

李颖颖,康业斌,李成军,等. 3 种拮抗烟草疫霉及产 IAA 内生细菌的分离鉴定[J]. 江苏农业科学,2023,51(18):107-114.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.18.016

# 3 种拮抗烟草疫霉及产 IAA 内生细菌的分离鉴定

李颖颖<sup>1</sup>, 康业斌<sup>1</sup>, 李成军<sup>2</sup>, 李淑君<sup>2</sup>

(1. 河南科技大学园艺与植物保护学院,河南洛阳 471000;

2. 烟草行业黄淮烟区烟草病虫害绿色防控重点实验室/河南省农业科学院烟草研究所,河南许昌 461000)

**摘要:**为挖掘河南省洛阳地区烟株体内的内生细菌功能菌株,以期开发优良生防菌剂。采用稀释涂布平板法分离纯化烟株各生育时期内生细菌菌株,采用平板对峙法、生长速率法测定内生菌株对烟草疫霉的抑制作用,紫外分光光度计法测定菌株产生 IAA 的水平。对筛选出的功能内生菌株进行形态学、生理生化鉴定及 16S rDNA、*gyrB* 序列分析鉴定,并测定对种子萌发的促生作用。结果表明,筛选出的 12 株内生菌株的鉴定结果为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)7 株,沙福芽孢杆菌(*B. safensis*)4 株,奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)1 株。芽孢杆菌属占菌株总数的 91.67%,其中菌株 LYYY63-1、LYRY39-1、LYSX141 具有较强的抑制活性,对烟草疫霉的抑菌率分别为 88.10%、84.55% 和 73.33%;沙福芽孢杆菌菌株 LYYY61-2、LYYY117 对烟草疫霉的抑菌率达 62.10%、64.72%;奇异变形杆菌菌株 LYRY45 产 IAA 水平达 11.06 mg/L,具有较高的产 IAA 水平。12 株细菌对烟草 7 种病原真菌具有不同程度的抑制作用,抑菌谱广,对烟草种子根长和总长均有显著的促生效果,其中菌株 LYRY45 的促生效果最为显著,种子萌发生率达 98.00%,处理组根长增长 37.76%,茎长增长 21.43%,总长增长 33.96%。研究分离鉴定了洛阳地区健康烟株中 3 类具有抑菌、促生效能的内生细菌菌株,希望为生防菌防治烟草病害提供理论基础。

**关键词:**烟草疫霉;内生细菌;分子鉴定;IAA;促生作用

**中图分类号:**TS41+4;S435.72 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)18-0107-08

由烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)侵染烟草引起的黑胫病在全球普遍发生,严重威胁烟草农业生产<sup>[1]</sup>。生物防治成为烟草病害防治的发展趋势<sup>[2]</sup>。内生细菌丰富多样,几乎存在于地球上所有的植物中,不少内生细菌具有促进植物生长、提高产品品质与增强植株抗病、抗逆能力的作用<sup>[3]</sup>。陈

泽斌等通过培养皿发芽试验,从烟草植株中初步筛选出 4 株能提高烟草种子发芽率、促进根系生长的内生细菌,浮育苗试验发现用这些内生细菌处理过的烟苗生长发育更好<sup>[4]</sup>。雷丽萍从白肋烟 TN90 中分离出一株内生芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)菌株 WT 能显著降低烟株中的亚硝胺(TSNA)含量<sup>[5]</sup>。邢颖等发现,相比普通烟株,感染内生菌的烟草中亚硝胺类物质含量更低,烟草品质更佳<sup>[6]</sup>。梁志超等发现,用内生解淀粉芽孢杆菌制成微生物功能基质,能达到促生烟苗的效果<sup>[7]</sup>。夏体渊等发现,通过控制生物炭的不同施用量可以调整烟草内生细菌的种类和数量<sup>[8]</sup>。周燕等在黄烟上发现了能够防治

收稿日期:2022-12-27

基金项目:中国烟草总公司重大科技项目(编号:110202101051)。

作者简介:李颖颖(1998—),女,河南洛阳人,硕士研究生,主要从事植物免疫学研究。E-mail:ying18438615889@outlook.com。

通信作者:康业斌,博士,教授,主要从事植物免疫学研究。E-mail:Kangyb999@163.com。

[24] Diabankana R G C, Afordoanyi D M, Safin R I, et al. Antifungal properties, abiotic stress resistance, and biocontrol ability of *Bacillus mojavensis* PS17[J]. *Current Microbiology*, 2021, 78(8):3124-3132.

[25] Borkovich K A, Ebbole D J. Cellular and molecular biology of filamentous fungi[M]. Washington D C: ASM Press, 2010.

[26] Ngolong Ngea G L, Qian X, Yang Q Y, et al. Securing fruit production: opportunities from the elucidation of the molecular mechanisms of postharvest fungal infections[J]. *Comprehensive*

*Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(3):2508-2533.

[27] 张莹莹,郝文娟,李宏玉,等. 一株多黏类芽孢杆菌 *Paenibacillus polymyxa* 菌株 P1 防治广东菜心根肿病的研究[J]. *植物保护*, 2022, 48(1):291-296, 304.

[28] Liu Q L, Zhang R, Xue H L, et al. Ozone controls potato dry rot development and diacetoxyscirpenol accumulation by targeting the cell membrane and affecting the growth of *Fusarium sulphureus*[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2022, 118:101785.

