

网络出版时间:2022-05-27 12:40 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2022.12.015
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20220525.1619.016.html

枸杞内生嗜线虫镰刀菌对灵武长枣采后 致腐真菌的抑制作用

张强强,任苗苗,顾沛雯

(宁夏大学 农学院,宁夏 银川 750021)

【摘 要】【目的】研究枸杞内生嗜线虫镰刀菌(*Fusarium nematophilum*) NQ8G II 4 对灵武长枣致腐真菌的抑制作用和保鲜效果,为灵武长枣采后保鲜提供参考。【方法】以灵武长枣采后优势致腐真菌交链格孢(*Alternaria alternata*)和灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)为靶标菌,采用皿内对峙试验,设同时接种 NQ8G II 4 和靶标菌、接种 NQ8G II 4 4 d 后再接种靶标菌和接种靶标菌 4 d 后再接种 NQ8G II 4 3 个处理,测定 NQ8G II 4 的抑菌率;采用盖玻片对峙法培养 NQ8G II 4 和靶标菌,显微观察 NQ8G II 4 对靶标菌的拮抗作用。制备 NQ8G II 4 培养液,检测其对靶标菌丝生长(培养液体积分数为 10%,15%,20%,25%,30%和 40%)和孢子萌发(培养液体积分数 10%,20%,30%,40%和 50%)的抑制作用。采用皿内对峙法测定 NQ8G II 4 对米根霉(*Rhizopus oryzae*)、出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)和球派伦霉(*Peyronellaea glomerata*)的抑菌广谱性。采用平板扣法测定 NQ8G II 4 挥发物质对靶标菌丝生长的抑制作用。将灵武长枣用 NQ8G II 4 培养液体积分数分别为 10%,20%,30%,40%和 50%的液体浸泡 1 min 后晾干,15℃冷藏,以无菌水浸泡处理为对照,每隔 5 d 观察腐烂情况并统计腐烂率,分析 NQ8G II 4 培养液对灵武长枣的保鲜作用。【结果】接种 NQ8G II 4 4 d 后再接种靶标菌处理的抑菌效果显著高于其他 2 个处理,该处理对交链格孢和灰葡萄孢的抑菌率分别达 71.25%和 68.75%。光学显微观察发现,菌株 NQ8G II 4 可使病原真菌菌丝出现畸形、干瘪和崩解等现象。菌株 NQ8G II 4 培养液对交链格孢和灰葡萄孢的菌丝抑制率分别为 71.25%和 62.00%;菌株 NQ8G II 4 培养液体积分数为 50%时,对交链格孢和灰葡萄孢的分生孢子萌发抑制率分别达 92.81%和 88.72%。NQ8G II 4 挥发物质对交链格孢和灰葡萄孢的抑菌率分别达 94.34%和 95.95%。菌株 NQ8G II 4 对出芽短梗霉、球派伦霉和米根霉抑制率分别达 87.91%,75.42%和 30.95%。在 15℃贮藏条件下,体积分数 20%的 NQ8G II 4 培养液处理 30 d 后,灵武长枣的腐烂率较对照处理下降了 77.09%,货架期延长了 15~30 d。【结论】枸杞内生嗜线虫镰刀菌 NQ8G II 4 是极具应用前景的果蔬保鲜剂出发菌种。

【关键词】枸杞内生真菌;嗜线虫镰刀菌;灵武长枣;致腐病原真菌

【中图分类号】S432.1

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2022)12-0137-09

Antibacterial effect of *Fusarium nematophilum* of *Lycium barbarum* on rot-causing fungi in oostharvest *Ziziphus jujube* cv. Lingwuchangzao

ZHANG Qiangqiang, REN Miaomiao, GU Peiwen

(School of Agricultural, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: 【Objective】 This study clarified the bacteriostasis and preservation effect of the antagonistic *Fusarium nematophilum* strain NQ8G II 4 on pathogenic fungus of *Ziziphus jujube* cv. Lingwuchangzao to provide reference for its postharvest preservation. 【Method】 With the dominant decay-causing fungi *Alter-*

【收稿日期】 2021-12-14

【基金项目】 国家自然科学基金项目“枸杞内生真菌与宿主及炭疽菌互作的超微结构与细胞化学研究”(31460484);宁夏重点研发计划项目“宁夏酿酒葡萄病虫害绿色防控关键技术创新与示范”(2019BBF02013)

【作者简介】 张强强(1995—),男,河南周口人,在读硕士,主要从事生物防治与菌物资源利用研究。E-mail:951987870@qq.com

【通信作者】 顾沛雯(1969—),女,宁夏银川人,教授,博士,博士生导师,主要从事植物病理学、生物防治与菌物资源利用研究。E-mail:gupeiwen2019@nxu.edu.cn

naria alternata and *Botrytis cinerea* after collection of *Ziziphus jujube* cv. Lingwu changzao as the target pathogenic fungi. The antibacterial rate of NQ8G II 4 was determined by in-dish confrontation test. Three treatments were set up: inoculation with NQ8G II 4 and target fungi at the same time, inoculation with NQ8G II 4 for 4 d followed by inoculation with target fungi, and inoculation with NQ8G II 4 for 4 d followed by inoculation with target fungi; the antagonistic effect of NQ8G II 4 on the target fungi was observed microscopically by culturing NQ8G II 4 and the target fungi using the coverslip standoff method. NQ8G II 4 culture filtrate was prepared, and its inhibitory effect on the growth of target mycelium (The volume ratios of the culture medium were 10%, 15%, 20%, 25%, 30% and 40%, respectively) and spore germination was tested (The volume ratios of the culture medium were 10%, 20%, 30%, 40% and 50%, respectively). The broad-spectrum antibacterial activity of NQ8G II 4 against *Rhizopus oryzae*, *Aureobasidium pullulans* and *Peyronella glomerata* was determined by in-dish confrontation method. The inhibition of NQ8G II 4 volatile substances on the growth of target mycelia was determined by the plate-to-button method. To analyze the preservation effect of NQ8G II 4 culture solution on *Ziziphus jujube* cv. Lingwu changzao, we used the method of soaking *Ziziphus jujube* cv. Lingwuchangzao with NQ8G II 4 culture filtrate solution content of 10%, 20%, 30%, 40% and 50% by volume for 1 min and then dried, refrigerated at 15 °C, with sterile water soaking treatment as the control, and observed the decay and counted the decay rate every 5 d. 【Result】 The antibacterial effect of inoculating strain NQ8G II 4 4 days before inoculating pathogenic fungi was significantly higher than that of simultaneously inoculating strain NQ8G II 4 and pathogenic bacteria. The bacteriostatic effect of NQ8G II 4 against *A. alternata* and *B. cinerea* were 71.25% and 68.75%, respectively. Optical microscopic observation showed that NQ8G II 4 could cause malformation, disintegration and branching increase to the mycelia of spoilage fungi. The culture filtrate of NQ8G II 4 effectively inhibited the growth of *A. alternata* and *B. cinerea* hyphae with inhibition rates of 71.25% and 62.00%, respectively; When the culture filtrate fraction of strain NQ8G II 4 was 50%, the conidial germination inhibition rates of *A. alternata* and *B. cinerea* were 92.81% and 88.72%, respectively. The inhibition rate of volatile substances of NQ8G II 4 to pathogenic fungi *A. alternata* and *B. cinerea* reached 94.34% and 95.95% respectively. The inhibition rates of strain NQ8G II 4 against *A. pullulans*, *P. glomerata* and *R. oryzae* were 87.91%, 75.42% and 30.95%, respectively. Compared with control, NQ8G II 4 strain culture filtrate at 20% volume fraction had the best preservation effect with decay rate reduced by 77.09% and shelf life extended by 15—30 days at 15 °C. 【Conclusion】 *Fusarium nematophilum* NQ8G II 4 is a promising strain for fruits and vegetables preservation.

