

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.04.028

四川传统烟区烤烟叶面可培养 细菌的遗传多样性分析

白燕¹, 冯文龙², 张宗锦², 邓黎雨¹,
李斌³, 顾勇⁴, 陈强¹, 张小平¹, 辜运富¹

(1. 四川农业大学资源学院, 成都 611130; 2. 四川省烟草公司攀枝花市公司, 攀枝花 617026;
3. 中国烟草总公司四川省公司, 成都 610017; 4. 四川省烟草公司泸州市烟草公司, 泸州 646000)

摘要: 为认识烤烟(Flue-cured tobaccos)叶面可培养细菌的多样性, 挖掘叶面可培养细菌资源. 本研究以四川省各传统烟区旺长期烤烟叶片为材料, 通过纯培养法及测定菌株的产吲哚乙酸(IAA)能力、溶磷溶钾特性、纤维素降解活性、拮抗病原菌等, 并通过反转录重复因子扩增(BOXA1R-PCR)技术、16S rRNA 基因测序和系统发育分析研究叶面可培养细菌的遗传多样性和功能特征. 结果表明: 分离得到的 86 株叶面细菌中有 12 株菌株(占总分离菌株的 13.95%)具有产 IAA 的能力, 4 株产量较高($>57 \mu\text{g}/\text{mL}$); 有 9 株(占总分离菌株的 10.47%)表现溶磷活性, 8 株(占总分离菌株的 9.30%)表现溶钾活性. 基于 BOXA1R-PCR 图谱选取 12 株代表菌株进行 16S rRNA 基因序列测定, 系统发育分析显示, 86 株菌株分别属于节杆菌属(*Arthrobacter*)、短小芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*), 其中以假单胞菌属(*Pseudomonas*)为优势菌属. 表明四川传统烟区烤烟叶面存在着丰富的细菌资源.

关键词: 烤烟; 叶面细菌; 16S rRNA 基因; 系统发育

中图分类号: S182 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2019)04-0758-07

Diversity of cultural phyllospheric bacteria in main tobacco cultivating areas Sichuan province

BAI Yan¹, FENG Wen-Long², ZHANG Zongji-Jin², DENG Li-Yu¹, LI Bin³,
GU Yong⁴, CHEN Qiang¹, GU Yun-Fu¹

(1. Department of Microbiology, College of Resource, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;
2. Panzhihua Branch, Sichuan Tobacco Company, Panzhihua 617026, China;
3. China National Tobacco Corporation, Chengdu 610017, China;
4. Luzhou Branch, Sichuan Tobacco Company, Luzhou 646000, China)

Abstract: To study the diversity of phyllospheric bacteria cultured in flue-cured tobacco leaves, and explore the resource of phyllospheric bacteria, this research collected flue-cured tobacco leaves in their fast-growing stage from different traditional cultivation areas of Sichuan province, China. Phyllospheric bacteria strains were isolated by pure culture method, and their genetic diversity and functional charac-

收稿日期: 2018-08-13

基金项目: 四川省烟草公司攀枝花市分公司项目(PZH2019003); 中国烟草总公司四川分公司重点科技项目(SCYC201504)

作者简介: 白燕(1995-), 女, 云南昭通市人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物资源的筛选利用. E-mail: 1049604349@qq.com

通讯作者: 辜运富. E-mail: guyf@sicau.edu.cn

teristics were studied via determination of strains of indole-3-acetic acid (IAA) production ability, phosphorus and potassium solubilizing activities, cellulose degradation activity and antibacterial ability, as well as by transcription factor amplification technology (BOXA1R-PCR), 16S rRNA gene sequencing and phylogeny analysis. The results showed that among the 86 isolates, 13.95% (12/86) of the strains had the ability to produce IAA, 4 of them had a higher yield ($>57\mu\text{g/mL}$); 10.47% (9/86) had phosphate solubilizing activities; 9.30% (8/86) showed solubilizing potassium activities. Based on the BOXA1R-PCR patterns, 12 representative strains were selected for 16S rRNA gene sequencing. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequencing showed that the isolates belonged to *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, and *Pseudomona*, in which *Pseudomona* was the dominant genus. All results indicated that abundant culturable phyllospheric bacteria existed in flue-cured tobacco leaves in traditional tobacco areas in Sichuan province.

