

研究报告

一株马铃薯干腐病拮抗菌的筛选、鉴定及其生物防效

张紊玮¹ 王艳玲² 毕阳^{1*} 俞建民¹

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院 甘肃 兰州 730070)

(2. 兰州理工大学生命科学与工程学院 甘肃 兰州 730050)

摘要:【背景】马铃薯干腐病是一种由镰刀菌引起的田间和储藏期都普遍发生的病害, 主要引起块茎腐烂, 致使马铃薯品质和产量降低, 严重影响其食用价值和经济价值。【目的】发掘有效的生防菌株以控制马铃薯干腐病, 并探究其抑菌作用。【方法】从甘肃定西地区马铃薯根际土壤中分离到 109 株细菌, 以疏色镰刀菌(*Fusarium sulphureum*)为靶标菌, 采用平板对峙法筛选拮抗菌, 并通过形态学、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析对拮抗菌株进行鉴定。检测拮抗菌无菌发酵液对 *F. sulphureum* 菌丝生长、孢子萌发、马铃薯块茎损伤接种病斑直径、干腐病发病率及对绿豆种子发芽的影响。【结果】筛选到一株对马铃薯干腐病有较强抑制作用的菌株 YL11, 经鉴定其为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)菌株。YL11 菌株无菌发酵液对 *F. sulphureum* 菌丝生长、孢子萌发、马铃薯块茎病斑扩展、干腐病发病率、毒素活性均有显著抑制作用。20% 无菌发酵液对 *F. sulphureum* 菌落生长的抑制率达到 87.3%; 75% 无菌发酵液可完全抑制孢子萌发; 无菌发酵液浸泡能有效抑制马铃薯干腐病病斑的扩展, 14 d 时对病斑扩展的抑制率达到 67.1%; 90 d 后干腐病的发生率降低了 68.4%; 同时降低了 *F. sulphureum* 毒素的活性。【结论】拮抗菌株 YL11 能显著抑制 *F. sulphureum* 的生长, 对马铃薯干腐病有较强的生物防治效果, 具有潜在的应用价值。

关键词: 马铃薯干腐病, 疏色镰刀菌, 假单胞菌, 无菌发酵液, 鉴定

Screening and identification of an antagonistic strain against potato dry rot

ZHANG Wen-Wei¹ WANG Yan-Ling² BI Yang^{1*} YUN Jian-Min¹

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

(2. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou, Gansu 730050, China)

Abstract: [Background] Potato dry rot is a fungal disease, caused by *Fusarium* spp., which always

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31560486, 31760494); Natural Science Foundation of Gansu Province (1506RJZA009); Sheng Tong-sheng Science and Technology Innovation Fund (GSAU-STS-1529)

*Corresponding author: Tel: 86-931-7631201; E-mail: biyang@gsau.edu.cn

Received: November 08, 2017; **Accepted:** March 19, 2018; **Published online** (www.cnki.net): March 22, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31560486, 31760494); 甘肃省自然科学基金(1506RJZA009); 盛彤笙科技创新基金(GSAU-STS-1529)

*通信作者: Tel: 86-931-7631201; E-mail: biyang@gsau.edu.cn

收稿日期: 2017-11-08; **接受日期:** 2018-03-19; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-03-22

happens in both field and storage period. It mainly leads to quality deterioration and lower economic value. **[Objective]** To isolate and identify effective biocontrol strains to control potato dry rot, and investigate the inhibitory effect on plant pathogens. **[Methods]** We used 109 strains as tested strains, which were isolated from the rhizosphere soil of potato from Dingxi region in Gansu province. Antagonistic bacteria were screened by plate confrontation method with *Fusarium sulphureum* as the target strain, strain identification was based on morphology, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis. The effects of cell-free fermentation filtrate on the mycelial growth, spore germination of *F. sulphureum*, the lesion diameter of wounded inoculated potato tubers, the incidence of dry rot and germination of mung bean seeds were evaluated. **[Results]** Strain YL11 was isolated from the rhizosphere soil of potato and exhibited an excellent antagonistic activity against *F. sulphureum*, which was identified as *Pseudomonas* sp., cell-free fermentation filtrate of YL11 strain significantly inhibited the mycelial growth, spore germination of pathogenic fungi, the lesion diameter of wounded inoculated potato tubers and the incidence of dry rot. Moreover, the inhibition rate of 20% cell-free filtrate to *F. sulphureum* was 87.3%; 75% cell-free filtrate completely inhibited spore germination; the cell-free fermentation dip significantly reduced the lesion diameter of inoculated potato tuber, the inhibition rate was 67.1% after 14 days inoculation; the incidence of dry rot reduced by 68.4% after 90 days inoculation. Meanwhile, it also decreased the mycotoxin activity of *F. sulphureum*. **[Conclusion]** Strain YL11 significantly inhibited the growth of the *F. sulphureum* and had a notably biological control effect on potato dry rot, and it would be a potential biological control agent.

Keywords: Potato dry rot, *Fusarium sulphureum*, *Pseudomonas*, Cell-free fermentation filtrate, Identification

马铃薯干腐病是一种生长期和储藏期都常见的病害,该病可由多种镰刀菌引起^[1],对马铃薯品质造成影响,不仅致使产量降低,还会积累真菌毒素^[2-3],严重危害人类的健康。我国是世界上最大的马铃薯生产国,随着“马铃薯主粮化战略”的提出,马铃薯种植面积不断扩大,病害的发生也越来越严重,常年发病率高达 30%,由此造成马铃薯产量损失 40%–50%^[4]。在我国马铃薯主产区甘肃,硫色镰刀菌(*Fusarium sulphureum*)、腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)和接骨木镰刀菌(*Fusarium sambucinum*)是造成马铃薯干腐病的主要病原菌^[5-6]。目前,对马铃薯干腐病以化学防治为主,化学杀菌剂处理虽然可以有效控制干腐病,但由于杀菌剂残留、病原物产生耐药性以及环境污染等问题而逐渐受到限制^[7-8]。因此,使用合理、高效、环保的方法控制病害的发生显得尤为重要,生物防治便成为了国内外研究的热点^[9-11]。

