

# 蛭石基质中马铃薯疮痂病防治后可培养菌群的变化分析

关欢欢<sup>1</sup>, 许华民<sup>1</sup>, 李寿如<sup>2</sup>, 贾景丽<sup>2</sup>, 赵伟全<sup>1\*</sup>, 刘大群<sup>1,3</sup>

(1. 河北农业大学植物保护学院/河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 河北 保定 071001; 2. 本溪市马铃薯研究所, 辽宁 本溪 117000; 3. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

**摘要:**为探索微型薯疮痂病防治后蛭石基质中可培养微生物类群的变化,本研究采用稀释平板法对防治后的蛭石基质中可培养微生物进行分离培养,并利用16S rDNA序列和ITS序列对可培养微生物的种类进行快速鉴定。结果表明,DW2处理的表现较好,防治效果为56.93%,可培养微生物数量约为 $8.15 \times 10^7$  CFU·g<sup>-1</sup>,细菌类群约占80.53%,含有假单胞菌属、金黄杆菌属等4个属;放线菌类群约占19.40%,含有链霉菌属、考克氏菌属等4个属;真菌类群约占0.08%,含有青霉属和镰孢菌属2个属。清水对照组可培养微生物数量约为 $9.19 \times 10^7$  CFU·g<sup>-1</sup>,细菌类群约占74.13%,含有假单胞菌属、根瘤菌属等6个属;放线菌类群约占25.25%,含有链霉菌属、微杆菌属等4个属;真菌类群占0.62%,含有轮枝孢属、枝顶孢属等6个属。以上结果为微型薯疮痂病的防治和发生规律研究提供了重要信息。

**关键词:**马铃薯疮痂病;微型薯;蛭石基质;可培养微生物

中图分类号:S435.32

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2020)05-0057-05

## Analysis on the Change of Culturable Flora after Potato Scab Control in Vermiculite Substrate

GUAN Huanhuan<sup>1</sup>, XU Huamin<sup>1</sup>, LI Shouru<sup>2</sup>, JIA Jingli<sup>2</sup>, ZHAO Wei-quan<sup>1\*</sup>, LIU Da-qun<sup>1,3</sup>

(1. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University/Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001; 2. Benxi Potato Research Institute, Benxi 117000; 3. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** In order to explore the changes of culturable microbial groups in vermiculite substrate after the control of potato scab, dilution plate method was used to isolate and culture culturable microorganisms in vermiculite substrate after control and 16S rDNA sequence and its sequences were used to quickly identify the culturable microorganisms. The results showed that DW2 treatment had a better performance and the prevention and treatment effect was 56.93%, the total amount of microorganisms was about  $8.15 \times 10^7$  CFU·g<sup>-1</sup>, in which the bacterial group accounted for about 80.53%, including 4 genera of *Pseudomonas* and *Chryseobacterium*. The actinomycetes group accounted for 19.40% of the total microorganism, including 4 genera of *Streptomyces* and *Kocuria*. The fungi group accounted for about 0.08%, including 2 genera of *Penicillium* and *Fusarium*. The number of cultured microorganisms in the control group was about  $9.19 \times 10^7$  CFU·g<sup>-1</sup>, among which the bacterial group accounted for about 74.13%, including 6 genera such as *Pseudomonas*, *Rhizobium*. The actinomycetes accounted for about 25.25%, including 4 genera such as *Streptomyces*, *Microbacterium*. The fungi group accounted for about 0.62%, including 6 genera of *Verticillium*, *Acremonium*. The above results provide important information for the control and occurrence of disease-associated microorganism.