Key words: endophytic fungi of *Lycium barbarum*; *Fusarium nematophilum*; *Ziziphus jujube* cv. Lingwuchangzao; rot-causing fungi

灵武长枣是宁夏最具特色的地方品种,皮薄、多汁,但鲜销期短,采后如储运不当,腐败现象严重^[1]。研究发现,交链格孢(*Alternaria alternata*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)、米根霉(*Rhizopus oryzae*)、出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)和球派伦霉(*Peyronella glomerata*)等病菌侵染是导致灵武长枣采后腐烂的主要病原菌,其中交链格孢和灰葡萄孢是灵武长枣采后腐烂的优势病原真菌^[2-3]。目前,灵武长枣采后的保鲜措施以物理保鲜和化学保鲜为主,物理保鲜以低温冷藏最为常见,此法成本和能耗高,温度调控不当易引发果实冷害^[4];化学保鲜

是利用化学制剂抑菌保质,此法存在果品污染、农药残留超标和抗药性等问题,也备受消费者抵制^[5]。因此,寻求安全、有效的灵武长枣采后防腐保鲜新技术迫在眉睫。

植物内生真菌是指其生活史的某一阶段或全部处于宿主植物组织中,但不会对宿主植物产生明显病害症状的一类真菌^[6]。植物内生真菌长期与宿主植物协同进化,可促进植物生长,提高植物抗逆性。作为潜在生防因子,植物内生真菌还可通过与病原菌争夺营养物质和空间而达到防治病害的目的^[7]。近年来,利用内生真菌作为生物保鲜剂来防治果蔬

采后病害的研究已取得了重大进展,如核桃内生真菌裂褶菌(*Schizophyllum commune*)SYS-5-2 发酵产物对苹果腐烂病原菌黑腐皮壳菌(*Valsa ceratosperma*)和水稻纹枯病原菌菌核菌(*Thanatephorus cucumeris*)的抑制率达 90.00%以上^[8];疏花水柏枝内生真菌草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)发酵液粗提物能较好地抑制橘青霉(*Penicillium citrinum*)的生长,有效阻止柑橘果实腐烂^[9]。但有关利用植物内生真菌来防治灵武长枣采后病原真菌危害和延长鲜果货架期的相关研究尚未见报道。

枸杞内生嗜线虫镰刀菌(*Fusarium nematophilum*)NQ8G II 4 分离自健康枸杞根部,前期研究发现,其能抑制枸杞胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)和灰葡萄孢菌丝的生长,并能产生挥发性抑菌物质,具有良好的生防潜力^[10]。为此,本研究以枸杞内生嗜线虫镰刀菌 NQ8G II 4 菌株为材料,通过皿内对峙培养和离体保鲜试验,探究其对灵武长枣采后优势致病病原真菌交链格孢和灰葡萄孢的抑菌作用及对采后灵武长枣的保鲜效果,以期对灵武长枣采后生物保鲜提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株及药剂:枸杞内生真菌 NQ8G II 4 (CGMCC No. 19271、专利号:CN202010357046.4),从健康枸杞根部分离纯化,经形态学和分子生物学鉴定,该菌为嗜线虫镰刀菌^[10];交链格孢、灰葡萄孢、米根霉、出芽短梗霉和球派伦霉,从采后腐烂的灵武长枣上分离纯化^[3],均保存在宁夏大学病理实验室;50%多菌灵,购自江苏三山农药有限公司(推荐用量为 2 g/L)。

供试果品:2019 年 9 月至 11 月,在宁夏灵武市大泉林场采摘无病虫害及机械损伤的棚栽八成熟灵武长枣(红色面积占枣果总面积的 1/2~2/3),用于保鲜试验。

1.2 菌株 NQ8G II 4 的抑菌活性测定

以交链格孢和灰葡萄孢为靶标菌,采用皿内两点对峙法测定 NQ8G II 4 对靶标菌的抑制作用^[10]。具体方法:在距 PDA 平板中心 2.5 cm 的一端接种 1 个直径 6 mm 的 NQ8G II 4 菌饼,另一端接种 1 个直径 6 mm 的靶标菌菌饼,置于 25℃霉菌培养箱中培养。试验设同时接种菌株 NQ8G II 4 和靶标菌、接种菌株 NQ8G II 4 4 d 后再接种靶标菌和接种靶标菌 4 d 后再接种菌株 NQ8G II 4 3 个处理,以只接

种靶标菌菌饼的平板为对照,每处理重复 4 次。待对照组靶标菌菌丝长满培养皿后,测量其半径(Rc),并测定处理组靶标菌朝菌株 NQ8G II 4 方向扩展的半径(Rp),计算抑菌率。

$$\text{抑菌率} = (Rc - Rp) / (Rc - 3) \times 100\%$$

1.3 菌株 NQ8G II 4 对靶标菌拮抗作用的显微观察

采用盖玻片对峙培养法^[10],在距 PDA 平板中心 1.5 cm 端分别接种直径 6 mm 的 NQ8G II 4 菌饼和靶标菌菌饼,2 种菌饼间放置浸有 PDA 培养基的灭菌盖玻片,待菌株 NQ8G II 4 菌丝和靶标菌丝接触 1~3 d 后取出盖玻片,于光学显微镜(400 倍)下观察并拍照。

