

李彩虹,杨志辉,张岱,等. 马铃薯枯萎病拮抗菌的筛选与鉴定[J]. 江苏农业科学,2018,46(13):92-95.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.13.022

马铃薯枯萎病拮抗菌的筛选与鉴定

李彩虹,杨志辉,张岱,赵冬梅,潘阳,朱杰华

(河北农业大学植物保护学院,河北保定 071000)

摘要:从河北省、内蒙古自治区及贵州省等地的16个马铃薯试验田采集根际土样,分离得到288株芽孢杆菌菌株。经筛选得到6株对尖孢镰刀菌马铃薯专化型具有较强拮抗作用的菌株NZ-4、NZ-5、NZ-6、HC-Z-18、HC-Y-5和HC-Y-16,其抑菌带宽度均达到6.6 mm以上,抑菌圈直径均大于20.0 mm。根据它们的菌落和菌体形态特征及*gyrB*基因序列分析,将其鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。抑菌谱测定结果表明,拮抗菌株NZ-4对马铃薯炭疽病和疮痂病、小麦根腐病等病原菌也具有很强的拮抗作用。

关键词:马铃薯枯萎病;拮抗芽孢杆菌;抑菌谱;筛选;鉴定;生物防治

中图分类号: S435.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)13-0092-04

马铃薯枯萎病是由茄病镰刀菌、尖孢镰刀菌、串珠镰刀菌、雪腐镰刀菌、接骨镰刀菌5种不同的镰刀菌寄生所引起的一种真菌土传病害^[1],分布广泛,在我国各种植区均有发生,发病率达15%~45%^[2]。近年来,随着马铃薯主粮化战略的实施,马铃薯种植面积逐年扩大,由此带来的连作重茬导致马铃薯枯萎病日益加重,一般造成减产30%,严重时可造成78%的植株死亡,直接影响了马铃薯产量及其经济效益,严重制约了我国马铃薯产业的发展^[2-3]。

目前,马铃薯枯萎病的防治措施主要以农业防治和化学药剂拌种为主,但由于该病为土传病害,其病原菌抗逆性强且对植株为系统性侵染,使用药剂防治效果较差,使用药剂进行

大面积的土壤处理可行性较小^[3]。在缺乏有效化学药剂和抗病品种的前提下,利用拮抗菌防治枯萎病是防治途径之一,并且生防菌对环境、生态和人类健康安全,具有改善环境、获得长期效益作用,符合现阶段植物病害控制的发展方向^[4]。

芽孢杆菌可以形成耐高温、辐射、高酸碱等逆境的芽孢,能够产生脂肽类和蛋白类等抗真菌物质,具有广谱抗真菌活性和良好的稳定性,越来越为人们所关注。普遍认为芽孢杆菌生防机制主要有营养和空间位点竞争、抗菌物质产生、溶菌作用、诱导植物抗病性等^[5]。目前,利用芽孢杆菌有益菌株拮抗植物镰刀菌病害的研究已有较多报道,如黄瓜枯萎病^[6]、香蕉枯萎病^[7]、西瓜枯萎病^[8]以及马铃薯干腐病^[9]等,但针对马铃薯枯萎病开展的拮抗芽孢杆菌筛选的研究尚不多见,因此,进一步筛选出适合我国不同区域的芽孢杆菌菌株对于防治马铃薯枯萎病具有重要意义。

本研究从16个马铃薯枯萎病发生地块的健康植株根际分离筛选出6株对马铃薯枯萎病病原菌有极强抗性的芽孢杆菌菌株,并对其中NZ-4菌株的抑菌谱进行了测定,旨在为马铃薯枯萎病的生物防治以及生防菌剂的开发提供科学依据。

收稿日期:2017-01-19

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-10-P12);河北省保定市科研项目(编号:16S02)。

作者简介:李彩虹(1991-),女,山西太原人,硕士研究生,主要从事植物病原真菌与真菌病害研究。E-mail:1033070276@qq.com。

通信作者:朱杰华,博士,教授,主要从事马铃薯病害方面的研究。E-mail:Zhujiehua356@126.com。

[5] Zhang W P, Jiang B, Li W G, et al. Polyamines enhance chilling tolerance of cucumber (*Cucumis sativus* L.) through modulating antioxidative system [J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, 122(2): 200-208.

[6] 鄢小宁,林茂松,刘亮山. 南方根结线虫拮抗链霉菌的筛选和鉴定[J]. *中国生物防治*, 2004, 20(3): 202-205.

