

研究报告

极端耐旱链霉菌 D67 对梨火疫病原菌毒力因子的抑制作用

江星彤¹, 柏晓玉², 冯玉莲^{2,3}, 李雪^{2,4}, 李梅^{2,4}, 朱艳蕾^{*1}, 张志东^{*1,2,3,4}

1 新疆师范大学 生命科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830054

2 新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆特殊环境微生物实验室, 新疆 乌鲁木齐 830091

3 新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830000

4 新疆农业大学 食品科学与药学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

江星彤, 柏晓玉, 冯玉莲, 李雪, 李梅, 朱艳蕾, 张志东. 极端耐旱链霉菌 D67 对梨火疫病原菌毒力因子的抑制作用[J]. 微生物学通报, 2025, 52(7): 3165-3175.

JIANG Xingtong, BAI Xiaoyu, FENG Yulian, LI Xue, LI Mei, ZHU Yanlei, ZHANG Zhidong. Inhibitory effects of extreme drought-resistant *Streptomyces* D67 on the virulence factors of *Erwinia amylovora*[J]. Microbiology China, 2025, 52(7): 3165-3175.

摘要: 【背景】梨火疫病是由解淀粉欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)引起的重大植物病害, 其毒力因子由该菌群体感应系统调控。群体感应抑制剂(quorum sensing inhibitor, QSI)作为一种新型活性物质, 可以通过阻断病原细菌的群体感应通路, 进而降低毒力因子代谢, 是防治梨火疫病的潜在新策略。【目的】挖掘梨火疫病欧文氏菌群体感应抑制剂, 为梨火疫病防控提供理论依据。【方法】通过对菌株 D67 发酵并制备发酵粗提物, 进而开展其对紫色色小杆菌(*Chromobacterium violaceum*) CV026 和梨火疫病原菌的抑菌活性测试, 分析不同亚抑菌浓度粗提物溶液对欧文氏菌生物膜、胞外多糖、运动性和胞外酶代谢的影响。【结果】菌株 D67 发酵粗提物具有明显的群体感应抑制活性和抑菌活性, 其对梨火疫病欧文氏菌最小抑菌浓度为 2 mg/mL; 在亚抑菌浓度下, 可有效降低梨火疫病原菌的运动能力, 并且对菌株生物膜、胞外多糖和多种胞外酶代谢具有显著影响, 并呈明显的浓度依赖性。在 0.25 mg/mL 浓度下, 梨火疫病原菌生物膜抑制率为 60.1%, 与阳性对照丁香酚处理效果相当; 在 1/2 MIC 浓度下, 多聚半乳糖醛酸酶和果胶裂解酶的抑制率高达 76.45%和 34.80%, 并在离体叶片实验中展现较好的防治效果。【结论】菌株 D67 发酵代谢产物具有明显的群体感应抑制活性, 能显著抑制欧文氏菌毒力因子的产生, 为梨火疫病生物防治提供了新思路。
关键词: 群体感应抑制剂; 欧文氏菌; 毒力因子

资助项目: 新疆维吾尔自治区“天山英才”项目(2022TSYCCX0067); 国家自然科学基金(32060004)

This work was supported by the Tianshan Talent Training Plan of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022TSYCCX0067) and the National Natural Science Foundation of China (32060004).

*Corresponding authors. E-mail: ZHU Yanlei, zhuyanlei1226@163.com; ZHANG Zhidong, zhangzheedong@sohu.com

Received: 2024-11-19; Accepted: 2025-03-07; Published online: 2025-04-28

Inhibitory effects of extreme drought-resistant *Streptomyces* D67 on the virulence factors of *Erwinia amylovora*

JIANG Xingtong¹, BAI Xiaoyu², FENG Yulian^{2,3}, LI Xue^{2,4}, LI Mei^{2,4}, ZHU Yanlei^{*1}, ZHANG Zhidong^{*1,2,3,4}

1 College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, Xinjiang, China

2 Xinjiang Laboratory of Special Environmental Microbiology, Institute of Applied Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, Xinjiang, China

3 College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830000, Xinjiang, China

4 College of Food Sciences and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

Abstract: [Background] Pear fire blight, caused by *Erwinia amylovora*, is a devastating plant disease. The virulence factors of this pathogen are regulated by the quorum sensing (QS) system. Quorum sensing inhibitors (QSIs), as novel bioactive compounds, can reduce the metabolism of virulence factors by disrupting the QS pathways of pathogenic bacteria, representing a potential new strategy for controlling pear fire blight. [Objective] To explore a QSI against *E. amylovora* and provide a theoretical foundation for the prevention and control of pear fire blight. [Methods] The crude extract of strain D67 was prepared through fermentation and tested for the inhibitory activities against *Chromobacterium violaceum* CV026 and *E. amylovora*. The effects of sub-inhibitory concentrations of the crude extract on the biofilm formation, extracellular polysaccharide production, motility, and extracellular enzyme metabolism of *E. amylovora* were analyzed. [Results] The crude fermentation extract of strain D67 exhibited significant QS inhibitory activity and antibacterial activity. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the crude extract against *E. amylovora* was 2 mg/mL. At sub-inhibitory concentrations, the crude extract reduced the motility and significantly impacted the biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and extracellular enzyme metabolism of *E. amylovora* in a concentration-dependent manner. The extract at 0.25 mg/mL showed the inhibition rate of 60.1% on biofilm formation, which was comparable to that of the positive control eugenol. The extract at 1/2 MIC showed the inhibition rates of 76.45% and 34.80% for polygalacturonase and pectin lyase, respectively. Additionally, the crude extract demonstrated effective control in an *in vitro* leaf assay. [Conclusion] The fermentation metabolites of strain D67 exhibited significant QS inhibitory activity and significantly inhibited the production of virulence factors of *E. amylovora*, providing a novel approach for the biocontrol of pear fire blight.

