

# 烟草拮抗内生细菌的筛选与防病促生长效果

杨珍福<sup>1</sup>, 吴毅歆<sup>2,3</sup>, 陈映岚<sup>4</sup>, 何月秋<sup>1,2\*</sup>

(1. 云南农业大学农业生物多样性应用技术国家工程研究中心, 昆明 650201; 2. 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201; 3. 微生物菌种筛选与应用国家地方联合工程研究中心, 昆明 650217; 4. 云南省禄劝县农业技术推广总站, 云南 禄劝 651500)

**摘要:** 为了获得能促进烟草生长和防治黑胫病的稳定菌株, 通过常规方法从烟草茎、叶中分离到 478 株内生细菌, 其中 65 株能拮抗烟草黑胫病菌, 占 13.60%。菌株 YN201408、YN201442、YN201448 和 YN201458 对烟草疫霉的抑菌率分别为 63.85%、60.82%、64.72% 和 76.07%, 用  $1.0 \times 10^7$  cfu/mL 拮抗菌液浸烟苗根系 30 min, 移栽后浇灌 1 次, 在温室盆栽试验中抗病效果分别为 68.24%、65.47%、69.12 和 41.40%。YN201448 对烟草种子萌芽率和烟草的生长都有促进作用, 烟草的发芽率、第 5~6 真叶期苗高和地上部鲜重分别高于清水对照 10.95%、29.31% 和 67.24%。依据菌体形态、生理生化特征和 16S rDNA 序列, YN201408、YN201442 和 YN201448 鉴定为解淀粉芽孢杆菌, YN201458 为铜绿假单胞菌。YN201448 因良好的促生长和抗病效果而具有继续开发应用的潜力。

**关键词:** 烟草; 黑胫病菌; 解淀粉芽孢杆菌; 生物防治; 促生长

中图分类号: S572.08

文章编号: 1007-5119(2014)06-0048-06

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2014.06.010

## Screening, Growth Promotion, and Disease Control of Antagonistic and Endophytic Bacteria in Tobacco

YANG Zhenfu<sup>1</sup>, WU Yixin<sup>2,3</sup>, CHEN Yinglan<sup>4</sup>, HE Yueqiu<sup>1,2\*</sup>

(1. National Engineering Center for Applied Techniques of Agricultural Biodiversity, Yunnan Agricultural University(YAU), Kunming 650201, China; 2. College of Agronomy and Biotechnology, YAU, Kunming 650201, China; 3. National and Local Joint Engineering Research Center for Screening and Application of Microbial Strains, Kunming 650217, China; 4. Extension Station of Agricultural Techniques, Luquan County, Luquan, Yunnan 651500, China)

**Abstract:** To obtain stable bacterial strains with good growth promotion of tobacco and black shrank disease control effect, 478 endophytic bacterial strains were isolated from tobacco leaves and stems. Among them 65 of strains (accounting for 13.60%) could inhibit *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* by the traditional methodology. Especially, the four strains, YN201408, YN201442, YN201448 and YN201458 inhibited 63.85%, 60.82%, 64.72% and 76.07% of mycelia growth of the pathogen and controlled 68.24%, 65.47%, 69.12 and 41.40% of disease severity by soaking the seedling root in  $1.0 \times 10^7$  cfu/mL of the bacterial suspension for 30 min and drenching once after transplanting in the pot experiment in the greenhouse, respectively. YN201448 could promote seed germination and growth of tobacco, showing 10.95%, 29.31% and 67.24% higher than water control in germination rate, seedling height during 5-6 leaf stage and fresh weight on the ground. YN201408, YN201442 and YN201448 were classified into *Bacillus amyloliquefaciens*, and YN201458 into *Pseudomonas aeruginosa* based on their morphology, physiological and biochemical traits and 16S rDNA sequences. YN201448 showed good potential for application based on its growth promotion and disease control effect.

