

新疆野果林苹果腐烂病病原菌鉴定及药用植物内生细菌对其抑菌效果

黄银^{1,2}, 马金彪¹, 李凯旋³, 刘永红¹, 李文均^{1,4}, 李丽^{*1,5}

1 中国科学院新疆生态与地理研究所 荒漠与绿洲生态国家重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 军事科学院军事医学研究院 生命组学研究所, 北京 102206

4 中山大学生命科学学院 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275

5 河北大学生命科学学院 河北省微生物多样性研究与应用重点实验室, 河北 保定 071002

黄银, 马金彪, 李凯旋, 刘永红, 李文均, 李丽. 新疆野果林苹果腐烂病病原菌鉴定及药用植物内生细菌对其抑菌效果[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 175-184.

HUANG Yin, MA Jinbiao, LI Kaixuan, LIU Yonghong, LI Wenjun, LI Li. Identification of pathogens causing apple *Valsa* canker in Xinjiang wild apple forests and antifungal effect of endophytic bacteria from medicinal plants on the pathogens[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 175-184.

摘要:【背景】药用植物内生细菌能产生与寄主植物相同或相似的化合物及一些新的次级代谢产物等, 具有促进宿主植物生长、抵抗病虫害、降解有毒有害化合物等作用。【目的】进一步提高苹果腐烂病生物防治的效率, 丰富新疆药用植物内生细菌拮抗功能菌株的资源库。【方法】从新疆伊犁新源县和塔城额敏县野果林中采集带腐烂病病斑的果树枝条, 分离鉴定苹果腐烂病病原菌, 并采用平板对峙法从药用植物内生细菌中筛选对苹果腐烂病具有抑制作用的拮抗菌株。【结果】从两地共分离获得 234 株分离株, 筛选鉴定出 25 株 *Valsa malicola* 和 2 株 *Valsa mali*; 同时, 筛选出 92 株具有抑菌效果的内生细菌菌株, 其中 70 株来自甘草植物内生细菌。【结论】药用植物甘草中富含较为丰富的抗苹果腐烂病病原菌的微生物菌株资源。本研究在新疆野果林苹果腐烂病的生物防治及药用植物内生细菌的开发利用等方面具有重要意义。

关键词: 苹果腐烂病; 内生细菌; 抑菌效果; 药用植物

资助项目: 国家自然科学基金(U1903206); 河北省微生物多样性研究与应用重点实验室开放课题(MDRA202104)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U1903206) and the Open Project from Key Laboratory of Microbial Diversity Research and Application of Hebei Province (MDRA202104).

*Corresponding author. E-mail: lili.bobo@outlook.com

Received: 2022-04-19; Accepted: 2022-05-12; Published online: 2022-06-13

Identification of pathogens causing apple *Valsa* canker in Xinjiang wild apple forests and antifungal effect of endophytic bacteria from medicinal plants on the pathogens

HUANG Yin^{1,2}, MA Jinbiao¹, LI Kaixuan³, LIU Yonghong¹, LI Wenjun^{1,4}, LI Li^{*1,5}

1 State Key Laboratory of Desert and Oasis Ecology, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, Xinjiang, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Beijing Institute of Lifeomics, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 102206, China

4 State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, Guangdong, China

5 Key Laboratory of Microbial Diversity Research and Application of Hebei Province, School of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, Hebei, China

Abstract: [Background] Endophytic bacteria of medicinal plants can produce the same or similar compounds as host plants and new secondary metabolites, which can promote the growth of the host, resist diseases and insect pests, and degrade toxic and harmful compounds. [Objective] To further improve the biocontrol efficiency of apple *Valsa* canker, and enrich the resource pool of antagonistic strains of endophytic bacteria from medicinal plants in Xinjiang. [Methods] The pathogens of apple *Valsa* canker were isolated and identified from the branches with disease spots of the apple plants in the wild apple forests of Xinyuan County (Yili area) and Emin County (Tacheng area) in Xinjiang. The endophytic bacteria of medicinal plants, which had the ability against the pathogen of apple canker, were screened by plate confrontation method. [Results] A total of 234 strains of pathogenic fungi were isolated from Xinyuan county and Emin county, including 25 strains of *Valsa malicola* and 2 strains of *V. mali*. In addition, 92 strains of endophytic bacteria with antifungal effect were screened out, among which 70 strains were from *Glycyrrhiza uralensis*. [Conclusion] The medicinal plant *G. uralensis* is rich in microbial resources against apple *Valsa* canker. This study is of great significance for the biocontrol of apple *Valsa* canker in Xinjiang wild apple forests and the development and utilization of endophytic bacteria in medicinal plants.

Keywords: apple *Valsa* canker; endophytic bacteria; antifungal effect; medicinal plant

新疆野果林在我国主要分布在伊犁和塔城地区, 有新疆野苹果(*Malus sieversii*)、野杏(*Armeniaca vulgaris*)、野生櫻桃李(*Prunus cerasifera*)等野生果木资源 60 余种, 为栽培果树的原始祖先, 是天然的果树种质资源基因库, 也是我国生物多样性保护中的重要群落类型之一^[1-5]。近年来, 受人类活动、气候因素、病虫害等多种因素影响, 新疆野果林大面

积衰退甚至死亡, 生态环境受到毁灭性的危害, 造成大量优质种质资源和基因资源的严重损失^[6-7]。苹果腐烂病被称为苹果树的“癌症”, 其分布范围广、危害程度高, 主要侵害苹果的枝干和果实, 使苹果树皮腐烂, 果实产量和品质大幅下降, 病害严重时会出现毁园现象, 且极难防治^[8-10]。随着苹果小吉丁虫在野果林的扩散, 苹果腐烂病的发生危害逐年加重^[11], 因

