

烟草黑胫病和根黑腐病生防假单胞杆菌的筛选与鉴定

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

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

摘要: 为获得对烟草黑胫病和根黑腐病具有双重防病效果且能够促进烟草生长的假单胞杆菌, 采用稀释涂布法从 40 份土壤样品中分离出 201 株细菌, 通过平板对峙和含毒介质法, 筛选出对烟草黑胫病和烟草根黑腐病病原菌均具有良好拮抗作用的菌株 PA2101 和 PG3402。盆栽促生试验表明, 菌株 PA2101 和 PG3402 能协调地改善烟草地上部分的生长和烟草根系发育, 均在一定程度上增加了烟草的株高、叶面积、株鲜重、根鲜重、叶片数和根长, 提高了烟草的根冠比和根活力。盆栽试验结果表明, 菌株 PA2101 对烟草黑胫病和根黑腐病的防效分别为 70.11% 和 62.67%, 均高于其对照药剂; 菌株 PG3402 对两种病害的防效分别为 60.92% 和 60.00%, 与对照药剂相当。抗性标记菌株的定殖试验结果表明, 菌株 PA2101 和 PG3402 在接种后第 29 d 能定殖于烟草根际土壤和根内, 在烟草茎和叶内也能长时间存在, 表明两菌株能够良好定殖。16S rDNA 序列、菌落形态和生理生化性状分析表明, 菌株 PA2101 为铜绿假单胞杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*, 菌株 PG3402 为格拉纳达假单胞杆菌 *Pseudomonas granadensis*。综上所述, 菌株 PA2101 和 PG3402 对烟草具有良好的促生作用, 并对烟草黑胫病和根黑腐病有较好的防病效果, 是具有生防潜力的菌株。

关键词: 烟草黑胫病; 烟草根黑腐病; 生物防治; 假单胞杆菌; 鉴定

中图分类号: S476 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2019)06-0940-09

Screening and Identification of *Pseudomonas* against Tobacco Black Shank and Tobacco Root Black Rot

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

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

Abstract: In order to obtain *Pseudomonas* bacteria with good biocontrol effect on tobacco black shank disease and black root rot disease, which can also promote tobacco growth, 201 biocontrol bacteria were isolated from 40 soil samples. Using plate confrontation method and poison media method, we ultimately obtained bacteria strains PA2101 and PG3402 that had stronger antagonistic effect on the pathogens of tobacco black shank disease and black root rot disease. The pot experiment showed that PA2101 and PG3402 could improve the growth of aboveground plants and root system in a coordinated way. Both of them could increase the plant height, leaf area,

收稿日期: 2019-04-02

基金项目: 黄淮烟区蚜、烟粉虱和烟草根黑腐病绿色防控关键技术研究与应用 (110201502017); 河南烟草病虫害绿色防控关键技术研究与应用 (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, 科研助理, E-mail: qianhuimin90@sina.com; *通信作者, 文艺, 博士, 助理研究员, E-mail: wy412@163.com; 刘红彦, 博士, 研究员, E-mail: liuhy1219@163.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.06.022

aerial fresh weight, root fresh weight, leaf number and root length of tobacco, as well as the root shoot ratio and root activity of tobacco. The control efficacies of PA2101 on tobacco black shank and black root rot were 70.11% and 62.67%, which were better than their fungicide control. And the control efficacies of PG3402 on the two tobacco diseases were 60.92% and 60.00%, which were equivalent to that of fungicide control. Colonization test with resistant label method showed that PA2101 and PG3402 could stably colonize on tobacco rhizosphere soil and root on 29th day after inoculation, and that they could be detected in tobacco stem and leaf, indicating that the two strains could well colonize. On the basis of molecular analysis of 16S rDNA sequences, colonial morphology, as well as physiological and biochemical characteristics, PA2101 and PG3402 were identified as *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas granadensis* respectively. PA2101 and PG3402 have good growth-promoting effects and disease prevention effects on tobacco black shank disease and root black rot disease, indicating that they are of great potential in the biocontrol on the two tobacco fungal diseases.

Key words: tobacco black shank; tobacco black root rot; biocontrol; *Pseudomonas* sp.; identification

由寄生疫霉烟草致病变种 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* 引起的烟草黑胫病和由根串珠霉 *Thielaviopsis basicola* 引起的烟草根黑腐病是烟草生产上的 2 种主要土传病害, 在苗期和大田期均能发生, 发病严重时能引起烟株死亡, 造成巨大的经济损失; 近年来, 这 2 种病害在河南省产烟区均有不同程度的发生, 随着烟草连作增多、栽培制度的变化, 这 2 种病害常混合发生, 危害持续加重, 已成为河南烟区主要的土传病害^[1,2]。目前化学防治是这两种病害的主要防治方法, 但化学农药的长期施用易引起病原菌产生抗药性, 造成环境污染等问题^[3]。生物防治因其无污染、无公害和长效性等优点成为植物病害综合防治的重要手段, 在烟草土传病害的防治中占有越来越重要的地位^[4]。目前国内外单一针对烟草黑胫病或烟草根黑腐病筛选生防菌的研究较多, 芽胞杆菌^[5,6]、假单胞杆菌^[7,8]和木霉菌^[9,10]等不同拮抗菌株能够分别抑制这 2 种病原菌菌丝的生长并有效防治病害的发生, 但能够同时防治 2 种病害的拮抗菌株还未报道。Ma 等^[11]已经得到能够同时防治烟草青枯病和烟草黑胫病的铜绿假单胞杆菌 NXHG29, 表明筛选同时防治多种病害的生防菌已成为生物防治的新策略。