根际微生物对植物病原菌具有寄生或拮抗作用,可用于防治由病原菌引起的植物病害,是一种

重要的生防菌^[12-14]。近年来用于防治植物病害的生防菌主要有假单胞菌(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、链霉菌(*Streptomyces*)、微球菌(*Micrococcus*)等,其中假单胞菌是植物根际最为丰富的细菌类群^[15]。研究表明,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、致金色假单胞菌(*Pseudomonas aureofaciens*)、绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)等对多种植物病原菌具有抑制作用^[9,16],假单胞菌可产一种或多种如吩嗪-1-羧酸、2,4-二乙酰藤黄酚、藤黄绿脓菌素、硝吡咯菌素和氰化物等活性物质抑制病原物的生长^[17]。目前有关假单胞菌功能的报道越来越多,但是还未见到其对马铃薯干腐病病原菌有拮抗作用的报道。国内外对番茄、大豆等植物生物防治的研究已经取得了较大进展,但对马铃薯干腐病生物防治的报道不多。

生物防治主要是利用拮抗菌及其代谢产物防治植物病害,筛选高效的拮抗菌株是生物防治的前提。马铃薯根系周围微生物总数中,细菌数占绝对

优势^[18]。因此,从中筛选出新的具有潜在生防效果的细菌具有重要意义。本文中,我们从甘肃定西马铃薯根际土壤中分离到一株拮抗马铃薯干腐病原菌硫色镰刀菌的菌株 YL11,通过形态学、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析鉴定该菌株为假单胞菌;研究了拮抗菌无菌发酵液对硫色镰刀菌菌丝生长、孢子萌发的影响,同时测定了无菌发酵液对马铃薯块茎损伤接种病斑直径、干腐病发病率及对绿豆种子发芽的影响。本研究旨在为探索拮抗菌 YL11 的生防潜力提供技术参考,为马铃薯干腐病的生物防治提供新的菌株资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品及菌株

供试土样采自甘肃省定西市马铃薯根系部位的土壤;供试马铃薯(品种:陇薯 3 号)于 2014 年 10 月采于定西市渭源县会川镇大田;供试病原真菌硫色镰刀菌(*Fusarium sulphureum*)、粉红单端孢(*Trichothecium roseum*)由甘肃农业大学采后生物学与技术实验室保藏;扩展青霉(*Penicillium expansum*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)由甘肃农业大学食品微生物与发酵技术实验室保藏;腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)均由兰州理工大学植物基因工程实验室馈赠。

1.1.2 培养基

NA 培养基(g/L):牛肉膏 3.0、蛋白胨 10.0、氯化钠 15.0、琼脂 20.0, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min; PDA 培养基(g/L):马铃薯 200.0、葡萄糖 20.0、琼脂 20.0, pH 自然, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min; LB 固体培养基(g/L):蛋白胨 10.0、酵母提取物 5.0、氯化钠 10.0、琼脂 15.0, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min; LB 液体培养基:LB 固体培养基中不加琼脂;GYEP 培养基(g/L):葡萄糖 20.0、酵母浸膏 1.0、蛋白胨 1.0, pH 5.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

牛肉膏、蛋白胨、酵母浸膏,北京奥博星生物技术有限公司;琼脂,北京索莱宝科技有限公司;葡萄糖、氯化钠,国药集团化学试剂有限公司。

恒温培养摇床、电热恒温培养箱、电热鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;立式高压灭菌器,上海申安医疗器械厂;生物显微镜,宁波舜宇仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌的分离、纯化

称取研细土样 5 g,加入盛有 45 mL 无菌水的锥形瓶中振荡 1 h,吸取上清液用无菌水依次稀释 10 倍到 10^{-6} 一系列稀释液,分别吸取 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 稀释液 200 μ L 均匀涂布于 NA 培养基上,每个处理 3 个重复。30 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后,挑取单菌落划线接种于 LB 培养基进一步纯化,筛选其中拮抗活性最高的菌株,做成甘油菌,于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 拮抗菌的筛选

采用平板对峙法将已培养 7 d 的 *F. sulphureum* 打孔移取直径 4 mm 的菌饼置于 PDA 培养基中央,同时在距离菌落边缘 3 cm 处上下左右均匀点接分离菌株,于 28 $^{\circ}$ C 培养 6 d,观察抑菌情况,测量抑菌带宽度。

1.2.3 拮抗菌抑菌谱的测定

采用平板对峙法测定抑菌效果。将在 PDA 培养基培养 7 d 的供试病原真菌 *F. sulphureum*、*F. solani*、*T. roseum*、*P. expansum*、*A. niger* 打孔移取直径 4 mm 的菌饼分别置于 PDA 培养基中央,同时在距离菌落边缘 3 cm 处上下左右均匀接种 YL11 菌株,每个处理重复 3 次,于 28 $^{\circ}$ C 培养 6 d,观察生长情况,计算菌丝生长的抑制率。

$$\text{菌丝生长抑制率} = \frac{C - T}{C} \times 100\%$$

式中: T 为处理组菌落直径(mm); C 为对照组菌落直径(mm)。

1.2.4 生理生化鉴定

参照《常见细菌系统鉴定手册》对菌株 YL11 进行革兰氏染色、反硝化、精氨酸双水解、接触酶、吲哚、氧化酶、明胶液化、葡萄糖、果糖、淀粉水解、硝酸盐水解、脂酶、4 °C 和 41 °C 生长情况等生理生化特征的鉴定^[19]。

1.2.5 分子鉴定

菌株 YL11 在 LB 液体培养基中 37 °C、120 r/min 培养过夜后, 于 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体细胞。用 CTAB 法提取基因组 DNA。采用通用引物 1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和引物 2 (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 扩增目的菌株的 16S rRNA 基因。PCR 反应体系: 模板 DNA (1-2 µg/L) 2 µL, 10×Buffer (含 2.5 mmol/L Mg²⁺) 5 µL, Taq 聚合酶(5 U/µL) 1 µL, dNTPs (10 mmol/L) 4 µL, 引物 1 和引物 2 (10 µmol/L) 各 2 µL, ddH₂O 补充至 50 µL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 80 s, 32 个循环; 72 °C 3 min。1% 琼脂糖凝胶电泳后胶回收, 胶回收产物送至金唯智生物科技(北京)有限公司进行测序。将测序结果在 GenBank 数据库进行 BLAST 同源序列检索, 选择相似性较高的序列, 使用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树。

