

玉米苗期内生细菌的种群初探及 有益内生细菌的筛选

辜运富¹ 张云飞² 张小平^{1*}

(1. 四川农业大学资源环境学院 雅安 625014)

(2. 农业部成都沼气研究所 成都 610041)

摘要: 从 3 个供试玉米品种(川单 13、川单 418、川单 416)苗期分离、纯化内生细菌 68 株, 经形态及理化特征鉴定, 分属 5 个不同的属, 微球菌属和芽孢杆菌属为优势属。芽孢杆菌属细菌鉴定出 5 个种。供试品种中内生细菌种群数量各不相同, 种群数量由多到少依次是川单 13、川单 418 和川单 416。通过抑菌谱和拮抗菌发酵液对种子萌芽率的影响, 筛选出两株抑菌谱广, 对玉米种子萌发无抑制作用的内生芽孢细菌 BH 和 B98。盆栽实验显示, 两株细菌均对玉米植株具有促生作用, 对玉米纹枯病具有防治效果。

关键词: 玉米纹枯病, 立枯丝核菌, 内生细菌, 抗病促生

Preliminary Research on the Flora of Endophytic Bacteria and Selection of Useful Endophytic Bacteria in the Seedling of Maize

GU Yun-Fu¹ ZHANG Yun-Fei^{1,2} ZHANG Xiao-Ping^{1*}

(1. College of Environmental and Resource Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)

(2. Institute of Biogas Science Ministry of Agriculture, Chengdu 610041)

Abstract: In the experiment, 68 endophytic bacteria strains of maize were isolated and purified from seedlings of three maize cultivars (Chuandan13, Chuandan418 and Chuandan416). Subsequently, these bacteria were identified and studied. The results indicated that these bacteria belong to five different genera. Among them, *Bacillus*, *Micrococcus* was the most widely distributed and predominant. Bacilli were classified into 5 species level. The endophytic bacteria isolated from three maize cultivars were variable, and the number of different species population of these endophytic bacteria followed as chuandan13>chuandan418>chuandan416. According to the inhibitory spectrum and influence of endophytic bacteria fermentation to the corn seeds, two strains (BH and B98) had wide pathogen range and didn't inhibit the viability of the seeds under intraventricular condition; the pot experiment results indicated both of the two strains could promote maize growth and antagonize the *Rhizoctonia solani*.

Keywords: Corn sheath blight, *Rhizoctonia solani*, Endophytic bacteria, Promoting and inhibiting

* 通讯作者: ✉ aumdwbsb@sicau.edu.cn

收稿日期: 2007-11-06; 接受日期: 2008-03-12

玉米纹枯病是由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起的世界性的玉米土传病害^[1]。对于玉米纹枯病的防治,传统的方法是使用化学农药(如井冈霉素)进行,这样做虽然有效但并不是长远之计,主要是因为长期使用单一的药剂易使病菌产生抗药性,因此寻找新的防治方法就显得格外重要。植物内生细菌是一类能够与寄主植物稳定和谐共处的微生物^[2,3],目前,人们已从棉花、玉米、小麦、油菜、马铃薯、辣椒、葡萄等多种植物分离获得内生拮抗细菌^[4-9],这些内生拮抗细菌对许多植物病害具有较好的防治效果,它们的合理应用可以减少化学药剂造成的环境污染,提高农田生态系统的生物多样性,有利于保持生态平衡,可以看出,研究植物内生细菌种群分布特点及有益内生细菌是研究内生细菌的热点领域。

川单系列是由四川农业大学玉米研究所选育,在西南地区广泛推广的玉米品种,现已在四川及西南推广面积 $3.4 \times 10^6 \text{ hm}^2$ 以上,本研究以川单系列为材料,进行了玉米苗期内生细菌的分离及抗纹枯病微生物的筛选,以期为开发利用新的内生菌资源奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试作物品种: 本实验以玉米品种川单 416、川单 418、川单 13 号为分离材料,玉米种子由四川农业大学玉米研究所提供。

1.1.2 供试土壤: 四川农业大学多营农场玉米试验地土壤,土壤类型为冲积土,质地砂壤。

1.1.3 供试病原菌株: 玉米纹枯病病原菌(*Rhizoctonia solani* AG1-AI)、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)、玉米新月弯孢菌(*Curvularia lunata*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)等均由四川农业大学植物病理实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 玉米苗的培养: 苗期培养在温室条件下完成。将供试种子用无菌水进行表面清洗,于 25 ~28 浸种 5 h,而后催芽至露白,播种于供试土壤中,每个品种播种 6 盆,每盆 10 株,即为供试材料,温室正常管理,待玉米长到 5 叶期的时候进行分离。

