

doi:10.11707/j.1001-7488.201707012

# 绿色荧光蛋白标记枯草芽孢杆菌 Y13<sup>UV</sup> 在油茶体内的定殖\*

金 勤<sup>1</sup> 朱丹雪<sup>1</sup> 周国英<sup>1</sup> 李 河<sup>1</sup> 何苑皞<sup>1</sup> 张 茜<sup>1,2</sup>

(1. 森林有害生物防控湖南省重点实验室 经济林培育与保护教育部重点实验室 中南林业科技大学 长沙 410004;  
2. 湖南汽车工程职业学院 株洲 412001)

**摘 要:** 【目的】枯草芽孢杆菌 Y13<sup>UV</sup> 对油茶炭疽病具有良好的防治效果, 研究其在油茶体内的定殖动态, 为油茶炭疽病的防治提供依据。【方法】通过原生质体转化法引入绿色荧光蛋白质粒, 构建荧光标记菌株。通过喷叶、灌根、喷叶灌根结合处理多种接种方式及重复接种, 测定菌株在油茶体内不同组织部位的定殖数量, 分析其定殖规律及能力。【结果】标记菌株可以在油茶根、茎和叶内定殖, 单次接种当天, 根内回收的标记菌株数量为  $1.07 \times 10^5$  cfu·g<sup>-1</sup>; 喷叶灌根结合处理 7 天后, 油茶根、茎和叶内标记菌株的数量分别为  $8.70 \times 10^2$ 、 $5.00 \times 10^2$  和  $7.30 \times 10^2$  cfu·g<sup>-1</sup>, 均高于喷叶、灌根单独处理。重复接种时, 油茶根茎叶内标记菌株的定殖量在接种 3~5 天内达到高峰, 然后呈现稳定趋势, 20 天时定殖量开始大幅下降, 第 30 天喷叶灌根处理的油茶根内的定殖量仅为  $5.30 \times 10^2$  cfu·g<sup>-1</sup>。荧光标记菌株生长较好, 稳定表达, 对炭疽病菌具有良好的抑制效果。【结论】枯草芽孢杆菌 Y13<sup>UV</sup> 能通过喷叶灌根方式接种在油茶体内定殖并传导, 有较好的定殖能力。

**关键词:** 绿色荧光蛋白; 枯草芽孢杆菌; 油茶炭疽病; 定殖

中图分类号: S763.13 文献标识码: A 文章编号: 1001-7488(2017)07-0111-07

## Colonization of GFP-Tagged *Bacillus subtilis* Y13<sup>UV</sup> in *Camellia oleifera*

Jin Qin<sup>1</sup> Zhu Danxue<sup>1</sup> Zhou Guoying<sup>1</sup> Li He<sup>1</sup> He Yuanhao<sup>1</sup> Zhang Qian<sup>1,2</sup>

(1. Hunan Provincial Key Laboratory for Control of Forest Disease and Pests Key Laboratory for Non-Wood Forest Cultivation and Conservation of Ministry of Education Central South University of Forest and Technology Changsha 410004;  
2. Hunan Automotive Engineering Vocational College Zhuzhou 412001)

**Abstract:** 【Objective】*Bacillus subtilis* Y13<sup>UV</sup> can control *Colletotrichum gloeosporioides* effectively. Studying its colonization dynamics could provide a scientific basis for controlling *C. gloeosporioides*. 【Method】The GFP plasmid was introduced into cells by protoplasts conversion and to acquire GFP-tagged Y13<sup>UV</sup>. *Camellia oleifera* plants were inoculated with the GFP-tagged Y13<sup>UV</sup> with different methods including foliar spray, root irrigation, foliar spray plus root irrigation, and single or multiple inoculations. The population numbers of GFP-tagged Y13<sup>UV</sup> in different tissues of *Camellia oleifera* were quantified after inoculations to test the colonization ability of the GFP-tagged strain. 【Result】GFP-tagged Y13<sup>UV</sup> could colonize in root, stem and leaf tissues of *Camellia oleifera*. In the same day after single inoculation, the population numbers of the marked strain in root were  $1.07 \times 10^5$  cfu·g<sup>-1</sup>. Seven days after inoculation by foliar spray plus root irrigation, the population of marked strain in root, stem and leaf tissues of *Camellia oleifera* were  $8.70 \times 10^2$ ,  $5.00 \times 10^2$  and  $7.30 \times 10^2$  cfu·g<sup>-1</sup>, respectively. And the population numbers were higher than inoculation by foliar spray or root irrigation alone. With multiple inoculations, the population numbers of the tagged strain reached their peaks about 3-5 days after inoculation, the populations kept stable until they dropped dramatically 20 days after inoculation. The population number of 30th day in root tissue of *Camellia oleifera* was  $5.30 \times 10^2$  cfu·g<sup>-1</sup> when inoculated by foliar spray plus root irrigation. The results showed that GFP-tagged Y13<sup>UV</sup> grew better, expressed stably and still had good inhibition to *C. gloeosporioides*. 【Conclusion】After inoculated by foliar spray or root irrigation, GFP-tagged Y13<sup>UV</sup> could colonize

收稿日期: 2016-04-08; 修回日期: 2016-12-26。

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题(2012BAD19B0803); 湖南省研究生科技创新基金项目(CX2015B294); 中南林业科技大学研究生科技创新基金项目(CX2015B15)。

\* 周国英为通讯作者。

and transfer in *Camellia oleifera*, and displayed good colonization ability.

