

## 烟草叶围细菌的分离及其对 *Alternaria alternata* 的拮抗作用

张成省<sup>1</sup>, 孔凡玉<sup>1\*</sup>, 李多川<sup>2</sup>, 王静<sup>1</sup>, 王凤龙<sup>1</sup>

(1中国农业科学院烟草研究所, 青岛, 266101; 2山东农业大学, 泰安, 271018)

**【摘要】**分离到烟草叶围细菌136株, 通过对峙培养实验筛选出对烟草赤星病菌 *A. alternata* 有较强拮抗活性的9个菌株。离体叶片生防测定实验表明, 9株细菌均能不同程度的减轻烟草赤星病的发生。其中菌株Tpb88具有较强和稳定的拮抗作用, 无菌滤液实验表明, 叶围细菌Tpb88在一定浓度范围内能有效抑制 *A. alternata* 菌丝生长、孢子萌发和芽管伸长, 且浓度越高, 抑制能力越强。本研究结果表明 Tpb88 对烟草赤星病菌的拮抗机制可能为抗菌物质的产生。

**【关键词】**生物防治 叶围细菌 *Alternaria alternata*

烟草赤星病, 病原物为 *Alternaria alternata*, 是烟叶成熟后期重要的叶部病害, 在我国各烟区均有发生, 直接影响烟叶的产量和质量。长期以来, 主要以利用抗病品种和化学防治为主。但是理想的抗病品种很难获得, 并容易丧失抗性。化学防治在病害防治中起到重要作用, 但又受到三个因素的限制: 目前高效低毒的杀菌剂农药品种较少; 环境条件对防治效果影响很大, 在环境条件适宜病原菌侵入和传播时, 防治效果不令人满意; 容易造成环境污染。生物防治对环境友好, 在某些情况下具有良好的防治效果, 并成为目前研究和开发的热点<sup>[1]</sup>。

叶围微生物 (phyllosphere microbe) 指的是附生或寄生于植物叶部周围的微生物。植物叶围分布着大量微生物细菌, 它们与植物病原菌具有相同的生态位, 在植物-微生物复杂的微生态关系中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。其中有一些微生物可以通过拮抗、竞争、促生以及诱导植物抗性 (HR) 等作用来抑制植物病害的发生发展<sup>[3, 4]</sup>, 具有潜在的开发和利用价值。作者从烟草叶围分离出对烟草赤星病菌具有显著拮抗作用的两株拮抗细菌, 并选择一株优良菌株Tpb88 进行拮抗实验, 以明确其拮抗力及拮抗机理, 为大田应用提供实验依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 供试材料

供试菌株为烟草叶围分离微生物Tpb 1~136, 测试病原菌为强致病力烟草赤星病菌 *A. alternata*, 由田间分离获得。供试烟草品种为云烟85。

#### 1.2 叶围细菌的分离和纯化

将采集的烟草叶片用清水洗净并剪成2~3cm 的小段, 用无菌水漂洗3 次后, 置于600mL烧杯中, 加入400 mL无菌水和0.5 mL吐温-80, 在摇床上振荡10 min (110 r/ min, 25±1℃)。取冲洗液1mL, 均匀涂布于NA 培养基, 倒置于26℃ 的培养箱中48h, 挑取单菌落分离纯化并作为参试菌株, 并用Tpb编号。通过这种方法共得到136个菌株, 即Tpb1~136。

#### 1.3 拮抗活性测定

采用对峙培养法<sup>[5]</sup>。在PDA平板中心首先接种烟草赤星病菌菌块 (直径3mm), 放置24h, 然后在菌块两侧3cm处, 划线接筛选菌, 对照不接筛选菌。在26℃恒温下培养8d后, 测量各拮抗菌的抑菌带宽度和病原菌的长、宽度。该试验重复2次, 每次设3个重复。

