

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2017)04-0227-07

病虫害防治

马铃薯黑痣病生防菌的筛选鉴定及生长条件研究

马 龙¹, 杨莉莉², 马 兴¹, 贾蕊鸿¹, 董星辰¹, 邱慧珍^{1*}

(1. 甘肃农业大学资源与环境学院/甘肃省干旱生境作物学重点实验室, 甘肃 兰州 730070;

2. 西北农林科技大学资源与环境学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要: 采用稀释平板法, 从马铃薯根际土壤中筛选到1株对马铃薯黑痣病病原菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)有良好拮抗效果的生防菌株QHZ-M1, 抑菌率达到59.8%; 通过生理生化 and 16S rDNA 鉴定, QHZ-M1 与芽孢杆菌属(*Bacillus*) 同源性高达99%, 且与 *B. axarquiensis* CR-119 亲缘关系最近, 由此将其鉴定为芽孢杆菌 *Bacillus axarquiensis*。对其生长条件进行了研究, 结果表明, 菌株QHZ-M1 的生长速率较快, 接种20 h后就进入稳定期, 其生长最适温度为37℃, 最适pH 8, 最适盐度<25 g/L, 最适碳源和氮源分别为蔗糖和酵母浸粉。QHZ-M1 对马铃薯黑痣病具有较好的防治效果, 具有作为生防制剂的潜力。

关键词: 马铃薯; 黑痣病; 拮抗菌; 芽孢杆菌

Isolation, Identification and Growth Condition of Antagonistic Strains Against Potato Black Scurf

MA Long¹, YANG Lili², MA Xing¹, JIA Ruihong¹, DONG Xingchen¹, QIU Huizhen^{1*}

(1. College of Resources and Environment, Gansu Agricultural University/Gansu Provincial Key Lab of Aridland Crop Science,

Lanzhou, Gansu 730070, China; 2. College of Resources and Environment, Northwest Agricultural and Forestry University,

Yangling, Shaanxi, 712100, China)

Abstract: A bio-control strain (QHZ-M1) with good antagonistic activity against *Rhizoctonia solani* of potato black scurf pathogenic bacteria was filtrated from potato rhizosphere soil by plate dilution method. Its inhibition percentage reached 59.8%. Based on the physiological and biochemical characteristics, and 16s rDNA identification, QHZ-M1 had 99% homology with *Bacillus* and had a close relationship with *B. axarquiensis* CR-119. Thus, it was identified as *B. axarquiensis*. Growth conditions of QHZ-M1 were studied and the results showed that the strain growth rate was relatively fast, and reached a stable period after 20 h. The optimal temperature for the growth was 37℃, the optimal pH was 8, the optimal salinity was < 25 g/L, and the optimal carbon and nitrogen source was sucrose and yeast extract powder, respectively. QHZ-M1 has good control effect on potato black scurf disease and potential as bio-control agent.

Key Words: potato; black scurf; antagonistic bacterium; *Bacillus axarquiensis*

马铃薯粮菜兼用, 营养全面, 适应性广, 是继玉米、小麦和水稻之后的世界第四大粮食作物^[1]。统计

资料显示, 2014年中国马铃薯的种植面积和总产量分别达到564.50万hm²和9608万t, 近50年分

收稿日期: 2016-03-31

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2015CB150501); 国家自然科学基金(31360500); 国家公益性行业(农业)科研专项(201103004); 白银市白银区科技计划项目(2014-5N)。

作者简介: 马龙(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为逆境胁迫与植物营养。

*通信作者(Corresponding author): 邱慧珍, 教授, 博士生导师, 主要从事植物营养与营养生态的教学与科研工作, E-mail: hzqiu@gsau.edu.cn。

别增加了4.33和7.44倍^[2]。马铃薯种植业已成为中国农村收入来源和经济发展的一个重要支柱产业。近年来,随着种植面积的增加,许多马铃薯主要产区由于无法实现轮作倒茬致使黑痣病的发生与危害日益严重,严重地块的发病率可达到70%~80%,严重影响了马铃薯的产量和品质^[3,4],使之成为制约中国马铃薯发展的主要因素之一。

