

防御假单胞菌 KBD-3 在作物病害防治及富硒中的应用研究

崔宏¹ 刘青² 赵秀珍³ 宗浩⁴ 李莹⁵
申莉莉⁵ 焦裕冰⁵ 王凤龙⁵ 杨金广⁵ 袁莲莲⁵

(¹新泰市现代农业发展服务中心, 271200, 山东新泰; ²泰安市岱岳区农业技术推广中心, 271000, 山东泰安; ³东阿县农业技术推广中心, 252201, 山东东阿; ⁴山东临沂烟草有限公司, 276000, 山东临沂; ⁵中国农业科学院烟草研究所, 266101, 山东青岛)

摘要 为筛选防效优良的微生物应用于作物病害防治中, 同时开发一条安全的补硒途径进行富硒农产品的生产, 对前期筛选到的防御假单胞菌 KBD-3 进行了抗病及纳米硒化研究。结果表明, KBD-3 菌液对烟草花叶病毒具有较好的钝化效果, 抑制率高达 95.77%, 同时对青枯雷尔氏菌的抑制效果较好, 对烟草青枯病的相对防效达 70.89%。另外, KBD-3 可将亚硒酸钠还原为纳米硒, 经纳米硒溶液处理的绿豆芽中硒含量大幅提高。这表明, KBD-3 不仅为作物病害防治提供新的微生物资源, 还能较好地用于作物的富硒培育。

关键词 防御假单胞菌; 病害防治; 富硒; 烟草花叶病毒; 青枯病; 绿豆芽

作物病害作为制约农业生产的重要因素, 严重威胁了全球农业和食品安全。传统的化学防治方法虽可在一定程度上控制病害的发生, 但是也存在环境污染、农药残留和破坏生态等问题, 故探索可持续、环保的作物病害防治技术^[1]。生物防治是指利用有益生物及其代谢产物进行植物病害防治, 与化学防治相比, 其绿色安全, 不易产生抗性, 选择性强。因此, 利用生防微生物的防治方式逐渐引起人们的关注, 国内外已有大量的相关研究, 发展前景广阔^[2]。防御假单胞菌 (*Pseudomonas protegens*) 是植物根际促生微生物的主要类群之一, 其营养需求简单、增殖速度快、根际定殖力强, 不但能产生多种抑菌活性物质, 同时还能分泌促进作物生长的代谢物质。除此之外, 与其他假单胞菌相比, 防御假单胞菌可分泌一些杀虫毒素, 其生物防治效果更加突出^[3-4]。

硒作为“生命元素”, 是生物体生长所必需的, 在提高机体免疫力、调节代谢、抗氧化、解毒、促进生殖等方面均有重要的生理功能^[5-7]。硒在地球上的分布并不均匀, 中国约 72% 地区处于低硒、缺硒带, 日常饮食过程中硒摄入量的不足严重影响着几亿人口的身体健康^[8]。目前, 随着人们保健和养生意识的增强, 各种富硒产品相继出现, 一些农户为增加卖点, 通过在种植过程中施

用无机硒 (亚硒酸钠、硒酸钠) 来提高产品中硒含量。但是无机硒的毒性大, 被《常用危险化学品的分类及标志: GB 13690-2009》将其列为第六类剧毒物质, 无机硒的使用严重影响人类和环境健康^[9], 而纳米硒毒性低且活性高, 有望成为最佳补硒形态。微生物转化合成纳米硒条件温和, 分散性好, 结构稳定, 应用前景良好^[10]。

高效安全的微生物制剂一直是作物病害防治研究的重点, 但目前少有多重防效且使作物富硒的研究成果, 更缺乏推广应用。本试验将从生物技术方面进行探索, 筛选出使作物富硒且防效优良的微生物制剂。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试生防菌株为防御假单胞菌 KBD-3, 该菌株从云南保山高发病烟区采集的健康烟草植株根际土壤中分离得到, 现保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为 CGMCC No.26145, 保藏日期为 2022 年 11 月 14 日。供试材料为烟草 (K326 和枯斑三生烟)、绿豆、青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 和烟草花叶病毒 (TMV) 毒源, 均由中国农业科学院烟草研究所植物保护研究中心保存提供。供试培

