

## 研究报告



## 梨火疫病拮抗菌筛选及温室防效测定

鲁晏宏<sup>1</sup> 郝金辉<sup>1</sup> 罗明<sup>2</sup> 黄伟<sup>3</sup> 盛强<sup>3</sup> 王宁<sup>1</sup> 詹发强<sup>1</sup> 龙宣杞<sup>1</sup> 包慧芳<sup>\*1</sup>

1 新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆特殊环境微生物重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830091

2 新疆农业大学农学院 新疆 乌鲁木齐 830052

3 新疆巴音郭楞蒙古自治州农业科学研究院 新疆 库尔勒 841000

**摘要:**【背景】梨火疫病是由梨火疫病菌(*Erwinia amylovora*)引起的细菌性病害,对苹果、梨、山楂等40余属220多种植物危害极大。近年来,与中国毗邻的中亚多国相继暴发梨火疫病。梨火疫病菌成为国内特别是对新疆地区的特高风险有害生物,梨火疫病已被中国农业农村部列入《一类农作物病虫害名录》。【目的】从新疆本土材料以及实验室现有菌株中进行梨火疫病菌拮抗菌株的筛选,为梨火疫病的防控奠定基础。【方法】采用平板对峙法从新疆香梨种植区土壤及实验室现有菌株中分离、筛选具有显著拮抗效果的菌株,通过生理生化特性分析和16S rRNA基因测序等方法对菌株进行初步鉴定,并采用牛津杯扩散法对抑菌效果进行复筛。利用两年生盆栽杜梨苗对拮抗菌进行温室内保护型和治疗型防效测定。【结果】筛选获得11株具有显著拮抗作用的菌株,均为革兰氏阳性菌。其中9株为芽胞杆菌属(*Bacillus*)、2株为乳杆菌属(*Lactobacillus*)。平板对峙实验结果表明贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*) JE7、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) LP1和植物乳杆菌 LP2拮抗作用较强,其次为贝莱斯芽胞杆菌 JE4。生理特性实验结果表明:JE4、JE7可在NaCl浓度为1%–7%时生长,JE4、JE7在pH 4.0–9.0时生长,LP1可在NaCl浓度为1%–9%时生长,在pH 5.0–9.0时生长良好。温室防效测定结果显示,贝莱斯芽胞杆菌 JE4防效最佳,可达到73%以上。【结论】筛选获得一批梨火疫病拮抗菌,其中部分菌株在温室内防效显著并具有较强的盐碱耐受能力。

关键词: 梨火疫病, 拮抗菌, 筛选, 防效测定

**Foundation items:** Major Scientific and Technological Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region of China (2019A01001-2); Key Cultivation Project of Xinjiang Academy of Agricultural Sciences (xjkcpy-2020006)

\*Corresponding author: E-mail: bbhf777@xaas.ac.cn

Received: 01-12-2020; Accepted: 08-07-2021; Published online: 08-09-2021

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技计划重大专项(2019A01001-2); 新疆农业科学院科技创新重点培育专项(xjkcpy-2020006)

\*通信作者: E-mail: bbhf777@xaas.ac.cn

收稿日期: 2020-12-01; 接受日期: 2021-07-08; 网络首发日期: 2021-09-08

## Screening of antagonistic bacteria against *Erwinia amylovora* and its control effect in greenhouse

LU Yanhong<sup>1</sup> HAO Jinhui<sup>1</sup> LUO Ming<sup>2</sup> HUANG Wei<sup>3</sup> SHENG Qiang<sup>3</sup>  
WANG Ning<sup>1</sup> ZHAN Faqiang<sup>1</sup> LONG Xuanqi<sup>1</sup> BAO Huifang<sup>\*1</sup>

1 Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Xinjiang Key Laboratory of Special Environmental Microbiology, Urumqi, Xinjiang 830091, China

2 College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China

3 Institute of Agricultural Sciences of Bayinguoleng Mongolian Autonomous Prefecture, Korla, Xinjiang 841000, China

**Abstract:** [Background] Fire blight is a bacterial disease caused by *Erwinia amylovora*, which is harmful to more than 220 plants belonging to more than 40 genera, such as apple, pear, hawthorn and so on. In recent years, fire blight has occurred in many countries, including central Asian countries. *E. amylovora* has become an extremely high risk microorganism for China, especially for Xinjiang. Fire blight has been listed in the list of first class crop diseases and pests by the Ministry of Agriculture and Rural Areas of China. [Objective] To screen the antagonistic strains of *Erwinia amylovora* from Xinjiang and improve the ability of Korla fragrant pear to resist the risk of fire blight. [Methods] The antagonistic strains were isolated from the soil of pear orchard and the bacteria stored in laboratory by confrontation plate method. The strains were preliminarily identified by physiological characteristics analysis as well as 16S rRNA gene sequencing, and the antibacterial effect was rescreened by Oxford cup diffusion method. The control effects were tested on two-year-old potted *Pyrus betulaefolia* seedlings in greenhouse. [Results] Eleven antagonistic strains were obtained, all of which were Gram positive. Nine of them were *Bacillus* and two were *Lactobacillus*. The results of confrontation plate experiment showed that *Bacillus velezensis* JE7, *Lactobacillus plantarum* LP1 and *Lactobacillus plantarum* LP2 had strong antagonistic effect, followed by *Bacillus velezensis* JE4. The control effects showed that *Bacillus velezensis* JE4 had the best prevention effect in greenhouse, which reached 73%. The physiological characteristics was showed that JE4 and JE7 could tolerate 1%–7% NaCl and could grow at pH 4.0–9.0; LP1 could tolerate 1%–9% NaCl and could grow better at pH 5.0–9.0. [Conclusion] A batch of bacteria against *Erwinia amylovora* were screened and obtained. Some of the antagonistic strains had significant control effect in greenhouse and strong saline-alkali tolerance.

