

玉米内生细菌的动态分布及拮抗作用

农倩^{1,2}, 唐照磊¹, 杜青¹, 李石初¹

(1. 广西农业科学院玉米研究所, 广西南宁 530007; 2. 广西农业科学院微生物研究所, 广西南宁 530007)

摘要 [目的]比较不同品种及生育期玉米内生细菌的多样性差异,对分离到的内生细菌的拮抗作用进行鉴定。[方法]以桂单0810、迪卡008、正大619玉米品种苗期和穗期的不同组织为研究对象,采用组织研磨匀浆方法分离培养内生细菌,结合形态生理特征和16S rDNA基因序列同源性比对分析对菌株进行了分类,并测定了所分离的菌株对4种玉米病原菌的拮抗作用。[结果]从桂单0810、迪卡008、正大619这3个玉米品种苗期和穗期的根、茎、叶中共分离到82株内生细菌,归于4个属,芽孢杆菌属为优势菌群,各菌群在不同生育期及组织的分布动态各有特点,其中有8株菌对4种玉米病原菌表现出不同程度的拮抗作用。[结论]玉米内生细菌的多样性丰富,可作为玉米病害生防菌的来源。

关键词 玉米;内生细菌;动态分布;拮抗作用

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)30-0003-04

Dynamic Distribution and Antagonism of Endophytic Bacteria from Maize

NONG Qian^{1,2}, TANG Zhao-lei¹, DU Qing¹ et al (1. Maize Research Institute of Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007; 2. Microbiology Research Institute of Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007)

Abstract [Objective] The aim was to compare the endophytic bacteria diversity and antagonism function isolated from different maize varieties at different growth stages. [Method] With different tissues of Guidan0810, Dika008, Zhengda 619 at seedling stage and heading stage as research objects, endophytic bacteria were isolated and cultured by tissues homogenate. Strains were classified combined with morphological and physiological characteristics and sequence homology comparison of 16S rDNA gene, the antagonism ability of isolated strains to 4 maize pathogens were identified. [Result] Totally 82 strains which belonged to 4 genus were isolated from root, stem and leaf at seedling stage and heading stage of maize variety Guidan 0810, Dekarl 008 and Zhengda 619, and Bacillus was the dominant flora. The bacterial population composition was diverse from the growth stage and tissues. 8 strains were showing antagonism ability to 4 pathogens. [Conclusion] The maize endophytic bacteria diversity is abundant, and can be the source of biocontrol bacterium for maize disease.

Key words Maize; Endophytic bacteria; Dynamic distribution; Antagonism

植物内生细菌是指能在健康植物组织内栖居且对植物不造成危害并建立和谐联合关系的细菌^[1]。研究表明,内生细菌为植物微生态系统天然组成部分,其存在可提高植物对恶劣环境的适应性及促进寄主植物生长,还可作为潜在的内生拮抗细菌加以利用,减少化学农药造成的环境污染,提高农田生态系统的多样性,保持生态平衡^[2]。植物内生细菌多样性和群落结构不仅因作物种类不同而存在差异^[3],还随着植物生长期、组织器官不同而有差别^[4-5]。笔者以桂单0810、迪卡008、正大619这3个玉米品种苗期和穗期的不同组织为研究对象,采用组织研磨匀浆方法分离培养内生细菌,结合形态生理特征和16S rDNA基因序列同源性比对分析对菌株进行了分类,并测定了所分离的菌株对4种玉米病原菌的拮抗作用,旨在为玉米病害的生物防治提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料 玉米品种为桂单0810、迪卡008和正大619。细菌基因组DNA提取试剂盒为天根生化科技有限公司产品;Taq PCR Mix为北京全式金生物技术有限公司产品;GeneJET为Thermo Scientific公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 玉米种植与样本采集。将玉米品种桂单0810、迪卡

008和正大619植于广西农业科学院明阳实验基地,随机区组排列,每个品种种植3个小区,每个小区5行,行长4.00 m,行距0.65 m,每行17株。于苗期和抽穗期进行样本采集,采用5点取样法,每点采4株。