作者简介: 崔宏, 主要从事农业技术推广相关工作, E-mail: 120397598@qq.com

袁莲莲为通信作者, 主要从事烟草病毒病综合防治与分子病毒学研究, E-mail: yllwsw11@126.com; 宗浩为共同通信作者, 主要从事农业技术推广相关工作, E-mail: hzongsdau@163.com

基金项目: 中国烟草总公司山东省公司科技重大专项 (202302)

收稿日期: 2024-03-15; 修回日期: 2024-04-28; 网络出版日期: 2024-07-30

培养基为 LB 液体培养基、LB 固体培养基、NB 液体培养基和 NA 固体培养基。供试试剂为亚硒酸钠（上海泰锐尔生物科技有限公司提供）和农用硫酸链霉素 72%可溶性粉剂（石家庄曙光制药厂提供）。

1.2 试验方法

1.2.1 对 TMV 抑制效果的测定 挑选生长良好的单一 KBD-3 菌落接种于 LB 液体培养基中，在 37 °C、150 转/min 条件下振荡培养 20 h，得到 KBD-3 发酵菌液，将其用无菌水稀释成 1×10^8 cfu/mL 菌液备用。

试验采用半叶法。取 KBD-3 菌液（浓度 10^8 cfu/mL）、LB 液体培养基分别与等体积 TMV 汁液（将带 TMV 的烟草叶片冷冻研磨成粉末，按 1:40 加去离子水，纱布过滤）混合 15 min 后摩擦接种，接种前接种叶片喷洒少量石英砂。左半片叶接种 KBD-3 菌液与 TMV 汁液的混合液，右半片叶接种 LB 液体培养基与 TMV 汁液的混合液（空白对照，CK），每半片叶接种量为 200 μ L。接种后对叶面进行冲洗，接种 3 株枯斑三生烟，每株接种上部 2 片叶，重复 3 次，3~5 d 调查枯斑数并计算抑制率。

抑制率 (%) = $[1 - (\text{处理平均枯斑数} / \text{对照平均枯斑数})] \times 100$ 。

1.2.2 对青枯雷尔氏菌抑制效果的测定 在 NA 培养基正中心滴加 20 μ L 防御假单胞菌 KBD-3 菌液（浓度 10^8 cfu/mL），待菌液被培养基充分吸收后，倒置于 28 °C 培养箱中培养 48 h，然后用喷壶喷洒青枯雷尔氏菌重悬液（ $OD_{600}=0.3$ ），倒置于 28 °C 培养箱中进行培养。重复 3 次，设置空白对照（NA 培养基中仅喷洒同等浓度的青枯雷尔氏菌重悬液），48 h 后观察结果，并测量抑菌圈直径。

1.2.3 对烟草青枯病防治效果的测定 在育苗盘中播撒 K326 种子，待烟苗伸展 4~5 片叶时移栽到装有无菌土的花盆中，缓苗后用 KBD-3 菌液（浓度为 10^8 cfu/mL）对烟苗进行第 1 次灌根处理，5 d 后进行再次灌根，每次灌根 10 mL/株，第 2 次灌根 2 d 后，将青枯雷尔氏菌菌液（ $OD_{600}=0.3$ ）接种于烟苗根际土壤中，用量 10 mL/株。同时设置对照组，以施用农用硫酸链霉素 72%可溶性粉剂（6470 倍液）作为阳性对照（CK1），2 次灌根间隔 5 d，每次灌根 10 mL/株，其他处理均与试验组相同；以只接种 10 mL/株青枯雷尔氏杆菌菌液作为发病对照（CK2）；以只浇清水作为空白对照（CK3）。每组处理 5 株，3 次重复。接种青枯雷尔氏杆菌 7 d

后，调查各烟苗的发病率（%）、病情指数及相对防治效果（%）。病情分级标准^[11]如下：

0 级：全株无病；1 级：茎部部分出现褪绿斑，或发病一侧 1/2 以下叶片凋萎；3 级：茎部出现黑色条斑，但不超过茎高 1/2，或发病一侧 1/2 至 2/3 叶片凋萎；5 级：茎部黑色条斑超过茎高 1/2，但未达到茎顶部，或发病一侧 2/3 以上叶片凋萎；7 级：茎部黑色条斑到达茎顶部，或病株叶片全部凋萎；9 级：病株基本枯死。

