

文章编号: 1003-8701(2015)04-0090-04

# 解淀粉芽孢杆菌在葡萄叶片上的定殖能力研究

郭继平<sup>1,2</sup>, 马光<sup>1</sup>, 王芳芳<sup>1</sup>, 傅俊范<sup>2\*</sup>

(1. 衡水学院生命科学系, 河北 衡水 053000; 2. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110161)

**摘要:**为探究解淀粉芽孢杆菌在葡萄叶片上的定殖能力,本研究先后采用利福平和链霉素对解淀粉芽孢杆菌N24进行双抗诱导,获得了菌落特征与野生菌相同且抗药性稳定的双抗菌株(抗利福平320 μg/mL、抗链霉素150 μg/mL)。此双抗菌株在葡萄叶片上的定殖试验结果表明:浓度为 $1 \times 10^4$  cfu/mL和 $1 \times 10^6$  cfu/mL的菌液喷施叶面后,5~10 d菌量快速增加,10 d达到最高峰,此时其定殖和繁殖能力最强,尤其是起始菌液浓度为 $1 \times 10^6$  cfu/mL时,叶片上的定殖量可达 $1.7 \times 10^3$  cfu/g。浓度为 $1 \times 10^8$  cfu/mL的菌液喷施叶面时,在喷雾后5 d菌量达到最高峰。综合来看,生防菌N24的最适喷施菌液浓度为 $1 \times 10^6$  cfu/mL。添加增效因子后有利于双抗菌株在葡萄叶片表面的定殖,其中,添加壳聚糖的效果最好,其次为苏氨酸。添加磷酸氢二钾后的菌量与对照相比,没有显著差别。

**关键词:**解淀粉芽孢杆菌;葡萄;定殖;生物防治

中图分类号:S432.1

文献标识码:A

## Studies on Colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* on Grape Leaves

GUO Ji-ping<sup>1,2</sup>, MA Guang<sup>1</sup>, WANG Fang-fang<sup>1</sup>, FU Jun-fan<sup>2\*</sup>

(1. Department of Life Science, Hengshui University, Hebei 053000; 2. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

**Abstract:** In order to study colonization ability of *Bacillus amyloliquefaciens* on grape leaves, the strain N24 of *Bacillus amyloliquefaciens* was induced by rifampicin and streptomycin to obtain double resistant strains. The obtained strain could resist 320 μg/mL rifampicin and 150 μg/mL streptomycin stably and its characteristics were same to wild strain. The experiment results of the double resistant strains colonized on grape leaves showed that after grape leaves were sprayed with  $1 \times 10^4$  cfu/mL and  $1 \times 10^6$  cfu/mL of N24, the bacteria amount of double resistant strains rose steeply from 5th day to 10th day and reached a peak at 10th day when the colonization ability and reproductive capacity were strongest. Especially when the initial bacterial concentration was  $1 \times 10^6$  cfu/mL, the amount of N24 reached  $1.7 \times 10^3$  cfu/g, then declined after 10th day. When concentration was  $1 \times 10^8$  cfu/mL, the amount of double resistant strains reached peak at 5th day. In conclusion, the most suitable concentration of N24 was  $1 \times 10^6$  cfu/mL when it was sprayed to grape leaves. Adding the synergistic factor was conducive to the colonization of double resistant strains on grape leaf surface. Among them, the best was chitosan, followed by threonine. When potassium hydrogen phosphate was added, there was no significant difference with control.

**Key words:** *Bacillus amyloliquefaciens*; Grape; Colonization; Biological control

葡萄的叶部病害主要为葡萄霜霉病(*Plasmopara viticola*)和葡萄白粉病(*Uncinula necator*),

两种病害的病原菌均为专性寄生菌<sup>[1]</sup>。全世界的葡萄产区均不同程度地遭到这两种病害的危害,造成了严重的经济损失。由于这些病害的化学防治存在种种弊端,所以生物防治的重要性日益凸显。但生物防治的研究由于环境条件复杂,室内试验所表现的拮抗作用与田间实际的相关性有一定差距。生防微生物的防病效果在很大程度上与其在植物体表的定殖竞争能力有关<sup>[2]</sup>,所以成功的生物防治有两个重要的基本条件,一是拮抗细

