

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

杨威¹ 蒋志强^{1,2} 郭亚辉³ 郭坚华^{1*}

(1. 南京农业大学植物保护学院植物病理系 江苏省生物源农药工程中心 农业部病虫检测与治理重点实验室
江苏 南京 210095)

(2. 南通市出入境检验检疫局 江苏 南通 226005)

(3. 河北工程大学农学院 河北 邯郸 056021)

摘要: 拟对 *Bacillus cereus* CH2 菌株在田间条件下, 对茄子黄萎病的防治效果及其对茄子根围土壤微生物群落结构和功能的影响进行研究。田间试验显示蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* CH2 对茄子黄萎病有 60.6% 的防治效果。对菌剂和清水对照处理小区茄子根围土壤的 Biolog 分析显示, CH2 的使用不会对根围土壤原有微生物群落结构和功能多样性产生显著影响, 同时对六大类碳源利用能力的分析结果显示, CH2 的使用能在植株生长前期提高根围土壤微生物群体对除酚类化合物的五大类碳源的利用能力。

关键词: 茄子黄萎病, 微生物群落, 多样性, 碳源

Biocontrol efficacy and impact on the rhizosphere community structure of *Bacillus cereus* CH2 against verticillium wilt on eggplant in the field condition

YANG Wei¹ JIANG Zhi-Qiang^{1,2} GUO Ya-Hui³ GUO Jian-Hua^{1*}

(1. Key Laboratory of Monitoring and Management of Crop Diseases and Pest Insects, Ministry of Agriculture, Engineering Center of Bioresource Pesticide in Jiangsu Province, Department of Plant Pathology, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

(2. Nantong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nantong, Jiangsu 226005, China)

(3. College of Agriculture, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056021, China)

Abstract: In this study we aimed to evaluate the biocontrol efficacy of *Bacillus cereus* CH2 against *Verticillium* wilt on eggplant in field condition and its influence on rhizosphere microbial community structure. Based on the results we can make a conclusion that *Bacillus cereus* CH2 could reduce the

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA10A211)

* 通讯作者: Tel: 86-25-84395425; E-mail: jhguo@njau.edu.cn

收稿日期: 2010-09-19; 接受日期: 2011-01-04

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

disease incidence of *Verticillium* wilt on eggplant at 60.6%. The Biolog data showed that inoculating of CH2 had no significant impacts on the diversity of microbial community in rhizosphere. It also showed that its inoculation could increase utilizing ability of five groups of carbon sources except the phenolic compounds during the early growth stage of plants.

Keywords: *Verticillium* wilt, Microbial community, Diversity, Carbon source

Garland 和 Mills (1991)建立起一套通过对 95 种不同碳源的利用来分析细菌群体潜在功能多样性的 Biolog GN 系统^[1], 但该系统主要是用于病原细菌的鉴定^[2]。Choi 和 Dobbs 在此基础上开发了专门用于群落结构分析和微生态研究的 EcoPlateTM^[3]。与其他方法如磷脂酸分析相比, Biolog 系统对环境变化的监测更灵敏, 并且对温度和水等主要环境影响因素的反应更灵敏。到目前为止, Biolog 系统已经被广泛用于分析被污染土壤^[4-5]、植物根围土壤^[6-8]、极地土壤^[9]、用杀虫剂处理或接种微生物土壤^[10-11]的结构、功能及其变化的分析。

Biolog 系统用于检测生防菌对土壤微生物群落的影响始于 1991 年, Bej 等人利用 Biolog 系统分析了基因改良菌株对土壤原有微生物群落结构和功能的影响^[11]。但是用于研究使用生防菌后植物根围微生物群落的变化则始于 2003 年, Björklöf 等人利用 Biolog 系统结合其他方法分析了用基因标记的荧光假单胞菌对白桦树根围微生物群落的影响^[12]。现在 Biolog 系统已经成为一种快速简洁的检测土壤微生物群落变化的常用方法。

