



研究报告

马铃薯疮痂病拮抗菌 YN-2-2 的分离与鉴定

石莹莹¹ 赵盼^{2,3} 宋双伟^{2,3} 熊惘梓¹ 莫乘宝⁴ 仲乃琴^{*2,3}

1 宁夏大学农学院 宁夏 银川 750021

2 中国科学院微生物学研究所 北京 100101

3 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

4 广西壮族自治区环江毛南族自治县糖蔗生产技术服务站 广西 河池 547100

摘要:【背景】近年来,疮痂病在全国马铃薯各主要产区普遍发生,危害呈逐年加重趋势,有效防控手段匮乏,给种植者造成严重的经济损失。利用拮抗微生物抑制病原菌繁殖,降低其危害程度,已成为马铃薯植保领域的研究热点。【目的】筛选对疮痂病原菌具有拮抗作用的菌株,为研制高效复合功能菌剂、有效防控马铃薯疮痂病提供菌种资源。【方法】从疮痂病发生严重的云南昭通马铃薯大田采集近根际土壤,分离、筛选代谢产物具有明显拮抗效果的菌株,通过形态学观察、生理生化特征分析和 16S rRNA 基因序列测定等方法进行菌种鉴定,并对其代谢产物的稳定性和抑菌效果进行分析。【结果】获得一株拮抗效果明显的细菌 YN-2-2,其菌落圆形,淡黄色,边缘整齐、光滑、干燥,中间有凹陷,菌体杆状,大小为(2.51–4.09) μm ×(1.09–1.68) μm ,革兰氏染色阳性,16S rRNA 基因序列与 *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792^T (ACNF01000156)的相似性达到 99.79%。YN-2-2 的代谢产物热稳定性较好,pH 耐受范围广(3.0–13.0),对蛋白酶 K 敏感度较低,对疮痂链霉菌的抑菌圈直径最大为 22.8 mm。盆栽试验结果表明:浇施 100 mL 浓度为 1×10^7 CFU/mL 的培养液,可显著降低马铃薯微型薯疮痂病病情指数,防效达 36.11%。【结论】菌株 YN-2-2 经鉴定为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*),可以作为高效复合功能菌剂的候选菌株。

关键词: 马铃薯疮痂病, 拮抗菌, 苏云金芽孢杆菌, 鉴定, 生物防治

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0200708); Major Science and Technology Innovation Project of Shandong Province (2018CXCC0303); Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region (2018BBF02021); National Natural Science Foundation of China (31601622)

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

Received: 06-03-2020; **Accepted:** 11-05-2020; **Published online:** 04-06-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0200708); 山东省重大科技创新项目(2018CXCC0303); 宁夏回族自治区重点研发计划(2018BBF02021); 国家自然科学基金(31601622)

***通信作者:** E-mail: nqzhong@im.ac.cn

收稿日期: 2020-03-06; **接受日期:** 2020-05-11; **网络首发日期:** 2020-06-04

Isolation and characterization of the antagonistic bacterium YN-2-2 against potato common scab

SHI Ying-Ying¹ ZHAO Pan^{2,3} SONG Shuang-Wei^{2,3} XIONG Min-Zi¹
MO Cheng-Bao⁴ ZHONG Nai-Qin^{*2,3}

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

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

3 Key Laboratory of Potato Fertilizer and Pesticide Efficient Utilization Technology Enterprise, Inner Mongolia, Hulunbuir, Inner Mongolia 021000, China

4 Sugarcane Production Technical Service Station of Huanjiang Maonan Autonomous County, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Hechi, Guangxi 547100, China

Abstract: [Background] The potato common scab is a highly destructive disease caused by *Streptomyces scabies*, which leads to severe economic loss in the main producing areas of China. Due to the increasing disease risk and lack of efficient control means, identification of antagonistic microorganisms is becoming a hotspot in the relevant research field. **[Objective]** This study is aimed to screen antagonistic bacterial strains against *Streptomyces scabies*, ultimately providing candidates for developing applicable microbial agents. **[Methods]** The near-rhizosphere soil was collected from potato fields in Zhaotong, Yunnan, where severe scab disease raged, and strains with antagonistic effects were isolated. Morphological observation, physiological and biochemical analyses, and 16S rRNA gene sequence determination were performed to characterize the strains isolated. The stability and bacteriostatic function of their metabolites were further examined. **[Results]** A strain with high antagonistic capacity was obtained and named YN-2-2. The bacterial cells were rod-shaped and gram-positive with a size range of (2.51–4.09) $\mu\text{m} \times (1.09–1.68) \mu\text{m}$. Its 16S rRNA gene sequence had 99.79% identity to *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792^T (ACNF01000156). The secondary metabolites of YN-2-2 showed good thermal stability, a wide pH tolerance between pH 3.0 and pH 13.0, and low sensitivity to proteinase K. The diameter of the largest inhibition zone against *Streptomyces scabies* was 22.8 mm. Pot experiments indicated that the disease index of common scab decreased significantly when potato plants were inoculated with 100 mL YN-2-2 culture with a final concentration of 1×10^7 CFU/mL, and the control effect was 36.11%. **[Conclusion]** Strain YN-2-2 was identified as *Bacillus thuringiensis*, it can be included into compound microbial agent against potato common scab.

