

芽孢杆菌 FJAT-55034 的鉴定、生长特性及对梨轮纹病菌的抑菌活性

车建美^{*1}, 赖恭梯², 赖呈纯², 陈冰星¹, 陈倩倩¹, 林思连³, 叶鹏鹏⁴, 刘波^{*1}

1 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350002

2 福建省农业科学院农业工程技术研究所, 福建 福州 350002

3 泉州村上小镇农业科技有限公司, 福建 泉州 362500

4 德化县农业科学院研究所, 福建 泉州 362500

车建美, 赖恭梯, 赖呈纯, 陈冰星, 陈倩倩, 林思连, 叶鹏鹏, 刘波. 芽孢杆菌 FJAT-55034 的鉴定、生长特性及对梨轮纹病菌的抑菌活性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 4925-4937.

CHE Jianmei, LAI Gongti, LAI Chengchun, CHEN Bingxing, CHEN Qianqian, LIN Silian, YE Pengpeng, LIU Bo. *Bacillus* sp. FJAT-55034: identification, growth characteristics, and antagonistic effect on *Botryosphaeria dothidea* causing pear ring rot[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 4925-4937.

摘要:【背景】由葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)引起的梨轮纹病是梨栽培生产中的主要病害之一, 造成巨大的经济损失。【目的】对梨轮纹病菌具有较高拮抗活性的菌株 FJAT-55034 进行鉴定、生长特性及抑菌活性评价, 为梨轮纹病的生物防治提供菌种资源。【方法】采用形态学观察、生理生化测定和 16S rRNA 基因序列分析进行拮抗菌株 FJAT-55034 的鉴定; 通过生长曲线、培养温度和 pH 测定, 研究该菌株的生长特性。采用抑菌圈法测定该菌株的抑菌谱; 采用共培养、显微镜观察和果实回接, 测定菌株 FJAT-55034 对梨轮纹病菌生长的抑制作用。【结果】拮抗菌株 FJAT-55034 鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。该菌株在 20–50 °C (最适温度 30 °C) 和 pH 5.0–9.0 (最适 pH 值 7.0) 均能够生长, NaCl 添加量为 0–5% 时, 该菌株均能够较好地生长。菌株 FJAT-55034 对 6 种果树不同病原真菌均具有不同程度的抑制作用, 抑菌圈直径范围为 19.8–29.1 mm; 与梨轮纹病菌共培养后, 菌株 FJAT-55034 对菌丝生长的抑制率为 77.2%。菌株 FJAT-55034 能够有效地抑制梨轮纹病斑的扩展, 处理梨果实 5 d 后对梨轮纹病的抑制率为 66.0%。【结论】菌株 FJAT-55034 对梨轮纹病菌有较好的抑制效果, 可作为梨轮纹病的生防备选菌株。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; 轮纹病菌; 生物学特性; 拮抗菌; 梨

资助项目: 福建省星火计划(2022S0044); 农业高质量发展超越“5511”协同创新工程(XTCXGC2021019)

This work was supported by the Fujian Spark Program (2022S0044) and the High Quality Development “5511” Collaborative Innovation Project (XTCXGC2021019).

*Corresponding authors. E-mail: CHE Jianmei, chejm2002@163.com; LIU Bo, fzliubo@163.com

Received: 2023-03-23; Accepted: 2023-04-12; Published online: 2023-05-26

***Bacillus* sp. FJAT-55034: identification, growth characteristics, and antagonistic effect on *Botryosphaeria dothidea* causing pear ring rot**

CHE Jianmei^{*1}, LAI Gongti², LAI Chengchun², CHEN Bingxing¹, CHEN Qianqian¹, LIN Silian³, YE Pengpeng⁴, LIU Bo^{*1}

1 Agricultural Bio-resources Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350002, Fujian, China

2 Institute of Agricultural Engineering and Technology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350002, Fujian, China

3 Quanzhou Cunshang Town Agricultural Technology Limited Company, Quanzhou 362500, Fujian, China

4 Dehua Institute of Agricultural Sciences, Quanzhou 362500, Fujian, China

Abstract: [Background] Pear ring rot caused by *Botryosphaeria dothidea* is one of the major diseases in pear cultivation, causing huge economic losses. [Objective] To identify the strain FJAT-55034 with high antagonistic activity against *B. dothidea* and evaluate its growth characteristics and antifungal activity, so as to provide an alternative strain for the biocontrol of pear ring rot. [Methods] Morphological characteristics, physiological and biochemical properties, and 16S rRNA gene sequencing were employed to identify the antagonistic strain FJAT-55034. Furthermore, we studied the growth characteristics of the strain by establishing the growth curve and determining the culture temperature and pH. The inhibition zone method was employed to determine the inhibitory spectrum of this strain. Finally, co-culture, microscopic observation, and pathogen inoculation in fruits were conducted to evaluate the antagonistic effect of strain FJAT-55034 on *B. dothidea*. [Results] The antagonistic strain FJAT-55034 was identified as *Bacillus velezensis*. It can survive at 20–50 °C (optimum 30 °C) and pH 5.0–9.0 (optimum pH 7.0) and grow well with 0–5% NaCl. The strain exerted inhibitory effects on 6 pathogenic fungal species derived from fruit trees, with the inhibition zone diameters ranging from 19.8 mm to 29.1 mm. The inhibition rate of FJAT-55034 on the mycelial growth of *B. dothidea* was 77.2%. Moreover, the strain inhibited the expansion of pear ring rot with an inhibition rate of 66.0%. [Conclusion] The strain FJAT-55034 presented a desirable inhibitory effect on *B. dothidea* and served as an alternative strain for the biocontrol of pear ring rot.

Keywords: *Bacillus velezensis*; *Botryosphaeria dothidea*; biological characteristics; antagonistic bacteria; pear

由葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)引起的梨轮纹病是梨种植过程中的主要病害之一^[1]。该病害在我国南北方 20 多个省份均发病,南方发病率更高,严重时枝干发病率达 100%,烂果率甚至超过 80%^[2],造成无法挽回

的损失,导致果实减产、农民减收^[3]。

目前梨轮纹病的防治主要依赖化学农药,包括甲基硫菌灵、甲硫酮和多菌灵等^[4]。种植户为追求产量,用药量盲目增加,容易导致病原菌抗药性增强^[5]。因此,生物防治是