Keywords: quorum sensing inhibitor; *Erwinia amylovora*; virulence factors

梨火疫病是解淀粉欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)侵染引起的一种毁灭性的植物病害之一^[1]。病原菌通过花蜜和嫩芽中的伤口进入植物体内,快速扩散蔓延至整个植株,之后导致植物的发病,如坏死、萎蔫和分泌物的产生^[2-3]。

2016年,新疆维吾尔自治区首次发现了梨火疫病,此后该病害迅速扩散,对新疆库尔勒香梨产业的发展构成了严重威胁^[4]。目前,生产中主要通过检疫、修剪、药剂防治和生物防治等手段进行防控^[5-6]。尽管修剪病枝能一定程度抑

制梨火疫病的传播,但会显著降低果树产量,而使用化学农药易导致病原菌耐药性增强,进而造成防治困难,并且带来环境污染和农药残留^[7],因此,加大梨火疫病生物防治的探索已成为该领域重要的热点研究之一。

群体感应抑制剂(quorum sensing inhibitor, QSI)是一类不影响细菌正常生长的情况下阻断群体感应通路的生物活性物质^[8]。研究表明,群体感应在细菌的生物学过程中发挥着关键作用,如孢子生成、毒力因子的表达及生物膜的形成^[9]。这些过程可能导致动植物疾病的发生或食物的腐败^[10]。群体感应抑制剂可以通过降解群体感应信号分子阻断其与受体蛋白的结合,或通过生成信号分子类似物竞争性结合转录蛋白受体等方式干扰病原菌的群体感应通路,从而削弱其耐药性并减少毒力因子的产生^[11],具有不易诱导细菌耐药性又可以起到防治细菌病害的优点。因此,群体感应抑制剂是研发新型生防制剂的理想材料。

放线菌凭借其独特的代谢机制和生成结构新颖、活性多样化合物的能力,成为天然活性物质的重要来源^[12]。目前,国内外已从多种特殊极端环境代谢产物中发现群体感应抑制剂^[13-14]。在前期研究中,本团队从库木塔格沙漠周边干旱区土壤中分离到 1 株具有较强群体感应抑制活性的链霉菌(*Streptomyces* sp.) D67,其发酵粗提物对荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) 毒力因子代谢具有显著影响^[15]。本研究通过进一步确定发酵粗提物对欧文氏菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),进而检测其亚抑菌浓度下对欧文氏菌运动性和生物膜形成的影响,并解析其对胞外酶代谢的抑制作用,以期菌株 D67 群体感应抑制剂在梨火疫病生物防治的应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品

紫色色小杆菌(*Chromobacterium violaceum*)

CV026, 中国海洋大学海洋生命学院王岩教授惠赠;梨火疫解淀粉欧文氏菌(*Erwinia amylovora*), 新疆农业科学院微生物应用研究所包慧芳研究员惠赠;链霉菌 D67 为前期实验室分离所得。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

群集培养基^[16] (g/L): 蛋白胨 10.0, D(+)-葡萄糖 5.0, NaCl 5.0, 琼脂粉 5.0, pH 7.0。泳动培养基^[16] (g/L): 胰蛋白胨 10.0, NaCl 3.0, 琼脂粉 3.0, pH 7.0。LB 肉汤培养基、LB 琼脂培养基和高氏一号培养基, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、丁香酚、蒽酮、结晶紫、蛋白胨、胰蛋白胨、琼脂粉、乙酸乙酯、D(+)-葡萄糖、NaCl、*N*-己酰基-L-高丝氨酸内酯标准品(*N*-hexanoyl-L-homoserine lactone, C6-HSL), 北京鼎国昌盛生物技术有限公司;纤维素酶测定试剂盒、中性木聚糖酶测定试剂盒、果胶裂解酶测定试剂盒及多聚半乳糖醛酸酶测定试剂盒, 苏州格锐思生物科技有限公司。

离心机, 希格玛公司;旋转蒸发仪, 河南巩义市英裕予华公司;恒温培养箱, 上海福玛实验设备有限公司;超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司;酶标仪, 伯腾仪器有限公司;振荡培养箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.3 发酵粗提物的制备

将菌株 D67 在高氏一号固体培养基 30 °C 培养 4 d 后刮取孢子, 接种至高氏一号液体培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 7 d。将菌液于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 加入乙酸乙酯在 100 r/min 条件下萃取 3 h, 吸取有机相 40 °C 蒸干, 获得粗提物。使用一定量的 DMSO 溶解粗提物制备不同浓度(8、4、2、1、0.5、0.25、0.13 mg/mL)的粗提物溶液, 经 0.45 μm 有机滤膜过滤后-20 °C 保存。

1.4 MIC 的测定

分别接种解淀粉欧文氏菌和菌株 CV026 于

LB 液体培养基, 30 °C、150 r/min 培养 12 h, 制备种子液, 采用 96 孔板法按 2%接种量接种待测菌株于含有不同浓度(8、4、2、1、0.5、0.25、0.13 mg/mL)的粗提物和丁香酚的 LB 液体培养基中, 置于酶标仪中 30 °C、220 r/min 振荡培养 24 h, 每 2 h 测定 OD_{590} 值, 以确定粗提物的抑菌情况。

1.5 不同浓度粗提物对菌株 CV026 产紫色素的影响

用接种环刮取菌株 CV026 新鲜菌苔接种于 LB 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 16 h, 分别取 150 μ L C6-HSL 溶液(0.1 mmol/mL)和 7.5 mL CV026 菌液加入冷却至 45 °C 左右的 300 mL LB 固体培养基中, 混匀后倒板, 待凝固后打孔, 备用^[17], 吸取不同亚抑菌浓度的粗提物溶液(0.5、0.25、0.13 mg/mL)加入孔中, 30 °C 正置培养 24 h, 观察透明圈的大小并判断其对菌株 CV026 产紫色素的影响。以 DMSO 为阴性对照, 同浓度的丁香酚为阳性对照。

1.6 粗提物对梨火疫病原菌运动性的影响

在群集培养基和泳动培养基平板中添加 0.5 mL 粗提物, 使培养基中粗提物的终浓度为 0.25 mg/mL, 并添加等体积的二甲基亚砷作为对照, 点接梨火疫病原菌, 30 °C 正置培养 24 h, 观察菌株群集和泳动情况, 统计结果并拍照。

1.7 粗提物对梨火疫病原菌形成生物膜的影响

采用 96 孔板法, 先以 2%的接种量接入欧文氏菌菌液于 20 mL LB 液体培养基中, 而后取 120 μ L 接种液于孔中, 分别加入一定量的粗提物溶液, 至培养基中粗提物终浓度为 0.06、0.13、0.25 mg/mL, 加入等量的 DMSO 作为阴性对照, 加入相同终浓度的丁香酚为阳性对照。置于酶标仪中 30 °C、220 r/min 振荡培养 24 h。参考 Zhang 等^[18]用结晶紫染色法测定生物膜含量。弃掉菌液后用蒸馏水冲洗 3 次, 自然风干后用 1%结晶紫染色 15 min, 冲洗干净并烘干, 用 95%