茄子黄萎病是由轮枝菌属(*Verticillium*)真菌引起的土传维管束病害, 是茄子上最有破坏性的病害之一^[13], 据不完全统计, 重病地区发病田块达 40%–100%, 造成产量直接损失达 10%–40%^[14], 病害的发生可大幅降低茄子的产量和品质。黄萎病主要为害叶片, 在茄子各个生长期均可发病, 以结果期发病最重。近年来, 我国保护地茄子种植面积迅速扩大, 而保护地的特殊光温、水肥条件及连年频繁种植使茄子黄萎病危害逐年加重。目前对于该病害的防治主要是化学防治和嫁接处理^[15-16]。*B. cereus* CH2 是本实验室从连云港赣榆县番茄根围土壤中分离到的一种能够产几丁质酶的菌株, 该菌株本身及其发酵上清液和几丁质酶液对 *Verticillium dahliae* 有拮抗作用, 在温室试验中, 该菌株对于茄

子黄萎病的防治效果能够达到 69.69%^[17]。本研究拟对 *Bacillus cereus* CH2 菌株在田间条件下对茄子黄萎病的防治效果及其对茄子根围土壤微生物群落结构和功能的影响进行研究。

1 材料与方法

1.1 菌株培养

从 R2A (g/L, 酵母粉 0.5, 酪蛋白胨 0.25, 肉蛋白胨 0.25, 水解酪蛋白 0.5, 葡萄糖 0.5, 淀粉 0.5, 丙酮酸钠 0.3, 磷酸氢二钾 0.3, 水合硫酸镁 0.024, 琼脂 15, pH 7.2) 平板上将该菌接种到 R2A 培养液中, 30 °C、200 r/min 培养, 36 h 后 7 000 r/min 离心 10 min, 收集到的菌体用少量无菌水悬浮, 混匀并用滴液法测定悬浮液中活菌浓度。

1.2 田间试验

田间实验在河北邯郸进行。实验分为 *B. cereus* CH2 菌剂处理和清水对照, 每个处理设 4 个重复/小区, 各小区在田间随机排列。处理时, 先将腐熟的有机肥均匀撒在定植沟内, 将菌剂按每小区(40 m²) 30 mL 菌剂(浓度 2.7×10¹² CFU/mL)对水稀释 1 000 倍后用农用喷雾器均匀喷在施用过有机肥的土壤表面, 然后盖上地膜。清水对照与菌剂处理方法相同。处理 15 d 后进行移栽。

1.3 病情统计标准

实验中, 统计茄子发病情况参照 Stinson 等人 (2003) 的病情分级标准为: 0 级: 健株; I 级: 植株症状轻微, 叶片有小面积褪色, 植株不矮化; II 级: 中度发病症状, 叶片发黄发病, 双生叶的部分萎蔫, 植株轻度矮化; III 级: 叶片彻底萎蔫, 所有叶片受侵染, 植株严重矮化。

1.4 茄子根围土壤样品的采集和样品处理

采集土样时将茄子整株挖出, 抖掉附着在非根围土后, 用毛刷将附着在根系上的土刷下来收集。

每个小区分 5 点取样并分开保存。土样共分 4 次采集, 分别为菌剂处理前 1 d、移栽前 2 d、移栽后 7 d 和移栽后 40 d。取样时分别从菌剂处理和清水对照小区取土。菌剂处理的土样用 sb 系列表示, 清水对照用 sc 系列表示, 4 批土分别编号为: sc1、sb1、sc2、sb2、sc3、sb3、sc4、sb4。其中的数字代表取样的批次。在处理样品时, 将土样用网径 2 mm 的铁筛过筛, 然后从同一批次同一小区的 5 点土样中各称取 2 g 并混匀作为作为该小区用于 Biolog 分析的样品。每次分析均用新鲜土样。

1.5 Biolog 检测

Biolog 操作程序: 称土(已换算成烘干土) 5.00 g, 放在 45 mL 生理盐水(0.85%氯化钠溶液) 中, 振荡 30 min 后静置 5 min, 倒出上清液到加样槽中, 摇匀加入 EcoPlate 中, 每个孔中加样 125 μ L。25 $^{\circ}$ C 恒温培养, 测定时间间隔为: 0 天开始, 每隔 1 天测 1 次。

