

生防细菌PA2101和PG3402抑菌和促生特性的研究

千慧敏¹, 赵辉¹, 刘新涛¹, 倪云霞¹, 邱睿², 李小杰², 赵新贝¹,
李淑君², 刘红彦^{1*}, 文艺^{1*}

(1. 河南省农业科学院植物保护研究所, 郑州 450002; 2. 河南省农业科学院烟草研究所/烟草行业黄淮烟区烟草病虫害绿色防控重点实验室, 许昌 461000)

摘要: 以本实验室分离的在烟草生产上具有较大生防潜力的铜绿假单胞杆菌 PA2101 和格拉纳达假单胞杆菌 PG3402 为对象, 测定了这 2 株细菌的抑菌活性及促生特性。试验结果表明, 菌株 PA2101 和 PG3402 对烟草根腐病、烟草赤星病、小麦纹枯病、芝麻茎点枯病和地黄轮纹病等多种作物常见病害的病原菌具有较强的拮抗作用; 2 株菌株的无菌发酵滤液能使烟草疫霉和根串珠霉菌丝生长畸形、抑制根串珠霉分生孢子的萌发。菌株 PA2101 和 PG3402 产生对 2 种病原菌有抑制作用的挥发性物质。抑菌特性检测结果表明, 菌株 PA2101 和 PG3402 均能产生蛋白酶、纤维素酶和 β -1,3-葡聚糖酶等胞外酶, PA2101 还能分泌几丁质酶。另外, 2 株菌株能合成抑菌活性物质氢氰酸 (HCN)。抗生素合成基因检测结果发现, 菌株 PA2101 和 PG3402 均包含吩嗪-1-羧酸 (Phenazine-1-carboxylic acid, PCA) 合成基因, PG3402 还含有 2,4-二乙酰基间苯三酚 (2,4-diacetylphloroglucinal, DAPG) 合成基因。促生物质的检测结果表明, 菌株 PA2101 和 PG3402 均可产生嗜铁素和生长素 (IAA), 且具备溶磷特性。综上所述, 菌株 PA2101 和 PG3402 抑菌谱较广, 产生多种抑菌和促生物质, 含有合成 PCA 和 DAPG 的基因, 可用于烟草病害的防控。

关键词: 生防细菌; 抑菌活性; 抑菌特性; 促生机制

中图分类号: S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261(2020)01-0135-10

Studies on Antibacterial and Plant-Growth-Promoting Characterization in Biocontrol Bacterial Strains PA2101 and PG3402

QIAN Huimin¹, ZHAO Hui¹, LIU Xintao¹, NI Yunxia¹, QIU Rui², LI Xiaojie², ZHAO Xinbei¹,
LI Shujun², LIU Hongyan^{1*}, WEN Yi^{1*}

(1. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Tobacco Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory for Green Preservation & Control of Tobacco Diseases and Pests in Huanghuai Growing Area Tobacco, Xuchang 461000, China)

Abstract: We investigated the antimicrobial activity, inhibition and plant-growth-promoting characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PA2101 and *Pseudomonas granadensis* PG3402 with great biocontrol potential for tobacco in our laboratory. The results showed that PA2101 and PG3402 greatly inhibited *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia cerealis*, *Macrophomina phaseolina* and *Phoma herbarum*. The fermentation filtrates of the two bacteria caused the abnormal hyphal growth of *Phytophthora nicotianae* and *Thielaviopsis basicola*, as well as inhibited spore germination of *T. basicola*. They could produce volatile substances with inhibitory activity against *P. nicotianae* and *T. basicola*. Both bacteria were detected to be able to produce protease,

收稿日期: 2019-04-11

基金项目: 黄淮烟区烟蚜、烟粉虱和烟草根黑腐病绿色防控关键技术研究与应 (110201502017); 河南烟草病虫害绿色防控关键技术研究与应 (201741000027063); 黄淮烟区烟草黑胫病高效生防菌剂及抑菌活性物质研究 (110201603012)

作者简介: 千慧敏, 硕士, E-mail: qianhuimin90@sina.com; *通信作者, 刘红彦, 博士, 研究员, E-mail: liuhyl219@163.com; 文艺, 博士, 助理研究员, E-mail: wy412@163.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.01.009

cellulose and β -1,3-glucanase. Meanwhile, PA2101 was detected to be able to secrete chitinase. Both could synthesize HCN and harbored the genes for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid (PCA). PG3402 had the genes for synthesis of 2,4-diacetylphloroglucinal (DAPG). It was found that PA2101 and PG3402 could produce siderophores and IAA, and that they had the characteristic of solubilizing phosphorus. To sum up, the two bacteria PA2101 and PG3402 have a broad antimicrobial spectrum, and can inhibit the growth of *P. nicotianae* and *T. basicola*. They can produce a variety of inhibition and plant growth promoting substances, which also contain specific antibiotic genes, indicating that PA2101 and PG3402 have multiple biocontrol functions and that they can be used for prevention of tobacco disease.