马铃薯黑痣病又称为立枯丝核菌病,是一种真菌性的土传病害。目前,中国马铃薯黑痣病的最常用防治方法是播前药剂处理和土壤消毒^[5,6],这一方法在一定程度上有效控制了土传病害的发生。但是,多年来使用高毒农药导致病原菌对农药产生了抗药性,因此,防治效果越来越差,同时带来了一系列的环境污染;且农产品中农药残留量的增加,将带来食品安全问题^[7]。因此,环境友好型的生物防治已成为当今各类植物病害防治研究的重点^[8]。

目前用生物防治方法防治植物病害已有很多研究,李卫利等^[9]筛选出1株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和1株解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)对黄瓜白粉病有很好的防治效果,王玲等^[10]筛选出一株解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)对于辣椒青枯病有很好的防治效果。目前,关于马铃薯黑痣病的防治报道较少,尤其是甘肃省。本研究从甘肃省白银市连作马铃薯田植株周围耕作层采集土样,从中筛选出针对马铃薯黑痣病具有生防效果的菌株,旨在为甘肃白银地区马铃薯黑痣病的生物防治提供优良菌株。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 土样采集

采用随机取样法,每个小区选取5个点(发病植株旁边的健康植株),采集马铃薯根际0~20 cm处土壤样品,采样时铲去表土,将带土植株取出,轻轻抖掉根系外围土,再用毛刷轻刷粘附在根表面的土壤,混匀装入自封袋中,编号,带回实验室,保存在-20℃冰箱中,用于拮抗微生物的分离筛选。

1.1.2 供试菌株

菌株QHZ-M1由本试验分离获得,立枯丝核菌

由本实验室提供。

1.1.3 供试培养基

LB培养基:NaCl 5 g、蛋白胨10 g、酵母浸粉5 g、琼脂20 g、蒸馏水1 000 mL、pH 7.0~7.2。

PDA培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g、蒸馏水1 000 mL。

牛肉膏蛋白胨培养基:蛋白胨10 g、NaCl 2.5 g、牛肉膏3 g、琼脂20 g、蒸馏水1 000 mL、pH 7.0~7.2。

1.2 细菌的分离纯化

称取土样5 g,加入装有45 mL无菌水的150 mL三角瓶中,加入玻璃球,30℃,180 r/min振荡15 min。取上清液进行稀释,取 1.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-5} 和 1.0×10^{-6} g/mL的上清液100 μ L涂于细菌固体培养基(营养琼脂)上,每梯度重复3次,于30℃恒温条件下培养48 h后,筛选并挑取培养特征相异的单个菌落,纯化培养后作为候选生防菌株。

1.3 拮抗菌的筛选

采用PDA平板对峙法,在平板中央点接立枯丝核菌菌饼,将已分离纯化的菌株点接在距离立枯丝核菌菌饼2.5 cm处的4个点上,以只点接立枯丝核菌菌饼的作为对照,在28℃培养箱中培养3 d。当对照菌饼长满整个培养皿,测定每个处理的菌落直径,每处理4次重复。选取对立枯病病原菌有较强拮抗作用的拮抗菌株进行复筛,选择抑制效果比较明显的菌株^[11]。

抑菌率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 $\times 100\%$ 。

1.4 拮抗菌株的鉴定

1.4.1 菌株的培养特征及形态特征鉴定

参照《微生物学实验》^[12]的试验方法,将所筛选的菌株接种于细菌培养基(LB)上,在28℃恒温培养箱,培养26 h后挑去做革兰氏染色,培养48 h后观察菌落的形态。

1.4.2 拮抗菌的生理生化特征

根据《常见细菌系统鉴定手册》^[13]的方法,将筛选的菌株,接种到细菌液体培养基,28℃恒温培养箱中培养24 h后,做生理生化的测定。

1.4.3 16S rDNA序列测定及分析

按照细菌基因组柱式提取试剂盒的方法,提取

菌株的基因, 以上述所有DNA按照比例稀释至5 ng/μL作为模板, 采用引物27F(5'-AGAGTTTGATCATG GCTCAG-3')和1492R(5'-GGYTACCTTGTACG ACTT-3')对样品16S rRNA基因进行扩增, 引物由南京瑞真生物技术有限责任公司(Realgene Biotech, Nanjing, China)合成, 按照说明书要求添加相应的ddH₂O将其配置成10 μmol/L的工作液。

