

## 研究报告

## 库尔勒香梨黑斑病菌拮抗菌筛选及其抑菌机理

郝金辉<sup>1</sup>, 包慧芳<sup>\*2</sup>, 王宁<sup>2</sup>, 詹发强<sup>2</sup>, 侯新强<sup>2</sup>, 郑素慧<sup>3</sup>, 何亚芳<sup>1</sup>, 史应武<sup>2</sup>, 杨蓉<sup>2</sup>, 龙宣杞<sup>\*2</sup>

1 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046

2 新疆农业科学院微生物应用研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091

3 新疆农业科学院农产品贮藏加工研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091

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 Jinhui, Bao Huifang, Wang Ning, Zhan Faqiang, Hou Xinqiang, Zheng Suhui, He Yafang, Shi Yingwu, Yang Rong, Long Xuanqi. Screening and possible mechanism of strains against black spot of Korla pear[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3709-3721

**摘要:** 【背景】由互隔交链孢(*Alternaria alternata*)引起的黑斑病是库尔勒香梨采后贮期的主要病害之一, 严重影响果实品质, 造成巨大的经济损失。【目的】筛选对梨黑斑病菌具有高拮抗活性的菌株并探究其可能的抑菌机制, 为香梨采后保鲜提供理论依据。【方法】从库尔勒香梨园健康植株根际采集土壤样品, 采用稀释涂布法分离细菌并进行纯化, 通过平板对峙法和琼脂打孔法筛选对梨黑斑病菌具有显著拮抗作用的菌株, 结合形态学观察和 16S rRNA 基因序列分析进行初步鉴定; 通过平板对峙法对拮抗菌抑菌谱进行测定; 采用特异性平板定性检测拮抗菌产酶活性, 采用 3,5-二硝基水杨酸比色法及福林-酚法定量酶活; 通过孢子萌发抑制试验和扫描电镜观察, 测定拮抗菌对梨黑斑病菌的拮抗作用。【结果】筛选得到 2 株对梨黑斑病菌有较强抑制活性的菌株 JE53 和 JE56, 经分析鉴定为多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)及枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 其发酵上清液对梨黑斑病菌的抑菌圈直径分别为 22.49 mm 和 22.40 mm。抑菌谱测定结果表明, 菌株 JE53 和 JE56 对马铃薯黑痣病菌等 9 种植物病原菌均有不同程度的抑制作用。胞外酶测定结果显示这 2 株菌可产生 4 种胞外酶; 其发酵上清液能够显著抑制病原菌孢子萌发, 抑制率分别为 70.30%和 88.87%; 扫描电镜发现这 2 株菌可导致病原菌菌丝表面粗糙、扭曲变形。【结论】JE53 和 JE56 对梨黑斑病菌有较好的抑制效果, 具有进一步开发和应用的潜力。

**关键词:** 梨黑斑病; 拮抗细菌; 生物保鲜

基金项目: 新疆维吾尔自治区优秀青年科技人才培养项目(2020Q027); 新疆农业科学院科技创新重点培育专项(xjkcpy-2020006)

Supported by: Outstanding Young Scientific and Technological Talents Training Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2020Q027); Key Cultivation Project of Xinjiang Academy of Agricultural Sciences (xjkcpy-2020006)

\*Corresponding authors: E-mail: BAO Huifang: bbhf777@xaas.ac.cn; LONG Xuanqi: longxq\_xj@sina.com

Received: 2022-01-05; Accepted: 2022-03-19; Published online: 2022-04-13

## Screening and possible mechanism of strains against black spot of Korla pear

HAO Jinhui<sup>1</sup>, BAO Huifang<sup>\*2</sup>, WANG Ning<sup>2</sup>, ZHAN Faqiang<sup>2</sup>, HOU Xinqiang<sup>2</sup>, ZHENG Suhui<sup>3</sup>, HE Yafang<sup>1</sup>, SHI Yingwu<sup>2</sup>, YANG Rong<sup>2</sup>, LONG Xuanqi<sup>\*2</sup>

1 College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang, China

2 Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, Xinjiang, China

3 Institute of Agricultural Storage and Processing, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, Xinjiang, China

**Abstract:** [Background] *Alternaria alternata*-induced black spot, among the major diseases of Korla pear during storage, lowers the quality of the fruit, thus causing huge economic loss. [Objective] To screen strains with strong inhibitory effect on *A. alternata*, explore the underlying mechanism, and thus to lay a theoretical basis for postharvest preservation of Korla pear. [Methods] The rhizosphere soil samples of healthy Korla pear plants were collected and bacteria were isolated and purified by serial dilution and plating. The antagonistic strains were screened by plate confrontation assay and cylinder plate method. The preliminary identification of antagonistic bacteria was based on morphological characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis. The antifungal spectrum of antagonistic bacteria was determined by plate confrontation assay. The extracellular enzyme species of antagonistic bacteria were detected by specific plate. The enzyme activity was quantified with 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetric method and Folin-phenol method. Spore germination test and scanning electron microscopy (SEM) were employed to detect the antagonistic effect of the bacteria on *A. alternaria*. [Results] JE53 and JE56 with strong activity against *A. alternaria* were screened out from 152 isolates, with inhibition zone diameters of 22.49 mm and 22.40 mm, respectively. According to phylogeny analysis, they were identified as *Paenibacillus polymyxa* (JE53, GenBank accession No. OL966428) and *Bacillus subtilis* (JE56, GenBank accession No. OL966429), separately. The results of antifungal spectrum showed that JE53 and JE56 had different degree of inhibition on 9 plant pathogens such as *Rhizoctonia solani*. They produced four kinds of extracellular enzymes. The supernatant of the fermentation broth could significantly suppress the spore germination of *A. alternaria*, with inhibition rates of 70.30% and 88.87%, respectively. SEM showed that the suppressed hyphae were rough and distorted. [Conclusion] JE53 and JE56 inhibit *A. alternaria*, which have the potential of further development and application.

**Keywords:** pear black spot; antagonistic bacteria; biological preservation

库尔勒香梨(*Pyrus sinkiangensis* Yü)属蔷薇科(*Rosaceae*)梨属(*Pyrus* L.)中的新疆梨系统, 以其味浓、皮薄和营养丰富等优良特性而闻名于世<sup>[1]</sup>。据统计, 截至2020年, 库尔勒市香梨种植面积达3.1万hm<sup>2</sup>, 总产量40.27万t, 2019年香梨收入占总收入的28.11%, 其作为当地支柱

型产业, 具有突出的经济效益和社会效益<sup>[2]</sup>。然而, 采后病原微生物的侵染导致梨果损失严重, 带来巨大的经济损失<sup>[3]</sup>。

黑斑病(black spot)是香梨贮期的主要病害之一, 其致病菌为互隔交链孢(*Alternaria alternata*)。该病原菌一般在果实幼果期侵染,

以附着孢的形式潜伏在果皮组织, 侵染初期无任何明显症状, 贮藏一定时间后开始发病<sup>[4]</sup>。发病初期会在果皮表面出现一个至数个浅褐至灰褐色斑点, 病斑凹陷; 发病后期病斑颜色转为黑褐色, 产生褐色或黑色霉层, 范围逐渐扩大, 至全果腐烂<sup>[5]</sup>。据调查, 库尔勒香梨果实黑斑病最高侵染率可达 20%, 严重影响其外观和品质<sup>[6]</sup>。截至目前, 香梨采后的防腐保鲜手段主要包括化学方法(化学杀菌剂、1-MCP 熏蒸)和物理方法(气调、低温), 但由于它们具有对环境不友好、成本高或对病原真菌的抑制效果不佳等缺点, 寻求更有效的替代方法迫在眉睫<sup>[7-9]</sup>。目前, 生物保鲜正以其环境友好且性价比高的优点逐渐成为控制果蔬采后病害的研究热点, 也成为果蔬采后防腐保鲜的重要发展方向。