Key words: biocontrol bacteria; antimicrobial activity; inhibition characterization; plant-growth-promoting mechanism

假单胞杆菌是一类具有强大生防潜力的植物根际微生物,能够防治多种植物病害,包括植物细菌病害^[1]、真菌病害^[2]、线虫病害^[3]和病毒病害^[4]等。尤其是铜绿假单胞杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* 和荧光假单胞杆菌 *Pseudomonas fluorescens*,能够产生多种抗生素、酶和挥发物等抑菌代谢产物,已经用于生物农药及其配方的研发^[5,6],在烟草上的研究和应用也逐渐增多。Ma 等^[7]使用铜绿假单胞杆菌 NXHG29 组成的新型生物有机肥有效地减轻了烟草黑胫病的危害,是一种长远有效的烟草黑胫病防治方法;铜绿假单胞杆菌 M18 的次生代谢产物申嗪霉素对烟草黑胫病病原菌有较强的毒力,已经被开发为高效生物农药^[8]。顾金刚等^[9]研究发现,荧光假单胞杆菌 RB-89 及其发酵滤液对烟草黑胫病的病原菌有抑制作用。

目前,有许多关于假单胞杆菌抑菌活性和抑菌物质的研究,主要包括拮抗菌株抑菌谱的测定,对病原真菌菌丝及孢子萌发的影响^[9],能否产生氢氰酸和纤维素酶等胞外抑菌活性物质^[10],是否含 2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-diacetylphloroglucinal, DAPG)、吩嗪-1-羧酸(phenazine-1-carboxylic acid, PCA)等抗生素合成相关基因^[11,12]。Wallace 等^[13]发现荧光假单胞杆菌 4-6 发酵滤液能够抑制苹果灰霉病菌的生长和孢子的萌发,并能产生挥发性抑菌物质;有学者筛选出含抗生素合成基因,并能分泌多种抑菌物质的荧光假单胞杆菌^[14]。一些生防细菌具有一定的促生作用,它们或能够分泌嗜铁素,或具有溶磷作用,或能直接分泌生长素 IAA,从而促进植物的生长。嗜铁素通过配合基的螯合反应,使土壤中难溶性的铁得以释放出来,从而提高植物对铁离子的吸收能力^[15];溶磷作用能够将难溶性磷酸盐转化为植物可利用的有效磷,促进植物对磷的吸收^[16];一定浓度的 IAA 能够直接促进植物的生长。有研究表明,假单胞菌株 G3-6^[17]有较强的降解有机磷、分泌 IAA 和铁载体能力,对黄瓜有较好的促生作用。

课题组前期获得了具有较好防病和促生效果的铜绿假单胞杆菌 PA2101 和格拉纳达假单胞杆菌 PG3402,本文研究了它们的抑菌谱,测定了其发酵液对烟草疫霉和根串珠霉的抑制作用,并对菌株的抑菌和促生特性进行检测,以明确其潜在的生防价值,为菌株的深入研究和在烟草生产上的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

生防细菌铜绿假单胞杆菌 PA2101 和格拉纳达假单胞杆菌 PG3402 由河南省农业科学院植物保护研究所生物防治研究室分离;供试病原菌见表 1。

1.2 供试培养基

KB 培养基^[18], PDA 培养基。

1.3 抑菌谱的测定

采用平板对峙和含毒介质法测定菌株对病原菌(表 1)的抑菌效果。

1.3.1 平板对峙法 于直径为 9 cm 的 PDA 平板中心接种 0.5 cm 病原菌菌块,菌株 PA2101 或 PG3402 与其相距 2 cm,同时以单独接种病原菌作为对照,每处理 3 次重复。对照病原菌基本长满皿时,测量对照和处理的病原菌菌落直径,计算相对抑菌率,相对抑菌率(%) = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 0.5) × 100。

表 1 供试病原菌
Table 1 Pathogens for test

病原菌 Pathogen	寄主 Host	提供单位 Department
菜豆壳孢 <i>Macrophomina phaseolina</i>	芝麻	河南省农业科学院植物保护研究所生物防治研究室
尖孢镰刀菌芝麻专化型 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>sesami</i>	芝麻	
球黑孢 <i>Nigrospora sphaerica</i>	芝麻	
索氏平脐蠕孢 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	芝麻	
立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	芝麻	
多主棒孢 <i>Corynespora cassicola</i>	芝麻	
草茎点霉 <i>Phoma herbarum</i>	地黄	
尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	烟草	河南省农业科学院烟草研究所
链格孢 <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) keiss	烟草	
疫霉 <i>Phytophthora nicotianae</i> van Breda de haan	烟草	
根串珠霉 <i>Thielaviopsis basicola</i>	烟草	
禾谷丝核菌 <i>Rhizoctonia cerealis</i>	小麦	河南省农业科学院植物保护研究所小麦病害研究室

1.3.2 含毒介质法 无菌发酵滤液的制备: 挑取菌株 PA2101 或 PG3402 单菌落, 接种于 KB 培养液中, 在 28 °C、180 r/min 振荡培养 16 h 制备种子菌, 种子菌以 3% 的接种量接种于 KB 培养液中, 28 °C、180 r/min 发酵 48 h。将菌悬液离心, 留上清液, 用微孔滤膜过滤两次得到无菌发酵滤液, 4 °C 保存。制作含 10% 无菌滤液的 PDA 平板, 以不含滤液的培养基为对照, 在每皿中央接入 0.5 cm 病原菌菌块 1 个, 每个处理重复 3 次。对照病原菌基本长满皿时, 测量对照和处理的病原菌菌落直径, 计算相对抑菌率。

1.4 菌株发酵滤液对病原菌的抑制作用

菌株 PA2101 和 PG3402 对烟草疫霉和根串珠霉菌丝影响的研究采用无菌发酵滤液与菌丝共培养法: 挑取病原菌菌丝分别加入两细菌菌株无菌发酵滤液 (体积比 1 : 9), 8 h 后镜检观察。菌株对根串珠霉分生孢子的影响采用无菌发酵滤液与分生孢子共培养法: 收集根黑腐病病原根串珠霉分生孢子 (浓度 1×10^7 孢子/mL), 并分别与菌株无菌发酵滤液 (PA2101 和 PG3402) 和无菌发酵滤液 5 倍浓缩液 (旋转蒸发仪 60 °C 旋蒸后得到 $5 \times$ PA2101 和 $5 \times$ PG3402) 等体积混合, 同时以 KB 液体培养基为对照, 共培养 8 h 和 24 h 时, 在光学显微镜下观察孢子萌发情况。

