

中国百种杰出学术期刊
中国精品科技期刊
中国科协优秀期刊
中国科学院优秀科技期刊
新中国 60 年有影响力的期刊
国家期刊奖

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica

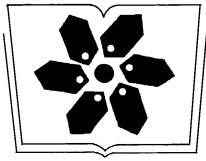
(Shengtai Xuebao)

第 31 卷 第 5 期
Vol.31 No.5
2011



中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 31 卷 第 5 期 2011 年 3 月 (半月刊)

目 次

盐胁迫下 3 种滨海盐生植物的根系生长和分布·····	弋良朋,王祖伟 (1195)
蕙兰病株根部内生细菌种群变化·····	杨 娜,杨 波 (1203)
森林不同土壤层全氮空间变异特征·····	张振明,余新晓,王友生,等 (1213)
基于生态位模型的秦岭山系林麝生境预测·····	罗 翀,徐卫华,周志翔,等 (1221)
黑河胜山自然保护区红松和红皮云杉生长释放判定及解释·····	王晓春,赵玉芳 (1230)
两种大型真菌菌丝体对重金属的耐受和富集特性·····	李维焕,于兰兰,程显好,等 (1240)
2005—2009 年浙江省不同土地类型上空对流层 NO ₂ 变化特征 ·····	程苗苗,江 洪,陈 健,等 (1249)
关帝山天然次生针叶林林隙径高比 ·····	符利勇,唐守正,刘应安 (1260)
鄱阳湖湿地水位变化的景观响应·····	谢冬明,郑 鹏,邓红兵,等 (1269)
模拟氮沉降对华西雨屏区撑绿杂交竹凋落物分解的影响·····	涂利华,戴洪忠,胡庭兴,等 (1277)
喷施芳香植物源营养液对梨树生长、果实品质及病害的影响 ·····	耿 健,崔楠楠,张 杰,等 (1285)
不同覆膜方式对旱砂田土壤水热效应及西瓜生长的影响 ·····	马忠明,杜少平,薛 亮 (1295)
干旱胁迫对玉米苗期叶片光合作用和保护酶的影响 ·····	张仁和,郑友军,马国胜,等 (1303)
不同供水条件下冬小麦叶与非叶绿色器官光合日变化特征 ·····	张永平,张英华,王志敏 (1312)
水分亏缺下紫花苜蓿和高粱根系水力学导度与水分利用效率的关系 ···	李文娆,李小利,张岁岐,等 (1323)
美洲森林群落 Beta 多样性的纬度梯度性 ·····	陈圣宾,欧阳志云,郑 华,等 (1334)
水体泥沙对菖蒲和石菖蒲生长发育的影响·····	李 强,朱启红,丁武泉,等 (1341)
蚯蚓在植物修复芫污染土壤中的作用·····	潘声旺,魏世强,袁 馨,等 (1349)
石榴园西花蓟马种群动态及其与气象因素的关系·····	刘 凌,陈 斌,李正跃,等 (1356)
黄山短尾猴食土行为·····	尹华宝,韩德民,谢继峰,等 (1364)
扎龙湿地昆虫群落结构及动态·····	马 玲,顾 伟,丁新华,等 (1371)
浙江双带蝠蛾发生与土壤关系的层次递进判别分析·····	杜瑞卿,陈顺立,张征田,等 (1378)
低温导致中华蜜蜂后翅翅脉的新变异 ·····	周冰峰,朱翔杰,李 月 (1387)
双壳纲贝类 18S rRNA 基因序列变异及系统发生 ·····	孟学平,申 欣,程汉良,等 (1393)
基于物理模型实验的光倒刺鲃生态行为学研究 ·····	李卫明,陈求稳,黄应平 (1404)
中国铁路机车牵引能耗的生态足迹变化 ·····	何吉成 (1412)
城市承载力空间差异分析方法——以常州市为例·····	王 丹,陈 爽,高 群,等 (1419)
水资源短缺的社会适应能力理论及实证——以黑河流域为例 ·····	程怀文,李玉文,徐中民 (1430)
寄主植物叶片物理性状对潜叶昆虫的影响·····	戴小华,朱朝东,徐家生,等 (1440)
专论与综述	
C ₄ 作物 FACE (free-air CO ₂ enrichment) 研究进展 ·····	王云霞,杨连新,Remy Manderscheid,等 (1450)
研究简报	
石灰石粉施用剂量对重庆酸雨区受害马尾松林细根生长的影响·····	李志勇,王彦辉,于澎湃,等 (1460)
女贞和珊瑚树叶片表面特征的 AFM 观察 ·····	石 辉,王会霞,李秧秧,刘 肖 (1471)

蕙兰病株根部内生细菌种群变化

杨娜^{1,2}, 杨波^{1,*}

(1. 中国科学院武汉植物园, 中国科学院植物种质创新与特色农业重点实验室, 武汉 430074;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 为了研究褐斑病与蕙兰根部内生细菌群落结构和多样性的关联, 从野生蕙兰健株和褐斑病株根部分离出内生细菌 112 株, 采用核糖体 DNA 扩增片段限制性酶切分析 (ARDRA), 研究了健株和病株内生细菌多样性与群落结构。将内生细菌纯培养物扩增近全长的 16S rDNA, 并用 ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) 对所分离的菌株进行分型, 根据酶切图谱的差异, 将健株中的内生细菌分成 8 个 ARDRA 型, 病株分成 13 个 ARDRA 型。并选取代表性菌株进行 16S rDNA 序列测定。结果表明, 健株分离出内生细菌 6 个属, 优势菌群为 *Bacillus*; 病株分离出 11 个属, 优势菌群为 *Mitsuaria* 和 *Flavobacterium*。通过回接兰花植物和初步拮抗实验发现, 从病株分离出的 H5 号菌株 (*Flavobacterium resistens*) 使兰花产生病症, 而健株中的 B02 (*Bacillus cereus*) 和 B22 号菌株 (*Burkholderia stabilis*) 对菌株 H5 有拮抗作用。