此, 苹果腐烂病的防治对新疆野果林的保护具有极为重要的意义。通常果园管理不能彻底清除腐烂病病原菌, 而化学药剂很难直接杀死病原菌, 并且病原菌会产生抗药性, 防治效果逐渐降低, 而长期依靠化学药剂防治可致果园生态环境恶化, 果实品质下降, 甚至可能引起食品安全问题^[12-13], 因此, 如何安全、高效地防治苹果腐烂病已经成为亟待解决的问题。

植物内生细菌是一类生活在植物组织内且不会对宿主植物造成伤害的微生物, 多数情况下它们可以直接或间接地保护和促进宿主植物的正常生长^[14-15]。药用植物内生细菌不仅能产生与寄主植物相同或相似的化合物, 还能产生一些新的次级代谢产物, 是一类宝贵的内生菌资源库^[16-17]。目前, 已有研究从牛至、剑麻、丹参、曼陀罗等药用植物中分离筛选出对苹果腐烂病病原菌有较好抑菌作用的内生细菌^[18-20]。因此, 本研究对新疆野果林苹果腐烂病进行分离、筛选及鉴定, 同时利用实验室现有药用植物内生细菌筛选对苹果腐烂病病原菌有抑菌效果的功能菌株, 以期新疆野果林苹果腐烂病的生物防治提供研究材料和理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

腐烂病病枝样本主要采自新疆伊犁新源县野果林和塔城额敏县野果林。

1.1.2 供试菌株

药用植物阿魏(57株)、黑果枸杞(36株)和甘草(83株)的内生细菌共计176株及苹果腐烂病标准菌株(*Valsa malicola*, Vmc2)均由中国科学院新疆生态与地理研究所极端环境微生物资源与生态功能研究团队提供。苹果腐烂病致病菌 *Valsa mali* (Vm)和 *Valsa malicola* (Vmc1)由本

实验分离获得。

1.1.3 培养基和主要试剂、仪器

本实验采用的培养基为 PDA 和 ISP2 培养基^[21]。头孢噻肟钠和真菌基因组 DNA 提取试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 2×Taq PCR Master Mix 和 50 bp DNA Ladder, 北京天根生化科技有限公司。洁净工作台, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 恒温培养箱, 上海天呈实验仪器制造有限公司; PCR 仪和电泳仪, Bio-Rad 公司; 数字凝胶成像分析系统, 柯达公司。

1.2 方 法

1.2.1 样品的采集与处理

在新疆伊犁新源县野果林和塔城额敏县野果林中, 采集具有典型腐烂病病斑的枝条, 用枝剪剪成约 10–15 cm 的小段带回实验室, 4 °C 保存备用。

1.2.2 腐烂病病原菌的分离、纯化与保藏

取样本枝条, 在超净工作台中切取病健交界处去皮后 5 mm×5 mm 左右的组织块。将切好的组织块用 75%酒精消毒 1 min, 接着用无菌水漂洗 3 次后移至准备好的 PDA (含头孢噻肟钠 100 μL/mL)培养基上, 每个平板接 5 个组织块于 25 °C 培养。观察菌落长出后挑取边缘菌丝, 进行菌株纯化和将纯化后获得的分离株保存在试管 PDA 斜面上, 放置在 4 °C 冰箱中储存备用。

1.2.3 病原菌形态观察

将分离纯化的菌株接种于 PDA 平板上, 置于 25 °C 暗培养, 观察并记录分离菌株的菌落形态、颜色、质地等性状。

1.2.4 腐烂病病原菌的分子生物学鉴定

用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取纯化病原菌的 DNA。用苹果腐烂病菌属专化型引物对 VF/VR 和种专化型引物对 VmF/VmR、VmcF/VmcR 和 VpF/VpR 进行巢式 PCR^[22], 引物

序列见表 1。PCR 反应体系(25 μ L): 模板 DNA (50 ng/ μ L) 1 μ L, $2\times$ Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 补足 25 μ L。第一轮扩增引物对用 VF/VR。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 64.7 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物用 2.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 挑取有特异性条带的 PCR 扩增产物作为第二轮扩增的模板。第二轮扩增分别以 VmF/VmR、VmcF/VmcR 和 VpF/VpR 为引物对。VmF/VmR 引物对的 PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 64.3 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。VmcF/VmcR 和 VpF/VpR 引物对的 PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55.3 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物用 2.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 然后使用凝胶成像仪观察并记录编号。根据编号找到对应纯化病原菌的 DNA, 以 ITS1/ITS4 为引物对进行 PCR 扩增, 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序并做拼接处理, 将获得的序列提交到 GenBank 数据库, 通过 BLASTn 进行在线比对, 完成分离病原菌的初步鉴定。

表 1 PCR 引物信息

Table 1 The primers information

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)
VF	GTTGCCTCGGCGCTGGCT	380
VR	GCGAGGGTTTACTACTGC	
VmF	GAGTACTCCCTCCCGCTCCG	350
VmR	TTAATTAAGGGGCGGCTCA	
VmcF	GAGTACTCCACCTGGGAGAA	300
VmcR	ACTAGTCTCCCGTGAGGGA	
VpF	CAAGCTTGTCTCCCTTCAGTGG	350
VpR	CGGATCCGTCCTGTAAAACAGT	
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCG	550
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

