烟草黑胫病拮抗菌的筛选及其生物效应*

曹明慧　冉　炜　杨兴明†　沈其荣　沈　标
（南京农业大学江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室，南京　210095）

摘　要　烟草黑胫病是烟草生产中危害最严重的土传病害之一，生物防治具有抗病和环保的作用，获得高效拮抗菌株是进行生物防治研究的基础。本研究采用平板对峙法，在烟草黑胫病发生严重的田块中选取健康烟株，从其根际土壤中分离筛选到 12 株对烟草黑胫病病原菌 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* 具有拮抗效果的菌株，抑菌率 59.4% ~71.1%。选择抑菌率最高的 C-5 菌株进行试验。经鉴定 C-5 菌株为多粘类芽孢杆菌（*Paenibacillus polymyxa*）。抗菌谱试验结果表明：C-5 菌株不仅对黑胫病病原菌有较强的拮抗作用，同时对甜瓜、黄瓜枯萎病病原菌和辣椒疫病病原菌也具有拮抗作用。苗期盆栽试验结果表明：利用 C-5 菌株发酵制备的微生物有机肥能抑制烟草黑胫病的发生，苗期防治率达 80%。本文首次报道了多粘类芽胞杆菌菌株对烟草疫霉有拮抗作用。

关键词　烟草黑胫病；微生物有机肥；多粘类芽孢杆菌；烟草疫霉
中图分类号　S154.39　　**文献标识码**　A

烟草黑胫病是烟草生产中危害最严重的土传病害之一，在我国云贵川三大烟区均有不同程度发生，每年经济损失高达亿元，仅次于烟草病毒病[1]。生产上用来防治烟草黑胫病的化学药剂以甲霜灵和乙磷铝为主。连年施用甲霜灵后，有效控制烟草黑胫病的农药用量呈不断上升趋势[2]；大面积长期重复性地大量使用同一种杀菌剂或作用机制相同的几种内吸性杀菌剂，容易使病原菌产生抗药性，导致防治效果下降[3]。施用这些化学农药也引起土壤、水体和大气等环境污染，导致农副产品中农药残留增加，直接危害人类的健康及生存。有效地减少化学农药使用，需要研究和开发环境友好的土传病害生物防治技术。

利用自然界中拮抗微生物抑制植物病原菌繁殖是目前克服土传病害的重要生物防治方法。虽然报导了 18 个属的根际细菌具有防治土传病害的潜力[4]，然而与化学农药的大量施用相比，利用根际细菌进行土传病害防治的推广应用仍然很不普遍。烟草黑胫病病原菌烟草寄生疫霉（*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*）属于卵菌纲（Oomycete）原生生物，其细胞壁由纤维素组成，而不是像真菌那样细胞壁由几丁质组成，因此筛选具有降解纤维素能力的拮抗菌，对于抑制疫霉生长十分重要。获得高效拮抗菌株是进行生物防治研究的基础[5-6]，而为拮抗菌提供合适的载体是在田间条件下促进拮抗菌在土壤中定殖和保持抗病活性的重要条件。

本文的研究目的是：（1）在烟草发病田块选取健康植株，从其根际土壤样品中分离和筛选抗烟草黑胫病的高效拮抗菌株；（2）研究以有机肥为载体用拮抗菌发酵的微生物有机肥料对烟草黑胫病的控制作用。本研究可望为开发根际土壤微生物资源、减少化学农药使用、发展基于有机肥的土传病害生物防治技术提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　土壤样品的采集

分别从云南玉溪、安徽宁国烟草黑胫病发病严重的田块选择健康植株取样，采集生长健康烟株的根，获取根际土壤 1000g，根际土采样方法见参考文献[7]，低温保存带回实验室、4℃冰箱保

* 农业部重大 948 滚动项目（2006－G62）和农业部农业公益性行业科研专项（200803031）资助
† 通讯作者，E-mail：xingming@njau.edu.cn
作者简介：曹明慧（1984—），女，吉林省吉林市人，硕士研究生，研究方向为烟草土传病害。Tel：15806151935；E-mail：caominghui11@126.com
收稿日期：2009－12－15；收到修改稿日期：2010－04－28

存待用。

1.2 供试病原菌株

烟草黑胫病病原菌烟草寄生疫霉(*Phytophthora parasitica var. nicotianae*),由云南烟草科学研究院提供,10℃冰箱保存。甜瓜枯萎病病原菌(*Fusarium osyporunm* f. sp *melonis*)、西瓜枯萎病病原菌(*Fusarium osyporunm* f. sp *niveum*)、香蕉枯萎病病原菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)、黄瓜枯萎病病原菌(*Fusarium osyporum* f. sp *cucumerinum*)、青椒疫病病原菌(*Phytophthora capsici*)、茄子青枯病病原菌(*Ralustonia Solanacerum*)、黄瓜立枯病病原菌(*Rhizoctonia solani* Kulhn)和棉花黄萎病病原菌(*Verticillium dahliae* Kleb.)来自南京农业大学江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室。