Keywords: Potato common scab, Antagonistic strain, *Bacillus thuringiensis*, Identification, Biological control

马铃薯是我国第四大农作物,也是精准扶贫的重要抓手。近年来,随着国家和地方政府对马铃薯产业的重视,其种植面积逐年扩大。然而,受耕地面积限制,薯田的轮作倒茬难度也越来越大。高强度种植和连作致使疮痂病(potato common scab)在全国各地普遍发生。

马铃薯疮痂病是由疮痂链霉菌(*Streptomyces scabies*)引起的土传兼种传病害,可侵染马铃薯、甜菜、萝卜等多种植物^[1]。马铃薯被侵染后易在块茎表面形成平状、凸起状和凹陷状等多种类型的褐色

木栓化病斑^[2],从而影响其商品价值和耐贮性,售价减少 20%–40%,目前尚无对该病防效显著的化学药剂和措施,给种植者造成巨大的经济损失,已成为制约马铃薯产业(尤其种薯产业)可持续发展的重要瓶颈。因此,分离和鉴定拮抗菌、研制高效复合菌剂是目前有效防控马铃薯疮痂病的理想途径。Meng 等筛选的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) BAC03 能产生对疮痂链霉菌有显著抗菌活性的 LCI 蛋白,盆栽试验防效达 57%^[3]。Chen 等分离鉴定的侧孢短芽孢杆菌(*Brevibacillus*

laterosporus) AMCC100017, 在温室盆栽试验中防效达到 70.51%^[4]。李玉聪等从土壤样品中分离出甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*), 其抑菌圈直径达 19.7 mm, 在盆栽试验中防治效果达 48.66%^[5]。但用于疮痂病防控的菌种数量仍十分有限, 至今尚未研制出适宜大面积推广的高效复合菌剂。

本研究以疮痂链霉菌(*Streptomyces scabies*)作为靶标微生物, 筛选具有高效拮抗作用的细菌并进行鉴定, 以期为马铃薯疮痂病的有效防治提供候选菌株资源。

1 材料与方法

1.1 材料

疮痂链霉菌(*Streptomyces scabies*) CGMCC 4.1765 购自中国科学院微生物研究所菌种保藏管理中心; 供试近根际土壤样品于马铃薯收获当日(2018 年 10 月 16 日)采自云南省昭通市昭阳区大山包镇车路村。采样田前茬作物为马铃薯, 疮痂病发病率达 34%, 病情指数为 18%; LB 培养基、OMA 培养基以及高氏 I 号培养基的配制均参照《分子克隆实验指南》第 3 版^[6]; 盆栽基质采用 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 的营养土和蛭石。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 2×T5 Super PCR Mix, 北京擎科新业生物技术有限公司; Biolog GENIII 鉴定板 1030、梅里埃 API 20NE 非发酵 G-杆菌鉴定试剂盒、API 20E 肠杆菌科 G-杆菌鉴定试剂盒、API ZYM 酶活性试剂条, 北京兰伯瑞生物科技有限公司; 试验所用引物由博迈德生物工程股份有限公司合成。

采用蔡司荧光倒置显微镜, Zeiss 公司; 透射电子显微镜, JEDL 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 电泳仪和凝胶成像分析仪, 上海天能科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病原菌孢子悬浮液的制备

将马铃薯疮痂病病原菌接种于 OMA 培养基上, 28 °C 培养 14 d, 用无菌水冲洗孢子, 得到悬

浮液。采用稀释涂布平板法调整孢子悬浮液的浓度至 1×10^6 CFU/mL, 置于 4 °C 冰箱备用。

1.2.2 拮抗菌的分离与筛选

菌株的分离: 取 1 g 土样放入 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 水振荡均匀。吸取 100 μ L 土壤悬浮液涂布于 LB 固体平板, 28 °C 培养 24 h; 从中挑选细菌单菌落进行划线纯化, 将纯化得到的菌株接种于 LB 斜面培养基中备用。

拮抗菌初筛: 吸取 100 μ L 疮痂链霉菌孢子悬浮液均匀涂布于高氏 I 号固体培养基, 在平板上放置无菌滤纸片($d=6$ mm)备用。将分离获得的细菌菌株接种于液体 LB 培养基, 37 °C、200 r/min 培养 24 h, 吸取 6 μ L 培养液滴于滤纸片中央, 以无菌液体 LB 培养基为空白对照, 28 °C 培养 5–7 d 后测量抑菌圈的直径。

拮抗菌复筛: 在涂布 100 μ L 疮痂链霉菌孢子悬浮液的高氏 I 号培养基平板上均匀放置 4 个牛津杯备用。将初筛得到的菌株接种于液体 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 48 h, 取 1 mL 培养液 8 000 r/min 离心 10 min, 上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤; 沉淀菌体用 1 mL 液体 LB 培养基重新悬浮。采用牛津杯法^[7]分别测定拮抗菌培养液、除菌上清液、菌体悬浮液的抑菌活性, 并以无菌液体 LB 培养基作为空白对照。

抑菌效果测定: 将复筛得到的菌株活化后接种于 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养, 12、24、36、48、60、72 h 后分别取培养液 8 000 r/min 离心 10 min, 上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤, 采用牛津杯法测定上清液的抑菌活性, 并以无菌液体 LB 培养基作为空白对照。