烟草青枯病的内生细菌<sup>[9]</sup>。云南省烟草农业科学研究院建立了国内首个烟草内生菌资源库,保存了具有较高杀线虫活性、提高烟草种子发芽率、促进根系生长与对烟草黑胫病、空茎病、野火病等具有明显拮抗作用的内生菌菌株<sup>[10]</sup>。周岗泉等研究发现,烟草中具有抑菌作用的内生细菌几乎均来自抗病品种,抗病品种比感病品种具有更多的拮抗内生细菌<sup>[11]</sup>。目前,已经报道的烟草内生细菌有 30 多个属,51 个种<sup>[10]</sup>。不同烟草种植地区、不同气候条件和土壤类型,烟草植株体内内生细菌种类和数量存在差异。本研究报道了河南省洛阳地区烟株内生功能细菌的分离鉴定结果,旨在为烟株内生有益微生物的开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试烟草植株 2021 年 6—9 月,选择河南省洛阳市宜阳、汝阳、洛宁、嵩县等 4 个县区烟田,于烟草团棵期、旺长期及成熟期采集健康烟株 164 株,带回实验室备用。

1.1.2 供试菌株和烟草品种 烟草疫霉 (*Phytophthora nicotianae*)、茄病镰刀菌 (*Fusarium solani*)、轮枝镰刀菌 (*F. verticillioides*)、异丝腐霉 (*Pythium diclinum*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*)、层出镰刀菌 (*F. proliferatum*)、葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*) 以及烟草品种 (秦烟 96) 均由河南科技大学植物病害分子鉴定与绿色防控实验室提供。

1.1.3 供试培养基 主要培养基有 NA 培养基、马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基、LB 液体培养基、糖醇发酵培养基、M. R 培养基、淀粉水解培养基、硝酸盐还原培养基、明胶液化培养基、苯丙氨酸脱氨酶培养基、石蕊牛乳培养基、柠檬酸盐培养基、休和赖夫森二氏培养基、半固体琼脂培养基、丙二酸盐培养基<sup>[12]</sup>。

### 1.2 试验时间与地点

烟株样品采集工作于 2021 年 6、7、8、9 月在河南省洛阳市宜阳县石村烟草种植田、河南省洛阳市汝阳县刘家凹烟草种植田、河南省洛阳市洛宁县王村烟草种植田、河南省洛阳市嵩县流涧峪村烟草种植田进行。

其他试验部分于 2021 年 6 月至 2022 年 12 月在河南科技大学植物病害分子鉴定与绿色防控实

验室进行。

### 1.3 试验方法

1.3.1 烟草内生细菌的分离、纯化 将根、茎、叶通过清水冲洗后自然晾干,随机称取 0.4 g,依次用 70% 乙醇、3% 次氯酸钠消毒,无菌水冲洗 3 次,以最后 1 次冲洗的无菌水涂布平板作为空白对照,检验样品表面的微生物是否消毒彻底,通过稀释涂布平板法分离<sup>[13]</sup>。

1.3.2 拮抗烟草疫霉内生细菌的筛选 (1)初筛:采用平板对峙法测定分离所得菌株对烟草疫霉的抑菌率<sup>[13]</sup>。(2)复筛:选择初筛对烟草疫霉抑菌率大于 50% 的内生菌株,通过菌丝生长速率法检验其发酵液对烟草疫霉的抑菌率<sup>[14]</sup>。

1.3.3 产 IAA 内生细菌的筛选 参照桂楚伊的方法制备吡啶 - 3 - 乙酸 (IAA) 标准曲线<sup>[15]</sup>,利用 Salkowski 比色法对菌株产 IAA 能力进行定性、定量测定<sup>[16]</sup>。

1.3.4 内生有益细菌的鉴定 选择对烟草疫霉初筛抑菌率大于 50% 与菌株发酵液 IAA 含量在 3.7 mg/L 以上的菌株进行鉴定。(1)形态学鉴定:采用平板划线法接种待鉴定菌株于 NA 平板,28 ℃ 倒置培养 3 d,至平板长出单一菌落。观察单菌落的颜色、形状、大小、黏稠度、透明度、边缘等形态特征。革兰氏染色和芽孢染色后<sup>[15]</sup>,通过光学显微镜观察菌体和芽孢形态。(2)生理生化鉴定:菌株的 M. R 试验、淀粉水解与糖醇类发酵等生理生化指标测定参照刘丽辉等的方法进行<sup>[17]</sup>。(3)16S rDNA 序列测定:根据生工生物工程(上海)股份有限公司细菌基因组 DNA 试剂盒方法提取 DNA 作为模板,采用细菌通用引物 27F、1492R 进行 PCR 扩增<sup>[18]</sup>。为了使鉴定结果更加准确,同时选用 *gyrB* 基因引物 UP-1、UP-2R 进行扩增测序验证<sup>[19]</sup>。PCR 扩增体系和反应条件见表 1。扩增产物经过电泳检测后,送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果在 GenBank (NCBI) 数据库中进行 BLAST 比对,以同源性较高的模式菌株基因序列作为参比对象,通过 MEGA 7.0 软件构建系统发育树<sup>[20]</sup>。

1.3.5 细菌的抑菌谱测定 采用平板对峙培养法测定 12 株细菌对 7 种烟草病原菌的抑菌谱。以只接种病原真菌为空白对照,28 ℃ 倒置培养 3 ~ 7 d,计算抑菌率。