发病率 (%) = $(\text{发病株数} / \text{调查总株数}) \times 100$ ；病情指数 = $(\sum \text{各级病株数} \times \text{该病级值}) / (\text{调查总株数} \times \text{最高级值}) \times 100$ ；控制效果 (%) = $[(\text{对照区病情指数} - \text{处理区病情指数}) / \text{对照区病情指数}] \times 100$ 。

1.2.4 对无机硒还原作用的测定 将活性菌株 KBD-3 接种到 LB 固体培养基上进行纯化，挑取生长良好的单一菌落接种于 LB 液体培养基中，37 °C、150 转/min 振荡培养 20 h，后以 1% (v/v) 接种量加入到含 1 mmol/L 亚硒酸钠的 LB 液体培养基中，30 °C、150 转/min 振荡培养，2~5 d 后观察菌液颜色，待出现红色后用扫描电镜观察^[12]。

1.2.5 纳米硒的制备 按 1%接种量将防御假单胞菌 KBD-3 菌液接种至含 1 mmol/L 亚硒酸钠的 LB 液体培养基中，在 37 °C、150 转/min 条件下振荡培养 2~5 d，获得纳米硒活性菌液。将纳米硒活性菌液在 13 000 g 条件下离心 10 min，沉淀物为纳米硒和菌体的混合物。向沉淀物中加入溶菌酶，使其终浓度为 20 mg/mL，37 °C 孵育 20 min，孵育期间间隔 5 min 取出倒置几次混匀。然后置于冰上超声 30 min（超声 30 s，停 40 s）。将超声后的溶液在 6000 转/min 条件下离心 10 min，去沉淀收集上清液。将上清液在 13 000 g 条件下离心 10 min，弃上清液，沉淀用超纯水溶解洗涤 2 次后获得纳米硒^[12]。

1.2.6 富硒豆芽的培育 挑选饱满、无蛀虫霉烂的绿豆作为供试种豆，于 50 °C 热水中浸泡 30 min 后沥干水分转移到盛有 30 mL 15 μ g/mL 纳米硒溶液的烧杯中，室温下浸泡过夜。后取出沥干放置于铺有 4 层纱布的育苗托盘中，上部覆盖 4 层湿纱布，每 12 h 喷淋 1 次 10 mL 15 μ g/mL 纳米硒溶液，同时设空白对照试验（CK）^[13]。4 d 后，分别取各处理培养的豆芽样品，去掉种皮，用去离子水反复漂洗后置于 60 °C 烘箱中烘干（约 6 h），粉碎过 60

目筛，后采用氢化物原子荧光分光光度计测定样品中的硒含量。

2 结果与分析

2.1 KBD-3 对 TMV 的抑制效果

由图 1 可知，KBD-3 菌液对 TMV 具有较好的抑制效果，结合表 1 可知，其对 TMV 的抑制率高达 95.77%，防治效果明显。



左半叶：KBD-3 发酵菌液；右半叶：空白对照。
Left half: KBD-3 bacterial solution; Right half: CK.

图 1 KBD-3 菌液对 TMV 的钝化作用

Fig.1 Passivation of KBD-3 bacterial solution on TMV

表 1 KBD-3 菌液对 TMV 的抑制作用

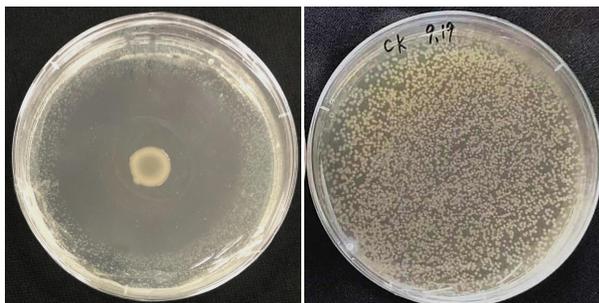
Table 1 Inhibition effect of KBD-3 bacterial solution on TMV

处理 Treatment	枯斑数 Number of local necrotic lesions	抑制率 Inhibition rate (%)
KBD-3	3.33±0.04b	95.77±1.05
CK	78.67±0.72a	—

不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。
Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same below.