1.2.5 三种药用植物内生细菌对苹果腐烂病原菌的抑菌效果

采用平板对峙法筛选抗苹果腐烂病原菌的菌株。用 ISP2 平板培养基活化 3 种药用植物内生细菌, 活化出的菌株在 PDA 平板上传代培养。用接种环挑取内生细菌点接在距平板中央 2.5 cm 处的 8 个点上, 将苹果腐烂病菌接种在 PDA 平板中央, 以仅接病原真菌的平板为空白对照。25 $^{\circ}$ C 恒温培养 5 d 后, 观察内生细菌的抑菌效果, 挑取有抑制作用的内生细菌菌株进行复筛。用接种环挑取内生细菌均匀接在距平板中央 2.5 cm 处的 4 条 3 cm 长的线上, 将苹果腐烂病菌接种在 PDA 平板中央, 以仅接病原真菌的平板为空白对照。25 $^{\circ}$ C 恒温培养 5 d 后, 测量病原菌生长半径, 按公式计算内生细菌的相对抑菌率。抑制率=[(对照菌落直径-0.5 cm)-(处理菌落直径-0.5 cm)]/(对照菌落直径-0.5 cm) \times 100%。

2 结果与分析

2.1 新疆野果林苹果腐烂病原菌分离鉴定结果

2.1.1 腐烂病病原菌分离结果

从伊犁野果林中野苹果树、野杏树、野山楂树和野梨树上采集 114 枝带病斑枝条, 从中分离获得 171 株真菌; 从塔城野果林的苹果树上采集 25 枝带病斑枝条, 从中分离获得 63 株分离株, 分离结果如表 2 所示。

2.1.2 苹果腐烂病原菌分子鉴定结果

通过苹果腐烂病种属专化引物对 234 株分离菌株进行快速检测, 挑选出 44 株有特异性条带的真菌进行 ITS 基因序列测定, 通过 BLASTn 进行在线比对, 完成分离病原菌的初步鉴定。如图 1 所示, 这 44 株菌分别属于 *Valsa*、*Alternaria*、*Clavariopsis*、*Monilinia*、*Mucor*、*Rhizopus*、*Dothiorella*、*Gibberella*、

Microsphaeropsis、*Peniophora* 10 个属, 其中 *Valsa* 占的比例最高, 为 61.36%, 表明本实验所用种属专化引物对苹果腐烂病病原菌具有很高的灵敏性, 可以通过该种属专化引物对所分离的病原菌进行快速地筛选, 从而缩小鉴定范围。从新源县野果林野苹果枝条中分离出 15 株 *Valsa malicola* 和 2 株 *Valsa mali*, 野梨树枝上分离出 1 株 *Valsa malicola*, 表明 *Valsa malicola* 不仅可以侵染野苹果树, 还可以侵染野梨树。在塔城额敏县野果林分离出 9 株 *Valsa malicola*, 表明 *Valsa malicola* 已经侵染了额敏县野果林的野苹果树(表 3)。

表 2 不同采样点分离结果

Table 2 Separation results of different sample points

采样点	树种	枝条数目	分离物数量
Sample points	Tree species	Number of branches	Number of isolates
新源县	野苹果树	84	135
Xinyuan County	<i>Malus sieversii</i>		
	野杏树	18	13
	<i>Armeniaca vulgaris</i>		
	野山楂树	6	8
	<i>Crataegus songorica</i>		
	野梨树	6	15
	<i>Pyrus asiamediae</i>		
额敏县	野苹果树	25	63
Emin County	<i>Malus sieversii</i>		

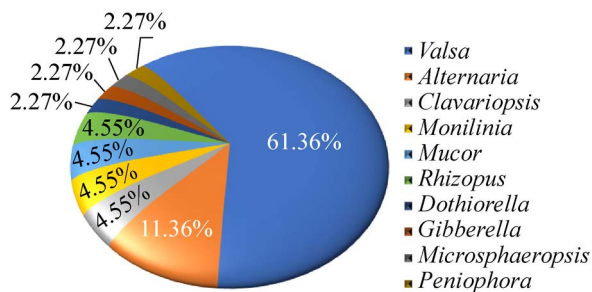


图 1 腐烂病菌属水平分布

Figure 1 Distribution of apple *Valsa* canker pathogenic fungi at the genus level.

表 3 苹果腐烂病病原菌的分布

Table 3 Distribution of apple *Valsa* canker pathogenic fungi

采样点	树种	<i>Valsa malicola</i> 分离数目	<i>Valsa mali</i> 分离数目
Sample points	Tree species	Number of <i>Valsa malicola</i> isolates	Number of <i>Valsa mali</i> isolates
新源县	野苹果	15	2
Xinyuan County	<i>Malus sieversii</i>		
	野杏树	0	0
	<i>Armeniaca vulgaris</i>		
	野山楂树	0	0
	<i>Crataegus songorica</i>		
	野梨树	1	0
	<i>Pyrus asiamediae</i>		
额敏县	野苹果树	9	0
Emin County	<i>Malus sieversii</i>		

2.2 三种药用植物内生细菌抗苹果腐烂病病原菌结果分析

2.2.1 阿魏内生细菌抗腐烂病病原菌结果分析

采用平板对峙方法从 57 株阿魏内生细菌中筛选对苹果腐烂病病原菌有抑菌效果的菌株, 共筛选到 12 株对苹果腐烂病病原菌有抑制作用的菌株, 筛选结果如表 4 所示。具有抑制作用的菌株分布在 *Acinetobacter*、*Bacillus*、*Micrococcus*、*Sphingomonas* 4 个属中。筛选到 4 株对菌株 Vm (*Valsa mali*)、Vmc1 (*Valsa malicola*)、Vmc2 (*Valsa malicola* 标准菌株)均有抑制作用的菌株且均为 *Bacillus*。

