



研究报告

烤烟根际烟碱降解细菌的多样性及其促生特性分析

李永赞¹ 曾宗梁² 杨军伟^{*2} 李广煜¹ 辜运富^{*1}

1 四川农业大学资源学院 四川 成都 611130

2 四川省烟草公司攀枝花市公司 四川 攀枝花 617099

摘要:【背景】挖掘兼具烟碱降解和植物根际促生细菌(Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR)功能的细菌资源,有助于保护土壤质量,实现绿色种植。【目的】分析烤烟根际细菌多样性,筛选可降解高浓度烟碱的 PGPR。【方法】采用纯培养法在选择性培养基上分离烟碱降解细菌。通过 BOXA1R-PCR 分析技术、16S rRNA 基因测序及系统发育树构建,对菌株的遗传多样性和分类学地位进行分析。进一步评价了菌株的吲哚乙酸(Indole-3-Acetic Acid, IAA)活性、溶磷能力、病原菌拮抗能力等 PGPR 指标,以筛选出高效 PGPR,最后通过盆栽试验验证其促生效果。【结果】分离得到 58 株烟碱降解细菌,根据 BOXA1R-PCR 指纹图谱选取 11 株菌进行 16S rRNA 基因序列测定,结果表明,58 株菌分别属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、拉乌尔菌属(*Raoultella*)和短波单胞菌属(*Brevundimonas*) 4 个属,以芽孢杆菌属(*Bacillus*)为优势菌属。58 株细菌中 48.28% 的菌株可产 IAA, 27.59% 具备溶磷能力, 37.93% 具备纤维素降解能力, G2-13、G2-3 及 HT2-8 因促生与抗病特性突出而被筛选为目标功能菌。盆栽试验结果表明, G2-13 菌株对幼苗生长的促进作用明显,可使株高与地上部鲜重分别增加 33.05% 与 53.32%。【结论】烤烟根际存在较为丰富多样的烟碱降解细菌,它们在种植业上具有潜在的应用价值。

关键词: 烟碱降解, 生物多样性, 植物根际促生菌, 盆栽试验

Analysis on the diversity and plant growth-promoting characteristics of bacteria in rhizosphere of flue-cured tobacco

LI Yongyun¹ ZENG Zongliang² YANG Junwei^{*2} LI Guangyu¹ GU Yunfu^{*1}

1 College of Resource, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China

2 Panzhihua Branch, Sichuan Tobacco Company, Panzhihua, Sichuan 617099, China

Abstract: [Background] The mining of bacterial resources with the capabilities of both nicotine degradation and plant growth-promoting would contribute to soil quality protection and green cultivation. [Objective] To analyze the bacterial diversity in the rhizosphere of flue-cured tobacco and screen the plant growth-promoting bacteria that can degrade high concentration of nicotine. [Methods] Pure culture is applied to isolate nicotine-degradation strains with selective medium. The diversity and phylogeny of

Foundation items: Project of Panzhihua Branch of Sichuan Tobacco Company (202051040024038, PZH2019003); National Natural Science Foundation of China (41201256)

***Corresponding authors:** E-mail: YANG Junwei: 1103581611@163.com; GU Yunfu: guyf@sicau.edu.cn

Received: 06-01-2021; **Accepted:** 19-02-2021; **Published online:** 16-03-2021

基金项目: 四川省烟草公司攀枝花市公司项目(202051040024038, PZH2019003); 国家自然科学基金(41201256)

***通信作者:** E-mail: 杨军伟: 1103581611@163.com; 辜运富: guyf@sicau.edu.cn

收稿日期: 2021-01-06; **接受日期:** 2021-02-19; **网络首发日期:** 2021-03-16

rhizobacteria were analyzed by transcription factor amplification (BOXA1R-PCR), 16S rRNA gene sequencing and phylogeny analysis. The PGPR characteristics of the nicotine-degradation strains were screened via determination of indole-3-acetic acid (IAA) production, phosphorus solubility, antimicrobial activity and other indexes. The growth-promoting effect of the isolates were further confirmed by pot experiment. **[Results]** Totally, 58 strains of nicotine-degradation bacteria were isolated, and 11 typical strains with different BOXA1R-PCR fingerprints were selected for 16S rRNA gene sequencing. Based on the phylogeny analysis, the 58 strains were belonged to four genera including *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Raoultella* and *Brevundimonas*, with *Bacillus* as the predominant genus. Of the 58 isolates, 48.28% produced IAA, 27.59% were able to dissolve phosphorus, 37.93% could degrade cellulose. Based on the PGPR abilities, three isolates including G2-13, G2-3 and HT2-8 were used to perform pot experiment to further confirm their potential growth-promoting ability. The results showed that when compared to the control, G2-13 could increased the plant height and aboveground fresh weight by 33.05% and 53.32%, respectively. **[Conclusion]** The tobacco rhizosphere harbors plenty of nicotine-degradation bacterial strains with PGPR capability and have potential application prospects in plant cultivation strains.

Keywords: nicotine-degradation, biodiversity, PGPR, pot experiment

植物根际促生菌 (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) 是一类存在于土壤并定殖于植物根际的重要微生物, 可通过直接或间接作用促进植物生长, 直接作用包括分泌吲哚乙酸 (Indole-3-Acetic Acid, IAA) 等植物生长激素、溶磷解钾、分泌铁载体等, 间接作用则主要是通过分泌抗菌物质以减轻或抑制植物病害的发生^[1-2]。目前报道的 PGPR 以细菌为主, 主要包含假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、农杆菌属 (*Agrobacterium*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*) 等^[3-4]。

烤烟作为高附加值经济作物, 其品质因素决定了收购价格的高低, 而部分种植户为了提升产量长期单一、过量施用化肥, 导致土壤理化性质变差、土传病害盛行, 产品质量与产量受到较大限制。农业农村部针对滥用化肥导致土地质量持续下降的现象, 提出了“药肥双减”项目, 鼓励新型高端肥料的研发, 从而实现产业可持续发展^[5]。减施化肥配施 PGPR 菌剂能够显著提高土壤微生物活性和微生物群落结构多样性, 活化养分、抑制病害、改善土壤结构, 从而解决连作障碍^[6-7]。研究表明, 烤烟根际是一个重要的细菌资源库。张欣悦等^[8]从烟株根际土壤分离得到的拮抗菌株 GZYCT-4 和 GZYCT-9 对烟草青枯病菌具有较强抑制作用, 经鉴定均为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*)。李小林等^[9]利用

