



研究报告

马铃薯疮痂病菌 *Streptomyces scabies* 拮抗细菌的筛选及 BKS104 鉴定陈志垚¹ 王鹏¹ 王微¹ 金光辉¹ 台莲梅^{*1,2} 郭永霞^{1,2} 孙冬梅³ 靳学慧¹

1 黑龙江八一农垦大学农学院 黑龙江 大庆 163319

2 黑龙江省作物-有害生物互作生物学及生态防控重点实验室 黑龙江 大庆 163319

3 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院 黑龙江 大庆 163319

摘要:【背景】近年来,马铃薯疮痂病的危害态势逐渐上升,在全国各主要产区均有发生,目前由于缺乏有效的防治手段,已造成了严重的经济损失。生物防治是防治土传病害的有效途径,逐渐成为研究热点。【目的】筛选对马铃薯疮痂病菌具有较高拮抗效果的菌株,为生防菌剂的开发提供菌种资源,同时也为马铃薯疮痂病的防治奠定理论基础。【方法】采用平板对峙法和牛津杯试验法对分离得到的菌株进行初筛和复筛,并通过形态特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因、*gyrB* 基因序列分析结果对菌株进行鉴定。通过平板对峙法测定菌株的抑菌谱。【结果】获得一株具有明显拮抗效果的菌株 BKS104,抑菌直径达到 43 mm,防效达到 85%。其菌落圆形、乳白色、不透明、表面有光泽,边缘整齐,菌体杆状,革兰氏阳性菌。结合 16S rRNA 基因、*gyrB* 基因的测序结果将其鉴定为贝莱斯芽孢杆菌,并对 8 种植物病原真菌均具有抑制效果。【结论】菌株 BKS104 为贝莱斯芽孢杆菌,可以有效抑制马铃薯疮痂病菌的生长,安全性高,具有良好的生防潜力。

关键词: 马铃薯疮痂病, 拮抗细菌, 鉴定

Screening of antagonistic bacteria against *Streptomyces scabies* and identification of BKS104CHEN Zhiyao¹ WANG Peng¹ WANG Wei¹ JIN Guanghui¹ TAI Lianmei^{*1,2}
GUO Yongxia^{1,2} SUN Dongmei³ JIN Xuehui¹

1 College of Agronomy, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China

2 Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Crop-Pest Interaction Biology and Ecological Control, Daqing, Heilongjiang 163319, China

3 College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China

Abstract: [Background] In recent years, the damage of potato scab disease has gradually increased,

Foundation items: Key Scientific Research Project of Heilongjiang Province Bureau of Agricultural Reclamation (HKKY190207); Applied Technology Research and Development Program of Heilongjiang Province (GA19B104); Heilongjiang Bayi Agricultural University Graduate Student Innovative Research (YJSCX2019-Y10)

Corresponding author:** E-mail: tailianmei@sina.com**Received:** 21-02-2021; **Accepted:** 24-03-2021; **Published online:** 29-03-2021**基金项目:** 黑龙江省农垦总局重点科研计划(HKKY190207); 黑龙江省应用技术与开发计划(GA19B104); 黑龙江八一农垦大学研究生创新科研(YJSCX2019-Y10)通信作者:** E-mail: tailianmei@sina.com**收稿日期:** 2021-02-21; **接受日期:** 2021-03-24; **网络首发日期:** 2021-03-29

and it has occurred in all major producing areas across the country. At present, the lack of effective prevention and control methods has caused serious economic losses. Biological control is an effective way to prevent and control soil-borne diseases, and has gradually become a research hotspot.

[Objective] Screening strains with high antagonistic effect on *Streptomyces scabies* will provide strain resources for the development of biocontrol agents and lay a theoretical foundation for the prevention and control of potato scab. **[Methods]** The isolated strains were preliminarily screened and re-screened by the plate confrontation growth method and the Oxford cup test method, and the strains were identified by morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, and 16S rRNA and *gyrB* sequence analysis results. The antifungal spectrum of the strain was determined by the plate confrontation method. **[Results]** A strain BKS104 with obvious antagonistic effect was obtained, with a antifungal diameter of 43 mm and a control effect of 85%. The colony is round, milky white, opaque, shiny surface, neat edges, rod-shaped bacteria, Gram-positive bacteria. Combined with the sequencing results of 16S rRNA and *gyrB*, it was identified as *Bacillus velezensis*, and it has inhibitory effect on 8 kinds of plant pathogenic fungi. **[Conclusion]** The strain BKS104 is *B. velezensis*, which can effectively inhibit the growth of *Streptomyces scabies*, with high safety and good biocontrol potential.

Keywords: potato scab, antagonistic bacteria, identification

如今马铃薯已经成为仅次于小麦、水稻和玉米的全球第四大重要粮食作物^[1]。马铃薯营养价值高,可作为粮食作物供人们生活所需,对环境的适应能力强,也可作为经济作物应用到多种行业中,而且其单产增产潜力大,发展前景十分广阔^[2]。马铃薯产业发展迅速,经济效益不断提高,同时对马铃薯的外观和质量提出了更高的要求。

