

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201807024

## 抑制烟草黑胫病菌和促烟草幼苗生长内生菌的 分离与鉴定\*

焦蓉<sup>1#</sup>, 刘剑金<sup>2#</sup>, 杨焕文<sup>3</sup>, 何鹏飞<sup>4</sup>, 吴毅歆<sup>1,4</sup>, 王军伟<sup>5</sup>, 王戈<sup>3\*\*</sup>, 何月秋<sup>1,4\*\*</sup>

[1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南昆明 650201; 2. 云南省烟草公司普洱市公司, 云南普洱 665000;  
3. 云南农业大学烟草学院, 云南昆明 650201; 4. 云南农业大学, 农业生物多样性应用技术国家工程中心,  
云南昆明 650201; 5. 红塔烟草(集团)有限责任公司, 云南玉溪 653100]

**摘要:**【目的】有效防控烟草黑胫病。【方法】采用稀释分离法和平板对峙法从烟草种子中分离筛选拮抗烟草疫霉的内生菌, 并通过发酵液抑菌、室内发芽、温室盆栽及漂浮育苗试验测定拮抗菌株对烟草幼苗的防病促生效果。【结果】从烟草种子中共计分离得到 34 株内生细菌, 筛选出 4 株对烟草疫霉具有较强抑制作用的拮抗菌株, 其中以 YN201716 的抑菌带最宽, YN201728 的抑菌谱最广; 温室盆栽试验结果表明: YN201728 菌株发酵液灌根处理后, 对烟草黑胫病的防效达 58.84%。此外, YN201728 菌株还促进种子萌发及烟草幼苗植株生长, 与无菌水对照相比, 幼苗的根长、株高、叶绿素、最大叶长、叶宽、鲜重和干重分别增加 23.4%、83.3%、176.4%、124.6%、97.10%、487.8% 和 196.8%。结合形态特征、生理生化测试、16S rRNA 基因序列测定及系统进化树分析的结果, YN201709、YN201728 菌株为被鉴定为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*), YN201702 菌株为沙福芽孢杆菌 (*Bacillus safensis*), YN201716 菌株为短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*)。【结论】烟草种子内生菌 YN201728 菌株对烟草具有较好的防病促生效果, 具有开发为微生物农药和菌肥的巨大潜力。

**关键词:** 烟草; 烟草黑胫病; 种子内生菌; 生物防治; 促生长

中图分类号: S 435.72 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X (2018) 06-1037-09

## Isolation and Identification of Endophytic Bacteria Inhibiting *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and Promoting Tobacco Seedling Growth

JIAO Rong<sup>1</sup>, LIU Jianjin<sup>2</sup>, YANG Huanwen<sup>3</sup>, HE Pengfei<sup>4</sup>, WU Yixin<sup>1,4</sup>,  
WANG Junwei<sup>5</sup>, WANG Ge<sup>3</sup>, HE Yueqiu<sup>1,4</sup>

[1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Pu'er Branch of Yunnan Tobacco Company, Pu'er 665000, China; 3. College of Tobacco Science,

Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 4. National Engineering Center for Applied Techniques of  
Agricultural Biodiversity, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 5. Hongta Tobacco

(Group) Co., Ltd., Yuxi 653100, China]

收稿日期: 2018-07-18 修回日期: 2018-09-26 网络出版时间: 2018-11-19

\*基金项目: 云南省烟草公司科技计划项目(2015YN26)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。焦蓉(1986—), 女, 陕西宝鸡人, 在读博士研究生, 主要从事烟草病害生物防治研究。E-mail: 314487167@qq.com; 刘剑金(1984—), 男, 云南建水人, 硕士, 农艺师, 主要从事烟草栽培和烟草植保研究。E-mail: 349356493@qq.com

\*\*通信作者 Corresponding authors: 王戈(1982—), 男, 云南沾益人, 博士, 副教授, 主要从事烟草生理生化研究。E-mail: wangge302@126.com; 何月秋(1956—), 男, 湖北武穴人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事植物内生菌分离与产品开发。E-mail: ynfh2007@163.com

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201807024](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201807024)

**Abstract:** [Purpose] For tobacco black shank control purpose. [Method] The dilution plate and dual culture were proceeded to screen the tobacco seed endophytes activity against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. The antagonistic and growth-promotion effects on tobacco seedlings were determined using disc filtrate assay, germination test, greenhouse experiment and floating seedling test. [Result] A total of 34 endophytic bacteria were isolated and 4 antagonistic strains with strong inhibitory effect on *P. nicotianae*. Among them, YN201716 displayed maximum inhibitory zone, and YN201728 had the maximum inhibitory spectrum. The control effect of YN201728 on tobacco black shank reached 58.84% under the greenhouse condition. Moreover, this strain showed a promotion effect on the seed germination and tobacco seedling growth. In addition, the root length, plant height, chlorophyll content, maximum leaf length, leaf width, fresh weight and dry weight of seedlings increase 23.4%, 83.3%, 176.4%, 124.6%, 97.10%, 487.8% and 196.8%, respectively. Based on 16S rRNA sequence alignment, YN201709 and YN201728 strains were identified as *Bacillus amyloliquefaciens*, YN201702 as *B. safensis*, and YN201716 as *Brevibacillus brevis*. [Conclusion] The seedborne endophyte YN201728 displayed good antagonistic and growth-promoting effect on tobacco, and has great potential for development as microbial pesticide and bacterial fertilizer.

