



疮痂链霉菌拮抗菌定向筛选及其功能评价

赵永龙¹, 赵盼^{2,3,4}, 曹晶晶^{2,3}, 汪志琴^{2,3}, 刘璐^{2,3}, 仲乃琴^{2,3,4*}

1 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

3 中国科学院农业微生物先进技术工程实验室, 北京 100101

4 内蒙古自治区马铃薯肥料农药高效利用技术企业重点实验室, 内蒙古 呼伦贝尔 021000

赵永龙, 赵盼, 曹晶晶, 汪志琴, 刘璐, 仲乃琴. 疮痂链霉菌拮抗菌定向筛选及其功能评价. 微生物学报, 2022, 62(7): 2624–2641.

Zhao Yonglong, Zhao Pan, Cao Jingjing, Wang Zhiqin, Liu Lu, Zhong Naiqin. Targeted screening and functional evaluation of the bacterial antagonists to *Streptomyces scabies*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2624–2641.

摘要:近年来由多种致病链霉菌引起的马铃薯疮痂病在我国普遍流行,且危害程度逐年加重,严重影响块茎的品质和商品价值。病原菌土传和种传,难以防控。利用拮抗微生物抑制病菌生长是目前防控疮痂病的重要措施。【目的】从病薯田土样中定向筛选对马铃薯疮痂病具有显著防效的菌种,研究其拮抗机制,评价其环境适应性,为开发可产业化应用的高效复合功能菌剂提供理论依据。【方法】通过平板对峙及盆栽试验研究目标菌株对主要病原菌疮痂链霉菌 *Streptomyces scabies* 的抑制效果;采用形态学、生理生化实验及分子生物学方法,确定其分类地位;结合高效液相色谱质谱联用方法分析相关抑菌活性物质。【结果】获得3株对致病链霉菌 *S. scabies* 具有显著拮抗功能的菌株 HZ11-4、HS-12、HZ13-1,抑菌圈直径分别为 34、29、30 mm,对马铃薯微型薯疮痂病的防效分别为 68.57%、57.15%和 65.96%。菌体革兰氏染色呈阳性,经鉴定均为解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amylolique-faciens*;3株菌皆可扩增出 surfactin、iturin 和 fengycin 等脂肽类物质合成酶相关基因片段,检测到上述脂肽类抗生索的存在,其中,仅 surfactin 对 *S. scabies* 有一定抑制

基金项目:山东省重大科技创新工程(2018CXCC0303);广东省重点领域研发计划(2020B0202010005);中国科学院科技扶贫项目(KFJ-FP-201905, KFJ-FP-202001);中国科学院战略性先导科技专项(XDA13020601);中国科学院科技服务网络计划(KFJ-STC-QYZD-199)

Supported by the Key Innovation of Science and Technology of Shandong Province in China (2018CXCC0303), by the Guangdong Province Key Field Research and Development Program Project (2020B0202010005), by the Science and Technology Poverty Alleviation Project of Chinese Academy of Sciences (KFJ-FP-201905, KFJ-FP-202001), by Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA13020601) and by the Science and Technology Service Network Initiative of Chinese Academy of Sciences (KFJ-STC-QYZD-199)

*Corresponding author. E-mail: nqzhong@im.ac.cn

Received: 26 October 2021; Revised: 1 December 2021; Published online: 29 March 2022

效果, 但非主要活性物质。3 株菌对茄链格孢菌、尖孢镰刀菌、立枯丝核菌、大丽轮枝菌等多种植物病原菌均具有明显的抑制效果; 可耐受 pH 5–9、NaCl 含量 1%–7% 的盐碱环境和 100 °C 高温; 对氟菌·霜霉威、氟硅唑、吡唑醚菌酯、春雷霉素、中生菌素和甲基硫菌灵等生产上常用的杀菌剂不敏感; 具有显著促生长特性。【结论】HZ11-4、HS-12 和 HZ13-1 具有良好的环境适应性和广谱抗病性, 均可作为防控马铃薯土传病害功能菌剂的候选菌株。文章首次验证了脂肽类抗生素 surfactin、iturin A 和 fengycin 均非抑制 *S. scabies* 的主要活性物质。

关键词: 疮痂链霉菌; 马铃薯疮痂病; 解淀粉芽孢杆菌; 脂肽类抗生素

Targeted screening and functional evaluation of the bacterial antagonists to *Streptomyces scabies*

ZHAO Yonglong¹, ZHAO Pan^{2,3,4}, CAO Jingjing^{2,3}, WANG Zhiqin^{2,3}, LIU Lu^{2,3}, ZHONG Naiqin^{2,3,4*}

1 School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Engineering Laboratory for Advanced Technology of Agricultural Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

4 The Enterprise Key Laboratory of Advanced Technology for Potato Fertilizer and Pesticide, Hulunbuir 021000, Inner Mongolia, China

Abstract: Potato common scab (CS) caused by pathogenic *Streptomyces* has occurred widely in China and led to increasing damage to the quality and commercial value of potato. Since the pathogen is soil-borne and seed-borne, antagonistic microorganisms are regarded as an important method for the prevention and control of this disease. **[Objective]** We aim to screen out the antagonistic bacterial strains from the soil in the field with serious CS, reveal the mechanism of antagonism against *Streptomyces scabies*, and evaluate the environmental adaptability of the targeted strains. This study can provide a theoretical basis for developing applicable microbial agents. **[Methods]** The strains with antagonistic effects were screened out via the plate confrontation method and pot experiment and then identified based on morphological, physiological, biochemical, and molecular characteristics. Their metabolites with antifungal functions were detected via high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **[Results]** Three Gram-positive strains with antagonistic effects were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* and designated HZ11-4, HS-12, and HZ13-1, which showed the inhibition zone diameters of 34, 29 and 30 mm to *S. scabies* and the control effects of 68.57%, 57.15%, and 65.96%, respectively. The genes coding for synthetases of surfactin, iturin, and fengycin were amplified from these strains, and existence of the lipopeptide antibiotics was detected by high performance liquid chromatography. *S. scabies* could be inhibited only by surfactin which was not the main active compound of the strains. The three strains exerted inhibitory effects on a variety of pathogens such as *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, and *Verticillium dahliae*. They could live in a wide pH range of 5–9, tolerate 1%–7% NaCl and high temperature of 100 °C, promote potato growth, and were insensitive to fluopicolide + propamocarb, flusilazole,

pyraclostrobin, kasugamycin, zhongshengmycin and thiophanate-methyl. **[Conclusion]** Owing to the good environmental adaptability and broad-spectrum resistance, *B. amyloliquefaciens* HZ11-4, HS-12, and HZ13-1 can be used to develop compound microbial agents against potato soil-borne diseases. This study verifies for the first time that surfactin, iturin A, and fengycin are not the main active substances to inhibit *S. scabies*.

Keywords: *Streptomyces scabies*; potato common scab; *Bacillus amyloliquefaciens*; lipopeptide antibiotics

马铃薯是仅次于小麦、玉米、水稻的第四大农作物，对维持我国粮食安全和人口增长发挥了重要贡献。联合国粮农组织(food and agriculture organization of the United Nations, FAO)公布数据显示，2019年中国马铃薯种植面积为491.47万 hm^2 ，产量约9188.14万t。近年来，由多种致病链霉菌引起的马铃薯疮痂病在全国各产区普遍流行，商品薯发病率为3%–60%，微型薯发病率为10%–60%，部分田块发病率高达90%^[1–2]，且危害呈逐年加重趋势，已发展成为制约我国马铃薯产业尤其是种薯产业可持续发展的瓶颈问题。已报道的致病链霉菌多达20多种，其中疮痂链霉菌 *Streptomyces scabies* (*S. scabies*)是分布最广、最具代表性的马铃薯疮痂病原菌^[3–4]，可通过分泌毒素 thaxtomin A 抑制纤维素合成，影响细胞壁形成，引起细胞程序性死亡^[5]。病原菌土传和种传，防控难度大，至今尚未发现对其有显著防效的化学药剂及值得大面积推广的其他措施。Li 等^[6]筛选的侧孢短杆菌 BL12 可以减少土壤中疮痂病原菌的数量，对疮痂病防效为34.29%；Cui 等^[7]分离鉴定的贝莱斯芽孢杆菌 8–4，在田间试验中对疮痂病防效可达51.83%；Zhang 等^[8]利用新型链霉菌 PBSH9，获得对疮痂病47.64%的防效，但其抑菌活性物质未见研究和报道。伊枯草菌素 A (iturin A)、泛革素 A (fengycin A)和表面活性素 A (surfactin A)是芽孢杆菌抑制多种植物病原菌的主要拮抗物质^[9–10]，三者是否对疮痂链霉

菌有效目前尚不清楚。另外，各产区土壤环境十分复杂，病原菌具有明显的组成多样性，且差异化分布^[11]，而绝大多数生防菌的环境适应性和生态稳定性十分有限，致使单一菌种很难在不同区域土壤定殖和发挥功能，限制了防控体系的模式化和产业化。

为了实现马铃薯生产中疮痂病的有效防控，本文定向筛选多株可显著抑制致病链霉菌生长的拮抗菌，在确定分类地位的同时，解析生防菌的活性物质及抗病机制，评价其环境适应性，为利用微生物及其代谢产物研制高效稳定的复合功能菌剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病原菌及供试土壤样品

疮痂链霉菌 *S. scabies* 菌株购自中国科学院微生物研究所菌种保藏管理中心，馆藏编号为CGMCC 4.1765 (下文简称为4.1765)；供试土壤样品采自广东省惠州市惠东县铁涌镇马铃薯田(pH为5.9，总磷1.54 g/kg，全氮1.70 g/kg，全钾19.82 g/kg，有机质33.73 g/kg)。

