

短短芽孢杆菌 DZQ3 对烟草的促生及系统抗性诱导作用

朱忠彬¹, 吴秉奇², 丁延芹², 陈晓明¹, 张长华¹, 杜秉海², 王玉军^{3*}

(1.贵州省烟草公司遵义市公司, 贵州 遵义 563000 ;2.山东农业大学生命科学学院, 山东省农业微生物重点实验室, 山东 泰安 271018 ; 3.山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018)

摘要: 植物根际促生细菌 (PGPR) 对植物的生长发育起到重要作用, 是目前生态农业研究的热点之一。为了研究烟草根际生防菌株短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*) DZQ3 对烟草促生效果及诱导系统抗性, 在温室内进行盆栽试验, 以浸根加灌根的方式接种 DZQ3。用测定各处理烟株生理指标的方法, 包括烟株的农艺性状、生物量, 烟草叶片叶绿素含量、电解相对渗透率、超氧化物歧化酶、过氧化物酶、多酚氧化酶、苯丙氨酸解氨酶和过氧化氢酶等系统抗性相关指标及根系发育情况, 评价接种 DZQ3 对烟株的影响。结果表明, DZQ3 处理后烟株农艺性状及生物量好于对照, 30 d 时较为显著 ($p < 0.05$) ; 系统抗性相关生理指标优于对照, 60 d 时最为显著 ($p < 0.05$)。生防菌 DZQ3 对烟草的生长发育具有促进作用, 能够诱导系统抗性, 增强烟草的抗病能力。

关键词: 植物根际促生细菌; 短短芽孢杆菌; 烟草; 农艺性状; 促生作用; 诱导系统抗性

中图分类号: S476

文章编号: 1007-5119 (2012) 03-0092-06

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2012.03.019

The Growth-promoting Effect and System Resistance Induction of *Brevibacillus brevis* DZQ3 to Tobacco

ZHU Zhongbin¹, WU Bingqi², DING Yanqin², CHEN Xiaoming¹, ZHANG Changhua¹, DU Binghai², WANG Yujun^{3*}

(1. Zunyi Tobacco Company of Guizhou Province, Zunyi, Guizhou 563000, China; 2. College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Shandong Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Tai'an, Shandong 271018, China; 3. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: Plant growth-promoting rhizobacteria play an important role in plant growth. In order to investigate the effect of *Brevibacillus brevis* DZQ3 on tobacco growth and resistance of induction system, pot experiments were conducted in greenhouse and DZQ3 was inoculated into soaking root with filling root. Agronomic traits, biomass and chlorophyll content, leakage rate of electrolyte, systemic resistance related indices, including SOD, POD, PPO, PAL and CAT, and root development situation were measured. The results showed that the agronomic traits and biomass of tobaccos with application of DZQ3 were better than the control (CK), the difference were significant in 30 d. Systemic resistance related indices were better than the control (CK), the difference were significant in 60 d. These results indicate that PGPR strain DZQ3 can promote tobacco growth and induce system resistance, and also enhance disease resistant ability of tobaccos.

Keywords: plant growth promoting rhizobacteria; *Brevibacillus brevis*; tobacco; agronomic trait; promote growth; induce system resistance

烟草是我国重要的经济作物之一, 对我国社会经济发展起着举足轻重的作用^[1-3]。但自上世纪 90 年代以来, 烟草生产中由于过量施用化肥带来的环境污染和土质下降等问题日益突出^[4]。烟草是叶用经济作物, 对烟草的外观和内在质量有特殊的要

求, 农药残留、病原菌抗性以及对卷烟卫生的影响, 限制了农药的大规模利用, 同时也不利于烟叶的出口^[5]。因此以植物根际促生细菌 (PGPR) 为主的微生物制剂成为目前烟草种植中研究的热点之一。一方面, PGPR 能够改善植物对矿物质元素和

基金项目: 贵州省烟草公司遵义市公司科技项目 (2008ZYCKJ-01)

