

汤鸣强,叶 雯,何爱明,等. 烟草青枯病拮抗菌 *Streptomyces* FQ-8 分离筛选与抑菌活性物质研究[J]. 江苏农业科学,2023,51(22):125-131.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.22.018

烟草青枯病拮抗菌 *Streptomyces* FQ-8 分离筛选 与抑菌活性物质研究

汤鸣强^{1,2}, 叶 雯¹, 何爱明^{1,2}, 吴承燕^{1,2}, 李小芳¹

(1. 福建技术师范学院食品与生物工程学院, 福建福清 350300; 2. 现代设施农业福建省高校工程研究中心, 福建福清 350300)

摘要:利用生防菌株及其代谢产物防治烟草青枯病是近年来的研究热点。从福建省龙岩市发病烟草根际土壤分离到一株烟草青枯病菌 XQ23 及其拮抗菌株链霉菌 FQ-8。分离提取该菌株所产抑菌活性物质,采用琼脂扩散法研究抑菌活性物质与 72% 农用硫酸链霉素、25% 多菌灵可湿性粉剂、80% 乙蒜素乳油、3% 中生菌素可湿性粉剂、75% 百菌清可湿性粉剂及 1.8% 辛菌胺醋酸盐水剂 6 种常见杀菌剂的抑菌特性,采用紫外及红外扫描技术研究抑菌活性物质的结构特征。结果表明,拮抗菌抑菌活性物质室内毒力与 3% 中生菌素可湿性粉剂相近,低于 72% 农用硫酸链霉素和 1.8% 辛菌胺醋酸盐水剂,高于 80% 乙蒜素乳油。烟草青枯病菌对拮抗菌株链霉菌 FQ-8 抑菌活性物质的敏感性高于 6 种常见杀菌剂。紫外及红外扫描结果显示,链霉菌 FQ-8 所产抑菌活性物质可能是一种含有酰胺键(—CO—NH₂)的糖肽类化合物。研究表明,拮抗菌 FQ-8 可能是一株新发现的烟草青枯病生防菌,所产生的活性物质有望用于烟草青枯病的防治。

关键词:烟草青枯病;拮抗菌活性物质;抑菌特性;分离筛选;室内毒力

中图分类号:S482.2;S435.72 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)22-0125-07

由茄科劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的烟草青枯病是一种毁灭性土传性病害^[1]。该病菌喜高温,寄主范围广泛,近年来呈增长趋势,防治非常困难^[2]。2015 年青枯病发病面积为 8.7 万 hm² 左右,约造成 5.5 亿元的经济损失^[3]。当前,化学药剂防治依然是最有效、最简单、最容易被烟农接受的

防治措施之一^[4]。但长期高频、单一使用化学药剂,容易导致病原菌产生抗药性、农药残留及土壤微生物生态平衡失调,致使土壤抵抗病原菌的能力降低^[5-6]。生物防治因其环境友好、不易形成抗性等优点为人们所重视^[7],特别是利用高效生防菌株及其代谢产物防治烟草青枯病成为研究的热点^[8-9]。目前,国内相关研究主要集中于对拮抗菌的分离筛选鉴定及其室内外抑菌效果,有关抑菌活性物质组分、性质及其作用机理的研究比较欠缺。赵倩等从烟草根际土壤中筛选枯草芽孢杆菌 CLB-17,该菌所产生的代谢物对烟草青枯病菌抑

收稿日期:2023-03-22

基金项目:中国烟草总公司福建省公司科技项目(编号:20173500024112)。

作者简介:汤鸣强(1966—),男,福建霞浦人,博士,教授,从事微生物技术研究。E-mail:mq1-1022@163.com。

国水稻科学,2021,35(1):1-10.

[11] 林付根,黄婷婷,陈永明,等. 2015 年盐城市小麦赤霉病的发生特点与防治对策探讨[J]. 安徽农业科学,2016,44(5):47-48,51.

[12] 王凤云,栗 寒,倪珏萍,等. 2-氧基-3-取代苯基丙烯酸酯类化合物、组合物及其制备方法以及在农作物杀菌剂上的应用:CN1160318C[P]. 2004-08-04.

[13] 王龙根,倪珏萍,王凤云,等. 新杀菌剂 JS399-19 的生物活性研究[J]. 农药,2004,43(8):380-383.

[14] 刁亚梅,倪珏萍,马亚芳,等. 创制杀菌剂氧烯菌酯的应用研究[J]. 植物保护,2007,33(4):121-123.

[15] 刁亚梅,朱桂梅,潘以楼,等. 氧烯菌酯(JS399-19)防治水稻恶苗病的研究[J]. 现代农药,2006,5(1):14-16,19.

[16] 车晋英,朱展飞,卞康亚,等. 大丰区小麦赤霉病农药减量增效技术研究[J]. 安徽农学通报,2018,24(19):57-58,131.

