

枯草芽孢杆菌对黄瓜耐盐性的影响

尹汉文¹, 郭世荣¹, 刘伟^{2*}, 陈海丽¹

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100089)

摘要: 采用基质栽培方式, 研究了枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 在盐胁迫下对黄瓜植株生长、生理生化代谢、产量及品质的影响。结果表明, 在无盐胁迫栽培时, 枯草芽孢杆菌对黄瓜植株的生长具有促进作用; 在 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下, 枯草芽孢杆菌同样促进植株的生长, 增加了株高与叶面积, 提高了植株 SOD、POD 和 CAT 保护酶的活性, 降低了 MDA 的含量, 产量比未添加枯草芽孢杆菌处理的增产 18%, 且一定程度地提高了果实的品质; 而在 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下, 枯草芽孢杆菌对黄瓜植株的生长和产量无促进作用。因此, 在 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下, 枯草芽孢杆菌可一定程度提高黄瓜植株的耐盐性。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 盐胁迫; 黄瓜

中图分类号: S642.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2006) 03-0018-05

Effects of *Bacillus subtilis* on salt tolerance of cucumber

YIN Han-wen¹, GUO Shi-rong¹, LIU Wei^{2*}, CHEN Hai-li¹

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

Abstract: Effects of *Bacillus subtilis* on the vegetative growth, physiological and biochemical activities, yield and quality of cucumber under NaCl stress were studied by substrate culture. The results showed that *Bacillus subtilis* had positive effect on cucumber growth under free salt stress. Compared to free *Bacillus subtilis* treatment, *Bacillus subtilis* accelerated the increase of leaf area and plant height, and enhanced the activities of protective enzymes, such as SOD, POD and CAT, but decreased the content of MDA under $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stress. *Bacillus subtilis* increased the output of cucumber by 18% and improved the quality of cucumber under $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stress. While under $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stress, *Bacillus subtilis* had no significant effects on cucumber growth compared to free *Bacillus subtilis* treatment. Therefore under $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stress, *Bacillus subtilis* improves salt tolerance of cucumber to a certain extent.

Key words: *Bacillus subtilis*; salt stress; cucumber

自 20 世纪 90 年代以来, 随着温室等设施蔬菜生产的蓬勃发展, 设施内土壤次生盐渍化程度不断加重, 蔬菜产量逐年下降, 已成为设施栽培中普遍存在的问题。据不完全统计, 我国的盐碱地面积已达 3 300 多万公顷, 并以每年 6 000 多公顷的速度增加。因此, 提高蔬菜等作物耐盐性的研究具有重要的现实意义。

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是自然界广泛存在、对人畜无毒无害、不污染环境的非致病菌。作为生防菌, 枯草芽孢杆菌已被较广泛地研究与应用, 但关于枯草芽孢杆菌在非生物逆境下作用的研究和报道较少, 尤其是国内还未见报道。笔者研究了在盐胁迫下枯草芽孢杆菌对黄瓜植株耐盐性的影响, 探讨枯草芽孢杆菌发挥作用的适宜盐胁迫浓度范围, 了解枯草芽孢杆菌提高黄瓜耐盐性及其作用方式。

1 材料与方法

1.1 材料培养和处理

试验在北京市农林科学院蔬菜研究中心的温室内进行。供试黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 品种为京研迷你二号; 枯草芽孢杆菌菌株为德国 Bayer 公司生产的枯草芽孢杆菌 FZB24 菌株 (简称 FZB24)。黄瓜

收稿日期: 2005-10-17

基金项目: 北京市科技新星计划 (2004B22)