1.2.6 发酵液的制备

将菌株 YL11 接种至 LB 液体培养基中, 37 °C、120 r/min 振荡培养 3 d, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 后, 收集上清液即为发酵上清液。将上清液用 0.22 µm 无菌滤膜过滤, 收集滤液即为无菌发酵液。

1.2.7 发酵上清液对 *F. sulphureum* 的抑菌作用

将在 PDA 培养基培养 7 d 的 *F. sulphureum* 打孔移取直径 4 mm 的菌饼置于 PDA 培养基中央, 28 °C 培养 3 d 后在距离中心 3 cm 处放置 2 个牛津杯, 加入 250 µL 发酵上清液, 无菌水处理为空白对照, 每处理 3 个重复。28 °C 培养 6 d, 观察抑菌情况, 用游标卡尺测量抑菌圈直径, 计算抑菌效价。

$$\text{抑菌效价}(\text{mm/mL}) = \frac{X - Y}{V} \times 1\,000$$

式中: X 为抑菌圈直径(mm); Y 为牛津杯直径(mm); V 为发酵液体积(µL)。

1.2.8 无菌发酵液对 *F. sulphureum* 的抑菌作用

将无菌发酵液分别以体积分数 1%、2%、5%、10%、20% 的比例与 PDA 培养基混合, 每平板 10 mL 混合培养基, 在混合培养基中央放置直径 4 mm 的 *F. sulphureum* 菌饼, 无菌水处理为空白对照, 每个处理 3 个重复。28 °C 培养 6 d 后测定菌落直径, 计算菌丝生长的抑制率。

$$\text{菌丝生长抑制率} = \frac{C - T}{C} \times 100\%$$

式中: T 为处理组菌落直径(mm); C 为对照组菌落直径(mm)。

1.2.9 无菌发酵液对 *F. sulphureum* 孢子萌发的影响

将在 PDA 培养基 28 °C 培养 7 d 的 *F. sulphureum* 用无菌水冲洗, 制备孢子悬浮液, 用血球计数板计数, 调整孢子浓度为 10⁵ CFU/mL, 分别吸取 3 mL 孢子悬浮液和 1 mL 无菌发酵液、2 mL 孢子悬浮液和 2 mL 无菌发酵液、1 mL 孢子悬浮液和 3 mL 无菌发酵液于无菌离心管中, 得到体积分数为 25%、50%、75% 的无菌发酵液, 无菌水处理为空白对照, 28 °C、120 r/min 振荡培养 24 h。每个处理重复 3 次。显微镜镜检观察, 孢子萌发形成的芽管长度大于孢子一半时视为萌发, 计算孢子萌发率。

$$\text{孢子萌发率} = \frac{G}{A} \times 100\%$$

式中: G 表示萌发孢子个数; A 表示总的孢子个数。

$$\text{孢子萌发抑制率} = \frac{S - S'}{S} \times 100\%$$

式中: S 表示空白对照萌发孢子率; S' 表示处理的孢子萌发率。

1.2.10 马铃薯块茎抑菌实验

选取大小一致、无病虫害感染的马铃薯块茎, 清洗表面杂物, 1% NaClO 表面消毒 5 min, 无菌水冲洗, 再用 75% 乙醇消毒, 然后置于 YL11 无菌发酵液中浸泡 10 min, 以灭菌 LB 液体培养基浸泡为对照, 在马铃薯的赤道部位均匀打 3 个 3 mm 深、直

径 3 mm 的小孔, 每个孔接种 20 μL *F. sulphureum* 的孢子悬浮液(孢子浓度为 10^5 CFU/mL)。用聚乙烯袋包装后装入纸箱中在室温[(25 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$), RH 55%–60%]条件下贮藏 10、12、14 d 后用十字交叉法测量病斑直径, 每个处理用马铃薯 20 个, 重复 3 次。

$$\text{病斑直径抑制率} = \frac{D - D'}{D} \times 100\%$$

式中: D 表示空白对照病斑直径(mm); D' 表示处理的病斑直径(mm)。

1.2.11 无菌发酵液对干腐病发病率的影响:

上述 YL11 无菌发酵液及灭菌 LB 液体培养基中浸泡后接种 *F. sulphureum* 的块茎在室温[(25 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$), RH 55%–60%]条件下贮藏 3 个月后测马铃薯干腐病的发病率。

$$\text{干腐病发病率} = \frac{D}{T} \times 100\%$$

式中: D 表示发生干腐病的马铃薯个数; T 表示总的马铃薯个数。

1.2.12 无菌发酵液对 *F. sulphureum* 真菌毒素活性的影响

将 *F. sulphureum* 接种于 PDA 培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d 后, 转种于 GYEP 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 黑暗条件振荡培养 14 d。用双层灭菌纱布滤去菌丝体, 即获得具有毒素活性的培养滤液。将大小均匀, 颗粒饱满的绿豆种子用 2% 次氯酸钠溶液表面消毒 5 min, 无菌水冲洗 3 次, 放入铺有灭菌滤纸、加入 2 mL 培养滤液和 3 mL 无菌水的培养皿内, 26–28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温黑暗条件下培养 3 d 后, 测量胚根长度, 计算平均值。用培养滤液对绿豆种子胚根长度的影响表示产毒情况。每个处理用种子 20 粒, 重复 3 次。

$$\text{胚根生长抑制率} = \frac{L - L'}{L} \times 100\%$$

式中: L 表示对照胚根平均长度(mm); L' 表示处理胚根平均长度(mm)。

1.2.13 数据处理

利用 SPSS 17.0 进行数据统计, 结果以平均值 \pm

标准差表示。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株的筛选

把土壤悬液经系列稀释后采用涂布法接种于 NA 培养基上, 培养后挑取单菌落, 共分离得到 109 株菌。通过对分离到的 109 株菌开展拮抗实验, 筛选到对 *F. sulphureum* 具有抑菌效果的 14 株菌(表 1), 其中具有最强抑制效果的 1 株编号为 YL11 (图 1)。

表 1 不同拮抗菌株对 *F. sulphureum* 的抑菌作用

Table 1 The inhibition of different strains against *F. sulphureum*

菌株编号 Strain No.	抑菌带宽度 Inhibition zone width (mm)
YL27	9.1 \pm 0.2f
YL28	13.4 \pm 0.3c
YM09	8.5 \pm 0.3g
YM14	11.6 \pm 0.4d
BL03	9.2 \pm 0.2f
BL10	10.5 \pm 0.2e
BL22	7.1 \pm 0.1h
YL09	13.7 \pm 0.3c
YL11	16.2 \pm 0.2a
YM11	7.5 \pm 0.4h
YM26	8.3 \pm 0.2g
BL23	5.2 \pm 0.2i
BM03	14.6 \pm 0.3b
BM14	13.6 \pm 0.6c

注: 同列数据后的不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: The different letter means significant difference ($P < 0.05$).

