

## 枯草芽孢杆菌 BSD-2 对黄瓜叶际微生物数量及菌群结构的影响

尹淑丽 孙劲冲 刘倩倩 董杰 刘洪伟 张丽萍\*

(河北省科学院生物研究所 河北 石家庄 050081)

**摘要:**【目的】阐明枯草芽孢杆菌 BSD-2 菌株抗菌素、芽孢及发酵液不同施入形式对黄瓜叶际微生物数量及菌群多样性的影响, 为该菌株的应用提供理论基础和依据。【方法】以黄瓜为实验材料于室内进行盆栽实验, 设置于接种灰霉病原菌前后喷施抗菌素、芽孢、发酵液, 单独接种灰霉病原菌和无菌水空白对照, 共 8 个处理。采用传统微生物分离的方法, 利用 PB、高氏 1 号和 PDA 培养基分离并统计叶际可培养细菌、放线菌和真菌的数量; 采用 Bio-Rad 公司的 Dcode™ System 进行样品的 DGGE 分析, 对条带数量和灰度进行定量分析, 采用 UPGMA 法对各条带进行聚类分析; 采用 Shannon-Wiener 指数、Pielou 均匀度指数和丰富度分析可培养微生物和 DGGE 图谱中的群落多样性; 并将条带回收测序。【结果】枯草芽孢杆菌 BSD-2 抗菌素、芽孢及发酵液以接种灰霉病原菌前喷施的效果最佳, 均可提高可培养细菌的数量, 降低可培养真菌的数量; 可使叶际微生物的 Shannon-Wiener 多样性指数、Pielou 均匀度指数和丰富度指数增加; 其中抗菌素处理对叶际微生物种群结构的影响最小。【结论】枯草芽孢杆菌 BSD-2 的发酵液可有效抑制真菌的数量; 芽孢可有效提高细菌及放线菌的数量; 抗菌素则利于保持叶际微生物的丰富度及多样性指数。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌 BSD-2, 叶际, 黄瓜, 微生物数量, 菌群, PCR-DGGE

### Effects of *Bacillus subtilis* BSD-2 on cucumber phyllosphere microorganism community

YIN Shu-Li SUN Jin-Chong LIU Qian-Qian DONG Jie LIU Hong-Wei  
ZHANG Li-Ping\*

(Institute of Biology, Hebei Academy of Science, Shijiazhuang, Hebei 050081, China)

**Abstract:** [Objective] By analyzing the effects of *Bacillus subtilis* antibiotics, spores and

**Foundation item:** Key Basic Research Project of Hebei Province (No. 13966503D); Science and Technology Cooperation and Development Funding Projects of Hebei Province (No. Y-15); High-level Personnel Fund Project in Hebei Academy of Sciences (No. 20150503LR62-11)

\*Corresponding author: Tel: 86-311-83014879; Fax: 86-311-83022636; E-mail: Lizzle-69@163.com

Received: January 05, 2016; Accepted: June 13, 2016; Published online (www.cnki.net): July 19, 2016

基金项目: 河北省重点基础研究项目(No. 13966503D); 河北省省级省校科技合作开发资金支持项目(No. Y-15); 河北省科学院高层次人才资助项目(No. 20150503LR62-11)

\*通讯作者: Tel: 86-311-83014879; Fax: 86-311-83022636; E-mail: Lizzle-69@163.com

收稿日期: 2016-01-05; 接受日期: 2016-06-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-07-19

fermentation on the microorganism quantity and microbial community in cucumber phyllosphere, providing theoretical basis for the effective application. **[Methods]** With cucumber as the experimental material, setting up eight treatments: applying the antibiotics, spores and fermentation before or after inoculating *Botrytis cinerea*, only inoculating *Botrytis cinerea* and spraying the sterile water. The experiment was conducted in the indoor. Using the method of traditional microbial separation to count the number, the cultured bacteria, actinomycetes and fungi of cucumber phyllosphere were respectively separated with PB, High's No.1 and PDA medium. At the same time, analyzing the phyllosphere microorganism samples of different treatments by the Dcode Universal Mutation Detection System for DGGE, the quantitative analysis of strip number and gray level were carried on by Quantity One analysis software, the various belt was clustered by UPGMA method, the microorganism quantity and microbial community was analyzed by microbe richness index, Shannon-Wiener diversity index and Pielou index, the differential DNA sequencing results were analyzed by NCBI Blast program homology, and clustered by The Sequence match program. **[Results]** The results of different treatments on the microorganism quantity and microbial community in cucumber phyllosphere, showed that spraying before inoculation with the *Botrytis cinerea* is the best applying way of *Bacillus subtilis* antibiotics, spores and fermentation, can effectively reduce the number of culturable fungi, increase the number of cultured bacteria and actinomycetes, increase leaf microbe richness index, Shannon-Wiener diversity index and Pielou index. Antibiotic treatment on the occasion of leaf microbial population structure is minimized. **[Conclusion]** *Bacillus subtilis* BSD-2 fermentation can reduce the number of culturable fungi. *Bacillus subtilis* BSD-2 spores can increase the number of the cultured bacteria and actinomycetes. *Bacillus subtilis* BSD-2 antibiotics can keep phyllosphere microbial richness and diversity index.