PCR反应的体系为50 μL, 包含: 25 μL TaKaRa Taq Version 2.0 plus dye (TaKaRa, Dalian, China)、27F/1492R(10 μmol/L)引物各1 μL, 模板DNA 2 μL, ddH₂O 21 μL。

PCR反应条件: 95 ℃ 5 min; 30 cycles(94 ℃ 45 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min); 72 ℃ 7 min; 4 ℃ Hold。每个样品3次重复, 同时做阴性对照, 以确保试验过程中不存在污染, 测序结果在NCBI基因库中进行BLAST比对, 并利用MEGA5.1软件构成系统发育树。

1.5 数据处理

利用Microsoft Excel 2003作图, 数据统计的分析采用SPSS 22统计软件, 不同处理间的差异显著性检验采用Duncan's新复极差法。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的筛选

通过对峙试验获得对马铃薯黑痣病原菌生长有强烈抑制作用的细菌4株(表1), 对峙培养3 d抑菌率分别为59.8%、51.0%、46.6%和44.5%。其中QHZ-M1抑菌效果最佳, 对立枯丝核菌的抑菌带宽度达到5.22 mm, 抑菌圈半径 > 2.5 cm, 抑菌率达到59.8%(图1)。表明, 菌株QHZ-M1对马铃薯立枯丝核菌有很好的防治效果。

2.2 拮抗菌的鉴定

2.2.1 拮抗菌的形态特征及生理生化测定

QHZ-M1在细菌培养基上, 28 ℃下培养2 d即

表1 对峙培养3 d后菌株QHZ-M1对立枯丝核菌的抑制率

Table 1 Strain QHZ-M1 inhibition on *Rhizoctonia solani* growth after three days of confrontation training

拮抗菌 Antagonistic bacterium	病原菌菌落直径(cm) Pathogen colony diameter		抑菌率(%) Inhibition percentage
	对照菌 CK	对峙菌 Confrontation	
QHZ-M1	9	3.78 ± 0.01 d	59.8
QHZ-M2	9	4.42 ± 0.034 c	51.0
QHZ-M3	9	4.82 ± 0.056 b	46.6
QHZ-M4	9	5.08 ± 0.306 a	44.5

注: 平均值后数值为标准差, 不同字母表示在0.05水平下差异显著。

Note: Number after mean value is standard deviation. Different letters indicate significant difference at 0.05 level.

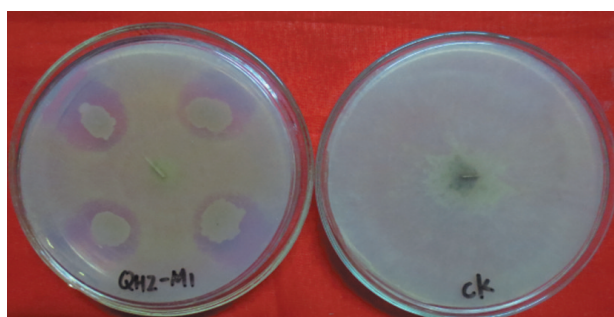


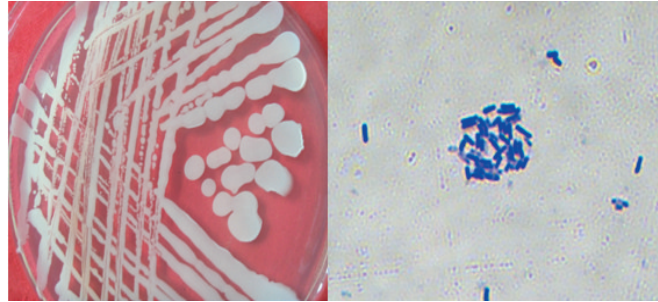
图1 菌株QHZ-M1对立枯丝核菌生长的影响(3 d)

Figure 1 Effect of strain QHZ-M1 on *Rhizoctonia solani* growth

可出现明显的菌落, 其菌落呈球形、椭圆形或不规则形, 菌落不透明, 乳白色, 革兰氏染色为阳性, 菌体呈杆状(图2)。

对QHZ-M1生理生化特征进行测定, 其结果为葡萄糖为发酵型, 丙二酸盐、柠檬酸盐利用为阳

性, V-P试验、接触酶反应、产氨试验、硫化氢产生均为阳性, 可以水解淀粉、明胶、色氨酸、酪氨酸, 能够产生吲哚, 苯丙氨酸水解、酒石酸盐水解、M-P试验均为阴性(表2)。通过自动检索数据库对测定结果进行鉴定该菌株属于芽孢杆菌属。



a: QHZ-M1的菌落形态; b: QHZ-M1革兰氏染色的形态特征。

a: Colonial morphology of strain QHZ-M1; b: Gram's staining of morphological characteristics of strain QHZ-M1.

