

广西岩溶区烟草黑胫病拮抗细菌 的筛选鉴定及其抗病机理

黄宁珍, 区 婵, 何金祥*, 赵志国, 王新桂,
郭伦发, 周 浩, 龚庆芳

(广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006)
中 国 科 学 院

摘 要: 从广西岩溶区靖西县优质烟叶生产区分离烟草黑胫病病原及土壤细菌, 通过拮抗试验、离体及田间抗病能力测试等方法筛选拮抗细菌; 利用形态观察、生理生化测试和 16S rDNA 序列分析三种方法相结合, 对抗病效果良好的菌株进行分类鉴定; 并对拮抗菌抗黑胫病机理进行初步研究。结果表明: 从 8 份土壤样品中, 共分离出土壤细菌 340 株, 获得抗黑胫病效果良好的拮抗细菌 3 株, 编号为 8-23、6-70 和 13, 它们分别属芽孢杆菌属、溶菌杆菌属和假单胞杆菌属细菌; 三个拮抗细菌的抗黑胫病机理是通过胞外分泌一些可溶解病原菌细胞壁的酶或其它化学物质, 破坏菌丝的细胞壁和细胞膜等生理结构, 使细胞质渗漏、凝集, 从而导致病原死亡; 其中, 菌株 8-23 和 13 的抗病活性物质主要为蛋白质类化合物; 而菌株 6-70 除蛋白质外, 还有其它一些非蛋白因子起作用。

关键词: 黑胫病; 拮抗细菌; 筛选鉴定; 抗病机理

中图分类号: Q944.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)06-0869-07

Isolation and identification of antagonistic bacteria and their mechanisms against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in karst area of Guangxi

HUANG Ning-Zhen, OU Chan, HE Jin-Xiang*, ZHAO Zhi-Guo,
WANG Xin-Gui, GUO Lun-Fa, ZHOU Hao, GONG Qing-Fang

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

Abstract: *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and soil bacteria were isolated from Jingxi county, a karst area in southwest of Guangxi province where produced high grade tobacco. Antagonistic bacteria to *P. parasitica* var. *nicotianae* were screened out according to their antagonistic action and anti-disease *in vitro* and field experiment. The well antagonistic effect strains were identified by combining the results of morphological observation, physiological and biochemical characteristics analyse, and 16S rDNA sequence test. And pilot study of the mechanism of anti-disease of *P. parasitica* var. *nicotianae* was carried out at the same time. Results showed that a total of 340 strains of bacteria were isolated from 8 samples of soil. And three strains with well antagonistic effect which marked as 8-23, 6-70, and 13 were screened out. They were the bacteria belonged to *Bacillus*, *Lysobacter*, and *Pseudomonas* respectively. The mechanism of the three strains against *P. parasitica*

收稿日期: 2010-07-21 修回日期: 2010-11-12

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCXZ-YW-N-48-05)[Supported by Key Project of Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Science(KSCXZ-YW-N-48-05)]

作者简介: 黄宁珍(1968-), 女, 广西大化人, 副研究员, 主要从事植物生理及生物防治研究工作, (E-mail) hnzhen68@yahoo.com.cn.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: hejinxiang@gxib.cn)

var. *nicotianae* was to excrete some protein enzymes or other substance which could dissolve the cell wall or membrane of pathogeny and killed them finally. The active substance of strain 8-23 and 13 were mainly protein. But for the strain 6-70, there were some other factors to work besides the protein compounds.

Key words: *P. parasitica* var. *nicotianae*; antagonistic bacteria; isolation and identification; anti-pathogeny mechanism

广西是我国烟草栽培基地之一,种植区主要分布在桂西岩溶区。由于烟草栽培面积的不断扩大和长期在同一地区种植等原因,使这些地区病虫害危害日益严重,特别是由烟草疫霉(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)引起的烟草黑胫病(Tobacco black shank),已成为影响当地烟草种植业持续发展的主要病害(陈瑞泰等,1997)。化学农药在烟草黑胫病防治上虽可发挥重要作用,但大量和持续性施用不仅严重污染生态环境,而且造成病原菌耐药和抗药性,使病害的发生频率、危害程度和防治难度加大。而生物防治具有无污染、无公害和长效性等优点,在烟草黑胫病的防治中将发挥重要作用。

