

烟草疫霉生防细菌的筛选及鉴定

舒晓玲¹, 吴毅歆¹, 周惠萍¹, 毛自朝², 李顺德³, 何月秋^{1,2*}

(1. 云南农业大学农业生物多样性应用技术国家工程中心, 昆明 650201; 2. 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201; 3. 玉溪市农业局, 云南 玉溪 663000)

摘要: 为获得防治烟草黑胫病的生防菌株, 通过对峙平板法, 从烟田土壤中分离出 1 株对烟草疫霉具有很好抑菌作用的细菌 B40-3。培养 3 d 后, 该菌株对烟草疫霉抑菌带宽度为 0.9 cm, 抑菌圈半径为 2.3 cm, 并对其余 12 种植物病原真菌有很好抑制作用。该菌株在 LB 液体培养基中, 37 °C, 210 rpm 条件下培养 40 h, OD 值达到最大值。依传统生理生化反应鉴定, B40-3 属于枯草芽孢杆菌。

关键词: 烟草疫霉; 生防细菌; 筛选; 鉴定; 烟草

中图分类号: S572.08

文章编号: 1007-5119 (2012) 04-0060-05

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2012.04.013

Screening and Identification of a Bacterium Antagonistic to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*

SHU Xiaoling¹, WU Yixin¹, ZHOU Huiping¹, MAO Zichao², LI Shunde³, HE Yueqiu^{1,2*}

(1. National Engineering Center of Biodiversity Applied Technologies, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. Yuxi Agricultural Bureau, Yuxi, Yunnan 663000, China)

Abstract: A biocontrol bacterial strain B40-3 antagonistic to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, a pathogen of tobacco black shrank, was isolated from tobacco-growing field by dual culture. The isolate had 0.9 cm fungistasis band and 2.3 cm inhibitory radius when it co-cultured with the pathogen for 3 days. B40-3 could inhibit other 13 fungal pathogens as well. In LB broth medium, its OD600 value reached to the maximum at 37 °C, 210 rpm for 40 hours. B40-3 was identified as *Bacillus subtilis* by the traditional spore staining and physiological and biochemical reactions.

Keywords: *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*; biocontrol bacterium; screening; identification; tobacco

烟草黑胫病是由烟草疫霉 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) 引起的, 是烟草生产中一类毁灭性真菌病害^[1]。烟草黑胫病从苗床期到大田生长期均能发生, 主要为害移栽后的大田烟株, 造成植株茎基部呈水渍状黑斑, 后向上下及髓部扩展, 直至植株萎蔫死亡。在防治上, 主要采用种植抗病品种与化学药剂等。然而, 随着绿色环保农业概念的推广, 应用对生态友好、防治效果稳定的生物制剂逐渐被人们所接受。植物根围促生长细菌是生存在植物根围中, 对植物生长有促进或对病原菌有拮抗作用的有益细菌的统称。近年来, 许多研究

表明, 植物根围促生长细菌在促进植物生长和防治植物病害方面有着其他微生物不具有的优势。云南是烟草生产大省, 黑胫病已成为烟草生产的重要限制因子。本研究于 2009—2010 年在云南农业大学农业生物多样性应用技术国家工程中心进行, 旨在云南的烟田土壤条件下, 筛选出适于环境, 对烟草黑胫病具有防治潜力的芽孢杆菌, 为防治该病提供生防菌株基础。

1 材料与方法

1.1 土壤中细菌的分离

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: 舒晓玲, 女, 硕士研究生, 主要从事植物病害生物防治。E-mail: clioshu@163.com。*通信作者, E-mail: ynfh2007@163.com

收稿日期: 2010-04-30

修回日期: 2011-03-15

采用平皿稀释法分离，从昆明市嵩明县羊桥乡和陆良县马街乡烟田土壤中分离芽孢杆菌。将土壤稀释成悬液，在 70 °C 的水浴锅中保温 10 min，以便杀死不耐高温的真菌、细菌、放线菌及其他土壤生物。将处理过的土壤悬液涂布于固体平板培养基上，32 °C 的温箱中培养 24 h，挑取单个菌落，进一步划线培养观察菌落性状并保存^[2]。分离和抑菌作用采用 PDA 培养基；性状观察用 NA、PDA、V8 固体培养基；生长速度测定用 LB 液体培养基。

1.2 生防细菌的初步筛选

将分离得到的菌株划线活化，挑取单菌落和烟草疫霉接种到同一个培养皿中进行对峙培养。两者间隔 2 cm，每个菌株设 3 个重复，3 d 后观察抑菌效果，以筛选具有明显抑菌带的生防菌株。