**Keywords:** tobacco; *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*; seedborne endophytic bacteria; biological control; growth-promoting

由烟草疫霉 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) 引起的烟草黑胫病是世界各地烟草种植区普遍发生的一种毁灭性土传病害, 该病害传入后病原菌以厚垣孢子和休眠菌丝可在病区长期存活, 主要通过带菌土壤和病残体进行传播, 难以根治, 给烟草生产造成巨大的经济损失<sup>[1-2]</sup>。目前生产上烟草黑胫病的防治主要依赖有机硫类和二氢代氨基甲酸酯类的保护性杀菌剂和苯基酰胺类、乙磷铝、烯酰吗啉、恶唑菌酮以及氨基甲酸酯类等内吸活性杀菌剂<sup>[3]</sup>, 大面积长期反复使用这些化学药剂易造成烟株药害<sup>[4]</sup>、化学药剂残留、环境污染和病原菌产生抗药性等弊端, 导致烟叶质量下降, 影响烟草农业的可持续发展。为了保护生态环境, 促进烟草产业持续、稳定和健康发展, 生物防治以其无污染、无毒害、无残留和适应性强等优势已成为烟草病虫害防治研究的首选措施, 符合绿色防控体系和绿色优质烟叶生产的总体要求<sup>[5]</sup>, 将是今后黑胫病防治的主要发展方向。

内生菌是一类生活于植物体内并对植物无不利影响的微生物的总称。已有研究证实: 植物携带丰富的内生菌资源, 这些微生物对植物的生长发育、代谢过程和抗逆抗病等性状产生重要影响<sup>[6]</sup>。种子作为植物物种延续的重要繁殖器官, 也是植

物内生菌垂直传播的重要方式<sup>[7]</sup>。种子内生菌与植物经过长期、稳定的进化选择, 相比于从其他植物器官中分离的内生菌更易长期定殖生存, 也更易演化出与宿主互惠互利的代谢途径<sup>[8-9]</sup>。因此, 本研究以烟草种子为材料, 拟从中分离筛选出对烟草黑胫病有较强拮抗作用兼有促进烟草生长的益生菌株, 并鉴定其分类地位, 以期丰富现有的生防菌种资源, 为实现烟草黑胫病的安全、有效防控提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料及病原菌

供试烟草: 云烟 85、TN86、云香巴斯玛 1 号、BES NO H382、宾川兰花烟、八大河土烟、野生烟 (*Nicotiana debneyi*), 以上种子均由云南省烟草农业科学研究院提供。感病品种红花大金元在育苗基质中培育至 5~6 片真叶备用。

供试病原菌: 烟草疫霉 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)、棉花立枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)、番茄枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycoperisci*)、油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*)、三七根腐病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp.)、香蕉枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)、蚕豆

茎基腐病菌 (*Fusarium. avenaceum* f. sp. *fabae*)、梨褐腐病菌 (*Monilinia fructigena*)、马铃薯疮痂病菌 (*Streptomyces scabies*)、烟草炭疽病菌 (*Colletotrichum destructivum*)、玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*)、草莓灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、辣椒黑斑病菌 (*Alternaria alternata*)、烟草赤星病菌 (*Alternaria alternata*)、棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*)、小麦全蚀病菌 (*Gaeumannomyces graminis*)，均由本实验室分离并保存。

## 1.2 培养基及主要试剂

内生细菌分离保存用 LB 培养基，烟草黑胫病菌的培养用燕麦培养基，对峙培养用 PDA 培养基，烟草种子培养用琼脂糖 MS 培养基。内生细菌 DNA 提取、16S rRNA 片段扩增、*Taq* 酶、dNTPs、Buffer 等试剂为北京全式金生物技术有限公司产品；pMD18-T 克隆连接试剂盒、琼脂糖凝胶回收自宝生物工程(大连)有限公司；引物由上海生工生物工程技术有限公司合成；其余试剂系进口分装或国产分析纯。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 烟草种子内生细菌的分离

分别将烟草种子用 30%  $H_2O_2$  消毒 2 min，无菌水漂洗 5 次，取最后 1 次漂洗的无菌水溶液涂板作为对照以确认种子表面消毒是否彻底，然后将种子接至无菌组培瓶中已灭菌的 MS 琼脂糖培养基上，于无菌环境中 28 °C 暗培养，待种子萌发后改为 16 h 光培养和 8 h 暗培养。待子叶完全展开后称取 0.1 g 烟草幼苗置于 5 mL 的灭菌离心管，灭菌玻璃棒捣碎后加入 900  $\mu$ L 0.9% NaCl。10 倍梯度稀释后，取适合的梯度倍数稀释液均匀涂布于 LB 培养基，28 °C 倒置黑暗培养 72 h。挑取外观形态特征各不同的单菌落于 LB 固体平板上画线进一步纯化，随后置于一定体积的液体 LB 培养基，恒温培养振荡器中 28 °C、160 r/min 振荡培养 24 h，加入等体积 40% (体积分数) 无菌甘油，混匀后 -80 °C 保存备用。

### 1.3.2 拮抗内生细菌的筛选

以烟草疫霉为指示菌，采用平板对峙培养法，在 PDA 平板中央接入直径为 0.5 cm 的烟草疫霉琼脂块，将分离到的细菌点接在距烟草疫霉琼脂块 3 cm 处，以只接烟草疫霉琼脂块的平板为空白对照，28 °C 恒温培养。待对照长满全皿时，观察对峙培养结果，选出对病原菌生长有抑

制作用的菌株作为复筛对象。每个复筛菌株除设有 3 次重复外，其他操作与上述无异。测量并记录抑菌直径大小 (mm)。相对抑菌率=[(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/对照组菌落直径] $\times$ 100%。将拮抗效果好的菌株转接 5 代以上，继续观察其对烟草黑胫病菌的抑菌作用。

