

网络出版时间:2014-01-02 16:02

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.02.065

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.02.065.html

烟草青枯病拮抗芽孢杆菌的筛选、鉴定及其抑菌活性初探

刘伟¹, 刘鹏², 沈小英¹, 安天赐¹, 成巨龙³, 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 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118; 3 中国烟草总公司 陕西省烟草研究所, 陕西 西安 710061)

【摘要】【目的】从不同烟区健康烟草的根际土壤样品中筛选对烟草青枯病具有较强拮抗作用的芽孢杆菌, 为防治烟草青枯病提供生防资源。【方法】随机从福建龙岩、四川德昌、陕西汉中等地健康烟草根际土壤中采集 30 份土壤样品, 采用平板稀释法从中分离芽孢杆菌, 以烟草青枯病菌为靶标菌筛选拮抗芽孢杆菌, 并通过培养特性、菌体形态、生理生化特征分析及 16S rDNA 序列分析, 对筛选的拮抗芽孢杆菌菌株进行鉴定; 采用温室盆栽试验, 测定拮抗芽孢杆菌的促生作用、定殖能力和抑菌活性。【结果】从健康烟草根际土壤中分离得到 1 株抗烟草青枯病菌活性较好的菌株 LW-4, 经鉴定其为甲基营养型芽孢杆菌 *Bacillus methylotrophicus*。LW-4 菌悬液对烟草青枯病菌的防治效果为 70.37%, 其可定殖于烟草根际土壤, 具有良好的定殖能力。LW-4 对烟草有明显的促生作用; 用饱和度为 25% 的硫酸铵获得的 LW-4 抑菌物质对烟草青枯病菌的抑菌活性较高, 抑菌圈直径达 37.82 mm。【结论】菌株 LW-4 在烟草青枯病防治中具有潜在的利用价值。

【关键词】 烟草青枯病; 拮抗芽孢杆菌; 定殖能力; 促生作用; 防治效果

【中图分类号】 S435.72

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)02-0123-08

Screening, identification and antifungal activity of antagonistic *Bacillus* spp. against tobacco bacterial wilt

LIU Wei¹, LIU Peng², SHEN Xiao-ying¹, AN Tian-ci¹,
CHENG Ju-long³, 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 College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China;

3 Shaanxi Tobacco Research Institute, China National Tobacco Corporation, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

Abstract: 【Objective】*Bacillus* spp. strains with strong antagonistic effects on tobacco bacterial wilt were selected from healthy tobacco rhizosphere soil samples collected from different tobacco growing areas. 【Method】30 samples were randomly collected from places including Longyan, Fujian province, Dechang, Sichuan province, and Hanzhong, Shaanxi province. Plate dilution method was used to separate the strains, and *Ralstonia solanacearum* was used as the target bacterium. The screened bacillus strains were identified based on morphological, physiological and biochemical characteristics, and 16S rDNA phylogenetic analysis. In addition, bonsai experiment in greenhouse was used to determine the inhibition ability, plant growth-pro-

【收稿日期】 2013-03-05

【基金项目】 高等学校学科创新引智计划项目(B07049); 国家“863”计划项目(2007AA021503)

【作者简介】 刘伟(1987—), 女, 内蒙古扎兰屯人, 在读硕士, 主要从事微生物资源利用研究。

E-mail: weiweipeng.3800006@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

moting ability and colonization of screened strains.【Result】 Strain LW-4 with strong antagonistic effect against tobacco bacterial wilt was obtained and identified as *Bacillus methylotrophicus*. Its control rate of tobacco bacterial wilt was 70.37%. LW-4 could colonize on tobacco rhizosphere soil with good colonization ability. LW-4 also promoted the growth of tobacco seedlings. The antifungal metabolite extracted from strain LW-4 by 25% ammonium sulfate showed the effective inhibition against *Ralstonia solanacearum* with inhibition zone diameter of up to 37.82 mm.【Conclusion】 The obtained LW-4 strain could be widely used to control tobacco bacterial wilt.

Key words: tobacco bacterial wilt; antagonistic bacteria; colonization ability; growth promoting; control efficacy

烟草青枯病是由青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的一种土传病害^[1]。该病菌寄主范围广,喜高温,加之缺乏抗源,易暴发流行,防治非常困难^[2]。烟草青枯病是热带、亚热带地区烟草的主要病害之一,在我国长江流域及其以南烟区普遍发生,其中以广东、福建、湖南、四川及贵州烟区发生较重^[3]。