假单胞杆菌因其适应能力强、产生多种抗菌素^[8]、诱导植物抗性^[12]、促生作用^[13]等优势成为烟草病害生防菌株的研究热点。已经有学者筛选出兼具防病和促生功能的假单胞杆菌, 杨珍福等^[14]分离的铜绿假单胞菌 YN201458 能促进烟草生长, 且对烟草黑胫病的温室防治效果为 41.40%, Fatima 等^[15]分离出一株对小麦禾谷镰刀菌和假禾谷镰刀菌均有抑制作用, 并能产生多种促生物质的荧光假单胞杆菌。因此, 筛选对烟草黑胫病和根黑腐病病原菌均具有良好拮抗作用的假单胞杆菌, 并研究其防病效果和促生作用, 对防治烟草黑胫病与根黑腐病两种主要土传病害具有重要意义。

本研究从土壤样品中分离假单胞杆菌, 通过平板对峙法和含毒介质法筛选出对烟草黑胫病病原菌和根黑腐病病原菌均具有拮抗作用的菌株。通过盆栽试验, 研究其防病和促生效果, 并测定其定殖能力, 为开发烟草黑胫病和根黑腐病的生防菌剂提供高效菌株。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试土样 2016 年 6—10 月从河南省郑州市、洛阳市、许昌市襄城县、驻马店市和黑龙江省阿尔山等地采集 40 份土壤样品。

1.1.2 供试菌种 烟草黑胫病病原菌寄生疫霉烟草致病变种(烟草疫霉)和根黑腐病病原菌烟草根串珠霉均由河南省农业科学院烟草研究所提供。

1.1.3 供试烟草品种 中烟 100。

1.1.4 供试培养基 KB 培养基^[16]: 蛋白胨 20 g, 甘油 10 mL, 磷酸氢二钾 1.5 g, 七水合硫酸镁 1.5 g, 琼脂 20 g (仅做固体培养基时添加), 添加蒸馏水定容至 1 L, 混匀后分装于三角瓶中, 121 °C 灭菌 30 min。PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 17 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 121 °C 灭菌 30 min。菌谷培

培养基^[17]：将小麦浸泡6 h后用清水洗净，淘尽瘪空壳谷粒，煮至谷粒炸开成半开花状，冷却至半干，分装入500 mL三角瓶中高压灭菌1 h（115 ℃），备用。

1.1.5 供试药剂 58%甲霜·锰锌可湿性粉剂（一帆生物科技集团有限公司）、70%甲基硫菌灵可湿性粉剂（山东海讯生物化学有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离 采用稀释平板涂布法。分别将1 g土样加入装有10 mL无菌蒸馏水的试管中，用涡旋振荡器振荡10 min，为 10^{-1} 的土壤稀释液，再依次稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} ，各吸取100 μ L液涂布于含8-羟基喹啉的KB固体平板^[18]上，28 ℃培养2 d后，挑选在紫外光UV2照射下能发出荧光的假单胞杆菌，划线纯化后，用25%的甘油保存于-80 ℃。

1.2.2 拮抗菌株发酵液的制备 挑取分离纯化的假单胞杆菌单菌落，接种于KB培养液中，在28 ℃、180 r/min条件下振荡培养16 h制备种子菌，种子菌以3%的接种量接种于KB培养液中，在28 ℃、180 r/min条件下摇培48 h，盆栽试验使用前用KB培养液将发酵液中活菌浓度调至 8×10^8 cfu/mL。

1.2.3 拮抗菌株的筛选 以烟草疫霉和烟草根串珠霉为靶标，采用平板对峙法筛选具有拮抗作用的菌株。于9 cm PDA平板中心接种直径0.5 cm的靶标菌菌饼，拮抗菌株与其相距2 cm，同时以单独接种病原菌作为对照，每个处理3次重复。28 ℃恒温培养7 d，测量对照和处理的靶标菌菌落直径，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） $\times 100$ 。

采用含毒介质法^[19]测定拮抗菌株发酵滤液抑菌效果：将1.2.2中摇培48 h的菌悬液离心，留上清液，用微孔滤膜过滤两次，制作含10%无菌滤液的PDA平板，在平板中央接入0.5 cm靶标菌菌饼，以不含滤液的PDA培养基为对照，每个处理重复3次。28 ℃恒温培养7 d，测量对照和处理的靶标菌菌落直径，计算相对抑菌率。

1.2.4 生防菌株盆栽促生试验 促生试验参考夏艳等^[20]的方法。取长势一致的5~6片真叶烟苗移栽于装有灭菌土与品氏基质（pindstrup）体积比为3:1的花盆中，缓苗3 d后，于根际接种拮抗菌发酵液，每株5 mL，共灌根接种3次，间隔2 d，以等量的无菌KB培养液为对照（CK）。每处理3株烟苗，3次重复。置于28 ℃、10 h光照，23 ℃、14 h黑暗、75%湿度条件下培养。30 d后，小心将苗整株挖出，洗去根部泥土，按《烟草农艺性状调查方法》^[21]测量并记载烟株株高、有效叶片数、最大叶长、最大叶宽、根长、地上鲜重、根鲜重和根活力。