筛选和鉴定高效拮抗微生物是生物防治的重要组成部分。生防微生物包括细菌、真菌和放线菌三大类。一些细菌生防菌,由于能形成芽孢,可以耐受高温、高酸碱度和厌氧等逆境,与真菌和放线菌生防菌剂相比,更受人们的关注。目前以细菌作为烟草黑胫病生防菌的研究,国内外已有相应报道。早期的研究发现,芽孢杆菌(*Bacillus*)和假单胞杆菌(*Pseudomonas*)可通过产生抗菌素使烟草黑胫病菌丝溶解,从而达到抗病效果(Broadbent, 1971);近年来,我国云南、浙江、湖北等地的研究人员也先后从土壤中筛选获得一系列烟草黑胫病拮抗细菌,田间小试对烟草黑胫病具有一定的防治效果(方敦煌等, 2001;王远山等, 2002;张慧丽, 2005;杨树军, 2009)。然而,这些工作大多还处在实验室和小试阶段,离大规模生产和推广应用还有相当大的距离,相关技术有待于进一步完善和提高。另一方面,由于烟草黑胫病病原有地域特异性,不同地区的病原属于不同的生理小种,由此可能导致某一生防菌剂在不同发病地区防治效果不同;加上农药施用和环境压力可能导致黑胫病病原不断发生变异,从而使现有的化学农药和生防菌剂失效。因此,对烟草黑胫病拮抗细菌不断地进行筛选鉴定及其抗病机理研究,有较大的理论和实际意义。本研究从广西岩溶区优质烟叶生产区靖西县采集烟草黑胫病发病植株和健康株根际土壤,分离黑胫病病原及土壤细菌,通过拮抗试验、离体和盆栽抗病能力测试筛选拮抗菌株,并对抗

病效果较好的拮抗菌进行菌种鉴定和抗病机理研究,为广西岩溶区烟草黑胫病生防菌剂的研制和开发利用提供理论和技术基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

黑胫病病株:从广西靖西县烟草种植地采集,用以分离当地的黑胫病病原。土壤样品:从广西靖西县烟草种植区高发病地块烟草健株的根际采集,共采集 8 份,用以分离土壤细菌。

1.2 培养基配制、烟草黑胫病病原及土壤细菌的分离及纯化

燕麦培养基(OA)、牛肉膏蛋白胨培养基(NA)和马铃薯麦芽糖培养基(PM)三种培养基的配制,以及烟草黑胫病病原及土壤细菌的分离及纯化均参照区婵(2010)的方法。通过形态观察和 ITS 序列分析鉴定烟草黑胫病病原,并选用云烟 85 为供试品种,采用王跃强(2006)的方法验证病原菌的致病力;病原确认后保存于冰箱中备用。土壤细菌采用平板稀释法在 NA 培养基上进行分离和纯化培养,根据培养物菌落形态差异,标记并收集不同的菌株,在 NA 培养基中保存备用。

1.3 烟草黑胫病拮抗细菌的筛选及其对黑胫病的防治效果

(1)拮抗细菌筛选:分别以 OA 和 NA 为培养基,采用纸片法和生长速率法(区婵, 2010)将土壤细菌与烟草黑胫病进行对抗试验,根据抑菌圈和抑菌率的大小进行初筛和复筛,对拮抗效果较好的菌株,在 NA 培养基上培养备用。(2)拮抗菌防病效果:黑胫病及拮抗菌悬浮液的制备分别参照刘廷利(2007)和区婵(2010)的方法。准备苗龄 50 d、4 片真叶以上健壮一致的烟草苗。每株根施拮抗菌悬浮液 50 mL/7 d,共施 2 次;之后,再根施黑胫病菌悬浮液 5 mL/株。共设 3 个不同处理:①拮抗菌处理:根施拮抗菌悬浮液 2 次之后,再接种黑胫病病原;②感病对照:仅接种黑胫病病原;③农药对照:根施烟草黑胫病病原后,再用 20 mL 甲霜灵锰锌 600 倍液浇根;

每个处理 6~10 株。接种病原后,每隔天观测记录各处理的发病情况,黑胫病病情按照“中国烟草行业标准(YC/T 39-1996)”进行分级,计算病情指数。

1.4 烟草黑胫病拮抗细菌的鉴定

综合平板拮抗实验与盆栽防效结果,对拮抗和防病效果较好的拮抗细菌,通过形态观察、生理生化测试和 16S rDNA 序列分析对菌株进行种属鉴定:(1)形态观测:包括菌落形态、革兰氏染色、有无芽孢和鞭毛数量等(陈金春,2005;赵斌,2005)。(2)生理生化特性测试:包括糖(醇)发酵、柠檬酸盐利用、丙二酸盐利用、过氧化氢酶反应、明胶液化、淀粉水解、甲基红反应(M.R 试验)、伏一普试验(V.P. 试验)和耐盐生长等(方中达,1998;陈金春,2005)。(3)分子鉴定:拮抗菌基因组 DNA 用微波炉法(张颖等,2004)提取;16S rDNA 引物扩增产物测序由上海生工工程有限公司完成;测序结果用 DNAMAN 和 BioEdit 软件进行校对、剪切和拼接后,通过 Blast 搜索在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的 GenBank 中进行 ITS 序列比对,并用 Clustal X2.0 和 MEGA4x1 软件进行 UPGMA 分析生成系统发育树,确定菌株的分类地位。