**Key words:** green fluorescent protein (GFP); *Bacillus subtilis*; *Colletotrichum gloeosporioides*; colonization

在油茶 (*Camellia oleifera*) 生产中, 油茶炭疽病 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 是一种最主要的病害, 在各大产区普遍发生, 造成严重的落叶、落果、落蕾, 产量降低 (杨华等, 2015)。目前, 防治油茶炭疽病主要是采取化学防治和生物防治手段 (陈彧等, 2010)。但大量使用化学农药容易导致植物病原菌产生抗药性, 造成环境污染, 引起人畜中毒等问题 (周国英等, 2007)。国内外已有不少关于生物防治植物病害的报道。周建宏等 (2011) 通过对 40 多种植物进行筛选, 利用筛选出来的丁香 (*Syringa oblata*) 和黄芩 (*Scutellaria baicalensis*) 研制出了防治油茶炭疽病的纯植物源农药。宋光桃 (2009) 从油茶林土壤中分离出了对油茶炭疽病具有拮抗作用的放线菌 CF17。美国 Agraquest 公司 (2001) 将枯草芽孢杆菌 QST713 制成生物杀菌剂, 具有广谱性。

利用能够在寄主植物体内定殖的内生拮抗菌对病害进行防治具有独特的优势 (杨光道等, 2009), 实际应用中拮抗作用强并不一定是最好的生防因子, 生防菌能否在植株体内定殖才是取得防效的关键。研究内生细菌定殖的常用方法有同位素示踪法 (葛银林等, 1995)、免疫学方法 (刘云霞等, 1996)、抗生素标记法 (吴蔼民等, 2001)、荧光标记法 (殷幼平等, 2010)。荧光标记中的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 荧光性能稳定、无需外源反应底物、对宿主细胞无毒害作用、检测方便, 成为研究微生物与宿主或环境互动的重要工具 (王卿等, 2015)。刘邗洲等 (2014) 发现绿色荧光蛋白基因标记的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 在番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 根际土壤中有一定的定殖能力, 接种 30 天后仍可检测到标记菌株。杜芳等 (2015) 研究了枯草芽孢杆菌 Y10 在白菜 (*Brassica rapa*) 根、茎及叶部组织的定殖情况, 结果表明枯草芽孢杆菌在白菜体内有良好的定殖能力, 且这种特性可能与其防治根肿病有关。Yang 等 (2013) 将携带质粒 *gfpmut3a* 基因的穿梭载体 pGFP4412 导入生防枯草芽孢杆菌中, 通过浸种、蘸根以及灌根接种研究其在黄瓜 (*Cucumis sativus*) 根表的定殖, 发现在根基部和中部都有标记菌株聚集而形成膜状结构, 在根的分叉和根冠处可观察到大量标记菌株。关于绿色荧光蛋白标记枯草芽孢杆菌在油茶体内定殖的研究, 国内目前未见相关报道。

枯草芽孢杆菌 Y13<sup>UV</sup> 是本实验室经过诱变获得

的优良菌株, 本试验通过 GFP 标记研究 Y13<sup>UV</sup> 在油茶体内的定殖及消长动态, 为提高 Y13<sup>UV</sup> 防治油茶炭疽病效果和制定施用方法提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试菌株: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) Y13<sup>UV</sup>, 本实验室分离、诱变保存。

供试质粒和内切酶: pHT315-GFP, 高效表达绿色荧光蛋白基因的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 一苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 穿梭载体, *Hind* III 和 *Xba* I 内切酶均由本实验室保存。

供试油茶苗: 湘林 210 品种, 2 年生健康盆栽苗, 购于湖南省林业种苗中心; 长势、苗高、大小一致。

### 1.2 GFP 标记菌株 Y13<sup>UV</sup> 的构建及检测

参考陈燕红等 (2014) 的方法, 本实验室自行构建标记菌株。

1.2.1 荧光显微镜检测 挑取少许绿色荧光蛋白标记菌株菌体涂布固定, 盖上盖玻片, 在荧光显微镜下检测 (激发光波长 480 nm, 发射光波长 520 nm), 观察有无荧光产生。

1.2.2 GFP 标记菌株生长动力学测定 挑取 GFP 标记菌单菌落接种到 LB 液体培养基中, 30 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 培养 24 h, 按 1% 的接种量接种到 100 mL 新鲜的 LB 液体培养基中, 每隔 4 h 测定 OD<sub>600</sub> 值。

1.2.3 GFP 标记菌株抑菌活性测定 采用平板对峙法: 取炭疽病菌菌饼放在 PDA 平板中央, 将 GFP 标记菌株接种至距离炭疽病菌 1.5 cm 处, 置于 28 °C 恒温培养箱中。待朝向标记菌株方向的病原菌菌落不再生长时, 采用十字交叉法测量菌落直径, 计算抑菌率。