1.3 生防菌株 B40-3 抑菌作用的测定

将在 PSA 平板生长好的烟草疫霉菌用打孔器制成直径 6 mm 的菌饼，接种于 PSA 平板中央，用接种环粘取菌株 B40-3 的单菌落在菌饼两旁，距离菌饼 2 cm 左右划两道平行线。27 °C 培养 3~4 d，测量抑菌带的宽度^[3]。

将保存的菌种在 NA 培养基上划线活化。32 °C 培养 24 h，待单菌落长出后，挑取单菌落放入 LB 液体培养基，在 32 °C，210 rpm 条件下培养 24 h，得到发酵液。制备烟草黑胫病原菌的孢子悬浮液^[4-5]，按陈方新等^[6]的方法，将孢子悬浮液调至合适浓度，混入融化好并冷却到 40 °C 左右的 PDA 培养基中。将培养基倒入培养皿，制成带菌平板。待培养基凝固后，在培养皿中间放入牛津杯。在牛津杯中加入生防菌发酵液 200 μL。27 °C 培养 3~4 d，测量抑菌圈的大小。

1.4 生防菌株 B40-3 的抑菌谱测定

选择实验室保存和田间为害较严重的 13 种病原真菌测定 B40-3 的抑菌谱。病原真菌包括：烟草疫霉 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)、玉米小斑病菌 (*Bipolaris maydis*)、玉米弯孢霉病菌 (*Curvularia lunata*)、康乃馨枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*)、蚕豆黑斑病菌 (*Alternaria*

sp.)、辣椒炭疽菌 (*Colletotrichum capsici*)、棉花红腐病菌 (*F. moniliforme*)、小麦雪腐病菌 (*Typhula incarnate*)、尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*)、禾谷镰刀菌 (*F. graminearum*)、水杉赤枯病菌 (*Pestalotia foedans*)、番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 和烟草赤星病菌 (*A. alternata*)。

1.5 生防细菌 B40-3 最佳生长条件的测定

将 OD600 为 1.2 的细菌发酵液分别按照 1% 的接种量接种在 LB 液体培养基中。在 25、28、30、32、34、37、40、42 °C，200 rpm 条件下振荡培养 24 h；37 °C，120、150、170、190、210 rpm 条件下振荡培养 24 h；在 37 °C，210 rpm 条件下振荡培养 1、2、3、4、8、16、24、32、40、48、56、64 h 时；测定 OD600，以明确 B40-3 的最适生长温度，摇床转速的影响及生长曲线。各处理均重复 3 次。

1.6 生防细菌 B40-3 的初步鉴定

将 B40-3 接种在 PSA、PDA、NA、LB 等不同培养基上，观察菌株在这几种培养基上的生长情况。参照文献[7]，将培养 24 h 的 B40-3 进行革兰氏染色、芽孢染色，观察细胞大小、形态、有无芽孢产生、芽孢产生位置等鉴定。

2 结果

2.1 细菌的分离和初步筛选

从来自烟田的 70 余份土样中，得到表观菌落形态不同的分离物 200 多个，筛选出对烟草黑胫病具有抑制作用的细菌 1 个，编号为 B40-3。对峙培养 3 d，抑菌带宽度为 0.9 cm (图 1)。牛津杯法进一步测定，抑菌圈直径为 2.3 cm (图 2)。

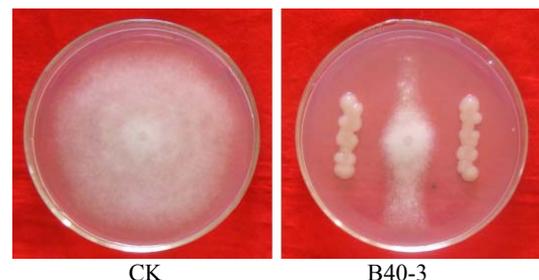


图 1 B40-3 与烟草疫霉的对峙培养

Fig. 1 Dual culture of B40-3 and *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*

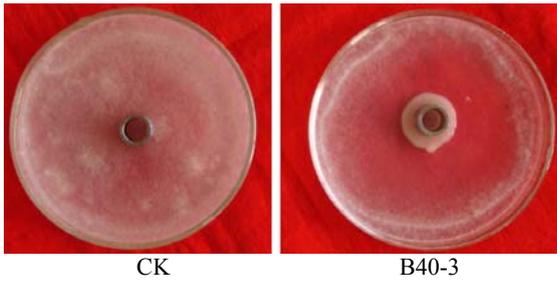


图2 B40-3对疫霉孢子萌发的抑制

Fig. 2 Inhibiting spore germination of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* by B40-3

