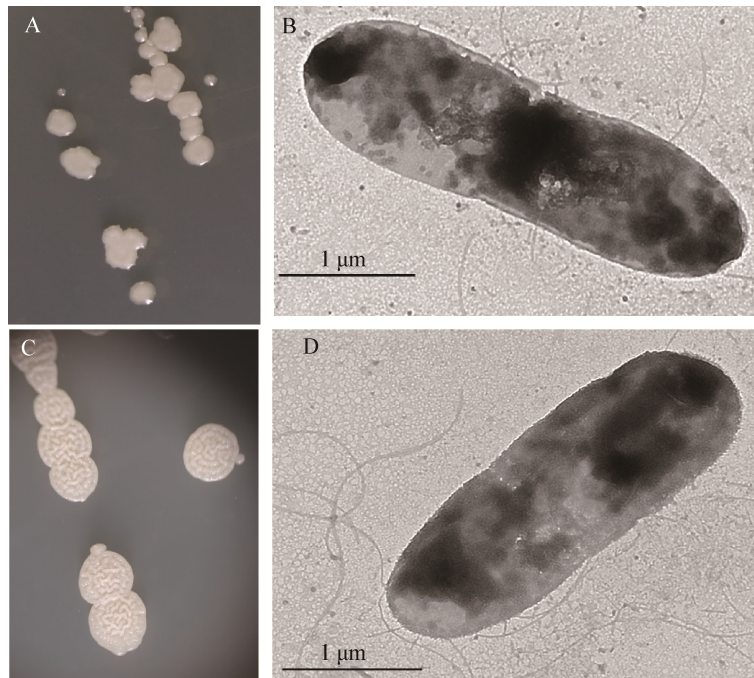


图 4 菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 的形态特征

Figure 4 Morphology of *Brevibacillus* strains FJAT-17214 and FJAT-10657

注：A、B：菌株 FJAT-17214 的菌落和菌体；C、D：菌株 FJAT-10657 的菌落和菌体。

Note: A, B: The colony and cell of the strain FJAT-17214; C, D: The colony and cell of the strain FJAT-10657.

短杆状, 菌体大小约为(0.6–1.0) μm×(2.8–3.0) μm, 具有鞭毛, 单个或成对(图 4B)。菌株 FJAT-10657 在 LB 培养基上培养 48 h 后, 菌落表面略干燥, 乳白色, 扁平, 边缘规则(图 4C)。透射电镜观察表明, 菌株 FJAT-10657 细胞为短杆状, 菌体大小约为(0.8–1.0) μm×(2.0–2.8) μm, 具有鞭毛, 单个或成对(图 4D)。

采用短芽胞杆菌属特异性引物对菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 进行特异性检测, 凝胶电泳结果表明, 这 2 个菌株均在 1 200 bp 处出现明亮的条带且条带单一, 阴性对照无条带, 阳性对照短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 在相同位置出现同样条带(图 5), 说明这 2 个菌株均为短芽胞杆菌属菌株。

进一步采用 16S rRNA 基因通用引物对菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 进行 PCR 扩增, 获得其 16S rRNA 基因序列, 菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 的 16S rRNA 基因序列 GenBank 登录号分别为 MF977723.1 和 MF977733.1。通过 NCBI 数

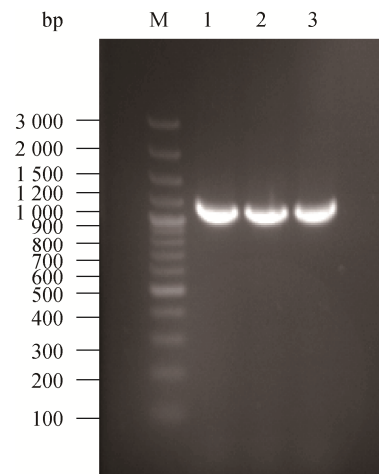


图 5 菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 的特异性检测
Figure 5 Specific detection of *Brevibacillus* strains FJAT-17214 and FJAT-10657

据库序列比对结果显示, 菌株 FJAT-17214 与 *Brevibacillus brevis* 的序列相似性达到 100%, 菌株 FJAT-10657 与 *Brevibacillus panacihumi* 的序列相似性达到 99%, 然后基于 16S rRNA 基因序列构建系统发育树(图 6), 结果表明, 菌株 FJAT-17214

