

刘芳, 袁宗胜, 张国防, 等. 毛竹内生细菌种群多样性分析 [J]. 福建农业学报, 2014, 29 (12): 1236-1239.

LIU F, YUAN Z-S, ZHANG G-F, et al. Diversity of Endophytic Bacteria Isolated from Moso Bamboo [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2014, 29 (12): 1236-1239.

毛竹内生细菌种群多样性分析

刘芳¹, 袁宗胜², 张国防^{2*}, 陈威²

(1. 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002)

摘要: 采用稀释平板法从福建武夷山毛竹根、鞭、秆、叶部组织中分离到 27 株内生细菌, 利用细菌菌落表征性状和 16S rDNA 序列对这些菌株进行了多样性分析。结果表明, 分离出 27 株内生细菌分属于 14 属 18 种, 其中以节杆菌属 *Arthrobacter*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、苍白杆菌属 *Ochrobactrum* 和葡萄球菌属 *Staphylococcus* 为主要菌群。

关键词: 毛竹; 内生细菌; 多样性

中图分类号: Q 939.96

文献标识码: A

Diversity of Endophytic Bacteria Isolated from Moso Bamboo

LIU Fang¹, YUAN Zong-sheng², ZHANG Guo-fang^{2*}, CHEN Wei²

(1. College of Life science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China;

2. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: Twenty-seven endophytic bacteria were isolated from the roots, rhizome, stems and leaves of moso bamboo by means of grinding separation. A preliminary determination on the diversity of the strains was made based on their phenotypic characteristics as well as the molecular classification using partial 16S rDNA sequences. The results showed that the isolated bacteria could be classified into 14 genera and 18 species, with *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Ochrobactrum* and *Staphylococcus* being the most predominant.

Key words: moso bamboo; endophytic bacteria; microbial diversity

植物内生细菌是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织或器官内部, 对植物组织没有引起明显病害症状并与其建立了和谐联合关系的细菌^[1-4]。有益的内生细菌不仅将寄主植物作为栖息场所, 而且对其具有防病、促生、内生固氮等多方面的生物学作用, 从而促进寄主植物对恶劣环境的适应并保证其健康生长^[5-7]。国内外学者已对柑橘、棉花、芦荟、水稻、茅苍术、杨树、烟草、铁皮石斛、花生等多种植物的内生细菌进行了深入的研究, 目前报道已有超过 54 属 129 种的植物内生细菌从各种农作物及经济作物中分离出来, 并且分布在植物所有的组织中^[2]。同时植物内生细菌也是人类筛选和开发防病杀虫、促

生、固氮、环境污染修复和外源基因载体等功能微生物资源的重要宝库^[1,7]。毛竹 *Phyllostachys edulis* 属散生型竹种, 具有生长快、成材早、用途广、经济收益大等优点, 是我国南方重要的森林资源。根据第 6 次全国森林资源清查统计, 全国竹林面积约为 484.26 万 hm^2 , 其中毛竹约占全国竹林面积的 70%^[8]。李潞滨^[9]、齐泽民^[10]等人分别对毛竹和苞箬竹根际微生物和土壤细菌进行了研究, 夏冬亮^[11]也进行了毛竹根部内生细菌分离培养基的探索, 但对毛竹不同组织内生细菌的系统研究尚未见报道。本研究选取福建省毛竹中心产区^[12]中武夷山的毛竹根、鞭、秆、叶组织分别进行取样并分离内生细菌, 以研究毛竹内生细菌的组成及多样

收稿日期: 2014-09-09 初稿; 2014-10-15 修改稿

作者简介: 刘芳 (1980-), 女, 讲师, 研究方向: 食用菌和农业微生物 (E-mail: fjliufang@163.com)

* 通讯作者: 张国防 (1966-), 男, 教授, 研究方向: 森林培育和经济林栽培 (E-mail: fjzgzgf@126.com)

性, 为毛竹内生细菌的系统研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

选取福建省毛竹中心产区武夷山(武夷山市星村镇程墩村)的 1 度毛竹 3 株。采集时间为 2014 年 3 月。各部位材料选取: 根部选取距土表 30 cm 左右的材料; 鞭部选取离毛竹根部 50 cm 以内带有鞭芽的部分; 杆部选取离地面 130~150 cm 左右毛竹竹杆; 叶片随机选取。同部位的样品作为 1 个混合样, 样品从植株分离后立即放入无菌样品袋中, 低温保鲜, 于 48 h 内进行内生细菌的分离。

