

DOI: 10.5846/stxb201303050350

杜威, 江萍, 王彦苏, 吕立新, 王宏伟, 卜元卿, 刘常宏, 戴传超. 白僵菌施加对水稻三种抗氧化酶活力及叶际微生物多样性的影响. 生态学报, 2014, 34(23): 6975-6984.

Du W, Jiang P, Wang Y S, Lü L X, Wang H W, Bu Y Q, Liu C H, Dai C C. Effects of *Beauveria bassiana* on paddy antioxidant enzymes activities and phyllosphere microbial diversity. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(23): 6975-6984.

白僵菌施加对水稻三种抗氧化酶活力 及叶际微生物多样性的影响

杜 威¹, 江 萍¹, 王彦苏¹, 吕立新¹, 王宏伟¹, 卜元卿², 刘常宏³, 戴传超^{1,*}

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 江苏省微生物与功能基因组学重点实验室, 南京 210023;

2. 环境保护部南京环境科学研究所, 南京 210042; 3. 南京大学生命科学学院, 南京 210093)

摘要: 为了考察白僵菌使用后的生态安全性, 研究了白僵菌施加对水稻 3 种保护酶活力及叶际微生物多样性的影响。使用荧光定量 PCR 对喷洒白僵菌孢子悬液的水稻叶际提取总 DNA 并进行荧光定量 PCR 扩增, 发现白僵菌可以在水稻叶际残留达 30 d 之久, 并且初始喷施浓度越大, 衰减速率越高。与施加化学农药相比, 施加白僵菌没有对水稻叶片的 3 种抗氧化酶活力带来不利影响。白僵菌处理组 SOD、POD 活力在第 10 天时高于对照组 20.38%、8.65%, 而 CAT 活力在第 30 天时最高高于对照组 33.67%, 在第 30 天时, 化学农药导致 CAT 活力相比较对照组下降了 42.71%。使用 DGGE 分析表明白僵菌对水稻叶际细菌、真菌微生物群落结构影响较小, 并且白僵菌处理组微生物群落结构相似度、香农指数及条带数均较高。结果表明白僵菌是一种环境友好型的微生物农药。

关键词: 白僵菌; 水稻; 实时定量 PCR; 微生物区系; 抗氧化酶系

Effects of *Beauveria bassiana* on paddy antioxidant enzymes activities and phyllosphere microbial diversity

DU Wei¹, JIANG Ping¹, WANG Yansu¹, LÜ Lixin¹, WANG Hongwei¹, BU Yuanqing², LIU Changhong³, DAI Chuanchao^{1,*}

1 Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Industrialization of Microbial Resources, Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China

2 Nanjing Institute of Environmental Science, Ministry of Environment Protection, Nanjing 210042, China

3 College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Abstract: *Beauveria bassiana* is a well-known entomopathogenic fungi with worldwide distribution that can be used as a microbial pesticide. To date, studies of *B. bassiana* have focused on its insecticidal mechanism, symbiosis with plants and antagonism of plant pathogens; however, few studies of its influence on the microecological phyllosphere and at physiological level of the plant have been conducted. To investigate the ecological security of *B. bassiana* in the paddy phyllosphere, we evaluated the effects of different concentrations of *B. bassiana* spore suspensions and a chemical pesticide (acephate) on paddy phyllosphere microbial flora and protective enzyme activities by a potted trial. *B. bassiana* were then induced to express the *egfp* gene (green fluorescent protein gene) through transformation with a vector, after which real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to quantify the organisms and measure their dynamics in a paddy

基金项目: 环境保护部环保公益性行业科研专项(201009023)

收稿日期: 2013-03-05; 网络出版日期: 2014-03-18

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: daichuanchao@njnu.edu.cn

phyllosphere. We also evaluated the effects of different concentrations of *B. bassiana* suspensions on the phyllosphere microflora using DGGE. To accomplish this, *B. bassiana* specific DNA primers were designed based on the green fluorescent protein sequence marked *B. bassiana*. Amplification of *B. bassiana* DNA using the eGPF-F1/eGFP-R1 primers yielded a single 289bp-long product with a detection limit of 10fg/ μ L of *B. bassiana* genomic DNA. The pot experiments, which were conducted in the botanical garden of Nanjing Normal University, consisted of the following seven treatments: sterile water applied as a control (CK), inoculation with the larva of *Chilo suppressalis* (A), application of the *B. bassiana* spore suspension at 7.5×10^4 spores/ml (B), 7.5×10^5 spores/ml (C), 7.5×10^6 spores/ml (D), or 7.5×10^7 spores/ml (E), application of acephate emulsifiable concentrates (F). Each treatment group was covered with gauze (3 m $\times$ 0.7 m $\times$ 1.5 m) after treatment. Fluorescence quantitative PCR analysis of the rice phyllosphere DNA revealed that *B. bassiana* was maintained for at least 30 days on the leaves of paddy plants after application, but when a higher initial dosage of the *B. bassiana* was applied, the *B. bassiana* population on the phyllosphere decreased more rapidly. When compared with chemical pesticide, *B. bassiana* did not significantly affect the antioxidant activity of three enzymes in paddy leaves. Specifically, the enzymatic activities of SOD and POD in *B. bassiana* treatment groups were 20.38 and 8.65% higher, respectively, than those in the CK group on the tenth day, while the activity of CAT was 33.67% higher than that of the CK group on day 30. However, the enzymatic activity of CAT in the F group was 42.71% lower than that of the CK group on day 10. DGGE cluster analysis showed that *B. bassiana* did not significantly influence the bacterial or fungal community structures on the paddy phyllosphere, and the microbial community structure similarity, Shannon index and band number in the *B. bassiana* treated group were higher than in the negative control group. These results indicated that *B. bassiana* is an environmental friendly microbial pesticide. Future studies of *B. bassiana* should focus on its effects on other endophytes in plants. Studies to evaluate the role of *B. bassiana* could lead to a new paradigm on its successful use in biological control programs.