植物病害防治的发展热点方向之一^[6-7]。芽孢杆菌因具有繁殖速度快、分布广和耐酸碱盐等特点,近年来在植物病害防治领域应用广泛^[8-10]。郝金辉等^[11]筛选得到的多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)发酵上清液对梨黑斑病菌互隔交链孢(*Alternaria alternata*)菌丝生长和孢子萌发均有显著抑制作用。耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*) LDFZ001 在 PDA 培养基上能够显著抑制小麦纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)菌丝生长^[12]。目前用于梨轮纹病生物防治的芽孢杆菌不多,解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) L-1 能够在梨伤口处成功定殖,而且在贮藏期间一直维持在较高水平,对梨轮纹病菌的活体抑制率达到 76.6%^[13]。枯草芽孢杆菌 sf628 可以抑制梨轮纹病斑病的扩展,抑制率为 60.0%^[14]。近年来,贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)作为一种潜在的生防菌在许多国家得到广泛应用^[15]。贝莱斯芽孢杆菌 SM905 对铁皮石斛胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)的防效优于苯醚甲环唑^[16]。贝莱斯芽孢杆菌 Ba-0321 具有较强的抗紫外线能力,对烟草根腐病菌(*Fusarium oxysporum*)的防治效果为 81.0%,同时能够促进烟草根系发育和植株生长^[17]。但目前关于贝莱斯芽孢杆菌应用于梨轮纹病的防治鲜见报道,而且由于梨在我国种植范围广、环境差异性大^[18],而生防菌的生长特性又与其环境适应性密切相关^[19],因此筛选适宜不同生态环境的菌株资源尤为必要。

本研究前期从葡萄叶片分离得到一株芽孢杆菌 FJAT-55034,发现其对梨轮纹病菌具有较好的拮抗作用。因此,本研究通过形态学对该菌株进行观察,并结合分子生物学技术对该菌株进行鉴定,研究其生长特性,并分析其对梨

轮纹病菌的抑制效果,旨在为进一步发掘梨主要病害生防菌株资源奠定基础,并为梨病害生防菌剂的应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

供试梨炭疽病菌(*Colletotrichum fructicola*)、梨腐烂病菌(*Valsa mali* var. *pyri*)、梨轮纹病菌(*Botryosphaeria dothidea*)和梨黑斑病菌(*Alternaria alternata*)均由江苏省农业科学院植物保护研究所李朝辉老师惠赠;供试病原菌枇杷炭疽病菌(*Colletotrichum acutatum*) FJAT-30256、龙眼焦腐病菌(*Lasiodiplodia theobromae*) FJAT-3586 均为本实验室分离保存。

1.1.2 培养基

LB 液体培养基(g/L): NaCl 5.0, 酵母浸膏 5.0, 胰蛋白胨 10.0, pH 7.0-7.2, 121 °C 灭菌 20 min。PDA 培养基(g/L): 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 35.0, pH 7.0-7.2, 121 °C 灭菌 20 min。配制相应固体培养基时,加入 17 g/L 琼脂粉。

1.1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, Biotek 公司; 2×Taq Mix, 北京天根生物有限公司; API 50CH 和 API 20E, BioMerieux 公司。扫描电镜, JEOL 公司; 奥林巴斯显微镜, Olympus 公司; PCR 仪、电泳仪和凝胶成像仪, Bio-Rad 公司。

1.2 拮抗菌株的鉴定

1.2.1 形态特征观察

在 LB 培养基上划线接种甘油保藏的菌株 FJAT-55034, 30 °C 培养 48 h, 观察菌落形态、颜色等特征,并于扫描电镜下观察菌体形态。

1.2.2 生理生化特征

生理生化特征采用 API 50CH 和 API 20E 进行检测。将菌株 FJAT-55034 于 LB 培养基上活化,挑取单菌落于 LB 液体培养基中, 30 °C、

180 r/min 培养 24 h。将菌株 FJAT-55034 发酵液分别滴加于 API 20E 和 API 50CH 试剂条各微量生化管内, 30 °C 培养 24 h, 观察并记录各生化管中反应现象。

1.2.3 16S rRNA 基因扩增

菌株 FJAT-55034 的基因组 DNA 按细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作方法提取。引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGACTTAACCCCAATCGC-3')^[20]。PCR 反应体系(25.0 μL): 2×*Taq* Mix 12.5 μL, 正、反向引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, 基因组 DNA (1 ng/μL) 1.0 μL, 去离子水补足 25.0 μL。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物交由上海铂尚生物技术有限公司测序, 测序结果利用 BLAST 在线工具与数据库的模式菌株序列进行同源性比对, 采用 MEGA 7.0 软件, 使用邻接法构建菌株的系统发育树。

1.3 拮抗菌株的生长特性

1.3.1 生长曲线

挑取菌株 FJAF-55034 单菌落于 LB, 30 °C、180 r/min 培养过夜按 1% 接种量将培养过夜的 FJAT-55034 发酵液加入 LB 培养基中, 于 30 °C、180 r/min 振荡培养, 不同时间(0、2、4、6、8、10、12、24、26 和 28 h)取样, 采用紫外分光光度计测定 600 nm 吸光值。每处理 3 次重复。

1.3.2 温度对拮抗菌生长的影响

按 1% 接种量将培养过夜的 FJAT-55034 发酵液加入 LB 培养基中, 置于 10、20、30、40 和 50 °C, 180 r/min 振荡培养 24 h 后取出, 测定 600 nm 吸光值。每处理 3 次重复。

1.3.3 pH 对拮抗菌生长的影响

将 LB 液体培养基的 pH 值分别调至 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 和 11.0, 按 1% 接种量将培养过夜的 FJAT-55034 发酵液加入不同 pH 的培养基中, 置于 30 °C、180 r/min 振荡培养 24 h

后取出, 测定 600 nm 吸光值。每处理 3 次重复。

1.3.4 耐盐性

按 1% 接种量将培养过夜的 FJAT-55034 发酵液加入 LB 培养基中, NaCl 添加浓度分别为 0.1%、0.5%、1%、2%、5%、10% 和 20%, 置于 30 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 后取出, 测定 600 nm 吸光值。每处理 3 次重复。

1.4 拮抗菌株对不同病原菌的抑制作用

在 LB 液体培养基中接入拮抗菌株 FJAT-55034 单菌落后, 30 °C、180 r/min 振荡培养 2 d 后取出。将活化的不同病原真菌接种于 PDA 培养基上, 28 °C 培养 5 d, 取 5 mL 无菌水轻轻冲洗培养 5 d 的不同病原真菌, 制备孢子悬浮液 (1.0×10^6 个/mL)。取 2 mL 真菌孢子悬浮液与 20 mL PDA 培养基混匀, 待其凝固后, 采用打孔器打孔(直径 6 mm), 加入 50 μL 拮抗菌发酵液 (2.0×10^8 CFU/mL), 30 °C 培养 48 h, 采用十字交叉法测量抑菌圈直径。试验重复 3 次。

1.5 拮抗菌株对梨轮纹病菌生长的影响

1.5.1 对菌丝生长量的影响

在 LB 液体培养基中接入 FJAT-55034 单菌落后, 30 °C、180 r/min 培养 2 d, 取出。在 50 mL PDB 培养基中接种一块 1 cm² 大小的梨轮纹病菌, 然后再按照 2% (体积分数) 接种量接入菌株 FJAT-55034 发酵液 (2.0×10^8 CFU/mL), 30 °C、100 r/min 培养 7 d, 以 LB 培养基作为对照。观察菌丝生长状态, 8 000 r/min 离心 15 min, 去掉上清液, 收集菌丝, 烘干并称重。每个处理 3 个重复。

