

地衣芽孢杆菌W10 及其抗菌蛋白对桃褐腐病的抑制作用

纪兆林¹, 贺惠文¹, 周慧娟², 韩 峰¹, 童蕴慧¹, 叶正文², 徐敬友^{1,*}

(¹扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009; ²上海市农业科学院林木果树研究所, 上海 201403)

摘 要: 地衣芽孢杆菌菌株 W10 菌液及其产生的抗菌蛋白对贮藏期桃褐腐病都有较好的抑制作用, 高浓度 (1×10^{10} cfu · mL⁻¹ 菌液, 3.0 mg · mL⁻¹ 抗菌蛋白) 效果更好。在较低温度 (4 °C) 和湿度 (RH 70% ~ 75%) 条件下, 高浓度菌液和抗菌蛋白在病菌定殖前处理桃果能收到较好的防病效果。钙离子 [0.1% Ca(NO₃)₂] 能提高 W10 菌液及抗菌蛋白对桃果实褐腐病的防治效果, 能明显推迟始病时间。W10 菌液和抗菌蛋白浸果处理能显著降低贮藏期的自然腐烂率, 与多菌灵效果类似; 通过对果肉色差 L^* 值、果实硬度、可溶性固形物含量、失重率等品质指标参数的测定, 发现菌液和抗菌蛋白处理均不会影响果实品质。

关键词: 桃; 地衣芽孢杆菌; 抗菌蛋白; 桃褐腐病菌; 生物防治; 果实品质

中图分类号: S 662.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 10-1879-10

Preservative Effects of *Bacillus licheniformis* W10 and Its Antifungal Protein on Storage Peach Fruits

Ji Zhao-lin¹, HE Hui-wen¹, ZHOU Hui-juan², HAN Feng¹, TONG Yun-hui¹, YE Zheng-wen², and XU Jing-you^{1,*}

(¹College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; ²Forestry and Fruit Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

Abstract: The biocontrol effects of *Bacillus licheniformis* W10 bacterial suspension and its antifungal protein on peach brown rot caused by *Monilinia fructicola* in storage peach fruits and the effects on fruit quality were investigated. The results showed that the fruit disease suppression of *B. licheniformis* W10 bacterial suspension and antifungal protein were significantly higher than that of the control. Inoculation of bacterial suspension and antifungal protein prior to *M. fructicola* gave a better biocontrol effect, and the higher concentrations of bacterial (1×10^{10} cfu · mL⁻¹) and antifungal protein (3.0 mg · mL⁻¹) performed better control effects. The environmental conditions, such as temperature and humidity, affected biocontrol effects of W10 bacterial suspension and antifungal protein. The influence of environment conditions on the activity of antifungal protein was less than that on bacterial suspension. Moreover, lower temperature (4 °C) and relative humidity (RH 70% – 75%) were favorable to prevent peach brown rot by W10 bacterial suspension and its antifungal protein. The W10 bacterial suspension and antifungal protein amended with

收稿日期: 2015 – 06 – 09; **修回日期:** 2015 – 09 – 23

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-31-2-02); 江苏省农业科技自主创新资金项目 [CX (14) 2015, CX (15) 1020]; 扬州大学高层次人才科研启动基金项目 (5018/137010407)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jyxu@yzu.edu.cn)

calcium[0.1% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$] could enhance the biocontrol effects, and obviously put off the occurrence of peach brown rot. In addition, the bacterial suspension and antifungal protein significantly reduced the natural decay rates of peach fruits during storage, and the effects were equal to carbendazim. Moreover, both W10 bacterial suspension and antifungal protein treatments did not have effects on external and internal fruit appearance, such as chromatic aberration parameter L^* of flesh, flesh firmness, soluble solids content and weight loss. Therefore, the *B. licheniformis* W10 is a potential biocontrol factor for peach brown rot.

Key words: peach; *Bacillus licheniformis*; antifungal protein; *Monilinia fructicola*; biological control; fruit quality

褐腐病又称菌核病、果腐病等,是记载最早的果品采后病害(Ogawa et al., 1995)。该病主要在果实生长后期和采后贮藏期严重发生,使果实丧失商品价值,造成巨大的经济损失(Ogawa et al., 1995; 李世访和陈策, 2009)。目前中国大部分地区的桃褐腐病主要病原物为果生链核盘菌(*Monilinia fructicola*) (Zhu et al., 2005; Hu et al., 2011a, 2011b; Yin et al., 2013), 该病原菌首先在美国东部被发现(Fan et al., 2010)。目前主要使用化学农药进行桃褐腐病的防治,这不仅会导致病菌对其产生抗药性(尹良芬等, 2010),而且桃果上残留的农药也会威胁公众健康。在欧洲,核果类果实采后禁止喷洒一切化学农药(Casals et al., 2010)。桃褐腐病的生物防治是该病综合治理的一个重要方向(Spadaro & Gullino, 2004)。生物防治由于无毒,无残留,也没有连续使用化学药剂产生的抗药性,逐渐成为控制果蔬采后病害的研究热点,并有望取代化学方法(Sharma et al., 2009)。