Key Words: *Beauveria bassiana*; paddy; real-time PCR; microflora; antioxidant enzyme

白僵菌是一种典型的杀昆虫真菌,作为一种微生物农药在全世界广泛使用^[1],白僵菌能够寄生在多种昆虫体内并产孢^[2],它可以拮抗许多植物茎内和叶际病原菌如灰霉病菌^[3]、立枯丝核菌^[4]等,除了能够抑制病原菌菌丝生长,还能诱导多种病原菌的细胞裂解^[5]。目前已经报道白僵菌可以成为很多植物的内生菌,例如其在可可豆^[6]、咖啡幼苗^[7]、玉米^[8]中共生,也有研究表明其可以在一些树种如西部白松^[9]、椰枣^[10]等树中共生。

国内外关于白僵菌的研究集中于其杀虫机制以及与其共生、拮抗病原菌等。对于其在土壤和叶际微生态系统中的行为研究较少,李永利等研究发现低温、壤土及土壤含水量为 15% 的条件下有利于白僵菌的宿存^[11],王滨等研究了白僵菌在土壤中的宿存情况,发现前 2 个月内处于波动状态,随后下降较快,但在宿存过程中产孢量不受影响^[12]。但是在叶际微生态系统中白僵菌的残留以及其对叶际微生态系统和植物本身的生理水平影响的研究几乎

没有。在植物叶际生存的微生物称为叶际微生物^[13],对叶际微生物的研究远落后于根际微生物的研究^[14],而叶际微生物作为一类重要的群体具有固氮^[15]、抵御病害^[16]及改变宿主微环境等功能,对外界变化也较敏感,因此研究白僵菌施用后对植物叶际的微生物群落结构、植物生理代谢水平影响及其在植物叶际的残留动态对于评价微生物农药白僵菌的生物安全性有重要意义。

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等 3 种抗氧化酶类能够有效的反映植物的生理代谢水平变化,可作为评价外界环境条件变化对植物生理代谢影响的指标。微生物群落结构变化也可作为评价外界环境变化影响的指标。目前,广泛利用分子生物学手段进行环境风险评估^[17],由于传统涂布平板法的局限性,DGGE 作为一种分子生物学手段能够有效的反映环境中微生物群落结构的变化。

实时定量 PCR 技术定量检测环境中某种特定

微生物的特异性和灵敏度都很高,目前已被作为一种成熟的技术手段用于微生物生态学研究^[18-20],选择合适的靶序列将决定 PCR 检测的特异性和灵敏度,从而精确的对某种特定微生物定量^[21-23]。本文获得了 1 株有绿色荧光蛋白标记并能组成性表达的白僵菌菌株^[24],该基因是以整合到质粒中的形式存在并转化到白僵菌菌株中,在无筛选压力下可以稳定遗传。针对绿色荧光蛋白序列设计了一对特异性引物,建立了快速定量检测水稻叶际白僵菌残留的实时定量 PCR 方法。由于白僵菌和化学农药乙酰甲胺磷均对水稻害虫二化螟有防治作用,因此本实验在对水稻植株接种二化螟幼虫的基础上研究了不同浓度的白僵菌孢子悬液及化学农药对水稻叶际微生物区系及水稻保护酶系统的影响,评价白僵菌的生物安全性并在同一体系中比较生物农药和化学农药的生态影响,为白僵菌的使用提供指导和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

(1)供试土壤 供试盆栽土壤取自南京师范大学植物园,土壤 pH 值 5.97,有机质 1.08%,总氮 1.21 g/kg,速效氮 98.64 mg/kg,总磷 0.39 g/kg,速效磷 24.67 mg/kg,总钾 0.73 g/kg,速效钾 67.58 mg/kg。

(2)供试水稻 (*Oryza sativa*) 水稻品种为武育粳 D1,购于江苏省农业科学院。

(3)供试二化螟 (*Chilo suppressalis*) 二化螟幼虫由南京农业大学高建芬副教授赠送。

(4)供试白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 白僵菌菌株 Bb0062 (带有草丁膦抗性标记基因 *bar* 和表达绿色荧光蛋白基因 *egfp*) 由西南农业大学裴炎教授赠送;将 GFP 标记的白僵菌菌株进行扩繁处理,并进行荧光检测,确定该白僵菌有很强的荧光活性。将平板上培养好的白僵菌刮取孢子并用无菌去离子水清洗并制成不同浓度孢子悬液用于实验。

(5)供试化学农药 化学农药为乙酰甲胺磷,购于农药市场。

1.2 实验设计

盆栽试验地点在南京师范大学植物园。试验共设 7 个处理,各 6 次重复。处理分别为 CK (空白)、A (接种二化螟幼虫)、B (1 倍,即白僵菌施用浓度 7.5×10^4 孢子/mL)、C (10 倍)、D (100 倍)、E (1000

倍)和 F (化学农药)处理组(除空白处理组外均接水稻害虫二化螟幼虫),白僵菌处理组每盆喷洒白僵菌孢子悬液 40 mL,化学农药施用量按说明操作。试验用桶高 70 cm,桶口直径 30 cm,每桶放置过筛土 20 kg。2012 年 5 月 1 日育苗,待幼苗长至 10—15 cm 高时将其移秧至新桶中,每桶 4 穴。整个盆栽试验期间,视土壤含水量状况不定期浇灌自来水,定期拔除杂草。各处理组用 3 m × 0.7 m × 1.5 m 防虫网遮盖并用竹竿固定。于 7 月 10 日接种二化螟幼虫并施用白僵菌孢子悬液和化学农药。

分别在喷施当天,喷施后第 10、30 天和第 60 天,带无菌手套,采用打孔器采集水稻叶片,每个重复约 5—6g 叶片立即放入无菌样品袋中并进行实验。从同一处理的每个重复中各取 1 g 均匀混合并提取叶际总基因组,各重复的剩余部分去除叶脉后取 0.5 g 单独进行酶活力的测定。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 白僵菌绿色荧光蛋白的引物设计

使用 Primer 5.0 设计引物 (eGFP-F1/eGFP-R1) 扩增标记白僵菌的绿色荧光蛋白的一段序列,PCR 产物为 289 bp。上下游引物序列分别是 (eGFP-F1: 5'CAGTGCTTCAGCCGCTACCC3', eGFP-R1: 5'AGT-TCACCTTGATGCCGTTCTT3')。