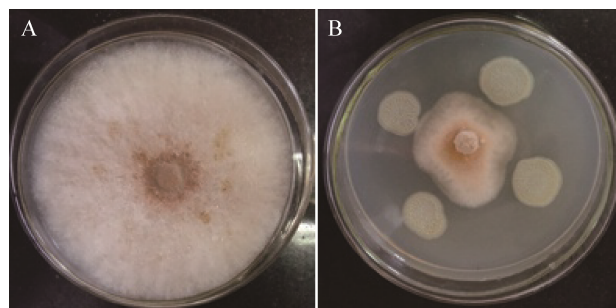


图 1 菌株 YL11 对 *F. sulphureum* 的抑菌作用

Figure 1 Inhibition of strain YL11 against *F. sulphureum*

注: A: 空白对照; B: 菌株 YL11.

Note: A: CK; B: Strain YL11.

2.2 拮抗菌株抑菌谱的测定

YL11 菌株对 *F. sulphureum*、*F. solani*、*T. roseum* 的抑菌效果较明显, 抑制率分别为 61.7%、61.2%、56.9%; 对 *P. expansum* 和 *A. niger* 也具有一定的拮抗作用, 抑制率分别为 41.9% 和 37.0% (表 2); 而对细菌如 *E. coli*、*A. faecalis*、*S. aureus*、*B. subtilis* 均未显示抑菌效果。研究表明 YL11 菌株具有广谱的抗病原真菌活性, 特别是对马铃薯干腐病优势病原菌 *F. sulphureum* 和 *F. solani* 有较好的抑制效果, 是潜在的植物病原真菌生防菌资源。

2.3 拮抗菌株的鉴定

2.3.1 生理生化试验

菌株 YL11 在 LB 培养基上生长良好, 28 °C 恒温培养 24 h 后可形成米黄色菌落, 圆形, 边缘整齐。镜检结果显示(图 2), 菌株 YL11 呈杆状或略弯, 不产芽孢, 革兰氏染色阴性。结合生理生化鉴定结果(表 3), 初步鉴定拮抗菌 YL11 为假单胞菌属细菌。

表 2 菌株 YL11 抑菌谱的测定

Table 2 The antimicrobial spectrum of strain YL11

菌株类型 Strain type	对照 CK (mm)	菌株 YL11 处理的 菌落直径 Colony diameter of YL11 treated (mm)	抑制率 Inhibition rate (%)
硫色镰刀菌 <i>F. sulphureum</i>	82.3±1.2	31.5±1.0	61.70
腐皮镰刀菌 <i>F. solani</i>	63.7±1.1	24.7±0.5	61.20
粉红单端孢 <i>T. roseum</i>	76.4±1.3	32.9±0.9	56.90
扩展青霉 <i>P. expansum</i>	78.1±1.6	45.4±1.8	41.90
黑曲霉 <i>A. niger</i>	82.1±1.5	51.7±2.4	37.00
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	79.2±0.7	78.7±1.7	0.63
粪产碱杆菌 <i>A. faecalis</i>	80.3±1.3	80.1±1.2	0.25
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	77.6±1.1	77.4±1.4	0.26
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	81.7±0.5	80.9±0.8	0.98

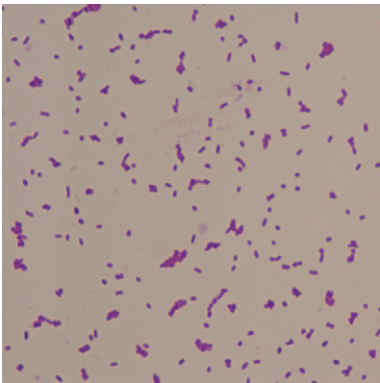


图 2 菌株 YL11 普通光学显微镜下的细胞形态(1 000×)
Figure 2 The cell morphology of strain YL11 under optical microscope (1 000×)

表 3 菌株 YL11 的生理生化特征

Table 3 The physiological and biochemical character of strain YL11

实验项目 Items	结果 Results
葡萄糖 Glucose	+
果糖 Fructose	+
氧化酶 Oxidase	+
接触酶 Catalase	+
脂酶 Lipase	-
精氨酸双水解酶 Arginine double enzyme hydrolysis	+
淀粉水解 Hydrolysis of starch	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-
反硝化 Denitrifying	+
吲哚试验 Indole test	+
V-P 试验 V-P test	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+
4 °C 生长 Growth at 4 °C	+
41 °C 生长 Growth at 41 °C	-

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

2.3.2 菌株 YL11 16S rRNA 基因序列分析与系统进化树构建

使用 16S rRNA 基因细菌通用引物扩增 YL11 的 16S rRNA 基因序列, 得到 1 366 bp 左右的特异性条带(图 3)。将得到的基因序列提交到 GenBank 数据库, 获得 GenBank 登录号为: MG877640。对测序结果进

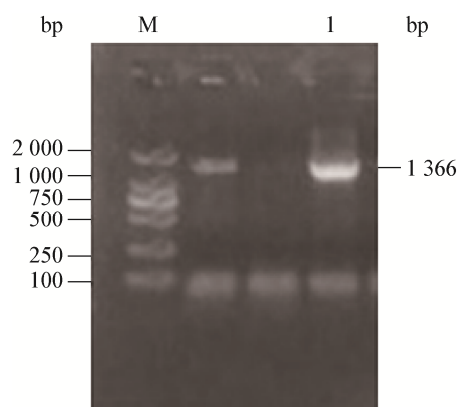


图3 菌株 YL11 16S rRNA 基因 PCR 产物电泳图

Figure 3 The electrophoretogram of YL11's 16S rRNA gene PCR product

Note: M: DNA marker; 1: YL11.

