

刘畅, 许家来, 郭凯, 等. 烟草黑胫病生防菌的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 167–170.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.046

烟草黑胫病生防菌的筛选鉴定及发酵条件优化

刘畅¹, 许家来², 郭凯¹, 李现道², 殷全玉¹, 聂庆凯¹, 阎海涛¹, 刘国顺¹

(1. 河南农业大学烟草学院, 河南郑州 450002; 2. 山东省烟草研究院, 山东济南 250098)

摘要:从山东烟田土壤中筛选对山东烟草黑胫病(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)具有较强拮抗作用的生防菌株。通过稀释涂布法初筛后,用平板对峙法复筛到拮抗效果较好的菌株 YCG-2,根据菌株形态与培养特征、ITS 序列分析进行鉴定,该菌株与哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)的亲缘关系较近,且形态与培养特征与哈茨木霉基本相符,因此鉴定为哈茨木霉。通过单因素试验和正交试验优化培养基组分及发酵条件,最优发酵条件为每 500 mL 瓶 20 g 菇渣,料水比为 1 g : 3.0 mL,种子液接种量 1×10^7 CFU/g, pH 值 7.0, 最适温度 28 ℃, 恒温恒湿培养箱中培养 6 d。

关键词:烟草黑胫病; 哈茨木霉; 发酵条件; 正交试验

中图分类号: S435.72 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0167-04

烟草黑胫病的病原菌为烟草疫霉菌(*Phytophthora nicotianae* Breda 或 *P. parasitica* var. *nicotianae* Tucker)^[1], 隶属于藻物界(Chromista)、卵菌门(Oomycota)、卵菌纲(Oomycetes)、腐霉目(Pythiales)、腐霉科(Pythiaceae)、疫霉属(*Phytophthora*)^[2]。烟草黑胫病是世界性的严重病害,在我国发生较为普遍,特别在河南和山东黄淮烟区严重影响烟草产量和质量^[3]。山东省是老重病区,曾因推广抗病品种在生产上起到较好的作用,但年发病率仍在 5%~20%,如 1981 年安丘县曾因此病绝产 667 hm² 以上^[4]。在不采取防治措施情形下,会出现毁灭性灾害^[5]。目前烟草生产上抗黑胫病品种效果有限,黑胫病的防治主要依赖甲霜灵等苯基酰胺类杀菌剂,且防治药物品种单一^[6]。

随着烟草和烟草制品逐步向无公害方向发展,生物防治方法应运而生,能够有效克服农药残留和病菌抗药性的问题,生防菌通过与病原真菌的拮抗作用来防治烟草黑胫病。近年来,国内已有不少关于烟草黑胫病生防菌方面的研究。如普城沙雷菌、绿针假单胞菌、黏炭芽孢杆菌等细菌都对烟草疫霉有较强的拮抗作用^[7-8]。喻会平等筛选出的复配细菌菌株对烟草黑胫病有很好的防治效果^[9]。张良等研究显示,长柄木霉(*Trichoderma longibrachitum*)和泾阳链霉菌(*Streptomyces jingyangensis*)是具有较高亲和性的增效组合,2 个菌株复配后可有效促进烟苗生长和防治烟草黑胫病^[10]。但目前为止,筛选出烟草疫霉菌的拮抗菌以细菌居多,真菌较少,且在实际生产中的应用很少。本研究拟从山东省潍坊市洛庄烟草实验站烟田的土壤中分离、纯化、筛选拮抗菌,并对拮抗效果较好的真菌菌株进行了发酵条件的优化,为后期验证该菌株在田间的

防治效果,利用该菌株制作菌肥,并应用于烟田奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 2014 年 6 月从山东省潍坊市洛庄烟草实验站附近烟草黑胫病发生较为严重的烟田采集土壤 5 份。采集土壤时,选取病烟株集中地块附近无病烟株,收集烟株根周围土壤,每块烟田取 3 株,3 株烟的根周围土等量混为 1 份样品,分装入无菌 50 mL 刻度塑料试管内,贴上标签后带回实验室分离拮抗菌。