### 1.3 GFP 标记菌株在油茶体内的定殖动态

1.3.1 单次接种监测 GFP 标记菌株在油茶体内的定殖动态 采用喷叶法、灌根法和喷叶灌根结合法接种标记菌菌悬液, 浓度为  $3.2 \times 10^8$  cfu·mL<sup>-1</sup>, 每处理 3 次重复, 每处理 100 株, 以无菌水处理为对照。喷叶法: 用喷雾器将菌液均匀地喷洒到油茶叶片上, 每株 10 mL; 灌根法: 将 GFP 标记菌株菌液浇灌于油茶根部, 每株 10 mL; 喷叶灌根综合法: 喷叶和灌根同时接种, 分别为每株 5 mL, 共 10 mL。分别于接种 0, 1, 3, 5, 7 天……对油茶根 (主根与侧根混匀)、茎 (茎下: 地表 3 ~ 8 cm 茎部; 茎中: 8 ~ 13 cm

茎部; 茎上: 13~20 cm 茎部)、叶(从上往下不同部位的叶子混匀)进行取样回收, 每处理随机抽取3株, 每份组织样品0.5 g, 直至回收不到标记菌株。

1.3.2 重复接种监测 GFP 标记菌株在油茶体内的定殖动态 单次接种7天后, 进行第2次接种。采用的接种方法、菌液浓度及用量与1.3.1相同。

分别于接种后1, 3, 5, 10, 15, 20, 30天对油茶根、茎、叶进行取样回收, 每处理随机抽取3株, 每份组织样品0.5 g, 直至回收不到标记菌株。

1.3.3 标记菌株的回收与鉴定 分别称取油茶苗根、茎、叶组织各0.5 g, 经表面消毒后研磨成匀浆, 分别取0.1 mL各梯度稀释液涂布LB氯霉素抗性平板, 28℃培养2~3天, 在荧光显微镜下观察荧光菌落数。用接种环挑取单菌落到10 mL LB液体培养基中, 37℃、180 r·min<sup>-1</sup>培养6 h, 提取质粒, 用Hind III和Xba I从GFP两端切开验证回收的菌株是否为标记菌株。

#### 1.4 数据统计分析

数据均为平均数±标准误差, 采用Excel 2007和SPSS19.0软件处理, 显著性水平采用Duncan's新复极差法分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 绿色荧光蛋白标记枯草芽孢杆菌 Y13<sup>UV</sup> 的构建及其检测

2.1.1 绿色荧光蛋白标记枯草芽孢杆菌 Y13<sup>UV</sup> 的荧光检测 绿色荧光蛋白标记菌株构建好之后, 挑取标记菌株于载玻片上涂布并固定, 在荧光显微镜下检测到菌株发荧光(图1), 并将绿色荧光蛋白标记菌株记为Y13<sup>UV-GFP</sup>。

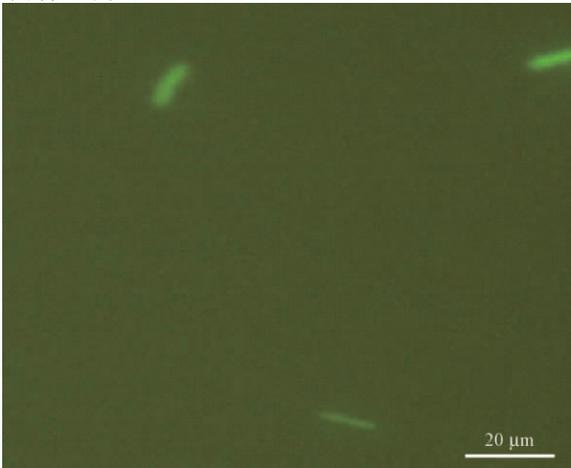


图1 Y13<sup>UV-GFP</sup>在荧光显微镜下的表现

Fig. 1 Fluorescence under the fluorescence microscope of Y13<sup>UV-GFP</sup>

2.1.2 绿色荧光蛋白标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 生长曲线测定 从图2可以看出, 绿色荧光蛋白标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 的生长趋势与原始菌株 Y13<sup>UV</sup> 基本一致。这表明外源质粒的转入以及绿色荧光蛋白的表达对菌株 Y13<sup>UV</sup> 生长没有产生不利影响。

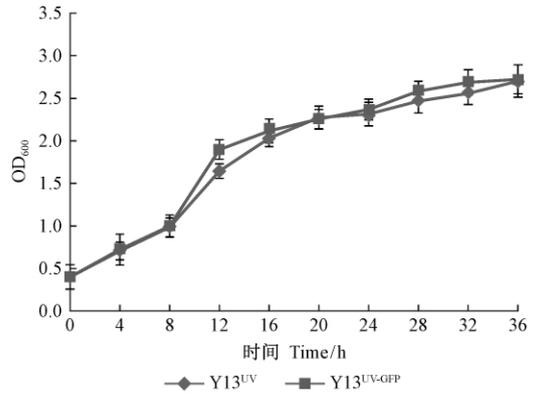


图2 Y13<sup>UV</sup> 菌株及 Y13<sup>UV-GFP</sup> 标记菌株生长曲线

Fig. 2 Growth curve of Y13<sup>UV</sup> and Y13<sup>UV-GFP</sup> strains

2.1.3 绿色荧光蛋白标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 的抑菌效果测定 从表1可知: 标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 和原始菌株 Y13<sup>UV</sup> 相比, 对炭疽病的抑制效果无显著差异, 因此 Y13<sup>UV-GFP</sup> 可以用来进行定殖动态和生防能力的研究。

表1 标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 和原始菌株 Y13<sup>UV</sup> 的抑菌效果<sup>①</sup>

Tab. 1 Control effect of Y13<sup>UV-GFP</sup> and Y13<sup>UV</sup> against

菌株 Strain	抑菌率 Inhibition rate (%)			
	1	2	3	平均 Average
Y13 <sup>UV-GFP</sup>	71.7	76.8	73.5	74.0 ± 1.49a
Y13 <sup>UV</sup>	77.2	71.7	73.5	74.1 ± 1.62a

①平均数后相同字母表示无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。The same letter after the averages indicate there was no significant difference ( $P > 0.05$ ).