关键词: 蕙兰; 内生细菌; 群落结构; ARDRA; 16S rDNA

Population dynamics of endophytic bacteria isolated from the roots of infected *Cymbidium faberi*

YANG Na^{1,2}, YANG Bo^{1,*}

1 Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Speciality Agriculture, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: A study was conducted to investigate the community structure and the diversity of culturable endophytic bacteria in the root tissues of healthy and diseased plants of *Cymbidium faberi* Rolfe collected from Hubei Province of China. The endophytic bacteria were identified by characterization of cultural features, and some molecular features using methods of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and sequence homology comparisons. Results showed that a total of 112 bacterial isolates were obtained, 53 strains from healthy plants and 59 strains from diseased plants of *C. faberi*. The amount of bacteria reached 1.33×10^5 cfu/g in healthy plants, whereas was 1.21×10^4 cfu/g in the plants infected with brown spot disease. The number of endophytic bacteria decreased in the diseased plants. Comparison of the *AluI*-restriction patterns of the 16S rDNA sequence showed that 112 bacterial isolates from diseased plants could be grouped into 13 operational taxonomic units (OTUs). The OTU10 and OTU11 were the major groups accounting for 13 and 15 isolates, respectively. The bacterial isolates from healthy plants could be grouped into 8 OTUs and OTU1 was the major group accounting for 24 isolates. The representative strains for these OTUs were selected for characterization of the 16S rDNA sequences. Phylogenetic analysis on the basis of the 16S rDNA sequences from this study and from related bacterial species in the GenBank database showed that the representative bacterial isolates from the healthy plants of *C. faberi* belonged to six genera, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* and *Microbacterium*. The genus *Bacillus* was the dominant bacteria, followed by *Paenibacillus* and *Burkholderia*. The bacterial isolates from diseased plants of *C. faberi* belonged to eleven genera, *Mitsuaria*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Brevundimonas*, *Pedobacter*, *Burkholderia*,

基金项目: 中国科学院创新专项 (KSCX2-YW-Z-0702-5)

收稿日期: 2010-05-25; 修订日期: 2011-01-17

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yangbo@wbcas.cn

Sphingomonas, *Mucilaginibacter*, *Pseudomonas* and *Microbacterium*. The dominant genera were *Mitsuaria* and *Flavobacterium*, followed by *Burkholderia*. The phylogenetic diversity of endophytic bacteria in diseased plants of *C. faberi* were different from that in healthy plants of *C. faberi*. Results also showed that the diversity of the endophytic bacterial community from diseased plants of *C. faberi* was higher than that in healthy plants of *C. faberi*. The dominant OTUs from diseased plants were suspected to be pathogens of *C. faberi*. Thus, representative bacterial isolates were selected to inoculate healthy plants of *C. faberi*, *Ascocentrum ampullaceum* and *Cymbidium goeringii*. Results showed that isolate H5 of *Flavobacterium resistens* from a diseased plant of *C. faberi* was pathogenic on leaves of *C. faberi*, *Ascocentrum ampullaceum* and *Cymbidium goeringii*. The endophytic bacterial isolates B02 of *Bacillus cereus* and B22 of *Burkholderia stabilis* from healthy plants were found to be antagonistic to the isolate H5 of *F. resistens*. These results indicate that the endophytic bacterial community in healthy plants and diseased plants of *C. faberi* differs greatly and the difference may be the cause responsible for brown spot disease in *C. faberi*.

Key Words: *Cymbidium faberi*; endophytic bacterial; community structure; ARDRA; 16S rDNA

植物内生细菌(Endophytic bacteria)是指能在健康植物组织内栖居而对植物不造成实质性危害,并与植物建立了和谐联合关系的微生物^[1-2],是植物微生态系统中的重要组成成分。研究表明,植物内生细菌具有防病^[3]、固氮^[4]、促生^[5]、促进植物合成多种生长激素^[6]、增强宿主植物的抗逆性^[7]等生物学作用。因此,内生细菌在促生和生防方面具有重要作用。

蕙兰(*Cymbidium faberi* Rolfe)为兰科兰属多年生地生植物,在迁地保育过程中,由于微生态环境的变化,造成保育率极低,而内生菌又是微生态系统中的重要组成成分,所以我们要对兰花内生菌进行研究。目前,对兰科植物微生态系统中的微生物研究主要集中在与兰花根共生的菌根真菌,而对内生细菌的研究较少,有关蕙兰内生细菌种群及其动态的研究,国内外未见报道。本文对蕙兰病株内生细菌的种群变化进行了研究,试图揭示健株与病株内生细菌群落结构的差异,对进一步了解蕙兰抗病性具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

2009年9月于湖北省随州大洪山(31°49'37"N,113°02'60"E)采集蕙兰健株和褐斑病株,当天带回实验室进行内生细菌的分离。

1.2 培养基、主要试剂与仪器

R2A培养基:酵母粉0.5g,胰蛋白胨1g,蔗糖0.5g,淀粉0.5g,磷酸氢二钾0.3g,硫酸镁0.024g,丙酮酸钠0.3g,琼脂15g,水1000mL,pH7.2。

PCR试剂、限制性内切酶等购自TaKaRa公司。PCR仪(Bio-Rad公司,S1000™Thermal Cycler),凝胶成像分析仪(Bio-Rad公司,Gel-DOC™XR)。

1.3 内生细菌的分离与纯化

将采回的样品用水冲洗干净,分别称取健株与病株2年生根1g,用1%的次氯酸钠消毒3min,然后用无菌水冲洗3次,再将表面杀菌后的兰根置于灭菌的研钵中充分研磨,加入10mL无菌水,静置15min,再将上清液按梯度稀释到 10^{-4} ,取0.1mL各个梯度的碾磨液涂布于R2A平板上,每个处理重复3次,28℃暗培养。取最后一次冲洗液0.1mL涂布平板进行培养,作为表面消毒的对照。