马铃薯疮痂病是由多种链霉菌(*Streptomyces* spp.)引起的一种土传病害,病原菌可在病薯和病土中越冬,成为次年的侵染源。病害主要危害块茎,病原菌仅能在块茎膨大初期从皮孔或伤口侵入,发病初期薯块表面形成褐色斑点,后期斑点扩大形成圆形或不规则形大斑块^[3-4]。侵染点周围组织木栓化,块茎表面变粗糙,病斑中央凸起或凹陷,有时病斑深度可达 7 mm,使得马铃薯的品质下降,加工成本增加,市场竞争力低^[5-6]。据报道,全国各产区疮痂病的发病率和严重程度呈逐年上升态势^[7]。现有防治措施中,农业措施的效果并不理想;化学防治虽然可以减轻疮痂病的发生,但具有时效性,而且大量使用化学药剂会影响土壤结构,造成严重的环境污染^[8-10];目前国内报道的抗疮痂病品种很少^[11]。因此,寻找一种绿色高效的疮痂病防治方法,

成为了马铃薯产业亟待解决的问题。

生物防治以其安全、高效、经济、绿色等优点逐渐成为研究的热点。国外学者的研究较早,Zadeh等^[12]从土壤中分离出来 174 株放线菌,温室试验表明,在土壤中添加 *S. olivaceus* 115 和 *S. plicatus* 101 能够减少疮痂病的发生;St-Onge 等^[13]发现,假单胞菌 LBUM223 能够产生一种抑制疮痂病原菌生长的抗生素,其对马铃薯疮痂病有一定的抑制作用;Larkin 等^[14]采用生防枯草芽孢杆菌 GB03 和不同的堆肥相结合的方法,使疮痂病的发病率减少 10%–34%;Meng 等^[15]在温室试验中利用解淀粉芽孢杆菌 BAC03 降低了马铃薯疮痂病的严重程度。国内关于马铃薯疮痂病的研究相对较晚,生物防治方面的报道也很少。高同国等^[16]筛选出一株马铃薯疮痂病拮抗菌株 12-82,鉴定为解淀粉芽孢杆菌;石莹莹等^[17]分离筛选得到苏云金芽孢杆菌菌株 YN-2-2,其对疮痂链霉菌有一定的抑制作用。目前国内用于防治疮痂病的菌种资源有限,并且尚未开发出适合大面积推广的生防菌剂。

本研究旨在从土壤中分离筛选得到对黑龙江省马铃薯疮痂病优势病菌 *Streptomyces scabies* 具有明显抑制效果的细菌菌株,并通过形态学鉴定、生

理生化鉴定以及分子生物学鉴定明确其分类地位, 从而为生防菌剂的开发提供菌种资源, 为马铃薯疮痂病的生物防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试土样及病原菌

供试土样采集自黑龙江省齐齐哈尔市克山农场马铃薯疮痂病发病地块。

供试病原菌株: 疮痂链霉菌 (*Streptomyces scabies*) LM17-1, 由黑龙江八一农垦大学马铃薯研究课题组提供。马铃薯早疫病菌 (*Alternaria solani*) QL17-1、向日葵菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) HP19-2、番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) HM18-1、水稻胡麻斑病菌 (*Bipolaris oryzae*) SJRB18-1、玉米圆斑病菌 (*Bipolaris zeicola*) DPQ19-1、菜豆根腐病菌 (*Fusarium solani*) BL19-1、玉米大斑病菌 (*Exserohilum turcicum*) TQRB17-1、大豆根腐病菌 (*Fusarium oxysporum*) JB16-5 由黑龙江八一农垦大学植物病理研究室分离保存。

1.1.2 供试培养基

YME 培养基(g/L): 酵母提取物 4.0, 麦芽浸提物 10.0, 葡萄糖 4.0, 琼脂 20.0。PDA 培养基、NA 培养基以及 LB 培养基参照《植病研究法》进行配制^[18]。

1.1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 氧化酶试纸、硫化氢试纸、细菌生化鉴定管, 杭州微生物试剂有限公司; 2×Taq PCR Master Mix、DL2000 DNA Marker、4S GelRed 核酸染料、试验所用引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 光学显微镜, Olympus 公司; PCR 仪、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌的分离与筛选

(1) 拮抗细菌的分离

采用土壤稀释分离法进行分离^[19]。称取 10 g

土样, 配成 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 倍稀释液, 分别取 100 μ L 在 NA 固体培养基上进行涂布, 每个土壤样品每个梯度均重复 4 次, 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后挑取形态不同的菌落分别进行划线纯化培养。重复纯化 3 次后将得到的单菌落转移到 NA 试管斜面培养基中, 进行编号记录后放入 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

(2) 拮抗细菌的初筛

将斜面保藏的拮抗细菌在 LB 培养基上进行划线活化, 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h。将活化后的细菌点接于涂好疮痂链霉菌的 YME 固体培养基中央, 并且以不接细菌的处理作为对照, 每个处理重复 3 次。30 $^{\circ}$ C 培养 7–10 d 后, 通过观察比较抑菌圈大小, 判断抑菌效果, 选取对疮痂链霉菌有抑菌作用的细菌菌株进一步复筛。

(3) 拮抗细菌的复筛

将初筛获得的菌株活化后接种于 LB 培养液中, 30 $^{\circ}$ C、160 r/min 振荡培养 48 h, 发酵液经 12 000 r/min 离心 3–5 min 后吸取上清液, 经细菌滤膜过滤得到无菌上清液。

将无菌牛津杯放置于涂好疮痂链霉菌的 YME 固体培养基中央, 吸取 200 μ L 无菌上清液于牛津杯中, 以无菌 LB 培养液作为对照, 每个处理重复 4 次, 30 $^{\circ}$ C 培养 7–10 d, 观察抑菌圈大小。

