孙伟霖,颜霞,高剑欣,等.烟草赤星病拮抗菌的筛选及其生防机理初探[J].山西农业大学学报(自然科学版),2024,44(5):58-67.
Sun W L, Yan X, Gao J X,et al.Screening of antagonistic bacteria against *Alternaria alternate*,tobacco scab, and preliminary exploration of their biocontrol mechanism[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2024,44(5):58-67.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202404042

烟草赤星病拮抗菌的筛选及其生防机理初探

孙伟霖[1],颜霞[1*],高剑欣[1],崔传斌[2],王平平[2],王娜娜[1],杨明明[3],黄丽丽[3*]

(1.西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨陵 712100;2.中国烟草总公司陕西省烟草公司,陕西 西安 710000;
3.西北农林科技大学 植物保护学院,陕西 杨陵 712100)

摘　要:[目的]本研究以烟草赤星病菌为靶标菌,筛选对其拮抗效果较好的生防菌,并对其进行后续的鉴定,同时初步设计试验验证生防机理,为烟草赤星病的拮抗生防菌资源、拮抗菌剂的制备等提供新的参考。[方法]采用初筛复筛获得生防菌后;绘制系统发育树鉴定、抑菌谱系测定、菌株产酶活性测定、对赤星病病菌菌丝生长和孢子萌发的影响、诱抗定量检测、离体叶片防效等方法验证生防机理。[结果](1)筛得2株对于赤星病菌拮抗效果较好的生防菌,经由16S rDNA鉴定发现其分别是枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)X768与贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)703;并完成了2株生防芽孢杆菌的抑菌谱系测定,证明其均具有抑菌广谱性;(2)对其生防机理探究过程中,菌株703具备产生纤维素酶、蛋白酶和淀粉酶的能力,菌株X768具备产生纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶的能力;2株生防芽孢杆菌均可抑制赤星病孢子的萌发和影响菌丝正常生长的形态,对于病原菌具有较强的抑制作用;(3)使用qRT-PCR法验证了生防菌对烟草防御基因通路(SA、JA、ET等通路)的影响,其中应用菌株703处理后烟草应用防御通路可能与SA通路、JA通路和泛素连接酶通路相关;而使用菌株X768处理后烟草应用防御通路可能与SA通路和泛素连接酶通路相关。[结论]筛得的具有抑制烟草赤星病作用的生防菌株*B. subtilis* X768与*B. velezensis* 703,抑菌谱较广,均可较强效果地抑制赤星病孢子的萌发和菌丝生长,并且2株生防菌均可引起烟草防御基因通路的上调,离体叶片防效效果较好。

关键词:烟草赤星病; 拮抗菌; 生物防治; 生防机理
中图分类号:S432　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2024)05-0058-10

真菌链格孢属(*Alternaria*)作为赤星病的病原菌,其会侵染烟草成熟期叶片并造成病害。该病原菌不仅会侵染烟草叶片,还会随着侵染程度的加大使烟草植株的病情加重,影响茎秆、花梗和蒴果[1]。许多作物会受到链格孢菌属的侵染影响,其会导致定殖作物发生病害并造成经济损失[2]。

当下中国大部分烟草种植区缺乏足够的疾病预防经验和管理技术,烟草赤星病的发病率逐年上升,给烟农带来了不同程度的经济损失。使用化学农药和杀虫剂来消灭引起植物病害的昆虫和病菌,被称为化学防治。生产中防治效果较好的化学农药有氟啶胺、嘧菌环胺等[3]。化学防治具有配置简单、杀伤效果明显[4]等显著优点。但后续引起的病菌耐药性、土壤菌群失衡与农药残留等问题[5]是化学防治的重大缺陷,目前技术无法解决。

由于化学方法存在诸多缺陷,故而对环境友好、健康威胁小的生物防治方法是烟草赤星病防治研究的热点。生物防治主要是利用一种有益物种的生物能力(作用机制和/或自然相互作用)来减少另一种致病物种的发展[6]。生防菌是在生物防治病害过程中发挥主要作用的优势菌群。

生防菌的生防机理通常包括:抗生作用、竞争作用、重寄生作用及诱导抗性,有些拮抗菌以某一种机制为主,但是许多菌有多种拮抗机制[7]。抗生

收稿日期:2024-04-16　　**修回日期**:2024-06-05
基金项目:中国烟草总公司陕西省公司科技项目(KJ-2021-02);中国烟草总公司重大科技项目(110202101056(LS-16))
作者简介:孙伟霖(ORCID:0009-0002-8926-424X),硕士研究生,研究方向:微生物资源与利用,E-mail: 12175968@qq.com
*通信作者:黄丽丽,教授,E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn; 颜霞,教授,E-mail: luckyx@126.com

作用是指大部分生防菌可以产生拮抗病原菌的活性物质,如几丁质酶、抗生素、溶菌酶或蛋白酶、细菌素或细菌素类似物等,它们能够影响和限制病原菌的生理活动。竞争作用是指生防菌和病菌之间对营养物质、物理位点和生态位点相互竞争,生防菌可以优先占领生存空间,在病原菌和植物体之间产生一个隔离带,使病原菌难以侵入。重寄生作用是指生防菌或病毒(噬菌体)能够以病原菌为载体或寄主,附着或寄生于植物病原菌上,使其变形直至死亡[8]。

本研究在实验室前期分得的菌种中,通过初筛与复筛筛选出抑菌效果较好的生防菌,对其进行16S rDNA鉴定,并进一步分析其抑菌谱系、产酶活性、对赤星菌菌丝生长与孢子萌发影响以及激活烟草防御通路功能等,旨在为烟草赤星病的生物防治及拮抗菌剂的制备提供资源、为生物防治机理研究提供基础。

1　材料和方法

1.1　试验材料

1.1.1　培养基

LB固体培养基:NaCl 10 g,酵母粉5 g,琼脂粉15 g,蛋白胨10 g,蒸馏水1000 mL,121 ℃高压蒸汽灭菌30 min,用于细菌的活化与培养。