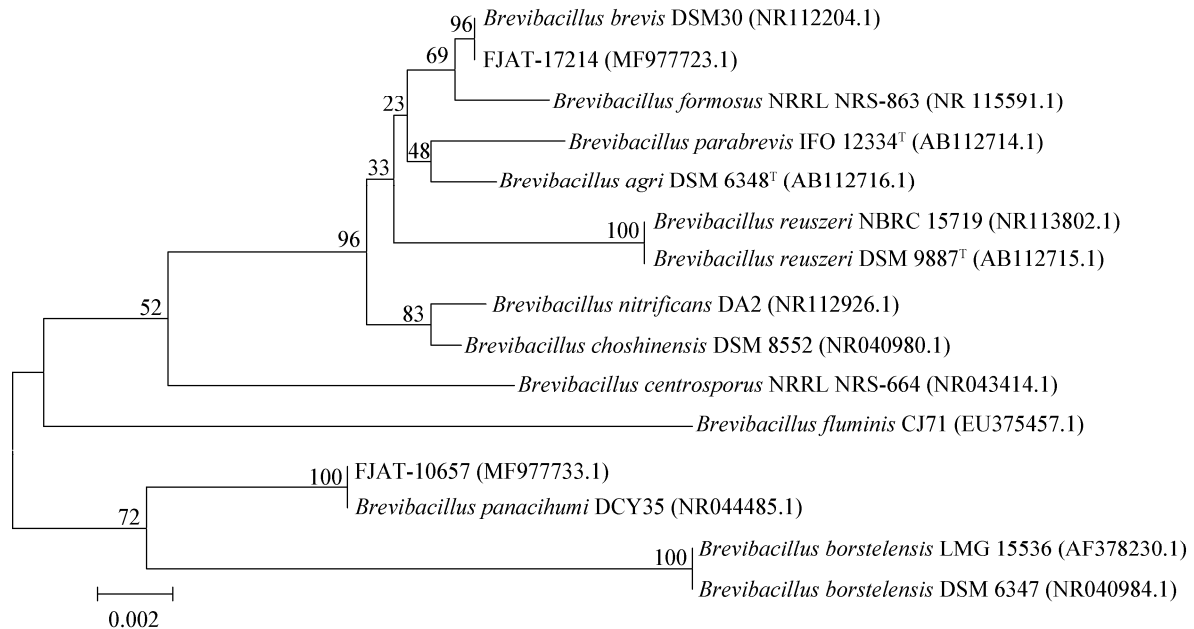


图 6 拮抗菌 FJAT-17214 和 FJAT-10657 基于 16S rRNA 基因序列的进化树

Figure 6 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of antagonistic bacteria FJAT-17214 and FJAT-10657

注: 分支上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比; 括号内数值为 GenBank 登录号; 标尺 0.002 代表 0.2% 的 16S rRNA 基因序列的进化差异。

Note: The bootstrap values (%) presented at the branches were calculated from 1 000 replications; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The scale bar 0.002 represents 2 nucleotide substitutions per 1 000 nucleotides.

与模式菌株 *Brevibacillus brevis* DSM30 在同一分支上, 亲缘关系最近; 菌株 FJAT-10657 与模式菌株 *Brevibacillus panacihumi* DCY35 在同一分支上, 亲缘关系最近。因此, 将菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 分别鉴定为 *Brevibacillus brevis* 和 *Brevibacillus panacihumi*。