本研究从库尔勒香梨园梨树根际土壤中分离筛选出 2 株对梨黑斑病菌有较好拮抗作用的菌株 JE53 和 JE56, 通过形态学和 16S rRNA 基因序列分析进行初步鉴定并进行抑菌机理的研究, 以期为梨采后黑斑病的控制提供新的微生物材料, 并为微生物防腐保鲜剂的开发与应用提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 供试菌株

香梨黑斑病菌互隔交链孢(*A. alternata*) XL2 由本实验室分离鉴定并保存; 抑菌谱测定指示菌: 香梨腐烂病菌(*Valsa mali* var. *pyri*) FL 和哈密瓜枯萎病菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) KW2 由本实验室分离鉴定并保存, 马铃薯黑痣病菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) ZN5、马铃薯早疫病菌茄链格孢菌(*Alternatia solani*) ZN6、西瓜枯萎病菌尖孢镰

刀菌(*Fusarium oxysporum*) ZN10、水稻恶苗病菌串珠镰孢菌(*Fusarium moniliforme*) ZN12、棉花枯萎病菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) ZN15、苹果斑点落叶病菌链格孢菌(*Alternatia alternata*) ZN16 和番茄早疫病菌茄链格孢菌(*Alternatia solani*) ZN18 由中国农业大学种子健康中心李健强老师惠赠。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

引物、dNTPs 和 *Taq* 酶等试剂, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司。PCR 扩增仪, 杭州博日科技股份有限公司; 高速冷冻离心机, 艾本德公司; 紫外分光光度计, 耶拿分析仪器公司。

营养肉汤(NB)培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉浸粉 3.0, 氯化钠 5.0; 用于 JE56 摇瓶培养。改良 LB 培养基(g/L): 蔗糖 10.0, 蛋白胨 10.0, MgSO<sub>4</sub> 5.0, CaCl<sub>2</sub> 3.0; 用于 JE53 摇瓶培养。

胞外酶检测培养基按照文献[10-12]配制。纤维素酶检测培养基(g/L): 羧甲基纤维素钠 5.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.10, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25, 琼脂 20.0; 蛋白酶检测培养基: NA 培养基 100 mL+10%牛奶 10 mL (5.0 g 脱脂奶粉+50 mL 蒸馏水溶解后 0.9×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 15 min); 几丁质酶检测培养基(g/L): 1% (质量体积分数)胶体几丁质 2.0 mL, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.50, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.010, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.30, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.70, ZnSO<sub>4</sub> 0.001, 琼脂 20.0, pH 7.2-7.4; 葡聚糖酶检测培养基(g/L): 葡聚糖 5.0, 蛋白胨 10.0, 刚果红 0.40, NaCl 5.0, 琼脂 20.0, pH 5.5-6.0。

蛋白酶发酵培养基(g/L): 可溶性淀粉 10.0, 蛋白胨 5.0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 4.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.30, CaCl<sub>2</sub> 1.0, pH 7.0; 纤维素酶发

酵培养基：不加琼脂的纤维素酶检测培养基，pH 中性；葡聚糖酶发酵培养基(g/L)：KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.8，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 18.0，酵母膏 20.0，葡聚糖 5.0，pH 7.0；几丁质酶发酵培养基(g/L)：胶体几丁质 2.0，酵母膏 6.0，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5，GaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.0，MgSO<sub>4</sub> 0.20，pH 中性。

以上培养基均于 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。

## 1.2 方法

### 1.2.1 样品采集和细菌分离

供试土壤样品采自库尔勒梨园中健康植株的根际。采用梯度稀释涂布法，称取 10 g 土壤样品于 90 mL 无菌水中，恒温摇床(28 °C、180 r/min)充分振荡 30 min。无菌水依次稀释至 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>和 10<sup>-5</sup>倍，分别取 100 μL 各梯度稀释液涂布于 NB 培养基平板，每个稀释度重复 3 次，于 28 °C 恒温培养箱中倒置培养 1–2 d，挑取菌落形态差异明显的单菌落，在 NA 培养基上进行纯化培养并保存。

### 1.2.2 拮抗菌的初筛

采用平板对峙法：将病原菌于 28 °C 培养 3–5 d 后，用无菌打孔器(直径 8 mm)打取菌块，倒置于 PDA 平板中央，在距菌饼边缘 2 cm 处点接活化的拮抗菌株单菌落。每株菌重复 3 次，于 28 °C 恒温黑暗培养，5–7 d 后观察抑菌情况，测量抑菌带宽度。

### 1.2.3 拮抗菌的复筛

孢子悬浮液制备：将病原菌于 PDA 平板 28 °C 培养 3–5 d，加入 10 mL 无菌蒸馏水，收集菌丝和孢子混合液，三层无菌擦镜纸过滤去除菌丝，即获得病原菌孢子悬浮液<sup>[13]</sup>。用血球计数板法计数。

拮抗菌上清液制备：挑取拮抗菌单菌落接入 50 mL/250 mL NB 液体培养基中，于 28 °C、180 r/min 摇床振荡发酵 24 h，将发酵液移入无菌离心管中，12 000 r/min 离心 20 min，即获得发酵上清液。

采用琼脂打孔法对拮抗菌上清液的抑菌效果进行复筛。取 100 μL 病原菌孢子悬浮液(1×10<sup>5</sup>个/mL)涂布于 PDA 平板上，用无菌打孔器在含病原菌的平板上打孔(8 mm)，每孔加入 100 μL 拮抗菌发酵上清液，28 °C 恒温培养 3–5 d，以抑菌圈大小选出拮抗活性较强的菌株，每个处理 3 次重复。

### 1.2.4 拮抗菌的鉴定

#### (1) 形态学鉴定

将拮抗菌在 NA 培养基上划线，28 °C 恒温培养，对其菌落形态、颜色、质地等进行观察；进行革兰氏染色和显微形态观察。

#### (2) 分子生物学鉴定

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。以菌株总 DNA 为模板，利用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC A-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') PCR 扩增 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(50 μL)：模板 DNA 2 μL，10×Buffer (含 2.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>) 25 μL，Taq 聚合酶(5 U/μL) 1 μL，dNTPs (10 mmol/L) 4 μL，27F 和 1492R (10 μmol/L)各 1 μL，ddH<sub>2</sub>O 补足 50 μL。PCR 反应条件：95 °C 5 min；95 °C 30 s，57 °C 40 s，72 °C 1.5 min，30 个循环；72 °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 GenBank 登录号，采用 MEGA 11 软件中的 neighbor-joining 法构建系统发育树。

### 1.2.5 生长曲线测定

将拮抗菌株活化后接种于 50 mL 相应液体培养基中，28 °C、180 r/min 条件下振荡培养 24 h 至 OD<sub>600</sub> 为 0.8–1.0，即得种子液。将种子液以 2% 接种量分别接种于 50 mL/250 mL 相应液体培养基中，28 °C、180 r/min 摇床培养，每隔 2 h 用分光光度计测定 600 nm 处吸光