1.3.6 细菌对烟草种子促生作用的测定 采用培

表 1 通用引物及 PCR 反应信息

引物		序列(5'→3')	反应体系	反应条件
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG		25 μL 反应体系:2 × Es Taq MasterMix 10 μL, 正、反向引物(10 μmol/L) 各 1 μL, DNA 模板 1 μL, 超纯水 12 μL	95 ℃ 5 min; 95 ℃ 45 s, 52 ℃ 40 s, 72 ℃ 90 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min
1492R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA			
UP-1	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA		25 μL 反应体系:2 × Es Taq MasterMix 12.5 μL, 正、反向引物(10 μmol/L) 各 2 μL, DNA 模板 1.5 μL, 超纯水 7 μL	94 ℃ 10 min; 94 ℃ 30 s, 52 ~ 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 60 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min
UP-2R	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTCNCRCTCNGTCAT			

养皿滤纸保湿法测定 12 株细菌对烟草种子萌发率的影响及促生效果<sup>[21]</sup>。将健康的烟草种子置于孢子悬浮液(1 × 10<sup>7</sup> 孢子/mL)中浸泡 16 h,整齐摆放于铺有灭菌脱脂棉和滤纸保湿的培养皿中,以无菌水浸种为空白对照,每皿 30 粒(5 × 6),重复 3 次。第 14 天统计种子萌发率、烟苗根长、茎长和总长(以种子生长节点区分根长和茎长,总长为根长与茎长之和),计算增长率。

增长率 =  $\frac{\text{处理组长度}(\text{cm}) - \text{对照组长度}(\text{cm})}{\text{对照组长度}(\text{cm})} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离

从 164 份烟株样品的根、茎及叶片中分别分离出细菌单菌落 133、99、157 株,依据这些菌株在 NA 培养基上菌落的颜色、形态等特征进行归类,共分离纯化获得 206 株细菌菌株。

2.2 拮抗烟草疫霉菌株的筛选

通过平板对峙法测定 206 株细菌对烟草疫霉的抑菌活性,抑菌率达 50% 以上的有 24 株(表 2),其中菌株 LYYY63-1、LYSX141 的抑菌效果最好,抑菌率分别为 74.79%、72.58%。菌株 LYYY61-2 的抑菌率为 62.10%,抑菌带最大,为 1.48 cm。复筛结果表明,增加拮抗菌的接种量可以明显提高菌株的抑菌效果,当 PDA 培养基中添加菌株发酵液至体积浓度为 10% 时,菌株 LYYY63-1、LYRY39-1、LYSX141 对烟草疫霉的抑菌率分别达到 88.10%、84.55%、73.33%(表 3),说明增加空间用量能有效提高菌株的抑菌作用。

2.3 产 IAA 菌株的筛选

2.3.1 IAA 标准曲线 通过 IAA 不同质量浓度标准品溶液与 Salkowski 比色计进行显色反应,用紫外分光光度计测量样品溶液在波长 535 nm 处的吸光

表 2 内生细菌菌株对烟草疫霉的平板抑制效果

菌株	菌落直径(cm)		抑菌带(cm)	抑菌率(%)
	对照组	处理		
LYYY63-1	6.68	2.13	1.00	74.79
LYSX141	8.00	2.63	1.28	72.58
LYRY25	6.98	2.35	1.12	72.16
LYLN146	6.80	2.51	1.25	69.09
LYRY69-2	6.68	2.48	1.20	69.04
LYRY8	6.98	2.70	1.28	67.06
LYRY39-1	6.98	2.71	0.97	66.27
LYLN27	6.98	2.68	0.49	65.88
LYSX73	5.71	2.35	1.18	65.80
LYYY63-3	6.68	2.70	0.70	65.48
LYYY117	8.02	3.22	1.36	64.72
LYYY61-2	6.80	2.95	1.48	62.10
LYYY7	7.43	3.33	0.90	60.00
LYRY29	6.98	3.20	0.65	59.22
LYRY58-2	6.80	3.28	1.33	56.72
LYYY32	6.98	3.40	0.63	56.08
LYLN43-2	5.72	2.87	1.51	55.70
LYRY107	6.80	3.38	0.47	55.24
LYRY8	6.80	3.38	0.96	55.11
LYRY58-1	5.72	2.95	1.43	54.07
LYRY34	6.98	3.55	1.10	53.73
LYYY96-1	8.02	4.03	0.89	53.71
LYLN116	8.02	4.10	1.00	52.81
LYRY68	6.68	3.63	1.18	50.14

度。IAA 标准品质量浓度分别为 10、20、30、40、50 mg/L 时,测得吸光度分别为 0.238、0.659、0.993、1.326、1.685,得到标准曲线  $y = 0.0356x - 0.0881$ ,  $r^2 = 0.9981$ (图 1)。

2.3.2 IAA 定性测定和定量测定 定性检测筛选出能产生 IAA 的细菌菌株。利用紫外分光光度计法测定菌株发酵液的吸光度,通过 IAA 标准曲线计

表 3 内生细菌菌株发酵液对烟草疫霉的抑菌效果

菌株	抑菌效果(%)		
	1% 发酵液	5% 发酵液	10% 发酵液
LYRY8	-3.81	12.86	22.27
LYRY25	5.24	18.18	60.00
LYLN27	11.43	26.67	51.71
LYRY39-1	-2.73	0.00	84.55
LYRY45	-95.71	13.33	57.62
LYYY61-2	6.19	23.36	71.82
LYYY63-1	-12.86	28.57	88.10
LYYY63-3	7.14	3.33	57.14
LYRY69-2	-2.86	12.38	66.19
LYSX73	3.81	9.05	44.29
LYYY117	7.14	12.73	50.91
LYSX141	-4.76	14.92	73.33