1.2.3 拮抗菌的鉴定

形态学观察: 将待测菌液均匀涂布于固体 LB 培养基, 37 °C 培养 24 h, 观察菌落形态; 利用透射电子显微镜观察菌体形态及大小; 利用蔡司荧光倒置显微镜观察菌体经革兰氏染色后的形态。

生理生化特性分析: 采用 Biolog GENIII 鉴定板 1030、梅里埃 API 20NE 非发酵 G-杆菌鉴定试剂

盒、API 20E 肠杆菌科 G-杆菌鉴定试剂盒、API ZYM 酶活性试剂条测定待试菌株生理生化指标;接触酶试验参照《常见细菌系统鉴定手册》^[8]。

分子系统学分析:采用试剂盒提取待试菌株基因组 DNA。以其为模板,采用细菌 16S rRNA 基因片段通用引物扩增,正向引物 27F: 5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3';反向引物 1492R: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。PCR 反应体系(25 μ L): 2 \times T5 Super PCR Mix 12.5 μ L, 基因组 DNA 2 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物送博迈德生物工程股份有限公司进行测序。将得到的序列在 EzBioCloud 网站比对,根据比对结果选取相似性高的菌株,以及同一菌群内知名度高的菌株作为参考菌株,应用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树^[9]。

1.2.4 拮抗菌发酵产物稳定性测定

除菌上清液的制备:将活化后的菌株接种于液体 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 48 h。培养液经 8 000 r/min 离心 10 min 后取上清,用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌并保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

热稳定性测定:取 1 mL 除菌上清液分别置于 40、60、80 和 100 $^{\circ}$ C 水浴处理 30 min,然后冷却至室温,采用牛津杯法培养 5-7 d 后测量抑菌圈直径,以未进行高温处理的除菌上清液作为对照。试验重复 3 次^[10]。

pH 耐受范围测定:用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 将除菌上清液 pH 值调至 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0、13.0,4 $^{\circ}$ C 处理过夜,随后将 pH 调至 pH 7.0。经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后用牛津杯法培养 5-7 d 后测量抑菌圈直径,以未调节 pH 的处理作为对照。试验重复 3 次^[10]。

蛋白酶 K 对发酵产物抑菌活性的影响:在 1 mL 除菌上清液中加入 20 mg/mL 蛋白酶 K 5 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后用牛津杯

法培养 5-7 d 后测量抑菌圈直径,以未加蛋白酶 K 的处理作为对照。试验重复 3 次^[10]。

1.2.5 盆栽抑病试验

参照李玉聪等^[5]的方法,在温室中,将培养 30 d 的马铃薯组培苗(品种:夏波蒂)移栽至混配营养土和蛭石(1:3)的花盆(直径 17 cm)中,生长 10 d 后选取长势一致的幼苗,采用灌根法接种 100 mL 疮痂链霉菌 CGMCC 4.1765 孢子悬浮液(1×10^7 CFU/mL)于花盆中,间隔 10 d 后接种 100 mL 拮抗菌培养液(1×10^7 CFU/mL),对照组不接种拮抗菌 YN-2-2,并以未接种任何菌剂的处理作为空白对照。每个处理重复 6 次。待马铃薯收获后,依据疮痂病病害分级标准,分别统计发病率、病情指数和防治效果。

疮痂病病害分级标准:0 级:薯皮健康,无病斑;1 级:发病病斑面积为 0-1/6;2 级:发病病斑面积为 1/6-1/3;3 级:发病病斑面积为 1/3-1/2;4 级:发病病斑面积为 1/2 以上。

发病率(%)=发病块茎数/收获总块茎数 $\times 100$;

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) $\times 100$ /对照组病情指数。

1.2.6 数据处理

试验中所有数据均利用 SPSS 20 软件处理,运用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 马铃薯疮痂病拮抗菌的分离与筛选

从采自昭通薯田的土壤样品中共分离获得 72 株细菌,其中 5 株对疮痂链霉菌具有拮抗效果,编号为 YN-2-2 的菌株抑菌效果显著。该菌经液体培养 48 h 后,除菌上清液抑菌圈直径达 21.4 mm,与培养液 21.8 mm 的抑菌圈大小相当(图 1A),而菌体悬浮液抑菌圈直径仅为 14.4 mm,明显小于除菌上清液,表明其拮抗活性物质以次级代谢产物为主。

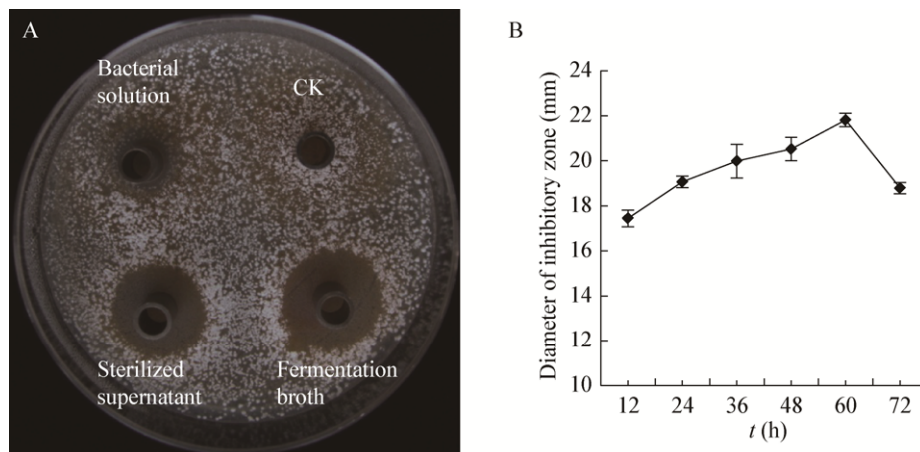


图 1 菌株 YN-2-2 对疮痂链霉菌的抑制效果

Figure 1 The inhibitory effect of strain YN-2-2 on *Streptomyces scabies*

注: A: 拮抗效果验证; B: 不同培养时间除菌上清液的抑菌效果。

Note: A: Antagonistic effect verification; B: Antibacterial effect of sterilized supernatant at different culture times.