烟草青枯病自发现以来,很快引起了国内外学者的广泛关注。目前,在生产中主要采用化学农药防治,但是并不能有效地防止该病发生,而且长期大量施用化学农药既容易使病菌产生抗药性,又容易造成严重的环境污染。生物防治是利用生防菌株或者其活性产物来防治植物病害,具有无污染、无公害和长效性等优点,在植物病害的防治中具有越来越重要的位置^[4]。Bekwe 等^[5]从微生物群落结构入手进行防治研究;赵蕾^[6]用木霉菌进行了烟草青枯病的生物防治;徐同等^[7]采用微生物分泌物几丁质酶拮抗植物病原菌;张深等^[8]从贵州省青枯病迟发烟地和不发烟地土壤中,分离出 3 株对烟草青枯病有明显抑制作用的细菌;Lemessa 等^[9]从埃塞俄比亚烟田根际土壤中,筛选出 6 株对烟草青枯病有明显拮抗作用的细菌。可见,采用生物防治青枯病的研究已受到国内外人们的广泛关注^[10]。但目前有关微生物农药的研究仍较为薄弱。为此,本研究采集不同烟区烟草根际土壤,进行拮抗芽孢杆菌的分离筛选和抑菌作用测定,对抑菌效果显著的菌株进行鉴定,并进行温室防病试验,以期防治烟草青枯病提供生防资源,为研制微生物农药提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样采集 从福建龙岩、四川德昌、陕西汉中等地的健康烟草根际土壤中共采集土样 30 份。

1.1.2 培养基 TTC 培养基:蛋白胨 10.0 g,葡

萄糖 10.0 g,酪素水解物 1.0 g,琼脂 18.0 g,氯化三苯基四氮唑 0.1 g,蒸馏水 1 000 mL。

牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 10.0 g,氯化钠 5.0 g,琼脂 18 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2~7.4。

LB 液体培养基:蛋白胨 10.0 g,氯化钠 5.0 g,酵母膏 10.0 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2。

BPA 固体培养基:牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 5.0 g,葡萄糖 10.0 g,酵母膏 0.5 g,琼脂 17.0 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

NA 液体培养基:牛肉浸膏 3.0 g,蛋白胨 5.0 g,葡萄糖 20.0 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

NA 固体培养基:牛肉浸膏 3.0 g,蛋白胨 5.0 g,葡萄糖 20.0 g,琼脂 17.0 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

NA 拮抗菌突变株回收培养基:在 NA 固体培养基中加入质量分数 0.01% 氯化三苯基四氮唑(TTC,染色以利于计数)、300 μg/mL 利福平(Rif)。

1.1.3 供试菌株 烟草青枯病菌由陕西杨凌西北农林科技大学植物病害综合治理实验室提供。

1.1.4 烟草品种 心叶烟由陕西省烟草研究所提供。将育苗物质消毒后,在西北农林科技大学植病试验站防虫温室内种植心叶烟,长至 4~5 叶期使用。

1.1.5 药 剂 72% 农用硫酸链霉素(72% agricultural streptomycin sulphate)可湿性粉剂,湖北艾源化工有限公司生产; Rif 可湿性粉剂,宝鑫公司生产。

1.1.6 主要仪器 恒温培养箱 DHP-9272(上海安竟实验设备有限公司生产)、智能三孔三温水浴锅 HW.SY1-P3S(北京东方精瑞科技发展有限公司生产)、高压灭菌锅 LDZX(上海申安医疗器械厂生产)。

1.2 拮抗芽孢杆菌的分离与筛选

1.2.1 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 20 min,80 ℃水浴 30 min,10 倍稀释,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、革兰氏染色阳性的分离物为芽孢杆菌^[11]。

1.2.2 筛选 (1)初筛。初筛采用抑菌圈法。用 TTC 培养基选择具有活性的烟草青枯病菌作为指示菌,将其配成 2×10^8 CFU/mL 菌悬液,转接到 BPA 固体培养基上,制成含烟草青枯病菌培养基,吹干后,在平板中央接种 1.2.1 中分离纯化的芽孢杆菌菌株,30 ℃培养 2~3 d,测定抑菌圈直径和抑菌带(从活性菌菌落的边缘到抑菌圈的外缘)的大小。

(2)复筛。复筛采用滤纸片法^[12]。将初筛得到的芽孢杆菌菌株接种到 200 mL LB 液体培养基中,在转速 200 r/min、30 ℃条件下发酵 48 h;取发酵液于 12 000 r/min 离心 10 min,将上清液用 0.22 μ m 细菌过滤器过滤,收集滤液备用。在牛肉膏蛋白胨平板上均匀涂布烟草青枯病菌菌液;吸取 10 μ L 经 0.22 μ m 细菌过滤器过滤后的上清液于灭菌滤纸片上,干燥 15 min 后将滤纸片扣于已接种烟草青枯病菌的牛肉膏蛋白胨平板中,以加入清水为对照,于 30 ℃下培养,24 h 后测量抑菌圈直径。

1.3 拮抗芽孢杆菌的鉴定

培养特性、菌体形态观察及生理生化指标测定参照柳凤等^[13]的方法进行。16S rDNA 基因序列测定及其系统进化树的构建参照 Todorov 等^[14]的方法进行。以筛选的拮抗芽孢杆菌基因组 DNA 为模板,以 7f (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3') 和 1540r (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-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,送上海生工生物工程有限公司进行序列测定,测序结果用 BLAST 软件在 GenBank 进行同源性比较,并提交,获取注册登录号。采用 Clustal X 进行多序列比对后,用 MEGA 5.0 的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树,并进行 1 000 次 Bootstraps 检测。