PDA培养基:葡萄糖20 g,琼脂15 g,土豆200 g,蒸馏水1000 mL,121 ℃高压蒸汽灭菌30 min,用于病原真菌的活化与培养。

LB液体培养基:蛋白胨10 g,NaCl 10 g,酵母粉5 g,蒸馏水1000 mL,121 ℃高压蒸汽灭菌30 min。

PDB培养基:200 g土豆,20 g葡萄糖,蒸馏水定容至1 L,121 ℃高压蒸汽灭菌30 min。

酵素培养基(YMA培养基):在LB固体培养基中加入1%酪蛋白(干酪素),用于产蛋白酶检测。

CMC-Na培养基:K_2HPO_4 0.5 g、$FeSO_4·7H_2O$ 0.01 g、羧甲基纤维素钠20.0 g、$MgSO_4·7H_2O$ 0.5 g、KNO_3 1.0 g、NaCl 0.5 g、琼脂15.0 g、蒸馏水1000 mL,121 ℃高压蒸汽灭菌30 min,用于产纤维素酶检测。

吐温60培养基:于1 L LB固体培养基内加入0.1 g无水氯化钙和15 mL吐温60,用于产脂肪酶检测。

淀粉酶培养基:在1 L LB固体培养基内加入10 g可溶性淀粉,用于产淀粉酶检测。

1.1.2　供试病原菌

烟草赤星病菌(*Alternaria alternate*)、苹果轮纹病菌(*Physallospora Piricola*)、苹果干腐病菌(*Botryosphaeria dothidea*)、苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioide*)、番茄叶霉病菌(*Passalora fulva*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、柳树腐烂病菌(*Cytospora chrysosperma*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)。以上病原真菌均由西北农林科技大学植物保护学院果树病害病原生物学与综合防治研究团队分离并保存。

1.1.3　供试烟草植株

供试烟草品种为'云烟99',在本实验室温室内种植;本氏烟草在本实验室温室内种植。温室环境设置为:白昼14 h,22 ℃;夜晚10 h,20 ℃;相对湿度72%。

1.2　试验方法

1.2.1　拮抗烟草赤星病菌生防菌的初筛与复筛

实验室前期分得的菌株(共8个,分别是X5,X768,C72,h2,h4,logA,703,Y419)保存在-80 ℃冰箱中,使用前在LB平板上活化2次。

通过平板对峙法进行初筛。在超净工作台中用打孔器打孔,用注射器无菌针头挑取赤星病菌饼放置在在PDA平板中央,后在其四周3 cm处分别接种活化2次的菌株,28℃培养约4 d后观察病菌生长状态;

在超净台中将活化2次的菌株接入含有5 mL或25 mL LB液体培养基的试管或锥形瓶中,28 ℃、150 $r·min^{-1}$培养60 h后,装入50 mL离心管中13 000 $r·min^{-1}$离心30 min,在超净台中用0.22 μm细菌过滤器将上清次级代谢液过滤后,将600 μL无菌滤液与30 mL PDA混匀后倾倒在3个无菌培养皿中,晾干后在平板中央接入1块病原菌菌饼(φ=6 mm),25 ℃培养5 d,以仅接赤星病菌饼的空白PDA平板为对照(CK)。每个菌株进行3次生物学重复,利用十字交叉法测量病菌直径并计算抑菌率[9]。

1.2.2　菌株16S rDNA鉴定

在灭菌的离心管中加入30 μL DNA裂解液(PrepMan™ Ultra),挑取抑菌率较好的菌株放入离心管中,反复吹打至轻微混浊[10]。13 000 $r·min^{-1}$离

心1 min后沸水浴10 min,13 000 r·min^{-1}离心5 min后吸取上清保存到PCR管中。以下整个过程在冰上操作,使用通用引物(27-F:5'-AGAGTTTGA-TCCTGGCTCAG-3';1492-R:5'-GGTTAC-CTTGTTACGACTT-3')扩增目的基因,扩增体系见表1。扩增完成后使用1%琼脂糖凝胶电泳检测,切取目的条带,利用E.Z.N.A.®Gel Extraction Kit胶回收试剂盒进行目的片段回收。

表1 目的基因的扩增体系

Table1 PCR amplification system of objective gene

单位:μL

PCR扩增体系 Components	体积 Volume
2× phata Max Buffer	25
上游引物(10 μM)	2
下游引物(10 μM)	2
模板DNA/cDNA	1~3
dNTP mix	1
Phanta Max super-fidelity DNA polyease	1
ddH_2O	定容至50

1.2.3 构建测序菌株的系统发育树

将测序反馈的16S rDNA的完整序列复制到NCBI官方数据库中,利用BLAST进行同源性比较,下载其同源性模式序列文件,通过MEGA 11软件的Neighbor-Joining方法去计算并构建菌株的系统发育树。

1.2.4 菌株X768与703的抑菌谱系测定

利用实验室中所保存的病原真菌为靶标菌:苹果轮纹病菌(*P. Piricola*)、苹果干腐病菌(*B. dothidea*)、苹果炭疽病菌(*C. gloeosporioides*)、番茄叶霉病菌(*P. fulva*)、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、柳树腐烂病菌(*C. chrysosperma*),测定菌株的抑菌谱性。在PDA平板上活化2次病原真菌后,用打孔器(φ=6mm)在长满各病原真菌的平板中打2块菌饼,分别接种到新PDA培养基的中心位置。再在其四周3 cm处分别划线前期筛得的菌株,28 ℃培养5 d后观察病菌生长状态,菌株X768与703分别重复3次,并统计计算抑菌率[11]。

1.2.5 菌株产酶活性测定

(1)产纤维素酶检测

在超净工作台中用微量移液枪吸取1 μL提前摇好的菌株发酵液或直接挑取在LB平板上活化后的菌落接种在固体的CMC-Na培养基上,尽量点在中心位置。Parafilm封口后,在37 ℃培养箱中倒置培养。直至细菌在中心位置长出菌苔后,将菌体刮掉,使用提前配制的0.3%碘液当染色剂,至少染色5 min以上,再用提前配制的5% NaCl溶液漂洗,观察培养基中心是否存在透明圈[12]。