度, 以未接种的空白液体培养基作为对照, 每个处理 3 个平行, 重复 2 次, 绘制出菌株的生长曲线。

### 1.2.6 抑菌谱测定

采用平板对峙法测定拮抗菌株对马铃薯黑痣病菌、马铃薯早疫病菌、西瓜枯萎病菌、水稻恶苗病菌、棉花枯萎病菌、苹果斑点落叶病菌、番茄早疫病菌、腐烂病菌和枯萎病菌 9 种植物病原真菌的抑制效果, 重复 3 次<sup>[14]</sup>。

### 1.2.7 拮抗菌对病原菌孢子萌发的抑制作用

将病原菌孢子悬浮液( $1 \times 10^6$  个/mL)分别与拮抗菌发酵上清液原液及  $10^1$ 、 $10^2$  和  $10^3$  倍稀释液按 1:1 (体积比)加入无菌 EP 管中, 以无菌 NB 液体培养基与孢子悬浮液等体积混合为对照, 每个处理重复 3 次, 28 °C、180 r/min 振荡培养 8 h 后于光学显微镜下观察孢子萌发情况, 计算孢子萌发率及孢子萌发抑制率。

孢子萌发率(%)=萌发的孢子数/孢子总数 $\times 100$ ;

孢子萌发抑制率(%)=

$$\frac{(\text{对照组孢子萌发率} - \text{处理组孢子萌发率})}{\text{对照组孢子萌发率}} \times 100。$$

### 1.2.8 菌株产胞外酶活性检测

通过特异性平板定性检测 2 株拮抗菌的产胞外酶能力, 取 2  $\mu$ L 拮抗菌发酵液接种于蛋白酶、纤维素酶、几丁质酶和葡聚糖酶检测培养基平板, 28 °C 恒温培养 2 d, 纤维素酶检测培养基用刚果红(1 mg/mL)染色 20 min 后, 用 1 mol/L NaCl 浸泡 15 min, 观察透明圈产生情况。采用

3,5-二硝基水杨酸比色法和福林-酚法测定菌株产酶发酵液中纤维素酶活、几丁质酶活、葡聚糖酶活和蛋白酶活<sup>[11,15]</sup>。

### 1.2.9 拮抗菌对病原菌菌丝生长影响的扫描电镜观察

病原菌于 28 °C 培养 3–5 d 后, 用无菌打孔器(直径 8 mm)打取菌块, 倒置于 PDA 平板中央, 在距菌饼 2.5 cm 处分别点接活化的拮抗菌株单菌落, 于 28 °C 恒温黑暗培养 5–7 d。用碳导电胶带粘取受抑制病原菌的边缘组织和正常组织的菌丝, 将样品紧贴于样品台, 放入离子溅射装置进行表面镀金膜 240 s, 在扫描电镜下观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌的筛选结果

从库尔勒梨园土壤中分离纯化得到 152 株细菌菌株。通过平板对峙法筛选得到 9 株对梨黑斑病菌抑制活性显著且效果稳定的菌株, 其中 4 株菌的抑菌带宽度大于 5 mm, 菌株 JE53 的拮抗效果最佳, 抑菌带宽度可达 6.73 mm (表 1 和图 1)。

采用琼脂打孔法对 4 株拮抗活性较强的菌株进行复筛, 测定其发酵上清液的抑菌活性, 发现菌株 JE53 和 JE56 发酵上清液的抑菌效果显著高于其他菌株, 抑菌圈直径可达 22.49 mm 和 22.40 mm, 因此选取这 2 株菌进行后续试验 (表 1 和图 1)。

表 1 拮抗菌株对梨黑斑病菌的拮抗效果

Table 1 The inhibition effect of the antagonistic strains against *A. alternata*

| 菌株<br>Strains             | 初筛菌体对峙抑菌带宽度<br>Strains confrontation inhibition bandwidth (mm) | 复筛发酵上清液抑菌圈直径<br>The fermentation supernatant inhibition zone diameter (mm) |
|---------------------------|--|--|
| <i>P. polymyxa</i> JE53   | 6.73 $\pm$ 0.10a   | 22.49 $\pm$ 0.42a  |
| <i>B. subtilis</i> JE56   | 6.44 $\pm$ 0.07a   | 22.40 $\pm$ 0.35a  |
| <i>B. velezensis</i> 55-2 | 5.79 $\pm$ 0.07b   | 8.00 $\pm$ 0.00b   |
| <i>B. velezensis</i> 38   | 5.61 $\pm$ 0.15b   | 8.00 $\pm$ 0.00b   |

注: 表中数据为平均值 $\pm$ 标准误。同列数据中不同小写字母表示经 Duncan's 新复极差法检验, 在  $P < 0.05$  水平差异显著, 下同  
Note: Values are means $\pm$ standard errors. Different lowercase letters in a column indicate significant difference at 0.05 level by using Duncan's test analysis. The same as following.

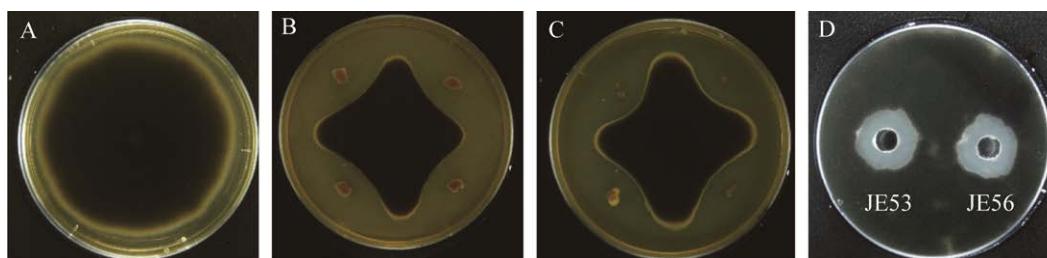


图1 拮抗菌株对梨黑斑病菌的抑制效果 A: 对照; B: 菌株 JE53 对 *A. alternata* 的抑制效果; C: 菌株 JE56 对 *A. alternata* 的抑制效果; D: 菌株 JE53 和 JE56 发酵上清液对 *A. alternata* 的抑制效果

Figure 1 Inhibition effect of antagonistic strains against *A. alternata*. A: CK; B: inhibition effect of strain JE53 on *A. alternata*; C: inhibition effect of strain JE56 on *A. alternata*; D: inhibition effect of fermentation supernatant of strain JE53 and JE56 on *A. alternata*.