**Keywords:** *Bacillus Subtilis* BSD-2, Cucumber, Phyllosphere, Microbial Community, Microorganism Quantity, PCR-DGGE

枯草芽孢杆菌防治蔬菜真菌病害的历史已有多年,因其抗逆性孢子及代谢产物的抑菌谱广、抑菌效果好且兼具促进植物生长的功能,因而成为一种理想的生防菌<sup>[1]</sup>。植物叶际是一个复杂的生态系统,附着丰富多样的微生物<sup>[2]</sup>,可抵御病害微生物、改变植物表面特性<sup>[3-5]</sup>等;了解叶际微生物数量及菌群变化利于发挥叶际微生态对病原菌的抵抗作用<sup>[6-8]</sup>。叶面喷施 TiO<sub>2</sub> 可使黄瓜叶围微生物多样性显著降低<sup>[9]</sup>;喷施多粘类芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌,对叶际菌群数量和种类均有所影响<sup>[10-11]</sup>;喷施苏云金芽孢杆菌可改变叶际微生物的群体结构<sup>[12]</sup>。采用 DGGE 技术可以发现微生物在数量及种类上的复杂,目前针对枯草芽孢杆菌不同施入形式对黄瓜叶际微生物数量及菌群结构的影响方面缺少系统的研究。

枯草芽孢杆菌 BSD-2 是一株由本实验室分离并保存的植物内生菌,对黄瓜灰霉病、叶霉病等多种植物病原真菌有较强的抑制作用,对寄主植物亲

和性好,能够诱导植物抗病,而且其分泌的抗菌素抑菌谱广、热稳定性、酸碱稳定性、光稳定性及储藏稳定性好<sup>[13]</sup>,可用于防治叶面真菌病害。目前研究主要集中在生防菌对于根际的抑菌机理研究及微生物群落的影响<sup>[14-15]</sup>,但对叶际微生物群落结构影响的相关研究较少。因此研究枯草芽孢杆菌 BSD-2 抗菌素、芽孢及发酵液施用后叶际微生物数量及菌群的变化,利于阐述生防菌株的微生态作用机制,为其高效生防应用提供理论基础及依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验时间、地点、条件及供试作物

2012-2013 年,于河北省科学院生物研究所采用 Conviron 公司的 Controlled environment TGLtd 进行作物培养;试验条件为温度 24 °C,湿度 80%,光照时间为 12L:12D。

### 1.2 供试材料

1.2.1 供试实验材料:黄瓜,品种为津春 4 号(天津

科润农业科技股份有限公司研制)。

**1.2.2 供试微生物:** (1) 植物病原菌: 黄瓜灰霉病菌为实验室分离保存。

(2) 益生菌: 枯草芽孢杆菌 BSD-2 菌株为植物内生细菌, 由本实验室分离、鉴定、保存。

**1.2.3 培养基:** (1) PB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 5.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 12.0, pH 7.0。

(2) 高氏 1 号培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.00, 硝酸钾 1.00, 磷酸氢二钾 0.50, 硫酸镁 0.50, 氯化钠 0.50, 硫酸亚铁 0.01, 琼脂 12.00, pH 7.40–7.60。

(3) PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 12.0, pH 自然。

**1.2.4 主要试剂和仪器:** 丙烯酰胺、Formamide Deionized、过硫酸铵、TEMED、甲酰胺、尿素, 美国 Bio-Rad 公司; Mag-Bind Soil DNA Kit、MiniBest Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver、PMD19-T Simple Vector, 宝生物工程有限公司; 真菌、细菌的通用引物, 生工生物工程有限公司; 基因组提取采用 DNA Kit, 美国 OMEGA 公司; SD3300HP 超声波清洗器, 北京中晟科技有限公司; 1-14 型高速离心机, 德国 Sigma 公司; PTC240 PCR 仪、Dcode™ System for DGGE 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; SW-CJ-2FD 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; SPX-250B-2 生化培养箱, 上海博讯实业有限公司; XW-80A 微型漩涡混合仪, 上海沪西分析仪器厂有限公司。

**1.2.5 枯草芽孢杆菌发酵液、芽孢及抗菌素准备:** 枯草芽孢杆菌 BSD-2 经 PB 培养基发酵培养, 发酵液离心后上清除菌过滤即为抗菌素, 沉淀即为芽孢。以防病效果相当的抗菌素、发酵液及芽孢进行相关处理, 其中抗菌素的施用浓度为 20 倍稀释; 发酵液的施用浓度为 50 倍稀释, 其中芽孢数量为  $1 \times 10^6$  CFU/mL; 芽孢的施用数量为  $1 \times 10^8$  CFU/mL。

**1.2.6 黄瓜灰霉病菌孢子悬液制备:** 将黄瓜灰霉病菌病原菌于 PDA 培养基上进行培养, 用无菌水将平板上的灰霉病菌孢子洗入三角瓶中摇匀, 配制成黄瓜灰霉病菌孢子含量为  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的孢子悬