图2 菌株QHZ-M1形态学鉴定结果

Figure 2 Morphological identification results of strain QHZ-M1

表2 菌株QHZ-M1生理生化鉴定结果

Table 2 Physiological and biochemical property results of strain QHZ-M1

测定指标 Tested index	试验结果 Result
糖醇类发酵实验 Sugar alcohol fermentation experiment	+
氨基酸脱羧酶 Aromatic amino acid decarboxylase	+
柠檬酸盐 Sodium citrate	+
尿素水解 Urea hydrolysis	+
产氨试验 Production of ammonia test	+
精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	+
精氨酸水解酶 Arginine dihydrolase	-
丙二酸盐 Malonate	+
酒石酸盐 Tartrate	-
色氨酸水解 Tryptophan hydrolysis	+
淀粉水解 Amylolysis	+
接触酶 Catalase	+
硫化氢产生 Hydrogen sulfide production	+
V-P试验 V-P test	+
M-P试验 M-P test	-
吲哚产生 Indole production	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+
酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	+
苯丙氨酸水解 Phenylalanine hydrolysis	-

注: +, 阳性反应; -, 阴性反应。

Note: +, positive reaction; -, negative reaction.

2.2.2 拮抗菌的分子生物学鉴定

PCR反应完成后, 采用1.8%琼脂糖凝胶, 0.5 × TAE缓冲液条件下电泳检测, Marker选用DL 5 000 (TaKaRa, Dalian, China)。QHZ-M1的电泳条带如图3, PCR产物经纯化后进行测序, 得到QHZ-M1的16S rDNA的序列长度为1 411 bp, 把菌株QHZ-M1的16S rDNA进行BLAST比对, 选择同源性不低于99%的序列, 利用MEGA5.1软件构建系统发育树(图4), 结果表明, QHZ-M1与芽孢杆菌属同源性高达99%, 与*B. axarquiensis* CR-119亲缘关系最近, 结合生理生化测定结果, 初步确定QHZ-M1为芽孢杆菌*B. axarquiensis*。

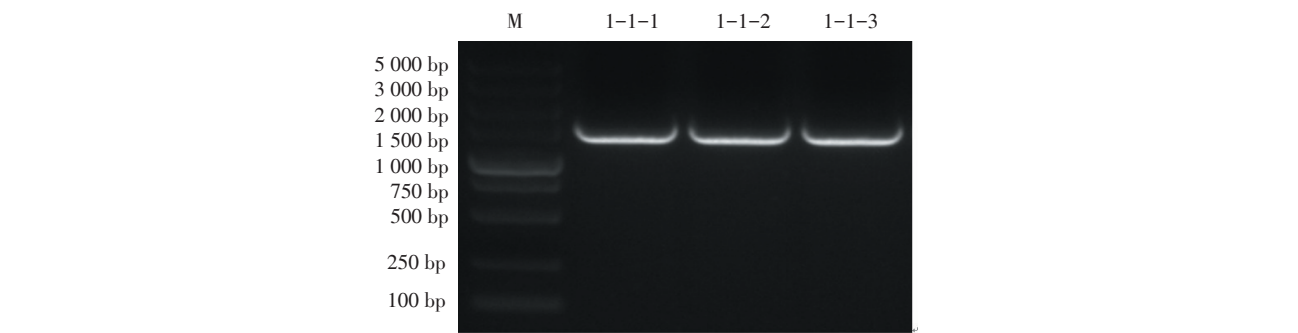
2.3 菌株QHZ-M1生长特性

2.3.1 QHZ-M1的生长特征曲线

由图5可以看出QHZ-M1菌株生长迅速, 接种到LB培养基后, 很快进入对数期, 在20 h后进入稳定期, 说明该菌株生长迅速。

2.3.2 QHZ-M1的生长条件研究

从表3中可以看出, 菌株QHZ-M1在pH 8时菌株生产量高于其他pH处理; 温度在37 °C时菌株的生长量显著高于其他温度处理; 盐分含量在0~25 g/L时菌株生长量显著高于盐分>25 g/L的处理; 氮源