## 2.2 拮抗菌的鉴定

### 2.2.1 形态学鉴定结果

拮抗菌株 JE53 和 JE56 形态特征如图 2 所示, 2 株菌在 NA 固体培养基上培养 24 h 后, JE53 菌落呈白色, 圆形, 表面光滑、不透明, 边缘整齐, 具黏性不易挑起; JE56 菌落呈乳白色并带有一些黄色, 圆形, 表面光滑。在光学显微镜下, 2 株菌菌体均呈杆状, 两端钝圆, 革兰氏染色均为阳性。

### 2.2.2 分子生物学鉴定结果

将菌株 JE53 和 JE56 的 16S rRNA 基因测序结果进行序列分析及相似性比对, 构建系统发育树(图 3), 结果表明菌株 JE53 (登录号为 OL966428) 与多粘类芽孢杆菌 (*P. polymyxa*)

DSM 36T (登录号为 HG324077.1) 的相似性最高, 达 99% 以上, 初步鉴定其为多粘类芽孢杆菌 (*P. polymyxa*); 菌株 JE56 (登录号为 OL966429) 与枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) NCIB3610 (登录号为 EF191549.1) 的相似性最高, 达 99% 以上, 初步鉴定其为枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)。

### 2.3 拮抗菌生长曲线的测定结果

拮抗菌株 JE53 和 JE56 的生长变化趋势如图 4 所示。结果表明, JE53 在 2–4 h 为延迟生长期, 4–14 h 为对数增长期, 14 h 后进入生长稳定期; JE56 在 2–4 h 时为延迟生长期, 4–12 h 时为对数增长期, 12–22 h 时为稳定期, 22 h 后进入衰退期。

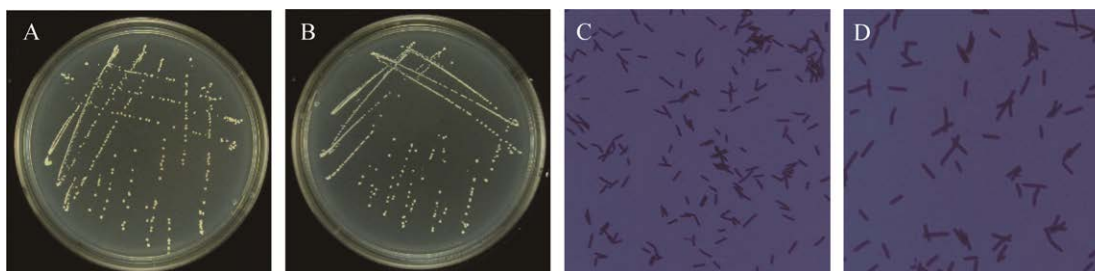


图2 拮抗菌株的形态特征 A: 菌株 JE53 菌落形态; B: 菌株 JE56 菌落形态; C: 菌落 JE53 菌体形态; D: 菌株 JE56 菌体形态

Figure 2 Morphological characteristics of antagonistic strains. A: colony morphology of strain JE53; B: colony morphology of strain JE56; C: bacterial morphology of colony JE53; D: bacterial morphology of strain JE56.

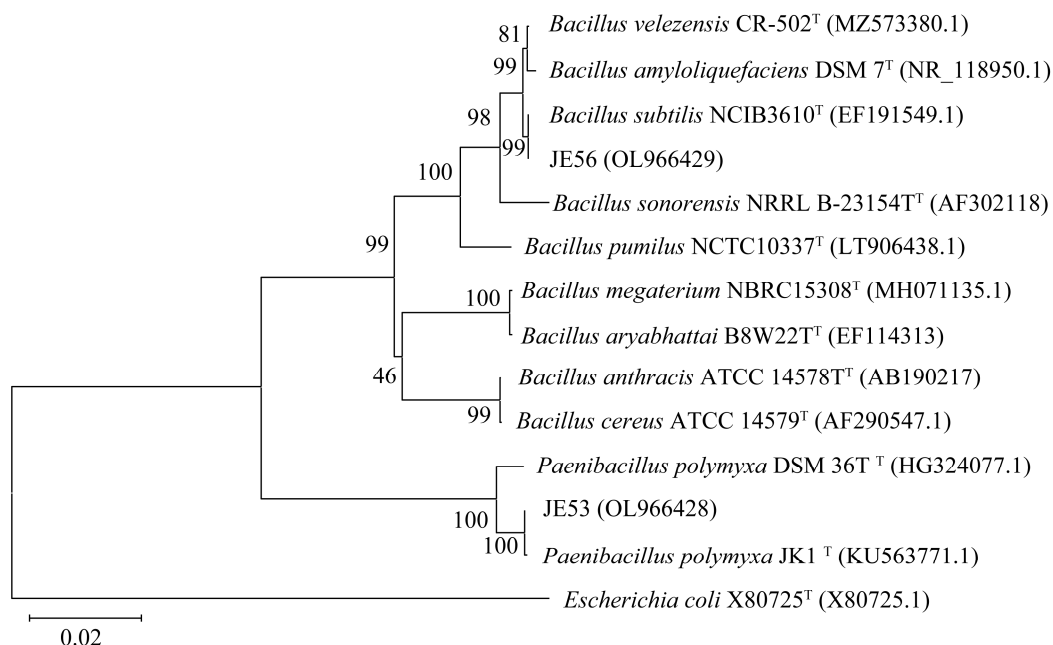


图3 菌株 JE53 和 JE56 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 分支上的数字为 bootstrap 值, 表示构建系统进化树时计算 1 000 次时形成该节点的百分比, 只显示大于 50% 的值; 括号内数值为 GenBank 登录号; 标尺 0.02 代表 50% 的 16S rRNA 基因序列的进化差异

Figure 3 Phylogenetic tree of strains JE53 and JE56 based on 16S rRNA gene sequences. 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 0.02 represents 50% evolutionary variation in the 16S rRNA gene sequence.

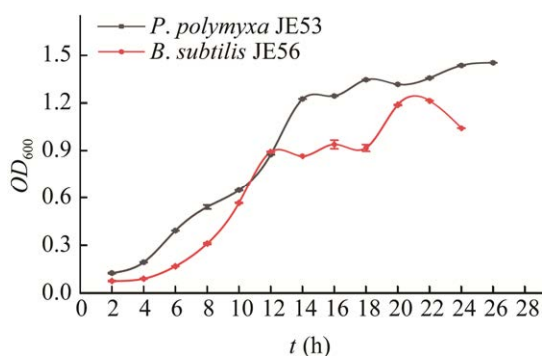


图4 拮抗菌的生长曲线  
Figure 4 Growth curve of antagonistic strains.

### 2.4 拮抗菌抑菌谱的测定结果

拮抗菌 JE53 和 JE56 对 9 株供试植物病原真菌均表现出不同程度的抑制作用(表 2)。其中, JE53 对 ZN6 的抑菌作用最明显(抑菌带宽度为 10.02 mm), 对 ZN10 抑制作用最弱(抑菌带宽度为 1.00 mm); 菌株 JE56 对 ZN16 的抑

表 2 拮抗菌株对 9 株植物病原真菌菌落生长的抑制作用

Table 2 Inhibitory effects of antagonistic strains on colony growth of 9 plant pathogenic fungi

| 病原指示菌<br>Indicator fungi           | 抑菌带宽<br>Inhibition bandwidth (mm) |                         |
|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
|                                    | <i>P. polymyxa</i> JE53           | <i>B. subtilis</i> JE56 |
| <i>A. solani</i> ZN6               | 10.02±0.02a                       | 7.54±0.02e              |
| <i>V. mali</i> var. <i>pyri</i> FL | 7.05±0.02b                        | 5.97±0.01g              |
| <i>F. moniliforme</i> ZN12         | 6.65±0.02c                        | 8.54±0.02c              |
| <i>A. alternata</i> ZN16           | 6.48±0.02d                        | 9.75±0.06a              |
| <i>F. oxysporum</i> KW2            | 6.12±0.00e                        | 6.03±0.01g              |
| <i>R. solani</i> ZN5               | 6.08±0.01e                        | 8.18±0.02d              |
| <i>A. solani</i> ZN18              | 6.00±0.02f                        | 8.93±0.03b              |
| <i>F. oxysporum</i> ZN15           | 4.53±0.06g                        | 7.02±0.01f              |
| <i>F. oxysporum</i> ZN10           | 1.00±0.02h                        | 4.14±0.02h              |

注: 同列数据中不同小写字母表示经 Duncan's 新复极差法检验, 在  $P < 0.05$  水平差异显著

Note: Different lowercase letters in a column indicate significant difference at 0.05 level by using Duncan's test analysis.

