DOI:10.13718/j.cnki.zwys.2021.04.006

3 种有益菌剂对烟草抗青枯病及根际微生物功能多样性的影响①

刘晓姣[1]， 麻子君[1]， 薛 乐[1]， 刘永琴[1,2]， 丁 伟[1]

1. 西南大学 植物保护学院，重庆 400715；
2. 重庆市永川区种子推广站，重庆 402160

摘 要：土传青枯病是世界性防治难题，可以给烟草生产造成毁灭性损失. 目前，田间防控烟草青枯病尚无有效的化学药剂，利用有益菌剂进行生物防治被视为一种可持续的防控措施. 在本研究中，通过在大田中增施枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*，BS)、多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*，PP)和荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*，PF)等有益菌剂，系统分析其对烟草生长、抗青枯病和根际微生物多样性的影响. 结果表明，在本试验条件下，田间增施这 3 种菌剂均能提高烟草对青枯病的抗性，抗病效果表现为：PF＞BS＞PP；仅荧光假单胞菌剂能提高烟草团棵期的生长. 对根际土壤微生物进行 Biolog ECO 测定，表明荧光假单胞菌剂处理对烟草根际微生物群落的均一性和碳源代谢能力有显著提升. 对青枯菌具有诱集作用的 4-羟基苯甲酸是荧光假单胞菌剂处理和枯草芽孢杆菌剂处理共同大量利用的碳源. 本研究结果可为大田应用有益菌剂防治烟草青枯病提供重要的科学依据.

关键词：有益菌剂；荧光假单胞菌；烟草青枯病；根际微生物；碳源代谢

中图分类号：S435.72 **文献标志码**：A **文章编号**：1007－1067(2021)04－0023－08

Effects of Adding Beneficial Microbial Agents in the Field on Tobacco Disease Resistance and Rhizosphere Microbial Diversity

LIU Xiaojiao[1]， MA Zijun[1]， XUE Le[1]，
LIU Yongqin[1,2]， DING Wei[1]

1. School of Plant Protection，Southwest University，Chongqing 400715，China；
2. Seed Promotion Station of Yongchuan District，Chongqing 402160，China

Abstract：Soil-borne bacterial wilt is a worldwide problem，which causes devastating losses in tobacco production. At present，there is no effective chemical agent to control this disease，and thus the use of beneficial microbial agents for biological control is regarded as a sustainable prevention and control measure. A field experiment was conducted in which *Bacillus subtilis* (BS)，*Paenibacillus polymyxa* (PP) and

① 收稿日期：2021－07－11
基金项目：中国烟草总公司重大专项(SYC202010)；重庆市自然科学基金博士后项目(cstc2020jcyj-bsh0052)；重庆市烟草公司重点项目(B20211NY1311).
作者简介：刘晓姣，博士，主要从事烟草根际土壤微生物研究. E-mail：xiaojiaoliu@email.swu.edu.cn
通信作者：丁 伟，教授，主要从事烟草根茎病害防控研究. E-mail：dingw@swu.edu.cn

Pseudomonas fluorescens (PF) were applied as beneficial microbial agents and the growth of the tobacco plants, their resistance to bacterial wilt and the diversity of rhizosphere microbe were systematically analyzed.The results showed that the disease resistance of tobacco to bacteria wilt was improved by applying any of the three agents, the resistance effect being PF>BS>PP, but only the treatment of P. *fluorescens* improved the growth of tobacco at the rosette stage. Biolog ECO test showed that the treatment of *P. fluorescens* significantly improved the microbial evenness and carbon metabolic ability. 4-Hydroxy benzoic acid, which is supposed to be able to attract *Ralstonia solanacearum*, is the carbon source used in large quantities by the treatment of *P. fluorescens* and *B. subtilis*.

Key words: beneficial microbial agent; *Pseudomonas fluorescens*; tobacco bacterial wilt disease; rhizosphere microorganism; carbon source metabolism

在我国，长期以来，不良的耕作、施肥和管理方式等导致土壤微生态系统严重破坏、微生物区系失调，土壤自身的调节能力降低，无法抑制某些病原菌的大量滋生，从而造成土传病害的严重发生[1]. 青枯病是一种由茄科劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的毁灭性土传病害，其病原菌是一种典型的土壤传染病菌[2]，可在土壤深处长期存活. 目前，施用化学药剂是农业生产中常用的防治措施，但是长期、连续、大面积的使用化学药剂存在较多的弊端. 一方面，常用的化学杀菌剂和消毒剂很难作用到土壤深处；另一方面，大量使用化学消毒剂易对土壤有益微生物造成不可逆的毒害，引起土壤微生态系统失衡，病害愈发严重. 近年来，维持土壤生态系统平衡成为有效抑制青枯病的绿色、环保和可持续的方法之一.

