

烟草青枯病菌拮抗菌的筛选、鉴定及生防特性研究*

夏艳^{1,3} 徐茜² 董瑜^{1,3} 林勇² 孔凡玉^{1**}
张成省^{1**} 王静¹ 宋毓峰^{1,3}

(1. 烟草行业烟草病虫害监测与综合治理重点实验室 中国农业科学院烟草研究所 青岛 266101;
2. 福建省烟草公司南平市分公司 南平 353000; 3. 中国农业科学院研究生院 北京 100081)

摘要 烟草青枯病危害严重,以拮抗菌进行防病的生物防治手段成为研究热点。从不同烟田分离纯化出238株细菌菌株,首先经牙签接种初筛,选取对青枯病菌抑制效果较好的菌株制备其抑菌物质的粗提物,以牛津杯法复筛,最终获得3株对烟草青枯病菌有明显抑制作用的拮抗菌。全细胞脂肪酸、16S rDNA及*gyrB*基因测序等分析结果表明,菌株H19、Y6为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),菌株H34为甲基营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*)。3株拮抗菌经CAS检测平板法和Salkowski比色法,发现均具有产铁载体和吲哚-3-乙酸(IAA)的能力,以菌株H19能力最强。温室促生试验结果表明,3株拮抗菌能显著促进烟草株高、鲜重及干重等指标,与对照相比,平均增长率分别达到70%~115%、40%~49%和32%~42%。温室控病试验结果表明,菌株H19、H34和Y6明显降低烟草青枯病的发病率,防效达76.57%、60.98%和69.83%,稍逊于农用链霉素处理的78.66%。

关键词 烟草青枯病 拮抗细菌 铁载体 植物生长素 促生作用 防治效果

中图分类号: S432.1 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2014)02-0201-07

Screening, identification and characterization of antagonistic bacteria against *Ralstonia solanacearum*

XIA Yan^{1,3}, XU Qian², DONG Yu^{1,3}, LIN Yong², KONG Fanyu¹, ZHANG Chengsheng¹,
WANG Jing¹, SONG Yufeng^{1,3}

(1. Tobacco Integrated Pest Management of China Tobacco; Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China; 2. Nanping Branch, Fujian Tobacco Company, Nanping 353000, China;
3. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract Tobacco bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the most destructive bacterial diseases of tobacco. As a recurring soil-borne disease, it is controlled mainly by chemical methods that are not only costly and less efficient but also have food safety and environment safety problems. Consequently, biological control methods that use antagonistic strains have gained strength in tobacco bacterial wilt disease research. To find new antagonist bacteria against *R. solanacearum*, 238 strains were identified and screened for in vitro antibiosis. By placing each strain on cultured pathogen plates with toothpicks 24 strains showed inhibition zones. Among the 24 strains, the width of the inhibition zones of 7 antagonist strains exceeded 10 mm. Then pathogen inhibitive ingredients of the 7 strains were extracted to determine bacteriostatic efficacy. Finally, 3 promising strains (H19, Y6, H34) were obtained. H19 and Y6 were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* and the other strain (coded H34) identified as *B. methylotrophicus*. The strain classification was based on phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence, *gyrB* sequence and fatty acid composition. Siderophores secreted by microorganisms to take up iron from the environment had an action mode of disease suppression that was solely based on competition with the pathogens for iron. Besides, indole-3-acetic acid (IAA) is a phytohormone known to be involved in root initiation, cell division and cell enlargement. In follow-up experiments, all the three strains showed the

* 国家自然科学基金项目(31000878)和福建省南平市烟草公司科技项目(201203)资助

** 通讯作者: 孔凡玉, 主要研究方向为植物病理学, E-mail: kongfanyu@caas.cn; 张成省, 主要研究方向为植物病理学, E-mail: zhchengsheng@126.com

夏艳, 主要研究方向为植物病理学, E-mail: summer88xy@sina.com

收稿日期: 2013-10-23 接受日期: 2013-12-26

ability to produce siderophores and plant growth promotor IAA. However, productions of siderophores and IAA were different, with H19 and Y6 as the highest and lowest producers under improved CAS and Salkowski colorimetric methods. The three strains were further characterized for plant growth promoting traits and disease control effects. Compared with control treatment, the strains significantly improved the growth of tobacco with increases of 19%–24% in the maximum leaf length, 7%–12% in the maximum leaf width, 70%–115% in plant height, 2%–14% in stem diameter, 40%–49% in fresh weight and 32%–42% in dry weight. H19, H34 and Y6 reduced bacterial wilt incidence by 76.57%, 60.98% and 69.83%, respectively in greenhouse experiments. This was slightly lower than using 40% agricultural streptomycin which had disease incidence control efficacy of 78.66%. In conclusion, the research isolated new efficient antagonistic strains against tobacco bacterial wilt. It also proved the mechanism of disease control and plant growth promotion by H19, H34 and Y6. The study further showed that the three strains had great potential for plant growth promotion and biological control under greenhouse conditions, which developed the needed reference for follow-up studies.

