

蔡永占,白涛,刘冬梅,等.烟草赤星病高效生防内生细菌的分离筛选及发酵培养条件优化[J].江苏农业科学,2022,50(13):129-135.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.13.021

烟草赤星病高效生防内生细菌的分离筛选 及发酵培养条件优化

蔡永占¹,白涛¹,刘冬梅¹,邱春丽¹,符宗伟¹,朱颖勋¹,华小兵²,赵崇钧²,张琪²

(1. 云南省烟草公司曲靖市公司,云南曲靖 655000;2. 云南省微生物发酵工程研究中心有限公司,云南昆明 650217)

摘要:为提高烟叶安全,探索曲靖烟区烟草赤星病生物防控技术,研究烟草内生菌株对烟草赤星病的防控作用。以曲靖烟区分离得到的烟草赤星病原菌为靶标,采用平板对峙培养法从健康烟株体内分离筛选出生防内生细菌,并应用 Design-Expert 软件,采用响应面法对其进行发酵培养基的优化。结果表明,从曲靖烟区健康烟株体内分离筛选出 15 株对烟草赤星病原真菌链格孢菌具有拮抗作用的菌株,其中编号为 YWF-19-0004、YWF-19-0065、YWF-19-0068、YWF-19-0070、YWF-19-0071 的 5 株内生细菌抑菌带宽 ≥ 10 mm、抑菌率 $\geq 50\%$;采用响应面法获得 YWF-19-0068 菌株的优化培养基配方:大豆粉浓度 14 g/L,蛋白胨浓度 2 g/L,鱼粉浓度 2 g/L,蔗糖浓度 11 g/L,玉米粉浓度为 7 g/L,碳酸钙浓度 5 g/L,氯化钠浓度 0.3 g/L,磷酸二氢钾浓度 0.3 g/L,磷酸氢二钾浓度 0.3 g/L,硫酸锰浓度 0.2 g/L,硫酸镁浓度 0.3 g/L,硫酸铵浓度 0.5 g/L,利用优化培养基进行发酵,YWF-19-0068 菌株的菌量是基础培养基发酵所得菌量的 4.47 倍,说明优化后的发酵培养基有助于降低生产成本,为其规模化生产应用奠定了基础。

关键词:烟草;烟草赤星病;生物防控;内生细菌;响应面法

中图分类号:S435.72 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)13-0129-07

烟草赤星病(tobacco brown spot disease, TBSD)是由链格孢菌在烟叶成熟时期侵染造成病斑的一种真菌性病害^[1],在各烟区普遍发生^[2],直接影响烟叶的产量和品质^[3],给烟农带来巨大的经济损失,是烟草生产上威胁最大的病害之一^[4]。现阶段对烟草赤星病的防治方法主要有 2 种。一种是筛选具有抗病性的烟草品种或通过田间措施增强植株抗性^[5];另一种是使用化学药剂防治^[6-7]。目前国内针对烟草赤星病的化学药剂主要有氟硅唑、异菌脲、菌核净、啞菌酯、醚菌酯、多菌灵、甲基硫菌灵和腐霉利等^[8-9]。化学药剂防治虽取得了一些成效,但因其选择性差、高残留和不易降解,也造成了生态环境被破坏、烟叶品质下降、环境污染加重、抗药性问题日益突出等后果^[10],且赤星病一般在烟叶成熟期发病,农药残留会影响卷烟质量及人类身体健康。因此研究开发出能防治赤星病的生物防控技

术尤为重要^[11]。

筛选烟草赤星病菌拮抗菌是实施生物防控的一项重要工作,也是近年来国内外科研工作者研究的热点^[12]。方敦煌等从烟草赤星病病斑上分离得到 14 株拮抗赤星病菌的微生物,对峙培养发现其中 6 株对赤星病主要病原链格孢菌(*Alternaria alternata*)具有不同致病力的 6 个菌株均具拮抗作用^[13];马冠华等从几个不同烟草品种的不同生长时期的不同生长部位中分离得到近 2 000 株内生细菌,经过筛选得到 4 株对赤星病菌的生长都有较强抑制作用的细菌^[14];马志远从陕西、云南、湖北和河南 4 省烟区的烟草根际土壤和烟叶中分离筛选到 10 株对赤星病菌有拮抗效果的芽孢杆菌,其中 M-07 菌株的拮抗效果最好,抑菌条带宽度达到 14.2 mm^[15]。目前,大多数研究还只停留在实验室阶段,少见烟草赤星病菌拮抗菌规模化生产应用的报道,同时由于大多数拮抗菌的针对性不强,导致田间应用的防治效果和稳定性都相对较差。本研究以曲靖烟区分离得到的烟草赤星病原菌为靶标,从曲靖烟区健康烟株内分离得到高效生防内生细菌,并对其发酵培养基进行优化,旨在为其规模化生产应用奠定基础,为曲靖烟区烟草赤星病的防治提供新思路。

