



1. 枯草芽孢杆菌Tpb55挥发物对烟草的防病促生效应

张成省^{1*}, 孔凡玉¹, 刘朝科², 杜卫民³, 李文刚³, 王 静¹

1. 中国农业科学院烟草所, 青岛 266101;

2. 川渝中烟工业公司, 成都 271018; 四川省烟草专卖局, 成都 266101

摘要: 枯草芽孢杆菌Tpb55菌株挥发性代谢产物对烟草赤星病菌菌丝生长、孢子产生具有抑制作用, 并延缓黑色素的产生。在相对封闭的试验条件下, Tpb55菌株挥发性物, 对烟草赤星病的防治效果达100%。促生效应测定结果表明, Tpb55挥发物对烟草生长无明显毒害作用, 且株高、叶长、叶宽和鲜重较显著增加。结果表明, Tpb55挥发性代谢产物具有良好的抑菌、促生和防病作用, 是寻找抗菌、促生物质新的途径。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 挥发物; 防病作用; 促生作用

中图分类号: S435.72 文献标识码: A

Tobacco Growth Enhancement and Disease Protection by the Volatile-producing Bacteria Strain *Bacillus subtilis* Tpb55

ZHANG Cheng-sheng¹, KONG Fan-yu¹, LIU-Chao-ke², DU Wei-min, LI Wen-gang³, WAN Jing¹ (1. Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101; 2. China Tobacco Henan Industrial Corporation, Chengdu 610017; Sichuan Tobacco Monopoly Administration, Chengdu 610017)

Abstract: Volatiles produced by *Bacillus subtilis* Tpb55 strain inhibited sporulation, mycelial growth and pigment biosynthesis of *Alternaria alternata*, pathogen of tobacco brown spot. Under enclosed experiment condition, volatiles of Tpb55 showed 100% efficiency to control tobacco brown spot. Compared with control, volatiles of Tpb55 significantly increased the plant height, leaf blade length, leaf blade width and fresh weight of tobacco. And no obvious adverse effect on tobacco was found. Results from this research showed that volatiles produced by Tpb55 had good effects of pathogen inhibition, disease control and tobacco growth enhancement. Bacterial volatiles provide a new source of compounds with antibiotic and growth-promoting features.

Keywords: *Bacillus subtilis*; volatile; disease protection; growth enhancement

由链格孢 (*Alternaria alternata*) 引发的烟草赤星病是烟叶成熟后期重要的叶部病害, 在我国各烟区均有发生, 严重影响烟叶的产量和品质。当前该病害的防治依赖化学药剂, 受环境因素影响大, 防治效果不理想, 易产生农药残留。且主用药剂菌核净在烟草生产上连续使用多年, 由于抗药性产生^[1], 防治效果明显下降。寻找新的替代药剂或更好的途径防治烟草赤星病极为重要。枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 对多种植物病原菌具有生防作用, 通过分泌溶菌酶、嗜铁素、抗生素等代谢物, 直接或间接促进植物生长^[2-5], 防治烟草赤星病有良好应用潜力。但是, 有关枯草芽孢杆菌挥发性代谢产物的抗真菌作用研究较少。Compant等^[6]报道枯草芽孢杆菌GB03菌株对尖孢镰刀菌或枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*) 具有拮抗作用。江木兰等^[7]发现, 油菜内生

枯草芽孢杆菌BY-2菌株挥发性物质,能够抑制油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)菌丝生长。Leelasuphakul等^[8]测定了205个枯草芽孢杆菌菌株的挥发物,对水果绿霉病菌(*Penicillium digitatum*)菌丝生长抑制作用,有9个菌株的抑制率达80%以上。上述研究表明,枯草芽孢杆菌挥发性代谢产物与其非挥发性产物一样,是一类重要的生防资源,但对其作用机制和生防途径均未作深入研究。在本研究中,作者以烟草赤星病菌作为指示病原菌,系统研究了枯草芽孢杆菌Tpb55^[9,10]菌株挥发性代谢产物抑菌、防病及促生效应,对寻找烟草赤星病以及其它植物病害生物防治的新途径和模式进行了有益探索。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与烟草品种