1.5 菌株挥发性产物对病原菌的作用

根据杨艺炜等^[19]的方法, 测定菌株 PA2101 和 PG3402 挥发性物质对靶标菌烟草疫霉和根串珠霉的抑制率。取一块直径为 0.5 cm 的靶标菌菌块放置于 PDA 平板中央, 用接菌环在 KB 平板上划满细菌菌株, 将前者反扣于后者之上, 两皿接触处用封口膜密封, 以空白的 KB 平板作对照, 每个处理 3 次重复。28 °C 培养 7 d, 测定对照和处理的靶标菌菌落直径, 并计算相对抑菌率。

1.6 菌株的抑菌特性

1.6.1 菌株分泌胞外酶测定 制作几丁质培养基^[20], 每平板 10 mL 培养基, 在平板中心位置放置牛津杯, 分别加入 200 μ L 菌株 PA2101 和 PG3402 的发酵滤液, 28 °C 培养 3 d, 观察是否产生透明圈, 若产生透明圈, 则表明有几丁质酶产生。

挑取菌株 PA2101 和 PG3402 单菌落, 分别接于羧甲基纤维素培养基^[21]平板中心, 28 °C 培养 7 d, 用 1 mg/mL 的刚果红染色 20 min, 再用 1 mol/L 的 NaCl 浸泡 15 min, 用水洗去表面附着的刚果红, 观察是否产生透明圈, 若产生透明圈, 则表明有纤维素酶产生。

挑取菌株 PA2101 和 PG3402 单菌落, 分别接于酪蛋白培养基^[22]平板上, 28 °C 培养 3 d, 观察是否产生透明圈, 若产生透明圈, 则表明有蛋白酶产生。

挑取菌株 PA2101 和 PG3402 单菌落, 分别接于 β -1,3-葡聚糖酶检测培养基^[23]上, 28 °C 培养 10 d, 若平板上出现无色水解区, 则表明菌株有 β -1,3-葡聚糖酶活性。

1.6.2 氢氰酸检测 氢氰酸的检测参考 Castric 等^[24]的方法。将放有 HCN 敏感试纸的无菌蓝色塑料盖放入培养皿中, 制作固体 KB 平板, 然后分别挑取菌株 PA2101 和 PG3402 单菌落在平板上划线, 28 °C 培养, 观察试纸颜色变化, 试纸由黄色变为红色即可判定有 HCN 产生。

1.6.3 抗生素合成基因检测 将菌株 PA2101 和 PG3402 接于 KB 培养液中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h, 取 2 mL 菌液离心后留沉淀, 用 CTAB 法提取菌株 DNA。由生工生物工程(上海)股份有限公司合成假单胞杆菌的 DAPG 和 PCA 合成基因的特异性引物(表 2)^[25,26], PCR 扩增后将特异性条带回收并克隆, 送由生工测序。用 NCBI BLAST 比对分析 DNA 序列。

表 2 检测假单胞杆菌抗生素合成基因的 PCR 引物

Table 2 PCR primers for detection of the genes for biosynthesis of related antibiotics in *Pseudomonas*

产物 Product	名称 Name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	片段长度 Length	来源 Reference
DAPG	Phl2a	GAGGACGTCGAAGACCACCA	745 bp	[25,26]
	Phl2b	ACCGCAGCATCGTGTATGAG		
PCA	PCA-F	CGCCTACCTGTGAACG	605 bp	Self designed
	PCA-R	GTTGCCCCAGAACTCCACCGACTCC		

注 Note: DAPG=2,4-二乙酰基间苯三酚 2,4-diacetylphloroglucinal; PCA=吩嗪-1-羧酸 phenazine-1-carboxylic acid.

1.7 促生特性

1.7.1 嗜铁素的检测 采用 MKB-CAS 固体检测培养基^[27]定性检测菌株 PA2101 和 PG3402 嗜铁素的产生, 将菌株单菌落接在 KB 培养基上培养 48 h 后, 接种于检测培养基上, 28 °C 培养 4 d 后观察培养基的颜色变化, 培养基由蓝色变为黄色时, 即可判断菌株产生嗜铁素。

1.7.2 溶磷能力检测 通过含有不同磷源 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ 和羟基磷灰石的平板培养基检测菌株 PA2101 和 PG3402 的溶磷能力^[28]。挑取菌株单菌落接种于含不同磷源的平板培养基上, 28 °C 培养 10 d 后观察是否产生透明圈。

1.7.3 IAA 的检测 参考 Patten 等^[29]的方法。将 OD_{600} 为 0.5 的菌株 PA2101 和 PG3402 种子液分别接入无 L-色氨酸和 L-色氨酸浓度为 0.47 mg/mL 的 KB 培养液中, 28 °C、180 r/min 摇培 2 和 5 d 时, 分别测定发酵液中 IAA 的含量。

1.8 数据统计与分析

数据处理采用 Excel 和 SPSS17.0 软件分析, 方差分析采用 Duncan's 新复极差法。

2 结果与分析

2.1 菌株 PA2101 和 PG3402 抑菌谱

菌株 PA2101 及其无菌滤液对 10 种供试病原菌均具有较好的抑制作用, 对尖孢镰刀菌胡麻专化型、球黑孢、索氏平脐蠕孢、立枯丝核菌、多主棒孢和草茎点霉的相对抑菌率均达到了 50% 以上。菌株 PG3402 对峙平板效果较好, 除链格孢和草茎点霉外, 对其他 8 种病原菌的相对抑菌率均在 50% 以上, 但其滤液效果较差, 原因有待进一步研究(表 3)。

2.2 菌株滤液对病原菌的拮抗作用

在光学显微镜下检测菌株对病原菌的抑制作用结果表明, 经菌株 PA2101 滤液处理的烟草疫霉菌丝短小且微膨大, 尖端变细扭曲; 菌株 PG3402 处理后菌丝不能正常生长, 菌丝内部原生质体分布不均匀, 部分甚至破裂, 分支处呈短小球状; 对照菌丝生长正常, 有明显锐角分支。菌株 PA2101 和 PG3402 发酵液处理后, 根串珠霉菌丝均扭曲成团, 正常生长受到抑制, 而对照菌丝生长正常(图 1)。