收稿日期:2021-07-12

基金项目:云南省烟草公司科技计划项目“曲靖烟草中后期白粉病、赤星病生物防控技术研究与示范”(编号:2019530000241008)。

作者简介:蔡永占(1984—),男,河南开封人,博士,农艺师,主要从事烟草病虫害绿色防控研究。E-mail:178244605@qq.com。

通信作者:张琪,农艺师,主要从事生物肥料及生物防控技术研究。
E-mail:15887216540@139.com。

1 材料与方法

1.1 试验时间和地点

1.1.1 试验时间 2020 年 2 月 7 日至 6 月 23 日。

1.1.2 试验地点 云南省安宁市青龙镇禹龙甸云南省微生物发酵工程研究中心有限公司实验室。

1.2 供试材料

1.2.1 供试菌株 供试的烟草赤星病病原真菌链格孢菌由笔者所在课题组前期从曲靖烟区的病叶上分离纯化获得,现保藏于云南省微生物发酵工程研究中心有限公司菌种库,菌株编号:YWFB-19-0013。

1.2.2 供试植株 供试健康烟株的根、茎、叶采自云南省曲靖市宣威市、麒麟区和师宗县,烤烟品种为 K326。

1.2.3 供试培养基 LB 培养基:用于烟草内生细菌的分离培养。配方如下(1 L):蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 5 g,加入蒸馏水定容至 1 L,充分溶解后,调节 pH 值至 7.0,经 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min 即可。加入 1.5% 琼脂,同等条件灭菌,即可得到 LB 固体培养基。

马铃薯蔗糖(PSA)培养基:用于具拮抗作用的生防菌株筛选。配方(1 L)如下:马铃薯 200 g,蔗糖 14 g,加入蒸馏水定容至 1 L,充分溶解后,经 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min 即可。加入 1.5% 琼脂,同等条件灭菌,即可得到 PSA 固体培养基。

发酵培养基原始配方:用于拮抗菌发酵培养基的优化。配方(1 L)如下:大豆粉 14 g,蛋白胨 2 g,玉米粉 4 g,碳酸钙 6 g,鱼粉 2 g,蔗糖 3 g,氯化钠 0.3 g,磷酸二氢钾 0.3 g,磷酸氢二钾 0.3 g,硫酸锰 0.2 g,硫酸镁 0.3 g,硫酸铵 0.5 g,加入蒸馏水定容至 1 L,充分溶解后,经 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min 即可。

1.3 试验方法

1.3.1 烟草内生细菌的分离 将烟草的根、茎、叶分别用自来水冲洗干净后,先在 70% 乙醇中振荡浸泡 1 min,再用有效氯含量 1% 的次氯酸钠溶液振荡浸泡 1~5 min 进行表面消毒后,用灭菌水冲洗 3 次,于灭菌的研钵中研磨,将研磨汁液涂布于 LB 平板上。以组织消毒后用灭菌水冲洗的最后一次冲洗液涂板作为对照,检测样品表面消毒是否彻底,如长菌落,研磨液所涂平板上长的菌落为非内生细菌,弃去;若对照中无菌落,在研磨液中长出的菌落

可能是内生细菌,随机挑取形态不同的菌落进行纯化培养并保存。

1.3.2 链格孢菌拮抗内生细菌的初筛和复筛 以烟草赤星病病原菌为指示菌,在 PSA 平板底部中心用记号笔点上一个点,以它为中心,在距离中心 3 cm 处按十字交叉点上 4 个点,将烟草赤星病病原菌菌饼接在 PSA 平板中心,在距中心 3 cm 处的 4 个点上用接种环点接分离出的烟草内生菌,以中心向四周辐射方向未点接烟草内生菌为空白对照,各平板正置于 28 ℃ 培养 1 周,测量不同烟草内生菌对烟草赤星病病原菌的抑制效果。

用同样的方法将初筛中抑菌带较宽的菌株进行复筛,各平板正置于 28 ℃ 培养 24 h 后测定复筛菌株对烟草赤星病病原菌的抑菌率。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径}} \times 100\%。$$

1.3.3 拮抗内生细菌发酵培养基优化研究 应用 Design-Expert 软件,采用响应面法对抑菌率最高的拮抗菌进行发酵培养基的优化。配制 Design-Expert 软件程序设计的培养基配方,以 1/1 000 的接菌量接入种子液,于 35 ℃,160 r/min 的恒温摇床内培养 72 h 后取样检测其菌含量。