Keywords Tobacco bacterial wilt; Antagonistic bacteria; Siderophore; Phytohormone; Growth promotion; Control effect

(Received Oct. 23, 2013; accepted Dec. 26, 2013)

烟草青枯病是由青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的典型土传病害^[1], 是烟草上主要毁灭性病害之一, 每年造成巨额经济损失^[2]。由于生产上基本无优质抗病的烟草品种可利用, 青枯病的防治主要以铜制剂和农用链霉素等药剂防治为主^[3], 易污染环境, 破坏生态系统。土壤中存在多种微生物, 在营养、生存空间等方面存在激烈竞争, 因此, 可通过调节土壤微生态抑制土传病害^[4]。近年来, 人们开始利用拮抗微生物防治烟草青枯病, 从烟草茎^[5]、根^[6]以及根际土壤^[7]分离获得大量生防细菌菌株。Phae等^[8]利用拮抗细菌处理感病土壤, 染病植株的死亡率明显下降; 胡军华等^[9]和Soad等^[10]应用筛选获得的拮抗细菌防治青枯病取得了明显的温室防效和小区试验防治效果。生防菌株还能分泌生长素促进植物生长, Monk等^[11]从新西兰牛毛草根部筛选细菌研究他们促进植物生长的原因, 发现10%的根部细菌会产生生长素。同时许多研究都证实了拮抗菌产生的铁载体可与植物根际病原微生物争夺有限的铁营养, 从而抑制病原微生物的生长繁殖, 在抑制病原细菌和真菌方面发挥重要作用^[12]。综上所述, 利用拮抗细菌防控烟草青枯病展现了良好的应用前景。目前, 我国利用拮抗细菌防治烟草青枯病研究基础还比较薄弱, 特别是高效菌种资源明显缺乏。本研究从发病烟区健康烟株上分离对烟草青枯病菌有拮抗作用的细菌菌株, 对3株优良菌株进行了脂肪酸分析和分子生物学鉴定, 测定了其对烟草的促生和控病效果, 旨在进一步丰富青枯病菌拮抗细菌菌种资源, 为3株优良生防菌株的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料: 致病性青枯病原菌由烟草行业烟草病虫害监测与综合治理重点实验室从福建省南平市

烟田采集感染青枯病典型症状的病株分离纯化获得。培养基: LB 液体培养基、NA 固体培养基、CAS 检测平板^[13]及 R₂A 液体培养基^[14]。烟草感病品种为‘红花大金元’。

1.2 菌株的分离纯化

从山东省、湖北省不同烟草青枯病烟田采集健康烟株及其根际土, 分别采用常规的内生细菌^[2]和根际细菌^[15]的分离方法来获得供试菌株。通过显微镜观察菌落, 挑取单菌落接在试管 LB 液体培养基中, 28 °C 条件下培养 48 h, 于 NA 固体培养基上采用平板划线法纯化, 将纯化出来的菌株保存于 4 °C 冰箱中备用。

1.3 拮抗细菌的筛选

1.3.1 拮抗细菌的初筛

拮抗细菌的初筛参照苏婷等^[15]的方法。制备烟草青枯菌浓度为 10^8 cfu·mL⁻¹ 的菌悬液, 取 1 mL 加入 50 °C 左右的 NA 培养基, 摇匀, 待培养基凝固后, 用灭过菌的牙签挑取 1.2 中备用菌株单菌落点接于培养基上, 每板测试 4 种菌, 每菌株重复 3 次, 28 °C 条件下培养 48 h, 用十字交叉法测量抑菌圈直径, 求平均值。

1.3.2 拮抗细菌的复筛

将初筛获得的效果较好的拮抗细菌于 28 °C、120 r·min⁻¹ 振荡培养 48 h 即成各菌株发酵液, 各 2 L 发酵液离心弃菌体, 离心条件为: 4 °C、10 000 r·min⁻¹、15 min。上清液用 6 mol·L⁻¹ HCl 溶液调至 pH 3.0, 4 °C 静置 4~6 h。离心收集产生的沉淀, 条件同上。沉淀经甲醇抽提, 真空减压浓缩, 得到抑菌物质的粗提物。用甲醇溶解抑菌物质的粗提物, 定容得到 10 mg·mL⁻¹ 提取液^[16]。

在水平放置的带有青枯病菌的平皿中均匀地放置 4 只无菌牛津杯(8 mm)。同时吸取 150 μL 拮抗菌株提取液加入牛津杯中, 每个平板 4 个处理, 每处理重复 3 次。对照加入等量甲醇。平板于超净工作