1.3.2 实时定量 PCR

实时定量 PCR 扩增使用 Step One™ (ABI, USA) 定量 PCR 仪。荧光定量标准曲线使用梯度稀释的白僵菌基因组 DNA 为模板。PCR 扩增反应为 25 μL 体系:2 μL DNA 模板,上下游引物各 1 μL,10 μL SYBR Premix Ex Taq, ROX 0.4 μL, H₂O 6 μL。扩增反应程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s, 60℃ 50 s, 40 个循环。所有的荧光定量 PCR 反应条件和体系完全一致。

1.3.3 POD、SOD、CAT 3 种酶活力测定

水稻叶片的 POD、SOD、CAT 3 种酶活力的测定使用南京建成公司试剂盒,其活性以每 mg 可溶性蛋白的催化活力 U 表示。

1.3.4 叶际微生物的分离及 DNA 提取

叶际微生物的分离方法参见文献^[25],提取后的菌体沉淀使用 Ultra Clean™ Soil DNA Isolation 试剂盒 (Mo BIO Laboratories) 提取 DNA,然后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.5 PCR 扩增和变性梯度凝胶电泳(DGGE)

DNA 的 PCR 扩增条件见表 1,反应体系均为 50 μL 体系: $10\times\text{PCR}$ 缓冲液 $5\mu\text{L}$, MgCl_2 $3.5\mu\text{L}$ (20 mmol/L), dNTP $2\mu\text{L}$ (10 mmol/L), 上下游引物各 $1\mu\text{L}$ ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$), Taq DNA 聚合酶 (REGEN BIOTEC 公司) $0.3\text{ }\mu\text{L}$ (1.5 U), DNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$ (15 ng), 无菌超纯水 $36\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 产物用 1% 的琼

脂糖凝胶检测。使用 CBS-DGGE 电泳系统 (CBS Scientific Co.) 进行变性梯度凝胶电泳 (DGGE), 聚丙烯酰胺凝胶浓度和变性梯度见表 1, 电泳缓冲液为 $1\times\text{TAE}$, PCR 产物上样量为 500 ng , $60\text{ }^\circ\text{C}$, 100 V 电泳 12 h , EB 染色 20 min , UVP 凝胶影像分析系统拍照。

表 1 PCR-DGGE 条件
Table 1 PCR-DGGE conditions

模板 Target	引物 Primer	扩增条件 Polymerase chain reaction conditions	凝胶浓度 Polyacrylme gel/%	变性梯度 Denaturing Gradient/%
细菌 Bacteria	518R(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')	94 $^\circ\text{C}$ 5min; 30cycles, 94 $^\circ\text{C}$ 45s, 60 $^\circ\text{C}$ 30s, 72 $^\circ\text{C}$ 45s; 72 $^\circ\text{C}$ 10min	8	35—65
	338F(5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGG GGCGGGCGGGGACGGGGGGA CTCCTACGGGAGGCAGC-3')			
真菌 Fungi	NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') GC-Fung(5'-CGCCC GCCGCGCCCGC GCCGGCCCGCCGCCCGCCCA TTCCCGCTACCCGTTG-3')	94 $^\circ\text{C}$ 4min; 35cycles, 94 $^\circ\text{C}$ 30s, 55 $^\circ\text{C}$ 30s, 72 $^\circ\text{C}$ 1min; 72 $^\circ\text{C}$ 10min	7	20—50

1.4 数据处理

实验结果用算术平均数 $\pm$ 标准误表示,应用 SPSS 13.0 软件进行方差分析, (One-Way ANOVA) 检验处理间差异显著性,并用 Duncan 法进行多重比较,当 $P<0.05$ 时,各个处理间存在显著差异。使用 Excel 2007 进行作图。

DGGE 指纹图谱使用 Gelcompar II 软件分析。其中,聚类分析使用 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages) 方法。用于计算群落生物多样性的指标有:

- (1) Shannon 指数 $H = - \sum (ni/N) \ln(ni/N)$
式中, ni 为单一条带的峰面积; N 为所有峰的总面积。
- (2) 条带数量 S , 为所在泳道的条带总数目。

2 结果与分析

2.1 荧光定量 PCR 检测白僵菌在水稻叶际的残留

2.1.1 白僵菌绿色荧光蛋白特异性引物设计及验证

通过对白僵菌绿色荧光蛋白序列的扩增效果及特异性验证筛选了一对合适的引物 eGPF-F1 (5'-CAGTGCTTCAGCCGCTACCC - 3')/eGFP-R1 (5'-AGTTCACCTTGATGCCGTTCTT-3')。从图 1 中可以看出,使用 eGPF-F1/eGFP-R1 进行常规 PCR 反应,

可以得到单一的扩增条带。

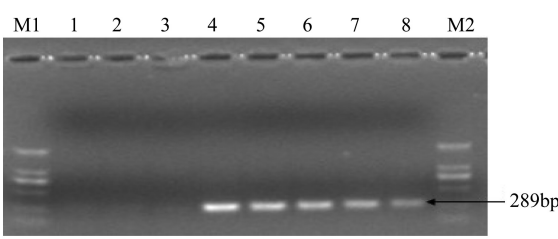


图 1 使用引物 eGPF-F1/eGFP-R1 扩增产物的电泳图谱
Fig.1 PCR products using primer eGPF-F1/eGFP-R1
泳道: 1 CK 组 0d; 2 A 组 0d; 3 F 组 0d; 4 白僵菌菌株; 5 E 组 0d; 6 D 组 0d; 7 C 组 0d; 8 B 组 0d; M1, M2 为 2000 Marker

2.1.2 白僵菌定量 PCR 标准曲线制备

荧光定量 PCR 扩增反应使用梯度稀释的白僵菌基因组 DNA 做为模板, 引物为 eGPF-F1/eGFP-R1。图 2 为白僵菌基因组荧光定量标准曲线, 横坐标(x)为模板质量, 纵坐标(y)为达到荧光阈值的循环数量即 C_t 值($y = -3.603x + 28.351$)。标准曲线的相关系数 ($R^2>0.99$), 这表明白僵菌基因组 DNA 质量在 10^{-1} — 10^3 pg 之间能够很好地线性定量扩增。同时, 将白僵菌基因组 DNA 继续稀释至 10^{-2} pg 、 10^{-3} pg 、 10^{-4} pg 、 10^{-5} pg 、 10^{-6} pg , 用 $1\text{ }\mu\text{L}$ 超纯无菌水作对照进行扩增, 研究该方法的检测极限, $1\text{ fg}/\mu\text{L}$ 白僵菌基因组 DNA 为模板及 $1\text{ }\mu\text{L}$ 超纯无菌水代替 DNA