利用有益土壤微生物(真菌、细菌和放线菌等)进行土壤微生态改良和病原体的生物防控的研究和实践越来越引起研究学者的重视[3]. 有益微生物通常具有产生拮抗类物质、与病原菌抢夺生态位点和营养物质、诱导植物产生抗性等特性，这些优异特性有利于它们抑制或者消除土壤中或者植物体内的病原菌. 因此，合理利用该类微生物可以在一定程度上防控作物土传病害的发生[4]. 然而，在田间通过外源添加微生物菌群防治土传病害也存在一些问题. 由于外源添加的微生物很难在栖息着大量土著微生物的土壤或根际土壤中定殖，对营养物质的竞争力不如土著微生物，再加上大田气候复杂，往往导致一些有益微生物在大田对病害的防治效果远不如在室内平板实验中对病原菌的拮抗效果好[5]. 在大田中外源添加的有益微生物与土壤微生物、植物土传病害之间的关系复杂，其效果和调控机理有待进一步探索.

基于此，本研究采用枯草芽孢杆菌剂、多粘类芽孢杆菌剂和荧光假单胞菌剂 3 种常见有益菌剂，在大田环境条件下，探索田间增施不同有益菌剂对烟草生长、抗病、微生物多样性和根际微生物代谢多样性的影响，以期为烟草青枯病的防治与土壤微生态修复提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 试验地基本情况

大田试验在重庆市彭水县润溪乡白果坪村进行，东经 107°94′ E，北纬 29°13′ N，海拔 1 145.50 m. 试验地为丘陵山地，光照充足，土壤均匀疏松，多年种植烟草，为烟草青枯病常年发生地块.

1.2 供试材料

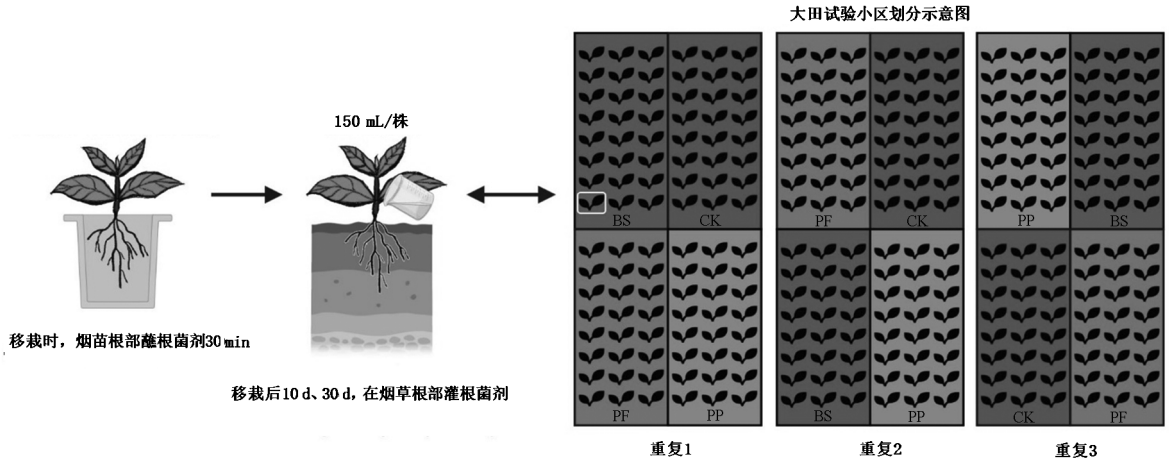
烤烟品种为“云烟 87”，试验药剂为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtitls*)可湿性粉剂(有效活菌 10 亿 cfu/g，由中国农业科学研究院植物保护研究所友情提供)、多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)可湿性粉剂(有效活菌 10 亿 cfu/g，购于浙江省桐庐汇丰生物化工有限公司)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)粉剂(有效活菌3 000亿 cfu/g，购自江苏省常州兰陵制药有限公司).