1.2.2 内生细菌的分离与纯化。将样本用自来水冲洗干净,称取根、茎、叶各1.0 g,75%乙醇表面消毒1 min,0.1%氯化汞消毒根3 min、茎2 min、叶片1 min,无菌水冲洗3次后,加10 mL无菌水研磨至匀浆,吸取最后一次冲洗液(作为对照)和匀浆各1 mL稀释1 000倍,分别取1 mL稀释液置于培养皿,倒入营养琼脂(NA)固体培养基25 mL并混匀,28℃培养24~72 h。根据菌落的颜色和形态分类,计数,挑取菌落形态、色泽及培养基颜色等不同的菌株按常规方法纯化,纯化菌株转入含有80%甘油的离心管中,4℃保存备用。

1.2.3 细菌形态学鉴定。形态学鉴定包括菌落外形观察、革兰氏染色和显微镜观察^[6]。

1.2.4 细菌基因组DNA提取。使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA,操作按说明书进行,使用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测DNA的浓度及其完整性,-40℃保存备用。

1.2.5 细菌16S rDNA的PCR扩增与测序。采用通用引物对细菌16S rDNA片段进行PCR扩增,上游引物27f:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',下游引物1492r:5'-TACGGCTACCTGTTTACGACTT-3'。PCR扩增体系为20 μL,其中含10 μL 2×Taq PCR Mix,2 μL DNA,4 μmol/L上、下游引物各1 μL,6 μL双蒸水。扩增程序:95℃预变性10 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,共36个

基金项目 广西农业科学院基本业务专项(2014YQ25);广西自然科学基金项目(2014GXNSFBA118121);广西农业科学院玉米研究所科技发展基金项目(玉ZX2014007)。

作者简介 农倩(1985-),女,广西河池人,助理研究员,硕士,从事植物内生微生物应用研究。

收稿日期 2016-09-14

循环;72℃延伸10 min。使用 Gene JET 胶回收试剂盒回收 PCR,委托上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.6 序列生物信息分析。将获得的16S rDNA 序列与 NCBI 数据库中已知序列进行同源性比对,采用基因序列分析软件 DNAMAN 和系统发育树构建软件 MEGA 7.0,与基因 GenBank 数据库中相关属种基因序列进行系统发育树分析^[7]。

1.2.7 拮抗作用鉴定。以玉米纹枯病、玉米大斑病、玉米小斑病和玉米茎腐病4种病原菌为供试病原菌,对分离到的内生细菌进行拮抗作用测试。采用平板对峙法,将已活化的直径5 mm的病原菌块接种到马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板培养基中央,病原菌块四周等距离接入分离到的菌株,28℃培养7 d后测量病原菌向拮抗菌方向的生长距离,以仅接种病原菌块的平板为对照,计算抑菌率。

抑菌率 = (对照病原菌菌落半径 - 病原菌向拮抗菌方向生长距离) / 对照病原菌菌落半径 × 100%

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离数量及鉴定 从苗期各组织样本中分离获得内生细菌36株,从穗期样本中分离得到46株;从根中分离得到的菌株数量最多,为44株,茎中数量次之,为21株,叶中数量最少,为17株;从桂单0810获得的菌株数量最多,为36株,迪卡008次之,为28株(表1)。对获得的内生细菌进行形态学观察、生理生化反应和16S rDNA 序列比对分析发现,82株内生细菌分属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)4个属(图1),其中芽孢杆菌属为优势类群,菌株数量为52株,占总数的63.4%(表1)。

表1 不同生育期玉米各组织中分离到的内生细菌数量

Table 1 Number of endophytic bacteria isolated from different maize tissues at different growth periods

玉米品种 Maize varieties	细菌类群 Bacteria group	合计 Total	苗期(穗期)菌株数 Bacteria at seedling stage(heading stage)		
			根 Root	茎 Stem	叶 Leaf
桂单 0810Guidan 0810	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	11 (9)	5 (5)	3 (2)	3 (2)
	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	3 (4)	2 (2)	1 (1)	0 (1)
	黄单胞菌属 <i>Xanthomonas</i>	3 (4)	2 (2)	1 (1)	0 (1)
	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	0 (2)	0 (1)	0 (0)	0 (1)
迪卡 008Dika 008	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	8 (11)	4 (5)	2 (3)	2 (3)
	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	2 (3)	2 (1)	0 (1)	0 (1)
	黄单胞菌属 <i>Xanthomonas</i>	0 (2)	0 (1)	0 (1)	0 (0)
	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	0 (2)	0 (1)	0 (0)	0 (1)
正大 619Zhengda 619	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	7 (6)	4 (3)	2 (2)	1 (1)
	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	1 (2)	1 (1)	0 (1)	0 (0)
	黄单胞菌属 <i>Xanthomonas</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
合计 Total		36 (46)	21 (23)	9 (12)	6 (11)
总计 Total		82	44	21	17

注:括号中数据为从穗期样本中分离获得的菌株数。

Note:Data in brackets were strains isolated from samples at the heading stage.