1.1.2 主要试剂和仪器 引物(ITS 1、ITS 4)、*Taq* mix 购自上海生工生物有限公司,Marker 购自 Takara 公司,其余试剂均为国产分析纯试剂。电泳仪、PCR 为 Bio-Rad,显微镜为 Nikon eclipse E100。

1.1.3 培养基及发酵材料 PDA 培养基(培养筛选出的拮抗真菌)购自北京奥博星生物技术有限公司, LB 培养基(培养筛选出的拮抗细菌,含胰蛋白胨 10.0 g/L,酵母提取物 5.0 g/L, NaCl 5.0 g/L,琼脂 15.0 g/L, pH 值 7.0),燕麦培养基(OA,燕麦 60.0 g/L,琼脂 18.0 g/L),发酵材料为蘑菇渣(蘑菇渣为主要发酵材料,来自山东省枣庄冠宇食用菌有限公司)。

1.2 拮抗菌的初筛

5 份土壤每份取 10 g 于盛有 90 mL 无菌水的三角瓶中,摇床 150 r/min 振荡 30 min,记作 1×10^{-1} 。取 1 mL 悬浊液至含有 9 mL 无菌水的试管中,涡旋 60 s,记作 1×10^{-2} ,依次稀释至 1×10^{-5} 。取 1×10^{-4} 和 1×10^{-5} 这 2 个浓度上清液各 100 μL 涂板,3 次重复,板中央接病原菌烟草黑胫病 WZL-072(由笔者所在实验室分离获得)。28 ℃ 下培养 3~5 d,挑取周围无病原菌丝生长的菌株进行分离纯化。

1.3 拮抗菌的复筛

采用平板对峙法,将初筛出来的拮抗菌与烟草黑胫病原菌株 WZL-072 进行对峙。

1.3.1 拮抗细菌与 WZL-072 对峙试验 将 5 mm 打孔器打孔的 WZL-072 菌块置于 OA 培养基上,4 个大小相同无菌滤

收稿日期:2015-12-09

基金项目:中国烟草总公司浓香型特色优质烟叶开发重大专项[编号:110201101001(TS-01)],烟田微生态改良技术研究与推广(编号:鲁烟科[2013]11号)。

作者简介:刘畅(1989—),女,河南上蔡人,硕士研究生,主要从事烟草栽培工程研究。E-mail:hnliuchang@126.com。

通信作者:刘国顺,教授,博士生导师,主要从事烟草栽培研究。E-mail:liugsh1851@163.com。

纸片等距离放于 WZL-072 四周,吸取 5 μ L 180 r/min、28 $^{\circ}$ C 培养 12 h 的拮抗细菌菌液滴于滤纸片上,以等量无菌水为对照,各 3 次重复。28 $^{\circ}$ C 下培养 5~7 d,每天测量 WZL-072 菌落直径。

1.3.2 拮抗真菌与 WZL-072 对峙试验 利用 5 mm 打孔器分别打孔拮抗真菌与 WZL-072,各取 1 块置于 OA 培养基上进行对峙培养,各 3 次重复。28 $^{\circ}$ C 下培养 5~7 d,每天测量 WZL-072 菌落直径。

1.3.3 抑菌率的计算

抑菌率 = $\frac{\text{对照病原菌菌落直径} - \text{处理病原菌菌落直径}}{\text{对照病原菌菌落直径}} \times 100\%$ 。

1.4 菌株的鉴定

1.4.1 形态学鉴定 滴 1 滴乳酸酚棉兰染色液于载玻片中央,胶带粘取一点转接 3 d 的 YCG-2 菌丝放于染色液上,滤纸吸去多余的染色液,在 10 \times 40、10 \times 100 倍的光学显微镜下观察菌丝形态、孢子的大小及形状。参照喻璋等的方法^[11]进行形态学鉴定。

