

对枯萎病不同抗性的香蕉品种的内生细菌 多样性及群落结构

许乐^{1,2} 阮小蕾² 李冬丽^{1,2} 李华平^{1,2*}

(1. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室 广东 广州 510642)

(2. 华南农业大学 资源环境学院 广东 广州 510642)

摘 要:【目的】了解抗感品种香蕉植株中内生细菌与香蕉枯萎病间的关系,从而为香蕉枯萎病的发生与防控提供一定的理论基础。【方法】通过基于 16S rRNA 的末端标记限制性片段长度多态性技术(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)分析健康和感枯萎病香蕉植株不同品种各组织,以及香蕉植株不同发病时间根组织中内生细菌的多样性和群落结构。【结果】抗病品种“农科一号”植株根、假茎、叶片各组织中内生细菌的种类基本都比感病品种“巴西蕉”的相应组织中的要丰富。感枯萎病香蕉植株根、假茎、叶片各组织中内生细菌种类基本都比健康植株各组织的丰富。在植株发病前、发病初期、再到发病后一个月的不同时期,对于抗病品种而言,其内生细菌的多样性都基本保持稳定,而感病品种则变化幅度较大。同时发现不同品种不同组织的内生细菌的优势种群有所不同,且不同品种健康和发病植株都存在一些特有优势种群。【结论】香蕉抗病品种比感病品种植株中内生细菌的多样性更丰富且更稳定;感枯萎病植株中的内生细菌种类比健康的丰富;而且不同抗性品种中健康和感病植株内的优势种群存在明显差异。

关键词: 香蕉, 枯萎病, 内生细菌, T-RFLP

Endophytic bacterial diversity and communities of banana cultivars with different resistance to fusarium wilt disease

XU Le^{1,2} RUAN Xiao-Lei² LI Dong-Li^{1,2} LI Hua-Ping^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

(2. College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: [Objective] In order to understand the relationship between endophytic bacterial diversity of banana and fusarium wilt disease, thus providing a scientific basis for the biological control against fusarium wilt. [Methods] Endophytic bacterial diversity and communities of different plant tissues of two banana cultivars with different resistance to fusarium wilt were examined using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). [Results] The results indicated that resistant cultivar “Nongke No.1” showed more abundant endophytic bacterial diversity than that of susceptible cultivar “Brazil” in the root, pseudomeristem and leaves of plants. Diseased plants conserved more abundant endophytic bacterial diversity than that of healthy plants in different tissues. Endophytic bacterial diversity of “Nongke No.1” kept basically stabilized, but that of “Brazil” showed a great range of variation among healthy and different diseased stages. Dominant bacterial populations were various in the different tissues, and there were some specific dominant populations in the healthy and diseased banana plants of different cultivars. [Conclusion] The results indicated that resistant cultivar showed more abundant and steady endophytic bacterial diversity than that of susceptible cultivar. Diseased plants showed more abundant endophytic bacterial diversity than healthy plants. In addition, there is a marked diversity of dominant populations in different plants between resistant or susceptible cultivars to fusarium wilt disease.

Keywords: Banana, Fusarium wilt, Endophytic bacteria, T-RFLP

香蕉是许多热带和亚热带国家的主食和重要的经济作物以及主要的出口农产品,也是我国南方的主要经济作物之一。香蕉枯萎病最早发生在巴拿马,是由古巴尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, FOC)引起的一种严重的土传病害,近年来枯萎病迅速蔓延,成为世界上最严重的香蕉真菌病害。在中国侵染香牙蕉(*Musa* AAA Cavendish)各品种的香蕉枯萎病于1967年在台湾省首次发现(致病菌株经鉴定为4

号生理小种),随后该病在广东、海南、福建、广西和云南等香蕉产区都有发生,且越来越严重。目前在华南各香蕉主产区,发病的香蕉园病株率一般为10%–40%,严重的达90%以上,以致蕉园荒弃。香蕉枯萎病已被广东省和广西壮族自治区列为补充植物检疫对象,禁止从疫区进口香蕉种苗,目前还尚未找到有效的解决香蕉枯萎病的措施^[1–2]。

