

## 枯草芽孢杆菌 RSS-1R 菌株在油菜植株和土壤中的定殖以及对微生物种群数量的影响

代玉立<sup>1,2</sup>, 潘月敏<sup>1</sup>, 樊淼<sup>1</sup>, 甘林<sup>2</sup>, 杨秀娟<sup>2</sup>, 陈福如<sup>2</sup>, 高智谋<sup>1\*</sup>

(1. 安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036;

2. 福建省农业科学院植物保护研究所福建省作物有害生物监测与治理重点实验室, 福州 350013)

**摘要:** 通过双抗药性标记法(抗利福平和硫酸链霉素)和扫描电子显微镜观察法研究了枯草芽孢杆菌 RSS-1R 菌株在油菜植株和根际土壤的定殖。结果表明, 喷雾处理后 2~6 d 内, 油菜植株上 RSS-1R 菌株的平均菌量从  $3.67 \times 10^5$  cfu·g<sup>-1</sup> 鲜组织下降到  $1.00 \times 10^3$  cfu·g<sup>-1</sup> 鲜组织; 到处理后 10 d, 油菜植株上即检测不到 RSS-1R 菌株; 喷雾处理 30 d 内, 油菜根际土壤中菌株 RSS-1R 种群数量呈现出先上升后下降的趋势。灌根处理后, 菌株 RSS-1R 可在油菜根际土壤中稳定定殖 30 d 以上, 且其种群数量无显著变化。同时研究了 RSS-1R 菌株对油菜周围微生物种群数量的影响。结果表明, 喷雾处理 2~10 d 后, 油菜植株上的细菌种群数量由  $6.30 \times 10^6$  cfu·g<sup>-1</sup> 湿土下降到  $3.00 \times 10^5$  cfu·g<sup>-1</sup> 湿土, 处理后 10 d, 油菜植株上的细菌种群数量恢复到对照水平。喷雾处理 10 d 内油菜根际土壤中的细菌种群数量与对照差异不显著, 但是处理后 20 d, 油菜根际土壤中的细菌种群菌量显著增加。灌根处理后, 油菜根际土壤中的细菌种群数量呈现出先增加后下降的趋势, 处理后 30 d, 油菜根际土壤中的细菌种群数量恢复到对照水平。无论是喷雾还是灌根处理均不影响油菜植株或根际土壤中的真菌和放线菌的种群数量。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; 微生物种群; 定殖; 抗生素; 油菜

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)04-0709-07

### Colonization of *Bacillus subtilis* strain RSS-1R on rapeseed plants and in rhizospheric soil and its influence on the quantity of microbial population around rapeseed plants

DAI Yuli<sup>1,2</sup>, PAN Yuemin<sup>1</sup>, FAN Miao<sup>1</sup>, GAN Lin<sup>2</sup>, YANG Xiujuan<sup>2</sup>, CHEN Furu<sup>2</sup>, GAO Zhimou<sup>1</sup>

(1. School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Fujian Key Laboratory for Monitoring and Integrated Management of Crop Pests, Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013)

**Abstract:** The double resistance labeling technique (Rifampicin and Streptomycin) and scanning electron microscope observation were adopted to investigate the colonization of *Bacillus subtilis* strain RSS-1R on rapeseed plants and in the rhizospheric soil. The results indicated that RSS-1R population on rapeseed plants significantly decreased after spraying of RSS-1R suspension, which was reduced from  $3.67 \times 10^5$  cfu·g<sup>-1</sup> fresh tissue at 2 days post-inoculation (dpi) to  $1.00 \times 10^3$  cfu·g<sup>-1</sup> fresh tissue at 6 dpi. RSS-1R was not detected on rapeseed plants since 10 dpi; whereas, the RSS-1R population showed a tendency of increase first and then decrease in the rhizospheric soil during the period of 30 dpi. RSS-1R could stably colonize at least 30 d in the rhizospheric soil without significant change of the population after the treatment of irrigating root. The quantity of microbial population on rapeseed plants and in the rhizospheric soil was also analyzed in this study. The results showed that the quantity of bacteria on rapeseed plants was obviously decreased after spraying with RSS-1R suspension, which was reduced from  $6.30 \times 10^6$  cfu·g<sup>-1</sup> wet soil at 2 dpi to  $3.00 \times 10^5$  cfu·g<sup>-1</sup> wet soil at 10 dpi, and then the bacteria

收稿日期: 2017-02-08

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201103016), 福建省自然科学基金(2016J05073), 福建省农业科学院博士启动基金(2015BS-4), 福建省农业科学院科技英才百人计划(2016YC-4)和安徽省现代产业(油棉)体系专项经费(11008751)共同资助。

作者简介: 代玉立, 博士, 助理研究员。E-mail: dai841225@126.com

\* 通信作者: 高智谋, 教授, 博士生导师。E-mail: gaozhimou@126.com

population resumed to the control level. The population of bacteria in the rhizosphere soil had no significant variation during 10 days after spraying of RSS-1R suspension. Nevertheless, it was increased obviously after spraying RSS-1R suspension for 20 days. The quantity of bacteria in the rhizosphere soil showed a tendency of increase first and then decrease after root-irrigation of RSS-1R suspension, and then the bacteria population recuperated to the control quantity at 30 dpi. There is no significant influence on population of fungi and actinomyces regardless of spraying or root-irrigation with RSS-1R suspension.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; microbial population; colonization; antibiotics; *Brassica napus* L.