1.2.2 拮抗细菌的鉴定

(1) 形态学及生理生化鉴定

将筛选出的拮抗细菌在 LB 固体培养基上划线接种, 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后对其菌落形态进行观察, 并参照《芽孢杆菌·第二卷 芽孢杆菌分类学》^[20]、《伯杰细菌鉴定手册》^[21]和《常见细菌系统鉴定手册》^[22]进行该菌株的生理生化性质测定。

(2) 分子生物学鉴定

挑取菌株单菌落于液体 LB 培养基中, 30 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 14–18 h 后得到菌悬液, 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行基因组 DNA 的提取。

16S rRNA 基因扩增: 采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACT-3')进行基因扩增^[23]。

PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR Master Mix 12.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL, DNA 模板 0.5 μL, ddH₂O 10.0 μL; PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55–58 °C 1 min, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

gyrB 基因扩增: 采用引物 *gyrB*-F (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNNGGNGNAARTTYGA-3')和 *gyrB*-R (5'-AGCAGGGTACGGATGTGCAGCCRTCNCRTCNGCRTCNGTCAT-3')进行基因扩增^[24]。PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR Master Mix 12.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, DNA 模板 1.0 μL, ddH₂O 10.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55–58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。

PCR 扩增产物由北京六合华大基因科技有限公司进行测序, 结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对后, 选取相似性较高的菌株序列, 利用 MEGA 7 软件中的 Neighbor-Joining 法(重复抽样 1 000 次)进行系统发育树的构建。

1.2.3 拮抗细菌对薯块的安全性测定

用 75%乙醇溶液对马铃薯块茎进行表面消毒, 用无菌水清洗 2 次, 晾干表面水分后, 用无菌刀将薯块切成厚 0.5 cm 左右的薯片, 将薯片在浓度为 1×10⁸ CFU/mL 的拮抗细菌培养液中浸润后放在有无菌滤纸的培养皿中, 以无菌蒸馏水和 LB 培养液为对照, 每个处理重复 3 次, 28 °C 放置 3–5 d 后观察薯片腐烂程度。

1.2.4 拮抗细菌的抑菌谱测定

选取 8 种常见的病原菌, 采用平板对峙法将 5 mm 病原菌菌饼置于 PDA 培养基中央, 在距离病原菌 2.5 cm 处放置 5 mm 无菌滤纸片, 并将 3 μL 的拮抗细菌培养液滴加于滤纸上, 28 °C 培养 5–7 d, 观察并测量抑菌带宽度并计算抑菌效果, 采用 SPSS 17.0 进行方差分析, 抑菌效果=(抑菌带宽度/生防菌距离菌饼的距离)×100%^[25]。

1.2.5 拮抗细菌的盆栽防效试验

盆栽试验采用直径 28 cm 的花盆, 选取健康

有芽的马铃薯块茎, 将其切成大小相近的三角块, 选取芽长一致的块茎备用。将 80 mL 浓度为 1×10⁹ CFU/mL 的链霉菌菌悬液加入土壤充分混匀后备用。试验共设置 3 组处理, 处理 1 在接入致病菌的土壤中加入 100 mL 无菌水作为空白对照, 处理 2 在接入致病菌的土壤中加入 100 mL 无菌 LB 培养液充分混匀, 处理 3 在接入致病菌的土壤中加入 100 mL 浓度为 1×10⁸ CFU/mL 的 BKS104 发酵液充分混匀。将薯块播入花盆后放置温室中, 每盆 2 株, 每个处理 3 盆, 重复 4 次, 待马铃薯成熟后调查薯块发病情况, 计算发病率、病情指数和防效, 数据采用 SPSS 17.0 进行方差分析。根据病斑占块茎面积的百分比分为 6 个等级: 0 级, 无病斑; 1 级, 0%–5%; 2 级, 5%–12.5%; 3 级, 12.5%–25%; 4 级, 25%–50%; 5 级, 大于 50%。

发病率(%)=(发病薯粒数/调查总薯粒数)×100;

病情指数=[Σ(病级薯粒数×发病级别)]/(调查总薯粒数×最高发病级别)]×100;

防治效果(%)=[(对照病情指数—处理病情指数)/对照病情指数]×100。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的分离与筛选

从采集的土样中分离得到 181 株细菌菌株, 经初筛后得到 27 株对马铃薯疮痂病菌具有明显拮抗效果的菌株, 进一步进行复筛, 最终选出一株具有明显抑制效果的菌株, 抑菌直径达到 43 mm (图 1D), 将其编号为 BKS104。

2.2 菌株 BKS104 的形态学鉴定

菌株 BKS104 在 LB 培养基上的菌落形态为圆形、乳白色、不透明, 菌落湿润, 表面有光泽, 边缘整齐、无色素的产生(图 2A)。染色后在光学显微镜下观察, 菌株 BKS104 菌体呈杆状, 含芽孢(图 2B)。

