

# 玉米品种遗传多态性与根系内生细菌种群的相互关系

高增贵<sup>1</sup>, 陈 捷<sup>1,2</sup>, 刘 限<sup>1</sup>, 薛春生<sup>1</sup>

(1 沈阳农业大学植物保护学院 农业部北方农作物病害免疫重点开放实验室, 沈阳 110161;

2 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101)

**摘要:** 对辽宁省 14 个玉米主栽品种根系内主要细菌种群的分析结果表明, 芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.) 为玉米内生细菌的主要种群, 其它种属包括肠杆菌属、沙雷氏杆菌属、假单胞菌属、黄单胞菌属和棍状杆菌属。内生细菌在不同玉米品种和不同生育期之间存在程度不同的差异。从 90 条随机引物中筛选出条带清晰、重复性好的 13 个引物, 对 14 个玉米主栽品种进行遗传多态性的 RAPD 分析, 共扩增出条带 139 条, 其中多态性条带 101 条, 多态性比率 72.7%。利用 SPSS 统计分析软件对 14 个玉米品种在 DNA 水平和内生细菌种群水平上进行聚类分析, 结果表明, 品种亲缘关系在这两个水平上表现基本一致, 即品种内生细菌的种类及其数量在很大程度上受品种的遗传背景控制。

**关键词:** 玉米; 内生细菌; 遗传背景; 随机扩增片段多态性

文章编号: 1008-0933(2006)06-1920-06 中图分类号: Q143, Q938, S314, S513.03 文献标识码: A

## The correlation between maize genetic polymorphisms and endophytic bacteria population in plant roots

GAO Zeng-Gui<sup>1</sup>, CHEN Jie<sup>1,2</sup>, LIU Xian<sup>1</sup>, XUE Chun-Sheng<sup>1</sup> (1 Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Key Laboratory of North Crop Immunology China's Ministry of Agriculture, Shenyang 110161, China; 2 Agriculture and Biology College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(6): 1920~ 1925.

**Abstract:** 14 major maize cultivars in Liaoning Province of China were analyzed for their endophytic bacteria population studies. The results showed that *Bacillus* spp. was the major genera of endophytic bacteria strains isolated from the maize roots, and the minor strains include *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Xanthomonas* spp., and *Clavibacter* spp. Also, there were degrees of variations between endophytic bacteria isolated from different species of maize cultivars and growth periods. All 14 major maize cultivars were subjected to a random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) study, among 90 random primers tested, 13 primers were able to generate distinct DNA fragments, in which, 72.7% of 139 RAPD fragments were shown results of polymorphism. Furthermore, from the studies of SPSS cluster analysis which conducted on maize cultivars and endophytic bacteria, our results strongly suggest a close relationship between the species and numbers of endophytic bacteria and the genetic background of maize cultivars.

**Key words:** maize; endophytic bacteria; genetic background; random amplified polymorphic DNA

植物本身就是一个复杂的微生态系统, 其重要成员之一是植物内生细菌<sup>[1,2]</sup>。目前, 在各种农作物(包括小麦、水稻、玉米、马铃薯、番茄、甜菜)及果树等经济作物体内已发现的内生细菌数量超过 129 种(隶属于 54 个属)<sup>[3-7]</sup>。已有研究表明, 内生细菌在宿主抵抗植物病虫害及抗非生物胁迫中起到重要作用。因此, 研究内生细菌种群与品种遗传背景的相互关系, 对抗病性微生物育种及其二者协同进化机理研究具有重要意义。目

基金项目: 国家十五科技攻关资助项目(2004BA509B05)

收稿日期: 2005-04-19; 修订日期: 2005-11-07

作者简介: 高增贵(1966~), 男, 内蒙古准格尔旗人, 博士, 研究员, 主要从事植物微生物生态学和病害生物防治研究。E-mail: gaozenggui@sina.com

**Foundation item:** The project was supported by National Tenth-five-year Project (No. 2004BA509B05)

**Received date:** 2005-04-19; **Accepted date:** 2005-11-07

**Biography:** GAO Zeng-Gui, Ph. D, Professor, mainly engaged in plant microecology and bio-control of plant disease. E-mail: gaozenggui@sina.com

前关于内生细菌与宿主植物的关系等方面的研究报道很少<sup>[8-10]</sup>。笔者初步研究表明, 内生细菌在不同玉米品种和不同生育期存在不同程度的差异<sup>[11]</sup>。为探讨内生细菌的种类及其数量与品种遗传背景之间的相关性, 本文利用随机扩增多态性(RAPD)技术, 从DNA水平上研究了品种的遗传特性与内生细菌种群的相互关系, 为丰富植物微生物生态学理论及基因工程菌的研究和应用奠定基础<sup>[12, 13]</sup>。