PCR-DGGE 技术对烤烟成熟期土壤微生物群落结构及多样性进行研究, 结果表明根际土壤优势细菌的群落结构较非根际土壤更为丰富, 烤烟生长后期根际环境逐步恶化。目前有关烤烟 PGPR 菌株的报道较少且研究侧重于生防作用。此外, 植烟土壤中对毒性最强的物质烟碱 (Nicotine) 极易渗入土壤且长期存在, 影响土壤环境质量和微生物群落结构, 而对兼具烟碱降解和 PGPR 能力的烤烟根际细菌的研究尚未见相关报道^[10]。

攀枝花市米易县等四川传统烤烟种植区具有适合优质烤烟生长的生态条件, 烤烟根际土壤存在数量繁多的微生物。本研究以四川传统烤烟种植区烤烟根际土壤为样本, 分离对烟碱有降解能力的根际细菌, 对菌株进行 PGPR 能力分析, 通过盆栽试验验证其抗病促生效果, 并利用分子生物学手段对菌株进行鉴定及多样性分析, 以期丰富根际细菌种资源库、挖掘高效烟碱降解微生物资源并应用于烤烟栽培、保护植烟土壤质量、提高烤烟种植效益等提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

本次根际土壤样品采自攀枝花市米易县新山乡 (102°07'5.44"E、26°49'24.57"N)、泸州市古蔺县

箭竹乡(105°36'57.48"E、28°02'2.80"N)与凉山州会东县铅锌镇(102°46'48.85"E、26°42'49.95"N)。采样点烤烟品种均为云烟 87, 采样时期值烤烟旺长期。在田间五点取样, 通过抖根法获得根际土壤样品, 以无菌自封袋包装带回实验室。

指示病原菌为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、黄瓜霜霉病菌 (*Pseudoperonospora cubensis*)、小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 由四川农业大学应用微生物学系提供; 烤烟种子品种为云烟 87。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

菌株分离与烟碱降解能力测定使用 LB-烟碱培养基^[11]、产铁载体能力测定使用 CAS 检测平板与 CAS 染液^[12-13]、溶磷能力测定使用无机磷固体培养基^[14]、纤维素降解能力测定使用刚果红培养基^[15]、产 IAA 能力测定使用 Salkowski 试剂^[16]; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 2×*Taq* PCR Master Mix、16S rRNA 基因引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 仪、凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 紫外可见分光光度计, 上海棱光技术有限公司。

1.2 根际烟碱降解细菌的分离

称取土壤 5 g 加入到装有 45 mL 无菌水的三角瓶中, 放置在摇床上振荡 1.5 h 以混匀, 从中吸取 1.0 mL 菌液进行 10 倍梯度稀释, 分别得到 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 浓度稀释液。取 10⁻²–10⁻⁴ 稀释菌液各 50 μL 涂布在 LB-烟碱固体选择培养基(烟碱浓度为 4 g/L)中, 28 °C 恒温培养 2–3 d, 挑选单菌落进一步纯化。将菌株接入 LB-烟碱液体培养基(烟碱浓度 4 g/L)中, 30 °C、140 r/min 培养 3 d, 测定烟碱降解率以筛选出烟碱降解菌。

1.3 烟碱降解能力测定

以未接菌 LB-烟碱液体培养基为空白对照, 10 000 r/min 离心 5 min, 上清液用 0.05 mol/L 盐酸溶液稀释到合适的吸光度值范围。在 5 g/L 烟碱工作液(纯烟碱加入 0.05 mol/L 盐酸溶液配制)中加入

对应量 0.05 mol/L 盐酸溶液配制一定浓度梯度, 以 259 nm 处所测吸光度值为纵坐标、烟碱浓度为横坐标绘制烟碱紫外吸收标准曲线, 标准曲线回归方程为 $Y=33.686X+0.0043$, R^2 为 0.9997。测定样品吸光度值, 根据标准曲线计算烟碱浓度, 烟碱降解率 = (空白对照培养基烟碱含量 - 接菌培养基烟碱) / 空白对照培养基烟碱含量 × 100%^[11]。

1.4 BOXA1R-PCR 分析

挑取 LB 平板单菌落, 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, -20 °C 保存。以 BOXA1R 引物(5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3')对菌株进行 PCR 扩增^[17]。BOXA1R-PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR Master Mix 12.5 μL, 引物(10 μmol/mL) 1.0 μL, 模板 DNA (10 μg/mL) 3.0 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 68 °C 8 min, 30 个循环; 68 °C 10 min。80 V 下 2% 琼脂糖凝胶电泳 90 min, 凝胶成像仪拍照获得图谱。

1.5 16S rRNA 基因测序及系统发育分析

基于 BOXA1R-PCR 指纹图谱, 选取 11 株代表菌株进行 16S rRNA 基因测序。以总 DNA 为模板, 通用引物 F1 (5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3') 和 F2 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 扩增 16S rRNA 基因^[18]。PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR Master Mix 25 μL, F₁ 和 F₂ 引物(10 μmol/mL) 各 0.5 μL, 模板 DNA (10 μg/mL) 4.0 μL, ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 次循环; 72 °C 8 min。取 PCR 产物 5 μL 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。PCR 产物纯化和测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, 将测序结果在 EzBioCloud 数据库中比对, 利用 MEGA 5.0 构建系统发育树。

1.6 促生特性测定

1.6.1 产 IAA 特性测定

采用 Salkowski 比色法^[16]测定菌株产 IAA 能力。取培养到 OD₆₀₀ 为 0.6 的细菌发酵液 50 μL 至含 0.5 g/L 色氨酸的 LB 液体培养基中, 每株 3 次重复,

