



姚博,何依璐,张晋豪,等.解淀粉芽孢杆菌JK10的鉴定及其对蓝莓根癌病的防治效果[J].江西农业大学学报,2022,44(4):891-899.

YAO B,HE Y L,ZHANG J H,et al.Identification and control efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* JK10 against blueberry crown gall[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2022,44(4):891-899.

解淀粉芽孢杆菌 JK10 的鉴定 及其对蓝莓根癌病的防治效果

姚 博¹,何依璐^{1*},张晋豪¹,魏兰芳²,崔兴国³,姬广海^{1*}

(1.云南农业大学 省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室,云南 昆明 650201;2.云南农业大学 农科基础实验教学中心,云南 昆明 650201;3.云南省曲靖佳沃现代农业有限公司,云南 曲靖 655000)

摘要:【目的】蓝莓根癌病目前是制约蓝莓产业发展的重要病害,生物防治是防治根癌病的有效措施。笔者前期从蓝莓健康根组织中分离得到一株对蓝莓根癌病菌有良好拮抗效果的生防细菌,研究旨在鉴定其种类、评价其对蓝莓根癌病的田间防治效果,并初步探索其可能产生的活性物质,为云南蓝莓根癌病的生物防治及其菌剂开发提供理论基础。【方法】通过形态学观察,生理生化测定和多序列比对(16S rDNA、*gyrB* 基因)对菌株 JK10 进行鉴定;使用平板对峙法和模式植株(向日葵,番茄)评价菌株 JK10 对蓝莓根癌病原菌的拮抗效果及对其致癌的影响;通过田间灌根进一步验证菌株 JK10 对蓝莓根癌病的田间防治效果;使用聚酮类和脂肽类基因的特异引物检测 JK10 基因组是否有相关物质的合成基因。【结果】经过鉴定明确生防菌株 JK10 为解淀粉芽孢杆菌;菌株 JK10 对蓝莓根癌土壤杆菌有良好的拮抗效果,抑菌圈为(22±1.2)mm,抑制由根癌土壤杆菌引起的向日葵、番茄冠瘿瘤效果明显,防效分别达到 94.28% 和 87.09%;田间试验表明,菌株 JK10 对蓝莓根癌病的防效在 50% 以上,可显著降低蓝莓根组织新瘤的发生率和病情指数,显著增加蓝莓的果率和百粒质量;菌株 JK10 基因组中含有聚酮类,脂肽类物质相关合成基因。【结论】解淀粉芽孢杆菌 JK10 对蓝莓根癌土壤杆菌有良好的拮抗效果,对蓝莓根癌土壤杆菌有明显的抑制起瘤作用。JK10 发酵液田间防病效果明显,且 JK10 基因组中存在多种脂肽类和聚酮类物质的合成基因,生防前景良好。

关键词:解淀粉芽孢杆菌;蓝莓根癌病;生物防治;内生菌

中图分类号:S436.639 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2022)04-0891-09

Identification and Control Efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* JK10 Against Blueberry Crown Gall

YAO Bo¹,HE Yilu^{1*},ZHANG Jinhao¹,WEI Lanfang²,CUI Xingguo³,JI Guanghai^{1*}

(1. Agricultural Foundation Experiment Teaching Center, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Agricultural Foundation Experiment Teaching Center, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. Qujing Jiawo Modern Agriculture Co., Qujing, Yunnan 655000, China)

收稿日期:2022-01-15 修回日期:2022-03-20

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFD1002004)

Project supported by the National Key R&D Program Projects(2019YFD1002004)

作者简介:姚博, orcid.org/0000-0002-8122-9004, 953228875@qq.com; * 共同第一作者; * 通信作者:姬广海,教授,博士,博士生导师,主要从事植物病害生物防治研究, orcid.org/0000-0002-7136-7278, 550356818@qq.com。

Abstract: [Objective] Crown gall caused by *Agrobacterium tumefaciens* is an emerging threat to the commercial production of blueberry. Biological control plays an important role in mitigating the disease incidence. With an isolated native endophytic strain from the roots of a healthy blueberry plant, this study aims to identify its species, evaluate its field control effect on blueberry root cancer, and explore preliminarily its possible active substances, thus laying a theoretical foundation for the biological control of blueberry root cancer and the development of fungicides in Yunnan. [Method] Based on morphological characteristics, physiological-biochemical determination, and PCR amplification of 16s rDNA and gyrB genes, the isolated strain was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* JK10. The plate confrontation method and model plant (sunflower, tomato) were used to investigate JK10 antagonistic effects on blueberry root cancer pathogens and its effect on tumorigenesis; the field control effect of strain JK10 on blueberry root cancer was further verified by root irrigation. Synthetic genes of related substances in JK10 genome were detected by using polyketide and lipopeptide gene specific primers. [Result] In-vitro assay, the isolated strain JK10 showed a strong antagonistic effect against *A. tumefaciens* and inhibition zone diameter was recorded 22±1.2 mm. In the greenhouse, assays JK10 significantly suppressed the incidence of gall formation in sunflower and tomato model plants with control effects of 94.28% and 87.09%, respectively. In the field experiments, JK10 reduced the gall formation with a control effect of more than 50% increased the fruit setting rate and fresh weight of 100 fruits by about 15.50% and 22.01%, respectively, compared with control. PCR amplification of polyketides and lipopeptides biosynthesis genes revealed that the genome of JK10 contains genes related to polyketides and lipopeptides and can produce antimicrobial substances. [Conclusion] This study highlights the potential of *B. amyloliquefaciens* JK10 to mitigate the crown gall disease of blueberry. The results suggest that *B. amyloliquefaciens* JK10 is a novel biocontrol agent for sustainable agriculture and a suitable candidate for the production of biopesticides.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*; Blueberry crown gall; biological control; endophyte

