

## 烟草赤星病拮抗生防菌 BS06-1 的筛选

唐圣华<sup>1</sup>, 万秀清<sup>2\*</sup>, 郭兆奎<sup>2</sup>, 颜培强<sup>2</sup>, 李丽杰<sup>2</sup>

(1. 安徽中烟工业公司蚌埠卷烟厂, 安徽蚌埠 233000; 2. 牡丹江烟草科学研究所, 黑龙江牡丹江 157011)

**摘要** [目的] 筛选对烟草赤星病具有明显拮抗作用的细菌。[方法] 应用平板对峙培养法对从烟草根际分离到的细菌进行烟草赤星病拮抗性鉴定, 对其中对烟草赤星病菌拮抗性较高的一株细菌利用细菌 16S rRNA 通用鉴定引物进行 PCR 扩增、测序和田间抗病性试验。[结果] 共从烟草根际分离 120 份细菌, 有 6 份对烟草赤星病原菌具有一定拮抗作用, 其中 1 份细菌拮抗作用明显, 定名为 BS06-1。将该细菌的 16S rRNA 测序结果登录 NCBI 网站进行 Blastn 序列比对, 结果表明该菌株与枯草芽孢杆菌 BSD-2 同源性达到 96%, 与枯草芽孢杆菌 BCRC 14718 同源性达到 95%, 证明该菌属于枯草芽孢杆菌。田间试验证明该菌株 BS06-1 对烟草赤星病具有显著的抑菌效果。[结论] BS06-1 细菌对烟草赤星病具有明显拮抗作用。

**关键词** 枯草芽孢杆菌 BS06-1; 烟草赤星病; 生防

**中图分类号** S435.72 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)35-15564-02

## Screening of Antagonistic Biocontrol Bacteria BS06-1 to Tobacco Brown Spot

TANG Sheng-hua et al (Bengbu Cigarettes Factory, Chinese Cigarette Industrial Company in Anhui, Bengbu, Anhui 233000)

**Abstract** [Objective] The study aimed to screen the bacterium that had obvious antagonism to tobacco brown spot. [Method] The method of confront culture on a plate was used to isolate the bacteria from tobacco rhizosphere for antagonism identification of tobacco brown spot. One isolated bacterium that had high antagonism to tobacco brown spot was made for PCR amplification and sequencing by general bacterium 16S rRNA identification primer and as well as for disease resistance test in field. [Result] There were 120 bacteria that were isolated from tobacco rhizosphere, among them, 6 bacteria had some antagonism to tobacco brown spot in which one BS06-1 had obvious antagonism to tobacco brown spot and was named as BS06-1. When the 16S rRNA sequencing result of the bacterium was logged on NCBI website for Blastn sequence comparison, it was found that the bacterium showed 96% homology with *Bacillus subtilis* strain BSD-2 and 95% homology with *B. subtilis* BCRC 14718, proving that this bacterium belonged to *B. subtilis*. The field test showed that the strain BS06-1 had significant inhibition to tobacco brown spot. [Conclusion] The bacterium BS06-1 showed an obvious antagonism to tobacco brown spot.