[17] 徐 超,陈宏州,吴雨琦,等. 2017—2021 年江苏省小麦赤霉病菌群体对 4 种杀菌剂的抗药性监测[J]. 植物保护,2022,48(6):341-345,367.

[18] 史建荣,刘 馨,仇剑波,等. 小麦中镰刀菌毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇污染现状与防控研究进展[J]. 中国农业科学,2014,47(18):3641-3654.

[19] Hou Y P, Qu X P, Mao X W, et al. Resistance mechanism of *Fusarium fujikuroi* to phenamacril in the field[J]. Pest Management Science,2018,74(3):607-616.

[20] 陈宏州,周 晨,庄义庆,等. 江苏省水稻恶苗病菌种群鉴定及抗药性检测[J]. 植物保护,2022,48(2):48-62.

菌带宽度为 7.11 mm^[10]。孙新城等筛选到的链霉菌所产生拮抗物质在 100 ℃ 以下对烟草青枯病菌都具有较强的抑菌活性,耐热性好,pH 值为 3.8 ~ 9.0 时拮抗能力无明显差异^[11]。董昆明等分离筛选到 1 株细菌 5B18,对烟草青枯病菌具有强烈拮抗活性,其提取物为 13 种不同化合物组成的混合物^[12]。

本项目前期获得 1 株对烟草青枯病菌有良好拮抗效果的链霉菌 FQ-8 菌株。该菌抑菌机理及其活性物质的研究有待开展。笔者所在课题组于 2020 年 8—12 月,在现代设施农业福建省高校工程研究中心微生物室,采用摇瓶发酵方式,发酵液经离心、过滤、萃取、浓缩,获得抑菌活性物质粗提物;采用紫外扫描及红外扫描分析其结构特征,推测抑菌活性物质的可能成分与结构;应用琼脂扩散法比较链霉菌 FQ-8 菌株所产抑菌活性物质与 6 种常见的烟草青枯病菌杀菌剂的防治效果,以期为该菌的开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株 烟草青枯病菌 XQ23 菌株 (*Ralstonia solanacearum* XQ23) 的分离筛选参考文献^[13]。分菌株置于 -80 ℃、25% 甘油中保存。烟草青枯病拮抗菌 FQ-8 菌株 (*Streptomyces* FQ-8), 分离自福建省龙岩市烟田发病烟草植株根际土壤,于福建技术师范学院微生物实验室保存。

1.1.2 主要药品 72% 农用硫酸链霉素可溶性粉剂(华北制药河北华诺有限公司);25% 多菌灵可湿性粉剂(四川国光农化股份有限公司);80% 乙蒜素乳油(河南科邦化工有限公司);3% 中生菌素可湿性粉剂(福建凯立生物制品有限公司);75% 百菌清可湿性粉剂(霍州市绿洲农药有限公司);1.8% 辛菌胺醋酸盐水剂(西安近代农药科技股份有限公司)。其他药品均为国产分析纯。

1.1.3 培养基 高氏 1 号培养基:20.0 g/L 可溶性淀粉,0.5 g/L K₂HPO₄ · 3H₂O,0.5 g/L MgSO₄ · 7H₂O,0.5 g/L NaCl,1.0 g/L KNO₃,0.01 g/L FeSO₄ · 7H₂O,pH 值为 7.4 ~ 7.6。

NA 培养基:3.0 g/L 牛肉膏粉,10.0 g/L 蛋白胨,5.0 g/L 氯化钠,pH 值为 7.1 ~ 7.5。

TTC 培养基:3.0 g/L 大豆胨,17.0 g/L 胰蛋白胨,2.5 g/L 氯化钠,6.0 g/L 葡萄糖,0.5 g/L 硫乙

醇酸钠,0.25 g/L L-胱氨酸,0.1 g/L 亚硫酸钠,pH 值为 7.1 ~ 7.3。

种子培养基:20.0 g/L 可溶性淀粉,1.0 g/L KNO₃,0.5 g/L NaCl,0.5 g/L K₂HPO₄,0.5 g/L MgSO₄,0.01 g/L FeSO₄ · H₂O。

基础发酵培养基:30.0 g/L 大豆粉,20.0 g/L 可溶性淀粉,2.0 g/L CaCO₃,2.0 g/L NaCl。

优化后基础培养基:30.0 g/L 氯化铵,20.0 g/L 蔗糖,2.0 g/L CaCO₃,2.0 g/L NaCl,pH 值为 7.0。

1.1.4 主要仪器 LDZX-50KB 手轮立式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);NRY-2102C 恒温培养振荡器(上海南荣试验室设备有限公司);H1850R 高速台式冷冻离心机(上海湘仪室仪器开发有限公司);SHZ-D(III)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);RE-100 旋转蒸发仪[维根技术(北京)有限公司];FD-IE 台式冷冻干燥机(北京德天佑科技发展有限公司);UV-1800PC-ds2 紫外分光光度计(上海美普达仪器有限公司);Nicolet80 红外光谱仪(美国尼高力仪器公司)。