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) W10 是本实验室从植株根围分离获得的可以产生胞外抗菌蛋白的一株生防细菌,对多种植物病原菌具有较强的抑制作用,田间防效与化学农药相当(童蕴慧等, 2000; 唐丽娟等, 2005; 孙启利等, 2007; 纪兆林等, 2008)。研究地衣芽孢杆菌 W10 及其抗菌蛋白对桃褐腐病的防治和保鲜作用,可促进其在桃褐腐病生物防治中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验于 2013 年在扬州大学植物保护学实验室和上海市农业科学院林木果树研究所进行。生防细菌地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) W10 菌株由本实验室提供,从番茄根际土壤中分离获得;桃褐腐病菌(*M. fructicola*)由本实验室提供,从贮藏期桃病果上分离获得。生防细菌和病原真菌的保存及培养分别用牛肉膏蛋白胨培养基(NA)和马铃薯蔗糖培养基(PSA)。试验用桃果为质地较硬的油桃‘沪油 18’和软质的水蜜桃‘湖景蜜露’,均由上海市农业科学院林木果树研究所提供。

地衣芽孢杆菌菌液和抗菌蛋白制备:将活化的W10 菌株接种于 150 mL NA培养液中,28 ℃、180 r·min⁻¹培养 48 h得到菌液,用平板计数法测量浓度,并调制为 1×10^{10} cfu·mL⁻¹,或再稀释成较低浓度用于试验。抗菌蛋白制备参照纪兆林等(2007)的方法,将培养获得的W10 菌液于 4 ℃、8 000 r·min⁻¹离心 15 min,上清液经细菌滤器(滤膜孔径 0.45 μm)除菌,得培养滤液;在滤液中缓慢加入硫酸铵达到 30%饱和度,4 ℃静置过夜,离心收集沉淀。沉淀用原体积 1/30 的 0.05 mol·L⁻¹ Tris-HCl缓冲液(pH 6.8)悬浮,经透析袋透析(4 ℃,截留分子量为 8 000 D),每 8 h更换 1 次透析液,换液 3 次。袋内透析液用细菌滤器(滤膜孔径 0.22 μm)过滤,即得抗菌粗蛋白液。制作和

回归计算出吸光度 (OD_{280}) 对浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的牛血清蛋白溶液标准曲线 $y = 0.6751x$ ($r^2 = 0.9947$) [其中 y 为吸光度 OD_{280} 值, x 为蛋白浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)], 测定提取蛋白的 OD_{280} 值, 根据标准曲线方程计算出蛋白浓度, 并稀释配制成各级较低浓度进行试验。

1.2 地衣芽孢杆菌菌液和抗菌蛋白对桃褐腐病防治作用试验

设高、中、低 3 种浓度菌液 (1×10^{10} 、 1×10^8 和 $1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和蛋白 (3.0 、 0.6 和 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。75% 乙醇消毒桃果表面后晾干, 用打孔器在果表切去深 3 mm、直径 6 mm 的果皮块, 在孔洞内分别接种生防细菌或抗菌蛋白 50 μL , 以无菌水为对照, 1 d 后再接种直径 6 mm 的桃褐腐菌丝块。

设 3 个接种时间处理: 先接种 W10 菌液或抗菌蛋白, 1 d 后再接种褐腐病菌; 菌液或抗菌蛋白与桃褐腐病菌同时接种; 先接种病菌, 1 d 后再接种菌液或抗菌蛋白。设无菌水替代菌液或抗菌蛋白的对照。W10 菌液浓度为 $1 \times 10^{10} \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 蛋白浓度为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

温度试验设低温 (4°C) 和常温 (25°C) 两种; 湿度试验设较低湿度 (RH 70% ~ 75%) 和高湿 (RH 95% ~ 100%) 两种。W10 菌液浓度为 $1 \times 10^{10} \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 蛋白浓度为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

喷施钙离子处理: 果实上先喷洒 0.1% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液, 晾干后再接种 W10 菌液 ($2 \times 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$) 或抗菌蛋白 ($3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 1 d 后再接种褐腐病菌。

上述每处理重复 3 次, 每重复 10 个桃果, 置于 25°C , RH 70% ~ 75% 条件 (不同温度、湿度试验按具体温度、湿度) 下贮存。每天检查 1 次, 记录开始发病时间及测量病斑直径。

1.3 地衣芽孢杆菌 W10 及抗菌蛋白对桃果实品质的影响试验

分别用 $1 \times 10^{10} \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ W10 菌液、 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 抗菌蛋白以及 $1\,000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 多菌灵浸果 3 min, 以无菌水为对照, 晾干后贮藏于 25°C 、相对湿度 70% ~ 75% 的果库中, 分别测定油桃 (9 d) 和水蜜桃 (7 d) 的果实品质, 包括果肉色泽、硬度、可溶性固形物含量 (周慧娟 等, 2010), 以及失重率、自然腐烂率。在果实缝合线左右赤道部位对称位置用日本产 CR-400C (D65 光源) Minolta 型全自动色差计测定表皮 1 cm 处的果肉色差, 获得果肉色差 L^* 值 (表示光亮度, 从黑到白, 0 ~ 100)。用水果刀削去果实缝合线左右赤道部位对称果皮后, 用 GY-1 型果实硬度计测定果肉组织硬度。用手持阿贝折光仪测定可溶性固形物含量。每次随机测定 10 个桃果, 每桃果测定 3 次, 取平均值。

采用 Excel 2003 软件进行数据统计, 应用 DPS (v7.05) 软件, 采用 ANOVA 进行邓肯氏多重比较。

2 结果与分析

2.1 W10 抗菌蛋白对桃褐腐病菌的拮抗作用

从图 1 可以看出, 地衣芽孢杆菌 W10 抗菌蛋白对桃褐腐病菌具有明显的拮抗作用, 抑菌带宽达 6.6 mm, 这说明 W10 菌株具有防治桃褐腐病的潜力。



图 1 地衣芽孢杆菌 W10 抗菌蛋白对桃褐腐病菌的拮抗作用

Fig. 1 Antagonistic effect of *B. licheniformis* W10 antifungal protein on *M. fructicola*