1.3 培养基

PDA,NB,LB 配方参照参考文献[8]。

几丁质培养基(胶体几丁质 5.0 g,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g,$FeSO_4$ 0.7 g,$ZnSO_4$ 0.001 g,琼脂 20 g,H_2O1000 ml,pH 7.2~7.4);羧甲基纤维素(CMC)培养基(CMC-Na 5.0 g,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g,$(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g,K_2HPO_4 0.25 g,琼脂 20 g,H_2O 1000 ml,pH 7.0);酪蛋白培养基(葡萄糖 10 g,酵母粉 4 g,酪蛋白 10 g,K_2HPO_4 1 g,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g,蒸馏水 1000 ml pH 7.0)。

1.4 拮抗菌的分离筛选

根际土壤细菌的分离:对土壤样品进行系列稀释涂布培养获得细菌单菌落[9-11]。将烟草黑胫病病原菌保藏种进行活化,用打孔器(直径 5 mm)在菌落边缘区域打孔制成菌片,转接在 PDA 平板中央,25℃培养 24 h,采用对峙法将分离到的细菌菌株点接在距烟草黑胫病病原菌菌片 20 mm 处,每皿接种 4 个菌株,同时设空白对照(不接菌),重复 3 次。置于培养箱 25℃培养 7 d,测量烟草黑胫病病原菌的菌落直径,选择抑菌效果显著的菌落进行纯化,并保存。

按照下式计算抑菌直径和抑菌率:

抑菌直径 = 对照烟草疫霉直径 - 与拮抗菌对峙的烟草疫霉直径

抑菌率(%) =(对照烟草疫霉直径 - 与拮抗菌对峙的烟草疫霉直径)/对照烟草疫霉直径 ×100% 。

1.5 抑菌谱试验

取本实验室保藏的不同病原菌菌株进行活化,用灭菌打孔器(直径 5 mm)在菌落边缘区域打孔制成菌片,转接至 PDA 平板中央,25℃培养 24 h,采用对峙法将抑菌效果明显的菌株(C-5 菌株)点接在距病原菌菌片 20 mm 处,每皿接种 3 个菌株(C-5),同时设空白对照(不接菌),每株病原菌做 3 个重复 。25℃培养 7 d,测量病原菌的菌落直径,计算抑菌率。

1.6 温度和 pH 值变化对 C-5 菌株 OD 值的影响

选 4℃、20℃、30℃、37℃、45℃、50℃、55℃为代表温度,每个温度做 3 个重复,LB 的装液量为大试管的 1/5,在 170 r min^{-1}摇床上摇 48 h。用 721 分光光度仪测波长为 600nm 时的 OD 值。将 LB 液体培养基的 pH 调为 4.0~10.0,取 250 ml 三角瓶每个 pH 做 3 个重复,装液量为三角瓶的 1/5,在 170 r min^{-1}、30℃下摇 48 h。用 721 分光光度仪测波长为 600nm 时的 OD 值。

1.7 几丁质酶、纤维素酶和蛋白酶活性定性测定

将 C-5 分别接种在几丁质培养基、CMC 培养基和酪蛋白培养基平板上,每个平板中点接 3 株拮抗菌 C-5,每种培养基平板重复 3 次,即每个菌株有 9 个测定菌落,30℃培养箱倒置培养。观察 C-5 菌株在以上三种培养基上产生水解圈情况,同时测量水解圈的直径大小,用于定性分析指示 C-5 菌株产几丁质酶、纤维素酶和蛋白酶的能力。

1.8 菌种生理生化和分子鉴定

将 C-5 菌株接种至 NB 培养基平板上,28 ℃倒置培养 48 h,观察其菌落形态特征。利用革兰氏染色镜检观察菌体形态;淀粉水解等生理生化试验及其培养基按常见细菌鉴定方法进行[12]。

C-5 菌株的分子生物学鉴定采用菌体直接扩增 16S rDNA 的方法。PCR 扩增引物选用 16S rDN 细菌通用引物 27f /1492r [5' 端引物: 5 '-AGAGTTT2GATCCTGGCTCAG-3 '(*Escherichia coli* bases 8 ~ 27) [13] ,3 ' 端引物: 5 '-TACCTTGTTACGACTT-3 '(*Escherichia coli* bases 1507~1492) [14]]。扩增反应体系为: 10 × Taq 聚合酶反应缓冲液 5 μl, dNTP (20 mmol l^{-1}) 5μl, 5' 端引物 (25 pmolμl^{-1}) 2μl,3' 端引物(25 pmolμl^{-1}) 2μl,Mg^{2+} (25 mmol l^{-1}) 6μl,菌体 DNA (约 50 ngμl^{-1}) 1μl, Taq DNA 聚合酶(5 U μl^{-1}) 0.5 μl,H_2O 28.5 μl,总体积 50 μl。PCR 反应条件: 94℃预变性 2 min,进入热循环: 94℃变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 30 个循环。PCR 产物采用试剂盒(Axyprep DNA Gel Extraction Kit, Axygen Biosciences) 纯化后,与 PMD19-T-vector 载体连接。16℃连接 10 h,转化 *E. coli* DH5α,经蓝白斑筛选,随机

挑选阳性克隆,酶切质粒 DNA 验证后,进行测序。测序结果在 NCBI 分子生物学数据库中进行同源性检索。

1.9　盆栽试验

供试土壤由贵州烟草科学院提供,为烟草连作黑胫病发生严重的土壤,采自贵州省烟草科学院福泉基地烟草黑胫病发病区的黄壤土,烟田表土 0 ~ 30cm,保持土壤湿润,封闭在袋中。