M: 标准引物; 1-1-1、1-1-2、1-1-3 是 QHZ-M1 电泳条带的 3 次重复。
M: Standard primers; 1-1-1, 1-1-2, and 1-1-3 is QHZ-M1 electrophoretic band of three replicates.

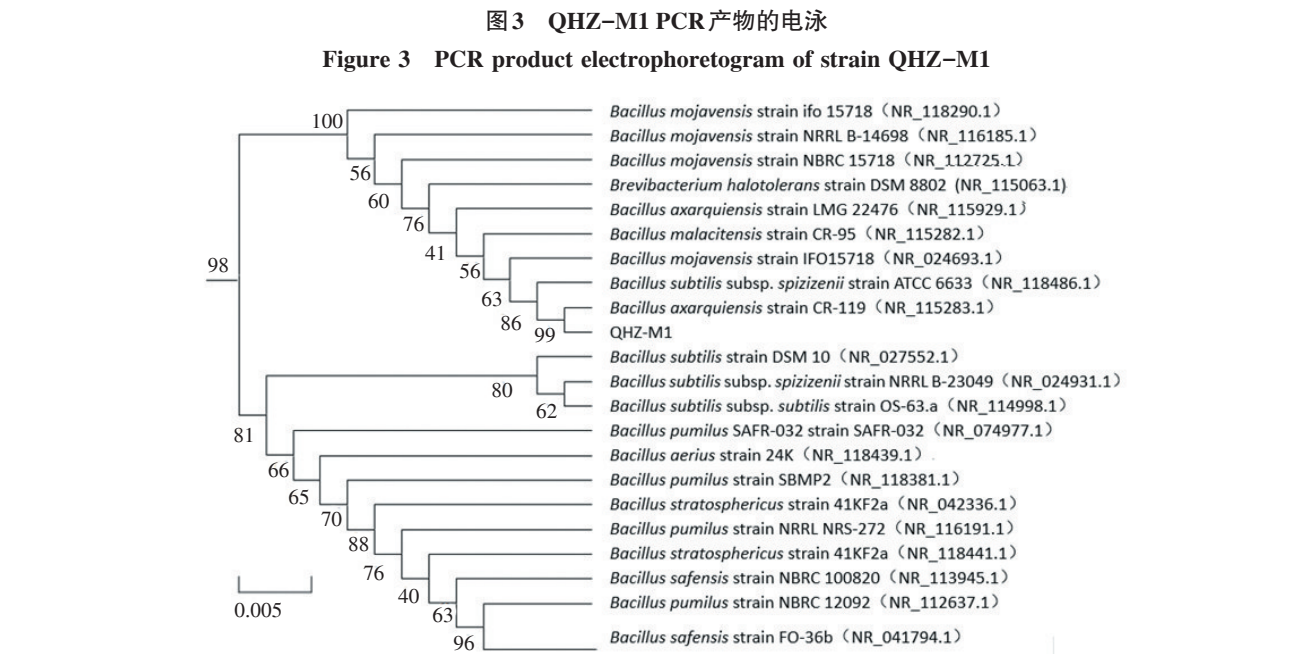


图4 QHZ-M1 的系统发育树
Figure 4 Phylogenetic tree of strain QHZ-M1

表3 QHZ-M1 生长条件
Table 3 Growth conditions of strain QHZ-M1

pH	OD ₆₀₀	温度(℃) Temperature	OD ₆₀₀	NaCl (g/L)	OD ₆₀₀	N 源 Nitrogen source	OD ₆₀₀	C 源 Carbon source	OD ₆₀₀
4	0.003 d	20	1.380 c	0	1.830 a	硫酸铵	1.585 b	葡萄糖	1.292 b
5	1.494 c	30	1.819 b	5	1.864 a	硝酸钾	1.119 c	蔗糖	1.521 a
6	1.540 bc	37	1.961 a	10	1.870 a	硝酸铵	1.189 c	麦芽糖	1.261 b
7	1.634 ab	45	1.301 d	25	1.860 a	蛋白胨	1.967 a	甘油	1.027 c
8	1.708 a	50	1.113 e	50	1.676 b	酵母浸粉	2.051 a	甘露醇	1.306 b
9	1.457 c			100	0.038 c	牛肉膏	1.987 a	淀粉	0.708 d
10	0.015 d			150	0.028 c			半乳糖	0.713 d