1.1.2 试剂来源

细菌基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司，2×T5 Super PCR Mix 购自北京擎科新业生物技术有限公司；细菌理化性质检测试剂条购自北京兰伯瑞生物科技有限公司。

1.1.3 LB 培养基

蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 用蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 调整至 7.0–7.2。

1.1.4 PDA 培养基

选取马铃薯块茎 200 g, 沸水煮 20 min, 纱布过滤除渣, 加入葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, 用蒸馏水定容 1 000 mL, 调 pH 至 7.0–7.2, 121 °C 高压灭菌。

1.1.5 Landy 培养基

葡萄糖 20 g, L-谷氨酸 5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, KH₂PO₄ 1 g, Fe₂(SO₄)₃·6H₂O 0.15 mg, MnSO₄·H₂O 5 mg, CuSO₄·5H₂O 0.16 mg, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值调至 7.0–7.6。

1.1.6 King 氏培养基

蛋白胨 20 g, K₂HPO₄ 1.725 g, 丙三醇 15 mL, MgSO₄·7H₂O 1.5 g, 色氨酸 0.1 g, 用蒸馏水定容至 1 000 mL, 调 pH 至 7.2。

1.1.7 比色液

将 20 mL 0.025 mmol/L 的 FeCl₃ 缓缓加入 30 mL 浓硫酸中, 用玻璃棒搅拌均匀。

1.1.8 B5 营养液

KNO₃ 50 g, MgSO₄·7H₂O 5 g, NaH₂PO₄·H₂O 3 g, CaCl₂·2H₂O 3 g, (NH₄)₂SO₄ 2.7 g, FeSO₄·7H₂O 5.56 g, EDTA·Na₂ 7.46 g, H₃O₃ 3 g, MnSO₄·4H₂O 10 g, ZnSO₄·7H₂O 2 g, NaMoO₄·2H₂O 0.25 g, CuSO₄·5H₂O 0.025 g, CoCl₂·6H₂O 0.025 g, KI 0.75 g, 蒸馏水 1 000 mL。

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌的分离

取 1 g 土壤样品置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 水充分振荡。吸取 100 μL 上述悬浮液均匀涂布于 LB 固体培养基上 28 °C 培养 24 h; 挑选细菌单菌落进行划线纯化, 并将所得菌株接种于液体 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养备用。

1.2.2 拮抗菌的筛选

吸取 100 μL 疮痂链霉菌孢子悬浮液均匀涂

布于 PDA 固体培养基上, 吸取上述细菌培养液 6 μL 滴至上述 PDA 固体培养基上, 28 °C 培养 7 d 后测量抑菌圈直径。

1.2.3 菌株形态观察

将待测菌液均匀涂布于 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 24 h 后观察菌落形态, 采用日立冷场发射扫描电子显微镜 SU8010 观察菌体表面形态, 并利用显微镜观察菌株革兰氏染色后的状态。

1.2.4 菌株生理生化特性分析

利用试剂条测试细菌的理化性质, 并将待测菌种接种至不同梯度 pH、不同 NaCl 浓度的液体 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h 后测定其 OD₆₀₀ 值^[12]。

将 1 mL 发酵液 8 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 用无菌水清洗菌体 3 次, 用 1 mL 无菌水悬浮, 分别置于 37、60、80、100 °C 水浴中处理 30 min, 吸取 6 μL 滴至涂有 *S. scabiei* 的 PDA 固体培养基上, 培养 36 h 测定抑菌圈直径, 采用平板计数法统计活菌数。

1.2.5 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列分析

采用细菌 16S rRNA 基因片段通用引物 (27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-C TACGGCTACCTTGTTACGA-3') 和 *gyrB* 基因引物 (5'-GCCTTGTCGACCACTCTTGA-3', 5'-AATGGCAGTCAGCCCTTCTC-3') 分别进行测序, 所得结果在 NCBI 上比对, 采用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

1.2.6 脂肽类抗生素合成酶相关基因分析

参照 Joshi 等^[13]报道的脂肽类抗生素合成酶相关基因片段的引物进行 PCR 扩增(引物序列见表 1), 反应条件为: 94 °C 2 min; 94 °C 10 s, 55 °C 20 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 退火 5 min, 反应体系 20 μL。采用琼脂糖凝胶电泳分离和观察目标片段。

表 1 PCR 扩增引物序列

Table 1 The primers for PCR amplification

Gene	Primer	Sequence (5'→3')	Product/bp	Reference
<i>srfA</i>	SrfAF	ACACAGATATCAGGCAAGC	867	Joshi et al. ^[13]
	SrfAR	GTCCCATCGTTCCTTCACA		
<i>ituA</i>	ItuAF	CCGCTATCAATGAATGTTTG	769	Joshi et al. ^[13]
	ItuAR	TTAAGAAATAAGCGATTCGG		
<i>fenA</i>	FenAF	GTCTTGATGGTGCAGTCAGA	693	Joshi et al. ^[13]
	FenAR	CTGGACCTGTTTGTCTTTGT		

1.2.7 脂肽类抗生素的分离和鉴定

将待测菌株接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h 作为种子液备用; 取 1% 种子液接入 200 mL Landy 培养基, 37 °C、200 r/min 培养 48 h。培养液于 8 000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀。上清液用等体积乙酸乙酯处理, 充分涡旋后静置数分钟, 分层后收集上层有机相, 旋转蒸发干燥后, 用 1 mL 甲醇溶解备用。

采用高效液相色谱(HPLC)分离纯化甲醇溶液中的活性物质, 色谱柱型号为 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (Agilent, 9.4×250 mm, 5 μm), 流动相 A 液为 650 μL 三氟乙酸、20 mL 乙腈和 980 mL 超纯水混合液, B 液为 500 μL 三氟乙酸、800 mL 乙腈和 200 mL 超纯水混合液。检测波长为 215 nm, 流速为 1 mL/min。梯度洗脱过程为 50 min 内流动相 A 由 100% 到 0%, 分段收集 HPLC 组分于 4 °C 保存备用。

Thermo Q Exactive HFX 质谱仪在软件 Xcalibur, Thermo 控制下进行一级、二级质谱数据采集, 运行条件为: 鞘气流量: 30 Arb, 辅气流量: 25 Arb, 毛细管温度: 350 °C, Full MS 分辨率: 60 000, MS/MS 分辨率: 7 500, 碰撞能量: 10/30/60 (NCE mode), 喷涂电压: 3.6 kV (positive)。

1.2.8 盆栽试验

参试马铃薯品种为夏波蒂。在直径为 17 cm

的花盆中装满蛭石, 浇施 2 L B5 营养液, 将培养 30 d 的夏波蒂组培苗移栽至花盆, 每盆 3 株, 置于相同环境培养, 10 d 后每株幼苗根部接种 10 mL 1×10⁷ CFU/mL 的 *S. scabies* 孢子悬浮液, 间隔 10 d 后接种拮抗菌悬浮液(30 mL/盆, 1×10⁸ CFU/mL), 以不接种任何菌株的处理为 CK1, 以仅接种 *S. scabies* 的处理组为 CK2。每个处理重复 3 次, 每周浇水 1 次, 每次浇 2 L。生长期分别测定叶绿素相对含量(SPAD-502 叶绿素测定仪, 以 SPAD 表示相对含量)、株高、茎径, 收获后分别测定块茎重量, 并依据马铃薯疮痂病分级标准统计发病率、病情指数, 计算防治效果。

病害分级标准: 0 级, 薯皮健康, 无病斑; 1 级, 块茎病斑面积为 0–1/6; 2 级, 病斑面积为 1/6–1/3; 3 级, 病斑面积为 1/3–1/2; 4 级, 病斑面积为 1/2 以上。

发病率(%)=发病块茎数/收获总块茎数×100%;

病情指数=Σ(各病级块茎数×该病级数代表值)/(调查个体总和×最高病级数)×100%;

相对防效(%)=(对照组病情指数–处理组病情指数)/对照组病情指数×100%。

1.2.9 菌株促生长特性分析

吸取 100 μL 菌液接种于 King 氏液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 48 h, 将培养液离心, 收集上清液, 并用 SalKowski 比色法定性

检测菌液中的生长素(indole acetic acid, IAA)。参照李振东等^[14]的方法测算 IAA 浓度。

1.2.10 数据处理

采用 Excel 和 Origin 2019b 软件处理,运用 MEGA 7.0 软件构建菌株系统发育树。

2 结果与分析

2.1 疮痂链霉菌拮抗菌的分离与筛选

从采自惠东县薯田的土样中分离出 3 株对疮痂链霉菌 *S. scabies* 具有明显拮抗作用的细菌, 编号分别为 HZ11-4, HS-12, HZ13-1, 培养 72 h 后发酵液抑菌圈直径分别为 34 mm (图 1A), 29 mm (图 1B), 30 mm (图 1C), 其中 HZ11-4 的抑菌圈透明度最高。

2.2 拮抗菌形态学观察

如图 2 所示, 菌株 HZ11-4, HS-12 和 HZ13-1 的菌落均为圆形, 白色, 表面干燥, 边缘整齐, 革兰氏染色均呈阳性, 细胞杆状, 两端钝圆。其中菌株 HZ13-1 鞭毛结构最为发达, HZ11-4 次之, HS-12 无鞭毛。