[7] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京:农业出版社, 1979.

[8] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京:中国农业出版社, 1995: 30-32.

[9] 胡玮. 钾对番茄部分抗性生理指标的影响及其对根结线虫的防治效果[D]. 北京:中国农业科学院, 2010.

[10] 尹淑丽,麻耀华,张丽萍,等. 不同生防菌对黄瓜根际土壤微生物数量及土壤酶活性的影响[J]. *北方园艺*, 2012(1): 10-14.

[11] 卢树昌,刘慧芹,王小波,等. 几种药剂对土壤根结线虫的防效及对番茄根系生理性状的影响[J]. *湖北农业科学*, 2012, 51

(1): 70-73.

[12] 蒋选利,李振岐,康振生. 过氧化物酶与植物抗病性研究进展[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2001, 29(6): 124-129.

[13] 陈金峰,王宫南,程素满. 过氧化氢酶在植物胁迫响应中的功能研究进展[J]. *西北植物学报*, 2008, 28(1): 188-193.

[14] 杨树泉,沈向,毛志泉,等. 环渤海湾苹果产区老果园与连作果园土壤线虫群落特征[J]. *生态学报*, 2010, 30(16): 4445-4451.

[15] 张海春,张浩,胡晓辉. 不同间作模式对温室连作番茄产量、土壤微生物和酶的影响[J]. *西北农业学报*, 2016, 25(8): 1218-1223.

[16] 张晓玲,潘振刚,周晓锋,等. 自毒作用与连作障碍[J]. *土壤通报*, 2007, 38(4): 781-784.

[17] Nolhr H F, Woece C R. Secondary structure of 16S ribosomal RNA [J]. *Science*, 1981, 212(4493): 403-411.

1 材料与方 法

1.1 土样采集

从河北省保定、承德、张家口、秦皇岛以及内蒙古自治区、贵州省的马铃薯枯萎病发病田块中采集健康植株的根际土壤,采集深度范围为10~20 cm,用无菌自封袋封好后带回实验室,暂保存于4℃,用于分离拮抗菌。

1.2 靶标病原菌

1株尖镰孢马铃薯专化型菌株(*Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi*, Y10-2),由河北农业大学植物病理学实验室提供。

1.3 培养基

细菌为LB培养基^[10],真菌为PDA培养基^[11]。

1.4 芽孢杆菌菌株的分离和纯化

采用热处理土壤稀释法^[12]分离芽孢杆菌,连续划线培养至纯,以体积比1:1混合于70%甘油中,-80℃冰箱保存备用。

1.5 拮抗菌的筛选

采用平板对峙法^[13]测定芽孢杆菌对尖孢镰刀菌Y10-2的拮抗作用。初筛采用抑菌带法,将接种平皿置于25℃恒温培养箱内培养,以只接种病原菌的PDA平板为对照,待对照长满平皿时,测量抑菌带宽度并筛选出抑菌效果较好的菌株,采用抑菌圈法进行复筛试验。

1.6 拮抗菌株的鉴定

采用菌落形态、革兰氏染色与分子生物学相结合的方法对筛选到的拮抗菌株进行鉴定。

*gyrB*基因的序列分析:正向引物 *gyrB*-F 为5'-TTGRCGGHRGYGGHTATAAACT-3';反向引物 *gyrB*-R 为5'-TCCDCCSTCAGARTWCCTC-3'^[14]。PCR扩增程序:95℃预变性3 min;94℃变性30 s,55℃退火45 s,72℃延伸1 min,35个循环;最后72℃延伸10 min,4℃终止反应。PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳上检测后,送生工生物工程(上海)有限公司进行测序。将所测序列通过NCBI数据库进行BLAST比对,利用Clustalx和MEGA 6.0^[15]软件对分离芽孢杆菌及模式菌进行系统发育分析。

1.7 拮抗菌抑菌谱测定

采用对峙培养法测定拮抗菌株对马铃薯炭疽病、马铃薯疮痂病、小麦根腐病菌、梨黑斑病菌、苹果斑点落叶病菌、番茄早疫病菌、红腐病菌以及烟草疫霉菌等重要的农业病害病原真菌的抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌的分离及拮抗菌株的筛选