1 材料和方法

1.1 供试玉米品种

辽宁省玉米主栽品种 14 个(表 1), 包括连玉 11、连玉 13、连玉 15、沈单 10、沈单 11、沈试 30、沈单 18、沈农 87、农大 108、富友 1 号、辽单 24、掖单 13、新铁 10、东单 57。

1.2 内生细菌的分离鉴定

1.2.1 分离用培养基 采用牛肉膏蛋白胨固体培养基(蛋白胨 5.0 g, NaCl 5.0 g, 牛肉膏 3.0 g, 酵母膏 3.0 g, 琼脂 18.0 g, 加水至 1000 ml, pH 7.2)<sup>[14]</sup>。

1.2.2 分离方法

(1) 试材培养与取样 首先用无菌水将供试品种的种子进行表面清洗, 播种于未曾种过玉米的砂壤土, 4 叶期进行取样幼苗根系。将玉米种子直接播种大田, 自然生长, 抽丝期和灌浆初期取样成株根系。每一根样取 2 份, 一份用于内生细菌分离, 另一份用于 DNA 提取。

(2) 分离 采用平板稀释分离法。先用水将取来的根样冲洗干净, 然后在 0.1% 十二烷基磺酸钠溶液中浸泡 30 min, 再用水冲洗干净, 而后随机取根 5.0 g,

纱布包裹。包裹好的材料浸入 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 中消毒, 苗期根消毒 10~12 min, 成株期消毒 15~18 min, 再用无菌水冲洗 3~5 次。取 0.2 ml 最后 1 次无菌水冲洗液涂布接种于分离培养基上, 每个处理重复 3 次, 培养 48 h, 观察有无菌落产生。据此验证此消毒方法是否能全部杀死供试样品表面微生物。然后将供试材料转入无菌研钵中研磨成匀浆。加入 5.0 ml 无菌水搅匀。以此为母液, 依次稀释为 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup> 5 个浓度的菌悬液。分别取 0.2 ml 加入牛肉膏蛋白胨固体分离培养基进行内生细菌的分离, 每个处理重复 3 次。培养 3~7 d 后计数。每皿挑选 3~5 株, 按常规方法对分离出的菌落进行纯化, 以供鉴定和保藏。

(3) 鉴定 内生细菌的鉴定参考权威手册<sup>[14, 15]</sup>, 其中芽孢杆菌属鉴定到种<sup>[16]</sup>的方法。

1.3 供试品种的 RAPD

1.3.1 基因组 DNA 的提取 首先将上述制备的根样进行冷冻干燥, 干燥后进行 DNA 的提取。

提取缓冲液(Extraction Buffer): 100 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 100 mmol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, 10% SDS。提取程序见文献<sup>[17]</sup>。

1.3.2 RAPD 反应体系和扩增程序 引物筛选和 RAPD 分析采用相同的 PCR 反应体系和扩增程序。供试引物为上海生物工程公司生产的 S1-S5、S11-S25、S41-S45、S61-S65、S81-S85、S91-S95、S101-S105、S121-S125、S181-S185、S190-S200、S1300-S1320、S1441-S1450、S1456-S1460 等 10 个碱基随机引物 90 条引物。反应体系: 反应体积为 20 μl, 各反应成分的终浓度分别为 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mmol/L dNTP, 0.6 μmol/L, Taq 酶(上海生物工程公司), 25 ngDNA。反应程序: 94℃ 1 min 35℃ 1.5 min 72℃ 2 min, 5 循环; 94℃ 0.5 min 35℃ 1 min 72℃ 1.5 min, 40 循环; 72℃ 10 min, 1 循环; 程序结束后进入 4℃ 状态。扩增反应在 PCR Express Thermal Cycler HBPX220 (英国 Thermo Hybaid Limited 生产) 上进行。电泳分离: 反应结束后, 反应管中加入 2 μl 含 40% 蔗糖的溴酚蓝溶液混匀, 根据电泳槽梳子的大小取 10~15 μl 扩增样品, 轻轻注入凝胶样品槽中。电泳凝胶为 1.5% 的琼脂糖,