2.3 拮抗菌生理生化特性分析

菌株 HZ11-4、HS-12、HZ13-1 均可利用葡萄糖、甘露醇、山梨醇、蔗糖作为唯一碳源, 可利用柠檬酸盐, 代谢产物可降解苦杏仁苷, 但不能分解鼠李糖和蜜二糖; 可分泌明胶酶使

明胶液化。菌株 HZ11-4 和 HS-12 的丙酮酸盐试验结果呈阳性, 表明二者可以丙酮酸盐为底物合成乙酰甲基甲醇; HZ11-4 的鸟氨酸试验呈阳性, 表明其可合成鸟氨酸脱羧酶降解鸟氨酸; HZ13-1 的邻硝基苯-半乳糖苷和精氨酸分解试验呈阳性, 表明其可以产生 β -半乳糖苷酶和精氨酸双水解酶(表 2)。

2.4 基于 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列的分子生物学鉴定

将菌株 HZ11-4、HS-12 和 HZ13-1 的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 中进行比对, 发现三者均与枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌的同源性达到 99.9%以上; 进一步扩增菌株的 *gyrB* 基因片段, 并通过 MEGA 7.0 软件构建系统发育树, 发现其与 NR041455、CP014700 和 CPO17953 等解淀粉芽孢杆菌聚类到一个分支(图 3、图 4), 结合形态学观察结果和生理生化特性, 确定菌株 HZ11-4、HS-12 和 HZ13-1 均为解淀粉芽孢杆菌。

2.5 脂肽类抗生素合成酶相关基因片段扩增

已有研究显示, *surfA* 和 *ituA* 基因所编码的蛋白在合成表面活性素和依枯草素的过程中发挥重要功能, *fenA* 可以活化泛革素合成酶基因中的第 7-9 位氨基酸, 占据氨基酸序列的 1/3, 三者常被用于上述抗生素的检测^[7]。为

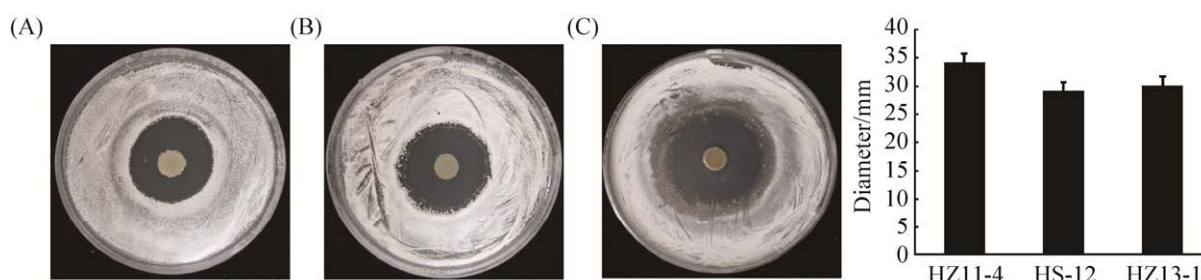


图 1 目标菌株对疮痂链霉菌的抑制效果

Figure 1 The inhibitory effect of the target strains on *Streptomyces scabies*. A: inhibition zone of HZ11-4; B: inhibition zone of HS-12; C: inhibition zone of HZ13-1.

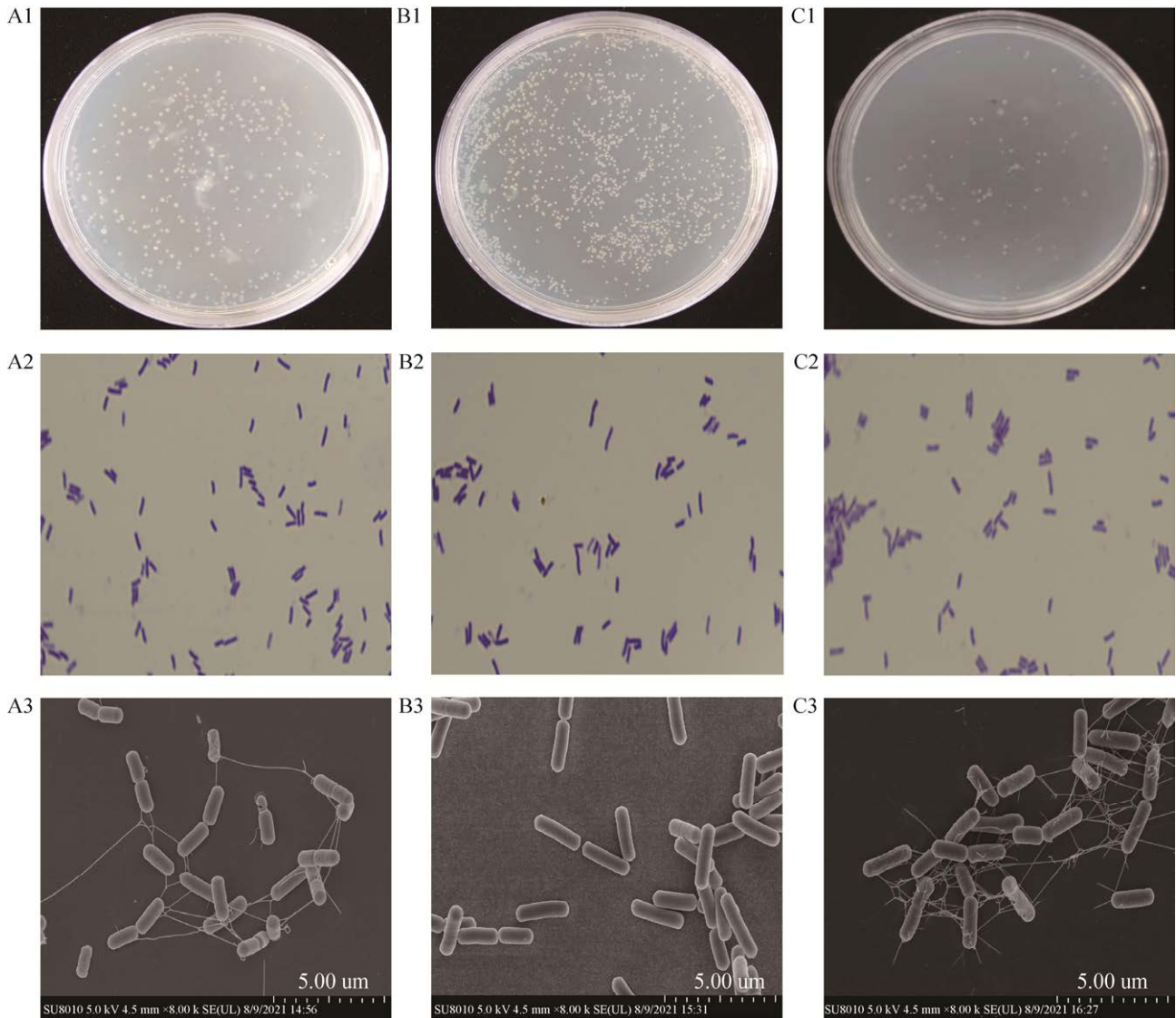


图 2 菌株形态特征

Figure 2 Morphological characteristics of HZ11-4, HS-12 and HZ13-1. A1: HZ11-4 colonies; A2: HZ11-4 Gram staining; A3: HZ11-4 scanning electron microscopy (SEM); B1: HS-12 colonies; B2: HS-12 Gram staining; B3: HS-12 SEM; C1: HZ13-1 colonies; C2: HZ13-1 Gram staining; C3: HZ13-1 SEM.

表 2 菌株 HZ11-4、HS-12 和 HZ13-1 的生理生化特性

Table 2 Physiological and biochemical properties of HZ11-4, HS-12 and HZ13-1

Test items	Results			Test items	Results		
	HZ11-4	HS-12	HZ13-1		HZ11-4	HS-12	HZ13-1
2-Nitrophenyl galactopyranoside	-	-	+	Rhamnose	-	-	-
Arginine	-	-	+	Sucrose	+	+	+
Lysine	-	-	-	Melibiose	-	-	-
Ornithine	+	-	-	Amygdalin	+	+	+
Sodium citrate	+	+	+	Glucose	+	+	+
Pyruvate	+	+	-	Mannitol	+	+	+
Kohn gelatin	+	+	+	Sorbitol	+	+	+

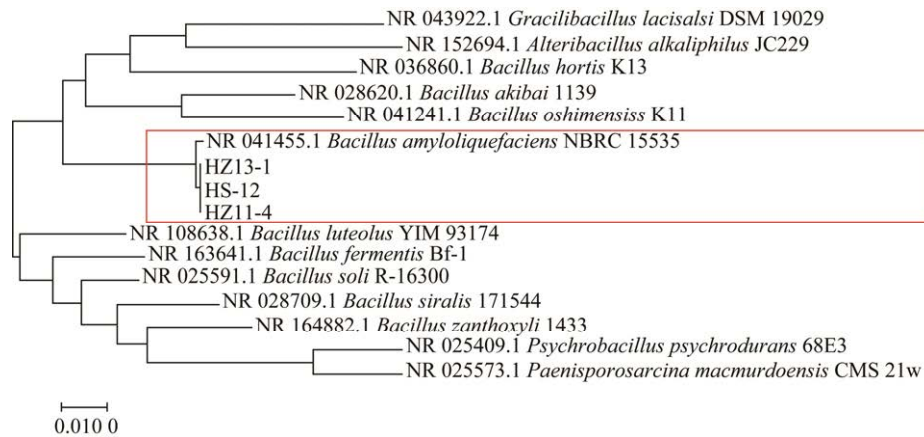


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree constructed based on the 16S rRNA gene sequences.