**Key words:** Potato scab; Minituber; Vermiculite substrate; Culturable microorganism

收稿日期:2019-04-24

基金项目:国家重点研发计划(2017YFE0115700);河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2018077);中国农业科学院农科英才项目(2017-2018)

作者简介:关欢欢(1993-),女,在读硕士,研究方向:植物病害生物防治。

通讯作者:赵伟全,男,博士,教授, E-mail: zhaowquan@hebau.edu.cn

马铃薯疮痂病(Potato common scab)是由植物病原链霉菌(Plant-pathogenic *Streptomyces* spp.)引起的重要经济性病害,在世界各地马铃薯种植区广泛发生且较难防治<sup>[1]</sup>。随着我国马铃薯产业的快速发展,疮痂病严重威胁着马铃薯生产,已成为人们高度关注的问题<sup>[2-5]</sup>。目前对马铃薯疮痂病的发生原因和防治方法尚无可靠依据和措施,尤其是在重复使用蛭石基质生产微型薯过程中极易发生疮痂病的原因一直不明,因此本研究以微型薯生产苗床二次使用的发病蛭石基质为切入点,对防治后蛭石基质中可培养微生物菌群变化进行分析,一则从微生物组成变化角度初步探索可能与病害防治有关的类群,二则能获得发生明显变化的微生物类群的菌株,以期为深入研究马铃薯疮痂病在蛭石基质中的发病规律筛选生物信息和提供材料资源。

## 1 材料和方法

本研究中的病害防治试验在辽宁省本溪市马铃薯研究所微型薯繁育基地进行,微生物菌群分析与菌株鉴定工作在河北农业大学植物保护学院生防与分子植病实验室完成。

### 1.1 试验材料

马铃薯品种:尤金(疮痂病感病品种)。旧蛭石基质:已重复使用2次,疮痂病严重发生。菌株和药剂:生防菌ZWQ-1,72%农用硫酸链霉素(华北制药),柠檬酸(福晨化学),Taq酶、2×GC buffer II、DNA回收纯化试剂盒(生工)。培养基:PDA培养基、燕麦培养基(OMA)、马丁氏培养基、高氏1号培养基等。

### 1.2 微型薯苗床病害防治试验

防治试验在已重复使用2次、疮痂病严重发生的旧蛭石苗床上进行。苗床总长8.0 m,宽1.5 m,基质厚度为8.0 cm。按照行距6.0 cm,株距5.0 cm的规格进行播种。采用两种配方处理,每个处理的床长3.0 m,对照床长2.0 m,各处理间以隔板分开,在微型薯苗出齐后7~10 d开始进行。处理一(DW1)先用0.7 g/L的72%农用硫酸链霉素浇灌1次,处理二(DW2)先用0.35 g/L的柠檬酸溶液浇灌1次,之后两个处理在第7天、14天使用生防菌ZWQ-1发酵液20倍液分别浇灌2次。对照(CK):相应清水浇灌苗床3次。其他时间段均以正常水肥进行管理,收获后调查发病情况。

### 1.3 可培养微生物统计

在薯块收获时采集各处理组蛭石基质样品,

检测时称取3.0 g,置于10 mL离心管中,加入7.0 mL无菌水,在振荡器上旋涡混匀10~15 min,静置30 s,待大颗粒沉降后,吸取1.0 mL上清液,放入1.5 mL离心管中,梯度稀释 $10^1\sim 10^5$ 倍。从稀释液中各吸取40 μL均匀涂布到相应培养基上进行培养,每样品5次重复。

利用稀释平板计数法<sup>[6]</sup>在PDA培养基上对可培养生物量进行统计。细菌分离培养采用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,25℃培养2 d;放线菌分离培养采用高氏1号培养基,30℃培养5 d;真菌分离培养采用马丁氏培养基,28℃培养4 d。分别对各培养基中细菌、放线菌、真菌数量进行统计,并挑取不同形态特征的菌落,分别进行菌株的培养和纯化。

### 1.4 分子鉴定

利用Easy Pure Genomic DNA Kit (TransGen Biotech)提取细菌基因组DNA;真菌和细菌基因组DNA提取分别参考陈吉良<sup>[7]</sup>和《Practical Streptomyces Genetics》<sup>[8]</sup>中的方法。对各菌株基因组进行PCR扩增<sup>[9-11]</sup>,获得细菌和放线菌的16S rDNA序列和真菌的ITS序列,扩增结束后利用DNA凝胶回收试剂盒目的片段,送交上海生物工程技术服务有限公司测序,将测序序列校对后,提交GenBank数据库进行BLAST比对分析,根据序列的相似程度进行快速分类鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 DW1、DW2处理对微型薯疮痂病的防治效果