2.3 菌株 BKS104 的生理生化鉴定

生理生化鉴定结果显示, 菌株 BKS104 为革兰氏阳性菌, 兼性厌氧, 具有过氧化氢酶及氧化酶活性, 代谢过程中不产生硫化氢气体; 糖酵解试验(葡

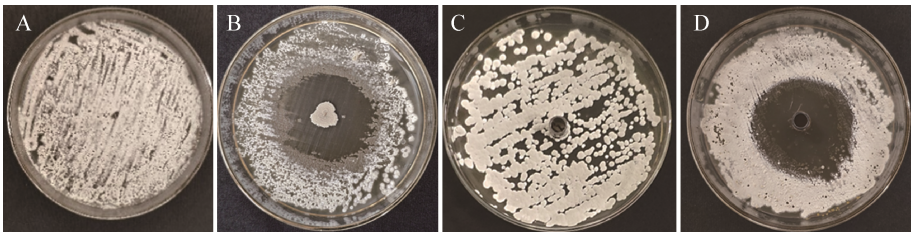


图 1 菌株 BKS104 对疮痂链霉菌的抑制效果
Figure 1 The inhibitory effect of strain BKS104 on *Streptomyces scab*

注: A: 初筛对照; B: 初筛效果; C: 复筛对照; D: 复筛效果
Note: A: Primary screening control; B: Primary screening effect; C: Re-screening control; D: Re-screening effect

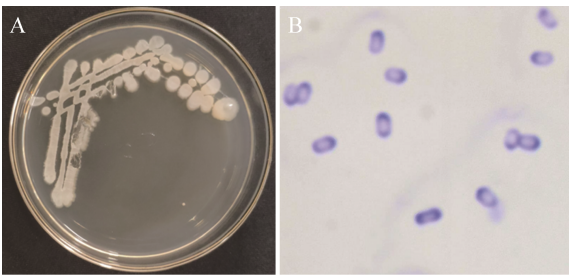


图 2 菌株 BKS104 的菌落形态及菌体形态
Figure 2 Colony morphology and cell morphology of strain BKS104

注: A: 菌落形态; B: 菌体形态
Note: A: Colony morphology; B: Cell morphology

葡萄糖、蔗糖)均呈阳性,并且代谢过程中不产生气泡;能够分解淀粉和明胶;V-P 试验和精氨酸双水解试验均呈阳性;硝酸还原试验、吲哚试验、柠檬酸试验、丙二酸盐试验、MR 试验、脲酶试验均呈阴性;在含 1%–10% NaCl 的 LB 培养基上均可正常生长(表 1)。通过生理生化试验的鉴定结果,结合形态学特征,可依据《伯杰细菌鉴定手册》^[21]初步确定菌株属芽孢杆菌属,参照《芽孢杆菌·第二卷 芽孢杆菌分类学》^[20]中的标准,可将菌株初步鉴定为贝莱斯芽孢杆菌。

2.4 菌株 BKS104 的分子生物学鉴定

菌株 BKS104 的 16S rRNA 基因序列长度为 1 417 bp。将序列提交 NCBI 后获得 GenBank 登录号 MW577624,经 BLASTn 比对发现,菌株 BKS104 的 16S rRNA 基因序列与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)、暹罗芽孢杆菌(*B. siamensis*)等菌株的基因序列的相

似性达到 99%以上,系统发育树结果显示, BKS104 与 *B. siamensis*、*B. amyloliquefaciens* 及 *B. velezensis* 分支较近,但是支持率较低,难以区分 BKS104 的种类(图 3)。

表 1 菌株 BKS104 的生理生化特性
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain BKS104

试验指标 Test index	结果 Results
革兰氏染色 Gram staining	+
过氧化氢酶 Catalase	+
氧化酶 Oxidase	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+
硝酸还原 Nitric acid reduction	—
吲哚 Indole	—
柠檬酸盐 Citrate	—
硫化氢 Hydrogen sulfide	—
精氨酸双水解 Arginine double hydrolysis	+
蔗糖 Sucrose	+
丙二酸盐 Malonate	—
葡萄糖 Glucose	+
脲酶 Urease	—
明胶液化 Gelatin liquefaction	+
MR test	—
V-P test	+
1% NaCl	+
2% NaCl	+
3% NaCl	+
4% NaCl	+
5% NaCl	+
6% NaCl	+
7% NaCl	+
8% NaCl	+
9% NaCl	+
10% NaCl	+

注: +: 阳性; —: 阴性
Note: +: Positive; —: Negative

菌株 BKS104 的 *gyrB* 基因序列长度为 1 132 bp, 将序列提交 NCBI 后获得 GenBank 登录号 MW579412, 经 BLASTn 比对发现, 菌株 BKS104 的 *gyrB* 基因序列与贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) 基因序列的相似性最高, 达到 99.91%, 系统发育树