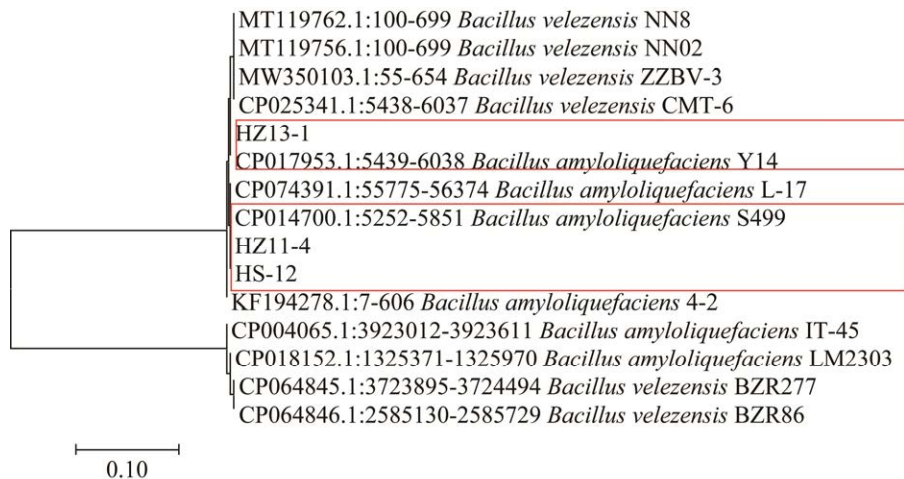


图 4 基于 *gyrB* 基因序列构建的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree constructed based on the *gyrB* gene sequences.

了进一步研究 3 株解淀粉芽孢杆菌的拮抗机理, 明确抗菌物质成分, 我们分别以菌株 HZ11-4, HS-12 和 HZ13-1 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 凝胶电泳结果如图 5 所示, 目标片段大小符合预期。将 PCR 产物测序结果在 NCBI 网站比对发现, 引物 SrfAF 与 SrfAR 扩增得到的序列均与菌株 ATCC 55079 和 PG12 (KC454625.1, KT896547.1) 表面活性素合成酶基因 *srfA* 序列的相似性达到 99% 以上; 引物

ItuAF 和 ItuAR 扩增得到的目的片段均与菌株 JK6 和 IBFCBF (KR149330.1, MG800639.1) 中的伊枯草素合成酶 *ituA* 基因序列的相似性达到 99% 以上; 引物 FenAF 和 FenAR 扩增的目标片段均与菌株 SYBCH47 (KY051731.1) 中的泛草素合成酶 *fenA* 基因序列相似性达到 99% 以上。可见, 3 株菌均可扩增出脂肽类抗生素表面活性素、泛草素和伊枯草素的合成酶相关基因。

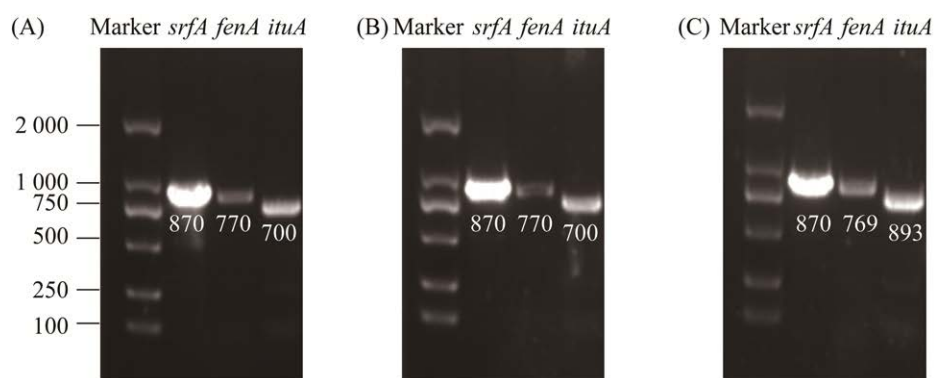


图 5 菌株 HZ11-4 (A)、HS-12 (B)、HZ13-1 (C) 特异性 PCR 扩增结果

Figure 5 Specific PCR amplification results of HZ11-4 (A), HS-12 (B) and HZ13-1 (C).

2.6 脂肽类抗生素的分离、纯化和鉴定

3 株参试细菌中, HZ11-4 和 HZ13-1 的发酵上清液对 *S. scabies* 有一定抑制效果(图 6A), 其中 HZ11-4 效果最明显。我们利用乙酸乙酯萃取法获得 HZ11-4 的脂肽类抗生素粗提物,

通过高效液相色谱进行组分分离, 将分段回收的所有馏分(图 7)分别滴于涂有 *S. scabies* 孢子悬浮液的 PDA 平板上, 48 h 后观察发现仅组分 1 对疮痂链霉菌有明显的拮抗效果, 如图 6B 所示。

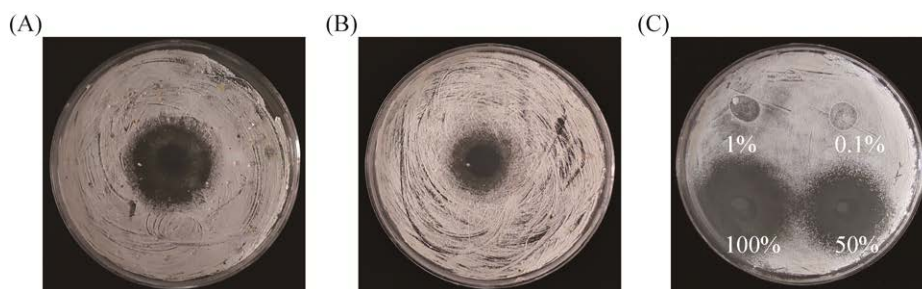


图 6 HZ11-4 及表面活性素对 *S. scabies* 的拮抗效果

Figure 6 The antagonistic effect of HZ11-4 and surfactin on *S. scabies*. A: HZ11-4 fermentation supernatant; B: HPLC fractionation components; C: different concentrations of surfactant.

如图 8 所示, 利用超高效液相色谱质谱, 检测到组分一中包含表面活性素 A, 分子量为 994.64 Da。我们购买了表面活性素 A 的标准品进行 HPLC 验证, 保留时间为 26 min, 与图 6 中组分 1 保留时间接近。平板对峙试验结果表明, 表面活性素 A 对疮痂链霉菌 *S. scabies* 具有一定的拮抗活性(图 6C)。

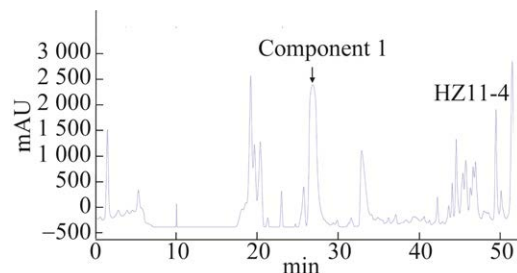


图 7 HPLC 结果

Figure 7 The profile of HPLC.

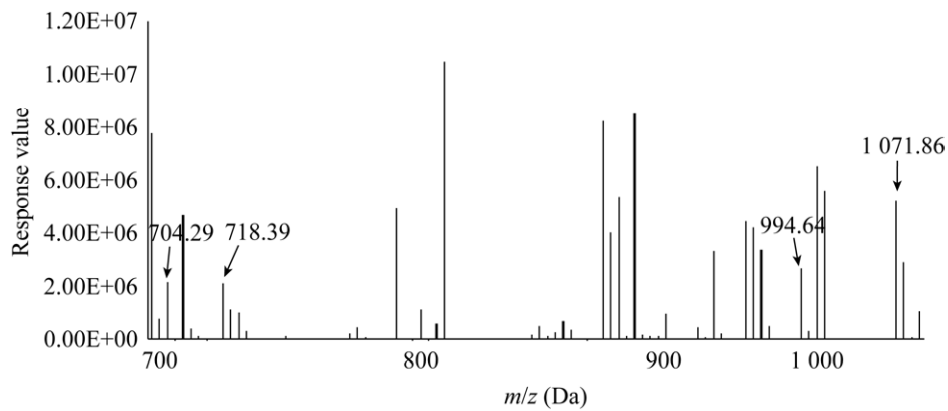


图 8 拮抗菌脂肽类物质的质谱分析图谱

Figure 8 Mass spectrum analysis profile of antagonist products.

2.7 盆栽防病试验结果

盆栽试验结果表明, CK1 处理组 3 盆共收获 10 粒微型薯, 均未发现疮痂病; CK2 处理组 3 盆共收获 11 粒微型薯, 发病率为 90.91%, 病级达 4 级的 7 粒, 占总薯数的 63.64%, 0 级的仅 1 粒, 病情指数为 79.55; *S. scabies* 和 HZ11-4 共同处理组 3 盆共收获 15 粒, 发病率为 53.33%, 其中无病斑微型薯 7 粒, 占 46.67%; 病薯中 1 级的居多, 占总薯数的 26.67%, 病情指数为

25.00, 较对照显著降低, 防效为 68.57%。*S. scabies* 和 HS-12 处理组 3 盆共收获 11 粒, 发病率为 63.64%, 其中无病斑薯 4 粒, 占 36.36%; 病薯中 1 级薯占 27.27%, 病情指数为 34.09, 防效为 57.15%。*S. scabies* 和 HZ13-1 处理组 3 盆共收获 12 粒, 发病率为 58.33%, 其中无病斑薯 5 粒, 占 45.45%, 1 级病薯最多, 占总薯数 33.33%, 病情指数为 27.08, 相对防效为 65.96% (表 3, 图 9)。

表 3 马铃薯疮痂病情统计

Table 3 Statistics of potato scab

Treatment	Number of grains	Sickness					Occurrence rate/%	Disease index	Relative control effects/%
		0	1	2	3	4			
CK1	10	10	0	0	0	0	0	0	-
CK2	11	1	0	2	1	7	90.91	79.55	-
HZ11-4	15	7	4	2	1	1	53.33	25.00	68.57
HS-12	11	4	3	1	2	1	63.64	34.09	57.15
HZ13-1	12	5	4	1	1	1	58.33	27.08	65.96



图 9 盆栽结果

Figure 9 Results of pot culture experiment.