(2)产蛋白酶检测

用微量移液枪取1 μL菌株的发酵液或直接挑取活化后菌落接种在固体的YMA培养基中心位置,Parafilm封口后在37 ℃倒置培养,待细菌在中心位置长出菌苔后,使用提前配制的1%刚果红当染色液,直接在培养皿中至少染色5 min以上,5% NaCl反复漂洗,观察培养基中心是否存在透明圈。

(3)产淀粉酶检测

在超净工作台中用微量移液枪吸取1 μL提前摇好的菌株发酵液或直接挑取在LB平板上活化后的菌落接种在淀粉酶培养基中央。培养与染色方法同纤维素酶检验方法。

(4)产脂肪酶检测

使用接种环或接种针直接挑取活化后菌落接种在固化的吐温60培养基上,尽量点在中心位置。37℃倒置培养24 h以上,直至细菌在中心位置长出菌苔后,直接观察菌落周围存在透明圈现象与否。

1.2.6 菌株对赤星病病菌的影响

(1)对赤星病病菌菌丝生长的影响

在超净台中用打孔器打孔,用注射器无菌针头挑取赤星病菌饼放置在PDA平板约中央位置,再在其四周3 cm处分别接种1 μL菌株的发酵液或直接挑取菌落接种在病原菌菌饼四周,Parafilm封口后28 ℃培养4 d以上。在超净工作台中分别挑取与生防菌形成生长界限的病原菌菌丝和对照组即无生防菌抑制的PDA平板上的病原菌菌丝,在光学显微镜下观察2次菌丝生长形态的异同,同时拍照记录,重复3次。

(2)对赤星病病菌孢子萌发的影响

取等体积的菌株的发酵液和烟草赤星病菌的孢子悬浮液在1.5 mL离心管混合并吹打摇匀,在28 ℃培养箱培养14 h。CK组取等体积的无菌LB培养液和烟草赤星病菌孢子悬浮液混匀培养。取混合液100 μL小心滴于洗净的玻片的凹槽内,在光学显微镜下观察病原菌孢子的萌发情况,并计算孢子萌发率[13]。每个处理重复3次。

1.2.7　菌株诱导抗性定量检测

1.2.7.1　烟草叶片样品的制备与保存

将活化2次的菌株(703和X768)分别接入含有100 mL LB液体培养基的250 mL锥形瓶中,28 ℃ 150 r·min^{-1}培养60 h后,同等的稀释倍数(20×)均匀地喷洒至烟草叶片上,未接菌的LB液体培养基为对照(CK),进行3次生物学重复。将处理后烟草后分别于0、6、12、24 h取样,置于液氮中速冻完全,并于－80 ℃保存。

1.2.7.2　烟草叶片RNA的提取及其cDNA的合成

使用华越洋快速通用植物RNA提取试剂盒,具体操作步骤参考说明书。使用Accurate Biotechnology(Human)Co.,Ltd公司的Evo M-MLV反转录预混型试剂盒进行RNA的反转录(含去除gDNA试剂,用于qPCR体系的后续试验)。

1.2.7.3　qRT－PCR方法检测Marker基因

检测烟草SA通路Marker基因*NtPR1c*,JA通路Marker基因*NtLOX*,ET通路Marker基因*NtERF1*表达情况,泛素连接酶通路Marker基因*NtRNF217*,并以*NtEF－1α*为内参基因,重复3次。荧光定量PCR引物见表2.。使用GeneStar的RealStar Green Mixture进行定量PCR,具体反应体系见表3。基因的相对表达量使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算。

表2　实时荧光定量PCR引物序列

Table 2　Real－time fluorescent quantitative PCR primer sequence

引物 Primer name	引物序列(5'－3') Primer sequence	Primer length
NtPR1c－F	ATGAGAAACAGTATTATGCCCACG	24
NtPR1c－R	TGAACCCTAGCACATCCAACA	21
NtLOX－F	AAGGTTCTATCTGGCAGTTGGC	22
NtLOX－R	GTCTCACGGAAATGAGGGTGG	21
NtERF1－F	ATGGGGCGACTTACCACTAA	20
NtERF1－R	CCTCCCTCTGCTCCGATTTT	20
NtRNF217－F	CGTTCAGTGCATTTGTCCTC	20
NtRNF217－R	GGCATTCCTTCCATTTTTTG	20
NtEF1α－F	TGCTGTAACAAGATGGATGC	20
NtEF1α－R	AGATGGGGACAAAGGGGATT	20

1.2.8　菌液对植物离体叶片防效检测

试验前将核盘菌、辣椒疫霉和赤星病菌分别在PDA和V8培养基活化。将菌株(703和X768)在LB培养基里面培养60 h后,同等的稀释倍数(20×)均匀地喷洒至4～6周的本氏烟草,并以相同稀释倍数的LB培养基喷洒为对照,24 h后取完整烟草叶片用于烟草的抗病性试验。用　5 mm直径的打孔器将病原菌打为菌饼,用1 mL规格针管的针头尖在烟草叶片上造成创伤,分别将病原菌置于烟草叶片的正面和背面,48 h后,记录发病。接种核盘菌和赤星病菌的叶片在日光灯下拍照观察,接种辣椒疫霉的叶片则在紫外光下拍照观察。

表3　实时荧光定量PCR反应体系

Table 3　Real－time fluorescence quantitative PCR reaction system

qRT－PCR反应体系组分 Components	体积/μL Volume
2×Real Star Green Fast Mixture	10
正向引物(10 μM)	1
反向引物(10 μM)	1
cDNA	1
ddH_2O	加ddH_2O至20

1.3　统计分析

孢子萌发率数据方差分析采用SPSS 25进行;定量数据采用Excel软件进行统计,差异显著性分析(用T检验进行比较)及图形的绘制使用GraphPad Prism软件。