30 °C、140 r/min 培养 2 d, 每支试管取 50 μ L 菌液于白瓷板中, 加入 100 μ L Salkowski 显色剂, 避光 30 min, 出现粉红色则表现为阳性, 表明该菌具有产 IAA 活性, 显色越深表明活性越强。

定量测定菌株 IAA 产量, 10 000 r/min 离心 5 min 获得的上清液取 2 mL 与 4 mL Salkowski 显色剂混合, 常温下避光静置 30 min 后, 530 nm 下测定吸光度值。以未接种空白培养基为对照, 重复 3 次。根据将 100 μ g/mL 的 IAA 标准样品(10 mg IAA 用 UP 水定容至 100 mL)加入对应显色剂测得的吸光度值做成标准曲线, 计算 IAA 的产量(mg/L)=(OD_{530} -固定值 B)/系数 $K^{[19]}$ 。

1.6.2 溶磷能力测定

利用溶磷圈法定性评价菌株的溶磷效果^[14]。将菌株点接于筛选平板上, 28 °C 培养 3–4 d, 观察接种菌株周围是否形成透明溶解圈。测定溶解圈直径, 计算 HD/CD 值(HD 为透明圈直径, CD 为菌落直径)来表征溶磷能力。重复 3 次。

1.6.3 纤维素降解能力测定

通过溶解圈法测定菌株的纤维素降解能力^[15]。将菌株点接于刚果红培养基上, 28 °C 培养 4–5 d, 观察菌落周围是否形成淡黄色透明溶解圈。计算 HD/CD 值(HD 为透明圈直径, CD 为菌落直径)以表征纤维素降解能力。重复 3 次。

1.6.4 产铁载体能力定性测定

利用 CAS 平板检测菌株产铁载体能力^[12–13]。将菌株接入 LB 液体培养基中, 30 °C、140 r/min 培养 2 d, 于平板中央点接 5 μ L 菌液, 每菌 3 次重复, 28 °C 培养 3–4 d。分泌铁载体细菌菌落周围出现明显橙黄色透明晕圈, 计算 HD/CD 值(HD 为橙黄色透明晕圈直径, CD 为菌落直径)^[13]。每菌重复 3 次。

1.7 抗病活性测定

采用平板对峙法^[20]测定对病原真菌抑制效果, 在 PDA 培养基中央接种直径 5 mm 的病原真菌菌块, 距菌块四周 2 cm 处十字接种分离菌株, 重复 3 组。以只接种病原菌平板为对照, 28 °C 培养箱培养 3 d, 计算抑菌率, 抑菌率(%)=(对照菌落直径–

处理菌落直径)/(对照菌落直径) $\times 100$ 。采用双层平板法^[21]对病原细菌抑制效果进行测定, LB 琼脂平板(含 2%琼脂)上放置牛津杯后, 加入混合病原菌菌液 LB 培养基(含 1%琼脂), 待上层凝固后, 向牛津杯加入 150 μ L 发酵菌液, 重复 3 次, 28 °C 培养箱培养 3 d, 测量抑菌圈直径。

1.8 盆栽试验

综合促生抗病测定指标筛选出目标功能菌。设置单菌组(不同菌株发酵液)、混菌组(功能菌混合发酵液)及对照组。挑选包衣完整的烤烟种子用于漂浮育苗, 每穴 2–3 粒种子, 置于恒温恒湿室内获得烟苗, 选择长势一致的烟苗移栽于塑料钵钵。向单菌组与混菌组盆栽中接种菌株, 于烟苗茎基部加入对应发酵菌液 50 mL, 对照组加入 LB 液体培养基 50 mL。每个处理 3 次重复, 每盆 1 株。移栽后 5 d 再次加入等量菌液及 LB 液体培养基。移栽后 30 d 收获整株植株, 测定株高、叶绿素含量、根体积等指标。

2 结果与分析

2.1 烟碱降解细菌的分离及多样性分析

利用 LB-烟碱固体培养基, 从 3 个样地的云烟 87 根际土壤样品中分离到 346 株细菌, 所分离的细菌具备一定的耐受烟碱能力, 但并不意味着能够对烟碱进行降解。测定烟碱浓度 4 g/L 下菌株摇瓶培养 72 h 后的烟碱降解率。346 株菌株中, 共 58 菌株具备降解能力, 其中 G2-13、G2-3、HT2-8 等 13 株菌株在 40%以上, HT14 降解率最高, 达 62.41%。不同地区分离得到的烟碱降解菌数量存在差异, 分离自泸州古蔺县的菌株最多, 为 23 株; 分离自攀枝花市盐边县的菌株为 19 株; 分离自凉山州会东县的数量最少, 为 16 株。结果显示(图 1), BOXA1R-PCR 指纹图谱将 58 株菌株划分为 11 种图谱类型。根据表 1 可知, 类型 11 数量最多, 为 20 株; 类型 3、4、8 均只有 1 株; 类型 1、7、8 谱带类型虽不一致, 但相似性最高的标准菌株均为 *Bacillus paranthracis* (MACE01000012)。根据图谱

类型选取的 11 株代表菌株进行 16S rRNA 基因片段测序, 结果显示(图 2), 58 株菌株分别属于革兰氏阳性菌的芽孢杆菌属(*Bacillus*)与革兰氏阴性菌的假单胞菌属(*Pseudomonas*)、拉乌尔菌属(*Raoultella*)和短波单胞菌属(*Brevundimonas*), 其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)有 49 株(84.48%), 为优势菌属; 短波单胞菌属(*Brevundimonas*)仅 1 个种 2 株菌。G2-13 与 *Bacillus paranthracis* (MACE01000012) 相似性达 99.93%, HT2-8 与 *Bacillus atrophaeus* (AB021181) 相似性为 98.69%, G2-3 与 *Raoultella ornithinolytica* (AJ251467) 相似性为 99.02%。