**Keywords:** fire blight, antagonistic bacteria, screening, control effect

梨火疫病是由梨火疫病菌(*Erwinia amylovora*)引起的困扰多国农业的一种细菌性病害<sup>[1]</sup>。梨火疫病菌生长温度广泛,可在动植物体内越冬,难以杀灭,极易侵染蔷薇科植物且传播迅速<sup>[2-3]</sup>。植株感染梨火疫病菌后可出现花腐、果腐、枝条枯萎和菌脓等症状。目前,梨火疫病已对美国、加拿大和新西兰等多国的梨、苹果等造成了毁灭性的打击,对林果产业产生了严重影响<sup>[4]</sup>。相关文献显示,与我国新疆毗邻的吉尔吉斯斯坦和哈萨克斯坦等国已有梨火疫病害发生,其中最近的发病果园离我国边境不到 200 km<sup>[5-8]</sup>,特别是对我国新疆地区香梨和苹果产业带来巨大风险,梨火疫病于 2020 年被中

国农业农村部列入《一类农作物病虫害名录》<sup>[9]</sup>。目前,对梨火疫病的防治以化学农药为主,虽然有一定防效,但易造成农药残留,危害人体健康,造成环境污染。另外,长期使用化学农药防治梨火疫病极易使病原菌产生耐药性<sup>[10]</sup>,如美国使用链霉素防治梨火疫病 50 年后出现了抗链霉素的梨火疫病菌株<sup>[7-8]</sup>,使梨火疫病更难防治。生物防治可有效解决农药残留问题,利用微生物防治病害不易使病原菌产生耐药性且对人体无害,不会造成环境污染<sup>[11-12]</sup>。国外诸多学者对梨火疫病生物防治进行了大量研究,并获得了一些生防菌株。如 Mohamad 等从未感染梨火疫病的梨树不同部位分

离获得了一批代表菌,其中4株菌接种于未成熟果实、花和叶子后对*E. amylovora*具有拮抗作用<sup>[13]</sup>。Mikiciński等从苹果叶际分离出对梨火疫病菌有抗性的*Pseudomonas graminis* 49M,其抑菌效果在实验室和温室实验中优于商业生防菌荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) A506,可达到与链霉素等等的抑菌效果<sup>[14]</sup>。目前大部分研究均是生防菌用于果树地上部分进行梨火疫病的防控。Santander等研究表明,梨火疫病菌可以从果树根系向上传播<sup>[15]</sup>,因此,土壤防控也是预防梨火疫病传播的重要途径。

本研究通过从新疆库尔勒、轮台、库车、阿克苏等香梨种植区采集土壤样品,进行梨火疫病菌拮抗菌的筛选及温室内防效测定,为梨火疫病生防菌的开发与利用提供资源,以应对梨火疫病暴发风险,以期为新疆香梨和苹果产业的可持续发展奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

病原菌:梨火疫病菌Ea 0017由新疆出入境检验检疫局技术中心提供<sup>[16]</sup>。

供试土壤样品:采用随机取样法<sup>[17]</sup>,从新疆库尔勒、轮台、库车、阿克苏等地区梨园土壤(土壤层5–20 cm)采样,获得土壤样品100余份。

供试菌株:*Lactobacillus plantarum* LP1 (MW082825)、*Lactobacillus plantarum* LP2 (MW082826)、*Lactobacillus plantarum* R1 (MH094118)、*Lactobacillus plantarum* R7 (MH094119)、*Bacillus subtilis* BS-2 (MH094129)、*Bacillus licheniformis* WS-6 (MH094127)为实验室已有菌株,由本项目组前期工作中筛选获得并保存。

测定菌株解磷解钾特征:蒙金娜无机磷细菌培养基和硝酸盐细菌培养基<sup>[18]</sup>。

营养琼脂(Nutrient Agar, NA)培养基、营养肉汤(Nutrient Broth, NB)培养基、MRS肉汤培养基、MRS琼脂培养基、琼脂粉等,北京奥博星生物技术有限责任公司;引物、dNTPs、*Taq*酶等试剂,生工生物工程(上海)股份有限公司;DNA基因提取

盒(Fungal/Bacterial DNA Miniprep<sup>TM</sup> D6005), Zymo Research公司。

全自动凝胶成像系统、电泳仪,北京市六一生物科技有限公司;PCR仪,杭州博日科技股份有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 拮抗菌的初筛

病原菌的活化:将病原菌划线接种于NA平板,28 °C条件下培养12 h,挑取单菌落接种于30 mL无菌NB液体培养基中,28 °C、160 r/min恒温摇床中培养12 h<sup>[19]</sup>,梯度稀释至 $10^{-4}$ ,取100 μL涂布NA平板。

实验室菌株复壮:从甘油管中取100 μL乳酸菌菌液涂布MRS平板,置于30 °C培养箱培养24 h,挑取单菌落划线于MRS平板,置于30 °C培养箱培养24 h后备用。