**Keywords:** tobacco; *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*; *Bacillus amyloliquefaciens*; biocontrol; growth promotion

烟草黑胫病是由烟草疫霉 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) 引起的烟草真菌性土传病害之一。该病常与烟草青枯病混合发生, 导致烟草

矮化、萎蔫、叶片发黄、根和茎基部坏死, 发病率 3%~12%, 重者损失达 50%<sup>[1-2]</sup>。目前除东北烟区零星发生外, 我国其他烟草主栽区均普遍发生<sup>[3-4]</sup>。

基金项目: 科技部国际科技合作项目(2009DFA32360); 昆明市科技局项目(09H130301)

作者简介: 杨珍福, 女, 硕士研究生, 主要从事植物病理学研究。E-mail: ynjczyf152@126.com。\* 通信作者, E-mail: ynfh2007@163.com

收稿日期: 2014-04-21

修回日期: 2014-08-13

该病的防治主要依赖化学农药,但长期反复施用,造成烟株药害、农药残留和病原菌产生抗药性<sup>[5-6]</sup>。近年来,随着烟草及烟草制品逐渐向更加安全化方向发展,生物防治已成为烟草病害防治研究的热点。

关于植物病害生防细菌的筛选,过去主要是从土壤或植物根际土壤微生物中分离,但由于易受外界条件的影响,这些土壤微生物防病效果时常不稳定<sup>[7]</sup>。近年来的研究表明,植物体是一个复杂的微生态系统,植株体内广泛分布大量内生细菌,其中许多内生细菌不仅可以抑制病原菌的生长,还具有促生、固氮等生物功能<sup>[8-9]</sup>,展示了很好的开发应用前景。为得到良好内生菌株,本研究开展了对烟草黑胫病菌有拮抗作用且具有促生作用的烟草内生细菌的分离筛选和鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

烟草黑胫病菌于 2012 年分离自玉溪烟区感病烟株,具强致病力。LB 培养基用于分离和保存内生细菌,燕麦培养基用于培养烟草黑胫病菌和对峙培养。云烟 97 种子由云南省烟草公司提供,烟草在育苗基质中培育至 5~6 片真叶备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 烟草内生细菌的分离 健康烟草茎、叶经酒精消毒后,用灭菌水冲洗 3 次,于灭菌的研钵中研磨,将研磨汁液涂布于 LB 平板上。用印迹法<sup>[10]</sup>检测样品表面消毒是否彻底,如长菌落,研磨液所涂平板上长的菌落为非内生细菌,弃去;若对照中无菌落,在研磨液中长出的菌落可能是内生细菌,随机挑取形态不同的菌落进行纯化培养并保存<sup>[11]</sup>。

1.2.2 拮抗内生细菌筛选 以烟草黑胫病菌为指示菌,采用燕麦平板对峙培养法<sup>[10]</sup>,在平板中央倒置直径为 0.5 cm 的烟草黑胫病菌的琼脂块,再将分离到的细菌点接在距烟草黑胫病菌的琼脂块 3 cm 处的 4 个角点上,置于 28 °C 培养箱培养 7 d,选出对病原菌生长有抑制作用的菌株进入复筛。每个菌

株 3 次重复,记录并保存。将拮抗性好的菌株转接 5 代以上,继续观察其对烟草黑胫病菌的抑菌作用,并测定其抑菌带宽度。对抑菌效果好的菌株,采用抗利福平标记法标记菌株<sup>[8]</sup>,灌根<sup>[12]</sup>测定其在烟草内的定殖能力。

