

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2025.05.005

# 烟草赤星病拮抗细菌的筛选、鉴定和抑菌机制研究

栗卢瑞<sup>1</sup>, 程曦<sup>1</sup>, 文俊明<sup>2</sup>, 杨吉勇<sup>2</sup>,  
张斌<sup>2</sup>, 刘东阳<sup>3</sup>, 邓全<sup>3</sup>,  
郝兴安<sup>1</sup>, 杨照<sup>2</sup>

1. 西北农林科技大学 植物保护学院/植物病毒和资源微生物实验室, 陕西 咸阳 712100;

2. 陕西省烟草公司 咸阳市公司, 陕西 咸阳 712000;

3. 四川省烟草公司 凉山州公司, 四川 凉山 615000

**摘要:** 烟草赤星病由普通链格孢菌(*Alternaria alternata*)侵染引起, 是烟草成熟期的常见病害, 严重影响烟叶产量与品质。为实现该病害的持续有效防控, 从不同烟区筛选出多株具有较高抑菌活性的生防菌株, 其中菌株CX-2在盆栽试验中的防效为68.71%。通过形态学观察、生理生化特性分析及分子生物学鉴定, 确认CX-2菌株为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。除对普通链格孢菌具有明显抑制作用外, CX-2菌株对小麦茎基腐病菌(*Fusarium pseudograminearum*)等多种植物病原菌也表现出较强抑制活性。同时, CX-2菌株具备较强的纤维素酶活性、产蛋白酶能力、固氮与溶磷能力, 并对烟草生长具有显著的促进作用。发酵条件优化结果表明, CX-2菌株在多种条件下均能保持良好发酵性能。研究表明, CX-2菌株具有广阔的生物防治应用潜力。

**关键词:** 贝莱斯芽孢杆菌; 生物防治;

烟草赤星病

中图分类号: S432.4

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 2097-1354(2025)05-0033-13

## Screening, Identification and Inhibitory Mechanism of Antagonistic Bacteria against Tobacco Brown Spot Disease

LI Lurui<sup>1</sup>, CHENG Xi<sup>1</sup>, WEN Junming<sup>2</sup>, YANG Jiyong<sup>2</sup>,

收稿日期: 2024-10-16

基金项目: 陕西省烟草公司咸阳市公司科技项目(XYKJ-2022-08); 中国烟草总公司四川省公司科技项目(SCYC-2024-10)。

作者简介: 栗卢瑞, 硕士研究生, 主要从事植物病理学研究。

通信作者: 杨照, 硕士, 农艺师。

ZHANG Bin<sup>2</sup>, LIU Dongyang<sup>3</sup>, DENG Quan<sup>3</sup>,  
HAO Xing'an<sup>1</sup>, YANG Zhao<sup>2</sup>

1. Laboratory of Plant Viruses and Resource Microbiology / College of Plant Protection,

Northwest A & F University, Xianyan Shaanxi 712100, China;

2. Xianyang Tobacco Company of Shaanxi Province, Xianyang Shaanxi 712000, China;

3. Liangshanzhou Company, Sichuan Provincial Tobacco Company, Liangshan Sichuan 615000, China

**Abstract:** Tobacco brown spot, caused by *Alternaria alternata*, is a prevalent disease during the mature stage of tobacco growth, significantly impacting both the yield and quality of tobacco leaves. To achieve sustainable and effective disease control, biocontrol strains of bacteria with high antifungal activity were identified from various tobacco-growing regions. Among the candidate strains, strain CX-2 demonstrated a pot control efficacy of 68.71%. Comprehensive morphological, physiological, biochemical, and molecular biological analyses confirmed that strain CX-2 is a *Bacillus velezensis*. In addition to its efficacy against *A. alternata*, strain CX-2 exhibited strong inhibitory activity against multiple pathogenic fungi, including *Fusarium pseudograminearum*, the causative agent of wheat root rot. Furthermore, strain CX-2 displayed robust cellulase activity, protease production, nitrogen fixation, phosphorus solubilization, and growth-promoting effects on tobacco. Optimization results of fermentation conditions revealed that strain CX-2 could maintain good fermentation performance under various conditions. The results showed that CX-2 strain has broad application potential in biological control.

**Key words:** *Bacillus velezensis*; biological control; tobacco brown spot disease

烟草赤星病是一种由真菌引起的病害，其病原体为丝孢纲链格孢属的普通链格孢菌(*Alternaria alternata*)。该病常发生于烟叶成熟期，主要表现为典型的叶斑症状。病原菌生长迅速、适应性强，近年来已成为继病毒病之后，对烟叶产量和品质影响最为严重的病害之一，严重制约了农民经济效益<sup>[1]</sup>。烟草赤星病最早于1892年在美国烟草上被发现，每年发病面积约10万hm<sup>2</sup>，显著降低烟叶质量，造成数亿元经济损失<sup>[2]</sup>，对全球烟草产业构成严重威胁。

目前，针对烟草赤星病的防治策略普遍强调“预防为主”，主要依靠选用抗性较强的烟草品种，并结合化学农药进行控制<sup>[3]</sup>。现有防治措施仍以化学药剂为主(如菌核净、丙环唑等)，这些药剂对病原菌具有较好的抑制效果。然而，长期依赖化学药剂存在明显弊端，不仅易导致病原菌产生抗药性，还会造成土壤和水体污染，对生态环境及人体健康带来不良影响。相比之下，生物防治主要依靠拮抗性微生物及其代谢产物(如木霉菌、芽孢杆菌及其产生的抗菌物质)来抑制病原菌，具有安全、环保、无残留等优点，不会造成环境污染，并能有效延缓病原菌抗药性的发展。近年来，生物防治在烟草病害防控中的研究逐渐增多，主要通过筛选来源于土壤或烟草内生的有益微生物加以利用，国内外相关研究均已取得初步进展<sup>[4-8]</sup>。例如，陈娜等<sup>[9]</sup>筛选并鉴定出一株对烟草赤星病具有生防效果的多粘类芽孢杆菌，其胞内粗提物可显著抑制黑胫病菌的菌丝生长和孢子萌发；田琳等<sup>[10]</sup>筛选的生防菌株XNB-02对烟草赤星病菌表现出较强拮抗作用，抑菌圈半径可达10.33mm；叶爱萍等<sup>[11]</sup>则从蚯蚓粪中筛选到一株副地衣芽孢杆菌，其初筛和复筛的抑菌率均超过60%，对孢子萌发和菌丝生长的抑制率分别为73.33%和79.68%。因此，从健康烟株根际土壤中筛选拮抗菌，寻找兼具绿色防控和环境友好特性的生防菌株具有重要意义<sup>[12-14]</sup>。本研究从四川省攀枝花市土壤样品中分离并筛选获得1株具有生防