菌作用最强(抑菌带宽度为 9.75 mm), 对 ZN10 抑制作用最弱(抑菌带宽度为 4.14 mm)。实验结果表明 2 株拮抗菌具有广谱的抑菌性能。

## 2.5 拮抗菌发酵液对梨黑斑病菌孢子萌发的影响

由表 3 可知, 菌株 JE53 和 JE56 的不同浓度发酵上清液对病原菌孢子萌发均有抑制作用, 培养 8 h 后镜检(20×40)显示, 对照组孢子萌发率达到 87.99% 时, 处理组孢子萌发率显著低于对照组。菌株 JE53 和 JE56 发酵原液对病原菌孢子萌发抑制率分别为 70.30% 和 88.87%。随着稀释倍数的增大, 拮抗菌发酵上清液对病原菌孢子萌发的抑制作用降低。

## 2.6 拮抗菌产酶能力的测定结果

### 2.6.1 平板透明圈法对菌株 JE53 和 JE56 产酶的测定结果

4 种胞外酶检测结果显示(图 5): 菌株 JE53 和 JE56 在纤维素酶、蛋白酶和葡聚糖酶检测培养基中均可产生较大降解圈, 在几丁质酶检测培养基中无明显降解圈。

### 2.6.2 标准曲线的建立

葡萄糖标准曲线、N-乙酰氨基葡萄糖标准曲线、L-酪氨酸标准曲线对应线性方程分别为:  $y=0.0046x-0.0250$ ;  $y=0.0061x-0.0816$ ;  $y=0.0763x+0.0357$ 。其相关性系数  $R^2$  分别为 0.9989、0.9952 和 0.9948, 线性关系良好。

表 3 菌株 JE53 和 JE56 发酵液对病原菌孢子萌发的影响

Table 3 Effect of the fermentation liquid of strains JE53 and JE56 on spore germination rate

| 发酵上清液浓度<br>Concentration of fermentation supernatant                           | <i>P. polymyxa</i> JE53     |                                | <i>B. subtilis</i> JE56     |                                |
|--|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
|  | 萌发率<br>Germination rate (%) | 孢子萌发抑制率<br>Inhibition rate (%) | 萌发率<br>Germination rate (%) | 孢子萌发抑制率<br>Inhibition rate (%) |
| 对照<br>Control  | 87.99±0.79a                 | —                              | 87.99±0.79a                 | —                              |
| 原液<br>Fermentation supernatant   | 26.13±0.25d                 | 70.30±0.55a                    | 9.78±0.25e                  | 88.87±0.38a                    |
| 10 倍稀释液<br>Fermentation supernatant diluted 10 times                           | 42.60±0.82c                 | 51.59±0.72b                    | 24.21±0.30d                 | 72.49±0.09b                    |
| 10 <sup>2</sup> 倍稀释液<br>Fermentation supernatant diluted 10 <sup>2</sup> times | 72.67±0.29b                 | 17.41±0.49c                    | 55.68±0.09c                 | 36.71±0.66c                    |
| 10 <sup>3</sup> 倍稀释液<br>Fermentation supernatant diluted 10 <sup>3</sup> times | 73.84±0.39b                 | 16.07±1.08c                    | 65.25±0.21b                 | 25.84±0.44d                    |

注: —: 无数据。同列数据中不同小写字母表示经 Duncan's 新复极差法检验, 在  $P<0.05$  水平差异显著

Note: —: No data. Different lowercase letters in a column indicate significant difference at 0.05 level by using Duncan's test analysis.

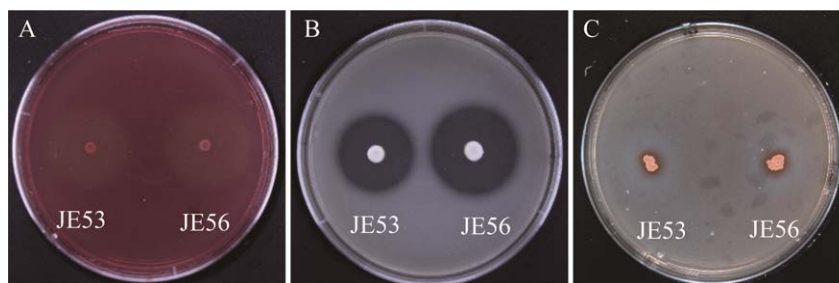


图 5 拮抗菌株产胞外酶检测 A—C: 纤维素酶、蛋白酶、葡聚糖酶检测平板

Figure 5 Extracellular enzyme activity detection of antagonistic strains. A—C represent cellulase, protease, glucanase detection plate, respectively.



### 2.6.3 拮抗菌株 JE53 和 JE56 的酶活性测定结果

图 6 结果表明, 菌株 JE53 和 JE56 均具有一定产蛋白酶、葡聚糖酶、纤维素酶和几丁质酶的能力。除几丁质酶外, 2 株菌的产酶活性基本一致。其中, JE53 和 JE56 产蛋白酶活最高为 $(10.02\pm 0.02)$  U/mL 和 $(10.08\pm 0.08)$  U/mL; JE53 产纤维素酶活、几丁质酶活和葡聚糖酶活比 JE56 高, 酶活最高分别为 $(35.51\pm 0.03)$ 、 $(17.72\pm 0.14)$ 和 $(230.94\pm 0.09)$  U/mL。

### 2.7 拮抗菌对病原菌菌丝生长的影响

扫描电镜观察菌丝形态特征(图 7)发现, 对照组菌丝体健康强壮、均匀且平整光滑; 而菌株 JE53 处理组菌丝体侧端呈现球状膨大、菌丝扭曲变形、不规则肿胀、表面凹陷、褶皱; 菌株 JE56 处理后菌丝畸形、表面粗糙不平整, 扭曲凹陷。

## 3 讨论与结论

芽孢杆菌在自然界广泛存在, 不仅具有较强的抗真菌能力, 而且对环境友好、对人体及动植物无毒无害, 在果蔬采后防腐保鲜中有巨大的开发潜力<sup>[16]</sup>。目前, 国内外关于芽孢杆菌控制果蔬采后病害的研究报道日益增多, 如从盐生植物的根际区分离得到的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) HM1 能有效防治苹果炭疽病<sup>[17]</sup>。Kim 等从苹果园土壤中分离获得的 2 株植物根际促生菌均为芽孢杆菌属, 能有效防治苹果采后炭疽病和白腐病的发生<sup>[18]</sup>。本研究从库尔勒香梨园土壤中分离筛选出 2 株对梨黑斑病病原菌 *A. alternata* 具有良好拮抗作用的菌株 JE53 和 JE56, 经过形态学观察和 16S rRNA 基因序列分析初步鉴定为多粘类芽孢杆菌(*P. polymyxa*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。