作者简介: 朱忠彬, 男, 农艺师, 从事烟叶生产管理工。*通信作者, E-mail: aoel19119119@163.com

收稿日期: 2011-10-25

修回日期: 2012-01-16

水分的吸收、改变植物激素平衡、改善根部环境,且可以通过产生生长素、赤霉素、细胞分裂素、乙烯、维生素及其他植物生长调节剂来调节植物的生长^[6-8];另一方面,PGPR 还可诱导植物系统抗性(ISR)^[9],使烟草具有对多种病害的抵抗能力,在烟草生产中具有十分重要的意义。

目前已经发现多种具有促生能力的 PGPR 菌株,荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)RB242 和 RB289 能够有效促进烟草生长^[10],从印度西部森林分离的 *Bacillus thioparas* NII-0902 表现出多种植物的促生活性^[11],*Bacillus vallismortis* EXTN-1 能够触发马铃薯等植物产生系统抗性,提高马铃薯抗病毒 PVY 和 PVX 能力,增加叶绿素含量^[12]。目前大多数的报道局限于 PGPR 的促生防病效果,其诱导烟草系统抗性以及对烟草生理指标的影响等方面的研究仍少见报道。

本研究在温室条件下研究 PGPR 菌株短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*) DZQ3 对烟草生长发育的影响,探讨其对烟草系统抗性的诱导作用,旨在为进一步的开发应用 PGPR 制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 盆栽试验土壤 取自泰安当地农田,每盆装土大约 10 kg,土壤理化性质为:全氮 5.47 g/kg,全磷 1.01 g/kg,全钾 6.03 g/kg,有机质和腐殖质含量分别为 8.81 mg/g 和 2.10 mg/g,速效磷、速效钾、铵态氮和硝态氮含量分别为 82.26、78.54、5.79 和 55.31 mg/kg, pH 为 7.54。

1.1.2 肥料 美康田佳牌复合肥(山东康田化肥有限公司),总有效成分 40%,其中 N:P:K=20:10:10,按照 5 g/盆用量溶解后浇灌于土壤中。

1.1.3 品种 烟草品种为 K326,在育苗基质中培育至 5~6 片真叶,备用。

1.1.4 供试菌种 分离自贵州烟田根际土壤的短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*) DZQ3,实验室条件下对烟草青枯病病原菌茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)具有强烈的拮抗作用^[13]。

1.1.5 培养基 菌株活化采用 LB 培养基, DZQ3 摇瓶发酵采用豆芽汁培养基(黄豆芽 200 g,蔗糖 20 g,蒸馏水 1000 mL)。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液的制备 DZQ3 活化后 30 °C、170 r/min 摇瓶发酵培养 3 d,用无菌水稀释成 1×10^8 CFU/mL。

1.2.2 盆栽试验设计 试验在山东农业大学校本部日光温室内进行,选择长势一致的烟苗,移栽前将烟草幼苗在 1×10^8 CFU/mL 浓度的 DZQ3 菌液中浸根 30 min,然后将烟苗移栽至盆中。缓苗 3 d 后用移液枪头将 DZQ3 菌悬液(1×10^8 CFU/mL)灌入烟株根际土壤,每株烟 4 mL 菌液,同时取 1 mL 菌液淋于茎基部。对照采用清水按同样的方法处理,其余按照温室常规管理。5 次重复,每重复 3 株烟。

1.2.3 DZQ3 促生效果调查 烟株移栽后 30、60、90 d 时调查农艺性状。种植期结束后,取出植株用清水洗净,风干后测定烟株鲜重。将烟株置于烘箱中 105 °C 杀青 30 min,60 °C 继续烘干 48 h,取出测整株干重。

1.2.4 烟草叶片生理指标的测定 烟株移栽后 30、60、90 d 时,取从上至下数第 4 片展开的叶片,剪碎混合均匀后测定以下指标,3 次重复取平均值。

叶绿素含量、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性参照文献[14]的方法测定,多酚氧化酶(PPO)活性采用高峻凤的方法测定^[15],过氧化氢酶(CAT)采用过氧化氢分解量法测定^[16],电解质相对渗透率用电导法测定^[16]。

1.2.5 烟草根系发育情况测定 生长期结束后,移出整个烟株,用清水洗净风干后称鲜重,计算根冠比。根系活力的测定采用 TTC 法^[17]。

1.2.6 统计分析 采用 SPSS 18.0 软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 DZQ3 对烟草生长发育的影响