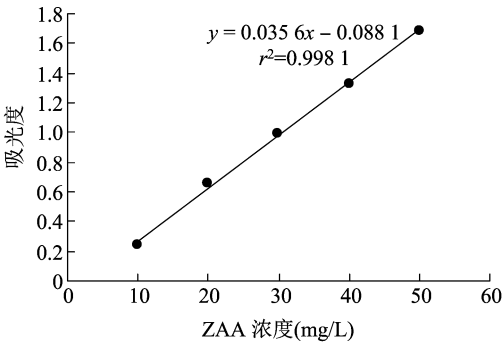


图1 紫外分光光度法的吡啶-3-乙酸标准曲线

算出各菌株产 IAA 含量,IAA 产量在 7 mg/L 以上的有 28 株(表 4)。

表 4 产吡啶-3-乙酸优势菌株的筛选结果

菌株	$D_{535\text{ nm}}$	吡啶-3-乙酸产量 (mg/L)	菌株	$D_{535\text{ nm}}$	吡啶-3-乙酸产量 (mg/L)
LYRY25	0.16	7.01	LYYY117	0.19	7.84
LYRY23-2-1	1.09	32.97	LYRY99-1	0.29	10.71
LYRY69-3	0.44	14.93	LYRY89-2	0.26	9.90
LYSX127	0.40	13.82	LYRY82	0.26	9.87
LYRY120	0.24	9.22	LYSX97	0.23	8.84
LYRY49	0.24	9.10	LYRY54-2	0.21	8.35
LYRY17	0.23	8.94	LYRY39-1	0.21	8.28
LYRY101	0.20	8.22	LYLN116	0.20	8.06
LYRY26	0.30	10.96	LYYY83	0.25	9.50
LYSX141	0.18	7.63	LYRY98	0.17	7.31
LYRY84	0.18	7.58	LYYY105-1	0.17	7.19
LYRY45	0.31	11.06	LYRY76-2	0.20	8.02
LYYY66-3	0.17	7.14	LYRY16	0.16	7.10
LYRY89-1	0.16	7.05	LYRY148	0.16	7.05

2.4 烟草内生功能细菌的鉴定

2.4.1 形态学特征 供试菌株在 NA 平板上划线接种,置于 28 ℃ 条件下恒温培养 3 d,大部分菌株呈现乳白色和白色,少部分呈现黄色,菌落整体上不透明,多为圆形或者近圆形。大小、表面特征和黏稠度特征存在差异。12 株细菌革兰氏染色结果表明,其中 5 株为阳性反应,7 株为阴性反应(表 5)。菌体呈杆状,少数为卵球形,部分产芽孢,呈柱形。

2.4.2 生理生化鉴定 生理生化试验结果表明,12 株细菌多为兼性厌氧细菌,菌株 LYRY8、LYYY63-1

表 5 12 株内生细菌的形态特征

菌株	菌落形态								菌体形状	革兰氏反应
	形状	大小	颜色	透明度	边缘	表面	黏稠性	背面		
LYRY8	圆形	中	浅黄	不透明	整齐	光滑,凸起	不太黏稠	浅黄	杆状	+
LYRY25	圆形	中	浅黄	不透明	整齐	不光滑,中心凸起	不黏稠	浅黄	长杆状	+
LYLN27	近圆形	大	乳白	半透明	整齐	光滑,凸起	黏稠	乳白	长杆状	-
LYRY39-1	近圆形	中	乳白	不透明	不整齐	不光滑,平整	不黏稠	乳白	长杆状	-
LYRY45	圆形	小	浅白	透明	整齐	光滑,凸起	不黏稠	浅白	球状	+
LYYY61-2	圆形	中	黄	不透明	整齐	光滑,凸起	不太黏稠	黄	杆状	-
LYYY63-1	近圆形	中	白	不透明	不整齐	不光滑,平整	黏稠	白	长杆状	+
LYYY63-3	近圆形	中	白	不透明	不整齐	不光滑,平整	黏稠	白	长杆状	-
LYRY69-2	近圆形	中	白	不透明	不整齐	不光滑,平整	黏稠	白	杆状	-
LYSX73	近圆形	中	白	不透明	不整齐	不光滑,较平整,粉状	不黏稠	浅白	长杆状	+
LYYY117	近圆形	小	黄	不透明	整齐	不光滑,凹陷	不太黏稠	黄	杆状	-
LYSX141	圆	中	乳白	不透明	不整齐	不光滑,皱缩	不黏稠	乳白	长杆状	-

注:“+”表示阳性反应;“-”表示阴性反应。

表 6 12 株内生细菌的生理生化检验结果

反应类别	反应名称	LYRY8	LYRY25	LYLN27	LYRY39-1	LYRY45	LYYY61-2	LYYY63-1	LYYY63-3	LYRY69-2	LYSX73	LYYY117	LYSX141
生理特征	厌氧性	+	±	±	±	±	±	+	±	±	±	±	±
	柠檬酸盐	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	丙二酸盐	-	-	-	W	-	W	W	W	-	-	-	-
	运动性	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
生化特征	氧化酶	Y	+	-	Y	-	+	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	接触酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	甲基红	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	乙酰甲基甲醇	W	-	W	+	+	W	+	+	W	+	+	W
	淀粉水解	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
	硝酸盐还原	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
	明胶液化	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	石蕊牛乳	A	A *	A *	A *	A	A *	A *	A *	A *	A *	A	A *
	苯丙氨酸脱氢	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	葡萄糖	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+
	蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	乳糖	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	甘露醇	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“+”表示阳性反应；“++”表示产酸产气反应；-表示阴性反应；±表示兼性反应；W表示弱阳反应；A\*表示产酸脲化反应；Y表示延迟反应。