2.2 内生细菌类群的变化 随着生育期变化,植株内生细菌种类也有所变化。其中,桂单0810、迪卡008从苗期到穗期的内生细菌种类有所增加,桂单0810苗期未分离到假单胞菌属,但穗期阶段获得了假单胞菌属;迪卡008苗期只含

有芽孢杆菌属和肠杆菌属,穗期多分离到黄单胞菌属和假单胞菌属,正大619的内生细菌种类在不同生育期无变化(表2)。可见,不同品种的内生细菌种类变化情况存在差异。

表2 不同生育期内生细菌种类的变化

Table 2 Endophytic bacteria changes at different maize growth stage

品种 Varieties	生育期 Growth stage	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	黄单胞菌属 <i>Xanthomonas</i>	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>
桂单 0810Guidan 0810	苗期	+	+	+	-
	穗期	+	+	+	+
迪卡 008Dika 008	苗期	+	+	-	-
	穗期	+	+	+	+
正大 619Zhengda 619	苗期	+	+	-	+
	穗期	+	+	-	+

注:“+”表示分离出;“-”表示未分离出。

Note:“+” stands for isolated;“-” stands for not isolated.

2.3 内生细菌数量的变化 分离计数发现,玉米植株内生细菌数量随着生育期发展呈上升趋势,其中桂单0810增幅

最大,由苗期的 1.983×10^4 cfu/g 增长至穗期的 12.307×10^4 cfu/g,增加了6.2倍。穗期各品种间的内生细菌总量差异达

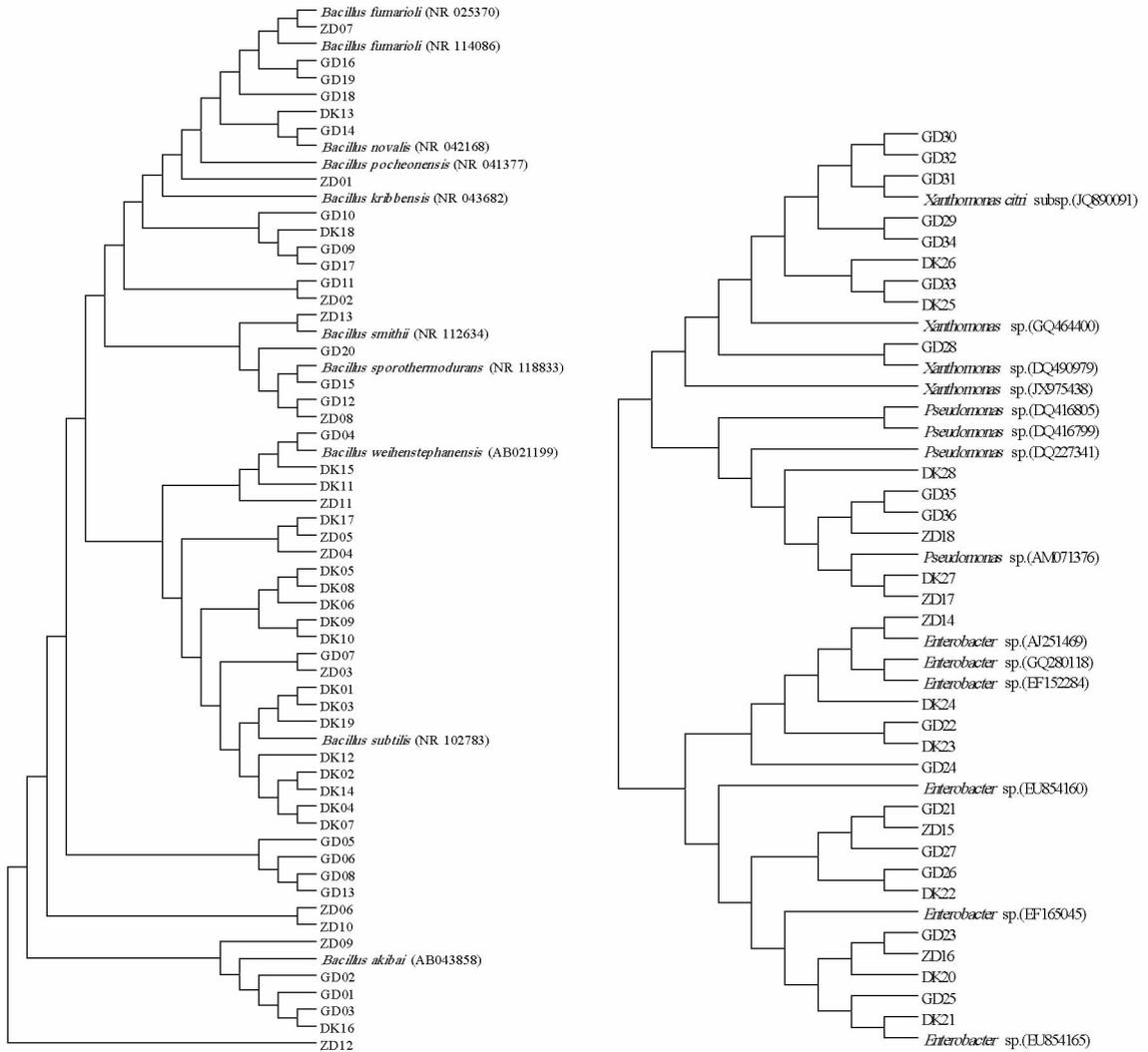


图 1 玉米内生细菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of endophytic bacteria from maize

到显著水平,表明不同品种间内生细菌的富集能力存在差异,桂单 0810 较其他 2 个品种更易诱捕到内生细菌定殖繁殖(表 3)。

2.4 拮抗作用鉴定 结果表明,82 株内生细菌中,有 8 株对 4 种病原菌表现出不同程度的拮抗作用,其中菌株 GD16 对 4 种病原菌均表现出不同程度的拮抗作用(表 4)。

表 3 不同生育期各组织中内生细菌总量的变化