从图 1 可以看出,接种拮抗菌 DZQ3 的烟株长势优于对照,处理烟株的茎围、最大叶宽、最大叶

面积和对照间差异较为明显。移栽 30 d 后，DZQ3 处理的烟株茎围、最大叶宽、最大叶面积 3 项指标分别比对照高出 16.79%、15.01%、24.56%，差异显著；移栽 60 d 后，DZQ3 处理烟株只有茎围与对照差异达显著水平，比对照高出 16.52%；移栽 90 d 时，DZQ3 处理烟株茎围和最大叶宽分别比对照高出 11.34%、24.23%，差异显著。由此可见，接种拮抗菌 DZQ3 对烟草早期的生长发育起到明显的促进作用，有利于烟株茎围增粗和叶面积增大，在烟草旺长期时处理间差距不是很明显，而在后期又表现出一定的差距。同时可以看出，DZQ3 处理烟株的茎围与对照间的差距在整个生长期均可达到显著

水平，而 DZQ3 对株高、叶数、最大叶长三项指标的影响不大，虽然各生长期相比于对照能够表现出一定的生长优势，但差异不显著。

由表 1 可以看出，DZQ3 对烟草生物量的影响较大，接种拮抗菌的烟株鲜质量和干质量相比于对照均有增大的趋势，尤其是烟株鲜质量，比对照增加 38.48%，差异显著，但在干质量方面虽然比对照高出 9.55%，差异并不显著。