1.2.5 生防菌株盆栽防病试验 防病试验参考陈泽斌等^[22]的方法。取长势一致的5~6片真叶烟苗移栽于装有灭菌土与品氏基质（pindstrup）体积比为3:1的花盆中，缓苗3 d后，于根际接种拮抗菌发酵液，10 mL/株，共灌根接种3次，间隔2 d，同时以无菌KB培养液为对照（CK）。另外，设置药剂对照，烟草黑胫病药剂对照为58%甲霜·锰锌可湿性粉剂500倍稀释液，烟草根黑腐病药剂对照为70%甲基硫菌灵可湿性粉剂1000倍稀释液，缓苗3 d后每株烟苗15 mL，7 d后再次灌根15 mL，共灌根2次。每个处理5株烟苗，3次重复。

拮抗菌发酵液第3次接种结束24 h后分别接种烟草疫霉和烟草根串珠霉。接种方法：用手术刀划伤烟苗茎基部（2 mm伤口），然后分别接种烟草疫霉菌谷5 g/株（将保存的烟草黑胫病菌丝接入PDA平板上培养5~7 d后，转入小麦菌谷培养基上培养18~20 d）和根串珠霉分生孢子悬浮液5 mL/株（将保存的根串珠霉接入PDA平板上培养7 d后，用0.05%的吐温80洗去平板上的分生孢子液，将浓度调至 1×10^6 孢子/mL）。置于28 ℃、10 h光照，23 ℃、14 h黑暗、75%相对湿度条件下培养。培养30 d后调查发病情况，计算发病率、病情指数和防治效果。

烟草根茎病害分级标准参照国家标准（GB/T 23222-2008）进行^[23]。烟草黑胫病分级标准：0级，全株无病；1级，茎部病斑不超过茎围的1/3，或1/3以下叶片凋萎；3级，茎部病斑环绕茎围1/3~1/2，或1/3~1/2叶片轻度凋萎，或下部少数叶片出现病斑；5级，茎部病斑超过茎围的1/2，但未全部环绕茎围，或1/2~2/3叶片凋萎；7级，茎部病斑全部环绕茎围，或2/3以上叶片凋萎；9级：病株基本枯死。烟草根黑腐病分级标准：0级，无病，植株生长正常；1级，植株生长基本正常或稍有矮化，少数根坏死呈黑色，中下部叶片褪绿（或变色）；3级，病株株高比健株矮1/4~1/3，或半数根坏死呈黑色，1/2~2/3叶片萎蔫，中

下部叶片稍有干尖、干边；5 级，病株比健株矮 1/3~1/2，大部分根坏死呈黑色，2/3 以上叶片萎蔫，明显干尖、干边；7 级，病株比健株矮 1/2 以上，全株叶片凋萎，根全部坏死呈黑色，近地表的次生根受害明显；9 级，病株基本枯死。

1.2.6 生防菌株的定殖试验 参考蔡学清的抗性标记法^[24]。因野生假单胞杆菌不具备利福平抗性，将其逐级接种到利福平浓度为 10、25、50、100、150、200 和 300 μg/mL 的 KB 平板上，诱导得到能够在 300 μg/mL 利福平的 KB 培养基上稳定生长的抗性标记菌株，并用平板对峙法挑选对烟草疫霉和烟草根串珠霉有拮抗作用的标记菌株。

标记菌株发酵液制备同 1.2.2，其中 KB 培养液加入利福平（浓度 300 μg/mL）。用标记菌株发酵液（浓度调至 8×10⁸ cfu/mL）处理长势一致的 5~6 片真叶的烟苗，移栽缓苗 3 d 后每株灌根接种 5 mL 接种液，以无菌 KB 培养液（浓度 300 μg/mL）为对照。分别在接种第 2、3、4、6、8、15、22 d 取 2 株烟苗，各取其根际土壤、根系、茎和下部第二片真叶 0.1 g，用 75% 的酒精浸泡 20 s 进行表面消毒（土壤不经消毒，直接进行分离）后于研钵磨碎，用无菌水逐级稀释，取合适倍数的稀释液 100 μL 均匀涂布于 200 μg/mL 利福平的 KB 培养基平板上，培养 2 d 后统计菌落数。

1.2.7 形态及生理生化鉴定 参照蔡妙英等^[16]《常见细菌系统鉴定手册》方法。

1.2.8 16S rDNA 鉴定 采用 CTAB 法提取生防菌株基因组 DNA。用通用引物 27F（5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3'）和 1492R（5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'）对 16S rDNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应程序：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 40 s，55 ℃退火 40 s，72 ℃延伸 1 min 30 s，35 个循环；72 ℃充分延伸 10 min。回收后的片段连接到 pMD-19T Vector 上，含目的片段的单克隆菌液送至生工生物工程（上海）股份有限公司完成测序。测序结果通过 Blast 方法在 GenBank 中与模式菌株序列进行比较，采用 BioEdit 7.0 进行序列匹配分析，应用 MEGA 4.0，以邻位法构建菌株的系统发育树。

