

DOI:CNKI:61-1390/S.20120223.1721.005

网络出版时间:2012-02-23 17:21

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120223.1721.005.html>

1 株烟草赤星病拮抗芽孢杆菌的鉴定与活性研究

马志远¹, 李金岭¹, 冯志珍¹, 段军娜¹, 李 晶¹, 成巨龙², 安德荣¹

(1 西北农林科技大学 植物保护学院/旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西省烟草研究所, 陕西 西安 710061)

【摘 要】 【目的】筛选对烟草赤星病具有拮抗作用的芽孢杆菌并进行鉴定,同时研究其抗菌作用。【方法】从陕西、云南、湖北和河南 4 省烟区采集烟草根际土壤和烟叶,从中分离筛选烟草赤星病拮抗芽孢杆菌,并对拮抗性最强的 1 株芽孢杆菌进行形态学、生理生化特性、16S rDNA 序列鉴定及粗提物抑菌作用测定。【结果】从烟草表面及根际土壤分离得到的芽孢杆菌中有 10 株对烟草赤星病有拮抗效果,将其中效果最好的 1 株芽孢杆菌定名为 M-07C2F,其抑菌条带宽度达 14.2 mm;通过 16S rDNA 测序并结合其形态和生理生化特征,鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌。通过显微观察发现,M-07C2F 菌株使烟草赤星病病原真菌的菌丝生长出现畸形,菌丝体内部细胞原生质体分布不均匀,部分菌丝内原生质有流出形成空壳的现象。在离体条件下采用生长速率法,测得其对烟草赤星病菌丝生长有抑制作用,EC₅₀为12.82 mg/L;在活体条件下采用田间小区试验,测得当 M-07C2F 菌株粗提物质量浓度为 80 mg/L 时,其对烟草赤星病的防治效果达到 86.0%。【结论】菌株 M-07C2F 对烟草赤星病菌的抑菌作用明显,该菌株通过抑制烟草赤星病菌菌丝生长、减少孢子萌发来抑制病菌对植株的侵染,且菌株粗提物质量浓度越高,抑菌能力越强。

【关键词】 烟草赤星病;拮抗芽孢杆菌 M-07C2F;生物防治;解淀粉芽孢杆菌

【中图分类号】 Q93-331;S435.72

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)03-0117-09

Isolation, identification and antibacterial activity of antagonistic bacteria M-07C2F against Tobacco Brown Spot

MA Zhi-yuan¹, LI Jin-ling¹, FENG Zhi-zhen¹, DUAN Jun-na¹,
LI Jing¹, CHENG Ju-long², AN De-rong¹

(1 College of Plant Protection, Northwest A&F University/State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Shaanxi Tobacco Research Institute of China National Tobacco Corporation, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

Abstract: 【Objective】 This research aims to screen out and identify the bacillus that shows an inhibitory effect on Tobacco Brown Spot, and examines this kind of effect closely. 【Method】 We collected the tobacco leaf and the rhizosphere soil from areas where mostly tobacco was grown in Shannxi, Yunnan, Hubei and Henan province. One strain of bacillus with the highest inhibitory effect was screened out. Then its morphology, physio-biochemical characteristics, the sequence of 16S rDNA and its crude extract's inhibitory effect were all examined. 【Result】 There are ten strains of bacillus isolated from the skin of tobacco and the rhizosphere soil, exhibiting an inhibitory effect on Tobacco Brown Spot. The best of them is named M-07C2F, with the width of the inhibitory band up to 14.2 mm, and passes the sequencing of 16S rDNA. Considering its morphology and physio-biochemical characteristics, this strain of bacillus is identified to be *Ba-*

* 【收稿日期】 2011-10-12

【基金项目】 高等学校学科创新引智计划项目(B07049);国家“863”高新技术研究与发展计划项目(2007AA021503);国家烟草专卖局项目(KJ-2010-04,110201002024)

【作者简介】 马志远(1985—),女,山西运城人,硕士,主要从事微生物资源利用研究。E-mail: sxczmazhiyuan@163.com

【通信作者】 安德荣(1963—),男,陕西大荔人,教授,博士生导师,主要从事微生物资源利用及植物病理研究。

E-mail: anderong323@163.com

cillus amyloliquefaciens. Observed through the microscope M-07C2F strain of Tobacco Brown Spot disease of mycelia growth of pathogenic fungi deformity, internal mycelium protoplasts are distributed unevenly, with some outflow of protoplasm formed with some outflow of protoplasm formed within the mycelium shell phenomenon. The growth rate methodology *in vitro* condition indicates that it has an inhibitory effect on the growth of hyphae of Tobacco Brown Spot, with EC₅₀ being 12.82 mg/L, and the field plot research in living body shows that when the concentration of its crude extract reaches 80 mg/L, the control efficiency could be as high as 86.0%. 【Conclusion】 M-07C2F has an obvious inhibitory effect on Tobacco Brown Spot. It could prevent plants from being infected by inhibiting the spore germination and the growth of the hyphae of Tobacco Brown Spot. And the higher the concentration of its crude extract is, the better the inhibitory effect is.