1.2 烟草青枯病拮抗菌的分离培养

参照文献^[13]进行烟草青枯病拮抗菌的分离培养。

1.3 拮抗菌发酵培养及其活性检测

1.3.1 拮抗菌种子液制备 取 1 环烟草青枯病拮抗菌 FQ-8 孢子,接种于 100 mL 种子培养基中,于 28 ℃、200 r/min 培养 24 h。

1.3.2 拮抗菌抑菌活性检测 采用琼脂扩散法检测拮抗菌抑菌活性^[14]。接种后的基础发酵培养基于 28 ℃、180 r/min 振荡培养 6 d,发酵液经离心去杂蒸发浓缩后用 0.22 μm 微孔滤膜除菌。移取 200 μL XQ23 菌株菌悬液于 NA 培养基中,倒平板后用无菌打孔器打孔 3 个,在每孔中加发酵液 100 μL,28 ℃ 培养 24 h。用十字交叉法测量抑菌圈直径(mm),分别以 72% 农用硫酸链霉素和无菌培养基为对照,重复 3 次。

1.4 拮抗菌活性物质制备

参照吴兴可等的方法^[15],以硅藻土为助滤剂,用布氏漏斗将其制成厚度约为 0.5 cm 的硅藻土滤层,发酵液离心后引流至滤层进行抽滤,抽滤液分别用 0.45 μm 和 0.22 μm 微孔滤膜抽滤除菌得到粗提物。粗提物用 1:1 乙酸乙酯等体积萃取,取有机相蒸发浓缩,获得的粗提物经 -80 ℃ 冻干备用。

1.5 拮抗菌活性物质对烟草青枯病菌的药效

选取 80% 乙蒜素乳油、75% 百菌清可湿性粉剂、72% 农用硫酸链霉素可溶性粉剂、1.8% 辛菌胺醋酸盐水剂、25% 多菌灵可湿性粉剂及 3% 中生菌素可湿性粉剂等 6 种杀菌剂,按照推荐剂量配成适宜浓度,拮抗菌粗提物也稀释成不同浓度梯度,备用。移取 200 μL XQ23 菌悬液与 NA 培养基混匀后倒平板。平板经打孔分别注入 100 μL 杀菌剂,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,通过测量抑菌圈直径计算抑菌率(%)。以抑菌率(%)为纵坐标(y),药剂浓度对数值为横坐标(x),获得各药剂的毒力回归方程,比较拮抗菌 FQ-8 所产抑菌活性物质与常见杀菌剂的药效。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照抑菌圈直径} - \text{处理抑菌圈直径}}{\text{对照抑菌圈直径}} \times 100\%$$

1.6 拮抗菌活性物质的结构表征

采用紫外和红外光谱分析拮抗菌 FQ-8 所产抑菌活性物质结构特征。将适量拮抗菌活性物质粗提物溶解于甲醇溶液中,稀释后移至石英比色皿内,置于 UV-1800PC-ds2 紫外分光光度计中,于 190~800 nm 范围内进行扫描。将提取的样品用溴化钾压片后,于 Nicolet80 红外光谱仪采集红外光谱,波数范围为 400~4 000 cm^{-1} 。

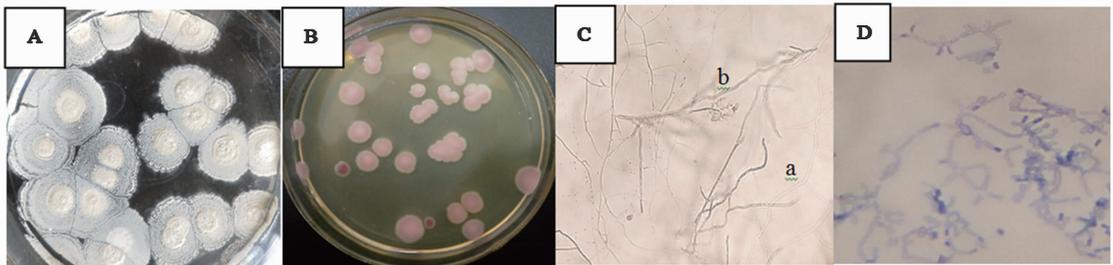


图1 烟草青枯病菌及其拮抗菌培养特征
A—拮抗菌 FQ-8 菌落形态(高氏 1 号培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$, 15 d); B—烟草青枯病菌 XQ23 菌落形态(TTC 培养基, 35 $^{\circ}\text{C}$, 4 d); C—拮抗菌 FQ-8 基内菌丝(a)与气生菌丝(b)(高氏 1 号培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$, 4 d, 10 \times 60); D—拮抗菌 FQ-8 孢子及孢子丝形态(高氏 1 号培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$, 4 d, 10 \times 100)