1.4 拮抗芽孢杆菌的抑菌活性

1.4.1 盆栽防病试验 首先制备拮抗芽孢杆菌菌悬液:将拮抗芽孢杆菌菌株接入 NA 液体培养基,30 ℃、200 r/min 培养 72 h,然后用适量蒸馏水稀释成 1×10^8 CFU/mL 菌悬液,备用。

盆栽试验在西北农林科技大学植保试验站防虫温室内进行,试验用土为灭菌的混配营养土(V(土壤):V(营养土)=1:1)。用灭菌混配营养土培育

心叶烟苗至 4~5 叶期后,将幼苗取出,于待测拮抗芽孢杆菌菌悬液(1×10^8 CFU/mL)中浸根 30 min,移栽至钵钵,缓苗约 3 d 后采取灌根接种的方法,接种拮抗芽孢杆菌菌悬液(1 mL/穴),重复接种 2 次,间隔期为 5 d,以 72% 农用硫酸链霉素可湿性粉剂 2 000 倍液、清水为对照。接种 1 d 后,将预先繁殖的用 TTC 培养基选择具有活性的烟草青枯病菌配制成 1×10^6 CFU/mL 的菌悬液,采用灌根法接种,接种量为 5 mL/株,放置于 28~36 ℃防虫温室内培养,观察 25~30 d 后,调查烟草植株发病情况,统计发病率,计算病情指数和防治效果。每处理 3 次重复,每重复 10 株烟苗。病情指数 = $\sum(\text{病害等级} \times \text{该级叶数}) / (\text{调查叶数} \times \text{最严重等级}) \times 100$,防治效果 = $[(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数}] \times 100\%$ ^[15]。

1.4.2 抗 300 μ g/mL Rif 拮抗芽孢杆菌突变株的筛选及其定殖能力测定 在 BPA 固体培养基(约 50 ℃)中加入 Rif,使其终质量浓度为 10 μ g/mL,制成含 Rif 的 BPA 平板。将拮抗芽孢杆菌稀释并涂布到含 Rif 的 BPA 平板培养,48 h 后挑取单菌落,在逐步增加 Rif 质量浓度的含 Rif 的 BPA 平板上诱导,直到筛选出抗 300 μ g/mL Rif 的突变株。将突变株在 BPA 固体培养基上转接数代后,挑取拮抗性能力及外部菌落形态与原野生型菌株无差异的菌株备用。

2012-01,在西北农林科技大学植保试验站防虫温室内培养心叶烟苗,待其长至 4~5 叶期时分别移栽于 60 盆装有灭菌混配营养土的营养钵中,按常规方法管理。移栽时用筛选的抗 300 μ g/mL Rif 的芽孢杆菌菌悬液(2×10^8 CFU/mL)灌根,每盆种 3 株,每株烟苗施入菌悬液 50 mL,即每盆 150 mL,每处理 10 盆,重复 3 次。另外以 30 盆未灌根的烟苗为对照。于处理后的第 20,40,60,80 天,分别取 1 g 根际土壤用无菌水按 10 倍进行系列稀释液后平板计数,计算定殖菌量^[16]。所用培养基为 NA 拮抗菌突变株回收培养基(含 300 μ g/mL Rif)。

1.4.3 拮抗芽孢杆菌对烟苗的促生效果 试验采用营养钵种植方式,于无菌土中进行。将大田壤土、农家肥和蛭石按 6:3:1 体积比配制成基质,灭菌后填装于营养钵中备用。小心挖出 4~5 叶期的烟苗,轻轻抖落附着于根部的土壤,并将其浸泡于预先配制好的待测生防芽孢杆菌菌悬液(1×10^8 CFU/mL)中,30~40 min 后取出,分别移栽于装有灭菌基质的营养钵中。每处理 10 株,3 次重复,随

机排列,于西北农林科技大学植病试验站防虫温室中 30 ℃ 保湿培养。另设清水对照。于 1 周后测量并记录烟苗株高,每周 1 次。4 周后,随机选取 10 株烟苗,小心将烟苗整株挖出,洗去根部泥土,测量其株高、整株鲜质量等指标。然后于 180 ℃ 烘干至恒质量,测定整株干质量。

1.4.4 拮抗芽孢杆菌抑菌物质的提取及其抑菌活性的测定 将拮抗芽孢杆菌接种到 LB 液体培养基中,以未接种 LB 液体培养基为对照,28 ℃、150 r/min 振荡培养 24 h,10 000 r/min 离心 20 min,去菌体,加入不同质量的硫酸铵,使硫酸铵饱和度分别为 10%,20%,25%,30%,35%,40%,50%,60%,70%,80%,90%和 100%,4 ℃ 下静置沉淀 24 h,弃上清液,将沉淀用 25 mmol/L 磷酸缓冲液溶解,透