近年,由于使用化学杀菌剂污染环境,诱导

病菌抗性增强,破坏生态平衡,它的残毒问题也令人担忧,而植物内生菌作为生物肥料和生物农药的重要资源库得到了越来越多的重视。植物内生菌泛指那些在其生活史中的某一阶段生活在植物组织内,对植物组织不引起明显病害症状的微生物,包括那些在其生活史中的某一阶段营表面生活的腐生微生物和对宿主暂时没有伤害的潜伏性病原微生物和菌根真菌^[3]。植物内生菌的研究开始于 1997 年 Bacon 等对高羊茅内生真菌的研究,随后人们对众多作物,如甜菜、烟草、甘草、辣椒、柑橘、棉花、水稻、哈密瓜等^[4-8]内生细菌开展了研究。研究表明许多内生菌与宿主形成互利的共生关系,即宿主为内生菌提供充足的营养促进其生长。同时内生菌在宿主应对外界环境的应激耐受性(包括抗旱、抗病虫害及对病原体拮抗等)、宿主植物的生长、宿主植物中的有效活性成分的产生等方面也产生重要影响^[9]。在香蕉上,曹理想等^[10]对香蕉内生真菌和放线菌、王宇光等^[11]对拮抗枯萎病香蕉植株内生细菌、以及付业勤等^[12]对香蕉不同生长时期和不同组织内生细菌进行了分离和鉴定,筛选到了一批用于生物防治的内生细菌。植物内生菌的防病机理主要表现在通过产生抗生素类、水解酶类、植物生长调节剂和生物碱类物质,与病原菌竞争营养物质,增强宿主植物的抵抗力以及诱导植物产生系统抗性途径抑制病原菌生长^[13]。随着分子生态学理论和技术的发展,人们逐渐认识到植物病害的发生和严重程度与植物内生菌群落的结构密切相关^[14]。少数内生细菌的存在和群落结构可以通过传统的可培养方法而研究获得,但是大多数植物内生菌是不可培养的,这就需要采用非人工培养的方法,例如结合 16S rRNA 基因序列分析的 DGGE、T-RFLP、ARDRA 等技术用于微生物群落和结构分析。就香蕉而言,Lian 等^[1]已经通过非人工培养的 DGGE 法从香蕉组织 DNA 中直接

扩增内生细菌的 16S rDNA,比较了对香蕉枯萎病感病的巴西蕉中的枯萎病发病与健康植株内生细菌多样性指数,同时 Jie 等^[15]对可培养的香蕉内生菌进行了分离,并证明了接种健康香蕉植株中内生菌的香蕉组培苗不仅可以减轻枯萎病的发病率,还可以促进植株的生长。

香蕉不同品种对香蕉枯萎病具有不同的抗性。这种抗性是否与抗感品种的内生细菌有关,以及抗感品种间是否存在内生菌多样性和种群结构的差异,目前尚未见报道。为了对不同香蕉品种健康和发病植株中内生细菌的群落结构多样性进行更全面的分析,并为研究内生菌的生态作用以及与植株以及病原的相互作用提供一定基础,本研究采用非人工培养的 T-RFLP 方法,对抗感香蕉品种间健康和枯萎病发病植株、不同发病时间植株内生细菌的群落结构多样性等进行了分析,拟为香蕉内生细菌与植物抗病性间的研究提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试植物材料及处理方法

感病香蕉品种“巴西蕉”(Musa AAA Cavendish cv. Brazil)和抗病香蕉品种“农科一号”(Musa AAA Cavendish cv. Nongke No.1)购于广东省农科院香蕉种苗中心,植株种植于直径 35 cm 的、含菜园土的塑料盆中。待植株有 10 片叶时,用含有 $10^6/\text{mL}$ 的古巴尖镰孢菌生理小种 4 号(本实验室保存)的孢子悬浮液 200 mL,采取伤根浇灌法进行接种,每隔 14 d 再接种一次,直至发病(共接种 4 次)。采样时取 3 株重复,采样位置一致。第一次接种前(2011 年 3 月 19 日)进行第一次采样,植株发病初期(第一片叶缘发黄)时(2011 年 5 月 12 日)进行第二次采样,发病一个月后(大部分叶片发黄)进行第三次采样(2011 年 6 月 11 日)。

以第二次采样(发病初期)作为健康和发病材

料用于内生细菌种群多样性分析, 3 次采样的材料用于不同发病时期内生细菌优势种群的分析。

1.2 香蕉内生细菌的 T-RFLP 分析

1.2.1 植物组织表面消毒和总 DNA 的提取: 香蕉叶片和假茎采用两步消毒法, 根采用三步消毒法^[16]。DNA 的提取参考 Lin 等方法进行^[17]。