的乙醇洗脱, 测定 OD_{590} 值, 并统计结果。根据公式(1)计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = [1 - (\text{处理组}/\text{对照组})] \times 100 \quad (1)$$

1.8 粗提物对梨火疫病原菌形成胞外多糖的影响

采用 1.7 所述方法培养菌液, 参考于福浩等^[19]的蒽酮-硫酸法测定多糖含量。将菌液于 10 000 r/min 常温离心 8 min, 取上清液, 加入乙酸乙酯萃取 2 次, 留存有机相在 40 °C 蒸干, 用 100 μ L 超纯水溶解, 添加 300 μ L 2%蒽酮-硫酸溶液, 在沸水条件反应 15 min 后冷却至室温, 测定 OD_{625} 值, 并统计结果。

1.9 粗提物对梨火疫病原菌蛋白酶的影响

采用 1.7 所述方法培养菌液, 将菌液于 10 000 r/min 离心 8 min, 取 100 μ L 上清液, 加入 200 μ L 1.3%的脱脂牛奶溶液, 37 °C 反应 2 h, 测量 OD_{600} 值, 并统计结果。 OD 值越大说明蛋白酶活越高。

1.10 粗提物对梨火疫病原菌纤维素酶活、木聚糖酶活、果胶裂解酶活和多聚半乳糖醛酸酶活的影响

采用 1.7 所述方法培养菌液, 将菌液于 8 000 r/min、4 °C 离心 5 min, 取 50 μ L 上清液, 采用纤维素酶测定试剂盒测定 OD_{540} 值, 根据公式(2)–(5)计算发酵液纤维素酶活、木聚糖酶活、果胶裂解酶活和多聚半乳糖醛酸酶活。

$$\text{纤维素酶活力}[\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{mL})] = 1\,515.2 \times (\Delta A + 0.054\,5) \quad (2)$$

$$\text{中性木聚糖酶活力}[\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mL})] = 223 \times (\Delta A + 0.000\,4) \times D \quad (3)$$

$$\text{果胶裂解酶活力}[\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mL})] = 193.2 \times \Delta A \quad (4)$$

$$\text{多聚半乳糖醛酸酶活力}[\text{mg}/(\text{h}\cdot\text{mL})] = 5.54 \times (\Delta A + 0.026\,3) \quad (5)$$

式中: $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ (每个样本做 1 个自身对照); D 为稀释倍数。

1.11 香梨离体叶片防效测定

离体叶片采用完全展开幼嫩健康叶片, 用

纯净水清洗叶片后风干, 先向叶片喷洒 100 μ L 梨火疫病原菌菌液(OD_{600} 为 0.8), 风干 2 h 后喷洒 100 μ L 1 mg/mL 的菌株 D67 粗提物, 随后置于装有无菌水润湿滤纸的培养皿中, 28 $^{\circ}$ C 恒温相对湿度 75% 放置 4 d 并观察记录。分别以接种欧文氏菌为阳性对照, 无菌水作为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 粗提物抑菌活性及群体感应抑制测定结果

2.1.1 粗提物对梨火疫病原菌及菌株 CV026 的 MIC 测定结果

选用丁香酚作为群体感应抑制阳性对照, 并测定不同浓度阳性对照和粗提物对菌株 CV026 和梨火疫病原菌抑制的影响, 结果如表 1 所示, 高浓度的丁香酚和粗提物对菌株生长均有明显的抑制活性, 但最小抑制浓度存在明显不同。其中丁香酚对梨火疫病原菌的 MIC 为 0.50 mg/mL, 而菌株 D67 粗提物为 2.00 mg/mL, 表明丁香酚的抑菌活性明显高于菌株 D67 粗提物。

为了排除丁香酚和粗提物对菌株的抑制影响, 在后续群体感应抑制实验中, 均采用亚抑菌浓度进行。

表 1 不同浓度粗提物及丁香酚对指示菌株生长的影响

Table 1 Effects of different concentrations of crude extracts and eugenol on the growth of strains

浓度 Concentration (mg/mL)	发酵粗提物 Fermentation crude extract		丁香酚 Eugenol	
	CV026	<i>E. amylovora</i>	CV026	<i>E. amylovora</i>
8.00	—	—	—	—
4.00	—	—	—	—
2.00	—	W	—	—
1.00	W	+	—	—
0.50	+	+	W	W
0.25	+	+	+	+
0.13	+	+	+	+

—: None growth; +: Normal growth; W: Weak growth.

2.1.2 不同浓度粗提物对菌株 CV026 群体感应抑制效果

不同浓度粗提物对菌株 CV026 群体感应抑制效果见图 1, 由图 1 可知, 菌株 D67 粗提物对菌株 CV026 具有较强的群体感应抑制活性, 并呈现明显浓度依赖性, 在其 0.25 mg/mL (1/8 MIC) 浓度时仍表现出明显群体感应抑制活性, 略低于同浓度阳性对照丁香酚(1/2 MIC)。

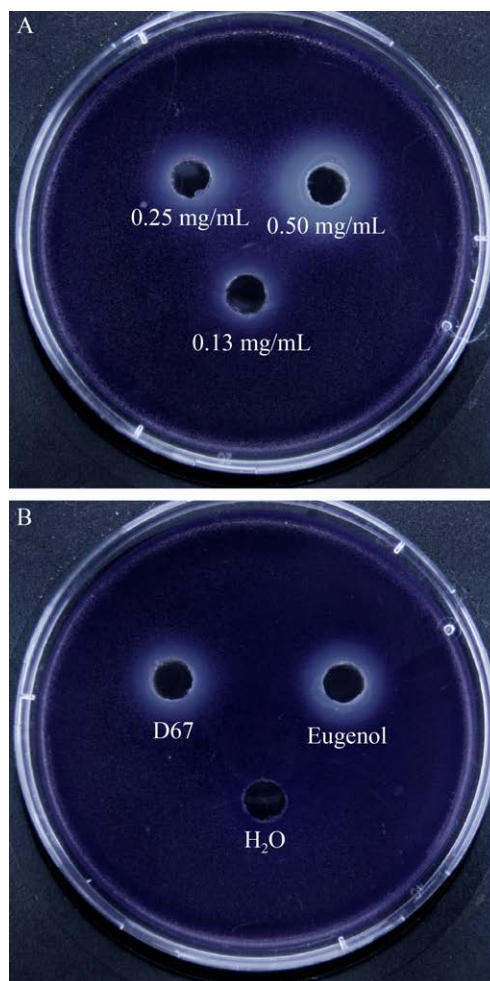


图 1 不同浓度粗提物对菌株 CV026 群体感应抑制效果 A: 0.13–0.50 mg/mL 粗提物处理组; B: 0.25 mg/mL 粗提物及对照。

Figure 1 The inhibitory effect of different concentrations of crude extracts on CV026 quorum sensing. A: 0.13–0.50 mg/mL crude extract treatment group; B: 0.25 mg/mL crude extract and control.

