

程海洋,魏有海,郭良芝,等. 马铃薯晚疫病生防细菌的筛选及鉴定[J]. 江苏农业科学,2021,49(18):116-121.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.18.019

# 马铃薯晚疫病生防细菌的筛选及鉴定

程海洋<sup>1,2,3</sup>, 魏有海<sup>1,2,3</sup>, 郭良芝<sup>1,2,3</sup>, 程亮<sup>1,2,3</sup>, 郭青云<sup>1,2,3</sup>

(1. 青海大学农林科学院,青海西宁 810016; 2. 青海省农业有害生物综合治理重点实验室,青海西宁 810016;

3. 农业农村西部作物有害生物科学观测实验站,青海西宁 810016)

**摘要:**为明确从矮火绒草根内分离获得的内生细菌对致马铃薯晚疫病病菌的抑制作用,采用稀释平板法分离矮火绒草内生细菌,以对峙培养法和打孔法分别测试细菌菌株和发酵液滤液对晚疫病菌丝生长和孢子囊萌发的抑制作用,并对优势菌株进行分子生物学鉴定。结果表明,在分离的54株细菌中,有20株细菌对晚疫病病菌具明显拮抗作用,有6株抑菌率达80%以上。其中,KBL17和KBL8菌株对致病疫霉的抑菌率较高,分别为95.47%、88.37%;发酵滤液以KBL17和KBL6的抑菌率较高,分别为92.58%、83.21%,KBL17的孢子囊抑制率最高,为96.03%;盆栽试验中,细菌菌株发酵滤液处理能够导致晚疫病病情指数下降,其中KBL17菌株防效最好,达到76.04%,低于化学药剂啮菌酯的防效(82.57%)。田间试验结果表明,与化学杀菌剂(70.27%)相比,KBL17菌株对晚疫病的平均防效达到67.45%。经鉴定KBL17菌株为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。该菌株在马铃薯晚疫病防治中有较大潜力。

**关键词:**马铃薯晚疫病;致病疫霉;拮抗作用;鉴定;生物防治;内生细菌

**中图分类号:**S435.32 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)18-0116-06

马铃薯,属茄科多年生草本植物,粮饲兼用,是全球第四大重要的粮食作物,仅次于水稻、小麦和玉米,马铃薯产业已成为我国保障粮食安全和社会发展的支柱<sup>[1-2]</sup>。马铃薯晚疫病是由致病疫霉(*Phytophthora infestans*)引起并导致马铃薯茎叶死亡和块茎腐烂的一种毁灭性真菌病害,常导致马铃薯严重减产甚至绝收,造成全球重大经济损失<sup>[3]</sup>。目前,使用化学杀菌剂是防治马铃薯晚疫病的有效方法<sup>[4-5]</sup>,但频繁使用杀菌剂对环境对人类健康均有不利影响,易造成病原菌抗(耐)药性越来越强<sup>[6]</sup>,同时加速了马铃薯晚疫病病菌群体遗传结构生理分化和变异<sup>[7]</sup>。青海省是马铃薯的重要产区之一,因此,筛选新的用于防治马铃薯晚疫病的药物,尤其是具有抗菌作用的生防菌迫在眉睫。

内生细菌(endophyte)是指生活史某一阶段或

全部阶段生活于健康植物组织或器官的细胞间隙或细胞内的一类细菌<sup>[8]</sup>。内生细菌具有抑菌、诱导产生次生代谢物、固氮、溶磷及产吲哚乙酸等多方面的有益生物功能,增强宿主植物抗病虫害能力及生长竞争能力等。由于内生细菌作为生防因子具有巨大优势,因此利用内生细菌对植物病害进行生物防治已成为研究的热点之一。许多学者通过筛选拮抗菌或其代谢产物抑制致病疫霉<sup>[9]</sup>,或利用一些特定的活性物质抑制致病疫霉<sup>[10]</sup>。如申芬等报道拮抗菌发酵液能够显著抑制致病疫霉菌丝生长,能使菌丝体发生畸变,降低孢子囊形成的能力,抑制孢子囊萌发、阻止休止孢萌发<sup>[11]</sup>。王梅菊等从油菜根茎部分离出来的1株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) CanL-30,可以有效地防治灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和油菜黑胫病病菌(*Leptosphaeria biglobosa*)等引起的病害,同时也可以促进寄主油菜的生长<sup>[12]</sup>。王玉琴等从高寒草地针茅叶部分离出的1株枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) 265ZY4对马铃薯坏疽病病菌(*Phoma foveata*)、马铃薯炭疽病病菌(*Colletotrichum coccodes*)和马铃薯枯萎病病菌(*Fusarium avenaceum*)具有明显的拮抗作用,同时具有产吲哚-3-乙酸(IAA)和溶磷等能力<sup>[13]</sup>。崔月贞等从东祁连山高寒草地牧草分离出的3株内生细菌[韦