模板做为阴性对照均未能扩增,表明该体系的检测下限为 10 fg/ μ L 白僵菌基因组 DNA 质量,能够满足一般检测需要。

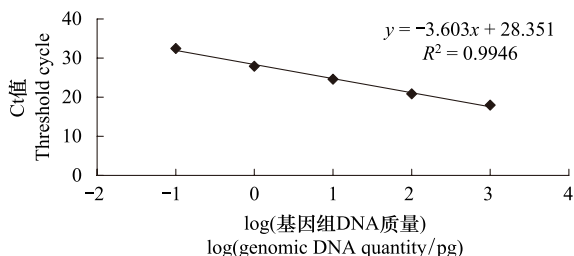


图2 白僵菌基因组实时定量 PCR 标准曲线

Fig.2 Standard curve from real time PCR by plotting the threshold cycle (Ct) vs the $\log_{10}$ quantity of template DNA (in pg) for *B. bassiana* amplified with the primer eGFP-F1/eGFP-R1

2.1.3 水稻叶际白僵菌残留量的跟踪检测

从 CK、A、B、C、D、E、F 总共 7 个处理中分别提取叶际总 DNA,进行定量 PCR。在所有的采样时间点,CK、A、F 处理中都没有检测到白僵菌的存在,说明在实验处理中及后续时期白僵菌并未污染此 3 组处理,能够更好的进行各处理组之间的比较。由图 3 可以看出,在分别喷施 1 倍、10 倍、100 倍、1000 倍白僵菌孢子悬液的 B、C、D、E 处理组中,在喷施后的第 0、10、30 天内均检测到了白僵菌的存在,而在第 60 天时 4 个处理组中均未检测到白僵菌的存在,说明白僵菌可以在水稻叶片残留至少达 30 d 之久。其中 1000 倍白僵菌处理即 E 处理组叶际白僵菌 DNA 含量在第 0 天为 $\log_{10} 2.93$ (pg DNA/g 叶片),而在第 30 天时为 $\log_{10} 0.69$ (pg DNA/g 叶片),衰减了

99.42%,而 D、C、B 处理组的叶际白僵菌含量分别衰减了 97.91%、92.41%、74.30%。说明了白僵菌喷施浓度越大,衰减速度越快,因此在喷施时应注意浓度不用过大,以免造成不必要浪费。

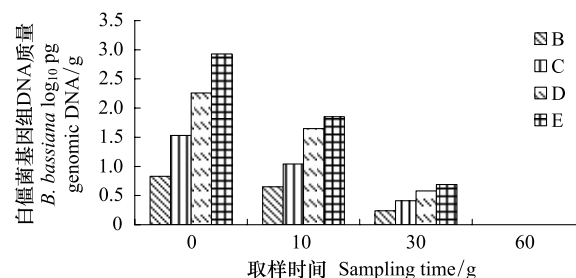


图3 定量 PCR 研究水稻叶际白僵菌 DNA 含量变化

Fig.3 Population dynamics of *B. bassiana* in rice phyllosphere measured by qPCR

B:1 倍,即白僵菌施用浓度 7.5×10^4 孢子 mL^{-1} ; C:10 倍; D:100 倍; E:1000 倍

2.2 白僵菌对水稻酶活力影响

2.2.1 白僵菌对水稻超氧化物歧化酶活力影响

超氧化物歧化酶 SOD 是目前为止发现唯一以超氧阴离子自由基为底物的酶,对于维护植物体内动态平衡起着重要作用^[26],具有防御活性氧毒性等功效。由图 4 可知,超氧化物歧化酶活性在整个周期中随着时间的延长逐渐降低。白僵菌处理能提高水稻超氧化物歧化酶活性,其中以 10—30 d 效果最为明显,在第 10 天时 D 处理组相比较 CK 提高了 20.38%,而 A 处理组相比较 CK 略有下降,推测二化螟虫害导致水稻酶活力下降,到成熟期,各处理组超氧化物歧化酶活力趋于一致。

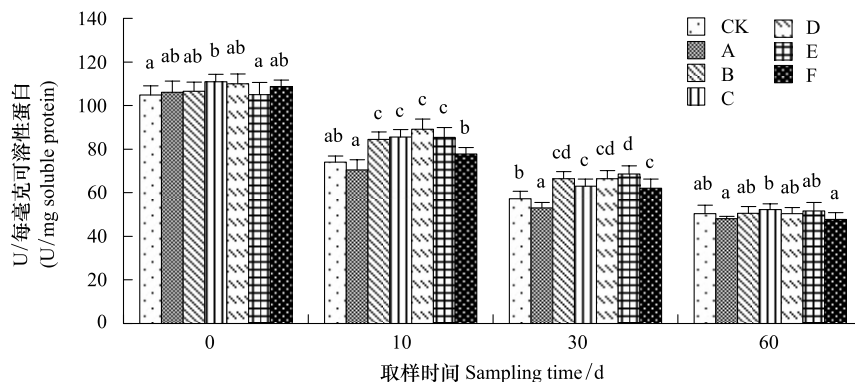


图4 不同处理对 SOD 活性的影响

Fig.4 Effect of different treatments on SOD activity

CK:空白对照;A:接种二化螟幼虫;B:1 倍,即白僵菌施用浓度 7.5×10^4 孢子/ mL ; C:10 倍; D:100 倍; E:1000 倍; F:化学农药处理组; 处理间数据比较不同的字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著