1.4 菌株 NQ8G II 4 培养液的抑菌活性

1.4.1 菌株 NQ8G II 4 培养液的制备 在预先培养 5 d 的 NQ8G II 4 菌落上取 6 个直径 6 mm 的菌饼,放入装有 150 mL 灭菌 PDB 培养基的三角瓶中,25℃、175 r/min 振荡培养 7 d,将培养好的发酵液(2.3×10^7 CFU/mL)用抽滤泵过滤菌丝和孢子,再经孔径 0.22 μm 微孔滤膜过滤除去菌丝,获得培养液,4℃保存备用。

1.4.2 培养液对病原真菌菌丝生长的抑制作用 采用菌丝生长速率法^[11]测定菌株 NQ8G II 4 培养液的抑菌活性。将菌株 NQ8G II 4 培养液与冷却至 50℃左右的灭菌 PDA 培养基混匀,分别制成培养液体积分数为 10%,15%,20%,25%,30%和 40%的 PDA 平板,凝固后,在平板中央分别放置 1 个直径 6 mm 的靶标菌菌饼,以 PDA 培养基为对照,每处理重复 3 次,置于 25℃霉菌培养箱中培养,待对照组靶标菌菌丝长满培养皿后,测量各处理靶标菌的半径,计算菌丝抑制率。

1.4.3 培养液对病原真菌孢子萌发的抑制作用 (1)靶标菌孢子悬浮液的制备:将交链格孢和灰葡萄孢接种至 PDA 培养基上,25℃黑暗培养 5 d 后,加入 5 mL 无菌水冲洗 PDA 培养平板,收集菌丝和孢子混合液,用双层无菌纱布过滤除去菌丝,得到靶标菌孢子悬浮液,用血球板计数法将靶标菌孢子悬浮液稀释为孢子含量为 1×10^5 CFU/mL 的菌液,备用。

(2)培养液对靶标菌孢子萌发抑制率测定:配制菌株 NQ8G II 4 培养液含量分别为体积分数 20%,40%,60%,80%和 100%的培养液,将其与靶标菌孢子悬浮液按体积比 1:1 混合(菌株 NQ8G II 4 培养液的最终体积分数分别为 10%,20%,30%,40%和 50%),设无菌水与靶标菌孢子悬浮液体积比 1:

1 混合处理为对照,25 ℃ 黑暗培养 8 h,每处理重复 3 次。在光学显微镜(400 倍)下每重复随机观察 5 个视野,每个视野随机观察 20 个孢子,统计萌发孢子数,计算孢子萌发抑制率。

孢子萌发率=萌发的孢子数/(20×5)×100%;
孢子萌发抑制率=(对照孢子萌发率-处理孢子萌发率)/对照孢子萌发率×100%。

1.5 菌株 NQ8G II 4 挥发物质对靶标菌菌丝生长的抑制作用

采用平板对扣法^[12]测定菌株 NQ8G II 4 挥发物质对交链格孢和灰葡萄孢菌丝生长的抑制作用。在培养 5 d 的 NQ8G II 4 菌落上取 1 个直径 6 mm 的菌饼,接种在 PDA 培养基上,25 ℃ 黑暗培养。分别在培养 0,2,4,6,8 和 10 d 后,与刚接种 6 mm 靶标菌菌饼的 PDA 平板对扣密封,对扣时接种菌株 NQ8G II 4 的培养皿在下,接种靶标菌的培养皿在上,以接种琼脂块代替 NQ8G II 4 菌饼的处理为对照,每处理重复 3 次,25 ℃ 霉菌培养箱中黑暗培养,待对照组靶标菌长满培养皿后,计算菌丝抑制率。

1.6 菌株 NQ8G II 4 的广谱抑菌活性测定

分别以病原真菌米根霉、出芽短梗霉和球派伦霉为靶标菌,采用皿内对峙法测定菌株 NQ8G II 4

的抑菌谱。具体方法同 1.2 节。

1.7 菌株 NQ8G II 4 培养液对灵武长枣的保鲜作用

将挑选好的灵武长枣用无菌水轻微冲洗 2 次,沥水晾干,分别用无菌水、50%多菌灵 500 倍液(质量浓度为 2 g/L)及 NQ8G II 4 培养液体积分数分别为 10%,20%,30%,40%和 50%的液体浸果 1 min,自然晾干,装入 20 μm 厚的保鲜袋中,每袋 12 颗果,每处理重复 4 次,共计 28 袋,15 ℃ 冷藏柜中贮藏,每隔 5 d 观察腐烂情况并统计腐烂率。将果面出现直径大于 0.3 cm 病斑的果实视为烂果,此类果占统计果实的比例即为腐烂率,以 20%腐烂率为临界点,判定灵武长枣是否失去商品价值^[13]。