Biolog 数据的分析: 土壤群落生物功能多样性分别用 Shannon 指数和均度、Simpson 指数、McIntosh 指数和均度等表示。Shannon 指数和均度用来评估微生物群落丰富度和均度, Simpson 指数用来评估某些最常见种的优势度, McIntosh 指数和均度来评估基于群落物种多维空间上的欧几里德距离的多样性和菌度。在分析微生物群落对 EcoPlate 上六大类碳源(聚合物、碳水化合物、有机酸、酚类、胺类和氨基酸)时采用温育 96 h 后这些碳源所在孔的颜色平均变化率(AWCD)来进行分析。为了比较各个样品微生物群落对单一碳源利用能力的差异, 用

SPSS11.0 对所有样品数据进行主成分分析(Principal component analysis)

2 结果与分析

2.1 田间防治实验

B. cereus CH2 对茄子黄萎病的田间防效见表 1。

从表 1 中可以看出, 菌株 CH2 在田间对茄子黄萎病具有很明显的防治效果, 与清水对照相比其防效可达 60.6%。相比于温室中防治效果略有降低, 造成这一现象的主要原因可能是由于田间环境条件相对于温室来说更加复杂, 对于生防菌株的影响也相对较大。

表 1 <i>B. cereus</i> CH2 对茄子黄萎病的田间防效 Table 1 Biocontrol efficacy of <i>B. cereus</i> CH2 against Verticillium wilt on eggplant in the field		
处理 Treatment	病情指数 Disease severity (%)	防病效果 Biocontrol efficacy (%)
CH2 菌剂 <i>B. cereus</i> CH2	15.4b	60.6
清水对照 Blank control	39.1a	—

注: 表中数据均为 4 个重复的平均值($P>0.05$, LSD test).
Note: Data means average value of four repeats ($P>0.05$, LSD test).

2.2 根围土壤微生物群落功能多样性变化

由表 2 可见, 处理前田间土壤的微生物群落结构和功能多样性分布均匀, 各小区间差异不显著。菌剂处理后, 各个处理的土壤微生物群落结构和多样性在不同时期出现微小变化, 从而可以看出该菌剂的使用对土壤中原有微生态有较小的影响。

表 2 反映根围土壤微生物群落功能多样性变化的 5 种指数的平均值 Table 2 Means numbers of five different indexes which can reflect the change of microbial community in rhizosphere soil					
土壤样品 Soil sample	Shannon 指数 Shannon index	Shannon 均度 Shannon evenness	Simpson 指数 Simpson index	McIntosh 指数 McIntosh index	McIntosh 均度 McIntosh evenness
sc1	3.195	0.928	47.50	5.890	0.951
sb1	3.200	0.931	47.40	6.000	0.949
sc2	3.197	0.935	47.87	5.883	0.953
sb2	3.219	0.937	46.19	6.691	0.959
sc3	3.192	0.930	49.84	5.628	0.952
sb3	3.175	0.927	50.21	6.552	0.947
sc4	3.269	0.952	43.96	7.124	0.967
sb4	3.210	0.935	47.67	7.119	0.957

注: t -检验均不显著($P<0.05$).
Note: Data are not significant different as determined by the t -test ($P<0.05$).

2.3 土壤样品微生物群落对单一碳源利用能力的主成分分析

从图 1 可以看出,在处理前,对照小区和待处理小区土壤的碳源利用能力(聚合物)几乎完全一致(sc1 和 sb1 几乎重叠)。从处理开始,土壤中的微生物群落碳源利用能力开始变化,移栽前 2 d (sc2 和 sb2)和移栽后 7 d (sc3 和 sb3)的土壤微生物群落对碳源的利用能力差异较大,但此后处理和对照间的差异随着植株的生长时间逐渐变小,到移栽后 40 d 时,两个处理群落间碳源利用能力的差异已经很小(sc4 和 sb4)(由于其他几种碳源的分析图基本一致,此处仅以聚合物作为例子显示)。