2　结果与分析

2.1　拮抗烟草赤星病菌的生防菌的初筛、复筛及抑菌活性测定

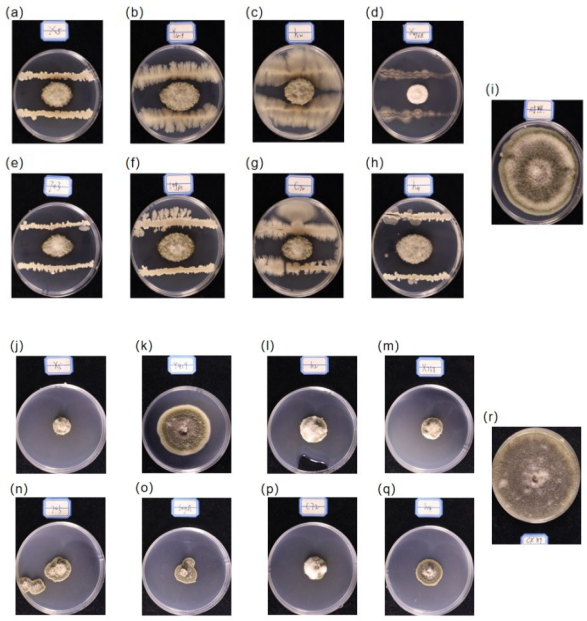
将实验室前期分离得到的菌种(代号X5,X768,C72,h2,h4,logA,703,Y419共8个菌株)通过平板对峙和无菌发酵液进行初步筛选,从中选出了2个抑菌作用较好的菌株X768和703(图1)。

2.2　16S rDNA鉴定结果

利用扩增16S rDNA片段的通用引物序列来扩增X768和703的16S rDNA片段,扩增产物电泳后在紫外凝胶成像仪中能看到电泳条带在约1500 bp的条带附近。切下电泳条带,根据E.Z.N.A.®Gel Extraction Kit凝胶回收试剂盒说明书来回收PCR扩增产物(图2)。

2.3　菌株系统发育树的构建

将测序结果复制在NCBI数据库中进行比对,将与其相似度较高的同源序列下载保存,采用MEGA11软件构建的菌株X768和703的16S rDNA序列的系统发育树。将下载的同源序列经过MegAlign软件包比对结果发现,菌株X768的



a到i分别代表X5、Y419、h2、X768、703、logA、C72、h4、对照(CK)的对峙结果;与j到r分别代表X5、Y419、h2、X768、703、logA、C72、h4、对照(CK)无菌发酵液筛选结果

a—i represented the confrontation results of X5, Y419, h2, X768, 703, logA, C72, h4, and control(CK) against *A. alternata*, respectively; While j to r represented the sterile fermentation broth screening results of X5, Y419, h2, X768, 703, logA, C72, h4, and control (CK) against *A. alternata*, respectively

图1 平板对峙与无菌发酵液筛选菌种结果图

Fig.1 Plate confrontation and sterile fermentation broth screening results

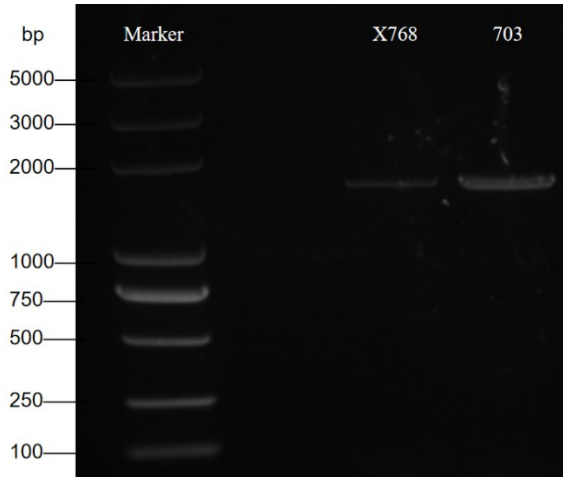


图2 16S rDNA片段扩增结果

Fig.2 16S rDNA fragment amplification results

16S rDNA序列与枯草芽孢杆菌的核苷酸序列可信度最高(可信度达到86%);菌株703的16S rDNA序列与贝莱斯芽孢杆菌的核苷酸序列可信度最高(可信度达到84%)。综合结合已经成功构建的菌株X768和703的16S rDNA序列系统发育树(图3),可初步判定鉴定菌株X768是枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*),菌株703是贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)。

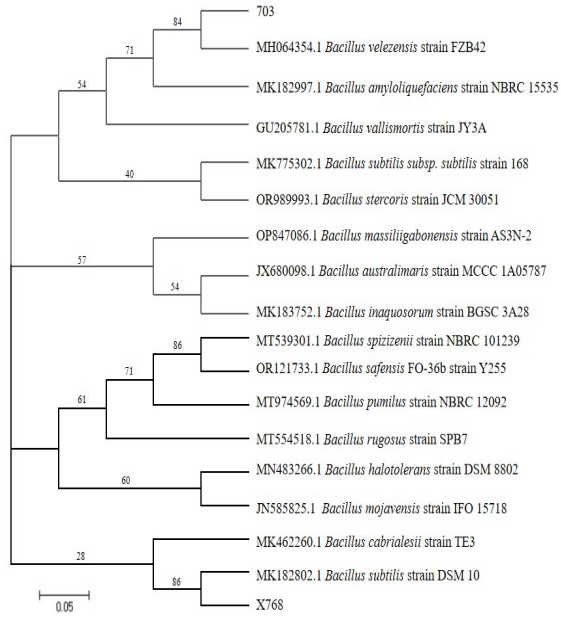


图3 基于Neighbor-Joining方法构建的菌株X768和703的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic Tree of Strain X768 and 703 Constructed by Neighbor-Joining Method

2.4 菌株X768与703的抑菌谱系测定

菌株X768和703对烟草赤星病菌具有较强抑制作用,在进一步探究这2株菌的抑菌谱时,选取了6种植物病原真菌,结果表明:菌株X768和703均对苹果轮纹病菌(*P. Piricola*)、苹果干腐病菌(*B. dothidea*)、苹果炭疽病菌(*C. gloeosporioides*)、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)和柳树腐烂病菌(*C. chrysosperma*)有较高的抑制效果,而对于番茄叶霉病菌(*P. fulva*)的抑制效果较差(图4)。