1.3.4 数据统计与分析处理

采用 Excel 和 Design-Expert 软件来进行试验数据的分析与处理。

2 结果与分析

2.1 烟草内生细菌的分离

将所采集的烟草根、茎、叶表面消毒后,一共分离得到 71 株内生细菌,将其编号为 YWF-19-0001 至 YWF-19-0071。部分内生细菌的平板照片见图 1。

2.2 链格孢菌拮抗内生细菌的筛选

以分离得到的 71 株烟草内生细菌为目标菌,采用对峙平板法测定其对链格孢菌的抑制作用。由表 1 可知,对链格孢菌具有抑制作用的有 22 株,其中抑菌带宽度 ≥ 10 mm 的有 5 株,5 mm \leq 抑菌带宽度 < 10 mm 的有 7 株,抑菌带宽度 < 5 mm 的有 10 株。部分内生细菌对链格孢菌的抑制效果见图 2。

2.3 链格孢菌拮抗内生细菌的复筛

将上述试验中效果较为明显的 5 株内生细菌再次对烟草赤星病病原菌进行拮抗验证,对病原菌菌丝

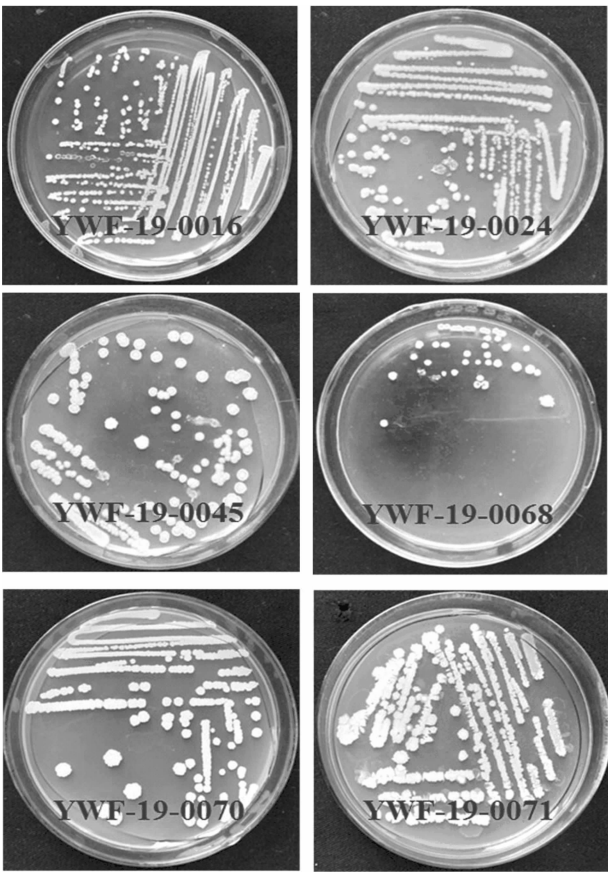


图1 部分内生细菌平板照片

生长的抑制效果如表 2 所示。从表 2 可知,YWF - 19 - 0004 、YWF - 19 - 0065、YWF - 19 - 0068、YWF - 19 - 0070 和 YWF - 19 - 0071 的平均抑菌带宽度分别为 10.6、10.3、12.5、11.8、12.3 mm,抑菌率分别为 51.25%、50.67%、56.70%、53.33% 和 55.58%。

2.4 生防内生细菌发酵培养基的优化

2.4.1 主要影响因素的确定 应用 Design - Expert 软件,采用响应面法对抑菌率最高的 YWF - 19 - 0068 菌株进行发酵培养基的优化。响应面法的 Plackett burman 设计是从多种因素中选取对试验指标有显著影响的因子,为下一步研究提供参考。影响发酵液菌量的碳源有碳酸钙、蔗糖、玉米粉。氮源有大豆粉、蛋白胨、鱼粉。PB 试验筛选 YWF - 19 - 0068 菌株基础发酵培养基中的显著因子,对基础培养基的 6 个组分:玉米粉(A)、大豆粉(B)、鱼粉(D)、碳酸钙(E)、蛋白胨(G)、蔗糖(H)进行全面考察,选择 11 因子 2 水平的试验设计,增加 5 个虚拟项(C、F、J、K、L)来估计试验误差。每个因子取高低 2 个水平。分别取高值和低值为:玉米粉浓度 4、8 g/L,大豆粉浓度 10、16 g/L,鱼粉浓度 2、