孢子萌发试验结果显示, 菌株 PA2101 和 PG3402 发酵滤液及 5 倍浓缩液, 与根串珠霉分生孢子共培养 8 h 后, 对孢子萌发的抑制率均达 100%; 24 h 后, 菌株 PA2101 和 PG3402 滤液对孢子萌发的抑制率分别为 70.67% 和 76.00%, 菌株 PA2101 和 PG3402 的 5 倍滤液对孢子萌发的抑制率分别为 96.67% 和 97.33%, 是菌株 PA2101 和 PG3402 滤液对孢子萌发抑制率的 1.37 和 1.28 倍, 表明发酵滤液浓缩后对根串珠霉分生孢子萌发的抑制效果更好(图 2)。

表 3 细菌菌株 PA2101 和 PG3402 的抑菌谱
Table 3 The antimicrobial spectrum of PA2101 and PG3402

病原菌 Pathogens	相对抑菌率 Relative inhibition rate (%)			
	PA2101		PG3402	
	平板对峙 Plate confrontation	含毒介质 Poison media	平板对峙 Plate confrontation	含毒介质 Poison media
尖孢镰刀菌 <i>F. oxysporum</i>	44.69 ± 3.20	38.09 ± 3.89	50.43 ± 3.94	17.79 ± 2.83
链格孢 <i>A. alternata</i> (Fr.) keiss	50.24 ± 0.21	44.71 ± 0.24	40.70 ± 4.17	7.23 ± 1.45
禾谷丝核菌 <i>R. cerealis</i>	50.93 ± 14.23	45.34 ± 16.12	69.37 ± 10.69	9.40 ± 1.72
菜豆壳球孢 <i>M. phaseolina</i>	52.08 ± 1.91	46.67 ± 1.91	62.17 ± 0.83	6.25 ± 0.00
尖孢镰刀菌芝麻专化型 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>sesami</i>	65.26 ± 0.88	60.80 ± 0.88	61.77 ± 3.81	4.22 ± 1.57
球黑孢 <i>N. sphaerica</i>	81.67 ± 1.91	79.17 ± 1.91	77.98 ± 1.66	6.25 ± 0.00
索氏平脐蠕孢 <i>B. sorokiniana</i>	63.12 ± 2.85	58.09 ± 2.85	62.76 ± 1.06	41.33 ± 5.98
立枯丝核菌 <i>R. solani</i>	66.25 ± 0.00	62.50 ± 0.00	57.38 ± 0.00	6.25 ± 0.00
多主棒孢 <i>C. cassiicola</i>	56.05 ± 0.19	50.55 ± 0.22	56.51 ± 1.96	7.82 ± 2.39
草茎点霉 <i>P. herbarum</i>	83.52 ± 11.54	80.77 ± 12.51	36.95 ± 0.48	6.76 ± 0.74

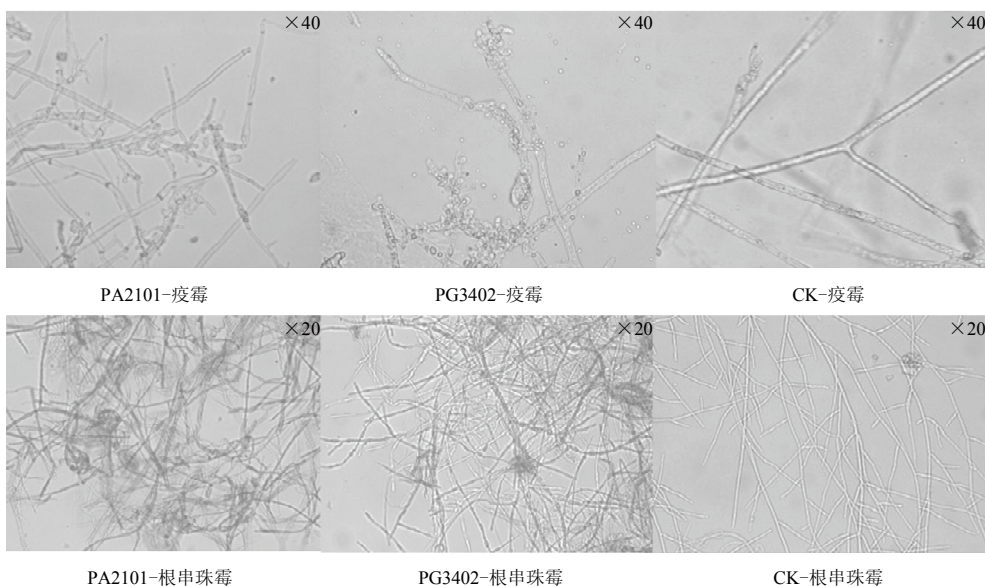


图 1 细菌菌株 PA2101 和 PG3402 发酵滤液对病原菌菌丝生长的影响

Fig. 1 The effect of bacterial strains PA2101 and PG3402 fermentation filtrate on hyphal growth of pathogens

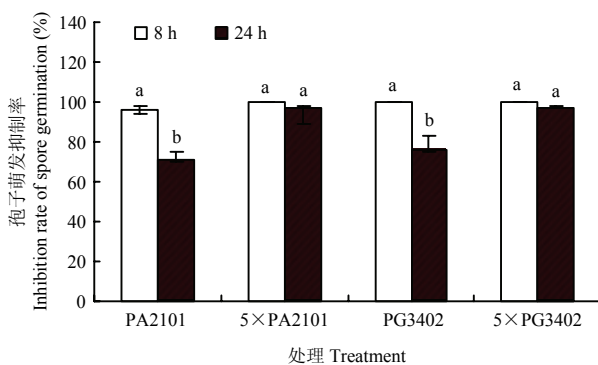


图 2 细菌菌株 PA2101 和 PG3402 发酵滤液对根串珠霉分生孢子萌发的抑制作用

Fig. 2 The inhibition rate of spore germination by the fermentation filtrate of the bacterial strains PA2101 and PG3402