Key words: Tobacco Brown Spot; antagonistic bacteria M-07C2F; biological control; *Bacillus amyloliquefaciens*

烟草赤星病是由半知菌亚门链格孢属真菌侵染引起的叶斑病^[1]。烟草赤星病是烟草生产中的主要真菌病害之一,其病原菌侵染烟叶后引致叶斑病,具有潜育期短、流行速度快的特点。烟草赤星病于1892年首次在美国发现,曾数次给世界烟草生产带来巨大经济损失^[2];我国于1916年首先在北京附近发现有烟草赤星病的发生,20世纪80年代初各烟草主产区赤星病病情呈现大幅度上升趋势,成为我国烟草领域发生范围最广、危害最重的叶部病害^[1,3]。目前烟草赤星病已成为继普通花叶病毒病和黄瓜花叶病毒病之后的第3大病害^[3]。烟草赤星病是一种典型的流行病,具有间歇性和爆发性的特点,病害严重时烟叶发病率可高达90%,使烤烟品质下降1~2个等级,重病区减产减值达50%以上^[4-5]。因此,烟草种植要实现优质,就必须做好烟草赤星病的防治工作。

多年来,对烟草赤星病的防治主要采用抗病育种、化学防治、生物防治、农业防治的方法^[6]。这些方法中,最根本的措施就是选育优良抗病烟草品种,但现阶段选育的抗病品种抗性水平偏低,即使抗性较高,但在接种压力大、环境有利于发病时,植株还是会呈现感病状,而且抗病品种往往是低产劣质品种,经济效益并不理想。化学防治措施虽效果明显,但会产生农药残留,严重影响烟草品质,且对环境造成了污染^[7-8]。农业措施只能够起到辅助防治效果,而起不到根本性的防治作用。生物防治由于具有独特的优越性,克服了农药防治带来的环境污染、人畜毒害以及病原微生物产生的抗药性,因而成为最有发展前景的方法,也成为国内外科研工作者研究的热点。据相关报道,从烟草根际土壤和烟草、番茄、黄瓜、桑树等植物的茎、叶部位分离得到的芽孢杆菌

以及假单孢杆菌,对烟草病原菌有较强的拮抗作用^[9]。前人已从烟草、辣椒等的根际土壤中分离得到对烟草赤星病有较好防治效果的放线菌和细菌^[3,10-12];王革等^[13]利用诱捕法,也从土壤中分离得到了对烟草赤星病病菌拮抗效果极强的木霉菌株。因此,本研究从陕西、云南、湖北、河南4个省份的烟草种植区采集烟草根际土壤和多种烟叶,采用平板对峙培养法进行了拮抗芽孢杆菌的筛选、鉴定及抑菌作用测定,以期对烟草赤星病提供新的生物防治资源。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病原菌:烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、烟草黑胫病菌(*Phytophthora parasitica*)、小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum*)和水稻纹枯病菌(*Stagonospora curtisii*),均由西北农林科技大学植物病理实验站提供。

供试烟草:品种为“NC89”,由西北农林科技大学病理实验室提供。

供试培养基:PDA培养基,用于病原菌的培养和对峙培养;NA培养基,用于分离、保存根际芽孢杆菌;LB培养基,用于分离、保存烟叶表面细菌。

1.2 烟草根际土壤和烟叶的采集

在烟株成熟期,从陕西、云南、湖北、河南4个省份的烟草种植区用五点采样法采集健康烟草的根际土壤,采样时拨开表面约5cm的表层土,每点约取50g土样。在上述烟草种植区随机抽取烟田中的5株健康烟株,在每株烟的上、中、下3个部位各采集2片烟叶。将采集的样品于4℃下保存待用。

1.3 烟草根际土壤和烟草叶围拮抗芽孢杆菌的分离与筛选

1.3.1 芽孢杆菌的分离 称取烟草根际土壤 10 g, 倒入装有 90 mL 灭菌水的锥形瓶中, 160 r/min 振荡 30 min, 提取根际细菌, 80 ℃ 水浴 30 min, 10 倍比稀释, 涂布分离。纯化的细菌经革兰氏染色和芽孢染色, 显示菌体呈杆状、产芽孢、G⁺ 的分离物为芽孢杆菌^[14]。将采集的健康烟叶剪成 1 cm² 的小碎片, 称取 10 g, 分离其表面芽孢杆菌, 方法同上。

将采用上述方法分离得到的芽孢杆菌编号, 观察菌落形态。

1.3.2 拮抗芽孢杆菌的筛选 采用平板对峙法进行拮抗芽孢杆菌的筛选, 在 PDA 培养基中央接入烟草赤星病菌, 28 ℃ 培养 24 h 后, 在赤星病菌四周接上待测芽孢杆菌, 于 28 ℃ 培养 4 d 后观察抑菌效果, 测量抑菌带宽度, 筛选效果最好的 1 株芽孢杆菌进行鉴定^[9,15]。

1.4 拮抗芽孢杆菌菌株的鉴定

在平板上观察菌落形态, 并在电镜下观察菌株形态, 参照《常见细菌系统鉴定手册》对菌体形态、培养特征及生理生化特征进行测定。以 CTAB (Hexadecyltrimethylammonium Bromide) 法^[16] 提取的细菌基因组 DNA 为模板, 以 F27 (5'-TACGG-TACCTTGTTACGACT-3') 和 R1492 (5'-CT-GAGCCAGGATCAAAC-3') 为上、下游引物扩增菌株的 16S rDNA。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送往生工生物工程(上海)有限公司进行序列测定, 测序结果采用 BLAST 软件在 GenBank 中进行同源性比对, 提交注册登录号, 并用 MEGA 4.0 的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树^[17-21]。