显示, BKS104 与 *B. velezensis* 同属一个分支, 而且支持率较高(图 4)。

结合形态特征、生理生化特性及 16S rRNA 和 *gyrB* 的基因序列分析结果, 将菌株 BKS104 鉴定为贝莱斯芽孢杆菌。

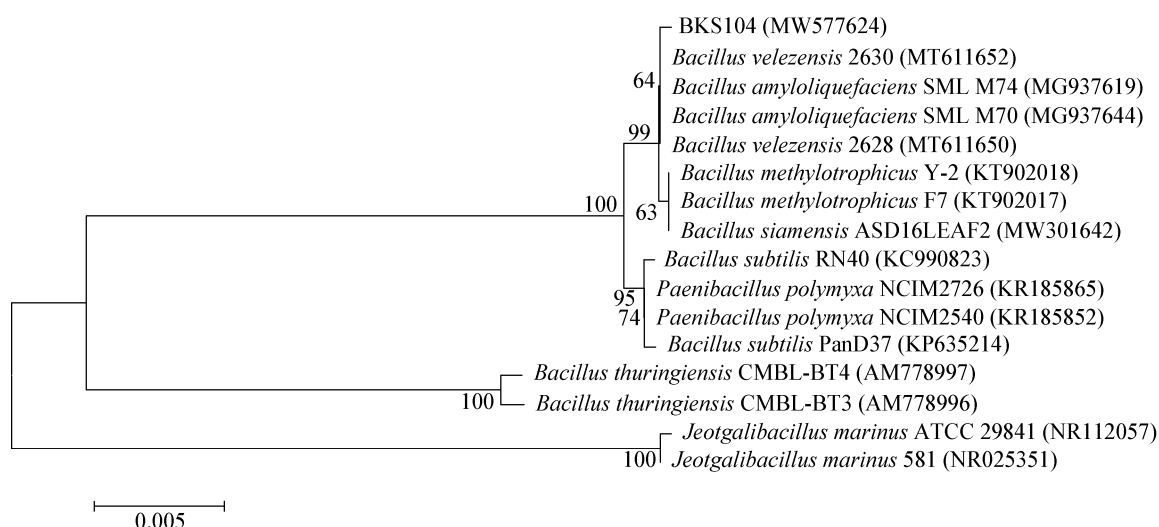


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 BKS104 的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of strain BKS104 constructed based on 16S rRNA gene sequence

注: 括号中数值为 GenBank 登录号; 分支处标注有自展值; 标尺 0.005 代表核苷酸替换率

Note: Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The bootstrap values are shown at the node and the scale bar indicates 0.005 substitutions per nucleotide position

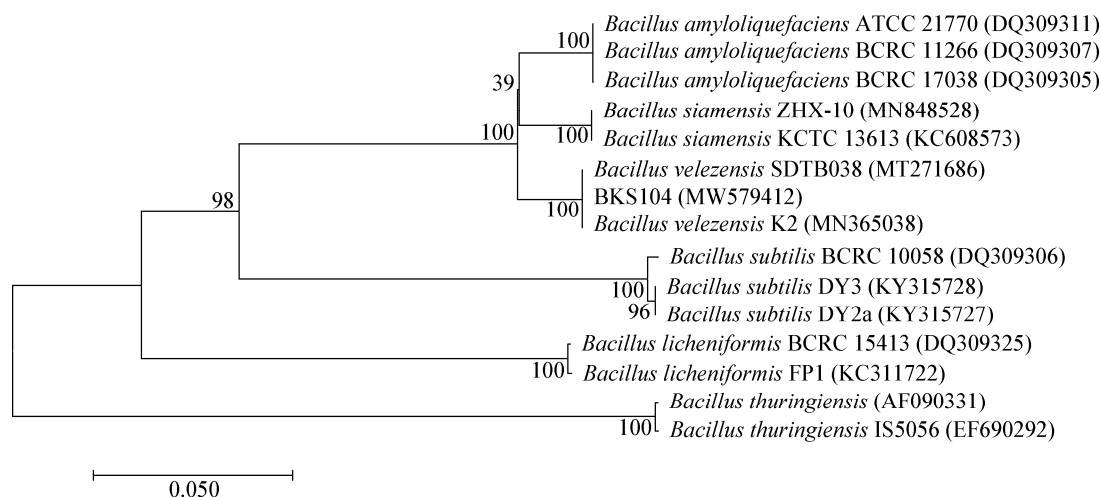


图 4 基于 *gyrB* 基因序列构建的菌株 BKS104 的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of strain BKS104 constructed based on *gyrB* gene sequence

注: 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

Note: Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The bootstrap values are shown at the node and the scale bar indicates 0.050 substitutions per nucleotide position

2.5 菌株 BKS104 对薯块的安全性测定

经菌液处理过的薯片放置 5 d 后, 没有出现腐烂迹象, 说明菌株 BKS104 对马铃薯块茎安全, 不会引起马铃薯薯块的腐烂(图 5)。

2.6 菌株 BKS104 的抑菌谱测定

菌株 BKS104 对 8 种植物病原真菌均有明显的抑制效果(表 2, 图 6)。菌株 BKS104 对马铃薯早疫病菌(*A. solani*) QL17-1 的抑制效果最为明显, 达到了 56.4%, 显著高于其他病原菌($P<0.05$)。另外, 菌株 BKS104 对水稻胡麻斑病菌(*Bi. oryzae*) SJR18-1、向日葵菌核病菌(*S. sclerotiorum*) HP19-2 及番茄灰霉病菌(*Bo. cinerea*) HM18-1 的抑制效果分别达到了 53.4%、53.1%、52.3%, 但其对大豆根腐病菌

(*F. oxysporum*) JB16-5 的抑制效果较差, 仅达到 20.4%。结果表明, 菌株 BKS104 具有良好的广谱抗菌性, 在生防领域具有较大的潜力。

2.7 菌株 BKS104 的盆栽防效试验

空白对照和 LB 处理对照马铃薯发病严重, 发病率均达到 100%, 空白对照的病情指数高达 72.5, LB 培养液处理的病情指数虽然低于空白对照, 但发病程度也较高, 病情指数为 58.7, 显著高于拮抗菌 BKS104 处理。BKS104 处理马铃薯发病情况较轻, 发病率为 36.1%, 病情指数 10.8, 另外 BKS104 对疮痂病的防效达到了 85%, 显著高于其他 2 个对照处理($P<0.05$), 进一步说明了菌株 BKS104 对马铃薯疮痂病具有较好的防治效果(表 3, 图 7)。