2.3 菌株挥发性物质对病原菌的抑制作用

菌株 PA2101 对烟草疫霉和烟草根串珠霉菌丝生长的抑制率分别为 28.82%和 75.51%；菌株 PG3402 对两种病原菌菌丝生长的抑制率分别为 14.20%和 87.76%（图 3）。表明两株拮抗菌均能产生抑制烟草疫霉和根串珠霉生长的挥发性物质。

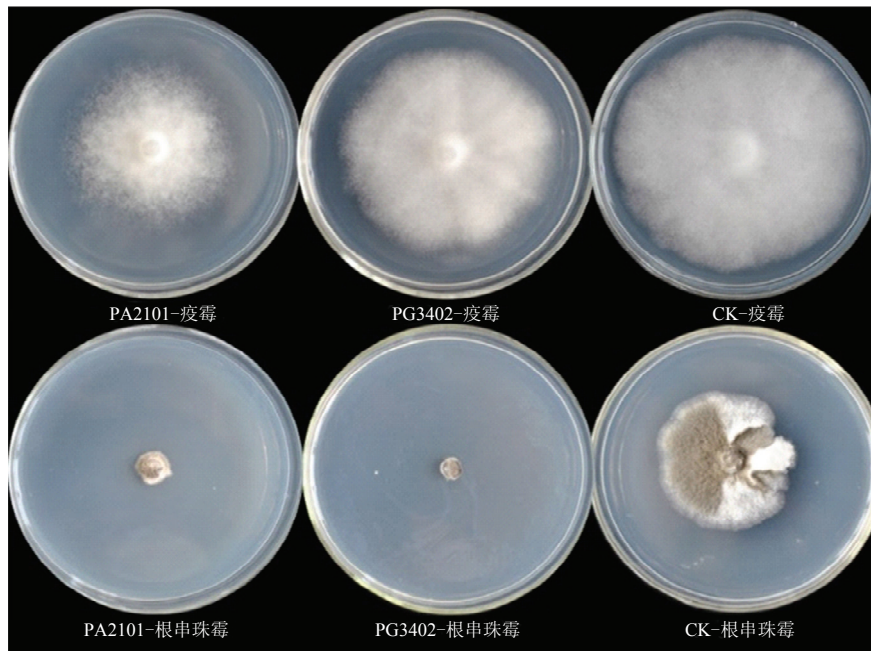
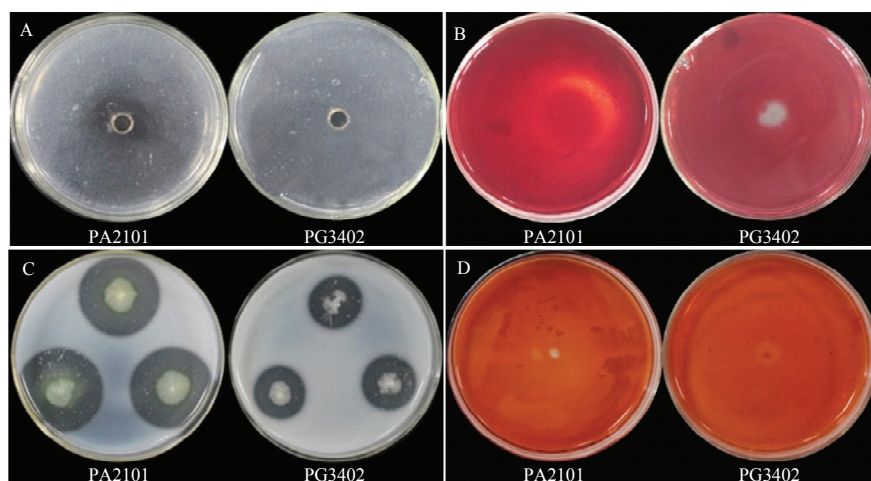


图 3 细菌菌株 PA2101 和 PG3402 挥发性产物对病原菌的抑制效果

Fig. 3 The inhibitory effect of bacterial PA2101 and PG3402 volatiles on growth of the pathogens

2.4 菌株的抑菌特性

2.4.1 抑菌活性物质 胞外酶活性测定结果表明，菌株 PA2101 发酵液中含有几丁质酶，菌株 PG3402 发酵液不含几丁质酶，不能水解几丁质（图 4A）；两菌株均有较高的蛋白酶水解能力（图 4C）；菌株 PA2101 降解 β -1,3-葡聚糖能力较强，降解纤维素能力较弱；菌株 PG3402 降解纤维素能力较强，降解 β -1,3-葡聚糖能力弱（图 4B、D）。在菌株产 HCN 能力测试中，菌株 PG3402 生长 4 d 后 HCN 敏感试纸变红，菌株 PA2101 在 7 d 后试纸变红，说明 PG3402 产 HCN 能力较强（图 5）



A: 几丁质酶活性 Chitinase activity; B: 纤维素酶活性 Cellulase activity; C: 蛋白酶活性 Protease activity; D: β -1,3-葡聚糖酶活性 β -1, 3-glucanase activity