1.3 试验设计与样品采集

试验共设 4 个处理，根据不同材料的推荐用量，分别设为 125 g/L 枯草芽孢杆菌(BS)、167 g/L 多粘

类芽孢杆菌(PP)、250 g/L 荧光假单胞菌(PF)、清水对照(CK),具体处理措施见图 1. 各处理田间随机区组排列,每区组处理面积约 300 m^2,行株距为 120 cm×50 cm,四周设保护行(图 1). 田间管理按照彭水当地优质烟叶生产技术规范进行.

在烟草现蕾期,采集烟草根际土壤样品. 将 3 株烟草的根际土壤混匀后作为处理的 1 个重复,土样采集后当日运回实验室. 利用 2 mm 筛子过筛,土壤保存至 4 ℃条件下作为待测土样.



BS 为 125 g/L 枯草芽孢杆菌,PP 为 167 g/L 多粘类芽孢杆菌,PF 为 250 g/L 荧光假单胞菌,CK 为清水对照,图 2 至图 5、表 1 同。

图 1　大田试验设计示意图

1.4　烟草农艺性状调查

按照《烟草农艺性状调查方法》(YC/T142—1998)标准,在 5 月 28 日和 6 月 18 日调查各处理烟草的株高和有效叶片数,每个处理调查 30 株.

1.5　烟草青枯病发病情况调查

按照《烟草病虫害分级及调查方法》(GB/T23222—2008)标准调查青枯病发病情况,田间烟草青枯病病情分级标准(以株为单位):

0 级,全株无病;

1 级,茎部偶尔有褪绿斑,或病侧 1/2 以下叶片凋萎;

3 级,茎部有黑色条斑,但不超过 1/2,或病侧 1/2 至 2/3 叶片凋萎;

5 级,茎部黑色条斑超过 1/2,但未到达茎顶部,或病侧 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.

从青枯病初发时期开始定期对各小区进行全株调查,准确记录发病株数与发病级数,并根据公式(1)(2)计算发病率和病情指数.

$$病株率=\frac{发病株数}{调查总株数}\times 100\% \tag{1}$$

$$病情指数=\frac{\sum(发病株数\times该病级代表值)}{调查总株数\times最高级代表值}\times 100 \tag{2}$$

1.6 土壤微生物功能多样性检测

利用 Biolog ECO 微平板检测烟草根际土壤微生物的功能多样性[6]. 称取 5 g 新鲜土加入 45 mL 无菌的 0.85%氯化钠溶液(w/v)中，在摇床震荡 30 min，然后进行 1 000 倍稀释，以每孔 150 μL 稀释液加入 Biolog ECO 板的 96 孔中，放入 28 ℃培养箱中进行 144 h 的恒温培养，每 24 h 用酶标仪检测一次 590 nm 波长下的吸光度值.

计算平均孔颜色变化率(Average well color development，$AWCD$)，以此反映土壤微生物对 31 种碳源的整体代谢活性. 计算土壤微生物培养 96 h 的 Shannon 多样性指数(H)、Simpson 指数(D)、McIntosh 指数(U)，这些指数表示土壤微生物功能的多样性.

$AWCD = \sum(C-R)/n$

C 与 R 分别是培养基孔和对照孔的吸光度值，n 是碳源数目；

$H = -\sum P_i \ln P_i$

$D = 1-\sum P_i^2$

其中 P_i 是第 i 孔相对吸光度值与整个平板相对吸光度值总和的比率；

$U = \sqrt{\sum n_i^2}$

其中 n_i 为第 i 孔的相对吸光度值.

1.7 数据分析

统计数据在 Excel 2013 中进行整理，利用 R(v 4.0.2)进行差异性显著分析并作图，显著性差异分析采用 Tukey HSD 方法.

2 结果与分析

2.1 田间增施有益菌剂对烟草生长状况的影响

对不同处理团棵期和旺长期的烟草株高和有效叶片数进行调查，结果如图 2 所示. 田间增施有益菌剂对于烟草的生长状况影响较小，仅有荧光假单胞菌(PF)处理在团棵期的烟株高度上表现出了显著性差异. 在团棵期，PF 处理的烟株平均高度为 18.20 cm，多粘类芽孢杆菌(PP)和枯草芽孢杆菌(BS)处理分别为 17.67 cm和 17.35 cm，对照(CK)处理最低，仅为 15.68 cm. 此外，PF 处理在团棵期和旺长期的有效叶片数分别为 7 片和 9 片，其余处理分别均为 6 片和 8 片，差异并未达到显著水平. 由此可知，PF 处理对烟草团棵期生长具有促进作用.