土壤微生物的分离:称取5 g土壤样品置于装有50 mL无菌水的三角瓶中,30 °C、160 r/min恒温振荡培养30 min,梯度稀释至 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ <sup>[20]</sup>,取100 μL涂布含有病原菌的NA平板,30 °C条件下培养24 h,对产生抑菌圈的菌株采用三线划板法进行纯化与保藏。

#### 1.2.2 拮抗菌复筛

利用平板对峙法<sup>[21]</sup>对初筛获得的拮抗菌进行抑菌稳定性检测,具体操作如下:挑取拮抗菌单菌落点接于涂布了100 μL病原菌( $10^2$  CFU/μL)的NA平板(乳酸菌筛选培养基为1/2 NA+1/2 MRS),每板点接4株拮抗菌,每个拮抗菌重复接种3块平板,28 °C培养培养48–72 h,测量抑菌圈直径和菌落直径,以抑菌圈直径与菌落直径的比值代表抑菌能力。

采用牛津杯扩散法<sup>[22]</sup>对初筛获得的拮抗菌进行复筛,测试发酵上清液的抑菌效果,具体操作如下:在涂布100 μL病原菌( $10^2$  CFU/μL)的NA平板上放置2个无菌牛津杯备用。将初筛获得的拮抗菌接种于NB液体培养基中,实验室已有的植物乳杆菌活化后接种于MRS液体培养基中,30 °C、160 r/min恒温培养12 h,取1 mL发酵液于12 000 r/min

离心 25 min。取上清液 200  $\mu\text{L}$  加入牛津杯, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 48–72 h, 测量抑菌圈直径, 以抑菌圈直径代表抑菌能力。

### 1.2.3 拮抗菌的分类鉴定

采用三线划板法将拮抗菌接种于相应培养基平板上, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 12–24 h。挑取单菌落接种至相应的液体培养基, 培养 12–24 h, 采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA。以基因组DNA为模板, 用细菌 16S rRNA基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-CGGTTACCTTGTACGACTTC-3')进行PCR扩增。PCR反应体系(50  $\mu\text{L}$ )<sup>[20]</sup>: 模板DNA 2  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ Buffer (含 2.5 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ ) 25  $\mu\text{L}$ , *Taq*聚合酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , dNTPs (10 mmol/L) 4  $\mu\text{L}$ , 27F和 1492R (10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O补足 50  $\mu\text{L}$ 。PCR反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 57  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。PCR扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检验后, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。所得序列提交至 NCBI数据库进行BLAST比对, 并申请基因登录号, 采用MEGA 7.0 软件进行系统发育分析<sup>[23]</sup>。

### 1.2.4 拮抗菌的生长特性测定

以麦氏比浊法为参照制备 0.5 麦氏比浊的菌悬液, 以细菌微量检定管生理生化指标测定。参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[24]</sup>及《伯杰氏细菌鉴定手册》进行测定<sup>[25]</sup>。

挑取单菌落接种于无菌蒙金娜无机磷细菌培养基(硅酸盐细菌培养基)中, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 7 d后观察有无溶磷圈(油滴状菌落)出现<sup>[18]</sup>。

选取抑菌效果较佳的拮抗菌测定其生长特性, 具体方法如下: 挑取单菌落接种至 30 mL相应液体培养基中, 32  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min培养 12 h作为种子液。乳酸菌采用MRS培养基作为基础培养基, 其他拮抗菌采用NB培养基为基础培养基, 分别设置不同梯度 pH值(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)、不同NaCl浓度(1%、3%、5%、7%、9%)的液体培养基 50 mL/瓶, 取 1 mL种子液接入 50 mL对应液体培养基中, 32  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min培养 14 h后测定  $OD_{600}$ 。

### 1.2.5 拮抗菌生长曲线测定

挑取各菌株单菌落接种至 30 mL NB液体培养基中(乳酸菌接种至 30 mL MRS液体培养基中), 32  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min培养 12 h作为种子液, 取 1 mL种子液接种至 100 mL相应液体培养基中, 32  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min培养, 每个菌种重复接种 3 瓶, 每隔 2 h 取 4 mL菌液测定其  $OD_{600}$  值<sup>[26]</sup>, 调整  $OD_{600}$  值在 0.1–0.8 之间, 测定数值乘以稀释倍数为最终结果。

### 1.2.6 室内防效测定

盆栽苗预处理: 对 2 年生盆栽杜梨苗松土并同时同时进行伤根处理。

选取抑菌效果较好的菌株, 选用 2 年生盆栽杜梨苗于温室内, 采用土壤接种法进行防效测定。将病原菌、拮抗菌分别挑取菌株单菌落接种于 30 mL NB液体培养基, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min振荡培养 12 h作为种子液, 取 1 mL种子液接种于 300 mL NB液体培养基, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min振荡培养 12 h后进行治疗型和保护型实验, 并设置CK。

治疗型: 每盆苗接种病原菌发酵液 ( $2 \times 10^8$  CFU/mL) 300 mL, 3 d后接种拮抗菌发酵液 300 mL ( $2 \times 10^8$  CFU/mL)。

保护型: 每盆苗接种拮抗菌发酵液 ( $2 \times 10^8$  CFU/mL) 300 mL, 3 d后接种病原菌液 300 mL ( $2 \times 10^8$  CFU/mL)。