析脱盐后与烟草青枯病菌对峙培养,36 h 后用滤纸片法^[17]测定抑菌圈直径。

1.5 数据分析

采用 SPSS 12.0 软件中的 Duncan 氏新复极差法对试验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 拮抗芽孢杆菌的筛选结果

从采集的 30 份烟草根际土壤样品中,分离得到 780 株芽孢杆菌。以烟草青枯病菌为供试植物病原细菌,通过对所分离的芽孢杆菌进行拮抗初筛和复筛,得到抗烟草青枯病菌活性较好的拮抗芽孢杆菌菌株 LW-4 (陕西汉中烟草根际土样中分离得到),其抑菌圈直径达到了 37.05 mm (图 1)。

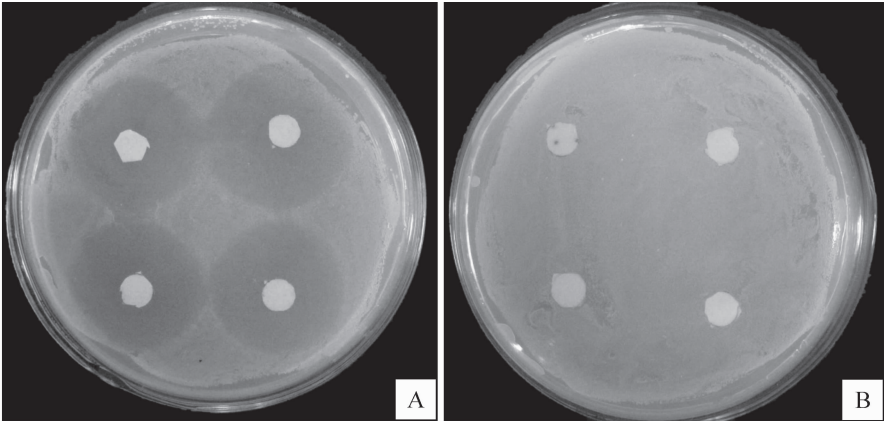


图 1 菌株 LW-4 对烟草青枯病菌的拮抗效果

A. LW-4;B. 空白对照

Fig. 1 Antagonistic effects of strain LW-4 against tobacco bacterial wilt

A. LW-4;B. Blank control

2.2 LW-4 菌株的鉴定

2.2.1 培养特性、菌体形态及生理生化特征 在 NA 固体培养基上,LW-4 菌落呈现奶白色,菌落表

面粗糙,边缘呈现锯齿状。电镜观察显示,LW-4 呈杆状,革兰氏阳性,周生鞭毛,单个细胞大小为 $(0.5\sim0.6)\mu\text{m}\times(2.0\sim2.5)\mu\text{m}$ (图 2)。

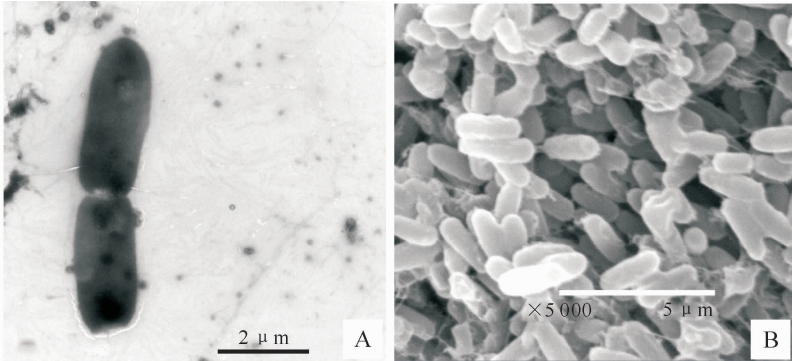


图 2 透射电镜(A)和扫描电镜(B)下 LW-4 的菌体形态

Fig. 2 Images of LW-4 strain from transmission (A) and scanning electron microscopy (B)

LW-4 菌株生理生化特征如表 1 所示。将菌株

的形态特征和生理生化特性(表 1)与《常用细菌系

统鉴定手册》中有关细菌的描述进行比较,将 LW-4 初步鉴定为芽孢杆菌。

表 1 LW-4 菌株的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain LW-4

试验项目 Test item	结果 Result	试验项目 Test item	结果 Result	试验项目 Test item	结果 Result	试验项目 Test item	结果 Result
革兰氏染色 Gram stain	+	甘露糖 Mannose	+	尿素酶 Urease	+	pH	11 -
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	生长温度 Growth temperature	10 ℃ -	NaCl	50 g/L +
厌氧生长 Anaerobic growth	+	柠檬酸盐 Citrate solution	-		30 ℃ +		70 g/L +
V-P 测试 V-P test	+	明胶 Hydrolysis of gelatin	+		55 ℃ +		100 g/L +
葡萄糖 Glucose	+	酪朊水解 Caseinate hydrolysis	+		60 ℃ -		150 g/L +
阿拉伯糖 Arabinose	+	氧化酶 Oxidase	+	pH	3 -		
木糖 Xylose	+	脂酶 Lipase	+		4 +		
半乳糖 Galactose	-	接触酶 Catalase	+		10 +		

注:“+”表示阳性反应,“-”表示阴性反应。
Note:+. Positive;- . Negative.