2.2 烟草叶片系统抗性相关生理指标

表 2 显示，接种 DZQ3 的烟草各项生理指标要好于对照，其中在移栽后 60 d 时，即旺长期时差异最为显著，此时处理烟株叶片的叶绿素含量、SOD、

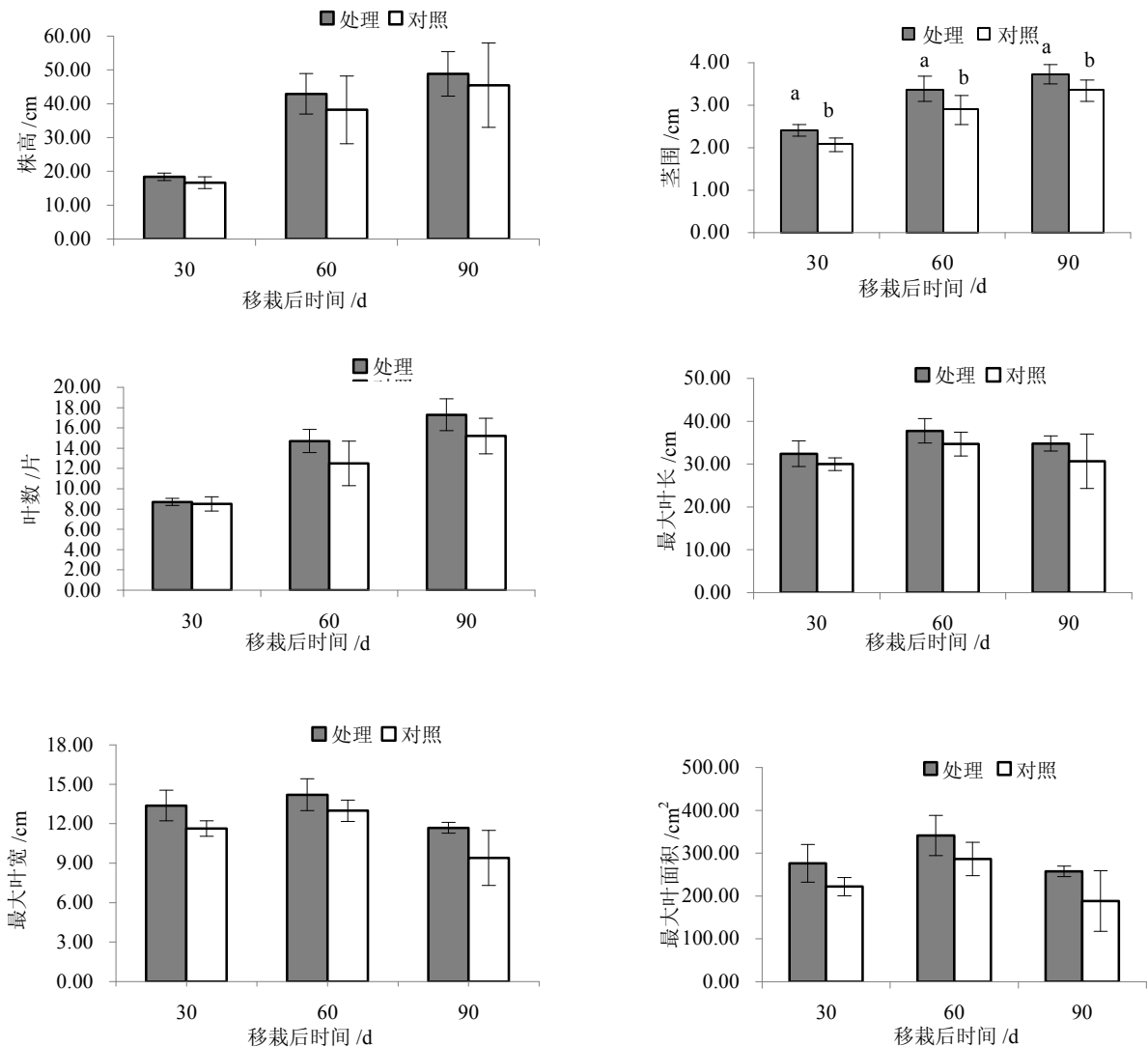


图 1 不同生长期各处理烟株农艺性状

Fig.1 Agronomic traits of tobacco of each treatment in different growth phase

注：不同小写字母表示 5%显著差异，下同。

表 1 各处理烟株生物量
Table 1 Biomass of tobacco

| 处理 | 鲜质量/g | 干质量/g |
|------|--------------|------------|
| DZQ3 | 129.73a±2.24 | 25.02±3.60 |
| CK | 93.69b±2.00 | 22.84±1.29 |

表 2 拮抗菌对烟草叶片部分生理指标的影响
Table 2 Effect of antagonism bacterium on physiological index in leaves of tobacco

| 指标 | 时间/d | DZQ3 | CK |
|--------------------------------|------|----------|------------|
| 叶绿素含量/(mg·g ⁻¹ FW) | 30 | 1.67 | 1.54 |
| | 60 | 2.13a | 1.82b |
| | 90 | 1.43 | 1.44 |
| 电解质相对渗透率 | 30 | 21.82b | 31.04a |
| | 60 | 19.93 | 27.06 |
| | 90 | 28.21 | 30.31 |
| SOD 总活性/(U·g ⁻¹ FW) | 30 | 277.55a | 244.37b |
| | 60 | 291.01a | 259.23b |
| | 90 | 129.10a | 106.67b |
| PPO 活性/(U·g ⁻¹ FW) | 30 | 123.47a | 98.67b |
| | 60 | 162.93a | 138.67b |
| | 90 | 149.33 | 145.07 |
| POD 活性/(U·g ⁻¹ FW) | 30 | 80.67 | 62.45 |
| | 60 | 138.18a | 106.18b |
| | 90 | 150.00 | 136.67 |
| PAL 活性/(U·g ⁻¹ FW) | 30 | 695.33a | 500.35b |
| | 60 | 1020.67a | 846.00b |
| | 90 | 690.67 | 668.67 |
| CAT 活性/(U·g ⁻¹ FW) | 30 | 5.31 | 3.92±0.16 |
| | 60 | 8.21a | 5.71±0.28b |
| | 90 | 4.16 | 4.03±0.62 |