2.2 粗提物对梨火疫病原菌毒力因子的影响

2.2.1 粗提物对梨火疫病原菌群集和泳动性的抑制作用

梨火疫病原菌具有较强的泳动性(图 2A), 观察粗提物对梨火疫病原菌群集和泳动性的影响, 结果显示, 当加入 0.25 mg/mL (1/8 MIC) 的粗提物后菌落泳动性明显受到抑制(图 2B), 但略低于同浓度丁香酚的抑制效果(图 2C)。由于梨火疫病原菌群集作用不明显(图 2D), 所以当加入粗提物和丁香酚后其群集效果不明显(图 2E、2F)。

2.2.2 粗提物对梨火疫病原菌形成生物膜的抑制作用

生物膜可以加强菌株的定殖能力, 使其大量繁殖还能减缓抗菌药物作用细胞, 从而降低

药物活性, 是欧文氏菌群体感应的明显标志。采用无明显抑制梨火疫欧文氏菌生长的不同浓度粗提物和丁香酚进行菌株培养和生物膜检测, 结果如图 3 所示, 菌株 D67 粗提物对梨火疫病原菌生物膜形成具有明显抑制, 呈现明显浓度依赖性。在 0.25 mg/mL 粗提物(1/8 MIC) 浓度下, 生物膜抑制率为 60.1%, 与同浓度丁香酚无显著差异。

2.2.3 粗提物对梨火疫病原菌产生胞外多糖的抑制作用

胞外多糖是生物膜形成的主要因素, 可通过增强欧文氏菌间通信能力间接增强致病活性, 当培养基中添加不同浓度粗提物, 检测其对梨火疫病原菌产生胞外多糖的影响, 结果如图 4 所示, 梨火疫病原菌胞外多糖产生对粗提物表现极为敏感, 在相同浓度 0.25 mg/mL (1/8 MIC)

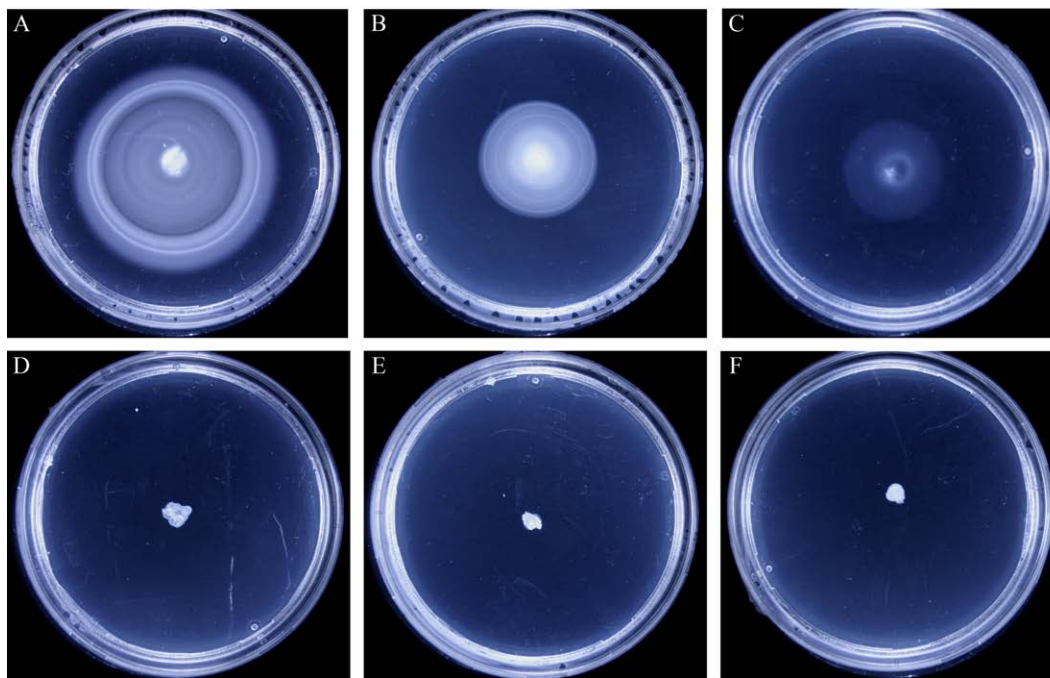


图 2 菌株 D67 粗提物对梨火疫病原菌群集和泳动性的影响 A: 泳动实验阴性对照组; B: 泳动实验 D67 粗提物处理组; C: 泳动实验阳性对照组; D: 群集实验阴性对照组; E: 群集实验 D67 粗提物处理组; F: 群集实验阳性对照组。

Figure 2 Effects of crude extracts of D67 on clustering and swimming motility of *Erwinia amylovora*. A: Negative control group of swimming experiment; B: Swimming experiment D67 crude extract treatment group; C: Positive control group of swimming experiment; D: Negative control group of cluster experiment; E: Cluster experiment D67 crude extract treatment group; F: Positive control group of cluster experiment.

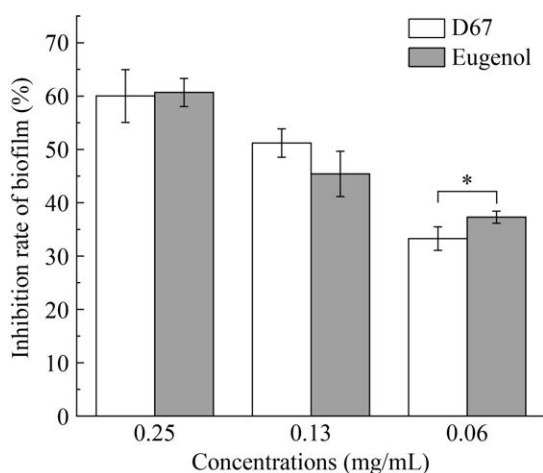


图 3 不同浓度粗提物对梨火疫病原菌形成生物膜的抑制率

Figure 3 Inhibition rate of different concentrations of crude extracts on biofilm formation of *Erwinia amylovora*. *: $P < 0.05$.