2.2.2 黑果枸杞内生细菌抗腐烂病病原菌结果分析

从 36 株黑果枸杞内生细菌中共筛选到 10 株对苹果腐烂病菌具有抑菌效果的菌株, 筛选结果如表 5 所示。10 株菌株中 *Bacillus* 占 8 株, *Bacillus* sp. GQ24、GQ26、GQ27、GQ29 等 4 株菌对菌株 Vm、Vmc1、Vmc2 均有抑制作用, 其中菌株 *Bacillus* sp. GQ24 的抑菌效果最好, 对 Vm、Vmc1、Vmc2 的抑菌率分别为 70.93%、

62.26%和 77.72%，而 *Rhodococcus* sp. GQ30 和 *Enterobacter* sp. GQ13 仅对 Vmc2 具有抑制作用。

2.2.3 甘草内生细菌抗腐烂病病原菌结果分析

从 83 株甘草内生细菌中共筛选出 70 株具抑菌效果的菌株，筛选结果如表 6 所示。有 55 株对 Vm、Vmc1、Vmc2 均有抑制作用，

表 4 三株苹果腐烂病病原菌与阿魏内生细菌的抑菌结果

Table 4 Antifungal results between three strains of apple *Valsa* canker and endophytic bacteria from *Ferula*

拮抗菌株	Vm (%)	Vmc1 (%)	Vmc2 (%)
Antagonistic strain			
<i>Bacillus</i> sp. AW2	58.01	59.41	63.73
<i>Bacillus</i> sp. AW8	38.36	57.89	81.60
<i>Acinetobacter</i> sp. AW13	—	—	35.96
<i>Acinetobacter</i> sp. AW16	—	—	23.31
<i>Bacillus</i> sp. AW19	—	40.47	—
<i>Bacillus</i> sp. AW22	—	59.68	62.96
<i>Sphingomonas</i> sp. AW26	—	—	48.28
<i>Bacillus</i> sp. AW29	56.24	55.81	73.51
<i>Bacillus</i> sp. AW33	—	—	21.92
<i>Bacillus</i> sp. AW40	53.42	56.03	68.98
<i>Micrococcus</i> sp. AW44	—	—	36.98
<i>Acinetobacter</i> sp. AW49	—	—	73.73

—: 抑菌圈半径为 0–5 mm。下同

—: The radial inhibition zone is 0–5 mm. The same below.

表 5 三株苹果腐烂病病原菌与枸杞内生细菌的抑菌结果

Table 5 Antifungal results between three strains apple *Valsa* canker and endophytic bacteria from *Lycium ruthenicum*

拮抗菌株	Vm (%)	Vmc1 (%)	Vmc2 (%)
Antagonistic strain			
<i>Enterobacter</i> sp. GQ13	—	—	45.06
<i>Bacillus</i> sp. GQ17	53.44	—	78.91
<i>Bacillus</i> sp. GQ24	70.93	62.26	77.72
<i>Bacillus</i> sp. GQ26	66.56	60.73	63.43
<i>Bacillus</i> sp. GQ27	36.54	46.66	64.27
<i>Bacillus</i> sp. GQ28	—	54.21	75.03
<i>Bacillus</i> sp. GQ29	66.52	58.74	81.88
<i>Rhodococcus</i> sp. GQ30	—	—	29.34
<i>Bacillus</i> sp. GQ33	—	50.96	64.76
<i>Bacillus</i> sp. GQ36	—	43.71	45.04

分布在 *Bacillus*、*Brevibacterium*、*Pantoea*、*Achromobacter*、*Dietzia*、*Microbacterium*、*Micromonospora*、*Mycobacterium* 8 个属中，其中 *Bacillus* 所占比例最高，为 80% (图 2)。虽然 *Bacillus* 所占比例最高，但 *Brevibacterium* 和 *Pantoea* 的平均相对抑菌率均高于 *Bacillus*。菌株 *Brevibacterium* sp. GC56 对 Vm 和 Vmc2 的抑菌效果最强，相对抑菌率分别为 77.96% 和 85.27%；菌株 *Pantoea* sp. GC40 对 Vmc1 的抑菌效果最强，相对抑菌率为 73.18%，同时也是唯一相对抑菌率均在 70% 以上的菌株。相较于阿魏和黑果枸杞内生细菌菌株筛选结果，甘草内生细菌的抑菌效果更佳且拮抗菌株的种类更多，表明甘草中蕴含着较为丰富的抗苹果腐烂病病原菌的微生物资源。

3 讨论与结论

3.1 新疆野果林苹果腐烂病病原菌分离、鉴定结果讨论

本研究对采自伊犁新源县和塔城额敏县 139 枝带病斑枝条进行分离获得 234 株分离菌株，经筛选鉴定出 27 株苹果腐烂病病原菌，有 25 株为 *Valsa malicola*，初步认为 *Valsa malicola* 为 2 个野果林苹果腐烂病的优势种。Seifollahi 等^[23]从欧洲酸樱桃、山楂树、李子树等 6 种果树中均分离出 *Valsa malicola*，表明 *Valsa malicola* 的寄主具有多样性。目前已从新源县野梨树上分离出 *Valsa malicola*，因此对苹果腐烂病的防治不仅仅局限在对苹果树上，其他树种同样也需要预防该病害的发生。

受环境条件和寄主植物等因素的影响，完全依靠传统的形态学鉴定方法很难准确鉴定出各种腐烂病菌的种类^[24]，因此，本实验采用苹果腐烂病种属专化引物对所分离的真菌进行快速筛选，最后通过 ITS 序列分析完成腐烂病菌的