将不同处理的新生微型薯块收获后,参照马铃薯疮痂病的病害分级标准对薯块发病情况进行统计,同时对各处理相应薯块的发病率、病情指数以及防治效果进行计算<sup>[12]</sup>。结果表明,DW1和DW2处理组收获薯块发病率和病情指数分别为87.40%和75.93%、37.86和24.84,对照组的发病率



DW1:生防菌ZWQ-1+农用链霉素;DW2:生防菌ZWQ-1+柠檬酸;CK:清水对照

图1 各处理对微型薯疮痂病的防治效果

和病情指数分别为 98.57% 和 57.67。DW1 和 DW2 处理的防效分别为 34.33% 和 56.93%，说明两个处

理对疮痂病均有一定的防治效果,但还达不到使新生薯块不发病的理想防效(图1,表1)。

表1 微型薯收获后各处理对疮痂病的防效统计

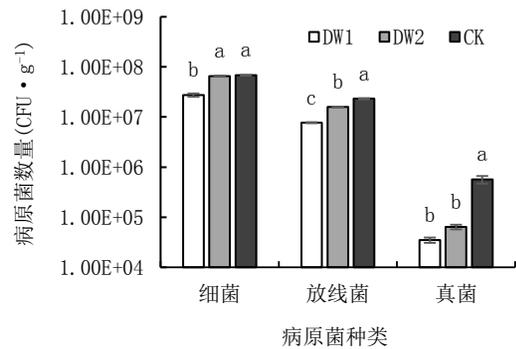
处理	收获粒数	病级							发病率(%)	病情指数	防治效果(%)
		0	1	2	3	4	5	6			
DW1	1151	145	255	241	237	211	49	13	87.40	37.86	34.33
DW2	914	220	200	358	104	26	6	0	75.93	24.84	56.93
CK(清水)	700	10	32	116	154	276	80	32	98.57	57.67	—

## 2.2 可培养微生物总量统计分析

为探究防治后蛭石中可培养微生物的变化情况,本研究对采集的 DW1、DW2 及 CK 样品进行了微生物富集和菌落计数。结果表明,DW1 中可培养微生物数量约为  $3.52 \times 10^7$  CFU·g<sup>-1</sup>,其细菌、放线菌、真菌占比为 78.05%、21.85%、0.09%; DW2 中可培养微生物数量约为  $8.15 \times 10^7$  CFU·g<sup>-1</sup>,其细菌、放线菌、真菌占比为 80.53%、19.40%、0.08%; CK 中可培养微生物数量约为  $9.19 \times 10^7$  CFU·g<sup>-1</sup>,其细菌、放线菌、真菌占比为 74.13%、25.25%、0.62%。对各处理组中不同种类微生物的数量比较发现,处理 DW1 中细菌数量显著低于 CK 与 DW2; 处理 DW1、DW2 中放线菌和真菌数量均显著低于 CK(图2)。

## 2.3 可培养微生物类群鉴定与比较结果

挑取纯化各种培养基中长出的菌落进行,选取不同菌落形态的菌株用于菌群种类分析,从不同样品中共分离 59 株。提取各菌株的基因组



注: 图中数值为平均值±标准误; 柱上不同小写字母表示不同处理间菌量差异显著( $P < 0.05$ )

图2 蛭石样品中可培养微生物数量统计结果

DNA, 经测定 OD<sub>260/280</sub> 值均在 1.8~2.0 之间, 说明核酸样品质量良好。并将快速分子鉴定结果与菌落形态特征<sup>[13-15]</sup>相结合, 对各菌株进行分类, 最后确定了全部菌株的种属(表2)。