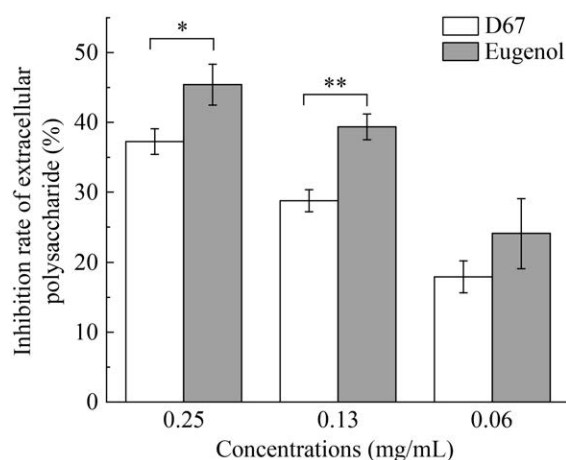


图 4 不同浓度粗提物对梨火疫病原菌产生胞外多糖的抑制率

Figure 4 Inhibition rate of different concentrations of crude extracts on extracellular polysaccharides produced by *Erwinia amylovora*. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

时, 丁香酚对梨火疫病原菌形成胞外多糖的抑制率略强于菌株 D67 粗提物, 丁香酚的抑制率为 45.40%, 而菌株 D67 对其抑制率为 35.93%。

2.2.4 粗提物对梨火疫病原菌蛋白酶的抑制作用

欧文氏菌释放的蛋白酶可以通过降解体外

的蛋白质, 进而产生多种含有氮和硫的挥发性和刺激性化合物, 促进欧文氏菌对外界的侵袭和扩散。当粗提物浓度为 0.25–1.00 mg/mL 时, 对蛋白酶产量均有显著的抑制效果(图 5), 其抑制率分别为 12.79%、19.86%、22.82%。

2.2.5 粗提物对梨火疫病原菌纤维素酶活的抑制作用

欧文氏菌产生纤维素酶破坏植物表面保护层, 从而深入侵染植物。如图 6 所示, 纤维素酶产量随着粗提物浓度的增加, 呈浓度依赖性下降。在粗提物浓度为 1 mg/mL 时对欧文氏菌产生纤维素酶有极显著的抑制作用, 抑制率为 34.70%。当粗提物浓度在 0.06–0.50 mg/mL 时对纤维素酶的产生也具有显著抑制作用, 在粗提物浓度为 0.5 mg/mL 时抑制率为 28.70%。

2.2.6 粗提物对梨火疫病原菌木聚糖酶活的抑制作用

木聚糖酶可以降解木聚糖, 在病原菌侵染植物时分解植物细胞壁, 也是重要的毒力因子之一。如图 7 所示, 在 0.13–1.00 mg/mL 粗提物浓度下, 其对欧文氏菌产生木聚糖酶具有极其显著的抑制作用, 并呈现明显的浓度依赖性。

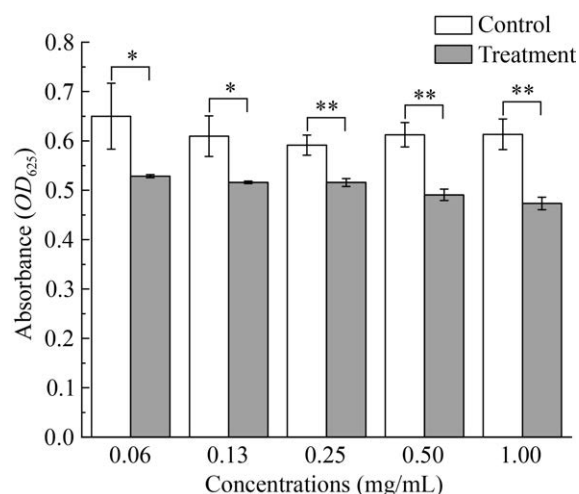


图 5 不同浓度粗提物对梨火疫病原菌蛋白酶的影响

Figure 5 Effects of different concentrations of crude extracts on protease of *Erwinia amylovora*. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

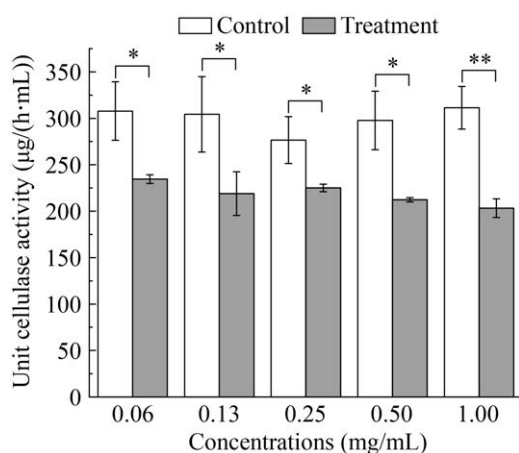


图 6 不同浓度粗提物对梨火疫病病原菌纤维素酶活的影响

Figure 6 Effects of different concentrations of crude extracts on cellulase of *Erwinia amylovora*. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

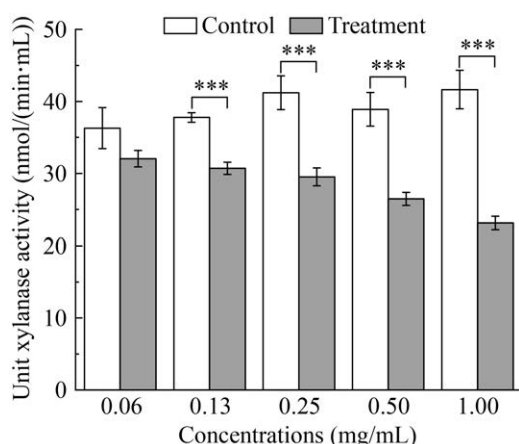


图 7 不同浓度粗提物对梨火疫病病原菌木聚糖酶活的影响

Figure 7 Effects of different concentrations of crude extracts on xylanase activity of *Erwinia amylovora*. ***: $P < 0.001$.