1.5 拮抗芽孢杆菌对病原菌的防治效果

1.5.1 拮抗芽孢杆菌发酵培养滤液和粗品的制备

将拮抗芽孢杆菌菌株接入发酵培养液中, 28 ℃、150 r/min 条件下发酵 72 h 后, 用 1 mol/L 草酸调 pH 至 3.5, 静置 2 h, 10 000 r/min 离心 30 min 获得发酵滤液。将发酵滤液在旋转薄膜蒸发器中于 80 ℃ 下减压浓缩至原体积的 1/10, 再用 10 倍体积的冰冻丙酮抽滤浓缩后上样于活性碳柱、离子交换柱和硅胶柱, 分离得到粗提物。将粗提物干燥得到粗品, 配制成 1 g/mL 的粗品母液备用^[22]。

1.5.2 拮抗芽孢杆菌发酵滤液和粗品的抑菌作用 采用生长速率法进行离体试验^[23]。将 1.5.1 节制备的粗品母液与 PDA 培养基混匀后, 制备得到含

粗提物 10, 20, 40, 80 mg/L 的混合培养基。在混合培养基上接种活化的烟草赤星病菌、烟草黑胫病菌、小麦赤霉病菌、棉花枯萎病菌和水稻纹枯病菌的菌饼(5 mm), 28 ℃ 下恒温培养 4 d 后测量菌落直径, 采用剂量对数-抑制率概率法求得毒力回归方程及 EC₅₀。

1.5.3 田间小区防试试验 选择拮抗效果最好的芽孢杆菌, 按 1.5.1 中的方法制备粗提液, 在陕西省烟草研究所科研基地进行田间小区防试试验, 烟草品种为“NC89”, 株行距为 55 cm×110 cm, 每小区植烟 50 株, 4 次重复, 小区随机排列, 小区之间以双行保护隔离, 常规栽培管理。待烟叶刚进入成熟期时, 即配制 10, 20, 40 和 80 mg/L 的芽孢杆菌粗提液, 以无菌水和 500 倍稀释的菌核净为对照, 采取喷雾法接种到烟株上。喷雾时, 以叶面均匀布满雾点为度。4 h 后, 喷雾接种按文献^[24]中方法制备的烟草赤星病菌孢子液(约 2.0×10⁵ 个/mL), 26~28 ℃ 保温保湿培养 7 d 后, 按烟草赤星病行业标准调查病情^[25]。大田取样时, 按五点法取样, 每点取 25 片叶, 参照严重度分级标准记录烟叶发病严重度, 并计算病情指数与防治效果。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{病害等级} \times \text{该级叶数})}{\text{调查叶数} \times \text{最严重等级}} \times 100\%;$$

$$\text{防治效果} = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100\%。$$

1.6 拮抗芽孢杆菌对烟草赤星病原菌生长及致病性的影响

1.6.1 对烟草赤星病原菌菌丝的影响 采用平板对峙法, 在 PDA 平板中央接种烟草赤星病菌菌饼, 在距离中心 3 cm 的两侧接种培养 48 h 且生长良好的 M-07C2F 菌于 28 ℃ 倒置培养 4 d, 挑取靠近拮抗芽孢杆菌抑菌圈边缘的菌丝, 以远离 M-07C2F 菌的边缘菌丝为对照, 显微观察烟草赤星病菌菌丝的生长情况^[22]。

1.6.2 对烟草赤星病原菌孢子萌发的影响 参照文献^[24]的方法, 将烟草赤星病菌孢子制备成孢子悬浮液(100 倍显微镜下, 每个视野中可看到 100 个孢子), 再配制 1, 10 和 100 mg/L 的 M-07C2F 菌株活性物质粗提液, 以无菌水为对照, 采用凹玻片孢子萌发法, 28 ℃ 保湿培养 8 h 后, 镜检孢子萌发情况。若尚未萌发, 每隔 1 h 检查 1 次。计算孢子萌发抑制率^[23]。

$$\text{孢子萌发抑制率} = \frac{\text{对照萌发率} - \text{处理萌发率}}{\text{对照萌发率}} \times 100\%。$$

1.6.3 对烟草赤星病原菌致病性的影响 将烟草

赤星病原菌接种在含有 10,20,40 和 80 mg/L M-07C2F 菌株活性粗提物的 PDA 培养基上,以无菌水作为对照,28 ℃培养 4 d。用直径为 6 mm 的打孔器取不同质量浓度活性物质作用后的菌饼,菌面朝下接种到大小一致的离体烟叶上,每个处理重复 5 次。将处理好的叶片置于含 2 g/L 琼脂的培养基中,于 28 ℃保湿培养 48 h 后测量病斑直径^[25-28]。

1.7 数据分析

采用 SPSS 12.0 软件,对试验数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 烟草根际土壤和烟草叶围拮抗芽孢杆菌的筛选

对采集的样品进行富集分离,得到菌株 48 株。进一步采用平板对峙法进行拮抗芽孢杆菌的筛选,获得 10 株有拮抗效果的芽孢杆菌,测量其抑菌条带宽度并观察菌落形态,结果如表 1 所示。其中,拮抗效果最好的菌株 M-07C2F 由烟叶表面分离得到,其抑菌条带宽度达到了 14.2 mm,如图 1 所示。