**Key words** *Bacillus subtilis* strain BS06-1; Tobacco brown spot; Antagonism

烟草赤星病是我国烟草烟叶生产中的主要真菌病害之一, 每年都有一定程度的发生和危害。目前农业生产中仍然以化学农药防治为主。目前, 人们已经逐渐认识到化学农药残留对环境和生物的影响, 减少化学农药的使用, 生产绿色食品已经成为农业生产新的发展方向。拮抗生防菌在农业生产过程中的研究与应用在解决农药残留及保护环境方面具有重要意义<sup>[1]</sup>。其中, 枯草芽孢杆菌在植物真菌病害的拮抗作用国内外已经有广泛的研究和报道<sup>[2-3]</sup>。枯草芽孢杆菌产生的抗菌物质主要包括伊枯草菌素(iturin)、多粘菌素、制霉菌素、短杆菌肽等活性物质, 这些抗菌物质的抑菌机制已经进行了大量的研究报道<sup>[4-8]</sup>。目前, 很多菌株在生产中进行了抗病性研究<sup>[9-10]</sup>, 然而其在烟草真菌病害方面的研究和应用上报道相对较少。该项目针对烟草赤星病, 利用平板对峙方法对从烟草根际筛选出的细菌进行拮抗性鉴定, 对其中拮抗烟草赤星病菌较高的一株细菌利用细菌 16S rRNA 通用鉴定引物进行 PCR 扩增并测序。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 常规化学试剂以及培养基试剂(包括酵母粉、牛肉膏、蛋白胨、琼脂等)购于上海博彩生物科技有限公司, *Taq* 酶、dNTPs 等生物制剂为宝(大连)生物技术有限责任公司产品, 引物由上海生工生物技术有限责任公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 烟草根际细菌的培养。**烟草根际土壤取样方法: 在多年重茬烟田(未施农药)取烟草根际土壤(上层: 1~2 cm;

中层: 2~4 cm; 下层: 4~8 cm), 取样方法如下: 在烟株的根际附近垂直向下掘穴, 用 70% 乙醇消毒的钢匙刮去一层表土(2~4 cm), 用 20 mm × 80 mm 的灭菌玻璃管平行插入根际土壤中取土样若干。将多点取得的根际土壤样品在无菌条件下混匀(各土层样品单独混合), 分成 3~4 份无菌保湿存放(4℃)备用。烟草根际细菌分离及培养方法: 将取得的根际土壤样品在无菌条件下用无菌水制成土壤悬浮液, 并稀释成 1 000~10 000 倍, 从中取 120 μl 涂 LB 平板(细菌培养用胰化蛋白胨 10 g; 细菌培养用酵母提取物 5 g; NaCl 10 g; 琼脂粉 10 g), 于 23℃ 条件下倒置培养, 培养期间挑取不同颜色、形态的菌落, 无菌条件下在 LB 培养基上进行纯化培养。

**1.2.2 烟草赤星病拮抗细菌筛选。**以烟草赤星病菌为指示菌, 将分离到的细菌菌株采用平板对峙生长法进行拮抗性筛选。在长满烟草赤星病菌菌丝的平板边缘处用灭菌的打孔器打下直径为 6 mm 的菌饼, 然后将菌饼倒贴(有菌丝的一面朝下)于 PDA 平板中央, 同时在与菌饼相距 30 mm 处均匀接种 3 滴(5 μl/滴)不同分离纯化后待测的未知细菌菌液, 对照平板只接烟草赤星病菌菌饼。将各处理平板置于 25℃ 培养箱中培养 3~5 d, 观察待测的细菌菌株对烟草赤星病菌有无拮抗作用。选取抑菌圈较大、拮抗作用持久的菌株进行 PCR 鉴定。

**1.2.3 烟草赤星病拮抗细菌的鉴定。**单菌落培养 4 h 后利用菌落 PCR 方法进行鉴定, 方法为: 在细菌的 16S rRNA 高度保守区域设计合成细菌 16S rRNA 通用鉴定引物, 16SF: 5' CCGGATCCAGAGTTTGATCATGCTCAGCA3', 16SR: 5' CGG-GATCCTACGGCTACCTTGTACGACTT3', 扩增片段 1.6 kb 左右。对筛选出来的具有拮抗作用的进行菌落 PCR 鉴定, 10 μl 的 PCR 扩增体系为: 2.5 mmol/L dNTPs 1 μl, 10 × PCR

