

# 烟草内生菌对烟草根结线虫病的防治效果\*

杨友才<sup>1\*</sup> 黄晓辉<sup>1</sup> 龚理<sup>1</sup> 曾强<sup>1</sup> 谭周进<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128 ;<sup>2</sup> 湖南中医药大学基础医学院, 长沙 410007 )

**摘要** 从烟草中筛选到几株内生菌进行防治根结线虫的盆栽试验,以研究其防治效果。结果表明,内生细菌发酵液的防治效果优于内生细菌菌体,内生放线菌则相反。内生菌普遍对植物具有促生作用,但内生菌菌体的促生效果优于内生菌的发酵液。H3 号内生细菌对根结线虫防治效果最好,病情指数为 4.16,防效为 91.68%,明显优于对照,优于阿维菌素处理。H3 号内生细菌处理的烟草形态指标明显优于阿维菌素处理。

**关键词** 烟草;内生菌;根结线虫;防治效果

中图分类号 S435.72 文献标识码 A 文章编号 1000-4890(2009)11-2269-04

**Controlling effect of tobacco endophyte against tobacco root-knot nematode disease.** YANG You-cai<sup>1</sup>, HUANG Xiao-hui<sup>1</sup>, GONG Li<sup>1</sup>, ZENG Qiang<sup>1</sup>, TAN Zhou-jin<sup>2</sup> ( <sup>1</sup> College of Bioscience & Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; <sup>2</sup> School of Preclinical Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China ). Chinese Journal of Ecology 2009 28( 11 ) 2269-2272.

**Abstract** : Several tobacco endophyte strains were screened out, and their controlling effect against tobacco root-knot nematodes was studied with pot experiment. The fermentation broth of endophytic bacteria was more effective than the bacterial thallus, while that of endophytic actinomycetes was less effective than the actinomycete fermentation broth. All test endophytes promoted tobacco growth, and the promotion effect of their thalli was better than that of their fermentation broths. Endophytic bacterial strain H3 was the best in controlling tobacco root-knot nematode disease, with 91.68% controlling effect and a disease index of 4.16, much better than the treatments CK and avermectin. Moreover, the morphological feature of tobacco plant treated with H3 was better than that treated with avermectin.

**Key words** : tobacco; endophyte; root-knot nematode; controlling effect.

烟草根结线虫( *Meloidogyne* spp. )病害是我国烟草生产上的一种重要病害,分布范围广,对烟草品质影响较大(段玉玺和吴刚,2002)。生产上,根结线虫的防治效果不明显,在河南、安徽、云南等烟区持续发生。植物感染根结线虫后,分为初次感染期和二次感染期,二次感染期一般在初次感染期后 38 d 左右(郭衍银等,2005)。根结线虫侵染后对植物的生长发育和新陈代谢产生一系列不良影响(贺文婷和彭得良,2007),造成了不利于植物生长的微生态环境,植物体内发生一些异常生理生化反应,游离脯氨酸、丙二醛、根系活力和叶绿素等都会有不同程度的变化。郭衍银等(2005)发现生姜( *Zingiber offi-*

*cinale* )被根结线虫侵染后,叶片中叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量均显著下降,降低了光合产物的积累,并使光合速率的日变化曲线由双峰变为单峰。花生( *Arachis hypogaea* )根结线虫侵染节瓜( *Benincasa hispida* var. *chieh-qu* ),使叶绿素含量和光合强度均显著降低(宾淑英和刘展眉,2007)。郝玉金等(1999)研究发现,山定子( *Malus baccata* )在遭到南京毛刺线虫( *Trichodorus nanjingensis* )侵染以后,根尖组织中游离脯氨酸含量有升高的趋势。

植物内生菌是指生活在植物体内或在其生活史的一定阶段处于植物体内的一类菌株(Sturz *et al.*, 2000)。植物内生菌可与植物结瘤固氮,产生生长素促进宿主生长,产生抗生素增加植物的抗病性,产生次生代谢活性物质使植物具有抗逆、抗虫、除草功