表 1 内生细菌分离的供试玉米品种

| Table 1 Cultivars tested for isolation of corn endophytic bacteria |                  |                         |
|--------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------|
| 编号*<br>Code*                                                       | 品种 Cultivars     | 组合 Combination          |
| 1                                                                  | 连玉 11 Lianyul1   | 543×880                 |
| 2                                                                  | 连玉 13 Lianyul3   | 104×673(104 与 543 近缘)   |
| 3                                                                  | 连玉 15 Lianyul5   | 543×136                 |
| 4                                                                  | 沈单 11 Shendan11  | 沈 135×340(沈 135-热带血缘)   |
| 5                                                                  | 沈单 10 Shendan10  | 沈 137×Q1261(沈 137-热带血缘) |
| 6                                                                  | 沈试 30 Shenshi30  | 沈 137×341(341-5003 血缘)  |
| 7                                                                  | 沈单 18 Shendan18  | 152×沈 137               |
| 8                                                                  | 沈农 87 Shennong87 | 2109×309(309-丹 340 血缘)  |
| 9                                                                  | 农大 108 Nongda108 | 178×黄 C (178-599 血缘)    |
| 10                                                                 | 富友 1 号 Fuyou 1   | 2109×598(2109-5003 血缘)  |
| 11                                                                 | 辽单 24 Liaodan 24 | 辽 2345×丹 340            |
| 12                                                                 | 掖单 13 Yedan 13   | 478×丹 340               |
| 13                                                                 | 新铁 10 Xintie 10  | C8605×丹 340             |
| 14                                                                 | 东单 57 Dongdan57  | (C8605×9046) 二环系×598    |

\* 下同 the same below

电泳缓冲液为 50×TAE(用时稀释 50 倍),电压为 5 V/cm。电泳结束后,将凝胶板放入溴乙淀(EB)溶液中染色,染色时间 40 min~ 2 h 不等。随后用 Kodak 紫外分析仪检测扩增效果,并记录。Marker: DNA/EcoR I + Hind III 浓度为 0.05 mg/ml,加样 4 μl。

1.4 数据分析

将由 14 个品种分离鉴定出的内生细菌数量以属、种形式汇总成数据表;RAPD 结果将每条带均看作一个遗传位点,根据扩增条带的有无分别记为 1 和 0,将 13 条引物 14 个品种的图谱转化成由 1、0 组成的数据表,分别输入 SPSS 统计软件,按公式  $d = \sum (X_i - Y_i)^2$  计算品种间的欧氏距离平方,形成欧氏距离矩阵,再采用分层聚类法进行聚类分析,并给出供试品种亲缘关系聚类分析图。

2 结果与分析

2.1 不同品种在内生细菌种群水平上的聚类分析

14 个品种从苗期和抽丝期内生细菌的分离鉴定结果见表 2 和表 3,从表中可以看出,玉米内生细菌种类比较复杂,共鉴定出 6 个属,包括芽孢杆菌属 *Bacillus*、肠杆菌属 *Enterobacter*、沙雷氏杆菌属 *Serratia*、假单胞菌属 *Pseudomonas*、黄单胞菌属 *Xanthomonas* 和棍状杆菌属 *Clavibacter*。其中芽孢杆菌分布最广,已鉴定出 8 个种,包括枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、巨大芽孢杆菌 *B. megaterium*、蜡状芽孢杆菌 *B. cereus*、地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis*、炭疽芽孢杆菌 *B. anthracis*、蕈状芽孢杆菌 *B. mycoides*、短小芽孢杆菌 *B. pumilus*、环状芽杆菌 *B. circulans*; *Serratia* 和 *Enterobacter* 分布较少;而 *Clavibacter* 分布最少。不同品种间内生细菌的种类和数量均存在差异,经相关分析表明,苗期与成株期细菌总量不相关。

将表 2 和表 3 中 14 个品种的苗期和成株期内生细菌属、种数量进行聚类分析,结果见图 1。供试品种在连锁距离 14 的范围内全部聚在一起,分成 6 组,沈单 10、沈单 11、沈试 30 和沈单 18 为第 1 组;沈农 87、新铁 10 为第 2 组;富友 1 号、东单 57 为第 3 组,连玉 11、连玉 13、连玉 15 和农大 108 为第 4 组,辽单 24 和掖单 13 自成一组,为第 5 组和第 6 组。同时从聚类分析结果发现,同组内不同品种具有相同或相似的血缘背景,如第 1 组的 4 个品种均含有热带血缘;第 2 组的 2 个品种其母本均含 5003 血缘,父本含丹 340 血缘;第 3 组的 2 个品种含有 5003 血缘。