1.5 烟草黑胫病拮抗细菌的抗病机理初步研究

将拮抗细菌在 PM 培养液中培养,获得的培养物经离心和无菌过滤后,得到拮抗细菌培养滤液。将培养了 5 d 的烟草黑胫病菌丝接种到拮抗细菌培养滤液中,以无菌水为对照,30 ℃ 培养,每隔 12 h 镜检观察黑胫病菌丝形态。另取上述拮抗细菌培养滤液 500 μ L,加入 5 μ L、1% 的蛋白酶 K 溶液,37 ℃ 水浴 3 h 后,取 100 μ L 均匀涂抹于 OA 平板培养基表面,以不经蛋白酶 K 处理的培养滤液为参照,在平板中心接种烟草黑胫病菌丝块(直径 5 mm),以无菌水为对照,28 ℃ 培养。重复 3 次,检测抑菌率。

1.6 数据收集和计算

抑菌率和病情指数的计算均参照区蝉(2010)的方法。

2 结果与分析

2.1 烟草黑胫病病原菌分离、纯化及鉴定

通过分离和纯化,获得烟草黑胫病靖西菌株。观察其菌落、菌丝、孢子囊,并进行致病性和 ITS 序列分析测定。结果表明,在燕麦(OA)培养基上,其菌落边缘明显,菌丝白色、纤细。显微镜下观察,菌

丝无隔,分枝少;孢子囊顶生,形状多为椭圆形、梨形、少数圆形,孢子囊大小 15~50 μ m $\times$ 12~51 μ m,顶端常有 1 个明显的半球形乳突,少数可观测到 2 个乳突;孢子囊不易脱落(图 1)。分子鉴定结果显示,其 ITS 序列与烟草疫霉(*P. parasitica* var. *nicotianae*)有 99% 的同源性。

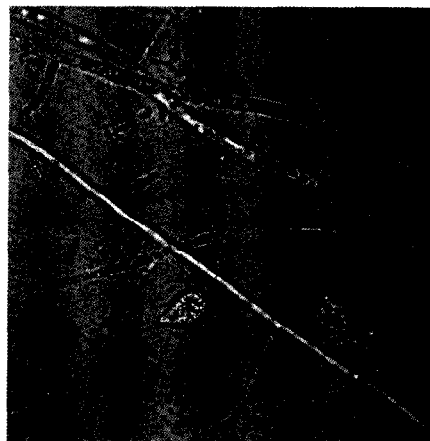


图 1 显微镜下烟草黑胫病原形态(600 倍)

Fig.1 Shape of *P. parasitica* var. *nicotianae* observed through microscope ($\times 600$)

A. 菌丝 mycelia; B. 孢子囊 sporangia.

离体烟叶接种黑胫病病原后,第一天形成棕色病斑,第三天蔓延至整叶的 2/3 以上,平均病情指数为 75.00。将病菌悬浮液注入烟草植株内,在高温、高湿条件下,接种第二天,针孔周围出现明显黑斑,七天后烟苗茎部的 3/4 以上变黑,叶干枯,所有接种病原的烟草均表现出典型的烟草黑胫病症状,平均病情指数 83.33。根据朱贤朝(2002)对烟草黑胫病病原形态特征、致病性的描述,结合分子鉴定结果,确定所分离到菌株为寄生疫霉烟草变种。

2.2 烟草黑胫病拮抗菌的筛选

对 8 个土壤样品进行微生物分离,共收集到细菌 340 株。采用平板对峙培养法进行初筛,依据病原的生长情况、抑菌圈大小等,初步筛选出对烟草黑胫病病原菌具有拮抗效果的细菌 82 株,占总数的 24.12%;抑菌圈半径 >5 mm 有 16 株。