\* 科技部支撑计划资助项目(2006BAD08A08)。

\*\* 通讯作者 E-mail: yangyc163@163.com

收稿日期:2009-04-15 接受日期:2009-07-25

能(黄晓辉等 2008)。张波等(2009)研究表明,接种内生真菌改变了茅苍术(*Atractylodes lance*)中挥发油的 4 种主要活性成分。目前,已有多类植物内生微生物制剂用于防治植物病害、降低植株体内有害物质(如烟草中的致癌物质)和提高农作物产量和质量(雷丽萍 2007)。本研究通过进行内生菌发酵液和菌液灌根盆栽试验,初步探明内生微生物在防治根结线虫病害上的效果及机理,旨在寻找能在生产上达到防治烟草根结线虫的内生菌菌株,减轻烟草根结线虫病害。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为易感根结线虫烤烟品种红花大金元(王静等 2001),由中国烟草中南试验站提供。供试菌株为前期实验从 4 个不同抗性烟草品种植株内筛选到的抗根结线虫烟草内生菌,一共分离到 84 株内生细菌,24 株内生放线菌,筛选方法参照胡汝晓等(2008),通过室内抑制根结线虫实验,筛选到 3 株内生细菌(H1、H3 和 K6)和 1 株内生放线菌 Y12,其发酵液对根结线虫二龄幼虫有很强的抑杀作用,其中 H3 号菌株发酵液 30% 浓度对根结线虫二龄幼虫的抑杀率达到 100%。

1.2 线虫的获取

挖取发病严重的南瓜病根,参照刘维志(2000)的方法收集虫卵,2~3 d 后待卵孵化成二龄幼虫后,计数备用。

1.3 试验设计

试验在湖南农业大学烟草科研基地大棚内进行,采用土培盆栽试验。供试土壤为没有发生过根结线虫病害的红壤土加基质土,前作为花生,土壤肥力水平中等。晾干后,121℃ 高压灭菌 120 min,备用(宋亚娜和林智敏 2003)。试验盆高 28~30 cm,内径 24~25 cm,每盆填充混合均匀的土壤 12 kg。10 月 1 日移栽,每盆栽烟苗 1 株。每盆均施烟草专用复合肥 25 g,其他栽培措施与大田栽培相同。共 10 个处理:4 个拮抗菌菌株处理(H1 菌体、H3 菌体、K6 菌体、Y12 菌体)、4 个发酵液处理(H1 菌液、H3 菌液、K6 菌液、Y12 菌液)、1 个阿维菌素处理和 1 个空白对照,每个处理 8 盆。移栽后第 2 天每盆分别加入根结线虫卵、二龄幼虫悬液 50 ml(每毫升约有二龄幼虫 100 条),每盆浇无菌水 200 ml。3 h 后灌根,按不同的处理每盆分别灌入生防拮抗菌液 20

ml,生防菌菌体 20 ml(浓度为  $1 \times 10^8$  CFU · ml<sup>-1</sup>),2% EC 阿维菌素 1 ml,稀释 200 倍,每株灌液 20 ml,空白对照灌入清水 20 ml。3 个月后调查病情指数,分级并记录结果。并于灌根 35 d 后进行形态指标的测定,于 9:00—11:00 时取倒数第 2 片展开的功能叶进行各项生理生化指标测定,每个指标重复测定 3 次。

1.4 测定项目和方法

1.4.1 病情分级 移栽 3 个月后,每个处理随机取 6 株烟草根系,用自来水冲洗干净。按 5 级分级法(方中达 1996)进行根结线虫分级:0 级,无根结;1 级,有少数根结,占全根系的 1%~20%;2 级,根系根结数量中等,占全根系的 21%~40%;3 级,根系根结数量很多,占全根系的 41%~60%;4 级,根系根结数量很多,占全根系的 61%~80%;5 级,根系根结数量很多,占全根系的 81%~100%。

病情指数 =  $\sum(\text{级数} \times \text{同级株数}) / (\text{总株数} \times 4) \times 100$

防效 =  $(\text{空白病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{空白病情指数} \times 100\%$

1.4.2 生理生化指标测定 根系活力、叶绿素、丙二醛、游离脯氨酸的测定参照郝再彬(2004)的植物生理实验的方法。

1.5 数据处理

病情指数和防效分析用 EXCEL 计算,形态指标和生理生化指标显著性用 LSD 法,处理软件 DPS v7.05。

2 结果与分析

2.1 根结线虫侵害病情指数

从表 1 可以看出,所有处理对根结线虫均有一定的防治效果。对比成熟药剂阿维菌素,H3 菌液处理的病情指数低于阿维菌素处理,H1 菌液处理的病情指数与成熟药剂阿维菌素处理效果一致。细菌发