液, 待用。

### 1.3 试验设计

试验设计 PA、PG、PF、TA、TG、TF、无菌水空白对照和灰霉菌对照共 8 个处理, PA 为施用抗菌素 48 h 以后接种灰霉孢子; PG 为施用芽孢 48 h 后接种灰霉孢子; PF 为施用发酵液 48 h 后接种灰霉孢子; TA 为接种灰霉孢子 3 d 后(发病后)施用抗菌素; TG 为接种灰霉孢子 3 d 后(发病后)施用芽孢; TF 为接种灰霉孢子 3 d 后(发病后)施用发酵液; CK0 为无菌水处理; CK1 为接种  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的灰霉孢子悬液处理; 每个处理 24 盆, 设置 3 个重复。待黄瓜长出 5 片真叶时进行试验处理。

### 1.4 样品采集

实验处理 72 h 后采集第 3、4 叶位的黄瓜叶片 20 g, 将采集的样品分别装入灭菌纸袋, 用于叶际微生物数量的统计及叶际微生物菌群结构的测定。

### 1.5 可培养叶际微生物数量统计

采用传统稀释平板法统计可培养微生物的数量, 称取 20 g 混匀叶片置于 100 mL (0.1 mol/mL) 磷酸盐缓冲液中, 室温 200 r/min 振荡 30 min, 然后超声波处理 5 min<sup>[16]</sup>, 制得菌悬液, 依次倍比稀释后涂平板, 统计可培养细菌、放线菌、真菌的数量。细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基, 真菌采用 PDA 培养基, 放线菌采用高氏 1 号培养基。

### 1.6 DGGE 方法分析叶际微生物的菌群变化

**1.6.1 叶际微生物总 DNA 提取:** 将叶际菌悬液收集于离心管中, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集沉淀。

**1.6.2 细菌、真菌目的片段的 PCR 扩增:** 细菌 16S rRNA 基因 V3 区的 PCR 扩增, 引物采用 357F-GC/518R<sup>[17]</sup>, 由生工生物公司合成, PCR 产物长约 230 bp。PCR 反应体系为 50  $\mu$ L, 包括 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 25  $\mu$ L,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 的引物各 1  $\mu$ L, 0.008 g/L 的模板 5  $\mu$ L, 补足 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ L。采用 Touchdown-PCR, 程序为 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 62 °C 30 s, 每个循环温度降低 0.5 °C, 共 20 个循环; 94 °C 1 min, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s,

共 10 个循环；72 °C 5 min。

真菌 18S-5.8S rRNA 序列的 PCR 扩增，采用巢式 PCR 方法，引物 NS7 (5'-ATAACAGGTCTGTGATGC-3')/NS8 (5'-GCAGGTTACCTACGGA-3') 对真菌 18S rRNA 基因进行 PCR 反应，并以此为模板，用 ITG1/ITG2-GC<sup>[18]</sup>对真菌 18S rRNA 基因与 5.8S rRNA 基因之前的间隔序列进行 PCR 扩增，PCR 产物长约 370 bp。NS7/NS8 引物的 PCR 反应程序为：94 °C 4 min；94 °C 1 min，49 °C 45 s，72 °C 30 s，30 个循环；72 °C 5 min。ITG1/ITG2-GC 引物的 PCR 反应程序同上，退火温度为 56 °C。

**1.6.3 扩增产物的 DGGE 电泳：**采用 Bio-Rad 公司的 Dcode<sup>TM</sup> System 进行样品的 DGGE 分析，聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%，电泳缓冲液为 1×TAE，缓冲液温度为 60 °C，上样量为 20 μL，细菌 V3 区的 PCR 产物电泳所用的凝胶变性梯度为 40%–60%，130 V 电泳 30 min 后，换为 200 V 电泳 240 min；真菌 18S-5.8S rRNA 基因的间隔序列 PCR 产物电泳所用的凝胶变性梯度为 35%–55%，130 V 电泳 30 min 后，换为 200 V 电泳 210 min。电泳结束后采用银染法进行染色<sup>[19]</sup>。将电泳图用 Quantity One 分析软件对各样品的条带数量和灰度进行定量分析，并对各条带以 UPGMA 法进行聚类分析，分析其相似性，并采用 Shannon-Wiener 指数、Pielou 均匀度指数和丰富度等指数比较各个处理的菌落多样性<sup>[20]</sup>。

**1.6.4 DGGE 条带回收及测序分析：**用灭菌的手术刀片对 DGGE 条带进行切割，无菌 ddH<sub>2</sub>O 清洗 2 次，加入 20 μL TE 缓冲液 37 °C 浸泡过夜，取 3 μL 上清为模板进行 PCR 扩增，细菌 16S rRNA 基因的条带回收产物用 357F/518R 为引物，真菌 18S rRNA 基因的条带回收产物用 ITS1/ITS2 为引物进行 PCR 扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化后与 PMD19-T Simple Vector 连接，16 °C 反应 30 min 使目的片段与载体连接，连接后将 10 μL 载体转入 100 μL 的大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中，挑选白斑，送生工生物有限公司进行序列测定。测序

结果采用 NCBI 的 BLAST 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行同源性分析，采用 Sequence match 程序 (Ribosomal Database Project II -Release 9 website) 进行分类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄瓜叶际可培养细菌、真菌和放线菌的数量

黄瓜叶际可培养微生物数量的测定结果由图 1 可见，与无菌水处理 CK0 相比，其他 7 个处理在  $P=0.05$  水平上均可显著提高黄瓜叶际可培养细菌、放线菌和真菌的数量。

