

天山北坡甜菜内生菌分离鉴定及其动态变化

史应武^{1,2}, 娄 恺², 李 春^{1,*}

(1. 石河子大学农学院/新疆兵团化工绿色过程重点实验室, 新疆 石河子 832003; 2. 新疆农科院微生物应用研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘要: 对新疆昌吉和石河子两地种植的甜菜内生菌进行了分离、鉴定和分析, 结果表明甜菜内生菌多属于细菌, 其中假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 和芽孢菌类 (*Bacillus* sp.) 的分离频率分别在 33.2% ~ 59.2% 和 12.7% ~ 28.1%, 是甜菜植株中的优势内生菌群。16S rDNA 和 ITS 序列同源性比较和系统发育分析表明内生菌具有丰富的多样性。根中内生菌的多样性高于茎、叶, 昌吉地区种植的甜菜中分离出的内生菌种类较多。从感病品种及生长不良甜菜植株中分离出的内生菌种类比较丰富。通过回接分离及利用扫描电镜观察内生菌在植物体内分布发现, 内生菌能够定殖于甜菜块根。

关键词: 甜菜; 内生菌; 分离; 鉴定; 动态分析

文章编号: 1000-0933(2009)05-2374-09 中图分类号: Q938 文献标识码: A

Isolation and identification of endophytic microorganisms from sugar beet and dynamic changing in the north slope of Tianshan Mountain

SHI Ying-Wu^{1,2}, LOU Kai², LI Chun^{1,*}

1 Agriculture College of Shihezi University/Key Laboratory of Green Chemical Process of Xinjiang Production and Construction Corps, Shihezi 832003 Xinjiang, China

2 Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agriculture Science, Urumqi 830091, Xinjiang China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(5): 2374 ~ 2382.

Abstract: Endophytic microorganisms isolated from the tissues of healthy sugar beets from Changji and Shihezi district in Xinjiang province were identified and investigated. The results showed that most of endophytic microorganisms of sugar beets belong to bacteria, in which *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. were the dominant communities with isolation frequency of 33.2%—59.2% and 12.7%—28.1%, respectively. The endophytic microorganisms were displayed a wide diversity by comparison their 16S rDNA and ITS sequences with GenBank using Blast software and analysis of phylogenetic tree. The biodiversity of endophytic microorganisms in roots of sugar beets were more than those of leaves, and the species of endophytic microorganisms in sugar beets from Changji district were more than those of Shihezi district. More endophytic microorganisms were isolated from poor growing seedlings and susceptible sugar beet cultivars than from the disease resistant counterparts. Endophytic microorganisms have been successfully re-isolated after inoculating sugar beet seedlings, in which endophytic microorganisms could colonize interior of the sugar beet roots by observation with scanning electron microscopy.

Key Words: sugar beet; endophytic microorganisms; isolation; identification; dynamic analysis

多数植物体内都存在大量的内生菌, 它们在植物体内繁殖和生长并产生有生物活性的次生代谢产物。研究表明植物内生菌的生物学功能: 增强宿主的抗病性^[1]、提高植物的生产力^[2]、抗逆抗虫^[3]、具有除草剂活性^[4]等。因此, 内生菌可能成为生物促生中有潜力的生物因子, 在生态农业和生物农药研制方面具有重要的用途。

基金项目: 国家农业部 948 资助项目 (2006-G62); 国家科技基础条件平台资助项目 (2005DKA21201-12)

收稿日期: 2008-02-25; 修订日期: 2008-10-21

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lichun@bit.edu.cn

甜菜内生菌(endophyte)是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康甜菜各种组织和器官内部或细胞间隙的真菌、细菌和放线菌^[5,6]。甜菜内生菌长期生活在甜菜体内的特殊环境中并与甜菜协同进化。一方面甜菜为其提供生长必需的能量和营养;另一方面,内生菌又可通过自身的代谢产物或借助于信号传导作用对甜菜产生影响。研究表明有些植物内生菌对其宿主植物有一定的促生作用^[7,8],但在糖料作物上的增糖作用很少见报道。据报道^[5],甜菜内生细菌的分布与种类呈多样性,甜菜含糖量的变化与内生菌有关。但有关甜菜内生菌种群及其动态的全面系统研究,国内外未见报道。对甜菜内生菌的类群、分布及其在甜菜体内定殖情况进行了研究,并分析了甜菜内生菌的多样性,为甜菜内生菌进一步应用于植物微生物生态制剂开发和应用奠定理论和实践基础。

1 材料和方法

1.1 材料

2007年6月至10月在新疆天山北坡昌吉、石河子土壤肥力中等甜菜生长良好的甜菜地采样。从甜菜生长中期8月7日开始每10d每个品种随机采样10株,每株分别随机选取整株中10个根和茎叶片段,进行内生菌的分离。采样甜菜品种为WSK2409、WSK0143、HI0135、华丹二号和新甜16号。

1.2 菌株的分离纯化

在甜菜根冠、根体、根尾的中心区、边缘区和次生根毛区,茎部,叶部分别取0.7cm×0.7cm×0.7cm,0.7cm,0.7cm×0.7cm的样块,进行表面消毒^[5,6,9],取最后一遍清洗的无菌水0.2ml涂布于3种分离培养基,每个处理重复3次,28℃下暗培养14d,据此验证此消毒方法是否能全部杀死供试材料表面微生物^[10,11]。然后供试材料放在真菌分离马铃薯葡萄糖培养基(PDA)^[6]上,每皿均匀放置5块,设3个重复,28℃暗培养。称取适量的已表面消毒的组织材料,无菌条件加2ml无菌生理盐水研磨匀浆,以此为母液稀释 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 5个梯度菌悬液,分别取200μl涂布到肉汁冻培养基(NA)^[5]、高氏一号培养基^[12]平板上,28℃培养。按常规方法对分离出的菌落进行纯化,以供鉴定和保藏。