2.2.2 白僵菌对水稻过氧化物酶活力影响

过氧化物酶主要起到酶促降解 H_2O_2 的作用,解除细胞内有害自由基。由图 5 可知,过氧化物酶活性在整个周期中呈现逐渐上升的趋势,到第 60 天时

达到最大值。白僵菌对过氧化物酶活力影响较小,在第 10 天时,F 处理组水稻过氧化物酶活力较高,推测是由于植物的应激反应所导致。

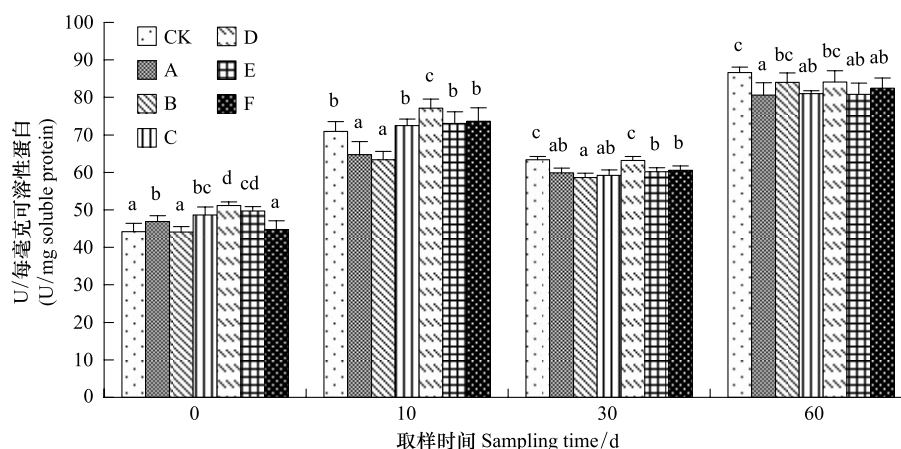


图 5 不同处理对 POD 活性的影响

Fig.5 Effect of different treatments on POD activity

2.2.3 白僵菌对水稻过氧化氢酶活力影响

过氧化氢酶 CAT 可以分解 H_2O_2 形成 O_2 和 H_2O ,与植物代谢强度及抗逆能力密切相关^[27]。由图 6 可以看出,在整个周期内随着时间延长,过氧化氢酶活力逐渐下降。F 和 A 处理组过氧化氢酶活力较低,推测病虫害及化学农药均会降低过氧化氢酶活

力,其中在第 10 天 时,A 和 F 处理组相比较 CK 分别下降了 19.55% 和 42.70%,化学农药处理导致酶活力下降幅度更大,在第 30 天 时 4 个白僵菌处理组过氧化氢酶活力均提高,其中 C 处理组相比较 CK 提高了 33.67%,而在第 60 天 时,A 处理组酶活力仍未恢复。

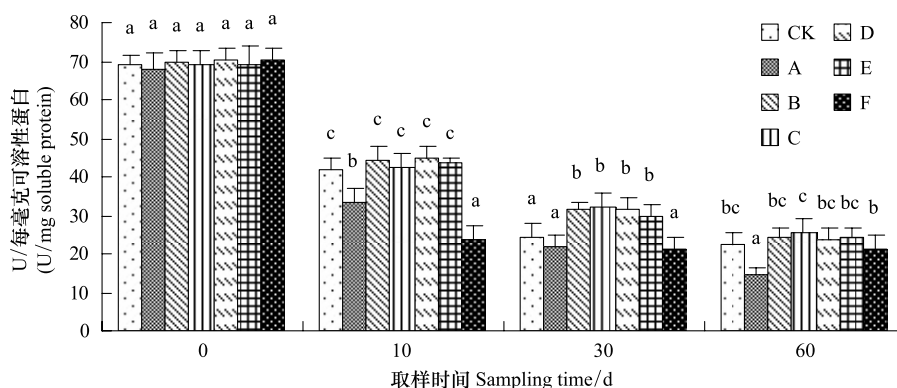


图 6 不同处理对 CAT 活性的影响

Fig.6 Effect of different treatments on CAT activity

2.3 白僵菌对水稻叶际微生物群落结构的影响

2.3.1 水稻叶际细菌 DGGE 分析

由图 7 和表 2 可以看出,白僵菌对水稻叶际细菌群落结构影响较小,但聚类分析表明在同一时期内各处理组聚成一类,说明细菌群落结构随时间具有一定波动性,而同一时期内各白僵菌处理组之间

细菌群落结构较相似,相比较其他处理组,条带数及香农指数有所提高。

2.3.2 水稻叶际真菌 DGGE 分析

由图 8 和表 3 可知,真菌的群落结构变化表现出与细菌相似的特点,即同一时期的各处理组聚成一簇,而白僵菌处理组群落结构较类似,并且在后期

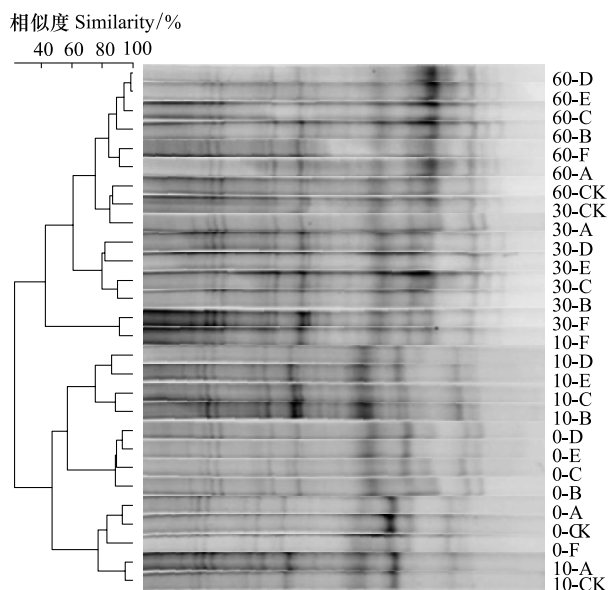


图7 水稻叶际细菌群落 DGGE 指纹图谱聚类分析

Fig.7 DGGE cluster analysis (UPGMA) of 16S rRNA profiles of rice phyllosphere bacterial communities

(0-CK、A、B、C、D、E、F): 分别指 0 d 的 CK、A、B、C、D、E、F 处理组; (10-CK、A、B、C、D、E、F): 分别指第 10 天的 CK、A、B、C、D、E、F 处理组; (30-CK、A、B、C、D、E、F): 分别指第 30 天的 CK、A、B、C、D、E、F 处理组; (60-CK、A、B、C、D、E、F): 分别指第 60 天的 CK、A、B、C、D、E、F 处理组