表 1 不同处理根结线虫病情指数及防效分析  
Tab.1 Effects of different treatments on root-knot nematodes disease index and control effect of tobacco

处理	病情指数	防效 (%)	处理	病情指数	防效 (%)
CK 空白	50.00		H3 菌液	4.16	91.68
CK 阿维菌素	8.33	83.34	K6 菌体	33.30	33.40
H1 菌体	25.00	50.00	K6 菌液	16.67	66.66
H1 菌液	8.33	83.34	Y12 菌体	25.00	50.00
H3 菌体	41.67	16.66	Y12 菌液	41.67	6.66

表 2 不同处理对烟草形态指标的影响

Tab.2 Effects of different treatments on morphological indices of tobacco plants

处理	株高 ( cm )	叶长 ( cm )	茎围 ( cm )	鲜质量 ( g )
CK 空白对照	34.4 ± 0.8 c	38.7 ± 3.1 de	3.47 ± 0.25 e	96.9 ± 11.1 e
CK 阿维菌素	32.0 ± 1.0 c	35.3 ± 1.5 e	3.17 ± 0.06 e	85.1 ± 10.1 e
H1 菌体	52.3 ± 5.5 a	43.0 ± 3.4 abc	4.93 ± 0.15 a	174.1 ± 12.2 a
H1 发酵液	50.3 ± 3.2 a	43.7 ± 2.0 ab	4.07 ± 0.15 d	134.1 ± 6.7 cd
H3 菌体	52.3 ± 1.5 a	39.0 ± 1.0 cde	4.23 ± 0.25 cd	169.4 ± 13.5 ab
H3 发酵液	45.8 ± 1.3 b	44.3 ± 4.0 a	4.43 ± 0.32 bc	182.4 ± 21.0 a
K6 菌体	52.3 ± 1.5 a	40.0 ± 2.1 bcd	4.10 ± 0.17 cd	124.2 ± 16.1 d
K6 发酵液	51.7 ± 2.1 a	39.0 ± 1.0 cde	4.16 ± 0.25 cd	150.9 ± 16.0 bc
Y12 菌体	53.6 ± 2.1 a	37.77 ± 1.9 de	4.30 ± 0.2 cd	135.8 ± 10.0 cd
Y12 发酵液	45.3 ± 2.1 b	39.2 ± 2.3 cde	4.77 ± 0.21 ab	175.8 ± 8.8 a

数值为平均值 ± 标准差 ,同列不同小写字母表示差异性显著。下同。

酵液对根结线虫的防治效果均比菌体的防治效果高 ,而放线菌 Y12 则相反。盆栽试验结果与实验室抑杀根结线虫二龄幼虫的实验结果基本吻合 ,H3 号发酵液的防治效果最好 ,达到 91.68% ,而放线菌的防治效果则较差 ,仅为 6.66%。

2.2 不同处理对烟草形态指标影响

从表 2 可知 ,灌入了发酵液和菌体的处理 ,烟草的株高、叶长、茎围和鲜质量均明显优于对照 ,可见 ,活性微生物在减轻烟草根结线虫病害同时 ,对烟草根系的发育以及整个植株地上部分生长都有明显的促进作用。对比同一菌体和发酵液对烟草形态指标的影响可知 ,菌体对烟草促生作用更明显 ,H1、H3 号菌体灌根处理的生长状况明显优于其他处理。但对根结线虫防治的病情指数 ,菌体的防治效果远不如发酵液 ,可能是发酵液的直接灌入 ,对根结线虫 2 龄幼虫有直接的触杀作用 ,而菌体的直接接触作用不明显。菌体长期存在于根际土壤 ,并少量进入烟草植株内部 ,对防治根结线虫和分泌某些生长激素