1.2.3 拮抗内生细菌对烟草黑胫病的温室控病作用 温室控病试验于 2013 年在云南农业大学植保学院温室中进行。挑选出抑菌圈较大且抑菌作用稳定的拮抗菌,活化后在 37 °C、170 r/min 摇瓶发酵培养 3 d,用无菌水稀释至  $1.0 \times 10^7$  cfu/mL。黑胫病菌采用郑小波<sup>[13]</sup>方法,制备成浓度为  $1.0 \times 10^4$  个/mL 游动孢子悬液。选择长势一致的 5~6 片真叶期的烟苗,移栽前将烟草幼苗在  $1.0 \times 10^7$  cfu/mL 浓度的相应菌液中浸根 30 min,然后将烟苗移栽至盆中,空白对照采用清水浸根。3 次重复,每重复 5 株烟苗。移栽 3 d 后用相应拮抗菌悬液( $1.0 \times 10^7$  cfu/mL)灌根一次,对照浇等量清水。3 d 后将配制好的黑胫病游动孢子菌悬液( $10^4$  个/mL)灌接于各处理烟苗根部,接种量为 5 mL/株。温室温度 28 °C,浇水保湿以利于发病。接种病原菌 20 d 后,调查各处理烟株的发病情况,计算病情指数、发病率和相对防效。分级标准和防治效果计算方法参照文献<sup>[3,14]</sup>。

1.2.4 拮抗内生细菌的促生作用测定 (1) 发芽率测定试验 云烟 97 种子经酒精消毒后,用菌株 YN201448 菌悬液( $1.0 \times 10^6$  cfu/mL)浸泡 24 h,取出种子置于垫有湿润滤纸的培养皿内,于 28 °C 保湿培养,第 7 天时检测种子的萌芽率。每皿处理 30 粒种子,3 次重复,用清水和 LB 液体培养基作对照。

(2) 漂浮育苗试验 试验于 2013 年在云南省微生物发酵工程中心大棚内进行。烟草种子用 YN201448 菌液进行浸种处理,出芽后播种到装有漂浮育苗基质的育苗盘中,烟草出苗后用浓度为  $10^7$  cfu/mL 的 YN201448 菌液喷雾 1 次,待烟草长到 5~6 片真叶时,测定株高、最大叶长、最大叶宽及地上部鲜重。每处理 50 株,3 次重复,用清水和 LB 液体培养基作对照。

1.2.5 生理生化与分子生物学鉴定 参照文献[15],对4株拮抗菌进行生理生化特性的测定。菌株YN201448基因组总DNA的提取采用冻融法<sup>[16]</sup>。16S rDNA基因片段的PCR扩增采用由上海生工公司合成的细菌通用引物P0(5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3')和P6(5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3')。PCR扩增采用20 μL反应体系:10×EasyTaq Buffer(含Mg<sup>2+</sup>)2.0 μL,dNTPs(10 mmol/L)1.6 μL,P0(10 mmol/μL)和P6(10 mmol/μL)均为1.0 μL,EasyTaq DNA Polymerase(5 U/μL,Transgene)0.2 μL,模板DNA(10~50 ng/μL)0.5 μL,补充ddH<sub>2</sub>O至总体积20 μL。PCR反应程序为:94℃预变性5 min,94℃1 min,55℃1 min,72℃2 min,30个循环,最后72℃延伸10 min。PCR产物经0.8%的琼脂糖凝胶电泳,目标条带切胶后,利用试剂盒回收,将回收后的16S rDNA片段连接到pMD18-T载体上,将连接产物转化到大肠杆菌(*E.coli*)DH5α中,以蓝白斑特征挑取阳性克隆,再以PCR验证阳性克隆<sup>[17]</sup>。被确认的克隆送至北京华大基因公司测序,测序结果在NCBI分

子生物学数据库中比对同源性。结合形态、生理生化反应及16S rDNA基因片段序列,鉴定菌株的分类地位。

## 2 结果

### 2.1 拮抗内生细菌的分离与筛选结果

从采自玉溪、昆明的烟草茎、叶中共分离到478株内生细菌,包括从茎部分离到358株,从叶部分离到120株。抑菌实验结果表明,478株内生细菌中有65株能拮抗烟草黑胫病菌,占总数13.60%,但它们都来自烟草茎秆。其中,YN201408、YN201442、YN201448和YN201458等有较强的抑菌作用(图1),对烟草疫霉的抑菌率分别为63.85%、60.82%、64.72%和76.07%。各菌株在转移5代后,其抑菌能力无明显变化。另外,烟草幼苗经利福平标记菌株菌液分别灌根处理后,在含利福平的LB培养基上均能从植株里分离到YN201408、YN201442、YN201448和YN201458细菌,而清水处理中未获得细菌。各回收菌株的基本形态和原菌株相同,测定菌株对烟草黑胫病菌的抑制作用也与