条带数及香农指数相比较其他处理组有所提高。A 处理组和 F 处理组条带数及香农指数均较小。

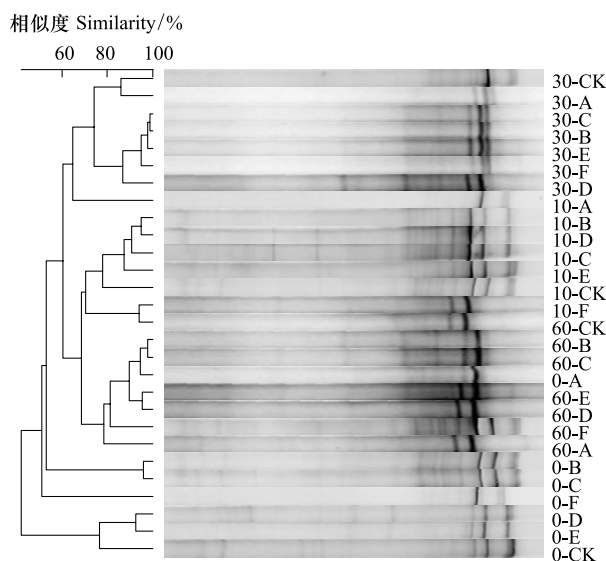


图8 水稻叶际真菌群落 DGGE 指纹图谱聚类分析

Fig.8 DGGE cluster analysis (UPGMA) of 18S rRNA profiles of rice phyllosphere fungi communities

表2 叶际细菌群落多样性

Table 2 Diversity of bacteria in phyllosphere

处理 Treatment	0d		10d		30d		60d	
	条带数 Band number	香农指数 Shannon index	条带数 Band number	香农指数 Shannon index	条带数 Band number	香农指数 Shannon index	条带数 Band number	香农指数 Shannon index
CK	18	2.28	19	2.36	19	2.65	22	2.73
A	18	2.33	19	2.49	17	2.21	14	2.04
B	23	2.75	24	2.76	27	2.94	22	2.72
C	24	2.79	22	2.65	22	2.76	24	2.84
D	21	2.6	22	2.68	23	2.823	25	2.95
E	22	2.56	23	2.72	24	2.98	22	2.81
F	20	2.66	16	1.91	21	2.75	21	2.49

CK:空白对照;A:接种二化螟幼虫;B:1 倍,即白僵菌施用浓度 7.5×10^4 孢子 mL^{-1} ;C:10 倍;D:100 倍;E:1000 倍;F:化学农药处理组

表3 叶际真菌群落多样性

Table 3 Diversity of fungi in phyllosphere

处理 Treatment	0d		10d		30d		60d	
	条带数 Band number	香农指数 Shannon index	条带数 Band number	香农指数 Shannon index	条带数 Band number	香农指数 Shannon index	条带数 Band number	香农指数 Shannon index
CK	5	1.24	18	2.37	12	1.82	13	2.19
A	8	1.57	6	1.02	9	1.56	12	1.6
B	8	1.62	18	2.23	12	1.96	16	2.38
C	9	1.41	19	2.44	15	2.21	15	2.27
D	5	1.42	17	2.24	14	2.31	13	2.14
E	6	1.12	18	2.24	17	2.32	13	2.24
F	7	1.32	7	1.38	9	1.69	16	2.31

3 讨论

虽然微生物农药白僵菌应用较广泛,但国内外目前尚没有关于白僵菌对植物叶际影响的研究。本文首次对微生物农药白僵菌在叶际的生态影响做了较为全面的评价,并首次在同一系统中比较了生物农药白僵菌与化学农药对植物叶际的不同生态影响。

3.1 白僵菌在环境中的残留

生防菌能否起到稳定、持久的防病效果的重要因素就是其在植物根际能否有效定殖^[28]。而研究生防菌在叶际的定殖对于评价其作用效果也至关重要。微生物农药在施用后面临着衰减残留情况的检测问题,传统抗生素标记及放射性同位素标记等技术手段难以直观、准确区分土著微生物和人工接种微生物^[29],绿色荧光蛋白作为分子标记应用较广,其对细胞无毒,结构稳定^[30],但是荧光表达需要一定条件,在胁迫、寡营养阶段或特殊生长阶段也会出现荧光表达较弱的问题。本文建立了一种使用 SYBR Green I 荧光染料快速检测叶际白僵菌残留的方法。SYBR Green I 的特异性主要依靠设计的 PCR 引物的特异性。根据白僵菌绿色荧光蛋白序列设计了一对特异性引物 eGFP-F1 和 eGFP-R1,验证特异性、灵敏性均较高,结果表明白僵菌可以在水稻叶际残留至少达 30 d,本研究在试验期间受多次的降水、大风的气候因素的影响,推测白僵菌能够与水稻由附生转变为半寄生状态。殷幼平等研究发现绿色荧光蛋白标记的枯草芽孢杆菌在柑橘叶际定殖达 42 d 之久^[31],然而并未比较不同浓度的生防菌衰减速率,本文研究发现白僵菌初始喷施浓度越大,其在叶际的衰减速率越快,其中在第 30 天时 B 处理组白僵菌残留量是初始量的 25.70%,而 E 处理组白僵菌残留量是初始量的 0.58%。

3.2 白僵菌对水稻抗氧化酶活力研究

SOD、POD、CAT 作为保护酶系统的主要指标,能够反映植物的生理代谢水平。而目前国内外针对植物保护酶系统的影响因素研究主要局限于化学农药^[32]、重金属离子^[33-34]、内生菌^[35]、盐胁迫^[36]、矿质元素^[37]等,关于微生物农药对植物保护酶系统的影响研究较少。本文研究发现白僵菌处理能够提高水稻超氧化物歧化酶及过氧化氢酶活力,并且不同浓

度白僵菌处理组之间酶活力相差较小,白僵菌能够与植物互作,改善植物生长状态,推测一方面白僵菌可以拮抗植物病原菌、诱导植物抗性^[38-39]及毒杀水稻害虫二化螟,另一方面白僵菌可能影响水稻土壤从而间接改善植物生长条件,然而具体机制目前还不清楚。在 A 处理组即接种二化螟处理组中,3 种保护酶活力均有不同程度下降,推测保护酶活力下降是由水稻虫害导致的。在 F 处理组即化学农药处理能够降低水稻过氧化氢酶活力,对其他两种酶活力影响较小,推测是化学农药引起了植物的应激反应。

