

疮痂链霉菌拮抗菌 HD9-1 的筛选及功能评价

周敬轩^{#1}, 赵永龙^{#2}, 赵盼^{3,4,5}, 曹晶晶^{3,4}, 汪志琴^{3,4}, 刘璐^{3,4}, 仲乃琴^{*2,3,4,5}

1 大连工业大学生物工程学院, 辽宁 大连 116034

2 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021

3 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

4 中国科学院农业微生物先进技术工程实验室, 北京 100101

5 内蒙古自治区马铃薯肥料农药高效利用技术企业重点实验室, 内蒙古 呼伦贝尔 021000

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 Jingxuan, ZHAO Yonglong, ZHAO Pan, CAO Jingjing, WANG Zhiqin, LIU Lu, ZHONG Naiqin. Screening and functional evaluation of strain HD9-1 against *Streptomyces scabies*[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1149-1162.

摘要:【背景】近年来, 由土传致病链霉菌引起的疮痂病在我国马铃薯产区大面积暴发, 严重影响块茎的商品价值, 由于缺乏有效防控措施, 其危害程度呈逐年加重趋势。然而拮抗菌可有效抑制病原菌的繁殖, 其防控效果优异, 对环境友好, 逐渐引起了人们的关注。【目的】分离筛选对致病链霉菌具有拮抗功能的细菌, 鉴定其分类学名, 评价其主要生物学特性, 为研发高效防病菌剂提供菌种资源。【方法】以疮痂链霉菌为靶向微生物, 从马铃薯疮痂病高发土样中筛选拮抗菌株, 通过形态学、生理生化和分子生物学试验确定其分类地位; 用盆栽试验初步判定其对马铃薯疮痂病的防控效果, 研究其广谱抗病性和耐盐碱特性, 结合生产中常用化学农药的敏感性测定, 综合评价其应用前景。【结果】筛选出一株对致病链霉菌(*Streptomyces scabies*)有显著拮抗效果的菌株 HD9-1, 抑菌圈直径约 31 mm, 菌落呈圆形、淡黄色, 边缘较为整齐, 革兰氏染色阳性, 菌体杆状, 宽度约为 0.75 μm , 长度为 1.0–2.5 μm 。以蔗糖作为唯一碳源, 能产生 β -半乳糖苷酶、精氨

资助项目: 广东省重点领域研发计划(2020B0202010005); 中国科学院科技扶贫项目(KFJ-FP-201905, KFJ-FP-202001); 内蒙古自治区科技计划(2021GG0300); 临泽开放课题(LZKFKT-2002); 云南省科技入滇项目(202003AD150005); 北京市乡村振兴科技项目(BJXCZX20221229)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Key Area Research and Development Program of Guangdong Province (2020B0202010005), the Science and Technology Poverty Alleviation Project of Chinese Academy of Sciences (KFJ-FP-201905, KFJ-FP-202001), the Science and Technology Program of Inner Mongolia Autonomous Region (2021GG0300), the Linze Open Project (LZKFKT-2002), the Science and Technology Project into Yunnan of Yunnan Province (202003AD150005), and the Beijing Rural Revitalization Science and Technology Project (BJXCZX20221229).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: nqzhong@im.ac.cn

Received: 2022-06-10; Accepted: 2022-09-16; Published online: 2022-11-30

酸双水解酶、赖氨酸脱羧酶和鸟氨酸脱羧酶; 培养 24 h 后代谢产物中含有 3.44 mg/L 的吲哚乙酸; 16S rRNA 基因序列与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) RUB 聚类到同一分支, 确定该菌株为 *Bacillus subtilis*; 盆栽试验结果表明, HD9-1 对马铃薯微型薯疮痂病的防效达 59.15%; 菌体可耐受 pH 3.0–11.0、NaCl 含量 1%–11% 的盐碱环境和 100 °C 水浴 30 min; 对中生菌素、苯醚甲环唑、氟菌·霜霉威、春雷霉素、氟硅唑、吡唑醚、啞菌酯和甲基硫菌灵等常用化学农药不敏感, 对大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)等农作物病原菌均具有一定的抑制效果。【结论】菌株 HD9-1 鉴定为枯草芽孢杆菌, 对马铃薯疮痂病防控效果较好, 且具有良好的环境适应性, 可作为防治马铃薯土传病害的高效复合菌剂的备选菌株。

关键词: 马铃薯疮痂病; 枯草芽孢杆菌; 致病链霉菌; 拮抗菌; 生物防治

Screening and functional evaluation of strain HD9-1 against *Streptomyces scabies*

ZHOU Jingxuan^{#1}, ZHAO Yonglong^{#2}, ZHAO Pan^{3,4,5}, CAO Jingjing^{3,4}, WANG Zhiqin^{3,4}, LIU Lu^{3,4}, ZHONG Naiqin^{*2,3,4,5}

1 School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China

2 School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

3 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

4 Engineering Laboratory for Advanced Technology of Agricultural Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

5 The Enterprise Key Laboratory of Advanced Technology for Potato Fertilizer and Pesticide, Hulun Buir 021000, Inner Mongolia, China

Abstract: [Background] The soil-borne potato common scab (CS), caused by *Streptomyces* spp., is rampant in China, resulting in tremendous economic loss. With not efficient control measure available, the pathogen become more aggressive. Biocontrol bacteria which are environmentally friendly and show ideal effect in controlling the reproduction of the pathogen have attracted the interest of scholars. [Objective] To isolate and identify antagonistic bacterial isolate against *Streptomyces scabies*, determine the taxonomic status, evaluate the major biological traits, and thus to provide resources for the development of biocontrol agents. [Methods] Antagonistic isolates were screened from soil with high incidence of potato CS. The taxonomic status was confirmed with morphological, physiological, biochemical, and molecular methods. The control effect was analyzed by pot trials. Then, the potential application of the isolate was evaluated by broad-spectrum resistance (BSR) test, salt-alkali tolerance assay, and sensitivity tests to chemical fungicides. [Results] HD9-1 with significant antagonistic effect on *S. scabies* was screened out, which exhibited an inhibition zone diameter of 31 mm. The bacterial cells were rod-shaped and Gram-positive, with width of 0.75 μm and length of 1–2.5 μm . Colony of the isolate was yellowish, with smooth round edge. HD9-1 used sucrose as the only carbon source and produced β -galactosidase, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, and

ornithine decarboxylase. IAA (3.44 mg/L) was detected in liquid medium after 24 h of culture. With the 16S rRNA sequence highly homologous to that of *Bacillus subtilis* RUB, HD9-1 was determined to be *B. subtilis*. The pot trial results showed that the scab-control efficiency was 59.15%. Under medium culture conditions, HD9-1 showed tolerance at pH 3.0–11.0, NaCl concentration of 1%–11%, and temperature of up to 100 °C (water bath for 30 min). This isolate was insensitive to zhongshengmycin, difenoconazole, fluconazole propamocarb, kasugamycin, flusilazole, pyrazole ether, azoxystrobin and thiophanate methyl. Meanwhile, it showed certain control effect on other crop pathogens, such as *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum*, and *Rhizoctonia solani*. [Conclusion] HD9-1, a *B. subtilis* strain, displays significant control effect on potato CS and strong adaptability, which can be a potential candidate for developing compound microbial agent against some potato soil-borne diseases.