2.2 W10 菌液及抗菌蛋白对桃褐腐病的防效

2.2.1 不同浓度对防病效果的影响

从表 1 可以看出, 高浓度 (1×10^{10} cfu · mL⁻¹) W10 菌液对 ‘沪油 18’ 油桃和 ‘湖景蜜露’ 水蜜桃褐腐病的抑制率均达 100%, 浓度降低则防病作用显著下降, 中浓度和低浓度 (1×10^8 和 1×10^6 cfu · mL⁻¹) 菌液对 ‘沪油 18’ 油桃褐腐病的抑制率分别为 38.5%和 28.3%。同样, 3.0 mg · mL⁻¹ 抗菌蛋白的防病效果最好, 两个品种分别达 63.5%和 62.6%; 当抗菌蛋白稀释 5 倍和 10 倍 (0.6 和 0.3 mg · mL⁻¹) 时, 病斑抑制率也有所降低。

另外由表 1 可知, W10 高浓度菌液处理后, 发病时间比对照推迟 9 d, 而中浓度和低浓度菌液处理后, 发病时间分别推迟 2~3 d 和 1~2 d。不同浓度抗菌蛋白处理也可推迟发病 1~3 d。

表 1 不同浓度 W10 菌液及抗菌蛋白对桃褐腐病的抑制和发病时间的推迟作用
Table 1 Effects of different concentrations of W10 bacterial suspension and antifungal protein on the suppression and disease happening time of peach brown rot

品种 Cutliver	处理 Treatment	浓度 Concentration	抑制率/% Inhibition rate	发病时间/d Diseased time	推迟/d Put off
‘沪油 18’ 油桃 ‘Huyou 18’ nectarine	菌液 Bacterial suspension	高 High	100.0 ± 0.0 a	> 10	> 9
		中 Medium	38.5 ± 2.1 b	3	2
		低 Low	28.3 ± 1.8 c	3	2
		对照 Control		1	
	抗菌蛋白 Antifungal protein	高 High	63.5 ± 1.4 a	3	2
		中 Medium	50.7 ± 1.0 b	3	2
		低 Low	40.4 ± 1.7 c	3	2
		对照 Control		1	
‘湖景蜜露’ 水蜜桃 ‘Hujing Milu’ honey peach	菌液 Bacterial suspension	高 High	100.0 ± 0.0 a	> 10	> 9
		中 Medium	57.6 ± 2.3 b	4	3
		低 Low	41.1 ± 1.7 c	2	1
		对照 Control		1	
	抗菌蛋白 Antifungal protein	高 High	62.6 ± 2.3 a	4	3
		中 Medium	44.1 ± 1.6 b	4	3
		低 Low	41.9 ± 2.1 b	2	1
		对照 Control		1	

注: 不同小写字母为 0.05 水平差异显著。下同。

Note: The small letters show significant difference at 5% level. The same below.

2.2.2 不同接种时间对防病效果的影响

不同接种处理时间下 W10 菌液及抗菌蛋白的防病作用有较大差异。如表 2 所示, 两种桃上, 在接种病菌前 1 d 接种 W10 菌液和同时接种病菌与 W10 菌液, 对病斑的抑制均达 100%, 但在接种病菌后 1 d 接种 W10 菌液, 则防病效果降为 14.9%~22.3%; 同样, 抗菌蛋白提前 1 d 处理的防病效果最好, 抑制率达 62.6%~63.5%, 而接种病菌后 1 d 以抗菌蛋白处理的防病作用较差, 仅为 12.6%~39.3%。

此外, 提前 1 d 接种 W10 菌液和同时接种病菌与 W10 菌液, 可以使发病时间推迟 9 d 以上, 而接种病菌 1 d 后再以 W10 菌液处理, 则不能推迟发病。另外, 抗菌蛋白提前处理和同时接种, 也可使发病时间推迟 2~3 d 和 1~2 d (表 2)。

2.2.3 不同温、湿度对 W10 菌液及抗菌蛋白防病效果的影响

由图 2 可看出, 在 4 ℃下, 各处理及对照桃果 (油桃和水蜜桃) 均不发病, 表明低温是防腐的必要条件。但在 25 ℃下, W10 菌液和抗菌蛋白处理可分别推迟发病 3 或 8 d 和 1~2 d (表 3), 且都具有一定的防病效果。

表 2 不同时间接种 W10 菌液及抗菌蛋白对桃褐腐病的抑制和发病时间的推迟作用
Table 2 Effects of different inoculation time of W10 bacterial suspension and antifungal protein
on the suppression and disease happening time of peach brown rot

品种 Cutlivar	处理 Treatment	时间/d Time	抑制率/% Inhibition rate	发病时间/d Diseased time	推迟/d Put off
‘沪油 18’ 油桃 ‘Huyou 18’ nectarine	菌液 Bacterial suspension	- 1	100.0 ± 0.0 a	> 10	> 9
		0	100.0 ± 0.0 a	> 10	> 9
		+1	22.3 ± 1.7 e	1	0
	抗菌蛋白 Antifungal protein	- 1	63.5 ± 1.4 b	3	2
		0	58.3 ± 1.4 c	3	2
		+1	39.3 ± 1.2 d	1	0
	对照 Control			1	
‘湖景蜜露’ 水蜜桃 ‘Hujing Milu’ honey peach	菌液 Bacterial suspension	- 1	100.0 ± 0.0 a	> 10	> 9
		0	100.0 ± 0.0 a	> 10	> 9
		+1	14.9 ± 1.5 d	1	0
	抗菌蛋白 Antifungal protein	- 1	62.6 ± 2.3 b	4	3
		0	52.7 ± 3.4 c	2	1
		+1	12.6 ± 1.3 d	1	0
	对照 Control			1	

注：- 1，在接种病菌前 1 d 处理；0，在接种病菌同时处理；+1，在接种病菌后 1 d 处理。
Note: - 1, 1 d before inoculation of pathogen; 0, together with inoculation of pathogen; +1, 1 d after inoculation of pathogen.