图1 烟草青枯病菌及其拮抗菌培养特征

2.2 拮抗菌抑菌活性检测

参照李璐宁等的琼脂扩散法检测拮抗菌 FQ-8 发酵液对烟草青枯病的抑菌活性^[14],结果(图 2)表明,拮抗菌 FQ-8 发酵液对烟草青枯病菌抑菌活性明显,抑菌圈直径为 9.7 mm。

2.3 拮抗菌活性物质的分离提取

拮抗菌活性物质用乙酸乙酯 1:1 等体积萃取后为无色液体,经浓缩后为淡黄色溶液,上下出现分层。其中,上层为有抑菌活性的拮抗菌活性物质粗提物,下层为没有抑菌活性的油状液体(图 3-A)。

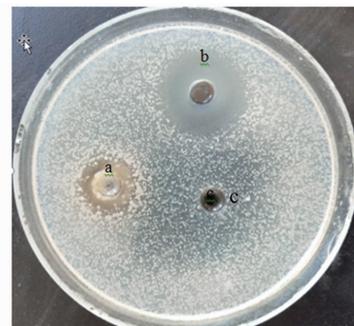
1.7 数据处理与分析

采用 OriginPro 8.0 作图,SPSS 22.0 进行数据统计分析,利用 LSD 多重比较法分析各处理差异显著性,显著性水平设定为 $\alpha = 0.05$ 。数据为平均值 \pm 标准差。

2 结果与分析

2.1 烟草青枯病菌及其拮抗菌培养特征

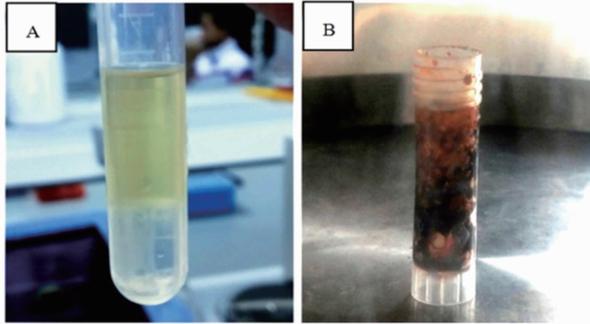
由图 1 可知,TTC 培养基上,烟草青枯病菌 XQ23 菌落特征为表面光滑湿润,稍突起,不规则圆形,流动性强,菌落中央粉红色,外围乳白色菌带。拮抗菌 FQ-8 在高氏 1 号培养基上表现为菌落呈辐射状,表面干燥,难以挑取,气生菌丝为白色,基内菌丝有淡黄色色素,孢子颜色为青色。培养 3 d 时菌落表面白色,培养 5~6 d 后菌落边缘覆盖一层青色的孢子,青色范围随着培养时间的延长而逐渐扩大,直至完全覆盖菌落。个体形态上,拮抗菌 FQ-8 由基内菌丝、气生菌丝和孢子丝组成。气生菌丝在上层,下层为基内菌丝。气生菌丝较细、较暗、直或曲折、少分支。基内菌丝或粗或细、无横隔、色亮、较透明、分支杂乱。孢子丝粗短,末端有孢子脱落,孢子为短柱状。



a—拮抗菌 FQ-8 发酵液浓缩液; b—72% 农用硫酸链霉素; c—无菌水

图2 拮抗菌发酵液抑菌活性

收集上层粗提物,经挥发、冷冻干燥后,拮抗菌活性物质呈深褐色,略带黏性,不易研磨成粉末(图 3 - B)。

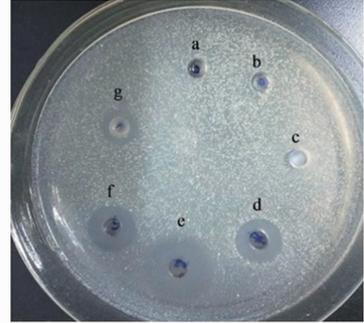


A—浓缩后的拮抗菌活性物质; B—冻干后的拮抗菌活性物质
图3 拮抗菌活性物质的物理状态

2.4 常见杀菌剂对烟草青枯病菌的药效

平板试验结果(图 4、表 1)表明,选用的 6 种杀菌剂对烟草青枯病菌 XQ23 呈现不同的药效。抑菌

效果最佳的是农用硫酸链霉素,乙蒜素与辛菌胺醋酸酸盐次之,效果较差的是中生菌素。百菌清与多菌灵则没有抑制作用。因此,后续试验选取农用硫酸链霉素、乙蒜素、中生菌素和辛菌胺醋酸酸盐,比较 4 种杀菌剂与拮抗菌活性物质对烟草青枯病菌 XQ23 的杀菌效果。