### 1.3.3 细菌发酵过滤液拮抗作用测定

将复筛中拮抗效果显著的内生菌分别接种到 LB 液体培养基中，于 28 °C、160 r/min 摇瓶发酵 48 h；10 000 r/min 离心 10 min，收集上清液并通过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤除菌，4 °C 贮存备用。将发酵滤液与 PDA 培养基按 1:9 的比例混合，倒制平板；在平板中央接入直径为 0.5 cm 的烟草疫霉菌饼，以加入等体积 LB 培养基为对照，28 °C 恒温培养 5 d 测定菌落直径，按上述公式计算各菌株发酵滤液的抑菌率。每处理 3 次重复。

### 1.3.4 拮抗菌株抑菌谱测定

为探究筛选出的拮抗内生细菌是否对其他植物病原真菌有类似于对烟草疫霉的抑制效果，开展抑菌谱测定。采用 1.3.2 节中平板对峙培养法测定拮抗内生菌的抑菌谱，供试病原菌见 1.1 节。

### 1.3.5 拮抗菌株对室内盆栽烟草黑胫病的防效测定

挑选抑菌圈大且作用稳定的拮抗菌于 LB 平板上划线，28 °C 培养 24~36 h。挑取单菌落并接种到预先装有 200 mL 无菌液体 LB 的 500 mL 三角瓶内，28 °C、160 r/min 振荡培养 48 h；稀释涂板，统计出拮抗菌培养物的菌体细胞浓度。在装有 500 g 灭菌土的花盆 (10 cm $\times$ 10 cm $\times$ 12 cm) 中移栽入 1 株含有 5~6 片真叶的红花大金元烟草幼苗；7 d 后使用调配至  $1.0\times 10^8$  CFU/mL 的拮抗菌悬液灌根 1 次，10 mL/株，以浇施等量的无菌 LB 培养基和 40% 烯酰吗啉可湿性粉剂 1 000 倍液为阴性和阳性对照；浇施拮抗菌液 3 d 后，采用菌丝块创伤茎接种法<sup>[10]</sup>接种烟草疫霉，采用烟草黑胫病病情分级标准<sup>[11]</sup>，分别于接种病原菌后的第 7、14 天调查各处理发病情况并计算病情指数和相对防效。每处理设 10 个重复，其中 1 盆为 1 个重复；试验重复 3 次。

### 1.3.6 拮抗内生细菌促生效果测定

#### (1) 室内种子发芽初筛

使用 75% 酒精对云 85 种子作表面消毒，随后将种子置于拮抗内生菌的发酵液 ( $1.0\times 10^6$  CFU/mL)

浸泡 2 h, 无菌水漂洗 3 次, 转入垫有湿润滤纸的培养皿内, 28 ℃ 保湿培养, 分别以清水、LB 液体培养基作阴性对照, 以本实验室分离并保存具有促生效果的解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 菌株发酵液为阳性对照; 第 3 天开始检测种子发芽势, 第 7 天统计种子发芽率。每处理 3 次重复, 每重复 30 粒种子。

### (2) 漂浮育苗试验

将出芽后的云 85 播种到装有灭菌育苗基质的漂浮育苗盘中, 采用温室漂浮育苗方式进行育苗。在烟苗 3 片真叶时, 用  $1.0 \times 10^7$  CFU/mL 的拮抗菌发酵液喷雾 1 次, 分别以清水、LB 液体培养基作阴性对照, 以 B9601-Y2 菌株发酵液为阳性对照。于处理后 10 d 测定植株的根长、株高、最大叶长、最大叶宽、鲜重及干重等指标, 采用日本柯尼卡美能达 SPAD-502 Plus 手持式叶绿素仪测定叶片叶绿素含量。每处理设 3 次重复, 每重复 20 株幼苗。使用 SPSS 17.0 软件统计分析各处理的相关数据。

### 1.3.7 生理生化与分子生物学鉴定

#### (1) 菌株生理生化指标测定。

参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[12]</sup>进行生理生化特性测定。

#### (2) 菌株 16S rRNA 序列分析

采用 CHENG 等<sup>[13]</sup>方法快速提取菌株基因组 DNA。16S rRNA 基因序列扩增引物为 P0 (5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') 和 P6 (5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3')。PCR 扩增采用 20 μL 反应体系: 10×EasyTaq Buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 2.0 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1.6 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1.0 μL, EasyTaq DNA Polymerase (5U/μL, Transgene) 0.2 μL, 模板 DNA (10~50 ng/μL) 0.5 μL, 补充 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 20 μL。采用杭州郎基科学仪器有限公司的基因扩增仪进行 PCR 扩增, 反应程序为: 94 ℃ 预变性 4 min 30 s, 94 ℃ 45 s, 53 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min 30 s, 30 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 利用胶回收试剂盒回收 PCR 产物; 取适量体积的回收产物与 pMD18-T 载体混合, 16 ℃ 连接过夜; 次日, 将连接产物全部转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 热激转化后根据蓝白斑特征挑取疑似阳性克隆, 并辅以菌落 PCR 进一步验证, 随

后挑取被确认为正确的克隆送交北京擎科生物技术有限公司予以测序。测序结果分别与 GenBank 数据库中已知序列作 BLAST 比对分析, 选取同源性较高的模式菌株 16S rRNA 基因序列作为参比对象, 运用 MEGA 5.0 软件采用 neighbour-joining (NJ) 法构建系统发育树<sup>[14]</sup>。结合形态、生理生化反应及 16S rRNA 序列, 鉴定菌株的分类地位。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟草种子内生细菌分离和筛选结果

从 7 个烟草品种种子中共分离出可培养内生细菌 34 株, 平板对峙试验初筛到 15 株对烟草疫霉有抑制作用的菌株, 占总菌株数的 44.1%。对上述有拮抗作用的菌株进行复筛, 获得 4 株对烟草疫霉有较强拮抗活性的菌株, 其抑菌带宽达 5.5~11.7 mm (表 1), 其中, 来自野生烟 *N. debneyi* 种子的菌株 YN201716 抑菌带最宽, 与其他 3 个菌株抑菌带相比存在显著差异 (图 1)。将此 4 株菌株连续转接 5 代后, 发现其对烟草黑胫病菌的拮抗效果无明显变化。