1.5.2 对菌丝形态的影响

将梨轮纹病菌在 PDA 培养基上培养, 待菌株长满平板, 用打孔器打 6 mm 菌饼置于 PDA 培养基中央, 在其两侧接种菌株 FJAT-55034, 以 LB 培养基作为对照。30 °C 培养 5 d 后观察该菌株对病原真菌的抑制情况, 并挑取边缘菌丝于奥林巴斯显微镜下观察形态。

1.6 拮抗菌株对梨轮纹病斑扩展的抑制效果测定

取新鲜的香梨, 70%酒精表面消毒后, 无菌水清洗 3 次, 用灭菌牙签在每个果实表面刺伤 6 mm 左右的伤口, 取 6 mm 的轮纹病菌饼贴于该伤口上, 30 °C 培养 24 h 后取下菌饼, 于菌株 FJAT-55034 发酵液(2.0×10^8 CFU/mL)中浸泡 20 min 后取出, 晾干。以 LB 培养基处理为对照, 每个处理 7 个梨。将不同处理的梨置于 30 °C 培养 3 d 后, 每天测定病斑的直径。每个处理 3 个重复。抑制率(%)=[(对照果斑面积-处理果斑面积)/对照果斑面积]×100, 果斑面积= $\pi(d/2)^2$, d 为果实果实病斑直径平均值。

1.7 数据统计与分析

采用 Microsoft Excel 2007 进行计算和作图, 试验数据差异显著性通过 DPS7.05 软件进行邓肯氏新复极差法检测。

2 结果与分析

2.1 菌株 FJAT-55034 的鉴定结果

2.1.1 形态特征

菌株 FJAT-55034 在 LB 培养基上培养 48 h 后, 菌落乳白色, 不透明, 表面干燥, 菌落最

初生长为近圆形, 继而边缘不规则扩散(图 1A)。扫描电镜观察发现, 菌体呈短杆状, 表面附着一层荚膜, 菌体大小为(0.8×1.5) μm -(2.0×2.5) μm (图 1B)。

2.1.2 生理生化特性

API 20E 检测表明, 菌株 FJAT-55034 精氨酸水解酶试验为阳性, 邻苯硝基-半乳糖苷酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶和苯丙氨酸脱氨酶反应均为阴性, 能利用柠檬酸盐, 不产硫化氢和吲哚, 脲酶和 V-P 试验为阴性, 能水解明胶, 能利用葡萄糖发酵产酸, 不能利用蔗糖、甘露醇、肌醇、山梨醇、鼠李糖、苦杏仁苷、密二糖和阿拉伯糖产酸(表 1)。API 50CH 检测 49 种碳水化合物, 菌株 FJAT-55034 能够利用甘油、D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、核糖、D-木糖、L-木糖、葡萄糖、果糖、甘露糖、肌醇、甘露醇、山梨醇、 α -甲基-D-葡萄糖苷、N-乙酰-葡萄糖胺、苦杏仁苷、熊果苷、七叶灵、柳醇、纤维二糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、淀粉、肝糖和龙胆二糖, 不能利用其余 23 种碳水化合物(表 2)。

2.1.3 16S rRNA 基因序列分析

菌株 FJAT-55034 与模式菌株贝莱斯芽孢

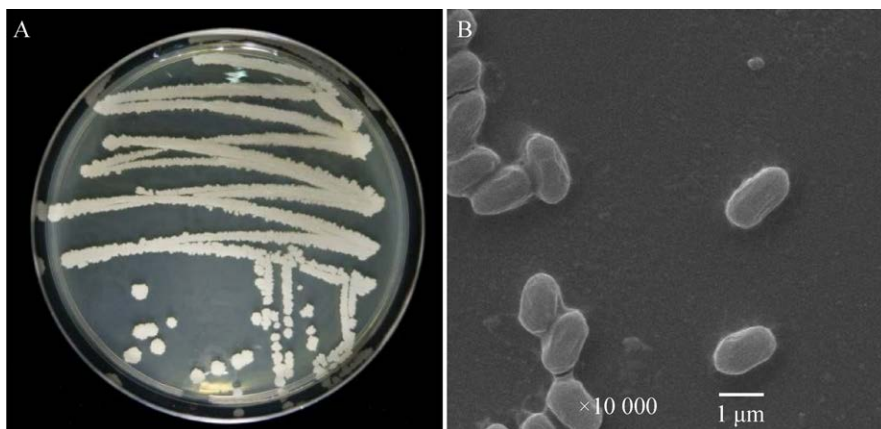


图 1 菌株 FJAT-55034 的菌落形态(A)和菌体形态(B)

Figure 1 Colony morphology (A) and cell morphology (B) of strain FJAT-55034.

表 1 菌株 FJAT-55034 的 API 20E 试验结果

Table 1 API 20E results of strain FJAT-55034

项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
VP 反应 Voges-Proskauer test	-	阿拉伯糖 L-arabinose	-
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-	甘露醇 Mannitol	-
精氨酸水解酶 Arginine hydrolase	+	肌醇 Inositol	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	苦杏仁苷 Amygdalin	-
邻苯硝基-半乳糖苷酶 O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside enzyme	-	蜜二糖 Melibiose	-
硫化氢 Hydrogen sulfide	-	葡萄糖 Glucose	+
明胶液化 Gelatin hydrolysis	+	山梨醇 Sorbitol	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	鼠李糖 Rhamnose	-
尿素酶 Urease	-	吲哚 Indole	-
柠檬酸盐利用 Sodium citrate	+	蔗糖 Sucrose	-

+: 阳性; -: 阴性. 下同

+: Positive; -: Negative. The same below.