对菌株 YN-2-2 培养液间隔 12 h 依次取样, 其上清液抑菌效果如图 1B 所示, 12 h 时抑菌圈直径为 17.5 mm; 随着发酵时间的增长, 拮抗效果逐渐增强, 至 60 h 时达到峰值, 抑菌圈直径为 21.8 mm, 之后其拮抗效果呈下降趋势。该结果表明 60 h 是该菌代谢产物的最佳收获期。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 形态特征

形态学观察结果如图 2 所示, 菌落呈圆形, 淡黄色, 边缘整齐, 表面干燥, 中间有凹陷, 不透明。

菌体杆状, 两端钝圆, 宽度为 1.09–1.68 μm , 长度为 2.51–4.09 μm , 革兰氏染色阳性。

2.2.2 生理生化特性分析

菌株 YN-2-2 能利用蔗糖、葡萄糖、甘露醇、鼠李糖作为唯一碳源, 生长过程中可产生过氧化氢酶和脂酶, 能使明胶液化, 硝酸盐还原成亚硝酸盐, 不产生脲酶和硫化氢, 柠檬酸盐试验、V-P 试验均呈阳性, 吡啶试验呈阴性, 在含 0–7% NaCl 的 LB 平板以及 28–45 $^{\circ}\text{C}$ 培养条件下均能正常生长, 但在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 48 h 未见菌落形成(表 1)。

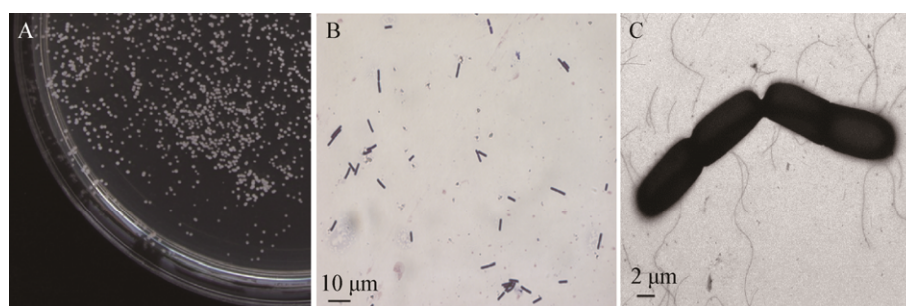


图 2 菌株 YN-2-2 形态特征

Figure 2 Morphological characteristics of strain YN-2-2

注: A: 菌落形态; B: 革兰氏染色; C: 细胞形态。

Note: A: Colony morphology; B: Gram staining; C: Cell morphology.

表 1 菌株 YN-2-2 的生理生化性质分析

Table 1 Physiological and biochemical properties of strain YN-2-2

试验项目 Test items	结果 Results	试验项目 Test items	结果 Results
蔗糖 Sucrose	+	接触酶试验 Contact enzyme test	+
D-葡萄糖 D-glucose	+	V-P 试验 V-P test	+
D-甘露醇 D-mannitol	+	柠檬酸盐 Citrate test	+
鼠李糖 Rhamnose	+	吡哌试验 Indole test	-
脲酶 Urease	-	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
脂酶 Lipase	+	明胶液化 Gelatin hydrolysis	+
5% NaCl	+	硫化氢 Hydrogen sulfide	-
7% NaCl	+	4 °C 生长 Growth at 4 °C	-
9% NaCl	-	55 °C 生长 Growth at 55 °C	-

注：+：阳性；-：阴性。
Note：+：Positive；-：Negative.

2.2.3 基于 16S rRNA 基因序列的分子系统学分析

以菌株 YN-2-2 基因组 DNA 为模板, 利用细菌 16S rRNA 基因通用引物可扩增出 1 500 bp 左右的目标片段。用 MEGA 5.0 软件构建的系统发育树如图 3 所示, 菌株 YN-2-2 与 *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792^T (ACNF01000156)、*Bacillus mobilis* 0711P9-1^T (MACF01000036)、*Bacillus toyonensis*

BCT-7112^T (CP006863) 在同一分支, 相似性达 99.79%。其中, *Bacillus mobilis* 柠檬酸盐试验阴性, 明胶液化试验阳性, 与菌株 YN-2-2 的结果相反; *Bacillus toyonensis* 明胶液化试验阳性, 与菌株 YN-2-2 相反; 只有 *Bacillus thuringiensis* 的生理生化特性与菌株 YN-2-2 相同, 因此将菌株 YN-2-2 鉴定为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。