2.8 菌株生长状况测定

为了进一步了解拮抗菌株的生长繁育特性,我们将3株拮抗菌分别接入LB液体培养基中,对其生长量与pH进行实时测定。结果表明,3株菌的生长情况基本一致,培养8h结束对数生长期, OD_{600} 值分别为0.975、0.940和0.878(图10左),此时发酵液pH值分别为6.76、6.75和6.74(图10右)。培养20h后生物量最大, OD_{600} 值分别为1.352、1.286和1.253,此时发酵液的pH值分别为7.62、7.44和7.44。

2.9 菌株耐高温及耐盐碱特性分析

菌体分别在37、60、80、100℃水浴中处理30min,平板计数法统计各处理活菌数。结果表明,HZ11-4在不同温度处理后的活菌数分别为 1×10^8 、 7×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 CFU/mL,HS-12的活菌数分别为 8×10^7 、 1×10^7 、 7×10^6 、 1×10^5 CFU/mL,HZ13-1的活菌数分别为 1.6×10^7 、 5×10^6 、 1.4×10^6 、 1×10^4 CFU/mL。100℃处理后3株菌体依然有一定的抑菌活性,抑菌圈直径分别为19.33、13.33、20.00 mm。三者相比较,HZ13-1具有较好的热稳定性(图11)。

为了探究参试菌株对盐碱环境的适应性,

我们分别将其接种于pH 1–13、NaCl含量为1%–11%的LB液体培养基中,培养24h后观察发现,菌株HZ11-4可耐受NaCl浓度为11%的高盐环境,在pH 5–13的条件下均可生长。其中,在pH为7–11和NaCl含量为1%–7%的培养基上能良好生长, OD_{600} 值达2.50左右;在NaCl含量为9%的条件下, OD_{600} 值可达1.881。菌株HS-12可耐受pH 13和NaCl含量为11%的极端盐碱环境,pH 5–9、NaCl含量为1%–7%的环境对其生长无影响, OD_{600} 值达2.5左右;在NaCl含量为9%的条件下,可获得一半左右的生物量。菌株HZ13-1对弱酸性与中性环境表现出良好的适应性,在pH为5–7和NaCl浓度为1%–5%的环境下生长良好, OD_{600} 值达2.75左右;在pH 9、NaCl含量7%的条件下可缓慢生长。推测菌株HZ11-4在北方中性偏盐碱土壤环境中的定殖力较强,HS-12和HZ13-1可能更适应南方偏酸性土壤环境。

2.10 菌株对常用杀菌剂的敏感性测试

化学药剂通过土地残留或当季喷施对生防菌的活性和功能产生影响。为明确目标菌株对农业生产中常用化学杀菌剂及生物农药的敏感

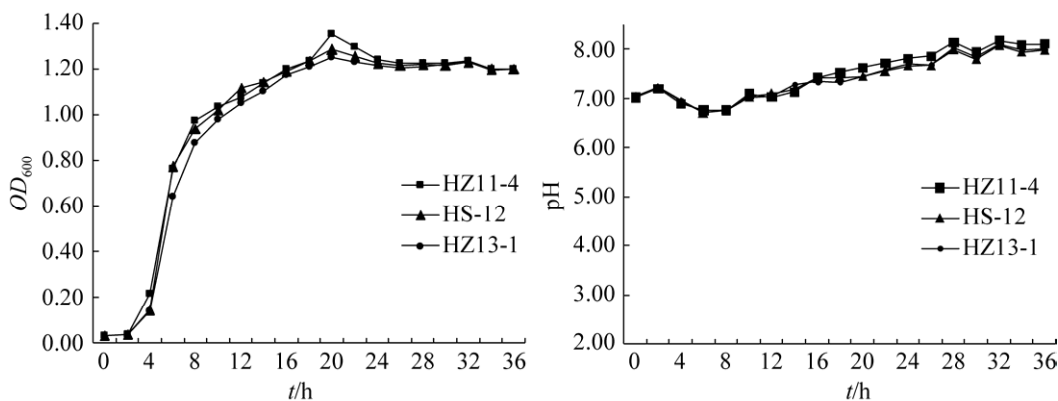


图10 菌株HZ11-4、HS-12、HZ13-1的生长曲线

Figure 10 The growth curve of HZ11-4, HS-12 and HZ13-1. The growth curves are shown on the left and the pH monitoring values on the right.

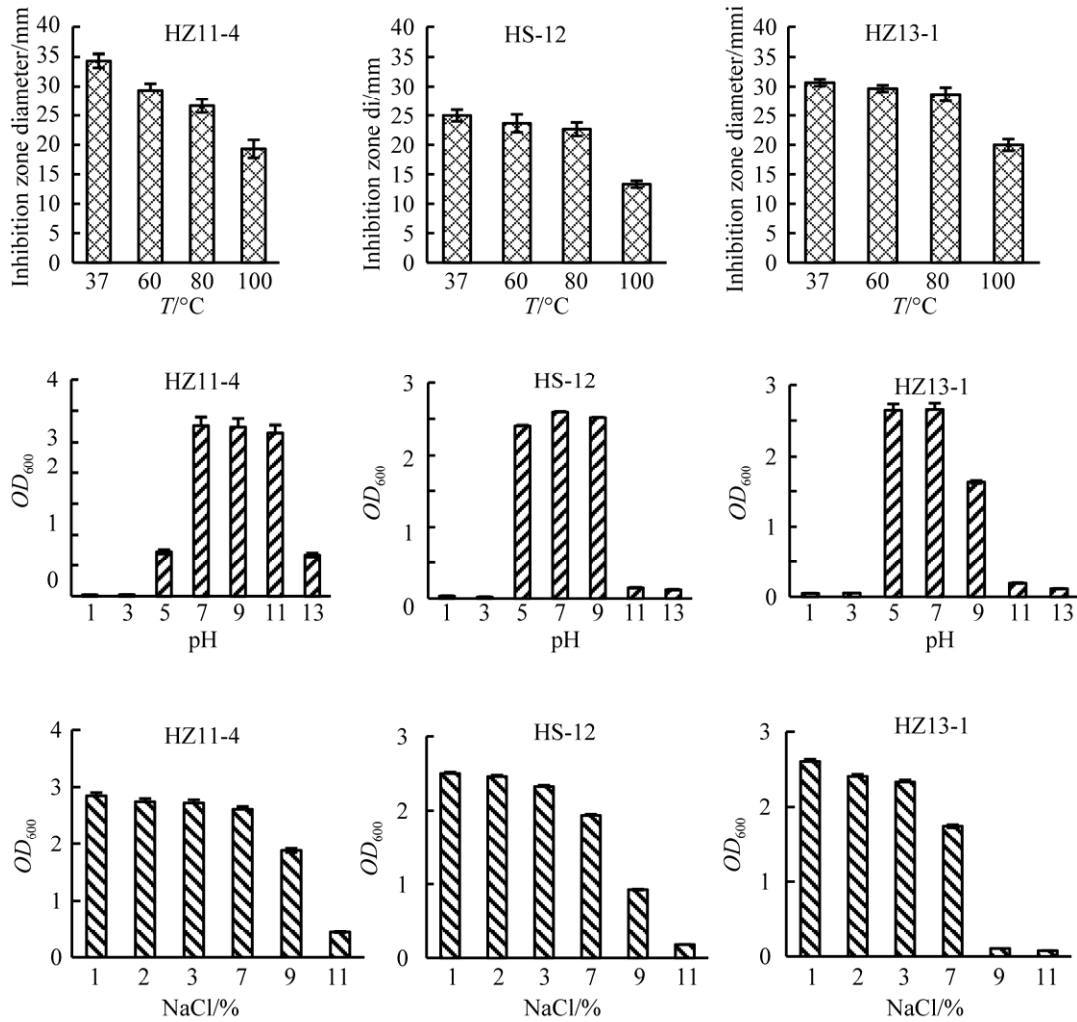


图 11 拮抗菌耐高温及耐盐碱范围

Figure 11 Resistance ranges of the antagonistic strains to high temperature and salt-alkali.