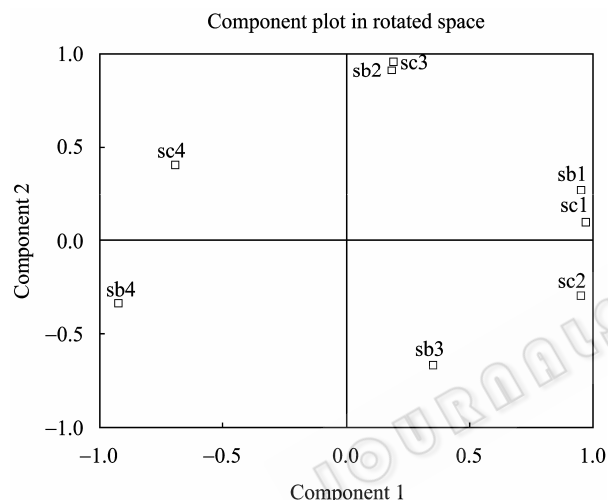


图 1 不同土壤样品中微生物群落对单一碳源(聚合物)利用能力的主成分分析

Fig. 1 Principal analysis of sole carbon source (polymers) utilizing ability of microbial community in different soil samples

注: PC1 和 PC2 总共聚集了 86.9% 的数据变异, 各样品点在主成分坐标系中的位置可以反映样品间在碳源利用能力上的差异。

Note: 86.9% data variation were gathered in PC1 and PC2, position of each samples in the Principal component coordinate system reflects the difference in carbon source utilizing ability.

2.4 同一处理不同批次土壤对 6 种不同碳源的利用

处理前所取各小区土样的微生物群落对六大类碳源的利用能力几乎没有差异,但从菌剂处理开始,处理与对照间的差异逐渐显现,随着茄子植株的生长,这种差异又逐渐缩小,到移栽后 40 d 时,菌剂处理和清水对照土壤微生物群落对六大类碳源的利

用能力已经基本相同。除了酚类化合物,菌剂处理土壤微生物群落对其余五大类碳源的利用能力基本都是先比清水对照高,随后两者能力差异又逐渐缩小并在 40 d 时基本相同(图 2)。

3 讨论

随着对化学杀菌剂和杀虫剂对环境 and 人体健康影响的关注,人们不断寻求对人体更安全,对环境影响更小的替代产品。由于对人畜安全,对环境友好,生防制剂作为替代产品应用有较好的前景。本实验室筛选到的 *Bacillus cereus* CH2 在温室和田间实验中均对茄子黄萎病有一定的防效,田间防治效果可以达到 60.6%。到目前为止,已经有较多 *B. cereus* 菌株被研究用于生物防治。其中最典型的是 *B. cereus* UW85,它已经被大量田间实验证明对美国中西部地区的大豆根腐病和疫霉菌引起的猝倒病有可靠的防效^[18],并且已在美国环境署作为大豆的种子处理剂登记注册。但是,到目前为止尚未见 *B. cereus* 菌株用于对茄子黄萎病生物防治的相关研究报道。

利用生物农药活菌制剂防治茄子黄萎病对生态环境和其他生物的非目标效应还不清楚。Cook 等(1996)评论 BCAs 潜在的非目标效应时提出,非目标效应可能包括:竞争性取代、过敏、毒素和致病性。通过争夺营养和空间,BCAs 会排除或取代环境中原有的非目标微生物;人类或其他动物可能会对 BCAs 的孢子或制剂过敏,同时 BCAs 所释放的帮助控制病害的抗生素或生物碱对非目标生物可能会有毒;从风险管理方面来看最受关注的是 BCAs 可能会侵染非目标生物,而不侵染目标生物^[19]。另外,还要考虑的是 BCAs 被释放后繁殖并传播到非目标环境中,这可能会对当地土著生物产生难以预料的影响^[20]。有些 BCAs 是植物病原物的无毒菌株,通过与有毒菌株竞争而起到防效,但这存在一种可能,即在无毒和有毒菌株间发生基因转移,从而导致 BCAs 获得致病力并因此失去生防能力^[21]。因此,不论是经过基因修饰或自然的微生物在商业化应用之前,一定要对其在农业环境中的行为和对土壤生态系统的潜在影响进行风险评估。