3 讨论与结论

短芽胞杆菌抗逆性强、易培养, 近几年越来越多地应用于植物病害的生物防治^[9]。本实验室筛选获得的对香蕉采后炭疽病具有较好防效的生防菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657, 经本研究鉴定分别为短短芽胞杆菌(*B. brevis*)和人参土壤短芽胞杆菌(*B. panacihumi*)。短短芽胞杆菌在生物防治领域应用较多, 对草莓灰霉病^[22]、莲雾黑腐病^[9]、番茄灰霉病^[23]、芒果炭疽病^[24]等具有较好防效, 但在香蕉炭疽病防治方面研究较少, 短短芽胞杆菌 Bb7802、Bb7304、Bb7202、Bb7108、Bb7004 和 Bb5911 对香蕉炭疽病的防效在 50.06%–65.74%^[25]。本实验室筛选得到的短短芽胞杆菌 FJAT-17214 对香蕉炭疽病的防效高于以上 6 株短短芽胞杆菌, 达 67.88%。人参土壤短芽胞杆菌作为降解菌应用较多^[26-27], 未见其在香蕉炭疽病防治方面的报道。本实验室筛选得到人参土壤短芽胞杆菌 FJAT-10657, 其对香蕉采后炭疽病的防效可达 54.55%, 从而进一步扩充了香蕉炭疽病生防菌的资源库。

短短芽胞杆菌 FJAT-17214 和人参土壤短芽胞杆菌 FJAT-10657 发酵上清液、菌体对香蕉炭疽病病原菌 FJAT-31129 的抑菌效果不同。菌体悬浮液同无菌水对香蕉炭疽病病原菌无抑菌效果, 而发酵上清液对其具有明显的抑菌效果, 抑菌圈直径分别为 15.30 mm 和 15.35 mm。这与程敏等^[28]研究解淀粉芽胞杆菌植物亚种 CGMCC11640 发酵上清液对山核桃干腐病菌(*B. dothidea*)具有很好抑制效果的结果相同。侧孢短芽胞杆菌 BPM3 发酵上清液对稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)和稻枯斑丝核菌(*Rhizoctonia oryzae*)具

有很强的抑制效果^[29]。这很可能是由于短短芽胞杆菌 FJAT-17214 和人参土壤短芽胞杆菌 FJAT-10657 发酵上清液中均含有具有抑菌活性的胞外代谢产物。进一步研究发现, 随着培养时间的延长, 菌株 FJAT-17214 和 FJAT-10657 发酵上清液的抑菌效果也逐渐增强, 这与李晶等^[30]的研究结果相同, 其研究表明, 生防枯草芽胞杆菌 B29 菌株在培养 48–120 时, 随着培养时间的延长, 发酵上清液的抑菌活性明显提高。说明随着培养时间的延长, 这 2 株菌的发酵上清液中的胞外代谢产物得到积累。随着其发酵上清液添加量的增加, 其抑菌效果也逐渐增加, 也同样说明了胞外代谢产物量的增加可以提高这 2 株菌的抑菌效果。

香蕉采后果实诱导抗病性的产生与一些蛋白、酶类的产生以及活性氧迅速产生和积累等相关^[31]。 β -1,3-葡聚糖酶活性的升高与果实的抗病性密切相关, 其能够通过水解裸露在真菌菌丝尖端的 β -1,3-葡聚糖降解真菌细胞壁, 抑制其生长^[32]。短短芽胞杆菌 FJAT-17214 和人参土壤短芽胞杆菌 FJAT-10657 可明显提高香蕉果皮的 β -1,3-葡聚糖酶活性, 该结果与 Lu 等^[33]的研究结果相符合, 他们采用海洋红酵母(*Rhodospiridium paludigenum*)处理柑橘, 可显著提高 β -1,3-葡聚糖酶活性, 对柑橘绿霉病菌(*Penicillium digitatum*)具有较好的防效。因此, 我们推测短短芽胞杆菌 FJAT-17214 和人参土壤短芽胞杆菌 FJAT-10657 很可能是通过维持香蕉果实正常生理代谢、提高 β -1,3-葡聚糖酶活性来增强其对炭疽病的抗病性。然而发酵上清液中发挥作用的活性物质目前还不清楚, 后续研究将对其活性物质的提取、纯化及毒性检测进行深入研究, 为提升这 2 株菌的生防潜力奠定基础。

REFERENCES

- [1] Du CJ, Fu G, Pan LF, et al. Mutation breeding and control effect of banana anthracnose antagonistic strain Bs6602[J]. Plant Protection, 2016, 42(5): 69-74,79 (in Chinese) 杜婵娟, 付岗, 潘连富, 等. 香蕉炭疽病拮抗菌 Bs6602 的诱变选育及防病作用研究[J]. 植物保护, 2016, 42(5):