台内放置 4 h 以确保大部分菌液扩散到琼脂中, 之后置于 28 °C 恒温培养箱培养 48 h, 用十字交叉法测量抑菌圈直径, 求平均值。选取效果最佳的 3 株拮抗菌, 进行后续试验。

1.4 拮抗菌的鉴定

1.4.1 全细胞脂肪酸分析

由中国农业微生物菌种保藏管理中心完成。

1.4.2 16S rDNA 序列分析鉴定

拮抗菌 16S rDNA PCR 扩增参考谢永丽等^[17]的方法。将 16S rDNA 扩增产物回收纯化后测序, 测序所得序列通过 NCBI 数据库进行 BLAST 比对。

1.4.3 *gyrB* 基因序列分析鉴定

gyrB 基因扩增引物序列及 PCR 扩增条件参照谢永丽等^[17]的方法。将 *gyrB* 基因扩增产物纯化后测序, 所测序列通过 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 通过 MEGA3.1 软件^[18]对拮抗菌与模式菌进行系统发育分析。

1.5 拮抗菌分泌铁载体的定性检测

参照荣良燕等^[13]的方法, 将拮抗菌菌株转接到 NA 平板上培养 24 h 后, 采用点接法, 用灭菌的牙签将菌种接在 CAS 固体检测平板上, 每皿测试 3 种菌, 每菌 3 次重复, 28 °C 培养 48 h, 观察平板上橘黄色透明圈的产生和大小、颜色, 并记录, 同时计算可溶性指数。

1.6 拮抗菌分泌生长素(IAA)的定性检测

参照姜晓宇等^[14]方法, 将拮抗菌菌株接种于 50 mL 液体 R₂A 培养基的三角瓶中, 每菌株 3 次重复, 处理完毕后观察其颜色变化, 颜色变粉红色者为阳性, 表示能够分泌 IAA, 颜色越深表示分泌的强度越大, 不变色为阴性, 表示不能分泌 IAA。

1.7 拮抗菌的室内促生试验

室内促生试验参照王静等^[19]的方法。试验共设 4 个处理, 处理 1~3 分别为菌株 H19、H34 和 Y6 的菌悬液(10^8 cfu·mL⁻¹), 处理 4(对照)为清水。每处理 8 株烟苗, 3 次重复, 随机排列。取 5~6 片真叶烟苗移栽于装有灭菌土的花盆中, 缓苗后约 3 d, 于根际接种拮抗菌菌悬液, 每株约 5 mL, 重复接种 2 次, 间隔为 3 d。对照接入等量清水。待烟苗长至 30 d 后, 各处理随机选取 10 株烟苗, 小心将苗整株挖出, 洗去根部泥土, 按烟草行业标准 YC/T142—1998《烟草农艺性状调查方法》测量并记载各处理烟株最大叶长、最大叶宽、株高、茎围和整株鲜重, 然后 70 °C 烘干至恒重, 测量各烟株整株干重。对各处理的促生效果采用 SPSS 16.0 统计软件 Duncan 法比较分析相关数据在显著性水平为 0.01 时的差异。

1.8 拮抗菌的温室控病试验

拮抗菌的温室控病试验参照王静等^[19]的方

法。试验共设 4 个处理, 处理 1~3 分别为菌株 H19、H34 和 Y6 的菌悬液(10^8 cfu·mL⁻¹), 处理 4(对照)为清水。每处理 5 株烟苗, 3 次重复, 随机排列。取 5~6 片真叶的烟苗浸根于拮抗菌菌悬液(10^8 cfu·mL⁻¹)中, 30~40 min 后取出并移栽于装有灭菌土的花盆中。缓苗后约 3 d, 于根际接种拮抗菌菌悬液, 每株约 5 mL, 重复接种 2 次, 间隔为 3 d。对照接入等量清水。1 d 后, 将烟草青枯菌菌悬液(10^8 cfu·mL⁻¹)接种于烟苗根际, 每株 5 mL。对照接等量清水。完成后将烟株置于 30 °C 左右的温室中保温保湿, 观察发病情况。见病株后, 每日观察记录发病株数。以接种病原菌日为起点日, 共观察 30 d。分级标准按全国烟草行业烟草病害调查分级标准 Yc/T39—1996 进行。病情指数和防治效果按烟草病害药效试验方法 Yc/T40—1996 计算。

采用 Microsoft Excel 2010 对试验数据进行基本处理, 计算出发病率、病情指数以及相对防效, 然后采用 SPSS 16.0 统计软件 Duncan 法比较分析相关数据在显著性水平为 0.01 时的差异。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的初筛及复测