潜力的菌株,测定其对烟草赤星病菌的抑制作用。通过形态学观察、生理生化特性分析及分子生物学鉴定,确认该菌株为贝莱斯芽孢杆菌。进一步探讨了该菌株对烟草赤星病的抑菌机理、室内防效及促生作用,并检测其发酵液的稳定性。研究结果可为生防菌剂的开发提供新的菌种资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

#### 1.1.1 供试病原真菌

烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)在使用前置于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上活化培养7 d。另选取9种病原真菌,包括小麦茎基腐病菌(*Fusarium pseudograminearum*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、梨腐烂病菌(*Valsa ambiens*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、辣椒疫病菌(*Phytophthora capsici* Leonian)、马铃薯早疫病菌(*Alternaria solani*)、烟草根黑腐病菌(*Thielaviopsis basicola*)、番茄早疫病菌(*A. solani*)和苹果炭疽病菌(*Glomerella cingulata*)。所有病原真菌均保存于西北农林科技大学植物病毒与资源微生物实验室。

#### 1.1.2 生防细菌土壤筛选

供试土壤采自四川省攀枝花市长期实行轮作的健康烟田,共随机采集烟株根际土壤20份。

#### 1.1.3 供试培养基

PDA培养基的配方为葡萄糖20 g、土豆200 g、琼脂15~20 g、蒸馏水1 000 mL, pH值维持自然。革兰氏染色所用试剂包括番红染色液、结晶紫染色液、95%乙醇溶液和碘液。LB液体培养基按常规配方制备,固体培养基在此基础上加入琼脂15~20 g。PVK培养基用于溶磷能力检测,其成分为MnSO<sub>4</sub> 1.0 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g、葡萄糖10.0 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g、KCl 0.3 g、琼脂粉15.0~20.0 g、Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 5.0 g、NaCl 0.3 g、FeSO<sub>4</sub> 0.3 g、蒸馏水1 000 mL。

钾长石培养基用于解钾能力检测,配方为CaCO<sub>3</sub> 0.1 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、钾长石粉1.0 g、蔗糖5 g、琼脂粉15.0~20.0 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g、FeCl<sub>3</sub> 0.05 g、蒸馏水1 000 mL。CMC培养基用于纤维素酶产量检测,成分为KNO<sub>3</sub> 1.0 g、羧甲基纤维素20.0 g、琼脂粉15.0~20.0 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g、NaCl 0.5 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g、蒸馏水1 000 mL。纳氏试剂分为两部分,a液为KOH 15 g溶于蒸馏水50 mL,b液为KI 5 g和HgCl<sub>2</sub> 2.5 g溶于蒸馏水10 mL,使用时混合。

#### 1.1.4 供试试剂

实验中使用甲基红试剂、卢戈氏碘液和石蕊试剂。

#### 1.1.5 供试植物

供试植物为烟草品种K326,6~8叶期。同时选用的烟草种子包括K326、延安1号、中烟特香301、云烟119、云烟87和豫烟12号。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 拮抗菌分离

从每份待检测土壤样品中取10 g,加入90 mL无菌水中混匀后,置于60℃恒温水浴锅中煮30 min,静置10 min。取上清液依次稀释,制备10<sup>-2</sup>至10<sup>-8</sup>梯度稀释液。吸取0.1 mL稀释

液涂布于 LB 平板, 在 28 °C 培养箱中倒置培养 3 d。挑选不同形态的单菌落进行多次纯化, 直至菌落在形态、颜色及大小上保持一致。将纯化后的菌株接种于 LB 斜面培养基, 在适宜条件下培养 3 d 后, 置于 4 °C 冰箱保存。

### 1.2.2 拮抗菌筛选

采用对峙培养法筛选拮抗菌株<sup>[15]</sup>。以烟草赤星病菌为指示菌, 将病菌菌饼接种于 PDA 平板中央, 再将分离得到的细菌菌株接种于距病原菌等距的十字交叉四端。置于 28 °C 恒温培养箱中培养 5 d 后, 测量抑菌带宽度, 并择优选取抑菌带最大的菌株。每组实验设置 3 个重复。

### 1.2.3 拮抗菌鉴定

#### 1.2.3.1 形态学及生理生化特征鉴定

在 30 °C 条件下于 LB 培养基中培养菌株 CX-2, 采用扫描电子显微镜观察其菌落形态, 并在光学显微镜下通过革兰氏染色和芽孢染色进行细胞形态观察。利用 MIDI 系统分析菌株 CX-2 的脂肪酸组成, 并通过 API 50CH 试剂条进行进一步鉴定。

#### 1.2.3.2 分子生物学鉴定

采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F 和 1492R 扩增 16S rRNA 基因。PCR 反应体系与反应条件参照相关文献<sup>[16]</sup>。扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。所得序列利用 NCBI 数据库的 BLAST 程序进行同源性比对, 并使用 MEGA 7.0 软件采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树。

### 1.2.4 菌株 CX-2 的抑菌谱测定

采用平板对峙法进行抑菌试验。将烟草赤星病菌菌饼接种于 PDA 平板中央, 再将菌株 CX-2 等距接种于菌饼周围 4 个方向(距离 3 cm)。平板置于 28 °C 培养箱中培养 5 d 后测量抑菌带宽度, 每组设 3 个重复。抑菌率的计算公式如下<sup>[17]</sup>:

$$\text{抑菌率}(\%) = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\% \quad (1)$$