**基金项目** 黑龙江省烟草专卖局资助项目(hykh20030001)。

**作者简介** 唐圣华(1970-), 男, 安徽广德人, 助理农艺师, 从事烟草工程研究。\*通讯作者。

**收稿日期** 2008-00-00

buffer 1 μl, Taq 酶 0.2 μl, 引物各 0.5 μl, 超纯水 5.8 μl, 菌液模板 1 μl。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 40 min, 58 °C 退火 40 min, 72 °C 延伸 1.2 min, 循环 36 次后, 72 °C 延伸 10 min。特异性 PCR 扩增片段(1.6 kb 左右)凝胶电泳回收后插入 TaKaRa pMD18-T vector, 转化大肠杆菌后涂 LB(含板氨苄 40 mg/L), 37 °C 倒置过夜培养, 次日挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定(PCR 扩增体系、条件同上), 阳性克隆置 LB 液体培养基繁殖后测序。测序结果输入 NCBI 进行比对, 根据比对结果鉴定细菌的种类。

**1.2.4 烟草赤星病拮抗细菌的田间抗病性试验。** 试验品种 NC89, 烟草打顶后每隔 3 d 分别喷施 3 次药剂, 试验处理如下: A: 40% 菌核净可湿性粉剂 500 倍; B: 10% 多抗霉素 B 可湿性粉剂 1 000 倍; C: 赤星病拮抗细菌(BS06-1)菌液 100 倍; D: 水。各处理 3 次施药完毕后隔 3 d 接种烟草赤星病菌孢子悬浮液, 跟踪调查烟草赤星病发病情况, 每株烟由下至上调查 10 片叶, 并计算各处理病情指数以及抑菌效果: 烟草赤星病病害严重度分级标准(以叶片为单位): 0 级: 全叶无病; 0.5 级: 病斑面积占叶片面积的 1% 以下; 1 级: 病斑面积占叶片面积的 1% ~ 5%; 2 级: 病斑面积占叶片面积的 5% ~ 10%; 3 级: 病斑面积占叶片面积的 10% ~ 20%; 4 级: 病斑面积占叶片面积的 20% 以上。

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

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

**2 结果与分析**

**2.1 烟草赤星病拮抗细菌筛选** 试验中共从烟草根际分离 120 份细菌, 其中有 6 份对烟草赤星病原菌具有一定的拮抗作用。其中 1 份细菌拮抗作用明显(图 1), 标记为 BS06-1。



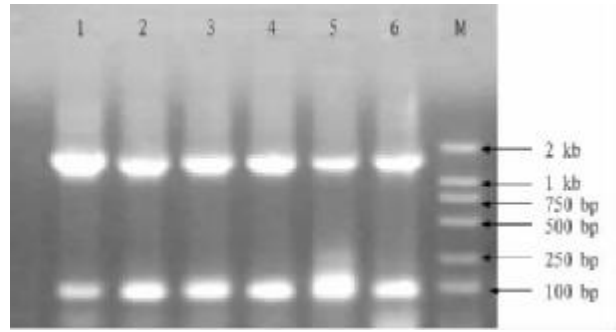
图 1 BS06-1 与烟草赤星病菌的对峙培养

Fig. 1 Confront culture of BS06-1 and tobacco brown spot

**2.2 烟草赤星病拮抗细菌 BS06-1 的鉴定** 取 BS06-1 单菌落置于 100 μl LB 液体培养基培养 4 h 后, 利用菌落 PCR 方法进行细菌的 16S rRNA 鉴定, 凝胶电泳结果见图 2。

回收泳道 1 中的 1 600 bp 左右的特异性片段后克隆到 T-载体后繁殖测序, 测序结果如下:

ATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCG-GCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGC-TTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG-GGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG-GGGCTAATACCGGATGTTGTTTGAACCGCATGTTCAAAC-ATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCCTTACAGATGGACCCGCG-GCGCATTAGCTAGTTGCTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCA-CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGCCACACTGG-



注: M 为 DL2000 DNA Marker。

Note: M: DL2000 DNA Marker.