Keywords: potato common scab; *Bacillus subtilis*; *Streptomyces scabies*; antagonistic bacteria; biological control

马铃薯作为重要的粮食作物, 具有极大的市场需求量, 约 70%的马铃薯产区集中分布于西北、西南、华北、东北等地, 是当地农民的主粮作物和重要经济收入来源^[1]。近年来, 疮痂病在各大产区普遍发生且逐年加重, 发病率多在 10%以上, 局部区域高达 100%^[2], 经济损失可达 10%–40%^[3], 已成为制约我国马铃薯产业发展的关键问题^[4]。

马铃薯疮痂病由多种致病链霉菌 (*Streptomyces* spp.)引起, 主要危害块茎^[5]。发病初期表皮出现褐色斑点, 后期逐渐扩大为形状不规则的疮痂状斑块, 导致发病部位组织木栓化, 影响其外观和商品价值^[6], 严重时会造成深度达到 7–10 mm 的褐色坑状病斑^[7], 利于其他病原菌的侵入, 从而造成大幅减产^[8]。已报道的病原菌种类多达 20 余种, 其中分布最广、最具代表性的病原菌是疮痂链霉菌 (*Streptomyces scabies*)^[9], 休耕轮作、种植绿肥、增施有机肥等农业措施是目前降低疮痂病危害的重要手段^[10], 但受人口众多、耕地资源有限和比较效益差异等因素的限制, 上述措施均难以大面积推广。人们对化学药剂进行了大量筛选, 发现 2,4-二氯苯氧乙酸、Capitan 等

能有效减低疮痂病危害, 但会危及土壤生态、引起马铃薯减产^[11]。近年来, 对环境友好的生防菌逐渐成为防控马铃薯疮痂病的研究热点。石莹莹等^[12]从云南昭通薯田土壤中分离的苏云金芽孢杆菌 YN-2-2 盆栽试验防效为 36.11%; 赵永龙等^[13]从广东省惠东县病薯田土样中获得了 3 株解淀粉芽孢杆菌 HZ11-4、HS-12 和 HZ13-1, 它们对马铃薯微型薯疮痂病的防效分别为 68.57%、57.15%和 65.96%; 陈志垚等^[14]从黑龙江省齐齐哈尔市克山农场获得一株贝莱斯芽孢杆菌 BKS104, 其盆栽试验相对防效达到 85%。此外, 木霉菌属、链霉菌属、假单胞菌属、丝核菌属等微生物复合菌剂在部分区域马铃薯疮痂病防控中展现出较好的效果^[15]。但现有生防菌的环境适应性存在一定局限^[16-17], 且我国马铃薯产地分布广泛, 生态环境差异明显, 亟须补充适宜不同土壤生态的菌种资源。

本研究以 *S. scabies* 为靶标微生物, 从土壤中筛选对其具有明显拮抗功能的细菌, 明确其分类地位, 分析其对马铃薯疮痂病的防治效果, 评价其环境适应性, 以期对马铃薯疮痂病的有效防控提供优良的菌种资源。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 病原菌及土壤样品

疮痂链霉菌(*S. scabies*)菌株购自中国科学院微生物研究所菌种保藏管理中心, 馆藏编号 CGMCC4.1765 (以下简称 4.1765); 大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)由本实验室分离保存, 编号为 V991; 尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*), 馆藏编号 CGMCC3.18025; 立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*), 馆藏标号 CGMCC3.2888。土壤样品采自广东省惠州市惠东县铁涌镇马铃薯病薯表面, 土壤的理化性质为: pH 5.9, 全氮 1.70 g/kg, 全钾 19.82 g/kg, 总磷 1.54 g/kg, 有机质 33.73 g/kg, 真菌 7.83×10^3 个/g, 放线菌 1.87×10^7 个/g, 细菌 1.53×10^7 个/g。

1.1.2 主要试剂和仪器

细菌理化性质检测试剂盒, 北京兰伯瑞生物科技有限公司。显微镜: 显微镜数码采集装置购自北京长恒荣创科技有限公司; 日立冷场发射扫描电子显微镜购自 Hitachi 公司。Biolog GENIII 鉴定板 1030, 北京兰伯瑞生物科技有限公司。

1.1.3 培养基

PDA 培养基(g/L): 土豆 200.0, 琼脂 15.0, 葡萄糖 20.0, 调整其 pH 值至 7.0–7.2。LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 调整其 pH 值至 7.0–7.2。King 氏培养基(g/L): 蛋白胨 20.000, K_2HPO_4 1.725, 丙三醇 0.015, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.500, 色氨酸 0.100, 调整其 pH 值至 7.2。比色液配方: 取 1 mL 浓度为 0.5 mol/L 的 $FeCl_3$ 缓缓加入 30 mL 的浓硫酸中, 用玻璃棒搅拌均匀。B5 营养液(g/L): KNO_3 50.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.0, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 3.0, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 3.0, $(NH_4)_2SO_4$ 2.7, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.56, $EDTA \cdot Na_2$ 7.46, H_3BO_3 3.0, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 10.0,

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.25, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.025, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.025, KI 0.75, pH 值调至 5.5, 添加蒸馏水定容至 1 L。

1.2 方 法

1.2.1 拮抗菌的分离

取 1 g 土样置于 50 mL 离心管, 加入 10 mL 蒸馏水, 振荡使土壤均匀悬浮。吸取 100 μ L 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释液滴至 LB 固体培养基并均匀涂布, 28 $^{\circ}C$ 培养 24 h, 挑选单菌落划线纯化, 将获得的菌株接种于 LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}C$ 、200 r/min 振荡培养过夜备用。

1.2.2 拮抗菌的筛选

取 100 μ L 疮痂链霉菌孢子悬浮液均匀涂布于 PDA 固体培养基, 吸取 6 μ L 细菌培养液滴于上述培养皿中央, 28 $^{\circ}C$ 共培养 7 d 后测量抑菌圈直径。在 4 $^{\circ}C$ 、4 500 r/min 离心 15 min, 分别收集参试菌株的培养上清液和菌体沉淀, 用等量无菌水重新悬浮菌体, 以 LB 液体培养基为对照, 将培养上清液、菌体悬浮液和培养液同时进行平板对峙试验, 培养 48 h 后观察并记录抑菌圈的直径。

1.2.3 拮抗菌形态观测

将待测菌液均匀涂布于 LB 固体培养基, 37 $^{\circ}C$ 培养 24 h, 观察菌落的形态特征, 并用显微镜数码采集装置 LV2000 拍照记录形态特征, 采用日立冷场发射扫描电子显微镜 SU8010 观察菌体形态, 测量 10 个菌体大小。

1.2.4 拮抗菌革兰氏染色

将待测菌液滴至载玻片上自然晾干, 轻微烘烤固定菌体, 滴加草酸铵结晶紫试剂, 染色 1 min 后用水冲洗, 碘液染色 1 min 再次冲洗, 用 95%乙醇脱色, 滴加番红复染 3–5 min, 水洗后进行镜检。

1.2.5 菌株生理生化特性分析

采用 Biolog GENIII 鉴定板 1030 鉴定菌株可利用碳源; 用试剂盒测试细菌的理化性质(具

体操作见说明书); 接触酶试验参照《常见细菌系统鉴定手册》^[18]。

1.2.6 菌株耐盐碱特性研究

将待测菌株分别接种至 pH 值为 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0, NaCl 含量为 1%、3%、5%、7%、9%、11% 的 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h 后测定其 OD_{600} 值。