2.5 菌株产酶活性结果

产酶培养测定结果如图5所示,在检测纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶的培养基中,经过菌株703处理后除产脂肪酶外均出现了透明圈,而经过菌株X768处理后其培养基均出现了透明。说明菌株703具有产生纤维素酶、蛋白酶和淀粉酶的能力,菌株X768具有产生纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶的能力。

2.6 菌株对赤星病病菌的影响结果

2.6.1 对赤星病病菌菌丝生长的影响

在与烟草赤星病菌(*A. alternate*)通过平板对

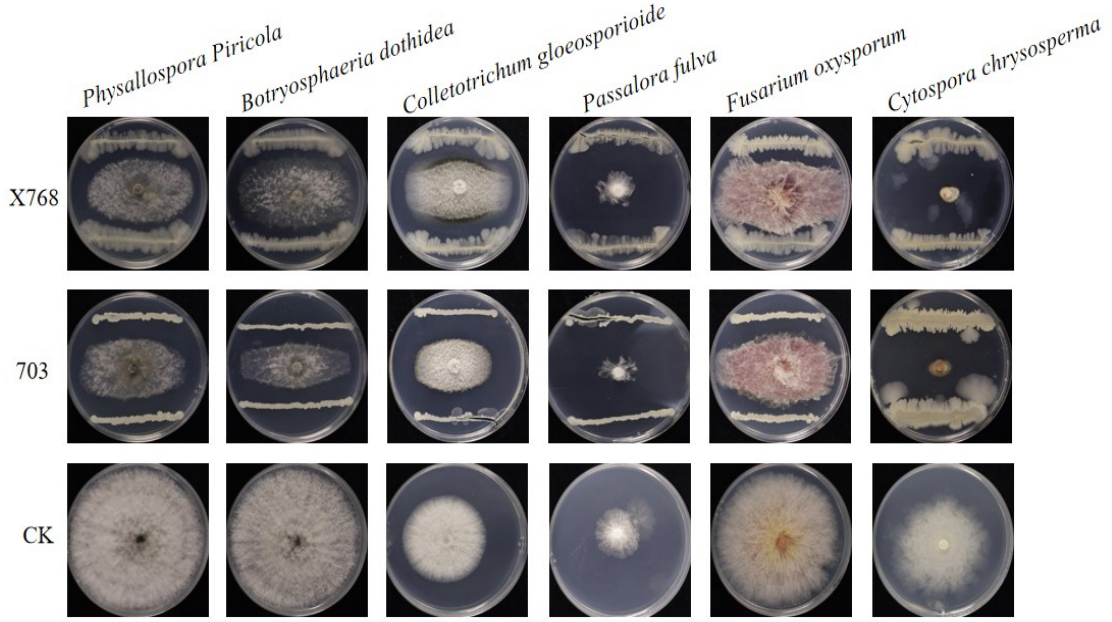


图4　菌株X768与703对于部分病原真菌的抑制作用结果

Fig.4　Inhibitory effects of strains X768 and 703 on part of pathogenic fungi

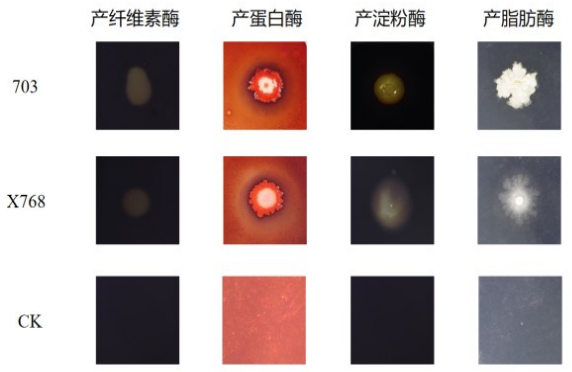


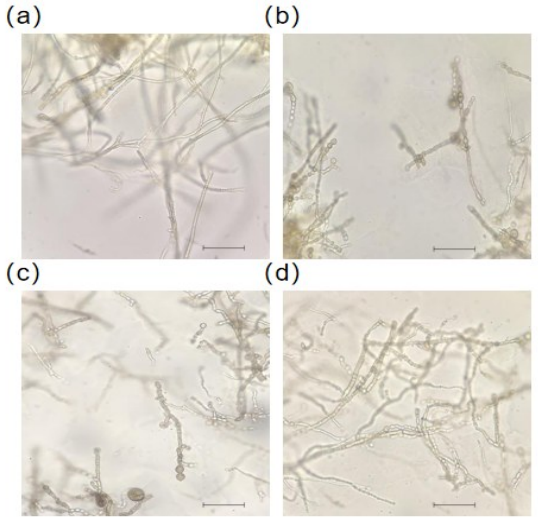
图5　菌株X768与703具有产生纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶的能力

Fig.5　Ability of strains X768 and 703 to produce cellulase, protease, amylase, and lipase

峙培养5 d后,将对峙边缘的菌丝块切取下来,置于光学显微镜下观察,发现与赤星病菌对峙培养后,可导致赤星病菌菌丝顶端纠结成团,菌丝顶端分枝增多,菌丝膨胀增粗呈现念珠状,顶端细胞破裂且内溶物流出以及菌丝颜色加深等现象(图6)。

2.6.2　对赤星病病菌孢子萌发的影响

培养15 h后取样在光镜下观察孢子萌发结果如表5所示,对照组PDB处理的病原菌孢子萌发率在85%左右,筛选出的菌株发酵液处理组孢子萌发明显被抑制,其中菌株X768发酵液处理的萌发率是36%左右,菌株703发酵液处理的萌发率是31%左右(表4)。



(a):空白对照;(b):菌丝顶端聚集成团;(c):菌丝顶端分枝多,菌丝膨大;(d):细胞破碎,内溶物出渗。标尺长度为20 μm

(a): blank control; (b): the top end of the mycelium is aggregated into a cluster; (c): the top end of the mycelium has more branches and the mycelium is expanded; (d): Cell disruption, endolysate exfiltration. The scale length is 20 μm