图 2 BS06-116S rRNA 的菌落 PCR 结果分析

Fig. 2 PCR analysis of BS06-116S rRNA colony

GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA-GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG-CCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT-GTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCT-TGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC-AGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA-ATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT-GATGTGAAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA-AACTGGGAACTTGACTGCAGAAGAGGAGACTGGAAATTC-CACGTGTAGCGGTGAAATGCCGTAGAGATGTGGAGGAACAC-CAGTGCCGAAGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG-GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGC-TAGTCCACCGCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTT-CCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCC-TGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAACTCAAGGAATTGAC-CGGGGCCCCACAAGCGTGAGCATGTGGATTAATCGAGCA-CGCGAGACCTTACCAAGTCTTGACATTCTCTGACAATCTA-AGAATAGGACGTCCCCGTTCCGGGGCAAGAGTGACACGGT-GGTGCAATGGACTAATC

将测序结果登录 NCBI 网站进行 Blastn 序列比对, 结果表明该菌株与枯草芽孢杆菌 BSD-2 同源性达到 96%, 与枯草芽孢杆菌 BCRC 14718 同源性达到 95%, 证明属于枯草芽孢杆菌。

**2.3 烟草赤星病拮抗细菌的田间抗病性试验** 从表 1 可见, C 处理(枯草芽孢杆菌)防效最好, 达到 80%, 要显著好于其他处理。分析认为, 由于试验采取先喷施药剂 3 次后隔 3 d

表 1 各处理对 NC89 烟草赤星病的抑菌试验结果

Table 1 Result of the bacteriostatic test of each treatment against NC89 tobacco brown spot

处理 Treatment	株数 Plant number	感病叶数 Susceptible leaf number	最高病级 Highest disease level	发病率 % Incidence rate	病情指数 Disease index	防效 // % Control effect
A	12	37	2	31	10.6	50 <sup>a</sup>
B	12	46	2	38	12.7	41 <sup>a</sup>
C	12	14	0.5	12	4.3	80 <sup>b</sup>
D(CK)	12	72	3	60	21.4	-

注: 表中数字后不同小写字母上标表示在 0.05 水平有显著差异。

Note: Different lowercase superscripts mean significant differences at 0.05 level.

前土壤含水量对总径流量的影响。由表 6 可知,在多数情况下,当雨前土壤含水量较高时,地表径流量较大。高含水量条件下,产流量相对增长 11.26% ~ 470.84%。有学者研究表明,径流量与土壤表层(0~20 cm)的初始含水量的关系可用幂函数表示<sup>[5]</sup>。由于稳定入渗率比较一致,因此径流量的增加反映了地表径流增长速率的快慢。在高含水量条件下,地表径流增速较快,在较短的时间内达到稳定,因此流量较大。对于小区 T6,较低含水量条件下的地表产流量大于较高含水量条件下的地表产流量,这可能与小区的地表状况有关。

表 6 不同雨前土壤含水量条件下的地表径流量  
Table 6 Surface runoff yield under different antecedent soil moistures

编号 Code	LM ml	HM ml	相对偏差//% Relative deviation
T1	16.17	69.78	331.42
T2	23.03	53.18	130.92
T3	42.86	236.41	451.54
T4	5.17	29.53	470.84
T5	12.57	41.37	229.17
T6	75.55	66.86	-11.49
T7	49.76	55.36	11.26

土壤入渗性能受土壤表层水力传导梯度的影响,雨前土

(上接第 15565 页)

再接种烟草赤星病菌,处理 A、B 喷施的药剂随田间降雨而流失或稀释,因此效果不显著;而 C 处理的枯草芽孢杆菌已经在烟草叶面定殖或进入烟草体内,其营养竞争作用以及源源不断分泌的具有抑菌作用的代谢产物能显著抑制病原真菌在烟草叶面上的繁殖,从而表现显著的抑菌效果。

### 3 结论与讨论

枯草芽孢杆菌所含有的抗菌物质以及抗菌机制国内外学者已经做过许多相关研究工作,然而针对任何单一菌株而言,不同生态环境中分离到的菌株产生的抗菌素种类及抑菌效果也有所不同<sup>[11]</sup>。目前,已经有部分菌株在生产上进行了实际应用,然而由于菌株在植物根际、叶面定殖情况以及产生抗菌素的多少受环境因素影响较大<sup>[12-13]</sup>,所以防治效果与室内试验结果还存在一定的差异。该试验研究过程中应用平板对峙方法从烟草根际土壤中分离到一株对烟草赤星病具有显著拮抗作用的细菌,经鉴定为枯草芽孢杆菌,定名为 BS06-1。田间试验证明该菌株对烟草赤星病具有显著的抑菌效果。但实际应用过程中,菌株的发酵条件以及菌株的叶面定殖情况等还需要进行深入的研究。