2.2 根际细菌促生特性

测定 58 株菌的促生能力发现, 28 株(48.28%)具有分泌 IAA 能力, 16 株(27.59%)具有溶磷能力, 22 株 (37.93%)具有纤维素降解能力, 13 株(22.41%)具有分泌铁载体能力。综合评价菌株促生能力, 有 14 株促生特性优良且同时具备 3 种及以上促生功能(表 2), 其中 10 株 IAA 分泌量在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上, HT14 分泌量最高, 为 53.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3 株溶磷能力较强($HD/CD \geq 2.50$), 其中 YBG10 的 HD/CD 值最高, 为 3.26; 7 株纤维素降解能力突出($HD/CD \geq 2.50$), 其中 HT2-8 与 HT13 的 HD/CD 值分别为 4.22 和

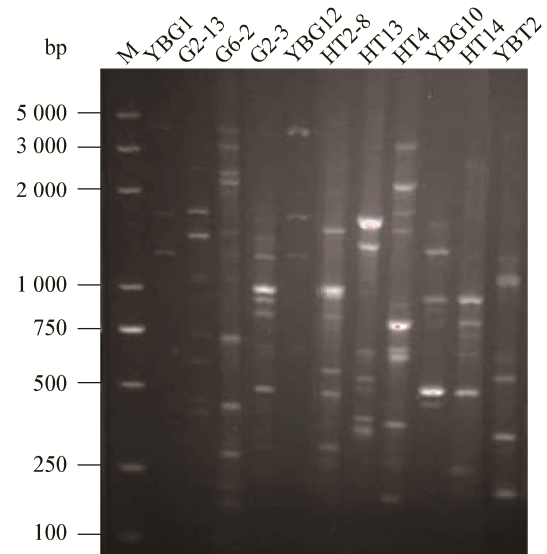


图 1 烟碱降解菌代表菌株 BOXA1R-PCR 指纹图谱类型

Figure 1 BOXA1R-PCR fingerprints of representative strains of nicotinic-degradation bacteria

Note: M: DL5000 DNA Marker

4.78; G2-13、G2-3、HT2-8、HT13、G1-14、YBT1 菌株兼具 4 项促生功能, G2-13、G2-3 与 G1-14 分离自泸州市古蔺县, HT2-8、HT13 分离自凉山州会东县铅锌镇, YBT1 分离自攀枝花市米易县。

表 1 烟碱降解菌代表菌株鉴定结果

Table 1 Identification of representative strains of nicotinic-degradation bacteria

属 Genus	菌株 Strains	类型(菌株数量) Type (number of strains)	近缘菌株(序列号) Similar strains (accession No.)	相似性 Similarity (%)
<i>Bacillus</i>	YBT2	1 (2)	<i>Bacillus paranthracis</i> (MACE01000012)	99.04
	YBG12	7 (5)	<i>Bacillus paramycoides</i> (MAOI01000012)	98.70
	G2-13	8 (1)	<i>Bacillus paranthracis</i> (MACE01000012)	99.93
	HT2-8	2 (8)	<i>Bacillus atrophaeus</i> (AB021181)	98.69
	G6-2	11 (20)	<i>Bacillus mobilis</i> (MACF01000036)	98.97
	YBG1	3 (1)	<i>Bacillus wiedmannii</i> (LOBC01000053)	98.76
	YBG10	6 (12)	<i>Bacillus toyonensis</i> (CP006863)	99.17
<i>Pseudomonas</i>	HT14	5 (3)	<i>Pseudomonas geniculata</i> (AB021404)	99.37
<i>Brevundimonas</i>	HT4	10 (2)	<i>Brevundimonas olei</i> (GQ250440)	99.11
<i>Raoultella</i>	G2-3	9 (3)	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (AJ251467)	99.02
	HT13	4 (1)	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (AJ251467)	99.03

注: 根据扩增条带片段划分图谱类型

Note: The types were divided according to the amplified fragments

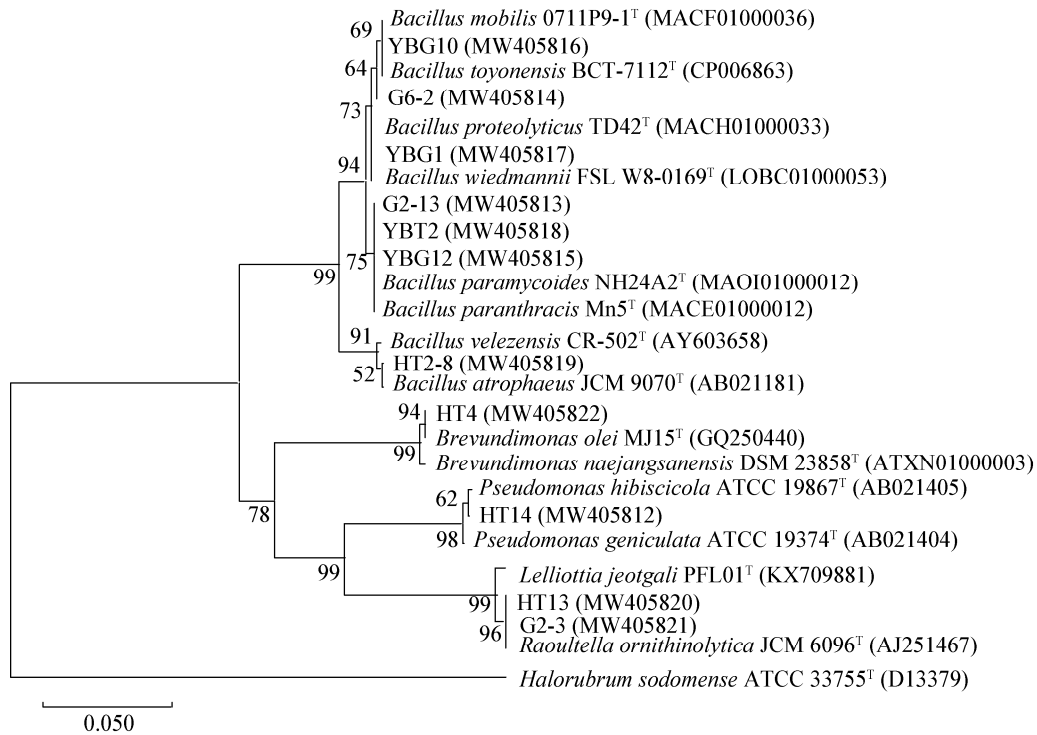


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

注: 括号中序号代表菌株在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数字代表 Bootstrap 值; 标尺表示碱基置换频率; 外类群菌株为嗜盐古菌属(*Halorubrum*)