### 2.2 标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 在油茶体内的定殖动态

2.2.1 标记菌株的回收与鉴定 从LB平板上挑取的 Y13<sup>UV-GFP</sup> 中提取出 pHT315-GFP (约7.2 kb) 质粒, 对质粒进行双酶切后可获得与 GFP 片段 (约714 bp) 长度相当的片段。由此可以确定回收到的菌株是 Y13<sup>UV-GFP</sup>。如图3: M 为 DL10000 marker, 1 为从回收菌株中提取的质粒 pHT315-GFP, 2 为 Hind III 和 Xba I 双酶切后的产物。

2.2.2 单次接种监测 Y13<sup>UV-GFP</sup> 在油茶体内的定殖动态 如表2所示: 灌根处理当天, 油茶苗根部能够检测到 Y13<sup>UV-GFP</sup>, 其定殖数量高达  $1.07 \times 10^5$  cfu·g<sup>-1</sup>。接种后第1天, 在茎及叶组织可以检测到标记菌株; 茎上部位及叶片, 定殖数量随时间递增逐

渐减少。接种后第 7 天,叶片内定殖数量显著低于根部 ( $P < 0.05$ ); 并且回收的植株中,有的叶内已经检测不到标记菌株。表明 Y13<sup>UV-GFP</sup> 能够通过油茶苗根部短时间内侵入并向上传递,但定殖时间有限。

喷叶处理后,根、叶片、茎下部位的 Y13<sup>UV-GFP</sup> 定殖数量呈现递减趋势。接种后第 1 天叶内的定殖数量显著高于灌根处理 ( $P < 0.05$ ); 茎上部位的定殖数量为  $1.1 \times 10^3$  cfu·g<sup>-1</sup>, 茎中部位仅有  $2.1 \times 10^2$  cfu·g<sup>-1</sup>。在 3, 5, 7 天均出现了茎上部位的定殖量高于茎中, 此现象在喷叶灌根结合处理后再次出现, 且第 7 天回收的大部分油茶苗叶片内检测不到 Y13<sup>UV-GFP</sup>, 说明通过叶部侵入的 Y13<sup>UV-GFP</sup> 有一定向下传递的能力。

喷叶灌根结合处理后,接种后 1 天根部定殖数量为  $2.00 \times 10^4$  cfu·g<sup>-1</sup>, 显著高于灌根处理的数量  $3.00 \times 10^3$  cfu·g<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ ); 茎上部位的定殖数量高于茎中部位, 此现象与喷叶方式处理相同。第 7 天根部定殖数量为  $8.70 \times 10^2$  cfu·g<sup>-1</sup>, 仍然高于

灌根处理; 叶内 Y13<sup>UV-GFP</sup> 定殖数量也高于喷叶处理的数量。

综合来看,3 种接种方式下 Y13<sup>UV-GFP</sup> 定殖量存在显著性差异,喷叶灌根结合处理为最优接种方式。

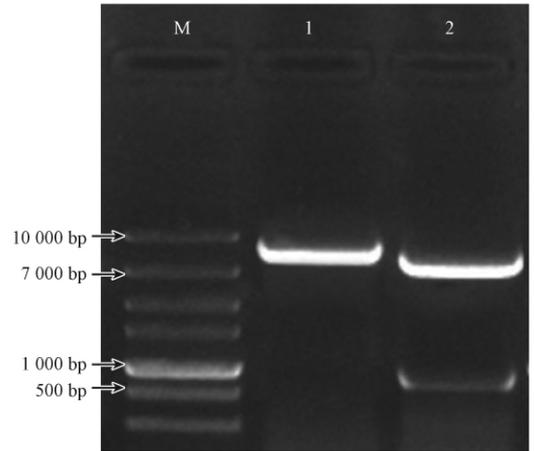


图 3 Y13<sup>UV-GFP</sup> 酶切鉴定

Fig. 3 Enzyme identification of Y13<sup>UV-GFP</sup>

表 2 单次接种情况下 Y13<sup>UV-GFP</sup> 在油茶体内的定殖动态<sup>①</sup>

Tab. 2 Colonization of Y13<sup>UV-GFP</sup> in *Camellia oleifera* under a single inoculation