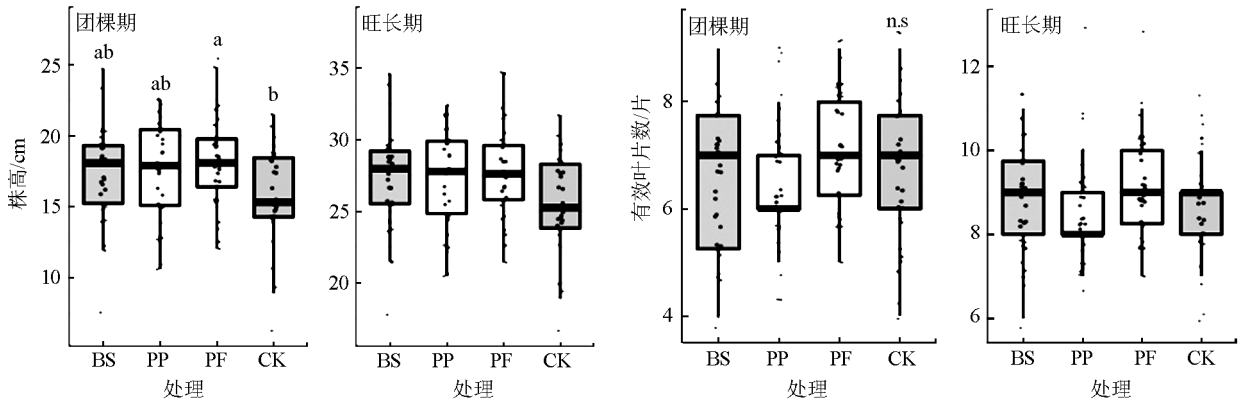


图 2 不同处理对团棵期和旺长期的烟草株高(A)与有效叶片数(B)的影响

2.2　田间增施有益菌剂对烟草抗青枯病的影响

对不同区组的烟草青枯病病情调查显示，3 种有益菌剂处理均能降低烟草青枯病的发病率与病情指数，控病效果表现为：PF＞BS＞PP(图 3). 其中，PF 处理的最终发病率与病情指数均表现为最低，分别为 24.00%，13.67；CK 处理发病率最高，达到 53.00%，病情指数为 36.56. 从病情指数可以发现，CK 和 PP 处理在 8 月 9 日后青枯病发病严重程度突增，而 PF 和 BS 处理在 8 月 14 日后才出现青枯病大幅增加，表明这 2 种菌剂均能显著延缓田间青枯病的暴发.