分离纯化得到细菌共计 238 株, 初筛获得 24 株具有拮抗效果的菌株, 其中 17 株根际细菌, 7 株内生细菌, 拮抗率为 10.1%。抑菌圈直径与菌落直径差值, 即抑菌带直径超过 10 mm 的菌株有 7 株, 其菌株编号分别为 H10、H15、H19、H34、H44、H55、Y6, 均为根际细菌。对此 7 株拮抗菌进行抑菌物质的粗提, 测其抑菌效果, 最终得到效果较好的 3 株拮抗菌, 分别为 H19、H34 和 Y6, 抑菌圈直径达 17.68 mm、14.35 mm 和 15.95 mm(表 1 及图 1)。说明该 3 株拮抗菌的抑菌粗提物比菌株本身对青枯菌有更强的抑菌能力, 后期的研究将主要针对该 3 株拮抗菌展开。

表 1 7 株拮抗菌对青枯菌的抑菌效果初测及复测
Table 1 Antagonistic effect of 7 strains of antagonistic bacteria against *Ralstonia solanacearum* mm

菌株编号 Code	抑菌带直径 Width of the inhibition zone	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone
H10	13.97±0.21D	10.75±0.72E
H15	11.73±0.21F	12.95±1.62CD
H19	17.23±0.21B	17.68±1.03A
H34	15.53±0.35C	14.35±0.31C
H44	13.27±0.15E	12.73±0.25CD
H55	12.27±0.21F	12.38±0.28D
Y6	18.53±0.35A	15.95±0.79B
CK	—	8.00±0.00F

同列数据后不同大写字母表示经邓肯氏新复极差测验差异极显著。下同。Different capital letters in the same column indicate very significant difference at $P < 0.01$ level by Duncan's new multiple range test. The same below.

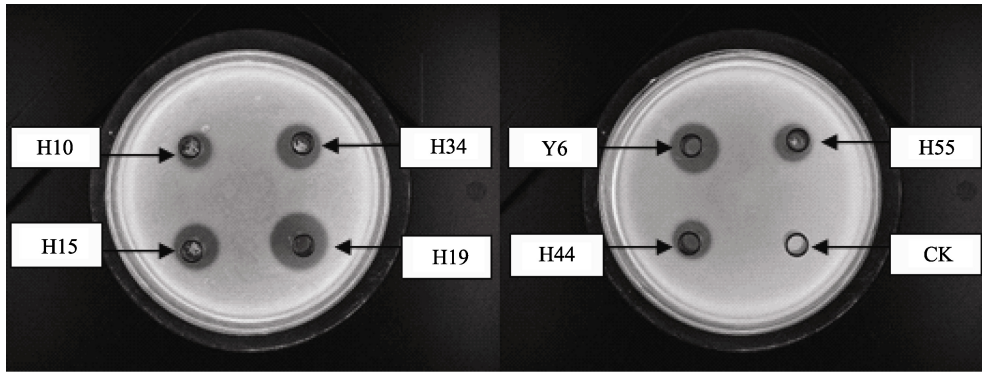


图 1 7 株拮抗细菌对青枯菌的抑菌效果复测

Fig. 1 Antagonistic effect of 7 strains of antagonistic bacteria against *Ralstonia solanacearum*

2.2 拮抗细菌的鉴定

2.2.1 全细胞脂肪酸分析

对 H19、H34 和 Y6 3 株拮抗细菌进行全细胞脂肪酸分析, H19 和 Y6 各含有 9 种脂肪酸, 与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)具有较高相似性; H34 含有 6 种脂肪酸, 与甲基营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*)具有较高相似性。初步判定 3 株拮抗细菌为芽孢杆菌属(表 2)。

2.2.2 分子生物学鉴定

以 3 株拮抗细菌的基因组 DNA 为模板扩增 16S rDNA 片段, 得到大小约 1 500 bp 的 PCR 特征性条带, 与芽孢杆菌 16S rDNA 的理论值基本相符。测序结果与 GenBank 中已知序列比较得到 H19 与 *B. amyloliquefaciens* ESR9 的 16S rDNA 序列相同(或一致性)为 100%; H34 与 *B. methylotrophicus* PY3 的 16S rDNA 序列相同(或一致性)为 99%; Y6 与 *B. amyloliquefaciens* HS8 的 16S rDNA 序列相同(或一致性)为 99%。

以 3 株拮抗细菌的基因组 DNA 为模板扩增 *gyrB* 基因片段, 得到大小约 1 300 bp 的 PCR 特征性条带,

与芽孢杆菌 *gyrB* 基因的理论值基本相符。测序结果与 GenBank 中已知序列比较得到 H19 和 Y6 均与 *B. amyloliquefaciens* Y2 的 *gyrB* 基因序列相同(或一致性)为 99%; H34 与 *B. methylotrophicus* 的 *gyrB* 基因序列相同(或一致性)为 98%。将 H19、H34、Y6 与已知模式菌株的 *gyrB* 序列构建系统进化树见图 2。