收稿日期:2020-01-11

基金项目:国家重点研发计划(编号:2018YFD020080505);青海省农业有害生物综合治理重点实验室项目(编号:2020-ZJ-Y11,2021-ZJ-Y08);青海省科技成果转化专项(编号:2018-NK-105);第二次青藏高原综合科学考察研究项目(编号:2019QZKK0303)。

作者简介:程海洋(1997—),男,河南洛阳人,硕士研究生,从事生物防治等研究工作。E-mail:haiyangcheng532@163.com。

通信作者:程亮,硕士,研究员,从事生物防治研究工作。E-mail:liangcheng1979@163.com。

氏芽孢杆菌 (*B. weihenstephanensis*) 262AY11、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 262AY6 和枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 262AY2] 对马铃薯晚疫病的抑菌率分别为 78.41%、78.03%、75.38%，且 262AY11 和 262AY6 具有固氮和产 IAA 的生物学功能<sup>[14]</sup>。

本研究从采集自祁连高寒草地矮火绒草根部分样品中分离筛选对马铃薯晚疫病有抑制效果的内生细菌菌株，并对其进行 16S rDNA 序列鉴定，以期为生防菌剂的研发提供菌株资源，也为植物内生细菌防治马铃薯晚疫病的生物防治开发应用等提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 病原菌 致病疫霉 (*P. infestans*) 菌株，由笔者所在实验室保存。

1.1.2 培养基 大豆酪蛋白琼脂 (TSA) 培养基：胰蛋白胨 15 g/L，大豆蛋白胨 5 g/L，氯化钠 5 g/L，蒸馏水 1 000 mL，琼脂 20 g/L，pH 值为 7.3 ± 0.2；理查德合成琼脂 (RSA) 培养基：黑麦 60 g 催芽露白后使用，番茄汁 100 mL，CaCO<sub>3</sub> 0.4 g，琼脂 18 g，蒸馏水 1 000 mL；LB 液体培养基：胰蛋白胨 10 g/L，NaCl 10 g/L，酵母提取物 5 g/L，蒸馏水 1 000 mL，pH 值为 7.2 ~ 7.4；LB 固体培养基：胰蛋白胨 10 g/L，NaCl 10 g/L，酵母提取物 5 g/L，琼脂 20 g/L，蒸馏水 1 000 mL，pH 值为 7.2 ~ 7.4。

### 1.2 内生细菌分离纯化

按胥婷等的方法<sup>[15]</sup>分离矮火绒草根内生细菌。用无菌水洗净矮火绒草根泥土后，滤纸吸干表面水分，称取 1.0 g 根，于无菌室内，用 75% 乙醇 (1 min)、5% 次氯酸钠 (5 min)、75% 乙醇 (30 s) 依次对根表面进行消毒，最后用无菌水洗涤 4 次，吸取最后 1 次洗涤的无菌水 100 μL 涂布 TSA 培养基平板，28 °C 培养 2 d，无菌落长出说明表面消毒合格。表面消毒后，用无菌滤纸吸干根部表面的水分，再用无菌剪刀剪碎后置于无菌研钵中，加入少量灭菌的石英砂和 9 mL 无菌水充分研磨，得到 10<sup>-1</sup> 的菌悬液。梯度稀释分别得到 10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> 浓度的菌悬液，各取 100 μL 菌悬液涂布于 TSA 培养基平板上，28 °C 培养，每个梯度做 3 次重复，培养 2 ~ 7 d，根据菌落形态、颜色、透明度等特征挑取不同的细菌菌落分离纯化，纯化 3 ~ 5 代后，得到单菌落进行转管并室温保存。

### 1.3 生防内生细菌筛选

1.3.1 平板拮抗性测定 将分离获得的细菌菌株接种到 LB 固体培养基上，37 °C 活化培养基 24 h 后，采用对峙培养法筛选拮抗细菌。将细菌菌株转接到 LB 培养基与经 RSA 培养基活化的致病疫霉对峙培养，观察菌株是否对致病疫霉菌丝生长有抑制效果，以交叉法测量抑菌带，并计算抑菌率。以未接细菌菌株的 RSA 培养基为对照，选择具有明显抑菌带的菌株，转接到 LB 培养基上培养，保存备用。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处菌菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%$$