1.2.7 菌株 HD9-1 对多种化学农药的敏感性测试

参考李建萍^[19]的研究方法, 采用 K-B 纸片扩散法评价目标菌株对多种药物的敏感性。依据参试药品说明书配制工作浓度(具体参数见表 4), 将直径 8 mm 的无菌圆形滤纸片分别置于药品溶液中浸泡 30 s, 然后将滤纸片放置于涂有 HD9-1 的 LB 固体培养基上, 以无菌水处理为对照, 37 °C 培养 12 h, 根据是否出现抑菌圈评价菌株 HD9-1 的药敏性。

1.2.8 菌株的广谱拮抗性测定

分别在 PDA 培养基上接种大丽轮枝菌、立枯丝核菌和尖孢镰刀菌, 在其两侧间隔 1 cm 处分别接种 6 μ L HD9-1 培养液, 并以单独接种病原菌的处理为对照, 28 °C 培养 4 d 观察抑菌效果。抑菌率(%)=(对照组面积-处理组面积)/对照组面积 \times 100。

1.2.9 菌种 16S rRNA 基因序列测定

将细菌培养液送至北京博迈德生物工程股份有限公司, 运用 16S rRNA 基因片段通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') 进行 PCR。PCR 反应体系(20 μ L): 2 \times T5 Super PCR Mix 10 μ L, HD9-1 基因组 DNA (200 ng/ μ L) 2 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 6 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。测序结果在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 上通过 BLASTn 进行比对查

找与 HD9-1 相似性较高的序列, 用 MEGA 7.0 软件构建菌株系统发育树。

1.2.10 盆栽试验

在直径大小为 17 cm 的花盆中装满蛭石, 每盆移栽马铃薯品种夏波蒂的脱毒试管苗 3 株, 置于光照强度为 50 000 lx、光周期为 L16 h/D8 h 的条件下培养。10 d 后在每株幼苗的根部注射 1×10^7 CFU/mL 的 *S. scabies* 孢子悬浮液 10 mL, 培养 10 d 后每盆均匀浇施 1×10^8 CFU/mL 拮抗菌悬浮液 30 mL。以未接种任何菌种的处理作为空白对照 Control 1, 仅注射 *S. scabies* 的处理为阳性对照 Control 2, 每个处理重复 3 次, 依据马铃薯疮痂病分级标准统计病情指数、发病率, 并计算防治效果。

病害分级标准: 马铃薯皮完好, 无病斑, 为 0 级; 表皮病斑面积为大于 0 小于 1/6, 为 1 级; 表皮病斑面积为大于 1/6 小于 1/3, 为 2 级; 表皮病斑面积为大于 1/3 小于 1/2, 为 3 级; 表皮病斑面积大于 1/2, 为 4 级。

发病率(%)=发病块茎数/调查总块茎数 \times 100;
病情指数= \sum (各病级块茎数 \times 该病级数代表值)/(调查个体总和 \times 最高病级数) \times 100%;
相对防效(%)=(对照组病情指数-处理组病情指数)/对照组病情指数 \times 100。

1.2.11 菌株促生长特性分析

参照李振东等^[20]方法分别配制终浓度为 0.02、0.04、0.06、0.08 和 0.2 mg/mL 的吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)标准液, 将标准液与比色液等量混合, 黑暗培养 30 min, 测定其 OD_{530} 值, 以 IAA 浓度为横坐标、 OD_{530} 为纵坐标绘制 IAA 浓度的标准曲线; 吸取 100 μ L 待试菌液接种于 King 氏液体培养基, 37 °C、200 r/min 振荡培养 48 h, 5 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 采用 SalKowski 比色法定性检测菌液中的 IAA 含量。

在直径大小为 17 cm 的花盆中装满蛭石, 每

盆移栽马铃薯品种夏波蒂的脱毒试管苗 3 株,置于光照强度为 50 000 lx、光周期为 L16 h/D8 h 的条件下培养 7 d 后每盆均匀浇施 1×10^8 CFU/mL 的拮抗菌悬浮液 30 mL,以加入 30 mL 无菌水处理为对照,分别于室温培养 0 d、14 d 时统计马铃薯株高。

1.2.12 数据处理

采用 Origin 2019b 和 Excel 2016 软件处理相关数据。

2 结果与分析

2.1 马铃薯疮痂链霉菌拮抗菌的分离与筛选

从采自广东省惠州市惠东县的薯田土壤中

分离出一株对 *S. scabies* 具有明显拮抗效果的细菌,编号为 HD9-1,其培养液的抑菌圈直径达到 31 mm (图 1A)。

HD9-1 培养上清液、菌体悬浮液和培养液同时进行平板对峙试验,抑菌效果如图 1B 所示,菌体悬浮液与培养液抑菌圈直径分别达到 23.1 mm 与 23.5 mm,大小相当,而上清液未出现抑菌圈,表明其代谢产物中无抑菌活性物质。

2.2 菌株 HD9-1 形态学特征

如图 2 所示,HD9-1 的菌落呈圆形,淡黄色,不透明,表面干燥,边缘较为整齐;菌体杆状,两端钝圆,宽度约为 $0.75 \mu\text{m}$,长度为 $1.0\text{--}2.5 \mu\text{m}$,革兰氏染色呈阳性。

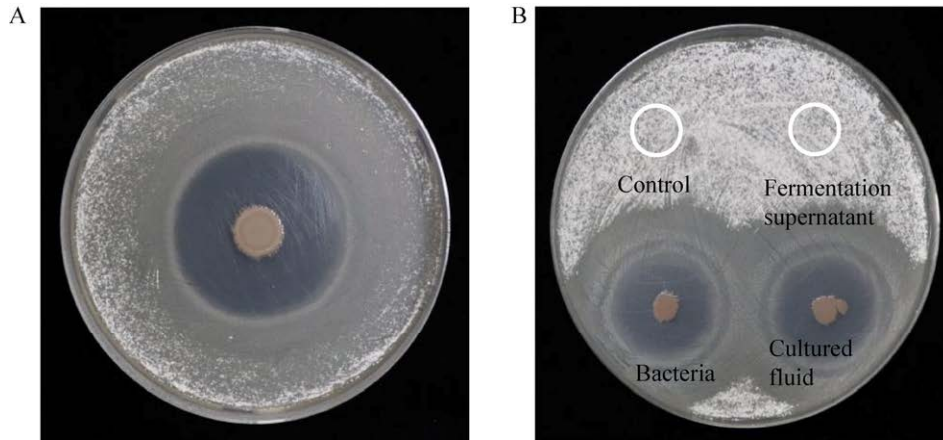


图 1 菌株 HD9-1 对疮痂链霉菌的抑制效果 A: 发酵液的抗菌作用. B: 菌体和发酵上清液的抑菌作用
Figure 1 The inhibitory effect of screening strain HD9-1 on *Streptomyces scabies*. A: Antibacterial effect of fermentation liquid. B: Bacteriostatic effect of bacteria and fermentation supernatant.