2.2.2 16S rDNA 序列分析与系统进化树构建
以 LW-4 基因组 DNA 为模板,用引物 7f 和 1540r 进行 PCR 扩增,测得该菌株的 16S rDNA 核苷酸序列长度为 1 454 bp,提交 GenBank 获得登录号为 JX993817。通过与 NCBI 中模式菌株的 16S rDNA 序列比对分析并构建系统发育树,结果(图 3)表明,

LW-4 菌株与甲基营养型芽孢杆菌 *Bacillus methylo**trophicus* CBMB205 (T) (GenBank 登录号为 EU194897) 同源性最近,相似性为 100%。综合菌株的培养特征、菌体形态和生理生化特征及 16S rDNA 序列分析结果,可知 LW-4 菌株为甲基营养型芽孢杆菌 *Bacillus methylo**trophicus*。

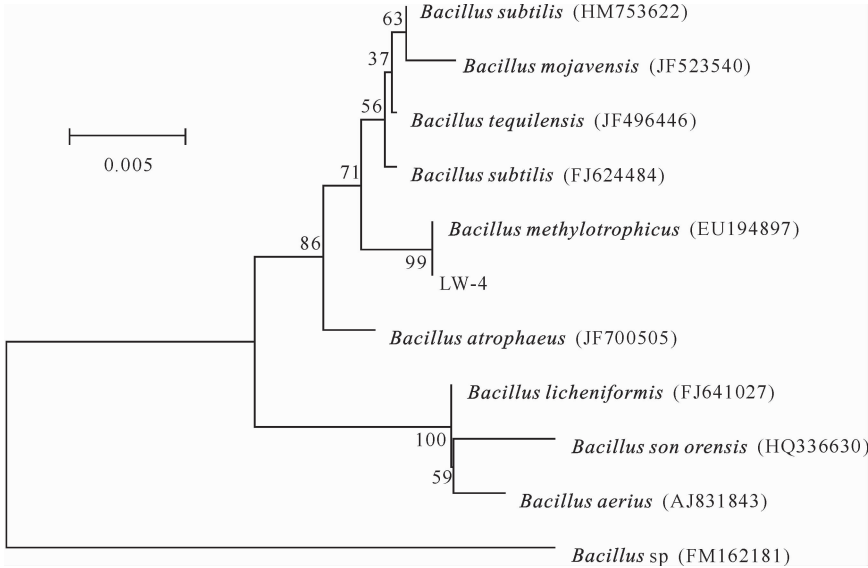


图 3 基于 16S rDNA 序列构建的 LW-4 与其他菌株的系统进化树

Fig. 3 Evolutional tree of strain LW-4 constructed by 16S rDNA and its relatives

2.3 LW-4 菌株的抑菌活性

2.3.1 LW-4 对烟草青枯病的盆栽防治效果 盆栽试验结果(表 2)表明,在接种烟草青枯病菌后,LW-4 菌悬液处理烟草植株的发病率为 27.55%,病情指数为 15.91,防治效果为 70.37%;而对照药剂

72%农用硫酸链霉素可湿性粉剂 2 000 倍液处理烟草植株的发病率为 11.09%,病情指数为 11.75,防治效果为 76.77%。说明 LW-4 菌株对由烟草青枯病菌引起的烟草青枯病有较好的防治效果。

表 2 LW-4 菌株对烟草青枯病的盆栽防治效果

Table 2 Control effects of strain LW-4 on tobacco bacterial wilt

处理 Treatment	发病率% Incidence	病情指数 Disease index	防治效果% Control efficacy
LW-4 菌悬液 LW-4 suspension	27.55±0.76 B	15.91±0.88 B	70.37±1.28
72%农用硫酸链霉素可湿性粉剂 72% agricultural streptomycin sulphate WP	11.09±0.96 C	11.75±1.47 C	76.77±1.92
清水 Water	86.44±2.43 A	55.82±1.53 A	—

注:表中数据为“平均值±标准差”。同列数据后标不同大写字母者表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.01$ 水平差异显著。下表同。

Note:The data are “mean±SD”. Different uppercase letters in the same column show significant difference at $P<0.01$ level by Duncan’s new multiple range test. The same below.