1.3 内生菌形态学观察和归类鉴定

内生细菌和放线菌的鉴定参考文献^[13,14]方法进行。将细菌培养24h,涂片用结晶紫染色1min,在显微镜下观察形态和有无芽孢的产生,初步归类,再将未产生芽孢的菌株进行革兰氏染色。将已纯化的细菌在28℃恒温培养16h,预处理菌悬液,分别对应使用GPI卡、GNI卡和BAC卡,放入VITEK-AMS仪,24h后获得生理生化反应结果和部分鉴定结果。放线菌采用高氏合成一号琼脂培养基,埋片培养法,按照参考文献^[15,16]的方法鉴定。真菌的鉴定按照文献^[17]方法进行。

1.4 内生细菌16S rDNA序列的测定

按常规方法提取细菌菌株的总DNA,采用细菌通用引物进行16S rDNA的PCR扩增,引物设计如下,PA: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';PB: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3',两引物间距离为1500bp。50μl的反应体系含:10×PCR缓冲液5μl,引物各20pmol,模板DNA(1000ng/μl)1μl,TaqTM(TaKaRa公司)0.5U,dNTP 8μl。PCR扩增条件:首先在94℃预变性2min,然后98℃10s、55℃30s、72℃1.5min,循环30次,最后在72℃延伸10min。PCR产物的纯化:取8μl的PCR产物,在1%琼脂糖凝胶中电泳,用TaKaRa PCR Fragment RecoveryKit从胶中回收目的片段,溶于20μl的高纯水中。对PCR产物用PA(+)和PB(-)作测序引物,测定的16S rDNA序列(TaKaRa公司完成)。16S rDNA序列分析用CLUSTALX软件生成,系统发育树用N-J法建立。PCR产物交上海生工生物工程技术有限公司测序。将测得的16S rDNA序列与GenBank数据库中序列进行BLAST分析,并利用MEGA4.0软件构建系统进化树。

1.5 内生真菌ITS序列的测定

参考文献^[18],以100mmol/L Tris、100mmol/L NaCl、50mmol/L EDTA-Na₂和2% SDS(pH9.0)为提取液,经石英砂研磨破壁,获得了较高质量的染色体DNA,并于-20℃保存。

参考文献^[19],分别以菌株DNA为模板,采用真菌ITS通用引物进行PCR扩增,引物设计如下,ITS1: 5'-

TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', 进行 ITS PCR 扩增区域。50 μ l 的反应体系含: 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ l, 引物各 20pmol, 模板 DNA (1 000ng/ μ l) 1 μ l, TaqTM (TaKaRa 公司) 0.5U, dNTP 8 μ l。PCR 扩增条件: 首先在 94 $^{\circ}$ C 预变性 2min, 然后 98 $^{\circ}$ C 10s、55 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 1.5min, 循环 30 次, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.6 内生菌在甜菜块根内定殖

采用回接分离试验和扫描电镜观察, 将分离到的内生细菌、真菌和放线菌分别接种于牛肉膏蛋白胨、马铃薯蔗糖和高氏一号液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养 3d, 用此菌液接种甜菜无菌苗的根部, 培养一周, 表面消毒后从接种的幼苗根、茎叶中分离内生菌, 以验证其内生特征。以戊二醛固定甜菜幼苗的根、茎秆和叶片, 利用扫描电镜观察被接种甜菜植株中内生菌的定殖及分布情况^[19,20]。

2 结果和分析

2.1 内生菌的类群鉴定和分析

2.1.1 类群鉴定

从昌吉种植的 4 个甜菜品种中共分离出内生细菌 201 株、内生真菌 24 株和内生放线菌 6 株。大多数属于细菌类群, 其次是真菌和放线菌。进一步将其分别鉴定为以下 7 个细菌种群(表 1): 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、弯曲芽孢杆菌 (*Bacillus flexus*)、变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、多粘芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*)、产吡啶金黄杆菌 (*Chryseobacterium indologene*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*); 3 个真菌种群: 链格孢菌 (*Alternaria alternata*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、甜菜茎点霉 (*Phoma betae*); 2 个放线菌类群: 灰褐类链霉菌 (*Streptomyces griseofuscu*)、球孢类链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*)。从石河子种植的 2 个甜菜品种中共分离到内生菌 175 株(根部 102 株, 叶部 73 株), 将其分别鉴定为以下 4 个细菌种群(表 1): 荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*)、弯曲芽孢杆菌 (*B. flexus*)、变形假单胞菌 (*P. plecoglossicida*)、多粘芽孢杆菌 (*P. polymyxa*); 2 个真菌种群: 链格孢菌 (*A. alternata*)、尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*); 1 个放线菌类群: 灰褐类链霉菌 (*S. griseofuscu*)。