- 69-74,79
- [2] Cook RJ. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens[J]. Annual Review of Phytopathology, 1993, 31: 53-80
- [3] Cook RJ, Bruckart WL, Coulson JR, et al. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation[J]. Biological Control, 1996, 7(3): 333-351
- [4] Panda AK, Bisht SS, DeMondal S, et al. *Brevibacillus* as a biological tool: a short review[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2014, 105(4): 623-639
- [5] Prasanna L, Eijssink VGH, Meadow R, et al. A novel strain of *Brevibacillus laterosporus* produces chitinases that contribute to its biocontrol potential[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(4): 1601-1611
- [6] Che JM, Liu B, Chen Z, et al. Identification of ethylparaben as the antimicrobial substance produced by *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX[J]. Microbiological Research, 2015, 172: 48-56
- [7] Chen SF, Zhang MS, Wang JY, et al. Biocontrol effects of *Brevibacillus laterosporus* AMCC100017 on potato common scab and its impact on rhizosphere bacterial communities[J]. Biological Control, 2017, 106: 89-98
- [8] Takagi H, Miyauchi A, Kadowaki K, et al. Potential use of *Bacillus brevis* HPD31 for the production of foreign proteins[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53(8): 2279-2280
- [9] Che JM, Liu B, Ruan CQ, et al. Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes black spot disease of harvested wax apple fruit, using a strain of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX[J]. Crop Protection, 2015, 67: 178-183
- [10] Che JM, Fu P, Liu B, et al. The preservation feature of a freshness-keeping function bacterium strain FJAT-0809-GLX to *Dimocarpus longanan* Lour[J]. Chinese Journal of tropical Crops, 2010, 31(9): 1632-1640 (in Chinese)
车建美, 付萍, 刘波, 等. 保鲜功能微生物 FJAT-0809-GLX 对龙眼保鲜特性的研究[J]. 热带作物学报, 2010, 31(9): 1632-1640
- [11] Guo WK, Hou ZW, Shi M, et al. The recovery mechanism and application of *Brevibacillus brevis* and *Bacillus cereus* in extra-low permeability reservoir of Daqing[J]. Petroleum Exploration and Development, 2007, 34(1): 73-78 (in Chinese)
郭万奎, 侯兆伟, 石梅, 等. 短短芽胞杆菌和蜡状芽胞杆菌采油机理及其在大庆特低渗透油藏的应用[J]. 石油勘探与开发, 2007, 34(1): 73-78
- [12] Gupta A, Kaushik C P, Kaushik A. Degradation of hexachlorocyclohexane (HCH; α , β , γ and δ) by *Bacillus circulans* and *Bacillus brevis* isolated from soil contaminated with HCH[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(11/12): 1803-1805
- [13] Hadad D, Geresh G, Sivan A. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98(5): 1093-1100
- [14] Yang BR, Sun ZQ, Wang LP, et al. Kinetic analysis and degradation pathway for *m*-dichlorobenzene removal by *Brevibacillus agri* DH-1 and its performance in a biotrickling filter[J]. Bioresource Technology, 2017, 231: 19-25
- [15] Maeda T, Yoshimura T, Garcia-Contreras R, et al. Purification and characterization of a serine protease secreted by *Brevibacillus* sp. KH3 for reducing waste activated sludge and biofilm formation[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(22): 10650-10656
- [16] Banerjee UC, Sani RK, Azmi W, et al. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive[J]. Process Biochemistry, 1999, 35(1/2): 213-219
- [17] Pramila R, Padmavathy K, Ramesh KV, et al. *Brevibacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas citronellolis*-Potential candidates for biodegradation of low density polyethylene (LDPE)[J]. Journal of Bacteriology Research, 2012, 4(1): 9-14
- [18] Song Z, Liu KQ, Lu CX, et al. Isolation and characterization of a potential biocontrol *Brevibacillus laterosporus*[J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(18): 2675-2681
- [19] Che JM, Zheng XF, Liu B, et al. Preparation of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX agent and study on its effect on loquats (*Eriobotrya japonica*)[J]. Storage and Process, 2011, 11(5): 6-9 (in Chinese)
车建美, 郑雪芳, 刘波, 等. 短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 菌剂的制备及其对枇杷保鲜效果的研究[J]. 保鲜与加工, 2011, 11(5): 6-9
- [20] Hei YX, Zhu WM, Guo SR, et al. Effects of riboflavin and TYLCV inoculation on the activities of chitinase and β -1,3-glucanase in tomato[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2012, 35(4): 135-139 (in Chinese)
黑银秀, 朱为民, 郭世荣, 等. 核黄素和接种番茄黄化曲叶病毒对番茄几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(4): 135-139
- [21] Shida O, Takagi H, Kadowaki K, et al. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(4): 939-946
- [22] Wafaa MH, El Kareem FKA, Shabaan AAH. Bioprocessing of *Brevibacillus brevis* and *Bacillus polymyxa*: a potential biocontrol agents of gray mould disease of strawberry fruits[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2013, 24(1): S45