表 6 三株苹果腐烂病病原菌与甘草内生细菌抑菌结果

Table 6 Antifungal results between three strains apple *Valsa* canker pathogenic fungi and endophytic bacteria from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch

拮抗菌株 Antagonistic strain	Vm (%)	Vmc1 (%)	Vmc2 (%)	拮抗菌株 Antagonistic strain	Vm (%)	Vmc1 (%)	Vmc2 (%)
<i>Bacillus</i> sp. GC1	62.06	64.67	63.28	<i>Brevibacterium</i> sp. GC44	69.46	—	78.72
<i>Bacillus</i> sp. GC4	—	33.25	—	<i>Bacillus</i> sp. GC45	—	—	65.03
<i>Bacillus</i> sp. GC6	57.22	60.75	67.93	<i>Bacillus</i> sp. GC47	—	38.27	45.17
<i>Bacillus</i> sp. GC7	72.93	57.56	59.56	<i>Bacillus</i> sp. GC48	69.11	64.53	66.26
<i>Microbacterium</i> sp. GC9	63.11	61.62	68.36	<i>Bacillus</i> sp. GC49	69.59	68.97	64.82
<i>Bacillus</i> sp. GC10	64.04	60.76	66.34	<i>Brevibacterium</i> sp. GC50	71.62	67.82	79.61
<i>Brevibacterium</i> sp. GC11	71.03	66.06	80.81	<i>Bacillus</i> sp. GC51	66.99	71.01	75.24
<i>Bacillus</i> sp. GC12	63.63	63.93	—	<i>Bacillus</i> sp. GC52	24.36	—	—
<i>Phyllobacterium</i> sp. GC13	63.55	62.23	—	<i>Bacillus</i> sp. GC54	41.29	—	—
<i>Bacillus</i> sp. GC17	73.36	66.66	69.26	<i>Brevibacterium</i> sp. GC55	76.65	68.85	82.97
<i>Micromonospora</i> sp. GC18	51.90	50.82	57.50	<i>Brevibacterium</i> sp. GC56	77.96	69.31	85.27
<i>Bacillus</i> sp. GC19	58.31	58.71	59.06	<i>Bacillus</i> sp. GC57	35.56	—	57.70
<i>Bacillus</i> sp. GC20	36.96	—	—	<i>Bacillus</i> sp. GC58	73.20	66.19	73.47
<i>Bacillus</i> sp. GC21	67.93	69.07	71.26	<i>Bacillus</i> sp. GC59	70.79	53.48	71.58
<i>Bacillus</i> sp. GC22	63.07	59.48	62.46	<i>Bacillus</i> sp. GC60	63.63	54.69	81.37
<i>Bacillus</i> sp. GC23	—	—	58.28	<i>Bacillus</i> sp. GC61	67.93	55.00	73.14
<i>Bacillus</i> sp. GC24	58.18	55.32	74.13	<i>Bacillus</i> sp. GC62	—	—	24.07
<i>Bacillus</i> sp. GC25	59.51	58.43	75.38	<i>Bacillus</i> sp. GC63	—	—	20.71
<i>Bacillus</i> sp. GC26	65.81	65.98	63.96	<i>Bacillus</i> sp. GC64	68.72	68.72	67.74
<i>Bacillus</i> sp. GC27	65.42	60.33	58.01	<i>Bacillus</i> sp. GC65	52.44	55.18	57.45
<i>Bacillus</i> sp. GC28	63.69	57.99	57.11	<i>Dietzia</i> sp. GC66	50.93	58.16	62.76
<i>Bacillus</i> sp. GC29	69.40	69.65	73.66	<i>Bacillus</i> sp. GC67	63.86	64.58	66.28
<i>Bacillus</i> sp. GC30	72.63	63.94	67.04	<i>Bacillus</i> sp. GC68	48.46	54.41	—
<i>Bacillus</i> sp. GC31	35.93	52.38	46.19	<i>Mycobacterium</i> sp. GC70	63.67	48.67	56.29
<i>Bacillus</i> sp. GC32	63.34	57.83	58.66	<i>Bacillus</i> sp. GC71	66.03	62.92	76.27
<i>Bacillus</i> sp. GC33	70.51	67.44	69.62	<i>Brevibacterium</i> sp. GC72	—	—	64.57
<i>Bacillus</i> sp. GC34	40.78	40.38	60.30	<i>Bacillus</i> sp. GC74	59.07	55.85	61.22
<i>Bacillus</i> sp. GC35	67.18	68.27	79.40	<i>Bacillus</i> sp. GC75	69.82	69.72	75.47
<i>Bacillus</i> sp. GC36	65.87	70.56	70.04	<i>Bacillus</i> sp. GC76	62.18	58.16	66.38
<i>Bacillus</i> sp. GC37	59.52	54.89	68.72	<i>Bacillus</i> sp. GC77	58.67	57.68	59.43
<i>Bacillus</i> sp. GC38	49.58	63.83	67.40	<i>Bacillus</i> sp. GC78	63.82	62.63	62.09
<i>Achromobacter</i> sp. GC39	43.03	61.71	76.22	<i>Bacillus</i> sp. GC79	55.52	54.19	64.89
<i>Pantoea</i> sp. GC40	71.73	73.18	83.61	<i>Bacillus</i> sp. GC80	61.32	61.54	68.79
<i>Bacillus</i> sp. GC41	62.49	65.38	69.78	<i>Pantoea</i> sp. GC82	53.02	45.82	67.61
<i>Bacillus</i> sp. GC43	65.79	63.88	62.44	<i>Bacillus</i> sp. GC83	56.01	60.16	67.85