表 1 10 株芽孢杆菌对烟草赤星病的拮抗活性及其菌落形态

Table 1 Antagonistic activity of 10 strains of bacillus against Tobacco Brown Spot disease pathogen and its colonial morphology		
菌株 Strain	拮抗活性 Antagohistic activity	菌落形态 Colony morphology
M-06C1F	+	菌落形状规则,淡黄色,边缘呈现透明状,湿润 Colony shape rules,light yellow,transparent edges shape,wet
M-08C1F	+	菌落形状不规则,有的呈脐状凸起,有的成纤维状,白色,湿润 Colonies of irregular shape,some were umbilicated raised,and some into fibrous,white,wet
M-10C2F	++	菌落纤维状,圆形突起,大小不等 Colonies fibrous,circular processes,ranging in size
M-12C2F	++	菌落形状不规则,乳白色,边缘整齐透明,干燥 Colonies of irregular shape,milky white,transparent edges neat,dry
M-07C2F	++	菌落形态不规则,中间有凸起褶皱,淡黄色,边缘透明锯齿状 Colonies irregular,raised the middle fold,light yellow,transparent jagged edge
M-18C1F	+	菌落形态不规则,有凸起,白色,边缘整齐不透明,干燥 Irregular colonies with raised,milky white,neat edges opaque,dry
M-20C2F	+	菌落圆形凹陷,乳白色,表面有褶皱,湿润 Colonies circular depression,milky white,surface wrinkled,wet
M-22C3F	++	菌落圆形凸起,淡黄色,边缘透明不整齐,湿润,菌落相对较小 Round convex colonies,light yellow,irregular edge transparent,moist,relatively small colonies
M-24C3F	+	菌落表面不平整,乳白色,边缘透明规则,干燥,菌落相对较小 Colony surface is not smooth,milky white,the edge of transparent rules,dry,relatively small colonies
M-26C2F	+	菌落表面平整,淡灰色,边缘不规则透明,湿润 Colony surface smooth,light gray,irregular edge transparent,wet

注:“+”表示抑菌条带宽 5~10 mm;“++”表示抑菌条带宽 10~15 mm。
Note:“+” inhibition zones from 5 to 10 mm;“++” from 10 to 15 mm.



图 1 菌株 M-07C2F 对烟草赤星病原菌的拮抗效果
A. 菌株 M-07C2F;B. 正常生长的烟草赤星病原

Fig.1 Antagonistic result of strain M-07C2F against Tobacco Brown Spot disease pathogen
A. Strain M-07C2F;B. Regulargrowth of Tobacco Brown Spot disease pathogen

2.2 M-07C2F 菌株的鉴定

2.2.1 形态学特征及生理生化特性 在 LB 固体培养基上,拮抗芽孢杆菌 M-07C2F 菌落表面有褶

皱、不光滑,边缘不规则,呈淡黄色,具有一定的黏性。在电镜下观察菌体呈杆状,有鞭毛,芽孢呈椭圆形(图 2)。

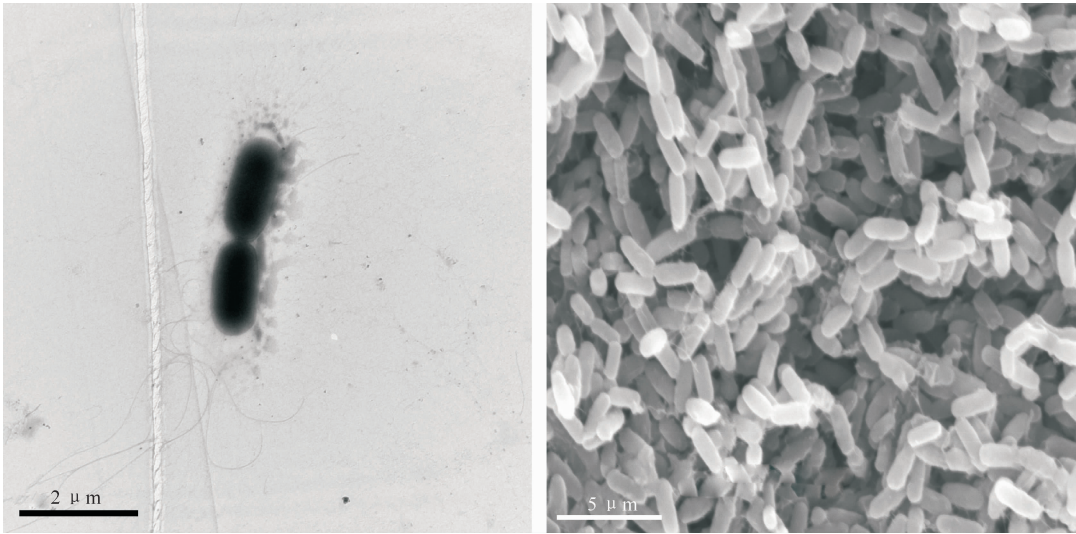


图 2 透射电镜(左)和扫描电镜(右)下 M-07C2F 的菌落形态
Fig. 2 Colonial morphology of M-07C2F through transmission electron microscope(Left) and scanning electron microscope(Right)

将菌株 M-07C2F 的形态学特征和生理生化特性(表 2)与《常用细菌系统鉴定手册》中有关细菌的描述进行比较,结果表明,菌株 M-07C2F 的生理生

化特性与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的特性基本一致,因此,初步鉴定菌株 M-07C2F 为解淀粉芽孢杆菌。

表 2 菌株 M-07C2F 的生理生化特性

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain M-07C2F

试验项目 Test items	结果 Results	试验项目 Test items	结果 Results
革兰氏染色 Gram stain	+	2% NaCl	+
芽孢圆形 Spore circular	—	5% NaCl	+
孢囊膨大 Cyst enlargement	—	5 ℃	—
厌氧生长 Anaerobic growth	—	10 ℃	d
利用丙酸盐 Propionate	—	30 ℃	+
V-P 测定 V-P test	+	50 ℃	d
酪朊水解 Caseinate hydrolysis	+	葡萄糖产气 Glucose gas production	—
明胶水解 Gelatin hydrolysis	+	酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	—
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	形成吡嗪 IPA test	—
柠檬酸盐 Citrate solution	+	形成二羟丙酮 dihydroxyacetone	ND

注:“+”表示阳性反应,“—”表示阴性反应,“d”表示部分呈阳性反应部分呈阴性反应,“ND”表示无资料或资料不足。
Note:“+”. Positive,“—”. Negative,“d”. Some positive and some negative,“ND”. No data.