烟草赤星病菌由中国农业科学院病理实验室分离鉴定,PDA培养基斜面4℃下保存。使用前转接到PDA平板上培养5~7d(26℃),用无菌水洗下,1500g离心3min去除菌丝,取上清液即为孢子悬浮液,稀释至10³个/mL,接种前制备最佳。Tpb55菌株由中国农业科学院病理实验室分离鉴定,NA培养基斜面4℃下保存,使用前转接到NA平板上活化2次。

烟草品种云烟85,托盘育苗,2~4片真叶时假植到育苗盆(Ø10.0cm)消毒土中,备用。

1.2 Tpb55挥发物对烟草赤星病菌的抑制作用

参照江木兰等^[7]方法,将烟草赤星病菌菌块(Ø5.0mm)和Tpb55菌株分别接种在装有PDA培养基和NA培养基的培养皿中预培养1d,以不接Tpb55的NA培养皿作对照,去掉培养皿盖,将PDA培养皿倒扣在NA培养皿上,用封口胶将2皿交接处密封,26℃培养,对照菌丝长满平皿时,测定挥发物对烟草赤星病菌的作用。

1.2.1 Tpb55挥发物对赤星病菌菌丝生长的影响 十字交叉法逐日测定对照和挥发物处理赤星病菌菌落直径,计算抑制率。

1.2.2 Tpb55挥发物对菌落性状及菌落色素形成的形态学观察 观察Tpb55挥发物对菌丝生长、色素产生及孢子产生的影响。

1.2.3 Tpb55挥发物对真菌繁殖体产量的测定 将处理与对照赤星病菌的分生孢子用10.0ml无菌水洗下,用血球计数板分别测定其浓度,然后转化成分生孢子总产量。

1.3 Tpb55挥发物对烟草赤星病的防治作用

选容积为5.0L的干燥器,用硫酸调节干燥器内部湿度为85%。取4~5真叶期烟苗2盆,每盆2株,用接种喷雾器,接种烟草赤星病菌孢子。将活化好的Tpb55菌株接种到PDA平板上,28℃培养24h,去掉皿盖与2盆烟苗一同置入干燥器中,培养皿置于底部,凡士林封口,28℃光照培养箱培养,观察记载烟株发病率和病斑数。以不接生防菌为对照,3次重复。

1.4 Tpb55挥发物对烟草的促生效应

方法同1.4。待烟苗长至20d后,小心将苗整株挖出,洗去根部泥土,测量其株高、最大叶的长宽、整株鲜重等指标。以不接生防菌为对照,3次重复。

2 结果

2.1 Tpb55挥发物对赤星病菌菌丝生长的影响

抑菌测定结果表明,Tpb55在NA培养基上产生挥发性物质抑制病原真菌生长。与烟草赤星病菌共同培养1d即有挥发性抗菌物质产生,对赤星病菌菌丝生长抑制率达70%以上。5d后,病原真菌仅向4周伸长3.0mm(图1),而对照平板上真菌几乎覆盖整个培养皿,菌丝生长抑制率达95.0%。

图1 Tpb55挥发物对菌丝生长影响

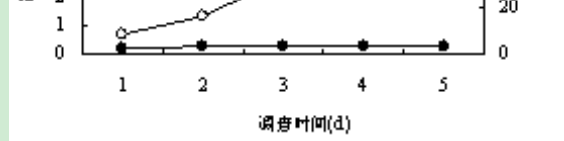


图1 Tpb55挥发物对菌丝生长影响

2.2 Tpb55挥发物对菌落性状的形态学观察

Tpb55挥发物作用于烟草赤星病菌后，菌丝较稀疏，生长缓慢，黑色素形成受阻，菌落呈黄色(图2A)；挑菌落置显微镜下观察，菌丝形态无明显变化，较透明，未见有分生孢子(图2C)。而对照菌丝则致密，生长旺盛，菌落呈灰褐色，菌丝稍暗，夹杂大量分生孢子(图2B)。