表 1 拮抗细菌对烟草疫霉菌丝生长的抑制效果

Tab. 1 Inhibitory activity against mycelial growth of *P. parasitica* var. *nicotianae*

菌株 strain	平均抑菌带宽度/mm inhibition zone	抑制率/% inhibition rate	发酵滤液抑制率/% inhibition rate of fermentation filtrate
CK	—	—	—
YN201702	5.5±0.5 a	51.9 a	19.9 a
YN201709	5.7±0.58 a	52.6 a	21.4 a
YN201716	11.7±1.2 b	65.2 c	32.1 c
YN201728	6.3±0.58 a	58.5 b	27.2 b

注: 不同的字母表示在  $\alpha=0.05$  水平上差异显著; 下同。

Note: Different lowercases mean significant difference at  $\alpha=0.05$  level; the same as below.

### 2.2 细菌发酵过滤液拮抗作用

室内发酵滤液抑菌活性测定显示: 复筛出的 4 株内生菌发酵滤液对烟草疫霉均有较强的抑菌效果 ( $\geq 20\%$ ), 其中以内生菌 YN201716 和 YN201728 的发酵滤液抗菌活性最强 ( $>25\%$ ), 并与 YN201702 和 YN201709 的抑菌率均存在显著性差异 (表 1), 暗示此两株内生菌的发酵滤液内存在抗生物质。

### 2.3 拮抗菌株抑菌谱

由表 2 可知: 复筛出的 4 株内生细菌对所选

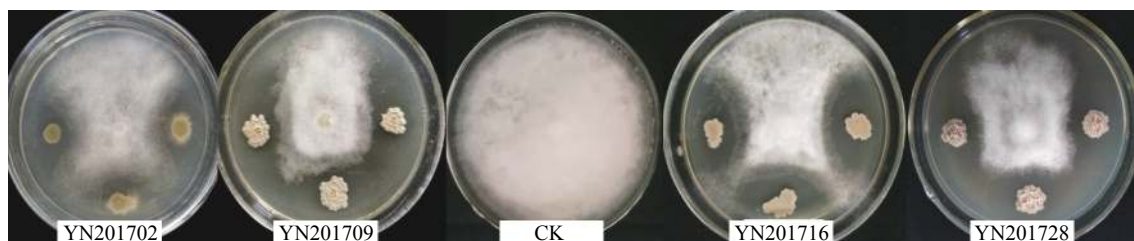


图 1 内生细菌对烟草疫霉生长的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of endophytic bacteria on growth of *P. parasitica* var. *nicotianae*

用的病原真菌均有不同程度的抑菌活性, 其中, YN201728 和 YN201709 的抑菌谱相当, 分别能对除棉花立枯病菌和油菜菌核病菌外的其他病原真菌的生长产生抑制效果, 对梨褐腐病菌、玉米大斑病菌、棉花黄萎病菌及小麦全蚀病菌的抑菌

带均超过 11.8 mm; 对烟草疫霉抑菌效果最为显著的 YN201716 菌株虽也能抑制除辣椒黑斑病菌外的其他供试病原菌, 但抑菌带较小; YN201702 菌株对 9 种供试病原菌有抑菌效果, 但对如马铃薯疮痂病菌、烟草赤星病菌的效果较差。

表 2 拮抗菌株对病原菌抑菌带宽

Tab. 2 Inhibition zone of the antagonistic bacteria against plant pathogenic fungi

mm

病原真菌 pathogenic fungi	YN201702	YN201709	YN201716	YN201728
棉花立枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	0 a	2.47±0.57 c	1.27±0.21 b	0 a
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	0 a	5.83±0.76 c	3.40±0.56 b	2.63±0.35 b
番茄枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	0 a	5.33±0.21 c	5.57±0.35 c	3.67±1.15 b
油菜菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0 a	0 a	1.23±0.23 b	5.43±0.60 c
三七根腐病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp.	0 a	8.57±0.40 d	3.03±0.32 c	1.07±0.15 b
香蕉枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	0 a	3.57±0.55 bc	2.93±0.21 b	3.90±0.36 c
蚕豆茎基腐病菌 <i>Fusarium avenaceum</i> f. sp. <i>fabae</i>	0 a	9.60±0.75 d	3.53±0.76 b	5.93±0.32 c
梨褐腐病菌 <i>Monilinia fructigena</i>	12.23±2.36 b	15.60±0.56 c	5.00±0.70 a	19.17±2.02 c
马铃薯疮痂病菌 <i>Streptomyces scabies</i>	0.37±0.12 a	12.73±1.11 c	7.93±0.42 b	8.60±0.56 b
烟草炭疽病菌 <i>Colletotrichum destructivum</i>	0.97±0.15 a	6.10±0.79 c	3.87±0.47 b	3.90±0.75 b
玉米大斑病菌 <i>Setosphaeria turcica</i>	5.77±0.40 b	11.83±0.80 c	3.17±0.40 a	11.97±0.40 c
草莓灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	3.47±0.85 a	7.30±0.17 b	3.07±0.91 a	2.73±0.64 a
辣椒黑斑病菌 <i>Alternaria alternata</i>	4.13±0.42 b	4.93±0.80 bc	0 a	5.63±0.60 c
烟草赤星病菌 <i>Alternaria alternata</i>	0.43±0.12 a	4.33±0.38 b	1.30±0.26 a	3.47±1.17 b
棉花黄萎病菌 <i>Verticillium dahliae</i>	12.07±0.60 b	16.13±0.70 c	5.97±0.70 a	15.07±0.40 c
小麦全蚀病菌 <i>Gaeumannomyces graminis</i>	11.73±0.95 b	16.10±0.70 c	3.50±1.11 a	15.30±0.90 c