烟草品种由贵州省烟草科学院提供,为云烟 87,该品种为黑胫病易感品种,漂浮育苗 60 d 后移栽。

根据江苏新天地生物肥料有限公司制备拮抗土传病害微生物有机肥工艺生产出以菌株 C-5 为功能菌的生物有机肥(有机质 360.5 g kg^{-1},全氮 35.6 g kg^{-1},全磷 62.8 g kg^{-1}),将菌种接种到菜粕酶解氨基酸有机肥中二次发酵而成,微生物有机肥中拮抗菌数量可达到 1×10^8 个 g^{-1}以上,作为供试肥料。

实验设计为五个处理:1)健康土壤空白对照 CK1;2)连作的发病土壤 CK2;3) OF(CK2 + 有机肥(菜粕酶解的氨基酸有机肥);4)ANT(CK2 + 拮抗菌 C-5 菌液);5)MOF(CK2 + C - 5 微生物有机肥),每盆加入 50 g 肥料与土壤混匀。拮抗菌 C-5 菌液接种方法是将拮抗菌 C-5 接种于 NB 培养基中,30℃、170 r min^{-1}振荡培养 48 h,将发酵好的菌液离心,收集菌体并用无菌水稀释,拌入土壤中,使土壤中拮抗菌 C-5 的浓度达到 10^8cfu g^{-1}(以干土计算)。以处理 MOF 施肥量为基准,对照和其他处理以无机肥补齐氮磷钾养分。每盆装 10 kg 土,每处理六个重复。烟草生长时,每盆烟定量浇水,定期除草、捉虫,45 d 后计算发病率和防治效果,测定烟草株高、鲜重、干重(105℃ 杀青 30min,75℃ 烘干至恒重)。发病率和防治效果测定和计算方法按参考文献[15]进行。

数据采用 SAS8.2 统计软件进行分析。

2　结果与分析

2.1　拮抗菌的分离筛选

采集重病烟田的健株烟株根际土样 15 份,分离出细菌 289 株,通过平板对峙试验分离获得具有一定拮抗作用的菌株 12 株(表 1),所占分离菌株的比例为 4.2%,其中,C-5 菌株抑菌率为 71.1%,抑菌直径为 2.8 cm,是所有筛选出的拮抗效果最明显的菌株。所以,选用 C-5 菌株作为研制微生物有机肥的试验供试菌株。目前 C-5 已在中国微生物菌种保藏中心保藏,菌种保藏号为:CGMCC No. 3303。

表 1　分离菌株对黑胫病病原菌生长的影响

Table 1　Effect of isolates on growth of *P. parasitica* var. *nicotianae*

供试菌株 Bacterial strain	抑菌率 Inhibition rate (%)	抑菌直径 Inhibition zone diameter (cm)
J4A-6-4	60.0	0.8de
GC7-2	61.7	1.1cde
2-4-1	64.4	1.6c
J2-7-31	67.8	2.2b
J2A-5-1	60.5	0.9de
J2-7-21	67.0	2.0b
J5-5-3	62.2	1.2cde
J2-7-3	62.8	1.3cd
J4A-7-3	63.3	1.4c
J5-6-1	59.4	0.7e
J5-6-2	63.9	1.5c
C-5	71.1	2.8a

注:同列数据后字母不同代表处理间差异显著 ($p \leq 0.05$)

Note: Values in the same column followed by different letters are significant difference ($p \leq 0.05$)

2.2　C-5 菌株抑菌谱测定

取本实验室提供的 8 株病原菌菌株进行 C-5 菌株抗菌谱测定,分别测量抑菌圈、计算抑菌率。测定结果表明 C-5 菌株对甜瓜枯萎病、黄瓜立枯病和青椒疫病病原菌均具有较高的抑菌作用,可达到 65% 以上;对香蕉枯萎病病原菌的抑菌率较低为 53.3%。C-5 菌株对西瓜枯萎病病原菌没有抑菌效果。

表 2 菌株 C-5 对不同病原菌的拮抗效果

Table 2 Antagonistic effect of strain C-5 on some plant pathogenic bacteria and fungi

病原菌 Pathogen	抑菌率 Inhibition rate (%)	抑菌直径 Inhibition zone diameter (cm)
甜瓜枯萎病 *F. osyporunm* f. sp *melonis*	73.3	1.5
西瓜枯萎病 *F. osyporunm* f. sp *niveum*	—	—
香蕉枯萎病 *F. oxysporum* f. sp. *cubense*	53.3	0.8
黄瓜枯萎病 *F. osyporum* f. sp *cucumerinum*	55	1.0
青椒疫病 *P. capsici*	66.7	2.7
茄子青枯病 *R. solanacerum*	—	2.6
黄瓜立枯病 *Rh. solani* Kulhn	53.4	0.9
棉花黄萎病 *V. dahliae* Kleb.	66.8	1.2