油菜 (*Brassica napus* L.) 是我国最重要的油料作物之一, 由油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 侵染油菜引起的油菜菌核病严重制约着油菜生产<sup>[1]</sup>。生物防治作为油菜菌核病的重要防治措施已越来越受到研究者的关注, 对油菜菌核病菌具有生防活性的拮抗微生物类群有细菌<sup>[2-3]</sup>、真菌<sup>[4]</sup>、放线菌<sup>[5]</sup>和病毒<sup>[6]</sup>。枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是细菌类群中最活跃的生防因子, 广泛分布于自然界中各种生态环境里, 是植物体表、根际及土壤中生防芽孢杆菌的优势种群, 亦是植物内生防芽孢杆菌中常见的种群。已有报道表明, 枯草芽孢杆菌菌株可在大田条件下显著抑制油菜菌核病的病情扩展<sup>[2-3,7]</sup>。

一切生物生长、繁殖都具有一定的生态适应性, 人为的将生防菌引入一个新的生态系统后, 该生防菌能否适应新的环境并在该生态系统中成功定殖决定着生物防治的成败<sup>[8]</sup>。Kloepper 和 Beauchamp<sup>[9]</sup>认为植物病害生物防治最主要的因素是拮抗微生物能在植物周围 (体表、根围或植物体内) 成功定殖, 且其定殖能力决定着生防作用的大小。土壤微生物是土壤生态系统中重要的组成成员, 土壤微生物群落多样性能够敏锐地反映生态系统的功能演变<sup>[10]</sup>。人为引入生防菌进入新的生态系统可能会破坏该生态系统中原有微生物种群结构和功能, 从而导致土壤生态系统的生物多样性降低<sup>[11-13]</sup>。因此, 在利用生防菌进行防治植物病害之前, 有必要应用理想的技术手段来跟踪检测引入的生防菌在农业生态系统中的定殖情况及其对土壤生态环境的潜在影响进行风险性评估, 从而明确其在新的农业生态系统中的定殖规律及其与土壤中其他微生物群落间的相互关系。为了更好的研究有益拮抗微生物在植物周围的定殖, 通常需要对引入植物周围的生防菌进行特殊标记。常用的方法有抗生素标记法<sup>[14-15]</sup> (如抗利福平、氨基青霉素、硫酸链霉素和卡那霉素等)、扫描电镜观察法<sup>[16-17]</sup>、免疫学检测法<sup>[18]</sup>、聚合酶链式反应 (PCR) 及荧光标记法<sup>[19-20]</sup>等。其中以抗生素标记法、扫描电镜观察法和荧光标记法最为人们所常用。

作者前期从油菜根际土壤中分离获得了一株枯

草芽孢杆菌 RSS-1 菌株, 该菌株对油菜菌核病菌菌丝生长和菌核形成的抑制率均高达 90% 以上。因此, 本研究采用双抗药性标记法 (抗利福平和硫酸链霉素) 及扫描电子显微镜观察法, 对该菌株在油菜植株表面和根际的定殖进行了研究; 同时研究了经菌株 RSS-1 的菌悬液喷雾和灌根处理后该菌株对油菜周围微生物群落的影响。旨在对该菌株进行安全性评估, 为油菜菌核病菌的生物防治挖掘新的微生物资源, 以及为进一步利用该生防菌株对油菜菌核病进行大田防治提供基础依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株及植物材料

将保存在  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱里的枯草芽孢杆菌 RSS-1 菌株划线接种于 LB 培养基平板上,  $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$  培养箱中活化 48 h 后, 挑取新鲜菌落接种于含有 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡培养 24 h, 备用。

供试油菜及其培养: 将供试的甘蓝型冬油菜 (*Brassica napus*) 德油 7 号 (合肥丰乐种业有限公司, 感病) 播种于装有砂壤土和蛭石 (体积分数 2:1) 的聚丙烯塑料花盆 ( $10\text{ cm}\times 10\text{ cm}\times 9\text{ cm}$ ) 中, 于  $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$  温室 (16:8 h 光照/黑暗) 内培养 60 d (约 4~6 片真叶), 备用。

### 1.2 供试培养基

**1.2.1 PDA 培养基** (Potato Dextrose Agar) 马铃薯 200 g, 葡萄糖 (Dextrose) 20 g, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 1 000 mL,  $121^{\circ}\text{C}$  高压蒸汽灭菌 20 min。

**1.2.2 LB 培养基** (Luria-Bertani) 胰蛋白胨 (Tryptone) 10 g, 酵母提取物 (Yeast extract) 5 g, 氯化钠 (NaCl) 10 g, 蒸馏水 1 000 mL, 调 pH 至 7.0,  $121^{\circ}\text{C}$  高压蒸汽灭菌 20 min。若需要固体培养基则按  $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  加琼脂粉。

**1.2.3 高氏 1 号培养基** 可溶性淀粉 20 g, 硝酸钾 ( $\text{KNO}_3$ ) 1 g, 磷酸氢二钾 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 0.5 g, 硫酸镁 ( $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0.5 g, 氯化钠 (NaCl) 0.5 g, 硫酸亚铁 ( $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0.01 g, 重铬酸钾 ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )  $0.6\times 10^{-6}\sim 0.7\times 10^{-6}\text{ g}$ , 调 pH 至 7.2~7.4, 琼脂粉