Keywords: Flue-cured tobacco; Phyllospheric bacteria; Biodiversity; 16S rRNA gene

1 引言

植物叶面是微生物栖居的重要微域生境,大量的细菌、放线菌、真菌和病毒等微生物群体均生活在叶面环境中^[1].叶面为微生物生存提供了巨大的面积,使得生活在叶面的微生物数量也很惊人,微生物通过附着或寄生的方式定殖于叶际称为“叶面微生物”,它们主要依靠叶片的分泌物及外渗物质如碳水化合物、氨基酸、矿物质等维持生存^[2,3].叶面微生物以细菌为主,其中优势菌群以好氧细菌占主导地位,如假单胞菌属(*Pseudomonadaceae*)和欧文氏杆菌(*Erwinia*)属是常见种类.此外,常见的类群还有芽孢杆菌属(*Bacillus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)等^[2].研究表明,叶面微生物的类群和数量对调控宿主植物的生长、代谢及防治病虫害等具有重要作用^[2].其中,细菌是叶面环境中最主要的微生物类群,对叶面细菌进行充分利用有助于促进植物生长、减少化肥和农药投入,实现农业的可持续发展^[4].叶际微生物具有固氮、产生促进植物生长的物质、抑制病原微生物等多种功能^[5].Koenig 和 Doronina 等人从不同作物叶面分离的粉色色素兼性甲基营养菌、假单胞菌和分枝杆菌等能够促进植物的生长^[6,7].Kasfi 等从葡萄叶面分离的真菌和细菌均能拮抗病原菌^[8].这表明叶面微生物对于促进植物生长、降低植物病虫害具有重要作用^[2].

近年来,由于不合理的耕作措施及施肥制度等造成植烟土壤质量下降、环境污染形势严峻,进而导致烤烟病虫害发生频率增加,极大地制约了烤烟的品质和经济效益.微生物杀虫剂是生物防治中较为有效的新型生物农药,采用生态方法固定空气中

的氮气,溶解土壤中不能被植物直接吸收的磷素,释放硅酸盐矿物中的钾素,促进植物生长,减少农药和化肥使用是生态农业发展的有效途径之一^[9,10].研究表明对植物生长具有促进作用,对病害具有拮抗作用的微生物多数是从叶围、根际等外部环境分离得到的附生细菌^[11].植物叶际微生物多样性及其潜在应用价值是目前植物-微生物关系研究的热点之一.赵铭钦等通过 PCR-DGGE 技术表明陈化烤烟叶面优势菌对烤烟具有明显的增香效应^[12].Romero 等研究表明,番茄叶面细菌能够拮抗病原菌并促进植物生长,可作为生物控制剂、生物抑制剂或生物刺激剂促进番茄植株生长^[13].综上所述,叶面微生物对促进植物生长、提升品质具有良好的作用.烤烟叶片面积较大,其上定居的微生物资源也更丰富^[18].因此,分离烤烟叶面具有“抗病促生”功能的细菌菌株、挖掘功能菌株的多样性并将其应用于农业生产,对于提高作物产量、降低作物发病率及农业的可持续发展具有重要意义.

本研究通过纯培养手段、重复因子扩增(BOX-PCR)分析技术、16S rRNA 基因测序和系统发育分析等方法对烤烟叶面细菌进行了分离鉴定及遗传多样性分析,以期揭示烤烟叶面可培养细菌的多样性特征,旨在为丰富叶面细菌菌种资源库和开发具有抗病促生功能的微生物菌剂应用于农业生产提供理论参考和依据.