2.3 C-5 菌株在不同温度及 pH 值条件下的生长变化

从图 1 结果看出,温度变化对 C-5 菌株 OD 值有一定影响。通过测量 C-5 菌株的 OD 值,可以衡量 C-5 菌株在不同温度下的相对生长状况。在 30℃下菌株 C-5 的 OD 值达到最高值 0.780。从图 2 中可以看出,随 pH 值的变化菌株 C-5 的 OD 值由低到高,在 pH 为 7.0 时达到最高值为 1.119,随着 pH 升高 OD 值降低,在 pH10.0 处最低。菌株 C-5 在 pH 为 5.0 到 9.0 区间都能生长,且在 pH 7.0 时 OD 值最高,为最适合菌株 C-5 生长条件。在 pH 为 4.0 和 10.0 时 OD 值最低,C-5 不生长。

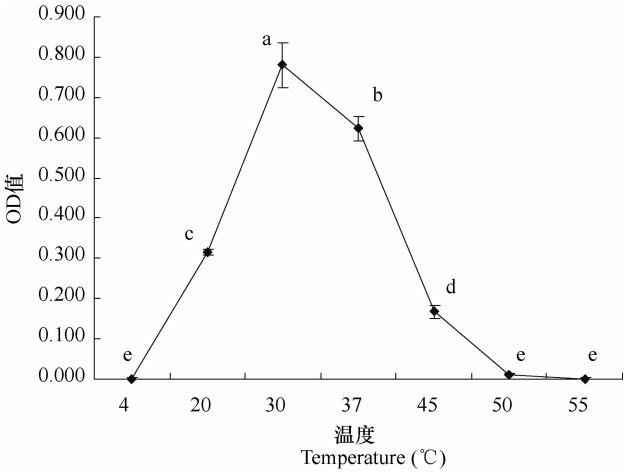

图 1 温度变化对 C-5 菌株生长的影响

Fig. 1 Effect of temperature on growth of Strain C-5

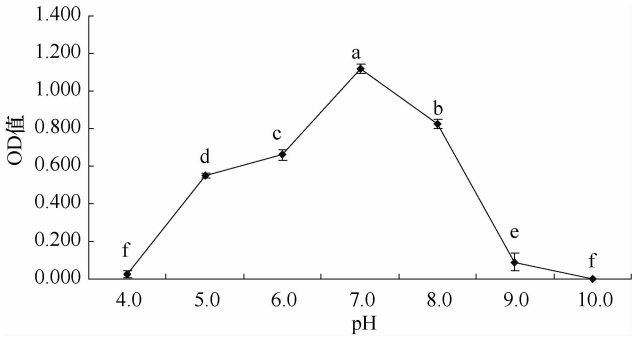

图 2 pH 变化对 C-5 菌株 OD 值的影响

Fig. 2 Effect of pH on growth of Strain C-5

2.4 C-5 菌株产几丁质酶、纤维素酶和蛋白酶活性的定性测定

几丁质酶、纤维素酶和蛋白酶是胞外水解酶类,它们引起病原寄主的菌丝崩解,从而进入寄生菌体形成寄生,抑制病菌的生长,最后病菌腐烂、解体,发生自溶和外溶;是微生物菌株产生拮抗作用的机制之一[16-18]。采用平板试验法,选取几丁质酶、纤维素酶和蛋白酶做为主要测定项目。培养 3 d 后,C-5 菌株产生蛋白酶,水解圈达 23 mm;C-5 菌株产纤维素酶,水解圈 3.1 mm;C-5菌株不产生几丁质酶(表 3)。

表 3　C-5 菌株产几丁质酶、纤维素酶和蛋白酶活性测定

Table 3　Activities of chitinase, cellulase and protease produced by Strain C-5 by plate assay

菌株 Strian	水解圈直径 Hydrolysis spot diameter(mm)		
	几丁质酶 Chitinase	纤维素酶 Cellulase	蛋白酶 Protease
C-5	—	3.1	23

2.5　C-5 菌株鉴定

菌株 C-5 在 NB 平板上 28℃培养 24 h,菌落乳白色,不透明,表面湿润、边缘光滑。镜检为杆状,G^+,产芽孢、椭圆型。菌株 C-5 的生理生化特征见(表 4)。将菌株 C-5 所测序列提交到 NCBI 数据库中进行 BLAST 检索,再用 MEGA3.1 分析绘制系统发育树(图 3)。系统进化树显示,C-5 菌株与多粘类芽孢杆菌 *Paenibacillus polymyxa BMP*-11 的 16S rDNA 序列同源性达到 100%。而菌株 C-5 的生理生化特征与标准多粘类芽孢杆菌的生理生化特征基本一致(表 4)。基于生物学特性和 16S rDNA 序列分析,将 C-5 初步确定为多粘类芽孢杆菌。