接种方法 Inoculation method	天数 Day /d	定殖数量 Colonization number / ( $10^3$ cfu·g <sup>-1</sup> )				
		根 Root	茎(下) Stem (3 ~ 8 cm)	茎(中) Stem (8 ~ 13 cm)	茎(上) Stem (13 ~ 20 cm)	叶 Leaf
	0	106.7 ± 6.67a	0	0	0	0
灌根 Pouring root	1	3.00 ± 1.36b	6.20 ± 4.90a	4.00 ± 0.53a	0.73 ± 0.07a	0.87 ± 0.06a
	3	1.07 ± 0.44b	1.80 ± 1.10a	1.17 ± 0.42b	0.80 ± 0.20a	0.53 ± 0.13a
	5	1.00 ± 0.42b	0.33 ± 0.13a	0.40 ± 0.12b	0.27 ± 0.07b	0.13 ± 0.07a
	7	0.80 ± 0.60b	0.40 ± 0.12a	0.53 ± 0.33b	0.27 ± 0.13b	0.07 ± 0.07a
喷叶 Spraying leaf	1	32.70 ± 5.21a	3.07 ± 0.18a	0.21 ± 0.05b	1.10 ± 0.75a	4.53 ± 0.87a
	3	1.13 ± 0.35b	0.60 ± 0.20b	0.33 ± 0.07b	0.67 ± 0.18a	2.87 ± 1.59ab
	5	0.60 ± 0.23b	0.53 ± 0.13b	0.60 ± 0.11a	1.07 ± 0.24a	1.00 ± 0.35b
	7	0.47 ± 0.18b	0.27 ± 0.07b	0.13 ± 0.07b	0.40 ± 0.23a	0.20 ± 0.20b
喷叶灌根 Spraying leaf and pouring root	1	20.00 ± 1.15a	1.47 ± 0.18ab	1.00 ± 0.20a	1.07 ± 0.35a	1.13 ± 0.29a
	3	2.20 ± 0.92b	3.60 ± 1.36a	0.93 ± 0.37a	0.80 ± 0.12a	1.07 ± 0.18a
	5	1.47 ± 0.29b	1.93 ± 0.70ab	0.47 ± 0.13a	1.40 ± 0.64a	1.27 ± 0.37a
	7	0.87 ± 0.07b	0.40 ± 0.12b	0.47 ± 0.13a	0.53 ± 0.07a	0.73 ± 0.37a

①同一组织不同时间列中具有相同小写字母的处理表示不同天数没有达到显著差异 ( $P > 0.05$ ) The same column with the same letters are not significant difference on different day ( $P > 0.05$ ).

### 2. 2. 3 重复接种监测 Y13<sup>UV-GFP</sup> 在油茶体内的定殖动态

1) 灌根接种标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 在油茶体内的定殖动态 通过灌根处理,回收检测结果显示:在油茶根茎叶组织中均可分离检测到标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup>,且根内的定殖量显著高于叶 ( $P < 0.05$ )。在接种初期,根内的定殖量为  $3.73 \times 10^3$  cfu·g<sup>-1</sup>, 高于茎和叶中的定殖量。随着接种时间的延长,在根中的定殖量逐渐下降,在 30 天时仅有  $5.30 \times 10^2$  cfu·g<sup>-1</sup>。在茎的各部位(茎下、茎中、茎上)和叶中

的定殖量呈现先上升后下降的趋势,茎下部位定殖量在第 3 天达到高峰,而茎中、茎上和叶的高峰期均为第 5 天。各组织中标记菌株的数量在第 5 ~ 15 天较为稳定,20 天后数量迅速减少。在第 30 天时,根内的数量高于茎内各部位和叶。

2) 喷叶接种标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 在油茶体内的定殖动态 采用喷叶法将标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 接入油茶苗后,回收检测结果表明:在接种后第 1 天,标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 在油茶叶内的定殖数量为  $6.00 \times 10^3$

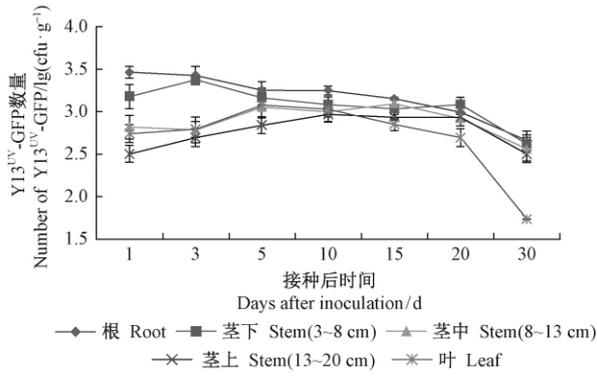


图 4 灌根接种标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 在油茶体内的定殖动态

Fig. 4 Colonization of Y13<sup>UV-GFP</sup> in *Camellia oleifera* by pouring root

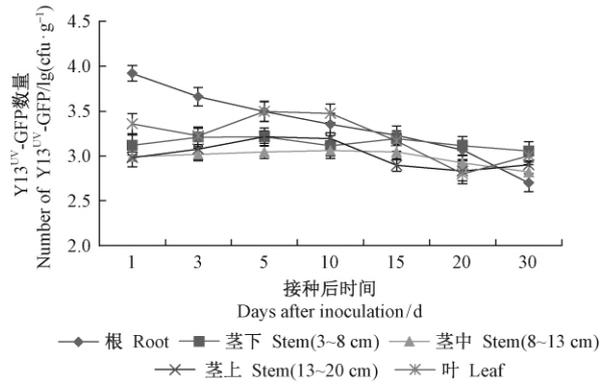


图 6 喷叶灌根接种标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 在油茶体内的定殖动态

Fig. 6 Colonization of Y13<sup>UV-GFP</sup> in *Camellia oleifera* by spraying leaf and pouring root

cfu · g<sup>-1</sup>, 然后迅速下降; 在无套袋处理、自然滴落的情况下, 在接种 1 天后根部回收到的 Y13<sup>UV-GFP</sup> 数量为 3.27 × 10<sup>3</sup> cfu · g<sup>-1</sup>, 与灌根处理的油茶根部第 1 天的回收量基本一致。茎内各部位 Y13<sup>UV-GFP</sup> 的定殖量先增后减, 茎下部的定殖量在第 5 天达到最大值 1.60 × 10<sup>3</sup> cfu · g<sup>-1</sup>, 而茎中部和上部在第 3 天就达到最大值, 3 ~ 10 天茎上部位回收量均高于茎中部位。第 30 天时, 根内的数量高于叶和茎内各部位; 叶内 Y13<sup>UV-GFP</sup> 的定殖数量为 4.00 × 10<sup>2</sup> cfu · g<sup>-1</sup>, 略高于灌根处理叶内 30 天的定殖量。