**2.1.1 黄瓜叶际可培养细菌的数量：**采用 PB 培养基测定黄瓜叶际可培养细菌数量的统计结果显示，接种灰霉病原菌可使黄瓜叶际细菌数量增加；PG、PF、TG、TF 处理黄瓜叶际可培养细菌的数量显著高于灰霉病原菌处理 CK1，PA 和 TA 处理黄瓜叶际可培养细菌的数量显著低于灰霉病原菌处理 CK1；其中喷施发酵液 PF、TF 处理黄瓜叶际可培养细菌的数量显著低于喷施芽孢 PG、TG 处理；PG 和 TG 处理黄瓜叶际可培养细菌的数量与灰霉病原菌处理相比可分别提高 63.51% 和 204.58%，其中 TG 处理叶际可培养细菌的数量最多。

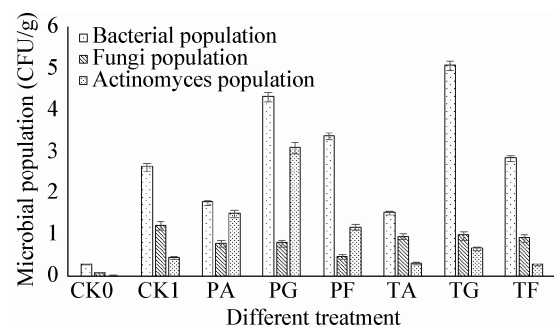


图 1 黄瓜叶际可培养微生物的数量

Figure 1 Culturable microbial population of cucumber phyllosphere

注：细菌数量(10<sup>7</sup> CFU/g)；真菌数量(10<sup>5</sup> CFU/g)；放线菌数量(10<sup>7</sup> CFU/g)。

Note: Bacterial population (10<sup>7</sup> CFU/g); Fungi population (10<sup>5</sup> CFU/g); Actinomyces population (10<sup>7</sup> CFU/g).

**2.1.2 黄瓜叶际可培养真菌的数量:** 采用 PDA 培养基测定黄瓜叶际可培养真菌数量的统计结果显示, 接种灰霉病原菌可使黄瓜叶际真菌的数量增加; PA、PG、PF、TA、TG、TF 处理与灰霉病原菌处理 CK1 相比, 均可显著降低黄瓜叶际可培养真菌的数量, 在接种灰霉病原菌之前喷施的各处理 PA、PG、PF 对黄瓜叶际可培养真菌降低的效果最好, 降低率分别为 35.47%、34.85%、61.24%, 其中喷施发酵液处理 PF 对黄瓜叶际可培养真菌的抑制效果最佳。

**2.1.3 黄瓜叶际可培养放线菌的数量:** 采用高氏 1 号培养基测定黄瓜叶际可培养放线菌数量的统计结果显示, PA、PG、PF、TG 处理黄瓜叶际可培养放线菌的数量高于灰霉病原菌处理 CK1; TA 和 TF 处理黄瓜叶际可培养放线菌数量低于灰霉病原菌处理 CK1; 其中接种病原菌前喷施各处理黄瓜叶际可培养放线菌的数量均高于接种病原菌后喷施各处理。喷施芽孢处理 PG 对黄瓜叶际可培养放线菌数量的影响最大, 与灰霉病原菌处理 CK1 相比增高率达 832.61%。

## 2.2 叶际微生物全基因组及 PCR 分析

从叶际样品中提取的微生物全基因组经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 通过条带位置参照 Marker 判断其大小为 1.5 kb。不同处理样品细菌 16S rRNA 基因的 V3 区 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测为大小约 230 bp 的 DNA 片段; 巢式 PCR 方法扩增真菌 18S-5.8S rRNA 基因的产物, 经琼脂糖凝胶电泳检测为大小约 350 bp 的 DNA 片段。

## 2.3 细菌 DGGE 图谱、聚类及测序分析

**2.3.1 细菌 DGGE 图谱分析:** 将不同处理样品细菌的 16S rRNA 基因的 V3 区 PCR 产物经变性梯度凝胶电泳获得黄瓜叶际细菌 DGGE 图谱(图 2), 不同处理的条带数从 10 到 17 条不等, 挑选部分峰密度较强的条带, 标记为 1-12 号。接种灰霉病原菌处理 CK1 和无菌水对照处理 CK0 相比, 共有条带 1、2、12 的峰密度均减弱, 增加了特有条带 7。PA、PG、PF、TA、TG、TF 各处理与接种灰霉病原菌处理 CK1 相比, 1、2、9、10、11、12 号条带的峰密

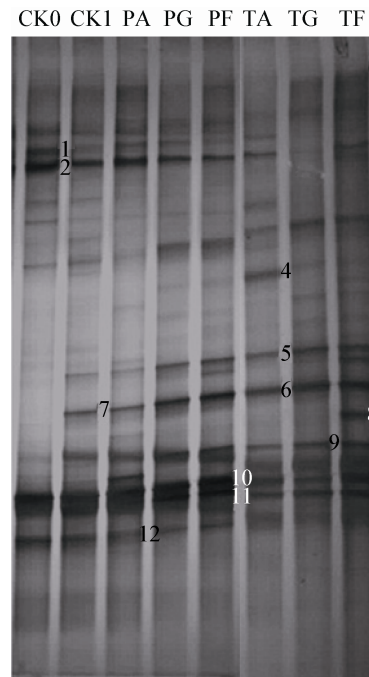


图 2 不同处理的黄瓜叶际细菌群落 DGGE 图谱  
Figure 2 The different treatment of bacterial community in cucumber phyllosphere by DGGE

注: 图中的数字代表不同处理的差异条带。

Note: Numbers in the figure represent differential band of different treatment.