#### 1.4 稳定性测定

将拮抗性好的菌株转移5代以上, 继续观察其抑菌作用, 测抑菌带宽度。

#### 1.5 离体叶片的防效测定筛选

参照Frabvel D R<sup>[6]</sup>方法进行。盛防烟叶的托盘用70%酒精消毒并用无菌水冲洗, 将对峙培养的分离物在PD培养液中, 26℃、120r/min震荡培养36h, 取培养液 (约107-8cfu/ml) 与等体积赤星病菌孢子液混合, 吸取25μl混合液悬滴接种于经表面消毒的烟草云烟85离体叶片上。每分离物接种3片叶, 每叶12滴, 以PD培养基与等体积赤星病菌混合液接种的叶片作对照, 26℃保湿培养。7d后统计病情, 计算病指及防效。

#### 1.6 细菌无菌滤液和赤星病菌孢子悬浮液的制备

Tpb88转至PDA培养基上, 在26℃下培养24h, 然后在含100 mL PD培养基的250ml的三角瓶中, 26℃、150r/min振荡

培养48h, 10,000g离心20min, 通过0.22μm微孔膜过滤, 滤液在4℃下保存备用。

取培养7-10d(26℃)的烟草赤星病菌配成悬浮液, 1, 500 g离心3 min去除菌丝, 取上清, 将孢子浓度调为2, 000 s/mL, 立即与等体积无菌滤液混合, 孢子终浓度为1, 000 s/mL。

## 1.7 菌株Tpb88无菌滤液对赤星病菌生长的影响

### 1.7.1 对赤星病孢子萌发的抑制作用

将无菌滤液分别稀释50倍、200倍、400倍(v:v), 与赤星病菌孢子悬浮液混合, 置载玻片上, 保湿, 室温下培养, 于6、12、24h、48h后镜检其孢子的萌发, 以芽管长度超过分生孢子小端直径一半时被记录为萌发, 每处理重复3次, 计算孢子萌发抑制率, 每个视野至少检查100个孢子。以未接菌的PD培养液以相同比例与赤星病菌孢子悬浮液混合作对照。

### 1.5.2 对赤星病菌菌丝生长的影响

参照Homma et al等<sup>[7]</sup>菌落直径法。将直径3 mm赤星病菌块移至含不同浓度Tpb88无菌滤液(稀释200倍、400倍、1600倍、6400倍和12800倍)的平板, 以未接菌的PD培养液按比例制成的平板作对照, 每处理重复3次, 26℃恒温培养6d, 测量各处理菌块的增长直径, 计算抑制率。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟草叶围拮抗细菌的分离与筛选

分离纯化获得136个菌株, 编号为Tpb1~ Tpb136。初步拮抗测定筛选到有较好拮抗性的菌株有23株(17%)。在PDA平板上作对峙测定, 抑菌带宽度>5.5mm的有9株, 即Tpb114, Tpb25, Tpb88, Tpb104, Tpb17, Tpb31, Tpb121, Tpb73 and Tpb55 (Tab. 1)。其中Tpb55和Tpb88的抑制效果最好, 其抑菌带宽度分别达13.8和15.3mm, 对病原菌菌落扩展有强烈的抑制作用。

表1 烟草赤星病菌拮抗细菌的筛选

Table 1 Screening of Antagonistic Bacteria

菌株 Strains tested	Dual culture analysis 对峙培养			Detached leaf biocontrol assays 离体生测		
	I/mm	P/mm	A /mm	Di/%	Dx	Ds/%
CK	-	74.3×75.1	-	100	100	-
Tpb114	5.9h	69.8×37.6	62.3×9.8	90.1	100	0
Tpb25	6.9g	68.5×37.2	56.8×17.4	93.5	85	15
Tpb73	7.6f	67.6×36.9	66.2×12.4	84.7	80	20
Tpb104	8.5e	60.5×36.1	61.9×11.8	85.6	80	20
Tpb17	8.6e	59.7×34.2	61.0×12.3	77.4	78	22
Tpb31	9.5d	55.4×33.6	68.4×9.6	78.6	65	35
Tpb121	10.2c	52.1×30.7	56.4×11.4	70.6	51	49
Tpb55	13.8b	43.2×26.9	57.5×15.3	69.0	23	77
Tpb88	15.3a	32.6×22.0	63.6×3.0	58.2	16	84

\* I: 抑菌带, P: 病原菌菌落(长×宽), A: 拮抗细菌(长×宽), Di: 发病率, Dx: 病指, Ds: 病害抑制率。I: Inhibition zone, P: Pathogen (length×width), A: Antagonistic bacteria(length×width), Di: Disease incidence, Dx: Disease index, Ds: Disease suppression.