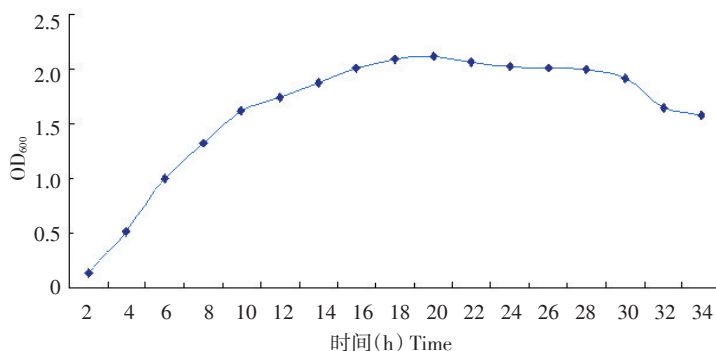


图5 QHZ-M1生长曲线

Figure 5 Growth curve of strain QHZ-M1

是蛋白胨、酵母浸粉和牛肉膏的菌株生长量显著高于其他氮源处理；碳源是蔗糖的菌株的生长量显著高于其他碳源处理。因此，菌株生长的最适pH 8；最适温度是37℃；最适盐度是0~25 g/L；最适碳源和氮源分别为蔗糖和酵母浸粉。

3 讨论

利用微生物代谢产物和有益微生物是防治作物病害的有效防治技术和方法^[14]。耕作层及植物根际土壤中具有丰富的微生物类群，土壤中不缺乏有益拮抗微生物资源。目前，植物病害的生物防治主要集中在芽孢杆菌类群，枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、多粘芽孢杆菌(*B. polymyxa*)等几个种^[15]。Zhang等^[16]报道，枯草芽孢杆菌*B. subtilis* N11可以有效防治香蕉枯萎病的发生，Cao等^[17]研究表明，枯草芽孢杆菌*B. subtilis* SQR 9可在作物根际定植，可很好的抑制香蕉枯萎病的发生，发病几率降低了49%~61%。孙淑琴等^[18]筛选出一株菌株Bs-18，后经鉴定为解淀粉芽孢杆菌，该菌株对于黄瓜白粉病有良好的防治效果，盆栽防治效率可达到82.22%。

本试验筛选出了1株对于马铃薯黑痣病有拮抗效果相对最好的菌株QHZ-M1，鉴定为芽孢杆菌(*B. axarquiensis*)，目前关于芽孢杆菌(*Bacillus axarquiensis*)的报道较少。2012年谢永丽等^[19]分离得到的菌株中有1株是芽孢杆菌，该菌对于油菜菌核病原真菌具有显著的拮抗效果。杨成德等^[20]筛选

得到1株芽孢杆菌菌株，对马铃薯枯萎病的抑菌率达52.21%；曾红和杨生强^[21]筛选出的芽孢杆菌菌株，对棉花黄萎病原菌具有较强抑菌活性，抑菌率可达到78.62%。因此，芽孢杆菌(*B. axarquiensis*)可作为优秀的生物防治菌。

本试验从马铃薯根际土壤中筛选得到1株QHZ-M1，对于马铃薯黑痣病原菌立枯丝核菌有良好的拮抗效果，抑菌率达到59.8%。通过生理生化和16S rDNA分子生物学鉴定，菌株QHZ-M1为芽孢杆菌(*B. axarquiensis*)。通过对其生长条件的研究，菌株QHZ-M1的生长速度较快，在接种20 h以后就进入稳定期，生长的最适温度是37℃，最适pH 8，最适盐度是0~25 g/L，最适碳源和氮源分别是蔗糖和酵母浸粉。菌株生长的最适条件跟土壤环境条件相近。菌株QHZ-M1适应的温度、pH和耐盐度范围较广；可利用的碳源和氮源比较广泛。因此菌株QHZ-M1具有马铃薯黑痣病生物防治的潜力。