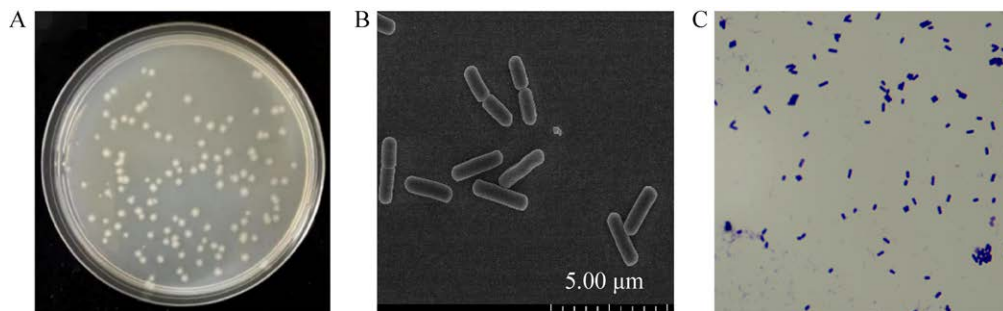


图 2 菌株 HD9-1 形态学特征 A: 菌落形态. B: 扫描电子显微镜图. C: 革兰氏染色显微镜图
Figure 2 Morphological characteristics of HD9-1. A: Colony morphology. B: Scanning electron micrograph diagram. C: Gram stain microstructure tissue.

2.3 菌株 HD9-1 生理生化特性

表 1 结果显示, HD9-1 可利用蔗糖作为唯一碳源, 不能利用葡萄糖、甘露醇、肌醇、山梨醇、鼠李糖、阿拉伯糖和蜜二糖, 可以合成明胶酶使明胶液化, 其代谢产物还可降解苦杏仁苷; 可以合成 β -半乳糖苷酶、精氨酸双水解酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶和脲酶; 可以利用柠檬酸钠; 能以丙酮酸盐作为底物合成乙酰甲基甲醇, 但不能分解硫代硫酸钠产生 H_2S 气体。

2.4 基于 16S rRNA 基因序列的分子系统学分析

以 HD9-1 的基因组 DNA 为模板, 利用通用引物扩增目的基因片段, 序列已上传至 NMDC 数据库(登录号: NMDCN000110J)。其序列在 National Center for Biotechnology Information (NCBI)进行比对, 发现与 *Bacillus*

sp. THY-159、*Bacillus velezensis* PR189、*Bacillus subtilis* QB928 和 *Bacillus subtilis* RUB 的相似性达 99.9%以上。运用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树, 发现 HD9-1 与 *Bacillus subtilis* RUB 在同一分支(图 3)。结合形态学和生理生化特性分析结果, 将菌株 HD9-1 鉴定为枯草芽孢杆菌。

2.5 菌株 HD9-1 对马铃薯疮痂病防控效果

盆栽试验共收获马铃薯微型薯 31 粒(图 4), 其中, 水处理 Control 1 收获的 10 粒微型薯均未发病; 病原菌 *S. scabies* 处理 Control 2 收获的 11 粒微型薯中, 未发病小薯仅 1 粒, 达 4 级的病薯 7 粒, 占 63.64%, 总发病率达到 90.91%, 病情指数为 79.55; 病原菌 *S. scabies* 与拮抗菌 HD9-1 共处理组收获的 10 粒微型薯中, 未发病小薯 3 粒, 占 30%, 1 级病薯 4 粒, 占 40%, 4 级病薯仅 1 粒, 占 10%, 总发病率为 70%, 病情指数 32.50, 相对防效为 59.15% (表 2)。

2.6 菌株 HD9-1 对高温及盐碱环境的耐受性

菌体悬浮液分别经 37、60、80 °C 处理 30 min 后, 平均活菌数分别为 1.6×10^9 、 6.0×10^8 、 1.2×10^6 CFU/mL, 100 °C 处理 30 min 后仍有 1.5×10^4 CFU/mL 的菌体存活(表 3)。可见 HD9-1 可耐受 100 °C 左右的高温, 环境适应性较强。

图 5 结果表明, HD9-1 在 NaCl 含量为 3% 的条件下可正常生长, 在 NaCl 含量 7%–9% 的条件下 OD_{600} 值为 0.45, 生物量约为 LB 培养基 (NaCl 含量 1%) 的 60%; 在 NaCl 含量为 11% 的条件下, 菌体可缓慢生长, OD_{600} 值约为 0.10。HD9-1 的最适 pH 值为 7.0, 在 pH 5.0 和 pH 9.0 的条件下, OD_{600} 值可达 0.56 以上, 生物量约为 LB 培养基的 75%, 在 pH 3.0 的高偏酸和 pH 11.0 的高偏碱条件下, 菌体仍可缓慢生长, 培养过夜的 OD_{600} 值约为 0.1。由此推测, 菌株 HD9-1 在中国南方和北方偏酸和偏碱性土壤均能适应^[21]。

表 1 菌株 HD9-1 的生理生化特性

Table 1 Biochemical properties of HD9-1

Test items	Reaction
2-nitrophenyl	+
Arginine	+
Lysine	+
Ornithine	+
Sodium citrate	+
Sodium thiosulfate	-
Uridine	+
Tryptophan	+
Melibiose	-
Amygdalin	+
Pyruvate	+
Kohn gelatin	+
Glucose	-
Mannitol	-
Inositol	-
Sorbitol	-
Rhamnose	-
Sucrose	+
Arabinose	-

+: Positive; -: Negative.

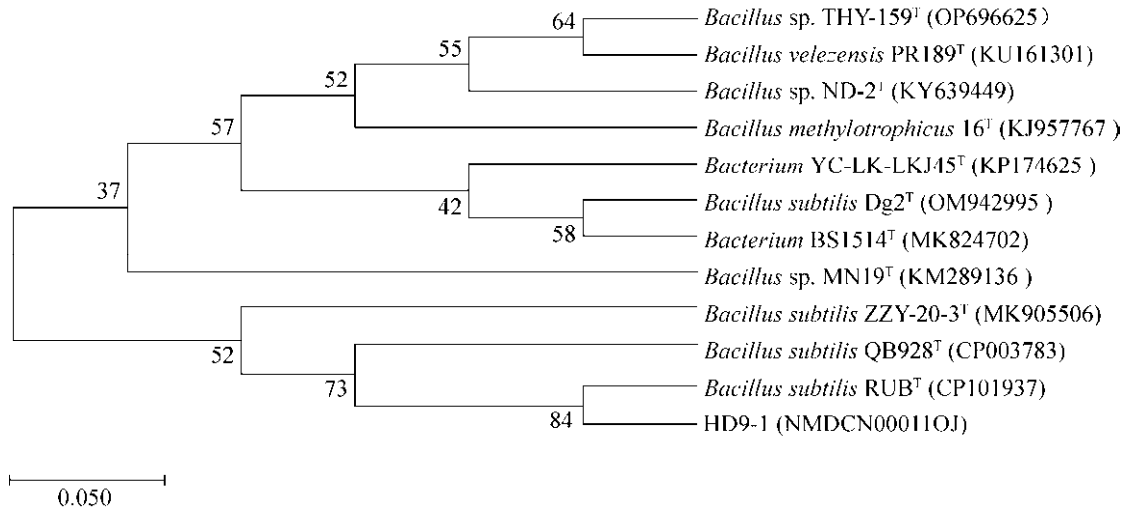


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 HD9-1 系统发育树 括号中数值为 GenBank 登录号；分支处标注有自展值；标尺 0.050 代表核苷酸替换率

Figure 3 Phylogenetic tree of HD9-1 constructed based on the 16S rRNA gene sequences. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The bootstrap values are shown at the node; The scale bar indicates 0.050 substitutions per nucleotide position.