2.2.2 16S rDNA 鉴定 菌株 M-07C2F 的 16S rDNA 序列(GenBank 登录号: JN244672)与 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantrum* FZB42T (GenBank 登录号: CP000560)具有较高的同源性,相似性达到 99.73%,与 *B. amyloliquefaciens* (GenBank 登录号: HQ844507)的同源相似性达到 97.28%。结合形态特征和生理生化特性,鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefa-*

ciens)。菌株 M-07C2F 的系统进化树见图 3。

2.3 拮抗芽孢杆菌 M-07C2F 的抑菌效果

2.3.1 离体试验 采用生长速率法测定 M-07C2F 菌株活性产物对多种离体植物病原真菌的抑菌活性。结果(表 3)表明,M-07C2F 菌株的抑菌谱较广,对烟草赤星病菌、烟草黑胫病菌、小麦赤霉病菌、棉花枯萎病菌和水稻纹枯病菌均有不同程度的抑制效果,其中对烟草赤星病菌菌丝生长的抑制作用最强,

EC₅₀ 为 12.82 mg/L。

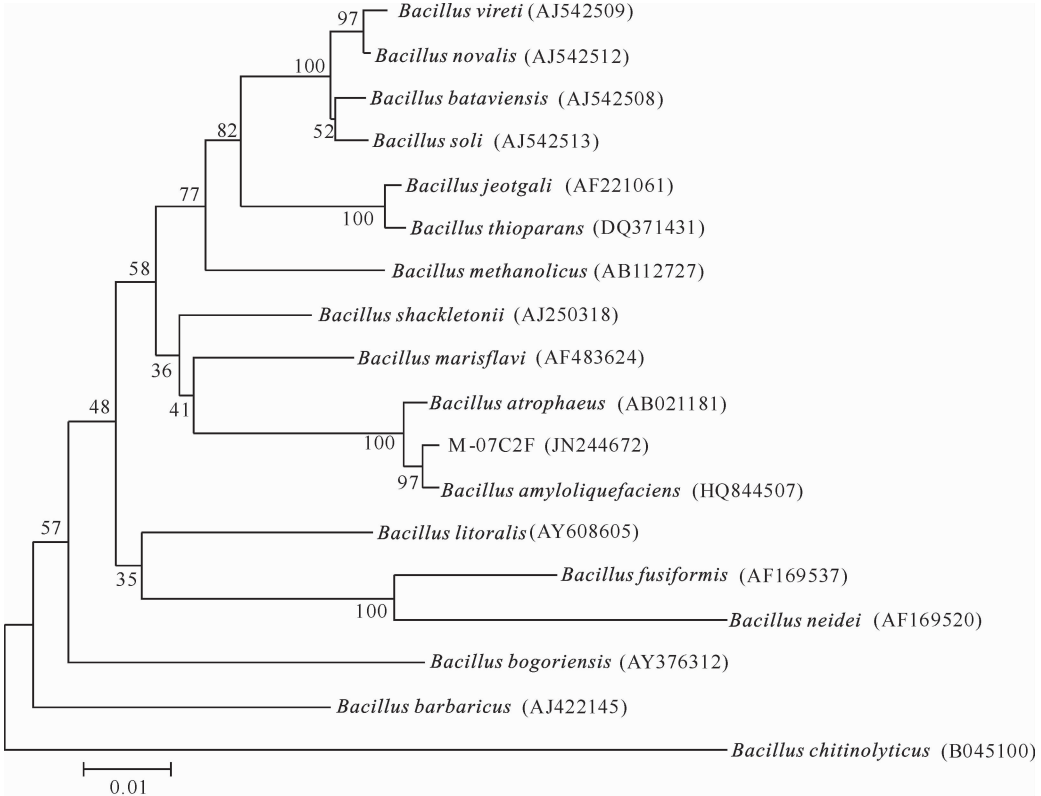


图 3 菌株 M-07C2F 的系统进化树

Fig. 3 Evolutional tree of strain M-07C2F

表 3 M-07C2F 菌株粗提物对 5 种病原菌菌丝生长的抑制作用

Table 3 Inhibition effect of M-07C2F active products on five pathogenic fungus

病原真菌 Pathogenic fungus	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 <i>r</i>	EC ₅₀ / (mg · L ⁻¹)
烟草赤星病菌 <i>A. alternata</i>	$y=3.176\ 4+1.645\ 8x$	0.982 9	12.82
烟草黑胫病菌 <i>P. parasitica</i>	$y=3.372\ 0+1.351\ 2x$	0.964 1	16.03
小麦赤霉病菌 <i>G. zeae</i>	$y=3.155\ 1+1.323\ 4x$	0.989 7	24.78
棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Vasinfectum</i>	$y=2.852\ 6+1.419\ 3x$	0.982 3	32.58
水稻纹枯病菌 <i>S. curtisii</i>	$y=3.002\ 2+1.430\ 3x$	0.998 7	24.93

2.3.2 田间小区试验 由表 4 可见,M-07C2F 菌株的粗提物能有效防止烟草赤星病病原菌菌丝的侵入,当粗提物质量浓度为 80 mg/L 时,对烟草赤星病的防治效果达到了 86.0%;质量浓度为 40 mg/L 时,与市售的菌核净 500 倍稀释液的防治效果相当。