图 4 细菌菌株 PA2101 和 PG3402 胞外酶活性检测

Fig. 4 Detection of bacterial PA2101 and PG3402 extracellular enzyme activity

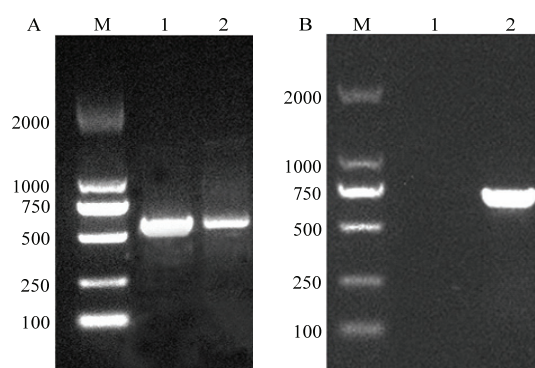


图 5 细菌菌株 PA2101 和 PG3402 产氢氰酸能力检测

Fig. 5 Detection of bacterial PA2101 and PG3402 hydrocyanic acid production capacity

2.4.2 抗生素产生相关基因的检测 以特异性引物扩增菌株 PA2101 的 DAPG 和 PCA 合成相关基因, 电泳仅检测到 PCA 特异性引物的特异性条带, 约 600 bp (图 6), 对条带回收后进行克隆测序, 得到 605 bp 的序列 (GenBank 登录号 MN044391), 在 NCBI 上 Blast 比对显示, 该序列与 *Pseudomonas aeruginosa* strain Ocean-1175 的 *phzF* 一致性为 100%, 与 *Pseudomonas aeruginosa* strain PA1201 的 *phz* 基因序列一致性为 99.50%。

以特异性引物扩增菌株 PG3402 的 DAPG 和 PCA 合成相关基因, 电泳检测分别得到约 750 和 600 bp 的特异性条带 (图 6), 对条带回收后进行克隆测序, 分别得到 746 和 605 bp 的序列, 在 NCBI 上 Blast 比对显示, DAPG 合成相关基因序列 (GenBank 登录号为 MN044392) 与 *Pseudomonas fluorescens* HR3-A13 的 *phlD* 基因一致性为 87.90%; PCA 合成相关基因序列 (GenBank 登录号为 MN044393) 与 *Pseudomonas aeruginosa* strain Ocean-1175 的 *phzF* 一致性为 98.18%, 与 *Pseudomonas aeruginosa* isolate paerg005 的 *phzF* 一致性为 98.01%。



1: PA2101; 2: PG3402; M: marker

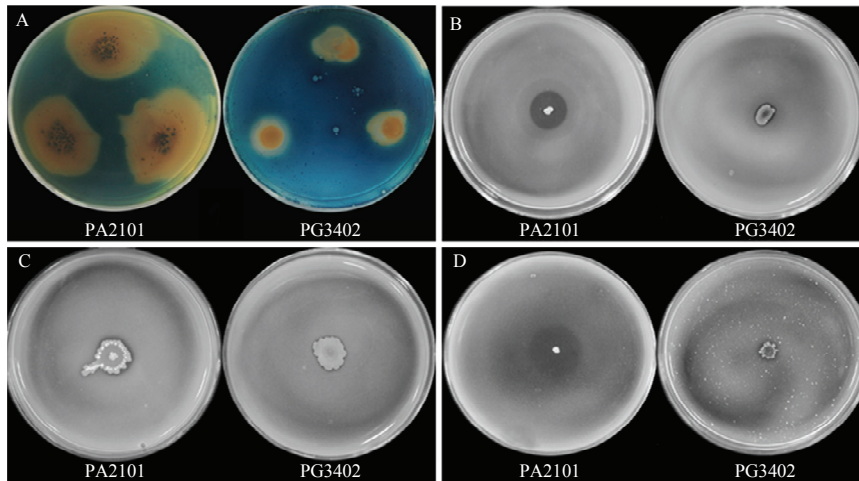
图 6 细菌菌株 PA2101 和 PG3402 中 PCA (A) 和 DAPG (B) 合成相关基因的检测

Fig. 6 Detection of PA2101 and PG3402 genes related to PCA (A) and DAPG (B) production

2.5 菌株促生特性的检测结果

菌株 PA2101 和 PG3402 在 CAS 检测平板上生长, 培养基由蓝变黄, 说明 PA2101 和 PG3402 能产生嗜铁素 (图 7A)。溶磷能力检测结果 (图 7B、C、D) 表明, 两菌株都具有溶磷作用, 水解透明圈大小表明菌株 PA2101 的溶磷能力高于菌株 PG3402。

菌株 PA2101 和 PG3402 在无色氨酸和含有色氨酸的 KB 培养液中均可以产生 IAA。菌株 PA2101 在两种培养液中的 IAA 产量之间无显著差异, 培养 5 d 后, 产量分别为 1.39 和 1.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。PG3402 在色氨酸培养液中 IAA 的合成量较高, 与不含色氨酸的培养液中合成量有显著差异, 5 d 后两种培养液中 IAA 的合成量分别为 1.46 和 2.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 说明色氨酸能促进菌株 PG3402 合成 IAA, 是菌株 PG3402 合成 IAA 的前体物质 (图 8)。



A: 嗜铁素 Siderophore; B: 磷酸锌 Zinc Phosphate; C: 磷酸钙 Calcium Phosphate; D: 羟基磷灰石 Hydroxyapatite

图 7 细菌菌株 PA2101 和 PG3402 嗜铁素和溶磷能力检测

Fig. 7 Detection of the bacterial PA2101 and PG3402 siderophore-producing ability and phosphorus solubility