行 BLAST 分析与多重序列比对, 选取相似序列构建系统进化树(图 4)。结果发现 YL11 菌株的 16S rRNA 基因序列与假单胞菌属中 *Pseudomonas azotoformans*、*Pseudomonas poae* strain Pier1 的相似性较高, 达到 99.9%。表明菌株 YL11 与 *Pseudomonas azotoformans* 的进化距离较近。由于假单胞菌属内 16S rRNA 基因

的同源性极高, 因此, 无法确定 YL11 为 *Pseudomonas azotoformans*, 综合菌体形态、生理生化试验结果以及 16S rRNA 基因序列分析, 只能暂时将其鉴定为假单胞菌属 *Pseudomonas* sp. 细菌。

2.4 菌株 YL11 的抑菌活性

2.4.1 发酵上清液对 *F. sulphureum* 的抑菌作用

菌株 YL11 的发酵上清液对 *F. sulphureum* 显示出明显的抑制效果(图 5), 抑菌圈直径为 25.4 ± 1.1 mm, 抑菌效价为 69.6 mm/mL。由于本实验发酵液中菌体未经破壁处理, 表明该抗菌物质为胞外产物。挑取抑菌圈周围的 *F. sulphureum* 菌丝制片, 显微观察到菌丝溶解、断裂和膨大的现象。

2.4.2 YL11 无菌发酵液对 *F. sulphureum* 的抑菌作用

菌株 YL11 无菌发酵液对 *F. sulphureum* 具有显著的抑菌活性, 随着无菌发酵液体积分数的增加, 菌落直径逐渐减小, 当无菌发酵液体积分数达到 20% 时, 菌落直径仅为 10.3 ± 1.5 mm, 生长抑制率达到 87.3% (表 4)。

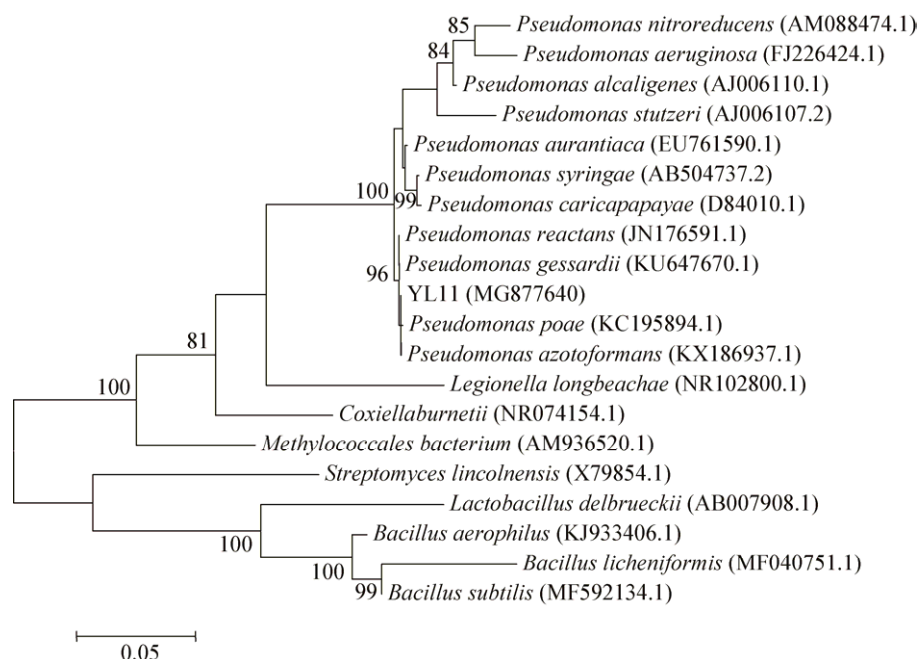


图4 菌株 YL11 的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of strain YL11

注: 括号内的数字为 GenBank 登录号; 进化树节点的数值表示 Bootstrap 值; 比例尺为 5% 的序列差异。

Note: Number in parenthesis represented GenBank accession number; Number at nodes present bootstrap percentages (based on 1 000 sampling); Bar 0.05 represents sequence divergence.

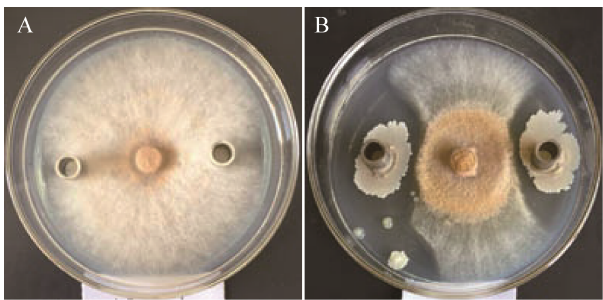


图5 菌株 YL11 发酵上清液对 *F. sulphureum* 的抑菌作用
Figure 5 Inhibitory activity of strain YL11's fermentation solution on *F. sulphureum*

注: A: 空白对照; B: YL11 菌株发酵液对峙处理。
Note: A: CK; B: Fermentation solution of YL11.