1.4.2 分子生物学鉴定 样品 DNA 的提取按照艾德莱生物公司的“真菌基因组 DNA 快速提取试剂盒”中的方法进行,用真菌通用引物(ITS 1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';ITS 4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行扩增^[12],测定其序列。通过 Blast 程序,从 NCBI 公共数据库中进行相似性搜索,选取相似性最高且是有效发表的典型菌株的序列,用 clusta IX 进行序列比对,用 MEGA 4.0 的 Neighbor-Joining 法选取前 250 个最好的比对结果构建系统进化树,确定 YCG-2 菌株的分类地位。

1.5 发酵条件的优化

1.5.1 种子液的制备及种子液孢子浓度检测 种子液的制备:称 20 g 菇渣于 500 mL 三角瓶中,加蒸馏水 50 mL,料水比为 1 g:2.5 mL,121 $^{\circ}$ C 灭菌 40 min,接种 5~10 块菌块,28 $^{\circ}$ C 培养 6 d。加 150 mL 无菌水,摇匀后用 2 层无菌纱布过滤,滤液 5 000 r/min 离心 10 min,倒掉上清液,加 30% 甘油重悬孢子液,混匀后分装入冻存管中,-80 $^{\circ}$ C 保存。采用活菌计数法检测种子液孢子浓度:取 1 mL 种子液,梯度稀释后进行平板培养(培养基内加入曲通抑制菌丝生长)。培养温度 28 $^{\circ}$ C,时间 48 h,3 次重复。

1.5.2 单因素试验 选择装料量、温度、料水比、接种量、pH 值作为影响 YCG-2 菌株生长的主要因素,通过单因素试验选取正交试验的因素和水平。基本条件为装料量 20 g 蘑菇渣,料水比为 1 g:2.5 mL,pH 值自然,接种 1 mL 浓度 1 \times 10⁷ CFU/g 的孢子液,28 $^{\circ}$ C 培养 6 d 后取出计算活菌数。在基本条件基础上,按照表 1 所列指标逐项进行单因素试验。每个处理 3 次重复。

表 1 单因素水平梯度设置

料水比 (含水率)	接种量 (CFU/g)	装料量 (g)	pH 值	培养温度 ($^{\circ}$ C)
1:1.5(60%)	1 \times 10 ⁴	5	5.0	22
1:2.0(67%)	1 \times 10 ⁵	10	5.6	25
1:2.5(71%)	1 \times 10 ⁶	15	6.0	28
1:3.0(75%)	1 \times 10 ⁷	20	6.5	31
1:3.5(80%)	1 \times 10 ⁸	25	7.0	34

1.5.3 正交试验设计 根据单因素试验结果,选取料水比(X_1)、装料量(X_2)、培养温度(X_3)3 个因素为考察对象,以活菌数量为评价指标,进行正交试验,3 次重复,试验因素水平及编码见表 2。

表 2 试验因素水平及编码

水平	A:装料量 (g)	B:温度 ($^{\circ}$ C)	C:料水比 (g:mL)
1	15	26	1:2.0
2	20	28	1:2.5
3	25	30	1:3.0

1.6 数据处理与分析

采用 STATA 方差分析软件及 Microsoft Excel 2003 统计软件进行单因素方差分析和差异显著性分析,采用 SPSS 16.0 软件进行正交分析。

2 结果

2.1 拮抗菌的初筛

从采集到的 5 份土样中初筛得到 26 株纯培养拮抗细菌,编号为 YCG-B1 至 YCG-B26,8 株纯培养拮抗真菌,编号为 YCG-1 至 YCG-8。

2.2 拮抗菌的复筛

如表 3 所示,采用对峙培养法进一步筛选,共筛选到 7 株菌株有抑制效果,其中 6 株细菌、1 株真菌,抑菌率 67.42%~84.34%,抑菌效果最好的是 YCG-2,抑菌率达到 84.34%。