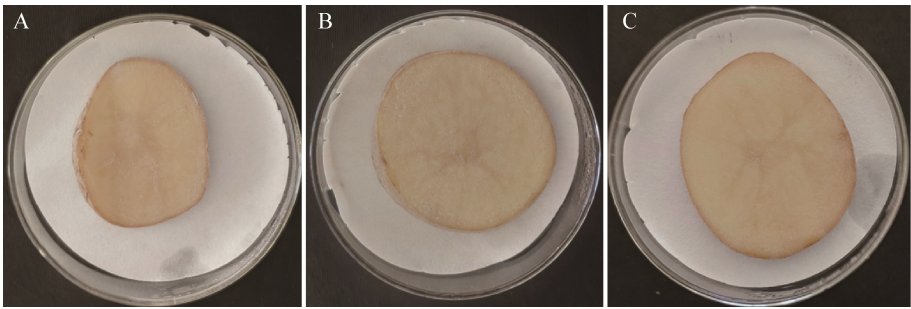


图 5 菌株 BKS104 对薯块的安全性测定
Figure 5 Determination of the safety of strain BKS104 to potato pieces
Note: A: CK; B: LB; C: BKS104

表 2 菌株 BKS104 的抑菌谱测定

Table 2 Determination of antifungal spectrum of strain BKS104

植物病原真菌	平均抑菌带	平均抑制率
Phytopathogenic fungi	Average antifungal zone (mm)	Average inhibition rate (%)
<i>A. solani</i> QL17-1	14.1±1.1a	56.4±1.3a
<i>Bi. oryzae</i> SJR18-1	13.4±1.4ab	53.4±1.4ab
<i>S. sclerotiorum</i> HP19-2	13.3±1.3ab	53.1±1.1ab
<i>Bo. cinerea</i> HM18-1	13.1±1.1ab	52.3±1.3ab
<i>E. turcicum</i> TQRB17-1	12.1±0.9bc	48.5±1.7bc
<i>F. solani</i> BL19-1	10.9±0.2cd	43.4±0.9cd
<i>Bi. zeicola</i> DPQ19-1	9.8±0.5d	39.2±1.1d
<i>F. oxysporum</i> JB16-5	5.1±0.3e	20.4±1.3e

注: 表中小写字母代表 0.05 水平差异显著性, 相同字母表示同一水平上无显著性差异
Note: The lowercase letters in the same column of data in the table represent the significance of the 0.05 level difference, and the same letter means no significant difference at the same level

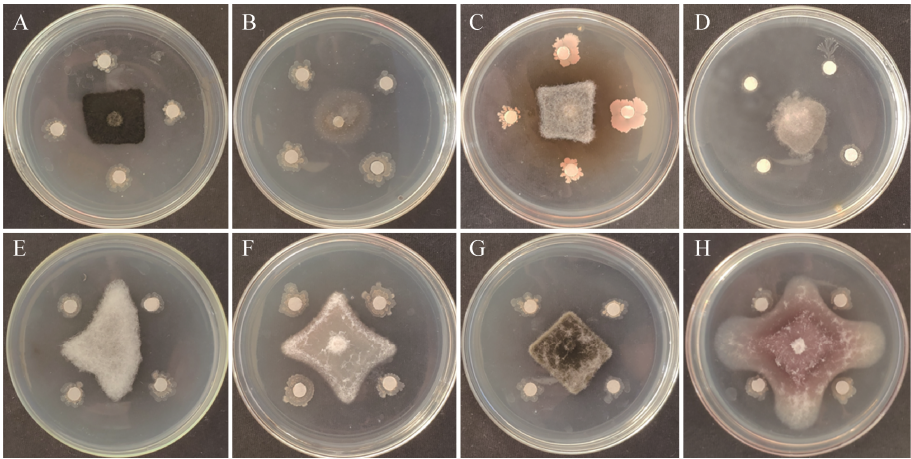


图 6 菌株 BKS104 抑菌谱测定
Figure 6 Determination of antifungal spectrum of strain BKS104

Note: A: *A. solani* QL17-1; B: *S. sclerotiorum* HP19-2; C: *Bo. cinerea* HM18-1; D: *Bi. oryzae* SJR18-1; E: *Bi. zeicola* DPQ19-1; F: *F. solani* BL19-1; G: *E. turcicum* TQRB17-1; H: *F. oxysporum* JB16-5

表 3 菌株 BKS104 的盆栽防效测定
Table 3 Determination of potted control effect of strain BKS104

处理 Treatments	发病率 Occurrence rate (%)	病情指数 Disease index	防效 Preventive effect (%)
CK	100.0±0a	72.5±2.8a	—
LB	100.0±0a	58.7±2.3b	19.0±2.2b
BKS104	36.1±2.4b	10.8±1.4c	85.0±2.5a

注：表中小写字母代表 0.05 水平差异显著性，相同字母表示同一水平上无显著性差异
Note: The lowercase letters in the same column of data in the table represent the significance of the 0.05 level difference, and the same letter means no significant difference at the same level



图 7 菌株 BKS104 的盆栽防效测定
Figure 7 Determination of potted control effect of strain BKS104

Note: A: CK; B: LB; C: BKS104

3 讨论与结论

目前报道的对马铃薯疮痂病菌有拮抗作用的菌株有解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、甲基营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*)^[16-17,23]。这些拮抗菌对疮痂链霉菌