表2 获得的可培养微生物分子鉴定结果

类别	获得菌株	鉴定结果	序列	相似性 %
细菌	CKX-12	寡养单胞菌属( <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> )	GU186108.1	99
	CKF-9, DW1F-4	红平红球菌( <i>Rhodococcus erythropolis</i> )	KF358249.1	99
	DW2X-4, CKX-4	根瘤菌属( <i>Rhizobium</i> sp.)	FN563444.1	99
	DW1X-4	芽孢杆菌属( <i>Bacillus</i> sp.)	HQ317169.1	99
	CKX-3	假单胞菌属( <i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> )	KF358268.1	99
	CKX-6	无色杆菌属( <i>Achromoter xylooxidans</i> )	HQ676601.1	99
	CKX-8	彭氏变形菌( <i>Proteus penneri</i> )	KC456594.1	99
	DW1X-1, DW2X-1	金黄杆菌属( <i>Chryseobacterium hispalense</i> )	NR116277.1	99
	CKX-10	莱比托泉动性球菌( <i>Planococcus rifietoensis</i> )	KJ734888.1	99
	CKX-11	无色杆菌属( <i>Achromobacter</i> )	KC608763.1	99
	DW1X-3, DW2X-6, CKX-2	恶臭假单胞菌( <i>Pseudomonas putida</i> )	KC582298.1	99
	CKX-7	普通变形杆菌( <i>Proteus vulgaris</i> )	KC456527.1	99
	DW1F-1	秋吉链霉菌( <i>Streptomyces akiyoshiensis</i> )	AB184095.2	99

续表 2

类别	获得菌株	鉴定结果	序列	相似性
	DW1F-3	红球菌属( <i>Rhodococcus</i> sp.)	KF790905.1	99
	DW2X-7	皮氏无色杆菌属( <i>Achromobacter piechaudii</i> )	EU239469.1	96
	DW1F-7, DW1F-6, DW2F-2, DW2F-3, DW2F-4, DW2F-5, CKF-2, CKF-3, CKF-6, DW1F-2, DW2F-1,	链霉菌属( <i>Streptomyces</i> sp.)	KM103260.1	99
	CKF-8	疮痂链霉菌( <i>Streptomyces caviscabies</i> )	NR114493.1	100
	CKF-5	锈赤蜡黄链霉菌( <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> )	KJ632658.1	99
放线菌	CKF-7	疮痂链霉菌( <i>Streptomyces scabies</i> )	HM018077.1	100
	CKF-10	酸性疮痂链霉菌( <i>Streptomyces acidiscabies</i> )	NR116534.1	100
	CKF-4	变铅青链霉菌( <i>Streptomyces lividans</i> )	CP009124.1	99
	DW1F-5, CKF-1	黄溶链霉菌( <i>Streptomyces xantholiticus</i> )	NR041123.1	99
	CKF-11, DW2F-7	噬尼古丁节杆菌( <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> )	GQ284333.1	100
	CKF-12, DW1F-8, DW2F-8	微杆菌属( <i>Microbacterium</i> sp.)	KJ184855.1	99
	DW1F-9, DW2F-6	考克氏菌属( <i>Kocuria</i> sp.)	EU372960.1	99
	CKZ-3, CKZ-8, DW2Z-4	青霉属( <i>Penicillium</i> )	KJ527027.1	99
	CKZ-4	产黄青霉( <i>Penicillium chrysogenum</i> )	JQ015265.1	100
	DW1Z-1, DW2Z-1	巴西青霉( <i>Penicillium brasilianum</i> )	HM469396.1	100
	DW1Z-4	微紫青霉( <i>Penicillium janthinellum</i> )	KM268666.1	99
	CKZ-7, DW1Z-3, DW2Z-3	尖孢镰刀菌( <i>Fusarium oxysporum</i> )	KM268673.1	100
真菌	CKZ-1	轮枝孢属( <i>Verticillium</i> )	KC785567.1	99
	CKZ-2	枝顶孢属( <i>Acremonium sclerotigenum</i> )	KJ194115.1	99
	CKZ-5	枝孢属( <i>Cladosporium</i> sp.)	GU797141.1	99
	CKZ-9	黄曲霉( <i>Aspergillus flavus</i> )	JF951750.1	99