在 1 mg/mL 粗提物(1/2 MIC)浓度下抑制率可达 44.40%，而在 0.06 mg/mL 粗提物(1/32 MIC)浓度时，抑制效果不显著。

2.2.7 粗提物对梨火疫病病原菌果胶裂解酶活的抑制作用

果胶裂解酶可以裂解植物中的果胶，是梨火疫病病原菌入侵梨树的重要毒力因子之一。粗提物对果胶裂解酶的影响结果如图 8 所示，当

粗提物浓度为 0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL 时，菌株产生果胶裂解酶受到极显著抑制，抑制率分别为 31.4%和 34.80%；当粗提物浓度低于 0.25 mg/mL 时，抑制效果不显著。

2.2.8 粗提物对梨火疫病病原菌多聚半乳糖醛酸酶活的抑制作用

多聚半乳糖醛酸酶可以降解植物细胞壁，导致组织软化。如图 9 所示，在粗提物浓度为 0.06–1.00 mg/mL 时，对菌株产生多聚半乳糖醛酸酶均具有显著的抑制活性，在 1.00 mg/mL 粗提物(1/2 MIC)时，抑制率可达 76.45%；在 0.06 mg/mL 粗提物(1/32 MIC)浓度时，抑制率仍可达到 25.81%。

2.3 粗提物对梨火疫病病原菌防效测定结果

采用梨树离体叶片法测定粗提物对梨火疫病的防治效果，喷洒了梨火疫病病原菌的阳性对照叶片呈现明显菌株感染症状，叶片出现大面积黑斑，并且病原菌随着叶脉有明显扩散痕迹；相较于阳性对照组，采用先喷洒梨火疫病病原菌再喷洒 1 mg/mL 粗提物(1/2 MIC)的实验处理表现出较好的防治效果，叶片无明显病斑(图 10)，与水处理阴性对照呈现相似叶片状况。

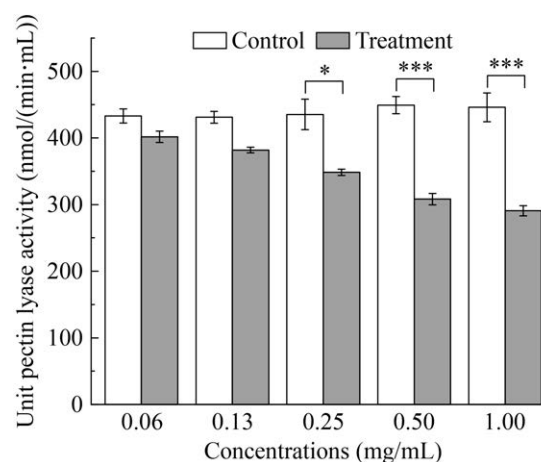


图 8 不同浓度粗提物对梨火疫病病原菌果胶裂解酶活的影响

Figure 8 Effects of different concentrations of crude extracts on pectin lyase of *Erwinia amylovora*. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

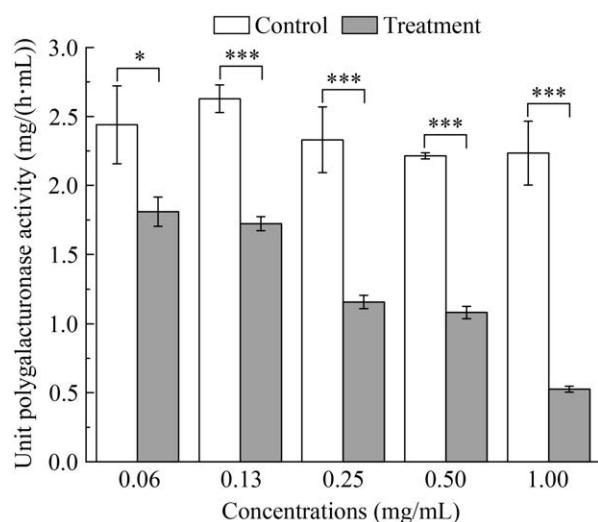


图 9 不同浓度粗提物对梨火疫病病原菌多聚半乳糖醛酸酶活的影响

Figure 9 Effects of different concentrations of crude extracts on polygalacturonase of *Erwinia amylovora*. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

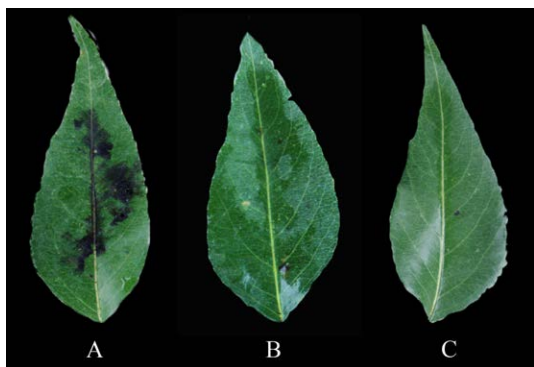


图 10 离体叶片上菌株 D67 粗提物对梨火疫病病原菌防效 A: 阳性对照; B: 阴性对照; C: 菌株 D67 处理。

Figure 10 Efficacy of strain D67 crude extract on detached leaves of pear against *Erwinia amylovora*. A: Positive control; B: Negative control; C: Strain D67 treatment.

3 讨论

解淀粉欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)主要侵染蔷薇科植物,可导致梨、苹果等 40 多个属 220 多种植物发病^[20],还能引发白菜软腐病和相关蔬菜细菌性根茎腐烂病等病害。欧文氏菌作

为革兰氏阴性菌,其群体感应主要受 *N*-酰基高丝氨酸内酯(*N*-acyl-homoserine lactones, AHLs)类和 AI-2 信号分子调控^[21]。相关研究表明,在欧文氏菌(*Erwinia* spp.)中,高丝氨酸内酯类信号分子发挥着关键作用,可以调控欧文氏菌的毒力因子,如胞外酶的分泌、细菌的运动能力及生物膜的形成,这些特性对于细菌的致病性和环境适应性至关重要^[22]。此外,AHLs 在生物膜形成过程中具有强化作用,能够增加细菌在生物膜上的黏附力,从而增强细菌在特定环境中的稳定性和生存能力^[23]。