细菌类群的假单胞菌 (*Pseudomonas*) 和芽孢菌 (*Bacillus*) 在昌吉、石河子及不同甜菜品种中均被分离到, 分离频率分别为 33.2% ~ 59.2% 和 12.7% ~ 28.1% 不等, 是甜菜植株中分离频率最高的菌种, 因而是甜菜中的优势菌类群, 其在甜菜生长发育过程中的作用值得重视和进一步研究。变形假单胞菌 (*P. plecoglossicida*) 分离频率也较高, 但在华丹二号品种中未分离到。

表 1 新疆天山北坡甜菜内生菌鉴定结果

Table 1 Identification result of strains of endophytes isolated from sugar beet on the north slope of xinjiang tianshan mountain

菌群编号 Isolate number	分离部位 Plant parts	菌株数 Number of strains	内生菌种类 Proportion of endophyte
B1	LR *	84	荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>
B2	LR	43	弯曲芽孢杆菌 <i>Bacillus flexus</i>
B3	R	18	变形假单胞菌 <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>
B4	R	46	短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i>
B5	R	10	多粘芽孢杆菌 <i>Paenibacillus Polymyxa</i>
B6	R	2	产吡啶金黄杆菌 <i>Chryseobacterium indologene</i>
B7	R	18	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>
S1	R	2	灰褐类链霉菌 <i>Streptomyces griseofuscu</i>
S2	R	3	球孢类链霉菌 <i>Streptomyces globisporus</i>
F1	LR	15	链格孢 <i>Alternaria alternate</i>
F2	R	6	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>
F3	R	3	甜菜茎点霉 <i>Phoma betae</i>

* L, 叶部 Leaves; R, 根部 Roots

2.1.2 内生菌系统发育定位

内生细菌 16S rDNA (图 1) 和内生真菌 ITS (图 1), 用 blast 软件与 GenBank 数据库中的相应序列进行同

源性比较。同源序列或内生菌的 16S rDNA 和 ITS 序列利用 MEGA4.0 软件生成内生细菌和真菌及其相近类群的系统发育进化树(图 2,图 3)。在细菌系统发育上多粘芽孢杆菌(*P. polymyxa* 12170504)和短小芽孢杆菌(*B. pumilus* 3-2)分别来源于相距较远的类群,而短小芽孢杆菌(*B. pumilus* 3-2)和弯曲芽孢杆菌(*B. flexus* 4-1),荧光假单胞菌(*P. fluorescens* 12170496)和变形假单胞菌(*P. plecoglossicida* 2-3),粪肠球菌(*E. faecalis* 12170506)和产吡啶金黄杆菌(*C. indologene* 2-2)发育地位相距很近。在真菌系统发育上尖孢镰刀菌(*F. oxysporum* 13)与链格孢菌(*A. alternata* 12)发育地位较远,而与甜菜茎点霉(*P. betae* 17)发育地位较近。

2.1.3 品种间差异

在石河子种植的不同甜菜品种中,新甜 16 号是相对比较抗病的品种,而 WSK2409 是感病品种,WSK2409 是德国品种,在新疆生长不适宜,生长性状较差。从新

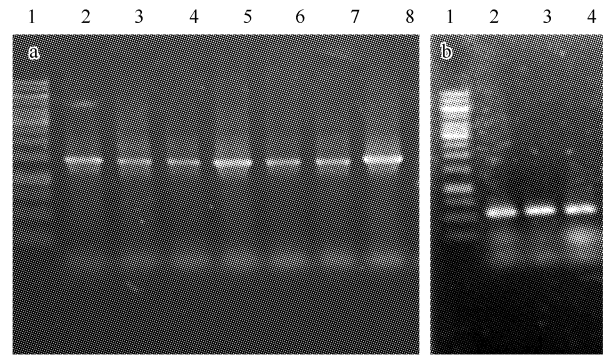


图 1 甜菜内生细菌 16S rDNA 和真菌 ITS 的 PCR 图谱

Fig. 1 PCR patterns of endophytic bacterial of 16S rDNA fragments (A) and endophytic fungal ITS rDNA (B) retrieved from sugar beet samples of profile

(a) Lane 1, marker; Lane 2, B1; Lane 3, B2; Lane 4, B3; Lane 5, B4; Lane 6, B5; Lane 7, B6; Lane 8, B7; (b) Lane 1, marker; Lane 2, F1; Lane 3, F2; Lane 4, F3

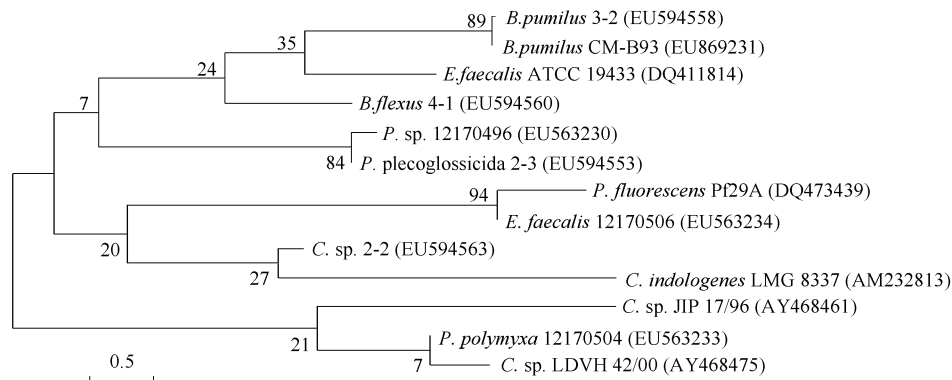


图 2 甜菜内生细菌 16S rDNA 基因序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of isolated endophytic bacterial 16S rDNA from sugar beet samples

Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank; The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap; Bar, 50% sequence divergence

甜 16 号抗性较好的品种中分离出内生菌的种类较少(仅 5 个类群),从感病品种 WSK2409 上分离出的内生菌种类较多(7 个类群),感病品种 WSK2409 体内的内生菌种类比抗病品种新甜 16 号的多,表明不同基因型品种甜菜对内生菌有一定的选择性(表 2)。

2.1.4 同品种不同种植区差异

在两地种植的同一种甜菜品种(WSK2409)植株体内分离到内生菌的种类不同,来自昌吉的植株分离出 12 种类群,来自石河子的植株只分离出 7 种类群,表明不同土壤环境对甜菜内生菌类群影响较大(表 2)。虽然甜菜品种(WSK2409)是一感病品种,但当土壤、气候、环境不同时,其体内内生菌的种类和分离频率都有很大的波动。甜菜品种 WSK2409 内生菌的优势种 *P. fluorescens* 在昌吉的分离频率比石河子的分离频率高 17.4%,说明同一种甜菜品种在不同生态区种植,其内生优势种的分离频率也有很大差异。

2.1.5 同植株不同器官内的差异

实验发现昌吉甜菜中分离出的内生菌的种类较为丰富,因而对其在不同器官内的分布进行分析。内生菌大多属于荧光假单胞菌(*P. fluorescens*) (根中 26.1%,茎叶中 47.3%)和弯曲芽孢杆菌(*B. flexus*) (根中

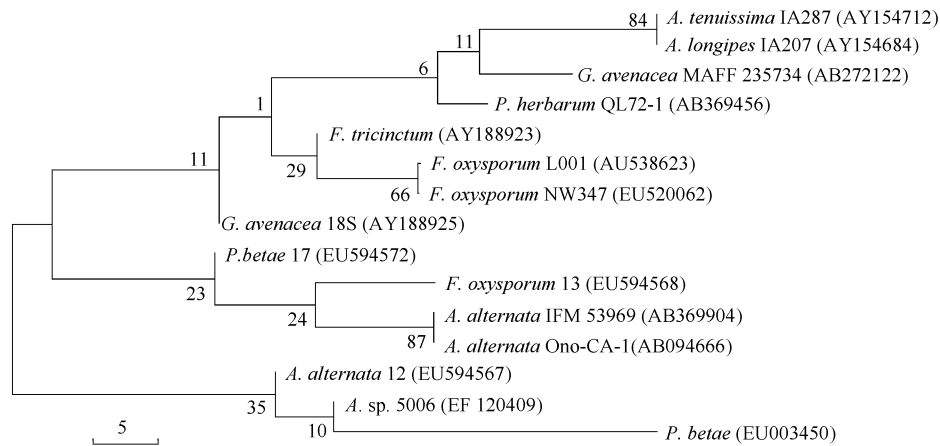


图3 甜菜内生真菌 ITS 序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of isolated endophytic fungal ITS from sugar beet samples

Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank; The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 500% sequence divergence

27.5% ,茎叶中 0), 其余类群所占比例较低。其中, 短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*)、变形假单胞菌 (*P. plecoglossicida*)、产吡啶金黄杆菌 (*C. indologene*)、粪肠球菌 (*E. faecalis*) 和灰褐类链霉菌 (*S. griseofuscus*) 仅在根部分离到, 茎叶中尚未见到这些类群, 表明某些内生菌的分布呈现出器官特异性(表 3)。在茎叶中分离到的 7 种菌类群, 在根中全部都分离到, 进一步分析发现, 在根中大约有 12 种菌, 叶中仅有 7 种, 说明甜菜根中含有的内生菌种类较多。

表 2 昌吉、石河子甜菜中内生菌的类群及其分离频率(%)

Table 2 Percentage (%) of endophytes isolated from sugar beet in Changji and in Shihezi

内生菌 Endophyte	内生菌比例 Proportion of endophyte					
	昌吉 Chanji			石河子 Shihezi		
	WSK2409	WSK0143	HI0135	华丹二号	WSK2409	新甜 16 号
细菌 Bacteria						
<i>P. fluorescens</i>	37.2	33.2	45.9	47.5	54.6	59.2
<i>B. flexus</i>	26.1	28.1	12.7	17.8	24.7	27.5
<i>P. plecoglossicida</i>	10.3	9.3	24.8	0	7.3	11.2
<i>B. pumilus</i>	7.5	7.7	0	18.3	0	0
<i>P. Polymyxa</i>	6.4	7.3	8.9	0	3.2	0
<i>C. indologene</i>	4.1	5.2	0	12.4	0	0
<i>E. faecalis</i>	3.2	4.5	0	0	0	0
真菌 Fungus						
<i>A. alternate</i>	2.1	1.7	4.8	1.2	5.4	0.4
<i>F. oxysporum</i>	1.2	1.4	0	0	3.6	0
<i>P. betae</i>	0.7	0.5	0	0.4	0	0
放线菌 Actinomycetes						
<i>S. griseofuscu</i>	0.7	0.5	2.9	0	1.2	1.7
<i>S. globisporus</i>	0.5	0.6	0	2.4	0	0