为厌氧性菌。柠檬酸盐利用、接触酶、明胶液化和产酸反应试验结果呈阳性,具有一定的运动性。可以利用葡萄糖、蔗糖和甘露糖,大部分能够利用石蕊产酸,菌株 LYRY45 利用葡萄糖时能够产气(表 6)。结合《常见细菌系统鉴定手册》将 11 株拮抗细菌鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.),菌株 LYRY45 鉴定为变形杆菌属(*Proteus* sp.)。

2.4.3 12 株内生细菌 16S rDNA 序列分析 将测序得到的 12 株细菌基因序列上传至 GenBank 数据库(获得登录号分别为 OP646622、OP646623、OP646624、OP646625、OP646626、OP503441、OP646627、OP646628、OP646629、OP646630、OP646631、OP646632),并将基因测序结果进行序列分析及同源性对比。结果表明,菌株 LYRY8 的基因序列与 *B. safensis* EGI287 (MN704552.1) 同源相似性为 99.68%,菌株 LYYY61-2 和 LYRY69-2 与 *B. safensis* S21 (MN062620.1) 同源相似性为 99.55%,菌株 LYYY117 与 *B. safensis* EGI287 (MN704552.1) 同源相似性为 98.39%,菌株 LYRY25 与 *B. subtilis* JX-2 (KX708699.1) 同源相似性为 99.28%,菌株 LYLN27 与 *B. subtilis* H10-7 (FJ392727.1) 同源相似性为 99.37%,菌株 LYRY39-1

与 *B. subtilis* UK19 (ON357947.1) 同源相似性为 97.53%,菌株 LYYY63-1 与 *B. subtilis* B11 (KJ870191.1) 同源相似性为 98.50%,菌株 LYYY63-3 与 *B. subtilis* HGUP332 (MK103123.1) 同源相似性为 97.81%,菌株 LYSX73 与 *B. subtilis* SRCM102750 (CP028215.1) 同源相似性为 98.69%,菌株 LYSX141 与 *B. subtilis* ACHB-2 (KU867636.1) 同源相似性为 99.46%。构建系统发育树(图 2)发现有 4 株细菌与沙福芽孢杆菌位于同一进化分支,亲源关系最近;另 7 株细菌与枯草芽孢杆菌位于同一进化分支,亲源关系最近。菌株 LYRY45 与 *Proteus mirabilis* M3-1-17 (CP053681.1) 同源相似性为 99.13%。构建系统发育树(图 3)发现 LYRY45 与奇异变形杆菌位于同一进化分支。*gyrB* 序列测定结果也与上述一致。

结合形态学鉴定、生理生化检验及 16S rDNA 序列分析,将 YRY25、LYLN27、LYRY39-1、LYYY63-1、LYYY63-3、LYSX73、LYSX141 菌株鉴定为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*),LYRY8、LYRY61-2、LYRY69-2、LYYY117 菌株鉴定为沙福芽孢杆菌(*B. safensis*),均属厚壁菌门,芽孢杆菌纲,芽孢杆菌目,芽孢杆菌科,芽孢杆菌属。LYRY45 菌株鉴定为