图1 内生细菌对烟草黑胫病原菌生长的抑制

Fig. 1 The effect of endophytic bacteria on growth of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*

原菌株接近,表明这4个菌株均能在烟株体内定殖。

### 2.2 温室控病试验

温室控病试验中,拮抗内生菌菌液处理烟草幼苗后,烟草黑胫病发病率和病情指数均显著低于空白对照,温室盆栽防治效果达41.40%~69.12%(表1)。对照烟苗发病严重,植株生长受到抑制;经拮抗菌悬液处理的烟苗发病程度较轻,植株生长发育正常(图2)。4个菌株处理中,YN201448菌液处理的防效最高,达到69.12%。

表1 拮抗内生细菌对烟草黑胫病的温室防治效果  
Table 1 The effect of antagonistic endophytic bacteria on control tobacco black shank in the greenhouse

处理	发病率/%	病情指数	防病效果/%
CK	80.00a	68.75a	-
YN201408	35.00c	21.25c	68.24a
YN201442	45.00bc	23.75c	65.47a
YN201448	35.00c	21.25c	69.12a
YN201458	55.00b	43.75b	41.40b

注:表中同列数据后小写字母不同表示在0.05水平差异显著,下同。

### 2.3 拮抗细菌悬液对烟草苗期促生作用的测定

从表2可以看出,烟草种子经YN201448菌液



图 2 YN201448 菌株对烟草黑胫病的温室防治效果

Fig. 2 The effect of YN201448 against tobacco black shank in greenhouse

处理后,发芽率高达 97.33%,显著高于清水和 LB 培养液处理的发芽率 87.67%和 89.00%,分别高于后两者 9.66%和 8.33%。在漂浮育苗试验中,在烟草 5~6 叶期,YN201448 菌液处理的烟草苗高 15.31 cm,地上部分鲜重 3.88 g,亦显著高于清水和 LB 培养液处理的苗高 11.84 cm 和 11.63 cm,地上部分鲜重 2.32 g 和 2.74 g,其中苗高分别高于后两者 29.31%和 31.64%,鲜重分别高出 67.24%和 41.61%。YN201448 菌液处理的烟草株高、最大叶长、最大叶宽和地上部分鲜重显著优于对照(图 3)。菌株 YN201448 处理的烟草幼苗长势明显好于对照,叶片宽厚、叶色更为浓绿,表明 YN201448 不仅能有效促进烟草种子萌发而且对烟草生长也有促进作用。

表 2 YN201448 菌液对烟苗生长的影响

Table 2 The effect of antagonistic endophytic bacterium YN201448 on tobacco seedling growth

处理	发芽率/ %	株高/ cm	最大 叶长/cm	最大 叶宽/cm	地上部 鲜重/g
YN201448	97.33a	15.31a	11.08a	4.22a	3.88a
CK	87.67b	11.84b	9.26b	3.74b	2.32b
LB	89.00b	11.63b	8.48b	3.64b	2.74b