Note: Numbers in parentheses mean accession numbers in GenBank; Numbers at the nodes mean the Bootstrap value; The scale means substitution frequency; The outer group strain is *Halorubrum*

表 2 根际土壤细菌产 IAA、溶磷及纤维素降解能力

Table 2 The ability of rhizosphere soil bacteria to produce IAA, dissolve phosphorus and degrade cellulose

菌株 Strains	IAA 产量 IAA production ($\mu\text{g/mL}$)	HD/CD		
		溶磷特性 Phosphate solubilizing (cm)	纤维素降解能力 Cellulose degradation (cm)	分泌铁载体能力 Siderophore production (cm)
G2-13	44.90 \pm 3.36	2.05 \pm 0.06	2.43 \pm 0.08	1.84 \pm 0.06
G2-3	24.34 \pm 1.92	2.88 \pm 0.09	3.38 \pm 0.27	2.38 \pm 0.08
HT2-8	32.22 \pm 2.48	1.75 \pm 0.03	4.22 \pm 0.11	2.05 \pm 0.11
HT13	29.24 \pm 3.49	2.34 \pm 0.12	4.78 \pm 0.12	1.76 \pm 0.05
G1-14	31.74 \pm 5.27	1.77 \pm 0.03	1.56 \pm 0.03	1.47 \pm 0.18
YBT1	34.04 \pm 2.09	2.54 \pm 0.17	1.82 \pm 0.09	1.89 \pm 0.14
HT3-1	22.85 \pm 1.81	1.35 \pm 0.15	nd	1.25 \pm 0.03
HT14	53.67 \pm 3.13	1.75 \pm 0.23	nd	2.17 \pm 0.22
YBT2	16.04 \pm 0.51	1.32 \pm 0.05	3.68 \pm 0.08	nd
G2-11	38.62 \pm 0.86	2.28 \pm 0.09	1.82 \pm 0.06	nd
HT6-2	28.58 \pm 4.88	nd	1.88 \pm 0.08	1.95 \pm 0.16
G2-1	nd	2.32 \pm 0.12	3.13 \pm 0.13	1.66 \pm 0.07
HT4	nd	1.55 \pm 0.06	2.02 \pm 0.19	1.70 \pm 0.11
YBG10	nd	3.26 \pm 0.27	2.58 \pm 0.15	2.26 \pm 0.12

注: 表中数据表示平均值 \pm 标准偏差; nd: 未检出; HD: 溶解圈直径; CD: 菌落直径

Note: The data in the table represents mean \pm standard deviation; nd: Not detected; HD: Transparent circle diameter; CD: Colony diameter

2.3 根际细菌抑菌活性

对菌株进行抑菌活性测定, 结果表明(表 3): 7 株菌对 3 种及以上病原菌有拮抗作用, 其中 HT2-8 对所有指示病原菌均存在拮抗作用, 而且对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径达 2.10 cm; 此外, G2-13、YBT6、G1-14 菌株对 3 种病原真菌均有抑制作用, 其中, G2-13 对黄瓜霜霉病菌、小麦赤霉病菌、尖孢镰刀菌抑制率均在 40%以上, 分别为 42.47%、52.38%、62.25%。对于黄瓜霜霉病菌, 仅 G2-1 未表现抑制特点, 抑制率最高的菌株是 HT4, 达 72.13%; 对于小麦赤霉病菌, 抑制率最高的菌株是 G2-13, 为 52.38%; 对于尖孢镰刀菌, 仅 HT4 未表现抑制特点, G2-13、G2-3 及 G1-14 菌株均有较强拮抗作用, 抑制率最高的菌株是 G1-14, 达 74.15%。

2.4 根际细菌对烤烟幼苗生长的影响

综合促生与抗病测定指标, 将性能突出的

G2-13、G2-3、HT2-8 菌株用于烤烟幼苗的主要生理指标测定。如表 4 所示, G2-13 与混菌处理(G2-13+G2-3+HT2-8)的烟苗株高显著高于其他处理, 较对照组分别提高 33.05%和 21.08%; G2-13、G2-3 和混菌处理可显著提高地上部鲜重, 较对照组分别增加 53.32%、19.67%和 44.59%, 而 G2-13 和混菌处理又显著高于 G2-3 处理; 在叶绿素含量方面, G2-13 与 G2-3 处理提升效果明显, 较对照组分别增加 8.28%和 9.55%; 就根鲜重和根体积而言, 指标内所有处理间无显著差异。总体上看, G2-13 处理的促生效果优于其余施菌液处理, 接种 G2-13 菌株的烟苗在株高、地上部鲜重及叶绿素含量 3 个指标上, 较对照组有显著提高; 混菌处理使株高和地上部鲜重显著增加, 但对其余指标影响不大; G2-3 与 HT2-8 处理整体促生效果不明显, 但均降低了株高、地上部鲜重和根体积的变异系数。

表 3 根际土壤细菌抑菌能力

Table 3 The antimicrobial activity of rhizobacteria

菌株 Strains	对病原细菌的抑菌直径 Disease resistance (cm)		对病原真菌抑菌率 Antifungal activity of the strains (%)		
	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	黄瓜霜霉病菌 <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>
	G2-13	1.44±0.04	nd	42.47±0.62	52.38±3.65
G2-3	1.22±0.03	nd	31.68±1.51	nd	64.68±2.82
HT2-8	1.20±0.11	2.05±0.09	34.82±0.48	40.62±2.26	28.95±0.45
HT4	nd	1.88±0.03	72.13±2.26	28.53±1.03	nd
YBT6	nd	nd	38.94±0.79	32.16±1.42	22.70±0.18
G1-14	nd	nd	35.34±0.21	48.72±1.31	74.15±2.64
G2-1	1.15±0.06	1.62±0.03	nd	nd	36.14±0.23