对在初筛中抑菌圈半径大于 >5 mm 的 16 株土壤拮抗细菌,采用生长速率法进行复筛。结果表明,在供试的 16 个土壤拮抗细菌中,对烟草黑胫病病原生长抑制率在 65% 以上的拮抗细菌有 8 株,综合菌株的抑菌率及培养难易程度等参数,以菌株 6-70、13-8-23 的整体效果较好,因此选择这三个菌株

进行进一步实验。

2.3 三株拮抗细菌对烟草黑胫病的防治效果

根据上述初筛和复筛结果,选择对烟草黑胫病病原拮抗效果较好的菌株 8-23、6-70 和 13,通过盆栽试验,测试其对烟草黑胫病的防治效果。结果发现,拮抗细菌 8-23、6-70 和 13 对盆栽烟草黑胫病的防治效果分别为 81.25%、81.25%和 85.94%,高于或等于甲霜灵 600 倍液的防效(表 1)。

表 1 三株拮抗细菌对盆栽烟草黑胫病的防治情况

Table 1 Effect of prevention tobacco black shank in pot experiment by three strains of antagonistic bacteria

处理 Treatment	黑胫病发病率 Incidence of Tobacco Black Shank(%)	病情指数 Disease index	防治效果 Control effect (%)
CK	100.00	41.67	0.00
菌株 8-23	33.33	8.33	81.25
菌株 6-70	33.33	8.33	81.25
菌株 13	33.33	6.25	85.94
甲霜灵 600 倍液	33.33	8.33	81.25

2.4 三株拮抗细菌的鉴定

2.4.1 三株拮抗细菌的形态及生理生化特征 对拮抗细菌的菌落和细胞形态、芽孢和鞭毛、以及革兰氏染色等进行观测,结果显示:(1)菌株 8-23:为革兰氏阳性细菌;菌落扁平,表面黏液状,呈土黄色不透明状,边缘不明显,生长物黏稠;细胞杆状,有芽孢,周生鞭毛,游动性强。(2)菌株 6-70:为革兰氏阴性细菌;菌落扁平,表面光滑,呈黄色不透明状,边缘明显,生长物黏稠;细胞杆状,无芽孢,一端生 1~3 根鞭毛,游动性差。(3)菌株 13:为革兰氏阴性细菌;菌落露滴状,表面有皱纹,呈乳白色不透明状,边缘明显,生长物黏稠;细胞杆状,无芽孢,一端生 1~3 根鞭毛,游动性差(表 2)。

对拮抗细菌进行生理生化测试,结果显示:菌株 8-23 能利用阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、麦芽糖、D-果糖、山梨醇、甘露醇和丙二酸盐,产生淀粉水解酶和过氧化氢酶,耐盐,能液化明胶;不能利用肌醇和柠檬酸盐,不产生酸性、非酸性或中性末端产物。菌株 6-70 能利用麦芽糖和 D-果糖,产生淀粉水解酶和过氧化氢酶,能液化明胶;不能利用阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、肌醇、山梨醇、甘露醇、柠檬酸盐和丙二酸盐,不耐盐,不产生酸性、非酸性或中性末端产物。菌株 13 能利用阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、麦芽糖、D-果糖、山梨醇、甘露醇、柠檬酸盐和丙二酸盐,产过氧化氢酶,能液化明胶;不能利用肌醇,无淀粉水解酶,不耐

盐,不产生酸性、非酸性或中性末端产物(表 2)。

综合上述形态及生理生化特性,依据《伯杰氏细菌鉴定手册》(1984)初步确定菌株 8-23 与芽孢杆菌属细菌相近。而菌株 6-70 和 13 两个菌株的分类地位还需要通过 16S rDNA 序列分析才能确定。

表 2 三株拮抗细菌的形态特征和生理生化特性

Table 2 Morphological, physiological and biochemical characteristics of three strains of antagonistic bacteria

观测项目 Observation items	菌株编号 Strain ID		
	8-23	6-70	13
形态特征			
鞭毛	周生	一端 1 根	一端 1~3 根
运动性	+	—	—
细胞	杆状	杆状	杆状
芽孢	+	—	—
革兰氏染色	+	—	—
菌落外形	扁平	扁平	露滴状
菌落表面	黏液状	光滑	皱纹
菌落边缘	不明显	明显	明显
菌落颜色	土黄色	黄色	乳白色
菌落质地	黏稠,不透明	黏稠,不透明	黏稠,不透明
生理生化特性			
阿拉伯糖	+	—	+
木糖	+	—	+
葡萄糖	+	—	+
麦芽糖	+	+	+
D-果糖	+	+	+
肌醇	—	—	—
山梨醇	+	—	+
甘露醇	+	—	+
柠檬酸盐	—	—	+
丙二酸盐	+	—	+
淀粉水解酶	+	+	—
过氧化氢酶	+	+	+
耐盐性	+	—	—
M. R 反应	—	—	—
V-P 反应	—	—	—
明胶液化	+	+	+