对烟草根系有促生作用 ,促使烟草的营养生长加快 ,根系生长好。对烟草形态指标形成最有利的 2 个菌株分别是 H1 菌体处理和 H3 发酵液处理。

2.3 不同处理对烟草生理生化指标的影响

根系活力是反映整个植物地下生长状况的指标 ,根结线虫的侵害会导致烟草根系活力降低。从表 3 可知 ,各处理间根系活力差异不大 ,H3 发酵液与对照间差异明显。

叶绿素是烟草地上部分反映根结线虫侵害的指标 ,联系病情指数 ,发病严重的 CK 空白、H1 菌体、Y12 菌液处理、K6 菌体处理叶绿素含量均显著低于其他处理。

丙二醛( MDA )是膜质氧化的产物 ,通常可以用 MDA 的含量衡量细胞膜的氧化程度和植物对逆境反应的强弱( 朱世东 ,1991 )。根结线虫可以对烟草细胞膜造成伤害 ,降低烟草对逆境的适应能力 ,促使植株早衰 ,烟草中丙二醛含量的规律同样符合病情指数的规律。

表 3 不同处理烟草根系活力、叶绿素含量、丙二醛及游离脯氨酸的变化

Tab.3 Changes of tobacco root vigor , and chlorophyll ,MDA and PRO contents under different treatments

处理	根系活力 ( mg · g <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> )	叶绿素含量 ( mg · g <sup>-1</sup> )	丙二醛 ( μmol · g <sup>-1</sup> FM )	脯氨酸 ( μg · g <sup>-1</sup> )
CK 空白	0.61 ± 0.14 b	0.12 ± 0.04 d	1.37 ± 0.35 a	0.23 ± 0.06 a
CK 阿维菌素	0.68 ± 0.16 b	0.26 ± 0.14 abc	1.38 ± 0.17 a	0.19 ± 0.08 ab
H1 菌体	0.62 ± 0.14 b	0.20 ± 0.04 cd	1.07 ± 0.25 abc	0.19 ± 0.06 ab
H1 菌液	0.58 ± 0.14 b	0.31 ± 0.01 ab	0.96 ± 0.23 abcd	0.17 ± 0.07 ab
H3 菌体	0.63 ± 0.16 b	0.17 ± 0.09 cd	1.27 ± 0.16 ab	0.16 ± 0.05 abc
H3 菌液	1.04 ± 0.34 a	0.34 ± 0.08 a	0.71 ± 0.08 cd	0.13 ± 0.05 abc
K6 菌体	0.87 ± 0.41 ab	0.19 ± 0.04 cd	0.74 ± 0.16 cd	0.07 ± 0.03 c
K6 菌液	0.75 ± 0.22 ab	0.20 ± 0.04 cd	0.81 ± 0.19 bcd	0.15 ± 0.08 abc
Y12 菌体	0.79 ± 0.08 ab	0.23 ± 0.06 bc	0.48 ± 0.83 d	0.19 ± 0.09 ab
Y12 菌液	0.56 ± 0.30 b	0.20 ± 0.04 cd	1.30 ± 0.35 ab	0.12 ± 0.05 bc

植物在胁迫条件下植物体内游离脯氨酸的增加可能与其合成受激化、氧化受抑制和蛋白质合成受阻有关,由于受到根结线虫的侵害,烟草中的游离脯氨酸就会有上升的趋势。空白对照中游离脯氨酸的含量最高,为  $0.23 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , K6 菌体最低,为  $0.07 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,其他几个处理间差异不明显。

### 3 讨论

内生细菌是植物体内的非致病性菌株,能够在植物体内很好的定殖并发挥一系列的生防及促生作用。通过试验,将大量的内生细菌灌根于烟草根系周围,非但没有对烟草植物的生长造成影响,在防治烟草根结线虫病害的同时,与阿维菌素处理相比,内生菌体和菌液灌根的处理烟草形态指标明显优于阿维菌素灌根的处理。陈雪丽等(2008)研究发现,蔬菜种类是决定根际微生物群落结构的主要因素,接种生防细菌对根际细菌群落结构影响不显著。因此,在烟草根际灌入菌体、菌液对烟草根际本身的细菌群落结构不大,烟草表现出的对根结线虫的防治及对烟草的促生作用与灌根处理有直接的影响。充分说明,有益微生物能有效的防治植物病害的同时,促进植物的生长发育,起到了刺激生长和生物药剂的双重作用。