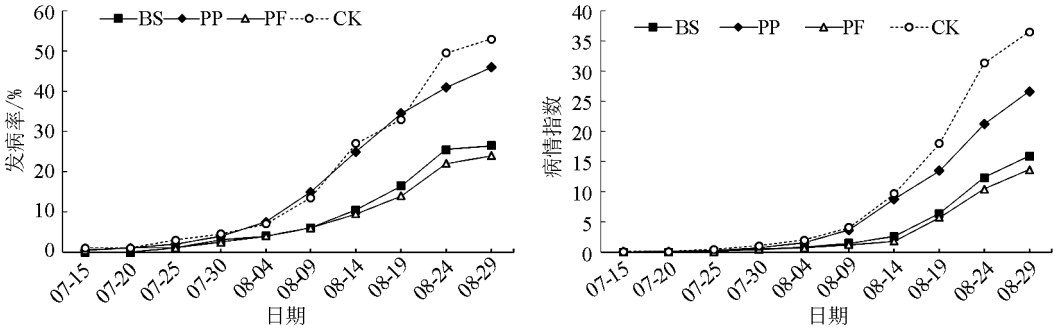


图 3　不同处理对烟草青枯病发病率(A)与病情指数(B)的影响

2.3　田间增施有益菌剂对烟草根际微生物整体代谢碳源的影响

由图 3A 可知，各处理的 *AWCD* 值均随培养时间增加而增加，这表明根际土壤微生物群落对碳源的利用逐渐增强，代谢活性逐渐增强. 整体上，PF 处理的微生物代谢活性明显高于其他处理. 在培养 96 h 时，不同处理的代谢活性差异最明显，PF 处理的 *AWCD* 值(＝1.52)显著高于 CK 处理(*AWCD* 值＝1.36). 因此，对 96 h 的检测数据进行进一步的分析. 由图 3B 可知，Biolog ECO 板上的 31 种碳源可被归纳为 6 大类碳源，即碳水化合物类、氨基酸类、羧酸类、聚合物类、胺类、酚酸类. 其中，PF 处理的微生物对胺类物质的代谢显著优于 CK 处理；BS 处理的微生物对氨基酸类、酚酸类物质的代谢显著优于 CK 处理，尤其对酚酸类物质的 *AWCD* 值高达 1.33，而其他处理的 *AWCD* 值均未高于 0.93.

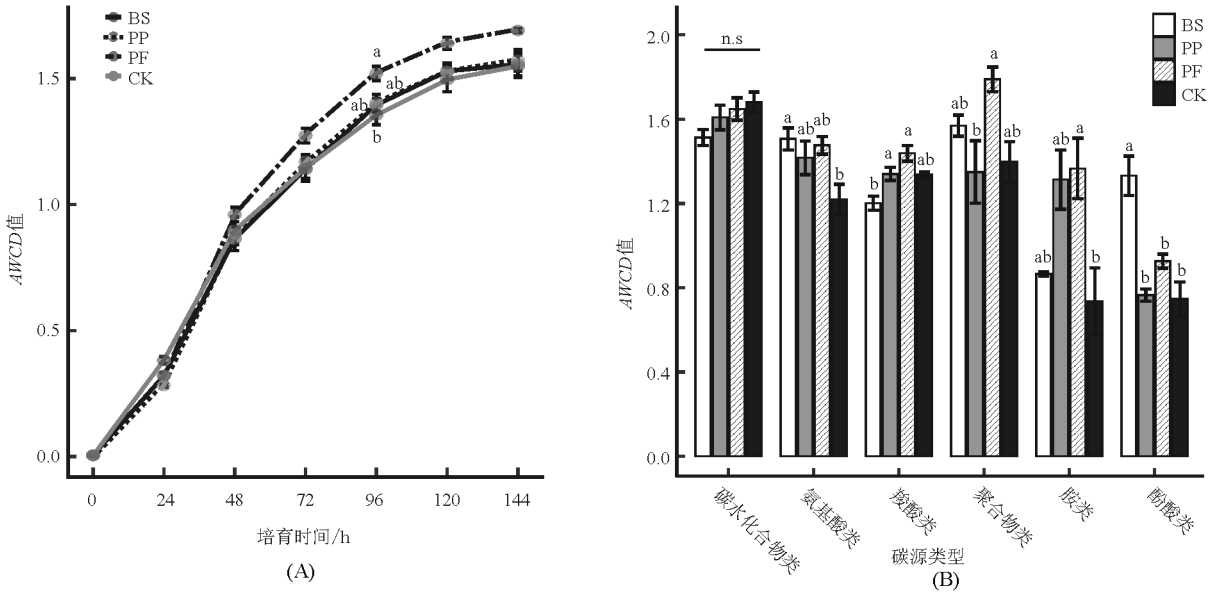


图 4　不同处理对烟草根际微生物整体代谢活性(A)与代谢碳源类型(B)的影响

2.4 田间增施有益菌剂对烟草根际微生物多样性指数的影响

Shannon 指数用来表示群落中物种的丰富度，Simpson 指数可用来表征群落中最常见物种的优势度，而 McIntosh 指数可以指示物种的均一性[6]. 由表 1 可知，各处理间微生物多样性的 Shannon 指数和 Simpson指数均无显著性差异；PF 处理在 McIntoch 指数上显著高于 BS 和 CK 处理. 由此说明，有益菌剂处理对现蕾期的烟草根际土壤微生物功能多样性影响较小，但 PF 处理能显著增强微生物的均一性.