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 试验地概况 攀枝花市年均气温 20℃,降水充沛且多为夜雨,日照充足.攀枝花是四川省优

质烤烟产区之一,主要集中在仁和区和米易县。广元市和泸州市均属于亚热带湿润气候,气温较高,日照充足,雨量充沛,四季分明,无霜期长,季风气候明显。本次样品取自米易县平地乡(101°57′0.64″E、26°57′4.70″N),广元市元坝乡(105°57′33.45″E、32°19′32.11″N),泸州市古蔺县箭竹乡(105°36′45.86″E、28°02′15.97″N)。取样点为植烟时间 10 年以上,且烟草质量、产量都较高的种植区。

2.1.2 试验材料 2016 年 7 月到 8 月,于攀枝花米易县平地乡、泸州市古蔺县箭竹乡和广元市元坝乡等四川传统烤烟种植区采集旺长期烤烟中下部叶片,品种均为云烟 87。在田间按“五点法”采集长势相近的烤烟叶片,每点 10 株,每株 5 叶,共 50 片烟叶,记录采样时烤烟的农艺性状。用无菌袋密封带回,放于冰箱中保存备用。将叶片装入没有拆封的保鲜袋中,贴上标签并封口,置于 4℃ 保温箱中迅速带回实验室。

2.1.3 培养基 叶面细菌分离用牛肉膏蛋白胨培养基、天门冬酰胺培养基、高氏一号培养基、溶钾能力测定用溶钾筛选培养基^[14]、溶磷能力测定用溶磷筛选培养基^[15]、解纤维素能力测定用刚果红培养基^[16]。

2.1.4 指示菌株 稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae* Cav)、玉米纹枯病菌(*Maize rhizoctoniasolani*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 4 种病原菌由四川农业大学植物病理室及微生物室提供。

2.2 试验方法

2.2.1 菌株分离 无菌条件下,用打孔器在烟草叶片上中下主脉两边对称位置打孔,每片烟叶取六份样品,用印象法^[3]接种于不同细菌培养基上。28℃ 倒置培养 3~4 d,当样品周围明显长出菌落时,用接种环挑取不同形态的菌落,采用平板划线分离法,根据叶面细菌的菌落形态特征,挑取明显分开的单菌落,如有几种不同形态的单菌落同时存在,则分别挑取到平板培养基上,进行划线分离直至获得纯培养。将分离纯化后的纯菌挑取到斜面上,待斜面培养物长出后,将斜面放置 4℃ 保藏。

2.2.2 分泌吲哚乙酸 (IAA) 特性测定 采用 Salkowski 比色法^[17]测定分离菌株分泌 IAA 能力。取培养到对数期的菌液 50 μL 于含 0.5 g/L 色氨酸的牛肉膏液体培养基中,重复 3 次,28℃, 140 r/min 培养到对数期(36 h),每支试管取 50 μL 菌

液于洗净自瓷板中,加入 100 μL Salkowski 显色剂,25℃ 下避光 30 min,如出现粉红色,表明产生 IAA。定量测定上述分泌吲哚乙酸分离菌株的 IAA 产量。8000 r/min 离心 5 min 获得培养物上清液 2 mL,加入 4 mL Salkowski 显色剂,25℃ 下避光 30 min 后,530 nm 下比色测定其吸光度 OD 值,重复 3 次。以空白培养基作对照,并以 IAA 的标准样品制作标准曲线,计算 IAA 的产量(mg/L)=(OD 值-固定值 B)/系数 K。

2.2.3 溶磷溶钾特性测定 为评价分离菌株的应用潜力,采用培养基溶解圈法测定菌株的溶磷溶钾特性^[14,15]。将分离菌株点接于筛选培养基上,28℃ 培养 7d,观察接种菌株周围有无透明溶解圈形成。测定溶解圈直径,计算 HD/CD 值(其中 HD 为透明圈直径,CD 为菌落直径)来表征溶磷溶钾能力。每个菌株重复 4 次。

2.2.4 纤维素降解能力测定 用培养基溶解圈法测定菌株的分泌纤维素特性^[16]。将分离菌株点接于刚果红选择培养基上,28℃ 培养 7d,观察接种菌株周围有无透明溶解圈形成。测定溶解圈直径,计算 HD/CD 值(其中 HD 为透明圈直径,CD 为菌落直径)来表征纤维素降解能力。每个菌株重复 4 次。