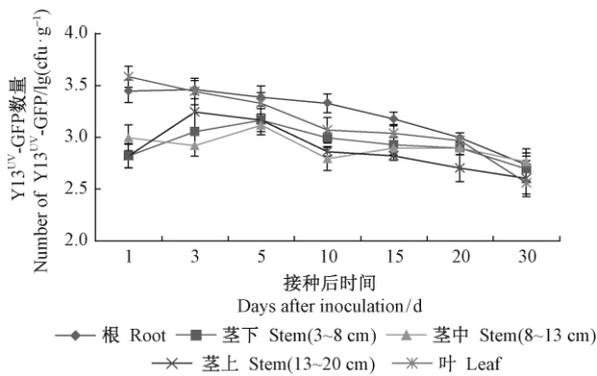


图 5 喷叶接种标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 在油茶体内的定殖动态

Fig. 5 Colonization of Y13<sup>UV-GFP</sup> in *Camellia oleifera* by spraying leaf

3) 喷叶灌根接种标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 在油茶体内的定殖动态 通过喷叶灌根接种处理, 根内标记菌株的定殖数量高于喷叶或灌根单独处理的数量。在接种后第 1 天, 根部标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 数量达 8.67 × 10<sup>3</sup> cfu · g<sup>-1</sup>, 然后降低, 第 30 天的数量与灌根接种处理的相同。茎各部位的定殖量呈现先上升后下降的趋势, 高峰期分别为 3 天和 5 天。接种后 1 天, 叶内 Y13<sup>UV-GFP</sup> 的数量较高, 第 3 天有所下降, 第 5 天出现第 2 次高峰, 之后下降。第 30 天时, 叶内的定殖量高于其他 2 种处理方式。

### 3 讨论

采用喷叶法、灌根法、喷叶灌根结合法 3 种接种方法接种, 均能使标记菌株侵入油茶根茎叶内, 并在油茶植株体内繁殖和传导。单次接种时, 3 种接种方式下标记菌株的定殖时间短, 不同接种方式的定殖量存在差异。重复接种使标记菌株在油茶体内的定殖时间长达 30 天, 喷叶灌根结合处理 30 天后, 根部定殖量为 5.3 × 10<sup>2</sup> cfu · g<sup>-1</sup>, 叶部为 6.7 × 10<sup>2</sup> cfu · g<sup>-1</sup>, 茎各部 (茎上、茎中和茎下) 的定殖量均高于其他 2 种处理方法。经酶切鉴定分析, 回收菌株均为标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup>。

王瑞芹 (2014) 用抗利福平标记 Y13 菌株, 虽然抗利福平标记的菌株与绿色荧光蛋白标记的菌株在油茶体内定殖没有显著性差异, 但抗性菌株接种到植物后, 部分菌株会因为植物体内没有了选择压力而在增殖过程中丢失了抗利福平的能力 (范晓静, 2007), 再者植物内生菌有些也可能对利福平具有抗药性, 从而造成分离到的细菌数量不准确, 绿色荧光蛋白基因标记就减小了分离菌量与实际定殖菌量的差异。

研究中发现, 单次接种时 Y13<sup>UV-GFP</sup> 定殖时间短, 重复接种时叶部回收并未出现 5 天和 7 天就已检测不到标记菌株的情况, 由此猜想, 重复接种的方式更易于内生拮抗细菌对植株生境的适应并稳定定殖。重复接种延长了 Y13<sup>UV-GFP</sup> 在油茶体内的定殖时间, 也有报道 (王卿等, 2015) 指出强化接种 1 次可能会使生防菌保持一定的种群优势, 进而将可能对植物有较长的保护作用。彭祎等 (2010) 研究发现多黏芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*) 能在番茄根表面形成生物膜, 国外也有研究 (Timmusk *et al.*, 2005) 报

道多黏芽孢杆菌可以在植物根尖形成生物膜,生物膜所包被的细菌群体,对不良环境有较强的耐受力(Costerton *et al.*, 1995)。至于枯草芽孢杆菌 Y13<sup>UV</sup> 是否能在油茶根部形成生物膜则有待进一步研究。

喷叶灌根结合处理 30 天后,叶片中的定殖数量比根部多,相比喷叶灌根单独处理的效果好。出现这一结果,笔者分析其原因可能是综合处理增强了菌株在叶内的定殖效果。叶内的标记菌株包括从根部进入并传递到叶片的标记菌株和直接从叶片侵入的标记菌株,更多的标记菌株与其他内生菌竞争生态位,在油茶体内繁殖,具有生长优势。针对此结果,笔者展开了后续试验,研究 Y13<sup>UV</sup> 菌株在油茶体内定殖对叶内微生物的影响。