Table 3 The change of endophytic bacteria amount in different tissues under different maize growth stage

× 10⁴ cfu/g

品种 Varieties	苗期 Seedling stage				穗期 Heading stage			
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	合计 Total	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	合计 Total
桂单 0810/Guidan 0810	1.203	0.567	0.213	1.983 a	6.657	3.230	2.420	12.307 a
迪卡 008/Dika 008	0.947	0.440	0.220	1.607 a	5.360	1.967	1.487	8.813 b
正大 619/Zhengda 619	0.660	0.290	0.098	1.048 ab	4.030	1.147	0.897	6.073 c

注:同列数据后不同字母表示不同品种间在 0.05 水平差异显著。

Note: Different letters in the same column stand for significant difference at 0.05 level.

3 结论与讨论

该研究结合形态学特征、生理生化特性和 16S rDNA 基因序列比对分析法对分离到的 82 株细菌进行鉴定。结果表明,玉米内生细菌的多样性较丰富,共鉴定出芽孢杆菌属、肠杆菌属、黄单胞菌属、假单胞菌属 4 个属,以芽孢杆菌属为主,这与前人的分离结果一致^[8]。

玉米内生细菌的种类、数量与品种的遗传背景及植株组

织部位相关^[5]。该研究表明,桂单 0810 和迪卡 008 均分离到 4 个属的内生细菌,而正大 619 只分离到 3 个属,其中桂单 0810 分离到的菌株数量最多,可能是该品种为当地选育品种,比较适应当地的生态环境和菌株的入侵。3 个品种均表现为根组织中内生细菌的数量最大,茎和叶中数量次之,原因可能是由于根系统是内生细菌进入植物的入口,所以根聚集内生细菌比其他器官多^[9]。在分离到的 82 株内生细菌

中,有8株对玉米纹枯病菌等4种病原菌有拮抗作用,其中4株(GD08、GD16、ZD13、DK17)为芽孢杆菌属,1株(DK27)为假单胞菌属。芽孢杆菌在玉米中分布广、菌量大,在玉米植株过程中具有稳定的内生特性,并能够形成芽孢,抵抗外界不良环境,有些菌株对植物病害有较好的防治作用^[10]。假单胞菌属是作物中具有稳定溶磷效应的优势菌种,分离自玉