从16份根际土壤中分离纯化到对马铃薯枯萎病菌具有潜在拮抗作用的芽孢杆菌有288株。通过平板对峙法初筛获得抑菌带宽度 ≥ 3 mm的拮抗菌株188株,占有菌株的65.3%。其中,20株拮抗菌抑菌带宽度达到5.7 mm以上。利用抑菌圈法继续对20株拮抗菌进行复筛,获得抑菌圈直径 >20.0 mm的拮抗菌6株(表1、图1)。

2.2 芽孢杆菌的种类鉴定

2.2.1 形态学特征 拮抗菌菌落呈圆形、乳白色,菌落边缘不整齐、表面有突起或褶皱,具有一定的粘附性,直径为5 mm

表1 芽孢杆菌对尖孢镰刀菌的抑制作用

菌株编号	抑菌带宽度 (mm)	抑菌圈直径 (mm)
NZ-4	7.5 ± 0.3a	20.1 ± 0.2c
HC-Z-18	6.9 ± 0.5ab	22.0 ± 0.2a
HC-Y-5	6.9 ± 0.4ab	21.1 ± 0.4b
HC-Y-16	6.8 ± 0.5ab	21.3 ± 0.8ab
NZ-5	6.7 ± 0.3b	21.7 ± 0.6ab
NZ-6	6.6 ± 0.6b	22.2 ± 0.3a

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。表2同。

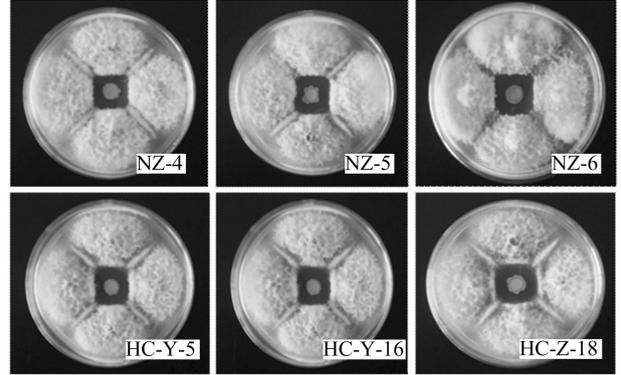
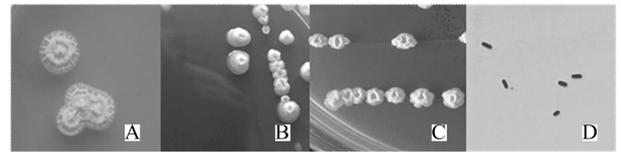


图1 拮抗菌株对尖孢镰刀菌Y10-2的平板拮抗作用

左右;4 d后可产生棕褐色色素。6株拮抗菌根据其菌落形态具体又可分为3类:NZ-4菌株为第1类,菌落中间为突起状,边缘褶皱明显,颜色较暗;NZ-5、NZ-6、HC-Z-18为第2类,菌落中间突起部分有凹陷,似喷泉状,边缘较为整齐;HC-Y-5、HC-Y-16为第3类,菌落中间凹陷,似鱼嘴状,边缘褶皱明显,不整齐。6株拮抗菌菌体均为杆状,长约2 μ m,单生,革兰氏染色结果为阳性(图2)。



A—NZ-4的菌落形态; B—HC-Z-18的菌落形态;

C—HC-Y-16的菌落形态; D—NZ-4的营养菌体

图2 拮抗菌菌落形态和营养菌体

2.2.2 拮抗菌 *gyrB* 基因序列分析 测定了NZ-4等6个芽孢杆菌菌株的 *gyrB* 基因序列,其序列相同,为1个haplotype,长度为964~999 bp。将该序列在GenBank数据库中进行Blast,并下载相似性高于98%的序列8条。以 *Bacillus subtilis* (枯草芽孢杆菌)等为外群,同源序列比对后,获得长度为892 bp的 *gyrB* 基因数据组,利用邻接法构建了6个未知芽孢杆菌的系统发育树(图3)。该树形成1个大分支,即解淀粉芽孢杆菌复合种,该大分支可分为3个末端分支,从上到下分别为 *Bacillus velezensis*、*Bacillus amyloliquefaciens* 和解淀粉芽孢杆菌中的另外1个隐藏种。本研究中的6条序列均聚在第1个分支,将其鉴定为 *Bacillus velezensis*。

2.3 拮抗菌 NZ-4 的抑菌谱

将菌株NZ-4对8株病原菌株进行抑菌谱测定。结果显示,菌株NZ-4对马铃薯炭疽病、疮痂病的抑菌效果最好,抑菌圈直径达到35 mm;对小麦根腐病菌、梨黑斑病菌、苹果