2.3.2 LW-4 菌株在烟草根围土壤中的定殖能力

标记结果显示,通过逐步提高药物 Rif 质量浓度的方法,获得了 LW-4 抗 300 $\mu\text{g/mL}$ Rif 的拮抗菌株,较高质量浓度 Rif 抑制了其他杂菌的生长,在 BPA 固体培养基上转接 5 代后,挑取拮抗性及其外部菌落形态与原野生型菌株无差异的菌株备用。用 Rif 抗性标记的 LW-4 菌株处理烟苗,回收检测结果表明,在处理后的烟草根际土壤中能分离得到 LW-4,其菌落形态与对应的原野生型菌株相同;而对照在回收平板中未见有菌落长出,说明 LW-4 菌株有定殖能力。

在灭菌混配营养土中,烟株接种后 20,40 d,定殖菌量分别为 4.57 lg(CFU/g)(每克样品中含有的细菌菌落总数的对数)和 5.23 lg (CFU/g),60 d 时达最高值(5.69 lg (CFU/g)),60 d 后根表土壤中的定殖菌量开始下降,至 80 d 时,定殖菌量为 5.18 lg(CFU/g),仍可维持一个较高水平,各期的定殖菌量相对稳定,说明 LW-4 的生防潜力较大。

2.3.3 LW-4 菌株对烟苗的促生效果

在盆栽防病试验基础上,测定 LW-4 菌株对烟苗生长的影响。将 LW-4 接种烟苗 1 周后,处理烟苗平均株高(7.21 cm)较对照高 1.10 cm,并且随着培养时间的延长,处理与对照烟苗的株高差异越来越明显;接种 4 周后处理烟苗平均株高(11.5 cm)较对照高 4.0 cm。LW-4 菌株对烟苗整株鲜质量和干

质量的增加效果也很明显,接种 4 周后 LW-4 接种烟草平均整株鲜质量(9.98 g)比对照(7.64 g)增加 30.6%,整株干质量(0.738 g)比对照(0.550 g)增加 34.3%(图 4)。

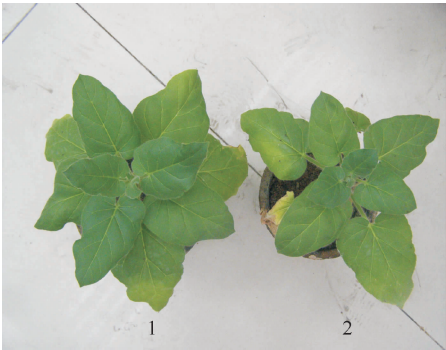


图 4 LW-4 菌株对烟苗的促生效果

1. LW-4 菌株处理过的烟苗;2. 清水(对照)

Fig. 4 Tobacco seedlings treated with LW-4

1. Tobacco seedlings treated with LW-4;2. Water (control)

2.3.4 菌株 LW-4 抑菌物质的抑菌活性

由表 3 可见,菌株 LW-4 能够分泌胞外抑菌物质,硫酸铵饱和度 $\geq 35\%$ 时无沉淀析出,即对烟草青枯病菌无抑菌活性;硫酸铵饱和度为 10%~30%时,获得的抑菌物质对烟草青枯病菌均具有抑制作用,但抑菌活性不同,其中硫酸铵饱和度为 25% 时获得抑菌物质的抑菌圈直径较大,抑菌活性较高。

表 3 LW-4 菌株饱和和硫酸铵提取物的抑菌活性

Table 3 Antifungal activity of LW-4 extraction by ammonium sulfate

硫酸铵饱和度/% Ammonium sulfate saturation concentration	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone	硫酸铵饱和度/% Ammonium sulfate saturation concentration	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone
10	32.52±1.23 C	50	—
20	35.23±0.42 B	60	—
25	37.82±0.68 A	70	—
30	30.80±0.55 C	80	—
35	—	90	—
40	—	100	—

3 讨论与结论

本研究从采自福建龙岩、四川德昌、陕西汉中等地的健康烟草根际土壤样品中,分离、筛选烟草青枯病菌的拮抗菌,因采用原位土壤,筛选出的拮抗菌可能对烟田土壤环境具有更强的适应性。本研究筛选分离到 1 株对烟草青枯病菌有强拮抗活性的芽孢杆菌菌株 LW-4,经培养特性、菌体形态学、生理生化特性鉴定和 16S rDNA 序列的系统发育分析,确定 LW-4 菌株为甲基营养型芽孢杆菌 *Bacillus methylophilus*,LW-4 对烟草青枯病菌的抑制作用与其产生了某种拮抗物质有关,故用不同饱和度硫酸铵对菌株 LW-4 抑菌物质进行粗提,结果显示,用饱和度 25%硫酸铵获得的抑菌物质抑菌活性最高,表明该抑菌物质可能是某种蛋白质。