1.2 培养基及主要试剂

内生细菌分离和培养采用 NA 培养基: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 18 g, 水 1 000 mL, pH7.0~7.2。内生细菌 DNA 提取及 16S rDNA 片段扩增所用的引物、Marker、dNTPs、Buffer、溶菌酶等试剂为生工生物工程(上海)股份有限公司产品, 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 内生细菌分离

采回的样品用无菌水冲洗干净, 采用传统稀释平板法对武夷山毛竹的根、鞭、杆、叶进行内生细菌的分离, 在超净工作台内, 无菌滤纸吸干后分别称取不同部位毛竹组织 1 g, 先用 75% 乙醇浸 5 min, 再用有效氯浓度在 5% 的次氯酸钠溶液浸 3 min。无菌水反复漂洗 3~5 次, 滤纸吸干后将样品表面与 NA 平板接触 3~5 min, 同时取最后一次漂洗用的无菌水涂布于 NA 平板上, 30℃ 恒温培养。若平板上无菌落长出则证明样品表面消毒彻底, 分离到的细菌均来自样品内部, 否则, 该分离结果无效。用无菌剪刀将样品剪碎至无菌研钵中, 加入灭菌过的石英砂及适量无菌水充分研磨至匀浆, 按 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 梯度稀释后取 100 μ L 稀释液涂布于 NA 平板上, 各样品重复 3 次。

1.4 内生细菌菌落调查

分离的样品在 28℃ 恒温培养 2~3 d, 长出单菌落后, 统计菌落总数, 计算各部位平均每克鲜重组织的含菌量, 用 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{FW}$ 表示。并根据菌落颜色、性状、光泽度、流动性、边缘平整度等特征, 挑取具有代表性的单菌落, 经 NA 平板划线培养后, 保存于 NA 斜面备用。分离到的单菌落以字母和数字组合来命名, 即 WYS 代表武夷山样本, 分离部位: A 代表根, B 代表竹鞭, C 代表杆, D

代表叶。

1.5 内生细菌 16S rDNA 鉴定

将内生细菌菌株在 NA 液体培养基中培养 24h, 用细菌基因组提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取 DNA。16S rDNA 基因序列扩增采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。

PCR 扩增产物经 1% (W/V) 的琼脂糖凝胶电泳检测并送至铂尚生物技术(上海)有限公司测序。测定后的 DNA 序列采用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/> 中 Blast 软件进行同源序列检索和同源性分析, 构建系统发育树, 确定菌株的分类地位。

1.6 数据统计与分析

数据统计绘图用 Excel, 数据统计分析采用 SPSS18 的相应分析功能进行。

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离

内生细菌分离结果表明, 在毛竹的根、鞭、杆、叶各个部位均分离出内生细菌, 其中以根部的内生细菌最多, 内生细菌数量为 $4.50 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{FW}$, 其次为竹鞭部和杆部, 内生细菌数量分别为 $1.73 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{FW}$ 和 $2.58 \times 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{FW}$, 叶部内生细菌较少, 仅为 $1.00 \times 10^2 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{FW}$ 。

2.2 内生细菌的种群组成及分布

根据菌落颜色、形状、光泽度、流动性、边缘平整度等特征, 共从武夷山毛竹的根、鞭、杆、叶组织中分离到内生细菌 27 株, 其中根部 9 株, 鞭部 8 株, 杆部 8 株, 叶部 2 株。依据菌落形态共有 7 个表型, 其中菌落形态表现为白色、有光泽、无流动性、圆形或不规则状的菌株最多, 为 15 株, 占总分离株数的 55.55% (表 1)。

2.3 内生细菌的 16S rDNA 序列分析

经克隆测序获得了 27 种内生细菌的 16SrDNA 序列, 通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/> 中 Blast 软件对 27 株内生细菌的 16SrDNA 测序结果进行相似性比对, 鉴定细菌的种类。发现 27 株分离物与已知分类地位菌种的 16SrDNA 序列相似性都大于 98%, 大部分分离物与核酸数据库中的已知菌株之间相似性达到了 100% (表 2)。

表 1 毛竹内生细菌菌落形态类型及其分布

Table 1 Colonial morphology and distribution of isolated bacteria from moso bamboo

菌落编号	菌落形态	数量	比例 /%
WYS-A02-2、WYS-A03-1、WYS-A05、WYS-B04-1、WYS-B05、WYS-C05、WYS-C10、WYS-B09、WYS-A04	白色,有光泽无流动性,菌落圆形	9	33.33
WYS-A01-1、WYS-A02-1、WYS-B04、WYS-C01、WYS-C08、WYS-C14	白色,有光泽无流动性,菌落多不规则	6	22.22
WYS-A06、WYS-B02、WYS-B03、WYS-B08、WYS-B12、WYS-C03	淡黄色不透明,有光泽无流动性,菌落圆形	6	22.22
WYS-A07、WYS-C01-1	淡黄色半透或透明,有光泽无流动性,菌落圆形	2	7.42
WYS-C09、WYS-D01-1	黄色不透明,有光泽无流动性	2	7.42
WYS-D01	白色,表面粗糙	1	3.70
WYS-A02	橙黄色,有光泽无流动性,菌落多不规则	1	3.70