表4 不同体积分数的 YL11 无菌发酵液对 *F. sulphureum* 的抑菌作用
Table 4 Inhibitory effect of YL11's fermentation solution with different volume fraction on *F. sulphureum*

无菌发酵液体积分数 Volume fraction of cell-free culture supermatant (%)	菌落直径 Colony diameter (mm)	生长抑制率 Growth inhibition rate (%)
0	81.1±1.8	0.0
1	42.3±1.7	47.8
2	36.1±1.0	55.5
5	28.4±2.1	65.0
10	19.7±1.9	75.7
20	10.3±1.5	87.3

2.4.3 无菌发酵液对 *F. sulphureum* 孢子萌发的影响

无菌水处理的 *F. sulphureum* 孢子在 12 h 萌发率为 75.6%，24 h 达到 90.2%，与对照相比，高浓度的无菌发酵液能彻底抑制孢子的萌发，随着浓度的降低，孢子的萌发率显著增大(图 6)。体积分数为 25% 的无菌发酵液处理的孢子在 24 h 萌发率为 43.2%，孢子萌发抑制率为 52.1%；体积分数为 50% 的无菌发酵液处理的孢子在 24 h 萌发率为 17.0%，孢子萌发抑制率为 81.1%；体积分数为 75% 的无菌发酵液完全抑制了孢子的萌发，12 h、24 h 后孢子萌发抑制率均为 100%。

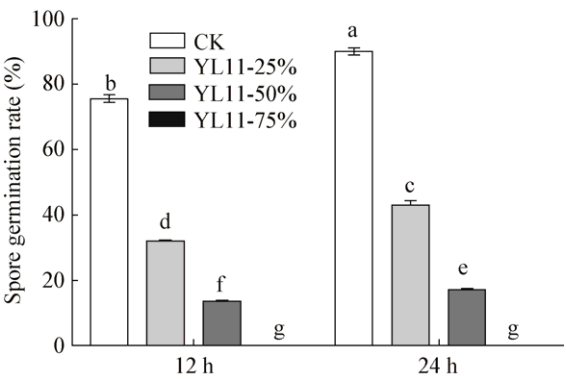


图6 菌株 YL11 无菌发酵液对 *F. sulphureum* 孢子萌发的影响
Figure 6 The effects of stain YL11's fermentation solution on spore germination of *F. sulphureum*

注: 柱形图上不同的小写字母表示差异显著($P<0.05$).
Note: The different letter means significant difference ($P<0.05$).

2.5 马铃薯块茎抑菌实验

2.5.1 无菌发酵液对马铃薯块茎病斑直径的影响

无菌发酵液能有效抑制马铃薯干腐病病斑的扩散，10、12、14 d 时无菌发酵液处理马铃薯块茎病斑直径均小于对照(图 7)。14 d 时 YL11 菌株无菌发酵液处理马铃薯块茎的平均病斑直径为 9.7 mm，灭菌 LB 培养基处理的平均病斑直径为 29.5 mm，

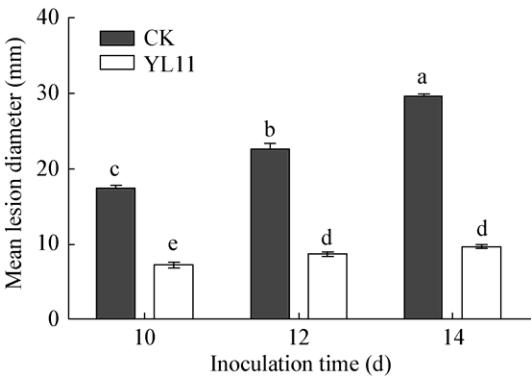


图7 菌株 YL11 无菌发酵液处理对马铃薯块茎病斑直径的影响
Figure 7 The effects of strain YL11's fermentation solution on the diameters of disease spots

注: 柱形图上不同的小写字母表示差异显著($P<0.05$).
Note: The different letter means significant difference ($P<0.05$).

YL11 菌株无菌发酵液处理对马铃薯块茎病斑直径扩展的抑制率为 67.1%。主要是无菌发酵液能有效抑制 *F. sulphureum* 的生长,进而更好地抑制了病斑扩展。12 d 时 YL11 无菌发酵液处理马铃薯块茎的平均病斑直径为 8.7 mm,与 14 d 相比没有显著性差异。进一步表明无菌发酵液对病斑的扩展具有较好的防效。

2.5.2 无菌发酵液对马铃薯干腐病发病率的影响

无菌发酵液处理马铃薯块茎接种 *F. sulphureum* 后,室温贮藏 90 d 后干腐病的发病率为 23.3%,与对照(干腐病的发病率 91.7%)相比降低了 68.4%,显著降低了干腐病的发病率(图 8),表明菌株 YL11 无菌发酵液对马铃薯干腐病的发生具有较好的防治效果。

2.5.3 无菌发酵液对 *F. sulphureum* 真菌毒素活性的影响

种子的发芽抑制实验是检测病原菌粗毒素的常用生物学方法之一。菌株 YL11 无菌发酵液处理 *F. sulphureum* 后,粗毒素对绿豆种子发芽的抑制率为 14.3%,与未经处理的 *F. sulphureum* 粗毒素(对绿豆种子发芽的抑制率为 44.8%)相比,显著提高了种子的发芽率(图 9),间接表明抑制了毒素的活性。

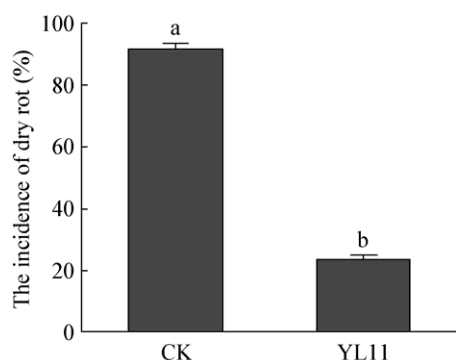


图 8 菌株 YL11 无菌发酵液处理对马铃薯干腐病发病率的影响

Figure 8 The effects of strain YL11's fermentation solution on incidence of dry rot

注:柱形图上不同的小写字母表示差异显著($P<0.05$).

Note: The different letter means significant difference ($P<0.05$).

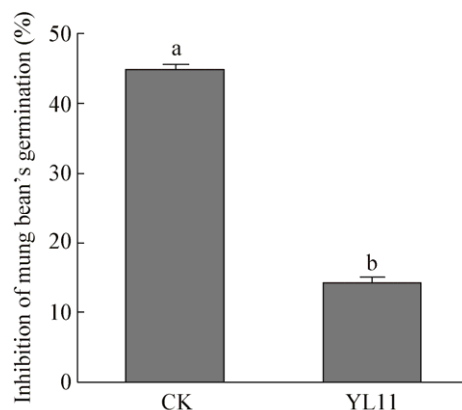


图 9 粗毒素对绿豆种子发芽的影响

Figure 9 The effects of crude toxin on germination of mung bean seeds

注:柱形图上不同的小写字母表示差异显著($P<0.05$).