2.1.6 同器官不同部位的差异

对昌吉甜菜内生菌在块根内的分布分析表明, 内生菌在甜菜次生根长出区 (SREZ) 的数量比 7 周前增长了 100 ~ 1000 倍(表 4), 而在甜菜块根外围、外层、中层和内层内生菌在数量上差异不显著 ($R > 0.05$)。在整个甜菜生育期, 甜菜块根外围、内层、中层、内层和次生根长出区的内生菌呈一定的变化趋势。其中甜菜块根外围内生菌变化不大; 甜菜块根外层、中层和内层内生菌数量先增高, 后降低; 而甜菜次生根长出区内生菌数

量呈上升趋势,比内层内生菌数高出近 10 倍。在甜菜同一横切面上由外及内内生菌数量表现出依次降低的趋势,在甜菜生育后期甚至中层和内层内生菌均分离不到。甜菜内生菌数量动态与甜菜含糖率变化呈一定的关系(甜菜含糖率未列出),表明内生菌对甜菜糖的合成积累有一定的影响。

2.2 内生菌在甜菜根内的分布和定殖

使用所分离到的内生短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)菌株 3-2、产吲哚金黄杆菌(*C. indologene*)菌株 2-2,从甜菜无菌组培幼苗根部接种,取幼苗经过表面消毒后,在根内分离到该内生菌(图 4)。利用扫描电镜观察接种后植株上内生菌的定殖与分布情况,发现内生菌不仅能够大量聚集于植株根表面,而且能够在植物体内繁殖扩展,定殖于根内部(图 5)。从上述两方面证明这些菌确实属于甜菜植株上的内生菌,能够很快适应甜菜植株组织内的生态环境。

3 讨论

研究发现,甜菜内生菌绝大多数是细菌类群,这与李湘民等^[21]、谢凤行等^[22]、宋子红等^[12]对其它种类植物中内生菌研究的报导相一致。Boehm 等^[23]和 Tiquia 等^[24]研究指出,土壤有机质含量和组成是影响微生物生物量、群落组成、生物活性的关键因素。钟文辉和蔡祖聪对近^[25]年来国外的研究成果进行总结和分析后认为,微生物多样性与土壤类型特别是土壤有机质含量关系密切。本研究对不同采样点、不同

表 3 甜菜植株根、叶中内生菌的类群分布

Table 3 Quantities (Q) and percentage (%) of endophytes from sugar beet leaves and roots Proportion of endophyte

内生菌 Endophyte	内生菌比例 Proportion of endophyte			
	根 Roots		叶 leaves	
	株数 Q	(%)	株数 Q	(%)
细菌 Bacteria				
<i>P. fluorescens</i>	41	26.1	43	47.3
<i>B. flexus</i>	43	27.5	0	0
<i>P. plecoglossicida</i>	18	11.6	0	0
<i>B. pumilus</i>	21	13.8	25	26.4
<i>P. Polymyxa</i>	10	6.5	0	0
<i>C. indologene</i>	2	1.4	0	0
<i>E. faecalis</i>	6	3.6	12	12.2
真菌 Fungus				
<i>A. alternate</i>	3	2.2	12	12.2
<i>F. oxysporum</i>	4	2.9	2	2.2
<i>P. betae</i>	2	1.4	1	1.1
放线菌 Actinomycetes				
<i>S. griseofuscu</i>	2	1.4	0	0
<i>S. globisporus</i>	2	1.4	1	1.1
总计 Total	155	100	96	100

表 4 甜菜根中不同部位微生物数量在时间上的动态变化

Table 4 Average quantity of microbiology enumerated from sugar beet tissue (cells per gram sugar beet tissue)

采收期 Harvest date month-day-year	根横切部位 Cross section of root	粘附土壤 Adhering soil	组织外围区 Peripheral tissue	组织中间区 Middle tissue	组织中心区 Core tissue	次生根区 Secondary root emergence zone
08-07-2007	根体头部 Top third	6.2 × 10 ⁸	5.6 × 10 ⁴	7.8 × 10 ⁴	5.9 × 10 ⁵	3.7 × 10 ³
	根体中部 Middle third	5.3 × 10 ⁸	4.6 × 10 ⁴	5.1 × 10 ⁴	4.9 × 10 ⁴	4.4 × 10 ³
	根体尾部 Bottom third	1.5 × 10 ⁹	1.4 × 10 ⁵	1.7 × 10 ⁵	2.0 × 10 ⁵	5.7 × 10 ³
08-22-2007	根体头部 Top third	7.1 × 10 ⁸	5.2 × 10 ⁶	4.3 × 10 ⁶	3.8 × 10 ⁶	4.2 × 10 ⁴
	根体中部 Middle third	5.1 × 10 ⁸	6.7 × 10 ⁶	5.2 × 10 ⁶	4.8 × 10 ⁶	3.6 × 10 ⁴
	根体尾部 Bottom third	1.1 × 10 ⁹	8.7 × 10 ⁶	9.1 × 10 ⁶	1.1 × 10 ⁷	6.1 × 10 ⁴
08-30-2007	根体头部 Top third	8.2 × 10 ⁸	5.2 × 10 ⁶	4.7 × 10 ⁶	3.8 × 10 ⁶	6.8 × 10 ⁴
	根体中部 Middle third	4.1 × 10 ⁸	6.7 × 10 ⁶	5.2 × 10 ⁶	4.8 × 10 ⁶	4.7 × 10 ⁴
	根体尾部 Bottom third	8.1 × 10 ⁸	8.7 × 10 ⁶	9.2 × 10 ⁶	1.1 × 10 ⁷	7.9 × 10 ⁴
09-12-2007	根体头部 Top third	9.4 × 10 ⁸	1.6 × 10 ⁶	1.3 × 10 ⁶	1.1 × 10 ⁶	3.4 × 10 ⁵
	根体中部 Middle third	3.7 × 10 ⁸	1.0 × 10 ⁶	3.5 × 10 ⁵	6.0 × 10 ⁴	1.2 × 10 ⁵
	根体尾部 Bottom third	7.8 × 10 ⁸	4.1 × 10 ⁶	0	0	5.1 × 10 ⁵
09-18-2007	根体头部 Top third	1.2 × 10 ⁹	2.5 × 10 ⁶	6.2 × 10 ⁵	1.4 × 10 ⁶	6.5 × 10 ⁵
	根体中部 Middle third	2.5 × 10 ⁸	1.0 × 10 ⁶	0	0	4.3 × 10 ⁵
	根体尾部 Bottom third	5.2 × 10 ⁸	1.1 × 10 ⁶	2.8 × 10 ⁵	0	1.8 × 10 ⁶
09-27-2007	根体头部 Top third	3.6 × 10 ⁹	5.6 × 10 ⁴	6.2 × 10 ⁴	5.9 × 10 ⁵	2.3 × 10 ⁶
	根体中部 Middle third	1.2 × 10 ⁸	4.6 × 10 ⁴	4.5 × 10 ⁴	4.9 × 10 ⁴	1.9 × 10 ⁶
	根体尾部 Bottom third	1.5 × 10 ⁸	1.4 × 10 ⁵	1.7 × 10 ⁵	2.0 × 10 ⁵	6.5 × 10 ⁶