表 2 菌株 FJAT-55034 的 API 50CH 试验结果

Table 2 API 50CH results of strain FJAT-55034

项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
甘油 Glycerol	+	柳醇 Saligenin	+
赤藓醇 Erythritol	-	纤维二糖 Cellobiose	+
D-阿拉伯糖 D-arabinose	+	麦芽糖 Maltose	+
L-阿拉伯糖 L-arabinose	+	D-阿糖醇 D-arabitol	-
D-木糖 D-xylose	+	D-来苏糖 D-lyxose	-
L-木糖 L-xylose	+	D-松二糖 D-turanose	-
β -甲基-D-木糖苷 β -methyl-D-xyloside	-	D-塔格糖 D-tagatose	-
阿东醇 Adonitol	-	D-岩糖 D-fucose	-
半乳糖 Galactose	-	L-岩糖 L-fucose	-
半乳糖醇 Dulcitol	-	淀粉 Starch	+
甘露醇 Mannitol	+	肝糖 Glycogen	+
甘露糖 Mannose	+	海藻糖 Trehalose	+
果糖 Fructose	+	菊糖 Inulin	-
核糖 Ribose	+	龙胆二糖 Gentiobiose	+
肌醇 Inositol	+	蜜二糖 D-melibiose	-
葡萄糖 Glucose	+	棉子糖 Raffinose	-
山梨醇 Sorbitol	+	木糖醇 Xylitol	-
山梨糖 Sorbose	-	乳糖 Lactose	+
鼠李糖 Rhamnose	-	松三糖 Melizitose	-
α -甲基-D-甘露糖苷 α -methyl-D-mannose glycosides	-	蔗糖 Sucrose	+
α -甲基-D-葡萄糖苷 α -methyl-D-glucoside	+	L-阿糖醇 L-arabitol	-
七叶灵 Esculin	+	葡萄糖酸盐 Gluconate	-
熊果苷 Arbutin	+	5-酮基-葡萄糖酸盐 5-keto-D-gluconate	-
苦杏仁苷 Amygdalin	+	2-酮基-葡萄糖酸盐 2-keto-D-gluconate	-
N-乙酰-葡糖胺 N-acetylglucosamine	+		

杆菌 BCRC17467 的序列相似性最高, 达到 99.4%。将菌株的 16S rRNA 基因序列提交到 GenBank 数据库, 登录号为 ON567374。基于 16S rRNA 基因序列采用邻接法构建系统发育树, 结果如图 2 所示, 菌株 FJAT-55034 与贝莱斯芽孢杆菌聚成一个分支。综合其形态特征、生理生化特征及系统发育分析的结果, 将菌株 FJAT-55034 鉴定为贝莱斯芽孢杆菌。

2.2 菌株 FJAT-55034 的生长特性

2.2.1 生长曲线

菌株 FJAT-55034 的生长起始期为 0–4 h, 之后进入对数生长期(4–24 h), 菌株生长迅速, 24 h 后进入稳定生长期(图 3)。

2.2.2 温度对拮抗菌生长的影响

菌株 FJAT-55034 在 20–50 °C 均能够生长, 其最适生长温度为 30 °C, OD_{600} 值为 1.3 (图 4)。该菌株对高温的耐受性比低温更强, 其在 50 °C 的 OD_{600} 值为 0.5, 在 10 °C 的 OD_{600} 值为 0.1。

2.2.3 pH 对拮抗菌生长的影响

菌株 FJAT-55034 在 pH 5.0–9.0 均可以生长, 最适生长 pH 7.0, 其 OD_{600} 值为 1.1。pH 值小于 5.0 或者大于 9.0 均不利于该菌株的生长(图 5)。

2.2.4 耐盐性

NaCl 添加量为 0–5% 时, 该菌株均能够较好地生长, 在不添加 NaCl、添加 0.5% 和 1% 的

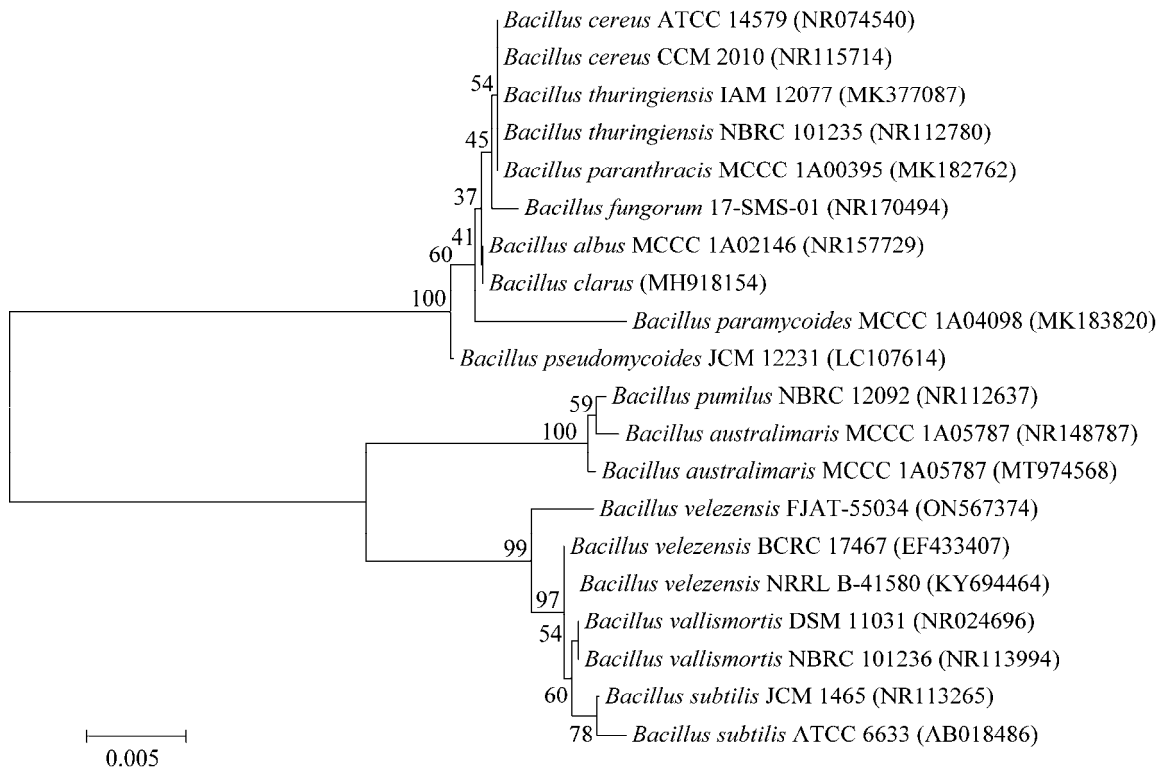


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 FJAT-55034 的系统发育树 括号内序号为该菌株 GenBank 登录号; 标尺 0.005 代表序列偏差值; 内部节点数字为支持度, 用于代表该分支结构的可靠程度

Figure 2 Phylogenetic trees of the strain FJAT-55034 and other *Bacillus* sp. strains. The serial number in brackets is the GenBank accession number of the strain; The value of 0.005 represents the sequence deviation value; The number of internal nodes is support value, which represents the reliability of the branch structure. The same below.

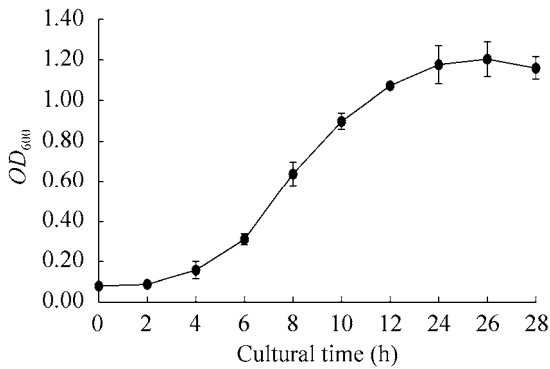


图3 菌株 FJAT-55034 的生长曲线

Figure 3 Growth curve of strain FJAT-55034.