度有不同程度的减弱甚至消失。在接种病原菌前喷施处理 PA 的 DGGE 图谱中, 条带 1 的峰密度有所减弱; PG 和 PF 处理 DGGE 图谱中, 条带 5、6、9、10、11 峰密度有明显增强。在接种病原菌后喷施处理 TA 的 DGGE 图谱中, 条带 1、2 减弱, 增加了特有条带 4; TG 处理 DGGE 图谱中, 条带 1、2 明显减弱; TF 处理 DGGE 图谱中, 条带 2 减弱, 增加了特有条带 8。

**2.3.2 细菌 DGGE 图谱的聚类分析:** 细菌群落 DGGE 图谱聚类分析结果显示(图 3): 无菌水处理 CK0、灰霉病原菌处理 CK1 和抗菌素喷施处理 PA 黄瓜叶际细菌群落相似度为 70%; 其中灰霉病原菌处理 CK1 与处理 PA 相似度为 79%。无菌水处理 CK0 与 PG、PF、TA、TF 处理叶际细菌种类的相似度为 40%, 与 TG 处理叶际细菌种类差异最为显著, 相似度为 35%。可见, 接种灰霉病原菌前各喷施处理对黄瓜叶际细菌的种类影响小, 且抗

菌素喷施处理 PA 对黄瓜叶际细菌种类的影响最小。

**2.3.3 凝胶条带回收及序列分析:** 将叶际细菌凝胶中的 1–12 号条带进行回收测序, 序列于 GenBank 数据库中比对的结果见表 1, 3 号条带未测出, 条带 1、2、7、12 号与不可培养的 *Bacterium* 有较近的亲缘关系, 4 号条带与 *Bacillus amyloliquefaciens* strain 的相似度达 99%, 5、6 号条带与 *Bacillus* 属序列相近, 相似度均大于或等于 99%, 9、11 号条带与 *Bacillus subtilis* strain BSD-2 相似度达 99%。8 号条带与 *Pseudomonas* sp. S-2 有较近的亲缘关系, 10 号条带与 *Acinetobacter* 有较近的亲缘关系。

## 2.4 真菌 DGGE 图谱、聚类及测序分析

**2.4.1 真菌 DGGE 图谱分析:** 在真菌群落图谱中(图 4) 接种灰霉病原菌前后喷施各处理与无菌水处理 CK0、灰霉病原菌处理 CK1 相比, 条带数明显减弱、甚至消失; 标记特异性条带为 13–15 号。接种灰霉病原菌的处理 CK1 和无菌水对照处理 CK0 相比, 增加了 14、15 号条带。接种病原菌前后喷

施各处理与接种灰霉病原菌的处理 CK1 相比, 条带 14、15 号条带基本消失; 接种灰霉病原菌后喷施各处理中 13、14、15 号条带有不同程度减弱。

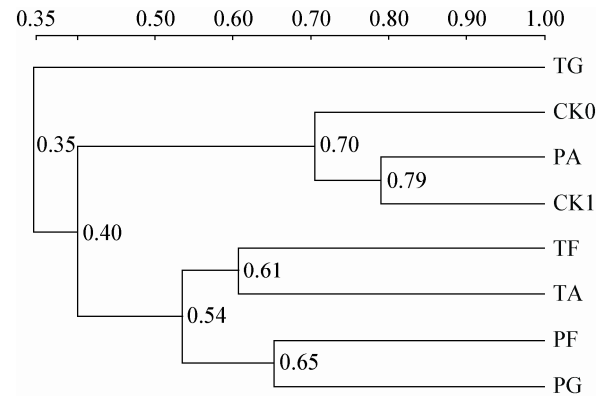


图 3 细菌 DGGE 指纹图谱的 UPGMA 聚类分析

Figure 3 The dendrogram of bacterial DGGE fingerprint using UPGMA

注: 图中的数字代表不同处理微生物种类相似度。

Note: Numbers in the figure represent different microbial species similarity.

表 1 细菌 DGGE 条带测序结果

Table 1 Phylogenetic affiliation of sequences retrieved from bacterium DGGE bands

条带编号 Band No.	最相似菌株 Closest relative	相似度 Percentage similarity (%)	亲缘关系 Phylogenetic affiliation	GenBank 登录号 GenBank accession No.
1	Uncultured soil bacterium clone A149 (JX489934.1)	100	Bacterium	KF031438
2	Uncultured bacterium clone 30-1-M13F(-47) (GQ866159.1)	100	Bacterium	KF006350
4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain zj01 (HQ910433.1)	99	<i>Bacillus</i>	KF006363
5	<i>Bacillus subtilis</i> strain PV7 (JQ812055.1)	99	<i>Bacillus</i>	KF006364
6	<i>Bacillus subtilis</i> strain BS-00 (KC660144.1)	100	<i>Bacillus</i>	KF006365
7	Uncultured bacterium clone amj-25-s-22 (FJ832152.1)	98	Bacterium	KF031439
8	<i>Pseudomonas</i> sp. S-2 (KC207087.1)	100	<i>Pseudomonas</i>	KF006366
9	<i>Bacillus subtilis</i> strain BSD-2 (EF523474.1)	99	<i>Bacillus</i>	KF031435
10	<i>Acinetobacter lwoffii</i> strain W1109-B7 (JQ815204.1)	100	<i>Acinetobacter</i>	KF031436
11	<i>Bacillus subtilis</i> strain BSD-2 (EF523474.1)	99	<i>Bacillus</i>	KF031437
12	Uncultured bacterium, clone DGGE gel A12-2 (HE860554.1)	99	Bacterium	KF031440