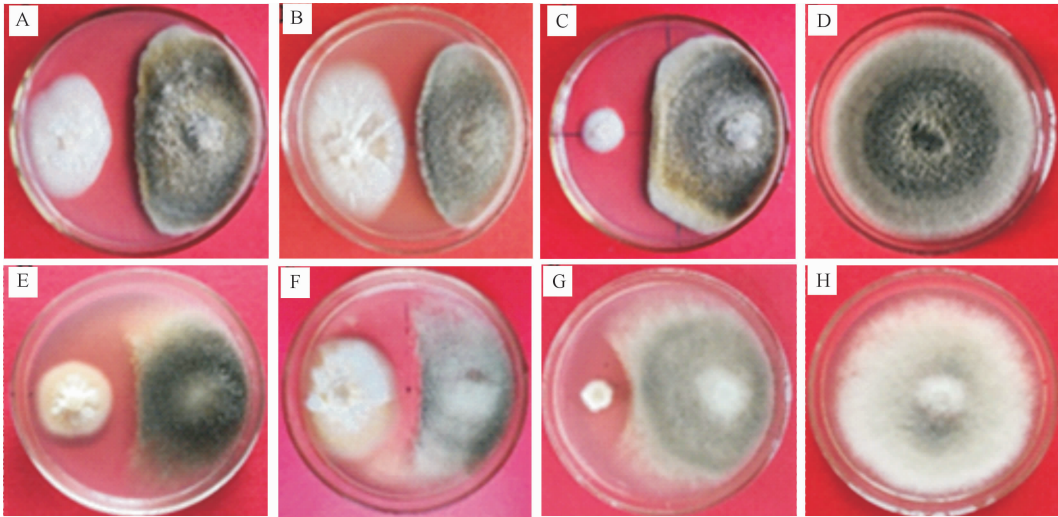
1.8 数据处理

采用 Spass 19.0 统计软件对抑制率、腐烂率进行差异显著性分析;利用 OriginPro 8 对孢子萌发率和萌发抑制率进行绘图。

2 结果与分析

2.1 菌株 NQ8G II 4 的抑菌活性测定

由图 1 可知,菌株 NQ8G II 4 对交链格孢和灰葡萄孢均有抑制作用,病原菌菌丝边缘变薄,生长受到抑制,不能向外正常扩展。



A. 同时接种菌株 NQ8G II 4 和交链格孢;B. 接种菌株 NQ8G II 4 4 d 后接种交链格孢;C. 接种交链格孢 4 d 后接种菌株 NQ8G II 4;
D. 仅接种交链格孢对照;E. 同时接种菌株 NQ8G II 4 和灰葡萄孢;F. 接种菌株 NQ8G II 4 4 d 后接种灰葡萄孢;
G. 接种灰葡萄孢 4 d 后接种菌株 NQ8G II 4;. H 仅接种灰葡萄孢对照
A. Inoculating strain NQ8G II 4 and *A. alternata* at the same time;B. Inoculation of strain NQ8G II 4 4 days followed by *A. alternata*;
C. Inoculation of *A. alternata* for 4 d followed by strain NQ8G II 4;D. Inoculation of *A. alternata*(CK);E. Inoculating strain NQ8G II 4 and
B. cinera at the same time;F. Inoculation of strain NQ8G II 4 4 days followed by *B. cinera*;G. Inoculation of
B. cinera for 4 d followed by strain NQ8G II 4;H. Inoculation of *B. cinera*(CK)

图 1 枸杞内生嗜线虫镰刀菌 NQ8G II 4 对靶标病原真菌菌丝生长的抑制作用
Fig. 1 Inhibitory effect of endophytic *F. nematophilum* NQ8G II 4 from *L. barbarum* on growth of target pathogenic fungi mycelium

由表 1 可知,预先 4 d 接种菌株 NQ8G II 4 处理对交链格孢和灰葡萄孢的抑制率最高,分别为 71.25%和 68.75%;同时接种菌株 NQ8G II 4 和病原真菌处理对交链格孢和灰葡萄孢的抑菌效果次

之,抑制率均在 50.00%以上;接种病原真菌 4 d 后再接种菌株 NQ8G II 4 的抑菌效果较差,抑制率均在 30.00%以下;3 种接种方法对 2 种病原菌的抑制作用存在显著差异($P<0.05$)。

表 1 枸杞内生嗜线虫镰刀菌 NQ8G II 4 对靶标病原真菌菌丝生长的抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of endophytic *F. nematophilum* NQ8G II 4 from *L. barbarum* on growth of target pathogenic fungi mycelium

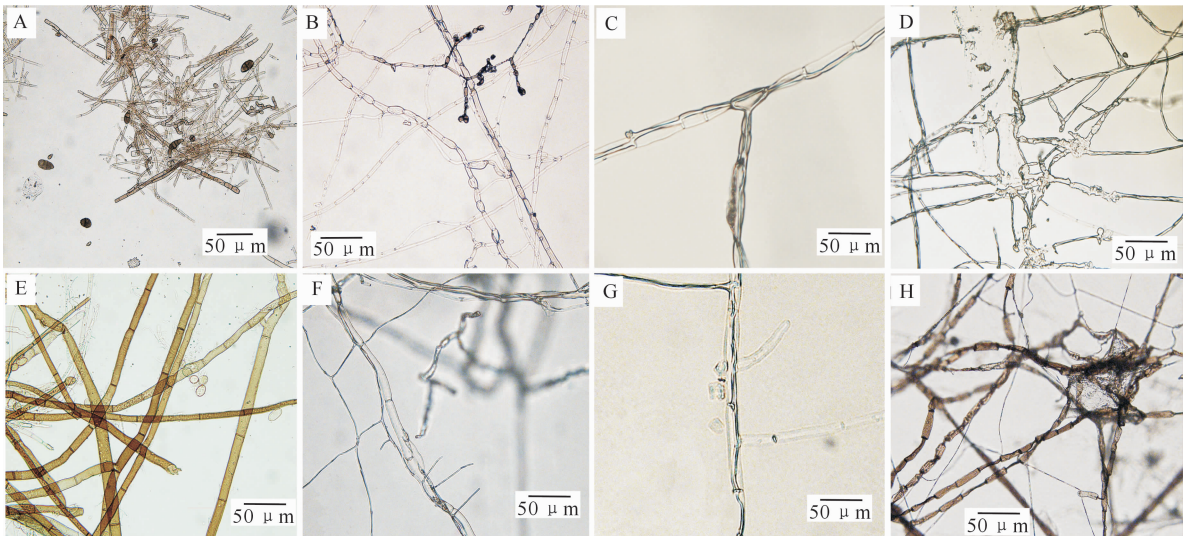
处理 Treatment	交链格孢抑制率/% Inhibition rate of <i>A. alternata</i>	灰葡萄孢抑制率/% Inhibition rate of <i>B. cinerea</i>
同时接种菌株 NQ8G II 4 和病原真菌 Inoculate strain NQ8G II 4 and pathogenic fungi at the same time	50.89±0.71 b	51.06±1.22 b
接种 NQ8G II 4 4 d 后接种病原真菌 Inoculation of NQ8G II 4 4 d followed by pathogenic fungi	71.25±0.99 a	68.75±1.14 a
接种病原真菌 4 d 后接种 NQ8G II 4 Inoculation of pathogenic fungi for 4 d followed by NQ8G II 4	29.04±1.54 c	20.13±0.69 c

注:表中数据为“平均值±标准误”。同列数据后标不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。下表同。
Note: The data is the “mean±SE”. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$). The same below.

2.2 菌株 NQ8G II 4 对病原真菌的拮抗作用

菌株 NQ8G II 4 菌丝与病原真菌交链格孢和灰葡萄孢菌丝相互作用的显微观察结果如图 2 所示。由图 2 可知,正常生长在 PDA 培养基上的交链格孢和灰葡萄孢菌丝粗细均匀,长势旺盛,产孢量较多,孢子大小均匀(图 2-A,E)。在对峙试验中,菌株

NQ8G II 4 对病原真菌产生了明显的拮抗作用。主要表现为 NQ8G II 4 的菌丝体与病原真菌菌丝相互缠绕(图 2-F),产生分支吸附、侵入和穿插在病原真菌菌丝体上(图 2-C,G),造成病原真菌菌丝体出现膨大肿胀、畸形、崩解和干瘪(图 2- B,H,D)等现象。