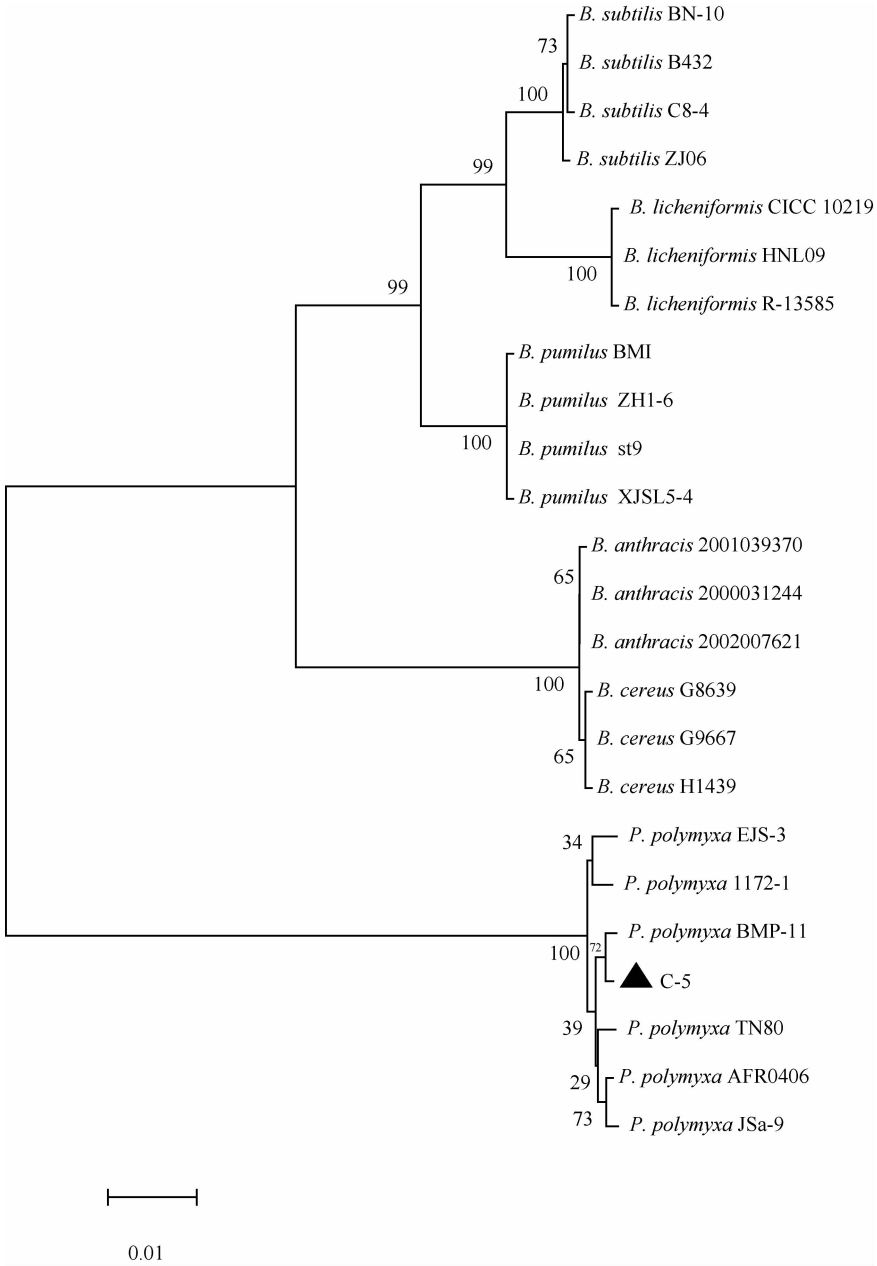

图 3　C-5 菌株 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 3　Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain C-5

表 4 C-5 菌株的生理生化特征

Table 4 Physiological and biochemical properties of Stain C-5

指标 Items	反应 Reaction	指标 Items	反应 Reaction
麦芽糖	+	M. R	+
乳糖	+	V. P	+
鼠李糖	-	淀粉水解	+
甘露糖	+	二羟基丙酮	+
阿拉伯糖	+	PH5.7 培养基生长	+
紫牛乳	+	运动性	+
葡萄糖	+	2% NaCl	+
蔗糖	+	3.5% NaCl	+
山梨醇	-	5% NaCl	-
肌醇	-	7.5% NaCl	-
明胶	+	10% NaCl	-

注“+”代表阳性,产酸,有运动性,耐盐,“-”代表阴性,不产酸,不耐盐

Note:“+” positive, acid-producing, motive, Salt-tolerant,“-” negative, non-acid-producing, not salt-tolerant

2.6 C-5 菌株制备的微生物有机肥对烟草生长的影响

利用 C-5 菌株与有机肥经二次发酵制备的微生物有机肥进行烟草苗期盆栽试验。实验结果表明(表 5),ANT 与 MOF 处理的鲜重、干重和株高没有显著差异;MOF 与 CK2 的鲜重、干重和株高有显著的差异,鲜重增加 1.8 倍,干重增加 1.7 倍,株高增加 1.4 倍;MOF 与 CK1 的鲜重和株高有显著差异,分别增加 1.4 倍、1.3 倍,干重没有明显差异;MOF 与 OF 的鲜重和株高有明显差异,分别增加 1.4 倍和 1.2 倍,干重增加 1.4 倍,说明微生物肥料有利于促进烟草生长,提高烟草的产量。

表 5 C-5 微生物肥料施用对烟草生长的影响

Table 5 Influence of C-5-added bio-organic fertilizer on growth of tobacco

处理 Treatment	鲜重 Fresh weight ($g\ pot^{-1}$)	干重 Dry weight ($g\ pot^{-1}$)	株高 Plant height (cm)
CK1	106.07 ± 20.3b	11.16 ± 2.6ab	40.38 ± 4.8c
CK2	80.89 ± 36.4b	9.75 ± 4.1b	37.65 ± 4.5c
OF	102.94 ± 49.5b	11.33 ± 5.2ab	44.92 ± 10.7bc
ANT	113.87 ± 20.7ab	13.46 ± 2.0ab	50.67 ± 5.3ab
MOF	149.41 ± 24.1a	16.02 ± 4.7a	54.22 ± 4.7a