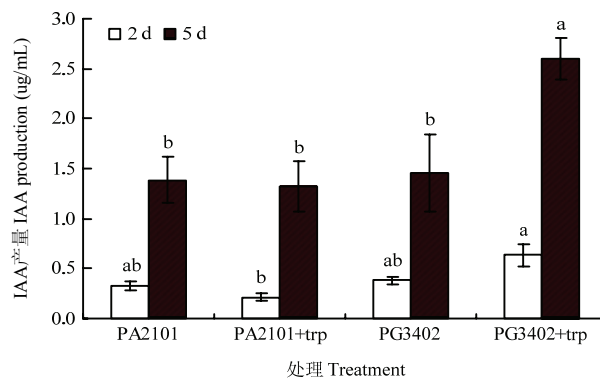


图 8 细菌菌株 PA2101 和 PG3402 IAA 产量

Fig. 8 The yield of IAA produced by bacteria PA2101 and PG3402

3 讨论

假单胞杆菌能够防治多种植物病害，是植物病害生物防治和根际促生菌最具应用潜力的菌种之一。目前，拮抗假单胞杆菌的研究和开发大多只针对某种作物的单一病害^[30,31]，本课题从土壤中分离的菌株 PA2101 和 PG3402 能够同时防治烟草黑胫病和根黑腐病两种土传病害，菌株 PA2101 对烟草黑胫病和烟草根黑腐病的防效分别为 70.11% 和 62.67%，菌株 PG3402 的防效分别为 60.92% 和 60.00%，与药剂对照防效相当；2 株菌株能改善烟草地上植物学性状，促进烟草根系发育，是烟草绿色防控的潜力菌株。

菌株 PA2101 和 PG3402 能产生抑制烟草疫霉和根串珠霉的胞外可溶性和挥发性物质，且菌株 PA2101 和 PG3402 以及 PA2101 发酵滤液对烟草赤星病、小麦纹枯病、芝麻茎点枯、芝麻枯萎病、芝麻叶枯病、芝麻叶斑病和地黄轮纹病等几种常见作物病害病原菌的拮抗作用较强，具有防治多种作物病害的潜力；菌株 PG3402 发酵滤液的拮抗能力较弱。本结果为菌株 PA2101 和 PG3402 进一步开发利用提供了理论依据，菌株 PA2101 及其发酵滤液均可研发为生防制剂，菌株 PG3402 应偏重于活菌制剂的开发。

基于菌株 PA2101 和 PG3402 的抑菌特性，本文研究了这两株菌株可能具有的抑菌机理。试验结果发现，两菌株均可分泌蛋白酶、纤维素酶和 β -1,3-葡聚糖酶，菌株 PA2101 滤液中含有几丁质酶，这些胞外酶可以抑制多种植物病原真菌的生长，是生防菌发挥拮抗作用的重要保障^[32,33]。两株菌株均包含 PCA 合成基因，菌株 PG3402 还包含 DAPG 合成基因。PCA 能抑制小麦全蚀病菌、辣椒疫霉和水稻纹枯病菌等病原

菌的生长^[34]; DAPG 生防机理较广, 包括抑制病原菌菌丝生长、抑制游动孢子运动和诱导植物的系统抗性^[35,36]。菌株 PA2101 和 PG3402 能产生广谱抗菌产物 HCN, 有研究表明 HCN 对根串珠霉有强的拮抗作用^[37], 与两株菌株的挥发性产物对根串珠霉有较强抑制效果的现象相符。Prabhukarthikeyan 等^[25]研究发现, 同时包含几种抗生素合成基因并能分泌 HCN 的假单胞杆菌菌株较少, 菌株 PA2101 和 PG3402 可分泌多种胞外水解酶, 含抗生素合成基因, 并能产生 HCN, 表明菌株 PA2101 和 PG3402 具有较大的生防潜力。

前期试验表明, 菌株 PA2101 和 PG3402 除具强烈的抑菌作用外, 还具有良好的烟草促生作用。本研究发现, 菌株 PA2101 和 PG3402 能够产生生长素、嗜铁素和 HCN 等促生物质, 并具有溶磷能力。其中产生生长素 IAA 是促生细菌的一大特性^[38]; 分泌嗜铁素和溶磷作用能够促进作物对铁离子和磷源的吸收^[39,40]; 另外, HCN 也能提高作物对磷酸盐的利用率^[41]。因此, 菌株 PA2101 和 PG3402 能促进烟草的生长。虽然菌株 PA2101 和 PG3402 的 IAA 生产效率低于张琳等^[38]筛选的促生菌株, 但 IAA 低浓度促进植物生长, 在应用时需要 IAA 的产量进行优化。