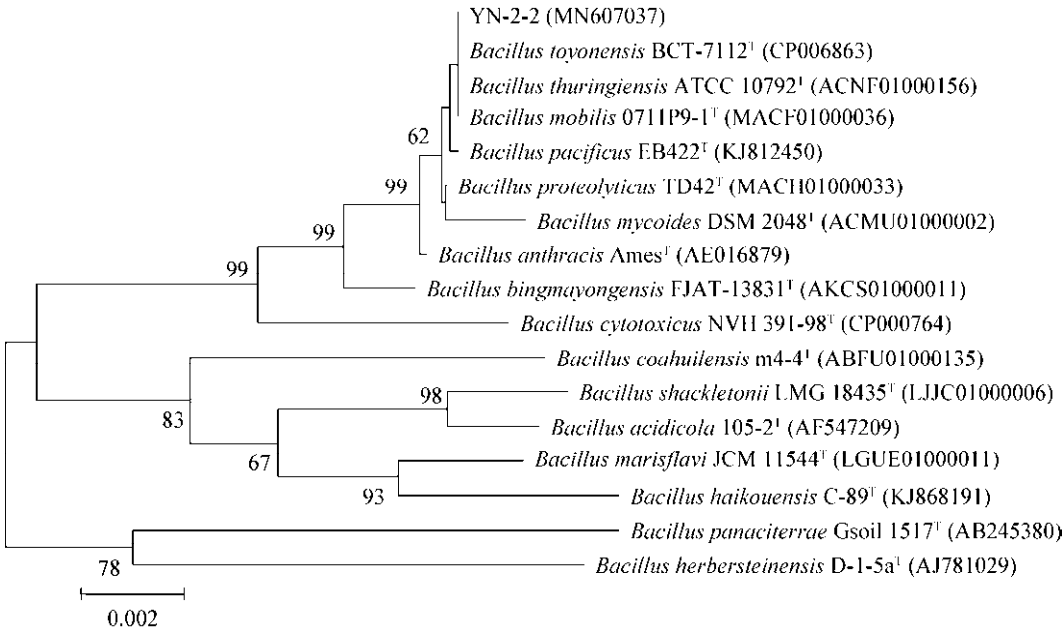


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 YN-2-2 系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of strain YN-2-2 based on 16S rRNA gene sequences

注：^T：模式菌株；括号中数值为 GenBank 登录号；分支处标注有自展值，标尺 0.002 代表核苷酸替换率。
Note：^T：Model strain；Numbers in parentheses are GenBank accession numbers；The bootstrap values are shown at the node and the scale bar indicates 0.002 substitutions per nucleotide position.

2.3 发酵产物稳定性测定

2.3.1 热稳定性测定

菌株 YN-2-2 培养液过滤除菌后分别经 40–80 °C 梯度温度处理 30 min 后, 仍有显著的抑菌活性。但随温度上升, 抑菌活性呈下降趋势(图 4A)。其中, 40 °C 处理的除菌上清液抑菌圈直径为 15.6 mm, 较对照的 18.2 mm 略有下降; 60 °C 处理的抑菌圈直径为 13.4 mm, 较对照下降 25.99%; 80 °C 处理的抑菌圈直径为 13.0 mm, 较对照下降 28.41%; 100 °C 处理后除菌上清液未形成明显的抑菌圈。上述结果表明胞外抑菌物质有较好的热稳定性。

2.3.2 pH 耐受范围测定

为了研究菌株 YN-2-2 活性物质的 pH 耐受范围, 将培养 48 h 的除菌上清液经不同 pH 处理过夜后发现, pH 9.0 处理的抑菌活性最强, 抑菌圈直径为 22.8 mm。与之相比, pH 3.0–11.0 处理的抑菌活性下降幅度均较小(约为 10%); pH 13.0 处理的抑菌活性下降幅度最大, 为 19.42%。结果表明, 胞外抑菌物质对 pH 的耐受范围较广(图 4B)。值得一提的是, 菌株 YN-2-2 接种至 pH 7.0 的液体 LB 培养基中培养 48 h 后, 其培养液 pH

也为 9.0, 由此可见菌株 YN-2-2 的最适 pH 值为 9.0。

2.3.3 蛋白酶 K 对发酵产物抑菌活性的影响

除菌上清液经蛋白酶 K 处理 30 min 后, 抑菌圈直径为 14.15 mm, 较对照组的 18.16 mm 下降 22.08%, 但仍保持良好的活性, 表明其代谢产物对蛋白酶 K 的敏感度较低(图 4C)。

2.4 对马铃薯疮痂病防控效果的盆栽试验

马铃薯试管苗移栽至花盆生长 92 d 后微型薯大小约为 4 cm 左右, 收获后观察各处理发病情况。如图 5 所示, 病情指数和防治效果统计结果见表 2。其中, 水处理的空白对照组 6 盆共收获 21 粒微型薯, 均未出现疮痂病斑; 病原菌处理组 6 盆共收获 21 粒微型薯, 疮痂病发病率为 100%, 病级达 4 级的居多, 占 57.14%, 病级为 3 级的占 28.57%, 病情指数为 85.71%; 病原菌+拮抗菌处理组 6 盆共收获 21 粒微型薯, 疮痂病发病率也为 100%, 但整体上发病均较轻, 病级为 1 级的最多, 占 57.14%, 病级达 4 级的仅占 33.3%, 病情指数为 54.76%, 防效为 36.11%。盆栽实验结果再次验证苏云金芽孢杆菌 YN-2-2 对于马铃薯疮痂病有较好的防控效果, 可作为复合菌剂的候选菌。