性, 参考李曦等^[15]和杨惠敏等^[16]的研究方法。本文选择了表 4 所示的 9 种药剂, 采用产品说明书推荐的溶液浓度进行测试, 并以无菌水、大肠杆菌 BL21、农杆菌 GV3101 和茄链格孢为对照。将直径 8 mm 的滤纸片在无菌水与杀菌剂溶液中浸泡, 分别置于涂有大肠杆菌 BL21、农杆菌 GV3101、茄链格孢、HZ11-4、HS-12 和 HZ13-1 的培养基上, 37 °C 培养 12 h 后观察发现(表 4), 无菌水不会影响菌株生长, 表明滤纸片无污染。氟硅唑、春雷霉素、中生菌素与代森锰锌可抑制 BL21 的生长, 苯醚甲环唑和

啉菌酯可抑制 GV3101 的生长, 氟菌·霜霉威、吡唑醚菌酯和甲基硫菌灵可抑制茄链格孢的生长, 表明以上 9 种药剂药效正常。3 株拮抗菌的生长均不受氟菌·霜霉威、氟硅唑、吡唑醚菌酯、春雷霉素、中生菌素、甲基硫菌灵的影响, 推测 3 株拮抗菌可与上述杀菌剂混合使用。但需要回避苯醚甲环唑、啉菌酯和代森锰锌。

2.11 菌株广谱抗病性分析

为了更进一步挖掘拮抗菌株的生防功能, 我们通过平板对峙试验测试了其多种重要植物病原菌的拮抗效果。结果如图 12 所示, 3 株

表 4 杀菌剂对菌株 HZ11-4、HS-12 和 HZ13-1 的影响

Table 4 Effect of fungicides on HZ11-4, HS-12 and HZ13-1

Fungicide	Producer	Concentration	Resistance					
			<i>Escherichia coli</i> BL21	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	<i>Moniliales</i> fungus	HZ11-4	HS-12	HZ13-1
H ₂ O			+	+	+	+	+	+
Difenoconazole	Hebei Zhongbao Green Crop Technology Co., Ltd.	0.10%	+	-	-	-	-	-
Fluorobacteria propamo carb	Bayer Crop Science (China) Co., Ltd.	0.10%	+	+	-	+	+	+
Flusilazole	Jiangsu Jiannong Plant Protection Co., Ltd.	0.01%	-	+	-	+	+	+
Pyrazole ether fungus ester	Jinan Zhongke Green Biological Engineering Co., Ltd.	0.05%	+	+	-	+	+	+
Kasugamycin	Shaanxi McColo Biological Co., Ltd.	0.10%	-	+	+	+	+	+
Zhongshengmycin	Fujian Kaili Biological Products Co., Ltd.	0.10%	-	-	+	+	+	+
Azoxystrobin	Xianzhengda Nantong Crop Protection Co., Ltd.	0.10%	+	-	-	-	-	-
Mancozeb	Sichuan Runer Technology Co., Ltd.	0.10%	-	-	-	-	-	-
Thiophanate-methyl	Jinan Taihe Chemical Co., Ltd.	0.10%	+	+	-	+	+	+

+: fungicides do not affect antagonist growth; -: fungicides inhibit antagonist growth.

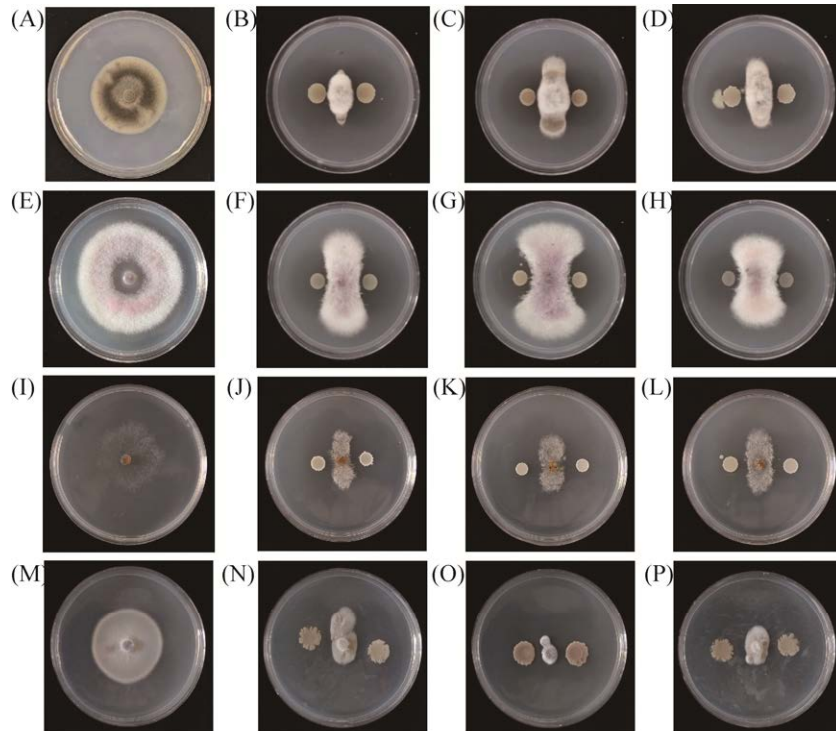


图 12 菌株 HZ11-4、HS-12、HZ13-1 的广谱抗性

Figure 12 Broad-spectrum resistance of HZ11-4, HS-12 and HZ13-1. A, B, C, D: HZ11-4, HS-12 and HZ13-1 antagonize *Alternaria solani*; E, F, G, H: HZ11-4, HS-12 and HZ13-1 antagonize *Fusarium oxysporum*; I, J, K, L: HZ11-4, HS-12 and HZ13-1 antagonize *Rhizoctonia solani*; M, N, O, P: HZ11-4, HS-12 and HZ13-1 antagonize *Verticillium dahlia*.

拮抗菌对茄链格孢菌(*Alternaria solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)均具有一定的拮抗效果, 其中, 菌株 HZ11-4 对以上 4 株病原菌的抑菌率分别达 76.41%、60.87%、64.26%、65.11%, HS-12 的抑菌率分别为 64.41%、36.08%、58.33%、80.01%, HZ13-1 的抑菌率分别为 70.51%、60.87%、52.56%、78.64%。表明这 3 株解淀粉芽孢杆菌具有广谱抗病效果, 产业化应用前景良好。

2.12 菌株促生长效果测定

将 3 株菌在 King 氏培养基培养 24 h, 将上清液与比色液混合, 观察到菌株 HZ11-4, HS-12, HZ13-1 的混合液均显粉红色, 表明 3 株菌皆可产 IAA, 对照标准曲线计算, 菌株 IAA 的产量分别为 4.64、3.83 和 4.45 mg/L。

将发酵菌体用自来水悬浮后浇施马铃薯幼苗(活菌数为 1×10^8 CFU/mL, 30 mL/盆), 60 d 后统计 SPAD、株高、茎粗, 收获后称取产量, 数据汇总见图 13 所示。3 株菌处理的植株长势均优于对照, 其中, HZ11-4 处理后的 SPAD 值、

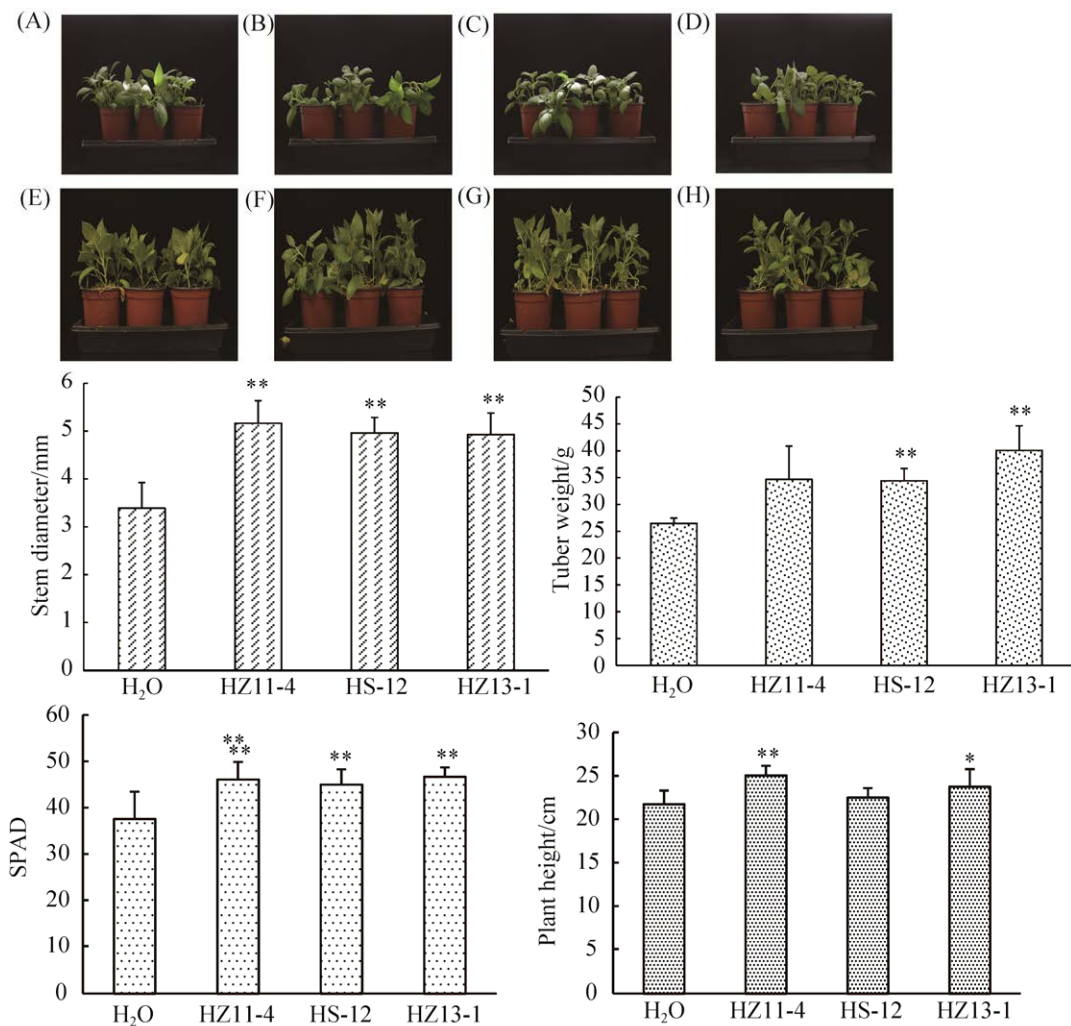


图 13 拮抗菌促生试验

Figure 13 Antagonistic bacterial growth promotion assay. A–D: basic condition; E: water treatment, F–H: the order of pouring HZ11-4, HS-12 and HZ13-1 bacterial culture.