【研究意义】蓝莓 (*Vaccinium* spp.) 又名笃斯、甸果、越桔等, 为杜鹃花科越橘属多年生低灌木。蓝莓作为一种新兴果树, 近年在许多国家发展迅猛^[1-2]。中国作为亚洲蓝莓的主要栽培国家, 2020年栽培面积已经超过6万hm², 全国规模化种植省、直辖市、自治区达到27个^[3-4]。云南地区由根癌土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 引起^[5]的蓝莓根癌病目前已经成为制约蓝莓产业发展的主要病害^[6], 而目前防治根癌病最有效的方法仍然是生物防治^[7]。【前人研究进展】2010年阿根廷科学家首次报道悬钩子土壤杆菌 *A. rubi* 和发根土壤杆菌 *A. rhizogenes* 能导致蓝莓冠瘿瘤^[8]。2019年德国科学家报道了一种分离自杜鹃冠瘿瘤组织的根瘤菌 *Rhizobium tumorigenes* 也能引起蓝莓冠瘿瘤^[9]。2011年傅俊范等^[6]首次报道了中国辽宁、吉林、山东及黑龙江省蓝莓园区内蓝莓根癌病原菌为根癌土壤杆菌 *A. tumefaciens*。2021年张荣琴等^[5]对云南滇中地区蓝莓根癌病原菌进行鉴定明确其为根癌土壤杆菌; 目前蓝莓根癌病的防治主要采用农业防治和化学防治。农业防治包括调节土壤pH、选用健康苗木, 剔除发病苗木、中耕施肥避免伤根、防治线虫等。化学防治主要包括使用链霉素、波尔多液进行土壤消毒, 病株使用噻霉酮、乙蒜素、硫酸铜、农用链霉素等灌根^[4-5, 10-11]。20世纪70年代Kerr首次报道了利用放射性土壤杆菌 *A. radiobacter* K84菌株防治桃树根癌^[12]。随后, 陆续有生物防治根癌病的报道。甲基营养型芽孢杆菌 *B. methylotrophicus* 39b、解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* 32a通过产生脂肽类物质抑制根癌土壤杆菌的生长达到生防的目的^[13-14]。其它用于防治根癌病的生防菌有利迪链霉菌^[15]、产碱杆菌^[16]等。但目前除K84菌株外, 其余菌株仅用于试验研究均未在田间规模化应用, 国内也未见登记的防治根癌病新的生防制剂, 具体的生防机制也不明确。【本研究切入点】目前国内外尚无蓝莓根癌病生物防治的报道, 本研究前期通过大量的室内筛选, 得到一株对蓝莓根癌土壤杆菌有良好拮抗效果的生防菌JK10。【拟解决的关键问题】明确一株对蓝莓根癌土壤杆菌有拮抗效果的生防菌的种类, 评价其温室及田间防效, 初步探索其可能存在的活性物质, 为蓝莓根癌病的绿色防控提供安全有效的技术支撑和理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

蓝莓根癌土壤杆菌L-11(16S rDNA登录号:MK910214.1)由蓝莓冠瘿瘤中分离得到^[5];JK10(16S rDNA登录号:OL825023)为蓝莓健康根内生细菌中筛选得到的一株具有广谱抑菌活性的生防细菌。番茄(中蔬4号)、向日葵(绿宝美食葵)均为市场购买;试验于云南农业大学和云南省曲靖佳沃现代农业有限公司完成,田间试验蓝莓品种为“Jewelry”,5年生苗。

1.2 培养基

YEM培养基:参考魏兰芳等^[17];解淀粉芽孢杆菌优化发酵培养基:以刘京兰等^[18]配方为基础对解淀粉芽孢培养基进行改良,改良后培养基命名为BA培养基(1 L),配方为工业蛋白胨11.25 g、酵母浸粉3.75 g、工业蔗糖5 g、马铃薯淀粉5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g、NaCl 1 g,自来水定容至1 L,使用1 mol/L的NaOH溶液将pH调至7.0,分装后灭菌备用。

1.3 试验方法

1.3.1 JK10形态学观察与生理生化检测 JK10在LB培养基上活化后,观察菌落的隆起形状、透明度、颜色、质地、边缘等,挑取少许单菌落经革兰氏染色后置于光学显微镜下观察。JK10生理生化测定,并参考《常见细菌系统鉴定手册》进行鉴定。

1.3.2 JK10基因组DNA提取与16S rDNA、*gyrB*基因扩增 使用细菌总DNA提取试剂盒提取JK10基因组DNA;参照姚锦爱等^[19]的方法与引物序列,对16S rDNA、*gyrB*基因扩增,将PCR产物送至北京擎科生物科技有限公司测序。

1.3.3 JK10分子鉴定 将16S rDNA、*gyrB*基因序列提交到NCBI核酸数据库中,进行BLAST分析,对比GenBank中现有细菌的16S rDNA、*gyrB*序列,挑选相似序列,利用MEGA-X进行系统发育分析,采用邻接法构建系统发育树,通过Bootstrap分析评价结果稳定性,重复数为1 000,分析同源性关系较近的菌株^[20-21]。