1.2.2 分离纯化: 1) 分离纯化用的培养基: 细菌的

分离和纯化用牛肉膏蛋白胨培养基。

2) 内生细菌的分离、纯化: (1) 取样: 分别称取供试品种玉米苗的根、茎、叶(根部取离土表 5 cm 内的材料,茎部选取离土表 10 cm~15 cm 内的材料,叶部则用打孔器随机选取各部材料)各 5 g。(2) 表面灭菌: 经清水冲洗后置于 95%的酒精 3 min~5 min 后转入含 0.1%升汞液中消毒 15 min,消毒结束后立即用无菌水漂洗 4 次,取最后一次清洗液 0.5 mL 转入无菌培养皿,倒入肉汁胨培养基,于 28 ~30 混菌培养 3 d~4 d,以检测消毒是否彻底,重复 3 次。(3) 样品处理: 用灭菌剪刀将表面无菌材料剪成 2 cm~3 cm 的小段后,转入盛有少量无菌水的无菌研钵,将植物组织分别研碎至汁液流出,用无菌纱布将汁液过滤至 100 mL 无菌水的三角瓶中,得到第一个稀释度 10^{-1} ,然后分别稀释到 10^{-6} ,取不同稀释度的菌悬液 0.5 mL 加入无菌培养皿中,倒入肉汁胨培养基于 28 ~30 温箱中混菌培养 3 d~4 d,重复 3 次,记数。(4) 纯化和保存: 挑取形态不同的菌落在固体肉汁胨平板上划线纯化、培养,然后将其转入含 30%甘油的塑料离心管中于 -70 保存备用。

1.2.3 内生细菌的种属鉴定: 参照张纪忠编写的《微生物分类学》^[10]、东秀珠和蔡妙英编著的《常见细菌系统鉴定手册》^[11],芽孢杆菌属鉴定到种;参照了蔡妙英等译《芽孢杆菌属》^[12]的方法,非芽孢细菌只鉴定到属。

1.2.4 抑菌作用测定: (1) 平板对峙法测定: 无菌操作下将玉米纹枯病病原菌接种到 PDA 平板中央,在距离病原菌 2.5 cm 处,接入待测内生细菌,以仅接种病原菌的处理为对照,每个处理重复 3 次,观察菌落的生长变化,以抑菌圈大小和形状判断拮抗程度,将获得的对植物病原真菌具有明显拮抗作用的菌株进行盆栽实验。

(2) 盆栽实验: 在每盆($d=24 \text{ cm}$)土壤上覆盖 15 g 玉米纹枯病菌的带菌麦粒,并使之均匀分散在离表层土壤 6 cm 范围内;种子用拮抗菌(总菌量 $4 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$)菌悬液,浸泡 5 h 后播种,以井冈霉素拌种处理的玉米种子为对照,每处理 10 盆,每盆 10 粒。15 d~20 d 后调查植株发病情况。

发病率(%)=发病株数/植株数 $\times 100\%$

病死率(%)=病死株数/植株数 $\times 100\%$

1.2.5 内生性测定: 参考蔡学清的标记方法^[13],利用抗利福平标记进行回接测定。

2 结果与讨论

2.1 内生细菌的分离结果

经过混菌平板分离法从不同品种分离到内生细菌的数量见表 1。

由表 1 可以看出 3 个供试品种含有的内生细菌

的数量各不相同, 内生细菌在根部分布最多, 其次是茎、叶, 这可能是由于内生细菌的侵入点在根的原因以及各部位对特定内生细菌的亲合力不一引起的。根部分离的内生细菌数量最多的是川单 13 号, 茎和叶里面分离到的内生细菌数量最多的是川单 418。

表 1 不同品种内生细菌数量

Table 1 Endophytic bacterial number of different varieties of maize

| 玉米品种 Maize type | 苗期内生细菌数量(CFU/g) Endophytic bacterial number of seedling(CFU /g) | | | 供试菌株数(株) Strain numbers being tested |
|----------------------|---|-------------------|-------------------|---|
| | 根 Root | 茎 Stem | 叶 Leaves | |
| 川单 416 (Chuandan416) | 2.7×10^3 | 9.0×10^2 | 5.0×10^2 | 10 |
| 川单 418 (Chuandan418) | 1.7×10^4 | 5.3×10^3 | 4.0×10^3 | 21 |
| 川单 13 (Chuandan13) | 1.76×10^4 | 2.5×10^3 | 1.7×10^3 | 37 |