### 1.2.5 菌株 CX-2 发酵条件优化

依据以下标准设定基础发酵条件: 接种比例为 1%, 培养液初始 pH 值设为 7.0, 培养温度为 28 °C, 液体装液量与三角瓶体积比为 2:5(即在 250 mL 三角瓶中加入 100 mL 培养液), 摇床转速设为 150 rpm, 培养时间为 2 d。为优化各参数, 分别设置如下梯度: 初始 pH 值设为 4、5、6、7、8、9 六个水平; 装液量设为 25、50、75、100、125、150 mL 六个水平; 温度设为 24、26、28、30、32、34 °C 六个水平; 接种比例设为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 六个水平。每个处理均设置 3 个重复。

### 1.2.6 菌株 CX-2 次生代谢产物分析

#### 1.2.6.1 溶磷、解钾及固氮能力

CX-2 菌株在 28 °C 恒温条件下培养 2 d 后, 利用接种环分别点接于溶磷(PVK)培养基和钾长石培养基中央, 置于 28 °C 培养箱中避光培养 4 d, 观察并记录透明圈的形成情况<sup>[18]</sup>。固氮能力的检测采用纳氏试剂法: 使用接种环将 CX-2 接种于蛋白胨无氮液体培养基中, 振荡培养 3 d 后向其中加入 5 mL 纳氏试剂, 以未接种的蛋白胨无氮培养基为空白对照。在常温条件下, 纳氏试剂呈淡黄绿色; 反应液在试管架中静置 1 h 后, 观察并记录碘离子和汞离子与液体中氨反应所形成的红棕色或黄色络合物生成情况<sup>[19]</sup>。

### 1.2.6.2 抑菌相关水解酶

CX-2 菌株的酶活性与代谢产物产生情况通过多种方法进行检测。产纤维素酶的测定中,将在 28 ℃ 恒温条件下培养 2 d 的 CX-2 菌体用接种环点接于羧甲基纤维素(CMC)培养基中央,在 28 ℃ 恒温培养箱内避光培养,每组设 3 个重复。培养 4 d 后,用碘液染色 10 min,再用 5% NaCl 溶液及无菌水反复冲洗,观察透明圈的产生情况。产蛋白酶的测定中,将同样培养 2 d 的 CX-2 菌体直接点接于酵素(YMA)培养基中央,每组设 3 个重复,并在 28 ℃ 恒温培养箱内避光培养 4 d。随后使用 1% 刚果红溶液染色 10 min,并用无菌水冲洗,观察透明圈形成情况<sup>[19]</sup>。产嗜铁素的检测中,将 CX-2 接种于嗜铁素培养基,在 30 ℃ 条件下培养 5 d,每组设 3 个重复;若在培养基上出现明显降解圈,则表明该菌株具有产生嗜铁素的能力<sup>[18]</sup>。

### 1.2.7 菌株 CX-2 盆栽防效测定

#### 1.2.7.1 促生试验

挑选生长势相近的 5 叶期烟苗 30 株,移栽至大盆中培养,并在常规条件下培育 7 d 至其生长稳定。制备含菌量为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 的发酵液,每盆灌根处理 300 mL,每 7 d 处理 1 次,期间正常浇水。同时,设置 10 株正常培养、不进行菌液处理的烟株作为对照。在移栽后 70 d 采收烟株,测定各株茎围和株高,去除根际附着土壤后称量植株鲜重,再将样品置于 60 ℃ 烘箱中干燥 72 h,最后测定植株干重。

#### 1.2.7.2 室内盆栽防治效果

设置清水对照组、接菌对照组、菌株发酵液保护效果处理组、菌株发酵液治疗效果处理组、50%多菌灵保护效果处理组及 50%多菌灵治疗效果处理组共 6 个处理。清水对照组不接种发酵液,仅以清水正常浇灌。接菌对照组移苗 7 d 后,每盆灌根 100 mL、菌数为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 的烟草赤星病菌悬液。菌株发酵液保护效果处理组移苗 7 d 后,每盆灌根 200 mL、菌数为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 的菌株 CX-2 发酵液,待 2 d 后再接种与接菌对照组相同条件的病菌悬液。菌株发酵液治疗效果处理组缓苗 7 d 后,先灌根 100 mL、浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 的病菌悬液,再于 2 d 后接种 200 mL、菌数为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 的菌株 CX-2 发酵液。50%多菌灵保护效果处理组在烟株茎基部喷施稀释 500 倍的 50%多菌灵,2 d 后再灌根 100 mL 病菌悬液。50%多菌灵治疗效果处理组在缓苗 7 d 后,先灌根 100 mL 病菌悬液,再于 2 d 后在烟株茎基部喷施稀释 500 倍的 50%多菌灵。每个处理均设 5 盆重复,置于温室条件下培养,15 d 后调查烟苗发病情况,并计算发病率和病情指数。为客观评价不同处理的防治效果,在盆栽试验之后对烟株病害进行分级,病害分级标准见表 1。统计烟草赤星病的发病率,并按照公式(2)(3)计算病情指数和相对防效。

表 1 病害分级表

病害等级	分级标准
0 级	全株无病
1 级	茎部病斑低于茎部 30%,或叶片凋萎低于 30%
3 级	茎部病斑环绕茎部 30%~50%,或 30%~50%叶片轻度凋萎
5 级	茎部病斑超过茎部 50%,或 50%~70%叶片凋萎
7 级	茎部病斑全部环绕茎部,或 70%以上的叶片凋萎
9 级	病株基本枯死

$$\text{相对防效}(\%) = \frac{\text{对照区病情指数} - \text{处理区病情指数}}{\text{对照区病情指数}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病叶数} \times \text{各级代表值})}{\text{调查总叶数} \times \text{最高级代表值}} \times 100 \quad (3)$$