### 参考文献

- [1] 王小艺,黄炳球. 农药对农业生态系统的影响与生态学控制对策[J]. 农业环境保护,1997,16(6):279-282.
- [2] 李忠武,王振中,邢协加,等. 农药污染对土壤动物群落影响的实验研

究[J]. 环境科学研究,1999,12(1):52-56.

### 3 结论与讨论

在其他条件相同的情况下,当雨前土壤含水量较高时,地表产流较快,径流量较大;雨前土壤含水量对稳定入渗率的影响不明显;雨前土壤含水量对降雨产流的影响主要体现在降雨初期,当降雨进行到一定阶段后,不同雨前土壤含水量的产流过程将趋于一致。

### 参考文献

- [1] 何毓蓉,陈学华. 中国紫色土(下篇)[M]. 北京:科学出版社,2003:1-404.
- [2] 袁建平,雷廷武,郭索彦,等. 黄土丘陵区小流域土壤入渗速率空间变异性[J]. 水利学报,2001(10):88-92.
- [3] 张金柱,李保国,郭素萍,等. 河北片麻岩山区坡地产流特征[J]. 河北农业大学学报,1999,22(4):103-106.
- [4] 宋孝玉. 黄土沟壑区不同下垫面条件对农田降雨入渗及产流关系影响的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2001:1-109.
- [5] 郭庆荣,张秉刚,钟继洪,等. 丘陵赤红壤降雨入渗产流模型及其变化特征[J]. 水土保持学报,2001(1):62-65.
- [3] SHODA, M. Bacterial control of plant diseases[J]. J Biosci Bioeng, 2000, 89(6):515-521.
- [4] CHARLES W BACON, IDA E YATES, DOROTHY M HINTON, et al. Biological control of fusarium moniliforme in maize [J]. Environmental Health Perspectives, 2001, 109(S2):325-332.
- [5] SOO-JIN CHO, SAM KEUN LEE, BYEONG JIN CHA, et al. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03 [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 223:47-51.
- [6] YOSHIDA S, HIRADATE S, TSUKAMOTO T, et al. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC22 isolated from mulberry leaves [J]. Phytopathology, 2001, 91:181-187.
- [7] ANNE-LAURE MOYNE, THOMAS E CLEVELAND, SADIK TUZUN, et al. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 234:43-49.
- [8] 顾真荣, 吴畏, 高新华, 等. 枯草芽孢杆菌 G3 菌株的抗菌物质及其特性[J]. 植物病理学报, 2004, 34(2):166-172.
- [9] BAKER C J. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions [J]. Plant Disease, 1985, 69:770-772.
- [10] 王雅平, 刘伊强, 潘乃遂, 等. 枯草芽孢杆菌 A014 菌株防治小麦赤霉病的初步研究[J]. 生物防治通报, 1992, 8(2):54-57.
- [11] 何红, 蔡学清, 陈玉森. 辣椒内生枯草芽孢杆菌 BS-2 和 BS-1 防治香蕉炭疽病研究[J]. 福建农林大学学报:自然科学版, 2002, 31(4):441-443.
- [12] 余桂容, 叶华智, 张敏, 等. 小麦赤霉病的生物防治研究 - II. 拮抗芽孢杆菌在麦穗上的消长动态及生物学特性[J]. 四川农业大学学报, 2002, 20(4):324-327.
- [13] 王占武, 李晓芝, 葛建国, 等. 拮抗菌 B501 在草莓根际的定殖及对其他根际微生物的影响[J]. 河北农业科学, 2002, 6(3):14-18.