表 2 玉米苗期不同品种根系内生细菌主要种群的数量分布(× 10<sup>4</sup> cfu·g<sup>-1</sup>)

| 属、种<br>Genus, species      | 品种编号 Numbered cultivars |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----------------------------|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                            | 1                       | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   |
| <i>Bacillus subtilis</i>   | 0.04                    | 0.21 | 0.11 | 0.26 | 0.20 | 0.08 | 0.48 | 0.06 | 0.05 | 0.05 | 0.20 | 0.31 | 0.26 | 0.15 |
| <i>B. megaterium</i>       | 0.12                    | 0.09 | 0.05 | 0.06 | 0.12 | 0.02 | 0.32 | 0.04 | 0.03 | 0.01 | 0.12 | 0.15 | 0.13 | —    |
| <i>B. cereus</i>           | 0.01                    | 0.01 | 0.02 | —    | —    | 0.01 | —    | —    | —    | 0.03 | —    | —    | —    | 0.06 |
| <i>B. licheniformis</i>    | —                       | —    | —    | 0.01 | 0.04 | 0.03 | 0.04 | —    | 0.01 | —    | 0.02 | 0.01 | —    | —    |
| <i>B. anthracis</i>        | —                       | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| <i>B. mycoides</i>         | —                       | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 0.03 | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| Others <i>Bacillus</i>     | 0.01                    | 0.01 | 0.03 | 0.02 | 0.01 | 0.03 | 0.04 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.03 |
| <i>Enterobacter</i> spp.   | 0.07                    | 0.12 | 0.10 | 0.07 | 0.10 | 0.03 | 0.08 | —    | 0.05 | 0.01 | 0.10 | 0.06 | 0.02 | 0.02 |
| <i>Serratia</i> spp.       | —                       | 0.02 | 0.05 | —    | —    | —    | —    | 0.10 | 0.04 | 0.03 | —    | —    | 0.07 | 0.12 |
| <i>Pseudomonas</i> spp.    | —                       | —    | —    | 0.02 | 0.06 | —    | 0.03 | —    | 0.02 | —    | —    | —    | —    | —    |
| <i>Xanthomonas</i> spp.    | 0.02                    | —    | 0.01 | —    | —    | —    | 0.01 | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| 合计 Total                   | 0.27                    | 0.46 | 0.36 | 0.44 | 0.53 | 0.20 | 1.00 | 0.24 | 0.21 | 0.16 | 0.45 | 0.54 | 0.49 | 0.38 |
| 差异显著性(α= 0.05)             | bcd                     | bcd  | bcd  | bcd  | b    | de   | a    | cde  | cde  | e    | bcd  | b    | bc   | bcd  |
| Significance of difference | bcd                     | bcd  | bcd  | bcd  | b    | de   | a    | cde  | cde  | e    | bcd  | b    | bc   | bcd  |

2.2 不同品种间 DNA 水平上的聚类分析

从 90 个随机引物中共筛选出条带清晰、重复性好的 13 个引物。引物编号、碱基序列和扩增结果见表 4。引物 S14 扩增的谱带最少,有 3 条,引物 S41 和 S101 扩增的谱带最多,有 17 条,其它引物扩增的谱带数介于二

者之间。13 条引物共扩增出 139 个 RAPD 标记, 多态性标记有 101 个, 占扩增片段总数的 72. 7%。不同引物扩增的玉米品种遗传图谱差异较大, 父母本亲缘关系(尤其是母本的亲缘关系)相近的品种间在 DNA 水平上相似性高, 共同谱带多。即扩增图谱相近。如引物 S12 对亲缘关系非常近的品种沈农 87、新铁 10、辽单 24 和掖单 13 的扩增谱带几乎一样, 扩增的 7 条谱带中只有一条略有差异(图 2)。

表 3 玉米抽丝期不同品种根系内生细菌主要种群的数量分布(× 10<sup>5</sup> cfu·g<sup>-1</sup>)