内生菌与宿主植物之间只形成不太明显的共生或伴生关系,能产生与宿主相似,甚至相同的活性成分(Stinson 2003),在病原感染后能诱导木质素和植保素等产生,在植物抗病中起到了重要的作用(李凡等 2001)。本试验结果显示,H3号菌株的发酵液能有效的防治烟草根结线虫病害,在盆栽试验中,病情指数仅为4.16,防效达91.68%,明显优于空白,与阿维菌素处理效果相当;而H3号菌株的发酵液处理的烟草在株高、叶长、茎围、鲜质量等方面明显占优,且烟株根系发达,叶色正常,其他理化指标更优。H3号内生细菌发酵液能有效的杀死根结线虫二龄幼虫,抑制并减少根结线虫的侵入,使移栽的烟苗能迅速返苗,增强烟株的抗性,并防止根结线虫侵染。从已有的研究结果(黄晓辉等 2008)来看,从放线菌中筛选各种具有生防效果的菌株的几率较大和防治效果较好,本研究从烟草中筛选的内生放线菌数量有限,没有找到防治效果很好的放线菌菌株。试验还分别设置了菌体、发酵液和灌根3种处理,通过试验结果分析,内生细菌发酵液防治线虫病害效果较好,而内生菌菌体的促生作用似乎更明显,

如设置菌体加发酵液同时灌根的效果是否会在防治线虫病害和促生之间达到一个更好的平衡,有待进一步的探索。

### 参考文献

- 宾淑英,刘展眉. 1999. 花生根结线虫对节瓜苗期植株生长及主要生理特性的影响. 仲恺农业技术学院学报, 12(3):7-10.
- 陈雪丽,王光华,金剑,等. 2008. 两株芽孢杆菌对黄瓜和番茄根际土壤微生物群落结构影响. 生态学杂志, 27(11):1895-1900.
- 段玉玺,吴刚. 2002. 植物线虫病害防治. 北京:中国农业出版社.
- 方中达. 1996. 植病研究方法. 北京:中国农业出版社.
- 郭衍银,王秀峰,徐坤,等. 2005. 生姜对南方根结线虫侵染的生理生化反应. 植物病理学报, 35(1):49-54.
- 郝玉金,翟衡,王寿华. 1999. 山定子感染南京毛刺线虫线虫后几种生理生化物质的变化. 植物病理学报, 29(1):82-85.
- 郝再彬. 2004. 植物生理实验. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社.
- 贺文婷,彭德良. 2007. 植物对线虫胁迫的生理生化响应机制. 植物保护, 33(2):11-15.
- 胡汝晓,李珊,谭周进,等. 2008. 鱼腥草内生微生物的分布特征初探. 生物技术通报, (2):155-157.
- 黄晓辉,李珊,谭周进,等. 2008. 植物内生放线菌研究进展. 生物技术通报, (1):42-46.
- 雷丽萍. 2007. 烟草内生芽孢杆菌降低烟叶亚硝胺类物质含量的研究. 西南农业大学学报, 20(3):515-519.
- 李凡,周雪平,陈海如. 2001. 病毒的侵染策略和植物的防卫反策略. 微生物学通报, 28(3):83-87.
- 刘维志. 2000. 植物病原线虫学. 北京:中国农业出版社.
- 宋亚娜,林智敏. 2003. 生防菌 BC2000 对番茄根结线虫的生防研究. 福建农业学报, 1(1):18-24.
- 王静,石金开,朱贤朝,等. 2001. 烟草品种资源对根结线虫病抗病性鉴定研究. 沈阳农业大学学报, (3):183-185.
- 张波,戴传超,方芳,等. 2009. 三种内生真菌对茅苍术的生长及主要挥发油成分的影响. 生态学杂志, 28(4):704-709.
- 朱世东. 1991. 茄果类幼苗低温伤害与膜脂过氧化作用. 安徽农学院学报, 18(2):141-146.
- Stinson M, Ezra D, Strobel G. 2003. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Science*, 165:913-922.
- Sturz AV, Christie BR, Nowak J. 2000. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19:1-30.

作者简介 杨友才,男,1969年生,博士,副教授。主要从事烟草栽培与生态方面的研究,发表论文16篇。E-mail: yangyc163@163.com  
责任编辑 魏中青