1.2.2 内生细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增: 以香蕉不同组织的总 DNA 为模板, 采用细菌的通用引物(由上海基康生物技术有限公司合成并标记) 8-27F-FAM (5'-FAM-AGAGTTTGTATCMTGGCTTCAG-3')和 1378-1401R (5'-CGGTGTGTACAA GGCCCGGGAACG-3')^[18]应用于 PCR 扩增。PCR 反应体系和程序见 KOD 酶(TOYOBO)使用说明书。PCR 产物纯化用多功能 DNA 纯化回收试剂盒(BioTeke)纯化, 方法按照试剂盒说明书进行。

1.2.3 PCR 产物的限制性酶切: 纯化后的 PCR 产物分别用 *Msp* I、*Hha* I 和 *Hae* III (TaKaRa)进行酶切, 反应体系 20 μL, 37 °C 消化 4–6 h, 具体操作按照产品说明书进行。酶切产物委托上海基康生物技术有限公司测序分析。

1.2.4 数据处理: TRFs 的长度在 50–500 bp 范围内且每个峰的荧光高度在 ≥50 的数据用来进行分析。其 T-RFLP 结果用 Peak scanner software-v 1.0 软件输出, 然后通过网站(<http://trflp.limnology.wisc.edu/index.jsp>)检索每个 TRF 片段可能代表的微生物类群。采用下列公式计算样品中多样性指数 *H* (Shannon-Wiener index, *H*)^[19–20]:

$$H=-\sum(n_i/N)\ln(n_i/N)=-\sum P_i\ln P_i$$

式中 n_i 表示第 i 个段的图谱面积, N 表示 i 所在的 T-RFLP 图谱的总面积; H 为多样性指数, P_i 表示第 i 个片段的相对面积, 即相对丰度。

2 结果

2.1 限制性内切酶的选择

本研究采用了 *Hha* I、*Hae* III 和 *Msp* I 3 种内切酶分别对香蕉不同品种和不同部位的材料进行酶切分析, 结果(表 1)表明, 对不同香蕉品种和组织而言, *Msp* I 酶切产生的 TRFs 数最多, *Hha* I 和 *Hae* III 酶切产生的 TRFs 数在不同品种和组织中存在变化, 但总体趋势表现为 *Hae* III 比 *Hha* I 产生的 TRFs 数要多。因此对于香蕉而言, 如果采用单酶, 则最好选择 *Msp* I, 如选用双酶, 则最好选用 *Msp* I 和 *Hae* III。据此, 选用 *Msp* I 和 *Hae* III 对香蕉不同品种和不同部位的材料进行双酶切分析。

2.2 香蕉不同品种各组织内生细菌多样性指数分析

2.2.1 不同品种健康和发病各组织内生细菌多样性指数分析: 对“农科一号”和“巴西蕉”健康和发病植株根、假茎和叶片组织间内生细菌多样性指数(*H*)的分析结果(图 1)显示: 对于不同品种而言, 在健康植株中“农科一号”的根、假茎和叶片的 *H* 值均高于“巴西蕉”中的相应组织; 而在发病植株中, 除“巴西蕉”叶片的 *H* 值高于“农科一

表 1 不同香蕉品种和不同组织用 3 种内切酶消化产生的 TRFs 数						
Table 1 Numbers of TRFs digested by three kinds of endonucleases in different tissues of banana cultivars						
内切酶 Endonucleases	巴西蕉 Brazil			农科蕉 Nongke No.1		
	根	假茎	叶	根	假茎	叶
	Root	Pseudomeristem	Leaves	Root	Pseudomeristem	Leaves
<i>Hha</i> I	19	15	8	11	12	12
<i>Hae</i> III	14	17	10	14	13	11
<i>Msp</i> I	19	22	19	16	14	22

号”的叶片外,其余各组织中 H 值均表现为“农科一号”高于“巴西蕉”。综合健康和发病组织的分析结果可以看出,抗性品种“农科一号”植株各组织中内生细菌的种类比感病品种“巴西蕉”的相应组织更为丰富。