(Agar) 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

### 1.3 抗药性标记菌株的诱导与培养

本研究采用抗利福平 (Rifampicin, Rif) 和硫酸链霉素 (Streptomycin, Str) 双抗药性标记, 菌株 RSS-1 的双抗药性菌株的获得参照 Chen 等<sup>[14]</sup>方法, 略有改动。

首先确定菌株 RSS-1 对利福平和硫酸链霉素的敏感浓度分别为  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 先筛选抗利福平的抗药性标记菌株, 再筛选抗硫酸链霉素的抗药性标记菌株: 将菌株 RSS-1 在低于敏感浓度的含利福平的 LB 培养液中培养, 然后逐级提高利福平的浓度 (利福平和硫酸链霉素的浓度设置为 0.1、0.5、1、2、5、10、20、50、100 和  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 进行诱导培养; 在每一级浓度梯度下筛选到抗药性菌株后, 均在相同浓度的 LB 平板上连续继代培养 7~10 代, 直到筛选出在含有  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  利福平的 LB 平板上能稳定生长、且菌落形态、生长曲线及对油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的抑菌作用等保持不变的 RSS-1 抗利福平标记菌株; 然后, 再用该抗利福平标记菌株来筛选抗硫酸链霉素的抗药性标记菌株, 方法同上。最后获得的抗利福平和硫酸链霉素的双抗药性标记菌株记为 RSS-1R。

### 1.4 菌株 RSS-1R 在油菜周围的定殖

**1.4.1 喷雾处理菌株 RSS-1R 在油菜周围的定殖** 将浓度为  $1\times 10^8 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$  的菌株 RSS-1R 的菌悬液采用喷雾法均匀喷施于整株油菜植株上, 以施用等量 LB 液体培养基为空白对照, 每处理重复 18~20 盆, 每盆 1 株幼苗, 每株幼苗喷施 10 mL 菌株 RSS-1R 的菌悬液或 LB 液体培养基, 实验重复 2 次。分别于处理后 2、4、6、10、20 和 30 d 取各处理的油菜植株的茎、叶组织和油菜根际土壤各 1.0 g。将油菜植株的茎、叶组织于无菌研钵中研磨成匀浆, 分别将油菜茎、叶组织匀浆和根际土壤溶于 10 mL 无菌水中,  $25^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  摇床上振荡 1 h 后, 分别稀释  $10$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  和  $10^5$  倍; 然后再分别取  $100 \mu\text{L}$  不同浓度菌悬液涂布于含  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  利福平和硫酸链霉素的 LB 平板上, 每处理 3 次重复,  $37^\circ\text{C}$  黑暗培养 24~48 h, 统计每皿出现菌落数, 计算每克鲜重组织 (或土壤) 中的菌落数 ( $\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ )。

**1.4.2 菌株 RSS-1R 在油菜叶片定殖的扫描电镜观察** 菌株 RSS-1R 在油菜叶片定殖的扫描电子显微镜 (Scanning electron micrograph, SEM) 观察参照 Heller 和 Geiges<sup>[21]</sup>, Yatzkan 和 Yarden<sup>[22]</sup>的方法: 于喷雾处理后 2、4、6 和 10 d 在上述各处理的油菜叶

片上打取直径 6 mm 的叶碟, 放入干净、干燥的装青霉素的小玻璃瓶内, 加入 2.5% 的戊二醛溶液固定 8~10 h。  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的磷酸缓冲液 (pH7.0) 清洗 3 次, 用 30%、50%、70%、85% 和 95% 乙醇梯度脱水, 各 1 次, 每次 10 min。再用无水乙醇脱水 3 次, 每次 15~20 min。再将经过脱水处理的样品放入 K850 临界点干燥仪 (Emitech, UK) 中进行干燥处理 2 h。样品干燥后即可放入 E-1010 离子溅射仪 (Hitachi, Japan) 上进行喷金, 然后将样品放入 S-4800 扫描电子显微镜 (Hitachi, Japan) 中进行观察。

**1.4.3 灌根处理 RSS-1R 菌株在油菜根际的定殖** 将浓度为  $1\times 10^8 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$  的菌株 RSS-1R 的菌悬液采用灌根法灌施于油菜根际的土壤中, 以施用等量 LB 液体培养基为空白对照, 每处理重复 18~20 盆, 每盆 1 株幼苗, 每株幼苗灌施 10 mL 菌株 RSS-1R 的菌悬液或 LB 液体培养基, 实验重复 2 次。实验设计及处理同 1.4.1。

### 1.5 菌株 RSS-1R 对油菜周围微生物群落的影响

**1.5.1 喷雾处理菌株 RSS-1R 对油菜周围微生物群落的影响** 实验设计及处理同 1.4.1。分离真菌、细菌和放线菌用的培养基分别为 PDA 培养基、LB 培养基和高氏 1 号培养基, 其中 PDA 培养基含终浓度为  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的青霉素和硫酸链霉素以抑制细菌生长。取上述各稀释梯度的菌悬液  $100 \mu\text{L}$  涂布于上述各培养基平板上, 每处理 3 次重复, 分离真菌和放线菌的培养基平板于  $(25\pm 1)^\circ\text{C}$  黑暗条件下培养, 直至无新菌落产生为止; 分离细菌的培养基平板于  $37^\circ\text{C}$  黑暗培养 24~48 h, 统计每皿出现菌落数, 计算每克鲜重组织 (或土壤) 中的菌落数 ( $\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ )。