1.3.4 JK10对蓝莓根癌土壤杆菌的拮抗作用及抑制起瘤效果 挑取在LB培养基上纯化后的JK10单菌落,接入到BA培养基中30℃、160 r/min摇瓶培养36 h备用。将YEM平板上生长蓝莓根癌病原菌用无菌水稀释成 $\text{OD}_{600}=0.3$ 左右的菌悬液^[22],吸取100 μL 于新的YEM平板涂布均匀。平板内均匀放置3只牛津杯,处理中加100 μL JK10菌液,无菌水作为对照。28℃培养箱中放置36 h后测量抑菌圈直径,以此评价JK10对蓝莓根癌土壤杆菌的拮抗效果。

L-11、JK10纯化后分别挑取单菌落于LB、BA培养基中,28℃、150 r/min摇床内过夜培养,然后使用无菌水分别将其 OD_{600} 值调整到1.0备用;参考高之蕾等^[16]的接种方法和陶铁男等^[23]的分级标准,以向日葵与番茄作为高感培养植株^[24]评价JK10对蓝莓根癌土壤杆菌的抑制起瘤效果。每个处理或对照10棵向日葵苗,3次重复,参考王红艳^[25]方法将拮抗菌与病原菌按照1:1混合后接种至出苗10 d的向日葵苗子叶处,距离子叶下方5 cm处再接种1次。30 d后使用游标卡尺测量瘤状物直径和向日葵茎粗,统计病情指数,计算JK10的防治效果。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{病级株数} \times \text{代表数值}) \times 100}{(\text{调查总株数} \times \text{最高级代表值})} \quad (1)$$

参考万其露^[26]的接种方法和陶铁男等^[23]的分级标准,取上述混合后的混合菌悬液接种于30 d苗龄的番茄苗茎基部与距离茎基部5 cm的位置,每棵番茄接种2处,每个处理或对照10棵番茄苗,重复3次。60 d后参考使用游标卡尺测量瘤状物直径和番茄茎粗,统计病情指数。

1.3.5 菌株JK10对蓝莓根癌病的田间防治效果 JK10纯化后挑取单菌落接种于BA液体培养基中,1 L三角瓶装液量500 mL,30℃、160 r/min摇床培养36 h(菌量为 5×10^{10} cfu/mL)后带到蓝莓基地内进行灌根。选取蓝莓基地内发病中等较轻且一致的区域进行试验,每个小区30棵蓝莓苗,每个处理或对照重复3个小区,每棵处理每次灌根稀释50倍菌液(菌量为 1×10^9 cfu/mL)2 L,清水作为对照。1月10日开始,连续灌根3次,2次灌根间隔30 d。4月初调查座果率,5月调查3次百粒质量,7月底调查植株根部新瘤发生率以及病情指数。

1.3.6 JK10活性物质初探 生防菌JK10聚酮类和脂肽类化合物合成相关基因的检测参照桑建伟等^[27]设

计的引物序列,使用 *beaS*、*bacA*、*dfnA*、*dhbA*、*bmyA*、*fenA*、*ituC*、*srfAA* 这 8 对聚酮类和脂肽类化合物合成相关基因特异引物,对内生细菌 JK10 的基因组 DNA 进行扩增,然后使用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 数据分析

使用 SPSS 20 和 Excel 2016 软件处理分析数据,显著差异水平 $P<0.05$ 用小写字母表示。参考张荣琴等^[5]的分级标准将蓝莓根癌病的发生程度分为 4 个等级(表 1)。新瘤一般特征为乳白色且较小,较软;老瘤颜色为深褐色,表面坚硬且较大。

新瘤发生率=(出现新瘤病株数/调查株数)×100% (2)

病情指数=Σ(发病株数对应病情等级)×100/(总株数最高病情等级) (3)

表 1 蓝莓根癌病分级标准
Tab.1 Grading standards for blueberry crown gall

级别 Disease grade	描述 Describe	代表数值 Representative value
I 级	植株健康,根部无冠瘿瘤	0
II 级	根部有 1~5 个冠瘿瘤,地上部基本正常	1
III 级	根部有 5 个以上冠瘿瘤,冠瘿瘤占相应段周面积 1/3 左右	2
IV 级	根部冠瘿瘤较多,且愈合成片;地上部矮小,叶部卷曲,枝条簇生,生长停滞	3

2 结果与分析

2.1 JK10 鉴定结果分析

纯化后的 JK10 于 NA 培养基,28 ℃ 恒温培养 24 h 后的菌落及菌株显微镜下的形态见图 1。由图 1A 可知,JK10 菌落呈乳白色或淡黄色、不透明、菌落扁平有褶皱、无光泽、边缘齿状;图 1B 显示,JK10 菌体近椭圆形,单个、成对或链状排列,革兰氏染色为阳性,芽孢中生。