Table 3 Distribution of endophytic bacteria in maize roots during silking period

| 属、种<br>Genus, species      | 品种编号 Numbered cultivars |        |       |        |        |        |        |        |       |       |       |        |        |        |
|----------------------------|-------------------------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
|                            | 1                       | 2      | 3     | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9     | 10    | 11    | 12     | 13     | 14     |
| <i>Bacillus subtilis</i>   | 2. 4                    | 4. 18  | 5. 01 | 5. 80  | 4. 50  | 4. 95  | 2. 81  | 3. 28  | 5. 41 | 4. 02 | 4. 80 | 2. 6   | 3. 75  | 4. 82  |
| <i>B. megaterium</i>       | 1. 41                   | 3. 12  | 0. 20 | 3. 20  | 2. 53  | 2. 93  | 1. 20  | 0. 95  | 6. 01 | 4. 34 | 4. 20 | 1. 25  | 4. 80  | 1. 25  |
| <i>B. cereus</i>           | 3. 20                   | 0. 04  | 2. 10 | 1. 01  | 0. 81  | 1. 12  | 2. 98  | 2. 80  | 1. 86 | 0. 04 | 1. 90 | 3. 11  | 1. 01  | 3. 91  |
| <i>B. licheniformis</i>    | 0. 03                   | 3. 98  | —     | —      | 0. 06  | 0. 21  | —      | —      | 0. 98 | 2. 40 | 0. 04 | —      | 0. 17  | 2. 10  |
| <i>B. anthracis</i>        | 0. 18                   | —      | —     | —      | 0. 06  | 0. 01  | —      | 3. 90  | —     | —     | —     | 1. 65  | —      | —      |
| <i>B. myoides</i>          | —                       | —      | —     | —      | 0. 10  | —      | —      | —      | 0. 12 | —     | 0. 16 | —      | —      | —      |
| <i>B. pumilus</i>          | —                       | —      | 0. 02 | 0. 03  | 0. 06  | 0. 7   | 0. 03  | —      | —     | —     | —     | —      | 0. 04  | 0. 17  |
| <i>B. circulans</i>        | 0. 05                   | 0. 05  | 0. 01 | —      | —      | —      | 0. 08  | 0. 06  | —     | 0. 04 | —     | 0. 05  | —      | —      |
| Others <i>Baillus</i>      | 0. 04                   | 0. 02  | 0. 02 | 0. 02  | 0. 01  | 0. 03  | 0. 03  | 0. 02  | 0. 01 | 0. 03 | 0. 01 | 0. 02  | 0. 02  | 0. 02  |
| <i>Enterobacter</i> spp.   | 3. 10                   | 1. 06  | 2. 01 | 3. 84  | 3. 85  | 4. 06  | 2. 96  | 3. 05  | 0. 08 | 1. 85 | 1. 04 | 2. 20  | 2. 80  | 3. 80  |
| <i>Serratia</i> spp.       | 1. 22                   | 0. 01  | 0. 01 | 2. 20  | 1. 98  | 2. 15  | 0. 95  | 1. 14  | 0. 2  | 0. 02 | 0. 17 | 1. 01  | 2. 21  | —      |
| <i>Pseudomonas</i> spp.    | 0. 09                   | 0. 01  | —     | 0. 02  | 0. 04  | 0. 05  | 1. 20  | 0. 01  | 1. 21 | 0. 01 | 1. 35 | 0. 93  | 0. 03  | —      |
| <i>Xanthomonas</i> spp.    | —                       | —      | —     | 1. 16  | 1. 50  | 1. 04  | 0. 01  | 0. 01  | 0. 4  | —     | —     | 0. 02  | 0. 01  | —      |
| <i>Clavibacter</i> spp.    | 0. 01                   | 0. 11  | 0. 01 | 0. 03  | 0. 02  | 0. 02  | —      | —      | —     | 0. 09 | —     | —      | 0. 03  | 0. 05  |
| Unknown bacteria           | 0. 10                   | 0. 038 | 0. 04 | 0. 09  | 0. 05  | 0. 03  | 0. 08  | 0. 06  | 0. 14 | 0. 05 | 0. 06 | 0. 04  | 0. 04  | 0. 12  |
| 合计 Total                   | 13. 13                  | 19. 87 | 15. 1 | 18. 75 | 27. 57 | 12. 24 | 37. 91 | 12. 81 | 12. 8 | 9. 75 | 19. 0 | 29. 18 | 21. 85 | 16. 24 |
| 差异显著性( <i>a</i> = 0. 05)   | b                       | ab     | b     | ab     | ab     | b      | a      | b      | b     | b     | ab    | ab     | ab     | b      |
| Significance of difference |                         |        |       |        |        |        |        |        |       |       |       |        |        |        |