表 1 拮抗链格孢菌内生细菌初筛结果

序号	菌株编号	抑菌带宽度	序号	菌株编号	抑菌带宽度
1	YWF - 19 - 0001	-	37	YWF - 19 - 0037	-
2	YWF - 19 - 0002	-	38	YWF - 19 - 0038	+
3	YWF - 19 - 0003	-	39	YWF - 19 - 0039	-
4	YWF - 19 - 0004	+++	40	YWF - 19 - 0040	+
5	YWF - 19 - 0005	+	41	YWF - 19 - 0041	-
6	YWF - 19 - 0006	-	42	YWF - 19 - 0042	-
7	YWF - 19 - 0007	-	43	YWF - 19 - 0043	++
8	YWF - 19 - 0008	-	44	YWF - 19 - 0044	-
9	YWF - 19 - 0009	+	45	YWF - 19 - 0045	-
10	YWF - 19 - 0010	-	46	YWF - 19 - 0046	-
11	YWF - 19 - 0011	-	47	YWF - 19 - 0047	-
12	YWF - 19 - 0012	-	48	YWF - 19 - 0048	-
13	YWF - 19 - 0013	+	49	YWF - 19 - 0049	-
14	YWF - 19 - 0014	-	50	YWF - 19 - 0050	+
15	YWF - 19 - 0015	-	51	YWF - 19 - 0051	-
16	YWF - 19 - 0016	++	52	YWF - 19 - 0052	-
17	YWF - 19 - 0017	+	53	YWF - 19 - 0053	-
18	YWF - 19 - 0018	-	54	YWF - 19 - 0054	-
19	YWF - 19 - 0019	++	55	YWF - 19 - 0055	-
20	YWF - 19 - 0020	-	56	YWF - 19 - 0056	++
21	YWF - 19 - 0021	+	57	YWF - 19 - 0057	-
22	YWF - 19 - 0022	+	58	YWF - 19 - 0058	-
23	YWF - 19 - 0023	-	59	YWF - 19 - 0059	-
24	YWF - 19 - 0024	-	60	YWF - 19 - 0060	-
25	YWF - 19 - 0025	-	61	YWF - 19 - 0061	-
26	YWF - 19 - 0026	++	62	YWF - 19 - 0062	-
27	YWF - 19 - 0027	-	63	YWF - 19 - 0063	-
28	YWF - 19 - 0028	-	64	YWF - 19 - 0064	++
29	YWF - 19 - 0029	-	65	YWF - 19 - 0065	+++
30	YWF - 19 - 0030	+	66	YWF - 19 - 0066	-
31	YWF - 19 - 0031	-	67	YWF - 19 - 0067	-
32	YWF - 19 - 0032	-	68	YWF - 19 - 0068	+++
33	YWF - 19 - 0033	-	69	YWF - 19 - 0069	++
34	YWF - 19 - 0034	-	70	YWF - 19 - 0070	+++
35	YWF - 19 - 0035	-	71	YWF - 19 - 0071	+++
36	YWF - 19 - 0036	-			

注:抑菌带宽度≥10 mm,用“+++”表示,5 mm≤抑菌带宽度<10 mm,用“++”表示,抑菌带宽度<5 mm,用“+”表示,无抑菌带,用“-”表示。

6 g/L,碳酸钙浓度 4、8 g/L,蛋白胨浓度 2、6 g/L,蔗糖浓度 5、10 g/L。PB 试验设计与结果如表 3 所示。

利用响应面分析软件对表 3 中的试验数据进行分析,得到回归模型方差分析和各因素的主效应结

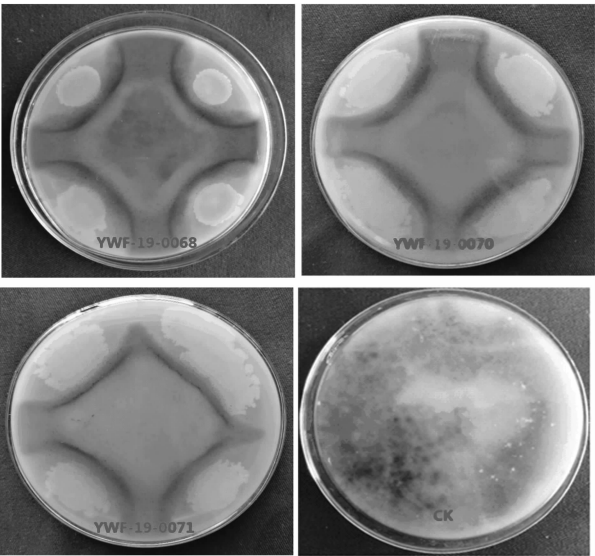


图2 部分内生细菌对链格孢菌的抑制效果

表 2 拮抗内生细菌对链格孢菌菌丝生长的抑制效果

菌株	平均抑菌带宽度 (mm)	抑菌率 (%)
YWF-19-0004	10.6±0.62b	51.25±1.71a
YWF-19-0065	10.3±0.57b	50.67±1.34b
YWF-19-0068	12.5±0.58a	56.70±1.27a
YWF-19-0070	11.8±0.68a	53.33±1.84a
YWF-19-0071	12.3±0.82a	55.58±1.84a