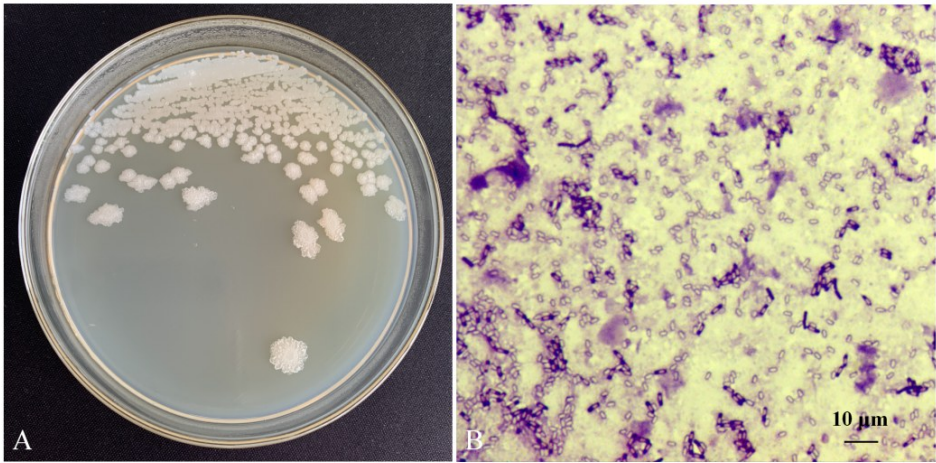


图 1 JK10 菌落形态(A)和显微观察(B)

Fig.1 JK10 colony morphology(A)and microscopic observation(B)

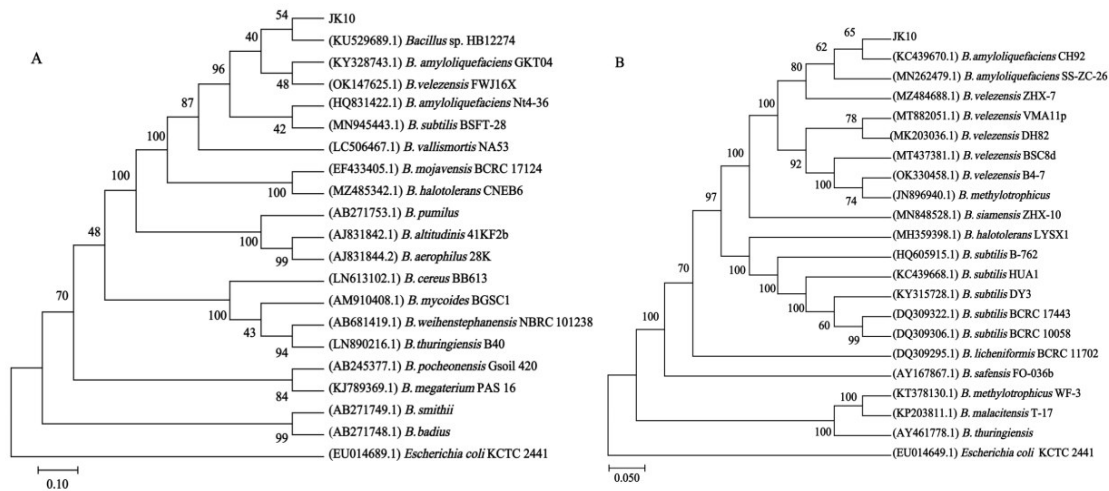
生理生化特征如表 2 所示,JK10 能利用淀粉、葡萄糖、麦芽糖、果糖等;卵磷脂降解、明胶水解、酪氨酸水解等反应为阳性。参考《常见细菌系统鉴定手册》可以发现 JK10 以下特征与芽孢杆菌特征吻合。

16S rDNA 比对结果显示,JK10 与 *Bacillus* sp. HB12274(KU529689.1) 同源性最高,为 99.24%,与 *B. amyloliquefaciens* GKT04(KY328743.1) 次之,为 99.23%。图 2A JK10 的 16S rDNA 系统发育树显示,JK10 与 *Bacillus* sp. HB12274、*B. amyloliquefaciens* GKT04 聚在同一分支内,说明生防菌 JK10 与这两株芽孢杆菌的遗传关系最近,可确定 JK10 为芽孢杆菌属菌株;挑选相似度 97% 以上的多个不同菌株 *gyrB* 基因序列进行分析,构建系统发育树。进化分析显示(图 2B),JK10 与所有的解淀粉芽孢杆菌都聚在了一起,且与亲缘关系较近的贝莱斯芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌分开,说明通过 *gyrB* 基因可以将 JK10 鉴定到种;结合形态学观察、生理生化测定、分子生物学鉴定结果,最终将 JK10 鉴定为解淀粉芽孢杆菌,命名为 *Bacillus amyloliquefaciens* JK10。

表 2 菌株 JK10 生理生化指标
Tab.2 Physiological and biochemical characteristics of JK10

指标 Index	特征 Characteristic	指标 Index	特征 Characteristic
革兰氏染色 Gram stain	+	氧化酶 Oxidase	—
芽孢染色 Spore staining	+	明胶水解 Gelatin hydrolysis	+
需氧性 O ₂	+	淀粉水解 Starch hydrolysis	+
运动性 Motility	+	酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	—
吲哚 Indole	—	柠檬酸盐 Citrate	+
蔗糖 Sucrose	+	D-甘露醇 D-mannitol	+
葡萄糖 Glucose	+	苯丙氨酸 Phenylalanine	—
麦芽糖 Maltose	+	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
果糖 Fructose	+	V.P.测定 Voges-proskauer	+
阿拉伯糖 Arabinose	+	厌氧生长 Anaerobic growth	—
棉子糖 Raffinose	—	葡萄糖产酸 D-glucose acid yield	+
半乳糖 D-galactose	—	硫化氢试验 Hydrogen sulfide test	—
木糖 Xylose	+	卵磷脂降解 Lecithin solubilization	+
接触酶 Catalase	+	Tween 80降解 Tween 80 degradation	—
甲基红试验 Methyl red test	—	50 g/L NaCl	+
3 ℃生长 Growth 3 ℃	—	70 g/L NaCl	—
芽孢位置 Spore location	中生	最适 pH Optimum pH	7.2

+: 阳性或能够利用; — : 阴性或不能利用。
+ Means positive or usable; — Means negative or unusable.