注:表中“+”表示阳性、能利用或有;“—”表示阴性、不能利用或无

2.4.2 三株拮抗细菌的分子鉴定 以菌株 8-23、13、6-70 粗提 DNA 为模板,用 16S rDNA 引物进行 PCR 扩增,将扩增产物回收、测序,并对测序结果进行校对、剪切和拼接后获得相应序列;将序列与 GenBank 中相关数据进行相似性分析,并建立系统发育树。

拮抗菌 8-23 获得全长 1 408 bp 序列,将该序列与 GenBank 中相关数据进行相似性分析,结果表明,在 GenBank 中与之关系相近的前 100 个序列都是 *Bacillus* 细菌,同源性在 98% 以上。以同源性为

基础,在前 50 个序列中选取关系接近的 5 个不同种的 16S rDNA 序列,建立系统发育树(图 2),结果发现,在同源性较高的细菌中,8-23 与枯草杆菌 *Bacillus subtilis* (AF0907) 处于同一分支,同源率 99%。说明该菌应属芽孢杆菌属细菌,且与枯草杆菌的亲缘关系最接近。

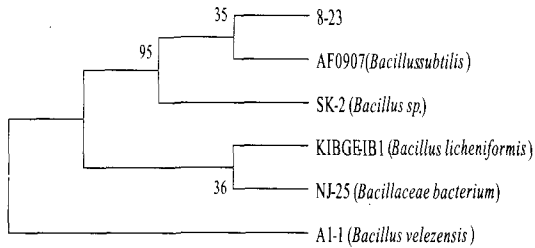


图 2 菌株 8-23 的 16S rDNA 系统发育树图
Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain 8-23

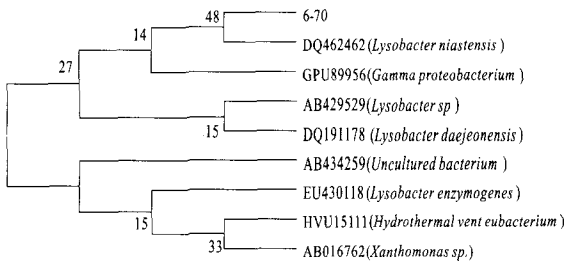


图 3 菌株 6-70 的 16S rDNA 系统发育树图
Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain 6-70

拮抗菌 6-70 获得全长 1 396 bp 的序列,将该序列与 GenBank 中相关数据进行相似性分析,结果表明,在关系相近的前 100 个序列中,46 个是 *Lysobacter* 菌株,同源性在 97% 以上。以 16S rDNA 同源性为基础,在前 50 个序列中选取亲缘关系接近的 8 个不同种的 16S rDNA 序列,建立系统发育树(图 3),结果发现,在同源性较高的细菌中,6-70 与 *Lysobacter niastensis* 处于同一分支,同源性为 97%。说明该菌属溶杆菌属的细菌,且与 *Lysobacter niastensis* 亲缘关系较接近。

拮抗菌 13 获得全长 1 397 bp 的序列。将序列与 GenBank 中的相关数据进行相似性分析,结果表明,在关系相近的前 100 个序列中,54 个是 *Pseudomonas*、44 个是 Uncultured *Pseudomonas* 菌株,同源性均在 98% 以上。以 16S rDNA 同源性为基础,在前 54 个同属序列中,选取其中亲缘关系接近的

12 个不同种的 16S rDNA 序列,构建拮抗菌 13 的系统发育树(图 4),结果发现,在同源性较高的菌株中,菌株 13 与假单胞杆菌 *Pseudomonas* sp. (EU221415) 处于同一分支,同源率 99%,说明两者之间亲缘关系最接近。

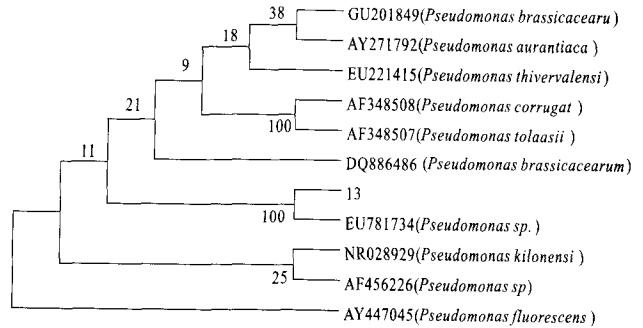


图 4 菌株 13 的 16S rDNA 系统发育树图
Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain 13