图6　平板对峙显微菌丝图片

Fig.6　Microscopic mycelium images of the confrontation analysis

2.7　qRT－PCR检测烟草防御基因通路结果分析

以烟草*NtEF－1α*为内参基因,检测了普通烟草(*Nicotiana tabacum*)SA通路Marker基因*NtPR1c*,JA通路Marker基因*NtLOX*,ET通路Marker基因*NtERF1*表达情况,以及泛素连接酶

表4 菌株发酵液对烟草赤星病菌孢子萌发的统计数据

Table 4 Statistical data on spore germination of *A. alternata* by strain fermentation broth

处理 Treatment	孢子萌发率 Germination rate
X768	35.59±1.16[b]
703	31.08±2.12[b]
CK	84.46±0.96[a]

注:表中病菌抑制率数据为平均值±标准差,同列数字后不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: Inhibition rate data in the table were mean±SD. Different letters in the same column indicated significant differences at $P<0.05$ level

通路Marker基因*NtRNF217*。

试验验证表明菌株703处理的普通烟草*NtLOX*和*NtPR1c*基因在0~6 h内迅速增加,在12 h后迅速回落至正常甚至下降到抑制水平;而703对于*NtRNF217*基因则是在0~12 h内不迅速增加,在12~24 h增加到12 h的1倍来发挥作用;703对于*NtERF1*基因在6 h增加的显著性不强甚至在12 h时极显著抑制,这点值得后续探究(图7a~图7d)。

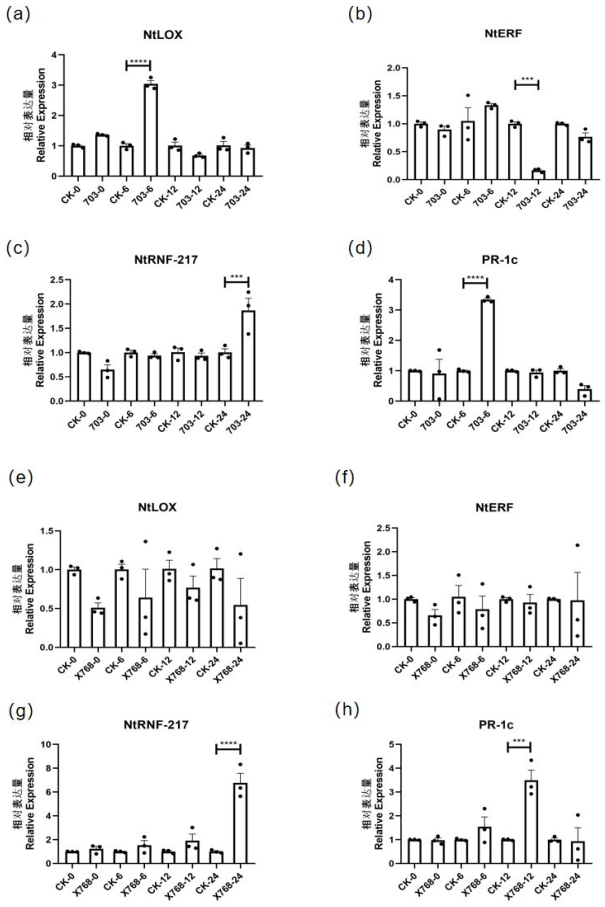
菌株X768处理的普通烟草*NtRNF217*基因在0~12 h内不迅速增加,在24 h增加数倍来发挥作用;对于*NtPR1c*基因其是在6 h后缓慢增加,在12 h基因表达量最高且与对照比极显著,之后回落至正常水平;对于*NtERF1*和*NtLOX*基因则没有表现出特别显著地增加或抑制的效果与作用(图7e~图7h)。

2.8 菌液处理烟草叶片后抗病性提高

经过菌液X768与703处理后的叶片对核盘菌和赤星病菌的抗性显著增强,病斑显著明显减小;菌液X768处理的叶片对辣椒疫霉的抗性也有增强,菌液703处理的叶片对辣椒疫霉抗性影响不显著(图8)。菌液处理X768与703后可能通过定殖叶片直接抗病或引起叶片防御相关基因的提高来间接抗病。由于真菌与卵菌的侵染致病机制不完全一样,故针对核盘菌和赤星病菌与辣椒疫霉的抗病活体结果不完全一致。

3 讨论

贝莱斯芽孢杆菌是好氧革兰氏阳性菌。其作为一种具有相当不错的生防应用潜力的新型芽孢杆菌,具备阻断病原体增殖、增强植物抗病性、刺



代表显著性差异,$P<0.05$, ***$P<0.001$

* represents significant difference, *$P<0.05$, ***$P<0.001$

图7 菌株703与X768影响烟草防御基因的情况

Fig.7 Effects of strains 703 and X768 on defense genes in tobacco

激植物生长发育以及提高产量的能力[14]。枯草芽孢杆菌易于枯草浸汁中定殖,早期市场田间实践应用较多。其分泌的多种活性物质如枯草菌素、短杆菌肽等,对侵染性的病原真菌有显著的抑制效果[15]。研究表明贝莱斯芽孢杆菌及枯草芽孢杆菌来源较广,对多种植物病害诸如烟草黑胫病、烟草青枯病、烟草赤星病等均存在显著抑制作用。

抑菌谱试验很好地证明了2株生防菌对于多种真菌病害的抑制效果,但对于番茄叶霉病菌的抑制效果较差。番茄叶霉病原属于子囊菌无性型褐孢霉属真菌,查阅资料发现其可在多种培养基上生长和产孢,在燕麦培养基和玉米粉培养基上生长最佳,但菌丝层薄;在PDA和PSA培养基上生长缓慢,但菌丝层厚[16]。本次所有使用的病原真菌均是接种在灭菌PDA培养基上进行试验,可能减弱了番茄叶霉病原菌的活力而导致最后的试验结果出现误差。后续可能会优化培养条件继续