2.2.5 抗病活性测定 采用平板对峙培养基法^[18],在平板中央接种直径大约为 0.5 cm 的病原菌,再将分离到的细菌点接在距病原细菌 2 cm 处的 6 个点上,倒置于 28℃ 培养箱培养 7d,选出对病原菌生长有抑制作用的菌株进行复筛。每株 4 次重复,记录并保存。

2.2.6 DNA 提取及 BOX-PCR 分析 将菌株活化后接种于牛肉膏蛋白胨固体培养基上,28℃ 培养 2d,挑取单菌落采用硅藻土提取 DNA^[17],然后用 1% 琼脂糖凝胶检测,-20℃ 保存。选取 BOX 引物(5′-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3′)进行 PCR 扩增^[19]。体系:2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL,引物(10 μmol/L) 0.5 μL,模板 DNA(10 μg/mL) 1 μL,加 ddH₂O 补齐至 25 μL。PCR 反应条件:95℃ 4 min; 95℃ 1 min,55℃ 1 min,65℃ 8 min,共 35 个循环;65℃ 16 min。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。将 BOXA1R-PCR 图谱中同一位置有条带的记为“1”,无条带的记为“0”。采用软件 NTSYSpc 2.1 中的平均连锁聚类法((UPGMA)进行聚类分析并获得树状图谱。

2.2.7 16S rRNA 基因测序及系统发育树构建 基于菌落特征、溶磷溶钾能力和 IAA 产量、纤维素

降解能力以及 BOX-PCR 遗传分析结果,选取代表菌株以引物 1492r (5'-TACGG(C/T)TACCTT-GTTAC GACTT-3') 和 25f (5'-AACTAA-GAGTTTGATCCTGGCTC-3') 进行 16S rRNA 基因片段的扩增。PCR 反应体系:2×Taq PCR Master Mix 25 μ L,引物(10 mol/L)各 0.5 μ L,模板 DNA (10 mg/L) 1 μ L,加 ddH₂O 补齐至 50 μ L。PCR 反应条件:94℃ 5 min; 94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 2 min,共 35 个循环;72℃ 12 min。扩增产物送至天津擎科生物有限公司进行测序。将所得序列通过 NCBI 的 BLAST 工具进行比对,然后用 MEGA 5.0 软件采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树。

3 结果与分析

3.1 烤烟叶面细菌的分离与筛选

本次试验中,从四川三个主要烟区烤烟叶面分离得到叶面细菌共 86 株,编号为 SCAU-1~SCAU-86。不同烟区烤烟叶面可培养细菌的分离

数量差异较大,从广元烟区的烟叶分离得到 42 株叶面细菌,占总分离菌株的 48.84%;其次从攀枝花烟叶分离得到 31 株叶面细菌,占总分离菌株的 36.05%;而泸州烟叶分离得到的叶面菌株最少,共 13 株,占分离菌株总数的 15.12%。

3.2 叶面细菌促生性能的测定

通过对分离的菌株定性筛选,得到了 12 株具有产 IAA 和溶磷溶钾能力的菌株,各种菌株溶磷溶钾、促生作用的测定结果见表 1。具有产 IAA 能力的菌株占总分离菌株的 13.95%,其中有 4 株菌株产 IAA 量较高(>57 μ g/mL)。分离得到 5 株菌株具有较强的溶磷活性(HD/CD \geq 2.0),9 株具有较强的溶钾活性(HD/CD \geq 2.0),分别占总分离菌株的 5.81%和 10.46%。其中菌株 SCAU-4, SCAU-23, SCAU-41 和 SCAU-42 同时具有较高的溶磷、溶钾和产 IAA 能力。分离的菌株中共有 8 株细菌具有降解纤维素的能力,其中 SCAU-4 和 SCAU-23 具有较高的纤维素降解能力(HD/CD > 5)。

表 1 叶面细菌产 IAA、溶磷溶钾及纤维素降解性能测定

Tab. 1 The abilities of IAA production, phosphate and potassium solubilizing and degraded cellulose of phylloplane bacteria