**1.5.2 灌根处理菌株 RSS-1R 对油菜根际微生物群落的影响** 实验设计及处理同 1.4.1 和 1.5.1。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 RSS-1 双抗药性标记菌株的诱导

检测实验结果表明, 枯草芽孢杆菌菌株 RSS-1 对利福平和硫酸链霉素的敏感浓度分别为  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 据此设置 0.1、0.5、1、2、5、10、20、50、100 和  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度梯度的含利福平和硫酸链霉素的 LB 平板进行双抗药性菌株的筛选, 最终获得能在含  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  利福平和硫酸链霉素的 LB 平板上生长的 RSS-1 双抗药性标记菌株 RSS-1R。继而采用平板对峙法检测该双抗药性标记菌株 RSS-1R 对油菜菌核病菌菌丝生长的抑制作用与野生菌株间无显著差异 ( $P<0.01$ )。同时, 测定双抗药性标记菌株 RSS-1R 与野生型菌株

RSS-1 的生长曲线, 实验结果表明, 抗药性标记菌株 RSS-1R 的生长曲线略低于野生型菌株 RSS-1 的生长曲线, 但是两者之间的差异不显著 (见图 1)。

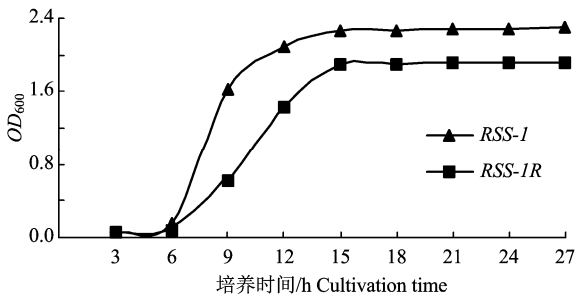


图 1 野生型菌株 RSS-1 与双抗药性标记菌株 RSS-1R 生长曲线  
Figure 1 Growth curves of strain RSS-1 and double-resistant strain RSS-1R

## 2.2 喷雾处理菌株 RSS-1R 在油菜周围的定殖

喷雾处理结果表明, 处理后 2 d, 从油菜植株上回收到的双抗药性标记菌株 RSS-1R 的平均菌量为  $3.67 \times 10^5$  cfu·g<sup>-1</sup> 鲜组织, 此后菌株 RSS-1R 的种群数量显著下降 ( $P < 0.05$ ) (图 2A 和图 3), 处理后 6 d, 菌株 RSS-1R 在油菜植株上的平均菌量下降为  $1.00 \times 10^3$  cfu·g<sup>-1</sup> 鲜组织。处理后 10 d, 从油菜植株上即检测不到菌株 RSS-1R (图 2A)。喷雾处理后 4 d, 才能从油菜根际土壤中回收得到菌株 RSS-1R, 其平均菌量为  $6.67 \times 10^3$  cfu·g<sup>-1</sup> 湿土, 处理后 4~10 d, 油菜根际土壤中菌株 RSS-1R 的种群数量无显著变化 ( $P < 0.05$ )。处理后 10~30 d, 油菜根际土壤中的菌株 RSS-1R 的种群数量呈现一定的下降, 然后保持一定量的水平不变 (见图 2A)。

## 2.3 灌根处理菌株 RSS-1R 在油菜根际土壤中定殖

灌根处理结果表明, 双抗药性标记菌株 RSS-1R

可在油菜根际土壤中稳定定殖。处理后 2 d, 从油菜根际土壤中回收到的菌株 RSS-1R 的平均菌量为  $1.12 \times 10^5$  cfu·g<sup>-1</sup> 湿土, 此后油菜根际土壤中菌株 RSS-1R 的种群数量略有增加, 从处理后 4~30 d, 菌株 RSS-1R 在油菜根际土壤中的种群数量无显著差异 (见图 2B)。

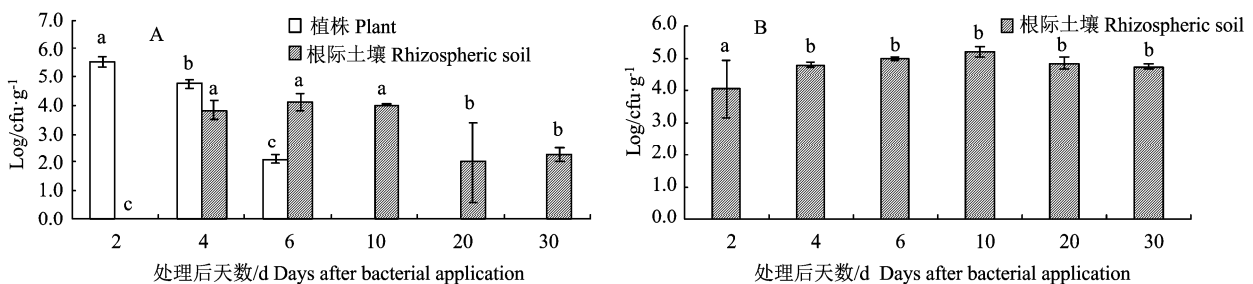
## 2.4 喷雾处理菌株 RSS-1R 对油菜周围微生物群落的影响

菌株 RSS-1R 喷雾处理后, 短期内油菜植株上的细菌种群数量显著增加, 处理后 2 d, 在油菜植株上分离到的平均细菌菌量为高达  $6.30 \times 10^6$  cfu·g<sup>-1</sup> 鲜组织, 显著高于对照组的平均菌量 ( $6.67 \times 10^5$  cfu·g<sup>-1</sup> 鲜组织); 此后油菜植株上的细菌种群数量显著下降, 到处理后 10 d, 其种群数量与对照组的细菌种群菌量无显著性差异。喷雾处理 10 d 内, 菌株 RSS-1R 对油菜根际土壤中的细菌种群数量的影响不显著, 但是喷雾处理 20 d 后, 油菜根际土壤中的细菌种群数量显著增加 (表 1)。