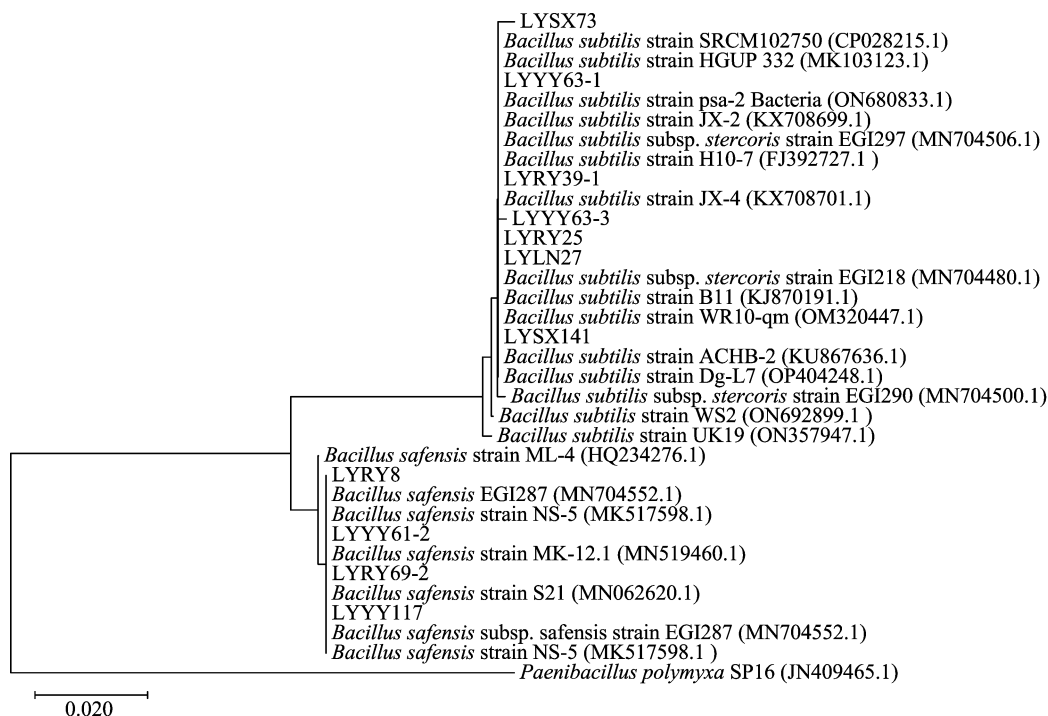


图2 基于枯草芽孢杆菌和沙福芽孢杆菌 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

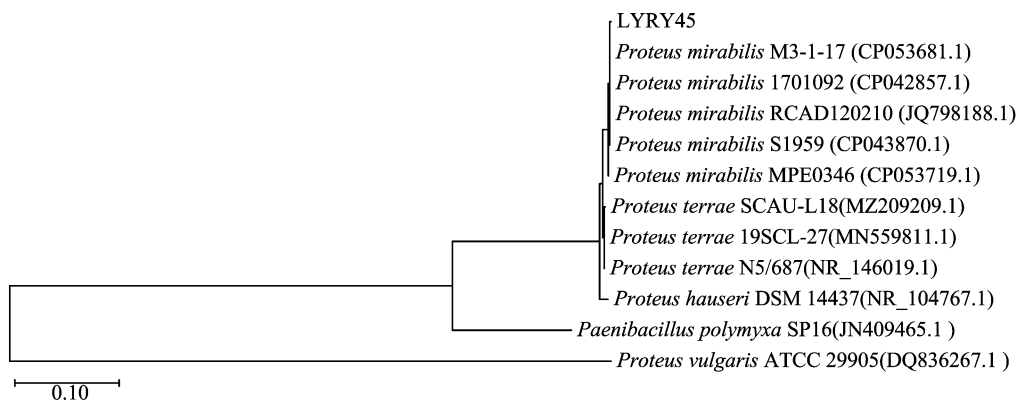


图3 基于奇异变形杆菌 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

奇异变形杆菌 (*P. mirabilis*), 属变形菌门, 变形菌纲, 肠杆菌目, 肠杆菌科, 变形杆菌属。

## 2.5 功能细菌的抑菌谱测定

试验结果证明, 12 株功能细菌对 7 种常见的烟草病原真菌均表现出不同程度的拮抗作用, 抑菌率介于 0.68% ~ 71.28% (表 7), 具有较好的抑菌广谱性。对比结果发现, 12 株细菌对轮枝镰刀菌、异丝腐霉和立枯丝核菌的拮抗效果最好, 抑菌率平均值高于其他病原真菌。沙福芽孢杆菌菌株 LYRY61-2、LYRY8、LYRY117 对立枯丝核菌的防治效果最好, 抑菌率分别为 71.28%、70.95%、61.15%。

## 2.6 功能细菌对烟草种子促生作用的测定

培养皿滤纸保湿法结果显示 (表 8), 浸种处理

后, 除菌株 LYRY8、LYLN27、LYSX73 未表现出明显促生作用外, 9 株细菌的萌发率、根长均高于空白对照组。菌株 LYRY45 促生效果显著, 出芽率达到 98%, 促进根部生长 37.76%, LYRY117 菌株次之。

## 3 讨论与结论

烟草中已报道的内生细菌资源包括芽孢杆菌属、微杆菌属、变形杆菌属、假单胞菌属等<sup>[6]</sup>。陈泽斌等报道芽孢杆菌是烟草内生菌的优势类群<sup>[22-23]</sup>。本研究筛选出的 12 株内生细菌, 有 11 株鉴定为芽孢杆菌属, 占比 91.67%, 与陈泽斌等的报道<sup>[22]</sup>相符。杨桃从烟株上分离出内生枯草芽孢杆菌 Itb57, 证实该菌株对烟草疫霉抑菌效果良好, 研究发现其

表 7 12 株细菌对常见烟草病原真菌的抑制作用

菌株	对病原菌的抑菌率(%)						
	茄病镰刀菌	轮枝镰刀菌	异丝腐霉	立枯丝核菌	尖孢镰刀菌	层出镰刀菌	葡萄座腔菌
LYRY8	16.60	20.50	28.99	70.95	27.65	16.97	16.98
LYRY25	36.60	34.73	40.34	18.58	53.41	23.39	27.04
LYLN27	60.00	42.26	66.39	36.15	48.48	19.27	38.36
LYRY39-1	21.28	26.36	21.01	27.03	24.62	25.23	25.79
LYRY45	25.11	24.69	12.18	1.69	21.21	24.31	11.95
LYYY61-2	25.96	27.62	23.95	71.28	21.97	22.48	17.61
LYYY63-1	41.28	54.81	50.00	2.70	30.68	26.61	18.87
LYYY63-3	16.60	8.79	4.20	0.68	2.27	13.30	8.81
LYRY69-2	10.21	26.36	18.07	4.73	21.97	25.23	18.24
LYSX73	34.47	60.25	58.82	29.73	35.23	35.78	16.98
LYYY117	25.11	28.03	31.93	61.15	19.70	21.10	18.24
LYSX141	56.60	33.05	41.18	50.68	39.39	25.46	22.64