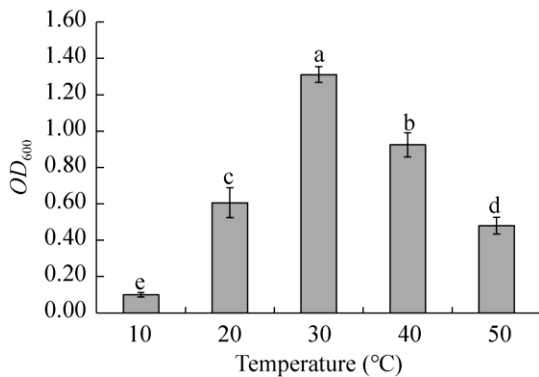


图4 温度对菌株 FJAT-55034 生长的影响 不同小写字母代表不同处理间结果差异显著($P < 0.05$)。下同

Figure 4 Effect of temperature on the growth of strain FJAT-55034. Different lowercase letters represent significant difference among the treatments ($P < 0.05$). The same below.

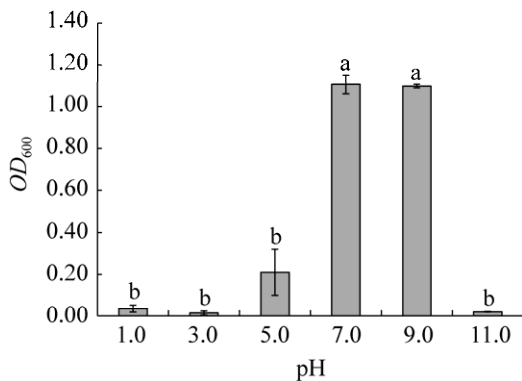


图5 pH 值对菌株 FJAT-55034 生长的影响

Figure 5 Effect of pH value on the growth of the strain FJAT-55034.

NaCl 培养基中的生长量无显著差异, 其 OD_{600} 值分别为 1.4、1.3 和 1.4。NaCl 添加量高于 10% 时不利于该菌株的生长(图 6)。

2.3 拮抗菌株 FJAT-55034 的抑菌谱

菌株 FJAT-55034 对 6 种病原真菌均具有较好的抑制作用, 抑菌圈直径范围为 19.8–29.1 mm (图 7)。该菌株对梨轮纹病菌的抑制作用最好, 抑菌圈直径为 29.1 mm; 对枇杷炭疽病菌的抑菌圈直径最小, 为 19.8 mm。

2.4 菌株 FJAT-55034 对梨轮纹病菌生长的影响

2.4.1 对生长量的影响

菌株 FJAT-55034 可以明显抑制梨轮纹病菌菌丝的生长(图 8)。菌株 FJAT-55034 处理组的菌丝干重为 0.3 g, 显著低于对照组的 1.5 g, 其对梨轮纹病菌菌丝生长的抑制率为 77.2%。

2.4.2 对菌丝形态的影响

菌株 FJAT-55034 和梨轮纹病菌对峙培养 5 d 后, 对照组菌丝长满整个平板(图 9A), 而菌株 FJAT-55034 处理组的菌丝则被抑制无法生长(图 9B)。取边缘的菌丝进行显微镜观察发现: 对照组菌丝细长, 顶端无膨大(图 9C); 处理组菌丝较粗, 顶端膨大呈泡状(图 9D)。

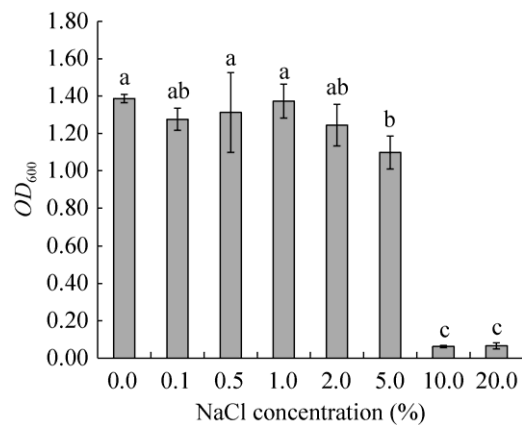


图6 NaCl 对菌株 FJAT-55034 生长的影响

Figure 6 Effect of NaCl on the growth of the strain FJAT-55034.

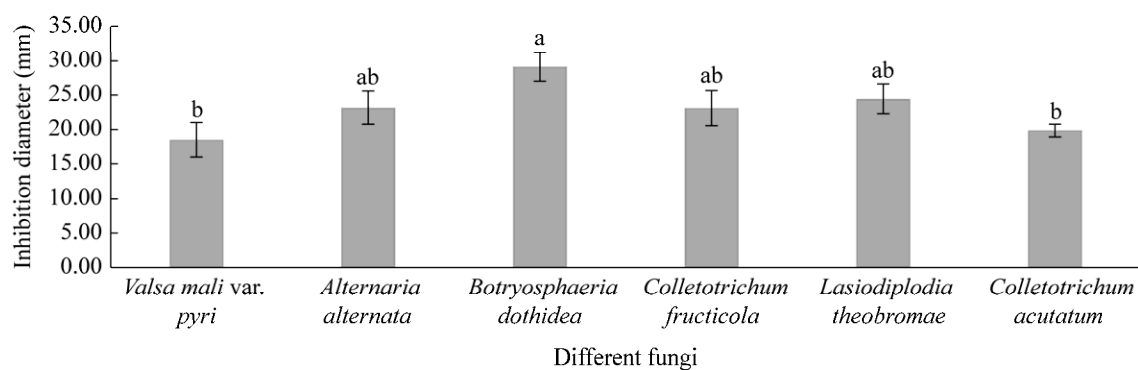


图 7 菌株 FJAT-55034 对不同病原真菌的抑制作用

Figure 7 Inhibition effects of strain FJAT-55034 on different fungi.

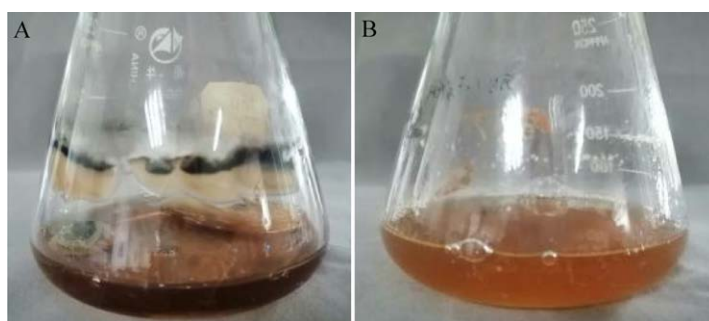


图 8 菌株 FJAT-55034 对梨轮纹病菌菌丝生长的影响 A: 对照组. B: 处理组

Figure 8 Effect of strain FJAT-55034 on mycelial growth of *Botryosphaeria dothidea*. A: Control group. B: Treatment group.