经纯化, 从 3 个品种中共分离保存了 68 株细菌, 其中品种川单 416 中分离到 10 株, 品种川单 418 中分离到 21 株, 品种川单 13 中分离到 37 株。

2.2 内生细菌的鉴定

根据形态特征和生理生化特征, 结合《微生物分类学》、《芽孢杆菌属》和《常见细菌系统鉴定手册》, 对未知菌株进行鉴定, 其中芽孢杆菌鉴定到种, 其它菌株鉴定到属, 供试玉米品种的苗期内生细菌的种属比较复杂, 共鉴定出了 5 个属, 包括芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、微球菌属(*Micrococcus*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*), 芽孢杆菌属又鉴定出 5 个种, 包括枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、蕈状芽孢杆菌(*B. mycoides*)、凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*), 所有分离的品种中均分离到了微球菌属(*Micrococcus*) 和芽孢杆菌属(*Bacillus*), 表明这两个属为玉米内生细菌的优势属, 其中分离到微球菌属的细菌数量为 21 株, 占总分离细菌数量的 30.9%, 虽然在供试品种中均分离到芽孢杆菌, 但是其数量并没有占绝对优势, 占所分离到细菌数量的 11.7%。

研究中, 从品种川单 418 中分离到的细菌种类和数量最少, 而品种川单 13 最多, 在前期的发病率试验中也发现这 3 个品种的发病率为川单 418>川单 418>川单 13, 这是否说明内生细菌的数量与宿主玉米品种的抗病性存在着某种相关关系还有待进一步研究。本研究中分离到的主要细菌种属和优势种属与高增贵等的研究结果有所区别^[14], 可能是由于不同地区、不同品种、不同分离时期所分离到的内生细菌种类不同。

2.3 拮抗内生细菌室内筛选结果

经室内对 68 株细菌 3 次重复测定(见表 4), 筛选出对玉米纹枯病产生拮抗作用的菌株 7 株, 占分离菌株的 10.29%。这些菌株主要集中在芽孢杆菌属(*Bacillus*)和黄单胞菌属(*Xanthomonas*), 其中一半以上是 *Bacillus* spp., 2 株枯草芽孢杆菌分别为菌株 BH 和 B98; 占筛选到有拮抗作用菌株的 27.8%, 巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)1 株, 菌株为 B63。从抑菌效果来看, 其中菌株 BH 抑菌圈直径最大, 达到 26.3 mm, 其次是 B98, 其抑菌圈直径也达到 17.1 mm, 分离得到的 7 株菌株中 4 株(B57、B59、B63 和 BH)来自 B 品种, 占 57.14%, 3 株(B13、B14、B98)来自 C 品种, 占 42.85%, 而 A 品种中未分离到有拮抗作用的内生细菌。结果见图 1。

2.4 拮抗内生细菌拮抗菌株对几种重要病原菌的拮抗作用

为了检验图 1 中几株内生细菌的广谱抗菌性, 以禾谷镰刀菌、新月弯孢菌、玉米小斑病菌等植物病原真菌与上图中的内生细菌进行对峙培养, 结果表明菌株 B14、B63、B98 和 BH 对各种供试病原真菌均具有不同程度的抑制作用(见图 2, 图 3, 图 4)。

2.5 拮抗菌发酵液对种子萌芽率的影响结果

内生拮抗菌发酵液对种子萌芽的影响结果见表 2。从表 2 可以看出, 在测定的 7 个菌株当中, 菌株的发酵液对种子萌发有不同程度的抑制作用, 菌株 B57、B59 和 B63 处理后种子萌芽率很低, 对萌芽率的抑制达到 85%以上; BH 和 B98 处理后对玉米种子萌发没有影响, 并且有促生作用, 玉米长势明显强于对照; 菌株 B14 处理种子后对种子萌芽率抑制为 6%; B13 处理后对种子萌发抑制率为 4.5%左右。