CK: 每盆苗接种病原菌发酵液 ( $2 \times 10^8$  CFU/mL) 300 mL, 3 d后浇水 300 mL。

实验于温室内进行, 每个处理 10 盆。接种病原菌后采用棚布遮盖保湿 3 d。统计每盆杜梨苗枝条数, 待枝条出现发病症状, 逐一进行统计。病斑长度  $\leq 1/3$  枝条长度, 计为 1 级;  $1/3$  枝条长度  $<$  病斑长度  $\leq 2/3$  枝条长度, 计为 3 级; 病斑长度  $> 2/3$  枝条长度, 计为 5 级<sup>[16]</sup>。按如下公式计算病情指数和防效值:

$$\text{病情指数}(\%) = \frac{\sum(\text{每处理各级病枝树} \times \text{该病级树})}{\text{该处理总枝数} \times 5 (\text{最高病级})} \times 100;$$

$$\text{防效}(\%) = \frac{\text{CK病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{CK病情指数}} \times 100.$$

实验完毕,全部实验用品,包括三角瓶、移液器枪头、废弃平皿、培养液、苗木及土壤采用高温灭菌,所用花盆等器具采用消毒液浸泡处理。

### 1.3 数据分析

数据采用SPSS软件进行单因素方差分析中的Duncan法进行显著性分析,Excel 2019 制图,MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌的分离与筛选

土壤微生物分离:采用平板对峙法从新疆香梨种植区土壤样品中初筛共获得 36 株对梨火疫病菌具有拮抗作用的菌株。

采用平板对峙法对上述 36 株拮抗菌抑菌能力进行初筛,以抑菌圈直径( $D$ )与菌落的直径( $d$ )比值( $D/d$ )来表示拮抗菌抑菌能力,结果得到 9 株拮抗效果优良( $D/d > 1.70$ )且稳定的菌株,分别命名为 JE1-JE9。结果如表 1 所示,实验所获得的 9 株代表菌对梨火疫病菌具有明显的抑制作用。其中,JE7 的抑菌作用最强,抑菌直径可达 19 mm,  $D/d$  值为 3.53; 其次为 JE4、JE6 和 JE1,  $D/d$  值分别为 3.33、3.17、3.00; JE2、JE3、JE5、JE8、JE9 的抑菌直径在 13.00-18.50 mm 之间,  $D/d$  值均大于 1.70。乳酸菌平板对峙实验结果表明,乳酸菌在 1/2 NA+1/2 MRS 上不能正常生长,未产生明显拮抗效果,因此后期收集其发酵液采用牛津杯扩散法进行筛选。

选取 JE1-JE9 中抑菌作用较强的拮抗菌 ( $D/d > 2.40$ ) JE1、JE3、JE4、JE6、JE7 及实验室已有的 2 株乳酸菌(分别命名为 LP1 和 LP2),采用牛津杯扩散法对菌株发酵液抑菌效果进行复筛。复筛结果如表 2 所示,以抑菌圈直径判断发酵液的抑菌效果。其中,土壤来源的拮抗菌 JE7 和实验室已有的乳酸菌 LP1、LP2 抑菌效果最强,抑菌圈直径分别为 29.33、27.33、26.33 mm; 其次为 JE4, 抑菌直径为 20.33 mm; 其他代表菌的抑菌能力依次为 JE6 > JE1 > JE3。部分拮抗菌发酵液抑制梨火疫病菌的结果如图 1 所示。

表 1 拮抗梨火疫病菌初筛结果

Table 1 Preliminary screening result of antagonistic *Erwinia amylovora* strains

Strain No.	$D/d$
JE1	3.00±0.25b
JE2	1.83±0.11d
JE3	2.40±0.20c
JE4	3.33±0.38ab
JE5	1.74±0.17d
JE6	3.17±0.38ab
JE7	3.53±0.31a
JE8	1.78±0.11d
JE9	2.14±0.13c

注:  $D$ 表示抑菌圈直径;  $d$ 表示菌落直径;  $D/d$ 值越大表明拮抗作用越强。不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Note:  $D$  is the diameter of inhibition zone;  $d$  is colony diameter; The greater the  $D/d$  value, the stronger the antagonism. Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

表 2 拮抗菌发酵液对梨火疫病菌的抑菌圈直径

Table 2 The diameter of inhibition zone produced by antagonistic fermentation broth against *Erwinia amylovora*

菌株编号	抑菌圈直径
Strain No.	Diameter of inhibition zone (mm)
JE1	15.67±1.53cd
JE3	13.33±2.08d
JE4	20.33±2.52b
JE6	16.67±1.53c
JE7	29.33±0.58a
LP1	27.33±1.15a
LP2	26.33±1.53a

注: 不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Note: The different letter means significant difference ( $P < 0.05$ )

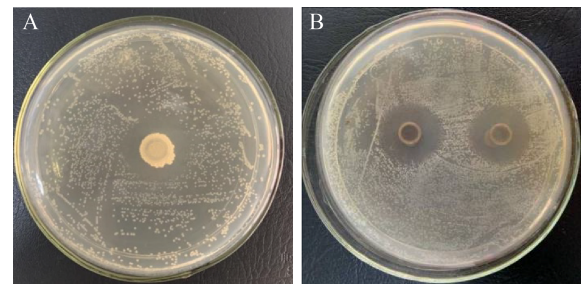


图 1 部分拮抗菌发酵液抑制梨火疫病菌结果

Figure 1 Partial antagonistic fermentation broth against *Erwinia amylovora*

注: A: JE7; B: 左LP1, 右LP2

Note: A: JE7; B: LP1 left, LP2 right

### 2.2 拮抗菌的分类鉴定

对上述拮抗效果较好的 11 株菌分别提取基因组DNA进行 16S rRNA基因扩增并测序。获得的菌株序列提交至NCBI数据库进行比对, 并申请基因登录号, 结合相似度最高的模式菌株序列构建系统发育树。结果表明, 所得的 11 株拮抗菌分别属于细菌域厚壁菌门的 2 个属, 如图 2 所示。其中, 9 株为芽胞杆菌属(*Bacillus*), 分别为贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)、解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)和多粘类芽胞杆菌(*Paenibacillus polymyxa*); 2 株为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