表 3 8 种拮抗菌对烟草疫霉的抑制作用

菌株	抑制率(%)
YCG-B5	77.27b
YCG-B7	75.37b
YCG-B9	75.75b
YCG-B11	75.75b
YCG-B13	76.51b
YCG-B15	67.42c
YCG-2	84.34a

注:同列数据后字母不同代表处理间差异显著($P\leq 0.05$)。

2.3 经典分类学特征

观察发现:在 PDA 培养基上,YCG-2 菌株菌落开始为白色絮状,逐渐变为绿色,后期变为暗绿色,颜色由浅变深,状态由絮状逐渐变得紧而密。通过光学显微镜观察发现:YCG-2 菌株的菌丝纤细无色,具分隔,多分枝,分枝间夹角呈锐角。分生孢子梗从菌丝的侧枝上生出,对生或互生,一般有 2~3 次分枝,着生分生孢子的小梗瓶形或锥形。分生孢子多为球形(图 1)。

2.4 系统发育学特征

用真菌通用引物 ITS 1 和 ITS 4 扩增菌株 YCG-2 的核糖体 DNA,得到 595 bp 的 ITS DNA 序列,利用 Blast 程序与 NCBI 中已登录的基因序列进行比对,选取与其同源性较高且已定名的菌株的相关序列信息,进行系统发育分析,取前 250 个最好的比对结果建树(图 2),可以看出,菌株 YCG-2 的序列与哈茨木霉的序列相似性较高。

2.5 拮抗菌株 YCG-2 发酵条件优化单因素试验结果

2.5.1 料水比变化对 YCG-2 孢子产量的影响 由图 3 可见,料水比对菌株 YCG-2 的生长有很大影响,料水比为

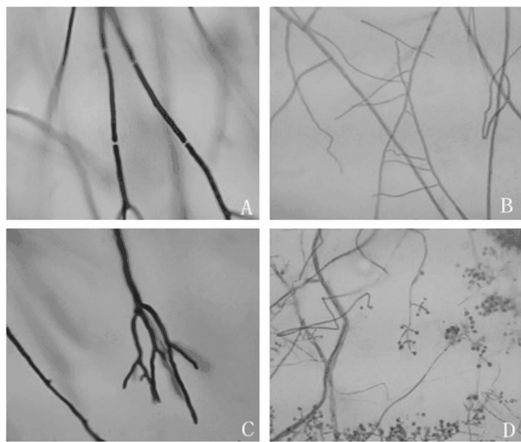


图1 菌株YCG-2的菌丝及分生孢子梗形态
(A、C: 10×100; B、D: 10×40)