株高、茎径较对照分别增加了 22.68%, 15.23% 和 52.38%, 差异均达到极显著水平, 块茎重量增加了 29.30%; HS-12 处理后块茎重量、SPAD 值与茎径较对照分别增加了 28.34%、19.78% 和 46.38%, 差异均达到极显著水平, 株高增加 3.42%, 差异不显著; HZ13-1 处理后块茎重量、SPAD 值与茎径分别较对照增加了 49.48%、24.28% 和 45.39%, 差异均达到极显著水平, 株高增加了 9.25%, 差异达到显著水平。由此可见, 3 株拮抗菌均表现出良好的促生长效果。

3 讨论

国际上开展马铃薯疮痂病研究已有近百年历史, 但在防控方面至今尚未获得重大突破。一方面其病原菌是特殊的可致病链霉菌。链霉菌可产生多种次级代谢产物, 目前发现的抗生素约 2/3 是由链霉菌产生的^[17], 还包括抗肿瘤剂、杀虫剂、酶抑制剂、色素及各种酶类, 其中几丁质酶也具有抗菌功能^[18] (至于疮痂链霉菌是否产抗生素、产哪种抗生素的报道并不多)。另一方面病原菌中包含多个毒素合成相关基因的致病岛 PAI 可以水平转移, 导致适宜不同生态环境的非致病性链霉菌致病, 病原菌因此具有遗传多样性, 且差异化分布^[19]。

有报道显示, capitan、ridomil 和 rizolex 3 种药剂在田间均能有效降低疮痂病危害程度^[20], 咯菌腈对种薯疮痂病的防效达 79.01%^[21], 施用铁补充剂可以增加马铃薯的抗病性, 但并没有改变病原菌定殖^[22]。可见化学药剂不能理想地控制疮痂病, 反而引发土壤生态恶化、有益菌群数量下降、影响人畜健康等问题; Larkin 等^[23]报道了马铃薯与大麦、油菜、绿豆等轮作, 疮痂病病情指数降低了 20%–33%, 以印度芥菜为绿肥对减少马铃薯疮痂病危害效果最佳^[24], 但疮痂链霉菌在无茄科作物的土壤中仍可存活

3 年^[25]。由于受土地资源的限制, 加之种植面积逐步扩大, 在我国马铃薯集中产区很难实现 5 年以上与非茄科作物有效轮作。

近年来, 以菌治菌的生物防治技术正在兴起。芽孢杆菌属(*Bacillus*)是应用最为广泛的生防菌之一, 对常见的细菌、真菌引起的植物病害都具有一定的防治效果, 包括马铃薯黑痣病^[26], 晚疫病^[27], 早疫病^[28]和枯萎病^[29]等。解淀粉芽孢杆菌是其中抗病效果好、对环境友好、应用较为广泛的菌种, 已被应用于多种植物病害的防控。李岚岚等^[30]筛选出 4 株高效防治橡胶树炭疽病的解淀粉芽孢杆菌; 董国然等^[31]筛选的两株解淀粉芽孢杆菌 HBW 和 HBR, 对橡胶棒孢菌、小麦赤霉菌、草莓灰霉菌、香蕉枯萎菌、辣椒炭疽菌和可可球二孢菌具有显著抑制效果。但是应用于防治马铃薯疮痂病的解淀粉芽孢杆菌却鲜有报道。本文所获得的 3 株解淀粉芽孢杆菌对于疮痂链霉菌的抑菌圈直径可达 34、29、30 mm, 盆栽试验防效达 68.57%、57.15% 和 65.96%。在解磷、解钾、固氮培养基上虽然不能产生明显的透明圈, 但均可较好地生长, 不仅抗病促生, 且能耐受极端盐碱条件, 具有良好的抗逆特性, 利于在各种土壤环境中定殖挥功能, 产业化应用前景良好。

芽孢杆菌的抗菌机制包括竞争和拮抗两个方面。自张娟等^[32]从枯草芽孢杆菌中鉴定出抑菌活性物质以来, 国内外学者先后分离出非核糖体代谢途径合成的多肽、脂肽类抗菌物质, 以及核糖体途径合成的抗菌蛋白类抑菌物质, 其中脂肽类物质研究和应用最多的是表面活性素 (surfactin)、伊枯草素 (iturin) 和泛革素 (fengycin)。表面活性素可以影响微生物的黏着性、破坏细胞膜结构^[33]、抑制真菌菌丝发育^[34], 在抑制水稻条斑病菌和灰葡萄孢的生长过程中发挥主要作用^[35–36]; 伊枯草素可改变磷脂裹泡

的曲率, 干扰 K^+ 离子运输^[37], 影响细胞膜的生物活性, 是抑制青霉菌和禾谷镰孢菌的有效物质^[38-39]; 泛革素会导致病原菌菌丝染色质浓缩和 DNA 链断裂, 诱导细胞凋亡^[40], 是抑制西瓜枯萎病病菌的主效物质^[41]。本文采用乙酸乙酯萃取法获得解淀粉芽孢杆菌的脂肽类物质, HPLC-MS 分析发现, 仅分子量为 700–1 000 Da 的组分对 *S. scabies* 具有明显的抑制效果。已知表面活性素、伊枯草素和泛革素的分子量分别为 994.64、1 071.86、718.39 Da, 于是我们购买了上述抗生素药剂进行平板对峙试验, 结果仅表面活性素对 *S. scabies* 有一定的抑制效果。

石莹莹等分离鉴定的苏云金芽孢杆菌 YN-2-2, 对疮痂链霉菌的抑菌圈直径为 22.8 mm, 其抑菌活性物质完全存在于发酵上清液中, 是一种对环境稳定的可溶性非脂肽类抗菌物质^[42], 其拮抗机制与本文 3 株解淀粉芽孢杆菌完全不同。HZ11-4、HS-12 和 HZ13-1 菌体对于 *S. scabies* 的抑菌圈直径均大于发酵上清液(HS-12 发酵上清液几乎无效果), 推测菌体还可能通过营养竞争或与病原菌互作产生其他抑菌物质, 具体机制有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 徐进, 朱杰华, 杨艳丽, 汤浩, 吕和平, 樊明寿, 石瑛, 董道峰, 王贵江, 王万兴, 熊兴耀, 高玉林. 中国马铃薯病虫发生情况与农药使用现状. 中国农业科学, 2019, 52(16): 2800–2808.
Xu J, Zhu JH, Yang YL, Tang H, Lü HP, Fan MS, Shi Y, Dong DF, Wang GJ, Wang WX, Xiong XY, Gao YL. Status of major diseases and insect pests of potato and pesticide usage in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(16): 2800–2808. (in Chinese)
- [2] 聂峰杰, 陈虞超, 巩樵, 张丽, 甘晓燕, 石磊, 宋玉霞. 马铃薯疮痂病致病链霉菌分类及其致病机理研究进展. 分子植物育种, 2018, 16(4): 1313–1319.
Nie FJ, Chen YC, Gong L, Zhang L, Gan XY, Shi L, Song YX. Research progress on classification and pathogenesis of *Streptomyces* spp of potato scab. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(4): 1313–1319. (in Chinese)
- [3] Leiminger J, Frank M, Wenk C, Poschenrieder G, Kellermann A, Schwarzfischer A. Distribution and characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Germany. *Plant Pathology*, 2013, 62(3): 611–623.
- [4] Dees MW, Sletten A, Hermansen A. Isolation and characterization of *Streptomyces* species from potato common scab lesions in Norway. *Plant Pathology*, 2013, 62(1): 217–225.
- [5] Bischoff V, Cookson SJ, Wu S, Scheible WR. Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(3): 955–965.
- [6] Li CP, Shi WC, Wu D, Tian RM, Wang B, Lin RS, Zhou B, Gao Z. Biocontrol of potato common scab by *Brevibacillus laterosporus* BL12 is related to the reduction of pathogen and changes in soil bacterial community. *Biological Control*, 2021, 153: 104496.
- [7] Cui LX, Yang CD, Wei LJ, Li TH, Chen XY. Isolation and identification of an endophytic bacteria *Bacillus velezensis* 8-4 exhibiting biocontrol activity against potato scab [J]. *Biological Control*, 2020, 141.
- [8] Zhang XY, Li C, Hao JJ, Li YC, Li DZ, Zhang DM, Xing X, Liang Y. A novel *Streptomyces* sp. strain PBSH₉ for controlling potato common scab caused by *Streptomyces galilaeus*. *Plant Disease*, 2020, 104(7): 1986–1993.
- [9] Peng WJ, Zhong J, Yang J, Ren YL, Xu T, Xiao S, Zhou JY, Tan H. The artificial neural network approach based on uniform design to optimize the fed-batch fermentation condition: application to the production of iturin A. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1): 54.
- [10] 金清, 肖明. 新型抗菌肽——表面活性素、伊枯草菌素和丰原素. 微生物与感染, 2018, 13(1): 56–64.
Jin Q, Xiao M. Novel antimicrobial peptides: surfactin, iturin and fengycin. *Journal of Microbes and Infections*, 2018, 13(1): 56–64. (in Chinese)
- [11] Cullen DW, Lees AK. Detection of the *necl* virulence gene and its correlation with pathogenicity in *Streptomyces* species on potato tubers and in soil using conventional and real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(4): 1082–1094.
- [12] 曹晶晶, 熊恂梓, 钞亚鹏, 赵盼, 汪志琴, 仲乃琴. 极耐盐碱固氮菌的分离鉴定及固氮特性研究[J/OL].