注: 表中数据表示平均值±标准偏差; nd: 未检出

Note: The data in the table represents mean±standard deviation; nd: Not detected

表 4 不同处理下烤烟幼苗生长性状

Table 4 Growth parameters of flue cured tobacco seedlings under different treatments

处理 Treatment	株高 Plant height (cm)	地上部鲜重 Aboveground fresh weight (g)	叶绿素含量 Chlorophyll content (mg/g)	根鲜重 Root fresh weight (cm)	根体积 Root volume (cm ³)
Control	11.62±0.58b	8.59±0.52c	1.57±0.05b	1.97±0.08a	6.48±0.24a
G2-13	15.46±1.02a	13.17±0.62a	1.70±0.06a	2.25±0.15a	6.80±0.30a
G2-3	12.22±0.20b	10.28±0.23b	1.72±0.06a	2.06±0.18a	6.78±0.13a
HT2-8	11.94±0.27b	8.81±0.34c	1.60±0.02ab	1.88±0.17a	6.32±0.21a
Combination	14.07±0.62a	12.42±0.32a	1.62±0.03ab	2.08±0.21a	6.67±0.41a

注: 表中数据表示平均值±标准偏差; 不同的字母代表不同的显著性差异($P<0.05$)

Note: The data in the table represents mean±standard deviation; Different lowercase letters mean significant differences ($P<0.05$)

3 讨论

烤烟是重要的经济作物,当前由于缺乏科学施肥与耕作措施,烟叶品质遭到严重限制,而已有研究表明,将 PGPR 菌剂应用于烟草可取得良好效果^[22-23]。谢雨歆等^[24]以复合肥和有机肥为底肥,施加 PGPR 复合菌剂有效改善了烟叶品质,使中上等烟叶比例和产值分别提高 34.5%和 26.4%。吴翔等^[25]从 923 株烟草根际土壤细菌中,筛选出 5 株促生能力较好的菌株,在此基础上构建的促生菌系“1345”可显著提高烟草种子发芽率。PGPR 对于植株的促生机理除了分泌激素、溶磷、解钾、拮抗病原菌等,可能还包括 PGPR 定殖于植株根系后分泌代谢物质调节根际微生物区系,改善微生态环境,从而促进植株生长^[26]。

本文筛选出的菌株 G2-13、G2-3 与 HT2-8 具有较强促生特性,对多数指示病原菌都存在抑制能力。根据 16S rRNA 基因序列比对结果(图 1),菌株 G2-13 与 HT2-8 都位于芽孢杆菌属(*Bacillus*)分支上,具备较强的促生、抗病活性。芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株在国内应用广泛,近年来有较多被筛选作为 PGPR 菌株的报道^[27]。杨晓云等^[28]通过盆栽试验,证实对番茄枯萎病菌有抑制作用的解淀粉芽孢杆菌 B1619,其发酵上清液可显著促进番茄生长。李亚男等^[29]分离筛选的萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*) YN01,对稻瘟病菌丝生长抑制率超过 90%。席淑雅等^[30]从烤烟根际分离得到 2 株细菌 A03 和 B04,它们对烟草角斑病、青枯病和赤星病的病原菌有较强抑制作用,将菌株制成菌肥后应用于烤烟漂浮育苗,成苗移栽成活率达到 100%。在本次盆栽试验中,菌株 G2-13 处理与混菌处理对于烤烟幼苗地上部分生长均具有明显促进作用,但混菌处理的促生效果弱于 G2-13 处理,推测是混菌处理后菌株的次级代谢产物引发拮抗作用,导致未能形成良好的促生菌体系,从而削弱了整体促生效果。吴颖等^[31]针对复合微生物菌剂不同菌株间存在的拮抗现象,对菌种配比、添加顺序及培养条件进

行调整,从而降低体系中的拮抗作用。此外,来源于烤烟及其废弃物的烟碱残留于土壤,因其难以分解且毒性较大,对于农田生态系统的污染问题不可轻视。当前已有通过筛选烤烟微生物并将其应用于烟碱降解的报道,而本实验筛选出的菌株具备明显的烟碱降解能力和纤维素酶活,在降解烟杆、减轻烟碱污染等方面也存在潜在应用价值^[32-34]。

综上所述,烤烟根际土壤存在丰富多样性且兼具烟碱降解和 PGPR 功能的细菌资源,具有较好的应用前景,可丰富现有微生物肥料用菌株资源库,并为烟碱降解研究提供基础材料。

REFERENCES

- [1] Bhattacharyya PN, Jha DK. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(4): 1327-1350
- [2] Zhang DL, Meng Z, Qi WZ, Qiao K. The research and application status of plant growth promoting rhizobacteria[J]. World Pesticides, 2018, 40(6): 37-43,50 (in Chinese)
张典利, 孟臻, 元文哲, 乔康. 植物根际促生菌的研究与应用现状[J]. 世界农药, 2018, 40(6): 37-43,50
- [3] Guo Y, Yang P, Zhang DY, Liu YY, Ma LJ, Bu N. Screening, identification and growth-promoting effect of multifunction rhizosphere growth-promoting strain of wild soybean[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(10): 108-115 (in Chinese)
郭英, 杨萍, 张丹雨, 刘莹莹, 马莲菊, 卜宁. 野大豆多功能根际促生菌的筛选鉴定和促生效果研究[J]. 生物技术通报, 2018, 34(10): 108-115
- [4] Hu JC, Xue DL, Ma CX, Wang SJ. Research advances in plant growth-promoting rhizobacteria and its application prospects[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(10): 1963-1966 (in Chinese)
胡江春, 薛德林, 马成新, 王书锦. 植物根际促生菌 (PGPR) 的研究与应用前景[J]. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1963-1966
- [5] Wang B, Xu ZY, Wang K, Li J, Xu T, Han YJ, Xi B, Hao XY, Gao SB. Correlation of GDP per capita and chemical fertilizer consumption of different countries from 1961 to 2015[J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2019, 36(6): 718-727 (in Chinese)
王博, 徐志宇, 王楷, 李季, 许艇, 韩一军, 习斌, 郝晓燕, 高尚宾. 1961—2015 年各国化肥消费量与人均 GDP 相关性分析[J]. 农业资源与环境学报, 2019, 36(6):