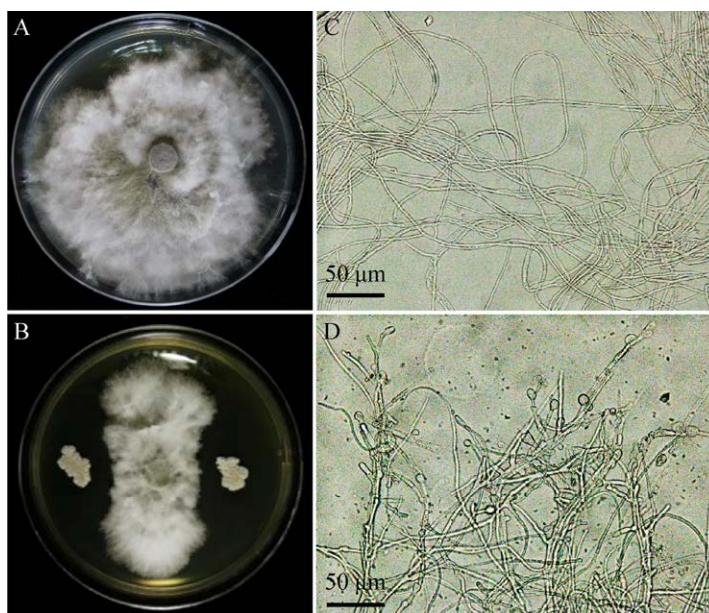


图 9 菌株 FJAT-55034 对梨轮纹病菌丝形态的影响 A、C: 对照组. B、D: 处理组

Figure 9 The growth of the mycelium of *Botryosphaeria dothidea* treated with bacterial strain FJAT-55034. A, C: Control group. B, D: Treatment group.

2.5 菌株 FJAT-55034 对梨轮纹病斑扩展的抑制效果

接种 3 d 后,对照组的病斑直径为 13.8 mm,处理组病斑直径为 8.5 mm,显著性差异不大(表 3 和图 10);接种 5 d 后,对照组的病原菌正常生长,病斑直径分别为 27.4、33.7 和 39.8 mm;而处理组病原菌生长受到不同程度的抑制,菌落直径分别为 16.0、20.6 和 25.0 mm,菌株 FJAT-55034 对梨轮纹病菌的抑制率分别为 66.0%、62.6%和 60.4%。

3 讨论与结论

贝莱斯芽孢杆菌因具有无残留、环境友好、广谱的抗菌活性、促生作用等优点,在农业种植领域的应用日益广泛^[15]。Mosela 等^[21]分离获得贝莱斯芽孢杆菌 03 可提高玉米和大豆产量。贝莱斯芽孢杆菌 SDTB038 对番茄镰孢菌冠腐病和根腐病均有较好的防治效果^[10]。但目前在实际应用过程中,贝莱斯芽孢杆菌易受到寄主、气候、土壤和水质等多种因素的影响,干扰菌株的生长繁殖进而影响其生防效果^[22],因此

表 3 菌株 FJAT-55034 对梨轮纹病的抑制效果
Table 3 The inhibition effect of FJAT-55034 strain on pear ring rot

培养时间 Cultural time (d)	病斑直径 Lesion diameter (mm)		抑制率 Inhibition rates (%)
	处理组 Treatment group	对照组 Control group	
	3	8.5±1.3a	
4	11.8±2.1a	20.2±2.5a	65.9
5	16.0±2.3a	27.4±2.6b	66.0
6	20.6±2.6a	33.7±3.3b	62.6
7	25.0±2.6a	39.8±3.1b	60.4

不同小写字母代表不同处理间结果差异显著($P<0.05$)

Different lowercase letters represent significant difference among the treatments ($P<0.05$).

迫切需要分离更多环境适应性强的菌株资源。本研究分离得到的拮抗贝莱斯芽孢杆菌 FJAT-55034 在 20–50 °C (最适温度 30 °C)和 pH 5.0–9.0 (最适 pH 值 7.0)均能够生长,我们的研究结果与高艳侠等^[23]的相似,他们发现贝莱斯芽孢杆菌 LF01 菌株的最适生长温度为 30 °C,最适 pH 7.0。但与杨迪等^[24]的研究结果有所不同,他们分离的 2 株贝莱斯芽孢杆菌最适生长温度均为 31 °C,最适生长 pH 值均为 5.5。

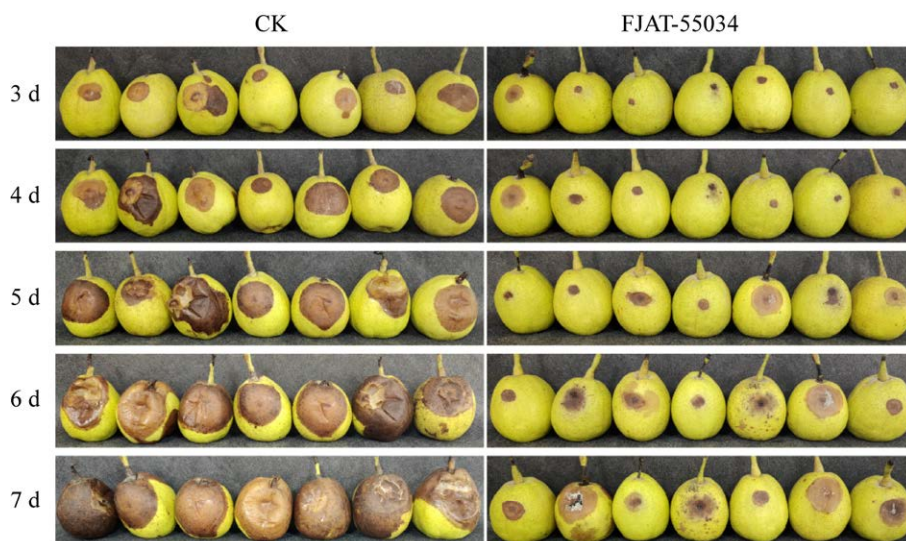


图 10 菌株 FJAT-55034 对梨轮纹病斑扩展的抑制作用

Figure 10 Inhibitory effect of strain FJAT-55034 on pear ring rot lesion expansion.