2.2 KBD-3 对青枯雷尔氏菌的抑制效果

待喷洒青枯雷尔氏菌重悬液后倒置于 28 °C 培养箱中进行培养，48 h 后进行观察测量，结果如图 2 所示，菌液对青枯雷尔氏菌的抑制效果较好，抑菌圈直径达 6.23 cm。



左：KBD-3 菌液；右：空白对照。
Left: KBD-3 bacterial solution; Right: CK.

图 2 KBD-3 菌液对烟草青枯病菌的拮抗活性

Fig.2 Antagonistic activity of KBD-3 bacterial solution against tobacco bacterial wilt

2.3 KBD-3 对烟草青枯病的防治效果

结果 (表 2) 显示，KBD-3 菌液处理的烟草青枯病发病率为 40.24%，病情指数相对较低，相对防效达到 70.89%，较 CK1 的防效高，而只接种青枯病菌的对照处理 (CK2) 的发病率高达 89.31%。

表 2 KBD-3 菌液对烟草青枯病的防治效果

Table 2 Control effects of KBD-3 bacterial solution on tobacco bacterial wilt

处理 Treatment	发病率 Incidence rate (%)	病情指数 Disease index	相对防效 Relative control effect (%)
KBD-3	40.24±0.07c	17.02±0.05c	70.89±0.12a
CK1	53.86±0.11b	30.21±0.03b	48.32±0.08b
CK2	89.31±0.14a	58.46±0.08a	—
CK3	0	0	—

2.4 KBD-3 对无机硒的还原作用

在 KBD-3 菌液中加入亚硒酸钠培养 2~3 d 后，菌液中观察到红色出现 (图 3)，表明 KBD-3 菌株可将亚硒酸钠还原为红色单质硒。经扫描电镜检测 (图 4) 发现，红色菌液样品中菌体表面及外部存在高电子密度颗粒，继而进行 EDS 分析，在 11.22 keV 发现了硒的特征吸收峰，表明颗粒中含有硒元素；硒颗粒为球形，呈聚集状，粒径主要分布在 100~200 nm，为纳米硒。由此可确定菌株 KBD-3 将亚硒酸钠还原为纳米硒。



左：KBD-3 菌液；右：KBD-3 纳米硒生物合成活性菌液。
Left: KBD-3 bacterial solution; Right: KBD-3 nano-selenium biosynthesis active bacterial solution.

图 3 KBD-3 菌液及其纳米硒生物合成活性菌液

Fig.3 KBD-3 bacterial solution and its nano-selenium biosynthesis active bacterial solution

2.5 KBD-3 对绿豆芽培育的富硒效果

如表 3 所示，经纳米硒溶液处理的绿豆芽中硒含量为 45.35 μg/g，与对照相比，硒含量有了大幅提高。这对富硒食品的研究与开发具有一定的指导

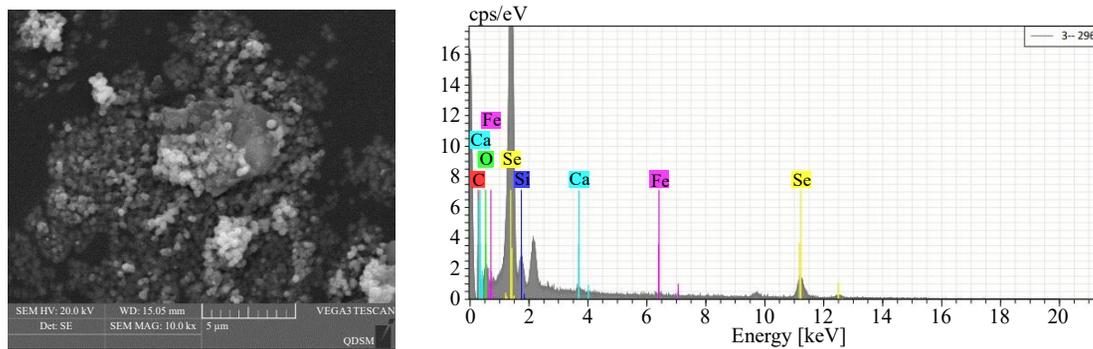


图 4 菌株 KBD-3 生物合成纳米硒的 SEM/EDS 图谱

Fig.4 SEM/EDS spectrum of biosynthesis of nano-selenium from strain KBD-3

意义。

表 3 不同处理对绿豆芽中硒含量的影响
Table 3 Effects of different treatments on selenium content in mung bean sprouts