综合全细胞脂肪酸分析、16S rDNA 及 *gyrB* 基因序列比对结果及与模式菌株系统发育树分析, 最终将菌株 H19、Y6 鉴定为解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens*, 菌株 H34 鉴定为甲基营养型芽孢杆菌 *B. methylotrophicus*。

2.3 拮抗细菌分泌铁载体的定性检测

H19、H34 和 Y6 3 株拮抗细菌在 CAS 检测平板上均出现橘黄色晕圈, 表明 3 株拮抗细菌都可以分泌铁载体, 可溶性指数 H19>Y6>H34(表 3)。

2.4 拮抗细菌分泌生长素(IAA)的定性检测

生长素分泌测定结果如图 3 所示, H19 为深粉色, H34 株为粉色, Y6 株为浅粉色, 说明 3 株拮抗细菌均可分泌生长素。颜色越深, 表明分泌 IAA 能力越强, 分泌生长素的能力大小为 H19>H34>Y6。

表 2 3 株拮抗细菌的全细胞脂肪酸分析

Table 2 Analysis of whole-cell fatty acid of 3 strains of antagonistic bacteria

特征性脂肪酸 Characteristic fatty acid	相对含量 Relative content (%)				
	H19	H34	Y6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>B. methylotrophicus</i>
14:0 iso	1.04	—	1.17	2.9	—
15:0 iso	23.22	18.01	17.80	21.5	20.8
15:0 anteiso	34.81	40.90	40.70	44.2	52.7
16:0	7.22	6.71	6.50	8.5	—
16:0 iso	2.44	2.38	3.16	—	13.9
17:0 iso	6.99	6.72	6.72	9.7	—
17:0 anteiso	7.16	13.11	10.53	12.5	12.6
16:1 w11c	2.07	—	1.45	—	—
17:1 iso w10c	1.66	—	1.23	—	—

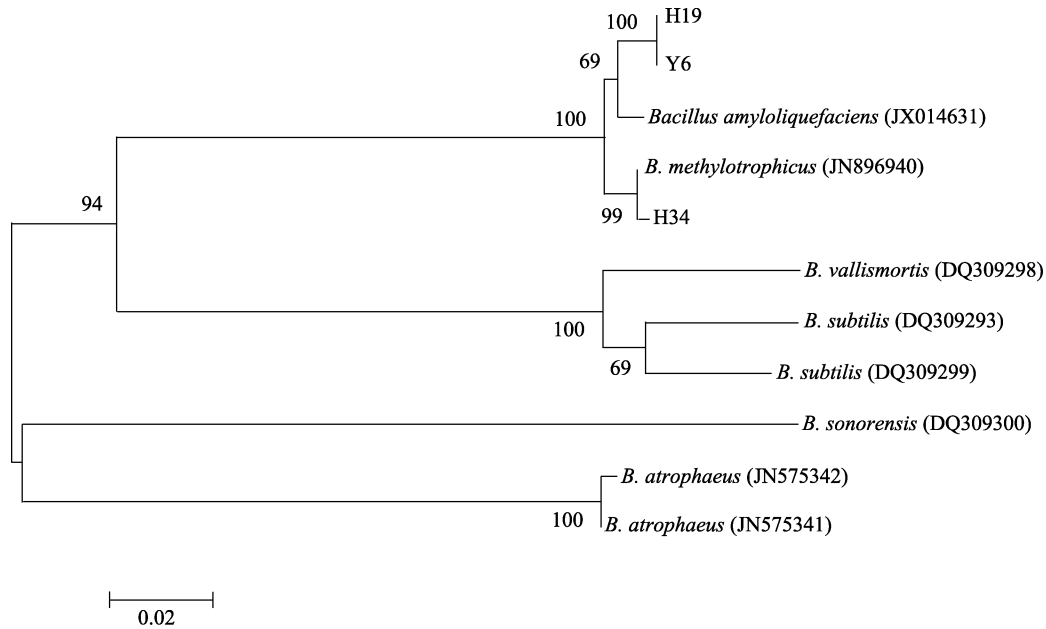


图 2 基于 *gyrB* 基因序列构建的拮抗菌株与模式菌株系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree based on *gyrB* sequences of antagonistic bacteria and type bacteria

表 3 CAS 检测平板上菌落大小、晕圈直径及其他特征
Table 3 Size, halo and other characteristics of bacterial colony on CAS plates