1.3 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 生防菌株的分离筛选

从 40 份土壤样品分离得到 201 株发荧光的假单胞杆菌，通过平板对峙法和含毒介质法筛选得到拮抗作用较好的 2 株菌株，分别为 PA2101 和 PG3402，菌株 PA2101 分离自河南襄城县汾城乡仲庄村烟草黑胥病病株根围土壤，菌株 PG3402 分离自阿尔山土壤。由平板对峙法结果可知，相比对照，与菌株 PA2101 和 PG3402 对峙培养的病原菌菌落直径显著降低（*P*<0.05），两株菌株对烟草疫霉和根串珠霉的相对抑菌率均达 80% 以上。由含毒介质法抑菌结果可知，菌株 PA2101 的发酵滤液对烟草疫霉的相对抑菌率达到 100%，对根串珠霉的相对抑菌率为 58.10%，均显著高于菌株 PG3402（*P*<0.05）；PG3402 发酵滤液对烟草疫霉有一定抑制作用，其病原菌落直径与对照有显著差异，对根串珠霉基本无抑制作用（表 1）。

表 1 生防菌株对烟草疫霉和根串珠霉的抑菌效果
Table 1 Biocontrol effect of biocontrol bacteria on *P. nicotianae* and *T. basicola*

| 菌株 Strains | 平板对峙法 Plate confrontation method | | | | 含毒介质法 Poison media method | | | |
|---------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| | 疫霉 <i>P. nicotianae</i> | | 根串珠霉 <i>T. basicola</i> | | 疫霉 <i>P. nicotianae</i> | | 根串珠霉 <i>T. basicola</i> | |
| | 菌落直径 | 相对抑菌率 | 菌落直径 | 相对抑菌率 | 菌落直径 | 相对抑菌率 | 菌落直径 | 相对抑菌率 |
| | Colony diameter (cm) | Relative inhibition rate (%) | Colony diameter (cm) | Relative inhibition rate (%) | Colony diameter (cm) | Relative inhibition rate (%) | Colony diameter (cm) | Relative inhibition rate (%) |
| PA2101 | 1.37±0.06 b | 85.75±1.05 a | 1.03±0.06 b | 81.42±2.01 a | 0.50±0.00 c | 100.00±0.00 a | 1.97±0.15 b | 58.10±4.36 a |
| PG3402 | 1.72±0.03 b | 80.04±0.41 a | 0.87±0.12 b | 87.22±4.02 a | 4.17±0.15 b | 40.18±2.49 b | 3.93±0.06 a | 1.90±1.65 b |
| CK | 6.90±0.36 a | 0.00±0.00 b | 3.37±0.23 a | 0.00±0.00 b | 6.63±0.32 a | 0.00±0.00 c | 4.00±0.00 a | 0.00±0.00 b |

注：数据为平均值±标准误，不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著，下同。
Note: Data were presented as mean±SE, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level, the same below.

2.2 生防菌株的促生效果

盆栽促生试验结果表明, 经菌株 PA2101 和 PG3402 发酵液处理后, 烟草的株高、最大叶面积、有效叶片数、地上鲜重、根长、根鲜重及根活力均比对照组高。

PA2101 发酵液处理后烟草株高、根长、最大叶面积、有效叶片数、地上鲜重、根鲜重、根活力和根冠比分别比对照增加了 28.12%、25.48%、5.91%、39.35%、27.97%、108.02%、24.88%和 49.17%, 除了有效叶片数和根冠比外, 其他植物性状均显著高于清水对照 ($P<0.05$)。PG3402 处理后烟草各个性状分别增加了 52.96%、13.59%、5.91%、31.08%、21.79%、131.38%、58.00%和 76.64%, 除了有效叶片数, 其他植物性状均显著高于清水对照 ($P<0.05$) (表 2)。

表 2 生防菌株对烟草的促生作用分析
Table 2 Analysis of biocontrol bacteria to growth-promoting of tobacco

| 处理 Treatment | 株高 Plant height (cm) | 最大叶面积 Maximum area of leaf (cm ²) | 有效叶片数 Effective number of blades (piece) | 地上鲜重 Aerial fresh weight (g) | 根长 Root length (cm) | 根鲜重 Root fresh weight (g) | 根活力 Root activity (mg TTF/g/h) | 根冠比 Root shoot ratio (%) |
|-----------------|----------------------------|---|--|------------------------------------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| PA2101 | 20.00±2.85 b | 238.30±17.52 a | 7.88±0.33 a | 36.90±2.75 a | 10.95±1.15 a | 2.85±0.92 a | 0.27±0.00 b | 7.71±2.28 ab |
| PG3402 | 23.88±5.45 a | 215.72±26.69 a | 7.88±0.60 a | 34.71±4.15 a | 10.43±1.89 a | 3.17±1.56 a | 0.35±0.03 a | 9.13±3.97 a |
| CK | 15.61±1.58 c | 189.91±24.58 b | 7.44±0.53 a | 26.48±5.28 b | 8.56±1.20 b | 1.37±0.63 b | 0.22±0.01 c | 5.17±1.87 b |

2.3 生防菌株盆栽防病效果

盆栽防效试验结果表明, 对照烟草黑胫病和根黑腐病的病情指数分别为 66.44 和 55.56, PG3402 和 PA2101 处理后能显著降低烟草黑胫病和根黑腐病的发病率和病情指数 ($P<0.05$)。PA2101 对烟草黑胫病和根黑腐病防效分别为 70.11%和 62.67%, 效果优于药剂对照处理; PG3402 对烟草黑胫病的防效为 60.92%, 效果与药剂对照处理相当, 对烟草根黑腐病的防效为 60.00%, 优于药剂对照处理的防治效果 (表 3、4)。