品种甜菜中内生菌的类群分布比较发现:昌吉的齐粒思苗品种分离出内生菌的种类比较丰富(12 个类群);而石河子的齐粒思苗植株中种类相对较少(7 个类群)。这种菌群差异可能由于不同的土壤微生态环境所致,昌吉土壤有机质含量较石河子高,更适合于各种微生物的生存,因而昌吉分离出内生菌的种类比较丰富。甜菜根直接与土壤接触,因而甜菜块根内生菌受土壤菌影响,类群多样性高于茎叶。两个地区优势菌群也有一些差异:石河子甜菜中分离到内生菌的优势类群是假单胞菌(*Pseudomonas*)和芽孢菌(*Bacillus*);昌吉除了假单胞菌(*Pseudomonas*)和芽孢菌(*Bacillus*)之外,还有其他类群。其优势类群差异的原因可能与不同的土壤微生态环境有关系。

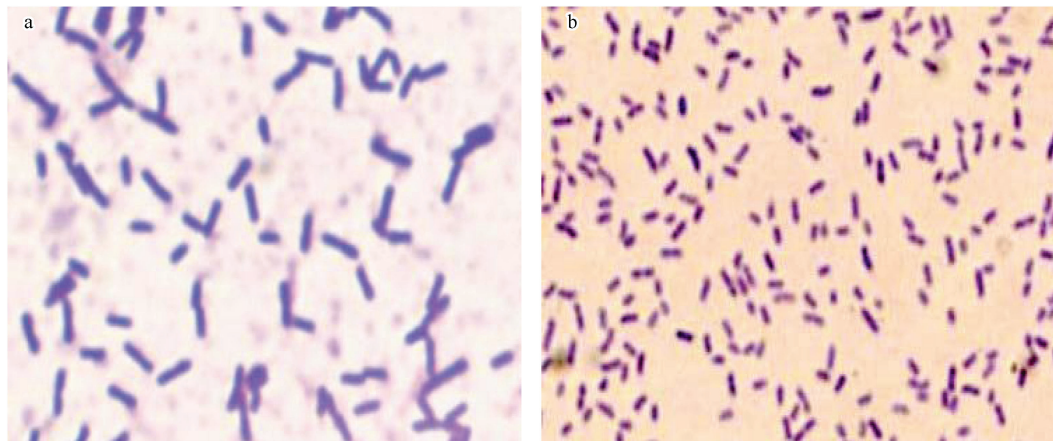


图4 短小芽孢杆菌(*B. pumilus* 3-2)和产吡啶金杆菌(*C. indologene* 2-2)菌体显微照片

Fig. 4 Cell micrograph of isolated strains (a) *Bacillus pumilus* 3-2 and (b) *Chryseobacterium indologene* 2-2

土壤微生物数量的多寡,受土壤水、热、气、养分和有机质状况的影响,而气候条件则决定着土壤上述诸因素的分布^[26]。Papatheodorou 等^[27]指出,与土壤微生物其它特性相比,微生物群落结构对温度的响应更敏感,小尺度的温度变化(人工增温处理)对土壤微生物量和微生物活动的影响不明显,干热气候条件下土壤有机质含量高,而全量养分和速效养分低于温湿气候条件下土壤,温湿气候条件有利于微生物的生长繁殖和有机质的分解,而干热条件限制了微生物的生长使有机质积累丰富。本实验中由于石河子靠近古尔班通古特沙漠,因此昌吉地区较石河子地区气候要温和,从而有利于微生物的生长繁殖。