图 4 菌株 HD9-1 的盆栽抑病试验结果

Figure 4 The results of potted disease inhibition test of HD9-1.

表 2 菌株 HD9-1 的防治效果统计

Table 2 Control effect statistics of HD9-1

Treatment	Number of grains	Sickness					Occurrence rate (%)	Disease index	Control effects (%)
		0	1	2	3	4			
Control 1	10	11	0	0	0	0	0.00	0.00	/
Control 2	11	1	0	2	1	7	90.91	79.55	/
HD9-1	10	3	4	1	1	1	70.00	32.50	59.15

/: The effectiveness of control 1 and control 2 does not need to be calculated.

表 3 HD9-1 的高温耐受性

Table 3 High temperature tolerance of HD9-1

Temperature (°C)	Colony number (CFU/mL)
37	$1.6 \times 10^9 \pm 8.2 \times 10^6$
60	$6.0 \times 10^8 \pm 8.1 \times 10^5$
80	$1.2 \times 10^6 \pm 3.2 \times 10^3$
100	$1.5 \times 10^4 \pm 4.1 \times 10^3$

表中数据格式为平均数±标准偏差

The data format in the table is average±standard deviation.

2.7 菌株 HD9-1 对多种化学农药的敏感性

表 4 数据显示, HD9-1 对中生菌素、苯醚甲环唑、氟菌·霜霉威、春雷霉素、氟硅唑、吡唑醚及啉菌酯和甲基硫均不敏感, 推测 HD9-1

可以在上述药品存在的环境中使用, 但代森锰锌和氟啶胺会抑制 HD9-1 的生长。

2.8 菌株 HD9-1 的广谱拮抗性

图 6 结果表明, 仅接种大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的对照组, 28 °C 培养 4 d 后病原菌可正常生长, 菌落面积分别为 4.27、22.75 和 8.02 cm²; 而接种 HD9-1 发酵液的处理组, 病原菌生长均受到不同程度的抑制, 菌落面积分别为 0.91、3.38 与 6.41 cm², HD9-1 对大丽轮枝菌、尖孢镰刀菌和立枯丝核菌的抑菌率分别约为 78.67%、85.14%和 16.34%。

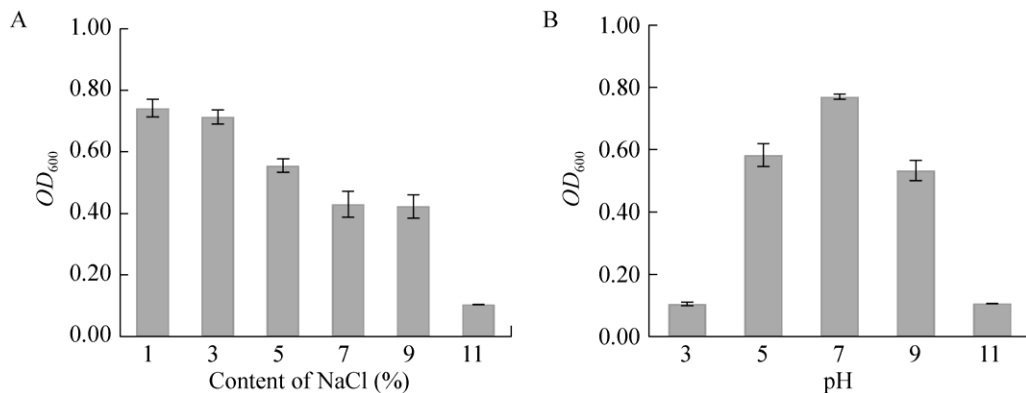


图 5 HD9-1 拮抗菌耐盐碱范围

Figure 5 Salt-alkali tolerance range of HD9-1.

表 4 多种化学农药对 HD9-1 生长的抑制效果

Table 4 Inhibitory effects of pesticides on HD9-1

Fungicide	Manufacturer	Potency (%)	Tolerance
H ₂ O	/	/	+
Zhongshengmycin	Fujian Kaili Biological Products Limited Company	0.10	+
Mancozeb	Sichuan Runer Technology Limited Company	0.10	-
Difenoconazole	Hebei Zhongbao Green Crop Technology Limited Company	0.10	+
Flutamicarb	Bayer Crop Science (China) Limited Company	0.10	+
Kasugamycin	Shaanxi McColo Biological Limited Company	0.10	+
Flusilazole	Jiangsu Jiannong Plant Protection Limited Company	0.01	+
Pyrazole ether fungus ester	Jinan Zhongke Green Biological Engineering Limited Company	0.05	+
Azoxystrobin	Xianzhengda Nantong Crop Protection Limited Company	0.10	+
Fluridylamine	Ningbo Shiyuan Jinniu Agricultural Technology Limited Company	0.10	-
Thiophanate-methyl	Jinan Taihe Chemical Limited Company	0.10	+

+: 拮抗性细菌生长没有影响; -: 抑制拮抗性细菌生长; /: H₂O 的防效, 不需计算

+: No effect of antagonistic bacterial growth; -: Inhibition of antagonistic bacterial growth; /: The effectiveness of H₂O does not need to be calculated.

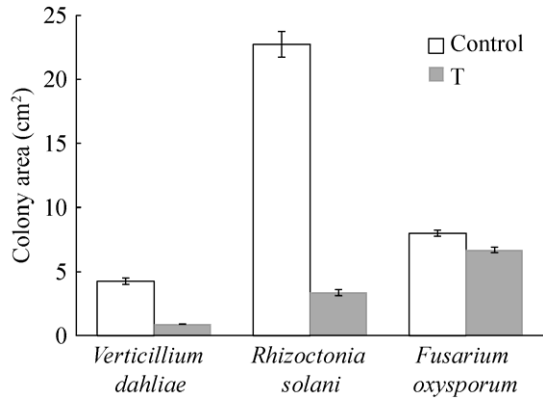


图 6 菌株 HD9-1 的广谱抑菌效果

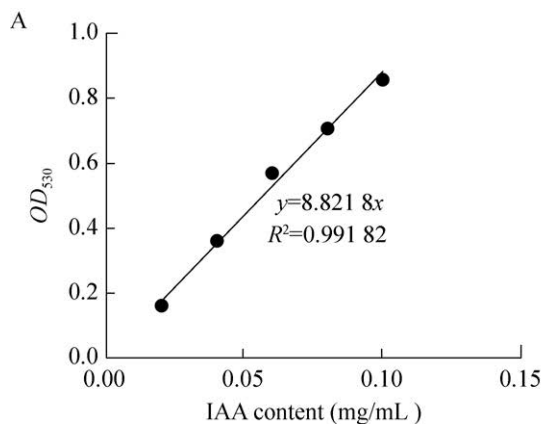
Figure 6 Wide-spectrum resistance of strain HD9-1. Control: The plate without HD9-1; T: The plate with HD9-1.