718-727

- [6] Li X, Liu YX, Xia FJ, Cai LT, Zhang H, Shi JX. Screening, identification and plant growth-promotion mechanism of tobacco plants rhizobacteria[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2017, 23(3): 111-118 (in Chinese)
李想, 刘艳霞, 夏范讲, 蔡刘体, 张恒, 石俊雄. 烟草根际促生菌(PGPR)的筛选、鉴定及促生机理研究[J]. *中国烟草学报*, 2017, 23(3): 111-118
- [7] Ruan AD. Studies on soil microbial ecotoxicology and microbial degradation of nicotine[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2005 (in Chinese)
阮爱东. 尼古丁的土壤微生物生态毒理和微生物降解研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2005
- [8] Zhang XY, Luo CQ, Chen XJ, Wang Q, Wang L, Ding T. Evaluation of two antagonistic bacteria from tobacco rhizosphere for controlling tobacco bacterial wilt[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2020, 26(1): 91-99 (in Chinese)
张欣悦, 罗翠琴, 陈小洁, 王其, 王璐, 丁婷. 两株防治烟草青枯病的烟草根际拮抗菌[J]. *中国烟草学报*, 2020, 26(1): 91-99
- [9] Li XL, Li Q, Peng WH, Gan BC, Zheng LY, Zhang XP. Study on diversity and community structure of bacteria in soils at tobacco maturing stage[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2015, 21(4): 40-47 (in Chinese)
李小林, 李强, 彭卫红, 甘炳成, 郑林用, 张小平. 烟草成熟期土壤细菌群落结构及多样性[J]. *中国烟草学报*, 2015, 21(4): 40-47
- [10] Wang X, Tang L, Yao YL, Wang HX, Min H, Lu ZM. Bioremediation of the tobacco waste-contaminated soil by *Pseudomonas* sp. HF-1: nicotine degradation and microbial community analysis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(13): 6077-6088
- [11] Mei F, Kong W, Li Y, Ma TT, Pi T, He DL, Cheng GJ, Liu T, Li XH. Isolation and gene characterization of a nicotine-degradation strain *Agrobacterium tumefaciens* SCUEC1[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(5): 701-709 (in Chinese)
梅枫, 孔雯, 李阳, 马婷婷, 皮婷, 何冬兰, 程国军, 刘涛, 李晓华. 尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株的分离及其降解基因[J]. *微生物学报*, 2017, 57(5): 701-709
- [12] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 160(1): 47-56
- [13] Zhao X, Xie ZX, Chen SX, Shen P. Improvement and analysis in over-siderophores production bacteria filtrating and detecting[J]. *Microbiology China*, 2006, 33(6): 95-98 (in Chinese)
赵翔, 谢志雄, 陈绍兴, 沈萍. 适合高产铁载体细菌筛选、检测体系的改进与探析[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(6): 95-98
- [14] Gong AD, Kong XW, Zhai XK, Lu YN, Wen ST, Zhang JB. Phosphate solubilizing, antagonistic and plant growth promoting activity of *Bacillus subtilis* WY8-7[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2019, 42(4): 697-705 (in Chinese)
宫安东, 孔宪巍, 翟新可, 路亚南, 文淑婷, 张静柏. 枯草芽胞杆菌 WY8-7 的溶磷、抑菌及促生长作用[J]. *南京农业大学学报*, 2019, 42(4): 697-705
- [15] Li J, Zhang HN, Zhao C, Zhang JY, Zhang Q, Zhang JY, Liu MK, Chen Q, Zhao K. Isolation and screening of cellulose decomposing microbe and the straw decomposing effect of complex microbial system[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2016, 22(4): 689-696 (in Chinese)
李静, 张瀚能, 赵舫, 张金羽, 张琪, 张靖莹, 刘茂柯, 陈强, 赵珂. 高效纤维素降解菌分离筛选、复合菌系构建及秸秆降解效果分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2016, 22(4): 689-696
- [16] Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(2): 535-538
- [17] Versalovic J, Koeuth T, Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(24): 6823-6831
- [18] Shukor MY, Gusmanizar N, Ramli J, Shamaan NA, MacCormack WP, Syed MA. Isolation and characterization of an acrylamide-degrading Antarctic bacterium[J]. *Journal of Environmental Biology*, 2009, 30(1): 107-112
- [19] Luo LH, Lu SE, Liang YH, Zhang XP, Gu YF. Diversity of the culturable bacteria isolated from *Aspongopus chinesis* Dallas (Pantatomidae)[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(9): 1945-1952 (in Chinese)
罗立华, 卢圣鄂, 梁煜桓, 张小平, 辜运富. 九香虫(椿象)体内可培养细菌的多样性分析[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(9): 1945-1952
- [20] Qi JM, Sun SS, Zhang DX, Xiao JZ, Xu ZW. Identification and biocontrol activity analysis of biocontrol strain PF-1 based on genome-wide data[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2020, 32(10): 1816-1822 (in Chinese)
戚家明, 孙杉杉, 张东旭, 肖建中, 徐志文. 生防菌株 PF-1 基于全基因组数据的分类鉴定及拮抗能力分析[J]. *浙江农业学报*, 2020, 32(10): 1816-1822
- [21] Ye XW, Zhu RQ, Ni XC, Zhang GL, Nie YG, Qi HF, Gu MM, Liu ZZ, Zhu DH. Isolation and identification of endophytes from *Radix Changii* (*Changium smyrnioides* Wolff) and its inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Microbiology*, 2019, 39(3): 35-43 (in Chinese)
叶晓婉, 朱润琪, 倪新程, 张桂丽, 聂雅阁, 戚贺飞, 谷