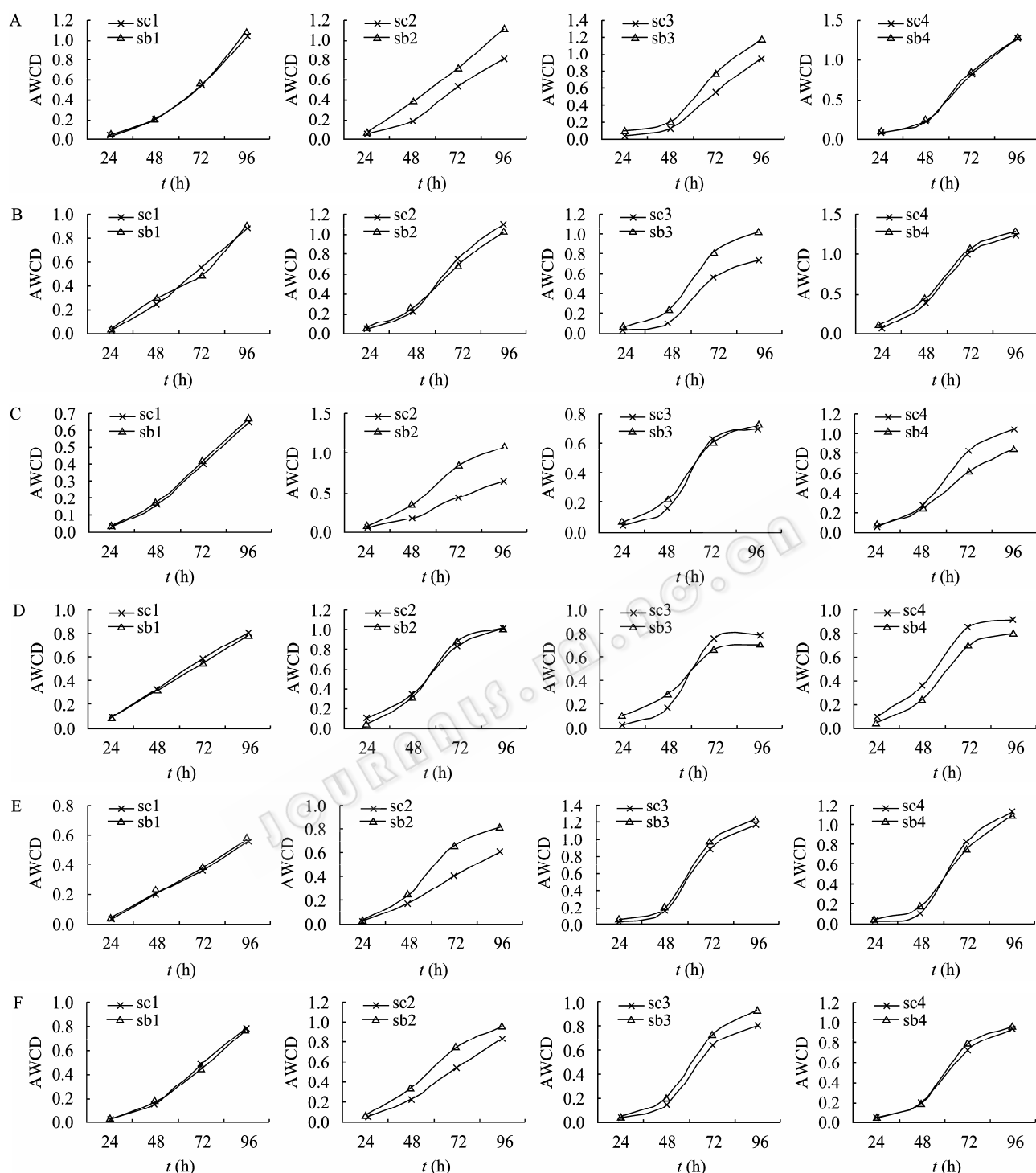


图2 同一小区不同批次土壤对六大类碳源的利用

Fig. 2 Utilizing ability of six major carbon source of the soil samples from different time

注: 图中sc, sb系列分别代表清水对照和菌剂处理, 数字则代表取样的批次。图中字母代表六大类不同碳源, 具体为: A: 聚合物; B: 糖类; C: 有机酸类; D: 酚类; E: 胺类; F: 氨基酸类。

Note: sc: Represent blank control; sb: Represent treatment of *B. cereus* CH2; Number means the time of sampling. Character in the picture represent the six kind of carbon source as described followed: A: Polymers; B: Sugars; C: Organic acids; D: Phenolic compounds; E: Amines; F: Amino acids.