在宿主植物与内生菌的长期进化过程中,形成一种共生或互生的关系,不同的植物其内生菌的种类、基因型是不相同的。内生菌对宿主也具有选择,其相互作用还受到环境因子的影响,环境条件和宿主基因型决定内生菌的遗传多样性,环境与宿主基因型的相互作用可能使宿主对某一种特殊内生菌基因型敏感性会随环境的改变而改变,一种特殊的内生菌基因型需要找到正确的宿主基因型才能成功感染。

在抗病性强和生长良好的甜菜植株中分离到内生菌类群较少,而生长较差和抗病性弱的品种中内生菌类群相对较多。在感病的甜菜品种 WSK 系列中也发现了内生菌种类增加的现象。在相同环境中,感病品种自身抵御病害的能力弱,易受病原菌的浸染,造成伤口致使其它微生物进入植株体内的机会较多;另外,内生菌

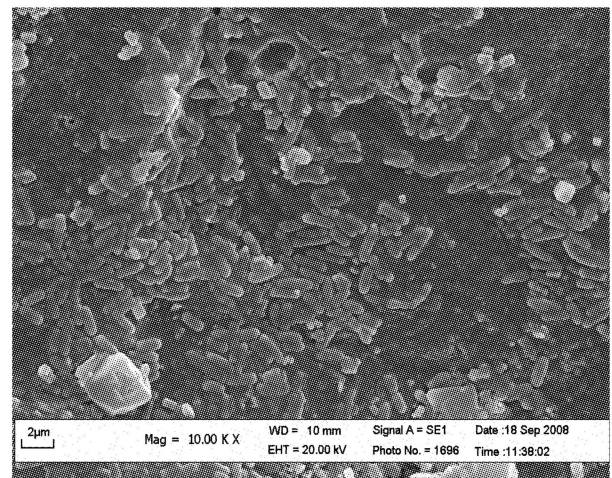


图5 扫描电镜下观察到内生细菌在甜菜植株体内的定殖

Fig. 5 The colonization of the endophytic bacteria under scanning electronic microscope

更易浸染生长较差的植株,这与植株生长不良时植物体内营养物质的运输有关,而较丰富的内生菌类群可能也间接参与了该植株的病害防御系统^[28]。优势类群内生菌回接甜菜组培苗后,用扫描电镜观察,发现其能够成功定植于植株根表面及其内部(图5),说明所分离到的内生菌适应甜菜组织内生活,甜菜为有活性内生菌发挥生物学作用提供了场所。内生菌进入植物体时可能与分泌的细胞壁降解酶有关。目前尚未见到对甜菜内生菌类群进行系统分析的报道, Jacobs 等^[5]通过形态学和免疫胶体金技术对甜菜根体不同部位的内生菌所含的7个内生真菌菌株在整个甜菜生育期不同部位间的多样性进行了研究,结果表明甜菜内生菌在形态和定殖部位上均表现出较高的遗传多样性。Larran S 等^[6]通过分离甜菜叶片内生真菌,结果表明内生真菌在甜菜整个生育期表现出较高的多样性,同时在数量上也存在一定差异。

尽管昌吉、石河子2个样地地理跨度大、田间生态和水肥条件不尽相同,但分离得到的内生菌优势种相同。结合 rDNA 序列分析结果可以推测,甜菜内生菌种群的优势种亲缘关系较近,可能起源于同一内生菌,但由于其地理分布广、气候差异大,从而造成不同地理种群内生菌种群间明显的遗传分化和较高的遗传多样性和植物组织专一性。

在甜菜的生长发育过程中,这些有活性的内生菌与植物具有密切的关系。进一步对内生菌与宿主在分子与细胞水平的联系深入研究及研究甜菜内生菌对甜菜代谢的影响机理,对于充分发挥它们在促生增糖和生物防治中的作用有着重要的意义。

References:

- [1] Sturz A V, Christie B R, Nowak J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2000, 19 (1): 1—30.
- [2] Siciliano S D, Germida J J. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. excel and *B. napus* cv. Parkland. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29 (3): 263—272.
- [3] Clay K, Holah J. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science*, 1999, 285: 1742—1745.
- [4] Peters S, Draeger S, Aust H J, et al. Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli. *Mycologia*, 1998, 90: 360—367.
- [5] Jacobs M J, William M B, David A G. Enumeration, location, characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *Can J Bot*, 1985, 63 (4): 1262—1265.
- [6] Larran S, Monaco C, Alippi H E. Endophytic fungi in beet (*Beta vulgaris* var. *esculenta* L.) leaves. *Advances in Horticultural Science*, 2004, (4): 193—196.
- [7] Morse L J, Day T A, Faeth S H. Effect of Neotyphodium endophyte infection on growth and leaf gas exchange of Arizona fescue under contrasting water availability regimes. *Environmental and Experimental Botany*, 2002, 48 (3): 257—268.
- [8] Franz H, Günther F K. Plant root carbohydrates affect growth behaviour of endophytic microfungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 41 (2): 161—170.
- [9] Schulz B, Wanke U, Draeger S. Endophytes from herbaceous and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*, 1993, 97: 1447—1450.
- [10] Gomez-Vidal S, Lopez-Llorca L V, Jansson H B, et al. Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. *Micron*, 2006, 37: 624—632.
- [11] Nejad P, Johnson P A. Endophytic Bacteria Induce Growth Promotion and Wilt Disease Suppression in Oilseed Rape and Tomato. *Biological Control*, 2000, 18, 208—215.
- [12] Song Z H, Ding L X, Ma B J, et al. studies on the population and dynamic analysis of peanut endophytes. ? *Acta Phytopythologica Sinica*, 1999, 26 (4): 309—314.
- [13] Kleiss T, Deberghes P, Durrer M, et al. Identification of environmental staphylococci and coliforms by Vitek Auto Micro-bic System. *Food Microbiology*, 1995, 12: 199—202.
- [14] Yang Y H, Chen W W. The Principle and Application of Detection System of automatic microbial detection system (VITEK). *Strait Journal of Preventive Medicine*, 2000, 6 (3): 38—39.
- [15] Actinomycetes class group in microorganism graduate schools of Chinese Academy of Sciences. *Streptomycin Identified Handbook*. Beijing: Science Press, 1975.