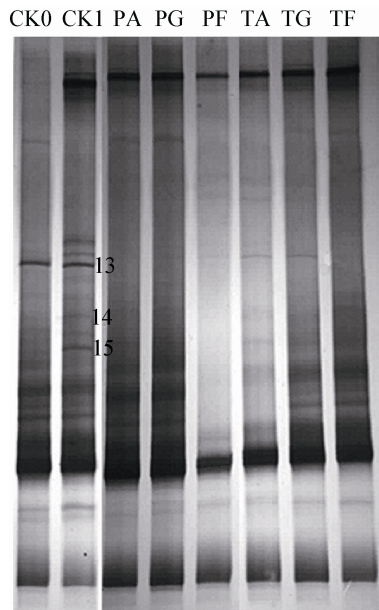


图4 不同处理的黄瓜叶际真菌群落 DGGE 图谱  
Figure 4 The different treatment of fungal community in cucumber phyllosphere by DGGE

注: 图中的数字代表不同处理的差异条带.

Note: Numbers in the figure represent differential band of different treatment.

**2.4.2 真菌 DGGE 图谱的聚类分析:** 真菌群落 DGGE 图谱聚类分析(图 5)结果显示, 无菌水对照处理 CK0 与接种灰霉病原菌的处理 CK1 黄瓜叶际真菌群落的差异显著, 位于两大聚类主分支, 相似度为 60%; 接种灰霉病原菌的处理 CK1 与处理 PG、PA、PF 黄瓜叶际真菌群落结构相似度均为 60%; 接种灰霉病原菌的处理 CK1 与处理 TA 相似度为 81%, 与处理 TF、TG 相似度为 78%。PF 处理叶际真菌菌群结构与无菌水处理 CK0 的相似度高达 85%。

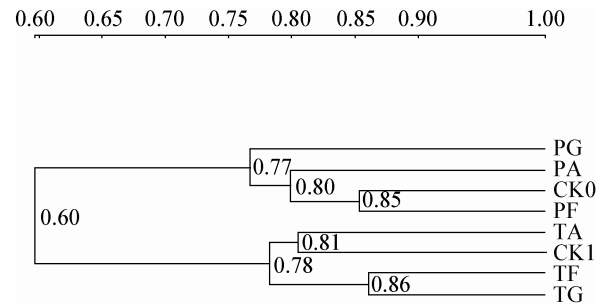


图5 真菌 DGGE 指纹图谱的 UPGMA 聚类分析

Figure 5 The dendrogram of fungal DGGE fingerprint using UPGMA

注: 图中的数字代表不同处理微生物种类相似度.

Note: Numbers in the figure represent different microbial species similarity.

**2.4.3 凝胶条带回收及序列分析:** 将叶际真菌凝胶中的 13–15 号条带进行回收测序, 序列于 GenBank 数据库中比对的结果见表 2, 13 号条带与不可培养真菌有较近的亲缘关系, 14、15 号条带与 *Botryotinia fuckeliana* 相似度达 99%。

**2.5 不同处理黄瓜叶际微生物丰富度、多样性和均匀度指数**

依据 DGGE 图谱条带峰密度分析微生物丰富度、多样性和均匀度的结果见表 3, 无菌水处理 CK0 黄瓜叶际微生物的多样性指数和均匀度指数高于其他处理, 接种灰霉病原菌的处理 CK1 黄瓜叶际微生物的丰富度指数和多样性指数均低于接种灰霉病原菌前后各喷施处理; 接种灰霉病原菌前喷施各处理黄瓜叶际微生物丰富度指数、多样性指数和均匀度指数均优于接种灰霉病原菌后喷施各处理, 且抗菌素喷施处理黄瓜叶际微生物丰富度指数、多样性指数和均匀度指数优于其他两个处理。

表 2 真菌 DGGE 条带测序结果

Table 2 Phylogenetic affiliation of sequences retrieved from fungal DGGE bands

条带编号 Band No.	最相似菌株 Closest relative	相似度 Percentage similarity (%)	亲缘关系 Phylogenetic affiliation
13	Uncultured fungus clone 60-6 (DQ834795.1)	98	Fungus
14	<i>Botryotinia fuckeliana</i> isolate UASWS0744 (HQ166517.1)	99	<i>Botryotinia fuckeliana</i>
15	<i>Botryotinia fuckeliana</i> isolate LGM002 (KC683713.1)	99	<i>Botryotinia fuckeliana</i>

表3 黄瓜叶际细菌和真菌 DGGE 条带丰富度、多样性及均匀度指数  
Table 3 Richness, Shannon-Wiener index, Pielou of the cucumber phyllosphere bacteria and fungal by the DGGE band patterns