表 2 毛竹内生细菌的种类及分布

Table 2 Species and distribution of moso bamboo endophytic bacteria

内生细菌种类	菌株 数目	序列相 似性/%	菌株数量分布			
			根	鞭	杆	叶
<i>Rhizobium</i> sp.	1	99	0	1	0	0
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	99	1	0	0	0
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1	100	0	0	1	0
<i>Bacillus pichinotyi</i>	2	98	2	0	0	0
<i>Staphylococcus equorum</i>	2	100	0	0	2	0
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	100	0	1	0	0
<i>Micrococcus luteus</i>	1	99	0	0	1	0
<i>Micrococcus</i> sp.	1	100	0	0	0	1
<i>Microbacterium</i> sp.	1	99	1	0	0	0
<i>Ochrobactrum</i> sp.	3	99~100	1	0	2	0
<i>Moraxella</i> sp.	1	99	1	0	0	0
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	99	1	0	0	0
<i>Burkholderia</i> sp.	1	100	1	0	0	0
<i>Enterobacter</i> sp.	2	99	0	1	1	0
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	99	1	0	0	0
<i>Arthrobacter</i> sp.	4	99~100	0	3	1	0
<i>Streptomyces flavofuscus</i>	1	100	0	0	0	1
<i>Janibacter</i> sp.	2	99	0	2	0	0

从表 2 可以看出,从武夷山毛竹根、鞭、杆、叶组织中分离出的 27 株内生细菌,分属于 14 属 18 种。其中毛竹根部、鞭部、杆部和叶部内生细菌种类分别为 8、5、6、2 种。以节细菌属 *Arthrobacter*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、苍白杆菌属 *Ochrobactrum* 和葡萄球菌属 *Staphylococcus* 为主要菌群,分别占总分离菌株数的 14.81%、11.11%、11.11%、11.11%。其中毛竹根部内生

细菌以芽孢杆菌属 *Bacillus* 为主要菌群;鞭部内生细菌以节细菌属 *Arthrobacter* 为主要菌群;杆部内生细菌以葡萄球菌属 *Staphylococcus* 和苍白杆菌属 *Ochrobactrum* 为主要菌群。图 1 显示了毛竹内生细菌的多样性和群落结构特征。

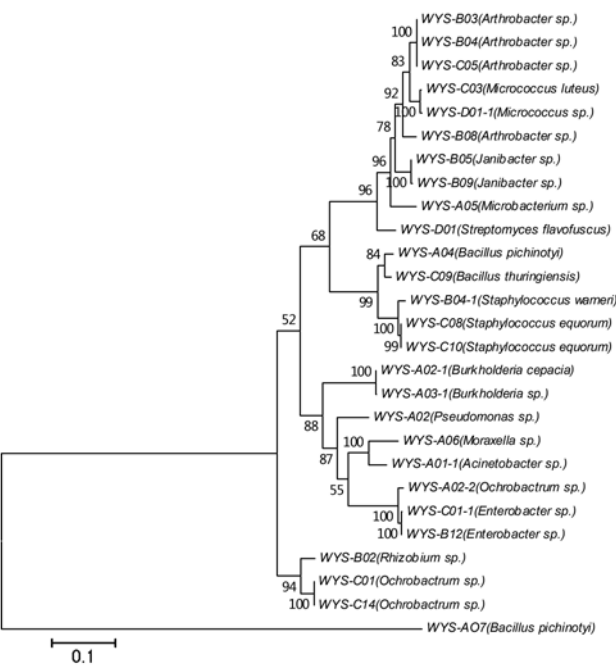


图 1 毛竹内生细菌 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree for moso bamboo endophytic bacteria based on 16S rDNA gene sequences

3 讨论与结论

本课题组研究了武夷山毛竹根、鞭、杆、叶等 4 个部位内生细菌数量分布及其种群的多样性。经细菌菌落表征性状观察和 16S rDNA 序列分析,分离出的 27 株内生细菌分属于 14 属 18 种,分别以节细菌属 *Arthrobacter*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、苍