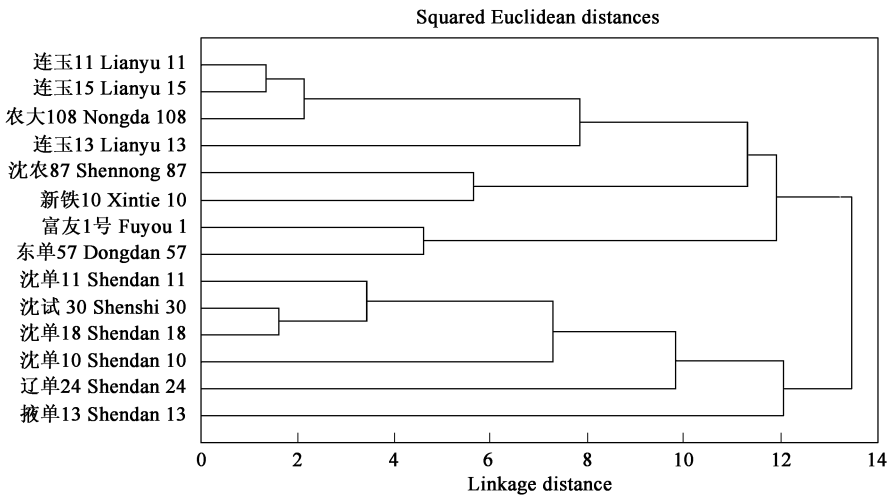


图 1 不同玉米品种在内生细菌种群水平上的聚类树状图

Fig. 1 Cluster analysis of maize cultivars based on endophytic bacteria population

通过分层聚类结果可以看出(图 3), 供试的 14 个品种在连锁距离 55 的范围内全部聚在一起, 分成 5 组。沈单 11、沈单 10、沈单 18 和沈试 30 为第 1 组; 沈农 87、新铁 10 为第 2 组; 富友 1 号和东单 57 为第 3 组; 连玉 13、连玉 15 和农大 108 为第 4 组; 辽单 24 和掖单 13 为第 5 组; 连玉 11 较特殊, 与其它品种的亲缘关系较远, 自成第 6 组。

2.3 品种遗传背景与内生细菌种群的相互关系

在 DNA 水平和内生细菌种群水平上分别对供试品种进行聚类比较, 结果见表 5, 从中可以看出, 品种在 DNA 水平的分组和在内生细菌种群水平上的分组相关性明显。玉米内生细菌种群划分的 A、B、C 3 组与 RAPD 划分的 a、b、c 3 组完全相同, 二者反映出的品种遗传背景是完全一致性; RAPD 划分的 d 组与内生细菌种群水平上划分的品种基本相同。只有个别品种离散度较高, 如连玉 11 和掖单 13。综合以上研究结果, 表明品种的遗传背景与其内生细菌种群存在明显的相关性, 即品种的遗传特性在相当程度上决定着内生细菌的种类及其数量。

3 讨论

对 14 个玉米品种内生细菌的分离鉴定结果表明, 不论是苗期还是抽丝期, 不同品种间内生细菌的种类和数量均存在差异。该结果与不同生育期或地域花生品种间内生细菌种类存在显著差异的研究报道一致<sup>[4]</sup>。

应用 RAPD 技术检测了品种的 DNA 多态性, 结果表明不同玉米品种具有丰富的 DNA 多态性。品种间遗传位点最高一致率为 84.9%, 最低一致率为 64.9%。即使是母本相同的品种, 其遗传位点也存在明显的差异, 如连玉 11 和连玉 15, 它们的母本均为 543, 但是两者的欧氏距离平方却很大, 为 39; 还有沈单 10 和沈试 30, 它们的母本均为具有热带血缘的沈 137, 两者欧氏距离平方也很高, 达到了 36。这说明玉米各品种的遗传背景是相当复杂的<sup>[18]</sup>。

品种的遗传背景对内生细菌种群有明显的选择性。品种内生细菌的种类及其数量在很大程度上受品种的遗传背景控制, 尤其内生细菌的种类与品种的遗传背景存在明显的相关性, 如沈农 87 和新铁 10 于抽丝期内生细菌种类完全相同, 均含有 *Bacillus subtilis*、*B. megaterium*、*B. cereas*、*B. licheniformis*、*B. mycoides*、*Enterobacter*、*Serratia*、*Pseudomonas*。但研究中也发现, 遗传背景相近的个别品种间内生细菌的数量存在差异, 可能是由于受外界环境间接影响的结果。