在前期研究中,从新疆库木塔格沙漠中分离出一株链霉菌潜在新种 D67,并利用紫色色小杆菌群体感应报告菌株 CV026 自身不产生 AHLs 类信号分子,只有在添加外源 AHLs 时才会启动其群体感应系统并产生紫色素这一特性,检测发现菌株代谢产物中具有破坏 AHLs 或抑制 AHLs 类信号分子的群体感应抑制剂,并在菌株 CV026 检测平板上形成具有菌株生长但不产生紫色的模糊透明圈^[15]。该菌发酵液对菌株 CV026 和铜绿假单胞菌展现出明显的群体感应抑制活性,能明显抑制铜绿假单胞菌的群集和泳动性,对其生物膜、绿脓菌素和鼠梨糖脂等毒力因子代谢表现出不同程度的抑制效果^[15]。本研究对菌株 D67 的发酵粗提物开展了进一步研究,发现其对梨火疫病病原菌 MIC 为 2 mg/mL,并且在 0.25 mg/mL (1/8 MIC)对菌株 CV026 表现出较好的群体感应抑制活性,略低于同浓度下丁香酚(1/2 MIC)阳性对照,但考虑到粗提物中非活性物质和丁香酚潜在抑菌影响,菌株 D67 粗提物中可能存在群体感应抑制活性大于或等于丁香酚的活性物质,相关推测有待进一步验证。

梨火疫病病原菌的传播与其生物膜有着密切关系,其可使病原菌在侵染植物后大量繁殖,并引起病原菌在宿主中系统性传播,在侵染不久后在花、枝、果表面产生菌脓,其含菌量可达 10^{10} CFU/mL,形成主要的传播源^[24]。相关研究表明,通过抑制欧文氏菌群体感应能有效

降低其生物膜的产生, Zhang 等^[25]发现在亚抑菌浓度下己醛可以有效降低胡萝卜欧文氏菌群体感应效应, 进而抑制菌体生物膜和胞外多糖的产生, 降低白菜的软腐病发生。本研究发现菌株 D67 粗提物对病原菌形成生物膜具有显著的抑制效果, 在 0.25 mg/mL 粗提物(1/8 MIC)浓度下, 抑制率可达 60.1%, 与同浓度丁香酚阳性对照处理效果相当, 但抑制胞外多糖形成效果显著低于阳性对照。同时, 研究发现粗提物可以明显抑制菌株的泳动性。

欧文氏菌会产生多种胞外酶如纤维素酶、木聚糖酶等, 加速植物组织软化从而分解植物组织, 有助于病原菌定殖到植物的内部, 从而加速病原菌的侵染和植物组织的病^[26]。葛玮珍^[27]发现在欧文氏菌侵染植物时, 果胶裂解酶发挥着非常重要的作用, 果胶裂解酶的产量越多植物软腐发病越严重; Amadioha^[28]发现多聚半乳糖醛酸酶是破坏马铃薯组织结构、导致细胞死亡的主要原因。Paccanaro 等^[29]发现小麦赤霉病菌中的 *xyl1* 是木聚糖酶的基因, 将基因敲除则导致禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)的致病性明显降低。本研究发现菌株 D67 粗提物对病原菌代谢胞外酶的产量均具有显著的抑制效果, 在 1 mg/mL 粗提物(1/2 MIC)浓度下, 对果胶裂解酶的抑制率可达 34.80%; 对木聚糖酶的抑制率可达 44.40%; 特别是对多聚半乳糖醛酸酶的抑制尤为显著, 抑制率高达 76.45%。上述研究结果为进一步开发利用菌株 D67 开展梨火疫病生物防治提供了研究基础。

4 结论

菌株 D67 发酵粗提物对梨火疫欧文氏菌的 MIC 为 2 mg/mL, 在亚抑菌浓度下表现出较好的群体感应抑制活性, 并对多种毒力因子均有较为显著的抑制作用, 其在 0.25 mg/mL (1/8 MIC) 浓度时对其生物膜、胞外多糖的抑制率仍能达到 60.1%、36.93%; 1 mg/mL (1/2 MIC) 对多聚半乳糖醛酸酶和果胶裂解酶等毒力因子的抑制

率高达 76.45% 和 34.80%, 并展现出较好的梨火疫病防治潜力。

作者贡献声明

江星彤: 参与 D67 粗提液制备及对欧文氏菌抑制实验、初稿撰写和修订; 柏晓玉: 参与胞外酶抑制实验; 冯玉莲: 参与粗提液制备实验; 李雪: 参与对欧文氏菌抑制实验; 李梅: 参与胞外酶抑制实验; 朱艳蕾: 参与数据分析和文稿修订; 张志东: 参与文稿修订的监督和资金支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] CHATTERJEE A. Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. edited by J.L. Vanneste[J]. European Journal of Plant Pathology, 2001, 107(5): 569.
- [2] 黄伟, 盛强, 罗明, 马德英, 张春竹. 新疆库尔勒香梨火疫病的发生特点及防控建议[J]. 植物保护, 2022, 48(6): 207-213, 231.
- [3] HUANG W, SHENG Q, LUO M, MA DY, ZHANG CZ. Occurrence status of fire blight on Korla fragrant pear in Xinjiang and the control proposals[J]. Plant Protection, 2022, 48(6): 207-213, 231 (in Chinese).
- [4] 李雅华, 咸洪泉, 李树文, 樊连梅, 高彩霞. 拮抗胡萝卜软腐欧文氏杆菌的放线菌的分离和筛选[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2009, 26(2): 143-146.
- [5] LI YH, XIAN HQ, LI SW, FAN LM, GAO CX. Isolating and screening of antagonistic *Actinomyces* to *Erwinia carotovora* var. *carotovora*[J]. Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science Edition), 2009, 26(2): 143-146 (in Chinese).
- [6] 韩丽丽, 荆琚, 王杰花, 陈卫民. 杏树梨火疫病在中国首次发生[J]. 植物检疫, 2022, 36(6): 46-49.
- [7] HAN LL, JING J, WANG JH, CHEN WM. First report of pear fire blight on apricot caused by *Erwinia amylovora* in China[J]. Plant Quarantine, 2022, 36(6): 46-49 (in Chinese).
- [8] ZHAO YQ, TIAN YL, WANG LM, GENG GM, ZHAO WJ, HU BS, ZHAO YF. Fire blight disease, a fast-approaching threat to apple and pear production in China[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2019, 18(4): 815-820.
- [9] DOLOTKELDIEVA T, BOBUSHOVA S, SCHUSTER C, KONURBAEVA M, LECLERQUE A. Isolation and genetic characterization of *Erwinia amylovora* bacteria from Kyrgyzstan[J]. European Journal of Plant Pathology, 2019, 155(2): 677-686.
- [10] 董志铭, 白欣禾, 窦新玉, 罗明, 吕文, 韩剑. 捕食