- [16] Yan X C. The classification and identification of Actinomycetes. Beijing: Science Press, 1992. 296—306.
- [17] He Y M, Zhang R Z, Zhang L H, *et al.* Effects of different tillage practices on fungi community structure and ecologic characteristics in loess soils. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(1): 0113—0119.
- [18] He Y X, Wang S Y, Li B, *et al.* A new method for rapid extract ion of chromosomal DNA from *Penicillium chrysogenum*. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2005, 30 (8): 503—504.
- [19] Zhang X, Li Yi, Wei Y K, *et al.* Distribution and rDNA-ITS sequence ana lysis of *Epichloa* endophyte symbiosis with *Achna the rum sibiricum* in mid and eastern Inner Mongolia Steppe. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27 (7): 2904—2910.
- [20] Minamiyamat H, Shimizu M, Kunoh H, *et al.* Mutiplication of isolates R25 of *Streptomyces galbus* on rhododendron leaves and its production of cell wall-degrading enzymes. *Journal of General Plant Pathology*, 2003, 69: 65—70.
- [21] Li X M, Xu Z G, Mew T W. Colonization of antagonistic bacteria on rice plants and their influence on native bacteria. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28 (8): 3868—3874.
- [22] Xie F X, Ren A Z, Wang Y H, *et al.* A comparative study of the inhibitive effect of fungal endophytes on turf grass fungus pathogens. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28 (8): 3913—3920.
- [23] Boehm M J, Wu T, Stone A G, *et al.* Cross-polarized magic-angle spinning (sup13)C nuclear magnetic resonance spectroscopic characterization of soil organic matter relative to culturable bacterial species composition and sustained bio logical control of *Pythium* root rot. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 162—168.
- [24] Tiquia S M, L loyd J, Hems D A, *et al.* Effects of mulching and fertilization soil nutrients, microbial activity and rhizosphere bacterial community structure determined by analysis of TRFLPs of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Soil Ecology*, 2002, 21: 31—48.
- [25] Zhong W H, Cai Z C, Effect of soil management practices and environmental factors on soil microbial diversity: a review. *Biodiversity Science*, 2004, 12 (4): 456—465.
- [26] Zhang D, Li D Y, He Y R, *et al.* The contrast of microbe quantity in purple soil under different climate condition. *Journal of Mountain Science*, 2001, 19, sup. : 71—74
- [27] Papatheodorou E M, Argyropoulou M D, Stamou G P. The effects of large- and small-scale differences in soil temperature and moisture on bacterial functional diversity and the community of bacterivorous nematodes. *Applied Soil Ecology*, 2004, 25 (1): 37—49 .
- [28] Reiter B, Schwab H, Sessitsch A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied Environmental Microbiol*, 2002, 68: 2261—2268.

参考文献:

- [12] 宋子红, 丁立孝, 马伯军, 等. 花生内生菌的种群及动态分析. *植物保护学报*, 1999, 26 (4): 309~314.
- [14] 杨毓环, 陈伟伟. VITEK 全自动微生物检测系统原理及其应用. *海峡预防医学杂志*, 2000, 6 (3): 38~39.
- [15] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1975. 13~15.
- [16] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定. 北京: 科学出版社, 1992. 296~306.
- [17] 何玉梅, 张仁陟, 张丽华, 解开治. 不同耕作措施对土壤真菌群落结构与生态特征的影响. *生态学报*, 2007, 27(1): 0113~0119.
- [18] 何叶喧, 王世英, 李兵, 等. 一种快速提取丝状真菌产黄青霉 DNA 的方法. *中国抗生素杂志*, 2005, 30 (8): 503~504.
- [19] 张欣, 李熠, 魏宇昆, 等. 内蒙古中东部草原羽茅 *Epichloa* 属内生真菌的分布及 rDNA-ITS 序列系统发育. *生态学报*, 2007, 27(7): 2904~2910.
- [21] 李湘民, 许志刚, MEW TW. 稻株上拮抗细菌的定殖及其对土著细菌的影响. *生态学报*, 2008, 28 (8): 3868~3874.
- [22] 谢凤行, 任安芝, 王银华, 等. 内生真菌对草坪植物病原真菌抑制作用的比较. *生态学报*, 2008, 28(8): 3913~3920.
- [25] 钟文辉, 蔡祖聪. 土壤管理措施及环境因素对土壤微生物多样性影响研究进展. *生物多样性*, 2004, 12 (4): 456~465.
- [26] 张丹, 李登煜, 何毓蓉, 等. 不同气候条件下紫色土的微生物数量比较. *山地学报*, 2001, 19, sup. : 71~74.