分子鉴定。臧睿以分离苹果腐烂病出现频率较高的菌为对照, 以此检验所设计苹果腐烂病种属专化引物的特异性^[22], 而本实验的鉴定结果表明该苹果腐烂病种属专化引物在实际应用中还是会受到 *Alternaria* 和其他菌属的干扰。虽

然本实验采用的种属专化引物并未完全达到对苹果腐烂病的专一特异性, 但该方法在一定程度上降低了鉴定的成本, 同时保证了数据的准确性, 在快速筛选鉴定苹果腐烂病上具有一定的参考价值。

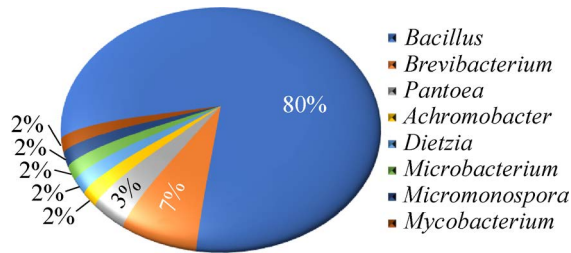


图2 抗Vm、Vmc1和Vmc2甘草内生细菌属水平分布

Figure 2 Distribution of endophytic bacteria resistant to Vm, Vmc1, and Vmc2 in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch at the genus level.

3.2 三种药用植物内生细菌抗菌活性结果讨论

本研究采用平板对峙法从176株药用植物内生细菌中筛选出92株具有抑菌效果的菌株，其中63株对3株苹果腐烂病均有抑制作用，而这些菌株大多数为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)。植物内生芽孢杆菌在植物中广泛存在，具有能促进宿主植物生长、抗病虫害和抗逆等作用，在生物防治、环境修复、医药等方面也具有应用潜力^[25]。除芽孢杆菌外，菌株 *Brevibacterium* sp. GC50、GC55、GC56和 *Pantoea* sp. GC40均具有较高的抑菌活性，而这些菌属在番茄枯萎病的防治上同样发挥着作用^[26-27]。因此，本实验筛选出的拮抗菌株不仅在新疆野果林苹果腐烂病的生物防治上有很大的应用前景，同时也丰富了生物防治的菌种资源，为药用植物内生细菌的开发利用奠定了基础。另外，我们实验室已从百里香、藜、牛至等药用植物中筛选出对苹果腐烂病原菌具有较好抑菌效果的内生细菌。百里香内生细菌 *Streptomyces polyantibioticus* T4SB028对 *Valsa malicola* 和 *Valsa mali* 的抑菌率分别为64.20%和70.55%^[28]，藜内生细菌 *Bacillus siamensis* S1-20对 *Valsa mali* 的抑菌率为73.33%^[29]。从牛至中分离的 *Streptomyces* sp. EGI 125对 *Valsa mali* 的抑菌率最高达81.90%，

但在牛至中具有抑菌功能的内生细菌仅分布在 *Bacillus* 和 *Streptomyces* 这2个属中^[19]。本实验从甘草中筛选出对腐烂病病原菌有抑制作用的菌株分布在 *Bacillus*、*Brevibacterium*、*Pantoea*、*Achromobacter*、*Dietzia*、*Microbacterium*、*Micromonospora*、*Mycobacterium* 这8个属中，其中 *Brevibacterium* sp. GC56对 *Valsa mali* 和 *Valsa malicola* 的相对抑菌率分别为77.96%和85.27%，因此，经比较以上研究报道及本文3种植物，甘草内生细菌对苹果腐烂病病原菌的总体抑菌效果更好。研究表明，从甘草植物中检测出的化学成分多达400余种，黄酮类和三萜类化合物为其主要成分^[30]，而药用植物内生菌能够合成和宿主植物相同或相似的化合物^[31]，因此推测甘草内生细菌具有较好的抑菌效果，可能与甘草中某种化学成分有关，本实验筛选出的有抑菌效果的药用植物内生细菌的具体抑菌机制还需要进一步探究。

REFERENCES

- [1] 陈灵芝. 中国的生物多样性: 现状及其保护对策[M]. 北京: 科学出版社, 1993.
CHEN LZ. Biodiversity in China[M]. Beijing: Science Press, 1993 (in Chinese).
- [2] 成克武, 周晓芳, 臧润国, 张炜银. 新疆野苹果资源保护对策探讨[J]. 干旱区研究, 2008, 25(6): 760-765.
CHENG KW, ZHOU XF, ZANG RG, ZHANG WY. Study on the measures of conserving *Malus sieversii* resources in Xinjiang, China[J]. Arid Zone Research, 2008, 25(6): 760-765 (in Chinese).
- [3] DUAN NB, BAI Y, SUN HH, WANG N, MA YM, LI MJ, WANG X, JIAO C, LEGALL N, MAO LY, WAN SB, WANG K, HE TM, FENG SQ, ZHANG ZY, MAO ZQ, SHEN X, CHEN XL, JIANG YM, WU SJ, et al. Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement[J]. Nature Communications, 2017, 8: 249.
- [4] 孙逸翔, 张静, 周晓兵, 陶冶, 张元明. 伊犁河谷退化野果林中新疆野苹果茎的水力结构[J]. 应用生态学报, 2020, 31(10): 3340-3348.
SUN YX, ZHANG J, ZHOU XB, TAO Y, ZHANG YM.