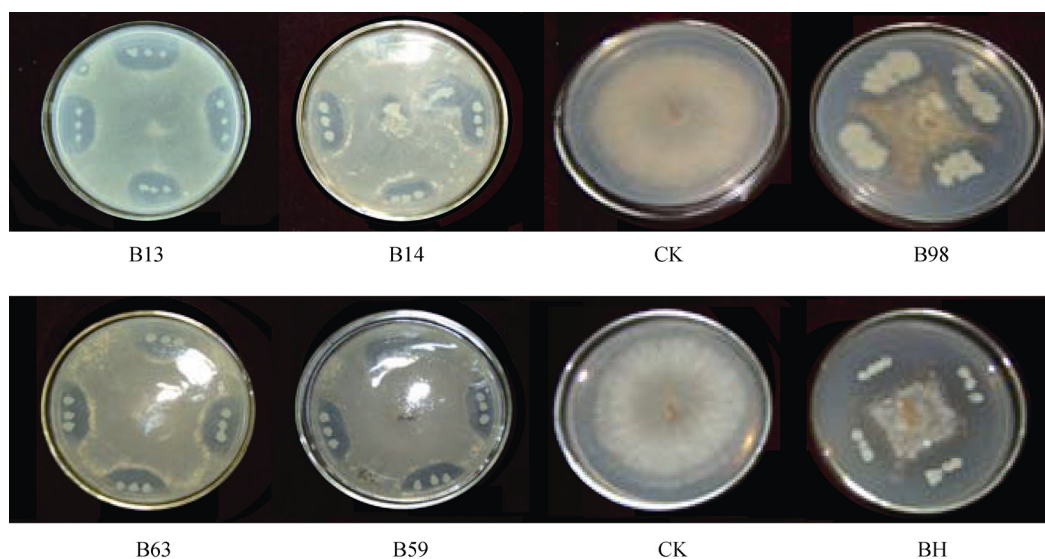


图 1 内生细菌对玉米纹枯病菌的拮抗作用

Fig. 1 Antagonism of endophytic bacteria against *Rhizoctonia solani*

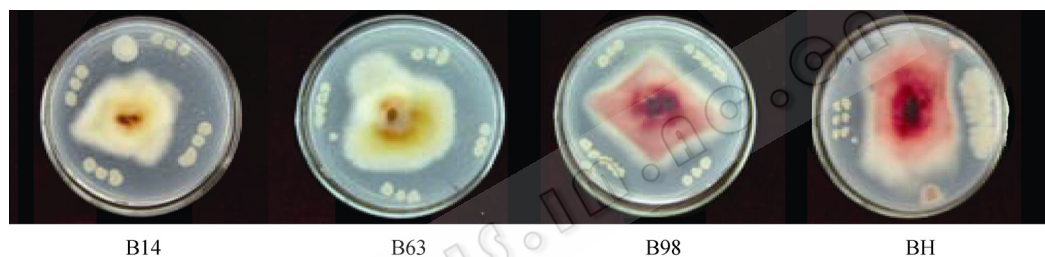


图 2 玉米内生细菌对禾谷镰刀菌的拮抗作用

Fig. 2 Antagonism of endophytic bacteria against *Fusarium graminearum*



图 3 玉米内生细菌对新月弯孢菌的拮抗作用

Fig. 3 Antagonism of endophytic bacteria against *Curvularia lunata*

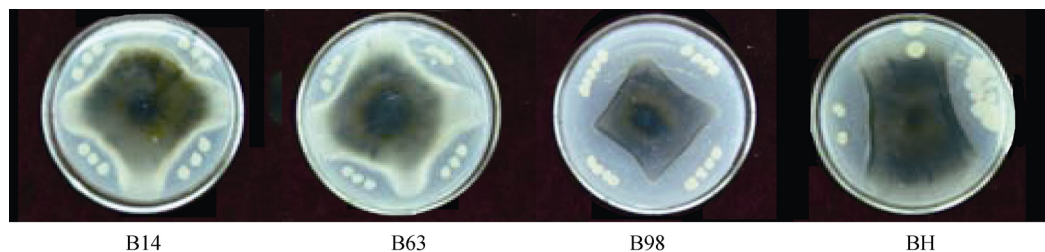


图 4 玉米内生细菌对玉米小斑病菌的拮抗作用

Fig. 4 Antagonism of endophytic bacteria against *Bipolaris maydis*

表 2 玉米纹枯病拮抗内生细菌的筛选
Table 2 Screening antagonistic strains of endophytic bacteria against *Rhizoctonia solani*