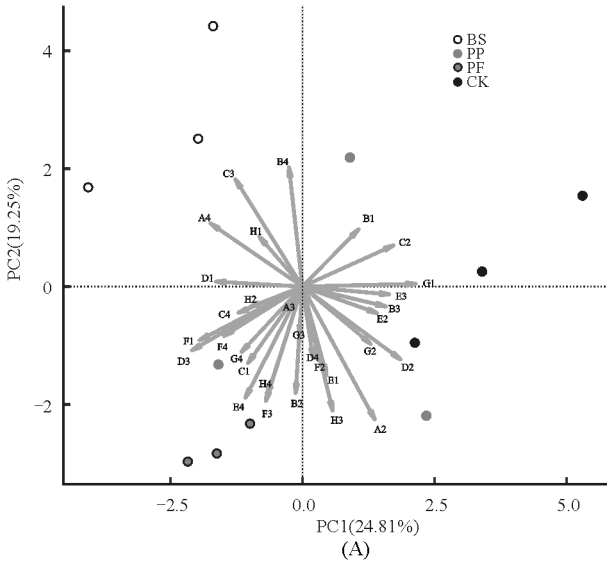
表 1 不同处理对烟草根际土壤微生物多样性指数的影响

处理	Shannon 指数	Simpson 指数	McIntoch 指数
BS	3.36±0.00a	0.96±0.00a	8.27±0.14b
PP	3.32±0.01a	0.96±0.00a	8.56±0.17ab
PF	3.35±0.01a	0.96±0.00a	9.04±0.14a
CK	3.33±0.02a	0.96±0.00a	8.20±0.18b

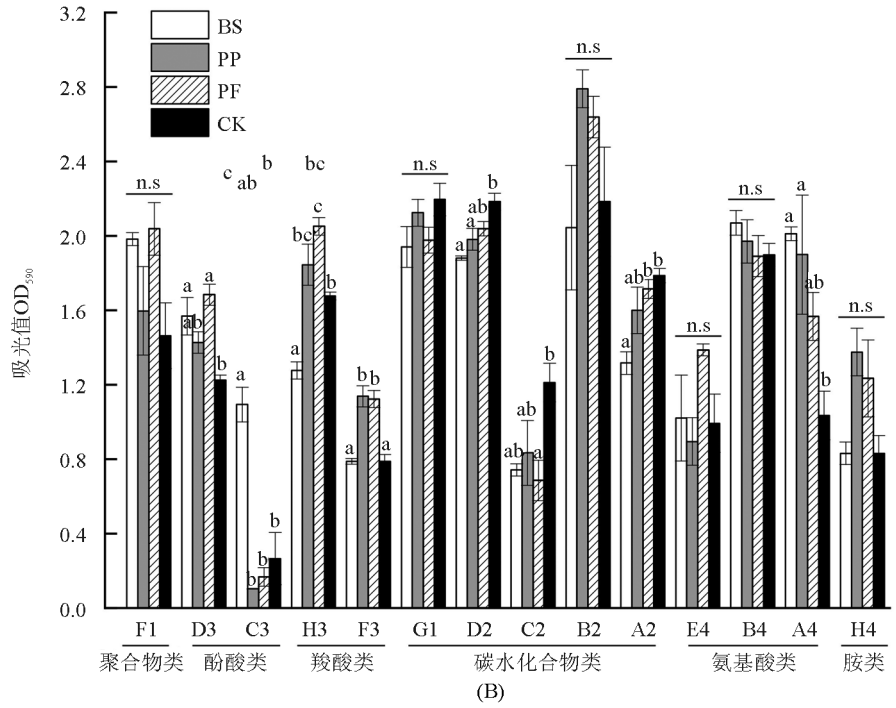
2.5 田间增施有益菌剂对烟草根际微生物代谢碳源的主成分分析

对不同处理条件下微生物代谢碳源进行主成分分析(PCA)，主成分 1(PC1)与主成分 2(PC2)的累计贡献率达 44.06%(图 5A). PC1 将 BS 和 PF 处理与 CK 处理清晰划分开，即 PF 和 BS 处理在 PC1 的得分值均为负值(−4.06 ～−0.99)，而 CK 处理在 PC1 的得分值均为正值(2.14 ～ 5.30). PC2 将 BS 处理与 PF 处理清晰划分开，即 BS 处理在 PC2 的得分值均为正值(1.69 ～ 4.42)，而 PF 处理在 PC2 的得分值均为正值(−2.97 ～−2.32).