PPO、POD、PAL、CAT 活性分别比对照高出 17.03%、12.26%、17.49%、30.14%、20.65%和 43.78%，差异均达到显著水平；移栽 30 d 时，电解质相对渗透率、SOD、PPO、PAL 活性与对照间差异显著，电解质相对渗透率低于对照 26.35%，SOD、PPO、PAL 活性分别比对照高出 13.58%、25.13%和 38.97%；移栽 90 d 时，只有 SOD 活性与对照间差异显著，高出对照 21.03%。可见，DZQ3 对烟株系统抗性的诱导主要体现在团棵期和旺长期等中前期生长阶段，烟草叶片防御酶活性相比于对照有较大提升，增强了植株对病害的防御力，而在烟草生长后期差距不是很明显，只有 SOD 活性与对照间的差距在整个生长期均可达到显著水平。

2.3 烟草根系发育

表 3 可见，DZQ3 能够促进烟草的根系发育，烟株根系活力和根部鲜重分别比对照高出 38.34% 和 44.91%，差异显著，根冠比略高于对照，但差异不显著。

表 3 烟草根系发育情况

Table 3 Root position of tobacco

| 处理 | 根系活力/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}\cdot\text{h}^{-1}$) | 根部鲜重/g | 根冠比 |
|------|---|--------|------|
| DZQ3 | 112.08a | 25.20a | 0.24 |
| CK | 81.02b | 17.39b | 0.23 |

2.4 烟草病害情况

调查发现，试验过程中 DZQ3 处理烟株和对照都不同程度的感染烟草花叶病，但是接种 DZQ3 的烟株发病较晚，且发病率低于对照。移栽 35 d 后，对照烟株开始出现花叶病症状，发病率为 6.67%，49 d 时发病率升至 20%，56 d 时达到 33.30%；DZQ3 处理烟株 56 d 时发现感染花叶病，发病率为 6.67%，推迟发病 21 d，同时期发病率低于对照 26.63%。

3 讨论

短短芽孢杆菌作为植物根际普遍存在的细菌种属，其促生作用已经有所报道，例如 A57 能够促进棉花子叶的展开和幼苗的发育^[18]，DS-1 可以提高黄瓜种子的发芽率，促进幼苗生长，并且能够诱导黄瓜产生系统抗性^[19]。本试验结果表明，根际接种短短芽孢杆菌 DZQ3 能够有效的促进烟草的生长，烟草农艺性状和生物量均好于对照。尤其是在烟草生长早期，DZQ3 对烟株茎围和叶面积的影响较大，有利于烟草在生长早期吸收利用营养物质、增强叶片的光合作用，为其生长发育打下良好的基础。对烟草根系发育情况的调查中发现，DZQ3 能够促进烟草的根部生长发育，烟株根系活力和根部鲜质量显著优于对照，这对地上部分的生长和烟草的抗病性起到重要作用。

研究表明，生物因子和非生物因子等多种诱导因子可诱导植物系统抗性^[20-21]。各种诱导因子可以诱导植物体内 SOD、POD、CAT、PAL、PPO 等防御酶活性的升高以及叶绿素、电解质相对渗透率等生理指标的改变。其中 SOD、POD 和 CAT 与植物体内活性氧的清除密切相关^[22]，PAL 和 PPO 与植物体内酚类代谢和木质素的形成有关，是与系统抗性密切相关的酶^[23]，叶绿素含量是衡量植物光合作用能力的大小重要指标，植物受到逆境胁迫时叶绿素含量会有所下降，电解质相对渗透率则反映了植

物对病原菌抵抗力的强弱,细胞电解质渗透率小则不易受到病原菌的侵害。Liang 等^[22]通过分根法在黄瓜根部分别接种生防菌 L8 和猝倒病病原菌发现黄瓜根部和叶片中 SOD、POD、CAT、PPO 和 PAL 活性均显著升高,降低了黄瓜幼苗猝倒病的发病率;Vanitha 等^[24]研究发现番茄根际接种荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 增强了番茄对青枯病的抗性,PPO、PAL 等防御酶活性显著提升,且通过 RT-PCR 手段发现相关酶合成基因的表达水平显著升高。本研究发现烟草根际接种 DZQ3 后,叶片中几种防御酶活性和叶绿素含量均显著高于对照,电解质相对渗透率比对照有所降低,移栽 60 d 时各项指标与对照间差异最为显著,此时也是烟草田间病害的高发期,同时温室试验中发现接种 DZQ3 的烟草花叶病发病率比对照有所降低,可能是 DZQ3 诱导烟株产生系统抗性从而抵御花叶病毒侵害的原因。以上结果表明生防细菌 DZQ3 可诱导烟草产生系统抗性,增强烟草对病害的抵抗力。