表 3 生防菌株对烟草黑胫病的防治效果
Table 3 Control effect of biocontrol bacteria on tobacco black shank

| 处理 Treatment | 株数 Number of stems | 病级 Grade | | | | | | 发病率 Disease incidence (%) | 病情指数 Disease index | 防效 Control efficiency (%) |
|-----------------------------|-----------------------|----------|---|---|---|---|---|------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 | 7 | 9 | | | |
| PA2101 | 15 | 7 | 4 | 1 | 1 | 2 | 0 | 53.33 b | 19.26 b | 70.11 a |
| PG3402 | 15 | 5 | 3 | 3 | 3 | 1 | 0 | 66.67 b | 25.19 b | 60.92 a |
| 甲霜·锰锌 metalaxyl mancozeb | 15 | 4 | 7 | 1 | 1 | 2 | 0 | 73.33 b | 21.48 b | 66.67 a |
| CK | 15 | 0 | 1 | 2 | 4 | 6 | 2 | 100.00 a | 64.44 a | 0.00 b |

表 4 生防菌株对烟草根黑腐病的防治效果
Table 4 Control effect of biocontrol bacteria on tobacco root black rot

| 处理 Treatment | 株数 Number of stems | 病级 Grade | | | | | | 发病率 Disease incidence (%) | 病情指数 Disease index | 防效 Control efficiency (%) |
|-----------------------------|-----------------------|----------|---|---|---|---|---|------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 | 7 | 9 | | | |
| PA2101 | 15 | 7 | 3 | 2 | 1 | 2 | 0 | 53.33 b | 20.70 b | 62.67 a |
| PG3402 | 15 | 5 | 5 | 2 | 1 | 2 | 0 | 66.67 b | 22.22 b | 60.00 a |
| 甲基硫菌灵 thiophanate-Methyl | 15 | 5 | 3 | 3 | 2 | 2 | 0 | 66.67 b | 26.67 b | 52.00 a |
| CK | 15 | 0 | 1 | 4 | 5 | 4 | 1 | 100.00 a | 55.56 a | 0.00 b |

2.4 生防菌株在烟草根围及体内的定殖

诱导抗性标记法得到能够在 300 μg/mL 利福平的 KB 培养基上稳定生长的抗性标记菌株 PA2101^R 和 PG3402^R, 平板对峙试验发现, 两株标记菌株对烟草疫霉的相对抑菌率分别为 83.10%和 79.81%, 对烟草根串珠霉的相对抑菌率分别为 82.28%和 78.85%, 表明利福平抗性标记菌株 PA2101^R 和 PG3402^R 对烟草疫霉

和烟草根串珠霉的拮抗作用与野生菌株相当。

定殖试验结果表明, PA2101^R 和 PG3402^R 在烟草根际土壤、根内、茎内和叶内的种群动态随时间的延长呈不同的变化。接种后 2 d, PA2101^R 和 PG3402^R 在根际土壤定殖量最大, 然后依次为根内、茎内、叶内。

2 d 后, PA2101^R 定殖数量呈现下降的趋势。第 29 d, 其在根际土壤的定殖数量趋于稳定, 仍能达到 10⁵ cfu/g, 与第 22 d 定殖数量无显著差异 ($P < 0.05$); 根内的定殖数量为 10⁴ cfu/g, 与 14 d 定殖数量相当; 同时, 烟草茎内和叶内均能分离到菌株 (图 1)。

2 d 后, PG3402^R 定殖数量呈现上升、下降、上升后下降的趋势。第 29 d 时, 其在根际土壤的定殖数量为 10⁵ cfu/g, 与第 22 d 时的定殖数量无显著差异 ($P < 0.05$); 根内的定殖数量为 10⁴ cfu/g, 显著高于 21 d 的定殖数量 ($P < 0.05$); 同时, 烟草茎内和叶内均能分离到菌株 (图 2)。