A. 交链格孢;B—D. 菌株 NQ8G II 4 与交链格孢交互;E. 灰葡萄孢;F—H. 菌株 NQ8G II 4 与灰葡萄孢交互
A. *A. alternata*;B—D. Microscopic observation of the interaction between strain NQ8G II 4 and *A. alternata*;
E. *B. Cinerea*;F—H. Microscopic observation of the interaction between strain NQ8G II 4 and *B. cinerea*

图 2 枸杞内生嗜线虫镰刀菌 NQ8G II 4 对靶标病原真菌拮抗作用的显微观察

Fig. 2 Microscopic observation of antagonistic effect of endophytic *F. nematophilum* NQ8G II 4 from *L. barbarum* on target pathogenic fungi

2.3 菌株 NQ8G II 4 培养液对病原真菌的抑制作用

2.3.1 对菌丝生长的抑制作用 观察发现,随着菌株 NQ8G II 4 培养液含量的增加,靶标菌的菌丝体

生长势变缓,菌丝呈溶解状,稀疏变薄。由表 2 可知,菌株 NQ8G II 4 培养液对病原真菌菌丝生长具有明显的抑制作用,不同含量的 NQ8G II 4 培养液对靶标菌的抑制率差异显著($P<0.05$),随着

NQ8G II 4 培养液含量的增加,其对病原真菌的抑制率呈上升趋势,在 NQ8G II 4 培养液体积分数为 40%时,其对交链格孢和灰葡萄孢的抑制率分别为 71.25%和 62.00%。

表 2 枸杞内生嗜线虫镰刀菌 NQ8G II 4 培养液对靶标病原真菌菌丝生长的抑制作用

Table 2 Inhibitory effect of culture solution of endophytic *F. nematophilum* NQ8G II 4 from *L. barbarum* on growth of target pathogenic fungi mycelium

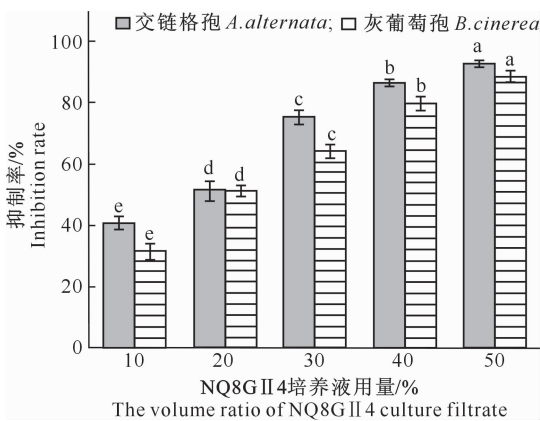
NQ8G II 4 培养液 体积分数/% Content of NQ8G II 4 culture filtrate	交链格孢抑制率/% Inhibition rate of <i>A. alternata</i>	灰葡萄孢抑制率/% Inhibition rate of <i>B. cinerea</i>	NQ8G II 4 培养液 体积分数/% Content of NQ8G II 4 culture filtrate	交链格孢抑制率/% Inhibition rate of <i>A. alternata</i>	灰葡萄孢抑制率/% Inhibition rate of <i>B. cinerea</i>
10	27.29±1.57 f	32.39±1.75 f	25	56.30±0.94 c	51.52±1.32 c
15	38.38±1.55 e	38.96±0.80 e	30	63.04±0.63 b	56.08±0.35 b
20	48.09±1.89 d	46.56±1.45 d	40	71.25±0.74 a	62.00±0.55 a

2.3.2 对病原真菌孢子萌发的抑制作用 由图 3 可知,菌株 NQ8G II 4 培养液对交链格孢和灰葡萄孢分生孢子萌发均有抑制作用,且不同含量 NQ8G II 4 培养液对病原菌分生孢子萌发的抑制率差异显著($P<0.05$),随着 NQ8G II 4 培养液含量的增加,其对病原真菌分生孢子萌发的抑制率呈上升趋势。当菌株 NQ8G II 4 培养液含量为 50%时,其对交链格孢和灰葡萄孢的分生孢子萌发抑制率分别达 92.81%和 88.72%;当 NQ8G II 4 培养液含量为 40%,其对交链格孢和灰葡萄孢的分生孢子萌发抑制率均在 80.00%以上。结果表明,菌株 NQ8G II 4 培养液中含有某种抑菌活性物质,能显著抑制靶标菌的生长。

2.4 菌株 NQ8G II 4 挥发性物质对病原真菌菌丝生长的抑制作用

菌株 NQ8G II 4 挥发物质能抑制病原真菌菌丝的生长,与对照相比,接种 NQ8G II 4 菌饼处理病原真菌的菌丝生长势明显减弱,菌丝稀疏变薄,且随着接种 NQ8G II 4 菌饼后培养时间的延长,这种趋势更加明显。由表 3 可知,接种 NQ8G II 4 菌饼培养 6 d 的处理对交链格孢的抑菌效果最好,抑制率高达 94.34%;接种 NQ8G II 4 菌饼培养 10 d 的处理对灰

葡萄孢的抑菌效果最好,抑制率高达95.95%。



图柱上标不同小写字母表示同种病原菌不同处理间差异显著($P<0.05$)

Different lowercase letters in the superscript indicate significant differences among differdnt treatments of the same pathogenic fungi ($P<0.05$)

图 3 枸杞内生嗜线虫镰刀菌 NQ8G II 4 培养液对病原真菌孢子萌发的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effect of culture solution of endophytic *F. nematophilum* NQ8G II 4 from *L. barbarum* on spore germination of pathogenic fungi

表 3 枸杞内生嗜线虫镰刀菌 NQ8G II 4 挥发性物质对病原真菌的抑制作用

Table 3 Inhibitory effect of volatile substances of endophytic *F. nematophilum* NQ8G II 4 from *L. barbarum* on pathogenic fungi

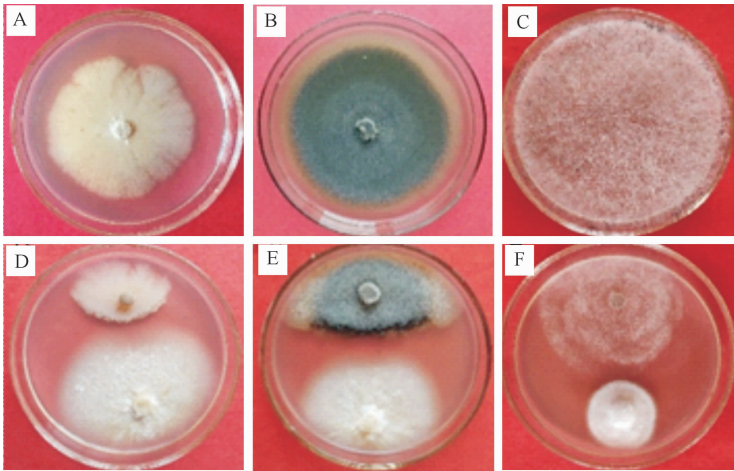
培养时间/d Incubation time	交链格孢抑制率/% Inhibition rate of <i>A. alternata</i>	灰葡萄孢抑制率/% Inhibition rate of <i>B. cinerea</i>	培养时间/d Incubation time	交链格孢抑制率/% Inhibition rate of <i>A. alternata</i>	灰葡萄孢抑制率/% Inhibition rate of <i>B. cinerea</i>
0	33.04±1.94 e	28.75±1.87 e	6	94.34±0.83 a	77.32±0.86 b
2	54.80±3.17 d	33.60±0.54 d	8	78.22±1.42 b	92.72±1.37 a
4	90.30±1.46 a	68.43±1.29 c	10	66.14±1.17 c	95.95±0.80 a