作者简介: 尹汉文 (1980-), 硕士研究生。* 通讯作者, E-mail: liuwei@nrcv.com。

于2005年4月26日播种,5月17日定植,采用基质培养方式栽培,基质为草炭:蛭石:珍珠岩,体积比为2:2:1,每盒2株,盒的体积为30 cm×25 cm×20 cm。营养液配方采用北京市农林科学院蔬菜研究中心根据北京地下水的水质设计的配方:606 mg·L⁻¹ KNO₃, 708.5 mg·L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O, 40 mg·L⁻¹ NH₄NO₃, 369.7 mg·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 1.3 mmol·L⁻¹ H₃PO₃, 20 mg·L⁻¹ Fe-EDTA, 1.54 mg·L⁻¹ MnSO₄·H₂O, 2.86 mg·L⁻¹ H₃BO₃, 0.22 mg·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 0.08 mg·L⁻¹ CuSO₄·5H₂O, 0.02 mg·L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O。常规栽培管理。试验设6个处理:(1)无盐胁迫,不加菌(对照CK);(2)无盐胁迫,加菌(CK+B.S);(3)1 g·L⁻¹ NaCl胁迫,不加菌(1 g·L⁻¹ NaCl);(4)1 g·L⁻¹ NaCl胁迫,加菌(1 g·L⁻¹ NaCl+B.S);(5)2 g·L⁻¹ NaCl胁迫,不加菌(2 g·L⁻¹ NaCl);(6)2 g·L⁻¹ NaCl胁迫,加菌(2 g·L⁻¹ NaCl+B.S)。随机区组设计,3次重复。

黄瓜定植后7 d开始盐胁迫处理,NaCl按不同浓度溶于营养液中,并根据黄瓜植株的生长阶段和气候条件,每周浇营养液2~3次,每次每盒浇2 L。

FZB24菌株使用方法:1 g·L⁻¹ FZB24溶液浸种→0.2 g·L⁻¹ FZB24溶液苗期(两叶一心)喷施1次→定植当天用0.2 g·L⁻¹ FZB24溶液浇1次。其他不加菌的处理相应的用清水处理。

1.2 测定方法

盐胁迫处理后每10 d定株测定株高和叶面积,每重复测定5株。黄瓜达商品化成熟标准时采收,测定每个处理总产量,然后计算每株平均产量。盐胁迫处理后14 d,每处理5株混合取样,分别取根尖1 g测定枯草芽孢杆菌菌落数量,重复3次。同时每处理取相同节位的叶片分别测定SOD、CAT、POD活性和MDA含量,5株混合取样测定,重复3次。取相同节位的黄瓜(果实)测定相关品质(均以鲜重计)。

枯草芽孢杆菌菌落数采用稀释平皿测数法测定^[1];硝酸盐含量测定采用水杨酸比色法^{[2]123};可溶性糖含量采用蒽酮比色法测定^[3];维生素C含量采用2,6-二氯酚靛酚滴定法测定^{[2]246};纤维含量采用酸碱洗涤法测定^[4];超氧化物歧化酶(SOD)活性采用氯化硝基四氮唑蓝(NBT)光化还原法测定^{[2]167},以抑制NBT光化还原的50%为一个酶活性单位,单位为U·g⁻¹;过氧化氢酶(CAT)活性采用高锰酸钾滴定法测定^{[2]165},CAT活性单位以mg·g⁻¹·min⁻¹表示;过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚法测定^{[2]164},POD活性单位以U·g⁻¹·min⁻¹表示;丙二醛含量(MDA)采用硫代巴比妥酸法测定^{[2]260}。所得试验结果用Excel和SAS软件采用邓肯氏多重比较方差分析方法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫对枯草芽孢杆菌菌落数量的影响

由图1可知,黄瓜根表面的枯草芽孢杆菌的菌落数量随着盐胁迫水平的提高有逐渐降低的趋势,但差异不显著,说明不同浓度盐胁迫对根际枯草芽孢杆菌的生长发育及繁殖没有显著的影响,也说明了枯草芽孢杆菌本身具有较强的耐盐性。

2.2 枯草芽孢杆菌对盐胁迫下植株生长的影响

2.2.1 对株高的影响 从图2可以看出,无盐胁迫条件下,添加枯草芽孢杆菌处理的植株株高与不加菌处理的差异不显著,但高于不加菌处理,提高幅度为5.1%~8.5%;1 g·L⁻¹ NaCl胁迫条件下,在盐胁迫处理后10 d添加枯草芽孢杆菌处理的植株株高与不加菌处理的差异不显著,在盐胁迫处理后30 d达到显著水平,增加了10.2%;2 g·L⁻¹ NaCl胁迫条件下,加菌处理的黄瓜植株在盐胁迫处理后10 d的株高略高于不加菌处理,而在盐胁迫处理后30 d株高则低于不加菌处理。