表 8 12 株细菌悬浮液浸种对种子萌发及生长的影响

处理	萌发情况		根长		茎长		总长	
	出芽数 (个)	萌发率 (%)	根长 (cm)	增长率 (%)	茎长 (cm)	增长率 (%)	总长 (cm)	增长率 (%)
CK	23.00 ± 1.73ef	80.00	0.98 ± 0.25bc		0.35 ± 0.13ab		1.33 ± 0.33c	
LYRY8	26.00 ± 1.73bcd	86.67	0.95 ± 0.17c	-3.06	0.34 ± 0.09ab	-3.57	1.29 ± 0.19c	-2.83
LYRY25	28.00 ± 1.00abc	93.33	1.00 ± 0.08bc	2.04	0.35 ± 0.04ab	0.00	1.35 ± 0.09c	1.89
LYLN27	26.00 ± 0.00bcd	86.67	0.98 ± 0.02bc	0.00	0.35 ± 0.06ab	0.00	1.33 ± 0.07c	0.63
LYRY39-1	28.33 ± 0.58ab	93.33	1.21 ± 0.22ab	23.47	0.23 ± 0.05b	-35.71	1.44 ± 0.26bc	11.95
LYRY45	27.00 ± 1.00abcd	98.00	1.35 ± 0.13a	37.76	0.43 ± 0.15a	21.43	1.78 ± 0.05a	33.96
LYYY61-2	26.00 ± 1.00bcd	86.67	1.00 ± 0.09bc	2.04	0.38 ± 0.02a	8.57	1.38 ± 0.09bc	4.15
LYYY63-3	25.33 ± 1.53de	86.67	1.00 ± 0.08bc	2.04	0.38 ± 0.03a	7.14	1.37 ± 0.09bc	3.40
LYYY63-9	27.00 ± 1.73abcd	90.00	1.00 ± 0.14bc	2.04	0.36 ± 0.03ab	2.86	1.36 ± 0.16bc	2.26
LYRY69-2	25.67 ± 1.53cd	86.67	1.03 ± 0.10bc	5.10	0.35 ± 0.09ab	0.00	1.38 ± 0.12bc	3.77
LYSX73	21.67 ± 1.15f	76.67	1.00 ± 0.14bc	2.04	0.33 ± 0.02ab	-5.71	1.33 ± 0.13c	0.38
LYYY117	29.00 ± 1.00a	96.67	1.20 ± 0.11ab	22.45	0.43 ± 0.01a	22.86	1.63 ± 0.12ab	23.02
LYSX141	26.67 ± 0.58abcd	90.00	1.10 ± 0.07bc	12.24	0.40 ± 0.08a	14.29	1.50 ± 0.04abc	13.21

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

抑菌活性与蛋白物质有关<sup>[24]</sup>。马冠华等先后报道了枯草芽孢杆菌对烟草黑胫病、烟草青枯病具有良好的防治效果<sup>[25-27]</sup>。本试验得到的 7 株枯草芽孢杆菌对茄病镰刀菌、轮枝镰刀菌、异宗腐霉、立枯丝核菌以及尖孢镰刀菌均表现出明显的抑制作用。菌株 LYYY63-1、LYRY39-1、LYSX141 对烟草疫霉的平板抑制拮抗效果可达 88.10%、84.55% 和 73.33%，形态和颜色特征与马冠华分离鉴定的 Iib57 菌落较相似<sup>[25]</sup>，生理生化特征略有差异，分析这与菌落培养环境条件不同有关。

沙福芽孢杆菌作为生防内生细菌，目前已在核桃、槐树、瓜果类和木豆等植物体内发现<sup>[28-31]</sup>，烟草

方面相关研究甚少。焦蓉等曾在烟草种子部位发现一株具有拮抗和促生作用的沙福芽孢杆菌菌株 YN201702<sup>[32]</sup>。本研究获得的沙福芽孢杆菌菌株 LYRY8、LYYY117、LYYY61-2 对烟草疫霉的室内抑菌率分别达到 67.06%、64.72% 和 62.10%，菌株 LYRY69-2 的抑菌率为 69.04%，在烟草植株的茎部、叶部均有分离发现，具备作为生防菌的良好潜力。抑菌谱试验结果说明菌株 LYRY8、LYYY61-2、LYYY117 针对立枯丝核菌具有显著的抑制效果。烟种经菌株 LYYY117 发酵液处理后，萌发率达到 96.67%，较空白对照组根长、茎长及总长指标均具有明显提高。相比于室内培养，室外田间环境易受

各种因素干扰影响,情况更加复杂多变,生防菌的作用效果尚需要结合盆栽或田间试验进行验证。

本研究首次于烟株体分离出奇变形杆菌菌株 LYRY45。奇异变形杆菌常作为动物体的病原菌存在<sup>[33]</sup>。试验分离得到的菌株 LYRY45 相比其他 11 株细菌产 IAA 含量更高,在 LB 液体培养基中 IAA 产量为 11.06 mg/L。种子萌发试验的萌发率达 98.00%,促进根长增长 37.76%,茎长增长 21.43%,总长增长 33.96%,其促生效果明显高于其他菌株处理,与 IAA 含量测定试验结果一致,促进作用显著。内生菌促生作用的机制途径复杂,这种产生植物生长素的机制在烟株体内能否表达及对植株生长的促进作用是否稳定仍需验证研究。

本研究筛选得到的 12 株烟草内生细菌,经鉴定为枯草芽孢杆菌、沙福芽孢杆菌、奇异变形杆菌 3 类,对烟草疫霉具有显著的抑制作用及产 IAA 能力,抑菌谱广且具备一定的促生作用,具有较好的应用潜力。