处理 Treatment	丰富度指数 Richness index	Shannon-Wiener 多样性指数 Shannon-Wiener index	Pielou 均匀度指数 Pielou index
CK0	21.00	3.09	0.94
CK1	20.00	2.79	0.92
PA	23.00	2.88	0.93
PG	23.00	2.88	0.91
PF	21.00	2.93	0.91
TA	22.00	2.84	0.92
TG	22.00	2.82	0.91
TF	21.00	2.76	0.91

### 3 讨论

#### 3.1 对叶际可培养微生物数量的影响

外源物质的引入会使黄瓜叶际的微生物数量发生改变,提高叶际可培养细菌、放线菌和真菌的数量,与宿燕明<sup>[10]</sup>、冉淦侨等<sup>[11]</sup>的研究结果相同。枯草芽孢杆菌芽孢的喷施可显著提高叶际可培养细菌的数量,也可提高可培养放线菌的数量,且两者表现出正的相关性。枯草芽孢杆菌发酵液的喷施,可提高可培养细菌的数量,但对叶际可培养放线菌数量的影响较小。枯草芽孢杆菌抗菌素的喷施,对叶际可培养细菌和放线菌数量的影响最小。枯草芽孢杆菌芽孢、发酵液、抗菌素的喷施均可降低黄瓜叶际可培养真菌的数量,不同于 Russell 等<sup>[21]</sup>喷施苏云金芽孢杆菌(Bt)对甘蓝叶际可培养真菌数量没有影响的结果;其中接种灰霉病原菌之前喷施发酵液对可培养真菌的抑制效果最佳。

#### 3.2 对黄瓜叶际微生物菌群结构的影响

外源物质的引入可使微生物的菌群结构发生变化,相同于 Grosch 等<sup>[22]</sup>植物病原菌的引入对微生物群落产生显著影响的结果。枯草芽孢杆菌芽孢、发酵液和抗菌素的喷施,可增加叶际微生物的丰富度指数、Shannon-Wiener 多样性指数及 Pielou 均匀度指数;灰霉病原菌的喷施,可降低叶际微生物的丰富度指数、Shannon-Wiener 多样性指数及 Pielou 均匀度指数。

接种灰霉病原菌后喷施各处理与灰霉病原菌

处理相比,增加了两条特异条带;抗菌素喷施处理增加了解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 的相似条带,解淀粉芽孢杆菌菌株在生长过程中可产生一系列次生代谢产物<sup>[23]</sup>,包括抗菌蛋白、脂肽类物质或多肽等活性物质,能够抑制多种植物病原真菌和细菌<sup>[24]</sup>;发酵液喷施处理增加了假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 的相似条带,假单胞菌是重要的生防细菌,其中荧光假单胞菌最为典型<sup>[25]</sup>。接种灰霉病原菌前喷施各处理与灰霉病原菌处理叶际微生物 DGGE 条带结构相似;其抗菌素喷施对叶际细菌菌群结构的影响最小,具有良好的生态保持功效。

灰霉病原菌的引入使叶际真菌的 DGGE 条带中增加了两条特异性条带,均为富氏葡萄孢盘菌 *Botryotinia fuckeliana* 的相似条带。接种后喷施各处理可有效抑制病原菌导致条带减弱。接种前喷施各处理均可抑菌该病原菌的生长而使条带消失;使 Uncultured fungus clone 的相似条带消失;抗菌素喷施对叶际真菌的种类影响最小。异于 Russell 等<sup>[21]</sup>喷施苏云金芽孢杆菌(Bt)对甘蓝叶际可培养真菌的多样性没有影响的结果。

### 4 结论

枯草芽孢杆菌芽孢、发酵液和抗菌素的喷施可对黄瓜叶际微生物数量及微生物菌群结构产生不同的影响,但接种灰霉病原菌前的喷施各处理在对可培养真菌数量及菌群结构及多样性方面优于接种灰霉病原菌后喷施各处理。发酵液处理可在破坏