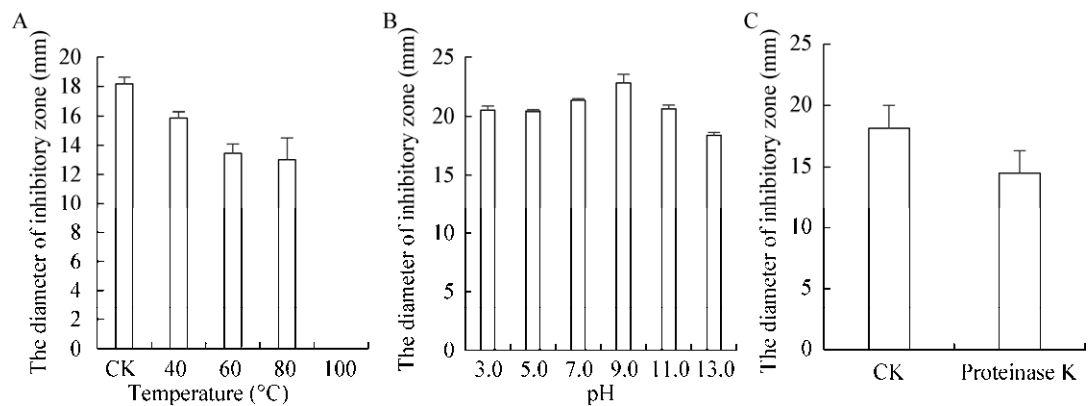


图 4 除菌上清液稳定性分析

Figure 4 The stability analysis of sterilized supernatant

注: A: 温度稳定性; B: pH 稳定性; C: 蛋白酶 K 稳定性.

Note: A: Temperature stability; B: pH stability; C: Proteinase K stability.

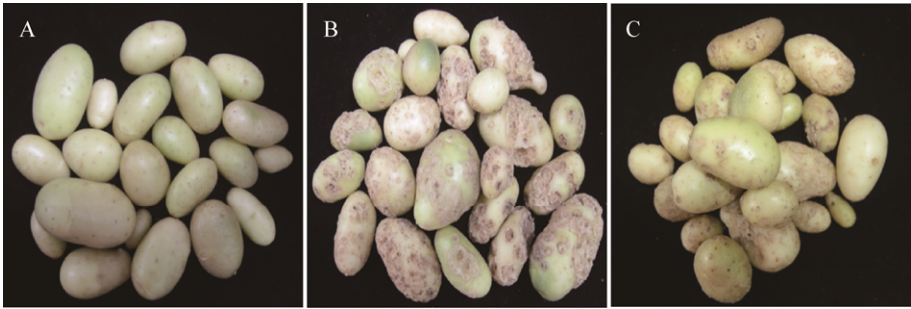


图 5 盆栽试验结果
Figure 5 The potted experiment results
注：A：空白对照；B：病原菌处理；C：病原菌+拮抗菌处理。
Note: A: Control; B: Pathogen treatment; C: Pathogen+antagonistic treatment.

表 2 盆栽试验结果
Table 2 The potted experiment results

处理 Treatment	收获粒数 Number of grains harvested	病级 Sickness					发病率 Occurrence rate (%)	病情指数 Disease index (%)	相对防效 Relative control effects (%)
		0	1	2	3	4			
病原菌+拮抗菌处理 Pathogen+antagonistic	21	0	12	0	2	7	100	54.76	36.11
病原菌处理 Pathogen	21	0	0	3	6	12	100	85.71	—
空白对照 Blank control	21	21	0	0	0	0	0	0	—

注：—：未发病。
Note: —: No morbidity.

3 讨论与结论

芽孢杆菌通常具有较强的抗逆性和繁殖力，理化性质稳定，在土壤中容易定殖，能够通过竞争、拮抗和诱导植物抗病等途径抑制病原菌的生长和入侵^[11]，已被广泛用于防治植物病害。目前可用于生防的芽孢杆菌有枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 和短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 等^[12-17]。但用于疮痂病防控的菌种数量仍十分有限，至今尚未研制出防效显著、适宜大面积推广的复合菌剂，需要进一步挖掘更多的菌种资源，为开发马铃薯疮痂病等农作物土传病虫害的高效生防菌剂提供参考。

本研究从马铃薯疮痂病的病害土壤中分离、筛

选出一株编号为 YN-2-2 的菌株，其对疮痂链霉菌具有显著的拮抗效果，抑菌圈直径最大为 22.8 mm，且绝大多数抑菌活性物质存在于发酵上清液中，经鉴定为苏云金芽孢杆菌。虽然盆栽试验结果中病原菌、病原菌+拮抗菌两组处理的发病率均为 100%，但前者病级达 3 级以上的居多，占调查总数的 85.71%，病情指数达 85.71%；而后者半数以上均为 1 级病薯，病情指数为 54.76%。由此可见，浇施苏云金芽孢杆菌 YN-2-2 后马铃薯疮痂病危害程度显著降低，表明其可作为抑制土传病害复合功能菌剂的候选菌株。

苏云金芽孢杆菌自 1901 年发现至今已有一百多年的历史，因其生物安全性高、稳定性好、特异性强等独特优势，成为目前产量最大、使用最为广泛的广谱型微生物胃毒杀虫剂^[18]。其伴孢晶体