注:以上数据均为 3 个重复的平均值 ± 标准偏差。同列数据后字母不同代表处理间差异显著($p \leq 0.05$) Note: The mean of three replicates is shown with their standard deviations (mean ± SD). Values in the same column followed by different letters are significant difference ($p \leq 0.05$)

2.7 C-5 菌株制备的微生物有机肥对烟草黑胫病的防治效果

从盆栽试验结果表明(表 6),OF、ANT 和 MOF 三个处理对烟草黑胫病都有一定的防治效果,其中 MOF 的防控效果最好可达到 80%,OF 和 ANT 两个处理的防病率分别为 31.6% 和 42.0%。CK2 发病率最高为 66.7%,MOF 的发病率比较低,只有 16.7%,CK1 是健康土壤没有发病植株,OF 和 ANT 处理的发病率为 33.3% 和 50.0%,结果说明使用 C-5 菌株制备的微生物有机肥更有利于抑制烟草黑胫病的发生。

表 6 C-5 菌株制备的微生物有机肥对烟草黑胫病的防控效果

Table 6 Effect of bio-organic fertilizer containing Strain C-5 on control of tobacco black shank in the pot experiment

处理 Treatment	发病率 Incidence of tobacco black shank(%)	防病率 Control effect(%)
CK1	—	—
CK2	66.7	—
OF	33.3	31.6
ANT	50.0	42.0
MOF	16.7	80.0

3 讨 论

土壤环境中有益的微生物对植物病原菌生长的抑制作用机制主要有产生拮抗物质、寄生于病原微生物之上、与病原菌竞争土壤营养、或诱导植物产生系统抗病性等。本文首次报道了一株多粘类芽孢杆菌 C-5 能有效抑制烟草寄生疫霉生长和防治黑胫病危害。C-5 对烟草寄生疫霉和辣椒疫霉较强的抑制作用可能与其能够分泌纤维素酶有关,纤维素酶对疫霉含有纤维素的细胞壁有裂解作用[19]。真菌细胞壁中都含有几丁质,由于本研究没有观察到 C-5 的几丁质酶活性(表 3),因此 C-5 对真菌病害如甜瓜枯萎病、黄瓜枯萎病、香蕉枯萎病以及细菌性病害茄子青枯病的抑制作用,可能与分泌其他拮抗物质有关[20],而与真菌细胞壁几丁质水解可能没有直接关系。拮抗微生物通过分泌一种或多种拮抗物质而直接抑制或杀死病原菌,它是拮抗微生物防治植物病害的一个重要机理[21]。这些拮抗物质包括酶类、抗生素、细菌素或细菌素类似物等[22]。一些报道也表明,多粘类芽孢杆菌具有生物防治潜力,例如,菌株 HY96-2 能抑制番茄青枯病病原菌生

长[23],菌株 W3、Y2 对番茄植株灰霉病有抑制作用[24],菌株 PFS08 对烟草赤星病、小麦赤霉病病菌有抑制作用[25],菌株 BRF-1 对黄瓜和番茄枯萎病有防治作用[26]。除此之外,多粘类芽孢杆菌产生的内生孢子对化学应激和物理应激均有较强的抵抗能力,有利于它们能够在土壤环境中生长增殖,适用于植物土传病害的生物防治[27-28]。

与单施 C-菌悬液或单施有机肥相比,C-5 与有机肥发酵后制成的微生物有机肥对烟草黑胫病的防治效果最好。有机物能为拮抗微生物提供养分,使其在土壤中更好的生长,从而达到降低烟草黑胫病的发生。近年来,用芽孢杆菌进行土传病害防治的例子很多,一些芽孢杆菌在防病的同时也存在促生的作用,能明显增加作物的产量[29]。有研究表明土壤中不仅存在对病原菌有抑制作用的拮抗细菌,还有一些根际促生细菌的存在[30-32]。本实验发现,施用微生物发酵的有机肥能促进烟草的生长,提高烟草的产量(表 5)。这与前人研究用拮抗菌及有机肥混合施用于棉花能降低黄萎病的发病和促进植株生长的结果一致[33]。

虽然对根际土壤中微生物多样性和功能已有较多的研究,但对添加微生物有机肥后根际土壤中微生物多样性和功能变化的认识仍然不多。本研究表明施用微生物有机肥能够促进作物生长和提高病害防治效果,该结果为推动环境友好型农业生产提供了佐证,但其机理尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] 陈瑞泰, 朱贤朝, 王智发, 等. 我国16个主产烟省(区)烟草侵染性病害调研报告. 中国烟草科学,1997,1(4):1—7. Chen R T, Zhu X C, Wang Z F, et al. A report of investigating and studying tobacco infectious diseases of 16 main tobacco producing provinces(regions) in China(In Chinese). Chinese Tobacco Science,1997,1(4):1—7