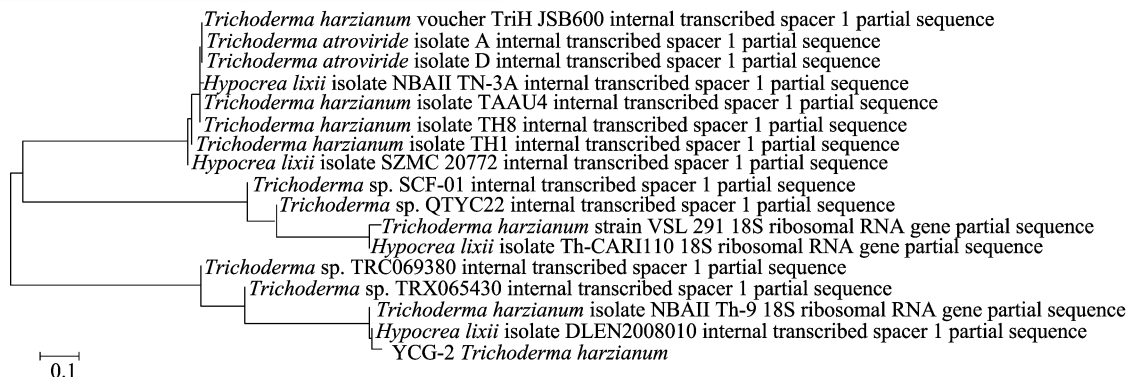


图2 菌株YCG-2与其在NCBI数据库中相关属种构建的以ITS DNA序列为基础的系统发育树

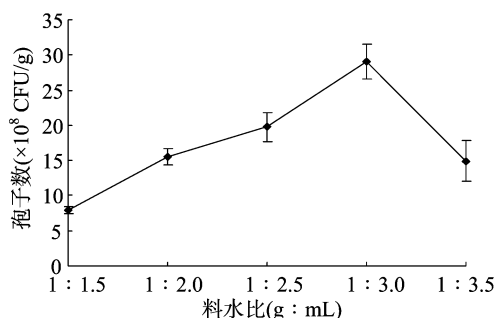


图3 料水比对YCG-2孢子产量的影响

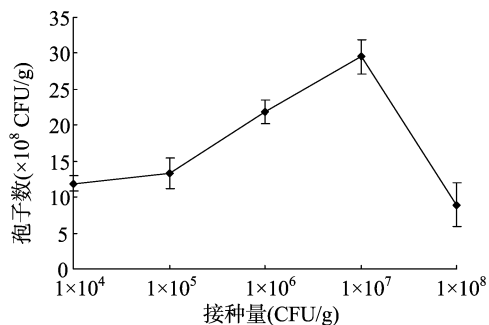


图4 接种量变化对YCG-2菌株生长的影响

2.5.3 装料量变化对 YCG-2 孢子产量的影响 由图 5 可见, YCG-2 菌株的孢子产量随着装料量的增加, 孢子产量越高, 此时料水比为 1 g : 3.0 mL, 自然 pH 值, 接种 1 mL 浓度 1×10^7 CFU/g 的孢子液, 温度 28 ℃。在每瓶 20 g 装料量情

况下菌株的生长状况最好, 孢子产量达到最高值 29.01×10^8 CFU/g。当装料量达到每瓶 25 g 时, 孢子产量有所降低, 这可能与物料堆积过多造成透气量下降有关。

2.5.2 接种量变化对 YCG-2 孢子产量的影响 由图 4 可知, 接种量对 YCG-2 菌株的生长有一定影响, 在装料 20 g 蘑菇渣, 料水比为 1 g : 3.0 mL, 自然 pH 值, 28 ℃ 条件下, 随着接种量的增大, YCG-2 孢子产量也会增加, 接种量为 1×10^7 CFU/g 时 YCG-2 孢子产量最大, 孢子数达到 29.50×10^8 CFU/g, 当接种量继续增大, YCG-2 菌株的活菌数则急剧降低, 这可能是因为蘑菇渣中的菌体过多, 导致营养成分不能满足过量菌体的生长, 从而影响活菌数。

况下菌株的生长状况最好, 孢子产量达到最高值 29.01×10^8 CFU/g。当装料量达到每瓶 25 g 时, 孢子产量有所降低, 这可能与物料堆积过多造成透气量下降有关。

2.5.4 初始 pH 值变化对 YCG-2 菌株生长的影响 用氢氧化钠溶液调节物料 pH 值。从图 6 可以看出, 在试验所设置的 pH 值梯度区间内 (5.5 ~ 7.5), YCG-2 菌株都能生长, 且在 pH 值为 7.0 时孢子产量达到最高值。在 pH 值为 7.0 时 YCG-2 的产孢量最多, 达到 40.11×10^8 CFU/g。物料 pH 值偏大或偏小, 孢子产量均减少。

2.5.5 温度变化对 YCG-2 菌株生长的影响 分别在 22、25、28、31、34 ℃ 下进行培养, 测定不同温度下的活菌数, 结果 (图 7) 表明, 温度变化对 YCG-2 菌株的生长影响很大。在 28 ℃ 下孢子产量达到最高值 39.60×10^8 CFU/g。随着温度的升高, YCG-2 孢子产量越来越低, 34 ℃ 时孢子产量降低到 6.0×10^4 CFU/g。