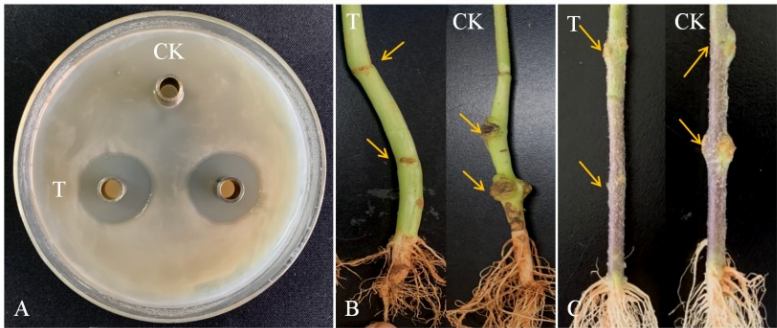
括号内的字母和数字组合为检索号。
The combination of letters and numbers in brackets is the retrieval number.

图 2 16S rDNA(A)与 gyrB(B)基因系统发育树
Fig.2 16S rDNA(A) and gyrB(B) gene phylogenetic tree

2.2 JK10 对蓝莓根癌土壤杆菌的拮抗作用及抑制起瘤效果

拮抗试验结果(图 3)显示,与对照相比 JK10 菌悬液对蓝莓根癌土壤杆菌有明显抑制效果,抑菌圈达到(22±1.2) mm,且边缘整齐,说明 JK10 菌悬液对蓝莓根癌土壤杆菌拮抗效果明显;向日葵活体接种试验结果表明,与只接种 L-11 菌悬液的对照相比,混合接种 JK10 与 L-11 菌悬液处理的向日葵苗病情指数为 5.0±0.66,而对照为 87.5±4.47,相对防效为 94.28%;番茄接种试验结果表明,同时接种 JK10 菌液的处

理病情指数为 10.0 ± 1.44 , 只接种病原菌 L-11 的对照病情指数为 77.5 ± 5.56 , 防效为 87.09%; 温室活体接种试验证明: 菌株 JK10 能有效抑制 L-11 引起的向日葵、番茄冠瘿瘤, 显著降低其病情指数, 可用于下一步田间试验。



A 为 JK10 对 L-11 的拮抗效果; B 为 JK10 对 L-11 引起的向日葵冠瘿瘤的影响; C 为 JK10 对 L-11 引起的番茄冠瘿瘤的影响。
A is the antagonistic effect of JK10 on L-11; B is the effect of JK10 on sunflower crown gall tumors caused by L-11;
C is the effect of JK10 on tomato crown gall tumors caused by L-11.

图 3 JK10 对蓝莓根癌土壤杆菌的拮抗作用以及抑制起瘤效果

Fig.3 The antagonistic effect of JK10 on blueberry *Agrobacterium tumefaciens* and its tumor-inhibiting effect

2.3 JK10对蓝莓根癌病的田间防治效果

与对照和乙蒜素相比, 蓝莓根癌病病区植株使用 JK10 菌液连续灌根 3 次后, 显著增加了蓝莓植株的座果率和百粒质量, 显著降低了蓝莓苗新瘤的出现率和病情指数(表 3)。连续灌根 3 次即有明显的田间防治效果和增产作用, 可用于蓝莓根癌病的田间防治。

表 3 JK10 对蓝莓根癌病的大田防效及产量的影响

Tab.3 The effect of JK10 on blueberry crown gall prevention and yield in the field

处理 Treatment	坐果率/% Fruition rate	百粒质量/g Hundred grainweight	新瘤出现率/% New tumor increase rate	病情指数 Disease index	相对防效/% Control effect
80% 乙蒜素 1 000 倍液	84.23a	210.4b	34.44b	28.89 ± 3.42^b	33.33
JK10	86.77a	245.6a	22.22b	18.89 ± 2.89^c	56.40
CK	75.12b	201.3b	72.22a	43.33 ± 5.78^a	—

同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

In the same column, significant difference between treatment is shown by the different small letters on the error bar according to t -test at $P<0.05$.

2.4 内生细菌 JK10 脂肽类和聚酮类化合物合成相关基因的检测

由图 4 可知, 以内生细菌 JK10 基因组 DNA 为模板, 可以扩增到 BacillomycinD、Fengycin、Iturin、Surfactin、Bacilysin、Bacillaene、Difficidin、Bacillibactin 对应的合成基因, 表明菌株 JK10 基因组 DNA 中含有上述 8 种脂肽类和聚酮类化合物合成基因。说明 JK10 发酵液中可能含有相关物质, 这些物质可能与其生防效果有关。

3 讨论与结论

本研究使用的 16S rDNA 与 *gyrB* 基因联合鉴定的方法, 近年来常被用于未知菌株的快速鉴定。傅奇等^[28]使用 16S 与 *gyrB* 基因联合建树快速准确鉴定了一株解淀粉芽孢杆菌。卢佳琦等^[29]结合生理生化和 16S rDNA 与 *gyrB* 基因鉴定了一株蜡样芽孢杆菌。16S rDNA 基因序列普遍应用于细菌鉴别或构造细菌系统发育进化树, 以弥补传统细菌鉴定的局限性, 但是由于 16S rDNA 序列间过高的相似度, 此方法难以区别亲缘关系接近的菌种^[30]。近年研究发现 *gyrA* 基因 *gyrB* 基因可弥补 16S rDNA 基因法的缺点而被普遍使用, 16S rDNA 和 *gyrB* 基因序列联合鉴定法是一种科学且被国际上认可的一种识别新分离物种身份的方法^[31]。