根据各碳源在 PC1 和 PC2 上的得分，选取相关系数大于平均半径值(0.24)的 14 个碳源作为对两个主成分轴贡献率较高的碳源：β-甲基 D-葡萄糖苷(A2)、L-精氨酸(A4)、D 木糖(B2)、L-天冬酰胺酸(B4)、I-赤藻糖醇(C2)、2-羟苯甲酸(C3)、D-甘露醇(D2)、4-羟基苯甲酸(D3)、L-苏氨酸(E4)、肝糖(F1)、衣康酸(F3)、D-纤维二糖(G1)、D-苹果酸(H3)、腐胺(H4). 其中包含碳水化合物类 5 个、氨基酸类 3 个、羧酸类 2 个、酚酸类 2 个、胺类 1 个、聚合物类 1 个. 由图 5B 可知，共有 8 个碳源的利用存在显著性差异. 例如，PF 处理对 4-羟基苯甲酸、衣康酸、D-苹果酸的利用显著高于 CK 处理，对 I-赤藻糖醇的利用显著低于 CK 处理；BS 处理对 L-精氨酸、2-羟苯甲酸、4-羟基苯甲酸的利用显著高于 CK 处理，对 β-甲基 D-葡萄糖苷、D-甘露醇、D-苹果酸的利用显著低于 CK 处理. 其中，4-羟基苯甲酸是 PF 和 BS 处理共同大量利用的碳源.



(A)



注：A2 为 β-甲基 D-葡萄糖苷，A3 为 D-半乳糖内酯-γ-内酯，A4 为 L-精氨酸，B1 为丙酮酸甲脂，B2 为 D 木糖，B3 为 D-半乳糖醛酸，B4 为 L-天冬酰胺酸，C1 为吐温 40，C2 为 I-赤藻糖醇，C3 为 2-羟苯甲酸，C4 为 L-苯基丙氨酸，D1 为吐温 80，D2 为 D-甘露醇，D3 为 4-羟基苯甲酸，D4 为 L-丝氨酸，E1 为 α-环式糊精，E2 为 N-乙酰基，E3 为 γ-羟基丁酸，E4 为 L-苏氨酸，F1 为肝糖，F2 为 D-葡萄氨酸，F3 为衣康酸，F4 为甘氨酰，G1 为 D-纤维二糖，G2 为葡萄糖-1-磷酸盐，G3 为 α-丁酮酸，G4 为苯乙基胺，H1 为 α-D-乳糖，H2 为 D，L-α-甘油，H3 为 D-苹果酸，H4 为腐胺.

图 5　根际土壤微生物对不同碳源利用的主成分分析(A)和根际土壤微生物对不同碳源的利用情况(B)

3　讨论与结论

外源添加有益菌剂能否起到良好的控病、促生的效果，关键在于其在田间能否良好的定殖，不管有益微生物是以何种机制发挥作用，其在植物根部若不能良好的定殖与适应植株根际环境，将对病害很难达到良好的防治效果[7]. 本研究发现，大田施用荧光假单胞菌制剂对青枯病防控效果最好(最终发病率与病情指数分别为 24.00%，13.67). 已有的研究表明，荧光假单胞菌广泛生活于土壤生态系统中，表现出广谱抗菌性[8-9]，它可以通过分泌抗生素类物质[10]以及竞争生态位点、营养物质[5]等方式来实现对病原菌的拮抗作用. 本研究中，荧光假单胞菌处理后的总 *ACWD* 值与 McIntosh 指数均高于其他处理，由此推测荧光假单胞菌可以较为稳定高效定殖于根际环境并影响根际微生物群落结构. 此外，柳辉林等[11]研究发现田间增施荧光假单胞菌剂，可增产 25%以上，这与增施荧光假单胞菌剂提高了团棵期烟草株高的结果一致.

在植物根系分泌物中，有机酸类物质占有较大的比重，如苹果酸、对羟基苯甲酸、丁香酸等，在土壤、微生物与植物互相作用的过程中，这些有机酸类物质对调控植物根际环境起着至关重要的作用[12-13]. 本研究发现，枯草芽孢杆菌处理后土壤微生物对氨基酸类、酚酸类物质的代谢显著优于对照处理，尤其对酚酸类物质的 *AWCD* 值高达 1.33；荧光假单胞菌处理后土壤微生物对胺类物质的代谢显著优于对照处理. 说明外源添加这 2 种菌剂能够明显地提高土壤微生物代谢植物根系分泌物的能力. 其中，4-羟基苯甲酸是植物的主要根系分泌物，在土壤中大量累积后会对下茬作物产生化感自毒作用[14]. 本研究中荧光假单胞菌处理与枯草芽孢杆菌处理对该物质的代谢强度均显著高于对照处理. 此外，Hasegawa 等[15]发现青枯菌对 4-羟基苯甲酸具有显著的趋化性，推测 4-羟基苯甲酸对青枯菌具有靶向诱集作用. 由此可推测，外源引入荧光假单胞菌与枯草芽孢杆菌能够迅速的向植株根部富集并定殖，增强烟株根际土壤对连作化感物质和根系分

泌物的代谢，减弱对青枯菌的靶向诱集作用，进而维持烟株的健康生长.