注:同列数据后不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)。

果(表 4、表 5),该模型的 P 值为 $0.019\ 5 < 0.05$,说明该模型显著,能较好地拟合数据。根据 P 值的大小可以判定,培养基中各因子对 YWF-19-0068 菌株菌量影响的重要性排序为 蔗糖浓度 > 玉米粉浓度 > 碳酸钙浓度 > 蛋白胨浓度 > 鱼粉浓度 > 大豆

表 3 PB 试验设计及结果

序号	A	B	C (空项)	D	E	F (空项)	G	H	J (空项)	K (空项)	L (空项)	菌含量 ($\times 10^8$ CFU/mL)
1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	5.32
2	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	12.78
3	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	11.48
4	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	11.43
5	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	17.05
6	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	19.65
7	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	15.21
8	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	17.43
9	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	14.43
10	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	12.07
11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	6.34
12	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	9.26

表 4 Plackett burman 试验分析与结果

因子	水平(浓度 g/L)		P	重要性排序
	1	-1		
玉米粉	8	4	0.023 4	2
大豆粉	16	10	0.788 0	6
鱼粉	6	2	0.551 6	5
碳酸钙	8	4	0.035 9	3
蛋白胨	6	2	0.305 2	4
蔗糖	10	5	0.003 5	1

表 5 Plackett burman 试验回归分析结果

因素	df	平方和	均方值	F 值	Prob > F
模型	6	189.05	31.51	7.84	0.019 5
玉米粉	1	41.70	41.70	10.38	0.023 4
大豆粉	1	0.32	0.32	0.08	0.788 0
鱼粉	1	1.64	1.64	0.41	0.551 6
碳酸钙	1	32.57	32.57	8.11	0.035 9
蛋白胨	1	5.24	5.24	1.30	0.305 2
蔗糖	1	107.58	107.58	26.77	0.003 5

粉浓度。蔗糖浓度、玉米粉浓度和碳酸钙浓度 3 个因子的 P 值均小于 0.05,说明其对 YWF-19-0068 菌株菌量有显著影响,因此选定蔗糖浓度、玉米粉浓度和碳酸钙浓度作为下一步试验的关键

因素。
2.4.2 最适浓度范围的确定 对蔗糖、玉米粉和碳酸钙浓度 3 个主要影响因子进行最陡爬坡路径试验,确定此 3 个因子的最适浓度范围(表 6、图 3)。

蔗糖、玉米粉和碳酸钙浓度对发酵液含菌量均是正影响, t 为正值,当蔗糖浓度为 11 g/L,玉米粉浓度为 7 g/L,碳酸钙浓度为 5 g/L 时对应的发酵液含菌量达到最大值,对链格孢属病原菌抑菌率达 67% 以上,为 3 个因子的最大响应值区域。

表 6 最陡爬坡路径试验设计及结果

序号	蔗糖浓度 (g/L)	玉米粉 浓度 (g/L)	碳酸钙 浓度 (g/L)	菌含量 ($\times 10^8$ CFU/mL)	抑菌率 (%)
1	5	4	2	20.34	54.31 \pm 1.31
2	7	5	3	23.40	57.28 \pm 4.95
3	9	6	4	31.70	58.22 \pm 5.69
4	11	7	5	38.56	67.53 \pm 3.44
5	13	8	6	29.80	59.53 \pm 4.71

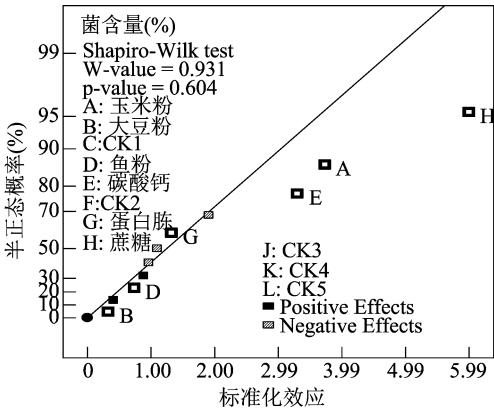


图3 爬坡试验结果

2.4.3 响应面分析 采用 Box – Behnken 的中心组合设计原理,以蔗糖浓度 11 g/L、碳酸钙浓度 5 g/L 和玉米粉浓度 7 g/L 为中心点施行响应面分析,设计 3 因素 3 水平的响应面分析试验,各自变量水平见表 7,试验设计及结果见表 8。