对于同一品种健康和发病植株根、假茎和叶片各组织中内生细菌的多样性分析发现(图 1),“农科一号”植株健康根的 H 值高于发病根,而假茎和叶片表现为发病植株 H 值高于健康植株。“巴西蕉”发病植株根、假茎和叶片的 H 值均高于健康植株各组织。这表明抗病品种和感病品种基本上都表现为发病植株中内生细菌的多样性比健康植株的丰富。

对于同一香蕉品种根、假茎和叶片各组织间的内生细菌多样性分析表明(图 1),抗病品种“农科一号”在健康和发病植株中根、假茎和叶片中 H 值均表现为假茎>根>叶片。而感病品种“巴西蕉”在健康和发病植株各部位中的 H 值则表现不同。在健康植株中,其根、假茎和叶片的内生细菌的 H 值表现为假茎>根>叶片,而在发病植株中根、假茎和叶片各组织中 H 值却为叶片>根>假茎。这表明对于抗病品种而言,不管植株是否受到病原菌侵染,其各部位的内生细菌多样性基本保持一致,而感病品种则在受到病原菌侵染

后,由原来表现植株假茎中内生细菌的种类最为丰富而叶子中的最不丰富,变为叶子中内生细菌的种类最为丰富而假茎中的最不丰富。

2.2.2 不同品种在不同发病时期内生细菌多样性指数分析: 对“农科一号”和“巴西蕉”植株根部在病菌接种前、刚发病(叶脉轻微发黄)和发病一个月后 3 个时间段 3 次采样分析。结果(图 2)显示:在 3 次采样的不同时间内(近 3 个月),其内生细菌的多样性指数 H 值均是抗病品种“农科一号”高于“巴西蕉”。就不同时间而言,“农科一号”在 3 次采样中 H 值变化较小,表现为逐渐降低。而“巴西蕉”在刚发病时 H 值有所增高,随后在发病严重时 H 值显著降低。这表明其根部内生细菌多样性,对于抗病品种而言,在发病前后和病害发展后期都基本保持稳定,而感病品种则变化幅度较大。

2.3 香蕉各组织优势种群分析

2.3.1 健康和发病不同香蕉品种各组织优势种群: 为了得到更加准确的优势种群信息,本研究将 *Hae* III 和 *Msp* I 酶切获得的 TRFs 与数据库中末端片段相比较,每个样品中取前 3 个最大的峰面积对应的 TRFs 比对出的相同菌属视为该酶切得到的优势种群,然后对两个酶切结果得到的优势种群进行比较,相同的菌属视为该样品的优势种群。

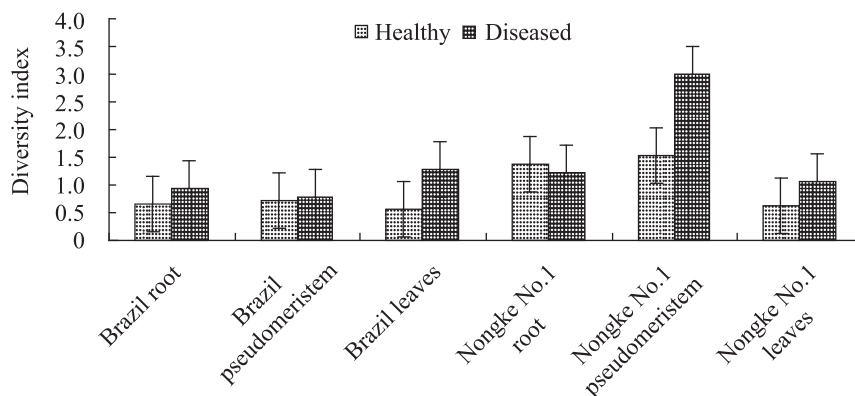


图 1 健康和发病不同香蕉品种各组织内生细菌多样性指数

Fig. 1 Endophytic bacterial diversity index of different tissues on healthy and diseased banana cultivars

对“农科一号”和“巴西蕉”分别在发病及健康情况下，植株的根、假茎和叶片中内生细菌的优势种群分析的结果(表 2)发现共有 17 种优势种群。对于抗感 2 个品种而言，不管是健康还是发

病的，均存在 *Clostridium* 和 *Strepetomyces* 这 2 种共有的优势种群。对感病品种“巴西蕉”而言，在健康和发病植株的根、假茎和叶片中都存在 4 种相同的优势种群: *Clostridium*、*Flavobacterium*、