收稿日期:2015-03-25

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(201203035);河北省青年拔尖人才支持计划项目(201319)

作者简介:郭继平(1979-),女,副教授,博士,从事植物病理相关的教学和科研工作。

通讯作者:傅俊范,男,博士,教授,博士生导师,E-mail:guojiping888@163.com

菌在引进位点能有效地定殖,二是在侵染位点能表现出与离体测定中相同的拮抗作用<sup>[3]</sup>。然而,生防菌的定殖会受到诸如自身特性、环境微生物、光照、水分等的影响,致使其生防效果不稳定。因此,探索生防菌的定殖动态和自然规律成为生物防治研究的重要内容<sup>[4]</sup>。

本研究前期筛选了1株对葡萄霜霉病菌具有较强拮抗活性的生防细菌—解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)N24菌株。该生防细菌能否适应葡萄叶面的生态环境并在叶片表面定殖尚不明确。本文对该菌株在葡萄叶片表面的定殖能力进行了研究,旨在为该生防细菌的进一步应用提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和葡萄品种

解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)N24菌株由衡水学院生命科学系微生物学实验室提供,供试葡萄品种为巨峰。

### 1.2 培养基

GYEP培养基:葡萄糖 20.0 g,蛋白胨 10.0 g,酵母浸汁 5.0 g,琼脂 20.0 g,蒸馏水 1000 mL。

### 1.3 野生解淀粉芽孢杆菌 N24 菌株固有抗药性的测定

将野生解淀粉芽孢杆菌(*B. licheniformis*)N24菌株接种于分别含利福平浓度梯度(20 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ g/mL、100 $\mu$ g/mL)和链霉素浓度梯度(20 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ g/mL、100 $\mu$ g/mL)的GYEP平板上。28 $^{\circ}$ C恒温培养3 d,观察生长情况。

### 1.4 利福平标记

将解淀粉芽孢杆菌 N24 菌株接种于分别含有利福平(1 $\mu$ g/mL、3 $\mu$ g/mL、5 $\mu$ g/mL、7 $\mu$ g/mL、9 $\mu$ g/mL)的GYEP液体培养基中进行诱导,28 $^{\circ}$ C摇床培养3 d,待其在一定浓度培养基中生长后,涂布含有相应抗生素浓度的GYEP固体平板上。待菌落长出后,挑取单菌落继续提高浓度诱导,直至得到抗320 $\mu$ g/mL利福平的菌株。

### 1.5 链霉素标记

对抗利福平320 $\mu$ g/mL的菌株再进行抗链霉素的诱导。首先以低浓度(1 $\mu$ g/mL、3 $\mu$ g/mL、5 $\mu$ g/mL、7 $\mu$ g/mL和9 $\mu$ g/mL)的GYEP液体培养基进行诱导,待其生长后涂布含有相应浓度链霉素的GYEP平板,待菌落长出后,挑取培养物进一步提高链霉素的浓度继续诱导,直至得到抗150 $\mu$ g/mL链霉素的双抗解淀粉芽孢杆菌。

## 1.6 双抗菌株稳定性研究

### 1.6.1 遗传稳定性

将双抗解淀粉芽孢杆菌在4 $^{\circ}$ C条件保存一周后,接种于不含抗生素的GYEP平板上,28 $^{\circ}$ C培养3 d后,再将生长的菌落接种于含两种抗生素的GYEP平板上,3 d后对生长情况进行观察,如此反复多次,测定双抗菌株的稳定性<sup>[5]</sup>。

### 1.6.2 拮抗性测定

取已感染葡萄霜霉病的叶片,用毛笔将白色霉层刷掉,22 $^{\circ}$ C保湿24 h,新霉层用毛笔刷到无菌水和不同稀释倍数的发酵滤液中,配成孢子悬浮液的浓度为10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>个/mL,置15 $^{\circ}$ C培养箱中黑暗培养5 h后观察孢子萌发情况。