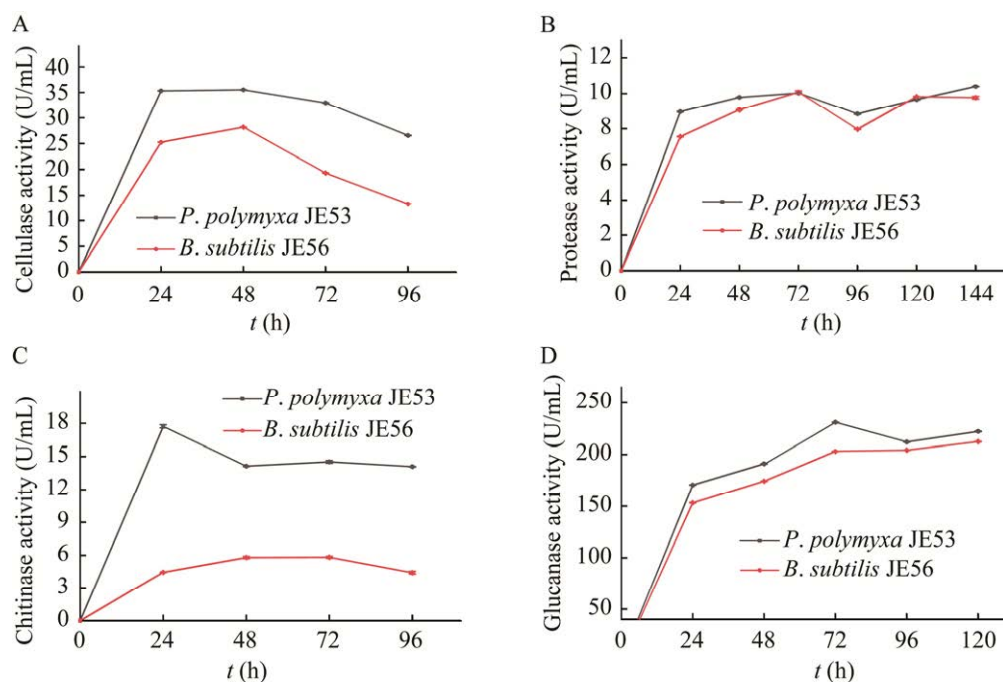


图 6 拮抗菌酶活测定 A: 纤维素酶; B: 蛋白酶; C: 几丁质酶; D: 葡聚糖酶

Figure 6 Determination of enzyme activity of antagonistic strains. A: Cellulase; B: Protease; C: Chitinase; D: Glucanase.

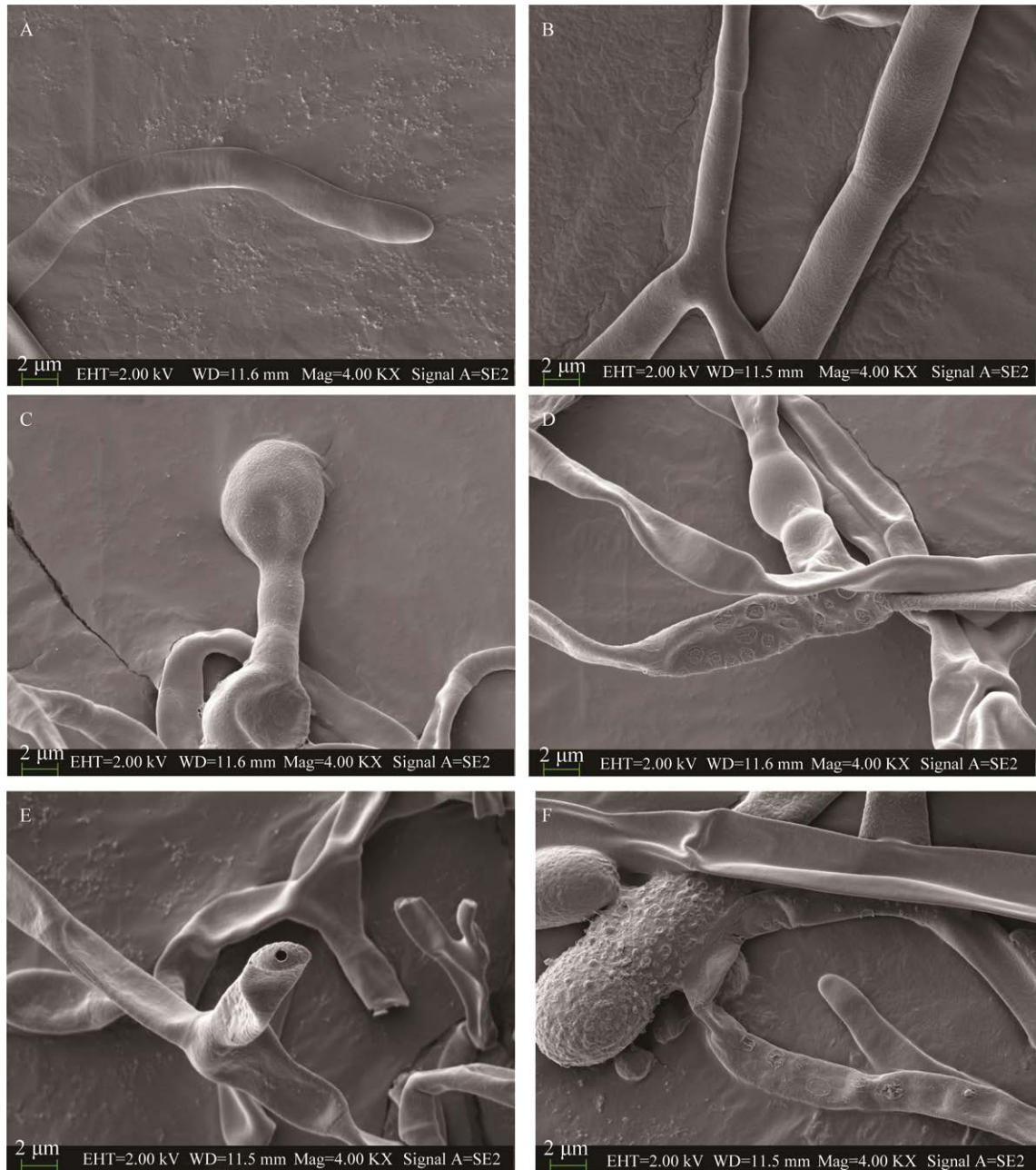


图 7 扫描电镜下拮抗菌对病原菌菌丝的影响 A 和 B: 对照 CK; C 和 D: JE53; E 和 F: JE56

Figure 7 Inhibitory effect of antagonistic strains on *A. alternata* hyphae under SEM. A and B: CK; C and D: JE53; E and F: JE56.