菌株编号 Strain code	IAA 产量 IAA production activities(μ g/mL)	HD/CD		
		溶磷特性(cm) Phosphate solubilizing(cm)	溶钾特性(cm) Potassium solubilizing(cm)	纤维素降解能力(cm) Cellulase production(cm)
SCAU-1	47.35	1.0	2.0	4.93
SCAU-4	61.65	2.5	3.0	5.75
SCAU-7	47.00	1.0	1.5	4.3
SCAU-9	46.35	1.0	2.0	3.36
SCAU-10	50.57	2.0	1.0	Nd
SCAU-11	47.03	1.0	1.0	Nd
SCAU-13	52.54	1.0	2.0	3.16
SCAU-23	60.82	2.0	3.0	6.25
SCAU-26	52.38	1.0	2.0	Nd
SCAU-29	48.09	1.0	2.0	Nd
SCAU-41	59.36	3.0	2.5	4.86
SCAU-42	57.47	2.5	2.0	3.83

注:Nd:未测定出;HD:透明圈直径;CD:菌落直径。

Note: Nd: Not detected; HD: Transparent circle diameter; CD: Colony diameter.

3.3 叶面细菌对植物病原菌拮抗性能的测定

如表 2 所示,对分离到的 86 株烟叶叶面细菌的抗菌效果表明:分离菌株对供试病原真菌均不表现出拮抗特点。而有 6 株菌株对供试病原细菌表现出拮抗作用,其中有 4 株对大肠杆菌具有拮抗作用,其中 SCAU-26 的抑菌圈半径为 0.9 cm, SCAU-23 的抑菌圈半径为 1.2 cm, SCAU-42 的抑菌圈半径为 1.4 cm, SCAU-4 的抑菌圈半径为 1.5 cm。另外有 2 个菌株对金黄色葡萄球菌有拮抗作

用,其中 SCAU-13 的抑菌圈半径 1.0 cm, SCAU-41 的抑菌圈半径 1.3 cm。

3.4 BOXA1R-PCR 分析与系统发育分析

为认识烤烟叶面细菌的遗传多样性,以 BOXA1R 引物对供试细菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增,遗传图谱类型见表 3,86 株菌被分成 12 种不同的遗传图谱类型。基于 BOXA1R 遗传图谱和菌落特征,选取 12 株代表菌株进行 16S rRNA 基因片段测序,长度约 1500 bp。所得序列提交 NCBI 数

数据库,用 ClustalX 软件进行多序列比对,MEGA 5.0 软件构建系统发育树(图 1),结果表明,代表菌

表 2 叶面细菌拮抗病原菌特性

Tab. 2 Disease resistance activity of phylloplane bacteria

菌株编号 Strain code	抗菌特性(cm)Disease resistance(cm)
SCAU-1	Nd
SCAU-4	1.5
SCAU-7	Nd
SCAU-9	Nd
SCAU-10	Nd
SCAU-11	Nd
SCAU-13	1
SCAU-23	1.2
SCAU-26	0.9
SCAU-29	Nd
SCAU-41	1.3
SCAU-42	1.4

株分为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌,以革兰氏阴性菌为主.其中,革兰氏阳性菌包括 *Arthrobacter*, *Bacillus* 和 *Lysinibacillus* 等 3 个属,共 3 株菌,占代表菌株的 25.00%,其中 SCAU-1 与 *Arthrobacter* (KM035405) 的系统发育相似性为 99%,SCAU-9 与 *Bacillus licheniformis* (KP859547.1) 系统发育相似性为 99%,SCAU-29 与 *Lysinibacillus fusiiformis* (KX713168.1) 系统发育相似性为 99%.革兰氏阴性菌有 9 株,占代表菌株的 75.00%,分属于 *Stenotrophomonas*, *Achromobacter* 和 *Pseudomonas* 等 3 个属. SCAU-23 与 *Stenotrophomonas* 属的 *Stenotrophomonas* (KC997228), SCAU-41 与 *Achromobacter* 属的 *Achromobacter marplatensis* (KF876913) 相似性为 98%,其余菌株相似性均为 99%.