3.3 白僵菌对水稻叶际微生物群落结构的影响

总体来看,白僵菌处理并未造成叶际细菌群落较大波动。在真菌群落结构中,A、F 处理组条带数及香农指数均较小,说明水稻病虫害及化学农药对真菌群落结构有较大影响。在第 10 天时,化学农药处理后细菌及真菌多样性均较小,这与荆梦^[40]等研究结果是一致的,推测由于化学农药导致某些抗药性菌群生长而抑制其他菌群的生长,从而导致叶际菌群结构较单一。

4 结论

本文建立了定量检测植物叶际白僵菌残留的荧光 PCR 方法,结果表明灵敏性及特异性均较高,白僵菌可以在水稻叶际残留达 30 d 之久,而白僵菌是以何种方式与水稻互作尚不清楚,同时白僵菌是否可以进入水稻叶片内部甚至由叶片迁移到茎、根等部位也是值得研究的。另外本文研究了白僵菌对水稻保护酶活力的影响,而白僵菌是以何种机制提高水稻保护酶活力还有待阐明。最后,本文研究了白僵菌对水稻叶际的微生物群落结构影响,DGGE 聚类分析结果表明白僵菌处理后水稻叶际细菌、真菌的条带数和香农指数均有所升高说明白僵菌对水稻叶际微生物群落结构有一定影响,而白僵菌作用于水稻后对水稻内生菌的定殖是否影响也是值得研究的,只有阐明以上问题,才能更好的理解白僵菌的作用机制,更充分的评价微生物农药白僵菌的生物安全性。

致谢:西南大学生物技术中心裴炎教授提供绿色荧光蛋白标记的白僵菌菌种,南京农业大学植物保护

学院高建芬副教授提供二化螟幼虫,特此致谢。

References:

- [1] Ownley B H, Griffin M R, Klingeman W E, Gwinn K D, Moulton J K, Pereira R M. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2008, 98 (3): 267-270.
- [2] Meyling N, Eilenberg J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 2007, 43 (2): 145-155.
- [3] Bark Y G., Lee D G., Kang S C., Kim Y H. Antibiotic properties of an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea*. *Korean Journal of Plant Pathology*, 1996, 12 (2): 245-250.
- [4] Lee S M, Yeo W H, Jee H J, Shin S C, Moon Y S. Effect of entomopathogenic fungi on growth of cucumber and *Rhizoctonia solani*. *Journal of Forest Science*, 1999, 62: 118-125.
- [5] Veselý D, Koubová D. In vitro effect of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. and *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch on phytopathogenic fungi. *Ochrana Rostlin*, 1994, 30 (2): 113-120.
- [6] Posada F J, Vega F E. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia*, 2005, 97 (6): 1195-2000.
- [7] Posada F, Vega F E. Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycoscience*, 2006, 47 (5): 284-289.
- [8] Wagner B L, Lewis L C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (8): 3468-3473.
- [9] Ganley R J, Newcombe G. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research*, 2006, 110 (3): 318-327.
- [10] Gómez-Vidal S, Lopez-Llorca L V, Jansson H B, Salinas J. Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. *Micron*, 2006, 37 (7): 624-632.
- [11] Li Y L, Wang Y Y, Dong J Z, Zhou T, Li J. The effects on survival ability of *Beauveria bassiana* under soil microecological environment. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28 (36): 259-263.
- [12] Wang B, Nie Y Q, Li Z Z, Fan M Z. The dynamic of population, virulence and sporulation of *Beauveria bassiana* survived in soil. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2003, 30 (1): 40-43.
- [13] Lindow S E, Brandl M T. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (4): 1875-1883.
- [14] Hu Z Y, Lu K H, Liang J J. Role of rhizosphere microorganisms of aquatic plants in phytoremediation of wastewater. *Environmental Science Technology*, 2010, 33 (5): 75-80.
- [15] Azevedo J L, Maccheroni Jr W, Pereira J O, Araujo W L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2000, 3 (1): 40-65.
- [16] Nair J R, Singh G, Sekar V. Isolation and characterization of a novel *Bacillus* strain from coffee phyllosphere showing antifungal activity. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93 (5): 772-780.
- [17] Duan X J, Min H. Diversity of microbial genes in paddy soil stressed by cadmium using DGGE. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2004, 25 (5): 122-126.
- [18] Shishido M, Sato K, Yoshida N, Tsukui R, Usami T. PCR-based assays to detect and quantify *Phomopsis sclerotoides* in plants and soil. *Journal of General Plant Pathology*, 2010, 76 (1): 21-30.
- [19] Luo Y, Gao W, Doster M, Michailides T J. Quantification of conidial density of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in soil from almond orchards using real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106 (5): 1649-1660.
- [20] Kuan C P, Wu M T, Huang H C, Chang H. Rapid detection of *Colletotrichum lagenarium*, causal agent of anthracnose of cucurbitaceous crops, by PCR and real-time PCR. *Journal of Phytopathology*, 2011, 159 (4): 276-282.
- [21] Li M Z, Senda M, Komatsu T, Suga H, Kageyama K. Development of real-time PCR technique for the estimation of population density of *Pythium intermedium* in forest soils. *Microbiological Research*, 2010, 165 (8): 695-705.
- [22] Kang Z H, Huang J L. Detection of *Thielaviopsis basicola* in soil with real-time quantitative PCR. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2010, 40 (2): 210-213.
- [23] Li F L, Li X Z, Min F X, Han F, Wei Q, Feng Y Z, Guo M. Application of real-time quantitative PCR on detection of fungal plant disease. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2010, 41 (4): 151-155.
- [24] Jin K, Zhang Y J, Luo Z B, Lin J W, Pei Y. GFP as a vital marker for investigation of pathogenic development of *Beauveria bassiana*. *Mycosystema*, 2008, 27 (3): 377-384.
- [25] Gu L K, Bai Z H, Yu Y, Zhao Q, Li Z M, Zhuang G Q, Zhang H X. Investigation of bacterial community structure within the sweet potato phyllosphere using culture-independent techniques. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30 (7): 1789-1796.
- [26] Liu S C, Xiao L T, Liao B H, Lu X D, Kuang F C, Zhao W K, Tong J H. Effects of lead stress on anti-oxidative enzyme activities and isoenzymes in cucumber seedlings. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17 (2): 300-304.
- [27] Li R P, Li G D, Yuan Y F, Hou C D, Yu C. Effects of Se on some physiological characteristics of wheat seedling under Hg stress. *Ecology and Environmental Sciences*, 2011, 20 (5): 975-979.