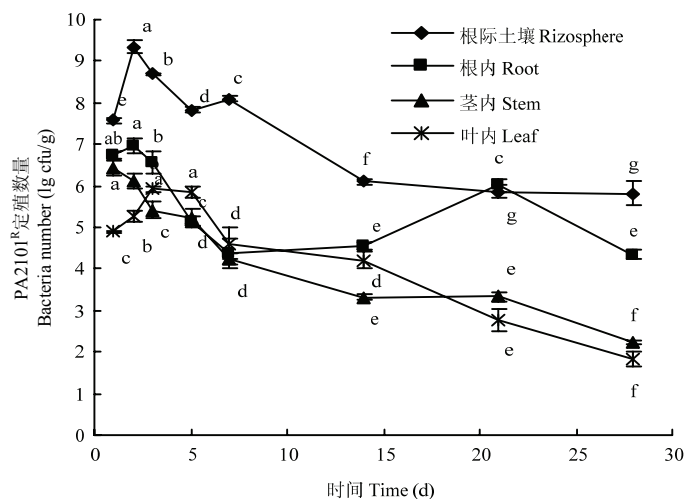


图 1 生防菌株 PA2101^R 的定殖结果

Fig. 1 Colonization of biocontrol bacterium PA2101^R

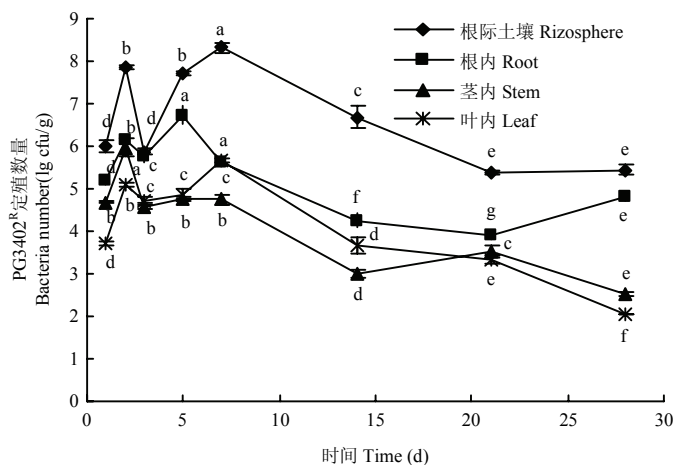


图 2 生防菌株 PG3402^R 的定殖结果

Fig. 2 Colonization of biocontrol bacterium PG3402^R

2.5 菌株鉴定结果

2.5.1 PA2101 鉴定 菌株 PA2101 革兰氏染色阴性, 在 KB 培养基上, 28 °C 培养 48 h 的菌落扁平近圆形, 半透明, 圆心黄色微凸, 边缘浅黄色不规则, 后期菌落颜色变深变暗, 底部有绿色颗粒物形成, 周围有肉眼可见的黄绿色可扩散性物质; 生理生化特征符合铜绿假单胞杆菌的特征 (表 5); 16S rDNA 序列 (GenBank

登录号为 MK607452) 与铜绿假单胞菌 DSM50071 和 ATCC10145 的 16S rDNA 全部或部分序列一致性高达 99.80%，从系统发育分析来看，PA2101 为铜绿假单胞杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* (图 3)。

2.5.2 PG3402 鉴定 菌株 PG3402 革兰氏染色阴性，在 KB 培养基上，28 ℃ 培养 48 h 的菌落凸起圆形，表面光滑湿润，乳黄色半透明，菌落粘稠；生理生化特征符合假单胞杆菌属的特征 (表 5)；16S rDNA (GenBank 登录号为 MK607455) 与格拉纳达假单胞菌 LMG27940 的 16S rDNA 全部序列一致性高达 99.67%，从系统发育分析来看，PG3402 为格拉纳达假单胞杆菌 *Pseudomonas granadensis* (图 3)。

表 5 生防菌株的生理生化特征
Table 5 Physiological and biochemical characteristics of biocontrol bacteria

| 特征 Feature | PA2101 | PG3402 |
|----------------------------|--------|--------|
| 4 ℃ 生长 Growth at 4 ℃ | - | + |
| 41 ℃ 生长 Growth at 41 ℃ | + | - |
| KOH 反应 KOH reaction | + | + |
| 氧化酶 Oxidase | + | + |
| 荧光物质 Fluorescent material | + | + |
| 淀粉水解 Amylolysis | - | - |
| 甲基红 Methyl red | - | - |
| V-P 试验 V-P text | - | - |
| 明胶水解 Gelatin hydrolysis | + | + |
| 硝酸盐还原 Nitrate reduction | + | - |
| 精氨酸双水解 Arginine hydrolysis | + | + |

注：+，阳性；-，阴性。 Note: +, Positive; -, negative.

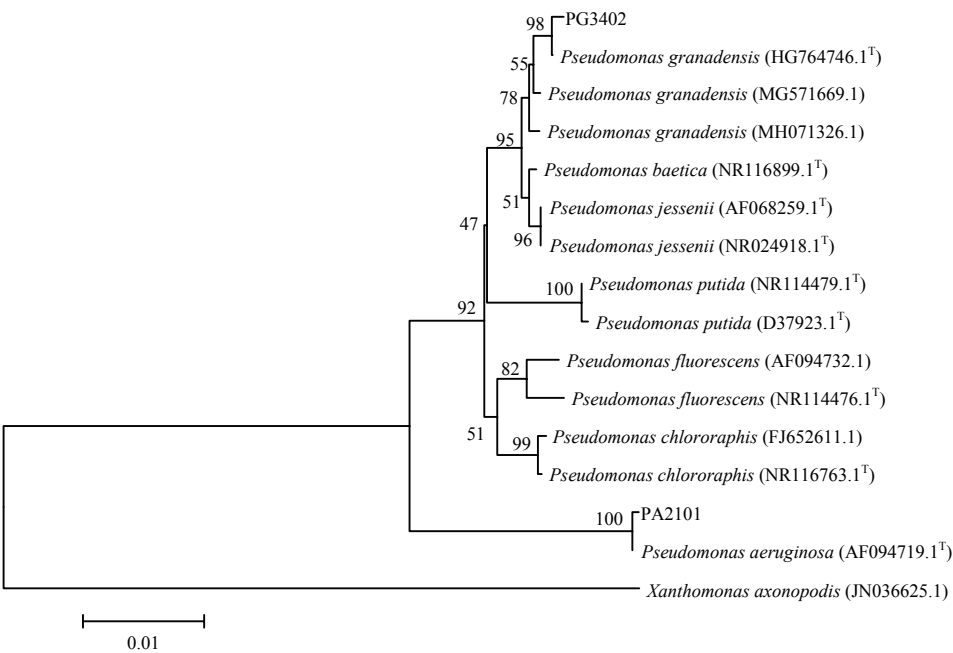


图 3 基于 16S rDNA 构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences

3 讨论

烟草黑胫病和烟草根黑腐病等土传病害制约着烟草的健康生长，严重时造成毁灭性的损失。近年在河南省植烟地区发生严重。随着烟草病害绿色防控技术生产体系的提出，烟草生物防治受到各方面的关注，