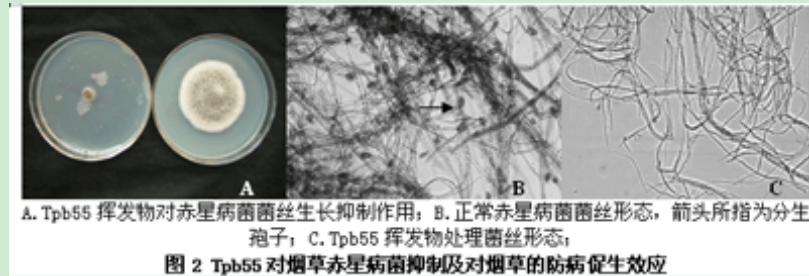


图2 Tpb55对烟草赤星病菌抑制及对烟草的防病促生效应

2.3 Tpb55挥发物对真菌繁殖体产量的测定

Tpb55挥发物作用于烟草赤星病菌5d后测定，所有平板均检测不到赤星病菌分生孢子，而对照分生孢子产量平均达 2.36×10^7 个/皿。

2.4 Tpb55挥发物对烟草赤星病的防治作用

接种赤星病菌后3d，对照烟株陆续开始发病，接种后5d，对照烟株全部发病，病斑主要集中在底部2~3片叶上。接种后10d调查，对照烟苗病株率为100%，病斑数达8.02个/株，发病叶片变黄枯死。Tpb55挥发物处理烟株全部生长良好，叶色正常，未见有发病叶片。

2.5 Tpb55挥发物对烟草的促生效果

促生试验结果表明(表1)，Tpb55挥发物对烟苗有较好的促生效果。与对照相比，Tpb55挥发物处理烟苗在株高、最大叶长、叶宽、鲜重等指标上显著增加，增加幅度分别为11.95%、18.49%、11.29%和12.35%。Tpb55挥发物处理烟苗20d后，与对照烟苗植株相比，叶色浓绿，叶片肥厚且大，长势更加旺盛。

表1 Tpb55挥发物对烟草的防病、促生效应

处理	防病效果(接种后 10d)			促生效果(处理后 20d)			
	发病率 (%)	病斑数(个/株)	控病效果 (%)	株高 /cm	最大叶长 /cm	最大叶宽 /cm	鲜重/g
对照	100	8.02	-	7.33 Ab	5.12 Bb	4.07Bb	9.28Aa
Tpb55 挥发物	0	0	100	8.21 Aa	6.07 Aa	4.53Aa	10.43Aa

3分析与讨论

生物防治资源是可持续农业研究与发展的重要前提，发展生物防治的新思想、新方法和新技术，提高综合防治水平，有利于环境保护、食品安全、生物多样性。拮抗微生物是植物病害生物防治的重要因子^[4]。微生物产生拮抗物质包括非挥发性物质和挥发性物质，长期以来，大量植物生防研究集中于微生物产非挥发性物质研究，纯化、鉴定了多种抗菌物质，如细菌素(bacteriocins)、荧光素(flourescein)、土壤杆菌素(agrocin)、酚类物质、多肽类抗生素(polypeptides)、蛋白质类抗真菌素等，并广泛应用于植物病害的生物防治。

有关微生物挥发性代谢产物用于植病生防的研究报道较少。大量研究结果表明，Marco Kai等^[11]测定了9个细菌菌株挥发性代谢物对立枯丝核菌Rhizoctonia solani菌丝生长的抑制作用，供

试菌株均表现不同程度的拮抗作用，其中枯草芽孢杆菌 B2等7个菌株具强烈抑制作用（99-

80%），证明了拮抗细菌产生的挥发性物质对植物病原菌有明显的抑制作用。本研究结果表明，对烟草赤星病菌菌丝生长抑制率达95%以上，说明挥发性抗菌物质是Tpb55菌株重要抑菌机制之一。挥发性物质的抗真菌作用主要有抑制孢子萌发或菌丝生长^[12-13]、孢子形成^[14]、子囊的产生^[14]和致畸作用^[15]。Tpb55挥发物对赤星病菌抑制作用主要以抑制菌丝生长和分生孢子的产生，对防止病原菌的侵染和病害传播具有重要意义。