本研究首次报道了利用 *B. cereus* 防治茄子黄萎病, 且首次对茄子黄萎病生物防治过程中根围土壤微生物群落结构和功能变化进行了分析。通过对菌剂和清水处理后茄子根围土壤微生物群落的 Biolog 分析发现 *B. cereus* CH2 的使用对茄子根围土壤的微生物结构和功能多样性没有显著影响, 这一结果与其他学者关于生防细菌非目标效应的研究结果相一致^[22-23], 即外源施用的生防菌剂对于所施用环境原有微生态不会产生显著影响^[24-26]。这一点正符合人们对生物农药的期望, 即对环境安全。不仅如此, *B. cereus* CH2 的应用在茄子植株生长前期提高了根围土壤对除酚类化合物之外的五大类碳源的利用能力。对于酚类化合物的利用能力, 对照土壤比处理土壤要高, 其中的原因可能是 *B. cereus* CH2 的使用抑制了能利用该类化合物的微生物群落的生长, 这种抑制作用的原因可能是营养竞争或其他因素所造成, 这有待于以后的研究。

参 考 文 献

- [1] Garland JL, Mills AL. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source utilization[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(8): 2351-2359.
- [2] Klirk JL, Beaudette LA, Hart M, et al. Methods of studying soil microbial diversity[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 58(2): 169-188.
- [3] Choi KH, Dobbs FC. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities[J]. Microbiol Methods, 1999, 36(3): 203-213.
- [4] Derry AM, Staddon WJ, Trevors JT. Functional diversity and community structure of microorganisms in uncontaminated and creosote-contaminated soils as determined by sole-carbon-source-utilization[J]. World J Microbiol Biotechnol, 1998, 14(4): 571-578.
- [5] Konopka A, Oliver L, Turco RF. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology[J]. Microb Ecol, 1998, 35(2): 103-115.
- [6] Ellis RJ, Thompson IP, Bailey MJ. Metabolic profiling as a means of characterizing plant-associated microbial communities[J]. FEMS Microbiol Ecol, 1995, 16(1): 9-17.
- [7] Grayston SJ, Campbell CD. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and sitka spruce (*Picea sitchensis*)[J]. Tree Physiol, 1996, 16(11/12): 1031-1038.
- [8] Grayston SJ, Wang SQ, Campbell CD, et al. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere[J]. Soil Biol Biochem, 1998, 30(3): 369-378.
- [9] Derry AM, Staddon WJ, Kevan PG, et al. Functional diversity and community structure of micro-organisms in three arctic soils as determined by sole-carbon-source-utilization[J]. Biodivers Conserv, 1999, 8(2): 205-221.
- [10] el Fantroussi S, Verschuere L, Verstraete W, et al. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(3): 982-988.
- [11] Bej AK, Perlin M, Atlas RM. Effect of introducing genetically engineered microorganisms on soil microbial community diversity[J]. FEMS Microbiol Ecol, 1991, 86(2): 169-176.
- [12] Björklöf K, Sen R, Jørgensen KS. Impacts of an inoculated *Pseudomonas fluorescens* on the microbial communities of the rhizosphere of birch[J]. Microbial Ecology, 2003, 45: 39-52.
- [13] Bletsos FA, Gantidis ND, Tsialtas JT. Heavy Metal Content of Eggplant Fruits Grown on Different Levels of Sewage Sludge[M]. Acta Hort, (ISHS) 549, 2001: 153-158.
- [14] 庄勇, 王述彬. 茄子黄萎病的发生和流行及综合防治技术[J]. 上海蔬菜, 2006, (4): 61-63.
- [15] 冯东昕, 李宝栋, 马宾生, 等. 嫁接对茄子黄萎病的抗性及其某些生物学性状的影响[J]. 中国蔬菜, 2000, (4): 13-15.
- [16] 王振跃, 曹丽华, 李洪连, 等. 不同砧木嫁接对茄子黄萎病防治效果的初步研究[J]. 河南农业大学学报, 2004, 38(4): 441-443.
- [17] Li JG, Jiang ZQ, Xu LP, et al. Characterization of chitinase secreted by *Bacillus cereus* strain CH2 and evaluation of its efficacy against *Verticillium wilt* of eggplant[J]. BioControl, 2008, 53(6): 931-944.
- [18] Osburn RM, Milner JL, Oplinger ES, et al. Effect of *Bacillus cereus* UW85 on the yield of soybean at two field sites in Wisconsin[J]. Plant Dis, 1995, 79(6): 551-556.
- [19] Cook RJ, Bruckart WL, Coulson JR, et al. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation[J]. Biol Control, 1996, 7(3): 333-351.
- [20] Simberloff D, Stiling P. How risky is biocontrol control?[J]. Ecology, 1996, 77(7): 1965-1974.