- [23] Zheng XQ, Guo ZH, Di N, et al. Isolation and screening of antagonistic bacterium against *Botrytis cinerea*[J]. Northern Horticulture, 2017(6): 122-126 (in Chinese)
郑喜清, 郭振华, 邸娜, 等. 番茄灰霉病拮抗细菌的分离筛选及鉴定[J]. 北方园艺, 2017(6): 122-126
- [24] Yang TY, Sun L, Zhou TT, et al. Analysis on the key antagonistic active compositions of *Brevibacillus brevis* HAB-5 and its characteristics[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(2): 222-231 (in Chinese)
杨廷雅, 孙亮, 周婷婷, 等. 短短芽孢杆菌 *Brevibacillus brevis* HAB-5 主要抑菌活性成分的分析及其特性研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(2): 222-231
- [25] Fu G, Ye YF, Wu YG, et al. Identification and control effect on banana anthracnose of seven antagonistic strains[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015, 36(2): 358-364 (in Chinese)
付岗, 叶云峰, 吴永官, 等. 7 株拮抗菌的鉴定及其对香蕉炭疽病的防治作用[J]. 热带作物学报, 2015, 36(2): 358-364
- [26] Ramlan MAM, Azizan NA, Han BH, et al. Decolourisation of reactive black 5 by azoreductase produced by *Brevibacillus panacihumi* ZBI[J]. Jurnal Teknologi, 2012, 59(1): 11-16
- [27] Wang XX, Li C, Zhao LB, et al. Optimization of fermentation medium and culture conditions of hydrocarbon-degrading bacterium *Brevibacillus panacihumi* W25[J]. Advanced Materials Research, 2014, 1010-1012: 69-72
- [28] Cheng M, Xu QF. Inhibitory mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* CGMCC 11640 against *Botryosphaeria dothidea*, the pathogen of canker disease of *Carya cathayensis*[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2017, 34(2): 326-331 (in Chinese)
程敏, 徐秋芳. 解淀粉芽孢杆菌植物亚种 CGMCC 11640 对山核桃干腐病菌的抑制机制[J]. 浙江农林大学学报, 2017, 34(2): 326-331
- [29] Saikia R, Gogoi DK, Mazumder S, et al. *Brevibacillus laterosporus* strain BPM3, a potential biocontrol agent isolated from a natural hot water spring of Assam, India[J]. Microbiological Research, 2011, 166(3): 216-225
- [30] Li J, Yang Q, Zhao LH, et al. Antifungal substance from biocontrol *Bacillus subtilis* B29 strain[J]. China Biotechnology, 2008, 28(2): 59-65 (in Chinese)
李晶, 杨谦, 赵丽华, 等. 生防枯草芽孢杆菌 B29 菌株抗菌物质的初步研究[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(2): 59-65
- [31] Tian SP, Chan ZL. Potential of induced resistance in postharvest diseases control of fruits and vegetables[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 34(5): 385-394
- [32] Yao HJ, Tian SP. Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98(4): 941-950
- [33] Lu LF, Ye CZ, Guo SH, et al. Preharvest application of antagonistic yeast *Rhodospiridium paludigenum* induced resistance against postharvest diseases in mandarin orange[J]. Biological Control, 2013, 67(2): 130-136