- [28] Zhang S M, Wang Y X, Li J, Zhao X C. Colonization of A Gene-marked *Bacillus subtilis* BS-68A in Cucumber. *Biotechnology*, 2006, 16(4): 73-74.
- [29] Tian T, Qi X C, Wang Q, Mei R H. Colonization study of GFP-tagged *Bacillus* strains on wheat surface. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2004, 34(4): 346-351.
- [30] Rengpipat S, Wongtangprasert N, Palaga T. The use of green fluorescent protein as a marker for monitoring a probiotic *Bacillus* S11 in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition*, 2009, 15(3): 297-305.
- [31] Yin Y P, Yuan X E, Li Q, Wang Z K. Construction of green fluorescent protein gene tagged biocontrol bacteria *Bacillus subtilis* CQBS03 and its colonization on the citrus leaves. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(17): 3555-3563.
- [32] Wang H Q, Xiao L T, Tong J H, Liu F L. Foliar application of chlorocholine chloride improves leaf mineral nutrition, antioxidant enzyme activity, and tuber yield of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Scientia Horticulturae*, 2010, 125(3): 521-523.
- [33] Shah K, Nahakpam S. Heat exposure alters the expression of SOD, POD, APX and CAT enzymes and mitigates low cadmium toxicity in seedlings of sensitive and tolerant rice cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 57: 106-113.
- [34] Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant system and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 2004, 52(3): 199-223.
- [35] Zhang X X, Fan X M, Li C J, Nan Z B. Effects of cadmium stress on seed germination, seedling growth and antioxidative enzymes in *Achnatherum inebrians* plants infected with a *Neotyphodium* endophyte. *Plant Growth Regulation*, 2010, 60(2): 91-97.
- [36] Ding H D, Zhu X H, Zhu Z W, Yang S J, Zha D S, Wu X X. Amelioration of salt-induced oxidative stress in eggplant by application of 24-epibrassinolide. *Biologia Plantarum*, 2012, 56(4): 767-770.
- [37] Juszczuk I, Malusà E, Rychter A M. Oxidative stress during phosphate deficiency in roots of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Plant Physiology*, 2001, 58(10): 1299-1305.
- [38] Ownley B H, Gwinn K D, Vega F E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*, 2010, 55(1): 113-128.
- [39] Gutjahr C, Paszkowski U. Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22(7): 763-772.
- [40] Jin M, Su Y M, Gu L K, Bai Z H, Zhuang G Q, Peng X W. Effects of imidacloprid insecticide on microbial community in peach phyllosphere. *Environmental Science Technology*, 2011, 34(5): 1-6.

参考文献:

- [11] 李永利, 王圆圆, 董建臻, 周婷, 李静. 土壤微生态环境对白僵菌宿存影响的研究. *中国农学通报*, 2012, 28(36): 259-263.
- [12] 王滨, 聂英奇, 李增智, 樊美珍. 白僵菌在土壤中宿存的数量、毒力及产孢量变化研究. *安徽农业大学学报*, 2003, 30(1): 40-43.
- [14] 胡智勇, 陆开宏, 梁晶晶. 根际微生物在污染水体植物修复中的作用. *环境科学与技术*, 2010, 33(5): 75-80.
- [17] 段学军, 闵航. 镉胁迫下稻田土壤微生物基因多样性的 DGGE 分子指纹分析. *环境科学*, 2004, 25(5): 122-126.
- [22] 康振辉, 黄俊丽. 土壤中烟草根黑腐病菌的实时定量 PCR 检测技术研究. *植物病理学报*, 2010, 40(2): 210-213.
- [23] 李凤兰, 李学湛, 闵凡祥, 韩峰, 魏琪, 冯艳忠, 郭梅. 实时定量 PCR 在植物真菌病原体定量检测中的应用. *东北农业大学学报*, 2010, 41(4): 151-155.
- [24] 金凯, 张永军, 罗志兵, 林健文, 裴炎. 利用 GFP 表达系统检测球孢白僵菌侵染昆虫过程. *菌物学报*, 2008, 27(3): 377-384.
- [25] 谷立坤, 白志辉, 于影, 赵青, 李祖明, 庄国强, 张洪勋. 非培养方法解析北京地区甘薯叶际细菌的群落结构. *生态学报*, 2010, 30(7): 1789-1796.
- [26] 刘素纯, 萧浪涛, 廖柏寒, 鲁旭东, 匡逢春, 赵文魁, 童建华. 铅胁迫对黄瓜幼苗抗氧化酶活性及同工酶的影响. *应用生态学报*, 2006, 17(2): 300-304.
- [27] 李瑞平, 李光德, 袁宇飞, 侯存东, 于冲. 硒对汞胁迫小麦幼苗生理特性的影响. *生态环境*, 2011, 20(5): 975-979.
- [28] 张淑梅, 王玉霞, 李晶, 赵晓宇, 张先成. 基因标记枯草芽孢杆菌 BS-68A 在黄瓜上定殖. *生物技术*, 2006, 16(4): 73-74.
- [29] 田涛, 亓雪晨, 王琦, 梅汝鸿. 芽孢杆菌绿色荧光蛋白标记及其在小麦体表定殖的初探. *植物病理学报*, 2004, 34(4): 346-351.
- [31] 殷幼平, 袁训娥, 李强, 王中康. 生防菌枯草芽孢杆菌 CQBS03 的绿色荧光蛋白基因标记及其在柑橘叶片上的定殖. *中国农业科学*, 2010, 43(17): 3555-3563.
- [40] 荆梦, 宿燕明, 谷立坤, 白志辉, 庄国强, 彭霞薇. 吡虫啉杀虫剂对桃树叶际微生物群落结构的影响. *环境科学与技术*, 2011, 34(5): 1-6.