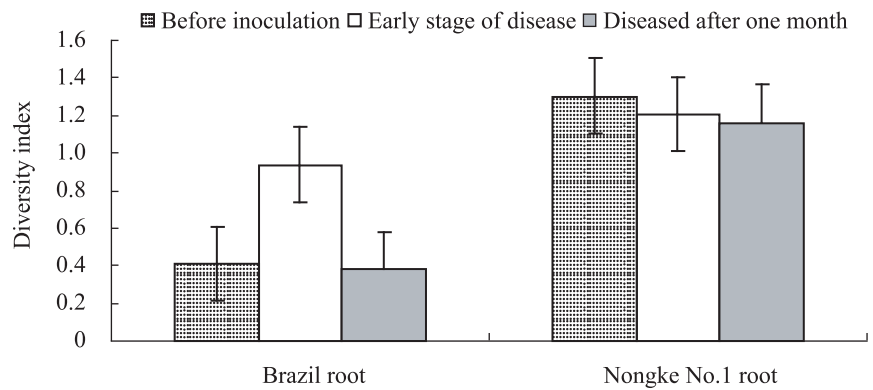


图 2 不同香蕉品种不同发病时期内生细菌多样性指数

Fig. 2 Endophytic bacterial diversity index of the roots of banana cultivars in different diseased stages

表 2 健康和发病不同香蕉品种各组织优势种群												
Table 2 Dominant populations of different tissues on healthy and diseased banana cultivars												
优势种群 Dominant populations	巴西蕉 Brazil						农科一号 Nongke No.1					
	根 Root		假茎 Pseudomeristem		叶片 Leaves		根 Root		假茎 Pseudomeristem		叶片 Leaves	
	D	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D	H
<i>Bartonella</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brevibacillus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptomonas</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cytophaga</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>Escherichia</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Flavobacterium</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>Mycoplasma</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Palmaria</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Pisum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phormidium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Paenibacillus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Strepetomyces</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Synechocystis</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sargasso</i>	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Sphingomonas</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Spiroplasma</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Note: +: This genus exist in the tissue; -: This genus do not exist in the tissue; D: Diseased; H: Healthy.

Palmaria 和 *Streptomyces*, 但在健康和发病植株 3 种组织中同样存在一些不同的优势种群, 如 *Bartonella*、*Pisum*、*Sphingomonas* 和 *Spiroplasma* 只存在于发病的组织中, 而 *Cryptomonas*、*Mycoplasma* 和 *Brevibacillus* 只存在于健康的组织中。对于抗病品种“农科一号”而言, 健康和发病植株根、假茎和叶片中主要存在 2 种相同的优势种群: *Clostridium* 和 *Streptomyces*, 而 *Escherichia* 和 *Paenibacillus* 为发病组织特有的优势种群,

Sargasso 为健康组织特有的优势种群。这表明在抗感品种的不同组织中, 除少数种群相同外, 大部分种群都不相同, 而且感病品种比抗病品种在不同组织中存在更大的优势种群的差异。

2.3.2 不同品种不同发病时期根组织的优势种群: 对“农科一号”和“巴西蕉”根部组织在接种前、发病初期(叶片轻微发黄)和发病一个月后进行 3 次根部组织的采样分析, 共发现根部组织存在 25 个优势种群(表 3)。其中 3 个优势种群

表 3 不同香蕉品种在不同发病时期根中的优势种群						
Table 3 Dominant populations of the roots of banana cultivars in different diseased stages						
优势种群 Dominant populations	巴西蕉 Brazil			农科一号 Nongke No.1		
	接种前 Before inoc.	发病初期 Early stage of disease	发病一个月后 Diseased after one month	接种前 Before inoc.	发病初期 Early stage of disease	发病一个月后 Diseased after one month
<i>Aranicola</i>	—	—	—	+	—	—
<i>Bartonella</i>	—	+	—	—	—	—
<i>Brevibacillus</i>	—	—	—	—	—	+
<i>Clostridium</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Cytophaga</i>	+	+	—	+	—	—
<i>Curacaobacter</i>	—	—	—	+	—	—
<i>Erwinia</i>	+	—	—	+	—	—
<i>Escherichia</i>	+	—	+	+	+	+
<i>Flavobacterium</i>	+	+	—	+	—	—
<i>Flectobacillus</i>	—	—	—	+	—	—
<i>Flexibacter</i>	—	—	—	+	—	—
<i>Klebsiella</i>	—	—	—	+	—	—
<i>Microscilla</i>	+	—	—	+	—	—
<i>Oceanospirillum</i>	+	—	—	+	—	—
<i>Palmaria</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudoalteromonas</i>	+	—	—	+	—	—
<i>Pseudomonas</i>	+	—	—	+	—	—
<i>Phytoplasma</i>	—	—	—	+	—	—
<i>Psychroserpens</i>	—	—	—	+	—	—
<i>Pyrenomonas</i>	—	—	—	+	—	—
<i>Salmonella</i>	+	—	—	+	—	—
<i>Sargasso</i>	—	—	+	—	—	—
<i>Synechocystis</i>	—	—	+	+	—	+
<i>Vibrio</i>	+	—	—	+	—	—