1.3.2 内生细菌发酵滤液的抑菌活性测定 内生细菌发酵滤液的制备：将离体对致病疫霉的抑菌率大于 70% 的菌株经 LB 固体培养基斜面活化后，接 1 环于盛 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中，37 °C 振荡培养 12 h 制成种子液，再按 5% 的接种量转接至 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中，37 °C 扩大培养 24 h 得到菌液原液。将上述培养得到的菌液经 12 000 r/min 离心 10 min，并经细菌过滤器 (22 μm) 除菌后得到发酵滤液。

内生细菌发酵滤液对致病疫霉菌丝生长的影响：采用打孔法测试菌株无菌代谢液的抑菌作用，取 200 μL 的发酵滤液加入孔中 (直径为 10 mm)，以灭菌的空白 LB 液体培养基为对照，每个处理 3 次重复。抑菌率统计方法同“1.3.1”节。

内生细菌发酵滤液对致病疫霉孢子囊萌发的抑制作用：参照张铨哲等的方法<sup>[16]</sup>，将马铃薯晚疫病病菌制成孢子囊悬浮液，浓度调至在 10 × 10 倍显微镜下每个视野 150 ~ 200 个孢子囊，将孢子囊悬浮液与发酵滤液按 1 : 1 的体积比混匀，每个处理吸取 15 μL 液体滴于干净凹玻片上，于 23 °C 培养 24 h，观察孢子囊萌发情况，芽管长于孢子囊直径视为萌发。每个处理 3 次重复，每个重复以视野中所见到的孢子囊数为准，统计萌发抑制率。

### 1.4 温室盆栽防效测定

试验于 2019 年在青海省农林科学院植物保护所温室中进行。马铃薯下寨 65 品种放在阴暗潮湿处催芽，将芽眼带薯块切下，每盆 3 块，每个处理种植 10 盆马铃薯植株，待其长至 10 ~ 12 片叶时，分别喷施内生细菌发酵滤液和啮菌酯，以清水为对照 (CK)，每株马铃薯植株喷施 15 mL，2 d 后进行晚疫病病原菌接种。接种方法参照徐生军等的方法<sup>[17]</sup>，

用无菌水将晚疫病病菌培养平板上的游动孢子囊洗下,经灭菌纱布过滤后制成孢子囊悬浮液,用血球计数板将孢子囊数调为  $1 \times 10^5$  个/mL,置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中  $2 \sim 3$  h 后取出,采用喷雾法接种。接种后 7 d 调查病害情况,计算病情指数和防治效果。盆栽试验以叶片为单位进行调查,病情分级标准按方中达的方法<sup>[18]</sup>。0 级:叶片无病斑;1 级:病斑面积占整个叶片面积的比例  $< 5\%$ ;3 级:病斑面积占整个叶片面积的  $6\% \sim 10\%$ ;5 级:病斑面积占整个叶片面积的  $11\% \sim 20\%$ ;7 级:病斑面积占整个叶片面积的  $21\% \sim 50\%$ ;9 级:病斑面积占整个叶片面积的比例  $> 50\%$ 。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病叶数} \times \text{相对级数值})}{\text{调查总叶数} \times \text{最高级数值}} \times 100。$$

### 1.5 田间晚疫病防效测定

2019 年田间试验设置在青海省农林科学院马铃薯试验田。采用液体发酵法制备内生菌株发酵液,过滤获得发酵滤液。试验小区面积为  $40 \text{ m}^2$ ,共设置 8 个处理,处理 1 ~ 6 分别为 KBL6、KBL8、KBL17、KBL18、KBL19、KBL20 发酵滤液  $83 \text{ L}/666.7 \text{ m}^2$ ;处理 7 为  $250 \text{ g/L}$  啞菌酯悬浮剂  $25 \text{ g}/666.7 \text{ m}^2$ ;处理 8 为清水对照,每个处理重复 3 次,随机区组排列。田间出现中心病株时进行病情指数的基数调查并施药,之后每隔 7 d 施药 1 次,共施药 3 次,每次施药前进行病情指数的调查,并于施药后 7 d 再次进行调查。每个小区分别进行 5 点取样,每点选 10 株,计算病情指数及发病率,统计分析确定防治效果。田间试验以整株为单位进行调查,病情分级参照方树民等的方法<sup>[19]</sup>。0 级:叶片无任何症状;1 级:叶片上有个别病斑;2 级:1/3 以下叶片有病斑;3 级:1/3 ~ 1/2 叶片上有病斑;4 级:1/2 以上叶片上有病斑;5 级:几乎整株枯死。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{病情级别} \times \text{各级病株数})}{\text{调查总株数} \times \text{最高级数值}} \times 100。$$