表 3 不同温度下 W10 菌液和抗菌蛋白对桃褐腐病发病时间的推迟作用
Table 3 Effects of W10 bacterial suspension and antifungal protein on the disease happening time
of peach brown rot at different temperatures

品种 Cutlivar	温度/℃ Temperature	处理 Treatment	发病时间/d Diseased time	推迟/d Put off
‘沪油 18’ 油桃 ‘Huyou 18’ nectarine	4	菌液 Bacterial suspension	> 10	0
		抗菌蛋白 Antifungal protein	> 10	0
		对照 Control	> 10	
	25	菌液 Bacterial suspension	> 10	> 8
		抗菌蛋白 Antifungal protein	3	1
		对照 Control	2	
‘湖景蜜露’ 水蜜桃 ‘Hujing Milu’ honey peach	4	菌液 Bacterial suspension	> 10	0
		抗菌蛋白 Antifungal protein	> 10	0
		对照 Control	> 10	
	25	菌液 Bacterial suspension	4	3
		抗菌蛋白 Antifungal protein	3	2
		对照 Control	1	

湿度对 W10 菌液和抗菌蛋白的防病作用有明显影响（图 3），在 RH 70% ~ 75%条件下 W10 菌液和抗菌蛋白对褐腐病的抑制效果显著高于 RH 95% ~ 100%高湿条件。RH 70% ~ 75%时，W10 菌液处理可推迟发病 3 或 8 d，抗菌蛋白处理可推迟发病 1 ~ 2 d（表 4）。RH 95% ~ 100%时，W10 菌液抑制作用较小，表明高湿条件虽有利于生防菌定殖，但更利于病菌繁殖（图 3）。

2.2.4 喷施钙离子对 W10 菌液及抗菌蛋白防病效果的影响

‘湖景蜜露’水蜜桃果实喷施钙离子后 W10 菌液（ 2×10^9 cfu · mL⁻¹）对褐腐病的防效达 100%，增加了 29.3%，抗菌蛋白（3.0 mg · mL⁻¹）的防效增加了 23.2%（表 5）；W10 菌液（ 2×10^9 cfu · mL⁻¹）对‘沪油 18’油桃褐腐病的抑制率达到了 100%，不能看出喷施钙离子的效果，而喷施钙离子后抗菌蛋白（3.0 mg · mL⁻¹）对‘沪油 18’油桃褐腐病的抑制率达 60.6%，增加了 13.9%（表 5）。

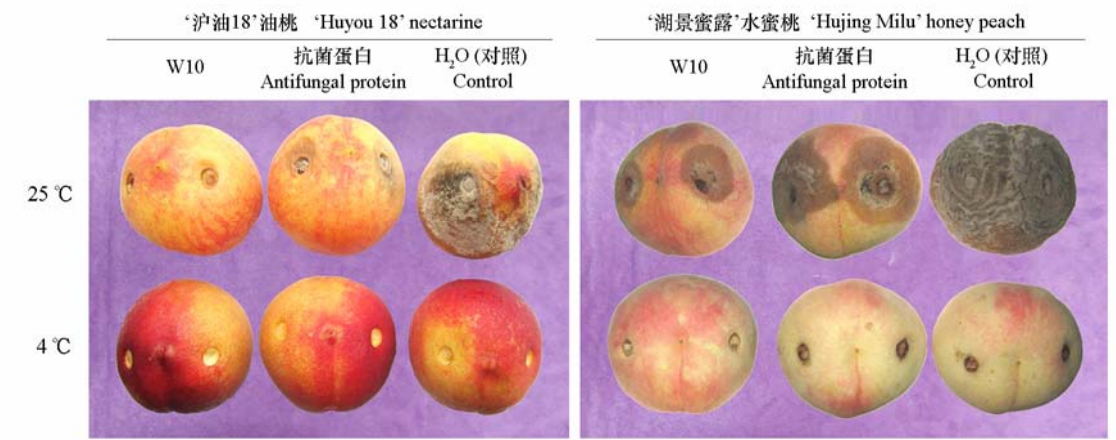


图 2 不同温度下 W10 菌液及抗菌蛋白对桃褐腐病的防病效果

Fig. 2 Inhibition activities of W10 bacterial suspension and antifungal protein on nectarine and honey peach at different temperatures