2.5 菌株 NQ8G II 4 抑菌谱测定

枸杞内生真菌菌株 NQ8G II 4 对出芽短梗霉、球派伦霉和半根霉等病原菌的抑制作用如图 4 所示。由图 4 可知,菌株 NQ8G II 4 对出芽短梗霉、球

派伦霉和米根霉均具有抑制作用,其中对出芽短梗霉的抑菌效果最好,对球派伦霉的抑菌效果次之,对米根霉抑菌效果较差。菌株 NQ8G II 4 对芽短梗霉、球派伦霉和米根霉的抑制率分别达 87.91%,

75.42%和 30.95%，结合 2.1 节可知，枸杞内生真菌 NQ8G II 4 的抑菌谱较广，对供试的 5 种病原真菌均有不程度的抑制作用。



A—C. 依次为出芽短梗霉、球派伦霉和米根霉组的对照组；D—F. 依次为菌株 NQ8G II 4 对出芽短梗霉、球派伦霉和米根霉的抑制作用组
A—C. The control group of *A. pullulans*, *P. glomerata* and *R. oryzae*, respectively; D—F. Inhibitory effects of strain NQ8G II 4 on *A. pullulans*, *P. glomerata* and *R. oryzae*, respectively

图 4 枸杞内生嗜线虫镰刀菌 NQ8G II 4 对不同病原菌的抑菌作用

Fig. 4 Inhibitory effect of endophytic *F. nematophilum* NQ8G II 4 from *L. barbarum* on different pathogenic fungi

2.6 菌株 NQ8G II 4 对灵武长枣的离体保鲜效果

参考文献[13]可知，腐烂率为 20%时灵武长枣就失去商品价值。由表 4 可知，在 15 ℃条件下贮藏 5 d 时，无菌水对照处理灵武长枣果面上出现病斑，腐烂率为 6.25%，2 g/L 多菌灵和体积分数 10%，20%，30%的 NQ8G II 4 培养液处理的腐烂率均为 0。贮藏 15 d 时，无菌水对照处理灵武长枣的腐烂率为 45.83%，失去商品价值；2 g/L 多菌灵处理的灵武长枣果面上开始出现病斑，腐烂率为 2.08%；体积分数为 20%的 NQ8G II 4 培养液处理的灵武长

枣腐烂率依然为 0。贮藏 30 d 时，无菌水对照处理的灵武长枣腐烂率高达 97.92%，腐烂现象非常严重；经 20% NQ8G II 4 培养液处理的腐烂率为 20.83%，与无菌水对照相比腐烂率降低了77.09%，保鲜效果与 2 g/L 多菌灵相当。结果表明，在 15 ℃贮藏条件下，体积分数 20% NQ8G II 4 培养液对灵武长枣具有显著的保鲜效果，可使货架期延长 15~30 d，表明 NQ8G II 4 菌株具有一定的生防开发潜力。

表 4 枸杞内生嗜线虫镰刀菌 NQ8G II 4 培养液对灵武长枣的保鲜效果

Table 4 Preservation effect of culture solution of endophytic *F. nematophilum* NQ8G II 4 from *L. barbarum* on *Ziziphus jujube* cv. Lingwuchangzao

处理 Treatment	腐烂率/% Decay rate					
	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	30 d
无菌水 Sterile water	6.25±2.08 a	18.75±2.08 a	45.83±2.40 a	64.58±3.99 a	85.42±5.24 a	97.92±2.08 a
体积分数 10% NQ8G II 4 培养液 10% culture filtrate of NQ8G II 4	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	2.08±2.08 de	8.33±0.00 de	20.83±2.40 de	33.33±3.40 e
体积分数 20% NQ8G II 4 培养液 20% culture filtrate of NQ8G II 4	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	0.00±0.00 e	4.17±2.41 e	10.42±3.99 f	20.83±2.40 g
体积分数 30% NQ8G II 4 培养液 30% culture filtrate of NQ8G II 4	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	4.17±2.41 d	12.50±2.41 d	25.00±3.40 d	43.75±2.08 d
体积分数 40% NQ8G II 4 培养液 40% culture filtrate of NQ8G II 4	2.08±2.08 bc	6.25±2.08 c	16.67±0.00 c	31.25±2.08 c	45.83±2.40 c	62.50±5.38 c
体积分数 50% NQ8G II 4 培养液 50% culture filtrate of NQ8G II 4	4.17±2.41 ab	14.58±2.08 b	27.08±2.08 b	39.58±2.08 b	56.25±2.08 b	79.17±2.41 b
多菌灵 Carbendazim	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	2.08±2.08 de	6.25±2.08 e	16.67±3.40 e	27.08±2.08 f

3 讨 论

作为重要的生防微生物,内生真菌可以与病原菌竞争生态位或产生拮抗物质等发挥防病功效,提高植物抗病性,具有防治果蔬采后病害的作用^[13]。孙文斌等^[14]研究表明,嗜线虫镰刀菌对甘蓝黑斑病菌(*Alternaria oleracea*)、甘蔗凤梨病菌(*Ceratocystis paradoxa*)、贡柑链格孢菌(*Alternaria citri*)和辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)等均有一定的抑制作用,抑菌谱广。本研究表明,菌株 NQ8G II 4 对灵武长枣采后致病病原真菌具有较强的抑制作用,保鲜效果明显,说明 NQ8G II 4 是一株极具开发潜力的生防菌株,在果蔬采后保鲜方面具有广阔的应用前景。