2.6 孢子产生条件优化正交试验

为了验证单因素试验结果, 通过 SPSS 统计软件设计正交试验。本试验选取装料量、培养温度、料水比 3 个因素为考察对象, 进行正交试验设计。每个试验重复 3 次, 取其平均值, 正交试验结果与分析见表 4, 方差分析见表 5。

由表 5 可知, 3 个因素对 YCG-2 菌株生长的影响作用大小依次为 A > B > C, 即装料量 > 温度 > 料水比。通过该正交试验结果确定最佳组合水平为 A₂B₂C₂。在装料量为 20 g、培养温度为 28 ℃、料水比为 1 g : 3.0 mL 的最佳条件下进行验证试验, 重复 3 次, 平均产孢量为 40.18×10^8 CFU/g。

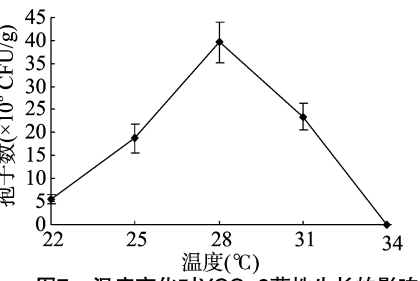
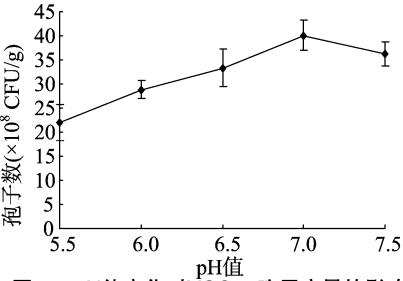
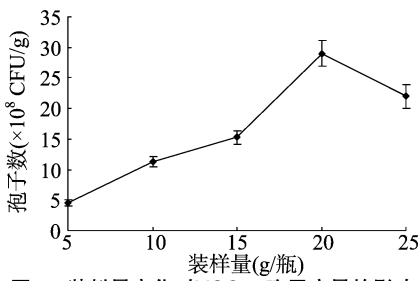


图5 装料量变化对YCG-2孢子产量的影响

图6 pH值变化对YCG-2孢子产量的影响

图7 温度变化对YCG-2菌株生长的影响

表 4 孢子产生条件优化正交试验结果与分析

试验号	A:装料量	B:温度	C:料水比	活菌数 ($\times 10^8$ CFU/g)
1	1	1	1	0.24
2	1	2	2	26.64
3	1	3	3	4.30
4	2	1	2	28.76
5	2	2	3	36.98
6	2	3	1	30.10
7	3	1	3	7.34
8	3	2	1	31.06
9	3	3	2	29.86
k_1	10.393	12.113	20.467	
k_2	31.947	31.560	28.420	
k_3	22.753	21.420	16.207	
R	21.554	19.447	12.213	

表 5 孢子产生条件优化 $L_9(3^4)$ 正交试验结果方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性
A	701.833	2	355.539	19	<0.05
B	567.606	2	287.541	19	<0.05
C	230.569	2	116.803	19	<0.05
误差	1.97	2			

3 小结与讨论

烟草黑胥病是烟草生产中危害最严重的土传病害之一，山东省是受害比较严重的产烟省，每年经济损失高达亿元，仅次于烟草病毒病^[1]。由于生物防治对环境无污染及不容易产生抗药性等特点成为病害防治研究的热点，需要研究和开发环境友好的土传病害生物防治技术。