2.2 生防细菌 B40-3 的抑菌谱

将 B40-3 菌株与病原真菌对峙培养于 PSA 平板上, 结果表明, 该菌株对 13 个病原真菌菌株均有很好的抑制作用(表 1), 且对于不同的病菌抑制效果存在差异。抑制玉米弯孢霉病菌的作用最强, 培养 3 d 后, 抑菌带达 1.0 cm, 抑制烟草赤星病的作用最弱, 抑菌带仅有 0.3 cm。方差分析结果显示, 菌株 B40-3 对康乃馨枯萎病菌、玉米弯孢霉病菌、烟草疫霉病菌、玉米小斑病菌的抑制效果与对其他 9 种病菌相比, 达到差异显著水平。

表 1 B40-3 对 13 种病原真菌的抑菌作用

Table 1 Inhibition of B40-3 to 13 plant pathogenic fungi

病原真菌	抑菌带宽度/cm	病原真菌	抑菌带宽度/cm
康乃馨枯萎病菌	1.03aA	水杉赤枯病	0.80bcABCD
尖孢镰刀菌	0.6333cdeCDE	蚕豆黑斑菌	0.57defDEF
禾谷镰刀菌	0.40fgEF	小麦雪腐病菌	0.47efgEF
烟草疫霉	0.90abcABC	玉米小斑菌	0.83abcABC
香石竹枯萎	0.47efgEF	玉米弯孢霉病菌	1.00abAB
棉花红腐病菌	0.73cdCD	烟草赤星病菌	0.33gF
辣椒炭疽菌	0.63cdeCDE		

注: 不同大、小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平上差异显著。

2.3 生防菌株 B40-3 最佳生长条件

将 B40-3 菌株培养液调节至 OD600 为 1.2, 按照 1% 接种量接种至 LB 液体培养基中, 所测定的结果如图 3~5。

2.3.1 最佳生长温度 B40-3 培养液的 OD600 与培养温度成正比。在 25~42 °C, 随温度的上升, 生长速度加快。30 °C 以下, 生长较为缓慢, 30 °C 以上, 生长速度较快。40 °C 和 42 °C 时, 测量的 OD 值高于 37 °C 的 OD 值, 表明该菌株能在 37 °C 以上的温度生长(图 3)。但在 40 °C 和 42 °C 时, 培养

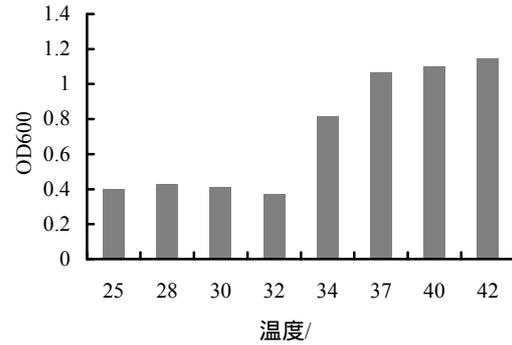


图3 不同温度对 B40-3 生长的影响

Fig. 3 Effect of temperatures on B40-3 growth

液中已经有明显的沉淀出现, 可能是菌体密度太大导致相互粘附, 不易准确测定, 故在以后的试验中将 37 °C 作为培养温度。

2.3.2 最佳摇床转速 B40-3 在 37 °C 条件下, 培养 24 h 时, 于摇床转速在 120~210 rpm 时, 随着摇床转速的提高 OD600 值增大, 达 1.42 (图 4), 说明 B40-3 在生长过程中需要较多的通气量。

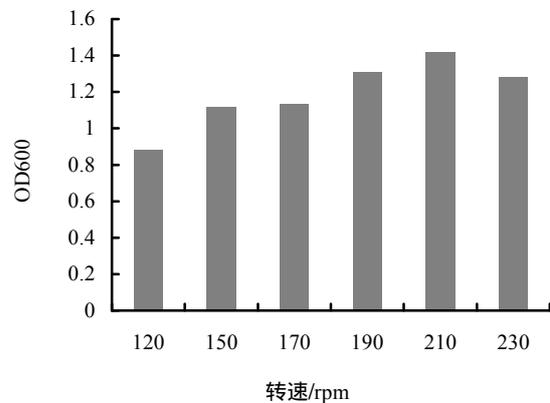


图4 不同转速对 B40-3 生长的影响

Fig. 4 Effect of rotations on B40-3 growth

2.3.3 最佳培养时间 B40-3 在 37 °C, 摇床转速为 210 rpm 条件下, 培养 2 h 后进入指数生长阶段, 培养 40 h 后, 菌量增长变得缓慢(图 5), 且有大量芽孢形成, 进入到停滞生长期。