a—百菌清; b—多菌灵; c—蒸馏水; d—辛菌胺醋酸; e—农用硫酸链霉素; f—乙蒜素; g—中生菌素

图4 常见杀菌剂对烟草青枯病菌的药效

表 1 常见杀菌剂对烟草青枯病菌的药效

杀菌剂	推荐浓度 (mg/L)	抑菌圈直径(mm)				透明度
		重复 1	重复 2	重复 3	平均值	
80% 乙蒜素	150	12.4	14.0	13.5	13.3c	B
75% 百菌清	500	0.0	0.0	0.0	0.0e	C
72% 农用硫酸链霉素	144	20.0	21.8	20.8	20.9a	A
1.8% 辛菌胺醋酸盐	90	12.3	11.3	12.8	12.1b	B
25% 多菌灵	250	0.0	0.0	0.0	0.0e	D
3% 中生菌素	50	9.6	10.1	10.0	9.9d	D
蒸馏水	—	0.0	0.0	0.0	0.0e	A

注:同列数字后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。A 表示透明;B 表示半透明;C 表示浑浊;D 表示不透明。

毒力回归方程斜率能反映病菌对杀菌剂的敏感程度,斜率越大,药剂随浓度的增大其抑菌效果提高得越快^[16]。由表 2 可知,农用硫酸链霉素、辛菌胺醋酸盐、中生菌素、乙蒜素及拮抗菌活性物质的毒力回归方程斜率分别为 0.593 5、0.530 6、0.439 9、0.335 9、0.846 4,拮抗菌活性物质的斜率最大,其次是农用硫酸链霉素和辛菌胺醋酸盐,而生菌素和乙蒜素稍低。说明随着药剂浓度的提高,烟草青枯病菌对拮抗菌活性物质和农用硫酸链霉素的敏感性越高,即提高药剂使用浓度可以达到更好的杀菌效果。

2.5 拮抗菌活性物质的结构表征

紫外扫描结果见图 5。拮抗菌抑菌活性物质在 284 nm 附近有吸收峰,表明拮抗菌活性物质结构上有一个简单的或非共轭的生色团,含 O、N 或 S,可

能是 C=C、C=N、N=N、—NO₂、—COOH、—CO—NH₂,推测是多肽类物质。红外光谱分析(图 6)表明,拮抗菌活性物质在 3 353.67 cm⁻¹吸收峰可能是 N—H 键的伸缩振动峰,2 943.48 cm⁻¹和 2 826.09 cm⁻¹出现弱吸收的是 C—H 伸缩振动峰。这 2 组吸收峰是糖类的特征峰。1 663.35 cm⁻¹强峰为羰基伸缩振动峰,1 445.34 cm⁻¹吸收峰表示可能含有甲基和亚甲基,1 417.39 cm⁻¹处吸收峰可能是 C—N 键的伸缩振动,1 026.09 cm⁻¹处强吸收峰可能是 C—O 键的变角振动吸收,包括 C—O—H 和 C—O—C 键^[17]。第 4 区 750~600 cm⁻¹区域有 1 个宽的中等强度谱带,即 668.32 cm⁻¹,可能是由 N—H 键面外摇摆振动引起的。由于抑菌活性物质溶于甲醇,因此 1 445.34 cm⁻¹与 1 026.09 cm⁻¹处的吸收峰不能作为拮抗活性物质的特征吸收峰。综上

表 2 拮抗菌活性物质及常见杀菌剂的药效比较

杀菌剂	浓度 (mg/L)	平均抑菌率 (%)	毒力回归方程	斜率	EC ₅₀ (mg/L)	r
72% 农用硫酸链霉素	160	36.95	$y = 0.5935x + 3.3906$	0.5935	514.88	0.9545
	200	40.63				
	270	44.47				
	400	48.15				
	800	53.72				
80% 乙蒜素	160	30.67	$y = 0.3359x + 3.7402$	0.3359	5630.16	0.9930
	200	32.09				
	540	35.09				
	800	36.92				
	1600	44.84				
3% 中生菌素	125	24.80	$y = 0.4399x + 3.4267$	0.4399	3771.33	0.9984
	250	30.96				
	500	36.02				
	1000	39.93				
	2000	44.44				
1.8% 辛菌胺醋酸盐	133	28.21	$y = 0.5306x + 3.3001$	0.5306	1598.57	0.9882
	267	33.96				
	400	37.61				
	533	40.49				
	800	43.20				
拮抗菌活性物质	480	19.97	$y = 0.8464x + 1.7344$	0.8464	3578.96	0.9912
	600	24.20				
	900	28.67				
	1200	32.35				
	1800	36.55				
蒸馏水	—	0.00	—	—	—	—