本研究从山东省烟草黑胥病发生严重的烟田里选择长势良好无病烟株，取其根际土，经过初筛和复筛，获得 1 株对烟草疫霉具有较强抑制作用的真菌菌株 YCG-2，该菌株的抑菌率最高可达到 84.34%。鉴于此，选择 YCG-2 菌株作为后期的主要研究对象，利用传统分类方法和 18S rDNA 序列测定法对菌株 YCG-2 进行了鉴定，确定菌株 YCG-2 为哈茨木霉。采用单因素和正交设计试验对菌株 YCG-2 进行发酵条件的优化，得到其最佳发酵配方和最适发酵条件。最适培养温度为 28℃，pH 值为 7.0，这与庄敬华等^[13]、于晓丹等^[14]的关于木霉发酵条件研究结果相似，但张爱华等^[15]关于哈茨木霉发酵条件的初步研究结果显示最适培养温度为 22℃，本研究结果与之相差较大，可能是因为哈茨木霉菌株不同、所用培养基不同等。

为了能降低菌种扩大生产成本，本试验以废弃菇渣为培

养基质，并以孢子产生量为指标，优化了相应的发酵条件，为推广应用打下了基础。Harman 研究认为，木霉的生防作用与其根际定殖能力密切相关^[16-17]，因此 YCG-2 菌株的根际定殖能力有待于进一步研究，以期能尽快将其推向大田应用。

参考文献：

[1] 方中达, 陆家云, 叶钟音, 等. 中国农业百科全书: 植物病理学卷 [M]. 北京: 农业出版社, 1996: 534-535.

[2] Hawksworth D L, Sutton B C. Ainsworth and bisby's dictionary of the fungi [M]. 8th ed. CAB International, 1995.

[3] 周嘉平, 王宝华. 烟草黑胥病田间动态研究 [J]. 植物病理学报, 1984, 14(1): 39-45.

[4] 王智发, 刘延荣, 谢成颂, 等. 山东省烟草黑胥病菌生理小种初步鉴定 [J]. 植物保护学报, 1985, 12(1): 51-55.

[5] Shew H D, Lucas G B. Compendium of tobacco diseases [M]. Saint Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press, 1991: 17-20.

[6] 李梅云, 祝明亮. 烟草黑胥病菌对甲霜灵的抗性测定 [J]. 中国农学通报, 2006, 22(9): 377-379.

[7] 王晶晶, 蒋士君, 常淑娟, 等. 两株生防菌对烟草黑胥病的抑制活性及其鉴定 [J]. 中国烟草学报, 2011, 17(6): 89-92.

[8] 曹明慧, 冉 炜, 杨兴明, 等. 烟草黑胥病拮抗菌的筛选及其生物效应 [J]. 土壤学报, 2011, 48(1): 151-155.

[9] 喻会平, 罗定棋, 代园凤, 等. 烟草黑胥病拮抗菌复合菌株的筛选与防治效果评价 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(8): 102-107.

[10] 张 良, 刘好宝, 顾金刚, 等. 长柄木霉和泾阳链霉菌复配对烟草生长及其抗病性的影响 [J]. 应用生态学报, 2013, 24(10): 43-45.

[11] 喻 璋, 张 猛. 半知菌分属图册 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.

[12] Kamel A A, Ibrahim N A, Mohamed A A, et al. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal - DNA sequence data [J]. African Journal of Biotechnology, 2003, 2(4): 82-85.

[13] 庄敬华, 高增贵, 刘 限, 等. 不同发酵条件对木霉产孢类型的影响 [J]. 中国生物防治, 2005, 21(1): 37-40.

[14] 于晓丹, 张彩霞, 林 英, 等. 拮抗木霉菌株 T21 发酵条件的研究 [J]. 安徽农业科学, 2005, 33(2): 215-216.

[15] 张爱华, 白 石, 周国兴, 等. 哈茨木霉发酵条件的初步研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(23): 9821-9822.

[16] Harman G E. Development and benefits of rhizosphere competent fungi for biological control of plant pathogens [J]. Plant Nutrition, 1992, 15(6): 835-843.

[17] Harman G E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in peiceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22 [J]. Plant Diseases, 2000, 84(4): 377-393.