### 2.3 拮抗菌生长特性的测定

对上述 11 株拮抗菌的生理生化特性进行分

析, 结果如表 3 所示, 11 株拮抗菌均为革兰氏阳性菌, 均可利用D-葡萄糖且接触酶呈阳性, 而氧化酶、硫化氢产气、吲哚试验呈阴性, 但对鼠李糖、甲基红、甘露醇的利用存在一定差异。此外, 除LP1 和LP2 外, 9 株芽胞杆菌均可利用L-阿拉伯糖, 而且明胶液化、水解淀粉、硝酸盐还原试验、VP试验等实验结果均呈阳性。上述 11 株拮抗菌均无溶磷、解钾特性。

对复筛拮抗效果较强的JE4、JE7及LP1生长特性进行分析, 结果如图 3 所示。NaCl浓度和pH耐受实验结果表明, JE4 在NaCl浓度为 1%–7%、pH值为 5.0–8.0 时生长良好; JE7 在NaCl浓度为 1%–5%、pH值为 4.0–8.0 时生长良好; LP1 在NaCl浓度为 1%–5%、pH值为 5.0–9.0 时生长良好。

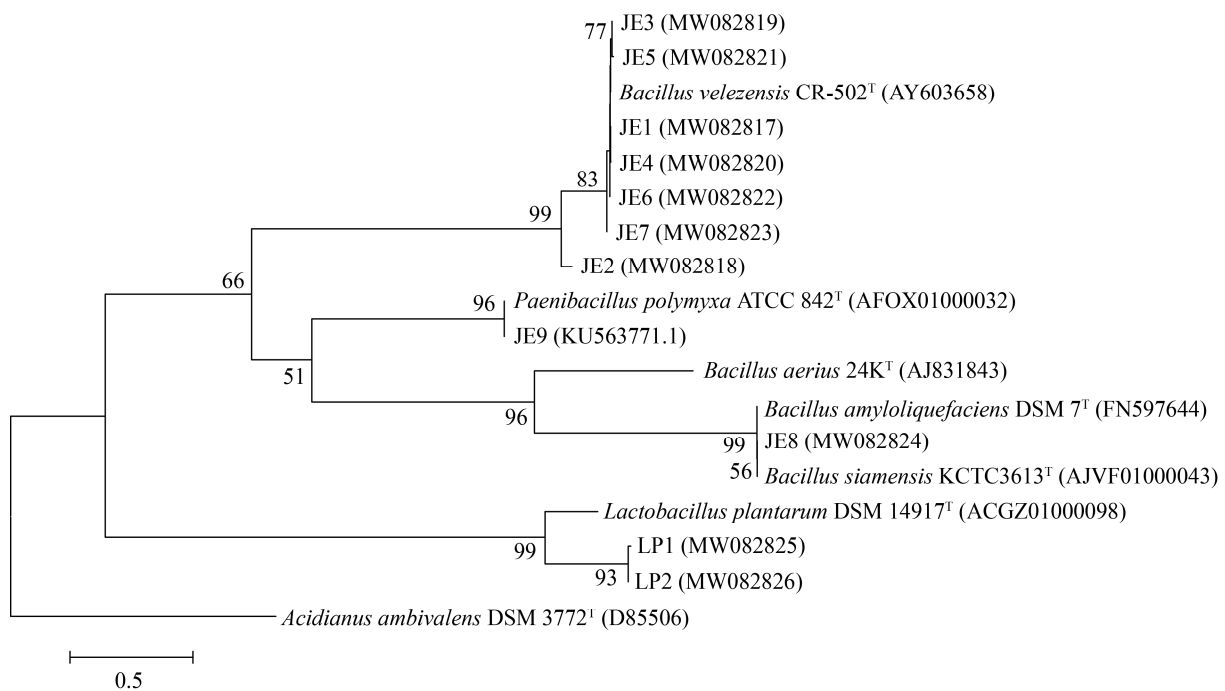


图 2 基于 16S rRNA基因序列构建的拮抗菌系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of antagonist bacteria based on 16S rRNA gene sequences

注: <sup>T</sup>为模式菌株; 分支上的数字为Bootstrap值, 表示构建系统进化树时计算 1 000 次时形成该节点的百分比, 只显示大于 50% 的值; 括号内数值为GenBank登录号; 标尺 0.5 代表 50% 的 16S rRNA基因序列的进化差异

Note: <sup>T</sup> is the model strain; The bootstrap values (%) presented at the branches were calculated from 1 000 replications, only showing bootstrap values higher than 50%. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The scale bar 0.5 represents 50% evolutionary variation in the 16S rRNA gene sequence