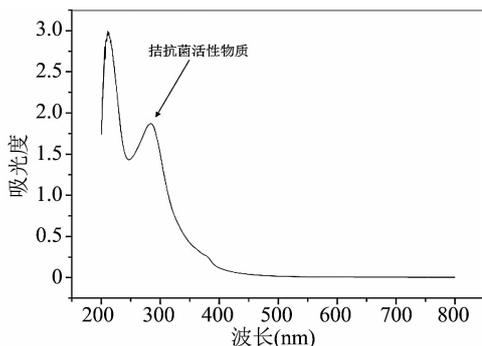


图5 拮抗菌活性成分的紫外光谱

所述,可以推断拮抗菌活性物质为含有酰胺键($-\text{CO}-\text{NH}_2$)的有机化合物,可能是一种糖肽类化合物,这与紫外扫描图谱的结果相符。

3 讨论与结论

生防菌株在植株根部的定殖能力往往决定了

其生防效果,而从土壤中提取分离的拮抗菌可以让生防菌更好的定殖^[18]。本试验前期从福建省龙岩上杭区下枋烟田土壤中分离筛选到1株对青枯病菌有明显抑菌效果的拮抗菌FQ-8,进行发酵培养,发酵液去杂后,经1:1乙酸乙酯萃取,蒸发浓缩收集拮抗菌活性物质,检测其抑菌特性并分析其结构特征。

试验参照吴兴可等的方法^[15],对发酵液过滤进行了改进,将助滤剂硅藻土制成滤层,显著提高了过滤效率,节约了微孔滤膜等耗材,且发酵液粗提物的抑菌效果没有改变。分离、提取浓缩后的拮抗菌粗提物呈淡黄色溶液,冷冻干燥后为深褐色黏性固体,不易磨成粉末。室内毒力试验结果表明,在推荐浓度下,25%多菌灵可湿性粉剂和75%百菌清可湿性粉剂对烟草青枯病菌没有抑制作用,而72%农用硫酸链霉素可溶性粉剂、1.8%辛菌胺醋酸盐水

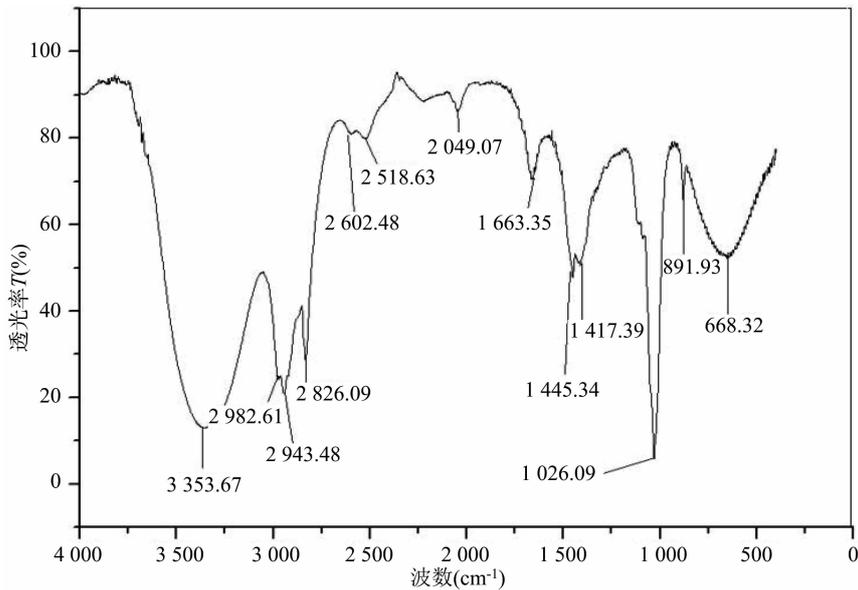


图6 拮抗菌活性成分的红外光谱

剂、3%中生菌素可湿性粉剂、80%乙蒜素乳油以及拮抗菌活性物质粗提物对烟草青枯病菌均有显著的抑制作用。通过对比 EC_{50} 发现,拮抗菌活性物质的抑菌效果与 3% 中生菌素可湿性粉剂相近,弱于 72% 农用链霉素而高于 80% 乙蒜素乳油。毒力回归方程(表 2)显示,拮抗菌活性物质斜率最大,表明烟草青枯菌对该活性物质敏感性最强,抑菌效果提高快。本试验结果与林天然等的研究结果^[19-20]基本一致,说明拮抗菌 FQ-8 所产抑菌活性物质具有成为防控烟草青枯病药剂的开发潜力。