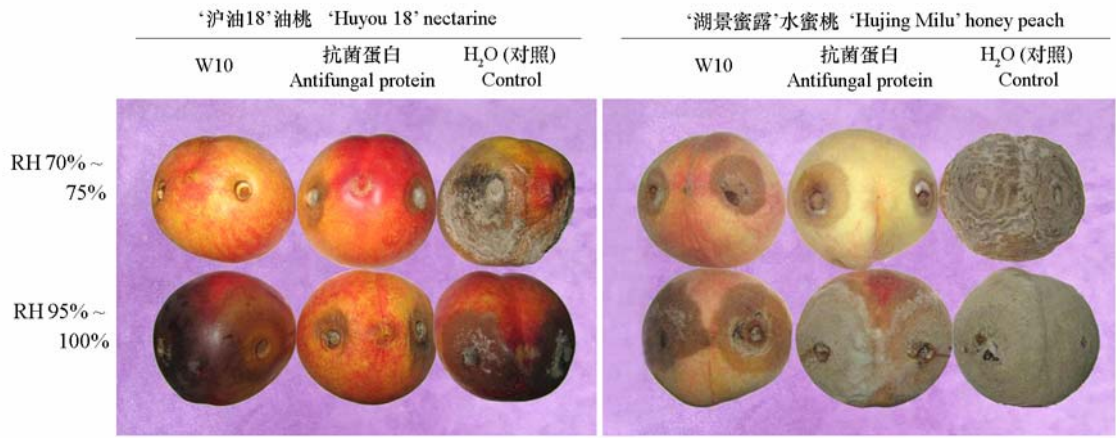


图 3 不同湿度下 W10 菌液及抗菌蛋白对桃褐腐病的防病效果

Fig. 3 Inhibition activities of W10 bacterial suspension and antifungal protein on nectarine and honey peach under different relative humidity

表 4 不同湿度下 W10 菌液和抗菌蛋白对桃褐腐病发病时间的推迟作用
Table 4 Effects of W10 bacterial suspension and antifungal protein on the disease happening time of peach brown rot under different relative humidity

品种	相对湿度/%	处理	发病时间/d	推迟/d
Cutlivar	Relative humidity	Treatment	Diseased time	Put off
‘沪油 18’ 油桃 ‘Huyou 18’ nectarine	70 ~ 75	菌液 Bacterial suspension	> 10	> 8
		抗菌蛋白 Antifungal protein	3	1
		对照 Control	2	
	95 ~ 100	菌液 Bacterial suspension	1	- 1
		抗菌蛋白 Antifungal protein	3	1
		对照 Control	2	
‘湖景蜜露’ 水蜜桃 ‘Hujing Milu’ honey peach	70 ~ 75	菌液 Bacterial suspension	4	3
		抗菌蛋白 Antifungal protein	3	2
		对照 Control	1	
	95 ~ 100	菌液 Bacterial suspension	4	3
		抗菌蛋白 Antifungal protein	2	1
		对照 Control	1	

表 5 钙离子对 W10 菌液及抗菌蛋白防桃褐腐病作用的影响
Table 5 Effects of Ca²⁺ on the activities of W10 bacterial suspension and antifungal protein in suppressing peach brown rot

品种 Cutlivar	处理 Treatment	钙 Calcium	抑制率/% Inhibition rate
‘沪油 18’ 油桃 ‘Huyou 18’ nectarine	菌液 Bacterial suspension	添加钙 Added calcium	100.0 ± 0.0 a
		不加钙 No calcium	100.0 ± 0.0 a
	抗菌蛋白 Antifungal protein	添加钙 Added calcium	60.6 ± 1.8 b
		不加钙 No calcium	46.7 ± 2.2 c
‘湖景蜜露’ 水蜜桃 ‘Hujing Milu’ honey peach	菌液 Bacterial suspension	添加钙 Added calcium	100.0 ± 0.0 a
		不加钙 No calcium	70.7 ± 1.5 b
	抗菌蛋白 Antifungal protein	添加钙 Added calcium	44.7 ± 2.0 c
		不加钙 No calcium	21.5 ± 1.6 d

2.3 地衣芽孢杆菌W10 及抗菌蛋白对桃果品质的影响

2.3.1 果肉色泽

25 ℃温度条件下, 各处理果肉色泽的变化如表 6。色差 L^* 值代表果肉的光亮度, 从侧面显示了果肉的衰老和变化程度。‘沪油 18’ 油桃经 W10 菌液、抗菌蛋白和多菌灵处理 9 d 后果肉色差 L^* 值介于 61.38 ~ 63.97 之间, 与对照差异不显著, 表明各处理不影响果肉色泽和组织完整性。W10 菌液、抗菌蛋白和多菌灵处理 ‘湖景蜜露’ 水蜜桃 7 d 后, 果肉色差 L^* 值分别为 46.26、45.55 和 44.93, 与对照差异均不显著。

2.3.2 果实硬度

从表 6 可以看出, ‘沪油 18’ 油桃贮藏 9 d 后, 各处理果实硬度与对照差异不显著, 说明 W10 菌液、抗菌蛋白和多菌灵处理均不会影响正常软化和后熟; ‘湖景蜜露’ 水蜜桃贮藏 7 d 后, 抗菌蛋白处理的果实硬度 ($0.38 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$) 最高, 显著高于其它处理, 而 W10 菌液和多菌灵与对照处理的果实硬度无显著差异, 说明抗菌蛋白可延缓水蜜桃软化, 而菌液和多菌灵处理对果实硬度没有影响。

2.3.3 可溶性固形物含量

W10 菌液和多菌灵处理 9 d 后, ‘沪油 18’ 油桃可溶性固形物含量与对照差异不显著, 抗菌蛋白处理的可溶性固形物含量虽然与菌液和多菌灵处理的差异不明显, 但其显著低于对照处理 (表 6); ‘湖景蜜露’ 水蜜桃贮藏 7 d 后, 各处理的可溶性固形物含量均与对照无显著差异。