注: DW1X/DW2X/CKX: 分别表示 DW1/DW2/CK 处理后蛭石基质中细菌的类群; DW1F/DW2F/CKF: 分别表示 DW1/DW2/CK 处理后蛭石基质中放线菌的类群; DW1Z/DW2Z/CKZ: 分别表示 DW1/DW2/CK 处理后蛭石基质中真菌的类群

对防治组和对照样品中微生物类群进行分析比较发现, 经 DW1 和 DW2 处理防治后共同出现的菌群有考克氏菌属、巴西青霉和金黄杆菌属, 减少的菌群有寡养单胞菌属、普通疮痂链霉菌、酸性疮痂链霉菌等 12 个菌属。进一步对 DW1、DW2 两个处理间的微生物类群进行分析比较发现, 两组处理均含有的细菌类群为金黄杆菌属、假单胞菌属(恶臭假单胞菌), 放线菌类群为微杆菌属、考克氏菌属和链霉菌属, 真菌为青霉属和镰孢菌属。DW1 中含有芽孢杆菌属、秋吉链霉菌、黄溶链霉菌、红平红球菌、微紫青霉; DW2 中含有无色杆菌属、根瘤菌属、噬尼古丁节杆菌。

### 3 讨论

土壤中水分、pH 等因素的变化均能改变植物根际的微环境, 从而导致根际微生物种类组成结构的改变<sup>[6]</sup>。本研究在利用生防菌 ZWQ-1+柠檬酸处理发病旧蛭石后, 发现可以有效降低马铃薯疮痂病的病情指数, 蛭石基质中可培养微生物的

种类和数量发生了明显变化, 表现为放线菌和真菌数量减少, 细菌比例增大, 有向“细菌型”转变的趋势。

植物在生长过程中根部组织分泌的代谢物质, 会在基质中形成特有的微生物群落, 而这些微生物的种群结构与病害发生紧密相关。马灿等<sup>[7]</sup>对番茄连作土壤微生物进行测定, 发现随连作茬次的增加, 土壤中细菌和放线菌呈先升高后降低的趋势, 而真菌数量在一直不断增加。Rosenzweig 等<sup>[8]</sup>对疮痂病抑制性土壤和疮痂病感病土壤中的微生物进行测序分析发现, 抑制性土壤中芽孢杆菌属的相对丰度比感病土壤高 1 个数量级。Chen 等<sup>[12]</sup>同时接种 72% 农用硫酸链霉素和疮痂病菌(*S. bottropensis*) 进行马铃薯盆栽防治试验, 结果发现其收获期根际细菌总量显著降低, 但芽孢杆菌有显著增加。本研究将马铃薯疮痂病菌的拮抗芽孢杆菌与 72% 农用硫酸链霉素结合使用处理蛭石基质后, 可使基质可培养微生物中细菌的总量显著降低, 从蛭石中也分离到了芽孢杆

菌,该结果与上述研究基本一致。Shi等<sup>[19]</sup>研究发现马铃薯疮痂病的严重度、致病链霉菌的丰富度和txtAB基因拷贝数与土壤中寡养单胞菌属的菌群变化呈正相关。Kobayashi等<sup>[20]</sup>对不同抗性品种的根际菌群进行分析,发现易感病马铃薯品种的根际中有大量红球菌属细菌。在本研究芽孢杆菌+柠檬酸处理的基质中寡养单胞菌属和红球菌属菌群明显减少,疮痂病发生的严重度明显降低,这与先前提到的病害发生趋势相吻合,但这两种细菌是否与马铃薯疮痂病的发生有关还需进一步研究。