由此可知, HD9-1 可以拮抗多种病原菌, 其广谱拮抗性有待进一步挖掘。

2.9 拮抗菌促生长特性鉴定

IAA 的测定通常采用 SalKowski 比色法。图 7A 为吸光度值 530 nm 条件下绘制的标准曲线。培养液与比色液混合静置后, 对照组无色透明, 而 HD9-1 则逐渐呈现出粉红色(图 7B), 表明菌株产 IAA, 对比标准曲线计算可知, 其 IAA 的浓度约为 3.44 mg/L。

盆栽试验结果表明, 添加 HD9-1 培养 14 d 后, 土豆苗株高为 13.82 cm, 较对照增高了 2.88 cm;



生长速度为 0.47 cm/d, 高出对照 0.13 cm/d (图 8)。

3 讨论与结论

在马铃薯生产中, 种植户为了追求产量和效益而过度施肥用药的现象普遍存在。化肥与农药的不合理施用导致土壤生态失衡, 以疮痂病为代表的土传病害逐年加剧, 不仅造成巨大的经济损失, 也严重威胁核心产区产业(尤其种薯产业)的可持续发展。人们开展马铃薯疮痂病防控研究已有 100 多年历史, 但至今尚未取得重大突破, 未开发出可规模化应用的特效化学药剂及其他措施^[22-23]。主要原因是病原菌为特殊的链霉菌, 土传兼种传, 种类多达 20 余种, 在不同生态区差异化分布^[24-25]。现有的生防菌种质资源十分匮乏, 且稳定性和生态适应性差, 难以大范围推广^[26]。

使用化学药剂及微生物制剂是目前缓解马铃薯疮痂病危害的主要方法, 研究者利用棉隆和辣根素水剂熏蒸土壤, 对疮痂病的防效可达 80% 左右, 但是防治效果与土壤质地密切相关, 且随着熏蒸次数的增加, 土壤中有毒物质含量也显著升高, 严重影响农产品品质^[27-28]。王丽玮等^[29]发现链霉菌 PBSH9 虽能较好地抑制疮



图 7 菌株 HD9-1 代谢产物中生长素测定 A: IAA 标准曲线. B: HD9-1 所产的 IAA

Figure 7 Auxin assay in strain HD9-1 metabolites. A: IAA standard curve. B: HD9-1 produces IAA.

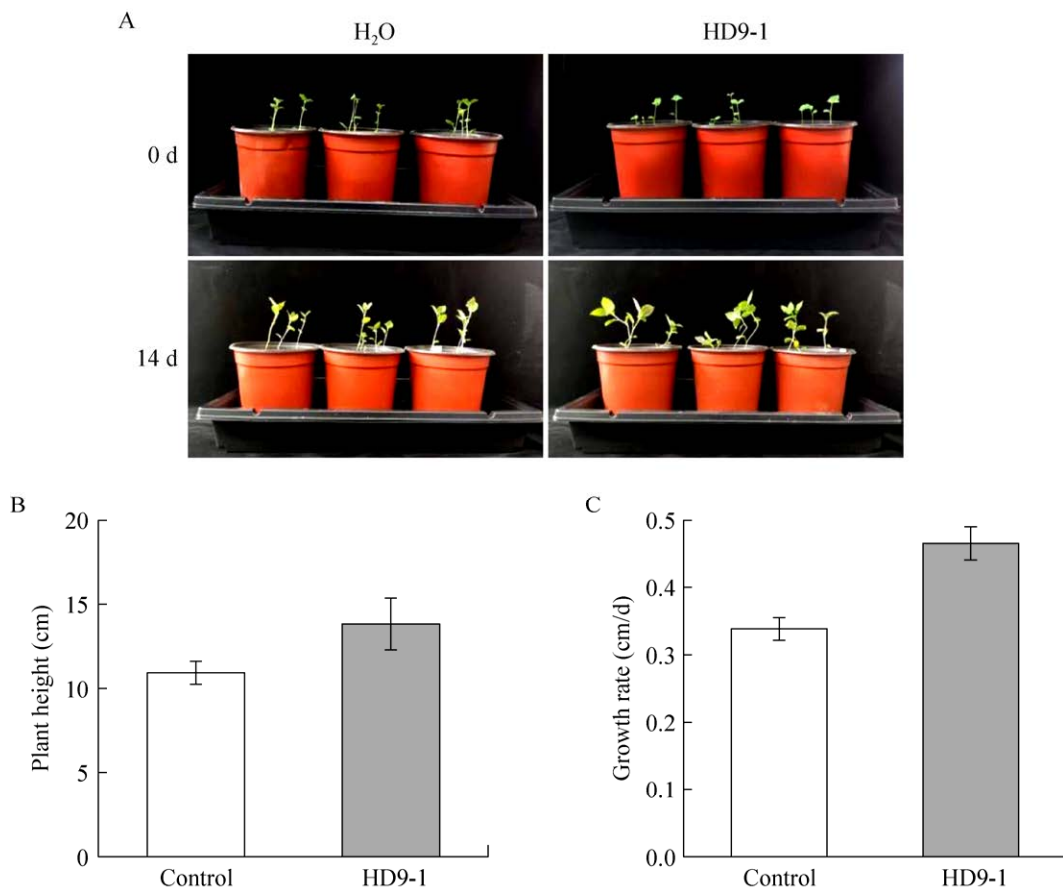


图 8 菌株 HD9-1 的促生能力分析 A: 盆栽实验照片. B: 植株高度. C: 平均生长速率

Figure 8 Analysis of growth-promoting ability of strain HD9-1. A: Photos of pot experiment. B: Plant height after 14 d. C: Average growth rate of 14 d.

痂病, 但对气温敏感, 在 28 °C 时抑菌活性最佳, 当温度低于 25 °C 或高于 31 °C 时其抑菌效果降低 30%, 难以在复杂的大田环境中应用。郭凤柳等^[30]报道的枯草芽孢杆菌 B1 及其代谢产物均可抑制疮痂链霉菌的生长, 但当培养时间超过 6 d 后其抑菌活性下降 50%。枯草芽孢杆菌的生防机制主要包括竞争作用、拮抗作用、溶菌作用、诱导植物产生抗性和促进植物生长等^[31]。曹君等^[32]发现枯草芽孢杆菌通过营养竞争抑制病原菌的生长, 有研究证明枯草芽孢杆菌与病原菌共培养时会分泌出新的抗菌物质^[33-34]。HD9-1 的发酵滤液中无抑菌活性物质, 排除了其通过胞外直接分泌抗菌物质实现抑菌

的可能性, 其机制有待进一步深入研究。

本文从广东薯田土壤中分离、筛选的枯草芽孢杆菌 HD9-1, 对 *S. scabies* 的抑菌圈直径达到 31 mm, 盆栽试验对马铃薯疮痂病的相对防效达 59.15%, 在拮抗菌接种量相近的情况下明显高于防效为 40% 的研究结果^[35-36]。菌株耐高温、耐盐碱, 具有良好的环境适应性和促生长特性, 对常用化学农药不敏感, 对立枯丝核菌、尖孢镰刀菌和大丽轮枝菌等植物病原菌有明显的抑制效果, 应用前景良好。为了加快其产业化、规模化进程, 尚需开展不同生态马铃薯产区的田间小区试验和大田示范, 确定其环境适应性和防病效果, 并优化其发酵工艺, 比较不