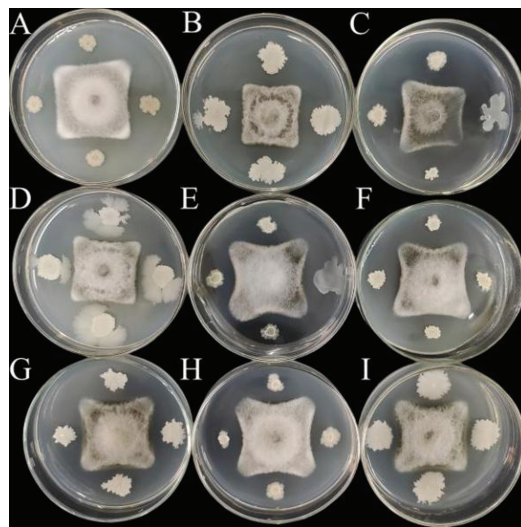
### 1.3 数据统计与统计学分析

试验数据包括抑菌率、透明圈直径、植株生长指标(茎围、株高、鲜重和干重)以及病情指数和相对防效等参数。所有数据均采用 Excel 2016 进行整理和初步统计,并使用 SPSS 19.0 软件进行方差分析(ANOVA)。各处理间差异通过 Duncan 多重比较法进行检验,显著性水平设定为  $p < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟草赤星病拮抗菌株的分离与筛选

从 20 份根际土样中共分离纯化 253 株细菌。通过对峙试验筛选出 9 株具有明显抑菌活性的菌株,菌株拮抗效果如图 1 所示。其中, CX-2 的抑菌带最大,达 17.23 mm(表 2), CX-2 对烟草赤星病菌的抑制表现见图 2。



图中 A~I 分别对应菌株 CX-1、CX-2、CX-3、CX-4、CX-5、CX-6、CX-7、CX-8 和 CX-9。

图 1 菌株拮抗烟草赤星病菌效果

表 2 拮抗效果显著菌株的生防菌抑菌圈直径

菌株编号	抑菌带宽度/mm
CX-1	13.60 ± 0.30b
CX-2	17.23 ± 0.70a
CX-3	14.97 ± 0.26b
CX-4	13.50 ± 0.20bc
CX-5	11.33 ± 0.35c
CX-6	12.87 ± 0.40bc
CX-7	10.37 ± 0.40d
CX-8	10.47 ± 0.45d
CX-9	9.17 ± 0.93e

注:小写字母不同表示组间数据比较差异具有统计学意义( $p < 0.05$ )。

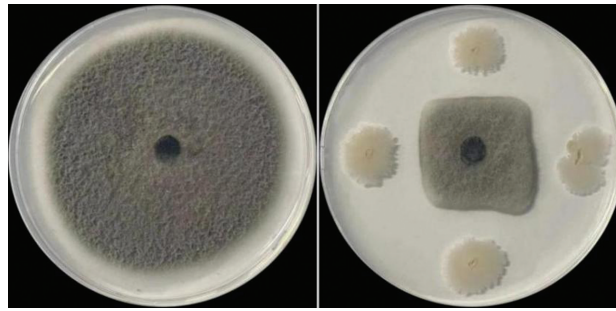
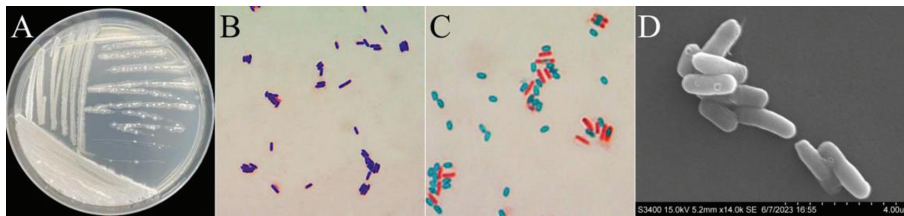


图 2 菌株 CX-2 对烟草赤星病菌的抑制效果

## 2.2 烟草赤星病拮抗菌 CX-2 的鉴定

### 2.2.1 形态学鉴定

CX-2 菌株革兰氏染色结果为阳性, 细胞呈杆状, 能形成芽孢。菌落边缘不规则, 表面呈白色且具有粘稠性(图 3)。



A 为菌落形态, B 为革兰氏染色菌体形态, C 为芽孢染色菌体形态, D 为扫描电镜图。

图 3 烟草赤星病拮抗菌 CX-2 形态图

### 2.2.2 生理生化鉴定

采用 MIDI 技术对 CX-2 菌株进行脂肪酸分析, 结果显示其主要脂肪酸 C15: 0 anteiso、C15: 0 iso、C16: 0, 分别为 44.44%、16.11%、12.51%(表 3)。此外, API 50CH 检测结果表明, 该菌株对纤维二糖、蔗糖、葡萄糖、果糖、甘露糖、甘露醇、淀粉、糖原、麦芽糖、 $\alpha$  籽甲基-D-葡萄糖甙、山梨醇和七叶灵呈阳性反应, 对甘油、L-阿拉伯糖、核糖、D-木糖、肌醇、柳醇、乳糖、牻牛儿糖、海藻糖、棉籽糖、N-乙酰-葡萄糖胺、苦杏仁甙和熊果甙呈弱阳性反应(表 4)。综合分析, 这些生理生化特征与贝莱斯芽孢杆菌的特性一致。

表 3 菌株 CX-2 的脂肪酸种类

脂肪酸种类	占比/%	脂肪酸种类	占比/%
C12: 0	0.12	C16: 0	12.51
C11: 0 3OH	0.18	C15: 0 iso 3OH	0.26
C13: 0 iso	0.79	C15: 0 2OH	0.39
C13: 0 anteiso	0.31	C17: 1 iso $\omega$ 10c	0.76
C12: 0 iso 3OH	0.10	C17: 0 iso	4.45
C12: 0 2OH	0.16	C17: 0 anteiso	6.04
C14: 0 iso	1.91	C17: 0	0.13
C14: 0	3.60	C16: 0 3OH	0.10
C15: 0 iso	16.11	C18: 1 $\omega$ 9c	0.14
C15: 0 anteiso	44.44	C18: 0	0.41
C15: 1 $\omega$ 5c	0.11	C17: 0 iso 3OH	0.09
C14: 0 iso 3OH	0.08	C17: 0 2OH	0.19
C16: 1 $\omega$ 7c alcohol	0.45	C16: 0 iso	1.99
C16: 1 $\omega$ 11c	3.52	Summed Feature 2	0.20
Summed Feature 4	0.46		