此外,由于土壤中仅有约1%的物种可被分离培养,并且在分离过程中存在漏筛的可能,尽管进行了大量的研究,但对土壤中微生物多样性认识仍不够深入<sup>[21-22]</sup>。通过本研究对疮痂病防治后微型薯蛭石基质中可培养微生物的比较分析,发现其组成和变化较为复杂,尽管已经获得了一些主要菌群,但仍需继续探索蛭石在使用过程中微生物的变化规律,以获得更多与马铃薯疮痂病发生发展密切相关的微生物菌群,为揭示该病的成因和生物防治提供生物学依据。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Lerat S, Simao-Beauvoir A M, Beaulieu C. Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2009, 10(5): 579-585.
- [ 2 ] 杨梦平,王瑞仙,杜魏甫,等. 云南省马铃薯疮痂病致病链霉菌种类组成研究[J]. *植物病理学报*, 2018, 48(4): 445-454.
- [ 3 ] 张建平,尹玉和,闫任沛,等. 内蒙古马铃薯疮痂病发生与防治途径[J]. *中国马铃薯*, 2013, 27(1): 56-59.
- [ 4 ] Hill J, Lazarovits G. A mail survey of growers to estimate potato common scab prevalence and economic loss in Canada[J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2005, 27(1): 46-52.
- [ 5 ] Loria R, Bukhalid R A, Fry B A, et al. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*[J]. *Plant Disease*, 1997, 81(8): 836-846.
- [ 6 ] 林先贵. 土壤微生物研究原理与方法[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 37.
- [ 7 ] 陈吉良,黄小龙,吴安迪,等. 一种快速高效提取病原真菌DNA作为PCR模板的方法[J]. *菌物学报*, 2011, 30(1): 147-149.
- [ 8 ] Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, et al. *Practical streptomyces genetics*[M]. Nrowich: The John Innes Foundation, 2000:161-211.
- [ 9 ] 张祥林,伍永明,王 翀,等. 西瓜细菌性果斑病菌的16S rDNA序列分析及特异性引物的设计[J]. *植物病理学报* 2007, 37(3): 225-231.
- [ 10 ] 张海颖,郭凤柳,许华民,等. 河北省张北地区马铃薯疮痂病的病菌鉴定[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(10): 131-134.
- [ 11 ] 周 倩,蒋贤慧,杨晶晶,等. 浙江乐清铁皮石斛rDNA ITS序列的克隆及序列比对[J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(3): 513-517.
- [ 12 ] Chen S F, Zhang M S, Wang J Y, et al. Biocontrol effects of *Brevibacillus laterosporus* AMCC100017 on potato common scab and its impact on rhizosphere bacterial communities[J]. *Biological Control*, 2017, 106: 89-98.
- [ 13 ] 布坎南R E,吉本斯N E,等编. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 313-1207.
- [ 14 ] 阮继生,黄 英. 放线菌快速鉴定与系统分类(第一版)[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 69-113.
- [ 15 ] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [ 16 ] 徐美娜,王光华,靳学慧. 土传病害生物防治研究进展[J]. *吉林农业科学*, 2005, 30(2): 39-42.
- [ 17 ] 马 灿,王明友. 设施番茄连作对土壤理化性状、微生物数量及病虫害的影响[J]. *吉林农业科学*, 2014, 39(4): 22-25.
- [ 18 ] Rosenzweig N, Tiedje J M, Quensen J F, et al. Microbial communities associated with potato common scab—suppressive soil determined by pyrosequencing analyses[J]. *Plant Disease*, 2012, 96(5): 718-725.
- [ 19 ] Shi W C, Li M C, Wei G S, et al. The occurrence of potato common scab correlates with the community composition and function of the geocaulosphere soil microbiome[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 1-18.
- [ 20 ] Kobayashi A, Ohdaira K Y, Someya N, et al. Community analysis of root- and tuber-associated bacteria in field-grown potato plants harboring different resistance levels against common scab [J]. *Microbes and Environments*, 2015, 30(4): 301-309.
- [ 21 ] 褚海燕,王艳芬,时 玉,等. 土壤微生物生物地理学研究现状与发展态势[J]. *中国科学院院刊*, 2017, 32(6): 585-592.
- [ 22 ] 宋长青,吴金水,陆雅海,等. 中国土壤微生物学研究10年回顾[J]. *地球科学进展*, 2013, 28(10): 1087-1105.

(责任编辑:王丝语)