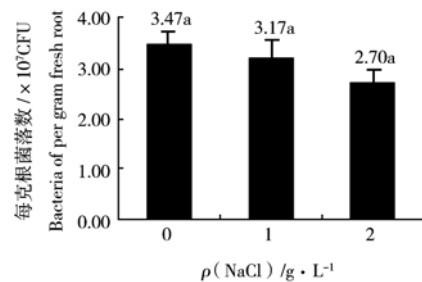


图1 盐胁迫对枯草芽孢杆菌菌落数量的影响

Fig.1 Population of *Bacillus subtilis* under NaCl stress

具有相同字母者表示在5%水平上差异不显著。The bars with the same letter mean no significant difference at 5% level.

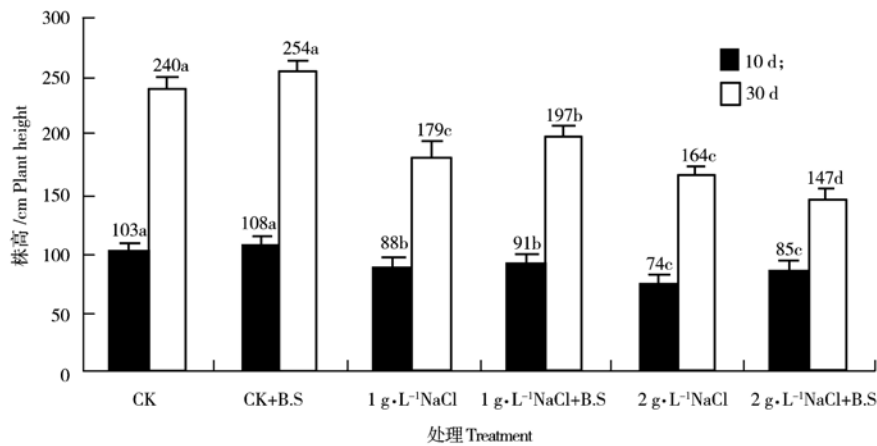


图 2 枯草芽孢杆菌对不同时间盐胁迫下黄瓜株高的影响

Fig. 2 Effects of *Bacillus subtilis* on plant height of cucumber under different time of NaCl stress

CK. 无盐胁迫, 不加菌; + B. S. 加枯草芽孢杆菌; NaCl. 添加不同浓度 NaCl. CK means no salt stress and *Bacillus subtilis* condition; + B. S means treated with *Bacillus subtilis*; NaCl means different concentrations of NaCl. The same as follows.

2.2.2 对叶面积的影响 由图 3 可知, 无盐胁迫条件下, 添加枯草芽孢杆菌处理的植株叶面积与不加菌处理的差异不显著, 但大于不加菌处理, 提高幅度为 7.8% ~ 10.5%。1 g · L⁻¹ NaCl 胁迫条件下, 在盐胁迫处理后 10 d 添加枯草芽孢杆菌处理的植株叶面积与不加菌处理的差异不显著, 但在盐胁迫处理后 20 d 达到显著水平, 叶面积增大了 19.2%, 在盐胁迫处理后 40 d 差异又不显著。2 g · L⁻¹NaCl 胁迫条件下, 加菌处理的叶面积在盐胁迫处理后 10 d 大于不加菌处理, 而盐胁迫处理后 20 d 则小于不加菌处理, 整个生长期都差异不显著。