喷雾处理对真菌和放线菌的种群菌量的影响无论是油菜植株上还是在油菜根际土壤中均不显著 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。在本实验中, 无论是处理组还是对照组, 均未从油菜植株上分离到放线菌。

## 2.5 灌根处理菌株 RSS-1R 对油菜根际土壤微生物群落的影响

灌根处理结果表明, 经双抗药性标记菌株 RSS-1R 灌根处理后, 油菜根际土壤中的细菌种群数量显著增加, 处理后 2 d, 从油菜根际土壤中分离到的平均细菌菌量为  $4.17 \times 10^7$  cfu·g<sup>-1</sup> 湿土, 而对照处理组的平均细菌菌量为  $2.67 \times 10^7$  cfu·g<sup>-1</sup> 湿土; 到处理后 20 d, 油菜根际土壤中的细菌种群数量显著

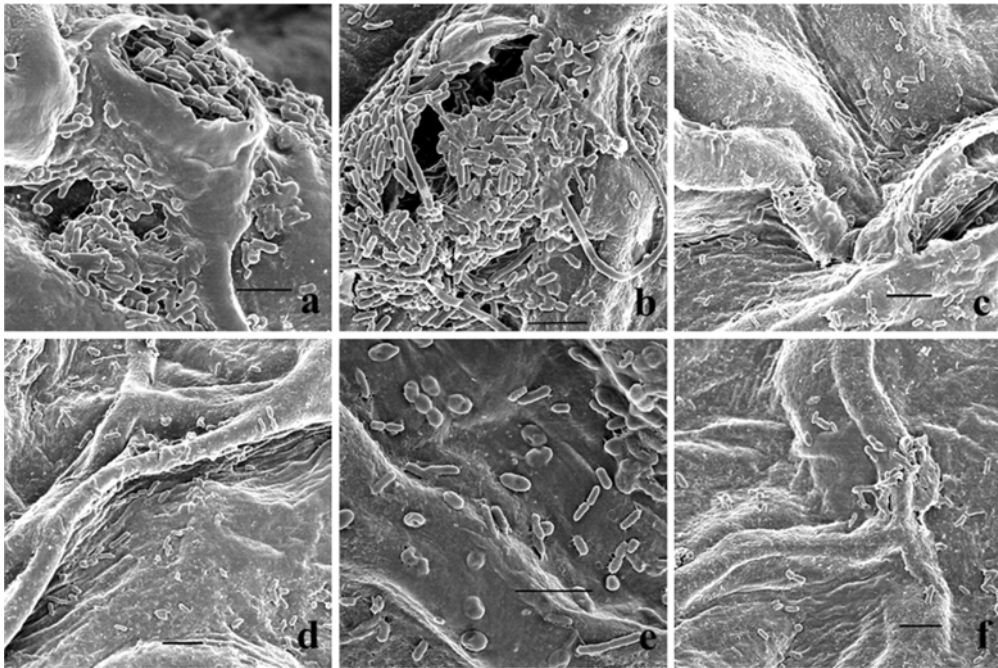


(A) 喷雾处理后双抗药性标记菌株 RSS-1R 在油菜植株和根际土壤中的定殖; (B) 灌根处理后菌株 RSS-1R 在油菜根际土壤中的定殖; 不同的小写字母代表 0.05 水平上的差异显著性

(A) Dynamics of strain RSS-1R population on rapeseed plants and in rhizospheric soil with the treatment of spraying the RSS-1R cell suspension (approximately  $1 \times 10^8$  cfu·mL<sup>-1</sup>) to rapeseed plants. (B) Colonization of strain RSS-1R population in rhizospheric soil of rapeseed with the treatment of irrigating the RSS-1R cell suspension (approximately  $1 \times 10^8$  cfu·mL<sup>-1</sup>) to rapeseed roots. Error bars represent standard deviations and different letters indicate that the differences were significant ( $P < 0.05$ ).

图 2 菌株 RSS-1R 在油菜植株和根际土壤中的定殖动态

Figure 2 Dynamics of the strain RSS-1R population on rapeseed plants and in rhizospheric soil



整株喷雾处理后 2 d(a, b)、4 d(c, d)和 6 d(e, f)双抗性标记菌株 RSS-1R 在油菜叶片定殖的扫描电镜观察; 图中黑色线段表示 2  $\mu\text{m}$

Dynamics of strain RSS-1R population on rapeseed leaves with the treatment of spraying the double-resistant strain RSS-1R cell suspension (approximately  $1 \times 10^8$  cfu·mL<sup>-1</sup>) to rapeseed plants. SEM observations was performed at 2d(a, b), 4d(c, d) and 6d(e, f) after treatments. Bars=2  $\mu\text{m}$

图 3 抗性菌株 RSS-1R 在油菜叶片定殖的扫描电镜观察

Figure 3 SEM observations of the colonization of resistant strain RSS-1R population on rapeseed leaves