同碳源、氮源、接种量、温度、通气量等对 HD9-1 的生长繁育及其抑菌活性的影响, 筛选出适宜工厂化发酵的培养基配方和培养条件。

REFERENCES

- [1] 谢江, 王雨林, 李文娟, 谢开云, 宋飞鸿, 赵钟峰, 李春荣, 葛宗卫, 罗李飞. 峨边县马铃薯价值链与产业发展[J]. 中国马铃薯, 2016, 30(1): 52-58.
XIE J, WANG YL, LI WJ, XIE KY, SONG FH, ZHAO ZF, LI CR, GE ZW, LUO LF. Potato value chains and industry development in Ebian county[J]. Chinese Potato Journal, 2016, 30(1): 52-58 (in Chinese).
- [2] 徐进, 朱杰华, 杨艳丽, 汤浩, 吕和平, 樊明寿, 石瑛, 董道峰, 王贵江, 王万兴, 熊兴耀, 高玉林. 中国马铃薯病虫害发生情况与农药使用现状[J]. 中国农业科学, 2019, 52(16): 2800-2808.
XU J, ZHU JH, YANG YL, TANG H, LÜ HP, FAN MS, SHI Y, DONG DF, WANG GJ, WANG WX, XIONG XY, GAO YL. Status of major diseases and insect pests of potato and pesticide usage in China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(16): 2800-2808 (in Chinese).
- [3] 刘齐栋, 陈焕丽, 张晓静, 李志敏, 陈亚伟. 5 种药剂处理对马铃薯疮痂病防治效果[A]//马铃薯产业与绿色发展(2021)[C]. 2021. DOI: 10.26914/c.cnkihy.2021.013248.
LIU QD, CHEN HL, ZHANG XJ, LI ZM, CHEN YW. Control effect of five fungicides on potato scab[A]// Potato industry and green development (2021)[C]. 2021. DOI: 10.26914/c.cnkihy.2021.013248. (in Chinese).
- [4] 聂峰杰, 陈虞超, 巩楠, 张丽, 甘晓燕, 石磊, 宋玉霞. 马铃薯疮痂病致病链霉菌分类及其致病机理研究进展[J]. 分子植物育种, 2018, 16(4): 1313-1319.
NIE FJ, CHEN YC, GONG L, ZHANG L, GAN XY, SHI L, SONG YX. Research progress on classification and pathogenesis of *Streptomyces*. spp of potato scab[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(4): 1313-1319 (in Chinese).
- [5] HILTUNEN LH, OJANPERÄ T, KORTEMÄÄ H, RICHTER E, LEHTONEN MJ, VALKONEN JPT. Interactions and biocontrol of pathogenic *Streptomyces* strains co-occurring in potato scab lesions[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(1): 199-212.
- [6] HILTUNEN LH, KELLONIEMI J, VALKONEN JPT. Repeated applications of a nonpathogenic *Streptomyces* strain enhance development of suppressiveness to potato common scab[J]. Plant Disease, 2017, 101(1): 224-232.
- [7] 夏善勇, 盛万民. 我国马铃薯疮痂病及其防治研究进展[J]. 植物保护, 2022, 48(1): 7-16, 28.
XIA SY, SHENG WM. Research progress on potato common scab disease in China and its control measures[J]. Plant Protection, 2022, 48(1): 7-16, 28 (in Chinese).
- [8] NÆRSTAD R, DEES MW, LE VH, HOLGADO R, HERMANSEN A. Occurrence of skin blemish diseases (scab and scurf) in Norwegian potato production[J]. Potato Research, 2012, 55(3): 225-239.
- [9] LERAT S, SIMAO-BEAUNOIR AM, BEAULIEU C. Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity[J]. Molecular Plant Pathology, 2009, 10(5): 579-585.
- [10] JOHANSEN TJ, DEES MW, HERMANSEN A. High soil moisture reduces common scab caused by *Streptomyces turgidiscabies* and *Streptomyces europaeiscabiei* in potato[J]. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science, 2015, 65(3): 193-198.
- [11] 杨冰, 平原, 杜春梅. 马铃薯疮痂病的致病机制及防治研究进展[J]. 中国农学通报, 2021, 37(18): 131-137.
YANG B, PING Y, DU CM. Research progress on pathogenesis and control of potato scab[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, 37(18): 131-137 (in Chinese).
- [12] 石莹莹, 赵盼, 宋双伟, 熊惘梓, 莫乘宝, 仲乃琴. 马铃薯疮痂病拮抗菌 YN-2-2 的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2020, 47(8): 2425-2435.
SHI YY, ZHAO P, SONG SW, XIONG MZ, MO CB, ZHONG NQ. Isolation and characterization of the antagonistic bacterium YN-2-2 against potato common scab[J]. Microbiology China, 2020, 47(8): 2425-2435 (in Chinese).
- [13] 赵永龙, 赵盼, 曹晶晶, 汪志琴, 刘璐, 仲乃琴. 疮痂链霉菌拮抗菌定向筛选及其功能评价[J]. 微生物学报, 2022, 62(7): 2624-2641.
ZHAO YL, ZHAO P, CAO JJ, WANG ZQ, LIU L, ZHONG NQ. Targeted screening and functional evaluation of the bacterial antagonists to *Streptomyces scabies*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(7): 2624-2641 (in Chinese).
- [14] 陈志珪, 王鹏, 王微, 金光辉, 台莲梅, 郭永霞, 孙冬梅, 靳学慧. 马铃薯疮痂病菌 *Streptomyces scabies* 拮抗细菌的筛选及 BKS104 鉴定[J]. 微生物学通报, 2021, 48(11): 4145-4155.
CHEN ZY, WANG P, WANG W, JIN GH, TAI LM, GUO YX, SUN DM, JIN XH. Screening of antagonistic bacteria against *Streptomyces scabies* and identification