表 3 叶面细菌代表菌株的遗传鉴定结果

Tab. 3 Identification of the representative phylloplane bacteria strains from tobacco leaves

种 属	代表菌株	谱带类型	16S rRNA 基因比对分析近缘菌株	相似性(%)
<i>Arthrobacter</i>	SCAU-1(MH498427)	5(12)	<i>Arthrobacter</i> (KM035405)	100
<i>Pseudomonas</i>	SCAU-7(MH498428)	12(15)	<i>Pseudomonas</i> (HG764636)	99
	SCAU-42(MH498424)	9(12)	<i>Pseudomonas</i> (KJ534480)	99
	SCAU-4(MH498425)	1(5)	<i>Pseudomonas</i> (JN559867)	99
	SCAU-13(MH498426)	10(11)	<i>Pseudomonas</i> (MF347446)	99
<i>Stenotrophomonas</i>	SCAU-11(MH498431)	6(2)	<i>Stenotrophomonas</i> (JX646652)	99
	SCAU-23(MH498422)	4(13)	<i>Stenotrophomonas</i> (KC997228)	98
	SCAU-26(MH498429)	11(6)	<i>Stenotrophomonas</i> (JX646653)	99
<i>Bacillus</i>	SCAU-9(MH498430)	7(2)	<i>Bacillus licheniformis</i> (KP859547.1)	99
<i>Lysinibacillus</i>	SCAU-29(MH498432)	3(4)	<i>Lysinibacillus fusiiformis</i> (KX713168.1)	99
<i>Achromobacter</i>	SCAU-10(MH498421)	4(3)	<i>Achromobacter marplatensis</i> (KU240049.1)	99
	SCAU-41(MH498423)	5(1)	<i>Achromobacter marplatensis</i> (KF876913)	98

注:图谱类型根据 BOXA1R-PCR 扩增条带片段来划分.

Note: rRNA types were defined based upon the amplification fragment of BOXA1R-PCR.

4 讨 论

烟叶表面微生物与植物长期共同生存,形成独特的植物微生物生态体系.细菌是叶面环境中最主要的微生物类群^[20].研究表明,烟叶叶面细菌具有促进营养吸收、促进宿主产生植物激素类物质、增加抗病能力、防治病虫害、降低生产成本、减少环境污染等生态学作用,具有潜在的应用价值^[21-22].

由于叶面微环境受阳光、温度、风速以及降雨量等多种理化条件影响,从而不同环境下叶面微生物生长情况不同^[23].不同地区因环境情况不同,特别是叶际微环境的湿度、地势特征等对微生物群落

影响显著的作用因素不同,叶面细菌的定殖数量和种类就也不同,本文中不同地区烟叶分离出的叶面细菌数量与种类差异明显.本文共分离得菌株 86 株,其中从广元云 87 烟叶分离的叶面细菌 42 株,数量最多,并主要以节杆菌属(*Arthrobacter*)和寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)为优势菌种.其次从攀枝花烟叶分离到 31 株叶面菌,以芽孢杆菌(*Bacillus*)为优势菌种.泸州分离得到的 13 株菌株,其中主要以假单胞菌(*Pseudomonas*)为主.研究表明,假单胞菌广泛存在于植物中,能够抑制植物病原微生物的生长,对改善植物营养、促进植物生长具有很好的作用.