生防菌株在自然寄主或其他植物中稳定定殖是其发挥防病作用的重要前提,也是决定其防病效果的关键因素。因此,许多研究者对生防菌株的定殖潜力进行分析,以了解菌株的定殖特性,从而最大程度地发挥菌株的防病效果,实现生防菌的合理利用^[18-20]。也有研究者将定殖能力作为生防菌筛选的重要指标,与抗菌活性相结合,大大提高了防病菌株筛选的效率^[21]。使用生防菌防治青枯病这类维管束病害,生防菌的防治效果与其在目标作物根际或者体内的有效定殖有关^[22]。魏春妹等^[23]报道,番茄青枯拮抗菌株 90B4-2-2 在田间具有良好防效,这与其经浸种或泼苗后可在番茄根部聚集,并向根组织内渗透及转移至茎、叶部有关。本研究通过盆栽防效试验和定殖能力测定相结合的方法,确定 LW-4 对烟草青枯病具有很好的防效,其可定殖于烟草的根际土壤中,并在一定时间内维持相当数量。这一研究结果将为烟草青枯病防治提供新的思路,但其定殖和转导的机理尚不清楚。

利用微生物之间的拮抗作用防治植物病害国内外已有较多研究^[24],现在人们研究的根际细菌多指在生防中具有拮抗作用或促生作用的根际促生菌(Plant Growth-Promotion Rhizobacteria, PGPR)。许多研究已经证明,根际有益细菌能够直接或间接地促进植物生长^[25]。在植物病害生防中,若将防病作用与促生作用相结合,则可起到更理想的效果。本研究中,温室防效试验和促生作用试验结果表明,拮抗芽孢杆菌 LW-4 菌株对烟草青枯病有较好的防效,且能不同程度地促进烟株生长。对于 LW-4 菌株是否可以分泌植物激素或诱导寄主产生植物激素

等相关促生作用机制,以及促生与抗病的关系,还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 彭细桥,刘红艳,罗 宽.烟草内生青枯病拮抗细菌的筛选和初步鉴定 [J].中国烟草科学,2007,28(2):38-40.
Peng X Q, Liu H Y, Luo K. Selection and preliminary identification of tobacco antagonistic endophytic bacteria against *Ralstonia solanacearum* [J]. Chinese Tobacco Science, 2007, 28(2): 38-40. (in Chinese)
- [2] 王 静,赵廷昌,孔凡玉.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):103-106.
Wang J, Zhao T C, Kong F Y. Disease-preventing and growth-promoting effects of antifungal bacteria against tobacco wilt [J]. Plant Protection, 2007, 33(5): 103-106. (in Chinese)
- [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.
Chen R T, Zhu X C, Wang Z F. A report of investigating and studying tobacco infectious diseases of 16 main tobacco producing (regions) in China [J]. Chinese Tobacco Science, 1997, 18(4): 1-7. (in Chinese)
- [4] 陈 亮,周晓见,董昆明.1 株烟草青枯病生防细菌的分离与鉴定 [J].江苏农业科学,2012,40(1):104-107.
Chen L, Zhou X J, Dong K M. Isolation and identification of antagonistic bacteria against tobacco bacterial wilt [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(1): 104-107. (in Chinese)
- [5] Bekwe A M, Kennedy A C, Frohne P S, et al. Microbial diversity along a transect of agronomic zone [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 39: 183-191.
- [6] 赵 蕾.木霉菌的生物防治作用及其应用 [J].生态农业研究, 1999, 7(1): 66-68.
Zhao L. Bio-control effect of *Trichoderma* spp. and its application [J]. Eco-Agriculture Research, 1999, 7(1): 66-68. (in Chinese)
- [7] 徐 同,柳良好.木霉几丁质酶及其对植物病原真菌的拮抗作用 [J].植物病理学报,2002,32(2):97-102.
Xu T, Liu L H. Chitinases from *Trichoderma* spp. and their antagonism against phytopathogenic fungi [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2002, 32(2): 97-102. (in Chinese)
- [8] 张 深,吴洪田,霍沁建.烟草青枯病拮抗菌的筛选及抑菌活性的测定 [J].烟草科技,2007(6):56-58.
Zhang S, Wu H T, Huo Q J. Screening of antagonistic bacteria against *Ralstonia solanacearum* and determination of their antibacterial activities [J]. Tobacco Science & Technology, 2007(6): 56-58. (in Chinese)
- [9] Lemessa F, Zeller W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia [J]. Biological Control, 2007, 42(3): 336-344.
- [10] 尹华群,易有金,罗 宽.烟草青枯病内生拮抗细菌的鉴定及小区防效的初步测定 [J].中国生物防治,2004(3):219-220.
Yin H Q, Yi Y J, Luo K. Identification and biocontrol test of tobacco endophytic bacteria against *Ralstonia solanacearum*