表 5 品种 RAPD 分组与内生细菌种群分组比较

| Table 5 Comparison of blood relationship groups of cultivars determined by RAPD and endophytic bacteria population |                             |                                               |                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------|
| 内生细菌种群聚类分组<br>Grouping on<br>the cluster of endophytic bacteria                                                    | 品种<br>Cultivars             | 品种随机扩增聚类分组<br>Cultivars<br>grouping with RAPD | 品种<br>Cultivars            |
| A                                                                                                                  | 沈单 10, 沈单 11, 沈试 30, 沈单 18  | a                                             | 沈单 10, 沈单 11, 沈试 30, 沈单 18 |
| B                                                                                                                  | 沈农 87, 新铁 10                | b                                             | 沈农 87, 新铁 10               |
| C                                                                                                                  | 富友 1 号, 东单 57               | c                                             | 富友 1 号, 东单 57              |
| D                                                                                                                  | 连玉 11, 连玉 13, 连玉 15, 农大 108 | d                                             | 连玉 13, 连玉 15, 农大 108       |
| E                                                                                                                  | 辽单 24                       | e                                             | 辽单 24, 掖单 13               |
| F                                                                                                                  | 掖单 13                       | f                                             | 连玉 11                      |

表 4 RAPD 扩增引物筛选结果

| Table 4 Screening amplification primer of RAPD |                                          |                          |                             |
|------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| 引物<br>Primers                                  | 核苷酸碱基序列 5'-3'<br>Nucleotide sequence 5-3 | RAPD 标记数<br>Scored bands | 多态性标记数<br>Polymorphic bands |
| S1                                             | GTTTCGCTCC                               | 14                       | 12                          |
| S2                                             | TGATCCCTGG                               | 6                        | 2                           |
| S12                                            | CCTTGACGCA                               | 10                       | 8                           |
| S13                                            | TTCGCCGCT                                | 7                        | 6                           |
| S14                                            | TCCGCTCTGG                               | 5                        | 4                           |
| S17                                            | AGGGAACGAG                               | 6                        | 5                           |
| S20                                            | GGACCCTTAC                               | 10                       | 8                           |
| S41                                            | ACCGGAAGG                                | 17                       | 9                           |
| S64                                            | CGCATCTAC                                | 16                       | 10                          |
| S99                                            | GTCAGGGCAA                               | 8                        | 6                           |
| S101                                           | GGTCGGAGAA                               | 17                       | 10                          |
| S1446                                          | AAGTGACCG                                | 15                       | 13                          |
| S1449                                          | TCGCTTCTCC                               | 8                        | 8                           |
| 合计 Total                                       |                                          | 139                      | 101                         |

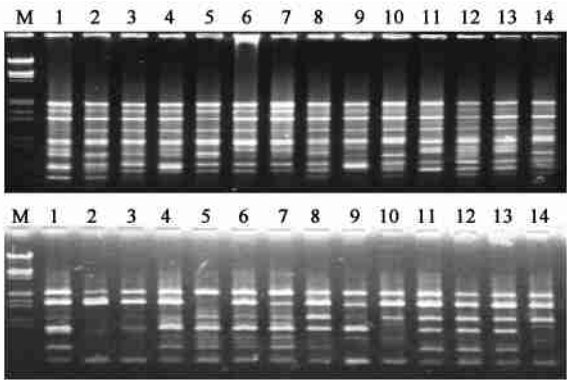


图 2 引物 S101(上)和 S12(下)在 14 个玉米品种中的扩增图谱

Fig. 2 Vertical RAPD patterns obtained in 14 com cultivars with the primers S101 and S12

M: Marker; 1~ 14: See Table 1 for the numbered cultivars

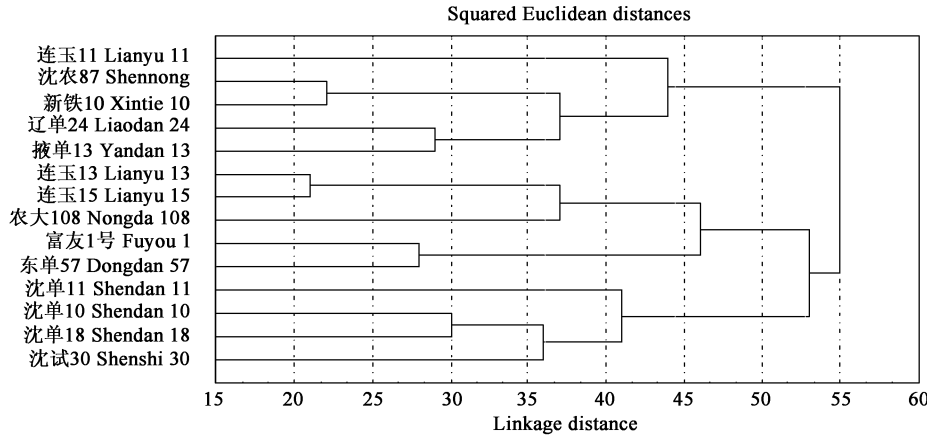


图 3 玉米品种在 DNA 水平上的聚类分析树状图

Fig. 3 Tree diagram of cluster analysis for 14 com cultivars on DNA level

References:

[ 1 ] Chanway C P. Endophytes: they're not just fungi. Can J Bot, 1996, 74: 321~ 322.