表4 菌株CX-2的Biolog GEN III结果

生理生化指标	结果	生理生化指标	结果
甘油	W	柳醇	W
L-阿拉伯糖	W	纤维二糖	+
核糖	W	麦芽糖	+
D-木糖	W	乳糖	W
葡萄糖	+	犏牛儿糖	W
果糖	+	蔗糖	+
甘露糖	+	海藻糖	W
肌醇	W	苦杏仁甙	W
甘露醇	+	熊果甙	W
山梨醇	+	棉籽糖	W
$\alpha$ 籽甲基-D-葡萄糖甙	+	淀粉	+
N-乙酰-葡糖胺	W	糖原	+
七叶灵	+		

注：“+”为阳性，“W”为弱阳性。

### 2.2.3 分子生物学鉴定

克隆并测序获得菌株CX-2的16S rRNA基因片段，长度为1453 bp。该基因序列已提交至GenBank数据库，登录号为PQ813645。通过EzBioCloud网站(<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/>)将CX-2的16S rRNA序列与已知模式菌株进行比对，结果显示CX-2与PQ459431.1 *Bacillus velezensis*的序列相似度最高(图4)。

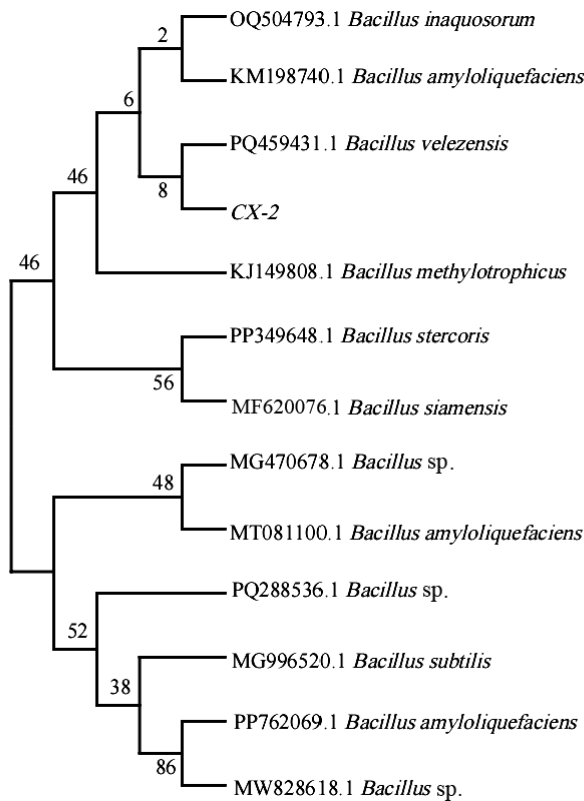
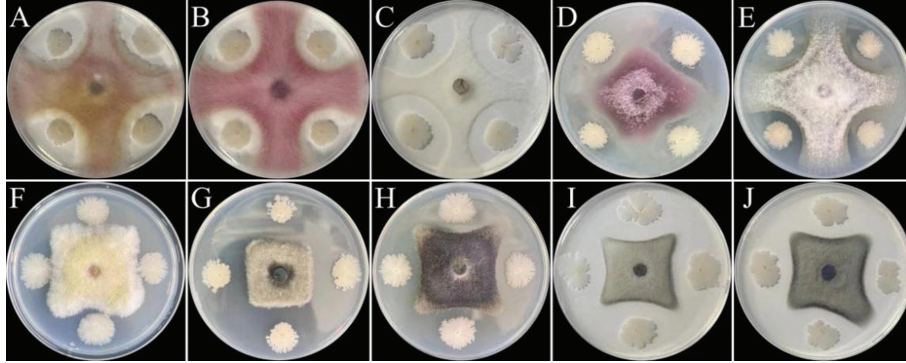


图4 CX-2菌株16S rRNA的系统发育树

### 2.3 菌株 CX-2 抑菌谱测定

通过对 10 种常见经济作物病害病原菌进行对峙试验, 菌株 CX-2 显示出良好的广谱抑菌活性。其中, 针对玉米大斑病菌、小麦赤霉病菌和苹果炭疽病菌的抑菌率均超过 90%; 此外, 对番茄早疫病菌、马铃薯早疫病原菌和小麦茎基腐的抑菌率均超过 70%。具体见图 5 和表 5。



A 为小麦茎基腐病菌, B 为小麦赤霉病菌, C 为梨腐烂病菌, D 为黄瓜枯萎病菌, E 为辣椒疫霉菌, F 为马铃薯早疫病菌, G 为烟草根黑腐病菌, H 为番茄早疫病菌, I 为苹果炭疽病菌, J 为玉米大斑病菌。

图 5 菌株 CX-2 拮抗常见病原菌

表 5 *B. velezensis* CX-2 对常见病原菌的抑菌效果

病原菌	抑菌带宽度/mm	抑菌率/%
小麦茎基腐病( <i>Fusarium pseudograminearum</i> )	7.10±0.06e	71.01±1.25b
小麦赤霉病菌( <i>Fusarium graminearum</i> )	11.27±0.22c	93.61±2.81a
梨腐烂病菌( <i>Valsa ambiens</i> )	3.22±0.15f	43.99±0.99e
黄瓜枯萎病菌( <i>Fusarium oxysporum</i> )	6.38±0.32e	53.10±2.44d
辣椒疫病菌( <i>Phytophthora capsici</i> Leonian)	9.46±0.45e	64.40±1.71c
马铃薯早疫病菌( <i>Alternaria solani</i> )	10.27±0.12b	70.89±1.55a
烟草根黑腐病菌( <i>Thielaviopsis basicola</i> )	6.21±0.12e	50.04±0.34d
番茄早疫病菌( <i>Alternaria solani</i> )	10.28±0.23d	80.99±1.06a
苹果炭疽病菌( <i>Glomerella cingulata</i> )	15.43±0.45a	93.07±0.30a
玉米大斑病菌( <i>Exserohilum turcicum</i> )	11.34±0.11c	92.61±1.56a