Note: The different letter means significant difference ($P<0.05$).

3 讨论与结论

马铃薯干腐病是农业生产上危害很大的采前、采后病害,导致作物减产由此造成经济损失。当前国内外从抗病育种、化学防治和农业措施等方面做了大量工作,初见防治效果。寻找并开发利用新的生防菌被认为是最具发展潜力的防治方法之一,国内已有研究表明细菌和木霉菌对马铃薯干腐病有一定的防治作用。张茹等从甘肃西部地区农牧交错区的马铃薯根际土壤中分离到的木霉对接骨木镰刀菌有较好的拮抗作用,抑制率达到 82.6%,与 YL11 对疏色镰刀菌的抑制率 61.7% 相比,较高的抑制效果可能与木霉产生细胞壁降解酶直接作用于病原菌有关^[20];王爱军等研究了从甘肃国营条山农场马铃薯连作试验田中分离到的 4 株芽孢杆菌对马铃薯干腐病致病菌有抑菌作用^[21],其中对腐皮镰刀菌最具抑菌效果的 F-4-1 抑菌圈直径为 5.6 mm,与之相比 YL11 菌株对腐皮镰刀菌的抑菌圈直径为 19.5 mm,显著优于芽孢杆菌;牛世全等从河西走廊盐碱土壤中分离到球孢链霉菌对腐皮镰刀菌具有很好的抑制作用,发酵液抑菌率为 54.45%,对马铃薯干腐病的防效为 65.45%^[22];孙现超等发现链霉菌属吸水链霉菌发酵液对马铃薯干腐病病原

菌丝生长和孢子萌发均有抑制作用,抑制率分别为 74.5% 和 100%,浸泡处理后可明显降低马铃薯干腐病原菌的致病率^[23]。菌株 YL11 与球孢链霉菌和吸水链霉菌相比,发酵液具有更强的抑制效果。值得一提的是,用发酵液衡量抑菌效果并不是真正的定性和定量分析,不同批次的发酵液其有效物质的浓度也可能不一样。

假单胞菌活跃于植物根际,部分是最主要的植物根际促生菌,已被应用于谷物种子或土壤中以抑制谷物病原菌的生长。张亚等研究表明假单胞菌 SU8 对稻瘟病菌、辣椒炭疽病菌、烟草赤星病菌、水稻纹枯病菌和小麦赤霉病菌均有较好的抑制作用^[24]。但是利用假单胞菌控制马铃薯干腐病的研究未见报道。本研究从甘肃定西地区马铃薯根际土壤中分离到 1 株假单胞菌,对峙实验表明对马铃薯干腐病致病菌 *F. sulphureum* 的抑制率为 61.7%,发酵上清液对 *F. sulphureum* 显示出明显的抑制效果,抑菌圈直径为 25.4 ± 1.1 mm,抑菌效价为 69.6 mm/mL; 无菌发酵液体积分数达到 20% 时,菌落直径仅为 10.3 ± 1.5 mm,生长抑制率达到 87.3%; 培养 24 h 后,体积分数 25% 无菌发酵液对 *F. sulphureum* 孢子萌发抑制率为 52.1%,体积分数 50% 无菌发酵液孢子萌发抑制率为 81.1%,体积分数 75% 无菌发酵液完全抑制了孢子的萌发,无菌发酵液能有效抑制马铃薯干腐病病斑的扩散,14 d 时对病斑扩展的抑制率达到 67.1%,室温贮藏 90 d 后干腐病的发生率降低了 68.4%; 绿豆种子发芽实验表明,无菌发酵液同时抑制了 *F. sulphureum* 毒素的活性。真菌毒素在块茎积累会严重危害食用者的健康,无菌发酵液在抑制 *F. sulphureum* 生长及降低干腐病发生的同时,降低了真菌毒素的活性,推测是由于降低了毒素的含量。本实验仅初步探讨了粗毒素的活性,毒素的分离、纯化、鉴定及定量分析需进一步进行研究。本实验研究菌株 YL11 对马铃薯干腐病原菌的抑菌作用,结果表明 YL11 不仅对 *F. sulphureum* 和 *F. solani* 有较强的抑制作用,还对 *T. roseum*、*P.*

expansum 和 *A. niger* 也具有一定的拮抗作用。这将为生物防治马铃薯干腐病等植物病害提供新的菌种资源和技术依据。随后,我们将对拮抗菌的发酵特性、活性物质的成分及抑菌机理进行深入研究。

REFERENCES

- [1] Li JH, Chai ZX, Wang D, et al. Isolation and identification of the pathogens of potato fungus diseases during storage in Gansu Province[J]. Journal of Lanzhou University (Natural Sciences), 2007, 43(2): 39-42 (in Chinese)
李金华, 柴兆祥, 王蒂, 等. 甘肃马铃薯贮藏期真菌性病害病原菌的分离鉴定[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2007, 43(2): 39-42
- [2] Delgado JA, Schwarz PB, Gillespie J, et al. Trichothecene mycotoxins associated with potato dry rot caused by *Fusarium graminearum*[J]. Phytopathology, 2010, 100(3): 290-296
- [3] Xue HL, Bi Y, Tang YM, et al. Effect of cultivars, *Fusarium* strains and storage temperature on trichothecenes production in inoculated potato tubers[J]. Food Chemistry, 2014, 151: 236-242
- [4] Hou ZY. Occurrence and control of potato dry rot[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2012(10): 173,179 (in Chinese)
侯忠艳. 马铃薯干腐病的发生与防治[J]. 现代农业科技, 2012(10): 173,179
- [5] He SQ, Jin XL, Wei ZQ, et al. Isolation and identification of pathogens causing dry rot of potato tuber in Dingxi prefecture of Gansu Province[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2004, 19(5): 550-552 (in Chinese)
何苏琴, 金秀琳, 魏周全, 等. 甘肃省定西地区马铃薯块茎干腐病原真菌的分离鉴定[J]. 云南农业大学学报, 2004, 19(5): 550-552
- [6] Li JH, Wang D, Chai ZX, et al. Isolation and identification of the dominant pathogens causing potato *Fusarium* dry rot in Gansu Province[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2011, 41(5): 456-463 (in Chinese)
李金华, 王蒂, 柴兆祥, 等. 甘肃省马铃薯镰刀菌干腐病优势病原的分离鉴定[J]. 植物病理学报, 2011, 41(5): 456-463
- [7] Shin JH, Han JH, Lee JK, et al. Characterization of the maize stalk rot pathogens *Fusarium subglutinans* and *F. temperatum* and the effect of fungicides on their mycelial growth and colony formation[J]. The Plant Pathology Journal, 2014, 30(4): 397-406
- [8] Lucas JA, Hawkins NJ, Fraaije BA. The evolution of fungicide resistance[J]. Advances in Applied Microbiology, 2015, 90: 29-92
- [9] Zuo J, Liao XL. Study progress on plant fungal diseases prevention by *Pseudomonas* spp.[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2011(22): 164-165,167 (in Chinese)
左静, 廖晓兰. 应用假单胞菌防治植物真菌性病害研究进展[J]. 现代农业科技, 2011(22): 164-165,167
- [10] Fang JS. Characteristics and methods of agricultural