- Stem hydraulic architecture of *Malus sieversii* in degraded wild fruit forest in Ili valley, China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2020, 31(10): 3340-3348 (in Chinese).
- [5] 阎国荣. 新疆野苹果[M]. 北京: 中国林业出版社, 2020.
- YAN GR. Xinjiang Wild Apple[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2020 (in Chinese).
- [6] 刘爱华, 张新平, 温俊宝, 岳朝阳, 阿里木, 焦淑萍, 张静文, 克热曼. 天山野苹果林苹果小吉丁与苹果腐烂病复合危害研究[J]. 新疆农业科学, 2014, 51(12): 2240-2244.
- LIU AH, ZHANG XP, WEN JB, YUE CY, ALIMU, JIAO SP, ZHANG JW, KEREMAN. Preliminary research on the composite damage of *Agrilus Mali Matsumura* and *Valsa Mali Miyabe et Yamada* in wild apple trees in Tianshan mountain[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2014, 51(12): 2240-2244 (in Chinese).
- [7] 周童, 李小双, 刘晓洁, 丁雨, 文雪静, 张道远. 新疆野苹果 NAC 基因分析及抗腐烂病基因筛选[J]. 果树学报, 2020, 37(8): 1111-1121.
- ZHOU T, LI XS, LIU XJ, DING Y, WEN XJ, ZHANG DY. Identification, classification and expression analysis of NAC transcriptional factor genes in *Malus sieversii* during canker disease response[J]. Journal of Fruit Science, 2020, 37(8): 1111-1121 (in Chinese).
- [8] 靳纪洋, 刁雨菲, 于成明, 熊雄, 赵涛, 何邦令, 刘会香. 苹果黑腐皮壳菌感染苹果枝干过程的转录组分析[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2021, 52(2): 187-193.
- JIN JY, DIAO YF, YU CM, XIONG X, ZHAO T, HE BL, LIU HX. Transcriptome analysis during apple stem infected by *Valsa Mali*[J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition), 2021, 52(2): 187-193 (in Chinese).
- [9] 薛应钰, 李兴昱, 李发康, 苟攀宁, 李龙, 徐秉良. 苹果树腐烂病生防真菌 Z-12A 的鉴定及其生防效果[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 57-69.
- XUE YY, LI XY, LI FK, GOU PN, LI L, XU BL. Identification of Z-12A fungus for biocontrol of apple tree canker[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 57-69 (in Chinese).
- [10] 李江舟, 王耀, 李元秀, 卓馨怡, 王子烜, 赵雪丽, 王美超, 侯义龙, 李晓艳. 苹果树腐烂病研究进展与展望[J]. 分子植物育种, 2019, 17(21): 7222-7227.
- LI JZ, WANG Y, LI YX, ZHUO XY, WANG ZX, ZHAO XL, WANG MC, HOU YL, LI XY. Research progress and prospect on *Valsa Mali miyabe* & *Yamada*[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(21): 7222-7227 (in Chinese).
- [11] 陈燕君. 新疆新源县野苹果林资源保护与恢复[J]. 北京农业, 2015(27): 98-99.
- CHEN YJ. Protection and restoration of wild apple forest resources in Xinyuan County[J]. Beijing Agriculture, 2015(27): 98-99 (in Chinese).
- [12] 吕前前, 赵兴刚, 王东东, 冒霞, 左存武, 杨江山. 解淀粉芽孢杆菌 BaA-007 鉴定及其对苹果腐烂病的抑制作用[J]. 园艺学报, 2020, 47(10): 1895-1904.
- LÜ QQ, ZHAO XG, WANG DD, MAO X, ZUO CW, YANG JS. Identification of *Bacillus amyloliquefaciens* BaA-007 and its inhibitory effect on apple canker[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(10): 1895-1904 (in Chinese).
- [13] 翟世玉, 殷辉, 周建波, 吕红, 常芳娟, 韩巨才, 赵晓军. 枯草芽孢杆菌发酵液对苹果树腐烂病的防治效果[J]. 植物保护, 2019, 45(5): 226-231, 274.
- ZHAI SY, YIN H, ZHOU JB, LÜ H, CHANG FJ, HAN JC, ZHAO XJ. Control efficacy of *Bacillus subtilis* fermentation broth against apple *Valsa* canker[J]. Plant Protection, 2019, 45(5): 226-231, 274 (in Chinese).
- [14] ABDELSHAFY MOHAMAD OA, MA JB, LIU YH, ZHANG DY, HUA S, BHUTE S, HEDLUND BP, LI WJ, LI L. Beneficial endophytic bacterial populations associated with medicinal plant *Thymus vulgaris* alleviate salt stress and confer resistance to *Fusarium oxysporum*[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 47.
- [15] LI L, MOHAMAD OAA, MA JB, FRIEL AD, SU YG, WANG Y, MUSA Z, LIU YH, HEDLUND BP, LI WJ. Synergistic plant-microbe interactions between endophytic bacterial communities and the medicinal plant *Glycyrrhiza uralensis* F[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2018, 111(10): 1735-1748.
- [16] 张永华, 刘岩, 赵兴民, 王道亮. 植物内生菌对苹果树腐烂病防治的研究进展[J]. 农业与技术, 2021, 41(16): 69-72.
- ZHANG YH, LIU Y, ZHAO XM, WANG DL. Research progress of endophytes in controlling apple tree rot[J]. Agriculture and Technology, 2021, 41(16): 69-72 (in Chinese).
- [17] 邓雪萍, 杨博. 药用植物内生菌及其产生的活性成分研究现状[J]. 安徽农学通报: 上半月刊, 2010, 16(1): 72-74.
- DENG XP, YANG B. Study on endophytes in pharmaceutical plants and the related active substances[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2010, 16(1): 72-74 (in Chinese).
- [18] 郭薇, 殷辉, 周建波, 吕红, 张志斌, 赵晓军, 刘慧平, 韩巨才. 几种药用植物内生细菌对苹果腐烂病菌 (*Valsa Mali*) 抑菌效果研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2017, 37(6): 402-407.
- GUO W, YIN H, ZHOU JB, LV H, ZHANG ZB, ZHAO