*代表显著性差异,***$P<0.001$; ****$P<0.0001$

Using T－test for comparison, *, ***, **** indicated significant difference at $P<0.05$, 0.001, and 0.0001 levels, respectively

图8　菌液处理本氏烟草抗病性检测图

Fig.8　Detection of disease resistance in *Nicotiana benthamiana* after inoculation treatment

对峙培养并统计结果,完善2株生防菌的抑菌谱。

针对课题组前期筛得的贝莱斯芽孢杆菌703和枯草芽孢杆菌X768的抑菌机理进行了初步探讨。菌株703具有产生纤维素酶、蛋白酶和淀粉酶的能力,菌株X768具有产生纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶的能力。具备产生纤维素酶是筛选菌株在植株中稳定定殖的必要要求,而分泌蛋白酶的能力对于拮抗病原菌的效果会大大增强。分别经菌株703与X768的发酵液处理后的*A. alternate*菌丝出现诸如分节增多、菌丝断裂、内容物破裂流出、菌丝顶端膨大畸形以及原生质明显聚集等的作用效果[17],同时抑制其孢子萌发与增殖。

菌株703处理的普通烟草*NtLOX*和*NtPR1c*基因在0～6 h内迅速增加,在12 h后迅速回落至正常甚至下降到抑制水平,表明菌株703处理后JA通路与SA通路快速响应发挥防御作用;而对于*NtRNF217*基因则是在0～12 h内不明显迅速增加,在12～24 h增加到12 h的1倍来发挥作用,发挥作用的时间周期较长,由于我们所取的时间周期只有24 h,没有取样测试到之后基因表达量下调的过程,再进行试验会选择更长的时间周期去进行取样。对于*NtERF1*基因没有上调甚至在12 h时又极显著抑制的现象出现,原因可能是菌株703中分泌产生的某种物质显著抑制了烟草ET的防御通路[18],或是烟草SA与JA通路反应上调迅速,在6～12 h基因表达量下调时产生了某些信号抑制了烟草ET的防御通路。

菌株X768处理的普通烟草*NtRNF217*基因在0～12 h内增加缓慢,在24 h增加数倍来发挥作用,响应作用周期时间较长,由于课题组所取的时间周期只有24 h,没有取样测试到之后基因表达量下调的过程。综合2次普通烟草*NtRNF217*基因的响应表达上调过程可以发现其响应速度较慢总在12～24 h才上调至最高。对于*NtPR1c*基因其

是在6 h后缓慢增加,在12 h基因表达量最高且与对照比极显著[19],之后回落至正常水平。对于*NtERF1*和*NtLOX*基因则没有表现出特别显著地增加或抑制的效果与作用。

菌液X768与703处理烟草后防御基因的上调证明了其可以诱导植物内源防御外源病害的开展。可能是通过刺激不同烟草防御基因通路的某个部分激活防御基因的上调,后续可以进一步验证一些上游激活受体来具体判断。

菌液X768和703喷施处理叶片后对核盘菌和赤星病菌的抗性显著增强,病斑显著明显减小,证明了其实际应用的防治价值。经由菌液处理后,由于已经验证过菌株直接的抑菌效果,所以可能由于喷施菌剂导致细菌定殖在叶片增强其抗病效果;或是生防菌处理后提高了烟草叶片的防御基因表达水平,使得叶片抗病性提高。

后续可针对筛得的2株菌,进行对其复配配比,复合发酵条件、发酵培养基进行优化,也可对可湿性粉剂的载体与助剂进行筛选并初步研制出生防菌剂,实际应用进行田间的具体试验。

4 结论

本研究筛得对烟草赤星病菌具有抑制作用的生防菌株*B. subtilis* X768与*B. velezensis* 703,抑菌谱较广。2株生防芽孢杆菌均可较强效果地抑制赤星病菌孢子萌发和菌丝生长,并且两株生防菌均可引起烟草防御基因通路的上调,具有较好的应用前景。

参 考 文 献

[1]许灵杰,谭应举,邹光进,等. 烟草赤星病研究进展及防治对策[J]. 农技服务,2018,35(6):53-55,57.
Xu L J, Tan Y J, Zou G J, et al. Research progress and control countermeasures of tobacco brown spot [J]. Agricultural Technology Service, 2018, 35(6): 53-55, 57.

[2]武海燕,李长水,马庆周,等. 链格孢(*Alternaria alternata*)在枣、梨和苹果果实上的致病性分化研究[J]. 天津农业科学,2023,29(5):47-50.
Wu H Y, Li C S, Ma Q Z, et al. Studies on the pathogenic differentiation of *Alternaria alternata* on jujube, pear and apple fruits[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2023, 29(5): 47-50.

[3]朱宇航,黄思洋,陈华保,等. 烟草赤星病防治药剂的筛选[J]. 烟草科技,2019,52(5):14-19.
Zhu Y H, Huang S Y, Chen H B, et al. Fungicide screening against tobacco brown spot [J]. Tobacco Science & Technology, 2019, 52(5): 14-19.

[4]宋月凤,王静茹,国立耘,等. 新疆枣上链格孢菌(*Alternaria alternata*)对戊唑醇、异菌脲和咪鲜胺的敏感性[J]. 中国果树,2023(5):88-92.
Song Y F, Wang J R, Guo L Y, et al. Sensitivity of *Alternaria alternata* from *Ziziphus* jujube in Xinjiang to tebuconazole, iprodione and prochloraz[J]. China Fruits, 2023(5): 88-92.

[5]Etesami H, Glick B R. Halotolerant plant growth - promoting bacteria: prospects for alleviating salinity stress in plants [J]. Environmental and Experimental Botany, 2020, 178: 104124.

[6]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.
Zhang Y J, Guo R. Screening and identification of antagonistic microorganism against *Alternaria alternata* and the stability analysis of its fermentation broth [J]. Journal of Zhejiang Normal University (Natural Sciences), 2019, 42(2): 179-183.