2.5 三株拮抗细菌抗烟草黑胫病机理

分别将拮抗细菌 8-23、6-70 和 13 的培养滤液处理烟草黑胫病菌丝,48 h 后观察发现,经三株拮抗细菌处理过的黑胫病菌丝都出现了形态异常,如菌丝局部膨大、扭曲,细胞壁溶解,细胞质渗漏、凝集、分布不均匀等;其中,以菌株 6-70 和 13 的效果尤为明显;而对照菌丝形态正常,细胞壁完整,细胞质、壁边界清晰,区域和组织轮廓明显。说明三个菌株的抗烟草黑胫病机理可能是通过产生某些溶解病原细胞壁的酶来完成的(图 5)。

用蛋白酶 K 处理拮抗菌培养滤液后,其对烟草黑胫病原的抑制能力明显低于与不经蛋白酶 K 处理的阳性参照。各菌株抗病能力降低的幅度分别为:菌株 13 降低 100%,菌株 8-23 降低 68.58%,6-70 降低 34.90%(表 3)。这一结果说明,菌株 8-23 和 13 的抗黑胫病活性物质可能主要为蛋白质类化合物;菌株 6-70 抗病活性物质除了蛋白质外,还有其它一些非蛋白因子起作用。

3 讨论

烟草黑胫病是一种土传病害,是世界烟草生产中最具毁灭性的病害之一。生物防治以其高效、低毒和长效性等特点,一直以来是人们研究的热点。而拮抗微生物的筛选、鉴定和抗病机理研究是生物防治研究的中心和重点。



图5 烟草黑胫病病原拮抗细菌 8-23、6-70 和 13 滤液处理 48 h 后菌丝形态(600 倍)

Fig. 5 Mycelia shape of *P. parasitica* var. *nicotianae* after treatment with culture filtrates of strains 8-23, 6-70 and 13 for 48 h

表3 菌株 8-23、6-70 和 13 培养滤液经

蛋白酶 K 处理后的抗黑胫病活性

Table 3 Effect of against *P. parasitica* var. *nicotianae* of culture filtrates of strain 8-23, 6-70 and 13 treated with proteinase K

菌株编号 Strain ID	对黑胫病菌的抑制率(%) Effect of against <i>P. parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>		
	未经蛋白酶 K 处理	蛋白酶 K 处理	下降幅度
8-23	94.44	29.67	68.58
6-70	94.44	61.48	34.90
13	94.44	0	100

其中,芽孢杆菌是研究最多、也是最重要一类的生防细菌,它们能产生耐热抗逆芽孢,有易繁殖、生长速度快、适应性强和防治效果好等特点,有利于生防农药的生产和拮抗菌在环境中存活和定殖(胡朋等,2008);该属中枯草芽孢杆菌是目前研究最多的一种有益土壤细菌,主要通过营养和空间位点竞争、分泌抗菌物质和溶菌作用等方面来达到抗病目的(黄海婵等,2005),在农业上可用于防治芒果软腐病、辣椒炭疽病、苹果轮纹病、水稻纹枯病、水稻白叶枯病和一些镰刀菌引起的病害(孔建等,1998;刘永锋,2006)。本文所分离到的几个拮抗细菌中,菌株 8-23 属芽孢杆菌属细菌,虽与枯草杆菌亲缘关系较近,同源率达到 99%;但枯草芽孢杆菌菌落表面干燥,而 8-23 菌落表面为黏稠的黏液状,形态上存在明显差别。因此,菌株 8-23 可能是与枯草芽孢杆菌亲缘关系较接近的另一个种。此外,该菌株能产生胞外抗菌活性物质,这些物质主要为蛋白质类化合物。

假单胞杆菌则是另一类比较重要的生防细菌,它们能够在植物根围土壤中大量繁殖,不仅对病害有抑制作用,且能促进植物生长。据报道,该属的荧光假单胞杆菌能防治烟草黑胫病(顾金刚等,2004)