菌株编号 Code	菌落直径 Diameter of colony (mm)	晕圈直径 Diameter of halo (mm)	颜色 Color	可溶性指数 Soluble index	特征 Characteristic
H19	3.50	8.53	淡橘黄色 Light orange	2.43	生长旺盛, 橘黄色周围蓝色加深较明显 Vigorous growth, obvious dark blue
H34	7.27	14.10	橘黄色 Orange	1.97	生长旺盛, 橘黄色周围蓝色不加深 Vigorous growth, no dark blue
Y6	7.03	14.07	橘黄色 Orange	2.01	生长旺盛, 橘黄色周围蓝色不加深 Vigorous growth, no dark blue

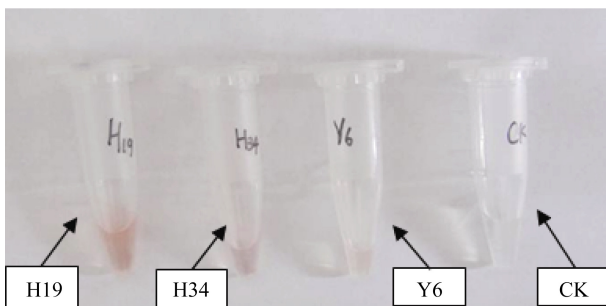


图 3 3 株拮抗细菌分泌 IAA 能力
Fig. 3 Ability of 3 strains of antagonistic bacteria for secreting IAA

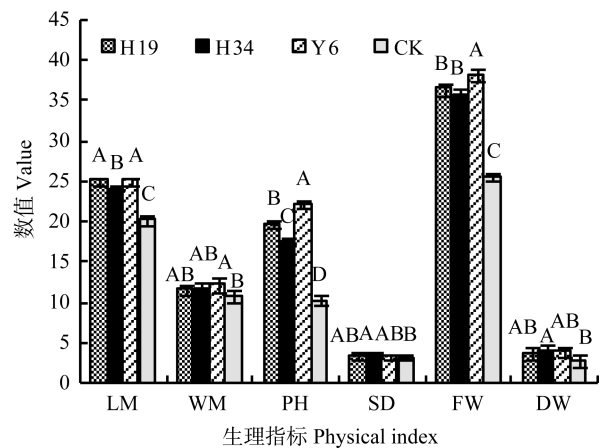


图 4 3 株拮抗细菌对烟草的促生作用测定结果
Fig. 4 Growth-promoting effect on tobacco of 3 strains of antagonistic bacteria

LM: 最大叶长(cm); WM: 最大叶宽(cm); PH: 株高(cm); SD: 茎围(cm); FW: 整株鲜重(g); DW: 整株干重(g). LM: maximum length of leaf (cm); WM: maximum width of leaf (cm); PH: plant height (cm); SD: stem diameter (cm); FW: fresh weight (g); DW: dry weight (g).

2.5 拮抗细菌的室内促生试验

促生试验结果如图 4 所示, Y6 处理后的烟株的最大叶宽、株高及整株鲜重比对照分别增长 12.40%、115.44%、48.98%, 与对照差异最显著; 经 H34 处理后的烟株茎围和整株干重比对照增长 13.98%、41.75%, 高于另外两株拮抗细菌; 而经 H19 处理后的烟株最大叶长增长率为 23.67%, 高于 H34 和 Y6。可见, 3 株拮抗细菌均表现出较好的促生作用, 与之前分泌铁载体及生长素测定试验结果相符。

2.6 拮抗细菌的温室控病试验

如表 4 所示, H19、H34 和 Y6 3 株拮抗细菌对烟

草青枯病均有明显的防治效果, 防效分别高达 76.57%、60.98%和 69.83%, 其中 H19 的防治效果最佳。但与 40%农用链霉素的 78.66%相比, 防效稍逊。

表 4 3 株拮抗细菌对烟草青枯病的防治效果
Table 4 Control efficacy of 3 strains of of antagonistic bacteria against tobacco bacterial wilt

菌株编号 Code	发病率 Disease incidence (%)	病情指数 Disease index	防治效果 Control effect (%)
H19	10.50±1.00C	4.17±0.38B	76.57±2.52AB
H34	17.50±1.00B	6.94±0.64B	60.98±2.87C
Y6	13.50±1.91BC	5.83±0.73B	69.83±4.90B
40%农用链霉素 40% agricultural streptomycin	9.50±1.00C	3.39±0.58C	78.66±3.69A
CK	55.00±3.83A	28.22±4.40A	—

3 讨论

由于生产上基本无优质抗病品种可利用, 轮作也较难大面积实施, 化学防治又有抗药性和农药残留等问题, 迫使人们亟待寻找一种安全高效的防治方法。生物防治具有安全无公害、长效等优点^[20], 是现在植物病害防治的热点研究领域。目前青枯病的生物防治措施包括利用无致病力菌株和拮抗微生物等。本试验从生防角度出发, 通过体外活性筛选获得了 H19、H34 和 Y6 3 株拮抗细菌, 经鉴定均属于芽孢杆菌属。许多研究发现, 芽孢杆菌具有生长速度快、营养需求简单、有较强抗逆性、在植物表面易于存活与繁殖、对人畜无害、不污染环境、制剂稳定、施用方便等优点^[21], 是理想的生防菌筛选对象。