目前,已分离鉴定的烟草青枯病拮抗菌有 100 多株^[21],主要包括芽孢杆菌^[10,22-24]、假单胞菌^[25-26]、放线菌^[7,11,13,27]及菌根真菌^[28]等,从拮抗菌发酵液中提取的抑菌活性物质种类繁多。Xue 等用超声波破碎链霉菌 *Streptomyces alboblavus* TD-1 菌丝,经甲醇提取的拮抗物质对烟草青枯病菌的最小抑菌浓度为 3.125 mg/mL,该物质通过影响病原菌细胞膜通透性,破坏细胞壁结构完整及干扰核酸、蛋白质的合成等途径起到生物防治的效果,但其化学性质与结构特征未知^[7]。罗文建等从健康土壤中分离到 1 株链霉菌 LC-7,所产抑菌活性物质为一种新的氨基糖苷类抗生素,分子量为 365.1^[29]。吴翔等从高粱根际土中筛选出株铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) MT-002-B-7,其拮抗物质经红外光谱和 GC-MS 分析,初步认为主要成分是 *N*-乙酰-3-甲基-1,4-二氮杂双环[4.3.0]-壬烷-2,5-二酮、脂肪酸和酚嗪^[30]。陈倩倩从烟草根际土壤分离到放线菌 SA74,并得到其

抗菌活性成分粗蛋白^[31]。段燕平等从云南和贵州烟草青枯病重病区的健康烟草根际土壤筛选到 1 株枯草芽孢杆菌 SH7,其抑菌活性物质为蛋白多肽类物质^[32]。本项目拮抗菌 FQ-8 抑菌活性物质在 284 nm 附近有吸收峰,表明该活性物质结构上含有 C=C、C=N、N=N、—NO₂、—COOH 及—CO—NH₂ 等基团,有可能是多肽类物质。红外光谱分析(图 6)表明,拮抗菌活性物质在 3353.67、2982.61、2943.48、2826.09、1663.35、1445.34、1417.39、1026.09、891.93、668.32 cm⁻¹ 有吸收峰,推测该活性物质为含有酰胺键(—CO—NH₂)的有机化合物,印证了紫外图谱的结果。综合来看,拮抗菌 FQ-8 所产活性物质可能是一种糖肽类化合物。有关活性肽对植物病害的控制报道更多的源自一些芽孢杆菌,而源自放线菌的少见报道^[33]。进一步试验(另文发表)表明,该化合物冷冻干燥后不溶于水,但可以溶解于甲醇中。其抑菌活性受低温抑制,但能耐受 125 °C 的高温。其确切成分、结构特性、抑菌机理及田间的防治效果有待深入研究。

综上,本研究从福建龙岩烟田发病烟草根际土壤分离到一株烟草青枯病拮抗菌株链霉菌 FQ-8。室内毒力试验表明,拮抗菌 FQ-8 活性物质对烟草青枯病毒力与 3% 中生菌素可湿性粉剂相近,低于 72% 农用硫酸链霉素可溶性粉剂和 1.8% 辛菌胺醋酸盐水剂,高于 80% 乙蒜素乳油,烟草青枯病菌对拮抗菌 FQ-8 活性物质的敏感性高于供试的 6 种杀菌剂。拮抗菌 FQ-8 所产抑菌活性物质可能是一种含有酰胺键(—CO—NH₂)的糖肽类化合物,其

结构特性有待深入研究。

参考文献:

- [1] Li X, Liu Y, Cai L, et al. Factors affecting the virulence of *Ralstonia solanacearum* and its colonization on tobacco roots [J]. *Plant Pathology*, 2017, 66(8): 1345–1356.
- [2] 李 想, 刘艳霞, 蔡刘体, 等. 烟草青枯病菌在烟草根际的定殖及最适发病条件[J]. *植物保护学报*, 2016, 43(5): 796–804.
- [3] Liu Y, Wu D S, Liu Q P, et al. The sequevar distribution of *Ralstonia solanacearum* in tobacco – growing zones of China is structured by elevation[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2017, 147(3): 541–551.
- [4] 王 垚, 黄纯杨, 杨 亮, 等. 烟草青枯病复配增效药剂筛选及田间防效[J]. *农药*, 2022, 61(10): 776–780.
- [5] 郭艾云, 鲍艳宇, 周启星. 土壤农药污染与细菌农药 – 抗生素交叉抗性研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(9): 2984–2995.
- [6] 易有金, 刘如石, 尹华群, 等. 烟草青枯病拮抗内生细菌的分离、鉴定及其田间防效[J]. *应用生态学报*, 2007(3): 554–558.
- [7] Xue Y B, Yang M G, Li S H, et al. The antibiotic activity and mechanisms of active metabolites (*Streptomyces alboflavus* TD – 1) against *Ralstonia solanacearum* [J]. *Biotechnology Letters*, 2019, 41(10): 1213–1222.
- [8] 何洪令, 李钠钾, 孙成成, 等. 烟草青枯病的生物防治研究进展[J]. *植物医生*, 2021, 34(2): 4–8.
- [9] 濮永瑜, 包玲凤, 何 翔, 等. 烟草青枯病和黑胫病拮抗细菌的筛选、鉴定及防效研究[J]. *中国农学通报*, 2022, 38(7): 116–123.
- [10] 赵 倩, 李军民, 雷 庭, 等. 嗜酸性 PGPR 菌株 CLB – 17 的筛选、鉴定及其对烟草青枯病菌的生防活性[J]. *植物保护学报*, 2022, 49(2): 528–538.
- [11] 孙新城, 司艳红, 张 莉, 等. 抗烟草青枯病拮抗菌的筛选及抑菌活性研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(14): 5917–5918, 5929.
- [12] 董昆明, 陈 亮, 周晓见, 等. 1 株抑烟草青枯病生防菌的筛选、鉴定及其活性物质研究[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(31): 19172–19175.
- [13] 汤鸣强, 林天然, 李小芳, 等. 烟草青枯病拮抗菌的分离筛选与抑菌活性物质研究[J]. *湖北农业科学*, 2021, 60(18): 92–96.
- [14] 李璐宁, 张 薇, 赵永强, 等. 放线菌 Y23 菌株发酵液抗菌活性及稳定性测定[J]. *山东农业科学*, 2009, 41(1): 71–74.
- [15] 吴兴可, 祁 荃, 卞婷婷, 等. 珍贵橙色束丝放线菌发酵产安丝菌素 P – 3 的分离纯化工艺优化[J]. *化工进展*, 2020, 39(3): 1122–1128.
- [16] 赵志祥, 严婉荣, 陈 圆, 等. 几种杀菌剂对生姜青枯病菌的毒力测定[J]. *贵州农业科学*, 2015, 43(9): 76–78, 81.
- [17] Cai Y Q, Chen P, Wu C Y, et al. Sulfated modification and biological activities of polysaccharides derived from *Zizyphus jujuba* cv. Jinchangzao [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 1149–1155.
- [18] 张洁梅, 张仁军, 姚正平, 等. 烟草青枯病生防菌的筛选及其田间防效评价[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(28): 131–136.
- [19] 林天然, 卢艺惠, 曾文龙, 等. 常见杀菌剂对烟草青枯病菌的毒力效应[J]. *农学学报*, 2020, 10(8): 33–37.
- [20] 黄保宏, 高正良, 周本国, 等. 四种杀菌剂对烟草青枯病菌的毒力比较[J]. *中国烟草学报*, 2015, 21(1): 72–75.
- [21] Hu Y, Li Y Y, Yang X Q, et al. Effects of integrated biocontrol on bacterial wilt and rhizosphere bacterial community of tobacco [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 2653.
- [22] 陆铮铮, 蒋选利. 烟草青枯病菌土壤拮抗细菌的筛选及鉴定[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(6): 99–102.
- [23] 黎妍妍, 李春黎, 王 林, 等. 生防菌使用方式对烟草青枯病的防效及根际土壤细菌群落的影响[J]. *中国烟草学报*, 2020, 26(4): 101–107.
- [24] Hu Y, Zhao W, Li X H, et al. Integrated biocontrol of tobacco bacterial wilt by antagonistic bacteria and marigold [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 16360.
- [25] 施河丽, 谭 军, 谭绍安, 等. 荧光假单胞菌缓解植烟土壤酸化效果及对烟草青枯病的防治作用[J]. *烟草科技*, 2023, 56(2): 19–25.
- [26] 舒翠华, 彭可为, 戴林建, 等. 烟草青枯病菌内生拮抗菌株 HN₃ 的鉴定与高产抗菌物质的培养基优化[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(10): 108–113.
- [27] Liu Y X, Shi J X, Feng Y G, et al. Tobacco bacterial wilt can be biologically controlled by the application of antagonistic strains in combination with organic fertilizer [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2013, 49(4): 447–464.
- [28] 刘先良, 刁向银, 申 鸿, 等. 接种丛枝菌根真菌对烟草青枯病抗性的影响[J]. *烟草科技*, 2014, 47(5): 94–98.
- [29] 罗文建, 刘雨虹, 施河丽, 等. 青枯雷尔氏菌拮抗放线菌的筛选及其抗菌活性物质的分离[J]. *中国烟草科学*, 2017, 38(2): 69–74.
- [30] 吴 翔, 谢丽源, 甘炳成, 等. 一株烟草青枯拮抗细菌中活性物质稳定性和粗提物成分分析[J]. *西南农业学报*, 2019, 32(7): 1549–1554.
- [31] 陈倩倩. 烟草根际土壤拮抗放线菌 SA74 菌株活性代谢产物的研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2019.
- [32] 段燕平, 杨金广, 杨继洪, 等. 抗烟草青枯病菌的枯草芽孢杆菌 SH7 的筛选与鉴定[J]. *吉林农业大学学报*, 2012, 34(1): 52–57.
- [33] Baysal Ö, Lai D, Xu H H, et al. A proteomic approach provides new insights into the control of soil – borne plant pathogens by *Bacillus* species [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53182.