Note: +: This genus exist in the tissue; -: This genus do not exist in the tissue.

Clostridium、*Streptomyces* 和 *Palmaria* 在发病不同时期始终存在, 其它优势种群则随不同品种和不同发病时期而变化。对于感病品种“巴西蕉”而言, 其优势种群数目在接种前最多(13 个属), 在发病初期和发病后期分别降为 6 个属和 7 个属。对于具体优势种群而言, 在不同发病时期也存在明显变化。如 *Bartonella* 在接种前不是优势种群, 在刚发病初期时新增为优势种群, 而在发病后期一个月后不是优势种群; *Escherichia* 在接种前为优势种群, 在刚发病初期时不是优势种群, 而在发病一个月后期又重新成为了优势种群, 同时在发病后期一个月后根组织中又发现新增加了 *Sargasso* 和 *Synechocystis* 为优势种群。

将“巴西蕉”与抗病品种“农科一号”比较分析发现, 在接种前“农科一号”的优势种群数目要比“巴西蕉”多 9 个属; 但在发病初期和发病一个月后的优势种群, “农科一号”比“巴西蕉”分别要少 2 个和 1 个属。这表明在植株发病前, 抗病品种比感病品种存在更多的优势种群, 但在植株发病后抗病品种的优势种群数目比感病品种下降显著。

3 讨论

植物内生细菌与植物病原菌的关系十分密切, 他们有着竞争对抗的关系, 许多内生菌已被报道有促进植株生长以及拮抗病原菌的作用^[3,11,21], 因此对内生菌结构和群落组成的了解是研究内生菌与寄主植株和病原菌关系的基础。香蕉枯萎病是香蕉最重要的病害, 对不同抗感品种、以及不同发病时期植株各部位内生菌多样性和群落结构的了解, 对于该病的发生和防控具有重要的意义。

本研究采用以分子系统学原理为基础的 T-RFLP 技术分析了抗病品种“农科一号”和感病品种“巴西蕉”在健康和发病时各组织中内生细菌的变化。此技术综合运用了 PCR 技术、DNA 限制性酶切技术、荧光标记技术和 DNA 序列自动

分析技术分析比较微生物群落结构。在该技术使用中, 由于不同研究分析的目的不同, 确定的目标 DNA 片段不同, 以及分析的内生菌寄主不同, 都会导致在 T-RFLP 中酶切位点存在差异, 因而选择不同的限制性内切酶会对试验结果产生影响^[22]。本研究选择了 T-RFLP 研究中常用的 *Hha* I、*Hae* III 和 *Msp* I 3 种内切酶分别对香蕉不同品种和不同部位的材料进行了酶切比较分析, 综合酶切分析的结果来确定用于香蕉不同品种和组织中 T-RFLP 分析中合适的内切酶种类。一般认为, 能够产生较多 TRFs 的限制性内切酶更适合分析细菌群落结构的多样性^[23], 而本试验的结果表明 *Msp* I 和 *Hae* III 的酶切结果产生了较多的 TRFs。据此, 本实验选用 *Msp* I 和 *Hae* III 2 种限制性内切酶进行了后续的研究。