- XJ, LIU HP, HAN JC. Study on the bacteriostatic effect of endophytic bacteria in several medicinal plants to *Valsa Mali*[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2017, 37(6): 402-407 (in Chinese).
- [19] 高磊, 刘永红, 马金彪, Osama Abdalla Abdelshafy Mohamad, 李文均, 李丽. 新疆药用植物牛至内生细菌多样性与抗菌活性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(4): 1140-1150.
- GAO L, LIU YH, MA JB, MOHAMAD O, LI WJ, LI L. Diversity and antagonistic effect of endophytic bacteria isolated from *Origanum vulgare* L. in Xinjiang[J]. Microbiology China, 2021, 48(4): 1140-1150 (in Chinese).
- [20] 张淑颖, 曲田丽, 孙阳, 董向丽, 王彩霞, 李保华, 肖春. 剑麻内生细菌 JM-3 对苹果腐烂病抑制作用的研究[J]. 华北农学报, 2013, 28(4): 208-213.
- ZHANG SY, QU TL, SUN Y, DONG XL, WANG CX, LI BH, XIAO C. Inhibiting effects of endophytic bacterial strain JM-3 from agavesisalana perrine against *Valsa ceratosperma*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2013, 28(4): 208-213 (in Chinese).
- [21] 起登凤, 邹良平, 周登博, 冯仁军, 高祝芬, 张锡炎. GA1-2 菌株的分离鉴定及其对香蕉尖孢镰刀菌的抑菌效果[J]. 植物保护学报, 2017, 44(5): 809-816.
- QI DF, ZOU LP, ZHOU DB, FENG RJ, GAO ZF, ZHANG XY. Isolation, identification of strain GA1-2 and its antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f.sp.cubense[J]. Journal of Plant Protection, 2017, 44(5): 809-816 (in Chinese).
- [22] 臧睿. 中国苹果树腐烂病菌的种群组成、分子检测及其 ISSR 遗传分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2012.
- ZANG R. The phylogentic relationship, molecular detection of apple tree *Valsa* canker causal agents in China, and population structure analysis using issr markers[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2012 (in Chinese).
- [23] SEIFOLLAHI E, FOTOUHIFAR KB, JAVAN- NIKKHAH M. Mycelial compatibility in *Valsa malicola*, the causal agent of canker disease in Iran[J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2017, 50(5/6): 239-253.
- [24] 孙祥瑞, 朱杰华, 刘蕊, 杨志辉, 曹克强. 几种树皮腐烂病菌的分子鉴定[J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(6): 36-42.
- SUN XR, ZHU JH, LIU R, YANG ZH, CAO KQ. Molecular identification of pathogens of several trees canker[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2010, 33(6): 36-42 (in Chinese).
- [25] 龚国利, 王亮, 王旭阳, 张帝, 吴咪, 田露. 植物内生芽孢杆菌的研究进展[J]. 生物学杂志, 2020, 37(3): 91-95.
- GONG GL, WANG L, WANG XY, ZHANG D, WU M, TIAN L. Research advances in plant endophytes Bacillaceae[J]. Journal of Biology, 2020, 37(3): 91-95 (in Chinese).
- [26] ABO-ELYOUSR KAM, HASSAN SA. Biological control of *Ralstonia solanacearum* (Smith), the causal pathogen of bacterial wilt disease by using *Pantoea* spp[J]. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2021, 31(1): 1-8.
- [27] CHACÓN-LÓPEZ A, GUARDADO-VALDIVIA L, BAÑUELOS-GONZÁLEZ M, LÓPEZ-GARCÍA U, MONTALVO-GONZÁLEZ E, ARVIZU-GÓMEZ J, STOLL A, AGUILERA S. Effect of metabolites produced by *Bacillus atrophaeus* and *Brevibacterium frigoritolerans* strains on postharvest biocontrol of *Alternaria alternata* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)[J]. Biocontrol Science, 2021, 26(2): 67-74.
- [28] MUSA Z, MA JB, EGAMBERDIEVA D, ABDELSHAFY MOHAMAD OA, ABAYDULLA G, LIU YH, LI WJ, LI L. Diversity and antimicrobial potential of cultivable endophytic Actinobacteria associated with the medicinal plant *Thymus roseus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 191.
- [29] GAO L, MA JB, LIU YH, HUANG Y, MOHAMAD OAA, JIANG HC, EGAMBERDIEVA D, LI WJ, LI L. Diversity and biocontrol potential of cultivable endophytic bacteria associated with halophytes from the west Aral Sea basin[J]. Microorganisms, 2021, 9(7): 1448.
- [30] 李葆林, 麻景梅, 田宇柔, 张铁军, 牛丽颖. 甘草中新发现化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(8): 2438-2448.
- LI BL, MA JM, TIAN YR, ZHANG TJ, NIU LY. Research progress on newly discovered chemical constituents and pharmacological effects of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(8): 2438-2448 (in Chinese).
- [31] 张国荣, 翟丽霞, 王燕萍, 周燕. 药用植物内生菌次级代谢产物药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2021, 32(7): 880-884.
- ZHANG GR, ZHAI LX, WANG YP, ZHOU Y. Research progress on pharmacological action of secondary metabolites of medicinal endophytes[J]. China Pharmacy, 2021, 32(7): 880-884 (in Chinese).