$$\text{防治效果} = 1 - \frac{CK_0 \times PT_1}{CK_1 \times PT_0} \times 100\%。$$

式中:  $CK_0$  表示对照组的药前病情指数;  $CK_1$  表示对照组的药后病情指数;  $PT_0$  表示药剂处理组的药前病情指数;  $PT_1$  表示药剂处理组的药后病情指数。采用 DPS 7.05 软件,应用 Duncan's 新复极差法,对试验数据进行差异显著性分析。

### 1.6 菌株 KBL17 鉴定

本试验采用分子生物学鉴定菌株 KBL17。使用生工生物工程(上海)股份有限公司的 Ezup 柱式试剂

盒提取内生细菌基因组,方法参照试剂盒说明书。利用 1 对通用引物(27f 和 1492r)进行 PCR 扩增。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列如下: 27f:  $5' - \text{AGAGTTTGATCCTGGCTCAG} - 3'$ , 1492r:  $5' - \text{GGTACCTTGTACGACTT} - 3'$ 。

PCR 反应体系:  $2 \times \text{Taq PCR MasterMix}$   $12.5 \mu\text{L}$ , DNA 模板( $50 \text{ ng/L}$ )  $1.0 \mu\text{L}$ , 上、下引物各  $1.0 \mu\text{L}$ , 双蒸水  $10.5 \mu\text{L}$ 。扩增条件:  $95^\circ\text{C}$  预变性  $5 \text{ min}$ ;  $95^\circ\text{C}$   $30 \text{ s}$ ,  $52^\circ\text{C}$   $30 \text{ s}$ ,  $72^\circ\text{C}$   $1.5 \text{ min}$ , 进行 40 个循环;  $72^\circ\text{C}$  延伸  $10 \text{ min}$ ,  $4^\circ\text{C}$  保存。扩增片段用生工生物工程(上海)股份有限公司的 PCR 产物回收试剂盒纯化后,与 pMD19 - T 载体  $16^\circ\text{C}$  连接过夜,转化至大肠杆菌感受态细胞。阳性克隆经菌落 PCR 验证正确后,提取质粒,由生工生物工程(上海)股份有限公司完成碱基序列测定。将测序获得的 16S rRNA 通过与 GenBank 中核酸数据库进行 Blast 分析并利用 Clustal X 软件构建系统发育树,确定 KBL17 的分类地位。

## 2 结果与分析

### 2.1 矮火绒草根内生细菌的分离结果及其抑制作用

采集矮火绒草根组织,采用平板稀释法,共分离获得 54 株内生细菌,编号分别为 KBL1 ~ KBL54,大部分菌株在 LB 培养基上迅速生长,大多菌落表现为湿润状、乳白色、不规则、扁平、光滑,少数菌落边缘褶皱、微黄色。将分离获得的 20 株内生细菌分别于经 RSA 活化培养的致病疫霉菌株在 RSA 平板上对峙培养。由表 1 可知,能够抑制致病疫霉生长的菌株共有 20 株。其中,抑菌率达到 80% 以上的有 6 株(KBL6、KBL8、KBL17、KBL18、KBL19、KBL20 菌株),以 KBL17 菌株的抑制作用最强,抑菌率达到 95.47%。在表现抑菌作用较强的菌株中,KBL6 和 KBL8 菌株与致病疫霉之间形成的抑菌带不明显,而 KBL18(抑菌率为 84.23%)和 KBL20(抑菌率为 81.04%)菌株形成的抑菌带十分明显。

### 2.2 内生细菌发酵滤液的抑菌活性测定

2.2.1 内生细菌发酵滤液对致病疫霉菌丝生长的影响 将抑菌率达到 80% 以上的 6 个菌株分别扩大培养后离心过滤得到其发酵滤液。由图 1 可知,供试 6 个菌株的发酵滤液对致病疫霉菌丝的抑制率均在 80% 以上,较菌株对峙培养抑菌率有所下降,分别为 83.21%、80.23%、92.58%、82.36%、81.37%、