选择菌落数在30—100范围的平板,将所有单菌落分别转接划线在R2A平板上,纯化后接斜面于4℃保存。

1.4 内生细菌的生理生化性状测定

观察菌落的颜色、大小、光泽度、边缘、透明度、凸起的形状等。生理生化实验测试了内生细菌碳源利用和酶活反应,方法参照API 20NE及其操作程序。

1.5 PCR 扩增

1.5.1 PCR 反应简易模板的制备

用热裂解法快速提取细菌总 DNA^[8]。菌株在 R2A 平板上 28℃ 活化培养 12—24h,用接种环挑取单菌落少许至 20μL 无菌 ddH₂O 中,95℃ 水浴 10min,立即置于冰上 2min,10 000×g 瞬时高速离心,取上清液 2μL 作为 PCR 反应模板。

1.5.2 16S rDNA 扩增

采用细菌通用引物(27f, 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和 1495r, 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'),由 Invitrogen 公司合成,用于分离物的 16S rDNA 扩增。扩增体系为 20 μL:ddH₂O 11.9 μL, DNA 模板 2.0 μL,引物(150 ng/μL)各 1.0 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.4 μL, 10×buffer 2.0 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μL, Taq 酶(1U/μL) 0.5 μL。PCR 扩增条件:95℃ 预变性 90 s, 94℃ 变 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 5 次循环; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min, 5 次循环; 95℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 2min, 25 次循环; 72℃ 10 min, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

1.6 核糖体 DNA 扩增片段限制性酶切分析 (ARDRA)

酶切反应体系为:PCR 产物 5 μL, 限制性内切酶 *Alu* I (10 U/μL) 0.3 μL, 10×buffer 2 μL, ddH₂O 补充体系至 20 μL, 37℃ 酶切 4 h。酶切产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后进行酶切带型的分析^[9]。

1.7 16S rDNA 扩增产物的测序及系统发育树的构建

根据 ARDRA 酶切图谱的差异进行分析聚类,划分为不同的操作分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU)。选取每个 OTU 中的代表性菌株进行 16S rDNA 扩增,PCR 产物由北京六合华大基因科技股份有限公司完成纯化和测序工作。

根据测序结果,从 GenBank 数据库中,选取同源性较高的相似序列,用 MEGA4.1 软件分析和构建系统发育树^[10]。

1.8 回接植物实验

将分离出来的代表性菌株在 R2A 平板上活化 12—24h,选取无菌的兰花组培苗,置于事先灭菌的培养皿中。采用针刺法接种,用接种针分别挑取代表性菌株回接到兰花叶片上,每个叶片接种 3 个点,25℃ 恒温保湿培养,以无菌水接种健康叶片作为对照。观察对兰花的影响情况。

1.9 拮抗实验

把通过回接试验使兰花产生病症的菌株接种到液体 R2A 培养基中,30℃、140r/min 恒温摇床培养 12—24h。取 100μL 菌悬液涂布在灭过菌的 R2A 固体平板上,点上待测菌株,用无菌水做对照,放在 28℃ 温箱中培养,观察抑菌圈的有无,记录实验结果。

2 结果

2.1 蕙兰内生细菌的分离

分别对蕙兰健株和病株进行内生细菌的分离,结果表明,健株根部可培养内生细菌数量为 1.3×10^5 cfu/g,而病株数量仅为 1.2×10^4 cfu/g。选择菌落数在 30—100 范围的稀释度平板,将同一平板上的所有单菌落分别进行分离纯化,共得到 112 株纯培养物,其中健株分离出 59 株,病株分离出 53 株。

2.2 内生细菌的 ARDRA 分析

将 112 株纯培养物分别制备 PCR 简易模板,扩增近全长的 16S rDNA,共获得约 1400bp 的目的片段。用限制性内切酶 *Alu* I 对 PCR 扩增产物进行酶切,根据酶切图谱的差异聚类,每一个特有的 ARDRA 类型代表一个操作分类单元(OTU)。将健株内生细菌划分为 8 个不同的 OTU,即 OTU1—OTU8(图 1),属于 OTU1 的有 24 个菌株,占总细菌数的 40.67%,为优势菌群;OTU3 和 OTU7 各含 11、9 个菌株,分别占总细菌数的 18.64%、15.25%,为次优势种群。病株划分为 13 个不同的 OTU,即 OTU9—OTU21(图 2),属于 OTU11 和 OTU10 的各含 15、13 个菌株,分别占总细菌数的 28.30%、24.53%,为优势种群,OTU16 有 5 个菌株,占总细

菌数的 9.43%,为次优势种群。

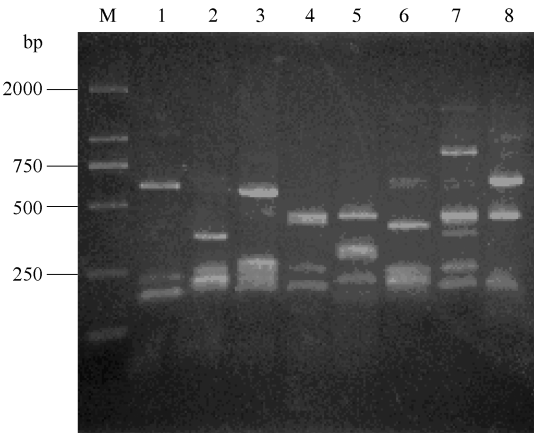


图1 蕙兰健株内生细菌 ARDRA 类型

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of amplified 16S rDNA digested with endonuclease *Alu* I from 59 strains isolated from healthy plant