- bio-control[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2014(7): 170,172 (in Chinese)
- 方俊松. 农业生物防治的特点及方法[J]. 现代农业科技, 2014(7): 170,172
- [11] Zhang LS, Chen HY. Advances in research and application of biological control agents in China[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(5): 581-586 (in Chinese)
- 张礼生, 陈红印. 生物防治作用物研发与应用的进展[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(5): 581-586
- [12] Mai JW, Li RJ, Zhang JM. Research summary on rhizospheric microorganisms[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2017(13): 135-136 (in Chinese)
- 麦靖雯, 黎瑞君, 张巨明. 根际微生物研究概况[J]. 现代农业科技, 2017(13): 135-136
- [13] Lu YH, Zhang FS. The advances in rhizosphere microbiology[J]. Soils, 2006, 38(2): 113-121 (in Chinese)
- 陆雅海, 张福锁. 根际微生物研究进展[J]. 土壤, 2006, 38(2): 113-121
- [14] Wu XQ, Zhou FY, Zhang XJ. Enlightenment from microbiome research towards biocontrol of plant disease[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(6): 867-875 (in Chinese)
- 吴晓青, 周方圆, 张新建. 微生物组学对植物病害微生物防治研究的启示[J]. 微生物学报, 2017, 57(6): 867-875
- [15] Jiang HX, Zhou L, He YW. Research progress in biocontrol strain *Pseudomonas aeruginosa*: antifungal metabolites and their applications in biocontrol[J]. Microbiology China, 2015, 42(7): 1338-1349 (in Chinese)
- 蒋海霞, 周莲, 何亚文. 铜绿假单胞菌生防菌株抑菌代谢产物及其生防应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1338-1349
- [16] He YJ, Liu HM, Hu HB, et al. Isolation and characterization of a new *Pseudomonas* strain against *Phytophthora capsici*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(4): 516-521 (in Chinese)
- 何延静, 刘海明, 胡洪波, 等. 一株拮抗辣椒疫霉的假单胞菌的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 2006, 46(4): 516-521
- [17] Yang GF, Wei YL. The research status and application prospect of *Pseudomonas*[J]. Biotechnology Bulletin, 2011(1): 37-39 (in Chinese)
- 杨光富, 魏云林. 假单胞菌研究现状及应用前景[J]. 生物技术通报, 2011(1): 37-39
- [18] Liu GY, Guo TW, Tan XL, et al. Soil microflora and dynamic changes of potato under different cultivation patterns[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2014, 33(4): 19-24 (in Chinese)
- 刘高远, 郭天文, 谭雪莲, 等. 不同栽培方式下马铃薯土壤微生物区系的动态变化[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(4): 19-24
- [19] Dong XZ, Cai MY. Manual of Determinative Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001: 162 (in Chinese)
- 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: 162
- [20] Zhang R, Li JH, Chai ZX, et al. Screening of biocontrol *Trichoderma* from potato rhizosphere of Western Gansu against *Fusarium sambucinum* and their identification[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2009, 18(2): 138-145 (in Chinese)
- 张茹, 李金华, 柴兆祥, 等. 甘肃河西马铃薯根际生防木霉菌对接骨木镰刀菌的拮抗筛选及鉴定[J]. 草业学报, 2009, 18(2): 138-145
- [21] Wang AJ, Chai ZX, Li JH, et al. Screening and identification of antagonistic *Bacillus* strains against pathogens of *Fusarium* dry rot and black scurf in potato[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 29(4): 586-594 (in Chinese)
- 王爱军, 柴兆祥, 李金华, 等. 马铃薯干腐病菌和黑痣病菌拮抗芽胞杆菌的筛选及鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2014, 29(4): 586-594
- [22] Niu SQ, Li WJ, Li HY, et al. Screening of actinomyces on antagonism to *Fusarium* spp. isolated from saline-alkali soils in Hexi corridor[J]. Journal of Northwest Normal University (Natural Science), 2017, 53(2): 94-98 (in Chinese)
- 牛世全, 李渭娟, 李海云, 等. 河西走廊盐碱土壤中抗马铃薯干腐病放线菌的筛选鉴定[J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2017, 53(2): 94-98
- [23] Sun XC, Peng JF, Zhang N, et al. Inhibitory effect and identification of an antagonistic actinomyces strain JY-22 against *Fusarium solani* causing potato dry rot[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2013, 40(1): 38-44 (in Chinese)
- 孙现超, 彭健芳, 张宁, 等. 马铃薯干腐病菌拮抗放线菌 JY-22 的抑菌作用及菌株鉴定[J]. 植物保护学报, 2013, 40(1): 38-44
- [24] Zhang Y, Su P, Liu SQ, et al. Inhibition of antifungal *Pseudomonas* SU8 against several phytopathogenic fungi[J]. Agrochemicals, 2013, 52(12): 917-920 (in Chinese)
- 张亚, 苏品, 刘双清, 等. 拮抗假单胞菌 SU8 对几种植物病原真菌的抑制作用[J]. 农药, 2013, 52(12): 917-920