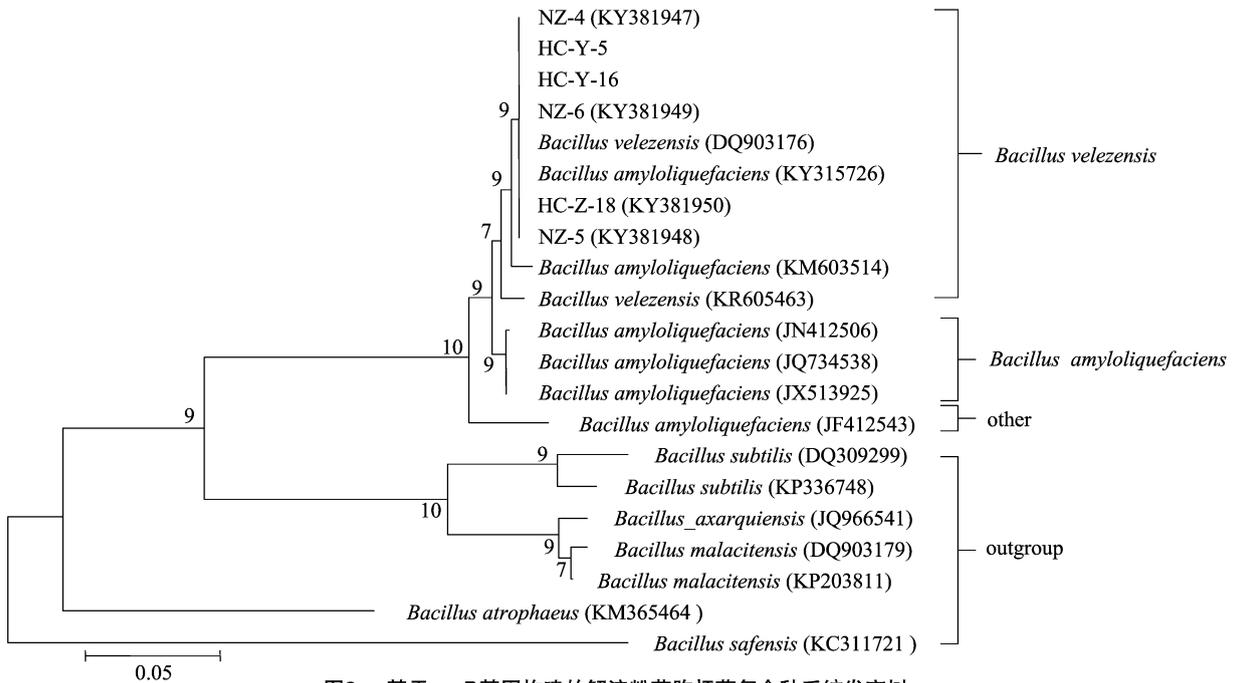


图3 基于 *gyrB* 基因构建的解淀粉芽孢杆菌复合种系统发育树

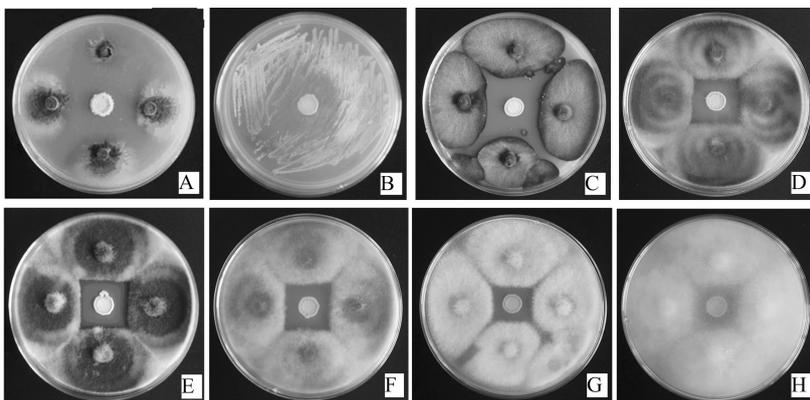
斑点落叶病菌、番茄早疫病菌的抑菌圈直径均在 24 mm 以上;对红腐病菌也有一定的拮抗作用;但对烟草疫霉菌的拮抗作用不明显(表 2、图 4)。表明菌株 NZ-4 有比较广的抑菌谱,可以考虑将其应用于除马铃薯枯萎病外的其他作物病害的生防研究。