不同的贝莱斯芽孢杆菌生长的最高温度有所不同, 贝莱斯芽孢杆菌 LF01 菌株最高生长温度 37 °C^[23], 而我们分离的贝莱斯芽孢杆菌 FJAT-55034 对高温条件的耐受性更强, 50 °C 条件下也能够生长, 且该菌株在 NaCl 添加量为 0–5% 时均能够较好生长, 但浓度升高时, 生长量下降。朱亚珠等^[25]也发现贝莱斯芽孢杆菌 SW5 在 NaCl 质量浓度为 0–5 g/100 mL 时的生长速度呈上升趋势, 5–20 g/100 mL 时生长速度呈下降趋势。然而贝莱斯芽孢杆菌 LF01 对盐的耐受性则较弱, 其最适盐度为 5‰^[23]。因此, 拮抗贝莱斯芽孢杆菌 FJAT-55034 耐高温、耐盐碱, 有望作为环境适应性强的菌株备选资源。

随着生活水平的提高, 人们对优质安全梨的需求越来越旺盛^[24]。化学农药的大量使用对梨果实品质的污染越来越严重, 因此病害防治与农药污染的矛盾亟待解决^[24]。相对安全、无残留和环境友好的微生物菌剂越来越受到重视, 成为国际绿色农药发展的重点^[26]。本研究分离得到的一株拮抗贝莱斯芽孢杆菌 FJAT-55034, 对 6 种常见果树病原真菌均具有较强的抑制作用, 可为果树真菌病害防治的微生物菌剂开发提供新资源, 具有较好的应用前景。该菌株可抑制梨轮纹病菌丝的生长, 抑制率达到 77.2%, 且能够有效抑制梨果实轮纹病斑的扩展, 抑制率为 66.0%, 高于枯草芽孢杆菌 sf628 的抑制率^[14]。由于目前关于贝莱斯芽孢杆菌用于梨轮纹病防治方面鲜见报道, 为加快其产业化应用, 尚需开展不同生态环境梨种植区的小区试验和大田示范, 确定其环境适应性和防病效果。

生防菌常常会抑制菌丝生长, 对菌丝有致畸效果^[27]。菌株 FJAT-55034 处理后的梨轮纹病菌丝明显变粗, 顶端膨大呈泡状, 这一结果与郝金辉等^[11]的研究结果一致。张倩等^[28]通过扫

描电镜观察也发现, 经与贝莱斯芽孢杆菌 KT 菌株共培养后, 匍枝根霉菌丝和孢子形态会发生扭曲。研究表明, 贝莱斯芽孢杆菌主要通过脂肽等抗菌代谢产物、诱导植物系统抗性、产生生长激素促进植物生长、竞争和生态位定殖调控等机制发挥生防作用^[29–30], 因此推测菌株 FJAT-55034 很有可能通过产生某些活性物质抑制梨轮纹病菌生长, 其具体的抑菌机制有待进一步深入研究。

综上所述, 贝莱斯芽孢杆菌 FJAT-55034 对梨轮纹病菌具有较强的抑制作用, 有望作为梨种植中病害防治的菌种资源。贝莱斯芽孢杆菌作为芽孢杆菌属的一个新种, 在病害防控领域的应用越来越广泛, 后续将通过宏基因组和转录组等分子生物学手段进一步探索该菌株对梨轮纹病菌的生防机制, 为田间广泛应用提供理论基础。

REFERENCES

- [1] HE Y, ZOU Q, LI SS, ZHU HD, HONG N, WANG GP, WANG LP. Molecular characterization of a new fusarivirus infecting *Botryosphaeria dothidea*, the causal agent of pear ring rot disease[J]. Archives of Virology, 2022, 167(9): 1893–1897.
- [2] 张璐, 刘奇志, 张国珍. 6 种梨果实对轮纹病的抗性差异及 4 种杀菌剂对轮纹病菌的抑菌作用[J]. 植物保护, 2019, 45(4): 224–228.
ZHANG L, LIU QZ, ZHANG GZ. Resistance of six pear variety's fruits to ring rot and inhibition effects of four fungicides to *Botryosphaeria dothidea*[J]. Plant Protection, 2019, 45(4): 224–228 (in Chinese).
- [3] ZOU Q, GAO YJ, WANG Q, YANG YK, WANG F, HONG N, WANG GP, WANG LP. The full-length genome sequence of a novel mitovirus from *Botryosphaeria dothidea*, the causal agent of pear ring rot disease[J]. Archives of Virology, 2021, 166(10): 2881–2885.
- [4] 张丽丽. 梨轮纹病菌生物学特性及其果实病害生物防治研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2009.
ZHANG LL. Study on biological characteristics and biological control of *Botryosphaeria berengeriana* f. sp.

- piricola* on pear fruits[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2009 (in Chinese).
- [5] AL-HAQ MI, SEO Y, OSHITA S, KAWAGOE Y. Disinfection effects of electrolyzed oxidizing water on suppressing fruit rot of pear caused by *Botryosphaeria berengeriana*[J]. Food Research International, 2002, 35(7): 657-664.
- [6] CHEN L, HENG JY, QIN SY, BIAN K. A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight[J]. PLoS One, 2018, 13(6): e0198560.
- [7] 许世洋, 李敏权, 刘梅金, 徐冬丽, 漆永红, 周兰兰, 汪学苗, 李风庆, 李雪萍. 青稞根腐病防病促生细菌的筛选及其菌剂防效[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2575-2586.
- XU SY, LI MQ, LIU MJ, XU DL, QI YH, ZHOU LL, WANG XM, LI FQ, LI XP. Screening of bacteria with biocontrol effects against naked barley root rot accompany with plant growth-promoting properties and the biocontrol effects of the bacterial inoculant[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2575-2586 (in Chinese).
- [8] MORADI M, NEJAD FJ, BONJAR GHS, FANI SR, MIMAND BM, PROBST C, MADANI M. Efficacy of *Bacillus subtilis* native strains for biocontrol of *Phytophthora* crown and root rot of pistachio in Iran[J]. Tropical Plant Pathology, 2018, 43(4): 306-313.
- [9] 李新宇, 李磊, 陈利达, 石延霞, 柴阿丽, 谢学文, 李宝聚. 番茄柄霉叶斑病拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 园艺学报, 2020, 47(4): 741-748.
- LI XY, LI L, CHEN LD, SHI YX, CHAI AL, XIE XW, LI BJ. Screening and identification of antagonistic bacteria against gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium solani*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(4): 741-748 (in Chinese).
- [10] CHEN QQ, QIU Y, YUAN YZ, WANG KY, WANG HY. Biocontrol activity and action mechanism of *Bacillus velezensis* strain SDTB038 against *Fusarium* crown and root rot of tomato[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 994716.
- [11] 郝金辉, 包慧芳, 王宁, 詹发强, 侯新强, 郑素慧, 何亚芳, 史应武, 杨蓉, 龙宣杞. 库尔勒香梨黑斑病菌拮抗菌筛选及其抑菌机理[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3709-3721.
- HAO JH, BAO HF, WANG N, ZHAN FQ, HOU XQ, ZHENG SH, HE YF, SHI YW, YANG R, LONG XQ. Screening and possible mechanism of strains against black spot of Korla pear[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3709-3721 (in Chinese).
- [12] FENG ZB, XU MZ, YANG J, ZHANG RH, GENG ZG, MAO TT, SHENG YT, WANG LM, ZHANG J, ZHANG HX. Molecular characterization of a novel strain of *Bacillus halotolerans* protecting wheat from sheath blight disease caused by *Rhizoctonia solani* Kühn[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1019512.
- [13] SUN PP, CUI JC, JIA XH, WANG WH. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* L-1 for biocontrol of pear ring rot[J]. Horticultural Plant Journal, 2017, 3(5): 183-189.
- [14] 刘邮洲, 常有宏, 魏本强, 刘永峰, 陈志谊. 梨轮纹病拮抗细菌的筛选与评价[J]. 果树学报, 2009, 26(3): 344-348, F0002.
- LIU YZ, CHANG YH, WEI BQ, LIU YF, CHEN ZY. Screening and evaluation of antagonistic bacteria against pear ring rot[J]. Journal of Fruit Science, 2009, 26(3): 344-348, F0002 (in Chinese).
- [15] RABBEE MF, HWANG BS, BAEK KH. *Bacillus velezensis*: a beneficial biocontrol agent or facultative phytopathogen for sustainable agriculture[J]. Agronomy, 2023, 13(3): 840.
- [16] 竺利红, 李孝辉, 施跃峰. 芽胞杆菌 SM905 的鉴定及其对铁皮石斛胶孢炭疽菌的抑菌活性研究[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(2): 469-475.
- ZHU LH, LI XH, SHI YF. Identification of *Bacillus* sp. SM905 and its antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(2): 469-475 (in Chinese).
- [17] LI XJ, YAO CX, QIU R, BAI JK, LIU C, CHEN YG, LI SJ. Isolation, identification, and evaluation of the biocontrol potential of a *Bacillus velezensis* strain against tobacco root rot caused by *Fusarium oxysporum*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2023, 134(1): 1xac049.
- [18] 郭文场, 刘佳贺. 中国梨的产业现状、存在问题及改进措施[J]. 特种经济动植物, 2019, 22(3): 47-49.
- GUO WC, LIU JH. Present situation, existing problems and improvement measures of pear industry in China[J]. Special Economic Animal and Plant, 2019, 22(3): 47-49 (in Chinese).
- [19] 周敬轩, 赵永龙, 赵盼, 曹晶晶, 汪志琴, 刘璐, 仲乃琴. 疮痂链霉菌拮抗菌 HD9-1 的筛选及功能评价[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1149-1162.
- ZHOU JX, ZHAO YL, ZHAO P, CAO JJ, WANG ZQ, LIU L, ZHONG NQ. Screening and functional evaluation of strain HD9-1 against *Streptomyces scabies*[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1149-1162