注:小写字母不同表示组间数据比较差异具有统计学意义( $p < 0.05$ )。

### 2.4 菌株 CX-2 发酵条件优化

通过对菌株 CX-2 在不同发酵条件(如培养温度、初始 pH 值、装液量及接种量等)的单因素优化, 得到了最佳发酵条件。当培养 pH 值为最佳值 6 时, 吸光值( $OD_{600}$ )达到峰值,  $OD_{600}$  值为 2.201; 在其他条件不变的情况下, 当接种量为 1.0% 时,  $OD_{600}$  达到峰值, 其值为 2.226; 在其他条件不变的情况下, 当培养温度设定为 30 °C 时,  $OD_{600}$  达到峰值, 其值为 2.314; 在其他条件不变的情况下, 当装液量为 75 mL 时,  $OD_{600}$  为 2.224(图 6)。

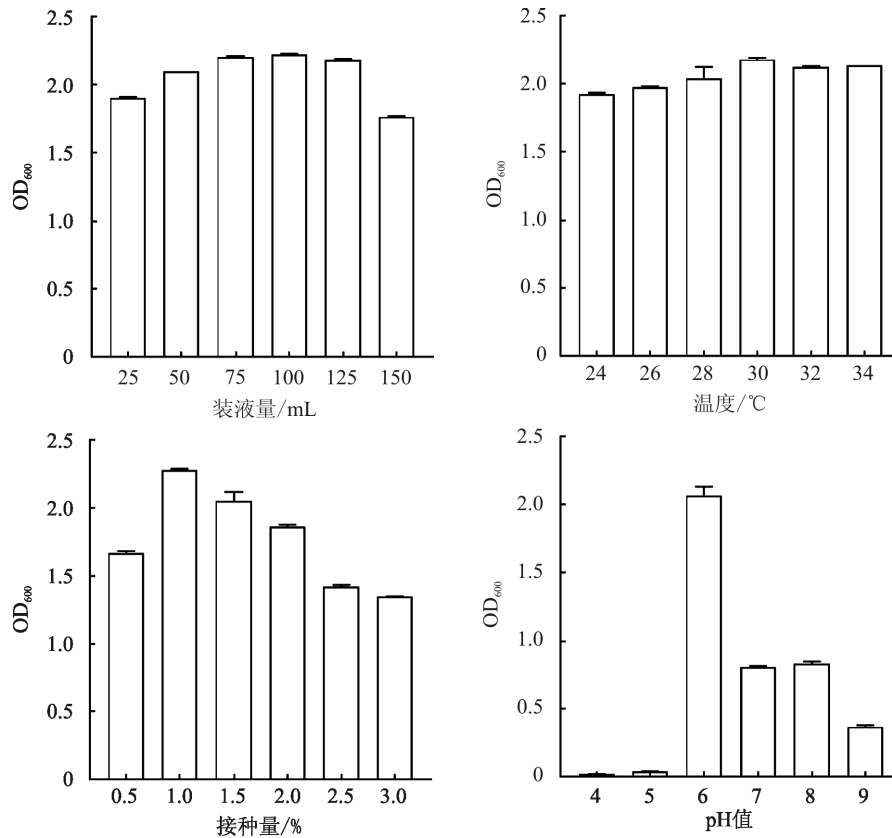


图6 菌株CX-2发酵条件优化

## 2.5 菌株CX-2次生代谢产物分析

在不同培养基中培养 96 h 后, 菌株 CX-2 均能产生透明降解圈(图 7)。分析结果表明, 菌株 CX-2 表现出较强的纤维素酶活性、蛋白酶产量、固氮能力和溶磷能力。在 CMC 培养基中, 菌株 CX-2 形成直径 54.3 mm 的透明圈; 在 YMA 培养基中, 透明圈直径为 22.7 mm; 在纳氏试剂中, 形成明显的红棕色络合物。菌株的解钾能力较弱。

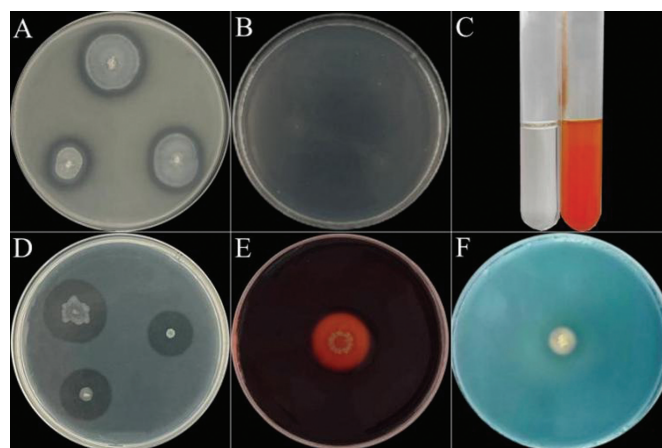
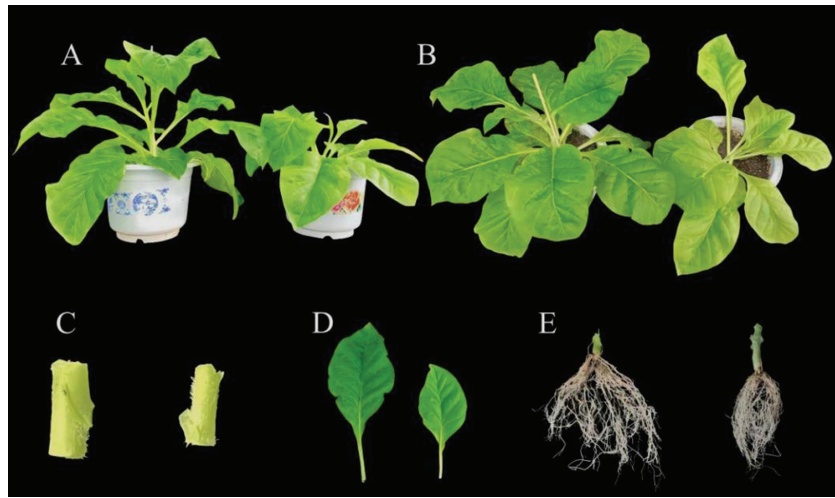