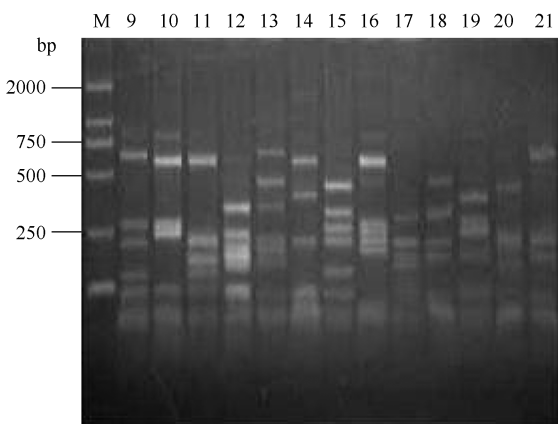


图2 蕙兰病株内生细菌 ARDRA 类型

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of amplified 16S rDNA digested with endonuclease *Alu* I from 53 strains isolated from infected plant

2.3 16S rDNA 序列相似性比较及系统发育分析

根据 ARDRA 结果,选取每个 OTU 中的代表性菌株,测定其 16S rDNA 序列,将分离菌株的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中进行相似性比较,选取同源性较高的菌株并与之构建系统发育树(表 1,图 3)。结果表明:健株中的 8 个 OTU 分别属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、

表 1 蕙兰内生细菌 OTUs 代表性菌株序列相似性比较

Table 1 16S rDNA sequence similarity between representative strains from each OTU and reference taxa (B represent the endophytic bacteria isolated from healthy plant; H represent the endophytic bacteria isolated from infected plant)

操作分类单元 OTUs	代表性菌株登录号 Representative strain GenBank Acc. No.	最相似菌株 The closest NCBI match	相似性 Similarity /%	菌株数/个 No. of strains	比例 /%
OTU1	B02	<i>Bacillus cereus</i> (GQ199591)	100	24	40.67
OTU2	B09	<i>Rhizobium tibeticum</i> (EU256404)	99.4	2	3.39
OUT3	B22	<i>Burkholderia stabilis</i> (AF148554)	99.4	11	18.46
OTU4	B13	<i>Bacillus megaterium</i> (D16273)	99.2	4	6.78
OTU5	B05	<i>Microbacterium flavescens</i> (AB004716)	99.3	1	1.69
OTU6	B50	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> (AJ249382)	99.6	5	8.47
OTU7	B48	<i>Paenibacillus phyllosphaerae</i> (AY598818)	95.1	9	15.25
OTU8	B15	<i>Paenibacillus pabuli</i> (AB073191)	99.4	3	5.08
OTU9	H1	<i>Bacillus aryabhattai</i> (EF114313)	100	4	7.55
OTU10	H5	<i>Flavobacterium resistens</i> (EF575563)	97.4	13	24.53
OTU11	H3	<i>Mitsuaria chitosanitabida</i> (AB006851)	99.2	15	28.30
OTU12	H6	<i>Pedobacter</i> sp. A48 (EU194884)	97.0	1	1.87
OTU13	H20	<i>Bacillus stratosphericus</i> (AJ831841)	99.9	1	1.87
OTU14	H12	<i>Enterobacter hormaechei</i> (AJ508302)	98.5	2	3.77
OTU15	H10	<i>Brevundimonas bullata</i> (D12785)	99.4	1	1.87
OTU16	H31	<i>Burkholderia sediminicola</i> (EU035613)	99.7	5	9.43
OTU17	H38	<i>Sphingobium amiense</i> (AB047364)	98.1	1	1.87
OTU18	H40	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> (Y17231)	99.7	2	3.77
OTU19	H43	<i>Flavobacterium chungangense</i> (EU924275)	98.4	3	5.66
OTU20	H45	<i>Mucilaginibacter kameinonensis</i> (AB330392)	98.8	4	7.55
OTU21	H48	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> (AM088474)	99.5	2	3.77

伯克氏属 (*Burkholderia*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和微杆菌属 (*Microbacterium*), 共 6 个属。其中优势菌群为 *Bacillus*, 次优势菌群为 *Paenibacillus* 和 *Burkholderia*。病株中的 13 个 OTU 分别属于 *Mitsuaria*、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、*Bacillus*、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、*Brevundimonas*、*Pedobacter*、*Burkholderia*、*Sphingomonas*、*Mucilaginibacter*、*Pseudomonas*、*Microbacterium*, 共 11 个属。其中优势菌群为 *Flavobacterium* 和 *Mitsuaria*, 次优势菌群为 *Burkholderia*。各 OTU 类群中代表性菌株的主要生理生化特征与其所归属的属也基本吻合 (表 2, 表 3)。