处理 Treatment	样品质量 Sample mass (g)	硒含量 Selenium content ($\mu\text{g/g}$)
纳米硒溶液 Nano-selenium solution	0.15	45.35
CK	0.15	0.00

3 讨论

目前,越来越多的生防菌种类被应用到作物病害防治中,生防菌的作用机理包括抗病物质产生、诱导抗病性、种群竞争等诸多方面^[14]。这些生防菌包括细菌、真菌和其他微生物,可有效抑制病原菌的生长繁殖,从而达到防治作物病害的效果^[1]。防御假单胞菌是近年来重新归类的一个新物种,有研究^[15-20]表明,防御假单胞菌可产生一些抑菌次生代谢产物,如硝吡咯菌素、藤黄绿脓菌素、2,4-DAPG等,这些物质可有效抑制作物病害的发生,对番茄灰霉病、小麦全蚀病以及葡萄灰霉病等多种果蔬的侵染病害具有防控作用。本研究提供的防御假单胞菌 KBD-3,同时对烟草花叶病和青枯病原菌具有拮抗活性,对烟草花叶病和青枯病的防效分别为 95.77%和 70.89%,防效较好。

硒元素具备多种生物学功能,可调控生物机能,但自然界中多以无机态硒(硒酸盐、亚硒酸盐等)存在,这些形态的硒具有一定的毒性,且难以被植物吸收利用^[21]。迄今为止,纳米硒在已发现的硒形态中毒性最低^[22]。纳米硒的产生与细菌的氧化还原反应有一定的关系,能够生物合成纳米硒的微生物种属很多,超 30 个属^[9],但应用生物纳米硒培育富硒作物的研究相对较少。本试验结果显示,防

御假单胞菌 KBD-3 具有硒元素还原能力,可将亚硒酸钠还原为纳米硒。经纳米硒溶液处理的绿豆芽中硒含量大幅提高,这表明微生物还原生成的纳米硒能被植物吸收转化,可满足人体对硒的安全要求,为有效制备富硒食品提供新思路。

4 结论

本研究中,防御假单胞菌 KBD-3 同时具备拮抗烟草花叶病毒和烟草青枯病原菌的活性,且具有硒元素还原能力,可将亚硒酸钠还原为纳米硒,因此,其不仅为作物病害防治提供新的微生物资源,还能较好地用于作物的富硒培育。

参考文献

- [1] 闾忙碌. 植物病害防治中的生物防治技术研究. 农业灾害研究, 2023, 13(10): 13-15.
- [2] 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. 湖南生态科学学报, 2023, 10(2): 109-116.
- [3] Haas D, Dfago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(4): 307.
- [4] Kupferschmid P, Pechy-tarr M, Imperiali N, et al. Domain shuffling in a sensor protein contributed to the evolution of insect pathogenicity in plant-beneficial *Pseudomonas protegens*. PLoS Pathogens, 2014, 10(2): e1003964.
- [5] Zeng H, Jr G F C. Selenium as an anticancer nutrient: Roles in cell proliferation and tumor cell invasion. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2008, 19(1): 1-7.
- [6] Beck M A, Levander O A, Handy J. Selenium deficiency and viral infection. The Journal of Nutrition, 2003, 133(1): 1463.
- [7] 郑世学, 粟静, 王瑞, 等. 硒是双刃剑?—谈微生物中的硒代谢. 华中农业大学学报, 2013, 32(5): 1-8.
- [8] 谢斌, 吴文良, 郭岩彬, 等. 作物富硒研究进展. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 15-18.
- [9] 李利军, 马英辉, 卢美欢. 纳米硒合成细菌 Lxz-41 的鉴定、培养条件优化及其在富硒猕猴桃栽培中的应用. 食品工业科技, 2019, 40(21): 110-117.
- [10] 杨辉, 王丽红, 孔阳, 等. 微生物合成纳米硒的研究进展. 食品工业科技, 2020, 41(15): 339-344, 351.
- [11] 曾缘欢. 烟草青枯病抗性相关 NBS-LRR 基因的克隆与功能鉴定. 福州: 福建农林大学, 2016.