## 2.4 拮抗菌株对烟草黑胫病的温室盆栽防效

表 3 表明: 菌株发酵液处理对烟草黑胫病均有一定的防治效果。与 LB 空白对照相比, 除 YN201709 处理外, 浇施其他菌株发酵液均可显著降低烟草黑胫病的病情指数。其中, 浇施 YN201728 菌液的防效最高, 在接种烟草疫霉后的第 7 和 14 天的防效分别为 74.2% 和 58.84%, 略低于同期 40% 烯酰吗啉可湿性粉剂 1 000 倍液的防效, 但两者的病情指数没有显著性差异, 而其他内生细菌处理的防效均低于 50%。

表 3 拮抗内生细菌对烟草黑胫病的温室防治效果

Tab. 3 Control effect of the antagonistic endophytic bacteria on tobacco black shank in the greenhouse

处理 treatment	7 d		14 d	
	DI	CE/%	DI	CE/%
CK	43.41 c	—	73.98 c	—
YN201702	33.33 bc	23.22	46.03 b	37.78
YN201709	34.92 c	19.56	69.05 c	6.66
YN201716	22.87 b	47.32	51.27 b	30.68
YN201728	11.21 a	74.20	30.46 a	58.84
40% 烯酰吗啉可湿性粉剂 dimethomorph 40% WP	10.47 a	75.88	25.75 a	65.21

注: DI. 病情指数; CE. 防治效果。

Note: DI. disease index; CE. control efficiency.

## 2.5 拮抗菌株对室内盆栽烟草的促生作用

### 2.5.1 培养皿发芽初筛试验

室内种子发芽试验结果显示：烟草种子经内生细菌 YN201702、YN201709 和 YN201728 发酵液浸泡处理后，发芽势与阳性、阴性对照相比均显著提高，但发芽率无显著差别(表 4)，表明内生细菌发酵液可加快烟草种子的萌发进程。另外，菌液 YN201728 处理组的烟草幼苗子叶更宽厚，叶色浓绿，根长也优于对照处理(图 2)。

表 4 菌液处理培养皿发芽试验结果

Tab. 4 Germination results of tobacco seeds treated with bacterium solution

处理 treatment	发芽势/% sprouting potential	发芽率/% sprouting rate
水 water	0 a	93.3±1.73 a
LB	0 a	96.7±1.73 a
Y2	0 a	96.7±1.53 a
YN201702	36.7±2.08 b	93.3±2.00 a
YN201709	93.3±5.57 c	100.0±1.15 a
YN201716	20.0±3.61 ab	90.0±3.05 a
YN201728	86.7±5.13 c	100.0±1.73 a

### 2.5.2 漂浮育苗复筛试验

由表 5 可知：除 YN201709 外，其余菌株处理的各项性状指标结果均优于清水对照和 LB 对照，鲜重、干重、叶长、叶宽和根长等指标与阳性对照 Y2 菌处理无显著差异，其中以 YN201728 效果最好，YN201702 次之。如图 3 所示：经 YN201728 处理过的烟苗根长于阴性对照，根系更为发达。定量测定结果也显示：YN201728 发酵液处理后的烟草幼苗根长、株高、叶绿素、最大叶长、叶宽、鲜重及干重比无菌水对照分别增加 23.4%、83.3%、176.4%、124.6%、97.10%、487.8% 及 196.8%，比空白 LB 培养基对照分别增加 20.9%、77.4%、103.3%、80.9%、75.5%、177.2% 及 129.0%。

### 2.6 生理生化与分子鉴定结果

内生菌 YN201702 在 LB 平板上所形成的单菌落直径 1~2 mm，乳白色，边缘整齐，不透明，湿润；YN201709 和 YN201728 的菌体细胞呈杆状，所形成的单菌落近白色，边缘不规则，中部有火山口，有隆起，表面褶皱干燥，不透

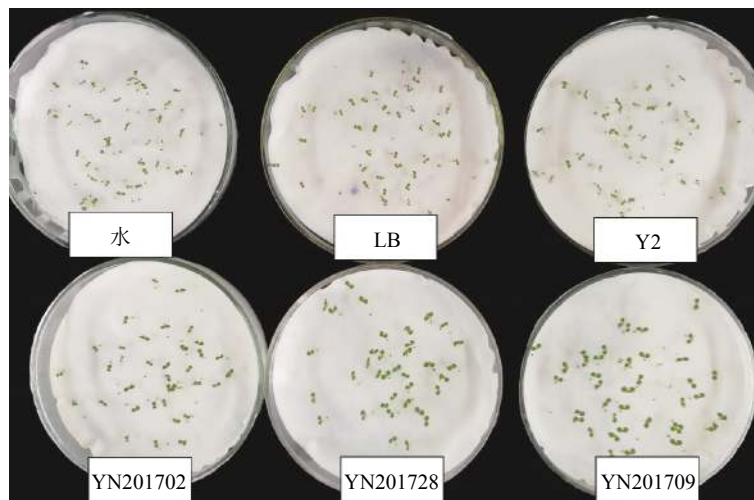


图 2 菌液处理对种子发芽的影响

Fig. 2 Effect of bacterial liquid treatment on seed germination

明，随着培养时间增长，菌落变厚变干；YN201716 细胞短杆状，菌落近圆形，灰白色，表面光滑湿润，不透明(图 4)。生理生化试验鉴定了 YN201702、YN201709、YN201716、YN201728 的 17 个生理生化特征，显示这 4 个菌株均为革兰氏阳性菌，产芽孢，接触酶、明胶液化均为阳性，甲基红、吡啶试验、KOH 反应均为阴性，糖发酵试验都可利用葡萄糖和甘露醇产酸。与其他菌