4 结 论

本试验结果表明,PGPR 菌株短短芽孢杆菌 DZQ3 能有效改善烟草生长期内的农艺性状、提高生物量,促进叶片防御酶活性的升高及根系发育水平。因此具有良好的促生作用和诱导系统抗性能力,可以增强烟草植株对病害的防御力,有利于烟草产量和质量的提高。短短芽孢杆菌是土壤中自然存在的细菌,对人体、动物无致病性,因而具有很强的应用潜力,但是关于 DZQ3 的促生机理、定殖能力和田间应用效果还有待进一步的研究证明。

参考文献

[1] 陈云堂,郭东权,王娟娟,等. 辐照技术在我国烟草中的应用研究进展[J]. 中国烟草科学, 2011, 32(2): 90-95.

[2] 董志坚,宋秀中,程彪,等. 基于“3S”技术的数字化烟草农业研究概况及展望[J]. 中国烟草科学, 2008, 14(3): 65-70.

[3] 王树林,刘好宝,史万华,等. 论烟草轻简高效栽培技术与对策[J]. 中国烟草科学, 2011, 31(5): 1-6.

[4] 王超. 烟草根际促生细菌研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2005.

[5] Lucas G B. Diseases of Tobacco (3rd. ed.)[M] Fuquay-Varina: Harold E. Parker & Sons Printer, 1975: 32-57.

[6] Christiansen-Weniger C, Van Veen J A. NH₄-excreting *Azospirillum brasilense* mutants enhance the nitrogen supply of a wheat host[J]. Appl. Environ. Microbiol, 1991, 57(10): 3006-3012.

[7] Fulchieir M, Lucangeli C, Bottini R. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affect growth and gibberellin status on corn seedling roots[J]. Plant Cell Physiol, 1993, 34(8): 1305-1309.

[8] Schippers B, Bakker A W, Bakker A H M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practice[J]. Ann. Rev. Phytopathol, 1987, 25: 339-358.

[9] 杨海莲,孙晓璐,宋未. 植物根际促生细菌和内生细菌的诱导抗病性的研究进展[J]. 植物病理学报, 2000, 30(2): 107-110.

[10] 顾金刚,方敦煌,李天飞,等. 荧光假单胞杆菌 RB242、RB289 促进烟草生长机理初探[J]. 植物营养与肥料学报, 2002, 8(4): 493-496.

[11] Deepa C K, Dastager S G, Pandey A. Plant growth-promoting activity in newly isolated *Bacillus thioparus* (NII-0902) from Western ghat forest, India[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2010, 26(12): 2277-2283.

[12] Park K, Paul D, Ryu K R, et al. *Bacillus vallismortis* Strain EXTN-1 Mediated Systemic Resistance against Potato virus Y and X in the Field[J]. Plant Pathol. J, 2006, 22(4): 360-363.

[13] Jin F L, Ding Y Q, Ding W, et al. Genetic diversity and phylogeny of antagonistic bacteria against *Phytophthora nicotianae* isolated from tobacco rhizosphere[J]. International journal of molecular science, 2011(12): 3055-3071.

[14] 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, 2000.

[15] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000.

[16] 赵士杰. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1998.

[17] 白宝璋,金锦子,白崧,等. 玉米根系活力 TTC 测定法的改良[J]. 玉米科学, 1994, 2(4): 44-47.

[18] 陈莉. 棉花生防芽孢杆菌 A57、A178 的抑菌机理、拮抗性物质及防病、促生作用[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2007.

[19] 张璐,杜秉海,魏琨,等. 黄瓜枯萎病拮抗菌的生防效果及其对植株生长代谢的影响[J]. 山东农业科学, 2007(4): 89-92.

[20] Michael O, Walter K, Bob D, et al. Induced disease resistance in plants by chemicals[J]. European Journal of (下转第 106 页)