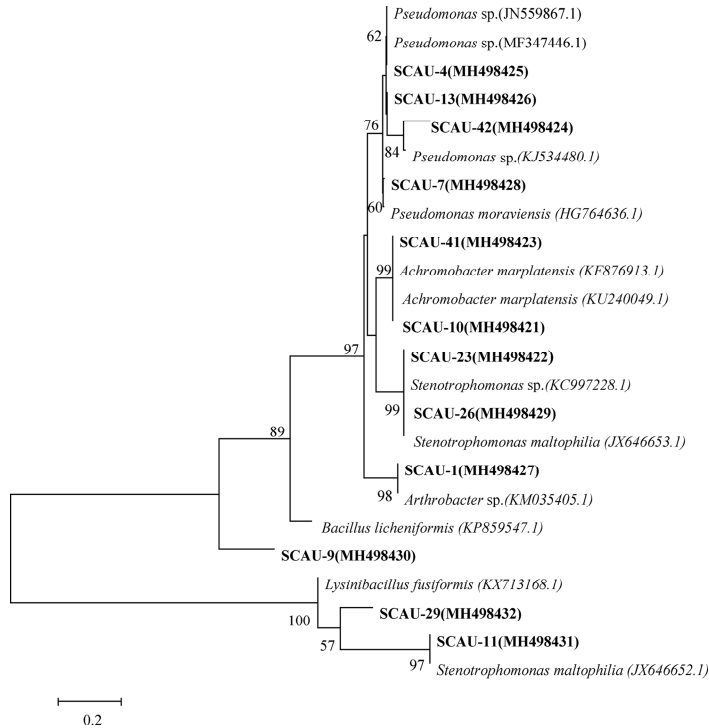


图 1 烤烟叶面细菌代表菌株 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

左下端标尺表示碱基置换频率, 括号中的序号表示序列查询号。外类群菌株为放线菌 (*Actinomycetes*) 及链霉菌 (*Streptomyces*)

Fig. 1 Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences of representative strains of the phylloplane bacteria

The scale of lower left means substitution frequency, numbers in brackets means query number of sequence information. The outer group strains are *Actinomycetes* and *Streptomyces*

氮、磷和钾是植物生长的必需营养元素, 在植物生长过程中具有重要的作用。化肥施用是植物获得有效磷、钾的重要途径, 但是施用过多的化肥对农业生产和环境反而不利, 以减少化肥使用是生态农业发展的重要途径^[10], 此外, 微生物通过分解转化纤维素类物质可以将其变为栽培基质和有机肥料等^[24]。可见筛选菌株资源的首要任务就是要充分了解菌株的各种促生能力。因此, 测定叶面细菌菌株的产 IAA、溶磷溶钾和纤维素降解特性是必不可少的。已有文献报道, 植物叶面细菌的充分利用有助于促进植物生长、减少化肥和农药投入, 实现农业的可持续发展^[3, 25]。倪红梅^[26]等研究表明, 晒烟与烤烟调制期间烟叶表面细菌种群较为丰富, 主要分布在芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*) 等 10 个属。本研究分离到的烟叶叶面细菌具有较强的溶磷溶钾特性和产 IAA 能力, 主要以假单胞菌 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*) 和寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas*) 为主。而这些菌株也普遍存在于植物根际, 具有较强的促生和抗病能力^[27], 可见本试验筛选得到的叶面促生菌与前人的研究结果殊途同归, 表明烤烟叶面促生菌在促进植物生长的

过程中具有重要作用, 将其应用于生产具有较高的潜在价值。

本次试验对烤烟烟叶进行了可培养叶面细菌多样性及功能特性分析, 获得的 86 株菌株可以划分为 12 种遗传图谱类型且分属于节杆菌属 (*Arthrobacter*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas*) 等, 其中以假单胞菌 (*Pseudomonadaceae*) 为优势类群, 表现出一定的遗传多样性。分离的菌株中有 12 株菌株 (占总分离菌株的 13.95%) 具有产 IAA 的能力, 4 株产量较高 ($>57 \mu\text{g}/\text{mL}$); 9 株 (占总分离菌株的 10.47%) 表现溶磷活性, 8 株 (占总分离菌株的 9.30%) 表现溶钾活性; 6 株菌株对供试病原细菌表现出明显拮抗效果, 具有潜在的应用价值。在后续研究中, 可以结合非培养手段 (如高通量测序技术) 对烤烟叶面可培养细菌的群落结构和多样性进行深入研究。

参考文献:

- [1] Lindow S E, Brandl M T. Microbiology of the phyllosphere [Review] [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 1875.
- [2] 施雯, 张汉波. 叶面微环境和微生物群落 [J]. 微生