株不同的是，YN201702 菌株不能水解淀粉，能利用柠檬酸盐而其他 3 个菌株不能，不能利用  $\alpha$ -半乳糖；YN201716 菌株不能水解淀粉，V-P 试验阴性，不能利用丙二酸盐，产  $H_2S$ ，不能利用  $\alpha$ -半乳糖和蔗糖。根据形态特征和生理生化特性测定，初步推测此 4 株内生菌均为芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)。

对提取的 4 株内生细菌基因组 DNA 分别进

表5 菌株发酵液处理对烟草幼苗生长的影响

Tab. 5 Effect of fermentation broth on tobacco seedling growth

处理 treatment	鲜重/g fresh weight	干重/g dry weight	叶绿素 SPAD	最大叶长/cm length	叶宽/cm width	根长/cm root length	株高/cm plant height
YN201702	0.48±0.022 6 c	0.032±0.001 5 b	16.64±1.43 c	5.40±1.11 c	2.62±0.51 c	10.53±4.97 b	0.93±0.25 b
YN201709	0.24±0.057 5 b	0.017±0.003 4 a	20.95±1.01 f	3.19±0.84 b	1.76±0.44 b	7.24±3.63 a	0.69±0.25 a
YN201728	0.50±0.083 6 c	0.037±0.006 9 bc	20.76±1.84 ef	5.48±1.24 c	2.72±0.67 c	11.62±6.01 b	1.10±0.36 cd
水 water	0.085±0.005 4 a	0.013±0.001 2 a	7.51±1.27 a	2.44±0.36 a	1.38±0.23 a	9.42±3.70 ab	0.60±0.22 a
LB	0.18±0.013 5 ab	0.016±0.001 3 a	10.21±1.08 b	3.03±0.56 b	1.55±0.22 a	9.61±3.63 ab	0.62±0.19 a
Y2	0.47±0.023 8 c	0.035±0.004 1 bc	19.03±1.13 d	5.35±1.13 c	2.72±0.59 c	11.15±5.21 b	1.04±0.47 c

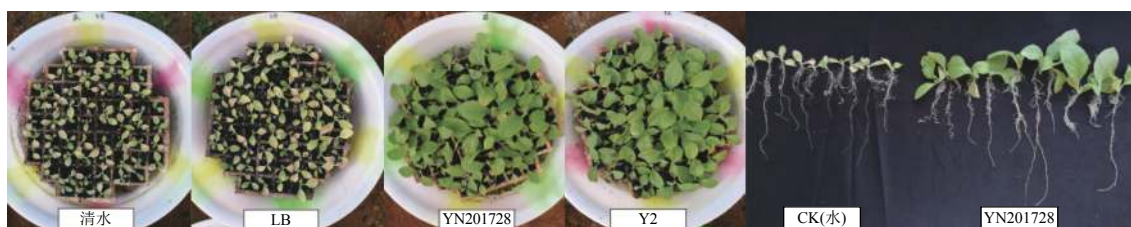
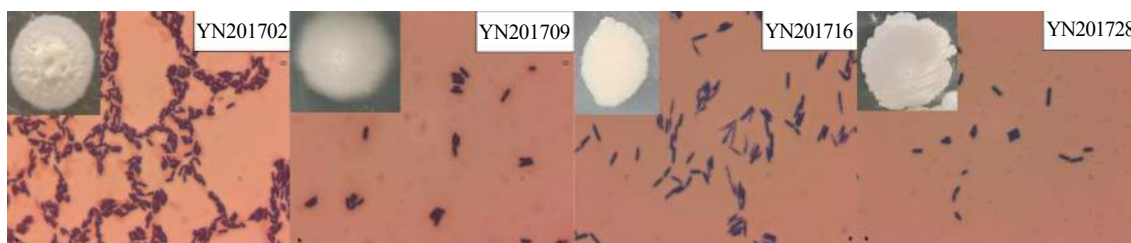


图3 YN201728 发酵液对漂浮苗生长的促进作用

Fig. 3 Effect of YN201728 fermentation broth on the growth of floating seedlings



注: 左上角为单位菌落形态, 其他为菌体细胞。

Note: The left corners show single colony, the rest are bacterial cells.

图4 内生菌的菌落图及革兰氏染色图

Fig. 4 Colony and Gram staining of the endophytes

行 16S rRNA 的 PCR 扩增, 获得大小约为 1.4 kb 的明亮条带。经 TA 克隆、后续验证及测序后, 将 YN201702、YN201716、YN201728 及 YN201709 菌株的 16S rRNA 基因测序拼接结果提交至 NCBI 的 GenBank 数据库, 分别获得登录号 MH217567、MH217568、MH217569 及 MH493676。BLAST 同源比对结果也证实这些内生细菌均属于芽孢杆菌属。

从 EzBioCloud 数据库<sup>[15]</sup>选取 *Bacillus* 属不同种的芽孢杆菌模式菌株构建系统发育树, 分析其属种间的遗传进化关系, 鉴定菌株的分类地位(图 5)。从系统进化树可以看出: YN201709、YN201728 菌株与解淀粉芽孢杆菌 FZB42、Y2 和 DSM7 处于同一分支, 遗传距离较近, YN201702 菌株与沙福芽孢杆菌 FO-36b 在同一分支, 而 YN201716 菌株与短短芽孢杆菌模式菌 NBRC 15304

进化关系最近。结合分子形态学、生理生化特性和 16S rDNA 序列同源性分析, 将 YN201702 菌株鉴定为沙福芽孢杆菌 (*B. safensis*), YN201709 和 YN201728 鉴定为解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*), YN201716 鉴定为短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*)。