表 7 响应分析法设计因子及水平

因子	水平(浓度 g/L)		
	- 1	0	1
蔗糖	9	11	13
碳酸钙	4	5	6
玉米粉	6	7	8

响应面分析法对菌含量浓度的分析见表 9,由表 9 可知,本试验二次多项回归方程的 P 值小于 0.05,说明模型显著,回归方程失拟项检验 P 值为 0.235 9 > 0.05,说明失拟项不显著,未知因素对试验结果干扰小。拟合检验显著,说明所建立的模型是有效的,与实际情况拟合,3 个参数对菌含量浓度的影响是显著的。

表 8 响应分析法试验设计及结果

序号	因子			菌量 ($\times 10^8$ CFU/mL)
	蔗糖浓度	玉米粉浓度	碳酸钙浓度	
1	1	0	1	32.00
2	0	0	0	37.42
3	0	1	1	33.34
4	0	0	0	36.5
5	0	- 1	- 1	34.45
6	1	0	- 1	31.56
7	- 1	0	- 1	28.67
8	0	0	0	36.56
9	0	1	- 1	30.89
10	- 1	1	0	27.34
11	1	- 1	0	28.00
12	0	0	0	38.00
13	- 1	- 1	0	26.23
14	0	- 1	1	34.00
15	1	1	0	29.05
16	- 1	0	1	30.45
17	0	0	0	38.56

表 9 响应面分析法对菌含量浓度的分析

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P
模型	242.66	9	26.96	22.39	0.000 2
A	7.84	1	7.84	6.51	0.038 0
B	0.53	1	0.53	0.44	0.528 2
C	2.23	1	2.23	1.85	0.216 1
AB	9.00	1	9.00	7.47	0.979 0
AC	0.45	1	0.45	0.37	0.560 8
BC	2.10	1	2.10	1.75	0.228 0
A ²	158.04	1	158.04	131.22	0.000 1
B ²	55.37	1	55.37	45.98	0.000 3
C ²	1.57	1	1.57	1.31	0.290 5
残差	8.43	7	1.20		
失拟项	5.21	3	1.74	2.16	0.235 9
纯误差	3.22	4	0.81		

根据回归方程所做出的响应曲面和等高线图见图 4。如果等高线图形呈椭圆形,说明 2 个因素的交互作用显著,如呈圆形,说明交互作用不显著;等高线的密集程度可说明该因子对菌含量影响的大小。由图 4 可以看出,等高线为椭圆形,说明交互作用显著。等高线的疏密可以看出玉米粉浓度和碳酸钙浓度对菌含量的影响 > 蔗糖和玉米粉浓度对菌含量的影响 > 蔗糖和碳酸钙浓度对菌含量的影响。