- 微生物学报: 1–17[2021-11-28]. <https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20210054>.
- Cao JJ, Xiong MZ, Chao YP, Zhao P, Wang ZQ, Zhong NQ. Isolation and identification of extremely saline-alkali-tolerant nitrogen-fixing bacteria and nitrogen-fixing characteristics[J/OL]. *Acta Microbiologica*: 1–17[2021-11-28]. <https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20210054>.
- [13] Joshi R, McSpadden Gardener BB. Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 2006, 96(2): 145–154.
- [14] 李振东, 陈秀蓉, 李鹏, 满百膺. 珠芽蓼内生菌 Z5 产 IAA 和抑菌能力测定及其鉴定. 草业学报, 2010, 19(2): 61–68.
- Li ZD, Chen XR, Li P, Man BY. Identification of *Polygonum viviparum* endophytic bacteria Z5 and determination of the capacity to secrete IAA and antagonistic capacity towards pathogenic fungi. *Acta Prataculturae Sinica*, 2010, 19(2): 61–68. (in Chinese)
- [15] 李曦, 廖汉鹏, 崔鹏, 白玉丹, 刘晨, 文畅, 周顺桂. 3 种常用除草剂对细菌抗生素耐药性的影响[J]. 环境科学, 2021, 42(5): 2550–2557. DOI: 10.13227/j.hjcx.202009249.
- Li X, Liao HP, Cui P, Bai YD, Liu C, Wen C, Zhou SG. The effects of three commonly used herbicides on bacterial antibiotic resistance[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(5): 2550–2557. (in Chinese)
- [16] 杨慧敏, 谢艳军. 检验科微生物检验质量的影响因素及病原菌耐药性分析. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(6): 664–666.
- Yang HM, Xie YJ. Analysis of influencing factors of microbiological examination quality and drug resistance of pathogenic bacteria in clinical laboratory. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2018, 28(6): 664–666. (in Chinese)
- [17] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 2005, 58(1): 1–26.
- [18] Bukhalid RA, Takeuchi T, Labeda D, Loria Rosemary. Horizontal transfer of the plant virulence gene, *necl1*, and flanking sequences among genetically. *Applied & Environmental Microbiology*, 2002, 68: 738–744.
- [19] Kers Johan A et al. A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(4): 1025–1033.
- [20] Hosny M, Abo-Elyousr KAM, Asran MR, Saeed FA. Chemical control of potato common scab disease under field conditions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2014, 47(18): 2193–2199.
- [21] 孙庚, 李志念, 颜克成, 陈亮, 司乃国. 应用于马铃薯疮痂病防治药剂筛选的改良方法研究. 农药, 2020, 59(4): 303–305.
- Sun G, Li ZN, Yan KC, Chen L, Si NG. The modified screening method research of fungicide against potato common scab. *Agrochemicals*, 2020, 59(4): 303–305. (in Chinese)
- [22] Sarikhani E, Sagova-Mareckova M, Omelka M, Kopecky J. The effect of peat and iron supplements on the severity of potato common scab and bacterial community in tuberosphere soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 93(1): fiw206.
- [23] Larkin RP, Griffin TS, Honeycutt CW. Rotation and cover crop effects on soilborne potato diseases, tuber yield, and soil microbial communities. *Plant Disease*, 2010, 94(12): 1491–1502.
- [24] Johansen TJ, Dees MW, Hermansen A. High soil moisture reduces common scab caused by *Streptomyces turgidiscabies* and *Streptomyces europaeiscabiei* in potato. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 2015, 65(3): 193–198.
- [25] Braun S, Gevens A, Charkowski A, Allen C, Jansky S. Potato common scab: a review of the causal pathogens, management practices, varietal resistance screening methods, and host resistance. *American Journal of Potato Research*, 2017, 94(4): 283–296.
- [26] 李扬凡, 邵美琪, 刘畅, 郭庆港, 王培培, 陈秀叶, 苏振贺, 马平. 解淀粉芽孢杆菌 HMB33604 的抑菌物质及对马铃薯黑痣病的防治效果. 中国农业科学, 2021, 54(12): 2559–2569.
- Li YF, Shao MQ, Liu C, Guo QG, Wang PP, Chen XY, Su ZH, Ma P. Identification of the antifungal active compounds from *Bacillus amyloliquefaciens* strain HMB33604 and its control efficacy against potato black scurf. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(12): 2559–2569. (in Chinese)
- [27] 高梦颖, 付海燕, 孙丛, 王颜波, 刘春光, 马玉堃, 杨峰山. 马铃薯致病疫霉拮抗细菌研究进展. 中国农学通报, 2021, 37(14): 136–140.
- Gao MY, Fu HY, Sun C, Wang YB, Liu CG, Ma YK, Yang FS. Antagonistic bacteria of *Phytophthora infestans* in potato: a review. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2021, 37(14): 136–140. (in Chinese)
- [28] Gorai PS, Ghosh R, Konra S, Mandal NC. Biological control of early blight disease of potato caused by *Alternaria alternata* EBP₃ by an endophytic bacterial

- strain *Bacillus velezensis* SEB1. *Biological Control*, 2021, 156: 104551.
- [29] Ben Khedher S, Mejdoub-Trabelsi B, Tounsi S. Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium* wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. *Biological Control*, 2021, 152: 104444.
- [30] 李岚岚, 戴利铭, 蒋桂芝, 刘一贤, 施玉萍, 蔡志英. 橡胶树炭疽病生防内生菌的分离鉴定及抑菌作用研究. *热带作物学报*, 2021, 42(10): 2958–2965.
Li LL, Dai LM, Jiang GZ, Liu YX, Shi YP, Cai ZY. Isolation, identification and bacteriostasis study of endophytic bacteria to control *Colletotrichum* leaf disease on rubber tree. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(10): 2958–2965. (in Chinese)
- [31] 董国然, 沙理堂, 周闯, 符可芯, 杨叶. 两株解淀粉芽孢杆菌的鉴定及对抗多菌灵可可球二孢菌的拮抗作用. *中国农业科技导报*, 2021, 23(7): 136–144.
Dong GR, Sha LT, Zhou C, Fu KX, Yang Y. Identification of two strains of *Bacillus amyloliquefaciens* and their antagonistic activity to carbendazim-resistant *Botryodiplodia theobromae*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2021, 23(7): 136–144. (in Chinese)
- [32] Johnson B A, Anker H, Meloney F L. Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group [J]. *Science*, 1945, 102 (2650) : 376–377.
- [33] Liu J, Li W, Zhu XY, Zhao HZ, Lu YJ, Zhang C, Lu ZX. Surfactin effectively inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm formation on surfaces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(11): 4565–4574.
- [34] Park G, Nam J, Kim J, Song J, Kim PI, Min HJ, Lee CW. Structure and mechanism of surfactin peptide from *Bacillus velezensis* antagonistic to fungi plant pathogens. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2019, 40(7): 704–709.
- [35] 张荣胜, 王晓宇, 罗楚平, 刘永锋, 刘邮洲, 陈志谊. 解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 产脂肽类物质鉴定及表面活性素对水稻细菌性条斑病的防治作用. *中国农业科学*, 2013, 46(10): 2014–2021.
Zhang RS, Wang XY, Luo CP, Liu YF, Liu YZ, Chen ZY. Identification of the lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* lx-11 and biocontrol efficacy of surfactin against bacterial leaf streak. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(10): 2014–2021. (in Chinese)
- [36] Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny JL, Thonart P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(4): 1084–1090.
- [37] 邓永卓, 张家宁, 邓爽, 赵心宇, 李晓岩, 牛犇. 伊枯草菌素类抗菌肽抑菌活性及机理研究进展. *中国抗生素杂志*, 2020, 45(7): 639–645.
Deng YZ, Zhang JN, Deng S, Zhao XY, Li XY, Niu B. Progress on the antibacterial activity and antibacterial mechanisms of iturins. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2020, 45(7): 639–645. (in Chinese)
- [38] Gong AD, Li HP, Yuan QS, Song XS, Yao W, He WJ, Zhang JB, Liao YC. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116871.
- [39] Chen K, Tian ZH, Luo Y, Cheng YJ, Long CA. Antagonistic activity and the mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* DH-4 against Citrus green mold. *Phytopathology*, 2018, 108(11): 1253–1262.
- [40] Tang QY, Bie XM, Lu ZX, Lv FX, Tao Y, Qu XX. Effects of fengycin from *Bacillus subtilis* fmbJ on apoptosis and necrosis in *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Microbiology*, 2014, 52(8): 675–680.
- [41] 罗楚平, 张婧, 季冬淳, 陈树桥, 陈永兴, 赵玉萍, 李相前. 表面活性素、杆菌霉素 L、罗克霉素和泛革素 4 种脂肽类抗生素高效制备方法及其生物学活性. *西南农业学报*, 2018, 31(11): 2307–2314.
Luo CP, Zhang J, Ji DC, Chen SQ, Chen YX, Zhao YP, Li XQ. Purification of four family lipopeptides from *Bacillus subtilis* and analysis of their biological activities. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 31(11): 2307–2314. (in Chinese)
- [42] 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. *微生物学通报*, 2020, 47(8): 2425–2435.
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. *Microbiology China*, 2020, 47(8): 2425–2435. (in Chinese)

(本文责编 李磊)