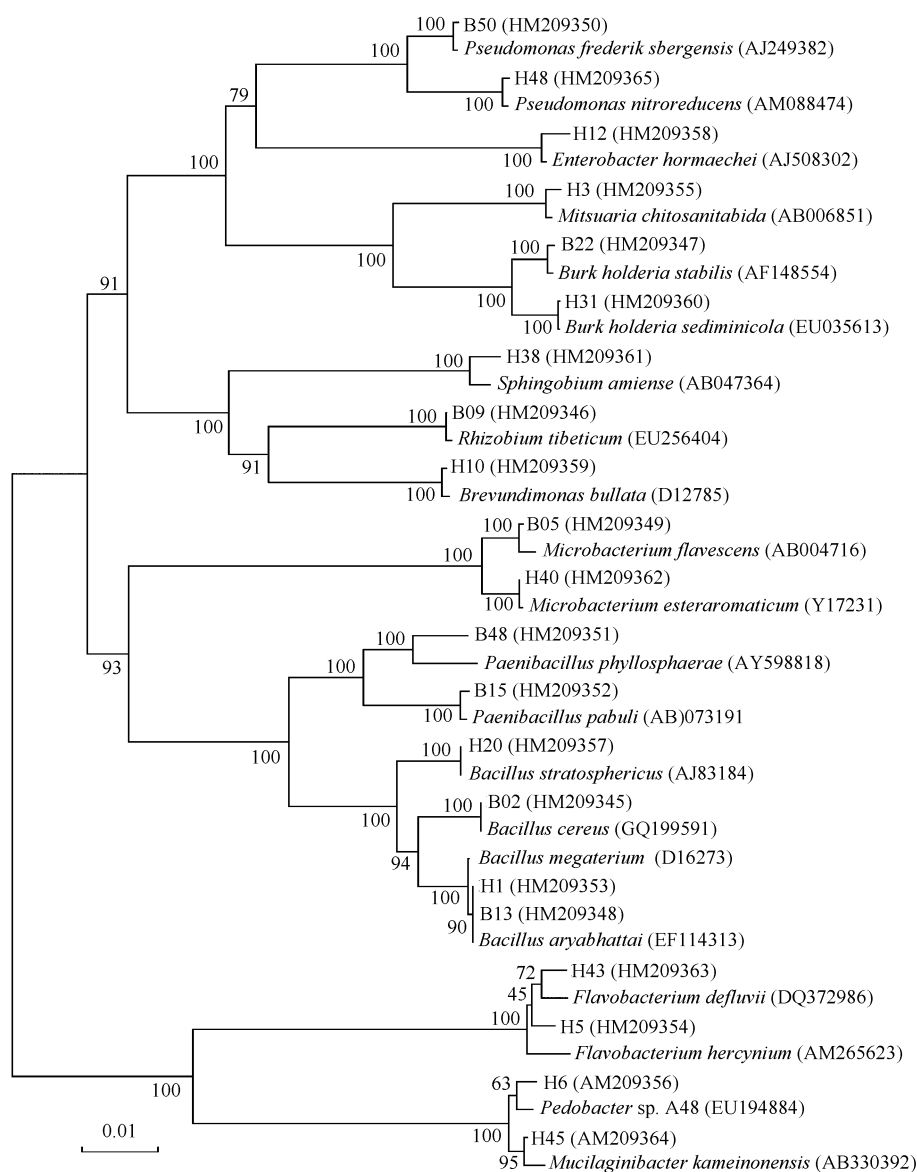


图 3 基于 16S rDNA 序列同源性的蕙兰内生细菌系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of endophytic bacteria from *Cymbidium faberi* based on 16S rDNA sequences

Numbers in parentheses are the GenBank accession numbers; Bar indicates 1% sequence divergence. Bootstrap supporting values are shown at branch nodes

2.4 蕙兰病株与健株根部内生细菌差异

蕙兰健株中分离出来的内生细菌种类比病株的少, 健株中优势种群为 *Bacillus*, 而病株为 *Flavobacterium* 和 *Mitsuaria* (图 4)。

表 2 代表菌株碳源利用

Table 2 Carbon source utilization among representative strains																			
碳源 Carbon source	B02	B09	B22	B13	B05	B50	B48	B15	H1	H5	H3	H6	H20	H12	H10	H31	H40	H43	H45
D-葡萄糖 D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-阿拉伯糖 L-arabinose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
D-甘露糖 D-mannose	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
D-甘露醇 D-mannitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
N-乙酰氨基葡萄糖 N-acetyl-glucosamine	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-麦芽糖 D-maltose	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
葡萄糖酸钾 Potassium gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
癸酸 Capric acid	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
己二酸 Adipic acid	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
苹果酸 Malic acid	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
柠檬酸钠 Trisodium citrate	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
苯乙酸 Phenylacetic acid	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

+: 阳性 positive;-: 阴性 negative

表 3 代表菌株酶活反应

Table 3 The result of enzyme activity test among representative strains																			
活性成分 Active ingredients	B02	B09	B22	B13	B05	B50	B48	B15	H1	H5	H3	H6	H20	H12	H10	H31	H40	H43	H45
硝酸钾 Potassium nitrate	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
色氨酸 Tryptophane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-葡萄糖 D-glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
精氨酸二水解酶 Arginine Dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
尿素酶 UREase	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
半乳糖苷酶 β -glucosidase	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
蛋白酶 Protease	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
半乳糖苷酶 β -galactosidase	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
细胞色素氧化酶 Cytochrome oxidase	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-

+: 阳性 positive;-: 阴性 negative

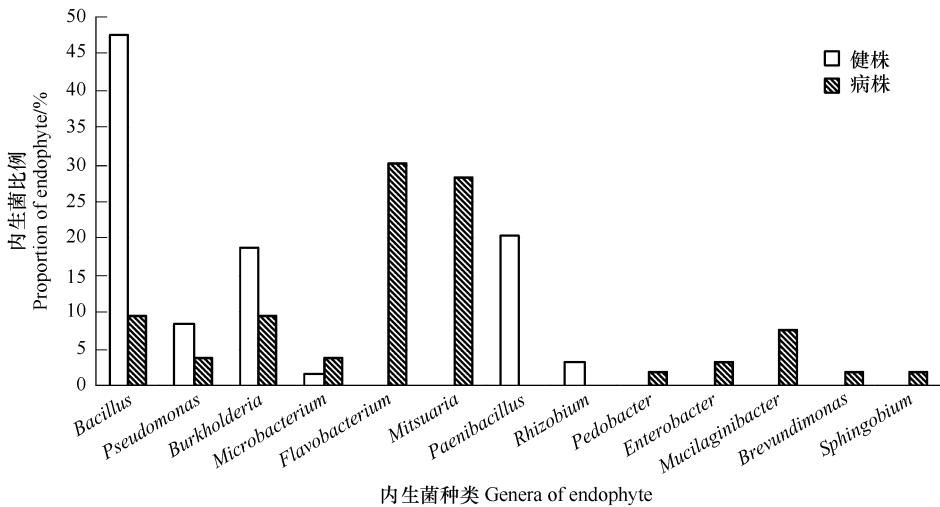


图 4 蕙兰根部内生细菌数量及种类的变化

Fig. 4 Shifts in the endophytic bacteria diversity in response to pathogen infection in the root tissues of *Cymbidium faberi*