2.4 拮抗芽孢杆菌 M-07C2F 对烟草赤星病菌生长和致病性的影响

2.4.1 对烟草赤星病菌菌丝生长的影响 显微镜观察(图 4)发现,菌株 M-07C2F 主要使烟草赤星病病原真菌的菌丝生长出现畸形,菌丝顶端和分枝处较为膨大;菌丝的分枝增多;菌丝体内部细胞原生质体分布不均匀,部分菌丝内原生质有流出形成空壳的现象。正常菌丝生长细长而均匀,细胞结构较为清晰,且无膨大畸形现象。

表 4 M-07C2F 菌株粗提物对烟草赤星病的田间防效

Table 4 Control effect of M-07C2F active products

against <i>A. alternata</i>		%
粗提物质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration	病情指数 Disease index	防治效果 Control effect
10	49.2±2.1 B	32.3
20	41.4±1.8 C	43.1
40	21.5±0.7 D	70.4
80	10.2±1.1 E	86.0
菌核净 500 倍稀释液 Dimethachlon(500×)	19.7±0.4 D	72.8
无菌水 Sterile water	72.7±1.1 A	—

注:同列数据后标不同大写字母表示在 $P=1\%$ 水平下差异显著。下表同。
Note:Data in the same column with different letters indicated the significant difference at $P=1\%$ level. The same as below.

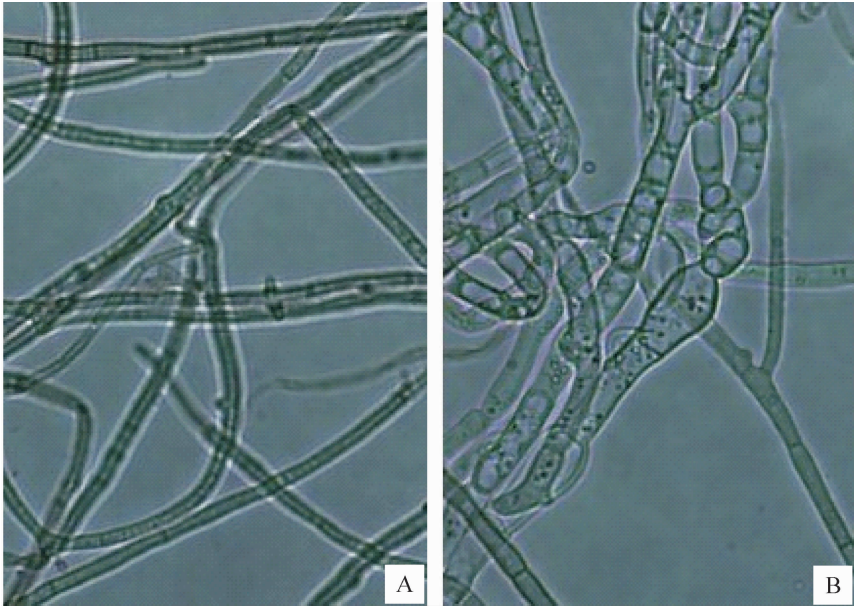


图 4 受 M-07C2F 菌株抑制后烟草赤星病菌菌丝的生长情况(400×)
A. 正常的烟草赤星病菌菌丝;B. 受到抑制的烟草赤星病菌菌丝

Fig. 4 By M-07C2F strain inhibit hypha growth situation of *A. alternata*
A. Normal mycelium of *A. alternata*; B. Abnormal mycelium of *A. alternata*

2.4.2 对烟草赤星病菌孢子萌发的影响 由表 5 可见,M-07C2F 菌株能够抑制烟草赤星病菌孢子的萌发,100 mg/L M-07C2F 粗提物对病原菌孢子的萌发抑制率高达 85.6%。

2.4.3 对烟草赤星病菌致病性的影响 由表 6 可见,随着 M-07C2F 菌株粗提物质量浓度的增加,烟草赤星病菌的致病性减弱,烟叶上的病斑直径减小,其中粗提物质量浓度为 80 mg/L 时,菌饼在烟叶上的病斑直径较对照无菌水减小了 12.3 mm。

表 5 M-07C2F 粗提物对烟草赤星病菌孢子萌发的影响

Table 5 Effect of M-07C2F active products on spore germination of *A. alternata* %

粗提物质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration	萌发率 Germination rate	萌发抑制率 Inhibition rate of germination
100	13.7	85.6 A
10	36.6	61.5 B
1	66.5	29.9 C
无菌水 Sterile water	94.8	—

表 6 M-07C2F 粗提物对烟草赤星病菌致病性的影响

Table 6 Effects of M-07C2F active products on the pathogenicity of mycelia of *A. alternata*

粗提物质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration	病斑直径/mm Dead area diameter					平均值/mm Average
	1	2	3	4	5	
10	16.8	16.3	15.1	17.2	16.5	16.4±0.8 B
20	14.1	14.5	12.3	14.8	13.8	13.9±0.9 C
40	9.7	10.8	9.1	10.9	9.6	10.0±0.8 D
80	6.3	6.7	6.5	7.0	6.5	6.6±0.3 E
无菌水 Sterile water	18.7	19.3	18.1	19.7	18.6	18.9±0.6 A

3 结论与讨论

本研究中的菌株 M-07C2F 是从烟叶表面分离获得的,与烟草赤星病菌有相似的生态环境。该菌生长快,对外界环境条件的适应性广、稳定性强,并表现出较高的抑菌活性,是一种广谱的抗植物病原真菌的拮抗芽孢杆菌。