- (in Chinese).
- [20] AL AZAD S, HOSSAIN KM, RAHMAN SMM, AL MAZID MF, BARAI P, GAZI MS. In ovo inoculation of duck embryos with different strains of *Bacillus cereus* to analyse their synergistic post-hatch anti-allergic potentialities[J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2020, 6(4): 992-999.
- [21] MOSELA M, ANDRADE G, MASSUCATO LR, de ARAÚJO ALMEIDA SR, NOGUEIRA AF, de LIMA FILHO RB, ZEFFA DM, MIAN S, HIGASHI AY, DANILLO SHIMIZU G, TEIXEIRA GM, BRANCO KS, FARIA MV, GIACOMIN RM, ALBERTO SCAPIM C, GONÇALVES LSA. *Bacillus velezensis* strain Ag75 as a new multifunctional agent for biocontrol, phosphate solubilization and growth promotion in maize and soybean crops[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 15284.
- [22] 张德锋, 高艳侠, 王亚军, 刘春, 石存斌. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(11): 3634-3649.
- ZHANG DF, GAO YX, WANG YJ, LIU C, SHI CB. Advances in taxonomy, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(11): 3634-3649 (in Chinese).
- [23] 高艳侠, 张德锋, 可小丽, 刘志刚, 衣萌萌, 王森, 韩雪晴, 卢迈新. 罗非鱼源无乳链球菌肠道拮抗芽孢杆菌的筛选及其生物学特性[J]. *微生物学报*, 2019, 59(5): 926-938.
- GAO YX, ZHANG DF, KE XL, LIU ZG, YI MM, WANG M, HAN XQ, LU MX. Selection and characterization of intestinal *Bacillus* strain antagonistic against pathogenic *Streptococcus agalactiae* of tilapia[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(5): 926-938 (in Chinese).
- [24] 杨迪, 杜婵娟, 张晋, 潘连富, 叶云峰, 黄思良, 付岗. 香蕉枯萎病拮抗菌贝莱斯芽孢杆菌的筛选鉴定及其生物学特性[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(1): 165-171.
- YANG D, DU CJ, ZHANG J, PAN LF, YE YF, HUANG SL, FU G. Screening, identification and biological characteristics of *Bacillus velezensis* with antagonst activity against banana *Fusarium wilt*[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2021, 37(1): 165-171 (in Chinese).
- [25] 朱亚珠, 夏率博, 陈琳, 刘洋, 吴祖芳, 翁佩芳. 一株贝莱斯芽孢杆菌的生长特性及抑菌活性研究[J]. *食品科学技术学报*, 2022, 40(1): 85-92.
- ZHU YZ, XIA SB, CHEN L, LIU Y, WU ZF, WENG PF. Study on growth characteristics and antimicrobial activities of *Bacillus velezensis*[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2022, 40(1): 85-92 (in Chinese).
- [26] 张绍铃. 梨学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013.
- ZHANG SL. Pear Science[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013 (in Chinese).
- [27] 李朝辉, 包艳, 苗成琪, 凌军, 孙伟波, 赵延存, 徐会永, 刘凤权. 梨炭疽菌拮抗细菌 CL01 的鉴定及其抗菌活性[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(4): 838-846.
- LI CH, BAO Y, MIAO CQ, LING J, SUN WB, ZHAO YC, XU HY, LIU FQ. Identification of antagonistic bacteria CL01 against pear anthracnose and its anti-pathogenic activity[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2021, 37(4): 838-846 (in Chinese).
- [28] 张倩, 陈雨诗, 许春艳, 邹曼, 包汶婷, 郗良卿, 辛力, 陈义伦. 贝莱斯芽孢杆菌防治甜樱桃采后软腐病的效果和机理[J]. *食品科学*, 2023, 44(7): 229-239.
- ZHANG Q, CHEN YS, XU CY, ZOU M, BAO WT, XI LQ, XIN L, CHEN YL. Effects and mechanism of *Bacillus velezensis* on control and induced resistance of postharvest soft rot of sweet cherry fruit[J]. *Food Science*, 2023, 44(7): 229-239 (in Chinese).
- [29] JIN PF, WANG HN, TAN Z, XUAN Z, DAHAR GY, LI QX, MIAO WG, LIU WB. Antifungal mechanism of bacillomycin D from *Bacillus velezensis* HN-2 against *Colletotrichum gloeosporioides* penz[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2020, 163: 102-107.
- [30] MAHDI I, ALLAOUI A, FAHSI N, BISKRI L. *Bacillus velezensis* QA2 potentially induced salt stress tolerance and enhanced phosphate uptake in quinoa plants[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(9): 1836.