利用 T-RFLP 技术对抗感品种植株内的内生细菌分析表明, 抗病品种“农科一号”无论是在健康还是在发病时, 各组织中的内生细菌种类都比感病品种“巴西蕉”更为丰富, 同时“农科一号”各组织在有无病原菌侵染时各组织中的内生细菌的分布基本保持一致。而“巴西蕉”在受到病原菌侵染后, 各组织内生细菌的分布却发生变化。这说明抗病品种“农科一号”在有无病原侵染时都有更丰富的内生细菌, 同时这些内生细菌的分布在受到病原侵染后仍能保持相对稳定的分布。进一步对“农科一号”和“巴西蕉”不同发病时期植株根部内生细菌的多样性进行分析表明, “农科一号”在发病前、发病初期和发病一个月后期的不同时间内, 其植株根部内生细菌的多样性都要比“巴西蕉”丰富, 同时“农科一号”在发病前后内生细菌的多样性也比较稳定, 而“巴西蕉”变化幅度较大。Lian 等^[1]研究证明, 香蕉部分内生菌对香蕉枯萎病有一定的抑制作用; Jie 等^[15]证明接种健康香蕉植株中一定种类内生菌的香蕉组培苗不仅可以减轻枯萎病的发病率, 还可以促进植株的

生长,且植物内生菌与宿主间存在互利共生的关系^[9]。因此我们可以推测,可能正是“农科一号”中这些多样性十分丰富的内生细菌以及在病原菌侵染后仍可以稳定维持内生细菌丰富度的情况下,从而加强了“农科一号”对香蕉枯萎病的抗性,并对植株起到了一定的保护作用。

对不同品种不同发病时期内生细菌的优势种群分析表明,3个优势种群菌属在不同品种的不同发病时期始终存在,还有一些优势种群则因不同品种和不同发病时期而变化。且在植株发病前,抗病品种比感病品种存在更多的优势种群,但在植株发病后抗病品种的优势种群类型明显下降。如抗病品种“农科一号”和感病品种“巴西蕉”的优势种群均表现为优势种群菌属数目在发病后有所减少,且促生菌和拮抗菌属的数目也有所减少,如欧文氏菌属 *Erwinia*^[24]、假单胞菌属 *Pseudomonas*^[1]在发病后就不再是优势种群。这可能因为植株发病后病原菌对植株正常的生长代谢产生了一定的影响^[25],且病原菌的侵入诱导了一些内生菌在植株中的定殖^[1],从而使植株中原有的优势种群发生变化。还有一些菌属在植株的不同发病时期是动态变化的,如“巴西蕉”中的 *Escherichia*,在接种前是优势种群,在发病初期不是,在发病后期又是优势种群,这种微生物在植株体内的动态变化受到很多因素的影响,具体的原因有待进一步研究。

在优势种群的分析中我们可以发现,抗病品种“农科一号”的根比感病品种“巴西蕉”的根具有更多对植株生长有促进作用和对病害有一定抑制作用的菌属。如在“农科一号”根中存在的欧文氏菌属 *Erwinia* 和黄杆菌属 *Flavobacterium* 中有些菌株有促进植物生长的作用^[24],在克雷伯杆菌属 *Klebsiella* 中有些菌株是内生固氮菌,而内生固氮菌可以通过固氮来提供植物氮营养或是合成植物生长激素类物质促进植株生长^[3],同时克雷伯

杆菌属 *Klebsiella* 和假单胞菌属 *Pseudomonas* 中有一些菌株对香蕉枯萎病菌有一定拮抗作用^[1,12]。林玲等^[26]认为植物内生细菌有与病原菌竞争生态位和营养物质、产生抗菌活性物质以及诱导植物产生系统抗性等多种作用方式来减轻或防止病害的发生。因此抗病品种“农科一号”比感病品种“巴西蕉”的内生细菌多样性更丰富且一些拮抗菌属和促生菌属更多,这似乎证明这些或部分内生细菌可能对香蕉植株抗病性的提高起到了一定的作用。至于这些或部分内生细菌的具体作用则有待今后进一步研究证实。