2.4 初步鉴定结果

菌株 B40-3 在 PSA 培养基上形成的单菌落为圆形, 乳白色至淡黄色, 表面光滑, 垫状突起, 菌落直径 3~4 mm, 边缘光滑。在 PDA 上形成的菌落和 PSA 无明显差异。在 NA 培养基上, 单菌落为圆

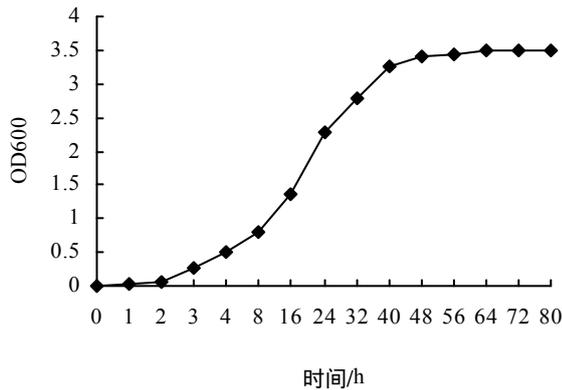


图 5 不同培养时间 B40-3 的生长曲线
Fig. 5 Growth curve of B40-3 with time

形，淡黄至黄色，表面光滑，不突起，无褶皱，菌落直径为 1~2 mm，边缘丝状。在 LB 培养基上形成的单菌落为圆形，淡黄至黄色，表面光滑，不突起，无褶皱，菌落直径为 2~3 mm，边缘丝状。革兰氏染色阳性，产芽孢，芽孢圆形、位于细胞中部或近端部。其生理生化反应与对照菌株枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* B168 基本相似，依据形态特征及生理生化反应（表 2），初步将 B40-3 鉴定为 *Bacillus subtilis*。

表 2 B40-3 的染色和部分生理生化实验结果

Table 2 The result of physiological and biochemical tests

测定项目	菌株	
	B168	B40-3
革兰氏染色	+	+
3%KOH 实验	-	-
芽孢	+	+
芽孢形状	圆形或椭圆形	圆形
芽孢产生位置	中部或稍偏	中部或近端部
淀粉水解	+	+
明胶液化	+	+
硝酸盐还原	+	+
甲基红和 V.P 实验	+	+
接触酶	+	+

注：“+”和“-”分别表示阳性和阴性反应。

3 讨论

烟草黑胫病是烟草生产中的重要病害，目前在防治方法上主要有种植抗病品种、轮作、推广高垄栽培与药剂防治等，生物防治主要在实验室和温室中进行，尚缺乏与化学农药相当且很稳定的生物防治制剂。在生物防治上，研究较多的有木霉属真菌 (*Trichoderma*)^[8]、双核丝核菌 (*Rhizoctonia*)^[9]、

内生芽孢杆菌^[10]、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[11-12]、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 和芽孢杆菌 (*Bacillus*)^[12-13]。

依据生态平衡原理分离有拮抗微生物菌株是一种常用策略，杨树军^[14]从云南省 9 个地州 29 个县的烟田中采集了 141 个土样，以土壤稀释平板法进行微生物分离和平板对峙培养法进行筛选，分离筛选出 280 个对黑胫病菌有拮抗作用的菌株，其中抑菌半径大于 17 mm 的拮抗菌有 19 株。我们分离了 200 多个菌株，但仅分离到 1 株具有抑制黑胫病菌的枯草芽孢杆菌 B40-3，分离效率低于杨树军报道的研究结果。然而，本研究采用先在 70 °C 水中预处理土壤水溶液，杀死不能耐热的菌株，仅留下产生芽孢的细菌；在杨树军的报道中未鉴定各个菌株的归属，也未说明它们是芽孢菌。王丽珍等^[15]从重庆市烟草根围土壤中采集 85 份土样，分离了 26 株对黑胫病菌有明显抑制作用，其中 24 株为荧光假单胞杆菌 (*Pseudomonas fluorescens*)，2 株芽孢菌 (*Bacillus*)。芽孢杆菌已在植物病害生物防治中起重要作用，但对黑胫病菌有抑制作用并用于黑胫病防治的菌株报道很少。

本研究依据芽孢杆菌有很好的抗逆性和易于生产加工及商品化，分离出了枯草芽孢杆菌 B40-3，并证明该菌株对 13 种植物病原真菌也有很好的抑制作用。然而，该菌株对烟草黑胫病的防治效果还有待田间试验的进一步证实。