表 1 内生细菌菌株对致病疫霉的抑制作用

供试菌株	抑菌率 (%)	供试菌株	抑菌率 (%)
KBL1	51.24e	KBL11	43.05e
KBL2	33.56f	KBL12	37.49f
KBL3	49.18e	KBL13	42.04e
KBL4	78.13c	KBL14	38.04f
KBL5	49.27e	KBL15	69.45d
KBL6	86.02b	KBL16	47.39e
KBL7	74.92c	KBL17	95.47a
KBL8	88.37b	KBL18	84.23b
KBL9	79.04c	KBL19	86.39b
KBL10	74.19c	KBL20	81.04bc

注:不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著,下表同。

80.53%。其中,KBL8 菌株降幅最大,为 9.21 百分点,其次为 KBL19 菌株,降幅为 5.81 百分点。其他菌株对峙与发酵滤液之间幅差在 5% 以内,相对稳定。综合评价 KBL17 菌株的抑菌率最高(92.58%),其次是 KBL6 菌株(83.21%),KBL8 菌株的抑菌率最低,为 80.23%。

经对峙平板观察发现,受 6 个菌株发酵滤液抑制的致病疫霉菌落变小,菌丝致密,生长速率降低。显微镜检发现,发酵滤液导致致病疫霉菌丝畸变,菌丝无法正常伸展,菌丝尖端呈现球形的畸变。

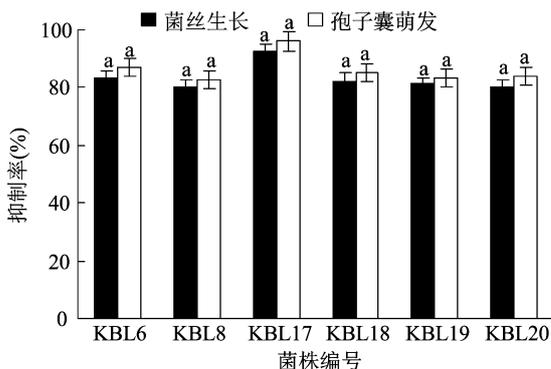


图 1 6 株拮抗细菌发酵滤液对致病疫霉的抑制作用

2.2.2 内生细菌发酵滤液对致病疫霉孢子囊萌发的抑制作用 将 6 株内生细菌发酵滤液和致病疫霉的孢子囊悬浮液混合后发现,无菌发酵滤液均可强烈抑制致病疫霉孢子囊的萌发,抑制率达到 82.49%~96.03% (图 1),显微镜检发现,发酵滤液引起致病疫霉孢子囊形态发生畸变,多为外壁破裂、中空结构、内含物分隔于两极、空孢子囊类型。

### 2.3 温室盆栽防治测定

由表 2 可知,致病疫霉游动孢子接种 5 d 后,清

水对照组病情指数达到 86.17,而生防菌 KBL6、KBL8、KBL17、KBL18、KBL19、KBL20 处理组马铃薯晚疫病病情指数显著降低,防治效果分别达到了 70.56%、66.91%、76.04%、71.15%、68.85%、65.79%。阳性对照噬菌酯的病情指数仅为 15.02,防治效果达到 82.57%。各处理组的病情指数与对照相比达到显著性差异,噬菌酯处理与各个内生菌处理组的防效达到显著性差异,显著高于内生菌株处理组。

表 2 内生细菌对马铃薯晚疫病的盆栽防效

处理	病情指数	防效 (%)
KBL6	25.37 ± 3.01b	70.56bc
KBL8	28.51 ± 2.98b	66.91c
KBL17	20.65 ± 2.78c	76.04b
KBL18	24.86 ± 2.69b	71.15b
KBL19	26.84 ± 3.12b	68.85c
KBL20	29.48 ± 3.08b	65.79c
噬菌酯	15.02 ± 2.56c	82.57a
CK	86.17 ± 3.217a	

### 2.4 田间防效测定

由表 3 可知,连续喷施 3 次生防菌剂,处理 7 (化学药剂)对马铃薯晚疫病的防治效果最好,平均防效可达 70.27%,其次为处理 3 (KBL17 菌株),平均防效达 67.45%,防效最差的为处理 2 (KBL8 菌株),平均防效仅为 54.81%。