芽孢杆菌能够产生铁载体、几丁质酶、脂肽类等抗菌物质; 与病原菌竞争营养物质和空间位点; 诱导植物获得系统抗性; 同时产生 IAA 等促进植物生长^[22-23]。如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)拥有广泛的寄主群体, 可形成内生孢子, 并产生杀菌谱广的不同生物活性物质; 从茶根际土壤中获得巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)具有溶磷作用, 可产生植物生长素(IAA)、铁载体和其他抗真菌代谢物, 从而可促进植物生长并降低病害程度^[24]。刘邮洲等^[25]筛选出 22 株对番茄枯萎病菌和番茄青枯病菌皆具有很强拮抗作用的菌株, 其中 3 株能分泌铁载体, 防效较好的 4 株拮抗菌均为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。本试验为初步验证 H19、H34 和 Y6 3 株拮抗细菌能够促进烟株生长同时有效防治烟草青枯病的作用机制, 对其进行了产铁载体和生长素能力的测定, 结果表明 3 株拮抗菌均可产生铁载体和生长素, 且以菌株 H19 的分泌能力最强。而随后做的温室促生和控病试验, 进一步证明三者具备对烟草的促生和防病能力。

拮抗菌的促生和防病作用是相辅相成的, 充分开发自然界中的拮抗菌, 可以有效保护作物, 获得高产同时有利于环境友好, 可谓是一举多得。本试验筛选获得的 3 株拮抗细菌对烟草青枯病具有较好的抑菌防病作用, 同时对烟草有明显的促生效应,

具有较高的开发利用价值, 可围绕上述菌株的生防作用机制及其发酵工艺等展开深入研究。

参考文献

- [1] 刘国红, 刘波, 林乃铨. 青枯雷尔氏菌生防芽孢杆菌的快速筛选及其鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2013(3): 145-152
Liu G H, Liu B, Lin N Q. Rapidly screening and identification of an antagonistic *Bacillus* sp. against *Ralstonia solanacearum*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2013(3): 145-152
- [2] 彭细桥, 周国生, 邓正平, 等. 烟草青枯病内生拮抗菌的筛选、鉴定及其防效测定[J]. 植物病理学报, 2007, 37(6): 112-116
Peng X Q, Zhou G S, Deng Z P, et al. Screening, identification and control efficacy of tobacco antagonistic endophytic bacteria against *Ralstonia solanacearum*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2007, 37(6): 112-116
- [3] 潘华彩, 唐嘉义, 秦小萍. 烟草青枯病防治研究进展[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(S1): 31-35
Pan H C, Tang J Y, Qin X P. Advances on control of tobacco bacterial wilt[J]. Journal of Yunnan University: Natural Sciences, 2008, 30(S1): 31-35
- [4] 李红丽, 李清飞, 郭夏丽, 等. 调节土壤微生态防治烟草青枯病[J]. 河南农业科学, 2006(2): 57-60
Li H L, Li Q F, Guo X L, et al. The prevention of tobacco bacterial wilt by regulating soil microenvironment[J]. Journal of He'nan Agricultural Sciences, 2006(2): 57-60
- [5] 周鑫钰, 朱宏建, 周倩, 等. 1 株烟草青枯病拮抗内生细菌的分离及鉴定[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2011(6): 637-640
Zhou X Y, Zhu H J, Zhou Q, et al. Isolation and identification of an antagonistic endophytic bacteria strain against tobacco bacterial wilt[J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences, 2011(6): 637-640
- [6] 李艳嫦, 程飞白, 陈泽鹏, 等. 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, et al. Studies on screening and identification of endophytic bacteria against *Ralstonia solanacearum* and its colonization[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2011, 17(5): 74-80
- [7] 刘伟, 沈小英, 段军娜, 等. 抗烟草青枯病菌的芽孢杆菌筛选和鉴定[J]. 植物保护学报, 2013, 40(1): 95-96
Liu W, Shen X Y, Duan J N, et al. Screening, identification of antagonistic rhizospheric *Bacillus* sp. LW-6 against tobacco