参考文献

- [1] 郭普. 植保大典[M]. 北京：中国三峡出版社，2006：216-217.
- [2] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京：中国农业出版社，1998：179-180.
- [3] 鲁素云. 植物病害生物防治学[M]. 北京：北京农业大学出版社，1993：247-248.
- [4] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术[M]. 北京：中国农业出版社，1997：93.
- [5] 杨建卿, 江彤, 陈学平. 烟草疫霉菌的培养及大量产生游动孢子囊和游动孢子方法的研究[J]. 植物保护, 2001, 27(4)：12-14.
- [6] 陈方新, 齐永霞, 高智谋, 等. 诱导疫霉菌产生游动孢

- 子囊液体培养基的研制[J]. 植物保护, 2005, 31(2): 34-37.
- [7] 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: 349-377.
- [8] 李梅云, 谭丽华, 方敦煌, 等. 哈茨木霉的培养及其对烟草疫霉生长的抑制研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(6): 79-83.
- [9] Cartwright D K. Biological control of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* on tobacco seedlings with non-pathogenic binucleate *Rhizoctonia* fungi[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30(4): 1879-1884.
- [10] 王万能, 全学军, 肖崇刚. 烟草内生细菌防治烟草黑胫病及促生作用研究[J]. 植物学通报, 2005, 22(4): 426-431.
- [11] 王远山, 王平, 胡正嘉. 绿针假单胞菌 PL9 菌株对烟草疫霉的拮抗作用研究[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(3): 248-251.
- [12] 方敦煌, 顾金刚, 李江涛, 等. 烟草黑胫病菌的拮抗根际细菌的筛选[J]. 云南农业大学学报, 2001(2): 93-95, 98.
- [13] 方敦煌, 李梅云, 李天飞. 烟草猝倒病生防根际细菌的分离与筛选[J]. 西南农业大学学报, 2001(3): 242-246.
- [14] 杨树军. 烟草黑胫病生防菌筛选及防效初探[J]. 中国农学通报, 2009, 25(2): 222-225.
- [15] 王丽珍, 肖崇刚. 重庆烟草主要病害土壤拮抗细菌的筛选[J]. 烟草科技, 2008(4): 60-64.

《烟草科技》2012年第8期目次

烟草工艺

- 05 卷烟机剔除梗签物中含丝量的检测..... 曾 静, 李 斌, 冯志斌, 等
- 08 不同卷烟机型对烟丝造碎的影响..... 邓国栋, 堵劲松, 张玉海, 等
- 12 物料干重控制模式在加香加料及掺配环节中的应用..... 易 浩, 廖文大, 杜 文, 等

设备与仪器

- 15 复合滤棒成型机组微波检测剔除系统的设计应用..... 赵宝生
- 18 布袋式除尘器反吹增大卷接机组负压波动问题的改进..... 房华伟, 向有新, 覃健兴, 等
- 22 滚刀式切丝机切丝刀切削角度分析..... 刘志翎, 郭 颀
- 26 ZJ17 卷接机组二次风选漂浮室的改进..... 柏世绣, 付 保, 张东南

烟草化学

- 29 连续流动法测定烤烟总植物碱的不确定度..... 张 威, 王 颖, 唐纲岭, 等
- 34 晒黄烟主要化学成分与致香成分的相关性..... 王浩雅, 王 毅, 孙 力, 等
- 40 模拟卷烟燃吸条件下款冬花浸膏的热裂解..... 杨叶昆, 耿永勤, 缪恩铭, 等
- 44 聚甲基丙烯酸缩水甘油酯互通多孔材料选择性降低卷烟烟气中的苯酚..... 杨 松, 聂 聪, 孙学辉, 等
- 49 江西烤烟主要化学特性的适宜性评价和聚类分析..... 王能如, 何宽信, 黎茶根, 等
- 54 烤烟不同部位叶片烟碱含量与中微量元素的关联分析..... 陈 伟, 唐远驹, 潘文杰, 等
- 60 初烤烟叶 25 种化学成分与焦油的相关、逐步回归及通径分析..... 张 涛, 段沅杏, 陈进雄, 等
- 66 基于烟草花叶病毒模板高密度纳米金的制备及其对卷烟烟气 CO 的影响..... 刘 楠, 唐纲岭, 陈再根, 等

烟草农学

- 70 烟草 β -胡萝卜素羟化酶基因的克隆与序列分析..... 林世锋, 王仁刚, 王 轶, 等
- 75 陕西省白河烟区气候适生性分析..... 王智慧, 李淑娥, 刘开平, 等

病虫害防治

- 79 烟草青枯病病圃土壤微生物多样性初步分析..... 蔡刘体, 商胜华, 胡重怡, 等
- 84 烟草野火病拮抗生防菌的筛选、鉴定与应用..... 孙宏伟, 元 野, 杨晓敏, 等