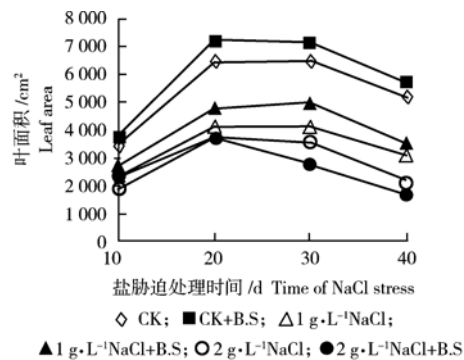


图 3 枯草芽孢杆菌对盐胁迫下黄瓜植株叶面积的影响

Fig. 3 Effects of *Bacillus subtilis* on leaf area of cucumber under NaCl stress

2.3 枯草芽孢杆菌对盐胁迫下黄瓜叶片保护酶活性及丙二醛含量的影响

由表 1 可见, SOD、CAT 和 POD 3 种保护酶活性的变化具有相同的趋势。在无盐胁迫和 1 g · L⁻¹ NaCl 胁迫下, 添加枯草芽孢杆菌处理植株的酶活性均比不加菌处理的高, 分别提高 7.3%、17.4%、4.7% 和 4.8%、8.5%、5.9%。在 2 g · L⁻¹ NaCl 胁迫下, 加菌处理的植株酶活性和未加菌处理的差异均不显著。

不同浓度盐胁迫下枯草芽孢杆菌对 MDA 含量的影响与对保护酶活性的影响趋势相反。在无盐胁迫和 1 g · L⁻¹ NaCl 胁迫下, 添加枯草芽孢杆菌有效降低了 MDA 的含量, 分别对应下降 5.6% 和 8.7%; 在 1 g · L⁻¹ NaCl 胁迫下添加枯草芽孢杆菌达到显著水平, 表明膜的稳定性有所提高。在 2 g · L⁻¹ NaCl 胁迫下, 加菌与不加菌处理无显著差异。

表 1 枯草芽孢杆菌对盐胁迫下黄瓜植株保护酶活性及丙二醛含量的影响

Table 1 Effects of *Bacillus subtilis* on protective enzyme activities and MDA content of cucumber under NaCl stress

处理 Treatment	超氧化物歧化酶/U · g ⁻¹ SOD	过氧化物酶/U · g ⁻¹ · min ⁻¹ POD	过氧化氢酶/mg · g ⁻¹ · min ⁻¹ CAT	丙二醛含量/μmol · g ⁻¹ MDA content
CK	107.05 ± 3.03 ^{ab}	738.93 ± 95.57 ^{ab}	0.960 8 ± 0.013 0 ^b	15.00 ± 0.11 ^{cd}
CK + B. S	114.91 ± 5.01 ^a	868.09 ± 65.96 ^a	1.005 9 ± 0.008 3 ^a	14.16 ± 0.31 ^d
1 g · L ⁻¹ NaCl	102.01 ± 1.34 ^{ab}	622.76 ± 74.35 ^b	0.881 7 ± 0.005 4 ^c	17.52 ± 0.07 ^b
1 g · L ⁻¹ NaCl + B. S	106.88 ± 1.58 ^b	675.60 ± 106.64 ^{ab}	0.933 3 ± 0.001 6 ^b	15.99 ± 0.17 ^c
2 g · L ⁻¹ NaCl	99.27 ± 2.75 ^{ab}	320.91 ± 48.46 ^c	0.844 6 ± 0.020 0 ^d	20.59 ± 0.97 ^a
2 g · L ⁻¹ NaCl + B. S	97.03 ± 9.35 ^b	265.79 ± 52.60 ^c	0.835 8 ± 0.014 1 ^d	20.51 ± 0.11 ^a

2.4 枯草芽孢杆菌对盐胁迫下黄瓜产量的影响

从图4可以看出,与对照相比, $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl胁迫都显著降低了黄瓜的产量。在无盐胁迫下,添加枯草芽孢杆菌显著提高了黄瓜单株产量,增产10.8%。在 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl胁迫条件下,添加枯草芽孢杆菌处理的单株产量与不加菌处理的相比提高了18.25%。说明通过促进生长和改善生理代谢,枯草芽孢杆菌缓解了盐胁迫对黄瓜产量的降低幅度。在 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl胁迫下,加菌处理的黄瓜产量和未加菌处理的差异不显著。