国内外研究表明,生防菌能否在植物体内有效定殖是其发挥防病作用的重要因素(Kloepper *et al.*, 1981; 连玲丽等, 2011)。本试验初步明确了 Y13<sup>UV</sup> 菌株能够在油茶体稳定定殖,不同部位定殖量也有较大差异,这说明对特定部位有所偏好,可能与各部位分泌的营养物质有关(李世贵等, 2009; 杜芳等, 2015)。本试验也只研究了 Y13<sup>UV-GFP</sup> 在油茶体内的定殖动态,能否在其他植物体内稳定定殖,进而发挥防治效果,还需进一步研究,为大范围推广 Y13<sup>UV</sup> 提供依据。

## 4 结 论

将绿色荧光蛋白基因导入到枯草芽孢杆菌 Y13<sup>UV</sup> 中,标记菌株 Y13<sup>UV-GFP</sup> 在蓝光激发下可以发出强而稳定的绿色荧光、生长好、具有较好的抑菌效果。标记菌株可以通过灌根和喷叶的方式侵入油茶体内,并进行繁殖和传导; 20 天后达到稳定定殖状态,定殖时间长达 30 天,为制定枯草芽孢杆菌 Y13<sup>UV</sup> 的林间施用措施提供了理论基础。

## 参 考 文 献

- 陈 彧,周国英,宋光桃,等. 2010. 油茶抗炭疽病优良单株筛选及抗病机理研究. 湖南农业大学学报:自然科学版,36(4): 426 - 429.
- (Chen Y, Zhou G Y, Song G T, *et al.* 2010. Mechanism of resistance and *Colletotrichum gloeosporoides* in resistant individual trees of *Camellia oleifera*. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Science, 36(4): 426 - 429. [in Chinese])
- 陈燕红,黎永坚,喻国辉,等. 2014. 绿色荧光蛋白标记的枯草芽孢杆菌 R31 在西芹根际定殖研究. 中国农学通报,30(9): 237 - 241.
- (Chen Y H, Li Y J, Yu G H, *et al.* 2014. Colonization of green fluorescent protein gene tagged *Bacillus subtilis* R31 in celery rhizosphere. Chinese Agricultural Science Bulletin, 30(9): 237 - 241. [in Chinese])
- 杜 芳,何鹏飞,陈君卓,等. 2015. GFP 标记内生枯草芽孢杆菌 Y10 及其在白菜体内的定殖. 生物学杂志,34(7): 2064 - 2070.
- (Du F, He P F, Chen J Z, *et al.* 2015. Colonization of GFP-tagged endophytic *Bacillus subtilis* Y10 in Chinese cabbage. Chinese Journal of Ecology, 34(7): 2064 - 2070. [in Chinese])
- 范晓静,邱思鑫,吴小平,等. 2007. 绿色荧光蛋白基因标记内生枯草芽孢杆菌. 应用与环境生物学报,13(4): 530 - 534.
- (Fan X J, Qiu S X, Wu X P, *et al.* 2007. Endophytic *Bacillus subtilis* strain BS-labeled with green fluorescent protein gene. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 13(4): 530 - 534. [in Chinese])
- 葛银林,李德葆. 1995. 植物抗病性的诱导、机制、分子生物学研究进展. 中国生物防治,11(3): 134 - 141.
- (Ge Y L, Li D B. 1995. Induced plant disease-resistance, its mechanism and molecular biology. Chinese Journal of Biological Control, 11(3): 134 - 141. [in Chinese])
- 郝变青,马利平,乔雄梧,等. 2010. GFP 标记的植物促生菌 B96-II-gfp 的定殖能力研究. 中国生态农业学报,18(4): 861 - 865.
- (Hao B Q, Ma L P, Qiao X W, *et al.* 2010. Colonization ability of plant growth promoting *Bacillus* B96-II-gfp labeled with GFP. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 18(4): 861 - 865. [in Chinese])
- 连玲丽,谢荔岩,陈锦明,等. 2011. 生防菌 EN5 的定殖能力及其对根际土壤微生物类群的影响. 植物保护,37(2): 31 - 35.
- (Lian L L, Xie L Y, Chen J M, *et al.* 2011. Colonization of biocontrol strain EN5 and its effects on rhizosphere soil microbial communities. Plant Protection, 37(2): 31 - 35. [in Chinese])
- 李世贵,吕天晓,顾金刚,等. 2009. 绿色荧光蛋白在微生物根际定殖研究中的应用. 生物技术通报, (2): 34 - 37.
- (Li S G, Lü T X, Gu J G, *et al.* 2009. Green fluorescent protein and its application to microbial colonization in rhizosphere. Biotechnology Bulletin, (2): 34 - 37. [in Chinese])
- 刘邮洲,梁雪杰,乔俊卿,等. 2014. 枯草芽孢杆菌 PTS-394 的 GFP 标记及其定殖能力. 植物保护学报,41(4): 416 - 422.
- (Liu Y Z, Liang X J, Qiao J Q, *et al.* 2014. *Bacillus subtilis* PTS 394 labeled by green fluorescent protein and its colonization. Acta Phytologica Sinica, 41(4): 416 - 422. [in Chinese])
- 刘云霞,张青文,周明群. 1996. 电镜免疫胶体金定位水稻内生细菌的研究. 农业生物技术学报,4(4): 354 - 358.
- (Liu Y X, Zhang Q W, Zhou M Q. 1996. Immuno-gold staining techniques for detection of endophytic bacteria in rice plant. Journal Of Agricultural Biotechnology, 4(4): 354 - 358. [in Chinese])
- 彭 祎,谭悠久,黄永春,等. 2010. GFP 标记的多粘芽孢杆菌 1114 在番茄根际的定殖. 中国生物防治,26(3): 307 - 311
- (Peng Yi, Tan Youjiu, Huang Yongcun, *et al.* 2010. Colonization of *gfp* tagged *Paenibacillus polymyxa* strain around tomato roots. Chinese Journal of Biological Control, 26(3): 307 - 311. [in Chinese])
- 宋光桃,周国英,罗秋良,等. 2009. 油茶林土壤放线菌的分离及其拮抗油茶炭疽病菌的筛选. 福建农林大学学报,29(4): 297 - 300.
- (Song G T, Zhou G Y, Luo Q L, *et al.* 2009. Isolation of actinomycetes and screening of their antagonistic strains to *Colletotrichum gloeosporioides* in soil of *Camellia oleifera* forest. Journal of Fujian