表 1 菌株 RSS-1R 不同处理对油菜周围微生物群落的影响

处理/d Treatment	油菜植株 Rapeseed plant				根际土壤 Rhizospheric soil						
	细菌/10 <sup>5</sup> cfu·g <sup>-1</sup> Bacteria		真菌/10 <sup>3</sup> cfu·g <sup>-1</sup> Fungi		细菌/10 <sup>7</sup> cfu·g <sup>-1</sup> Bacteria		真菌/10 <sup>5</sup> cfu·g <sup>-1</sup> Fungi		放线菌/10 <sup>3</sup> cfu·g <sup>-1</sup> Actinomyces		
	CK	处理	CK	处理	CK	处理	CK	处理	CK	处理	
喷雾 Spray	2	6.67±1.20 <sup>d</sup>	63.0±8.89 <sup>a</sup>	4.67±1.20 <sup>a</sup>	2.00±1.00 <sup>a</sup>	2.67±0.88 <sup>abc</sup>	2.37±1.52 <sup>bc</sup>	3.33±0.67 <sup>abc</sup>	3.50±0.21 <sup>abc</sup>	4.33±1.45 <sup>a</sup>	4.67±2.03 <sup>a</sup>
	4	6.60±0.56 <sup>d</sup>	39.7±7.72 <sup>b</sup>	2.67±1.20 <sup>a</sup>	4.33±0.67 <sup>a</sup>	2.37±0.50 <sup>bc</sup>	1.53±0.19 <sup>c</sup>	3.37±0.47 <sup>abc</sup>	3.43±0.49 <sup>abc</sup>	3.33±0.33 <sup>a</sup>	2.67±0.33 <sup>a</sup>
	6	5.40±0.74 <sup>d</sup>	22.9±0.90 <sup>c</sup>	1.67±0.33 <sup>a</sup>	2.67±1.20 <sup>a</sup>	1.77±0.48 <sup>c</sup>	1.57±0.23 <sup>c</sup>	4.30±0.90 <sup>ab</sup>	2.77±0.46 <sup>bc</sup>	3.00±0.58 <sup>a</sup>	5.00±1.00 <sup>a</sup>
	10	4.63±0.34 <sup>d</sup>	3.00±1.53 <sup>d</sup>	2.67±0.67 <sup>a</sup>	3.00±1.00 <sup>a</sup>	2.20±0.17 <sup>c</sup>	1.83±0.37 <sup>c</sup>	4.33±0.33 <sup>ab</sup>	2.93±0.49 <sup>abc</sup>	3.67±0.67 <sup>a</sup>	4.33±1.45 <sup>a</sup>
	20	4.00±0.52 <sup>d</sup>	1.87±0.20 <sup>d</sup>	3.33±1.45 <sup>a</sup>	1.67±0.33 <sup>a</sup>	2.90±0.44 <sup>abc</sup>	4.63±0.12 <sup>a</sup>	3.87±0.26 <sup>abc</sup>	2.70±0.23 <sup>c</sup>	4.67±0.33 <sup>a</sup>	3.67±0.33 <sup>a</sup>
	30	4.37±0.59 <sup>d</sup>	2.67±0.88 <sup>d</sup>	3.67±0.67 <sup>a</sup>	1.67±0.67 <sup>a</sup>	3.50±0.57 <sup>abc</sup>	4.37±0.82 <sup>ab</sup>	4.47±0.38 <sup>a</sup>	3.63±0.23 <sup>abc</sup>	4.00±1.00 <sup>a</sup>	5.67±0.88 <sup>a</sup>
		根际土壤 Rhizospheric soil									
处理/d Treatment		细菌/10 <sup>7</sup> cfu·g <sup>-1</sup> Bacteria		真菌/10 <sup>5</sup> cfu·g <sup>-1</sup> Fungi		放线菌/10 <sup>3</sup> cfu·g <sup>-1</sup> Actinomyces					
		CK	处理	CK	处理	CK	处理	CK	处理	CK	处理
灌根 Irrigation	2	2.67±0.88 <sup>cd</sup>	4.17±0.47 <sup>ab</sup>	3.33±0.67 <sup>ab</sup>	3.57±0.24 <sup>ab</sup>	4.00±2.52 <sup>a</sup>	4.33±0.67 <sup>a</sup>				
	4	2.37±0.50 <sup>cd</sup>	1.22±0.03 <sup>c</sup>	3.37±0.47 <sup>ab</sup>	3.27±0.48 <sup>ab</sup>	4.67±1.76 <sup>a</sup>	3.33±1.33 <sup>a</sup>				
	6	1.77±0.48 <sup>dc</sup>	2.64±0.18 <sup>cd</sup>	4.30±0.90 <sup>ab</sup>	3.80±0.71 <sup>ab</sup>	6.33±1.20 <sup>a</sup>	3.67±1.76 <sup>a</sup>				
	10	2.20±0.17 <sup>cd</sup>	1.23±0.03 <sup>c</sup>	4.33±0.33 <sup>ab</sup>	3.23±0.19 <sup>ab</sup>	3.33±0.67 <sup>a</sup>	3.00±1.15 <sup>a</sup>				
	20	2.90±0.44 <sup>bcd</sup>	2.23±0.30 <sup>cd</sup>	3.87±0.26 <sup>ab</sup>	2.77±0.23 <sup>b</sup>	4.33±1.76 <sup>a</sup>	5.00±1.53 <sup>a</sup>				
	30	3.50±0.57 <sup>abc</sup>	4.40±0.44 <sup>a</sup>	4.47±0.38 <sup>a</sup>	3.57±0.35 <sup>ab</sup>	4.67±2.19 <sup>a</sup>	5.67±0.33 <sup>a</sup>				

注: 表中数据表示为平均值±标准差 ( $n=3$ ), 数据采用 Duncan's 新复极差法比较差异显著性, 不同字母表示 0.05 水平上的差异显著性。

Note: Means±standard errors ( $n=3$ ). Duncan's new multiple range method was used for variance analysis. Treatments with small letters in columns were significant difference ( $P<0.05$ ).