\*\* 表中同一字母标注的数值差异不显著(LSD, P < 0.05)。Values followed by the same letter within a column are not significantly different.



图1 拮抗菌 Tpb55 和 Tpb88 对赤星病菌的拮抗作用

拮抗菌除产生明显的抑菌带外，对赤星病菌生长也有影响，菌落边缘和抑菌带接触部位菌丝溶解，整个菌落的生长明显受到抑制。赤星病菌菌落(长×宽)处理与对照相比，对照病菌生长正常，菌落铺展平板呈圆形扩展，而受拮抗的病原菌呈梭形生长，且长、宽度均受抑制。Tpb55和Tpb88在平板上的拮抗作用见图1，菌株转移5代以上，抑菌带的宽度仍达8 mm以上。

## 2.2 离体叶片防效测定

离体叶片防效测定，Tpb88和Tpb55效果较好，其它菌株防效较差，甚至无防效(表1)。

## 2.3 菌株Tpb88对烟草赤星病菌孢子萌发的抑制作用

抑制孢子实验测定结果表明，菌株Tpb88无菌滤液对 *A. alternata* 孢子萌发具有强烈的抑制作用，且抑制效果与无菌滤液浓度正相关。在无菌水中(对照)，48 h后*A. alternata* 孢子芽管伸长平均超过560 μm。稀释50倍，6 h内无菌滤液孢子萌发抑制率达100%，稀释200倍和400倍，*A. alternata* 孢子萌发率为15.6%和23.4%，显著低于对照处理的47.4%(表2)。

表2 Tpb88无菌滤液抑制*A. alternata*孢子萌发试验

Table 2 Effects on spore germination and elongation of germ tubes of *A. alternata*

Times of cultivation (hours)	Fungal spores in water		Proportion of filtrate to fungal spores in the mixture					
			1:50		1:200		1:400	
	A*	B	A	B	A	B	A	B
6	47.4	14-31	0	0	15.6	8-22	23.4	10-24
12	69.8	16-102	10.7	7-20	22.3	12-31	35.6	12-50
24	86.3	>380	22.3	14-33	40.1	50-70	55.8	>70
48	91.2	>550	37.1	30-60	58.9	>120	70.0	>150

\* A : 孢子萌发率; B: 芽管长度(μm)。A: % of germinated spores. B: length of germ tube in μm.

## 2.4 菌株Tpb88无菌滤液对烟草赤星病菌菌丝生长的影响

Tpb88对烟草赤星病菌菌丝生长有强烈的抑制作用，稀释6400倍，抑制率仍达20%(图2)以上，与对照相比，各处理菌丝生长缓慢，且菌落稀薄。

## 3 讨论

植物病害的生物防治被认为是具有发展潜力的重要防治方法之一。本研究拟从自然生态环境中寻找有益细菌来抑制烟草赤星病的发生，以避免化学农药所产生的毒性和残留问题。筛选烟草叶围细菌用于烟草赤星病的防治，在国内还未见成功报道，国际上利用烟草叶围微生物防治赤星病也刚起步。从2002年开始，我们对赤星病叶围拮抗菌进行室内分离、筛选，共获得9个菌株对赤星病菌的生长具有较强的抑制作用，其中Tpb88是非常有希望的菌株。

控制病害的早期发展对拮抗细菌的成功生防是非常重要的<sup>[8]</sup>，有关这方面的研究较少。在细菌-真菌互作中，拮抗细菌在病害发展初期便产生大量的抑菌物质来控制病害的进一步的发展，显然更为合理。我们的研究表明Tpb88的抗菌机制极有可能是产生抗菌物质抑制早期赤星病菌孢子萌发和芽管伸长。