### 2.5 内生菌株的鉴定

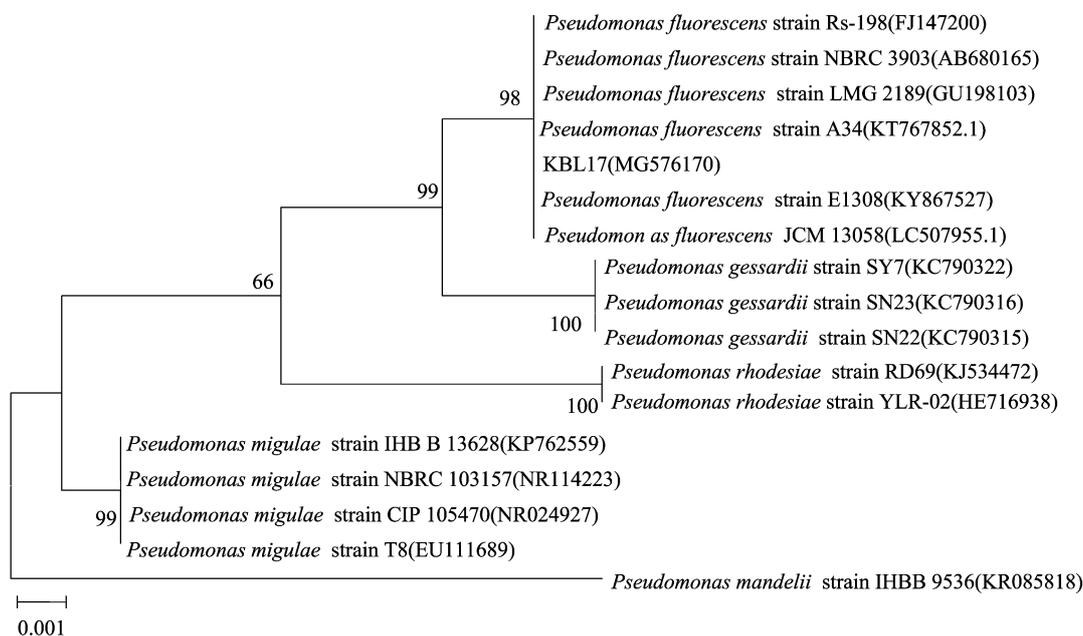
用引物 27f/1492r 进行 PCR 扩增,扩增获得约 1 444 bp 的片段。将所得序列与 GenBank 数据库中其他细菌 16S rDNA 基因序列进行比对,分析其分类地位。发现该菌的 16S rDNA 与假单胞菌序列有很高的同源性。构建 16S rDNA 序列系统发育树,发现 KBL17 菌株与荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 聚在一个群组里 (图 2),初步确定 KBL17 为荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*)。

## 3 结论与讨论

植物内生细菌分布于宿主植物的不同部位,由于其生存环境相对封闭,因此其生长发育不易受外界不良环境的干扰,这一生境优势使其在植物病害防治中拥有比根围、叶围细菌更大的应用空间<sup>[20]</sup>。利用内生细菌及其代谢产物抑制植物病害已有许多研究,目前用于防治植物病害的内生细菌种类主

表 3 不同药剂处理对马铃薯晚疫病的防治效果

处理编号	药前病情指数	第 1 次施药后 7 d		第 2 次施药后 7 d		第 3 次施药后 7 d		平均防效 (%)
		病情指数	防治效果 (%)	病情指数	防治效果 (%)	病情指数	防治效果 (%)	
1	4.46 ± 2.32	12.19 ± 3.14	70.07b	22.31 ± 4.13	61.47b	52.02 ± 2.15	53.80b	61.78
2	4.31 ± 2.11	11.26 ± 3.16	71.39b	28.77 ± 4.12	48.59c	60.43 ± 3.02	44.46c	54.81
3	4.26 ± 3.11	8.14 ± 2.19	79.08a	19.34 ± 4.01	65.04a	44.91 ± 3.04	58.24a	67.45
4	4.65 ± 4.02	11.23 ± 3.76	73.55b	24.52 ± 3.29	59.39b	55.24 ± 2.94	52.94b	61.96
5	4.31 ± 1.45	10.01 ± 4.01	74.57b	27.65 ± 3.19	50.59c	63.01 ± 2.56	42.09c	55.75
6	4.78 ± 3.29	11.91 ± 4.38	72.71b	25.69 ± 3.42	58.61b	58.93 ± 2.56	51.16b	60.83
7	4.36 ± 3.12	7.26 ± 3.27	81.77a	17.57 ± 3.21	68.96a	43.94 ± 2.75	60.08a	70.27
8(CK)	3.19 ± 2.39	29.13 ± 3.64		41.42 ± 2.95		80.53 ± 2.56		