表 6 不同处理后桃果品质的变化
Table 6 Changes of fruit quality of nectarine and honey peach in different treatments

品种 Cutlivar	处理 Treatment	L^*	硬度/($\text{kg} \cdot \text{cm}^{-2}$) Firmness	可溶性固形物含量/% Soluble solid content	失重率/% Weight loss	腐烂率/% Rotting rate
‘沪油 18’ 油桃 ‘Huyou 18’ nectarine	菌液 Bacterial suspension	61.38 ± 9.76 a	0.53 ± 0.19 a	10.58 ± 0.95 ab	12.85 ± 1.25 a	10.00 ± 0.00 b
	抗菌蛋白 Antifungal protein	63.97 ± 11.88 a	0.53 ± 0.18 a	10.09 ± 1.52 b	14.00 ± 1.23 a	10.00 ± 0.00 b
	多菌灵 Carbendazim	63.62 ± 7.83 a	0.70 ± 0.41 a	10.92 ± 1.42 ab	11.23 ± 1.73 a	8.33 ± 2.89 b
	对照 Control	56.75 ± 9.35 a	0.68 ± 0.54 a	11.46 ± 1.46 a	12.71 ± 1.28 a	23.33 ± 2.89 a
‘湖景蜜露’ 水蜜桃 ‘Hujing Milu’ honey peach	菌液 Bacterial suspension	46.26 ± 8.71 a	0.21 ± 0.06 b	12.85 ± 1.84 a	17.80 ± 2.78 b	28.33 ± 5.77 ab
	抗菌蛋白 Antifungal protein	45.55 ± 9.31 a	0.38 ± 0.11 a	14.04 ± 0.49 a	7.91 ± 1.57 c	26.67 ± 5.77 b
	多菌灵 Carbendazim	44.93 ± 8.96 a	0.26 ± 0.04 b	14.22 ± 1.98 a	23.91 ± 2.96 a	38.33 ± 7.64 a
	对照 Control	43.15 ± 9.92 a	0.21 ± 0.05 b	14.22 ± 1.63 a	15.16 ± 2.00 b	21.67 ± 2.89 b

注: 油桃是贮藏 9 d 时测量的数据, 水蜜桃是贮藏 7 d 时测量的数据。
Note: The data of 9 d storage time for nectarine, the data of 7 d storage time for honey peach.

2.3.4 失重率

由表 6 可知, ‘沪油 18’ 油桃贮藏 9 d 各处理桃果的失重率变化基本一致, 说明 W10 菌液和抗菌蛋白保鲜处理并不会影响桃果的失重率; 对于 ‘湖景蜜露’ 水蜜桃, 贮藏 7 d 后各处理失重率变化幅度较大, 其中多菌灵处理的桃果失重率最高, W10 菌液和对照处理的桃果失重率差异不显著, 抗菌蛋白处理的果实失重率最小, 说明 W10 菌液及抗菌蛋白处理不会增加 ‘湖景蜜露’ 水蜜桃果实失重率, 而抗菌蛋白处理能显著减少果实失重。

2.3.5 腐烂率

从表 6 可以看出, ‘沪油 18’ 油桃贮藏 9 d 后经过 W10 菌液、抗菌蛋白或者多菌灵处理的桃果腐烂率显著低于对照; 对于 ‘湖景蜜露’ 水蜜桃, 7 d 时多菌灵处理的果实腐烂率显著高于对照, 而 W10 菌液和抗菌蛋白处理的腐烂率与对照差异不显著。

3 讨论

芽孢杆菌作为生防细菌的最大优点是繁殖速度快, 营养要求简单, 易于在植物体表定殖, 具有抗逆性芽孢, 可以产生多种抗菌物质, 有利于其生产、加工和应用。应用芽孢杆菌对采后桃果褐腐病的防治研究较少, 现有报道主要涉及枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)。枯草芽孢杆菌 B-912 较高浓度的菌液能完全抑制 25 °C 和 3 °C 贮藏条件下桃果褐腐病的发生 (范青 等, 2000)。枯草芽孢杆菌 CPA-8 能有效防治桃褐腐病, 其产生的脂肽类抗菌物质 Fengycin 在防腐中具有重要作用 (Yáñez-Mendizábal et al., 2012)。解淀粉芽孢杆菌 C06 也能有效防治采后桃褐腐病, 防效可达 78%, 可将桃果的货架期从 3 d 延长到 7 d, 其产生的抗菌物质为脂肽类化合物 Fengycin 和 Bacillomycin D (Zhou et al., 2008; Liu et al., 2011)。本研究结果表明, 提前用地衣芽孢杆菌 W10 菌液及其产生的抗菌蛋白处理对采后桃果褐腐病有较好的控制作用, 能显著推迟发病时间, 且浓度越高防效越好。在较低温度 (4 °C) 和湿度 (RH 70%~75%) 条件下, W10 菌液和抗菌蛋白处理桃果能收到较好的防病效果, 且能推迟发病时间。相比于脂肽类抗菌物质, 本研究也是首次明确地衣芽孢杆菌代谢产生的抗菌蛋白在桃褐腐病防治中的作用, 为这类抗菌蛋白的应用奠定了基础。