的抑菌直径为 21.4–29.56 mm。本研究从根际土中分离得到 181 株细菌菌株，经过筛选获得一株对疮痂链霉菌具有显著效果的菌株 BKS104，鉴定为贝莱斯芽孢杆菌，其抑菌圈直径达到了 43 mm，防效达到 85%，效果明显优于前人报道的拮抗菌。菌株 BKS104 的抑菌直径也优于申永瑞等^[26]分离得到的

贝莱斯芽孢杆菌 BU396, 另外, 在 GenBank 下载 BU396 的序列后与 BKS104 进行比对发现, 2 株菌株序列间存在着差异, 可能属于不同菌系。

传统的细菌分类鉴定方法主要是通过形态特征以及生理生化特性来确定细菌的分类地位, 但是这样的方法烦琐耗时, 而且在试验的过程中往往会出现假阳性的结果, 很大程度上影响了鉴定结果。如今, 随着分子生物学的飞速发展, 16S rRNA 基因序列已经广泛应用于细菌鉴定或者构建细菌的系统进化关系上^[25]。但是由于 16S rRNA 基因序列相似度较高, 以至于难于区分亲缘关系近的菌种。本研究发现基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树中, 菌株 BKS104 与 *B. amyloliquefaciens* 和 *B. velezensis* 聚集在同一分支上, 不能区分出 BKS104 的种类。然而使用 DNA 促旋酶 B 亚基编码基因 *gyrB*, 能在一定程度上弥补 16S rRNA 基因序列的不足。*gyrB* 基因的进化率大于 16S rRNA 基因, 而且不发生水平转移, 普遍存在于细菌中, 满足了作为系统发育靶基因的要求, 目前已有很多国内学者通过结合 16S rRNA 基因与 *gyrB* 基因的序列分析进行近缘菌株的区分^[23,25,27-29]。因此, 本研究进一步通过菌株 BKS104 的 *gyrB* 基因序列进行系统发育树的构建, 结果表明菌株 BKS104 只与 *B. velezensis* 聚集在同一分支上, 能与 *B. amyloliquefaciens* 区分开来。值得注意的是, 生理生化性质依然是细菌分类的重要依据, 本研究在通过分子鉴定确定菌株 BKS104 的分类地位的同时, 依然将菌株的生理生化性质作为重要参考指标。

目前国内报道的马铃薯疮痂病生防菌的种类较少, 已分离鉴定出的菌株也远远不能达到人们对生防制剂的要求。因此, 在不断筛选新菌株的同时, 也应该对菌株的生防作用机制、定殖能力、生物安全性以及发酵条件等进行探索, 从而为生防菌剂的开发奠定基础, 同时也对马铃薯疮痂病的绿色防控具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Hadi MR, Balali GR. The effect of salicylic acid on the reduction of *Rizoctonia solani* damage in potato[J]. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 2010, 7(4): 492-496
- [2] Xing YY, Lü DQ, Wei Q, Wan SM, Dong XZ, Qiu CL, Jin GH. Species and pathogenicity identification of *Streptomyces* species causing potato common scab in part of Heilongjiang province[J]. Plant Protection, 2016, 42(1): 26-32,50 (in Chinese)
邢莹莹, 吕典秋, 魏琪, 万书明, 董学志, 邱彩玲, 金光辉. 黑龙江省部分地区马铃薯疮痂病菌种类及致病性鉴定[J]. 植物保护, 2016, 42(1): 26-32,50
- [3] Mao FR, Liu YN, Li YJ, Wang HZ. Occurrence and control of potato scab[J]. Jilin Vegetable, 2014(10): 31 (in Chinese)
毛芙蓉, 刘燕妮, 李彦军, 王会志. 马铃薯疮痂病发生与防治[J]. 吉林蔬菜, 2014(10): 31
- [4] Li SC, Li CL. Occurrence and control of potato scab[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2016, 62(1): 76-77 (in Chinese)
李拴曹, 李存玲. 马铃薯疮痂病的发生与防治[J]. 陕西农业科学, 2016, 62(1): 76-77
- [5] Zhang HH, Du ZG. Causes of potato scab in Yiwu city and its prevention and control measures[J]. China Plant Protection, 2010, 30(5): 26-27 (in Chinese)
张涵辉, 杜志贵. 义乌市马铃薯疮痂病发生原因及防控措施[J]. 中国植保导刊, 2010, 30(5): 26-27
- [6] Wang W, Yang WJ. Occurrence and control of potato scab[J]. Northwest Horticulture (Vegetables), 2014(3): 43 (in Chinese)
王文, 杨文杰. 马铃薯疮痂病发生与防治[J]. 西北园艺: 蔬菜, 2014(3): 43
- [7] Xi QX, Du FY, Wang FS, Liu CS. Adjusting soil pH value and medicament to prevent potato scab[J]. Chinese Potato, 2000, 14(1): 57-58 (in Chinese)
奚启新, 杜凤英, 王凤山, 刘长顺. 调节土壤 pH 值和药剂防治马铃薯疮痂病[J]. 中国马铃薯, 2000, 14(1): 57-58
- [8] Wanner LA. A patchwork of *Streptomyces* species isolated from potato common scab lesions in North America[J]. American Journal of Potato Research, 2009, 86(4): 247-264
- [9] Bramwell PA, Wiener P, Akkermans ADL, Wellington EMH. Phenotypic, genotypic and pathogenic variation among *Streptomyces* implicated in common scab disease[J]. Letters in Applied Microbiology, 1998, 27(5): 255-260
- [10] Zhang L, Ai YT, Ma J, Zhang W, Zhao KT. Control efficacy of various levels of fluazinam on potato tuber common scab[J]. Chinese Potato Journal, 2013, 27(3): 175-178 (in Chinese)