的 δ -毒素(δ -endotoxins)或杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal protein, ICP)是主要的杀虫成分,已被用于防治鳞翅目、双翅目、膜翅目、同翅目、鞘翅目、直翅目等多种有害昆虫,而且对螨虫和线虫也具有杀伤性^[19-20]。高效异源表达苏云金芽孢杆菌主要杀虫晶体蛋白 Cry 的转基因玉米、棉花等已在世界范围广泛种植,表现出良好的抗虫增产效果^[21]。近年来,也有学者报道了苏云金芽孢杆菌对植物病害的防治效果。Dong 等发现苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)能产生高丝氨酸内酯类化合物(acyl-homoserine lactones, AHLs),抑制细菌的致病性^[22]。Roy 等从农田土壤样品中分离出产脂肽丰霉素的苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*),对丝状真菌具有抑制效果^[23]。这些发现扩大了苏云金芽孢杆菌除杀虫活性之外的应用范围,有利于更好地了解其在土壤生态系统中的作用。

有研究显示芽孢杆菌属的一些菌株可通过产生脂肽类表面活性素、伊枯草菌素和丰霉素,对多种潜在植物病原菌具有拮抗活性^[24]。我们设计了相应的引物,从本实验室保存的贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中均检测到了上述物质的关键合成基因,但从苏云金芽孢杆菌 YN-2-2 中未扩增出目标片段。另外,李晶等发现去除苏云金芽孢杆菌发酵上清液会大幅降低其杀虫效果,是因为上清液中含有分子量 396 Da 的水溶性抗生素 Zwittermicin A,其不仅是伴孢晶体毒素的增效剂,也对一些革兰氏阴性细菌和某些真菌具有显著的抑菌效果,并已解析出该种抗生素的化学结构^[25-26]。Silo-Suh 等验证了 Zwittermicin A 对预防由疫霉菌(*Phytophthora medicaginis*)引起的苜蓿根腐病极为有效^[27]。我们设计了 Zwittermicin A 合成基因簇中腺苷酰化功能域的特异性引物,但从苏云金芽孢杆菌 YN-2-2 的基因组 DNA 中未扩增出目标片段,且其抑菌活性物质可耐受 80 °C 高温 30 min,对蛋白酶 K 敏感度较低,在 pH 9.0 环境下抑菌活性最强,这些特性与刘

中信等描述的 Zwittermicin A 的理化性质不太一致^[28]。由此可见,YN-2-2 的抑菌活性物质并非上述报道的这几类物质。

关于苏云金芽孢杆菌 YN-2-2 抑菌成分的分离及其分子结构的分析还需深入研究,并通过分析发酵过程中的营养物质、优化发酵条件、改造菌种等措施,以提高其抑菌物质的得率,为实现 YN-2-2 的大面积应用奠定基础。

REFERENCES

- [1] Li S, Yang MJ, Zhang Y, et al. Research progress on potato scab[J]. Chinese Potato Journal, 2018, 32(4): 240-248 (in Chinese)
李爽, 杨美军, 张云, 等. 马铃薯疮痂病研究进展[J]. 中国马铃薯, 2018, 32(4): 240-248
- [2] Loria R, Bukhalid RA, Fry BA, et al. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*[J]. Plant Disease, 1997, 81(8): 836-846
- [3] Meng QX, Jiang HH, Hanson LE, et al. Characterizing a novel strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BAC03 for potential biological control application[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(5): 1165-1175
- [4] Chen SF, Zhang MS, Wang JY, et al. Biocontrol effects of *Brevibacillus laterosporus* AMCC100017 on potato common scab and its impact on rhizosphere bacterial communities[J]. Biological Control, 2017, 106: 89-98
- [5] Li YC, Li BY, You XY, et al. Screening, identification and biocontrol effect of antagonistic bacteria on potato common scab[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(10): 116-121 (in Chinese)
李玉聪, 李滨影, 油心怡, 等. 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
- [6] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Huang PT, trans. 3rd ed. Beijing: Science Publishing Company, 2002 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002
- [7] Liu PJ, Fu ZH, Sun D, et al. Separation and purification of Lectin from *Morus alba* L. and its antimicrobial activity[J]. Natural Product Research and Development, 2015, 27(3): 475-479 (in Chinese)
刘鹏举, 付志慧, 孙东, 等. 桑叶凝集素分离纯化及抑菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(3): 475-479
- [8] Cai MY, Dong XZ. Handbook for Identification of Common

- Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [9] Zhao CC, Chen GM, Zhang JX. Isolation, identification & antagonistic characteristics of *Bacillus pumilus* HLK8-1[J]. Journal of Microbiology, 2016, 36(2): 33-38 (in Chinese)
- 赵彩春, 陈国明, 张家学. 短小芽孢杆菌 HLK8-1 的分离鉴定及抑菌特性分析[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(2): 33-38
- [10] Zhang RP, Zheng HB, Jia CY, et al. Study on antimicrobial activity and stability of bioactive metabolite produced by actinomycete 97 strain fermentation[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(18): 279-283 (in Chinese)
- 张茹萍, 郑洪波, 贾春燕, 等. 放线菌菌株 97 发酵液中活性代谢产物的抑菌作用及稳定性测定[J]. 中国农学通报, 2010, 26(18): 279-283
- [11] Ma J, Li Y, Hu D, et al. Progress on mechanism and applications of *Bacillus* as a biocontrol microbe[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2018, 34(4): 639-648 (in Chinese)
- 马佳, 李颖, 胡栋, 等. 芽孢杆菌生物防治作用机理与应用研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(4): 639-648
- [12] Ye JJ, Cao NN, Wu JM, et al. Research progress on application of biocontrol *Bacillus*[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2014, 42(8): 185-190 (in Chinese)
- 叶晶晶, 曹宁宁, 吴建梅, 等. 生防芽孢杆菌的应用研究进展[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2014, 42(8): 185-190
- [13] Chen LH, Chang YJ, Wang CC, et al. Biocontrol of the *Fusarium* wilt of *Artemisia selengensis* seedling with bioorganic fertilizer of *Bacillus subtilis* D9[J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2016, 33(1): 66-71(in Chinese)
- 陈立华, 常义军, 王长春, 等. 枯草芽孢杆菌 D9 生物有机肥对连作芦蒿扦插苗枯萎病病害防控研究[J]. 农业资源与环境学报, 2016, 33(1): 66-71
- [14] Fu G, Ye YF, Wu YG, et al. Identification and control effect on banana anthracnose of seven antagonistic strains[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015, 36(2): 358-364 (in Chinese)
- 付岗, 叶云峰, 吴永官, 等. 7 株拮抗菌的鉴定及其对香蕉炭疽病的防治作用[J]. 热带作物学报, 2015, 36(2): 358-364
- [15] Liu L, Li L, Yan HX, et al. Research progress of application of *Bacillus megaterium*[J]. Journal of Northern Agriculture, 2016, 44(4): 117-120 (in Chinese)
- 刘露, 李丽, 闫洪雪, 等. 巨大芽孢杆菌的应用研究进展[J]. 北方农业学报, 2016, 44(4): 117-120
- [16] Dong YL, Li H, Rong SH, et al. Isolation and evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* Rdx5 as a potential biocontrol agent against *Magnaporthe oryzae*[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2019, 33(1): 408-418
- [17] Padaria JC, Tarafdar A, Raipuria R, et al. Identification of phenazine-1-carboxylic acid gene (*phc* CD) from *Bacillus pumilus* MTCC7615 and its role in antagonism against *Rhizoctonia solani*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2016, 56(9): 999-1008
- [18] Ye X, Zhao X, Ma CY, et al. Review on the research of mixture use of *Bacillus thuringiensis* with virus insecticides[J]. China Plant Protection, 2018, 38(2): 60-64 (in Chinese)
- 叶幸, 赵旭, 马春英, 等. 苏云金杆菌与病毒杀虫剂的混剂研究概况[J]. 中国植保导刊, 2018, 38(2): 60-64
- [19] Priesnitz KU, Vaasen A, Gathmann A. Baseline susceptibility of different European lepidopteran and coleopteran pests to *Bt* proteins expressed in *Bt* maize: a systematic review[J]. Environmental Evidence, 2016, 5: 27
- [20] Soares-da-Silva J, Queirós SG, de Aguiar JS, et al. Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance[J]. Acta Tropica, 2017, 176: 197-205
- [21] Liu YJ, Xue YC. Research progress on plant insect resistance genetic engineering[J]. Zhejiang Agricultural Sciences, 2016, 57(6): 873-878 (in Chinese)
- 刘一杰, 薛永常. 植物抗虫基因工程的研究进展[J]. 浙江农业科学, 2016, 57(6): 873-878
- [22] Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, et al. Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1754-1759
- [23] Roy A, Mahata D, Paul D, et al. Purification, biochemical characterization and self-assembled structure of a fengycin-like antifungal peptide from *Bacillus thuringiensis* strain SM1[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 332
- [24] Wang RL, Xu WF, Wang F, et al. Isolation and identification of an antagonistic endophytic bacterium from mulberry for biocontrol against *Boeremia exigua*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(11): 2130-2143 (in Chinese)
- 王若琳, 徐伟芳, 王飞, 等. 桑树内生拮抗菌的分离鉴定

- 及其对桑断枝烂叶病的生防初探[J]. 微生物学报, 2019, 59(11): 2130-2143
- [25] Li J, Liu JM, Guo W, et al. Zwittermicin A enhances the toxicity of Bt Cry1Ac to *Spodoptera exigua* Hübner[J]. Journal of North China Agricultural, 2008, 23(5): 136-141 (in Chinese)
- 李晶, 刘建密, 郭巍, 等. Zwittermicin A 对 Cry1Ac 杀虫活性的增效作用[J]. 华北农学报, 2008, 23(5): 136-141
- [26] Silo-Suh LA, Stabb EV, Raffel SJ, et al. Target range of Zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*[J]. Current Microbiology, 1998, 37(1): 6-11
- [27] Silo-Suh LA, Lethbridge BJ, Raffel SJ, et al. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(6): 2023-2030
- [28] Liu ZX, Chen SW, He J, et al. Study on separation and purification of Zwittermicin A and its stability[J]. Microbiology China, 2007, 34(2): 212-215 (in Chinese)
- 刘中信, 陈守文, 何进, 等. Zwittermicin A 的分离纯化及其稳定性的初步研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 212-215

征 稿 简 则

1 刊物简介与刊登内容

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。本刊为月刊, 中文核心期刊, 中国科技核心期刊, CSCD 核心期刊, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。从 2012 年至今, 本刊以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选 300 种“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

本刊刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投稿; (5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA、ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.2570)