本研究在离体条件下采用生长速率法、在活体条件下采用小区田间试验等方法,测定了 M-07C2F 菌体与其代谢活性产物对烟草赤星病的抑菌效果,结果表明:菌株 M-07C2F 在离体条件下对烟草赤星病菌菌丝生长有抑制作用,EC₅₀ 为 12.82 mg/L;在活体条件下,当 M-07C2F 菌株的粗提物质量浓度为 80 mg/L 时,对烟草赤星病的防治效果达到86.0%;该菌对烟草赤星病菌菌落生长、菌丝生长及孢子萌

发等有明显的抑制作用,导致病原菌的菌丝顶端膨大,菌丝畸形并停止生长,孢子萌发受到明显抑制。

芽孢杆菌作为生防材料具有其独特的优势。首先,芽孢杆菌具有的耐热、产芽孢、杆状、G⁺等特点,便于对其定向筛选;其次,防治效果较好的芽孢杆菌大多与其产生拮抗活性物质密切相关。方敦煌等^[10-11,24-25]已从健康烟草根际分离得到拮抗芽孢杆菌;周棱波等^[9]也从健康烟叶表面分离得到了对烟草赤星病有拮抗效果的短芽孢杆菌(*Bacillus brevis* Migula)。本研究从定向分离芽孢杆菌入手,筛选时将平板拮抗筛选、离体抑菌试验和田间小区防治试验紧密结合,最终筛选得到 1 株高效的拮抗解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

近年来,烟草赤星病的危害日趋严重,对烟草病害进行综合防治的发展趋势就是生物防治。因此,筛选拮抗菌株、研发生防制剂成为防治烟草赤星病的一种安全、有效的途径。但到目前为止,已报道的能用来防治烟草赤星病的拮抗菌株或者生防制剂大部分尚处于试验阶段。因此,筛选新的拮抗菌株,加大其研发力度,改良施用技术,对于实现烟草赤星病的安全、有效防治具有十分重要的意义。本研究为陕西、云南、湖北和河南 4 省烟区赤星病的生物防治奠定了基础,相关病理学、拮抗芽孢杆菌 M-07C2F 的抑菌机理和活性物质的提取以及大田施用方法的改良等问题,有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 杨 波. 烟草赤星病拮抗细菌筛选及其 16S rDNA PCR-RFLP 分析 [D]. 杭州:浙江大学,2005.
Yang B. Screening of antagonistic bacterium against pathogens of Tobacco Brown Spot disease and analysis of their 16S rDNA PCR-RFLP [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005. (in Chinese)

[2] Lucas G B. Disease of tobacco [M]. 3rd ed. Raleigh NC, America: Bid Cons Assoc, 1975: 267-296.

[3] 刘 丹, 黎定军, 陈 武, 等. 8 种杀菌剂对烟草赤星病菌的室内毒力测定 [J]. 湖南农业科学, 2010(9): 72-74.
Liu D, Li D J, Chen W, et al. Indoor toxicity test of eight fungicides on *Alternaria alternata* [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2010(9): 72-74. (in Chinese)

[4] 何可佳, 汤光忠, 黄声仪, 等. 烟草赤星病发生规律与防治研究 [J]. 湖南农业大学学报, 1997, 23(5): 445-449.
He K J, Tang G Z, Huang S Y, et al. Studies on the epidemics and control of Tobacco Brown Spot (*Alternaria alternata*) [J]. Journal of Hunan Agricultural University, 1997, 23(5): 445-449. (in Chinese)

[5] 陈 勇, 唐春生, 刘爱中, 等. 4 种药剂对烟草青枯病的防治效

果研究 [J]. 湖南农业科学, 2008(4): 93-95.
Chen Y, Tang C S, Liu A Z, et al. Control effects of four pesticides on tobacco bacterial wilt [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2008(4): 93-95. (in Chinese)

[6] 谭仲夏, 杨龙祥. 烟草赤星病的生物防治研究现状及展望 [J]. 中国烟草学报, 2005, 11(3): 34-38.
Tan Z X, Yang L X. Biological control of Tobacco Brown Spot disease: present and future [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2005, 11(3): 34-38. (in Chinese)

[7] Fravel D R, Spurr H W. Biocontrol of Tobacco Brown Spot disease by *Bacillus cereus* subsp *Mycoides* in a controlled environment [J]. Phytopathology, 1977, 67(7): 930-932.

[8] 杨献营. 非病原细菌对烟草赤星病菌的生物抑制 [J]. 中国烟草科技, 2000, 21(3): 45-48.
Yang X Y. Study of the biological control of non-pathogenic bacteria to brown spot [J]. Chinese Tobacco Science, 2000, 21(3): 45-48. (in Chinese)

[9] 周棱波, 黎定军, 陈 武, 等. 烟草赤星病拮抗菌的筛选 [J]. 湖南农业科学, 2011(3): 100-101, 104.
Zhou L B, Li D J, Chen W, et al. Screening of antagonistic bacterium to *Alternaria alternata* (Fries) Keissler [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2011(3): 100-101, 104. (in Chinese)

[10] 方敦煌, 吴建祖, 邓云龙, 等. 烟草赤星病拮抗菌株 B75 产生抗菌物质的条件 [J]. 中国生物防治, 2006, 22(3): 244-247.
Fang D H, Wu Z J, Deng Y L, et al. Factors affecting production of antagonistic substance by bacillus subtilis B75, a potential biocontrol agent against Tobacco Brown Spot [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006, 22(3): 244-247. (in Chinese)