图 3 YN201448 处理的烟苗

Fig. 3 Seedlings treated with YN201448

## 2.4 生理生化与分子鉴定结果

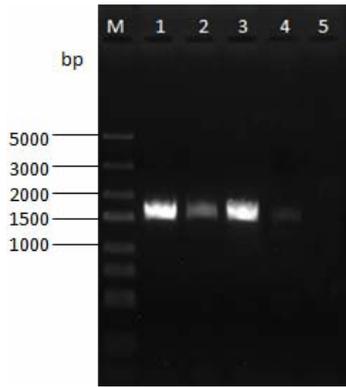
生理生化试验鉴定了 YN201408、YN201442、YN201448 和 YN201458 等 4 个拮抗菌株的 12 个生理生化特征(表 3)。其中 YN201408、YN201442 和 YN201448 的革兰氏染色、芽孢染色、淀粉水解、葡萄糖利用、柠檬酸盐利用、V-P 试验、硝酸盐还原、明胶液化等均呈阳性;而 YN201458 菌株的 KOH 反应、葡萄糖利用、柠檬酸盐利用、V-P 试验、明胶液化等呈阳性,其余反应均为阴性。根据形态特征和生理生化特性测定,初步确定 YN201408、YN201442、YN201448 为芽孢杆菌,YN201458 为假单胞菌。对提取的细菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增,得到了约为 1500 bp 的明亮条带(图 4)。YN201408、YN201442 和 YN201448 菌株的 16S rDNA 序列经与 NCBI 数据库 BLAST 比对,与其同源性较高的菌株均属于芽孢杆菌属,其中菌株 YN201448 与 *Bacillus amyloliquefaciens* CC178 (CP006845.1)、*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* str. FZB42(CP00560.1)、*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* AS43.3 相似度均达 99%,菌株 YN201408 和 YN201442 均与 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAUB946 (HE617159) 和 *B. amyloliquefaciens* LFB112 (CP006952) 相似度达 98%,而菌株 YN201458 与 *Pseudomonas aeruginosa* CNU082141

表 3 四种拮抗菌株的生理生化鉴定结果

Table 3 Identification of 4 antagonistic bacteria in morphology, biology, and biochemistry

特征	YN201408	YN201442	YN201448	YN201458
革兰氏染色	+	+	+	-
KOH 反应	-	-	-	+
芽孢染色	+	+	+	-
淀粉水解	+	+	+	-
甲基红	-	-	-	-
V-P 试验	+	+	+	+
吲哚产生	-	-	-	-
明胶液化	+	+	+	+
柠檬酸盐利用	+	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+	-
葡萄糖利用	+	+	+	+
丙二酸盐利用	-	-	-	-

注:“+”为反应呈阳性或者可以生长、利用;“-”为反应呈阴性或者不可以生长、利用。



注：M 为 250 bp-DNA 分子标记；1 为 YN201448；2 为 YN201442；3 为 YN201458；4 为 YN201408；5 为空白对照。

图 4 四株拮抗菌的 PCR 扩增图

Fig. 4 The agarose gel electrophoresis of 4 antagonistic bacteria

(KF979144.1)、*P. aeruginosa* CNU082137 (KF979142.1) 和 *P. aeruginosa* C1501 (KF976394.1) 等的相似度都达到 99%。结合菌株的形态特征，生理生化特性及 16S rDNA 序列，将 YN201408、YN201442 和 YN201448 鉴定为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)，YN201458 鉴定为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。

### 3 讨论

生物防治已成为现代农业生产中有害生物防治的一项重要措施。很多相关试验表明，生防菌对烟草黑胫病具有一定的防治效果。赵秀香等<sup>[18]</sup>研究发现侧孢短芽孢杆菌对烟草黑胫病菌有拮抗作用；易有金等<sup>[19]</sup>研究发现，短短芽孢杆菌对烟草黑胫病具有显著防治效果。在植物病害生防中，若将防病作用与促生作用相结合，可起到更理想的效果<sup>[20]</sup>。目前，已有学者<sup>[20-22]</sup>对防病促生的内生菌进行研究，但绝大多数研究成果都还没有应用于实际生产。

在平板和温室拮抗测定试验中发现，平板拮抗活性较高的菌株在温室也呈现出防效较高的趋势，但也有些菌株例外。如本研究中菌株 YN201458 在平板对峙试验中有很好的抑菌活性，但其在盆栽试验中防效低于 YN201448，表明拮抗细菌对环境的适应性直接影响到其对有害生物的控制效果<sup>[21]</sup>，即拮抗菌对烟草黑胫病菌的拮抗能力并不等同于防