较非挥发性抗菌物质，挥发性抗菌物质更易于在土壤或空气中渗透和扩散，能更有效的杀灭病原菌接种体^[16]。Leel asuphakul 等^[8]认为芽孢杆菌对仓储水果的防治效果主要得益其挥发性抗菌物质的产生。为了探索微生物挥发物用于植病生防的途径，本研究开展了封闭条件下，模拟病害环境，测定了Tpb55挥发物对烟草赤星病的防治作用。结果表明，Tpb55挥发物在实验条件下，有效抑制了病害的发生，防治效果达100%。生防菌对寄主植物的影响是判断其是否具有推广应用价值的重要方面，此前研究结果枯草芽孢杆菌挥发物对寄主植物（拟南芥）无不良影响^[12]或有促生作用^[17,18]。本文研究结果与上述研究一致，Tpb55挥发物对烟草生长无明显毒害作用，且在株高、鲜重等方面较对照显著增加。

大量研究表明，微生物挥发性抗菌物质是重要的植病生防资源，具有良好的生防潜力和应用前景，但长期以来相关领域研究却受到忽视，生防潜力没有得到充分的发掘。本研究为微生物挥发性代谢产物抗真菌作用机理提供了直接证据，丰富了植病生防理论，对利用微生物挥发性抗菌物质用于植病生防途径或模式作了有益探索。Ryu C M等^[19]和Farag M A等^[18]研究证明，细菌产生的挥发物2,3-丁二醇和3-羟基-2-丁酮对拟南芥对具促生作用，有关Tpb55挥发性抗菌物质产生的条件和种类，以及在生产上利用和推广的方法和途径等，还有待于深入研究。

参考文献

- 1、李梅云, 祝明亮. 烟草赤星病菌对菌核净的抗药性测定[J]. 西南农业学报, 2007, 20(3): 412-416.
- 2、Gupta A M, Gopal K V B, Tilak R. Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria[J]. Indian J Exp Biol, 2000, 38: 856-862.
- 3、Haas D, Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads[J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3: 307-319.
- 4、Handelsman J, Stabb E V. Biocontrol of soilborne plant pathogens [J]. Plant Cell, 1996, 8: 1855-1869.
- 5、胡小加, 江木兰, 张银波等. 枯草芽孢杆菌Tu-100对几种作物的促生效果[J]. 中国油料作物学报, 2005, 27(4): 92-94.
- 6、Compant S, Duffy B, Nowak J, et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 4951-4959
- 7、江木兰, 赵瑞, 王国平. 油菜内生枯草芽孢杆菌BY-2抗油菜菌核病菌有效成分的鉴定和分离提纯[J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(4): 453-456.
- 8、Leelasuphakul W, Hemmanee P, Chuenchitt S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2008, 48(1): 113-121.
- 9、张成省, 孔凡玉, 李多川, 等. 烟草叶围细菌的分离及其对 *Alternaria alternata* 的拮抗作用[J]. 中国烟草学报, 2005, 11(4): 17-20.
- 10、张成省, 孔凡玉, 关小红等. 烟草叶围细菌Tpb55菌株的鉴定及其抑菌活性[J]. 中国生物防治, 2008, 24(1): 63-68.
- 11、Vespermann A, Kai M, Piechulla B. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(17): 5639-5641.
- 12、Fernando W G, Ramarathnam R, Krishnamoorthy A S, et al. Identification and use

of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol [J]. *Soil Biol Biochem*, 2005, 37: 955-964.

13、 Huang H, Huang J W, Saidon G, et al. Effect of allyl alcohol and fermented agricultural wastes on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and colonization of *Trichoderma* spp. [J]. *Can J Plant Pathol*, 1997, 9: 43-46.

14、 Robinson P M, Mckee N D, Thompson L A A, et al. Autoinhibition of germination and growth in *Geotrichum candidum*[J]. *Mycological Research*, 1989, 93: 214-222

15、 Chaurasia B, Pandey A, Palni L M S, et al. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro [J]. *Microbiol Res*, 2005, 160: 75-81.

16、 Fernando W G D, Ramarathnam R, Krishnamoorthy A S, et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37: 955-964.

17、 Ryu C M, Farag M A, Hu C H, et al. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1017-1026.

18、 Farag M A, Ryu C M, Summer L W, et al. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67: 2262-2268

19、 Ryu C M, Farag M A, Hu C H, et al. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci. USA* 100, 2003, 4927– 4932

基金项目：中国农科院院长基金和中央级科研院所基金项目

作者简介：张成省（1976-），男，助研；*通讯作者，E-mail: zhchengsheng@126.com。