### 3 讨论

目前已从植物根际土壤及烟草植株内分离筛选到大量对烟草疫霉有较强拮抗作用的生防菌, 但利用种子内生菌及其代谢产物进行烟草黑胫病生物防治的报道尚不多见。本研究从种子的组培苗中分离得到 34 株内生细菌, 与烟草根际土壤及其他不同组织中分离得到的内生菌相比<sup>[16]</sup>, 种类和数量都有一定的差异。但遗憾的是, 本研究

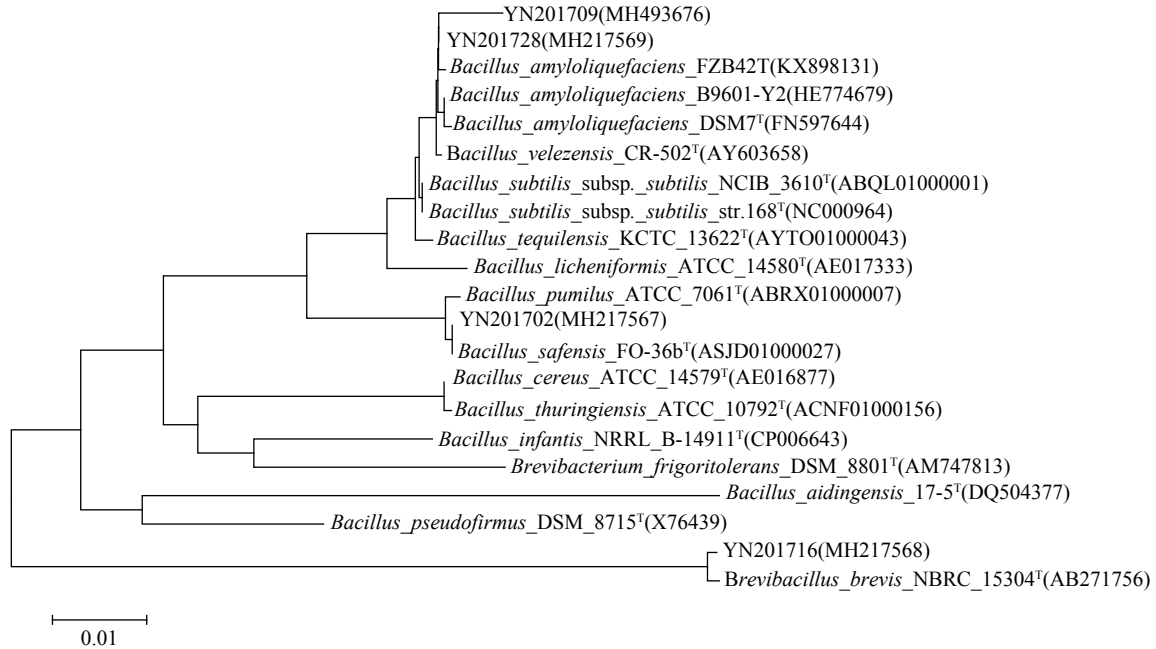


图 5 基于 16S rRNA 基因序列的拮抗菌系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

所分离到的可培养内生菌都是细菌，未分离到真菌和放线菌，推测可能的原因是种子为高度受保护的封闭性器官，且烟草种子比较小，导致内生菌种类、数量都要少于其他植物器官，影响了真菌和放线菌在种子中的定殖。从烟草种子中分离得到的菌株以芽孢杆菌数量居多，与黄晓辉等<sup>[17]</sup>的研究一致，分析原因可能是芽孢杆菌产生的芽孢有极强的抗逆性，能够抵抗外界不良环境；芽孢杆菌也可能是内生细菌适应植物生命周期更替的重要生命形态。

植物病害的生物防治是通过植物、病原菌、生防菌、植物表面及其周围的有益微生物群落和自然环境等因素之间的互作来达到防治病害的作用<sup>[18]</sup>。大量研究表明：植物内生菌与其他生防菌一样，主要通过生态位及营养竞争、分泌抗菌物质<sup>[19]</sup>、诱导抗病相关酶活性提高<sup>[20]</sup>、改善植物及根围土壤中其他生物的群落结构<sup>[21]</sup>等途径发挥生防作用，内生菌侵入并在寄主植物上持久稳定定殖<sup>[22]</sup>及诱导寄主抗性<sup>[23]</sup>等也决定着其生防效果，因此生防菌对病害的防控更多地可能是多种机制共同作用的结果<sup>[24]</sup>。YN201716 菌株和 YN201728 菌株在室内平板对峙和发酵滤液抑菌试验中都有较高的抑菌率，说明这 2 株菌在生长代谢过程中产生了具有抑菌活性的抗生物质，产生抗菌物质是其抗菌的重要机制之一。室内对峙培养试验对

烟草疫霉有较强拮抗活性的 YN201716 菌株，在温室盆栽的防病效果不太理想。分析原因可能是自然土壤环境下，菌株在烟株中的侵入定殖能力和自身的增殖能力各不相同，土壤环境不仅影响寄主植物、病原菌和生防菌的生存，也可能对它们相应的代谢活动产生重要影响。因此，室内筛选必须与温室盆栽及大田防治相结合才有望获得具有应用价值的益生菌株。YN201728 菌株在体外抑菌试验和温室盆栽试验中均有较好的防治效果，菌株发酵液能抑制菌丝生长是其生防机制之一，而其定殖能力如何？是否诱导烟草的系统性抗性，防卫反应基因表达情况如何？是否对植物及根围土壤其他生物的群落结构产生影响？这些生防机理还有待下一步深入研究。