治能力，因此筛选拮抗菌时应采用平板对峙与温室防效及田间试验相结合的方法。

### 4 结论

本研究从烟草中分离获得 478 株内生细菌，其中有 13.60% 在平板上对烟草黑胫病菌有抑制作用，四株内生细菌在盆栽试验中表现出较好的防病效果，且具有促生作用。本研究通过室内筛选、盆栽试验和漂浮育苗试验，筛选到 1 株对烟草黑胫病有较好防治效果且显著促生作用的解淀粉芽孢杆菌 YN201448，展现出了用于种子包衣、制作烟草漂浮育苗基质和微生物肥料及药剂的应用前景。在盆栽试验中，它对黑胫病的防治效果达 69.24%。特别值得一提的是，烟苗是处在高接种菌量和有利于发病的接种室中，在田间条件下，病菌孢子量不可能达到  $10^4$  个/mL 剂量。然而，YN201448 在田间控病效果还有待进一步验证。

### 参考文献

- [1] 杨建卿, 汉彤, 承河元. 烟草病理学[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2003.
- [2] 马国胜, 高智谋. 烟草黑胫病菌培养性状的研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(3): 512-517.
- [3] 陈瑞泰, 朱贤朝, 王智发. 全国 16 个主产烟省(区)烟草侵染性病害调研报告[J]. 中国烟草科学, 1997, 18(4): 1-7.
- [4] 彭清云, 易图永. 防治烟草黑胫病研究进展[J]. 河北农业科学, 2008, 12(6): 29-31.
- [5] 袁宗胜, 张广民. 烟草黑胫病菌对甲霜灵的敏感性测定[J]. 中国烟草科学, 2001, 22(4): 9-12.
- [6] Shew H. Response of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* to metalaxyl exposure [J]. Plant disease, 1985, 69: 559-562.
- [7] 杨秀荣, 刘水芳, 孙淑琴, 等. 生防细菌防治土传病害的研究进展[J]. 天津农业科学, 2008, 14(4): 38-42.
- [8] Bacon C W, Hinton D M. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species [J]. Biological Control, 2002, 23(3): 274-284.
- [9] Strobel G A. Endophytes as sources of bioactive products [J]. Microbes and infection, 2003, 5(6): 535-544.
- [10] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [11] 鲁素芸. 植物病害生物防治学[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993.

- [12] 何红,邱思鑫,蔡学清,等. 辣椒内生细菌 BS-1 和 BS-2 在植物体内的定殖及鉴定[J]. 微生物学报, 2004, 44 (1): 13-18.
- [13] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [14] 国家烟草专卖局. YC/T 39—1996 烟草病害分级及调查方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.
- [15] 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.
- [16] 冯广达, 陈美标, 羊宋贞, 等. 用于 PCR 扩增的细菌 DNA 提取方法比较[J]. 华南农业大学学报, 2013, 34 (3): 439-442.
- [17] Marchesi J R, Sato T, Weightman A J, et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA [J]. Applied and environmental microbiology, 1998, 64(2): 795-799.
- [18] 赵秀香, 吴元华, 李晔. 拮抗细菌 B8 对烟草黑胫病菌的抑制作用及其菌株鉴定[J]. 中国生物防治, 2007, 23 (1): 54-59.
- [19] 易有金, 尹华群, 罗宽, 等. 烟草内生短芽孢杆菌的分离鉴定及对烟草青枯病的防效[J]. 植物病理学报, 2007, 37 (3): 301-306.
- [20] 王静, 赵廷昌, 孔凡玉, 等. 拮抗细菌对烟草青枯病的温室防病及促生效果[J]. 植物保护, 2007, 33 (5): 103-105.
- [21] 许明双, 生洁萍, 郭顺堂, 等. 水稻内生菌 K12G2 菌株的鉴定及其促生特性研究[J]. 中国农学通报, 2014, 30 (9): 66-70.
- [22] 易龙, 马冠华, 肖崇刚. 烟草生防益菌对烟草幼苗的促生效应研究 [J]. 中国农学通报, 2006, 22(2): 331-333.