Ca^{2+} 对 *M. fructicola* 的生长及其多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 的活性都有影响, 一方面是 Ca^{2+} 破坏了病原菌细胞膜的透性, 同时 Ca^{2+} 与 PG 结合降低其活性, 另一方面 Ca^{2+} 增强了桃的抗病性 (Biggs et al., 1997)。 Ca^{2+} (Chelan、钙粉和氯化钙) 能显著降低桃褐腐病菌 (*M. laxa*) 菌丝的生长, 用这些钙化合物溶液浸渍的桃果褐腐病发病率显著降低 (Thomidis et al., 2007), 桃收获前喷施 Ca^{2+} , 能显著降低采收时的褐腐病 (*M. fructicola*) 果实数量以及采后桃果的腐烂率 (Elmer et al., 2007)。本研究中发现 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 提前喷洒桃果处理能明显提高地衣芽孢杆菌 W10 菌液及抗菌蛋白对桃褐腐病的抑制效果, 如对 ‘湖景蜜露’ 水蜜桃褐腐病的防治效果分别提高了 29.3% 和 23.2%。单独喷施 Ca^{2+} (CaCl_2) 能降低果实褐腐病发病率, 但 Ca^{2+} 和枯草芽孢杆菌 B-912 配合使用对褐腐病抑制效果不明显 (范青 等, 2000)。本研究结果表明施用 Ca^{2+} [$1\% \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$] 后均能显著增加 W10 菌液及抗菌蛋白的防治效果。因此在桃果褐腐病综合防治中可考虑添加 Ca^{2+} , 以提高桃果的防腐和抗病效果。

桃品质是由外观和众多内在因素的复合评价因子构成, 包括果实大小、色泽和香气等感官品质; 硬度、可溶性固形物含量、果胶、酚类物质、水分含量等理化与营养品质 (焦艺 等, 2014)。本研究 W10 及其抗菌蛋白处理油桃和水蜜桃桃果后对桃果色泽、硬度、可溶性固形物含量、水分含量

等品质均没有影响, 有些指标如抗菌蛋白处理水蜜桃的果实硬度显著高于对照处理, 而且还能显著抑制油桃果肉自然腐烂率, 菌液和抗菌蛋白处理效果相当于化学农药多菌灵。本试验中各处理和对照的水蜜桃自然腐烂率较高, 可能与浸果处理影响和破坏了水蜜桃桃毛有关。

研究地衣芽孢杆菌 W10 生防细菌及其产生的抗菌蛋白在桃果采后防腐和保鲜方面的作用, 为采后及生长期桃褐腐病的生物防治提供了新的途径, 有利于减少化学农药使用、减少环境污染和降低果实农药残留。

References

- Biggs A R, El-Kholi M M, El-Neshawy S, Nickerson R. 1997. Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*. *Plant Disease*, 81 (4): 399 - 403.
- Casals C, Teixidó N, Viñas I, Cambray J, Usall J. 2010. Control of *Monilinia* spp. on stone fruit by curing treatments. Part II: The effect of host and *Monilinia* spp. variables on curing efficacy. *Postharvest Biology and Technology*, 56 (1): 26 - 30.
- Elmer P A G, Spiers T M, Wood P N. 2007. Effects of pre-harvest foliar calcium sprays on fruit calcium levels and brown rot of peaches. *Crop Protection*, 26: 11 - 18.
- Fan J Y, Guo L Y, Xu J P, Luo Y, Michailides T J. 2010. Genetic diversity of populations of *Monilinia fructicola* (Fungi, Ascomycota, Helotiales) from China. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57 (2): 206 - 212.
- Fan Qing, Tian Shi-ping, Li Yong-xing, Xu Yong, Wang Yi. 2000. Biological control of postharvest brown rot in peach and nectarine fruits by *Bacillus subtilis* (B-912). *Acta Botani Sinica*, 42 (11): 1137 - 1143.
- 范 青, 田世平, 李永兴, 徐 勇, 汪 沂. 2000. 枯草芽孢杆菌 (B-912) 对桃和油桃褐腐病的抑制效果. *植物学报*, 42 (11): 1137 - 1143. (in English)
- Hu M J, Chen Y, Chen S N, Liu X L, Yin L F, Luo C X. 2011a. First report of brown rot of peach caused by *Monilinia fructicola* in Southeastern China. *Plant Disease*, 95 (2): 225.
- Hu M J, Cox K D, Schnabel G, Luo C X. 2011b. *Monilinia* species causing brown rot of peach in China. *PLoS ONE*, 6 (9): e24990. doi: 10.1371/journal.pone.0024990
- Ji Zhao-lin, Ling Zheng, Zhang Qing-xia, Xu Jing-you, Chen Xi-jun, Tong Yun-hui. 2008. Study on the inhibition of *Bacillus licheniformis* on *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola* and *Glomerella cingulata* and biocontrol efficacy on postharvest apple diseases. *Journal of Fruit Science*, 25 (2): 209 - 214. (in Chinese)
- 纪兆林, 凌 箴, 张清霞, 徐敬友, 陈夕军, 童蕴慧. 2008. 地衣芽孢杆菌对苹果轮纹病菌和炭疽病菌的抑制及其对贮藏期苹果轮纹病的防治作用. *果树学报*, 25 (2): 209 - 214.
- Ji Zhao-lin, Tang Li-juan, Zhang Qing-xia, Xu Jing-you, Chen Xi-jun, Tong Yun-hui. 2007. Isolation, purification and characterization of antifungal protein from *Bacillus licheniformis* W10 strain. *Acta Phytopathologica Sinica*, 37 (3): 260 - 264. (in Chinese)
- 纪兆林, 唐丽娟, 张清霞, 徐敬友, 陈夕军, 童蕴慧. 2007. 地衣芽孢杆菌 W10 抗菌蛋白的分离纯化及其理化性质研究. *植物病理学报*, 37 (3): 260 - 264.
- Jiao Yi, Bi Jin-feng, Liu Xuan, Zeng Mu-cheng, Ruan Wei-hong, Chen Qin-qin. 2014. Research progress on quality evaluation of peach. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, (4): 55 - 59, 62. (in Chinese)
- 焦 艺, 毕金峰, 刘 璇, 曾目成, 阮卫红, 陈芹芹. 2014. 桃品质评价研究进展. *农产品加工 (学刊)*, (4): 55 - 59, 62.
- Li Shi-fang, Chen Ce. 2009. Incidence and management of the peach fruit brown rot. *Plant Protection*, 35 (2): 134 - 139. (in Chinese)
- 李世访, 陈 策. 2009. 桃褐腐病的发生和防治. *植物保护*, 35 (2): 134 - 139.
- Liu J, Zhou T, He D, Li X Z, Wu H J, Liu W Z, Gao X W. 2011. Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20 (1): 43 - 52.
- Ogawa J M, Zehr E I, Bird G W, Ritchie D F, Uriu K, Uyemoto J K. 1995. *Compendium of stone fruit diseases*. USA St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press.