- bacterial wilt[J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2013, 40(1): 95-96
- [8] Phae C G, Shoda M, Kita N, et al. Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22[J]. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1992, 58(3): 329-339
- [9] 胡军华, 张伏军, 蓝希钊, 等. 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 G, et al. 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
- [10] Soad A A, 谢关林, 李斌, 等. 利用芽孢杆菌在温室环境中控制番茄青枯病[J]. *植物病理学报*, 2006, 36(1): 80-85
Soad A A, Xie G L, Li B, et al. Biological control of bacterial wilt of tomato by *Bacillus* spp. under greenhouse environment[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2006, 36(1): 80-85
- [11] Monk J, Gerard E, Young S, et al. Isolation and identification of plant growth-promoting bacteria associated with tall fescue [C]. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*. New Zealand Grassland Association, 2009, 71: 211-216
- [12] Compant S, Duffy B, Nowak J, et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 4951-4959
- [13] 荣良燕, 姚拓, 赵桂琴, 等. 产铁载体 PGPR 菌筛选及其对病原菌的拮抗作用[J]. *植物保护*, 2011, 37(1): 59-64
Rong L Y, Yao T, Zhao G Q, et al. Screening of siderophore-producing PGPR bacteria and their antagonism against the pathogens[J]. *Plant Protection*, 2011, 37(1): 59-64
- [14] 姜晓宇, 高菊生, 徐凤花, 等. 水稻种子内生细菌多样性及其分泌植物生长素能力的测定[J]. *微生物学报*, 2013(3): 55-61
Jiang X Y, Gao J S, Xu F H, et al. Diversity of endophytic bacteria in rice seeds and their secretion of Indole acetic acid[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013(3): 55-61
- [15] 苏婷, 路梅, 周青, 等. 抗不同生化型青枯菌的生防菌筛选鉴定及其活性分析[J]. *植物保护学报*, 2010, 37(5): 431-435
Su T, Lu M, Zhou Q, et al. Evaluation and identification of antagonistic bacteria against different biovars of *Ralstonia solanacearum* and their active metabolites[J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2010, 37(5): 431-435
- [16] 张翼, 白晨, 冉国华, 等. 柑橘内生细菌 YS45 的鉴定、抗菌物质分析及其对油菜菌核病的防治作用[J]. *植物病理学报*, 2009, 39(6): 638-645
Zhang Y, Bai C, Ran G H, et al. Characterization of endophytic bacterial strain YS45 from the citrus xylem and its biocontrol activity against *Sclerotinia* stem rot of rapeseed[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2009, 39(6): 638-645
- [17] 谢永丽, 高学文. 高寒草甸根围拮抗芽孢杆菌筛选鉴定及脂肽化合物分析[J]. *中国生物防治学报*, 2012, 28(3): 367-374
Xie Y L, Gao X W. Screening and identification of bio-control *Bacillus* strains isolated from rhizosphere of altiplaino meadow and its lipopeptide compounds[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2012, 28(3): 367-374
- [18] Kumar S, Tamura K, Nei M. Mega3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150-163
- [19] 王静, 赵廷昌, 孔凡玉, 等. 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(5): 108-111
Wang J, Zhao T C, Kong F Y, et al. Disease-preventing and growth-promoting effects of antifungal bacteria against tobacco wilt[J]. *Plant Protection*, 2007(5): 108-111
- [20] 陈程, 黎定军, 陈武. 烟草青枯病生物防治研究进展[J]. *作物研究*, 2011, 25(6): 639-642
Chen C, Li D J, Chen W. Research progress of biocontrol of tobacco *Ralstonia solanacearum*[J]. *Crop Research*, 2011, 25(6): 639-642
- [21] 朱玥妍, 刘姣, 杜春梅. 芽孢杆菌生物防治植物病害研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(34): 16635-16638
Zhu Y Y, Liu J, Du C M. Research progress of biological control in plant diseases by *Bacillus* spp.[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(34): 16635-16638
- [22] 黄晓东, 季尚宁, Glick B, 等. 植物促生菌及其促生机理(续)[J]. *现代化农业*, 2002(7): 13-15
Huang X D, Ji S N, Glick B, et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and its growth-promoting mechanism (continued)[J]. *Modernizing Agriculture*, 2002(7): 13-15
- [23] 齐爱勇, 赵绪生, 刘大群. 芽孢杆菌生物防治植物病害研究现状[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(12): 277-280
Qi A Y, Zhao X S, Liu D Q. Research of biological control in plant diseases by *Bacillus* spp.[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(12): 277-280
- [24] Chakraborty U, Chakraborty B, Basnet M. Plant growth promotion and induction of resistance in camellia sinensis by *Bacillus megaterium*[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2006, 46(3): 186-195
- [25] 刘卹洲, 陈志谊, 梁雪杰, 等. 番茄枯萎病和青枯病拮抗细菌的筛选、评价与鉴定[J]. *中国生物防治学报*, 2012, 28(1): 101-108
Liu Y Z, Chen Z Y, Liang X J, et al. Screening, evaluation and identification of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Ralstonia solanacearum*[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2012, 28(1): 101-108