筛选拮抗细菌是根癌病生物防治的一个思路^[32], 李昱佳等^[7]筛选得到的桃内生菌泛菌 *Pantoea deleyi*

与肠杆菌 *Enterobacter cowanii*, 均能有效抑制根癌土壤杆菌引起的向日葵冠瘿瘤。高之蕾等^[16]筛选得到的粪产碱菌 *Alcaligenes faecalis* 对根癌土壤杆菌有良好拮抗作用, 且强烈抑制根癌向日葵、番茄起瘤。张锡唐等^[33]筛选得到的瓦雷兹芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* 菌株对樱花根癌病防效达到了 50%; 本研究使用 JK10 发酵液连续对蓝莓根癌病植株连续灌根 3 次后, 蓝莓根癌病植株新瘤发生率和病情指数较清水和乙蒜素对照都有显著降低, 且防效达到 56%, 并且对蓝莓植株的坐果率和百粒质量也有一定的提高。这与张荣琴等^[5]的研究结果防效 45% 相比, 提高了 11 个百分点, 这可能由于 JK10 来自健康蓝莓根组织内生菌, 相较于其他生防菌更容易定殖。脂肽类与聚酮类化合物是解淀粉芽孢杆菌产生的常见抑菌物质。解淀粉芽孢杆菌 32a 和甲基营养型芽孢杆菌 39b 除能产生芽孢杆菌霉素外, 还产生脂肽类混合物, 且对根癌土壤杆菌引起的番茄冠瘿瘤防治效果良好^[14,34]。

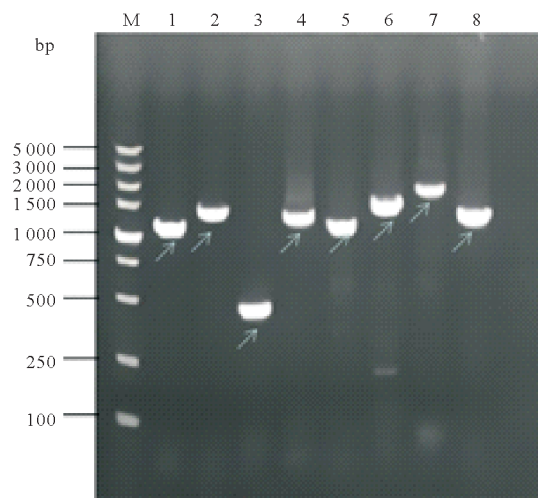
Chakraborty 等^[35]报道的解淀粉芽孢杆菌可产生多种聚酮类物质, 对副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*、创伤弧菌 *V. parahaemolyticus* 有良好的抑制效果。Chen 等^[36]报道的贝莱斯芽孢杆菌 *B. velezensis* CLA178 产生的大环内脂类抗生素 macrolactin 对根癌土壤杆菌 C58 有较好的抑制活性。本研究通过对菌株 JK10 基因组中相关基因的扩增, 证明其代谢物中可能存在多种脂肽类和聚酮类物质, 具体哪种是主要抑制蓝莓根癌土壤杆菌的物质还有待研究。

本研究结合形态观察、生理生化测定和分子鉴定明确一株生防菌 JK10 为解淀粉芽孢杆菌。室内拮抗试验和温室活体接种试验证明菌株 JK10 对蓝莓根癌土壤杆菌 L-11 有良好拮抗作用和抑制起瘤的效果。田间防效试验证明, JK10 发酵液对蓝莓根癌病的田间防治效果良好, 相对防效为 56.4%, 且有一定的增产作用, 可以用作生防菌剂的开发和蓝莓根癌病的田间防治。

致谢: 云南省“万人计划”产业技术领军人才(YNWR-CYJS-2019-046)同时对本研究给予的资助, 谨致谢意!

参考文献 References:

- [1] 丰震, 许景伟, 范广武, 等. 蓝莓引种可行性浅析[J]. 山东林业科技, 2001(2): 34-36.
FENG Z, XU J W, FAN G W, et al. Feasibility analysis of blueberry introduction[J]. Journal of Shandong forestry science and technology, 2001(2): 34-36.
- [2] 聂飞, 韦吉梅, 文光琴. 蓝莓的经济价值及其在我国产业化发展的前景探讨[J]. 贵州农业科学, 2007, 35(1): 117-119.
NIE F, WEI J M, WEN G Q. Discussion on economical values of blueberry and its industrial development prospect in China [J]. Guizhou agricultural science, 2007, 35(1): 117-119.
- [3] 李亚东, 裴嘉博, 孙海悦. 全球蓝莓产业发展现状及展望[J]. 吉林农业大学学报, 2018, 40(4): 421-432.
LI Y D, PEI J B, SUN H Y. Status and prospect of global blueberry industry[J]. Journal of Jilin agricultural university, 2018, 40(4): 421-432.
- [4] 高勇, 刘海明, 郝宝华. 蓝莓根癌病的发生与防治[J]. 烟台果树, 2021, 155(3): 46.
GAO Y, LIU H M, HAO B H. Occurrence and control of blueberry crown gall[J]. Yantai fruit, 2021, 155(3): 46.
- [5] 张荣琴, 万效琰, 张晋豪, 等. 云南蓝莓根癌病病原鉴定及其防控药剂的筛选[J]. 中国农学通报, 2021, 37(16): 119-126.
ZHANG R Q, WAN X Y, ZHANG J H, et al. Pathogen identification of blueberry crown gall disease in Yunnan Province and screening of control gentas in field[J]. Chinese agricultural science bulletin, 2021, 37(16): 119-126.
- [6] 傅俊范, 彭超, 严雪瑞, 等. 蓝莓根癌病发生调查及病原鉴定[J]. 吉林农业大学学报, 2011, 33(3): 283-286.
FU J F, PENG C, YAN X R, et al. Investigation and identification of blueberry crown gall[J]. Journal of Jilin agricultural uni-