- Sharma R R, Singh D, Singh R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50: 205 - 221.
- Spadaro D, Gullino M L. 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 91 (2): 185 - 194.
- Sun Qi-li, Chen Xi-jun, Tong Yun-hui, Ji Zhao-lin, Li Hai-dong, Xu Jing-you. 2007. Inhibition of antifungal protein produced by *Bacillus licheniformis* W10 to *Sclerotinia sclerotiorum* and control of rape stem rot by the protein. *Journal of Yangzhou University: Agricultural and Life Science Edition*, 28 (3): 82 - 86. (in Chinese)
- 孙启利, 陈夕军, 童蕴慧, 纪兆林, 李海东, 徐敬友. 2007. 地衣芽孢杆菌W10抗菌蛋白对油菜菌核病菌的抑制作用及防病效果. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 28 (3): 82 - 86.
- Tang Li-juan, Ji Zhao-lin, Xu Jing-you, Chen Xi-jun, Tong Yun-hui. 2005. Mechanisms of action to *Botrytis cinerea* and antimicrobial substance of *Bacillus licheniformis* W10. *Chinese Journal of Biological Control*, 21 (4): 203 - 205. (in Chinese)
- 唐丽娟, 纪兆林, 徐敬友, 陈夕军, 童蕴慧. 2005. 地衣芽孢杆菌 W10 对灰葡萄孢的抑制作用及其抗菌物质. *中国生物防治*, 21 (4): 203 - 205.
- Thomidis T, Sotiropoulos T, Karagiannidis N, Tsipouridis C, Papadakis I, Almaliotis D, Boulgarakis N. 2007. Efficacy of three calcium products for control of peach brown rot. *Horttechnology*, 17 (2): 234 - 237.
- Tong Yun-hui, Xu Jing-you, Chen Xi-jun. 2000. Screening antagonistic bacteria against *Botrytis cinerea*. *Chinese Journal of Biological Control*, 16 (3): 123 - 126. (in Chinese)
- 童蕴慧, 徐敬友, 陈夕军. 2000. 灰葡萄孢拮抗细菌的筛选. *中国生物防治*, 16 (3): 123 - 126.
- Yáñez-Mendizábal V, Zerrouh H, Viñas I, Torres R, Usall J, de Vicente A, Alejandro Pérez-García A, Teixidó N. 2012. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*, 132: 609 - 619.
- Yin L F, Chen S N, Yuan N N, Zhai L X, Li G Q, Luo C X. 2013. First report of peach brown rot caused by *Monilinia fructicola* in central and Western China. *Plant Disease*, 97 (9): 1255.
- Yin Liang-fen, Hu Meng-jun, Jin Xin, Schnabel G, Luo Chao-xi. 2010. Progress in molecular mechanisms of fungicide resistance in peach brown rot fungi *Monilinia* spp. *Plant Protection*, 36 (5): 28 - 32. (in Chinese)
- 尹良芬, 胡勳郡, 金 鑫, Guido Schnabel, 罗朝喜. 2010. 桃褐腐病菌抗药性分子机理研究进展. *植物保护*, 36 (5): 28 - 32.
- Zhou Hui-juan, Qiao Yong-jin, Zhang Shao-ling, Wang Hai-hong, Chen Zhao-liang. 2010. Study on the effects of different maturity on the fruit shelf-qualities and difference in metabolism of Datuanmilu honey peach cultivar. *Journal of Fruit Science*, 27 (2): 244 - 250. (in Chinese)
- 周慧娟, 乔勇进, 张绍铃, 王海宏, 陈召亮. 2010. 不同成熟度大团蜜露水蜜桃货架期间品质与代谢差异性研究. *果树学报*, 27 (2): 244 - 250.
- Zhou T, Schneider K E, Li X Z. 2008. Development of biocontrol agents from food microbial isolates for controlling post-harvest peach brown rot caused by *Monilinia fructicola*. *International Journal of Food Microbiology*, 126: 180 - 185.
- Zhu X Q, Chen X Y, Luo Y, Guo L Y. 2005. First report of *Monilinia fructicola* on peach and nectarine in China. *Plant Pathology*, 54 (4): 575.