拮抗作用的强弱与拮抗菌和病原菌的接种时间相关^[15-16]。周可等^[17]研究发现,接种解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) HN 后再接种黄瓜灰霉病菌(*B. cinerea*)处理的抑菌效果比同时接种处理高 26.00%。徐涛等^[18]研究证实,接种内生链格孢(*Alternaria* sp.) Al54 菌株 3 d 后再接种苹果树腐烂病菌(*Valsa ceratosperma*)处理的抑菌效果比同时接种处理好,抑菌率高达 87.34%。本研究通过皿内对峙培养发现,预先接种 NQ8G II 4 菌株 4 d 后再接病原真菌的处理可明显抑制病原真菌的生长,这可能是菌株 NQ8G II 4 占据了有利的生态位,从而发挥了生防作用。显微观察发现,靠近菌株 NQ8G II 4 的病原真菌菌落边缘菌丝出现畸形、崩解和原生质外渗等现象,笔者推测可能是由于菌株 NQ8G II 4 产生了某种抑菌或溶菌物质所致^[19]。此外,本研究还发现,菌株 NQ8G II 4 培养液可以有效抑制交链格孢和灰葡萄孢菌丝生长及分生孢子萌发。结果表明,菌株 NQ8G II 4 培养液中含有某种抑菌活性物质,但是其具体成分尚不明确,还需进一步研究。

真菌挥发性物质不仅可以抑制果蔬病原真菌侵染,还可以诱导果蔬产生抗病性^[20-21],在果蔬采收病害防治方面受到广大学者的关注。如产香真菌(*Apiospora montagnei*) ZY-2 产生的挥发物质苯乙醇能够有效抑制灰霉病菌(*B. cinerea*)引起的草莓腐烂^[22];枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*) Y13 发酵产生的挥发性物质对油茶炭疽病菌有较好的抑制作用^[23]。本研究发现,菌株 NQ8G II 4 挥发物质对灵武长枣致病病原真菌具有较好的抑制作用,致使病原菌生长势减弱,菌丝稀疏,但其挥发物质的成分还

需通过气相色谱-质谱联用(GC-MS)方法分析确定。

保鲜剂的浓度与果蔬保鲜效果密切相关,选用合适的保鲜剂浓度能达到良好又经济的保鲜效果^[24]。许原等^[25]分别用质量浓度为 5, 10, 15, 20 g/L 的壳聚糖对凤尾菇进行处理,发现 15 g/L 的壳聚糖的保鲜效果最好;胡丽杰等^[10]研究发现,体积分数 10% 的 NQ8G II 4 培养液对枸杞胶孢炭疽菌抑菌率最高,对枸杞果保鲜作用也最好。本研究发现,体积分数 20% 的 NQ8G II 4 培养液对采后灵武长枣的保鲜效果最好,与化学药剂多菌灵相当。从本研究结果看,菌株 NQ8G II 4 培养液的用量并非越大越好,分析认为,用量过低,不能激发寄主的诱导抗性,抑菌效果差,起不到保鲜作用;用量过高会使拮抗菌与宿主植物处于敌对状态,导致果蔬上出现腐败斑点。

关于内生拮抗真菌对果蔬的保鲜效果研究目前尚处于初步阶段,商品化的保鲜剂在国内尚未见报道。枸杞内生嗜线虫镰刀菌 NQ8G II 4 作为极具前景的微生物源保鲜剂生产菌,还需对其抑菌机理、发酵条件和制剂工艺等进行深入研究,使其真正成为一种新型的果蔬保鲜剂应用于生产实际。

4 结 论

预先接种枸杞内生嗜线虫镰刀菌 NQ8G II 4 对灵武长枣采后致病病原真菌有较好的拮抗作用, NQ8G II 4 培养液和挥发性物质对灵武长枣采后优势致病病原真菌交链格孢和灰葡萄孢菌丝生长和孢子萌发均有较强的抑制作用。在 15 ℃ 贮藏条件下,用体积分数 20% 的 NQ8G II 4 培养液处理的灵武长枣,在 30 d 后,与对照相比腐烂率下降了 77.09%,货架期延长了 15~30 d。

[参考文献]

- [1] 任苗苗, 闫思远, 李嘉泓, 等. 两株拮抗芽孢杆菌对灵武长枣采后致病真菌的抑菌作用 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(20): 21-26.
Ren M M, Yan S Y, Li J H, et al. Antibacterial effect of two antagonistic *Bacillus* strains on rot-causing fungi in postharvest *Ziziphus jujube* cv. Lingwuchangzao [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(20): 21-26.
- [2] 任玉锋, 马爱瑛, 刘雅琴, 等. 灵武长枣采后主要病原真菌的鉴定 [J]. 食品研究与开发, 2012, 33(9): 128-130.
Ren Y F, Ma A Y, Liu Y Q, et al. Identification of main pathogenic fungus from post-harvest *Ziziphus jujubamill* cv. Lingwuchangzao [J]. Food Research And Development, 2012, 33(9): 128-130.

[3] 任苗苗,闫思远,李嘉泓,等.宁夏‘灵武长枣’采后病原真菌的分离与鉴定[J].中国果树,2020(5):93-97,102.
Ren M M, Yan S Y, Li J H, et al. Isolation and identification of pathogenic fungi in postharvest *Ziziphus jujube* cv. Lingwu-changzao [J]. China Fruits, 2020(5): 93-97, 102.

[4] 沈雅珉,何三宁.鲜枣采后贮藏保鲜技术研究进展[J].保鲜与加工,2016,16(5):134-138.
Shen Y M, He S N. Research progress on storage technology of postharvest fresh jujube [J]. Storage and Process, 2016, 16(5): 134-138.

[5] 庞荣丽,成 昕,谢汉忠,等.我国水果质量安全标准现状分析[J].果树学报,2016,33(5):612-623.
Pang R L, Cheng X, Xie H Z, et al. Current status of fruit quality safety standards in China [J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(5): 612-623.

[6] Khan A R, Ullan I, Waqas M, et al. Host plant growth promotion and cadmium detoxification in solanum nigrum, mediated by endophytic fungi [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 136: 180-188.

[7] Aly A H, Edrada-Ebel R A, Indriani I D, et al. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant polygonum senegalense [J]. Journal of Natural Products, 2007, 71(6): 972-980.

[8] 郝苑汝,庞俊倩,赵鑫丹,等.核桃内生真菌 SYS-5-2 的鉴定及其抑菌活性[J].西北林学院学报,2020,35(1):158-164.
Hao Y R, Pang J Q, Zhao X D, et al. Identification and antimicrobial activity of endophytic fungus SYS-5-2 from walnut [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2020, 35(1): 158-164.

[9] 秦王阁阁,蒋 维,黄炜诚,等.几株内生真菌对三峡地区柑橘的生物保鲜作用[J].湖北农业科学,2017,56(9):1717-1720.
Qinwang G G, Jiang W, Huang W C, et al. Biopreservation of several endophytes to the citrus in Three Gorges Region [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2017, 56(9): 1717-1720.