- Chinese)
张露, 艾玉廷, 马健, 张伟, 赵凯涛. 不同比例氟啶胺对马铃薯块茎疮痂病防治效果[J]. 中国马铃薯, 2013, 27(3): 175-178
- [11] Nie FJ, Gong L, Zhang L, Gan XY, Liu X, Yang WJ, Song YX. Prospect of disease resistance breeding for potato common scab[J]. Ningxia Journal of Agriculture and Forestry Science and Technology, 2020, 61(5): 56-57 (in Chinese)
聂峰杰, 巩榴, 张丽, 甘晓燕, 刘璇, 杨文静, 宋玉霞. 马铃薯疮痂病抗病育种展望[J]. 宁夏农林科技, 2020, 61(5): 56-57
- [12] Zadeh MK, Bonjar GHS, Farrokhi PR, Ghasemi A, Aghighi S, Mahdavi MJ. Antagonistic potential of two native *Streptomyces* strains in biocontrol of the major causals of common scab of potato in Iran[J]. Asian Journal of Plant Sciences, 2005, 5(1): 5-8
- [13] St-Onge R, Goyer C, Coffin R, Filion M. Genetic diversity of *Streptomyces* spp. causing common scab of potato in eastern Canada[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2008, 31(6/8): 474-484
- [14] Larkin RP, Tavantzis S. Use of biocontrol organisms and compost amendments for improved control of soilborne diseases and increased potato production[J]. American Journal of Potato Research, 2013, 90(3): 261-270
- [15] Meng QX, Hanson LE, Douches D, Hao JJ. Managing scab diseases of potato and radish caused by *Streptomyces* spp. using *Bacillus amyloliquefaciens* BAC03 and other biomaterials[J]. Biological Control, 2013, 67(3): 373-379
- [16] Gao TG, Jiang JP, Guo XJ, Zhang DD, Zhu BC. Screening and identification of highly effective antagonistic bacteria for potato scab[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2016, 44(12): 157-159 (in Chinese)
高同国, 姜军坡, 郭晓军, 张冬冬, 朱宝成. 马铃薯疮痂病高效拮抗菌的筛选及鉴定[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(12): 157-159
- [17] 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)
石莹莹, 赵盼, 宋双伟, 熊桐梓, 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
- [18] Fang ZD. Research Method of Plant Disease[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2001 (in Chinese)
方中达. 植物研究法[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2001
- [19] Microbiology Room, Nanjing Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences. Soil Microbiology Research Method[M]. Beijing: Science Press, 1985 (in Chinese)
中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 1985
- [20] Liu B, Tao TS, Wang JP, Liu GH, Xiao RF. Bacillus Volume 2: Taxonomy of *Bacillus*[M]. Beijing: Science Press, 2016 (in Chinese)
刘波, 陶天申, 王阶平, 刘国红, 肖荣凤. 芽胞杆菌[M]. 北京: 科学出版社, 2016
- [21] Buchanan RE, Gibbons NE. Berger's Bacteria Identification Manual[M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese)
布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984
- [22] Dong XZ, Cai MY. Manual of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (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
- [23] Liang Y. Screening of biocontrol bacteria and preliminary study on its biocontrol mechanism in potato common scab[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2019 (in Chinese)
梁燕. 马铃薯疮痂病生防菌筛选及其生防机制的初步研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2019
- [24] La Duc MT, Satomi M, Agata N, Venkateswaran K. *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(3): 383-394
- [25] Xie XY, Jia HH, Yang HQ, Gao TT, Wei YM, Ren ZG. Study on the identification, antimicrobial activities and biocontrol abilities of *Bacillus* sp. strain BJ-10[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2020, 35(2): 1-5 (in Chinese)
谢心悦, 贾慧慧, 杨海清, 高坦坦, 魏艳敏, 任争光. 芽胞杆菌 BJ-10 的鉴定及其抑菌活性与防病作用[J]. 北京农学院学报, 2020, 35(2): 1-5
- [26] 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)
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
- [27] Yan WR, Xiao M, Chen Y, Zeng XP, Zhao ZX. Comparative analysis between basic characteristics and 16S rRNA, and specific gene discovery of *Bacillus*[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(11): 4686-4692 (in Chinese)
严婉荣, 肖敏, 陈圆, 曾向萍, 赵志祥. 芽胞杆菌基本特

- 征、16S rRNA 对比分析及特异性基因挖掘[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(11): 4686-4692
- [28] Li A, Wang XF, Yang HY, Gao XZ, Cui ZJ. Application of *gyrB* in the identification of closely related bacteria: a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(5): 701-706 (in Chinese)
- 李献梅, 王小芬, 杨洪岩, 高秀芝, 崔宗均. 促旋酶 (gyrase) B 亚单位基因 *gyrB* 在鉴别细菌近缘种中的应用[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 701-706
- [29] Fu Q, Lin JJ, Gan MY, Lu YQ, Xiao YJ. Identification of a *Bacillus licheniformis* strain from seawater using a phylogenetic tree based on 16S and *gyrB* gene sequences[J]. Marine Sciences, 2020, 44(4): 90-95 (in Chinese)
- 傅奇, 林俊杰, 甘美裕, 卢源钦, 肖玉娟. 16S 与 *gyrB* 基因联合建树快速鉴定海水中的一株地衣芽胞杆菌[J]. 海洋科学, 2020, 44(4): 90-95