已有许多报道称生防菌除了防控植物病害外，还兼有一定的促生效果<sup>[25-26]</sup>。与前人报道相一致，本研究所筛选到的解淀粉芽孢杆菌 YN201728 菌株不仅对烟草病害有良好的防治效果，还能促进烟草的生长。促生试验结果显示：YN201728 处理的烟草种子，发芽势比对照显著提高；烟草幼苗各项生理指标显著提升，根长、叶绿素、鲜重比无菌水对照分别增加了 23.4%、176.4% 和 487.8%，显示 YN201728 可能会通过促进烟草根系生长，加强对水分和养分的吸收能力，同时提升幼苗的光合能力，健苗壮苗从而间接地提高

烟草植株对包括黑胫病在内的多种病害的抵抗力。

本研究筛选的 YN201728 菌株对烟草黑胫病的防效达 58.84%,既能促进烟草种子萌发,又能促进烟草幼苗的生长,且对多种病原菌具有较宽的抑菌谱,为烟草生物菌肥和生物农药的开发提供了优质的菌种资源,具有巨大的开发应用价值。下一步将针对生防菌的防病促生作用机理、发酵生产工艺以及大田施用技术等方面进一步开展深入研究。

#### [参考文献]

- [1] 马国胜,高智谋,陈娟.烟草黑胫病研究进展[J].烟草科技,2001(9):44. DOI: 10.3969/j.issn.1002-0861.2001.09.016.
- [2] XIE Y H, ZHANG Y G, ZHU L Q, et al. Progress on integrated control of tobacco black shank[J]. Agricultural Biotechnology, 2015, 4(4): 37.
- [3] 张凯,谢利丽,武云杰,等.烟草黑胫病的发生及综合防治研究进展[J].中国农业科技导报,2015(4):66. DOI: 10.13304/j.nykjdb.2015.145.
- [4] 刘世超,黄国联,李斌,等.烟草苗期12种常用杀菌剂的药害症状分析[J].安徽农业科学,2015,43(15):111. DOI: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2015.15.041.
- [5] 易龙,邱妙文,陈永明,等.烟草黑胫病的生物防治研究进展[J].中国农学通报,2017,33(25):146.
- [6] STROBEL G. The emergence of endophytic microbes and their biological promise[J]. Journal of Fungi, 2018, 4(2): 57. DOI: 10.3390/jof4020057.
- [7] KHALAF E M, RAIZADA M N. Taxonomic and functional diversity of cultured seed associated microbes of the cucurbit family[J]. BMC Microbiology, 2016, 16(1): 131. DOI: 10.1186/s12866-016-0743-2.
- [8] 龙锡,严希,洪佳丽,等.植物种子内生菌的研究进展[J].浙江农业科学,2016,57(8):1319. DOI: 10.16178/j.issn.0528-9017.20160851.
- [9] PITZSCHKE A. Developmental peculiarities and seed-borne endophytes in quinoa: omnipresent, robust bacilli contribute to plant fitness[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 2. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00002.
- [10] 马国胜,高智谋.烟草黑胫病菌研究进展(II)[J].烟草科技,2004(1):41. DOI: 10.3969/j.issn.1002-0861.2004.01.015.
- [11] GB/T 23222—2008.烟草病虫害分级及调查方法[S].
- [12] 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.
- [13] CHENG H R, JIANG N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(1): 55. DOI: 10.1007/s10529-005-4688-z.
- [14] HALL B G. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(5): 1229. DOI: 10.1093/molbev/mst012.
- [15] YOON S H, HA S M, KWON S, et al. Introducing Ez-BioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67: 1613. DOI: 10.1099/ijsem.0.001755.
- [16] 陈泽斌,夏振远,雷丽萍,等.云南烟草内生细菌菌群密度及分布特征[J].西南农业学报,2014,27(2):682. DOI: 10.16213/j.cnki.scjas.2014.02.052.
- [17] 黄晓辉,杨友才,谭周进,等.四个品种烟草内生微生物的分布特征[J].生态学报,2009,29(12):6827. DOI: 10.3321/j.issn:1000-0933.2009.12.062.
- [18] O'BRIEN P A. Biological control of plant diseases[J]. Australasian Plant Pathology, 2017, 46(4): 293. DOI: 10.1007/s13313-017-0481-4.
- [19] HAN T, YOU C, ZHANG L, et al. Biocontrol potential of antagonist *Bacillus subtilis* Tpb55 against tobacco black shank[J]. BioControl, 2016, 61(2): 195. DOI: 10.1007/s10526-015-9705-0.
- [20] 王万能.烟草内生细菌对烟草黑胫病的防治作用及其机理的研究[D].重庆:西南农业大学,2003.
- [21] 韩腾,张立猛,高加明,等.枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)Tpb55灌根与烟草根围细菌多样性变化的相关性[J].微生物学报,2016(5):835. DOI: 10.13343/j.cnki.wsbx.20150333.
- [22] REN X L, ZHANG N, CAO M H, et al. Biological control of tobacco black shank and colonization of tobacco roots by a *Paenibacillus polymyxa* strain C5[J]. Biology and Fertility of Soils, 2012, 48(6): 613. DOI: 10.1007/s00374-011-0651-4.
- [23] KLOPPER J W, RYU C M. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance[M]//SCHULZ B J E, BOYLE C J C, SIEBER T N. Microbial root endophytes. Soil biology, vol. 9. Berlin: Springer, 2006.
- [24] RAO A P, AGBO B E, IKPOH I S, et al. Biological control mechanisms against plant-based pathogens[J]. Journal of Biopesticides and Environment, 2016, 3: 1.
- [25] 杨珍福,吴毅歆,陈映岚,等.烟草拮抗内生细菌的筛选与防病促生长效果[J].中国烟草科学,2014,35(6):48. DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2014.06.010.
- [26] SANTOYO G, OROZCO-MOSQUEDA M D C, MELAPPA G. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review[J]. Biocontrol Science and Technology, 2012, 22(8): 855. DOI: 10.1080/09583157.2012.694413.

责任编辑:何馨成