## 1.7 双抗菌株在葡萄叶面的定殖

### 1.7.1 菌株的活化和定殖检测

将双抗标记的解淀粉芽孢杆菌转接于含上述两种抗生素的GYEP液体培养基中培养,150 r/min、28 $^{\circ}$ C震荡72 h,然后用无菌水稀释成菌液。将菌液均匀喷洒于葡萄叶的正反面,以喷施无菌水作为对照。接种后于1 d、5 d、10 d、15 d、20 d、25 d、30 d取样,共7次,实验组和对照组分别取4片叶子,叶子剪碎后称5 g放入含有100 mL无菌水的三角瓶中,同时加2~3滴吐温80,150 r/min、震荡30 min,取菌液进行系列稀释,涂布于含320 $\mu$ g/mL利福平和150 $\mu$ g/mL链霉素的GYEP平板上,3 d后统计菌落数,以cfu/g鲜叶表示。

### 1.7.2 生防菌浓度对其定殖的影响

菌液浓度分别稀释成10<sup>4</sup>、10<sup>6</sup>和10<sup>8</sup> cfu/mL,其他方法同1.7.1。

### 1.7.3 增效因子对生防菌定殖的影响

壳聚糖、苏氨酸、磷酸氢二钾分别溶解于菌液(浓度为10<sup>6</sup> cfu/mL)中,添加量均为0.2%(w/v)。对照仅接种生防菌液,处理1接种含有壳聚糖的生防菌液,处理2接种含有苏氨酸的生防菌液,处理3接种含有磷酸氢二钾的生防菌液,其他方法同1.7.1。

## 2 结果与分析

### 2.1 解淀粉芽孢杆菌 N24 菌株的固有抗药性测定

解淀粉芽孢杆菌 N24 对利福平和链霉素均不具天然抗性,故可对 N24 菌株进行利福平和链霉素双抗标记,以在后续的试验中区分植物体内存在的土著性的解淀粉芽孢杆菌。

### 2.2 解淀粉芽孢杆菌 N24 菌株的双抗标记

对解淀粉芽孢杆菌 N24 菌株采用抗生素浓度逐渐升高的液体培养基和固体平板进行高抗性诱导, 先进行单抗诱导获得抗利福平  $320\mu\text{g/mL}$  的抗性菌株, 再用所得单抗菌株进行双抗诱导, 进一步得到抗链霉素  $150\mu\text{g/mL}$  的双抗菌株。

### 2.3 抗性突变株的稳定性

#### 2.3.1 遗传稳定性

从图 1 可看出, 双抗解淀粉芽孢杆菌菌落特征与野生菌相同。将双抗菌株接种在不含两种抗生素的 GYEP 平板上进行传代培养, 再接种在含有利福平  $320\mu\text{g/mL}$ 、链霉素  $150\mu\text{g/mL}$  的 GYEP 平板上进行培养, 重复 20 次, 结果发现该菌株能正常生长, 由此证明所得的双抗突变菌株的抗药性是稳定的。

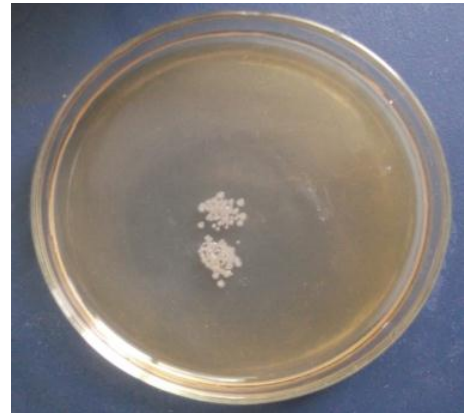


图 1 双抗菌株稳定性的平板  
(利福平  $320\mu\text{g/mL}$ 、链霉素  $150\mu\text{g/mL}$ ) 检测结果

#### 2.3.2 对病菌的拮抗性

表 1 发酵滤液对葡萄霜霉病菌孢子囊萌发的抑制作用

%

稀释倍数	原菌株		双抗菌株	
	孢子囊萌发率	抑制率	孢子囊萌发率	抑制率
5	27.8	67.3	25.8	69.6
10	45.9	46.0	46.1	45.7
50	62.1	26.9	65.3	23.2
100	79.8	6.1	80.2	5.6
CK	85			