[7]赵龙飞,徐亚军,侯怡婷,等. 烟草赤星病菌拮抗性大豆根瘤内生菌的筛选及抑制作用[J]. 应用生态学报,2016,27(5):1560-1568.
Zhao L F, Xu Y J, Hou Y T, et al. Screening and inhibition of antagonistic endophytic bacteria isolated from soybean (*Glycine* max) nodules against *Alternaria longipes*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2016, 27(5): 1560-1568.

[8]杨菀彤,许灵杰,徐健,等. 基于精益生产的黔东南烟草赤星病防控关键问题调查与对策[J]. 浙江农业科学,2022,63(10):2368-2371,2376.
Yang W T, Xu L J, Xu J, et al. Investigation and countermeasures of tobacco red star disease control based on lean production in Qiandongnan [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2022, 63(10): 2368-2371, 2376.

[9]Kiesewalter H T, Lozano-Andrade C N, Wibowo M, et al. Genomic and chemical diversity of Bacillus subtilis secondary metabolites against plant pathogenic fungi [J]. Cold Spring Harbor Laboratory, 2020.

[10]Kaur P K, Joshi N, Singh I P, et al. Identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus vallismortis* R2 and their antifungal activity against *Alternaria alternata*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 122(1): 139-152.

[11]胡晓莉,蒋彩虹,耿锐梅等.山东部分地区烟草赤星病病原菌的形态学与分子生物学鉴定[J].江苏农业科学,2018,46(11):82-86.
Hu X L, Jiang C H, Geng R M, et al. Morphological and molecular biological identification of pathogens causing tobacco brown spot disease in some areas of Shandong Province [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(11): 82-86.

[12]蒋佳璇. 猪源益生菌的筛选及抗沙门氏菌感染的研究[D]. 重庆:西南大学,2017.
Jiang J X. Screening of probiotics from swine faeces and its protection of chicken from *Salmonella* spp. infection [D]. Chongqing: Southwest University, 2017.

[13]任建雯. 土壤生防菌株B56的分离、鉴定及对烟草赤星病的

生物防治研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2021.
Ren J W. Isolation, identification and biological control of soil-borne strain B56 against tobacco brown spot[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2021.
[14]张彩文,程坤,张欣,等. 贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)分类学及功能研究进展[J]. 食品与发酵工业,2019,45(17):258-265.
Zhang C W, Cheng K, Zhang X, et al. Taxonomy and functions of *Bacillus velezensis*: a review [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(17): 258-265.
[15]林波. 蚯蚓粪中烟草赤星病拮抗菌的筛选、防效验证及发酵条件优化[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2021.
Lin B. Screening, control effect and optimization condition of antagonistic bacterial strains against *Alternaria alternata* in vermicompost[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2021.
[16]张冬野. 番茄抗叶霉病Cf-16基因定位及抗病应答机制研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2020.
Zhang D Y. Mapping of tomato leaf mold resistance gene Cf-16 and analysis of resistance response mechanism [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2020.
[17]May A, de Souza dos Santos M, da Silva E H F M, et al. Effect of *Bacillus aryabhattai* on the initial establishment of pre-sprouted seedlings of sugarcane varieties[J]. Research, Society and Development, 2021, 10(2): e11510212337.
[18]Zhang L, Yan J P, Fu Z C, et al. FoEG1, a secreted glycoside hydrolase family 12 protein from *Fusarium oxysporum*, triggers cell death and modulates plant immunity[J]. Molecular Plant Pathology, 2021, 22(5): 522-538.
[19]Shin D. J., Yoo S. J., Hong J. K., et al. Effect of *Bacillus aryabhattai* H26-2 and *B. siamensis* H30-3 on growth promotion and alleviation of heat and drought stresses in Chinese Cabbage[J]. The Plant Pathology Journal, 2019, 35(2): 178 - 187.

Screening of antagonistic bacteria against *Alternaria alternate*, tobacco scab, and preliminary exploration of their biocontrol mechanism

Sun Weilin[1], Yan Xia[1*], Gao Jianxin[1], Cui Chuanbin[2], Wang Pingping[2], Wang Nana[1], Yang Mingming[3], Huang Lili[3*]

(*1. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. Shannxi Tobacco Company, Xi'an 710000 China; 3. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, China*)

Abstract: [Objective] The purpose of this study was aimed to identify biocontrol agents with good antagonistic effects against *Alternaria alternate*. The research included preliminary testing of their biocontrol control mechanism to provide valuable insights into the development of biocontrol agents and resources against Tobacco scab. [Methods] Antagonistic bacteria were obtained through primary and secondary screening. The biological control mechanisms were verified using methods such as phylogenetic tree analysis, inhibition spectrum determination, enzyme activity measurement, effects on mycelial growth and spore germination of *A. alternate*, included resistance quantitative detection, and *in vitro* leaf protection efficacy. [Results] Two strains with good antagonistic effects against *A. alternate* were identified as *Bacillus subtilis* X768 and *Bacillus velezensis* 703 through 16S rDNA sequencing. Both strains demonstrated broad-spectrum antibacterial activity. During the exploration of their biological control mechanisms, strain 703 was found to produce cellulase, protease, and amylase, while strain X768 produced cellulase, protease, amylase, and lipase. Both strains inhibited spore germination and affected the normal growth morphology of the pathogen's mycelium, showing strong inhibition effects. qRT-PCR analysis confirmed the impact of the antagonistic bacteria on tobacco defense gene pathways, including SA, JA, ET, etc. Treatment with strain 703 suggested possible invovlement of SA, JA, and ubiquitin ligase pathways in tobacco defense, while treatment with strain X768 indicated possible involvement of SA and ubiquitin ligase pathways. [Conclusion] The antagonistic strains *B. subtilis* X768 and *B. velezensis* 703, identified for their inhibitory effects against *A. alternate* exhibited broad-spectrum antibacterial activity, effectively inhibiting spore germination and mycelial growth of the pathogen. Both strains also upregulated tobacco defense gene pathways and showed good efficacy in in vitro leaf protection tests.

Keywords: Tobacco scab, Antagonistic bacteria, Biological control, Biocontrol mechanism

(编辑:吕俊俐)