M 为 DL 5 000 Maker; 1-8: *bmyA*, *fenA*, *ituC*, *srfAA*, *bacA*, *beaS*, *dfnA* 和 *dhbA*。
M: DL 5 000 Maker; 1-8: *bmyA*, *fenA*, *ituC*, *srfAA*, *bacA*, *beaS*, *dfnA* and *dhbA* of the strain JK10.

图4 脂肽类与聚酮类合成基因 PCR 检测
Fig.4 The PCR detection of lipopeptide and polyketide compounds synthesis gene

- versity, 2011, 33(3): 283-286.
- [7] 李昱佳, 李茜, 张志想, 等. 拮抗根癌土壤杆菌的桃内生细菌的筛选鉴定[J]. 中国农业科学, 2017, 50(20): 3918-3929.
LI Y J, LI Q, ZHANG Z X, et al. Screening and identification of peach endophytic bacteria with antagonism against *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Scientia agricultura Sinica, 2017, 50(20): 3918-3929.
- [8] ALIPPI A M, LOPEZ A C, BALATTI P A. First report of *Agrobacterium rubi* and *A. rhizogenes* causing crown and root gall and hairy root on blueberry in argentina [J]. Plant disease, 2010, 94(8): 1064-1065.
- [9] KUZMANOVI N, BEHRENS P, IDCZAK E, et al. A novel group of *Rhizobium tumorigenes*-like *Agrobacteria* associated with crown gall disease of rhododendron and blueberry [J]. Phytopathology, 2019, 109(11): 1840-1848.
- [10] 苏佳明, 沙玉芬, 李公存, 等. 蓝莓主要病虫害及其防控措施[J]. 烟台果树, 2012, 120(4): 46-48.
SU J M, SHA Y F, LI G C, et al. Main diseases and insect pests of blueberry and their control measures [J]. Yantai fruit, 2012, 120(4): 46-48.
- [11] 王琴. 辽宁省蓝莓主要病虫害及防治方法[J]. 宁夏农林科技, 2018, 59(3): 11-13.
WANG Q. Main pests and diseases of blueberry and its control methods in Liaoning province [J]. Ningxia journal of agriculture and forestry science and technology, 2018, 59(3): 11-13.
- [12] KERR A, HTAY K. Biological control of crown gall through bacteriocin production [J]. Physiological plant pathology, 1974, 4(1): 37-44.
- [13] BEN A D, FRIKHA G O, TOUNSI S. *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as a source of lipopeptides for biocontrol of *Agrobacterium tumefaciens* strains [J]. Journal of applied microbiology, 2015, 119(1): 196-207.
- [14] FRIKHA G O, BEN A D, GHORBEL I, et al. Lipopeptides from a novel *Bacillus methylotrophicus* 39b strain suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants [J]. Pest management science, 2017, 73(3): 568-574.
- [15] 季敬霖, 刘志民, 马焕普. 桃根癌病菌拮抗放线菌抑菌活性物质的分离及其初步鉴定[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(15): 9013-9016.
JI J L, LIU Z M, MA H P. Isolation and preliminary identification of antimicrobial peptides produced by antagonistic actinomycetes against peach crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*) [J]. Journal of Anhui agricultural science, 2011, 39(15): 9013-9016.
- [16] 高之蕾, 李茜, 郭荣君, 等. 2株桃树根际细菌 *Alcaligenes faecalis* 对根癌病的抑制作用[J]. 果树学报, 2015, 32(2): 267-273.
GAO Z L, LI Q, GUO R J, et al. Suppression effect of two peach rhizobacteria *Alcaligenes faecalis* on crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Journal of fruit science, 2015, 32(2): 267-273.
- [17] 魏兰芳, 张荣琴, 姚博, 等. 大豆轮作及秸秆还田模式对白菜根肿病的影响[J]. 江西农业大学学报, 2021, 43(1): 52-62.
WEI L F, ZHANG R Q, YAO B, et al. Effect of rotating soybean and its straw returning on Chinese cabbage clubroot disease [J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2021, 43(1): 52-62.
- [18] 刘京兰, 薛雅蓉, 刘常宏. 内生解淀粉芽孢杆菌 CC09 产 Iturin A 摇瓶发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 75-82.
LIU J L, XUE Y R, LIU C H. Optimization of shake flask-fermentation conditions for Iturin A production by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* CC09 [J]. Microbiology China, 2014, 41(1): 75-82.
- [19] 姚锦爱, 黄鹏, 赖宝春, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 ZZBV-3 的鉴定及其对草莓根腐病的防效[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(1): 172-177.
YAO J A, HUANG P, LAI B C, et al. Identification and control efficacy of *Bacillus velezensis* ZZBV-3 against strawberry root rot [J]. Chinese journal of biological control, 2021, 37(1): 172-177.
- [20] LIU H, LI J B, ZHANG Q X. Lie symmetry analysis and exact explicit solutions for general burgers' equation [J]. Journal of computational and applied mathematics, 2009, 228(1): 1-9.
- [21] 刘勇, 刘希强, 王振立. (2+1) 维 Potential Boiti-Leon-Manna-Pempinelli 方程的对称、约化和精确解[J]. 量子电子学报, 2014, 31(5): 533-540.
LIU Y, LIU X Q, WANG Z L. Symmetries, reductions and exact solutions of (2+1) dimensional potential boiti-leon-manna-pempinelli equation [J]. Chinese journal of quantum electronics, 2014, 31(5): 533-540.
- [22] 魏艳丽, Ryder M, 李纪顺, 等. 土壤杆菌 K1026 对樱桃冠瘿病原菌的抑制作用及田间防治效果[J]. 植物保护, 2017, 43(5): 52-56.