下降 ( $P < 0.05$ ), 到处理后 30 d, 油菜根际土壤中的平均细菌菌量再恢复到初始水平。通过灌根处理后, 无论是油菜根际土壤中的真菌还是放线菌的种群数量变化均不显著 (表 1)。

### 3 讨论

引入生防菌进行植物病害生物防治能否达到预期的防病增产效果, 其关键在于该生防菌能否适应新的生态环境并在该生态系统中有效定殖<sup>[8-9]</sup>。对引入生防菌的定殖能力以及在与生态系统中其他微生物的竞争存活能力的研究是发掘和利用该生防菌的基本前提, 对于该生防菌发挥其最佳的生物防治效果具有重要的现实意义。

枯草芽孢杆菌作为理想的生防因子及农业生态系统中的优势种群, 具有极强的抵抗不良环境条件的能力和生防抑菌效果。它能否在植物周围成功存活决定了其对植物病害的生物防治效果。杨洪凤等<sup>[23]</sup>研究表明内生 *Bacillus amyloliquefaciens* CC09 不同处理均能在小麦的叶际和叶内稳定定殖 15 d 以上, 且其预防与治疗小麦白粉病的防效均在 90% 以上。Chen 等<sup>[14]</sup>报道芽孢杆菌 JM-1128 菌株在棉花植株上 7 d 内菌量显著下降, 但是处理后 7 d 到 21 d 植株上的菌量下降缓慢。Theoduloz 等<sup>[24]</sup>报道 *B. subtilis* 在温室条件下在番茄叶片上至少可存活 45 d, 其菌量仅下降 2.5 个单位。Zhang 等<sup>[7]</sup>利用 *B. subtilis* 菌株 SB24 防治大豆菌核病 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 时发现, 在温室条件下菌株 SB24 可在大豆叶片上存活超过 5 周, 其菌量仅下降 0.8 个单位; 在大田条件下菌株 SB24 可在大豆叶片上存活超过 15 d, 其菌量仅下降 1.5 到 2.5 个单位。本研究通过抗利福平和硫酸链霉素双抗药性标记法及扫描电镜观察法, 研究了喷雾和灌根 2 种不同处理下菌株 RSS-1R 在油菜周围的定殖情况。结果表明, 喷雾处理后菌株 RSS-1R 可在油菜植株上定殖 6 d 左右。然而, 无论是喷雾还是灌根处理菌株 RSS-1R 均可在油菜根际稳定定殖 30 d 以上。表明枯草芽孢杆菌 RSS-1R 是一株具有极高应用潜能的生防菌株。

将生防菌引入新的生态系统发挥生物防治作用之前, 研究引入的生防菌对植物周围其他微生物群落结构以及周边生态环境的影响, 进行初步的风险性评估已成为国际共识。陈雪丽等<sup>[25]</sup>利用 DGGE-PCR 技术证明在盆栽条件下接种 *B. subtilis* BRF-2 和 *Paenibacillus polymyxa* BRF-1 对不同时期

黄瓜和番茄根际土壤中的细菌群落结构影响不大, 但是对土壤真菌群落结构产生一定的影响, 特别是对番茄根际土壤真菌群落结构影响较大。余贤美等<sup>[26]</sup>通过固体平板法和 Biolog 法分析了具有良好定殖能力的 *B. subtilis* Bs-15 对枣树根际土壤中细菌的种群数量影响不显著; 放线菌的种群数量在处理 7 d 内显著下降, 14 d 以后恢复到对照水平; 而真菌种群数量的增长速度显著下降, 表明菌株 Bs-15 提高了土壤微生物的整体活性以及土壤微生物种群和功能多样性。Girlandad 等<sup>[27]</sup>研究表明, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 不仅对黄瓜根部病害具有较好的生物防治效果, 而且其对黄瓜根际可培养真菌群落多样性没有明显的影响。本研究结果表明, 经菌株 RSS-1R 喷雾处理后, 短期内油菜植株上的细菌种群数量显著增加, 到处理后 10 d, 油菜植株上的细菌种群数量恢复到初始水平。喷雾处理 10 d 内油菜根际土壤中的细菌种群数量变化不显著, 但是到处理后 20 d, 油菜根际土壤中的细菌种群菌量显著增加。灌根处理后, 油菜根际土壤中的细菌种群数量呈现出先增加后下降的趋势, 到处理后 30 d, 油菜根际土壤中的细菌种群数量恢复到初始水平。但是, 无论是喷雾还是灌根处理, 均对油菜植株上的真菌或根际土壤中的真菌和放线菌的种群数量影响不显著。表明对油菜菌核病菌具有良好的生防效果的 *B. subtilis* 菌株 RSS-1R 不仅能够成功在油菜植株和根际定殖, 而且对油菜植株和根际土壤中的可培养微生物群落亦不造成显著的影响。