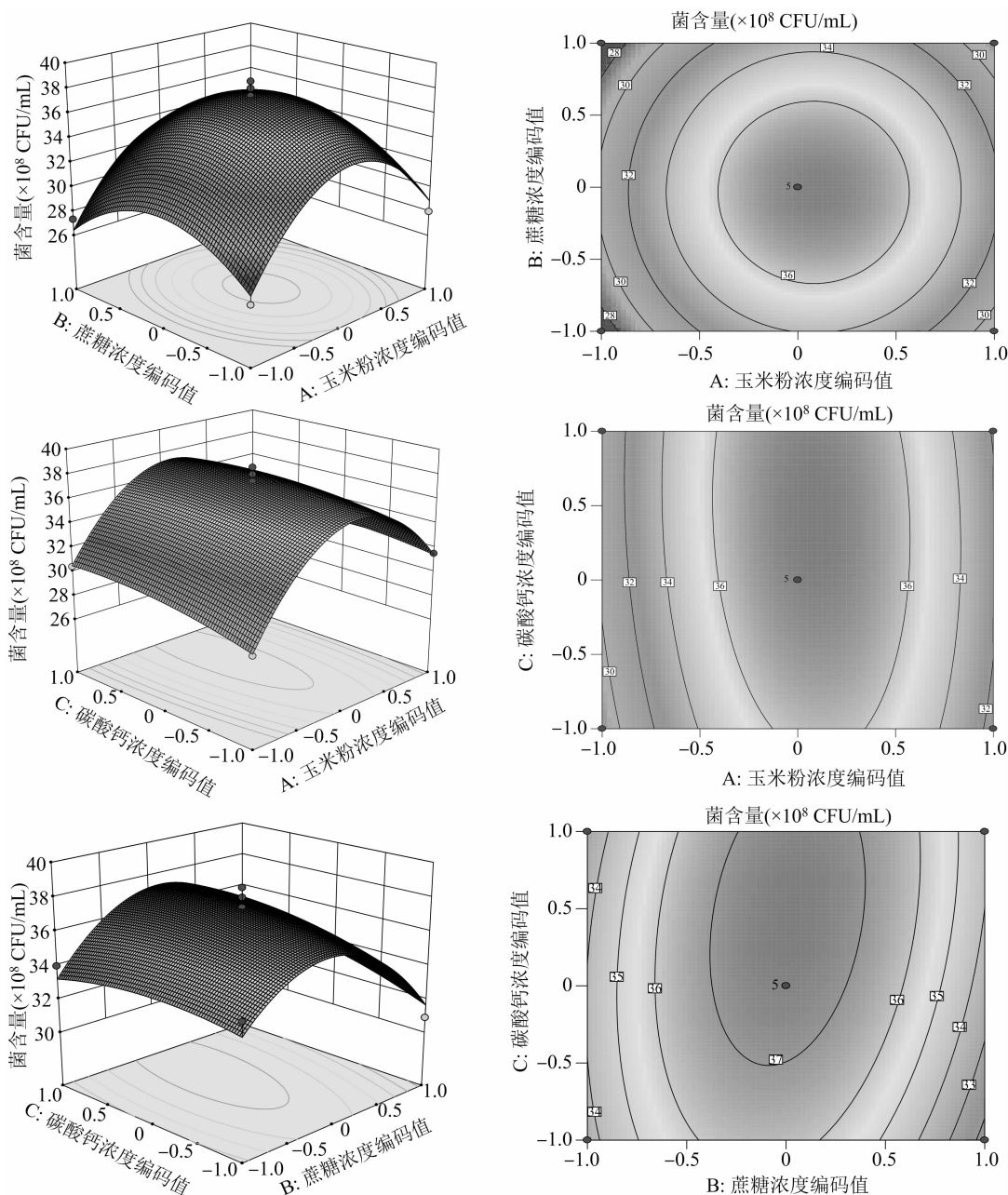


图4 响应面及等高线

2.4.4 优化试验验证 在相同的发酵条件下利用基础培养和优化后的培养基对 YWF-19-0068 菌株进行发酵的结果见表 10。从表 10 中可以看出,采用优化后的培养基进行发酵,菌量为 36.85×10^8 CFU/mL,是基础培养基发酵所得菌量 8.24×10^8 CFU/mL 的 4.47 倍。

3 讨论与结论

国家烟草专卖局提倡绿色防控理念,减少化学农药使用,采用微生物菌剂或其他绿色防控措施替代化学农药,这已经成为烟草病虫害防控的主要思

路。因此,筛选出具有生防功能的微生物,将其应用到烟草生产中,并评价其针对烟草赤星病的防控效果,对烟草赤星病防控、生态环境保护以及人们生命健康具有重大意义^[16]。而在进行工业发酵时,碳源和氮源是微生物细胞和代谢产物的重要营养物质,也是发酵培养基的重要组成部分,不同细菌对各种营养物质的需求量不同。通过优化发酵培养基配方,提高发酵液中的菌含量,为大规模工业化生产奠定基础,有助于降低生产成本,提高制剂的生防效果。

本研究利用烟草鲜样,分离出烟草内生细菌共

表 10 发酵培养基优化前后的结果对比

培养基配方	优化	对照
大豆粉浓度(g/L)	14	14
蛋白胨浓度(g/L)	2	2
鱼粉浓度(g/L)	2	2
蔗糖浓度(g/L)	11	3
玉米粉浓度(g/L)	7	4
碳酸钙浓度(g/L)	5	6
氯化钠浓度(g/L)	0.3	0.3
磷酸二氢钾浓度(g/L)	0.3	0.3
磷酸氢二钾浓度(g/L)	0.3	0.3
硫酸锰浓度(g/L)	0.2	0.2
硫酸镁浓度(g/L)	0.3	0.3
硫酸铵浓度(g/L)	0.5	0.5
菌量(10^8 CFU/mL)	36.85	8.24