[2] 王革, 郑小波, 陆家云, 等. 云南省烟草黑胫病对甲霜灵抗性的检测. 南京农业大学学报,1997,20(4):105—107. Wang G, Zheng X B, Lu J Y, et al. Detection of resestance of black shank to metalaxyl in Yunnan province(In Chinese). Journal of Nanjing Agricultural University,1997, 20(4):105—107

[3] 周向平, 肖启明, 罗宽, 等. 烟草黑胫病菌拮抗内生细菌的筛选和鉴定. 湖南农业大学学报:自然科学版,2004,30(5):448—453. Zhou X P, Xiao Q M, Luo K, et al. Screening and indentification of tobacco antagonistic endophytic bacteria against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*(In Chinese). Journal of Hunnan Agricultural University: Natural Science Edition, 2004, 30(5):448—453

[4] 赵秀香, 吴元华, 李晔. 拮抗细菌 B8 对烟草黑胫病菌的抑制作用及其菌株鉴定. 中国生物防治, 2007,23(1):54—59. Zhao X X, Wu Y H, Li Y. Inhibition of an antagonistic rhizobacteria B8 to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and its identification (In Chinese). Chinese Jouranl of Biological Control, 2007,23(1):54—59

[5] 陈龙英,吴印青,范林华,等. 桃树根癌病的生物防治. 中国果树, 1995,1:8—10. Chen L Y, Wu Y H, Fan L H, et al. Biocontrol of *Agrobacterium tumefaciens* (In Chinese). China Fruits, 1995,1:8—10

[6] 陈志谊, 许志刚, 陆凡, 等. 拮抗细菌 B-916 培养液对水稻纹枯病菌的抗生活性及其抗菌物质的研究. 江苏农业学报, 2000,16(3):148—152. Chen Z Y, Xu Z G, Lu F, et al. On antagonism against Rhizoctonia solani of culture solution of strain B-916 and constituent of its antifungal substance (In Chinese). Jiangsu Journal of Agriculture Sciences, 2000,16(3):148—152

[7] 凌宁,王秋君,杨兴明,等. 根际施用微生物有机肥防治连作西瓜枯萎病研究. 植物营养与肥料学报, 2009,15(5):1 136—1 141. Ling N, Wang Q J, Yang X M,et al. Control of Fusarium wilt of watermelon by nursery application of bio-organic fertilizer. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2009,15(5):1 136—1 141

[8] 方中达. 植病研究方法(第 3 版). 北京:中国农业出版社, 1998. Fang Z D. Methods of Plant Pathology Research (In Chinese). 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998

[9] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验(第3版). 北京: 高等教育出版社, 1999.69—72. Shen P, Fan X R, Li GW. Laboratory Experiments in Microbiology (In Chinese). 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 1999.69—72

[10] 章家恩,蔡燕飞,高爱霞,等. 土壤微生物多样性试验研究方法概述. 土壤,2004,36(4):346—350. Zhang J E, Cai Y F, Gao A X, et al. Review on laboratory methods for soil microbial diversity. Soils, 2004,36(4):346—350

[11] Liu B R, Jia G M, Chen J, et al. A review of methods for studying microbial diversity in soil. Pedosphere,2006,16(1):18—24

[12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. Dong X Z, Cai M Y . Manual of Systematic and Determinative Bacteriology (In Chinese) . Beijing: Science Press, 2001

[13] Edwards U, Rogall T B, Emde H, et al. Isolati on and direct complete determination of entire genes . Nucleic Acids Res , 1989, 17:7 843—7 853

[14] Wils on K H, Blitchington R B, Green R C. Amp lificati on of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. J. Clin Microbiol, 1990, 28: 1 942—1 946

[15] 朱贤朝, 郭振业, 刘保安. 山东省烟草黑胫病菌生理小种研究. 植物病理学报,1987,17 (2):90—95. Zhu X C, Guo Z Y, Liu B A. A Identification of physiological races of the black shank pathogen (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) in Shandong provice (In Chinese). Acta Phytopatholgica Sinica, 1987,17 (2):90—95

[16] De la Cruz J, Rey M, Lora J M, et al. Carbon source control on β-glucanase, chitobiase and chitinase from Trichoderma harzianum. Arch. Microbiol. 1993,159:316—322

[17] Benitez T, Limbn C, Delgado-Jarana J, et al. Glucanolytic andother enzymes and their genes, 1998. 101—127. In: Harman G E, and Kubicek C. ed. Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, Biological Control Andcommercial Applications, vol 2. Taylor and Francis, Ltd, London

[18] De la Cruz J, Pintor-Toro J A, Benitez T, et al. Purification and characterization of an endo-β-1, 6-glucanase from Trichoderma harzianum that is related to its mycoparasitism. J Bacteriol, 1995, 177: 1 864—1 871

[19] Picard K, Tirilly Y, Benhamou N. Cytological effects of cellulases in the parasitism of Phytophthora parasitica by Pythium oligandrum. Applied and Environmental Microbiology 2000, 66: 4 305—4 314

[20] Raza W, Yang W, Shen Q R. Paenibacillus polymyxa: Antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment. Journal of Plant Pathology, 2008, 90: 419—430