### 参考文献:

- [1] HU X, ROBERTS D P, JIANG M, et al. Decreased incidence of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and improved plant vigor of oilseed rape with *Bacillus subtilis* Tu-100[J]. Appl Microbiol Biot, 2005, 68(6): 802-807.
- [2] HU X, ROBERTS D P, XIE L, et al. Formulations of *Bacillus subtilis* BY-2 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape in the field[J]. Biol Control, 2014, 70(1): 54-64.
- [3] ZHANG J, XUE A G, MORRISON M J, et al. Impact of time between field application of *Bacillus subtilis* strains SB01 and SB24 and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* on the suppression of sclerotinia stem rot in soybean[J]. Eur J Plant Pathol, 2011, 131(1): 95-102.
- [4] ZENG W, WANG D, KIRK W, et al. Use of *Coniothyrium minitans*, and other microorganisms for reducing *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Biol Control, 2012, 60(2): 225-232.
- [5] BAHARLOUEI A, SHARIFI-SIRCHI G R, BONJAR G H S. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (oilseed rape isolate) by an effective antagonist *Streptomyces*[J]. Afr J Biotechnol, 2011, 10(30): 5785-5794.
- [6] YU X, LI B, FU Y, et al. A geminivirus-related DNA my-

- covirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(18): 8387-8392.
- [7] ZHANG J X, XUE A G. Biocontrol of sclerotinia stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of soybean using novel *Bacillus subtilis* strain SB24 under control conditions[J]. Plant Pathol, 2010, 59(2): 382-391.
- [8] BABALOLA O O. Beneficial bacteria of agricultural importance[J]. Biotechnol Lett, 2010, 32(11): 1559-1570.
- [9] KLOPPER J W, BEAUCHAMP C J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria[J]. Can J Microbiol, 1992, 38(12): 1219-1232.
- [10] LI F L, LIU M, LI Z P, et al. Changes in soil microbial biomass and functional diversity with a nitrogen gradient in soil columns[J]. Appl Soil Ecol, 2013, 64: 1-6.
- [11] O'CALLAGHAN M, GLARE T R. Impacts of transgenic plants and micro-organisms on soil biota[C]// New Zealand Plant Protection Society's Annual Conference. New Zealand plant protection 54 (2001). Palmerston North: The New Zealand Plant Protection Society Inc, 2001: 105-110.
- [12] LOTTMANN J, HEUER H, DE VRIES J, et al. Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2000, 33(1): 41-49.
- [13] LIN M, SMALLA K, HEUER H, et al. Effect of an *Alcaligenes faecalis*, inoculant strain on bacterial communities in flooded soil microcosms planted with rice seedlings[J]. Appl Soil Ecol, 2000, 15(2): 211-225.
- [14] CHEN C, BAUSKE E M, MUSSON G, et al. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria[J]. Biol Control, 1995, 5(1): 83-91.
- [15] NAUTIYAL C S, JOHRI J K, SINGH H B. Survival of the rhizosphere-competent biocontrol strains *Pseudomonas fluorescences* NBRI2650 in the soil and phyto-sphere[J]. Can J Microbiol, 2002, 48(7): 588-601.
- [16] REVA O N, DIXELIUS C, MEIJER J, et al. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2004, 48(2): 249-259.
- [17] DEMOZ B T, KORSTEN L. *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens[J]. Biol Control, 2006, 37(1): 68-74.
- [18] QUADT-HALLMANN A, KLOPPER J W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species[J]. Can J Microbiol, 1996, 42(11): 1144-1154.
- [19] CAO Y, ZHANG Z, LING N, et al. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots[J]. Biol Fert Soils, 2011, 47(5): 495-506.
- [20] GAO S, WU H, YU X, et al. Swarming motility plays the major role in migration during tomato root colonization by *Bacillus subtilis* SWR01[J]. Biol Control, 2016, 98: 11-17.
- [21] HELLER A, GEIGES T W. Oxalic acid has an additional, detoxifying function in *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenesis[J]. PloS One, 2013, 8(8): 1-17.
- [22] YATZKAN E, YARDEN O. The B regulatory subunit of protein phosphatase 2A is required for completion of macroconidiation and other developmental processes in *Neurospora crassa*[J]. Mol Microbiol, 1999, 31(1): 197-209.
- [23] 杨洪凤, 薛雅蓉, 余向阳, 等. 内生解淀粉芽孢杆菌 CC09 菌株在小麦叶部的定殖能力及其防治白粉病效果研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(4): 481-488.
- [24] THEODULOZ C, VEGA A, SALAZAR M, et al. Expression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin cry1Ab gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mills)[J]. J Appl Microbiol, 2003, 94: 375-381.
- [25] 陈雪丽, 王光华, 金剑, 等. 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[J]. 生态学杂志, 2008, 27(11): 1895-1900.
- [26] 余贤美, 侯长明, 王海荣, 等. 枯草芽孢杆菌 Bs-15 在枣树体内和土壤中的定殖及其对土壤微生物多样性的影响[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(4): 497-502.
- [27] GIRLANDA M, PEROTTO S, MOENNE-LOCCOZ Y, et al. Impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and a genetically modified derivative on the diversity of culturable fungi in the cucumber rhizosphere[J]. Appl Environ Microb, 2001, 67(4): 1851-1864.