综上所述，本研究在大田环境下探讨了 3 种不同有益菌剂增施对烟草生长、抗病、根际微生物代谢多样性的影响. 结果表明，田间增施荧光假单胞菌剂对烟草前期生长具有一定的促进作用；对烟草青枯病的期防控，荧光假单胞菌剂处理的效果最好，枯草芽孢杆菌剂处理次之；荧光假单胞菌剂处理对烟草根际微生物代谢碳源能力有显著提升，其对 4-羟基苯甲酸、衣康酸、D-苹果酸的利用显著高于对照处理；4-羟基苯甲酸是荧光假单胞菌剂处理和枯草芽孢杆菌剂处理共同大量利用的碳源. 荧光假单胞菌剂处理和枯草芽孢杆菌剂可能通过提高对 4-羟基苯甲酸的代谢来减弱青枯菌对植物根际的趋向性，从而达到控病的效果.

参考文献：

[1] BERENDSEN R L，PIETERSE C M J，BAKKERP A H M. The Rhizosphere Microbiome and Plant Health [J]. Trends in Plant Science，2012，17(8)：478-486.

[2] JIANG G，WEI Z，XU J，et al. Bacterial Wilt in China：History，Current Status，and Future Perspectives [J]. Front Plant Sci，2017，8：1549.

[3] LECOMTE C，DE ALABOUVETTE C，EDEL-HERMANN V，et al. Biological Control of Ornamental Plant Diseases Caused by Fusarium Oxysporum：a Review [J]. Biological Control，2016，101：17-30.

[4] CHAPARRO J M，SHEFLIN A M，MANTER D K，et al. Manipulating the Soil Microbiome to Increase Soil Health and Plant Fertility [J]. Biology and Fertility of Soils，2012，48(5)：489-499.

[5] FRAVEL D R. Commercialization and Implementation of Biocontrol [J]. Annual Review of Phytopathology，2005，43(1)：337-359.

[6] 刘晓姣. 烟草根际抑病土壤有益微生物的组学特征及对青枯病的拮抗作用研究 [D]. 重庆：西南大学，2018.

[7] 夏 飞. 生防枯草芽孢杆菌、荧光假单胞杆菌及哈茨木霉菌对西瓜根围土壤细菌群落影响规律的研究 [D]. 上海：华东理工大学，2012.

[8] KIELY P D，HAYNES J M，HIGGINS C H，et al. Exploiting New Systems-Based Strategies to Elucidate Plant-Bacterial Interactions in the Rhizosphere [J]. Microbial Ecology，2006，51(3)：257-266.

[9] 慕小倩，杨 超，王 硕. 荧光假单胞杆菌化感作用的初步研究 [J]. 应用生态学报，2005，16(4)：778-779.

[10] RAMESH R，PHADKE G S. Rhizosphere and Endophytic Bacteria for the Suppression of Eggplant Wilt Caused by Ralstonia Solanacearum [J]. Crop Protection，2012，37：35-41.

[11] 柳辉林，张 剑，徐隆根，等. 荧光假单胞菌 3000 亿个/克粉剂防治烟草青枯病田间药效试验 [J]. 农药科学与管理，2008，29(6)：24-26.

[12] 刘艳霞，李 想，蔡刘体，等. 烟草根系分泌物酚酸类物质的鉴定及其对根际微生物的影响 [J]. 植物营养与肥料学报，2016，22(2)：418-428.

[13] 李石力. 有机酸类根系分泌物影响烟草青枯病发生的机制研究 [D]. 重庆：西南大学，2017.

[14] 王 博. 外源酚酸对贝达葡萄植株生长及根际土壤微生物作用机制研究 [D]. 沈阳：沈阳农业大学，2016.

[15] HASEGAWA T，KATO Y，OKABE A，et al. Effect of Secondary Metabolites of Tomato (*Solanum lycopersicum*) on Chemotaxis of *Ralstonia solanacearum*，Pathogen of Bacterial Wilt Disease [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2019，67(7)：1807-1813.