芽孢杆菌能够有效抑制病原真菌的生长, 而且具有广谱抗性<sup>[19-22]</sup>。如枯草芽孢杆菌能延迟番茄灰霉病菌的孢子萌发, 对苹果霉心病菌等 12 种植物病原菌也有良好的抑制作用, 对

水蜜桃采后常见的 4 种病原菌也有较强的抑制作用<sup>[21,23]</sup>。多粘类芽孢杆菌能降低番茄灰霉病的发病率, 还对油菜菌核病菌等 8 种植物病原真菌有很好的抑制作用<sup>[24]</sup>。本研究分离到的

2 株拮抗菌株抑菌谱广泛, 对马铃薯黑痣病菌等 9 种常见植物病原菌均有较强的抑制活性, 这为生物防腐保鲜剂的开发提供了新资源。

本研究发现, 菌株 JE53 和 JE56 发酵上清液对梨黑斑病菌孢子萌发具有较强的抑制作用, 而且随稀释倍数增大抑制作用减弱。说明拮抗菌发酵过程中会分泌抑菌活性物质, 从而起到抑制病原菌孢子萌发的作用。然而何种活性成分发挥抑菌功效还尚未明确, 仍需进一步研究。对于芽孢杆菌抑制真菌孢子萌发方面也有类似报道<sup>[25-27]</sup>。拮抗菌的抑菌作用与其产生的代谢产物密切相关, 水解酶的产生是芽孢杆菌发挥抑菌作用的重要方式之一<sup>[28-30]</sup>。葡聚糖、几丁质、纤维素、蛋白质等是真菌细胞壁的重要组成成分, 有关报道已证明几丁质酶、葡聚糖酶、纤维素酶、蛋白酶是防治植物病害的机理之一。如 Rishad 等从短小芽孢杆菌 MCB-7 中分离纯化几丁质酶, 其粗酶液和纯化酶对黄曲霉、黑曲霉等植物病原菌有显著的抗菌活性<sup>[31]</sup>。Xu 等大量表达并纯化了菌株 *B. velezensis* ZJ20 的  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶, 该酶处理供试病原真菌其菌丝形态被完全破坏<sup>[28]</sup>。张之奇报道解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) ZL-16 菌株的纤维素酶粗提液对辣椒疫霉病菌有抑制作用, 抑制率为 79.49%, 并会导致菌丝体发生畸变<sup>[32]</sup>。本研究发现, 拮抗菌 JE53 和 JE56 均可产生纤维素酶、蛋白酶、葡聚糖酶及几丁质酶, 推测拮抗菌通过产生该类水解酶作用于梨黑斑病菌细胞壁, 改变或降解其细胞壁, 破坏菌体的完整性从而达到抑制效果。值得注意的是, 平板透明圈外径大小与经产酶培养基培养后测定的酶活大小之间的关系并非线性正相关, 这在蒋明星等<sup>[33]</sup>研究中有类似报道。可能原因是酶活受不同培养条件如培养基状态的影响, 而且不同拮抗菌最佳产酶条件也

不同<sup>[33]</sup>。扫描电镜显示, 用拮抗菌处理梨黑斑病菌后其菌丝畸变, 表面粗糙凹陷, 这一结果与许乐等的扫描电镜研究结果一致, 进一步说明拮抗菌可以作用于真菌细胞壁, 通过产生某些活性物质来破坏其结构<sup>[34-35]</sup>。拮抗菌的抑菌作用机理还需进一步的研究。

综上所述, 多粘类芽孢杆菌 JE53 和枯草芽孢杆菌 JE56 对梨黑斑病菌具有较强的抑制作用, 有望作为梨采后生物保鲜的优势资源菌种。因此, 进一步对这 2 株菌的抑菌机理进行研究, 探究发挥抑菌功效的活性成分, 有助于为今后库尔勒香梨生物防腐保鲜剂的开发和应用提供更多的理论基础。

## REFERENCES

- [1] 滕元文. 梨属植物系统发育及东方梨品种起源研究进展[J]. 果树学报, 2017, 34(3): 370-378  
Teng YW. Advances in the research on phylogeny of the genus *Pyrus* and the origin of pear cultivars native to East Asia[J]. Journal of Fruit Science, 2017, 34(3): 370-378 (in Chinese)
- [2] 张峰, 李养义. 库尔勒香梨产业发展现状与对策建议[J]. 西北园艺(综合), 2020(6): 3-5  
Zhang F, Li YY. Development status and countermeasures of Korla fragrant pear industry[J]. Northwest Horticulture, 2020(6): 3-5 (in Chinese)
- [3] 赵晓梅. 库尔勒香梨采后萼端黑斑病的发生机理与控制研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学博士学位论文, 2015  
Zhao XM. Studies on mechanism and control of postharvest black spot on calyx end in Korla fragrant pear[D]. Urumqi: Doctoral Dissertation of Xinjiang Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [4] 马晶. 库尔勒香梨黑斑病潜伏侵染机理研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2012  
Ma J. Study on latent infection mechanism of black spot disease of Korla fragrant pear[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- [5] 张晓宇. 黄金梨采后病害生防菌的分离筛选及抗菌蛋白研究[D]. 太谷: 山西农业大学博士学位论文, 2014  
Zhang XY. Study on isolating, screening and actibiotic

- protein of biological controlling bacteria against gold pear postharvest disease[D]. Taigu: Doctoral Dissertation of Shanxi Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- [6] 穆香轶, 张璇, 胡有贞, 关波, 陈国刚. 库尔勒香梨黑头病拮抗菌的筛选和鉴定[J]. 微生物学通报, 2020, 47(6): 1795-1806  
Mu XY, Zhang X, Hu YZ, Guan B, Chen GG. Screening and identification of an antagonistic bacterium against blackhead disease of Korla fragrant pear[J]. Microbiology China, 2020, 47(6): 1795-1806 (in Chinese)
- [7] Guo JM, Wei XY, Lü EL, Wang Y, Deng ZL. Ripening behavior and quality of 1-MCP treated d'Anjou pears during controlled atmosphere storage[J]. Food Control, 2020, 117: 107364
- [8] Du MJ, Liu ZT, Zhang XT, Li HD, Liu ZY, Li XH, Song JX, Jia XY, Wang LY. Effect of pulsed controlled atmosphere with CO<sub>2</sub> on the quality of watercored apple during storage[J]. Scientia Horticulturae, 2021, 278: 109854
- [9] Estiarte N, Crespo-Sempere A, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ. Effect of 1-methylcyclopropene on the development of black mold disease and its potential effect on alternariol and alternariol monomethyl ether biosynthesis on tomatoes infected with *Alternaria alternata*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 236: 74-82
- [10] 崔郑龙. 棉花枯萎病菌拮抗菌的筛选和抑菌机理初探[D]. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 2015  
Cui ZL. The researches on screening and mechanism of antagonistic bacteria in cotton *Fusarium wilt*[D]. Shihezi: Master's Thesis of Shihezi University, 2015 (in Chinese)
- [11] 李雪艳. 棉花内生与根际拮抗菌对黄萎病的防病机理研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学硕士学位论文, 2019  
Li XY. Study on the mechanism of cotton endophytic and rhizosphere antagonism against *Verticillium wilt*[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang University, 2019 (in Chinese)
- [12] 韩松. 内生细菌对棉花枯黄萎病的拮抗机制[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2011  
Han S. The antagonistic mechanism of endophytic bacteria against *Fusarium* and *Verticillium wilt* of cotton[D]. Ala'er: Master's Thesis of Tarim University, 2011 (in Chinese)
- [13] Wang ZR, Jiang MY, Chen KW, Wang KT, Du MY, Zalán Z, Hegyi F, Kan JQ. Biocontrol of *Penicillium digitatum* on postharvest citrus fruits by *Pseudomonas fluorescens*[J]. Journal of Food Quality, 2018, 2018: 1-10
- [14] 曾欣, 张亚惠, 迟惠荣, 孙钟毓, 陈卫良, 毛碧增. 温郁金内生拮抗细菌B-11的分离及其抑菌活性[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1018-1029  
Zeng X, Zhang YH, Chi HR, Sun ZY, Chen WL, Mao BZ. Antimicrobial activity of endophytic bacterium strain B-11 isolated from *Curcuma wenyujin*[J]. Microbiology China, 2019, 46(5): 1018-1029 (in Chinese)
- [15] 白燕, 王维新. 刺参肠道蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶与纤维素酶活性的测定方法[J]. 饲料工业, 2012, 33(20): 28-32  
Bai Y, Wang WX. Determination of protease, amylase, lipase and cellulase activities of *Apostichopus japonicus*[J]. Feed Industry, 2012, 33(20): 28-32 (in Chinese)
- [16] 闫杨, 刘月静, 陈芳. 枯草芽孢杆菌的应用现状概述[J]. 生物学教学, 2019, 44(2): 2-3  
Yan Y, Liu YJ, Chen F. An overview of the application research of *Bacillus subtilis*[J]. Biology Teaching, 2019, 44(2): 2-3 (in Chinese)
- [17] Kim HM, Lee KJ, Chae JC. Postharvest biological control of *Colletotrichum acutatum* on apple by *Bacillus subtilis* HM1 and the structural identification of antagonists[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(11): 1954-1959
- [18] Kim YS, Balaraju K, Jeon Y. Effects of rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* APEC136 and *Bacillus subtilis* APEC170 on biocontrol of postharvest pathogens of apple fruits[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2016, 17(12): 931-940
- [19] Cai XC, Liu CH, Wang BT, Xue YR. Genomic and metabolic traits endow *Bacillus velezensis* CC09 with a potential biocontrol agent in control of wheat powdery mildew disease[J]. Microbiological Research, 2017, 196: 89-94
- [20] 刘小玉, 付登强, 刘立云, 黄丽云, 齐兰. 一株具有广谱抗真菌活性的解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定[J]. 中国果菜, 2021, 41(1): 43-47, 59  
Liu XY, Fu DQ, Liu LY, Huang LY, Qi L. Isolation and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* with broad-spectrum antimicrobial activity[J]. China Fruit & Vegetable, 2021, 41(1): 43-47, 59 (in Chinese)
- [21] 李玲. 枯草芽孢杆菌 BH-8 对番茄灰霉病防病机理及其促生作用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2017  
Li L. The control mechanisms of *Bacillus subtilis* BH-8 against tomato grey mould and its promoting effect[D].

- Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2017 (in Chinese)
- [22] De Paula Kuyat Mates A, De Carvalho Pontes N, De Almeida Halfeld-Vieira B. *Bacillus velezensis* GF267 as a multi-site antagonist for the control of tomato bacterial spot[J]. *Biological Control*, 2019, 137: 104013
- [23] 李培中, 许丽, 何惠霞, 尹京苑, 高海燕. 1株水蜜桃采后病害拮抗细菌的鉴定及抑菌作用[J]. *食品科学*, 2019, 40(2): 102-109  
Li PZ, Xu L, He HX, Yin JY, Gao HY. Identification and antifungal activity of an antagonistic strain against postharvest disease in honey peach[J]. *Food Science*, 2019, 40(2): 102-109 (in Chinese)
- [24] Zhang QX, Xing CL, Li SY, He LL, Qu TL, Chen XJ. *In vitro* antagonism and biocontrol effects of *Paenibacillus polymyxa* JY1-5 against *Botrytis cinerea* in tomato[J]. *Biological Control*, 2021, 160: 104689
- [25] 刘洋, 朱天辉, 郑磊, 张静, 兰浩洋, 郭志斌. 一株内生拮抗细菌的分离鉴定及其抗菌机理研究[J]. *植物保护*, 2016, 42(1): 33-39  
Liu Y, Zhu TH, Zheng L, Zhang J, Lan HY, Guo ZB. Isolation, identification and antimicrobial mechanism of an endophytic antagonistic bacterium[J]. *Plant Protection*, 2016, 42(1): 33-39 (in Chinese)
- [26] 伏波, 姚娟妮, 高小宁, 黄丽丽, 康振生, 韩青梅. 植物内生枯草芽孢杆菌 Em7 菌株对葡萄灰霉病菌的抑菌活性[J]. *农药学学报*, 2016, 18(4): 465-471  
Fu B, Yao JN, Gao XN, Huang LL, Kang ZS, Han QM. Antifungal activity of plant endophytic *Bacillus subtilis* strain Em7 against *Botrytis cinerea*[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2016, 18(4): 465-471 (in Chinese)
- [27] 任苗苗, 闫思远, 李嘉泓, 杜娟, 马玲, 顾沛雯. 两株拮抗芽孢杆菌对灵武长枣采后致病真菌的抑菌作用[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(20): 21-26  
Ren MM, Yan SY, Li JH, Du J, Ma L, Gu PW. Antibacterial effect of two antagonistic *Bacillus* strains on rot-causing fungi in postharvest *Ziziphus jujube* cv. Lingwu changzao[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(20): 21-26 (in Chinese)
- [28] Xu T, Zhu TH, Li SJ. B-1, 3-1, 4-glucanase gene from *Bacillus velezensis* ZJ20 exerts antifungal effect on plant pathogenic fungi[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2016, 32(2): 26
- [29] 宋利沙, 蒋妮, 张占江, 蓝祖裁. 草珊瑚炭疽病拮抗细菌的鉴定及其抑菌机理[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(10): 3266-3276  
Song LS, Jiang N, Zhang ZJ, Lan ZZ. Identification of antagonistic bacteria against anthracnose of *Sarcandra glabra*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(10): 3266-3276 (in Chinese)
- [30] Subbanna ARNS, Rajasekhara H, Stanley J, Mishra KK, Pattanayak A. Pesticidal perspectives of chitinolytic bacteria in agricultural pest management[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 116: 52-66
- [31] Rishad KS, Rebello S, Shabanamol PS, Jisha MS. Biocontrol potential of Halotolerant bacterial chitinase from high yielding novel *Bacillus pumilus* MCB-7 autochthonous to mangrove ecosystem[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2017, 137: 36-41
- [32] 张之奇. 产纤维素酶菌株的分离鉴定及抑菌作用研究[D]. 太谷: 山西农业大学硕士学位论文, 2016  
Zhang ZQ. Isolation, identification and antibacterial activity of cellulase producing strain[D]. Taigu: Master's Thesis of Shanxi Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- [33] 蒋明星, 丁晓帆. 纤维素降解细菌的筛选及其酶活测定[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(36): 161-164  
Jiang MX, Ding XF. Screening of cellulose-decomposing bacteria and enzymatic activity determination[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(36): 161-164 (in Chinese)
- [34] 许乐, 王子强, 张爽, 邢倩, 刘丽娜, 洒荣波. 丹参根腐病拮抗细菌筛选、鉴定及生防机理研究[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(4): 846-854  
Xu L, Wang ZQ, Zhang S, Xing Q, Liu LN, Sa RB. Screening, identification and biocontrol mechanism of antagonistic bacteria against root rot of *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2021, 37(4): 846-854 (in Chinese)
- [35] Shu C, Zhao HD, Jiao WX, Liu BD, Cao JK, Jiang WB. Antifungal efficacy of ursolic acid in control of *Alternaria alternata* causing black spot rot on apple fruit and possible mechanisms involved[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 256: 108636