白杆菌属 *Ochrobactrum* 和葡萄球菌属 *Staphylococcus* 为主。芽孢杆菌属 *Bacillus* 是在大多数植物中均可以分离到的内生细菌^[13]，节细菌属 *Arthrobacter*、苍白杆菌属 *Ochrobactrum* 和葡萄球菌属 *Staphylococcus* 也分别在红三叶草、棉花、黄瓜、水稻、大豆、葡萄、大豆、哈密瓜等植物^[14-20]中分离到。本研究表明毛竹具有多样性极其丰富的内生细菌菌种资源，为毛竹内生细菌的生物活性物质筛选和毛竹资源开发提供了基础理论依据，应进一步发掘、研究并加以利用。

本研究仅对武夷山毛竹根、鞭、秆、叶等不同部位内生细菌进行生物多样性初步分析，针对不同部位毛竹内生细菌的群落结构的差异性还需进一步研究。本研究所分离内生细菌优势属种是否具有促生、防病及内生固氮作用还需深入研究。此外，毛竹叶片样品中仅分离出少量的内生细菌，可能与样品表面消毒方式、培养基的选择等有关，还需进一步研究，同时也有必要利用非培养方法对其组织内未培养微生物进行深入分析。

参考文献：

- [1] 胡桂萍, 郑雪芳, 尤民生, 等. 植物内生菌的研究进展 [J]. 福建农业学报, 2010, 25 (2): 226-234.
- [2] 徐亚军. 植物内生菌资源多样性研究进展 [J]. 广东农业科学, 2011, (4): 149-152.
- [3] ROBERT P R, KIERAN G, ASHLEY F, et al. Bacterial endoPhytes: recent developments and application [J]. Federation of EuroPean Microbiological Societies, 2008, 278: 1-9.
- [4] 黄瑞虎, 刘会强, 迪丽拜尔·托乎提, 等. 植物内生菌及其宿主植物研究概况 [J]. 新疆师范大学学报: 自然科学版, 2008, 27 (1): 76-79.
- [5] 国辉, 毛志泉, 刘训理. 植物与微生物互作研究进展 [J]. 中国农学通报, 2011, 27 (9): 28-33.
- [6] 卢镇岳, 杨新芳, 冯永君. 植物内生细菌的分离、分类、定殖与应用 [J]. 生命科学, 2006, 18 (1): 90-94.
- [7] 何红, 邱思鑫, 胡方平, 等. 植物内生细菌生物学作用研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2004, 24 (3): 40-45.
- [8] 国家林业局. 2005 国家森林资源报告 [R]. 北京: 中国林业出版社, 2005: 12.
- [9] 李璐滨, 刘敏, 杨淑贞, 等. 毛竹根际可培养微生物种群多样性分析 [J]. 微生物学报, 2008, 48 (6): 772-779.
- [10] 齐泽民, 杨万勤. 苞箭竹根际土壤微生物数量与酶活性 [J]. 生态学报, 2006, 25 (11): 1370-1374.
- [11] 夏冬亮, 任玉, 李璐滨, 等. 毛竹内生细菌分离培养基的选择 [J]. 北京农学院学报, 2009, 24 (1): 15-19.
- [12] DB35/1194-2011. 毛竹林丰产培育技术规程 [S].
- [13] STURZ A V, CHRISTIE B R, NORWAK J. et al. Potential role in developing sustainable Systems of crop production [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2000, 19 (1): 1-30.
- [14] STURZ, CHRISTIE. EndoPhytic bacteria of red clover as agents of alleloPathic clover-maize syndromes [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1996, 28, (4/5): 583-588.
- [15] 兰海燕, 王长海, 宋荣. 棉花内生细菌及其研究进展 [J]. 棉花学报, 2000, 12 (2): 105-108.
- [16] GAGNE S, RIEHARD C, ROUSSEAU H, et al. Xylem-residing bacteria in alfalfa roots [J]. Canadian Journal Of Microbiology, 1987, 33: 996-1000.
- [17] TRIPATHI, VERMA, CHOWDHURY, et al. *Ochrobactrum oryzae* sp. nov., an endophytic bacterial species isolated from deep-water rice in India [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56: 1677-1680.
- [18] 刘杰, 汪恩涛, 陈文新. 豆科植物根瘤内生细菌的发现及其研究进展 [J]. 微生物学报, 2011, 51 (8): 1001-1006.
- [19] PHAM QUANG HUNG, ANNAPURNA K. Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycne* sp.) [J]. Omonrice, 2004, 12: 92-101.
- [20] 芦云, 罗明. 哈密瓜内生细菌的分离及拮抗菌的筛选 [J]. 石河子大学学报, 2004, 22: 104-109.

(责任编辑: 黄爱萍)