2.5 枯草芽孢杆菌对盐胁迫下黄瓜品质的影响

表2表明,在 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl胁迫下添加枯草芽孢杆菌,一定程度上改善了黄瓜的品质,与未添加枯草芽孢杆菌处理相比,维生素C含量分别增加5%和13%,可溶性糖含量分别增加4%和18%,水分含量分别增加0.28%和-0.86%,纤维含量分别降低17%和5%,硝酸盐含量分别降低1.3%和5.2%;而无盐胁迫下添加枯草芽孢杆菌处理对黄瓜果实品质的影响则表现不一,维生素C含量增加3%,可溶性糖含量下降8%,水分含量增加0.31%,纤维含量增加5%,硝酸盐含量降低6.5%。

表2 枯草芽孢杆菌对盐胁迫下黄瓜果实品质的影响

Table 2 Effects of *Bacillus subtilis* on quality of cucumber under NaCl stress

处理 Treatment	维生素C含量/ $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ Vitamin C content	水分含量/ $\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ Water content	纤维含量/ $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ Fiber content	可溶性糖含量/ $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ Soluble sugar content	硝酸盐含量/ $\text{mg}\cdot \text{kg}^{-1}$ Nitrate content
CK	13.03 ± 0.47^b	95.76 ± 0.28^{ab}	6.95 ± 0.51^a	2.85 ± 0.06^{cd}	282.24 ± 11.95^c
CK + B.S	13.47 ± 1.04^b	96.16 ± 0.17^a	7.31 ± 0.43^a	2.62 ± 0.14^d	264.02 ± 23.07^{bc}
$1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl	13.93 ± 0.81^b	95.14 ± 0.28^c	6.45 ± 0.38^a	3.24 ± 0.13^{bc}	306.22 ± 14.12^{ab}
$1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl + B.S	14.63 ± 0.81^b	95.41 ± 0.12^{bc}	5.35 ± 0.13^b	3.38 ± 0.12^b	302.34 ± 12.77^{ab}
$2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl	16.17 ± 2.33^{ab}	94.66 ± 0.18^d	5.56 ± 0.15^b	3.57 ± 0.12^b	326.00 ± 7.91^a
$2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl + B.S	18.23 ± 0.78^a	93.84 ± 0.14^e	5.28 ± 0.23^b	4.22 ± 0.18^a	309.10 ± 2.64^{ab}

3 讨论

利用有益微生物提高蔬菜的耐盐性为蔬菜耐盐研究开辟了新的途径。Bochow等^[5]报道,枯草芽孢杆菌FZB24菌株可显著提高茄子和辣椒的耐盐性,产量分别增加550%和430%。Woitke等^[6]的研究显示,在电导率高达 $7.4\text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 的NaCl胁迫条件下,用枯草芽孢杆菌处理番茄,叶片鲜重、叶片数和叶面积显著高于未添加枯草芽孢杆菌的盐胁迫处理。本试验结果与这些报道基本一致,在 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl胁迫下,枯草芽孢杆菌FZB24菌株促进黄瓜植株的生长(株高、叶面积),提高SOD、POD和CAT 3种保护酶的活性,降低MDA的含量,在一定程度上提高了黄瓜植株的耐盐性,最终表现为产量高于未添加枯草芽孢杆菌处理,而且果实品质有所改善。在没有盐胁迫的正常栽培情况下,添加枯草芽孢杆菌也有利于促进黄瓜植株的生长。而在 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl胁迫下,枯草芽孢杆菌没有表现出对黄瓜生长有显著的促进作用。但枯草芽孢杆菌在本试验中提高作物耐盐性的效果没有前人在茄子、辣椒等作物上报道的显著,这可能是枯草芽孢杆菌对不同作物的影响存在差异;另外,栽培方式和环境等因素也会影响枯草芽孢杆菌作用的效果。

在本试验中,在 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl胁迫下,根际枯草芽孢杆菌菌群数量并没有显著降低,但对作物生长的促进作用不同,表明在较高浓度盐胁迫下,枯草芽孢杆菌的代谢分泌物可能有所变化。