表 3 拮抗菌的生理生化特性

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of antagonistic bacteria

测定指标 Identification index	JE1	JE2	JE3	JE4	JE5	JE6	JE7	JE8	JE9	LP1	LP2
D-葡萄糖D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-阿拉伯糖L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
明胶液化反应Liquefy glutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
硝酸盐还原Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
革兰氏染色Gram stain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
接触酶反应Contact enzyme test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
淀粉水解Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
氧化酶Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
硫化氢产气H <sub>2</sub> S production test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
吲哚试验Indole test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
鼠李糖Rhamnose	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
甲基红Methyl red	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
甘露醇Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
解钾Dissolving potassium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
溶磷Dissolving phosphate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：+：阳性；-：阴性

Note: +: Positive; -: Negative

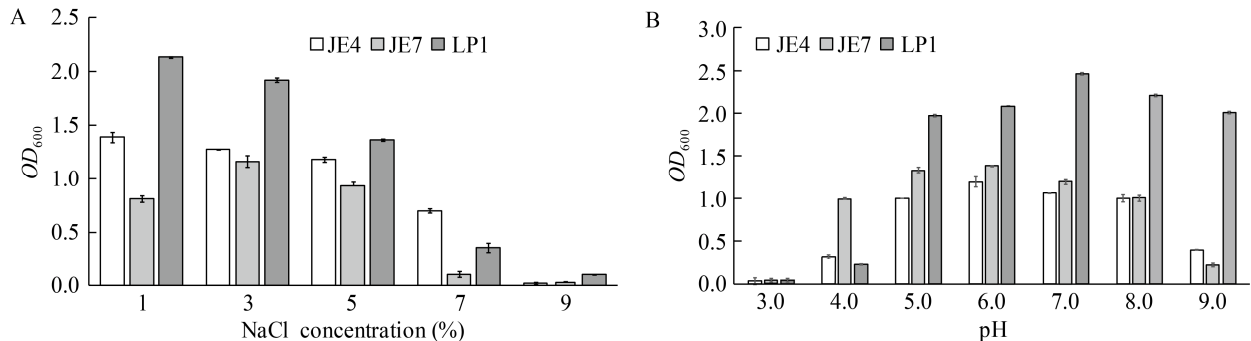


图 3 NaCl浓度和pH值对菌株生长的影响

Figure 3 The effect of NaCl concentration and pH on the growth of strains

## 2.4 拮抗菌的生长曲线

对复筛拮抗效果较强的JE4、JE7、LP1 进行生长曲线测定，结果如图 4 所示。实验结果表明，3 株拮抗菌生长曲线的变化趋势和进入延迟生长期、对数增长期、稳定期和衰退期的时间存在区别。LP1 在 2–10 h 为延迟生长期，10–12 h 为对数增长期，12–18 h 为生长稳定期，18–22 h 为衰退期。JE4 和JE7 生长曲线的变化趋势较为接

近，但JE4 在 2–4 h 为延迟生长期，4–10 h 为对数增长期，10–16 h 为稳定期，16–22 h 为衰退期；JE7 在 0–6 h 为延迟生长期，6–16 h 为对数生长期，18–20 h 为稳定期，20–22 h 为衰退期。

## 2.5 拮抗菌的室内防效测定

对复筛拮抗效果较强的JE4、JE7 及LP1 于室内进行防效实验，结果如表 4 所示。结果表明，贝莱斯芽胞杆菌JE4 防效最佳，保护型防效可达

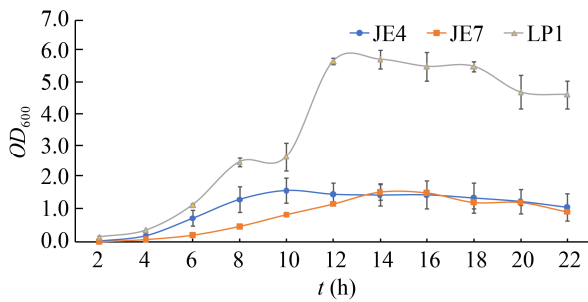


图 4 拮抗菌的生长曲线  
Figure 4 The growth curve of antagonistic bacteria

表 4 温室防效测定结果

Table 4 The results of control effect in greenhouse

处理 Treatment	病情指数 Disease index (%)	防效 Efficacy (%)
CK (The total number of branches 68)	88.66±3.5a	
JE4 protected (The total number of branches 48)	22.9±1.0e	74.17±4.5a
JE7 protected (The total number of branches 40)	36.5±4.4d	58.83±2.4bc
LP1 protected (The total number of branches 125)	45.2±1.7c	49.02±4.5d
JE4 remedy (The total number of branches 34)	23.7±1.3e	73.26±5.7a
JE7 remedy (The total number of branches 44)	40.6±8.8cd	54.21±3.1cd
LP1 remedy (The total number of branches 96)	64.6±3.3b	38.41±8.8b

注: 不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: The different letter means significant difference ( $P<0.05$ )