#### 参考文献:

- [1] Xie Y H, Zhang Y G, Zhu L Q, et al. Progress on integrated control of tobacco black shank[J]. Agricultural Biotechnology, 2015, 4(4): 37–41.
- [2] 易 龙, 邱妙文, 陈永明, 等. 烟草黑胫病的生物防治研究进展[J]. 中国农学通报, 2017, 33(25): 146–151.
- [3] Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms[J]. Journal of Natural Products, 2004, 67(2): 257–268.
- [4] 陈泽斌, 杨跃华, 夏振远, 等. 烟草内生促生细菌的筛选及在漂浮育苗中的应用效果[J]. 中国烟草学报, 2013, 19(1): 70–75.
- [5] 雷丽萍. 烟草内生芽孢杆菌降低烟叶亚硝胺类物质含量的研究[J]. 西南农业学报, 2007, 20(3): 515–520.
- [6] 邢 颖, 张 莘, 郝志鹏, 等. 烟草内生菌资源及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 411–419.
- [7] 梁志超, 杨国萍, 白 兵, 等. 烟草内生细菌 YN201448 用于烟苗基质和肥料的潜力研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2019, 34(5): 838–844.
- [8] 夏体渊, 陈泽斌, 靳 松, 等. 生物炭不同施用量对烟草内生细菌多样性的影响[J]. 西南农业学报, 2017, 30(12): 2711–2716.
- [9] 周 燕, 成志军, 易有金, 等. 晒黄烟内生菌株筛选及对青枯病生物防治[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2005, 31(5): 500–501.
- [10] 云南省烟草农业科学研究院. 烟草内生菌研究与应用[J]. 中国烟草学报, 2013, 19(1): 101.
- [11] 周岗泉, 张建华, 陈泽鹏, 等. 烟草内生细菌及其对烟草青枯病的生物防治研究[J]. 中国烟草学报, 2008, 14(2): 31–34.
- [12] 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: 364–370.
- [13] 宋喜乐. 洛阳地区烟草根际土壤拮抗细菌的筛选鉴定[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2017: 15–16.
- [14] 姚晨虢. 烟草镰刀菌根腐病生防细菌与真菌的鉴定筛选[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2022: 16.
- [15] 桂楚伊. 三株番茄根内生细菌产 IAA 能力的测定及其应用研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2020: 25–26.
- [16] 李振东, 陈秀蓉, 李 鹏, 等. 珠芽蓼内生菌 z5 产 IAA 和抑菌能力测定及其鉴定[J]. 草业学报, 2010, 19(2): 61–68.
- [17] 刘丽辉, 彭桂香, 黄淑芬, 等. 落地生根内生固氮菌多样性和促生特性[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2538–2547.
- [18] 金玲月, 路晶晶, 冯燕辉, 等. 患根结线虫病番茄根内生固氮菌的筛选、鉴定和系统发育分析[J]. 福建农业科技, 2020, 51(12): 46–51.
- [19] 蔡红艳, 方玉洁, 于可艺, 等. 基于 16S rRNA 和 *gyrB* 基因的施万菌种水平鉴定分析[J]. 疾病监测, 2021, 36(1): 42–47.
- [20] 张飞官, 高雅慧, 任慧爽, 等. 桑疫病病原拮抗菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学报, 2013, 53(12): 1285–1294.
- [21] 姚晨虢, 李小杰, 李 琦, 等. 烟草尖孢镰刀菌拮抗真菌的筛选鉴定及促生作用研究[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(5): 1066–1072.
- [22] 陈泽斌, 夏振远, 雷丽萍, 等. 烟草内生细菌种群特征分析[J]. 中国烟草学报, 2014, 20(3): 102–107.
- [23] 陈泽斌, 黄 丽, 夏振远, 等. 云南不同地区烟草内生细菌多样性特征[J]. 西南农业学报, 2015, 28(2): 857–861.
- [24] 杨 桃. 内生枯草芽孢杆菌 Itb57 对烟草疫霉菌的抑制机理[D]. 重庆: 西南大学, 2015: 16–21.
- [25] 马冠华, 周常勇, 肖崇刚, 等. 烟草内生细菌 Itb57 的鉴定及其对烟草黑胫病的防治效果[J]. 植物保护学报, 2010, 37(2): 148–152.
- [26] 易有金, 肖浪涛, 王若仲, 等. 内生枯草芽孢杆菌 B-001 对烟草幼苗的促生作用及其生长动态[J]. 植物保护学报, 2007, 34(6): 619–623.
- [27] 彭细桥, 刘红艳, 罗 宽, 等. 烟草内生青枯病拮抗细菌的筛选和初步鉴定[J]. 中国烟草科学, 2007, 28(2): 38–40.
- [28] 张知晓, 户连荣, 刘 凌, 等. 生防 *Bacillus safensis* 的鉴定及其对核桃病原菌的抑菌特性[J]. 河南农业科学, 2020, 49(12): 97–104.
- [29] 王 红. 砂生槐内生细菌的分离鉴定及生防潜力研究[D]. 林芝: 西藏农牧学院, 2021: 29.
- [30] 张 玲, 张荣意, 刘盛科, 等. 瓜类细菌性果斑病菌拮抗细菌的筛选及其抑菌作用[J]. 生物技术通报, 2023, 39(1): 253–263.
- [31] 唐佩佳. 一株大豆促生 *Bacillus safensis* J2 的分离、筛选及其促生功能研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021: 11.
- [32] 焦 蓉, 刘剑金, 杨焕文, 等. 抑制烟草黑胫病菌和促烟草幼苗生长内生菌的分离与鉴定[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2018, 33(6): 1037–1045.
- [33] 王 涛, 马 轲, 张建刚, 等. 长春地区鸡源奇异变形杆菌的分离鉴定及毒力分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 4987–4998.