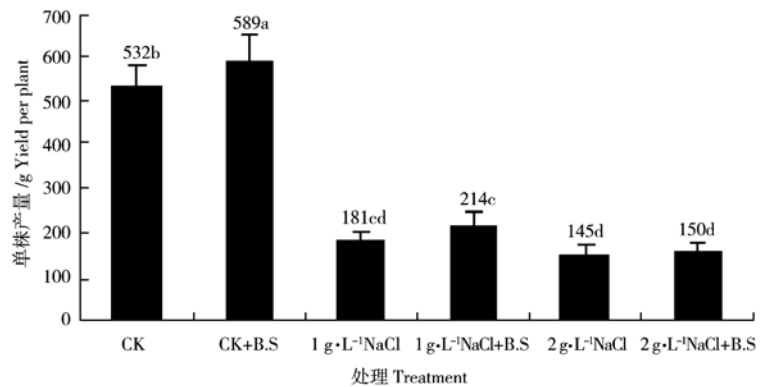


图4 枯草芽孢杆菌对盐胁迫下黄瓜产量的影响

Fig. 4 Effects of *Bacillus subtilis* on yield of cucumber under NaCl stress

作为生防菌枯草芽孢杆菌已被广泛重视,但是关于枯草芽孢杆菌在非生物逆境 (abiotic stressing) 下作用的研究和报道很少,尤其是国内还未见报道。国外科学家对枯草芽孢杆菌特定菌株在提高蔬菜抗非生物逆境上的最新发现,开辟了枯草芽孢杆菌作物抗逆领域崭新的研究和应用方向。目前对枯草芽孢杆菌提高作物耐盐性的机理还知之甚少,对影响枯草芽孢杆菌作用效果的外界因素也不确定。现在研究人员一般是借鉴枯草芽孢杆菌在生防上的作用机理来研究其在提高作物耐盐性的机理。枯草芽孢杆菌作为生物制剂的作用方式包括以下几方面:(1) 形成抗生素;(2) 诱导作物体内抗逆基因的表达;(3) 促进根系的生长;(4) 产生植物激素或具有植物激素活性的代谢物。顾真荣等^[7]发现枯草芽孢杆菌能分泌伊枯草菌素、生物表面活性素、几丁质酶等能抗真菌病害的抗菌物质。Kilian 等^[8]发现枯草芽孢杆菌能分泌植物激素或具有植物激素活性的代谢物。Idriss 等^[9-10]的试验发现,枯草芽孢杆菌表现出细胞外肌醇六磷酸酶活性,可以将束缚态的有机磷以肌醇六磷酸的形式提供给作物,枯草芽孢杆菌可以产生 $10^{-10} \sim 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的植物激素 (生长素),但其生物活性没有被鉴定。枯草芽孢杆菌对作物的影响及互作机理还有许多未知的方面,这也是我们正在进一步研究的方向。

参考文献:

- [1] 李阜棣, 胡正嘉. 微生物学 [M]. 5 版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 89-90
- [2] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 123, 164, 165, 167, 246, 260
- [3] 韩雅珊. 食品化学实验技术指导 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992: 19-22
- [4] 华东师范大学生物系植物生理教研组. 植物生理学实验指导 [M]. 上海: 人民教育出版社, 1982: 56-158
- [5] Bochow H, El-Sayed S F, Junge H, et al. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. IV. Salt-stress tolerance induction by *Bacillus subtilis* FZB24 seed treatment in tropical vegetable field crops, and its mode of action [J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2001, 108 (1): 21-30
- [6] Woitke M, Junge H, Schnitzler W H. *Bacillus subtilis* as growth promotor in hydroponically grown tomatoes under saline conditions [J]. Acta Horticulturae, 2004, 659(1): 363-369
- [7] 顾真荣, 吴畏, 高新华, 等. 枯草芽孢杆菌 G3 菌株的抗菌物质及其特性 [J]. 植物病理学报, 2004, 34(2): 166-172
- [8] Kilian M, Steiner U, Krebs B, et al. FZB24[®] *Bacillus subtilis*-Mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality [J]. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 2000, 53(1): 72-93
- [9] Idriss E E, Makarewicz O, Farouk A, et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect [J]. Microbiology, 2002, 148: 2097-2109
- [10] Idriss E E, Bochow H, Ross H, et al. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormone-like action of culture filtrates prepared from plant growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37 [J]. Zeitschrift-fur-Pflanzenkrankheiten-und-Pflanzenschutz, 2004, 111(6): 583-597

责任编辑: 范雪梅