3 讨论

采用 *gyrB* 序列对比方法对 NZ-4 等 6 株芽孢杆菌菌株进行了系统发育分析,并结合传统的形态观察将它们鉴定为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*)。系统发育分析主要依据与 6 株拮抗菌 *gyrB* 基因序列同源性为 99% 的 DQ903176

表 2 拮抗菌株 NZ-4 对不同病原菌拮抗效果

病原菌	抑菌圈直径 (mm)
马铃薯炭疽病 (<i>Colletotrichum coccodes</i>)	35.1 ± 0.2a
马铃薯疮痂病 (<i>Streptomyces scabies</i>)	34.9 ± 0.3a
小麦根腐病 (<i>Cochliobolus sativas</i>)	26.3 ± 0.4b
梨黑斑病 (<i>Alternaria kikuchiana</i> Tanaka)	25.0 ± 0.3c
苹果斑点落叶病 (<i>Alternaria alternaria</i> f. sp. mali)	24.8 ± 0.3cd
番茄早疫病 (<i>Alternaria solani</i>)	24.5 ± 0.2d
红腐病 (<i>Fusarium equiseti</i>)	18.6 ± 0.2e
烟草疫霉 (<i>Phytophthora nicotianae</i>)	



A—马铃薯炭疽病菌(*Colletotrichum coccodes*); B—马铃薯疮痂病菌(*Streptomyces scabies*); C—小麦根腐病菌(*Cochliobolus sativas*); D—梨黑斑病菌(*Alternaria kikuchiana* Tanaka); E—苹果斑点落叶病菌(*Alternaria alternaria* f. sp. mali); F—番茄早疫病病菌(*Alternaria solani*); G—红腐病菌(*Fusarium equiseti*); H—烟草疫霉菌(*Phytophthora nicotianae*)

图4 NZ-4 对不同病原菌的拮抗效果

(GenBank 登录号), 该菌株同 KY315726、KM603514 和 KR605463 单独聚为 1 个分支。贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 是 2005 年由 Ruiz - García 等新命名的芽孢杆菌种^[16], DQ903176 菌株属于 *Bacillus velezensis*, 该菌之前被认定

为 *Bacillus amyloliquefaciens* 的后异形同义词^[17], 2015 年, Dunlap 等通过对 *Bacillus velezensis* NRRL B - 41580T 进行比较基因组学和 DNA - DNA 杂交分析, 否定了 *Bacillus velezensis* 为 *Bacillus amyloliquefaciens* 的后异形同义词, 即 *Bacillus*

*velezensis*为不同于 *Bacillus amyloliquefaciens* 的一个种^[18]。因此,本研究将登录号为 DQ903176 的菌株所在的分支界定为 *Bacillus velezensis* 种群,并将 6 株拮抗菌鉴定为 *Bacillus velezensis*。

贝莱斯芽孢杆菌是一种新型生防细菌,有关它的研究日益增多。有研究发现,该菌对棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌^[19]、番茄灰霉病灰葡萄孢菌^[20]等具有拮抗活性,该菌产生的 β -葡聚糖酶可抑制杨树紫纹羽病菌^[21],还有研究者将该菌制成生物制剂,可有效降低赤霉病和 DON 积累^[22]。本研究从 16 个马铃薯种植地块分离筛选得到 6 株贝莱斯芽孢杆菌,它们对马铃薯枯萎病病原菌尖孢镰刀菌都具有很强的拮抗活性,为贝莱斯芽孢杆菌在马铃薯枯萎病的生物防治上提供了新的科学依据。

芽孢杆菌的拮抗机制通常是由于它能产生生物活性物质^[23-24]。芽孢杆菌产生的拮抗物质主要有细菌素、抗生素、细胞壁溶解酶、其他抑菌蛋白及挥发性抗菌物质等^[25]。相关研究表明,芽孢杆菌产生的 fengycin 类和 iturin 类家族的脂肽类化合物在抑制真菌病害中起着重要作用,这些物质中的一些只抗相同或相近的有特异受体位点的种类^[26]。Lee 等研究发现,贝莱斯芽孢杆菌产生的 bacillomycin D、fengycin 和 (oxy) difficidin 等活性物质抑制病原菌^[27]。本研究结果表明,NZ-4 菌株对除马铃薯枯萎病以外的其他多种重要农业病害病原菌也能产生较强的拮抗作用,由此推测,NZ-4 菌株可能产生多种不同的抑菌物质,亦或该菌株产生的抑菌物质有较广的抑菌能力,具体活性物质成份还有待于进一步研究,以期为该菌株在生产实践中更广泛的应用提供理论基础。