[21] Gullino ML, Migheli Q, Mezzalama M. Risk analysis for biological control agents: antagonistic *Fusarium* spp. as a case study[J]. *Plant Dis*, 1995, 79(12): 1193–1201.

[22] 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]. *Applied Soil Ecology*, 2000, 15(2): 211–225.

[23] 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]. *Microbiology Ecology*, 2000, 33(1): 41–49.

[24] Scherwinski K, Wolf A, Berg G. Assessing the risk of biological control agents on the indigenous microbial communities: *Serratia plymuthica* HRO-C48 and *Streptomyces* sp. HRO-71 as model bacteria[J]. *BioControl*, 2007, 52(1): 87–112.

[25] Schwarzenbach K, Enkerli J, Widmer F. Effects of biological and chemical insect control agents on fungal community structures in soil microcosms[J]. *Applied Soil Ecology*, 2009, 42(1): 54–62.

[26] Vasiliauskas R, Lygis V, Thor M, et al. Impact of biological (Rotstop) and chemical (urea) treatments on fungal community structure in freshly cut *Picea abies* stumps[J]. *Biological Control*, 2004, 31(3): 405–413.

征订启事

2011 年部分生物、农林类学术期刊联合征订表(2-2)

刊物名称	邮发代号	刊 期	年价(元)	网 址	E-mail
微生物学通报	2-817	月 刊	576	http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN	tongbao@im.ac.cn
微生物学报	2-504	月 刊	660	http://journals.im.ac.cn/actamicrocn/	actamicro@im.ac.cn
武汉植物学研究	38-103	双月刊	180	http://whzwxxyj.cn	editor@rose.whiob.ac.cn
畜牧兽医学报	82-453	月 刊	360	www.xmsyxb.com	xmsyxb@263.net
遗传	2-810	月 刊	600	www.chinagene.cn	yczz@genetics.ac.cn
遗传学报	2-819	月 刊	600	www.jgenetgenomics.org	jgg@genetics.ac.cn
云南植物研究	64-11	双月刊	150	http://journal.kib.ac.cn	bianji@mail.kib.ac.cn
植物遗传资源学报	82-643	双月刊	120	www.zwyczy.cn	zwyczyxb2003@163.com
植物学报	2-967	双月刊	480	www.chinbullbotany.com	cbb@ibcas.ac.cn
中国实验动物学报	2-748	双月刊	120	www.calas.org.cn	A67761337@126.com
中国生态农业学报	82-973	双月刊	210	www.ecoagri.ac.cn	editor@sjziam.ac.cn
中国生物工程杂志	82-673	月 刊	960	www.biotech.ac.cn	biotech@mail.las.ac.cn
中国水产科学	18-250	双月刊	180	www.fishscichina.com	zgscckx@cafs.ac.cn
中国水稻科学	32-94	双月刊	120	www.ricesci.cn	cjrs@263.net
作物学报	82-336	月 刊	600	www.chinacrops.org/zwxp	xbzw@chinajournal.net.cn