74%, 治疗型防效可达 73%; LP1 防效最差, 保护型防效为 49%, 治疗型防效为 38%。3 株菌的保护型防效均优于治疗型。

### 3 讨论与结论

生物防治是预防植物病害、减少化学农药污染和残留的重要手段, 优良拮抗菌种的筛选是生物防治取得良好成效的重要前提。Stockwell等采

用成团泛菌(*Pantoea agglomerans*) Eh252 对梨火疫病进行防治, 并通过施加于果树上进行防治等方法测试了对 *E. amylovora* 的防治效果<sup>[27]</sup>, 但在果园中使用时抑菌效果明显降低。El-Goorani等曾在实验室筛选出 5 株在平板对峙实验中对 *E. amylovora* 具有拮抗作用的枯草芽胞杆菌, 但其在植株防效测定时对病原菌却未展现出抑菌作用<sup>[28]</sup>。由此可见, 生防菌田间使用效果与环境条件密切相关, 拮抗菌株首先要对当地环境有良好的适应性, 能在土壤或植物组织上存活并大量繁殖, 才能充分发挥其防病效果。新疆地处典型的内陆干旱区, 紫外线辐射较强、气候干燥、土壤盐碱度高等均成为限制生防菌功效发挥的影响因素。因此, 本文主要以香梨种植区土壤为材料进行拮抗菌筛选, 以提高拮抗菌的环境适应性, 从而提高拮抗菌的应用价值。本研究从土壤中筛选获得的拮抗菌进行平板对峙实验时, JE7、LP1 拮抗效果最佳, 二者无显著差异, JE4 效果次之; 采用盆栽杜梨苗进行防效测定时, JE4 防效最佳, JE7 次之, LP1 防效最差。植物乳杆菌在平板对峙时拮抗效果最佳, 采用土壤接种时防效却最差, 推测可能是植物乳杆菌在土壤中定殖能力不如贝莱斯芽胞杆菌强, 因此植物乳杆菌可能不适合单独施用于土壤中。实际生产中, 可以考虑将植物乳杆菌采用叶喷方式在树体上使用, 贝莱斯芽胞杆菌采用土壤灌根方式进行配伍使用。另外, 由于环境等多因素影响, 单一菌剂效果往往不如复合菌剂效果优良。因此, 在后期研究中, 可就复合菌剂协同作用展开研究。

新疆土壤大多属于盐碱土壤, 本研究中拮抗菌 NaCl 浓度和 pH 值耐受能力检测结果显示, 3 株菌均具有较强的盐碱耐受能力, 表明其对新疆土壤具有较强的适应性。

多批次盆栽防效实验结果显示, 保护型防效均优于治疗型防效, 表明提前预防比后期治疗更有效。因此, 在日常的栽培管理中, 若以有机肥



为载体, 配合施用梨火疫病拮抗菌, 将大大提升梨树、苹果树等蔷薇科植物抵御梨火疫病暴发风险, 对新疆香梨、苹果等产业可持续发展具有重大意义。

## REFERENCES

- [1] Liang HM, Liu J, Wang XD, Yang ZY, Li JH. Laboratory screening for antibacterial agents and microorganism preparation against fire blight[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2019, 56(2): 333-344 (in Chinese)  
梁慧敏, 刘君, 王希东, 杨治月, 李敬桦. 梨火疫病抑菌制剂的室内筛选[J]. 新疆农业科学, 2019, 56(2): 333-344
- [2] Lu L. PCR-based techniques for detection of *Erwinia amylovora*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2004 (in Chinese)  
卢玲. 梨火疫病菌的分子检测技术研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2004
- [3] Xu EL. Functional study of *luxR* 'Solo' homologue gene and prokaryotic expression, purification of ExpR protein from *Erwinia amylovora* strain Neppb1665[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese)  
徐恩丽. 梨火疫病菌中未配对的 *luxR* 同源基因的功能初析以及 ExpR 蛋白的原核表达及纯化[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2012
- [4] Ait Bahadou S, Oujija A, Karfach A, Tahiri A, Lahlali R. New potential bacterial antagonists for the biocontrol of fire blight disease (*Erwinia amylovora*) in Morocco[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 117: 7-15
- [5] Yan HL. Genome-wide identification and gene expression analysis of the Sec-dependent secreted protease and cellulase in *Erwinia amylovora* and prokaryotic expression and purified of the *E. amylovora*-encoded EAMY-3046[D]. Ala'er: Master's Thesis of Tarim University, 2020 (in Chinese)  
严海璘. 梨火疫病菌 Sec 分泌蛋白酶和纤维素酶的全基因组筛选与表达分析及 EAMY-3046 蛋白的原核表达与纯化[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2020
- [6] Marinova-Todorova M, Ranta J, Hannunen S. The suitability of Finnish climate for fire blight (*Erwinia amylovora*) epidemics on apple[J]. Agricultural and Food Science, 2015, 24(1): 59-66
- [7] Kim WS, Hildebrand M, Jock S, Geider K. Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*[J]. Microbiology: Reading, England, 2001, 147(Pt11): 2951-2959
- [8] Doolotkeldieva T, Bobusheva S. Fire blight disease caused by *Erwinia amylovora* on rosaceae plants in Kyrgyzstan and biological agents to control this disease[J]. Advances in Microbiology, 2016, 6(11): 831-851
- [9] A list of crop diseases and insect pests[J]. Agricultural Technology Service, 2020, 37(11): 74 (in Chinese)  
一类农作物病虫害名录[J]. 农技服务, 2020, 37(11): 74
- [10] Zhang W, Yu Y, Shen SX. Analysis of the impact of pesticide pollution on the ecological environment and the sustainable governance countermeasures[J]. Value Engineering, 2020, 39(19): 103-104 (in Chinese)  
张巍, 于宇, 沈淑霞. 农药污染对生态环境的影响分析与可持续治理对策[J]. 价值工程, 2020, 39(19): 103-104
- [11] Tancos KA, Cox KD. Effects of consecutive streptomycin and kasugamycin applications on epiphytic bacteria in the apple phyllosphere[J]. Plant Disease, 2017, 101(1): 158-164
- [12] McGhee GC, Guasco J, Bellomo LM, Blumer-Schuette SE, Shane WW, Irish-Brown A, Sundin GW. Genetic analysis of streptomycin-resistant (SmR) strains of *Erwinia amylovora* suggests that dissemination of two genotypes is responsible for the current distribution of SmR *E. amylovora* in Michigan[J]. Phytopathology®, 2011, 101(2): 182-191
- [13] Mohamad S, Behrouz H, Amin S. Evaluation of biological control of *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease of pear by antagonistic bacteria[J]. Biological Control, 2017, 104: 28-34
- [14] Mikiciński A, Sobiczewski P, Puławska J, Maciorowski R. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) by a novel strain 49M of *Pseudomonas graminis* from the phyllosphere of apple (*Malus* spp.)[J]. European Journal of Plant Pathology, 2016, 145(2): 265-276
- [15] Santander RD, Català-Senent JF, Figàs-Segura À, Biosca EG. From the roots to the stem: unveiling pear root colonization and infection pathways by *Erwinia amylovora*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2020, 96(12): fiae210
- [16] Li HT, Zhang JW, Sheng Q, Tang ZH, Zhang XL, Zhang CZ, Luo M. Resistance evaluation of 20 pear varieties (germplasms) in China to foreign strains of *Erwinia amylovora*[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(5): 629-637 (in Chinese)  
李洪涛, 张静文, 盛强, 唐章虎, 张祥林, 张春竹, 罗明. 我国 20 个梨品种(种质)对国外梨火疫病菌的抗病性评价[J]. 果树学报, 2019, 36(5): 629-637
- [17] Geng YM, Sun Q, Gu X, Wang R, Wu N. Screening and identification of Watermelon *Fusarium oxysporum* biotypes of antagonistic bacteria in arid soil[J]. Journal of Henan Polytechnic University: Natural Science, 2016, 35(4): 526-532,567 (in Chinese)  
耿源濛, 孙权, 顾欣, 王锐, 吴宁. 干旱区土壤中西瓜专化型尖孢镰刀菌拮抗菌的筛选及分类[J]. 河南理工大学学报(自然科学版), 2016, 35(4): 526-532,567
- [18] Wang HD. Screening and medium optimization of phosphate-solubilizing, potassium-solubilizing microorganism[D].

- Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- 王海德. 溶磷解钾菌株的筛选及培养基优化[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2018
- [19] Leathers TD, Saunders LP, Bowman MJ, Price NPJ, Bischoff KM, Rich JO, Skory CD, Nunnally MS. Inhibition of *Erwinia amylovora* by *Bacillus nakamurai*[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(5): 875-881
- [20] Cheng RJ. Screening, identification and control efficacy of antagonistic strain ZY-11-2 against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A & F University, 2019 (in Chinese)
- 程睿君. 烟草黑胫病拮抗菌 ZY-11-2 的筛选、鉴定及其生物防治效果研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2019
- [21] Bao HF. Construction of the compound inoculants and study of fermentation mechanism for cotton stalk silage[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- 包慧芳. 棉花秸秆微贮饲料复合菌系构建及发酵机理研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2019
- [22] Wang B, Cui WY, He PJ, Wu YX, He PF, Wang ZQ, Li XY, He PB, He YQ. The inhibitory effect of crude protein from *Bacillus amyloliquefaciens* ASR-12 against various plant pathogens[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2019, 46(5): 865-869 (in Chinese)
- 王彪, 崔文艳, 何朋杰, 吴毅歆, 何鹏飞, 王再强, 李兴玉, 何鹏搏, 何月秋. 解淀粉芽孢杆菌 ASR-12 粗蛋白对多种植物病菌的抑制作用[J]. *安徽农业大学学报*, 2019, 46(5): 865-869
- [23] Liu XJ, Chu M, Zhu J, Tang QY, Song SQ, Sun J, Zhu X, Zhang ZD. Isolation, identification and verification of a decay pathogenic bacterium in Kuqa apricot[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(18): 105-110 (in Chinese)
- 刘晓静, 楚敏, 朱静, 唐琦勇, 宋素琴, 孙建, 朱璇, 张志东. 一株库车小白杏采后软腐病原细菌的分离鉴定及验证[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(18): 105-110
- [24] Dong XZ, Cai MY. Manual for Identification of common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001
- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [25] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Translation Group of Berger's Manual for Bacterial Identification, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese)
- 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984
- [26] Liu H, He TB, Zhao GM, Zhang YC, Wang XY, Li F, Tong Y. Isolation and fermentation performance study of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2020(6): 46-49 (in Chinese)
- 刘辉, 何太波, 赵国森, 张永昌, 王小艳, 李凡, 佟毅. 耐高温酿酒酵母菌的筛选及发酵性能研究[J]. *酿酒科技*, 2020(6): 46-49
- [27] Stockwell VO, Johnson KB, Sugar D, Loper JE. Antibiosis contributes to biological control of fire blight by *Pantoea agglomerans* strain Eh252 in orchards[J]. *Phytopathology*, 2002, 92(11): 1202-1209
- [28] El-Goorani MA, Hassanein FM. The effect of *Bacillus subtilis* on *in vitro* growth and pathogenicity of *Erwinia amylovora*[J]. *Journal of Phytopathology*, 1991, 133(2): 134-138