菌群结构较小的基础上有效抑制病原真菌的数量;芽孢处理可有效提高叶际可培养细菌和放线菌的数量,但抑制可培养真菌数量的效果差于发酵液处理;喷施抗菌素可抑制可培养真菌的数量,对细菌、真菌的菌群结构的影响较小,利于保持微生物的丰富度及均匀度。可见,同一株生防菌株不同的施入形式会对植株叶际的生态环境产生相应的影响,可因不同目的而采用不同施入方式,其作用机制需要进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Liu X, Mu CQ, Jiang XL, et al. Research progress of the metabolic substances produced by *Bacillus subtilis* and their application on biocontrol of plant disease[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006, 22(S1): 179-184 (in Chinese)  
刘雪, 穆常青, 蒋细良, 等. 枯草芽孢杆菌代谢物质的研究进展及其在植病生防中的应用[J]. 中国生物防治, 2006, 22(S1): 179-184
- [2] Lindow SE, Brandl MT. Microbiology of the phyllosphere[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(4): 1875-1883
- [3] Krimm U, Abanda-Nkwatt D, Schwab W, et al. Epiphytic microorganisms on strawberry plants (*Fragaria ananassa* cv. *Elsanta*): identification of bacterial isolates and analysis of their interaction with leaf surfaces[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 53(3): 483-492
- [4] Leveau JHJ, Lindow SE. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(6): 3446-3453
- [5] Sandhu A, Halverson LJ, Beattie GA. Bacterial degradation of airborne phenol in the phyllosphere[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(2): 383-392
- [6] Pan JG, Hu Q, Qi HY, et al. Advance in the research of phyllospheric microorganism[J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(2): 583-592 (in Chinese)  
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(2): 583-592
- [7] Zhang BG, Zhang HX, Jin B, et al. Effect of cypermethrin insecticide on the microbial community in cucumber phyllosphere[J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, 20(11): 1356-1362
- [8] Yang CH, Crowley DE, Borneman J, et al. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(7): 3889-3894
- [9] Chang LY, Wang Q, Mei RH. Effect of Nano-TiO<sub>2</sub> on the bacterial community of the cucumber phyllosphere[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2009, 17(1): 159-163 (in Chinese)  
常立艳, 王琦, 梅汝鸿. 纳米 TiO<sub>2</sub> 对黄瓜叶围细菌群落的影响[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(1): 159-163
- [10] Su YM. Effects of *Paenibacillus polymyxa* on quality of Rape and the microbial community in Rape phyllosphere and rhizosphere[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Forestry University, 2011 (in Chinese)  
宿燕明. 多粘类芽孢杆菌对油菜品质及其叶际、根际微生物群落的影响[D]. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2011
- [11] Ran CQ, Wang N, Dai JK, et al. Colonization of *Bacillus subtilis* BS24 on the apple leaf surface and their effects on the leaf microbial flora[J]. Biotechnology Bulletin, 2013(10): 131-136 (in Chinese)  
冉淦侨, 王楠, 戴佳银, 等. 枯草芽孢杆菌 BS24 在苹果叶面的定殖及其对叶面菌群的影响[J]. 生物技术通报, 2013(10): 131-136
- [12] Zhang BG, Bai ZH, Hoefel D, et al. Assessing the impact of the biological control agent *Bacillus thuringiensis* on the indigenous microbial community within the pepper plant phyllosphere[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 284(1): 102-108
- [13] Zhang D. Screening, identification and characterization of the antifungal substance of antagonistic endophytic bacteria against *Verticillium dahliae*[D]. Shijiazhuang: Master's Thesis of Hebei Normal University, 2008 (in Chinese)  
张铎. 棉花黄萎病拮抗内生细菌的筛选鉴定及其抗菌物质研究[D]. 石家庄: 河北师范大学硕士学位论文, 2008
- [14] Scherwinski K, Grosch R, Berg G. Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and negligible, short-term effects on nontarget microorganisms[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 64(1): 106-116
- [15] Yang W, Jiang ZQ, Guo YH, et al. Biocontrol efficacy and impact on the rhizosphere community structure of *Bacillus cereus* CH2 against verticillium wilt on eggplant in the field condition[J]. Microbiology China, 2011, 38(5): 715-721 (in Chinese)  
杨威, 蒋志强, 郭亚辉, 等. *Bacillus cereus* CH2 对茄子黄萎病的田间防治效果研究以及对根围微生物群落结构的影响[J]. 微生物学通报, 2011, 38(5): 715-721
- [16] Zhang BG, Tang L, Li ZM, et al. Effect of abamectin insecticide on the microbial community in broccoli phyllosphere[J]. Environmental Science, 2009, 30(5): 1292-1297 (in Chinese)  
张保国, 唐玲, 李祖明, 等. 阿维菌素杀虫剂对甘蓝叶际微生物群落结构的影响[J]. 环境科学, 2009, 30(5): 1292-1297
- [17] Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700
- [18] Hamelin RC, Bérubé P, Gignac M, et al. Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested multiplex PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(11): 4026-4031
- [19] Lang JJ, Jiang H, Ran W, et al. Control of cotton *Verticillium* wilt and fungal diversity of rhizosphere soils by bio-organic fertilizer[J]. Biology and Fertility of Soils, 2012, 48(2): 191-203
- [20] Luo HF, Qi HY, Zhang HX. Assessment of the bacterial diversity in fenvalerate-treated soil[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, 20(5): 509-515
- [21] Russell D, Chard J, McKinlay R. Effect of *Bacillus thuringiensis* and a pyrethroid insecticide on the leaf microflora of *Brassica oleracea*[J]. Letters in Applied Microbiology, 1999, 28(5): 359-362
- [22] Grosch R, Scherwinski K, Lottmann J, et al. Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community[J]. Mycological Research, 2006, 110(12): 1464-1474
- [23] Scholz R, Vater J, Budiharjo A, et al. Amylocyclin a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(10): 1842-1852
- [24] Wang YG, Wang JH, Quan CS, et al. Purification and antifungal characterization of an antifungal substance from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. China Biotechnology, 2007, 27(12): 41-45 (in Chinese)  
王英国, 王军华, 权春善, 等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌活性物质的分离纯化及抑菌活性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(12): 41-45
- [25] Xiao H. The research situation of *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* spp. against plant disease[J]. World Pesticides, 2014, 36(2): 23-26 (in Chinese)  
筱禾. 两类生防细菌对植物病害的防治研究[J]. 世界农药, 2014, 36(2): 23-26