- [12] 王钰婷. 纳米硒合成菌株的筛选及产硒机理和应用研究. 合肥: 中国科学技术大学, 2019.
- [13] 孟君, 董梦娜, 张峻松, 等. 富硒豆芽培育条件研究. 食品研究与开发, 2019, 40(22): 57-61.
- [14] 刘卹洲, 陈志谊, 梁雪杰, 等. 番茄枯萎病和青枯病拮抗细菌的筛选、评价与鉴定. 中国生物防治学报, 2012, 28(1): 101-108.
- [15] Ramette A, Frapolli M, Fischer-Le S M, et al. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2, 4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. Systematic and Applied Microbiology, 2011, 34(3): 180-188.
- [16] 方倩, 谢芝玲, 陈汉娜, 等. 脂肪酶 *lipAB* 操纵子在防御假单胞菌中的克隆、表达及活性研究. 激光生物学报, 2018, 27(5): 442-450.
- [17] 汤丹艳. 防御假单胞菌 SN15-2 生防和抗逆基因功能分析. 上海: 华东理工大学, 2020.
- [18] 彭于发, 陈善铭. 荧光假单胞菌 Tn5 诱变菌株防治小麦全蚀病的初步研究. 植物病理学报, 1990, 20(3): 229-233.
- [19] Andreolli M, Zapparoli G, Angelini E, et al. *Pseudomonas protegens* MP12: A plant growth-promoting endophytic bacterium with broad-spectrum antifungal activity against grapevine phytopathogens. Microbiological Research, 2019, 219: 123-131.
- [20] 梅小飞, 王智荣, 阚建全. 荧光假单胞菌防治果蔬病害的研究进展. 微生物学报, 2019, 59(11): 2069-2082.
- [21] 余婷婷, 袁莲莲, 李莹, 等. 纳米硒化荧光假单胞菌 KBD-1 菌株对烟草病毒病的抑制作用. 中国烟草科学, 2021, 42(5): 43-49.
- [22] Zhang J S, Gao X Y, Zhang L D, et al. Biological effects of a nano red elemental selenium. Biofactors, 2001, 15(1): 27-38.

Applied Research of *Pseudomonas protegens* KBD-3 in Crop Disease Control and Selenium-Enrichment

Cui Hong¹, Liu Qing², Zhao Xiuzhen³, Zong Hao⁴, Li Ying⁵, Shen Lili⁵,
Jiao Yubing⁵, Wang Fenglong⁵, Yang Jinguang⁵, Yuan Lianlian⁵

¹Xintai Modern Agricultural Development Service Center, Xintai 271200, Shandong, China;

²Tai'an Daiyue District Agricultural Technology Extension Center, Tai'an 271000, Shandong, China;

³Dong'e Agricultural Technology Extension Center, Dong'e 252201, Shandong, China;

⁴Linyi Tobacco Co., Ltd. of Shangdong Province, Linyi 276000, Shandong, China;

⁵Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China)

Abstract In order to screen the microorganisms with good control effect for crop disease control and develop a safe way of selenium supplementation for the production of selenium-rich agricultural products, the disease resistance and nano-selenization of *Pseudomonas protegens* KBD-3 were studied. The results showed that the KBD-3 bacterial solution had good inactivation effect on tobacco mosaic virus (TMV), the inhibition rate was 95.77%, and had a good inhibition effect on *Ralstonia solanacearum* with the relative control effect on tobacco bacterial wilt reaching 70.89%. In addition, KBD-3 could reduce sodium selenite to nano-selenium, and the selenium content of mung bean sprouts treated with nano-selenium solution was greatly increased. These indicated that KBD-3 did not only provide a new microbial resource for crop disease control, but also could be used for selenium-rich cultivation of crops.

Key words *Pseudomonas protegens*; Disease control; Selenium-enrichment; Tobacco mosaic virus; Bacterial wilt; Mung bean sprouts