- 物学报, 2007, 34: 761.
- [3] 王元格, 谭茂玉, 李金娥, 等. 转 Bt 基因抗虫棉叶面可培养微生物多样性的变化[J]. 应用生态学报, 2007, 18: 549.
- [4] 赵敏, 徐宸, 贾凌, 等. 烟草叶面细菌区系检测探针的设计及优化[J]. 中国烟草学报, 2016, 22: 87.
- [5] 孙泓, 李慧, 詹亚光, 等. 不同生境中桂花和夹竹桃叶际细菌的群落结构[J]. 应用生态学报, 2018, 29: 1653.
- [6] Koenig R L, Morris R O, Polacco J C. tRNA is the source of low-level trans-zeatin production in *Methylobacterium* spp. [J]. J Bacteriology, 2002, 184: 1832.
- [7] Doronina N V, Ivanova E G, Iua T. New evidence for the ability of methylobacteria and methanotrophs to synthesize auxins [J]. Mikrobiol, 2002, 71: 116.
- [8] Kasfi K, Taheri P, Jafarpour B, et al.. Characterization of antagonistic microorganisms against *Aspergillus* spp. from grapevine leaf and berry surfaces [J]. J Plant Pathol, 2018, 100: 179.
- [9] 查艳梅, 杨娜, 石佳杏, 等. 一株来自青藏高原土壤日本曲霉菌的分离鉴定及其杀东亚飞蝗活性研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2018, 55: 1307.
- [10] 黄智华, 崔永和, 计思贵, 等. 云南烤烟根际土壤 PGPR 菌株的筛选与鉴定[J]. 中国烟草科学, 2017, 38: 18.
- [11] 张成省, 孔凡玉, 李多川, 等. 烟草叶围细菌的分离及其对 *Alternaria alternata* 的拮抗作用[J]. 中国烟草学报, 2005, 11: 17.
- [12] 赵铭钦, 刘云, 李芳芳, 等. 陈化烤烟叶面优势菌的筛选鉴定与其增香效应[J]. 微生物学报, 2009, 49: 624.
- [13] Romero F M, Marina M, Pieckenstain F L. Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases [J]. Res Microbiol, 2016, 167: 222.
- [14] 周毅峰, 罗云霞, 刘华中. 解钾菌的筛选[J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2009, 27: 285.
- [15] 余贤美, 沈奇宾, 李炳龙, 等. 土壤解磷细菌分离和筛选方法的建立[J]. 热带作物学报, 2008, 29: 321.
- [16] 史同瑞, 刘宇, 王岩, 等. 产纤维素酶真菌的筛选与鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42: 2794.
- [17] 攀枝花地区烤烟可培养内生固氮菌的多样性[J]. 微生物学通报, 2017: 428.
- [18] 黄蓉. 防治草莓灰霉病酵母菌株筛选及防病机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [19] Naik PR, Raman G, Narayanan K B, et al. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing Fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil [J]. BMC Microbiol, 2008, 8: 230.
- [20] 邢颖, 张莘, 郝志鹏, 等. 烟草内生菌资源及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42: 411.
- [21] 高爽, 刘笑尘, 董铮, 等. 叶际微生物及其与外界互作研究进展[J]. 植物科学学报, 2016, 34: 654.
- [22] Press C M, Wilson M, Tuzun S, et al.. Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2007, 10: 761.
- [23] 杜佳, 张晓娟, 吴钢, 等. 雪茄茄衣人工发酵过程中叶面微生物区系研究[J]. 生物技术进展, 2016, 6: 188.
- [24] 贾辉, 陈秀蓉, 芦光新, 等. 纤维素降解细菌的筛选、生物学特性及降解效果[J]. 草业学报, 2016, 25: 60.
- [25] 潘建刚, 呼庆, 齐鸿雁, 等. 叶际微生物研究进展[J]. 生态学报, 2011, 31: 583.
- [26] 倪红梅, 李雪梅, 谢丽华, 等. 晒黄烟调制期叶面可培养细菌的多样性研究[J]. 中国烟草学报, 2015, 21: 95.
- [27] 罗菲, 汪涯, 曾庆桂, 等. 东乡野生稻根际可培养细菌多样性及其植物促生活性分析[J]. 生物多样性, 2011, 19: 476.

引用本文格式:

中文: 白燕, 冯文龙, 张宗绵, 等. 四川传统烟区烤烟叶面可培养细菌的遗传多样性分析[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2019, 56: 758.

英文: Bai Y, Feng W L, Zhang Z J, et al. Diversity of cultural phyllospheric bacteria in main tobacco cultivating areas Sichuan province [J]. Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2019, 56: 758.