| 菌株 Strain | 来源 Sources | 菌株编号 Strain code | 拮抗作用 Antagonism | 抑菌距离(mm) Inhibition zones(mm) | 发酵液对种子萌发抑制率(%) Maize germination inhibition rate of the fermentation(%) |
|--------------------------------|---------------|---------------------|--------------------|----------------------------------|--|
| 枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> | 川单 13 | B98 | ++ | 17.1 | 无 |
| | 川单 418 | BH | +++ | 26.3 | 无 |
| 巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i> | 川单 418 | B63 | + | 12.4 | 91.5 |
| 短小芽孢杆菌 <i>B. pumilus</i> | 川单 418 | B57 | + | 8.3 | 87.4 |
| 黄单胞菌属 <i>Xanthomonas</i> | 川单 418 | B59 | + | 7.4 | 85.8 |
| 假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> | 川单 13 | B13 | + | 13.4 | 4.5 |
| | 川单 13 | B14 | + | 14.0 | 6 |

注：+：显示内生细菌与玉米纹枯病之间的拮抗效果，“+”越多，拮抗效果越强
Note: +: The antagonistic of endophytic bacteria against *Rhizoctonia solani*, more “+” means more antagonistic

综合可得，菌株 B98 和 BH 不仅对纹枯病菌具有较强的抑制效果，还对其它 3 种植物病原真菌具有明显的抑制作用，显示二者具有一定的广谱抗菌性，同时对玉米种子的萌发无抑制作用，显示出了良好的开发前景。

2.6 菌株的内生性检测

两株内生细菌的内生性检测结果见表 3。

对综合性状较好的 2 株菌进行抗药(利福平)性标记后，各获得 1 株稳定的突变体，突变株的拮抗性试验结果表明，2 株内生细菌具有较好的稳定性，通过抗药性标记，它们的抗性与原菌株相同。利用

内生细菌突变株接种玉米进行再分离实验，结果见表 5。由表中可见突变株接种玉米后第 3 天在接种点以上根部均分离到接种的突变菌株，说明细菌到第 3 天已经侵入植物根部；到第 5 天拮抗突变株均可以在根部、茎部分离到，说明细菌在侵入根部以后已经向上转移，到第 7 天为止在叶部也分离到了拮抗菌株，说明拮抗菌株已经转运至叶部。结果说明供试菌株不仅可以在体内繁殖，且具有可转移的属性。

2.7 菌株的田间防效检测

拮抗细菌苗期盆栽试验结果见表 4。

表 3 拮抗内生细菌突变株回接分离结果
Table 3 Isolation of mutant strains from inoculated seedlings

| 菌株编号 Strain code | 接种后天数(d) Days after inoculated | | | | | | | | |
|---------------------|--------------------------------|--------|----------|--------|--------|----------|--------|--------|----------|
| | 3 | | | 5 | | | 7 | | |
| | 根 Root | 茎 Stem | 叶 Leaves | 根 Root | 茎 Stem | 叶 Leaves | 根 Root | 茎 Stem | 叶 Leaves |
| B98 | + | - | - | + | + | - | + | + | + |
| BH | + | - | - | + | + | - | + | + | + |
| CK | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

注：+：分离到；-：未分离到
Note: +: Isolated; -: Not isolated

表 4 拮抗内生细菌苗期盆栽防治玉米纹枯病实验
Table 4 Control of corn sheath blight with endophytic antagonist bacteria in seeding stage

| 菌株编号 Strain code | 实际植株数 Real plant numbers | 发病株数 Plant numbers being infected | 发病率(%) Infected rate | 病死株数 Dead numbers | 病死率(%) Dead rate | 病斑直径(mm) Lesions diameters |
|---------------------|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|-------------------------------|
| CK 空白 | 91 | 81 | 89.01 | 6 | 6.6 | 68.55b |
| CK 井冈霉素 | 95 | 40 | 42.11 | 无 | 0 | 45.10a |
| B98 | 93 | 66 | 69.47 | 无 | 0 | 69.45b |
| BH | 93 | 53 | 56.99 | 无 | 0 | 54.15a |

注：数字后具有相同字母表示差异不显著(Duncan 新复极差法测验 $P=0.01$)
Note: The same letter after the numbers mean the treatments are not significantly different ($P=0.01$, LSR test)