计 71 株,编号 YWF-19-0001~YWF-19-0071,并以烟草赤星病病原真菌链格孢菌为指示菌,筛选出 15 株对其具有拮抗作用的菌株。针对其中抑制作用效果较好的菌株进行复筛,最终得到 5 株抑菌带宽 ≥ 10 mm、抑菌率 $\geq 50\%$ 的拮抗菌,编号分别为 YWF-19-0004、YWF-19-0065、YWF-19-0068、YWF-19-0070、YWF-19-0071。

应用 Design-Expert 软件,采用响应面法对抑菌率最高的 YWF-19-0068 菌株进行发酵培养基的优化研究,获得 YWF-19-0068 菌株的优化培养基配方:大豆粉浓度 14 g/L,蛋白胨浓度 2 g/L,鱼粉浓度 2 g/L,蔗糖浓度 11 g/L,玉米粉浓度为 7 g/L,碳酸钙浓度 5 g/L,氯化钠浓度 0.3 g/L,磷酸二氢钾浓度 0.3 g/L,磷酸氢二钾浓度 0.3 g/L,硫酸锰浓度 0.2 g/L,硫酸镁浓度 0.3 g/L,硫酸铵浓度 0.5 g/L。利用优化培养基进行发酵,YWF-19-0068 菌株的菌量为 36.85×10^8 CFU/mL,是基础培养基发酵所得菌量 8.24×10^8 CFU/mL 的 4.47 倍,说明优化培养基能有效提高 YWF-19-0068 菌株的菌量,有助于降低生产成本,具有较高的实用价值。

总而言之,从健康的烟草植株中,可筛选出烟草赤星病高效生防内生细菌,通过对其发酵培养基进行优化研究,可以有效提高生防菌的菌量,为其

规模化生产奠定基础。本研究团队将继续进行烟草内生菌株防治烟草赤星病的研究,旨在将筛选出的菌株制成菌剂应用于田间,并研究其田间验证效果,为烟草内生菌株在烟草赤星病防控方面提供基础及技术支撑,也为其在后期的推广应用提供数据支撑。

参考文献:

- [1] Lucas G B. *Alternaria alternata* (Fries) Keissler, the correct name for *A. tenuis* and *A. longipes*[J]. Tobacco Science, 1971, 15: 37-42.
- [2] 王 佩,欧雅珊,张 强,等. 烟草赤星病研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(21): 33-36.
- [3] 刘 洋,赵正雄. 对烟草赤星病防治的分析与思考[J]. 作物杂志, 2010(3): 87-90.
- [4] 陈利锋,徐敬友. 农业植物病理学:南方本[M]. 北京:中国农业出版社, 2001.
- [5] 姚玉霞,于 莉,程淑云,等. 烟草赤星病发病程度与烟叶内总氮含量关系的初报[J]. 吉林农业大学学报, 1995, 17(3): 99-101.
- [6] 施永平,陈 杰,贾忠建. 异菌脉对烟草赤星病的室内生测及药效评价[J]. 现代农药, 2010, 9(5): 54-56.
- [7] 严清平,袁善奎,王晓军,等. 5 种链格孢属植物病原真菌对 10 种杀菌剂的敏感性比较[J]. 植物保护, 2008, 34(2): 124-127.
- [8] 黄艳飞,汪汉成,陈庆元,等. 六种杀菌剂对烟草赤星病菌菌丝生长和分生孢子萌发的抑制作用[J]. 农药学报, 2016, 18(2): 263-267.
- [9] 雷飞斌. 烟草赤星病菌的抗药性及替代药剂的研究[D]. 杭州:浙江农林大学, 2016: 53-55.
- [10] 李 晶. 烟草赤星病菌拮抗放线菌的筛选、发酵及活性物质研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2008: 2-4.
- [11] 易 龙. 烟草内生与附生细菌互作对赤星病的控病及机理研究[D]. 重庆:西南农业大学, 2004: 1-6.
- [12] 张艳军,郭 荣. 烟草赤星病菌拮抗菌的筛选鉴定及发酵液稳定性分析[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2019, 42(2): 179-183.
- [13] 方敦煌,王 革,马永凯,等. 烟草赤星病菌拮抗微生物的筛选及其对病原的抑制作用[J]. 西南农业学报, 2002, 15(2): 59-61.
- [14] 马冠华,肖崇刚,李浩申. 烟草病原真菌拮抗性内生细菌的筛选[J]. 烟草科技, 2004, 37(8): 44-45.
- [15] 马志远. 烟草赤星病菌拮抗芽孢杆菌的筛选、鉴定及应用研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2012: 18-20.
- [16] 司世飞. 烟草赤星病生防菌筛选及发酵条件优化[D]. 贵阳:贵州大学, 2018: 11-16.