- College of Forestry, 29 (4) : 297 – 300. [in Chinese])
- 王 卿, 林 玲, 罗楚平, 等. 2015. 生防内生枯草芽孢杆菌 Jaas ed1 在西瓜植株内的定殖能力检测. 西南农业学报, 28 (5) : 2079 – 2085.
- (Wang Q, Lin L, Luo C P, *et al.* 2015. Colonization of biocontrol endophytic *Bacillus subtilis* Jaas ed1 inside plant of watermelon. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 28 (5) : 2079 – 2085. [in Chinese])
- 王瑞芹. 2014. 油茶内生拮抗细菌 Y13 定殖动态及对叶内微生物调整效应研究. 长沙: 中南林业科技大学硕士学位论文.
- (Wang R Q. 2014. Colonization and adjusted effect of inoculating with antagonistic strains Y13 on microbe in *Camellia oleifera*. Changsha: MS thesis of Central South University of Forestry and Technology, 1 – 57. [in Chinese])
- 吴嵩民, 顾本康, 傅正擎, 等. 2001. 内生菌 73a 在不同抗性品种棉花体内的定殖和消长动态研究. 植物病理学报, 31 (4) : 289 – 294.
- (Wu A M, Gu B K, Fu Z Q, *et al.* 2001. Studies on the population fluctuation of entophytic bacteria 73a in cotton plant. Acta Phytopathologica Sinica, 31 (4) : 289 – 294. [in Chinese])
- 杨 华, 赵丹阳, 秦长生, 等. 2015. 不同油茶种和品种对炭疽病的抗性观察. 植物保护, 41 (2) : 195 – 199.
- (Yang H, Zhao D Y, Qin C S, *et al.* 2015. Resistance of different species and cultivars of oil-tea *Camellia* to *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Protection, 41 (2) : 195 – 199. [in Chinese])
- 杨光道. 2009. 油茶不同品种对炭疽病的抗性机制研究. 合肥: 安徽农业大学博士学位论文.
- (Yang G D. 2009. Resistance mechanism of *Camellia oleifera* cultivars to *Colletotrichum gloeosporioides*. Hefei: PhD thesis of Anhui Agricultural University, 1 – 135. [in Chinese])
- 殷幼平, 袁训娥, 李 强, 等. 2010. 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, 43 (17) : 3555 – 3563.
- (Yin Y P, Yuan X E, Li Q, *et al.* 2010. Construction of green fluorescent protein gene tagged biocontrol bacteria *Bacillus subtilis* CQBS03 and its colonization on the citrus leaves. Scientia Agriculture Sinica, 43 (17) : 3555 – 3563. [in Chinese])
- 周国英, 宋光桃, 李 河, 等. 2007. 油茶病虫害防治现状及应对措施. 中南林业科技大学学报, 27 (6) : 179 – 182.
- (Zhou G Y, Song G T, Li H, *et al.* 2007. Present Situation and Countermeasures to Control *Camellia oleifera* Pest and Disease. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 27 (6) : 179 – 182. [in Chinese])
- 周建宏, 刘君昂, 邓小军, 等. 2011. 植物提取物对油茶主要病害的抑菌作用. 中南林业科技大学学报, 31 (4) : 42 – 45.
- (Zhou J H, Liu J A, Deng X J, *et al.* 2011. Inhibition effects of plant extracts against major diseases of *Camellia oleifera*. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 31 (4) : 42 – 45. [in Chinese])
- Costerton J W, Lewandowski Z, Caldwell D E, *et al.* 1995. Microbial biofilms. Annual Reviews in Microbiology, 49 : 711 – 745.
- Kloepper J W, Schroth M N. 1981. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnoipbiotic conditions. Phytopatholog, 71 (6) : 642 – 644.
- Paulitz TC, Belanger R R. 2001. Biological control in greenhouse systems. Annual Review of Phytopathology, 39 : 103 – 133.
- Timmusk S, Grantcharova N, Gerhart E, *et al.* 2005. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. Applied and Environment Microbiology, 71 (11) : 7292 – 7300.
- Yang X R, Tian T, Sun S Q, *et al.* 2013. GFP-expressing *Bacillus subtilis* B579 strain and its colonization detection. Acta Phytopathologica Sinica, 41 (3) : 82 – 87.

(责任编辑 朱乾坤)