[21] Cook R J, Thomashow L S, Weller D M, et al. Molecular mechanisms for biological control of plant pathogens. Phytopathology 1995, 31: 53—80

[22] Davies J E. What are antibiotics Archaic functions for modern activities. Mol Microbiol, 1990, 4: 1 227—1 232

[23] 徐玲, 王伟, 魏鸿刚, 等. 多粘类芽孢杆菌 HY96-2 对番茄青枯病的防治作用. 中国生物防治, 2006, 22(3): 216 ~ 220. Xun L, Wang W, Wei H G, et al. Effect of Paenibacillus polymyxa HY96-2 on Bacterial Wilt of tomato (In Chinese). Chinese Journal of Biological Control, 2006, 22(3): 216—220

[24] 童蕴慧, 郭桂平, 徐敬友, 等. 拮抗细菌对番茄植株抗灰霉病的诱导. 中国生物防治, 2004, 20(3): 187—189. Tong Y H, Guo G P, Xu J Y, et al. Induced resistance to gray mould in tomato plant by antagonistic bacteria (In Chinese). Chinese Journal of Biological Control, 2004, 20(3): 187—189

[25] 石志琦, 胡梁斌, 于淑池, 等. 细菌 P-FS08 的鉴定及其对几种植物病原真菌的拮抗作用. 南京农业大学学报, 2005, 28(3): 48—52. Shi Z Q, Hu L B, Yu S C, et al. Identification of bacterium P-FS08 and its inhibition to some pathogenic fungi (In Chinese). Journal of Nanjing Agricultural University, 2005, 28(3): 48—52

[26] 陈雪丽, 王光华, 金剑, 等. 多粘类芽孢杆菌 BRF-1 和枯草芽孢杆菌 BRF-2 对黄瓜和番茄枯萎病的防治效果. 中国生态农业学报, 2008, 16(2): 446—450. Chen X L, Wang G H, Jin J, et al. Biocontrol effect of Paenibacillus polymyxa BRF-1 and Bacillus subtilis BRF-2 on fusarium wilt disease of cucumber and tomato (In Chinese). Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2008, 16(2): 446—450

[27] Tong Y H, Ji Z L, Xu J Y, et al. Identification of bacterial species antagonistic against Botrytis cinerea and conditions for their growth. Journal of Yangzhou University: Agricultural and life Sciences Edition, 2002, 23(2): 67—70

[28] Dijksterhuis J, Sanders M, Gorris L G M, et al. Antibiosis plays a role in the context of direct interaction during antagonism of Paenibacillus polymyxa towards Fusarium oxysporum. J Appl Microbiol, 1999, 86: 13—21

[29] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97—103. Chen Z Y, Zhang J, Huang D F. Research progress on antimicrobial mechanism and genetic engineering of Bacillus for plant diseases biocontrol (In Chinese). Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(2): 97—103

[30] Jetiyanon K, Kloepper J W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria of induction of systemic resistance against multiple plant diseases. Biological Control, 2002, 24: 285—291

[31] Zhang S A, Reddy M S, Kloepper J W. Development of assays for assessing induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. Biological Control, 2002, 23: 79—86

[32] Bai Y M, Aoust F, Smith D L, et al. Isolation of plant-growth-promoting Bacillus strains from soybean rootnodules. Canadian Journal of Microbiology, 2002, 48: 230—238

[33] 张慧, 杨兴明, 冉炜, 等. 土传棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物效应. 土壤学报, 2008, 45(6): 1 095—1 101. Zhang H, Yang X M, Ran W, et al. Screening of bacteria antagonistic against soil-borne cotton Veticillium wilt and their biological effectis on the soil-cotton system (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2008, 45(6): 1 095—1 101

SCREENING OF ANTAGONIST AGAINST TOBACCO BLACK SHANK AND BIOLOGICAL EFFECT OF THE STRAIN

Cao Minghui Ran Wei Yang Xingming† Shen Qirong Shen Biao

(*Jiangsu Key Laboratory for Organic Solid Waste Utilization, Nanjing Agricultural University, Nanjing* 210095, *China*)

Abstract Tobacco black shank is one of the most serious soil-borne diseases in tobacco production. Biological control has been proved effective and environment-friendly, but screening of antagonists against pathogens is the basic work in bio-controlling. Twelve strains of bacteria antagonist against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* were isolated by using the plate-confrontation method from rhizosphere soils under healthy tobacco plants in tobacco fields seriously infected with the pathogen. The averaged inhabiting rates of the antagonists ranged from 59.4% to 71.1%. The best performer Strain C-5, which was identified as *Paenibacillus polymyxa* (C-5) based on biochemi-

cal tests and 16S rRNA sequence similarity, was then selected for further experiments. Results from antibiotic spectrum experiments show that Strain C-5 was also effective in inhibiting other plant pathogen such as *Fusarium osyporunm* f. sp *melonis* , *Fusarium osyporum* f. sp *cucumerinum* and *P. capsici*. Pot experiments show that application of bio-organic fertilizer supplemented with Strain C-5 suppressed the incidence of tobacco black shank by 80% as compared with the control. To our knowledge, this is the first report on the microbiological antagonism of Strain *Paenibacillus* against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*.

Key words Tobacco black shank; Microbial organic fertilizer; *Paenibacillus polymyxa*; *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*