图7 菌株CX-2代谢产物测定

## 2.6 菌株CX-2盆栽促生效果

在温室中培养 70 d 后, 将处理组和对照组的烟株采出, 分别对株高、茎围、烟叶鲜重、烟

叶干重、根系湿重和根系干重进行比较。由表6可见,CX-2发酵液处理组的烟株在各项农艺性状上均表现出显著的提升,整体长势优于对照组,烟叶面积较大,根茎部健康发达(图8)。与对照组相比,地上部分鲜重和干重分别增加了67.71%和84.92%,根系鲜重增加了74.59%。



A为叶片大小,B为全株对比,C为处理前4心叶烟苗,D为处理70 d后对比,E为根部对比;右侧均为空白对照。

图8 菌株CX-2盆栽促生效果

表6 菌株CX-2对烟株农艺性状的改善效果

处理方法	株高/cm	茎粗/cm	地上部鲜重/g	地上部干重/g	地下部鲜重/g
菌株发酵液	16.23±0.32a	3.12±0.72a	32.62±5.12a	2.33±0.47a	2.13±0.24a
空白对照	11.78±0.68b	2.37±0.54b	19.45±4.87b	1.26±0.24b	1.22±0.33b

注:小写字母不同表示组间数据比较差异具有统计学意义( $p < 0.05$ )。

### 2.7 菌株CX-2的室内盆栽防治效果

室内盆栽试验结果如表7所示,CX-2菌株发酵液和50%多菌灵处理后的烟株发病率和病情指数较接菌对照相比均显著降低。CX-2菌株发酵液在预防烟草赤星病方面的效果与杀菌剂50%多菌灵相当,但在治疗效果上,50%多菌灵优于菌株发酵液。该结果表明,CX-2菌株发酵液对烟草赤星病具有较好的防治效果。

表7 CX-2发酵液对烟草赤星病的防治效果

处理方法	发病率/%	病情指数	防治效果/%
菌株发酵液保护处理	14.28±1.85a	6.97±0.32a	68.71±1.23a
50%多菌灵保护处理	14.71±1.71a	7.03±0.27a	71.62±1.14a
菌株发酵液治疗处理	17.15±1.36bc	10.21±0.64c	58.77±1.62bc
50%多菌灵治疗处理	16.21±0.87b	8.62±0.41ab	69.72±1.17b
接菌对照	29.37±0.24d	22.87±0.62d	—

注:小写字母不同表示组间数据比较差异具有统计学意义( $p < 0.05$ )。

## 3 讨论与结论

生防菌因其环保、低毒性及对非目标生物影响小等特点,已成为农业中重要的绿色防控手段。通过分离和筛选优质生防菌株,可以丰富烟草的生防资源。在常见的生防菌中,枯草芽孢

杆菌、地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、木霉菌和淡紫拟青霉等已广泛应用于农作物病害防治和土壤健康管理<sup>[20]</sup>。本研究从根际土壤中分离得到了一株具有显著拮抗作用的菌株 CX-2, 经形态学、生理生化及分子鉴定, 确认其为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。

贝莱斯芽孢杆菌作为一种常用的生防菌, 广泛分布于植物根际土壤中, 具有良好的环境适应性, 能够有效定殖在植物根部, 形成保护屏障, 从而减轻病害的发生, 并显著促进植物的生长<sup>[21]</sup>。已有研究报道了贝莱斯芽孢杆菌在植物病害防治中的应用。Xia 等<sup>[22]</sup>的研究表明, 芽孢杆菌是抗性玉米品种的核心微生物群, 可以诱导宿主对玉米茎腐病的代谢防御; 王玉鹏等<sup>[23]</sup>分离鉴定出一株贝莱斯芽孢杆菌 G18, 能够显著促进枸杞的生长, 并增强其对根腐病的抗性; 周池等<sup>[24]</sup>的研究表明, 辣椒内生菌贝莱斯芽孢杆菌 XY40-1 对辣椒疫病具有良好的生防效果, 同时具备促生作用, 具有成为防治辣椒病害的多功能优质菌株的潜力; 王文肖等<sup>[25]</sup>将贝莱斯芽孢杆菌 EA19 与化学药剂复配, 发现贝莱斯芽孢杆菌 EA19 与多菌灵在小麦赤霉病防治中具有协同效果, 二者复配可减少多菌灵的使用量。本研究筛选出的菌株 CX-2 同样表现出广泛的抑菌活性和极强的生物活性, 温室促生试验证实了 CX-2 发酵液对烟株各农艺性状的显著提升效果, 室内盆栽防效试验则明确了 CX-2 在烟草赤星病防治中的应用前景。CX-2 对烟草赤星病的防治效果近 70%, CX-2 菌株的成功应用表明, 它可以显著抑制链格孢属真菌的生长, 从而降低烟草赤星病的发病率, 验证了 CX-2 作为生防菌株的可行性, 为其在病害防治体系中的应用提供了重要依据。

由于贝莱斯芽孢杆菌在生长过程中能够产生多种活性物质和芽孢, 因此筛选和优化其发酵培养条件显得尤为重要<sup>[26-27]</sup>。菌株 CX-2 的发酵过程受到多种因素(如发酵设备、工艺和技术等)的影响。本研究对菌株 CX-2 的发酵工艺进行了优化, 确定其最适 pH 值为 6、最适接种量为 1.0%、最适培养温度为 30 °C、最适装液量为 75 mL, 以提高发酵效率和产孢量。下一步可进一步优化 CX-2 在环境应激条件下(如高温、干燥)的抗逆性, 以增强其在多种农业生态环境中的适应能力。