和赤星病(李洪林等,2008)。目前,已对该属某些菌株的抑菌物质(李晶等,2008)进行了初步研究,发现其生防活性物质除了蛋白酶外,还包括氢氰酸、酚类、苯胺基甲基乙酸等。本文分离的菌株 13 的形态和生理生化等特征均符合《伯杰氏细菌鉴定手册》(1984)及《中国农业百科全书·植物病理学卷》(1996)对假单胞杆菌属相关特征的描述,其 16S rDNA 序列信息分析结果表明,该菌与 *Pseudomonas* sp. 亲缘关系较近,同源性达 99%;其胞外抗菌物质除了蛋白质外,还有一大部分为其它类型化合物,与上述所报道的假单胞杆菌属的抗病物质类型相符合。因此,菌株 13 可能与 *Pseudomonas* sp. 属同一个种。

溶杆菌属则是近 20 年才发现和命名的一类新型生防细菌(Monica 等,2001),由于其中一些菌株具有富产胞外酶的特性,分泌能够溶解病原菌细胞壁的几丁质酶和 β -1,3 葡聚糖酶,以及溶解土壤细菌的 α -水解蛋白酶等酶类;初步的研究表明,该属细菌对水稻纹枯病、辣椒疫病、瓜果腐霉、油菜菌核病、棉花枯萎病和黄萎病、茄根腐病、番茄青枯病、甘蓝黑腐病等重要土传病害有较强拮抗作用,在植物病害生物防治中有较好的应用潜力(杜华等,2004;于淑池等,2004;朱慧,2007)。本文中分离的菌株 6-70,其 16S rDNA 序列信息表明它应属于溶杆菌属细菌,与 *L. niastensis* 亲缘关系较近;其菌落黄色、菌体杆状等性状与 Weon 等(2007)报道的 *Lyso bacter niastensis* 形态相似;但其端生 1 根鞭毛,与姜英华(2006)报道的溶杆菌属细菌无鞭毛有出入,所以,菌株 6-70 确切的分类地位还需要更多的信息加以核定。另外,我们研究发现,其胞外抗病活性物质主要为蛋白质类化合物,而且这些抗病活性蛋白对温度十分敏感。

土壤微生物是筛选生防菌的重要资源,本研究分离到三个烟草黑胫病拮抗细菌均有比较好的抗病效果,其中菌株 8-23 和 6-70 两个菌株的分类特征、胞外抗菌活性物质和抗病机理与目前已报道的相关生防菌株有相似之处,但又有所不同。因此,本研究结果丰富了同领域的研究内容,为同类研究提供重要参考和补充,同时,也为广西岩溶区烟草黑胫病生防菌剂的研制提供理论和技术基础。

参考文献:

- 中国烟草总公司青州烟草研究所. 1996. YC/T 39-1996 烟草病害分级及调查方法(行业标准)[R]. 北京:国家烟草专卖局方中达. 1998. 植病研究方法(第三版)[M]. 北京:中国农业出版社:203-211
- 区婵. 2010. 广西岩溶地区烟草黑胫病拮抗细菌的筛选与特性研究[D]. 广西师范大学硕士学位论文:12-15, 23-25, 43-44
- 王跃强. 2006. 烟草黑胫病菌(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)拮抗内生细菌的筛选与应用研究[D]. 湖南农业大学硕士学位论文:12-13
- 朱慧. 2007. 产酶溶杆菌 OH11 菌株生防相关基因的克隆与表达[D]. 南京农业大学硕士学位论文:8-10
- 朱朝贤. 2002. 中国烟草病害[M]. 北京:中国农业出版社
- 刘廷利. 2007. 重庆地区烟草黑胫病致病性分化及小种鉴定[D]. 西南大学硕士学位论文:20
- 刘永锋. 2006. 枯草芽孢杆菌 Bs-916 胞外抗菌蛋白质的纯化及其鉴定[D]. 南京农业大学博士学位论文:2-6
- 陈金春, 陈国强. 2005. 微生物学实验指导[M]. 北京:清华大学出版社:31-35, 60-6
- 陈瑞泰, 朱贤朝, 王智发, 等. 1997. 我国 16 个主产烟省(区)烟草侵染性病害调研报告[J]. 中国烟草科学, 4:1-7
- 姜英华. 2006. 一种新型生防菌菌株 OH11 的鉴定和生防效果研究[D]. 南京农业大学硕士学位论文:39-40
- 张慧丽. 2005. 烟草黑胫病拮抗细菌的分离与特性研究[D]. 浙江大学硕士学位论文:28-29
- 赵斌, 何绍江. 2005. 微生物学实验(M). 北京:科学出版社:38-44
- 杨合同. 1996. 中国农业百科全书·植物病理学卷[M]. 北京:农业出版社:242-244
- R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯. 1984. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京:科学出版社:729-733
- Broadbent P. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soil[J]. *Australian J Biological Sci*, 24:925-944
- Du H(杜华), Wang L(王玲), Sun BJ(孙炳剑), et al. 2004. Research and development progress in biological control agents against plant disease (防治植物病害的生物农药研究开发进展)[J]. *J Henan Agric Sci*(河南农业科学), 9:39-42
- Fang DH(方敦煌), Gu JG(顾金刚), Li JT(李江涛), et al. 2001. Screen for antagonistic rhizobacteria of *Phytophthora nicotianae* on tobacco (烟草黑胫病菌的拮抗根际细菌的筛选)[J]. *J Yunnan Agric Univ*(云南农业大学学报), 16(2):93-97
- Gu JG(顾金刚), Fang DH(方敦煌), Li FD(李天飞), et al. 2004. Mechanisms of *Pseudomonas fluorescens* RB-42 and RB-89 in biocontrol of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (两株荧光假单胞杆菌菌株对烟草黑胫病病原菌的抑制作用)[J]. *Chin J Biological Control*(中国生物防治), 20(1):76-78
- Hu P(胡朋), Shen L(申琳), Fan B(范蓓), et al. 2008. Isolation and identification of antagonistic bacteria against *Botrytis cinerea* (番茄灰霉病拮抗细菌 *Bacillus*-1 的筛选和鉴定)[J]. *Food Sci*(食品科学), 29(6):276-279
- Huang HC(黄海婵), Qiu JP(裘娟萍). 2005. Review on plant disease biological control by using *Bacillus subtilis* (枯草芽孢杆菌防治植物病害的研究进展)[J]. *Zhejiang Agric Sci*(浙江农业科学), 3:213-215
- Kong J(孔建), Zhao BG(赵白鸽), Wang WX(王文夕), et al. 1998. Survey on the antifungal mechanism of *Bacillus subtilis* Cohen to *Fusarium oxysporum* under the microscope (枯草芽孢杆菌抗菌物质对镰刀菌抑制机理的镜下研究)[J]. *Acta Phytopathol Sin*(植物病理学报), 28(4):337-340
- Li HL(李洪林), Wang XQ(王秀清), Yian PQ(颜培强), et al. 2008. Antagonistic action of *Pseudomonas fluorescens* strain G20-9 to *Alternaria alternata* Keissler (荧光假单胞杆菌 G20-9 拮抗烟草赤星病菌研究)[J]. *Tobacco Sci Tech*(烟草科技), 4:56-59
- Li J(李晶), An DR(安德荣), Li AR(李爱荣), et al. 2008. Isolation, purification, and structural characterization of antibiotic substance from *Pseudomonas fluorescens* Ab III 745-6 (荧光假单胞杆菌 Ab III 745-6 抑菌物质分离纯化和结构鉴定)[J]. *J Microbiology*(微生物学杂志), 28(2):11-14
- Monica LE, Elizabeth ADJ, William EBJ, et al. 2001. Viability and stability of biological control agents on cotton and snap bean seeds[J]. *Mandg Sci*, 57:695-706
- Wang YS(王远山), Wang P(王平), Hu ZJ(胡正嘉). 2002. Screening of *Rhizobacteria* antagonistic to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, pathogen of disease of tobacco black shank (绿针假单胞菌 PL9 菌株对烟草疫霉的拮抗作用研究)[J]. *J Huazhong Agric*(华中农业大学学报), 21(3):248-251
- Weon HY, Kim BY, Kim MK, et al. 2007. *Lysobacter niabensis* sp. nov. and *L. niastensis* sp. nov., isolated from greenhouse soils in Korea[J]. *International J Systematic Evolutionary Microbiology*, 57:578-557
- Yang SJ(杨树军). 2009. Study on screening and control effect bio-controlling strain of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (烟草黑胫病生防菌筛选及防效初探)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), 25(2):222-225
- Yu SC(于淑池), Zhang LP(张利平), Wang LA(王立安). 2004. A procedure of research on the antagonistic bacterium as a means of biocontrol (拮抗细菌作为生物防治手段研究进展)[J]. *J Hebei Agric Sci*(河北农业科学), 8(1):62-65
- Zhang Y(张颖), He R(赫然), Wang Q(王强), et al. 2004. Rapid preparation of PCR templates of genomic DNA from *Escherichia coli* by using microwave and boiling (利用微波炉和煮沸法快速制备大肠杆菌基因组 DNA PCR 模板)[J]. *Acta Univ Sunyatseni; Sci Nat Edi*(中山大学学报·自然科学版), 43(Suppl):80-81