有关烟草病害生防菌筛选的研究逐渐增多,成为烟草病害极具发展潜力的防治方法之一^[25,26]。很多研究表明,生防菌对烟草黑胫病和烟草根黑腐病具有一定的防治效果。杨艺炜等^[27]分离一株绿针假单胞菌 XF10,对烟草疫霉有较强的拮抗作用,易龙等^[28]研究发现,芽胞杆菌 T295 对烟草根黑腐病具有较好的防治作用。众所周知,假单胞杆菌属广泛存在于植物根部,其防病和促生功能^[12,29]以及机理^[30]被广泛研究,但促生作用在烟草上的应用较少,因此筛选兼具防病和促生效果的假单胞杆菌,在烟草病害绿色防控中具有更好的开发应用前景。

本研究从 40 份土壤样品中分离筛选出 201 株具有荧光的假单胞杆菌,有 2 株菌株在平板对峙法和含毒介质法中对烟草黑胫病和烟草根黑腐病的病原菌均具有较强的拮抗作用,分别为菌株 PA2101 和 PG3402。依据生理生化特征和 16S rDNA 序列系统发育分析鉴定 PA2101 为铜绿假单胞杆菌,PG3402 为荧光假单胞杆菌谱系^[31]中的格拉纳达假单胞杆菌。铜绿假单胞杆菌 YN201458^[14]在对峙平板中对烟草疫霉的抑菌率为 76.07%,盆栽试验对烟草黑胫病的防效为 41.40%,均明显小于本研究中 PA2101 和 PG3402 对烟草疫霉的抑菌率和烟草黑胫病防效。关于烟草根黑腐病生防菌的研究较少,假单胞杆菌更少,仅 Laville 等^[8]分离到一株荧光假单胞杆菌 CHA0 对根串珠霉有较好的抑制作用;易龙等^[28]研究发现,枯草芽胞杆菌 T295 对烟草根黑腐病的防效较好,但效果低于药剂对照甲基硫菌灵,而本研究中菌株 PA2101 和 PG3402 的防效均高于甲基硫菌灵。由上可知,菌株 PA2101 和 PG3402 对烟草疫霉和根串珠霉的拮抗作用优于其他假单胞杆菌,对烟草黑胫病和烟草根黑腐病的防效优于其他研究中的生防菌,因此,菌株 PA2101 和 PG3402 可以作为单独或同时防治烟草黑胫病和烟草根黑腐病的高效潜力生防菌株。

本研究的盆栽促生试验表明,菌株 PA2101 和 PG3402 能协调改善烟草地上植株的生长和根系发育,作为促生菌在烟草生产上具有良好的应用前景。理想的生防菌不仅要求拮抗和促生能力,还需具备在寄主根围和体内良好的定殖能力。李洪林等^[32]筛选的荧光假单胞杆菌 G20-9 在接种菌液 15 d 时,在烟株根内的定殖数量为 10^4 cfu/g,本试验中菌株 PA2101 和 PG3402 在接种 29 d 时,能在根际土壤和根内稳定定殖,数量为 10^5 cfu/g,比荧光假单胞杆菌 G20-9 的定殖效果好,同时在茎内和叶内也可检测到菌株 PA2101 和 PG3402。菌株 PA2101 和 PG3402 较强的土壤和烟草植株内定殖能力,为其充分发挥防病和促生功能提供了保障。