- 梨火疫病菌黏细菌菌株的筛选及其生防潜力[J]. 果树学报, 2024, 41(1): 143-154.
- DONG ZM, BAI XH, DOU XY, LUO M, LÜ W, HAN J. Screening and biocontrol potential of myxobacteria preying on pathogenic bacteria causing pear fire blight[J]. Journal of Fruit Science, 2024, 41(1): 143-154 (in Chinese).
- [8] KALIA VC. Quorum sensing inhibitors: an overview[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(2): 224-245.
- [9] PAPENFORT K, BASSLER BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(9): 576-588.
- [10] LIU L, YAN YP, FENG LF, ZHU JL. Quorum sensing *asaI* mutants affect spoilage phenotypes, motility, and biofilm formation in a marine fish isolate of *Aeromonas salmonicida*[J]. Food Microbiology, 2018, 76: 40-51.
- [11] DEFOIRDT T. Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy[J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(4): 313-328.
- [12] 刘萍, 钱嘉兴, 谢连欢, 成超钊, 莫杰, 缪莉. 具有群体感应抑制活性的红树林底泥海洋放线菌的分离筛选与鉴定[J]. 工业微生物, 2023, 53(4): 164-169.
- LIU P, QIAN JX, XIE LH, CHENG CF, MO J, MIAO L. Isolation, screening and identification of marine actinomycetes from mangrove sediments with quorum sensing inhibitory activity[J]. Industrial Microbiology, 2023, 53(4): 164-169 (in Chinese).
- [13] AL-MAHDI AY. Isolation and identification of bioactive actinomycete isolates from Yemen soils[J]. Thamar University Journal of Natural & Applied Sciences, 2023, 4(4): 109-119.
- [14] REHMAN ZU, LEIKNES T. Quorum-quenching bacteria isolated from red sea sediments reduce biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1354.
- [15] ZHANG ZD, SUN Y, YI YY, BAI XY, ZHU LY, ZHU J, GU MY, ZHU YL, JIANG L. Screening and identification of a *Streptomyces* strain with quorum-sensing inhibitory activity and effect of the crude extracts on virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microorganisms, 2023, 11(8): 2079.
- [16] 刘佳宜, 李婷婷, 励建荣, 谢晶, 林洪, 王轰, 申照华, 郭晓华. 乙基麦芽酚对杀鲑气单胞菌群体感应及腐败活性的抑制作用[J]. 食品科学, 2021, 42(17): 27-33.
- LIU JY, LI TT, LI JR, XIE J, LIN H, WANG H, SHEN ZH, GUO XH. Inhibitory effect of ethyl maltol on quorum sensing and spoilage capacity of *Aeromonas salmonicida*[J]. Food Science, 2021, 42(17): 27-33 (in Chinese).
- [17] 柏晓玉, 朱丽英, 包慧芳, 江凌, 朱静, 顾美英, 朱艳蕾, 张志东. 一株群体感应抑制活性链霉菌的筛选鉴定及其毒力因子代谢能力分析[J]. 新疆农业科学, 2024, 61(4): 1011-1020.
- BAI XY, ZHU LY, BAO HF, JIANG L, ZHU J, GU MY, ZHU YL, ZHANG ZD. Screening and identification of a *Streptomyces* strain with quorum sensing inhibitory activity and effect of the crude extracts on virulence factors of *Erwinia amylovora*[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2024, 61(4): 1011-1020 (in Chinese).
- [18] ZHANG JM, RUI X, WANG L, GUAN Y, SUN XM, DONG MS. Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation[J]. Food Control, 2014, 42: 125-131.
- [19] 于福浩, 姜在祥, 王洪新, 寇兴然. 咖啡酸对铜绿假单胞菌群体感应的抑制及毒力因子降低的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(6): 56-63.
- YU FH, LOU ZX, WANG HX, KOU XR. Effect of caffeic acid on quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(6): 56-63 (in Chinese).
- [20] 刘凤权, 明亮, 赵延存, 孙伟波. 中国梨火疫病发生与防控进展[J]. 落叶果树, 2023, 55(6): 1-7.
- LIU FQ, MING L, ZHAO YC, SUN WB. Progress in the occurrence and control of pear fire blight in China[J]. Deciduous Fruits, 2023, 55(6): 1-7 (in Chinese).
- [21] RASCH M, ANDERSEN JB, NIELSEN KF, FLODGAARD LR, CHRISTENSEN H, GIVSKOV M, GRAM L. Involvement of bacterial quorum-sensing signals in spoilage of bean sprouts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(6): 3321-3330.
- [22] ZHANG Y, YU H, XIE YF, GUO YH, CHENG YL, YAO WR. Inhibitory effects of hexanal on acylated homoserine lactones (AHLs) production to disrupt biofilm formation and enzymes activity in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas fluorescens*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 60(1): 372-381.
- [23] 董卫卫. *Kurthia huakuii* N-酰基高丝氨酸内酯酶(AiiK)的鉴定及其在致病菌群感淬灭上应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- DONG WW. The identification of AiiK from *Kurthia huakuii* and its application on quenching pathogens[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [24] 葛艺欣. 梨火疫病菌对春雷霉素的抗性机制以及丁香假单胞菌 RsmA 蛋白的功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- GE YX. Study on mechanism of kasugamycin resistance in *Erwinia amylovora* and functions of RsmA proteins in *Pseudomonas syringae*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [25] ZHANG Y, KONG J, HUANG F, XIE YF, GUO YH, CHENG YL, QIAN H, YAO WR. Hexanal as a QS inhibitor of extracellular enzyme activity of *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas fluorescens* and its application in vegetables[J]. Food Chemistry, 2018, 255: 1-7.
- [26] TOTH IK, BELL KS, HOLEVA MC, BIRCH PRJ. Soft rot *erwiniae*: from genes to genomes[J]. Molecular Plant Pathology, 2003, 4(1): 17-30.
- [27] 葛玮珍. 魔芋软腐病发病过程动态研究及基于 QS 系统的防治研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- GE WZ. Study on the dynamic infection process of soft rot disease in konjac and its control based on quorum sensing[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013 (in Chinese).
- [28] AMADIOHA A. Interaction of hydrolytic enzymes produced by *Rhizoctonia bataticola* during rot development[J]. Acta Phytopathologica Et Entomologica Hungarica, 1997, 32(1/2): 79-87.
- [29] PACCANARO MC, SELLA L, CASTIGLIONI C, GIACOMELLO F, MARTÍNEZ-ROCHA AL, D'OVIDIO R, SCHÄFER W, FAVARON F. Synergistic effect of different plant cell wall-degrading enzymes is important for virulence of *Fusarium graminearum*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2017, 30(11): 886-895.