[ 2 ] Lu S Y, Chen Y X. Preliminary studies on the main groups of microorganisms colonizing the vascular system of cotton plant and their population dynamics. Acta Agri Univ Pekinensis, 1989, 15( 3 ): 326~ 329.

[ 3 ] McInroy J A, Kloepper J W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. Plant Soil, 1995, ( 173 ): 337~ 342.

[ 4 ] Song Z H, Ding L X, Ma B J. Studies on the population and dynamic analysis of peanut endophytes. Acta Phytophycica Sin, 1999, 26( 4 ): 309~ 314.

[ 5 ] Sturz A V, Matheson B G. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. Plant Soil, 1996, 184: 265.

[ 6 ] Misaghi I J, Donndelinger C R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. Phytopathology, 1990, ( 80 ): 808~ 811.

[ 7 ] Gao Z G, Chen J. Immunogold silver staining techniques for detection of endophytic bacteria in corn plant. In: Proceeding of the 15<sup>th</sup> international plant protection congress. Beijing: Foreign Languages Press, 2004. 369.

[ 8 ] Liu Y X, Zhang Q W, Zhou M Z. Population dynamics of endophytic bacteria in symptom-free rice plants. Chin J Appl Ecol, 1999, 10( 6 ): 735~ 738.

[ 9 ] Misaghi I J, Donndelinger C R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. Phytopathology, 1990, 80( 9 ): 79~ 82.

[ 10 ] Bell C R, Dickie G A, *et al.* Endophytic bacteria in grape vine. Can J Microbiol, 1995, ( 41 ): 46~ 53.

[ 11 ] Gao Z G, Zhuang J H, Chen J, *et al.* Population of endophytic bacteria in maize roots and its dynamic analysis. Chin J Appl Ecol, 2004, 15( 8 ): 1344~ 1348.

[ 12 ] Mei R H, Xu W M. Plant Microecology. Beijing: China Agricultural Press, 1998.

[ 13 ] Zou W X, Tan R X. Recent advances on endophyte research. Acta Bot Sina, 2001, 43( 9 ): 881~ 892.

[ 14 ] Dong X Z, Cai M Y. Manual of Deteminative Bacteriology. Beijing: Science Press, 1999. 43~ 267.

[ 15 ] Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science. General Method of Deteminative Bacteriology. Beijing: Science Press, 1978.

[ 16 ] Gordon R E, Haynes W C, Pang C H N. The genus Bacillus. ARS-USDA agriculture handbook. Washington, DC: U. S. Government Printing Office, 1973. 4~ 93.

[ 17 ] Sambrook J, David W Russell. Molecular Cloning: A laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

[ 18 ] Sun Z L, Zhang C L, Jin D M, *et al.* Application of RAPD analysis in the study of phylogenetic relationship among maize inbred lines. Acta Genetic Sinica, 1999, 26( 1 ): 61~ 68.

参考文献:

[ 2 ] 鲁素芸, 陈延熙. 棉花维管系中主要微生物类群初步分析. 北京农业大学学报, 1989, 15( 3 ): 326~ 329.

[ 4 ] 宋子红, 丁立孝, 马伯军. 花生内生菌的种群及动态分析. 植物保护学报, 1999, 26( 4 ): 309~ 314.

[ 8 ] 高增贵, 庄敬华, 陈捷, 等. 玉米根系内生细菌种群及动态分析. 应用生态学报, 2004, 15( 8 ): 1344~ 1348.

[ 9 ] 刘云霞, 张青文, 周明. 水稻体内细菌的动态研究. 应用生态学报, 1999, 10( 6 ): 735~ 738.

[ 12 ] 梅汝鸿, 徐维敏. 植物微生态学. 北京: 中国农业出版社, 1998.

[ 13 ] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展. 植物学报, 2001, 43( 9 ): 881~ 892.

[ 14 ] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1999. 43~ 267.

[ 15 ] 中科院微生物所编著. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.

[ 18 ] 孙致良, 张超良, 金德敏, 等. RAPD 技术在玉米自交系亲缘关系研究中的应用. 遗传学报, 1999, 26( 1 ): 61~ 68.