*Pseudomonas mandelii* strain为曼德勒假单胞菌; *Pseudomonas migulae* strain为米氏假单胞菌; *Pseudomonas rhodesiae* strain为罗氏假单胞菌; *Pseudomonas gessardii* strain为格萨尔假单胞菌; *Pseudomonas fluorescens* strain为荧光假单胞菌

图2 KBL17 菌株的16S rDNA 系统发育树

要以芽孢杆菌属和假单胞杆菌属为主<sup>[21]</sup>。有文献报道,荧光假单胞杆菌的一些菌株已在食品<sup>[22]</sup>和环境保护<sup>[23]</sup>等领域展现出很大潜力,在马铃薯晚疫病防治方面,Bengtsson 等研究发现 1 株荧光假单胞杆菌(*P. koreensis* 2.74)产生的表面活性剂既能使马铃薯致病疫霉的游动孢子裂解,也能诱导马铃薯对致病疫霉产生抗性<sup>[24]</sup>。Zegeye 等对荧光假单胞杆菌(*P. koreensis*) Bak150 菌株对致病疫霉具有强烈的抑制作用,抑制率可达 88% 以上<sup>[25]</sup>。本试验从矮火绒草根中分离筛选致病疫霉拮抗细菌,54 株细菌中有 20 株有一定的抑菌作用,其中活体菌株 KBL17 和 KBL8 的抑菌率最高,分别为 95.47%、88.37%,而无菌代谢液以 KBL17 和 KBL6 菌株的抑菌率最高,分别为 92.58%、83.21%。综合菌株和

无菌代谢液的抑菌率,以 KBL17 菌株的抑菌作用最为稳定,抑菌率均在 90% 以上。经初步鉴定,对致病疫霉抑制能力较强的菌株 KBL17 为荧光假单胞杆菌,这与蒋继志等报道的结果<sup>[26]</sup>相一致。

目前,很多在平板上对致病疫霉有拮抗作用的菌株,当用于盆栽或田间防治时,防治效果减弱或无防治效果。Caulier 等施用假单胞菌 *P. protegens* 44R-P8 和 *P. brenneri* 43R-P1 的菌悬液,对马铃薯晚疫病的防治效果分别为 83%、64%<sup>[27]</sup>。李双东等施用枯草芽孢杆菌 EB-2 的菌悬液和无菌体发酵液,对马铃薯晚疫病的防治效果分别为 61.80%、60.54%<sup>[28]</sup>。胡军华等将假单胞菌 20-5 的发酵液先喷于马铃薯叶片上再接种马铃薯晚疫病菌,马铃薯苗不发病或发病很轻。在本研究盆栽

试验中,6 个菌株处理与对照相比,马铃薯晚疫病病情指数均有不同程度的下降,说明 6 个菌株对马铃薯晚疫病有很好的抑菌活性,其中以菌株 KBL17 的防效最高,为 76.04%,略低于化学农药啞菌酯的防效(82.57%)<sup>[29]</sup>。田间试验中,菌株 KBL17 的平均防效为 67.45%,啞菌酯的平均防效为 70.27%。说明该菌株在马铃薯晚疫病的生物防治中具有应用潜力。

综上,喷施内生细菌有助于马铃薯抵抗晚疫病病菌的侵染,提高马铃薯的抗病能力,在田间试验中也具有良好的防治效果,未来可通过内生细菌与化学杀菌剂联合使用,以减少晚疫病病菌的侵染,达到防病增收的效果。关于内生细菌在大田生产中的应用,仍需大量试验,其作用机制也需更深入的研究。

#### 参考文献:

[1] 谢从华. 马铃薯产业的现状与发展[J]. 华中农业大学学报(社会科学版),2012,17(1):1-4.

[2] Forbes G A, Pérez W, Andeade - Piedra J. Field assessment of resistance in potato to *Phytophthora infestans*: International cooperators guide[M]. Lima:International Potato Center,2014.

[3] Mosquera T, Alvarez M F, Jiménez - Gómez J M, et al. Targeted and untargeted approaches unravel novel candidate genes and diagnostic SNPs for quantitative resistance of the potato (*Solanum tuberosum* L.) to phytophthora infestans causing the late blight disease[J]. PLoS One,2016,11(6):e0156254.

[4] Chmielarz M, Sobkowiak S, Dębski K, et al. Diversity of *Phytophthora infestans* from Poland[J]. Plant Pathology,2014,63(1):203-211.

[5] Arora R K, Sharma S, Singh B P. Late blight disease of potato and its management[J]. Potato Journal,2014,41(1):16-40.