- [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2004(3):219-220. (in Chinese)
- [11] 马志远, 李金岭, 冯志珍. 一株烟草赤星病拮抗芽孢杆菌的鉴定与活性研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2012, 40(3): 117-125.
- Ma Z Y, Li J L, Feng Z Z. Isolation, identification and antibacterial activity of antagonistic bacteria M-07C2F against tobacco brown spot [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2012, 40(3): 117-125. (in Chinese)
- [12] 单文荣, 李俊霞, 刘花粉. 滤纸片法筛选不同活性物对棉花黄萎病菌抑制效果研究 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(19): 285-289.
- Shan W R, Li J X, Liu H F. Study on the inhibitory effects of different active materials screened by the filter paper on cotton verticillium wilt [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(19): 285-289. (in Chinese)
- [13] 柳 凤, 欧雄常, 何 红. 红树内生细菌 AmS2 菌株对芒果炭疽病的抑制作用 [J]. 植物保护学报, 2010, 37(5): 453-458.
- Liu F, Ou X C, He H. Antifungal activity of endophytic bacterium AmS2 against *Colletotrichum gloeosporioides* and its identification [J]. Acta Phytopylacica Sinica, 2010, 37(5): 453-458. (in Chinese)
- [14] 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.
- [15] 马冠华, 周常勇, 肖崇刚. 烟草内生细菌 Itb57 的鉴定及其对烟草黑胫病的防治效果 [J]. 植物保护学报, 2010, 37(2): 148-152.
- Ma G H, Zhou C Y, Xiao C G. Identification of the endophytic bacterial isolate Itb57 from tobacco plant and its control efficacy on tobacco black shank caused by *Phytophthora nicotianae* [J]. Acta Phytopylacica Sinica, 2010, 37(2): 148-152. (in Chinese)
- [16] 吕建林, 刘二明, 柏连阳. 烟草青枯病生防菌混合接种对其定殖及防效的影响 [J]. 中国生物防治, 2010, 26(2): 200-205.
- Lü J L, Liu E M, Bo L Y. Effects of the mixed inoculation of different biocontrol strains on colonization in tobacco and control of tobacco bacterial wilt [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(2): 200-205. (in Chinese)
- [17] 冯志珍, 陈太春, 段军娜. 烟草黑胫病拮抗根际芽孢杆菌 FB-16 的筛选鉴定及其抑菌活性 [J]. 植物保护学报, 2012, 39(3): 224-230.
- Feng Z Z, Chen T C, Duan J N. Screening, identification and antifungal activity of antagonistic rhizospheric *Bacillus* FB-16 against tobacco black shank [J]. Acta Phytopylacica Sinica, 2012, 39(3): 224-230. (in Chinese)
- [18] Baudoin E, Benizri E, Guckert A. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting [J]. Applied Soil Ecology, 2002, 19(2): 135-145.
- [19] 连玲丽, 谢荔岩, 林奇英. 芽孢杆菌三种抗菌素基因的杂交检测 [J]. 激光生物学报, 2008, 17(1): 81-85.
- Lian L L, Xie L Y, Lin Q Y. Hybridization detection of three antibiotics related genes from *Bacillus* spp. [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2008, 17(1): 81-85. (in Chinese)
- [20] 胡军华, 张伏军, 蓝希钊. 烟草根际细菌铜绿假单胞菌 swu31-2 的定殖能力及其对烟草青枯病的防治作用 [J]. 植物保护, 2009, 35(5): 89-94.
- Hu J H, Zhang F J, Lan X Q. Analysis of the colonization of tobacco rhizosphere bacterium swu31-2 and its control effect on tobacco bacterial wilt [J]. Plant Protection, 2009, 35(5): 89-94. (in Chinese)
- [21] 郭坚华, 王玉菊, 李 瑾. 抑菌圈-定殖力双重测定法筛选青枯病生防细菌 [J]. 植物病理学报, 1996, 26(1): 49-54.
- Guo J H, Wang Y J, Li J. Screen of biocontrol bacteria of plant wilt by inhibiting zones and root-colonizing capacity [J]. Acta Phytopylacica Sinica, 1996, 26(1): 49-54. (in Chinese)
- [22] 李艳嫦, 程飞白, 陈泽鹏. 拮抗烟草青枯病菌的内生细菌筛选、鉴定及定殖研究 [J]. 中国烟草学报, 2011, 17(5): 74-80.
- Li Y C, Cheng F B, Chen Z P. Studies on screening and identification of endophytic bacteria against *Ralstonia solanacearum* and its colonization [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2011, 17(5): 74-80. (in Chinese)
- [23] 魏春妹, 张春明. 拮抗青枯病 90B4-2-2 菌株作用机理探讨 [J]. 上海农业学报, 2000, 16(4): 74-77.
- Wei C M, Zhang C M. Study on mechanism of antagonistic action of bacterial strain 90B4-2-2 on tomato bacterial wilt [J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2000, 16(4): 74-77. (in Chinese)
- [24] Whipps J M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere [J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 56: 487-451.
- [25] Silveira E B, Mariano R L, Michereff S J, et al. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Pseudomonas solanacearum* and effect on tomato seedling growth [J]. Fit Pathologia Brasileira, 1995, 20(4): 605-612.