2.5 回接植物与拮抗实验

将分离出的代表性菌株回接兰花,结果显示从病株中分离出的 H5 号菌株接种 2d 后叶片开始出现斑点状,并逐渐扩展为深褐色,部分兰花周围有水渍状晕圈(图 5—图 7)。对照叶片未见症状(图 8—图 10)。



图 5 菌株 H5 回接蕙兰

Fig. 5 Strain H5 inoculate *Cymbidium faberi*



图 6 H5 菌株回接鸟舌兰

Fig. 6 Strain H5 inoculate *Ascocentrum ampullaceum*



图 7 菌株 H5 回接金边春兰

Fig. 7 Strain H5 inoculate *Cymbidium goeringii*



图 8 回接金边春兰实验对照

Fig. 8 Symptom produced on *Cymbidium goeringii* plant by inoculation of distilled water

把分离出来的菌株与 H5 菌株做拮抗实验,结果发现,从健株分离出来的 B22 和 B02 菌株对 H5 菌株有抑制作用(图 11,图 12)。



图9 回接蕙兰实验对照

Fig. 9 Symptom produced on *Cymbidium faberi* plant by inoculation of distilled water



图10 回接鸟舌兰实验对照

Fig. 10 Symptom produced on *Ascocentrum ampullaceum* plant by inoculation of distilled water



图11 B22 对 H5 的拮抗效果图

Fig. 11 The hadantagonistic action of bacteria B22 to strain H5



图12 B02 对 H5 的拮抗效果图

Fig. 12 The hadantagonistic action of bacteria B02 to strain H5

3 讨论与结论

3.1 讨论

本文采用 ARDRA 方法对从蕙兰病株和健株中分离培养的 112 株内生细菌进行分析,比较其种群结构与多样性。结果表明,两者种群结构存在明显差异,无论是数量还是种类上都有所不同,这为下一步了解蕙兰抗病性打下了基础。

研究中发现,健株内生细菌的种类比病株的少,健株中的内生细菌分为 8 个 OTUs,共 6 个属,而病株分为 13 个 OTUs,共 11 个属。植物内生菌的种群结构不仅与植物的种类、基因型有关,还与环境条件、生长状态有关,存在复杂的多样性。一般来讲,生物多样性是衡量生态系统稳定和健康的一个重要指标^[11]。Reiter 等的研究表明,马铃薯内生细菌的群落结构与病原菌的存在和消失有密切关系,受 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 侵染的马铃薯病株内生细菌的群落多样性要高于健康植株^[12]。而本研究的结果与之相同,这可能是因为在相同的环境中,感病植株自身抵抗病害的能力减弱,易受其他病原菌的侵染;也可能是更加丰富的内生细菌类群参与了该植株的病害防御系统^[12]。

蕙兰病株和健株分离出来的细菌类群也有所不同。*Paenibacillus* 和 *Rhizobium* 仅在健株中分离出来,据报道,分离自大豆的内生 *Paenibacillus* 对大豆的病原真菌有拮抗作用^[13],而且能帮助宿主植物固氮^[14],*Rhizobium* 对扁豆的镰刀霉枯萎病(*Fusarium wilt*)有防治作用,还能促进扁豆的生长^[15],而这两个属在病株中并没有被发现,所以推测,可能是这两个属的细菌对蕙兰的抗病性起到了一定的作用。*Mitsuaria*、*Flavobacterium*、*Enterobacter*、*Mucilaginibacter*、*Sphingomonas*、*Brevundimonas*、*Pedobacter* 仅在病株中分离到。其中 *Mitsuaria* 是新发现的菌株,国内外对其的研究较少,它在植物体内的功能还不是很清楚,它们有可能对蕙兰植株有害也可能参与了该植株的病害防御系统,这需要进一步研究证明。在健株和病株中都分离到 *Burkholderia*^[16]、*Microbacterium*^[1] 和 *Pseudomonas*^[17] 这 3 个属,这些属已经广泛的从各种植物中分离到,其中包含了很多作为生防因子开发的菌株。

从蕙兰病株和健株中分离出来的内生细菌,在优势种群上也有很大差别。健株中 *Bacillus* 为优势菌群,占分离物的 47.45%,而在病株中仅占 9.42%,数量大大减少,据报道,*Bacillus* 对外界有害因子抵抗力强,菌体生长过程中产生的枯草菌素、多粘菌素、制霉菌素、短杆菌肽等活性物质对致病菌或内源性感染的条件致病菌有明显的抑制作用。Silva 等^[18]已经证明内生 *Bacillus* 对番茄病原菌(*Pseudomonas syringae*)有拮抗活性。而病株中的优势菌群为 *Mitsuaria*、*Flavobacterium*,分别占分离物的 28.30%、30.19%。其中 H5 菌株(*Flavobacterium resistens*)回接到兰花植物后,植株表现出明显的病症,*Flavobacterium* 细菌是一类以在生长过程中产生黄色素为特征的革兰氏阴性杆菌,很多都是人或动物的条件致病菌,但它与植物之间的关系还有待进一步研究。本文通过拮抗实验发现,从健株中分离出的 B02 菌株(*Bacillus cereus*)和 B22 菌株(*Burkholderia stabilis*)对病株中的 H5 菌株(*Flavobacterium resistens*)有拮抗作用,而在健株中没有分离出 *Flavobacterium*,因此作者推测,可能是健株中的一些细菌对 H5 这类潜在的有害细菌能产生抑制作用。蕙兰病株与健株内生细菌的群落结构差异变化明显,这种变化打破了蕙兰体内的微生态平衡,这对植物的生存是不利的,而通过人为控制逆转这种变化,则可能为植物病害防治提供新的思路。

3.2 结论

通过对野生蕙兰病株和健株根部内生细菌的比较分析得到如下结论:

(1) 蕙兰病株与健株根部内生细菌种群结构存在明显差异。通过 ARDRA 分型、理化测定和分子生物学鉴定,健株划分为 8 个 OTU,共 6 个属,主要菌群为 *Bacillus*;病株划分为 13 个 OTU,共 11 个属,主要菌群为 *Mitsuaria*、*Flavobacterium*。病株内生细菌多样性比较丰富。

(2) 从病株中分离出的 H5 菌株使兰花产生病症,而从健株中分离出的 B02 菌株和 B22 菌株对其有拮抗作用。

References:

- [1] Zinniel D K, Lambrecht P, Harris N B, Feng Z Y, Kuczmarski D, Higley P, Ishimaru C A, Arunakumari A, Barletta R G, Vidaver A K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(5): 2198-2208.
- [2] Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J, van der Lelie D. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(3): 748-757.
- [3] Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora R A, Ulrich A, Hallmann J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 51(2): 215-229.
- [4] Dalton DA, Kramer S, Azios N, Fusaro S, Cahill E, Kennedy C. Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila laevis* and *Elymus mollis*) from Oregon. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 49(3): 469-479.
- [5] Ting A S Y, Meon S, Kadir J, Radu S, Singh G. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. *Biocontrol*, 2008, 53(3): 541-553.
- [6] Minamisawa K, Nishioka K, Miyaki T, Ye B, Miyamoto T, You M, Saito A, Saito M, Barraquio W L, Teamroong N, Sein T, Sato T. Anaerobic nitrogen-fixing consortia consisting of clostridia isolated from gramineous plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 3096-3102.
- [7] Wilkinson H H, Siegel M R, Blankenship J D, Mallory A C, Bush L P, Schardl C L. Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2000, 13(10): 1027-1033.
- [8] Yang R X, Sun G Y, Zhang R, Chen L J. 16S rDNA RFLP analysis of endophytic bacteria from *Brassica napus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(4): 606-609.
- [9] Chen M, Zhao L P. Biodiversity of bacterial isolates on three different media from coking wastewater treatment system. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(3): 366-371.
- [10] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [11] Bertollo P. Assessing landscape health: a case study from northeastern Italy. *Environmental Management*, 2001, 27(3): 349-365.
- [12] Reiter B, Pfeifer U, Schwab H, Sessitsch A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and Environment Microbiology*, 2002, 68(5): 2261-2268.
- [13] Senthilkumar M, Govindasamy V, Dureja P, Annapurna K. Purification and partial characterization of antifungal peptides from soybean endophyte-*Paenibacillus* sp strain HKA-15. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 16(2): 131-134.
- [14] Beneduzi A, Costa P B, Parma M, Melo I S, Bodanese-Zanettini M H, Passaglia L M P. *Paenibacillus riograndensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(1): 128-133.
- [15] Akhtar M S, Shakeel U, Siddiqui Z A. Biocontrol of Fusarium wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium* sp. on lentil. *Turkish Journal of Biology*, 2010, 34(1): 1-7.
- [16] Mu Z M, Lu G B, Ji X L, Gai Y P, Wang Y W, Gao H J, Cha C Y. Identification and colonization of an antagonistic endophytic *Burkholderia cepacia* Lul0-1 isolated from mulberry. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(5): 623-630.
- [17] Lee S W, Ahn I P, Sim S Y, Lee S Y, Seo M W, Kim S, Park S Y, Lee Y H, Kang S. *Pseudomonas* sp. LSW25R, antagonistic to plant pathogens, promoted plant growth, and reduced blossom-end rot of tomato fruits in a hydroponic system. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, 126(1): 1-11.
- [18] Silva J R C, de Souza R M, Zacarone A B, da Silva L H C P, Castro A M D S. Control with endophytic bacteria and in vitro inhibition of *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agent of bacterial speck of tomato. *Cienciae Agrotecnologia*, 2008, 32(4): 1062-1072.

参考文献:

- [8] 杨瑞先, 孙广宇, 张荣, 陈立军. 油菜内生细菌 16S 核糖体 DNA 的 RFLP 分析. *微生物学报*, 2005, 45(4): 606-609.
- [9] 陈敏, 赵立平. 焦化废水处理系统中不同培养基分离的细菌种群多样性. *微生物学报*, 2003, 43(3): 366-371.
- [16] 牟志美, 路国兵, 冀宪领, 盖英萍, 王彦文, 高绘菊, 查传勇. 桑树内生拮抗细菌 *Burkholderia cepacia* Lul0-1 的分离鉴定及其内生定殖. *微生物学报*, 2008, 48(5): 623-630.