[11] 方敦煌, 吴建祖, 邓云龙, 等. 防治烟草赤星病拮抗根际芽孢杆菌的筛选 [J]. 植物病理学报, 2006, 36(6): 555-561.
Fang D H, Wu Z J, Deng Y L, et al. Screening of antagonistic rhizospheric spore-producing bacilli against Tobacco Brown Spot [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2006, 36(6): 555-561. (in Chinese)

[12] 丁爱云, 郑继法, 时呈奎, 等. 烟草几种重要病害拮抗菌的筛选 [J]. 中国烟草科技, 1999(1): 10-11.
Ding A Y, Zheng J F, Shi C K, et al. Screening of antagonists against several important tobacco diseases [J]. Chinese Tobacco Science, 1999(1): 10-11. (in Chinese)

[13] 王 革, 周晓翌, 方敦煌. 木霉拮抗烟草赤星病菌菌株的筛选及其生防机制 [J]. 云南农业大学学报, 2000, 15(3): 216-218.
Wang G, Zhou X G, Fang D H. Screening for the isolates of trichoderma viride against *Alternaria alternata* and its biocontrol mechanism [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2000, 15(3): 216-218. (in Chinese)

[14] Claus D, Berkeley R C W. Bergey's manual of systemic bacteriology [M]. Baltinore: Williams & Wilkins, 1986.

[15] 储慧清, 方敦煌, 孔光辉, 等. 拮抗菌 AM6 代谢产物防治烟草赤星病试验 [J]. 烟草科技, 2004(4): 42-44.
Chu H Q, Fang D H, Kong G H, et al. Experiments on controlling *Alternaria alternata* with antagonistic bacteria AM6

- metabolite [J]. Tobacco Science & Technology, 2004(4): 42-44. (in Chinese)
- [16] 刘少华, 陆金萍, 朱瑞良, 等. 一种快速简便的植物病原真菌基因组 DNA 提取方法 [J]. 植物病理学报, 2005, 35(4): 362-365.
- Liu S H, Lu J P, Zhu R L, et al. A rapid and simple extraction method for plant pathogenic fungi [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(4): 362-365. (in Chinese)
- [17] Baker K F. Evolving concepts of biological control of plant pathogens [J]. Ann Rev Phytopathol, 1987, 25: 67-85.
- [18] Kloepper J W, Rodriguez-Kabana R, Zehnder G W. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases [J]. Australasian Plant Pathology, 1999, 28(1): 21-26.
- [19] Timothy C, Robert V S. A critical evaluation of augmentative biological control [J]. Biological Control, 2004, 31: 245-256.
- [20] 易 龙, 肖崇刚. 烟草赤星病拮抗细菌的筛选及其控病作用 [J]. 植物保护学报, 2004, 31(3): 63-68.
- Yi L, Xiao C G. Screening of antagonistic bacteria for biocontrol against Tobacco Brown Spot [J]. Journal of Plant Protection, 2004, 31(3): 63-68. (in Chinese)
- [21] Todorov S D, Meincken M, Dicks L M T. Factors affecting the adsorption of bacteriocins ST194BZ and ST23LD to *Lactobacillus sakei* and *Enterococcus* sp [J]. Journal of General and Applied Microbiology, 2006, 52: 159-167.
- [22] 苟丽霞, 王 斌, 高 峰, 等. 委内瑞拉链霉菌 RL-2 活性产物对植物病原真菌的抑制作用及其作用机制 [J]. 植物保护学报, 2010, 37(3): 255-260.
- Gou L X, Wang B, Gao F, et al. Inhibitory effect and mechanism of *Streptomyces venezuelae* var RL-2 active products on plant pathogenic fungi [J]. Journal of Plant Protection, 2010, 37(3): 255-260. (in Chinese)
- [23] 陈 丽, 疏秀林, 安德荣, 等. 土壤拮抗放线菌 S-5210-6 活性产物抑菌谱及其作用机制 [J]. 植物保护学报, 2007, 34(3): 277-282.
- Chen L, Shu X L, An D R, et al. Inhibiting range and mechanism of the active product of S-5210-6 [J]. Journal of Plant Protection, 2007, 34(3): 277-282. (in Chinese)
- [24] 方敦煌, 马永凯, 孔光辉, 等. 云南烟草赤星病菌致病力分析研究 [J]. 西南农业大学学报, 2000, 22(1): 42-44.
- Fang D H, Ma Y K, Kong G H, et al. An investigation of differentiation of pathogenicity in Tobacco Brown Spot (*Alternaria alternata*) in Yunnan [J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2000, 22(1): 42-44. (in Chinese)
- [25] 方敦煌. 防治烟草赤星病根际芽孢杆菌的筛选及其抗菌物质研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2007.
- Fang D H. Antagonistic substances and screening of Rhizospheric spore-producing bacilli against Tobacco Brown Spot [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2007. (in Chinese)
- [26] 顾真荣, 吴 畏, 高新华, 等. 枯草芽孢杆菌 G3 菌株的抗菌物质及特性 [J]. 植物病理学报, 2004, 34(2): 166-172.
- Gu Z R, Wu W, Gao X H, et al. Antifungal substances of *Bacillus subtilis* strain G3 and their properties [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 34(2): 166-172. (in Chinese)
- [27] Dana B B, Larry L N. Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: A review [J]. Journal of Chromatography B, 2002, 78: 5-29.
- [28] LaMondia J A. Outbreak of brown spot of tobacco caused by *Alternaria alternata* in Connecticut and Massachusetts [J]. Plant Disease, 2001, 85(2): 23.