- of BKS104[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(11): 4145-4155 (in Chinese).
- [15] CHEN SF, ZHANG MS, WANG JY, LÜ D, MA YF, ZHOU B, WANG B. Biocontrol effects of *Brevibacillus laterosporus* AMCC100017 on potato common scab and its impact on rhizosphere bacterial communities[J]. *Biological Control*, 2017, 106: 89-98.
- [16] 杨亚东, 罗其友, 王道龙, 刘洋, 伦闰琪. 中国马铃薯区域分布影响因素分析[J]. *中国农业资源与区划*, 2018, 39(2): 76-81.
- YANG YD, LUO QY, WANG DL, LIU Y, LUN RQ. Influencing factors of potato planting spatial structure in China[J]. *Chinese Journal of Agricultural Resources and Regional Planning*, 2018, 39(2): 76-81 (in Chinese).
- [17] 赵伟全, 杨文香, 李亚宁, 刘大群, 孟庆芳, 张汀. 中国马铃薯疮痂病菌的鉴定[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(2): 313-318.
- ZHAO WQ, YANG WX, LI YN, LIU DQ, MENG QF, ZHANG T. Characterization and identification on the pathogen of potato scab in China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(2): 313-318 (in Chinese).
- [18] 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.
- DONG XZ, CAI MY. *Handbook of Identification of Common Bacterial Systems*[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [19] 李建萍. 检验科微生物检验质量的影响因素及病原菌耐药性分析[J]. *中国药物与临床*, 2021, 21(15): 2733-2735.
- LI JP. Analysis of influencing factors of microbial inspection quality and drug resistance of pathogenic bacteria in laboratory[J]. *Chinese Remedies & Clinics*, 2021, 21(15): 2733-2735 (in Chinese).
- [20] 李振东, 陈秀蓉, 李鹏, 满百膺. 珠芽蓼内生菌 Z5 产 IAA 和抑菌能力测定及其鉴定[J]. *草业学报*, 2010, 19(2): 61-68.
- LI ZD, CHEN XR, LI P, MAN BY. Identification of *Polygonum viviparum* endophytic bacteria Z5 and determination of the capacity to secrete IAA and antagonistic capacity towards pathogenic fungi[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2010, 19(2): 61-68 (in Chinese).
- [21] 刘方春, 邢尚军, 马海林, 杜振宇, 马丙尧. 干旱生境下根际促生细菌的筛选、鉴定及应用[J]. *核农学报*, 2014, 28(7): 1306-1313.
- LIU FC, XING SJ, MA HL, DU ZY, MA BY. Screening, identification and application of plant growth-promoting rhizobacteria under drought conditions[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(7): 1306-1313 (in Chinese).
- [22] 刘玉华, 王文桥. 河北省一季作区马铃薯病虫害发生及综合防控[J]. *中国马铃薯*, 2010, 24(3): 159-164.
- LIU YH, WANG WQ. Occurrence of diseases and insects on one-cropping potatoes in Hebei province and their integrated managements[J]. *Chinese Potato Journal*, 2010, 24(3): 159-164 (in Chinese).
- [23] 王鹏程, 金光辉, 张春雨, 李鑫. 不同生防菌剂组合及施用方式对马铃薯疮痂病的防治效果及促生作用[J]. *西南农业学报*, 2022, 35(4): 797-803.
- WANG PC, JIN GH, ZHANG CY, LI X. Biological control and growth promoting effect of potato common scab with different biocontrol agents and application method[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 35(4): 797-803 (in Chinese).
- [24] TAKANO Y, CHOI W, MITCHELL TK, OKUNO T, DEAN RA. Large scale parallel analysis of gene expression during infection-related morphogenesis of *Magnaporthe grisea*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2003, 4(5): 337-346.
- [25] 罗山, 巩晨, 赵庆云, 杨梦萍, 杜魏甫, 伏雪, 张保菊, 于德才, 张红骥. 云南省马铃薯疮痂链霉菌种群分布及环境相关因子分析[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(5): 1246-1254.
- LUO S, GONG C, ZHAO QY, YANG MP, DU WF, FU X, ZHANG BJ, YU DC, ZHANG HJ. Population distribution and environment related factors of *Streptomyces* spp. on potato in Yunnan[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(5): 1246-1254 (in Chinese).
- [26] 陈宇飞, 石琰, 张丽莉, 柳迎杰, 刘海旭. 10 种杀菌剂不同施药方式对马铃薯生长和疮痂病防效影响[J]. *中国马铃薯*, 2021, 35(3): 262-271.
- CHEN YF, SHI Y, ZHANG LL, LIU YJ, LIU HX. Effects of ten agents applied in different ways on potato growth and common scab control[J]. *Chinese Potato Journal*, 2021, 35(3): 262-271 (in Chinese).
- [27] 梁宏杰, 吕和平, 高彦萍, 吴雁斌, 王敏, 赵康, 张武. 98%棉隆在马铃薯原原种生产中对疮痂病的防治效果[J]. *农药*, 2021, 60(2): 150-153.
- LIANG HJ, LÜ HP, GAO YP, WU YB, WANG M, ZHAO K, ZHANG W. Control effect of dazomet 98% against scab in mini-tuber production[J]. *Agrochemicals*, 2021, 60(2): 150-153 (in Chinese).
- [28] 徐雪亮, 刘子荣, 曾绍民, 刘小娟, 范会云, 黄衍章, 姚英娟, 王奋山. 5 种生物药剂防治马铃薯主要病害田间药效试验[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(9): 122-126.
- XU XL, LIU ZR, ZENG SM, LIU XJ, FAN HY,

- HUANG YZ, YAO YJ, WANG FS. Field control effect of five biological agents on main potato diseases[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(9): 122-126 (in Chinese).
- [29] 王丽玮, 万中义, 宋亚迪, 修志君, 于世成, 杜美娥, 张笑宇. 生防链霉菌 PBSH9 对马铃薯疮痂病菌的抑制作用及其代谢物培养条件优化[J]. 中国蔬菜, 2022(6): 64-71.
- WANG LW, WAN ZY, SONG YD, XIU ZJ, YU SC, DU ME, ZHANG XY. Inhibitory effect of biocontrol *Streptomyces* sp. strain PBSH9 on potato common scab and optimization of its metabolites cultivation condition[J]. China Vegetables, 2022(6): 64-71 (in Chinese).
- [30] 郭凤柳, 张海颖, 李勇, 于秀梅, 赵伟全, 刘大群. 马铃薯疮痂病拮抗菌株 B1 的鉴定及防效测定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 90-93.
- GUO FL, ZHANG HY, LI Y, YU XM, ZHAO WQ, LIU DQ. Identification and control effect of antagonistic strain B1 against potato scab[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2013, 41(5): 90-93 (in Chinese).
- [31] 黄曦, 许兰兰, 黄荣韶, 黄庶识. 枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(1): 24-29.
- HUANG X, XU LL, HUANG RS, HUANG SS. Research advance in controlling plant diseases by *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(1): 24-29 (in Chinese).
- [32] 曹君, 高智谋, 潘月敏, 李静, 纪文飞, 李秀丽. 枯草芽孢杆菌 BS 菌株和哈茨木霉 TH-1 菌株对棉花枯萎病菌的拮抗作用[J]. 植物病理学报, 2005, 35(S1): 170-172.
- CAO J, GAO ZM, PAN YM, LI J, JI WF, LI X. Inhibition of *Bacillus subtilis* BS and *Trichoderma harzianum* TH-1 against the pathogens of *Verticillium* wilt and *Fusarium* wilt of cotton[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(S1): 170-172 (in Chinese).
- [33] ABDEL-WAHAB NM, SCHARF S, ÖZKAYA FC, KURTÁN T, MÁNDI A, FOUAD MA, KAMEL MS, MÜLLER WEG, KALSCHEUER R, LIN WH, DALETOS G, EBRAHIM W, LIU Z, PROKSCH P. Induction of secondary metabolites from the marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* through co-cultivation with *Bacillus subtilis*[J]. Planta Medica, 2019, 85(6): 503-512.
- [34] BOELAN EG, PURNOMO AS. Abilities of co-cultures of white-rot fungus *Ganoderma lingzhi* and bacteria *Bacillus subtilis* on biodegradation DDT[J]. Journal of Physics: Conference Series, 2018, 1095: 012015.
- [35] 申永瑞, 向君亮, 王佳琦, 刘爽, 李章雷, 刘权, 殷奎德. 疮痂链霉菌拮抗菌株 BU396 的分离鉴定与抗菌性质分析[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2601-2611.
- SHEN YR, XIANG JL, WANG JQ, LIU S, LI ZL, LIU Q, YIN KD. Isolation, identification and antimicrobial properties of a biocontrol strain BU396 against *Streptomyces scabies*[J]. Microbiology China, 2019, 46(10): 2601-2611 (in Chinese).
- [36] 李玉聪, 李滨影, 油心怡, 刘宇豪, 周波, 林榕珊. 马铃薯疮痂病拮抗菌的筛选鉴定及防治效果初探[J]. 生物技术通报, 2018, 34(10): 116-121.
- LI YC, LI BY, YOU XY, LIU YH, ZHOU B, LIN RS. Screening, identification and biocontrol effect of antagonistic bacteria on potato common scab[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(10): 116-121 (in Chinese).