参 考 文 献

- [1] 杨春云, 邓渊钰, 李伟, 等. 小麦全蚀病生防细菌的筛选和鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(6): 873-881.
- [2] Patil S V, Jayamohan N S, Kumudini B S. Strategic assessment of multiple plant growth promotion traits for shortlisting of fluorescent *Pseudomonas* spp. and seed priming against ragi blast disease[J]. Plant Growth Regulation, 2016, 80(1): 1-12.
- [3] 唐佳频, 邵宗泽, 张智涛, 等. 南极土壤来源的恶臭假单胞菌 1A00316 抗南方根结线虫的机制[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(6): 1045-1051.
- [4] 郭丛, 杨金广, 申莉莉, 等. 一株对 TMV 具有显著拮抗活性的恶臭假单胞菌的筛选与鉴定[J]. 华南农业大学学报, 2011, 32(3): 57-60.
- [5] Vassilev N, Vassileva M, Lopez A, et al. Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(12): 4983-4996.
- [6] 方运玲, 孙爽, 申阅, 等. 微生物源农药申嗉霉素的研制与应用[J]. 农药学报, 2014, 16(4): 387-393.
- [7] Ma L, Zhang H Y, Zhou X K, et al. Biological control tobacco bacterial wilt and black shank and root colonization by bio-organic fertilizer containing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* NXHG29[J]. Applied Soil Ecology, 2018, 129: 136-144.
- [8] 朱流红, 安启菲, 吴铁凡, 等. 烟草黑胫病菌对 7 种杀菌剂的敏感性[J]. 山地农业生物学报, 2016, 35(1): 18-22.
- [9] 顾金刚, 方敦煌, 李天飞, 等. 两株荧光假单胞杆菌菌株对烟草黑胫病原菌的抑制作用[J]. 中国生物防治, 2004, 23(1): 76-78, 81.
- [10] Gómez-Lama Cabanás C, Legarda G, Ruano-Rosa D, et al. Indigenous *Pseudomonas* spp. strains from the olive (*Olea europaea* L.) rhizosphere as effective biocontrol agents against *Verticillium dahliae*: from the host roots to the bacterial genomes[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 277.
- [11] Redondo-nieto M, Barret M, Morrissey J, et al. Genome sequence reveals that *Pseudomonas fluorescens* F113 possesses a large and diverse array of systems for rhizosphere function and host interaction[J]. BMC Genomics, 2013, 14(54): 1-17.
- [12] Jitendra Mishra, Naveen Kumar Arora. Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture [J]. Applied Soil Ecology, 2018, 125: 35-45.
- [13] Wallace R L, Hirkala D L, Nelson L M. Mechanisms of action of three isolates of *Pseudomonas fluorescens* active against postharvest grey mold decay of apple during commercial storage[J]. Biological Control, 2018, 117: 13-20.
- [14] 魏海雷, 王焯, 张力群, 等. 生防菌株 2P24 与 CPF-10 的鉴定及其生防相关性状的初步分析[J]. 植物病理学报, 2004, 34(1): 80-85.
- [15] 余贤美, 郑服丛. 嗜铁素在促进植物生长及病害防治等方面的应用[J]. 中国农学通报, 2007(8): 507-510.
- [16] Kucey R M N, Janzen H H, Leggett M E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus[J]. Advances in Agronomy, 1989, 42: 199-228.
- [17] 王欢, 王敬敬, 徐松, 等. 有机磷降解菌的筛选及其促生特性[J]. 微生物学报, 2017, 57(5): 667-680.
- [18] 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.
- [19] 杨芝炜, 黎妍妍, 张安盛, 等. 烟草黑胫病拮抗菌 XF10 的筛选与鉴定[J]. 烟草科技, 2018, 51(4): 20-27.
- [20] Roberts W K, Selitrennikoff C P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity[J]. Microbiology, 1988, 134(1): 169-176.
- [21] Ghose T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure and Applied Chemistry, 1987, 59(2): 257-268.
- [22] 王明江, 章如意, 林多多, 等. 棉花黄萎病不同抗性品种内生菌数量调查与拮抗菌筛选[J]. 江苏农业科学, 2010, 38(2): 102-104.
- [23] 何碧珀, 郝学政, 刘红彦, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B10-26 对芝麻的促生防病效果及其定殖能力分析[J]. 河南农业科学, 2018, 47(12): 78-83.
- [24] Castric K F, Castric P A. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, 45(2): 701-702.

- [25] Prabhukarthikeyan S R, Keerthana U, Raguchander T. Antibiotic-producing *Pseudomonas fluorescens* mediates rhizome rot disease resistance and promotes plant growth in turmeric plants[J]. Microbiological Research, 2018, 210: 65-73.
- [26] 李洪林. 荧光假单胞菌生防菌株的筛选及对烟草赤星病菌的抑制作用[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2008.
- [27] 杨常娥, 鲁艳莉, 倪捍成, 等. 创伤弧菌产铁载体菌株的筛选及其诱导条件的响应面优化[J]. 食品工业科技, 2017, 38(3): 159-165.
- [28] 杨顺, 杨婷, 林斌, 等. 两株溶磷真菌的筛选、鉴定及溶磷效果的评价[J]. 微生物学报, 2018, 58(2): 264-273.
- [29] Patten C L, Glick B R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3795-3801.
- [30] 易龙, 马冠华, 肖崇刚. 烟草根黑腐病拮抗内生细菌的筛选及其抑菌作用[J]. 微生物学通报, 2012, 39(10): 1464-1470.
- [31] 刘烈花. 4种生防菌对烟草黑胫病的防治作用[J]. 植物医生, 2018, 31(4): 42-44.
- [32] 檀建新, 陈忠义, 张杰, 等. 产几丁质酶菌的分离鉴定及其抑菌作用的初步研究[J]. 植物保护, 2001, 27(2): 1-3.
- [33] 金志雄, 周围, 王娅, 等. 内生枯草芽孢杆菌 SWB8 菌株 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的抗菌作用及细胞毒性[J]. 微生物学报, 2011, 51(11): 1527-1537.
- [34] 蒋海霞, 周莲, 何亚文. 铜绿假单胞菌生防菌株抑菌代谢产物及其生防应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1338-1349.
- [35] Souza J T D, Arnould C, Deulvot C, et al. Effect of 2, 4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species[J]. Phytopathology, 2003, 93(8): 966-975.
- [36] GómezLama Cabanás C, Schilirò E, Valverdecorredor A, et al. The biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7 induces systemic defense responses in aerial tissues upon colonization of olive roots[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 427.
- [37] Voisard C, Keel C, Haas D, et al. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions[J]. EMBO Journal, 1989, 8(2): 351-358.
- [38] 张琳, 陈彦宏, 王雪妍, 等. 三七植物内生细菌的促生作用[J]. 大连工业大学学报, 2018, 37(4): 244-248.
- [39] Arya N, Rana A, Rajwar A, et al. Biocontrol efficacy of siderophore producing indigenous pseudomonas strains against *Fusarium* wilt in tomato[J]. National Academy Science Letters, 2018, 41(3): 133-136.
- [40] 李静, 张金羽, 张琪, 等. 玉米根际无机磷溶解菌的筛选与促生特性[J/OL]. 应用与环境生物学报, 2019: 1-11.
- [41] Rijavec T, Lapanje A. Hydrogen cyanide in the rhizosphere: not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate[J]. Front Microbiology, 2016, 7: 1785.