- WEI Y L, RYDER M, LI J S, et al. Suppression of the pathogen of cherry crown gall disease by *Agrobacterium rhizogenes* K1026 and its control effect in the field[J]. Plant protection, 2017, 43(5): 52-56.
- [23] 陶铁男, 明发源. 主要农作物灾害评估[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010.
- TAO T N, MING F Y. The assessment of disease on main crops[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2010.
- [24] ANDERSON A R. Host specificity in the genus *Agrobacterium*[J]. Phytopathology, 1979, 69(4): 320-323.
- [25] 王红艳. 樱桃和樱花根癌病病原及生物防治研究[D]. 北京: 中国农业大学, 1998.
- WANG H Y. Study on pathogen and biological control of cherry and flowering cherry crown gall[D]. Beijing: China Agricultural University, 1998.
- [26] 万其露. 桃树根癌病病原分离及拮抗菌筛选研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2016.
- WAN Q L. The study on peach tree crown gall pathogen and the screening of antagonistic microorganisms[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2016.
- [27] 桑建伟, 杨扬, 陈奕鹏, 等. 内生解淀粉芽孢杆菌 BEB17 脂肽类和聚酮类化合物的抑菌活性分析[J]. 植物病理学报, 2018, 48(3): 402-412.
- SANG J W, YANG Y, CHEN Y P, et al. Antimicrobial activity analysis of lipopeptides and polyketones of endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* BEB17[J]. Acta phytopathologica Sinica, 2018, 48(3): 402-412.
- [28] 傅奇, 林俊杰, 冯亚栋, 等. 16S 与 *gyrB* 基因联合建树快速鉴定一株解淀粉芽孢杆菌[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(12): 116-120.
- FU Q, LIN J J, FENG Y D, et al. Identification of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain using a phylogenetic tree based on 16S and *gyrB* sequences[J]. Food and fermentation industry, 2020, 46(12): 116-120.
- [29] 卢佳琦, 李市场, 王大红, 等. 16S rDNA 与 *gyrB* 序列联合法鉴定一株蜡样芽孢杆菌[J]. 河南科技大学学报(自然科学版), 2018, 170(1): 73-77.
- LU J Q, LI S C, WANG D H, et al. Identification of a *Bacillus cereus* by 16S rDNA and *gyrB* sequence[J]. Henan university of science and technology (natural science edition), 2018, 170(1): 73-77.
- [30] WANG M, LI X, ZHA J. The (G'/G)-expansion method and travelling wave solutions of nonlinear evolution equations in mathematical physics[J]. Physics letters A, 2017, 372(4): 417-423.
- [31] 别小妹, 陆兆新, 房耀维, 等. 利用 16S rDNA 序列分析鉴定一株产抗菌物质的微生物菌株[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 466-470.
- BIE X M, LU Z X, FANG Y W, et al. Identification of a microorganism strain producing the antimicrobial substance with 16S rDNA sequence analysis[J]. Food science, 2006, 27(11): 466-470.
- [32] 孔庆科, 丁爱云. 内生细菌作为生防因子的研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2001, 32(2): 256-260.
- KONG Q K, DING A Y. Research progress of endophytic bacteria as biocontrol factors[J]. Journal of Shandong agricultural university (natural science edition), 2001, 32(2): 256-260.
- [33] 张锡唐, 吴小芹, 陈飞. 瓦雷兹芽孢杆菌 JK-XZ8 对樱花根癌病的防效与抑菌物质初探[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2020, 40(5): 75-82.
- ZHANG X T, WU X Q, CHEN F. The control effect of *Bacillus velezensis* JK-XZ8 on cherry blossom crown gall and preliminary study on its antibacterial substance[J]. Journal of Shanxi agricultural university (natural science edition), 2020, 40(5): 75-82.
- [34] ABDALLAH D B, TOUNSI S, GHARSALLAH H, et al. Lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as promising biocontrol compounds against the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Environmental science and pollution research, 2018, 25(36): 36518-36529.
- [35] CHAKRABORTY K, THILAKAN B, RAOLA V K. Previously undescribed antibacterial polyketides from heterotrophic *Bacillus amyloliquefaciens* associated with seaweed padina gymnospora[J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2018, 184(2): 716-732.
- [36] CHEN L, WWANG X, LIU Y. Contribution of macrolactin in *Bacillus velezensis* CLA178 to the antagonistic activities against *Agrobacterium tumefaciens* C58[J]. Archives of microbiology, 2021, 203(4): 1743-1752.