综合以上结果,我们发现抗病品种“农科一号”与感病品种“巴西蕉”相比较,表现为植株具有更为丰富的内生细菌,且在健康和发病情况下更为稳定,在内生菌类群中可能具有更多的促进植物生长和抑制病原菌的菌属,这些都有可能与“农科一号”的抗病性有关。一般认为植物内生细菌来源于植物土壤,因此在栽种香蕉生产实际中,我们可以通过人为施加发酵液或通过人工接种植物内生菌的方法来提高土壤中微生物的多样性,特别是增加对香蕉枯萎病具有拮抗作用的细菌来有效防治日益严重的香蕉枯萎病。另外,为了更好地防治香蕉枯萎病,一些内生细菌的功能以及其与宿主植株间的相互作用还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Lian J, Wang ZF, Zhou SN. Response of endophytic bacterial communities in banana tissue culture plantlets to *Fusarium* wilt pathogen infection[J]. General and Applied Microbiology, 2008, 54(2): 83–92.
- [2] 何欣,黄启为,杨光明,等. 香蕉枯萎病致病菌筛选及致病菌浓度对香蕉枯萎病的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(18): 3809–3816.
- [3] 张祺玲,杨宇红,谭周进,等. 植物内生菌的功能研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(7): 28–34.

- [4] 张敏, 沈德龙, 饶小莉, 等. 甘草内生细菌多样性研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(4): 524–528.
- [5] 王爱华, 殷幼平, 熊红利, 等. 广西柑橘黄龙病植株韧皮部内生细菌多样性分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(23): 4823–4833.
- [6] 黄晓辉, 杨友才, 谭周进, 等. 四个品种烟草内生微生物的分布特征[J]. 生态学报, 2009, 29(12): 6827–6833.
- [7] 史应武, 娄恺, 李春. 天山北坡甜菜内生菌分离鉴定及其动态变化[J]. 生态学报, 2009, 29(5): 2374–2382.
- [8] 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.
- [9] 姚领爱, 胡之璧, 王莉莉, 等. 植物内生菌与宿主关系研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, 19(7): 1750–1754.
- [10] 曹理想, 田新莉, 周世宁. 香蕉内生真菌、放线菌类群分析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2003, 42(2): 70–73.
- [11] 王宇光, 孙建波, 夏启玉, 等. 从拮抗枯萎病的香蕉植株中分离内生细菌的研究初报[J]. 中国农学通报, 2010, 26(8): 207–211.
- [12] 付业勤, 蔡吉苗, 刘先宝, 等. 香蕉内生细菌分离、活性评价及数量分布[J]. 热带作物学报, 2007, 28(4): 78–83.
- [13] 石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2395–2401.
- [14] Sessitsch A, Reiter B, Berg G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(4): 239–249.
- [15] Lian J, Wang ZF, Can LX, et al. Artificial inoculation of banana tissue culture plantlets with indigenous endophytes originally derived from native banana plants[J]. Biological Control, 2009, 51(3): 427–434.
- [16] 吕恒玉, 张科立, 刘先宝, 等. 一株香蕉拮抗内生细菌的分离及鉴定[J]. 热带农业工程, 2009, 33(5): 26–30.
- [17] Lin YH, Chang JY, Liu ET, et al. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4[J]. European Journal of Plant Pathology, 2009, 123(3): 353–365.
- [18] Heuer H, Krsek M, Baker P, et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3233–3241.
- [19] 王陶, 王振中. 3种杀菌剂对小白菜内生细菌多样性的影响[J]. 广东农业科学, 2010, 37(11): 153–159.
- [20] Zhang Y, Du BH, Jin ZG, et al. Analysis of bacterial communities in rhizosphere soil of healthy and diseased cotton (*Gossypium* sp.) at different plant growth stages[J]. Plant and Soil, 2011, 339(1/2): 447–455.
- [21] Araújo WL, Marcon J, Maccheroni W Jr, et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 4906–4914.
- [22] 贾俊涛, 宋林生, 李筠. T-RFLP 技术及其在微生物群落结构研究中的应用[J]. 海洋科学, 2004, 28(3): 64–68.
- [23] 李秋红, 吴凤芝, 景芳毅. 套作对黄瓜根际土壤细菌群落结构的多样性影响[J]. 土壤通报, 2010, 41(1): 47–52.
- [24] 李文英, 彭智平, 于俊红, 等. 香蕉根际促生菌的研究展望[J]. 热带作物学报, 2011, 32(1): 182–187.
- [25] 李赤, 黎永坚, 于莉. 香蕉枯萎病菌对不同香蕉品种防御酶系的影响[J]. 中国农学通报, 2010, 26(17): 251–255.
- [26] 林玲, 乔勇升, 顾本康, 等. 植物内生细菌及其生物防治植物病害的研究进展[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(6): 969–974.