进一步比较原始菌株和双抗菌株的发酵滤液对葡萄霜霉病菌孢子囊萌发的影响, 结果见表 1, 发现稀释倍数从 5 到 100, 原菌株和双抗菌株发酵滤液对游动孢子囊萌发的抑制率没有显著差别, 说明该菌株被标记后对病菌的拮抗性没有发生变化。

### 2.4 双抗菌株在葡萄叶片上的定殖

#### 2.4.1 生防菌浓度对其定殖的影响

将双抗菌株的不同浓度菌液喷雾于葡萄叶片的正反面, 分别于不同天数取样测定菌数。从图 2 可看出, 起始菌液浓度为  $1 \times 10^4$  cfu/mL 和  $1 \times 10^6$  cfu/mL 时, 在喷雾后的 5 ~ 10 d 菌量快速增加, 在 10 d 菌量达到最高峰, 此时其定殖能力和繁殖能力最强, 尤其是起始菌液浓度为  $1 \times 10^6$  cfu/mL 时, 数量可达  $1.7 \times 10^3$  cfu/g, 10 d 以后呈下降趋势。双抗菌株菌量下降可能是因为环境因素的改变以及原有存在于叶片的微生物逐渐恢复了竞争能力, 变为正常条件下的微生物区系组成。起始菌液浓度为  $1 \times 10^8$  cfu/mL 时, 在喷雾后 5 d 菌量达到最高峰。所以起始菌液浓度越高, 达到定殖高峰的时间越短, 但过高的菌液浓度, 会影响叶片本身的微生物区系组成, 破坏原有的区系平

衡。综合来看, 生防菌的最适喷施菌液浓度为  $1 \times 10^6$  cfu/mL。

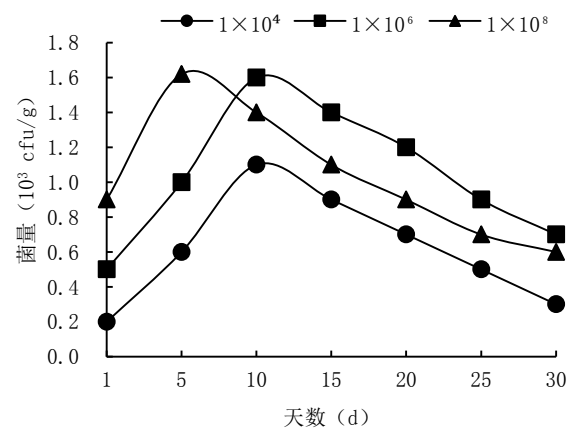


图 2 生防菌浓度对双抗菌株定殖的影响

#### 2.4.2 增效因子对生防菌定殖的影响

从图 3 可看出, 添加增效因子后有利于解淀粉芽孢杆菌双抗菌株在葡萄叶片表面的定殖。其中, 添加壳聚糖的效果最好, 比仅接种生防芽孢杆菌的高出 6.8%, 效果其次为添加苏氨酸。添加磷酸氢二钾后的菌量与对照相比, 没有显著差别, 所以该因素对该菌株的定殖没有影响。