本研究虽对菌株 CX-2 的生防能力进行了初步评估, 但其关键抑菌活性物质尚未明确。此外, 未来可进一步探索 CX-2 与土壤中其他微生物的相互作用, 研究其在复杂微生态环境中的表现; 还可以研究 CX-2 与其他生物防治剂(如木霉菌、苏云金芽孢杆菌)的协同效应, 以提升整体防病效果。

#### 参考文献:

- [1] 彭希文, 刘光珍, 杨永柱, 等. 云南省烟草赤星病(Tobacco brown spot)病原研究及其防治药剂的筛选[J]. 西南农业大学学报, 2000, 22(2): 153-156.
- [2] 彭坤, 王士良, 刘富, 等. 烟草赤星病病原菌生物学特性及致病性研究[J]. 现代农业科技, 2021(2): 78-80.
- [3] 侯慧, 徐汉虹, 林壁润, 等. 防治植物病害的农用抗生素的研究及应用[J]. 河南农业科学, 2003, 32(11): 28-31.
- [4] 曾智, 孙运军, 钱荣华, 等. 我国微生物农药的研究应用现状与前景[J]. 农业现代化研究, 2008, 29(2): 254-256.
- [5] 宋芷薇, 田志宏. 细菌在烟草土传病生物防治中的应用研究[J]. 安徽农学通报, 2021, 27(8): 31-35, 100.
- [6] 何沛, 苏代发, 杨俊誉, 等. 微生物在烟草中的研究、开发与利用进展[J]. 湖北农业科学, 2019(S2): 42-57, 60.
- [7] 邓建良, 刘红彦, 刘玉霞, 等. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1 抑制植物病原真菌活性物质鉴定[J]. 植物病理学报, 2010, 40(2): 202-209.
- [8] SYED AB RAHMAN S F, SINGH E, PIETERSEC M J, et al. Emerging Microbial Biocontrol Strategies for Plant Pathogens[J]. Plant Science, 2018, 267: 102-111.
- [9] 陈娜, 陈婧, 闵琪茹, 等. 烟草赤星病生防菌的鉴定及其抑菌机理[J]. 西北农业学报, 2023, 32(8): 1268-1278.
- [10] 田琳, 陈娜, 曹尚, 等. 生防菌 XNB-02 的鉴定及其对烟草赤星病的防病机理[J]. 植物保护学报, 2024,

- 51(4):804-816.
- [11] 叶爱萍,林波,王平平,等.烟草赤星病拮抗菌 Q96 的筛选鉴定及其防病效果研究[J].中国烟草科学,2022,43(5):56-60.
- [12] AITKAKI A, KACEMCHAOUICHE N, DEHIMATL, et al. Biocontrol and Plant Growth Promotion Characterization of Bacillus Species Isolated from Calendula Officinalis Rhizosphere[J]. Indian Journal of Microbiology, 2013, 53(4): 447-452.
- [13] AL-SAADL A, AL-BADRANA I, AL-JUMAYLIS A, et al. Impact of Bacterial Biocontrol Agents on Aflatoxin Biosynthetic Genes, aflD and aflRExpression, and Phenotypic Aflatoxin B1Production by Aspergillus flavus under Different Environmental and Nutritional Regimes[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 217: 123-129.
- [14] BARAHONA E, NAVAZO A, MARTÍNEZ-GRANERO F, et al. Pseudomonas Fluorescens F113 Mutant with Enhanced Competitive Colonization Ability and Improved Biocontrol Activity Against Fungal Root Pathogens [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(15): 5412-5419.
- [15] 李茂业,闫芳芳,刘苏,等.四川烤烟赤星病的生物学特性及药剂筛选[J].中国烟草科学,2021,42(1):54-59.
- [16] 宋福平,张杰,谢天健,等.苏云金芽孢杆菌 cry 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立[J].中国农业科学,1998,(3):13-18.
- [17] 祖丽皮亚木·木沙尔,李丽,郭建伟,等.甘草内生细菌对4种植物病原菌的抑菌谱及其16S rRNA 系统发育分析[J].西北农业学报,2018,27(9):1367-1374.
- [18] 邵嘉朱,吕雯,廖鑫琳,等.大豆根际促生菌的分离、鉴定及其耐盐促生作用[J].中国农业科学,2024,57(21):4248-4263.
- [19] LIUY H, GUO J W, SALAM N, et al. Culturable Endophytic Bacteria Associated with Medicinal Plant Ferula Songorica; Molecular Phylogeny, Distribution and Screening for Industrially Important Traits[J]. 3 Biotech, 2016, 6(2): 209.
- [20] 李雨欣,戴欣宇,曹雪梅,等.生防菌在植物病害领域的研究进展[J].湖南生态科学学报,2023,10(2):109-116.
- [21] 皮娜娜,王玺茜,罗建军,等.贝莱斯芽孢杆菌防控植物病害的研究进展[J].广东农业科学,2024,51(6):48-59.
- [22] XIA X Y, WEI Q H, WU H X, et al. Bacillus Species Are Core Microbiota of Resistant Maize Cultivars that Induce Host Metabolic Defense Against Corn Stalk Rot[J]. Microbiome, 2024, 12(1): 156.
- [23] 王玉鹏,何静,陈伟,等.贝莱斯芽孢杆菌 G18 的抑菌及促生作用研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2025,53(5):64-75.
- [24] 周池,周诗晶,陶禹,等.贝莱斯芽孢杆菌 XY40-1:全基因组特征分析及对辣椒疫病的生物防治效果评价[J].微生物学报,2024,64(12):4882-4901.
- [25] 王文肖,刘美玲,阙亚伟,等.贝莱斯芽孢杆菌 EA19 与多菌灵复配防治小麦赤霉病研究[J].河南农业科学,2024,53(10):117-126.
- [26] 谭鸿升.植物病害生防菌抗菌活性物质研究进展[J].农业研究与应用,2024,37(1):66-74.
- [27] 赵金,高子晴,丛丽娜.贝莱斯芽孢杆菌 BA-300 的鉴定、发酵条件优化及应用[J].大连工业大学学报,2023,42(3):176-180.