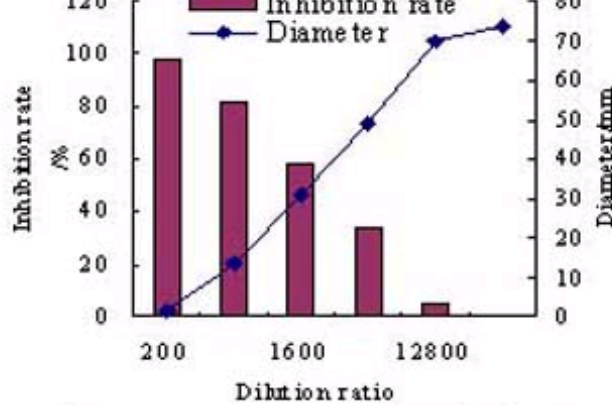


图2 Tpb88 对 *A.alternata* 菌丝生长的影响  
Fig.2 Effects on hyphal growth of *A.alternata*

叶围细菌是烟草叶片上的土著菌，占有一定的生态位，相较于其它菌株在烟草叶片上的定殖和存活能力强。离体生测结果表明，烟草叶围拮抗细菌Tpb88对烟草赤星病菌有较强的抑制能力，展现了良好的应用前景。有关菌株的田间应用效果及菌株特性和在烟草叶片上的定殖还需进一步研究。

国家烟草专卖局科教司资助 (110200201008)。

作者简介：张成省 (1976-)，男，硕士，助理研究员，研究方向为植物病理学。

\*通讯作者：kongfanyu123@163.com，主要研究方向为烟草病害生物防治和病理学研究。

#### 参考文献

- [1] Raaijmakers J M, Weller D M, Thomashow L S. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63:881-887
- [2] Bonsall R F, Weller D M, Thomashow L S. Quantification of 2,4- diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. in vitro and in the rhizosphere of wheat [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63:951-955
- [3] Whipps J M. Status of biological disease control in horticulture [J]. *Biocontrol Sci Technol*, 1992, 2: 3-24.
- [4] Kloepper JW (1991) Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents of soilborne diseases. In: *The biological control of plant diseases*. Bay-Petersen J (ed). FFTC book series no. 42. Food and Fertilizer Technology Center, Taipei, Taiwan
- [5] Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, et al. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves [J]. *Phytopathology*, 2001,91:181-187
- [6] Frevel D R, Spurr JR H W. Biocontrol of tobacco brown spot disease by *Bacillus cereus* subsp. *Mycoides* in a controlled environment [J]. *Phytopathology*, 1977,67:930-932.
- [7] Homma Y, Sato Z, Hirayama F, et al. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens [J]. *Soil Biol Biochem*, 1989, 21:723-728
- [8] Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, et al. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology*, 2001, 91:621-627

Screening of Antagonistic Bacteria from Phyllosphere towards Tobacco Brown Spot Fungus *Alternaria alternata*

ZHANG Cheng-sheng<sup>1</sup>, KONG Fan-yu<sup>1\*</sup>, LI Duo-chuan<sup>2</sup>, Wang jing<sup>1</sup>, Wang Feng-long<sup>1</sup>

(1 Tobacco Institute of CAAS, Qingdao 266101; 2 Shandong Agriculture University, Taian 271018)

Abstract The possibility of employing antagonistic bacteria for control of tobacco brown spot

was studied. Approximately 136 strains of bacteria were isolated from phyllospheres of tobacco and 9 of these possessed high levels of antagonistic properties. They significantly reduced brown spot in detached tobacco leaves when artificially inoculated with *Alternaria alternata*. Culture filtrate of the most effective bacterial isolate which designated as Tpb88 was shown to be very efficient in inhibiting mycelial growth of *A. alternata* in dual cultures. Culture filtrate of Tpb88 inhibited germination and germ tube elongation of *A. alternata*. The results show that the culture filtrate directly inhibited spore germination of *A. alternata*, especially during the first hours of the paired cultivation. The rate of antagonistic activity of culture filtrate of Tpb88 depended on its concentration in the mixture. The greatest inhibition of spore germination was observed at the highest concentration of filtrate (filtrate to fungal spores inocula mixed in proportion 1:50). These suggested that the hypothetic mechanism of Tpb88 against tobacco brown spot was producing antagonistic substances.

Key words Simultaneous Distillation and Extraction(SDE); GC; GC/MS; Casing; Flavor Components Biological control; *Alternaria alternata*; Bacteria isolated from phyllospheres.

www.tobacco.org.cn All Rights Reserved.

版权所有 中国烟草学会

本网站由中国烟草物资电子商务网提供技术支持