米的溶磷内生细菌,具有ACC脱氨酶活性,可以促进植株生长和防治植物病害^[11]。并且假单胞菌能产生多种抗生素,改善植物营养,促进植物生长,并降解土壤中有毒物质,对植株促生及防病作用明显^[12]。因此,该研究对3个玉米品种内生细菌的分离鉴定可为进一步研究细菌种属多样性与玉米品种特性的关系,并获得有益微生物资源奠定基础。

表4 内生细菌对4种玉米病原菌的拮抗作用

Table 4 Antagonism identification of endophytic bacteria to 4 maize pathogens

病原菌 Pathogens	抑菌强度 Antimicrobial strength	菌株数 Strain number	菌株编号 Strain No.	分离来源 Isolate source
玉米纹枯病菌 Corn sheath blight pathogens	+++	1	GD08	桂单0810 苗期根系
	++	1	GD16	桂单0810 苗期根系
	+	2	ZD13	正大619 穗期茎
			DK17	迪卡008 穗期根系
玉米大斑病菌 Corn northern leaf blight pathogens	++	1	GD28	桂单0810 穗期根系
	+	2	GD16	桂单0810 苗期根系
			GD21	桂单0810 穗期根系
玉米小斑病菌 Corn southern leaf blight pathogens	+	2	GD16	桂单0810 苗期根系
			ZD15	正大619 苗期茎
玉米茎腐病菌 Corn stalk rot pathogens	++	1	GD16	桂单0810 苗期根系
	+	2	DK27	迪卡008 穗期根系
			ZD15	正大619 苗期茎

注:“+++”表示抑菌率>75%;“++”表示35%<抑菌率<75%;“+”表示0<抑菌率<35%。

Note:“+++” antibacterial rate >75%; “++” 35% < antibacterial rate <75%; “+” 0 < antibacterial rate <35%.

参考文献

- [1] HALLMANN J, QUDAT-HALLMANN A, MAHAFFEE W F, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops [J]. *Can J Microbiol*, 1997, 43 (1): 895-914.
- [2] COMPANT S, DUFFY B, NOWAK J, et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71 (9): 4951-4959.
- [3] YU Z H, YU J, LKENAGA M, et al. Characterizing endophytic bacterial diversity in roots of soybean and corn using locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide-PCR clamping and 454 pyrosequencing methods [J]. *J Integr Agr*, 2016, 15: 1883-1891.
- [4] 刘洋, 左山, 邹媛媛, 等. 杂交玉米农大108及其亲本种子内生细菌群落的多样性[J]. *中国农业科学*, 2011(23): 4763-4771.
- [5] 高增贵, 陈捷, 刘限, 等. 玉米品种遗传多态性与根系内生细菌种群的相互关系[J]. *生态学报*, 2006(6): 1920-1925.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 365-375.
- [7] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33 (7): 1870-1874.
- [8] 许艳蕊, 方志军, 卢晓平, 等. 四个玉米自交系根系内生细菌的分离和鉴定[J]. *作物杂志*, 2016(4): 112-117.
- [9] 刘云霞, 张青文, 周明详. 水稻体内细菌的动态研究[J]. *应用生态学报*, 1999(10): 735-738.
- [10] 侯美玲, 辛媛媛, 郝志敏, 等. 玉米内生芽孢杆菌的抗菌活性物质及其拮抗玉米大斑病菌机理的初步研究[J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20 (9): 1018-1027.
- [11] 沈萍, 闫淑珍, 陈双林, 等. 具ACC脱氨酶活性的植物内生细菌对辣椒的促生作用和对疫霉病的防治作用[J]. *植物保护学报*, 2008, 35 (1): 28-32.
- [12] 滕松山, 刘艳萍, 赵蕾. 具ACC脱氨酶活性的碱蓬内生细菌的分离、鉴定及其生物学特性[J]. *微生物学报*, 2010, 50(11): 1503-1509.

本刊提示 参考文献只列主要的、公开发表的文献,序号按文中出现先后编排。著录格式(含标点)如下:(1)期刊——作者(不超过3人者全部写出,超过者只写前3位,后加“等”)。文章题名[J]。期刊名,年份,卷(期):起止页码。(2)图书——编著者.书名[M]。版次(第一版不写)。出版地:出版者,出版年:起止页码。(3)论文集——析出文献作者.题名[C]//。主编.论文集名.出版地:出版者,出版年:起止页码。