[10] 胡丽杰,闫思远,李嘉泓,等.枸杞内生真菌对胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 的拮抗作用及生防潜力[J].植物保护,2020,46(1):125-133.
Hu L J, Yan S Y, Li J H, et al. Antagonism and control potential of endophytic fungi from *Lycium barbarum* against *Colletotrichum gloeosporioides* [J]. Plant Protection, 2020, 46(1): 125-133.

[11] 马志远,李金岭,冯志珍,等.1株烟草赤星病拮抗芽孢杆菌的鉴定与活性研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2012,40(3):117-125.
Ma Z Y, Li J L, Feng Z Z, et al. Isolation, identification and antibacterial activity of *Antagonistic bacteria* M-07C2F against tobacco brown spot [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2012, 40(3): 117-125.

[12] 郭洁心,张育铭,朱洪磊,等.解淀粉芽孢杆菌 XJ5 挥发性物质抑菌活性及对苹果褐腐病防效测定[J].中国生物防治学报,2020,36(4):575-580.
Guo J X, Zhang Y M, Zhu H L, et al. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Bacillus amyloliquefaciens* XJ5 and control effect against *Monilinia fructigena* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(4): 575-580.

[13] 张淑萍,张小康,袁 雪,等.1-甲基环丙烯对早中熟鲜食枣的保鲜及采后生理效应[J].食品科学,2018,39(13):272-279.
Zhang S P, Zhang X K, Yuan X, et al. Effect of 1-methylcyclopropene on preservation and postharvest physiology of early-middle maturing table jujube [J]. Food Science, 2018, 39(13): 272-279.

[14] 孙文斌,黄小京,冯蓓蓓,等.地枫皮内生真菌 DFP-G-7 的分离鉴定、生物学特性及抑菌活性[J].江苏农业科学,2018,46(20):97-100.
Sun W B, Huang X J, Feng B B, et al. Biological characteristics and antibacterial activity of endophytic fungus DFP-G-7 from the bark of maple leaf [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(20): 97-100.

[15] 周丽洪,姬广海,王永吉,等.魔芋内生拮抗细菌生防机理研究[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2014,40(3):262-266.
Zhou L H, Ji G H, Wang Y J, et al. Mechanism of biocontrol of *Amorphophallus konjac* endophytic bacteria [J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2014, 40(3): 262-266.

[16] 孙广正,姚 拓,赵桂琴,等.荧光假单胞菌防治植物病害研究现状与展望[J].草业学报,2015,24(4):174-190.
Sun G Z, Yao T, Zhao G Q, et al. Research progress and prospects for controlling plant diseases using *Pseudomonas fluorescens* [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(4): 174-190.

[17] 周 可,魏冬冬,张峰峰,等.解淀粉芽孢杆菌 HN 对番茄、黄瓜病原菌的抑制作用[J].天津师范大学学报(自然科学版),2019,39(4):51-57.
Zhou K, Wei D L, Zhang F F, et al. Inhibitory effects of *Bacillus amyloliquefaciens* HN on the fungus pathogens of tomato and cucumber [J]. Journal of Tianjin Normal University (Natural Science Edition), 2019, 39(4): 51-57.

[18] 徐 涛,胡同乐,王亚南,等.苹果树皮内生真菌的分离及其对腐烂病的生物防治潜力[J].植物保护学报,2012,39(4):327-333.
Xu T, Hu T L, Wang Y N, et al. Isolation of endophytic fungi from apple bark and their potential for biological control of *Valsa ceratosperma* [J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2012, 39(4): 327-333.

[19] 柳焕章,刘建钊,周敬霄.微生物间拮抗的研究方法与农业应用[J].安徽农业科学,2011,39(3):1310-1314,1332.
Liu H Z, Liu J C, Zhou J X. Research methods and agricultural application of microbial antagonism [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(3): 1310-1314, 1332.

[20] Ramadan M, Gigolashvili T, Groginsky D K, et al. Trichoderma volatiles effecting arabidopsis: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 68: 45-50.

leaves [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2019, 47(8): 109-116, 143.

[25] 陈思南,王心怡,李梦婷,等. 五味子蜂花粉不同萃取物对小鼠肝脏脂质过氧化及 DNA 氧化损伤的作用 [J]. 食品科学, 2019, 40(11): 146-151.

Chen S N, Wang X Y, Li M T, et al. Effects of different solvent extracts from *Schisandra chinensis* bee pollen on hepatic lipid peroxidation and DNA oxidative damage [J]. Food Science, 2019, 40(11): 146-151.

[26] 徐元庆,王哲奇,张 静,等. 岩藻多糖的抗氧化功能研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(10): 1782-1793.

Xu Y Q, Wang Z Q, Zhang J, et al. Research advance on antioxidant function of fucoidan [J]. Natural Product Research and Development, 2020, 32(10): 1782-1793.

(上接第 145 页)

[21] 钟 涛,王智荣,杜木英. 微生物源挥发性物质防治采后果蔬病害的研究进展 [J]. 微生物学报, 2021, 61(7): 1771-1785.

Zhong T, Wang Z R, Du M Y. Control of postharvest fruits and vegetables diseases by microbial volatile compounds [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(7): 1771-1785.

[22] 陈利军,王国君,田雪亮,等. 产香真菌 ZY-2 菌株鉴定及其挥发性物质抑菌活性测定与组分分析 [J]. 南方农业学报, 2013, 44(11): 1818-1822.

Chen L J, Wang G J, Tian X L, et al. Identification of an aroma-producing fungus ZY-2 and its analysis on antifungal activity and chemical component of volatile compounds [J]. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(11): 1818-1822.

[23] 冯福山,刘君昂,胡廉成,等. 枯草芽胞杆菌 Y13 挥发性物质的分析及抑菌活性 [J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(4): 597-604.

Feng F S, Liu J A, Hu L C, et al. Analysis of volatile compounds from *Bacillus subtilis* Y13 and its antimicrobial activity [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(4): 597-604.

[24] 张 茜,李 洋,王磊明,等. 生物保鲜剂在果蔬保鲜中的应用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(6): 308-316.

Zhang X, Li Y, Wang L M, et al. Research progress of application of biological preservative in the preservation of fruits and vegetables [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(6): 308-316.

[25] 许 原,张梦奇. 3 种天然保鲜剂对凤尾菇的保鲜效果 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(16): 253-257, 265.

Xu Y, Zhang M Q. Three natural preservatives for preservation of *Pleurotus sajorcaju* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(16): 253-257, 265.