菌株 PA2101 和 PG3402 能够在烟草上发挥如此强大的生防功能,除了菌株本身具有的生防特性外,还可能与烟草本身有密切关系,Ma 等^[33]发现烟草根系分泌物烟碱、东莨菪碱和十八烷对假单胞杆菌的生长、根定殖能力和对烟草黑胫病等土传病害的防控等有增强作用,因此菌株 PA2101 和 PG3402 的防病以及与烟草互作的机理值得进一步探索。另外,关于烟草防病和促生的生防菌研究较多^[14,34],但很少应用于实际生产中,菌株 PA2101 和 PG340 作为极具潜力的防病促生菌,在田间的应用效果还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 边传红,丁玥琪,赵世民,等. 河南省烟草根黑腐病菌的分子鉴定及致病性分析[J]. 烟草科技, 2017, 50(3): 8-14.
- [2] 孙向阳,苗圃,董昆乐,等. 洛阳市烟草黑胫病与根腐病概述[J]. 现代农业科技, 2017(5): 118-119, 122.
- [3] 汪汉成,李文红,冯勇刚,等. 烟草黑胫病化学防治的历史与现状[J]. 中国烟草学报, 2011, 17(5): 96-102.
- [4] Yuan S, Li M, Fang Z, et al. Biological control of tobacco bacterial wilt using *Trichoderma harzianum* amended bioorganic fertilizer and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae*[J]. Biological Control, 2016, 92: 164-171.
- [5] Han T, You C, Zhang L, et al. Biocontrol potential of antagonist *Bacillus subtilis* Tpb55 against tobacco black shank[J]. BioControl, 2016, 61(2): 195-205.
- [6] Schoina C, Stringlis I A, Pantelides I S, et al. Evaluation of application methods and biocontrol efficacy of *Paenibacillus alvei* strain K-165, against the cotton black root rot pathogen *Thielaviopsis basicola*[J]. Biological Control, 2011, 58(1): 68-73.
- [7] 董国菊,李文英,刘翠平,等. 烟草疫霉拮抗菌株 P-72-10 的鉴定及其拮抗代谢产物初步分析[J]. 植物病理学报, 2012, 42(3): 297-305.
- [8] Laville J, Voisard C, Keel C, et al. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89(5): 1562-1566.
- [9] 彭阁,姜乾坤,谭军,等. 烟草黑胫病拮抗真菌的筛选及活性评价[J]. 中国烟草科学, 2018, 39(1): 77-84.
- [10] 易龙,肖崇刚. 烟草根黑腐病拮抗木霉菌株 TB72 的鉴定及抑菌作用[J]. 西南农业学报, 2016, 29(8): 1889-1893.

- [11] 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.
- [12] Sahu B, Singh J, Shankar G, *et al.* *Pseudomonas fluorescens* PGPR bacteria as well as biocontrol agent: A review[J]. *International Journal of Chemical Studies*, 2018, 6(2): 1-7.
- [13] David B V, Chandrasehar G, Selvam P N. *Pseudomonas fluorescens*: a plant-growth-promoting rhizobacterium (PGPR) with potential role in biocontrol of pests of crops[M]//Crop Improvement Through Microbial Biotechnology. Elsevier, 2018, 221-243.
- [14] 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): 48-53.
- [15] Sebihi F Z, Benguedouar A, Benhizia Y, *et al.* Evaluation of multi-trait plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* isolated from Constantine wheat rhizosphere soil (Algeria) and screening there antifungal activity against two species of *Fusarium*[J]. *Advances in Environmental Biology*, 2016, 10(5): 102-115.
- [16] 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.
- [17] 周向平, 杨全柳, 王锡春, 等. 烟草品种(系)的烟草黑胫病抗性鉴定[J]. *作物研究*, 2013, 7(6): 637-639.
- [18] 刘欢欢, 焦伟, 乔保明, 等. 一种利用铁离子螯合剂恢复丁香假单胞杆菌菌落荧光的方法[J]. *中国农业科技导报*, 2012, 14(4): 142-147.
- [19] 全鑫, 薛保国, 杨丽荣, 等. 生防菌株 YB-81 的鉴定及其对番茄灰霉病的防效[J]. *植物保护*, 2010, 36(5): 57-60.
- [20] 夏艳, 徐茜, 董瑜, 等. 烟草青枯病菌拮抗菌的筛选、鉴定及生防特性研究[J]. *中国生态农业学报*, 2014, 22(2): 201-207.
- [21] 全国烟草标准化技术委员会. 烟草病虫害分级及调查方法: GB/T 23222-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [22] 陈泽斌, 夏振远, 雷丽萍, 等. 烟草黑胫病拮抗内生细菌的分离、鉴定及防效测定[J]. *中国烟草学报*, 2011, 17(6): 94-99.
- [23] 全国烟草标准化技术委员会农业分技术委员会. 烟草农艺性状调查测量方法: YC/T142-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [24] 蔡学清, 何红, 胡方平. 双标记法测定枯草芽孢杆菌 BS-2 和 BS-1 在辣椒体内的定殖动态[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2003, 32(1): 41-45.
- [25] 夏振远, 祝明亮, 杨树军, 等. 烟草生物农药的研制及应用进展[J]. *云南农业大学学报(自然科学版)*, 2004, 19(1): 110-115.
- [26] 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]. *中国生物防治学报*, 2004, 20(1): 76-78.
- [27] 杨艺炜. 绿针假单胞菌 XF10 对烟草黑胫病菌的拮抗作用研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] Subramanian J, Satyan K. Isolation and selection of fluorescent pseudomonads based on multiple plant growth promotion traits and siderotyping[J]. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 2014, 74(3): 319-325.
- [31] Pascual J, Garcia-Lopez M, Bills G F, *et al.* *Pseudomonas granadensis* sp. nov., a new bacterial species isolated from the Tejada, Almijara and Alhama Natural Park, Granada, Spain[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65: 625-632.
- [32] 李洪林, 万秀清, 颜培强, 等. 荧光假单胞杆菌 G20-9 拮抗烟草赤星病菌研究[J]. *烟草科技*, 2008(4): 56-59.
- [33] Ma L, Zheng S C, Zhang T K, *et al.* Effect of nicotine from tobacco root exudates on chemotaxis, growth, biocontrol efficiency, and colonization by *Pseudomonas aeruginosa* NXHG29[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2018, 111(7): 1237-1257.
- [34] 徐同伟, 周建云, 祖庆学, 等. 两株烟草黑胫病拮抗菌的筛选、鉴定和促防病潜力评价[J]. *中国烟草科学*, 2017, 38(3): 44-50.