参考文献:

- [1] Rakhimov U K, Khakimov A K. Wilt of potatoes in Uzbekistan [J]. *Zashchita i Karantin Rastenii*, 2000, 3: 46.
- [2] 张治军. 马铃薯黄萎病与枯萎病防治 [J]. *西北园艺·蔬菜*, 2016(6): 40.
- [3] 王晓丽. 马铃薯枯萎病发生特点及防治措施的初步研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.
- [4] 苏琴. 化学防治与生物防治的优缺点浅析 [J]. *内蒙古农业科技*, 2011(6): 84-85, 132.
- [5] 陈志谊, 刘永峰, 刘卮洲, 等. 植物病害生防芽孢杆菌研究进展 [J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(5): 999-1006.
- [6] 韦巧婕, 郑新艳, 邓开英, 等. 黄瓜枯萎病拮抗菌的筛选鉴定及其生物防效 [J]. *南京农业大学学报*, 2013(1): 40-46.
- [7] 俞鲁, 凌宁, 张楠, 等. 香蕉枯萎病拮抗菌的筛选鉴定及其生防效果 [J]. *南京农业大学学报*, 2012(4): 81-86.
- [8] 王晓晓. 西瓜枯萎病拮抗菌的筛选、生物学特性及发酵条件和抗生物质的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [9] 王爱军. 马铃薯干腐病和黑痣病菌拮抗芽孢杆菌的筛选及芽孢杆菌遗传多样性研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
- [10] Wu H J, Wang S, Qiao J Q, et al. Expression of HpaG (Xooc) protein in *Bacillus subtilis* and its biological functions [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(2): 194-203.
- [11] 郝士海. 现代细菌学培养基和生化试验手册 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1992.
- [12] 龚国淑, 张世熔, 唐志燕, 等. 土壤芽孢杆菌分离方法的比较——以成都郊区土壤为例 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(11): 3685-3690.
- [13] El-Tarabily K A, Nassar A H, Hardy G E S J, et al. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(1): 13-26.
- [14] Sharga B M, Lyon G D. *Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1998, 44(8): 777-783.
- [15] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150-163.
- [16] Ruiz-García C, Béjar V, Martínez-Checa F, et al. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55: 191-195.
- [17] Wang L T, Lee F L, Tai C J, et al. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58: 671-675.
- [18] Dunlap C A, Kim S J, Kwon S W, et al. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66: 1212-1217.
- [19] 王伟, 李术娜, 李红亚, 等. 大丽轮枝菌拮抗细菌菌株 12-51 的筛选鉴定与抗菌物质性质分析 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25(19): 14-19.
- [20] 王伟, 李术娜, 李红亚, 等. 番茄灰霉病拮抗细菌的筛选与 X-75 菌株鉴定 [J]. *园艺学报*, 2010, 37(2): 307-312.
- [21] 徐婷, 朱天辉, 李姝江, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* YB15 β -葡聚糖酶的抑菌作用与基因克隆 [J]. *中国生物防治学报*, 2014, 30(2): 276-281.
- [22] Palazzini J M, Dunlap C A, Bowman M J, et al. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium head blight* and deoxynivalenol accumulation: genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles [J]. *Microbiological Research*, 2016(192): 30-36.
- [23] 孙梅, 张维娜, 高亮, 等. 解淀粉芽孢杆菌 JSSW-LA 的分离鉴定及对病原菌拮抗特性 [J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(4): 275-279.
- [24] 高同国, 姜军坡, 郭晓军, 等. 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.
- [25] 林东, 徐庆, 刘忆舟, 等. 枯草芽孢杆菌 SO113 分泌蛋白的抑菌作用及抗菌蛋白的分离纯化 [J]. *农业生物技术学报*, 2001, 9(1): 77-80.
- [26] Kloeppe J W, Rodríguez-Kábana R, Zehnder A W, et al. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases [J]. *Australasian Plant Pathology*, 1999, 28(1): 21-26.
- [27] Lee H H, Park J, Lim J Y, et al. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* G341, a strain with a broad inhibitory spectrum against plant pathogens [J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 211: 97-98.