CONTENTS

Root system characters in growth and distribution among three littoral halophytes	YI Liangpeng, WANG Zuwei (1195)
Population dynamics of endophytic bacteria isolated from the roots of infected <i>Cymbidium faberi</i>	YANG Na, YANG Bo (1203)
Spatial variability of forest soil total nitrogen of different soil layers	ZHANG Zhenming, YU Xinxiao, WANG Yousheng, et al (1213)
Habitat prediction for forest musk deer (<i>Moschus berezovskii</i>) in Qinling mountain range based on niche model	LUO Chong, XU Weihua, ZHOU Zhixiang, et al (1221)
Growth release determination and interpretation of Korean pine and Koyama spruce in Shengshan National Nature Reserve, Heilongjiang Province, China	WANG Xiaochun, ZHAO Yufang (1230)
Growth tolerance and accumulation characteristics of the mycelia of two macrofungi species to heavy metals	LI Weihuan, YU Lanlan, CHENG Xianhao, et al (1240)
Characters of the OMI NO ₂ column densities over different ecosystems in Zhejiang Province during 2005—2009	CHENG Miaomiao, JIANG Hong, CHEN Jian, et al (1249)
The forest gap diameter height ratio in a secondary coniferous forest of Guan Di Mountain	FU Liyong, TANG Shouzheng, LIU Ying'an (1260)
Landscape responses to changes in water levels at Poyang Lake wetlands	XIE Dongming, ZHENG Peng, DENG Hongbing, et al (1269)
Effect of simulated nitrogen deposition on litter decomposition in a <i>Bambusa pervariabilis</i> × <i>Dendrocalia mopsi</i> plantation, Rainy Area of West China	TU Lihua, DAI Hongzhong, HU Tingxing, et al (1277)
Effect of aromatic plant-derived nutrient solution on the growth, fruit quality and disease prevention of pear trees	GENG Jian, CUI Nannan, ZHANG Jie, et al (1285)
Influences of different plastic film mulches on temperature and moisture of soil and growth of watermelon in gravel-mulched land	MA Zhongming, DU Shaoping, XUE Liang (1295)
Effects of drought stress on photosynthetic traits and protective enzyme activity in maize seedling	ZHANG Renhe, ZHENG Youjun, MA Guosheng, et al (1303)
Photosynthetic diurnal variation characteristics of leaf and non-leaf organs in winter wheat under different irrigation regimes	ZHANG Yongping, ZHANG Yinghua, WANG Zhimin (1312)
The root system hydraulic conductivity and water use efficiency of alfalfa and sorghum under water deficit	LI Wenrao, LI Xiaoli, ZHANG Suiqi, et al (1323)
Latitudinal gradient in beta diversity of forest communities in America	CHEN Shengbin, OUYANG Zhiyun, ZHENG Hua, et al (1334)
Influence of silts on growth and development of <i>Acorus calamus</i> and <i>Acorus tatarinowii</i> in turbid water	LI Qiang, ZHU Qihong, DING Wuquan, et al (1341)
Roles of earthworm in phytoremediation of pyrene contaminated soil	PAN Shengwang, WEI Shiqiang, YUAN Xin, et al (1349)
Population dynamics of <i>Frankliniella occidentalis</i> (Thysanoptera: Thripidae) along with analysis on the meteorological factors influencing the population in pomegranate orchards	LIU Ling, CHEN Bin, LI Zhengyue, et al (1356)
Geophagy of <i>Macaca Thibetana</i> at Mt. Huangshan, China	YIN Huabao, HAN Demin, XIE Jifeng, et al (1364)
The structure and dynamic of insect community in Zhalong Wetland	MA Ling, GU Wei, DING Xinhua, et al (1371)
Analysis of layer progressive discriminant relations between the occurrence of <i>Bipectilus zhejiangensis</i> and soil	DU Ruiqing, CHEN Shunli, ZHANG Zhengtian, et al (1378)
New mutations in hind wing vein of <i>Apis cerana cerana</i> (Hymenoptera: Apidae) induced by lower developmental temperature	ZHOU Bingfeng, ZHU Xiangjie, LI Yue (1387)
18S rRNA gene variation and phylogenetic analysis among 6 orders of Bivalvia class	MENG Xueping, SHEN Xin, CHENG Hanliang, et al (1393)
Laboratory study on ethology of <i>Spinibarbus hollandi</i>	LI Weiming, CHEN Qiuwen, HUANG Yingping (1404)
Dynamic change in ecological footprint of energy consumption for traction of locomotives in China	HE Jicheng (1412)
Approach to spatial differences analysis of urban carrying capacity; a case study of Changzhou City	WANG Dan, CHEN Shuang, GAO Qun, et al (1419)
Social adaptive capacity for water resource scarcity in human systems and case study on its measuring	CHENG Huaiwen, LI Yuwen, XU Zhongmin (1430)
Effects of physical leaf features of host plants on leaf-mining insects	DAI Xiaohua, ZHU Chaodong, XU Jiasheng, et al (1440)
Review and Monograph	
Progresses of free-air CO ₂ enrichment (FACE) researches on C ₄ crops; a review	WANG Yunxia, YANG Lianxin, Remy Manderscheid, et al (1450)
Scientific Note	
Influence of limestone powder doses on fine root growth of seriously damaged forests of <i>Pinus massoniana</i> in the acid rain region of Chongqing, China	LI Zhiyong, WANG Yanhui, YU Pengtao, et al (1460)
Leaf surface microstructure of <i>Ligustrum lucidum</i> and <i>Viburnum odoratissimum</i> observed by Atomic force microscopy (AFM)	SHI Hui, WANG Huixia, LI Yangyang, LIU Xiao (1471)

2009 年度生物学科总被引频次和影响因子前 10 名期刊*

(源于 2010 年版 CSTPCD 数据库)

排序 Order	期刊 Journal	总被引频次 Total citation	排序 Order	期刊 Journal	影响因子 Impact factor
1	生态学报	11764	1	生态学报	1.812
2	应用生态学报	9430	2	植物生态学报	1.771
3	植物生态学报	4384	3	应用生态学报	1.733
4	西北植物学报	4177	4	生物多样性	1.553
5	生态学杂志	4048	5	生态学杂志	1.396
6	植物生理学通讯	3362	6	西北植物学报	0.986
7	JOURNAL OF INTEGRATIVE PLANT BIOLOGY	3327	7	兽类学报	0.894
8	MOLECULAR PLANT	1788	8	CELL RESEARCH	0.873
9	水生生物学报	1773	9	植物学报	0.841
10	遗传学报	1667	10	植物研究	0.809

★《生态学报》2009 年在核心版的 1964 种科技期刊排序中总被引频次 11764 次,全国排名第 1;影响因子 1.812,全国排名第 14;第 1—9 届连续 9 年入围中国百种杰出学术期刊;中国精品科技期刊

编辑部主任: 孔红梅

执行编辑: 刘天星 段 靖

生 态 学 报
(SHENGTAI XUEBAO)
(半月刊 1981 年 3 月创刊)
第 31 卷 第 5 期 (2011 年 3 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA
(Semimonthly, Started in 1981)
Vol. 31 No. 5 2011

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel:(010)62941099 www.ecologica.cn Shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	冯宗炜	Editor-in-chief	FENG Zong-Wei
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717	Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net	Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		