[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(1): 1-4.
- [2] Food and Agriculture Organization. FAOstat[EB/OL]. (2015-11-01) [2015-11-10]. <http://faostat.fao.org>.
- [3] 曹春梅, 李文刚, 张建平, 等. 马铃薯黑痣病的研究现状[J]. 中国马铃薯, 2009, 23(3): 171-173.
- [4] 李莉, 曹静, 杨靖芸, 等. 马铃薯黑痣病发生规律与综合防治措

- 施 [J]. 西北园艺: 蔬菜专刊, 2013(5): 51-52.
- [5] 何云龙, 谢桂先, 孙改革, 等. 土传病害防治的研究进展 [J]. 湖南农业科学, 2012(6): 27-29.
- [6] 李永红. 土传病害的综合防治方法 [J]. 蔬菜, 2002(12): 28.
- [7] 梁建根, 施跃峰, 竺利红, 等. 植物病害生物防治的研究现状 [J]. 现代农业科技, 2008(18): 53-57.
- [8] 陈淑琴, 王生荣. 放线菌 DX23 对马铃薯炭疽病菌的拮抗作用及其鉴定 [J]. 甘肃农业大学学报, 2015, 50(2): 95-99.
- [9] 李卫利, 何鹏飞, 吴毅歆, 等. 黄瓜白粉病的生防细菌筛选及鉴定 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(16): 160-165.
- [10] 王玲, 刘二明, 周鑫钰, 等. 一株辣椒青枯病菌拮抗内生细菌的筛选鉴定与发酵条件优化 [J]. 南方农业学报, 2014, 45(10): 1781-1787.
- [11] 关小敏, 孟品品, 刘星, 等. 马铃薯黑痣病生防菌的筛选和鉴定及其生长条件的研究 [J]. 干旱地区农业研究, 2015, 33(3): 90-95.
- [12] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [13] 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.
- [14] 邱德文. 我国植物病害生物防治的现状与发展策略 [J]. 植物保护, 2010, 36(4): 15-18, 35.
- [15] 李潞滨, 李术娜, 李佳, 等. 大花惠兰根腐病拮抗细菌 ZL7-5 菌株的筛选与鉴定 [J]. 园艺学报, 2008, 35(11): 1647-1652.
- [16] Zhang N, Wu K, He X, *et al.* A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11 [J]. Plant and Soil, 2011, 344(1-2): 87-97.
- [17] Cao Y, Zhang Z, Ling N, *et al.* *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots [J]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47(5): 495-506.
- [18] 孙淑琴, 杨秀荣, 田涛, 等. 黄瓜白粉病拮抗细菌 Bs-18 的筛选与鉴定 [J]. 山东农业科学, 2015, 47(2): 58-60.
- [19] 谢永丽, 马莉贞, 徐志伟, 等. 青海柴达木极端干旱沙地分离芽孢杆菌的分子鉴定及拮抗活性分析 [J]. 微生物学通报, 2012, 39(8): 1079-1086.
- [20] 杨成德, 王颖, 王玉琴, 等. 东祁连山高寒草地几株醉马草内生细菌的生物功能评价及鉴定 [J]. 草业学报, 2014, 23(5): 249-255.
- [21] 曾红, 杨生强. 棉花黄萎病菌拮抗细菌 TUBP1 的分离鉴定及其防病作用 [J]. 棉花学报, 2014, 26(5): 445-451.

新书书讯

由中国农业出版社出版, 金光辉、王腾、吕文河撰写的《黑龙江省马铃薯晚疫病菌群体结构及抗病种质资源研究》一书于2016年11月正式出版发行, 该书针对黑龙江省马铃薯晚疫病发生发病规律, 明确菌群群体遗传结构, 以抗源鉴定研究为重点, 利用有效的抗源筛选方法鉴定出重要的马铃薯晚疫病抗源。该书是我国马铃薯晚疫病研究方面比较全面深入的专著, 值得马铃薯研究者和生产者拥有和珍藏。每本定价: 45元(包括邮费)。

有需购者请联系微信号: tudou772480099, 其微信名: 马铃薯书籍。