苗期防病(表 4)试验表明, 经拮抗细菌处理的玉米种子的发病率均明显低于空白对照, 经菌株 BH 处理过的玉米植株发病率比空白对照低了 32.02 个百分点, 病斑高度平均低了 14.4 mm; 而与井岗霉素的处理相比, 细菌 BH 处理玉米后发病率比井岗霉素处理玉米后的发病率高了 14.88 个百分点, 病斑的平均高度也高了 9.05 mm, 可见经拮抗细菌 BH 处理过的玉米种子不仅发病率得到了一定的控制, 同时在抑制病斑的高度上也起到了一定的抑制作用; 经 B98 细菌处理过的玉米植株的发病率比空白对照低了 19.54 个百分点, 病斑的平均高度相差不大, B98 处理玉米后发病率相比井岗霉素处理玉米后发病率低了 27.36 个百分点。而经过细菌 B98 处理过玉米种子后, 其作用主要是体现在对发病率的控制上, 病斑高度和空白对照差异不显著, 由此可见两株细菌对玉米的纹枯病都有一定的抑制作用, 只是抑制作用具体的表现有所不同, 细菌 BH 对玉米纹枯病的抑制作用主要表现在两个方面: 一是发病率, 二是抑制病斑高度, 而细菌 B98 的表现则主要是体现在对发病率的控制上面, 对病斑的高度几乎没有影响。

3 结论

植物体内存在大量能够与植物和谐共处的内生细菌, 他们对植物的健康生长具有举足轻重的作用, 能够与植物自身构建起一套完整的不良环境抵御系统。目前对于内生细菌的研究, 主要注重于内生细菌在植物体内的分布特点及它们对植物自身的抗病促生作用。

本研究通过对这 3 个玉米品种(一个是各种性状比较好的品种川单 13, 另外两个是新品种川单 418、川单 416)苗期内生细菌的研究发现几个品种内生细菌种类比较丰富, 分属 5 个属包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、微球菌属(*Micrococcus*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*), 芽孢杆菌属又鉴定出 5 个种, 包括枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、蕈状芽孢杆菌(*B. mycoides*)和凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)。分布最广泛的是芽孢杆菌属和微球菌属, 在供试的几个品种中均分离到。

试验中, 分离到的 7 株拮抗细菌对宿主安全性的测定结果表明大部分菌株对玉米种子的萌发具有抑制作用, 抑制率最高的可以达到 91%以上。进一步的抑菌试验和盆栽试验表明, 菌株 B98 和 BH 不仅对玉米苗具有促进生长作用, 同时还对各种供试病原真菌均具有抑制作用, 表现了良好的生防潜力。

经拮抗内生细菌蘸根处理, 经过 7 d 后能在玉米叶片内能够检测出接种的生防菌, 说明内生细菌具有系统的转导性, 这与前人研究的结果一致^[15]。

参 考 文 献

- [1] 李荣花, 陈捷, 高增贵, 等. 玉米纹枯病抗性与防御酶关系的研究. 天津师范大学学报(自然科学版), 2005, 25(4): 32-36.
- [2] 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.
- [3] Sturz AV, Matheson BG. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. *Plant and Soil*, 1996, 184(2): 265-272.
- [4] 兰海燕, 王长波, 宋未. 棉花内生细菌及其研究进展. 棉花学报, 2000, 12(2): 105-108.
- [5] 袁平, 孙福右, 田宏先. 防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选. 微生物学报, 2002, 2(3): 70-274.
- [6] 何红, 蔡学清, 洪永聪. 辣椒内生细菌的分离及拮抗菌的筛选. 中国生物防治, 2002, 18(4): 171-175.
- [7] 杨海莲, 孙晓璐, 宋未. 植物内生细菌的研究. 微生物学通报, 1998, 25(4): 224-227.
- [8] Fisher PJ, Pertin O, Scott HML, et al. Research on the plant endophytes. *New Phytologist*, 1992, 12(2): 299-305.
- [9] Bell CR, Dickie GA, Harvey WLG, et al. Endophytic bacteria in *Grapevine*. *Can J Microbiol*, 1995, 41(1): 46-53.
- [10] 张纪忠. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990, pp. 349-398.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp. 62-63, 349-39.
- [12] Ruth EG, William CH, Pang CH. 芽孢杆菌属. 蔡妙英等译. 北京: 农业出版社, 1983, pp. 4-16, 25-32, 41-47, 151-153, 164-169, 221-222.
- [13] 蔡学清, 何红, 胡方平. 双抗标记法测定枯草芽孢杆菌 BS-2 和 BS-1 在辣椒体内的定殖动态. 福建农林大学学报, 2003, 32(1): 41-45.
- [14] 高增贵. 玉米内生细菌种群多样性与纹枯病生防机理的研究. 沈阳农业大学博士学位论文, 2003.
- [15] 郭良栋. 内生真菌研究进展. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-153.