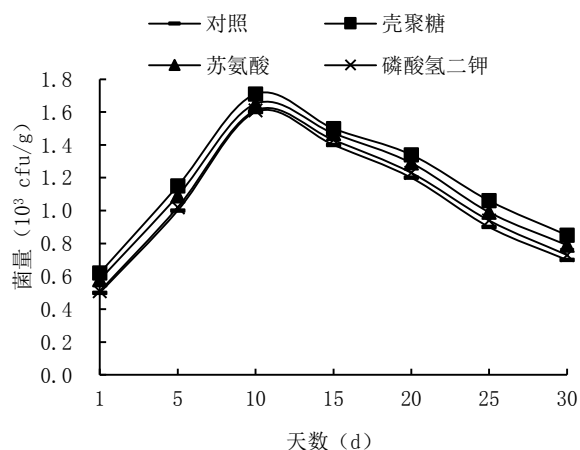


图3 增效因子对双抗菌株定殖的影响

### 3 结论与讨论

采用抗药性标记引入微生物,以研究其在环境中的定殖情况是一种传统而实用的方法,具有简便、经济、快速的优点<sup>[6]</sup>。在实际研究中,有的采用单抗标记,如孙建波等对芽孢杆菌XB16进行了利福平标记后研究了其在香蕉体内的定殖<sup>[7]</sup>;有的采用双抗标记,如龙良鲲对内生菌01-144进行了链霉素和利福平标记后研究了其在番茄根茎内定殖<sup>[8]</sup>。本研究采用了双抗标记法,解淀粉芽孢杆菌N24菌株对利福平和链霉素均不具天然抗性,经过诱导均可产生较高的抗性,最终获得抗利福平320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、抗链霉素150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的双抗菌株。可见,试验的菌种和植物品种不同时,采用的标记方法也有所区别。

本试验中解淀粉芽孢杆菌的定殖采用的是喷雾的方法,将菌液喷雾于葡萄叶片正反面让其定殖,结果发现该菌株定殖情况良好。有研究表明,采用浇土法处理棉花种子,Z-5菌株在棉花植株体内及根际土壤定殖效果最好,优于浸种法和拌种法<sup>[9]</sup>。由此证明,不同种类的菌株和植株应该采用不同的接种方法,才能得到最佳的定殖效果。微生物的定殖能力可受其他因素的影响,如

温度、湿度、光照等环境因素<sup>[10]</sup>,也可受其他微生物的影响,尤其是接种初期。由于本研究周期较短,环境条件改变较小,与实际生产中的环境有所差异,所以本试验结果可为大田应用提供一部分理论依据。由于解淀粉芽孢杆菌N24菌株分离于葡萄叶片表面,所以该菌株对葡萄植株的生长和人类健康没有不良影响,是一个安全的菌株。在双抗菌株于葡萄叶片上有效定殖的基础上,可继续研究该菌株的定殖位点,为生防机理的探讨提供一定的前期基础和理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 程廉,王汝贤,李新民.葡萄病害[M].陕西:天则出版社,1993.
- [2] Tombolini R, Gaag D J, Van Der Gerhardson B, et al. colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(8): 674-680.
- [3] 任小平,谢关林,王笑.铜绿假单胞菌ZJ1999对水稻纹枯病的防治及其在水稻上的定殖[J]. *中国生物防治*, 2006, 22(1): 54-57.
- [4] 谯天敏,朱天辉,李姝江.铜绿假单胞菌ZB27的定殖能力及对杂交竹梢枯病的防控作用[J]. *植物保护学报*, 2011, 38(2): 133-138.
- [5] 罗明,芦云,张祥林,等.内生拮抗细菌在哈密瓜植株体内的传导定殖和促生作用研究[J]. *西北植物学报*, 2007, 27(4): 1719-1725.
- [6] 张炳欣,张平.植物根围外来微生物定殖的检测方法[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2000, 26(6): 624-628.
- [7] 孙建波,王宇光,赵平娟,等.拮抗菌XB16在香蕉体内的定殖及对抗病相关酶活性的影响[J]. *热带作物学报*, 2010, 31(2): 212-216.
- [8] 龙良鲲,肖崇刚.内生细菌01-144在番茄根茎内定殖的初步研究[J]. *微生物学通报*, 2003, 30(5): 53-56.
- [9] 张冬冬,刘涛,高同国,等.棉花黄萎病拮抗细菌Z-5菌株的定殖能力检测[J]. *棉花学报*, 2013, 25(6): 510-516.
- [10] 闫孟红,蔡正求,韩继刚,等.植物内生细菌在防治植物病害中的应用研究[J]. *生物技术通报*, 2004(3): 8-12, 22.

(责任编辑:范杰英)