[6] 田荟遥,蒋继志,侯宁,等. 马铃薯致病疫霉生理小种鉴别寄主的组培条件优化及部分生理小种的鉴定[J]. 河北农业大学学报,2017,40(5):78-83,89.

[7] 李成斌,张红霞,李岩,等. 2015—2017 年北方 5 省(区)致病疫霉抗药性监测及与啞菌酯交互抗性[J]. 河北农业大学学报,2018,41(6):75-79,103.

[8] 方珍娟,张晓霞,马立安. 植物内生菌研究进展[J]. 长江大学学报(自然版),2018,15(10):41-45.

[9] Guo B, Wang Y, Sun X, et al. Bioactive natural products from endophytes: a review[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2008,44(2):136-142.

[10] Li Y, Xia L Q, Wang Y N, et al. The inhibitory effect of *Epicoccum nigrum* strain XF1 against *Phytophthora infestans*[J]. Biological Control,2013,67(3):462-468.

[11] 申芬,蒋继志,侯宁,等. 5 种拮抗菌复合发酵对致病疫霉的抑制及离体防病作用研究[J]. 河北农业大学学报,2018,41

(1):11-16,23.

[12] 王梅菊,刘晨,吴明德,等. 油菜内生细菌多样性分析及菌株 CanL-30 生防潜力评估[J]. 中国油料作物学报,2018,40(2):258-268.

[13] 王玉琴,杨成德,王颖,等. 针茅内生细菌菌株 265ZY4 的鉴定及其生物学功能[J]. 微生物学通报,2015,42(1):101-109.

[14] 崔月贞,杨小利,杨成德,等. 拮抗马铃薯晚疫病菌的高寒草地牧草内生细菌的鉴定及其生物功能测定[J]. 植物保护学报,2016,43(5):789-795.

[15] 胥婷,杨丽强,宋宇,等. 不同草原类型针茅根部可培养内生细菌群落结构及其功能[J]. 生态学杂志,2015,34(11):3101-3110.

[16] 张铭哲,李媛媛,李璐,等. 抗病诱导剂与杀菌剂混合处理对马铃薯晚疫病的防治效果[J]. 中国蔬菜,2019(9):55-61.

[17] 徐生军,姚亮亮,李新新,等. 黑龙江省和吉林省马铃薯晚疫病菌对氟啶胺和甲霜灵的敏感性变化[J]. 植物保护,2009,35(5):80-85.

[18] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,1998.

[19] 方树民,翁定河,徐大东,等. 马铃薯品种对晚疫病的抗性评价[J]. 福建农业科技,2001(4):5-6.

[20] 蒋继志,郭俊亭,李丽艳. 致病疫霉拮抗真菌研究进展[J]. 河北大学学报(自然科学版),2012,32(1):105-112.

[21] Glare T, Caradus J, Gelernter W, et al. Have biopesticides come of age? [J]. Trends Biotechnol,2012,30(5):250-258.

[22] 王侨,秦正山,袁涛,等. 两种假单胞杆菌协同发酵产脂肪酶优化和酶性质研究[J]. 酿酒科技,2018(4):38-46.

[23] 魏荷芬,韩保安,王田野,等. 一株荧光假单胞杆菌的分离鉴定与反硝化特性[J]. 微生物学通报,2016,43(8):1679-1689.

[24] Bengtsson T, Holefors A, Liljeroth E, et al. Biosurfactants have the potential to induce defence against phytophthora infestans in potato [J]. Potato Research,2015,58(1):83-90.

[25] Zegeye E D, Santhanam A, Gorfud D, et al. Biological activity of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* against *Phytophthora infestans* under greenhouse conditions [J]. International Journal of Agricultural Technology, 2011,7(6):1589-1602.

[26] 蒋继志,梁延银,王怀远,等. 致病疫霉拮抗荧光假单胞杆菌的筛选及离体防病作用[J]. 河北农业大学学报,2013,36(3):72-76.

[27] Caulier S, Gillis A, Colau G, et al. Versatile antagonistic activities of soil-borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and other potato pathogens[J]. Frontiers in Microbiology,2018,9:143.

[28] 李双东,曹克强. 枯草芽孢杆菌 EB-28 对马铃薯晚疫病菌的抑菌作用及防病效果[J]. 安徽农业科学,2009,37(24):11376-11378.

[29] 胡军华,周泽杨,蓝希钿,等. 假单胞菌 20-5 菌株对致病疫霉的作用[J]. 西南农业学报,2007,20(5):1002-1005.