- 萌萌, 刘珍珍, 朱大恒. 明党参内生菌的分离鉴定及其对金黄色葡萄球菌的抑制作用[J]. 微生物学杂志, 2019, 39(3): 35-43
- [22] Wang BX, Li FX, Zhang CH, Wu FG, Xi SY, Zhu B, Cao YB, Liu TX, Qiu LY. Effect of application of PGPR on chemical fertilizer application rate for flue-cured tobacco[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48(4): 813-822 (in Chinese)
王豹祥, 李富欣, 张朝辉, 吴风光, 席淑雅, 朱宝, 曹育博, 刘天翔, 邱立友. 应用 PGPR 菌肥减少烤烟生产化肥的施用量[J]. 土壤学报, 2011, 48(4): 813-822
- [23] Liu CJ, Du CY, Liang ZJ, Zhang DZ, Liu AX, Yu JF. Screening and identification of phosphorus-solubilizing bacteria in tobacco rhizosphere and their antibacterial and growth-promoting effects[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2020, 41(1): 9-15, 29 (in Chinese)
刘春菊, 杜传印, 梁子敬, 张德珍, 刘爱新, 于金凤. 烟草根际溶磷细菌的筛选鉴定及抑菌促生效果研究[J]. 中国烟草科学, 2020, 41(1): 9-15, 29
- [24] Xie YX, Zeng QB, Yang JW, Zhao C, Li B, Kang X, Cheng WM, Feng WQ, Chen Q, Yu XM. Effects of growth-promoting rhizobacteria on quality and yield of flue-cured tobacco[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2017, 50(7): 14-21, 30 (in Chinese)
谢雨歆, 曾庆宾, 杨军伟, 赵聪, 李斌, 康夏, 程惟森, 冯文强, 陈强, 余秀梅. 植物根际促生细菌在烤烟提质增产中的作用[J]. 烟草科技, 2017, 50(7): 14-21, 30
- [25] Wu X, Gan BC, Tang Y, Tan H, Huang ZQ, Xie LY, Peng WH, Tang J, Zhou J, Chen Y. Screening growth-promoting rhizobacteria from main tobacco-growing areas in Sichuan and construction of growth-promoting rhizobacteria groups[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2019, 52(3): 1-9 (in Chinese)
吴翔, 甘炳成, 唐亚, 谭昊, 黄忠乾, 谢丽源, 彭卫红, 唐杰, 周洁, 陈影. 四川烟草主栽区根际促生菌筛选及促生菌系构建[J]. 烟草科技, 2019, 52(3): 1-9
- [26] Tan ZJ, Xiao L, Xie BY, Yi YJ. Microecological functions of pseudomonad[J]. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2004, 18(1): 72-76 (in Chinese)
谭周进, 肖罗, 谢丙炎, 易有金. 假单胞菌的微生物生态调节作用[J]. 核农学报, 2004, 18(1): 72-76
- [27] Hu XD, Chai YX, Zou Y, Wu J. Advances in the application of plant growth promoting bacteria in rhizosphere of flue-cured tobacco[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2015, 21(5): 119-125 (in Chinese)
胡小东, 柴云霞, 邹阳, 吴杰. 烤烟根际促生菌应用研究进展[J]. 中国烟草学报, 2015, 21(5): 119-125
- [28] Yang XY, Chen ZY, Jiang PP, Zhang RS, Liu YZ, Liu YF. Growth-promotion effect of *Bacillus amyloliquefaciens* B1619 on tomato plant[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2016, 32(3): 349-356 (in Chinese)
杨晓云, 陈志谊, 蒋盼盼, 张荣胜, 刘邨洲, 刘永锋. 解淀粉芽孢杆菌 B1619 对番茄的促生作用[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(3): 349-356
- [29] Li YN, Jiang F, Zhang J, Fan YY, Chen J, Peng YL, Hu YG. Inhibition effects and antibacterial mechanism against rice blast of antagonistic bacteria in plateau soil[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2017, 23(1): 33-40 (in Chinese)
李亚男, 蒋芬, 张杰, 范永义, 陈敬, 彭友林, 胡运高. 高原土壤中稻瘟病拮抗细菌的抑菌效果及抗菌机理[J]. 应用与环境生物学报, 2017, 23(1): 33-40
- [30] Xi SY, Bi QW, Wang BX, Yang LB, Zhang XJ, Wang J, Qiu LY. Application of PGPR fertilizer in flue-cured tobacco seedling production using floating system[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2009, 15(6): 53-57 (in Chinese)
席淑雅, 毕庆文, 王豹祥, 杨林波, 章新军, 汪健, 邱立友. PGPR 菌肥在烤烟漂浮育苗中的应用[J]. 中国烟草学报, 2009, 15(6): 53-57
- [31] Wu Y, Hou LD, Zhang J. Antagonistic effect of bacterial strains in complex microbial inoculants and the screening of their culture condition[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2016, 28(5): 820-827 (in Chinese)
吴颖, 侯璐丹, 张杰. 复合微生物菌剂中各菌株间的拮抗试验及培养条件的筛选[J]. 浙江农业学报, 2016, 28(5): 820-827
- [32] Zou F, Zhao J, Lei YP, Zu CL, Cao H. Isolation, identification and enzymatic property of a tobacco straw degradation strain[J]. *Soils*, 2016, 48(5): 939-945 (in Chinese)
邹芳, 赵娟, 雷燕萍, 祖朝龙, 曹慧. 一株烟草秸秆降解菌的分离、鉴定及酶学性质研究[J]. 土壤, 2016, 48(5): 939-945
- [33] Long ZD, Wei FL, Li JF, Tian ZF, Zhang M, Li XQ, Shen PH. Screening, isolation and identification of a high concentration nicotine degradation bacterium strain[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2013, 32(5): 612-615 (in Chinese)
龙章德, 韦方立, 李俊芳, 田兆福, 张敏, 黎新钦, 申佩弘. 一株高浓度烟碱降解菌的筛选、分离和初步鉴定[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(5): 612-615
- [34] Ma GH. Diversity and phylogenetic analyses of nicotine-degrading bacteria isolated from tobacco plantation soils[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(34): 6392-6398