

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.01.007

桑树内生细菌多样性及内生拮抗活性菌群的研究^①

任慧爽, 徐伟芳, 王爱印, 左伟东, 谢洁

西南大学 生物技术学院/家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715

摘要: 为探究桑树内生细菌多样性, 获得拮抗性内生菌, 开发利用桑树内生菌资源, 通过非培养法构建 16S rDNA 文库, 并结合组织分离培养法对桐乡青(桑树品种)内生细菌的种群特征进行了研究. 非培养法研究结果显示所构建文库的 111 个阳性克隆属于 22 个分类单元, 其分属于 3 门 10 属, 其中, 鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、*Massilia* 和甲基杆菌属(*Methylobacterium*)为优势菌属; 使用不同培养基通过培养法从桐乡青茎中获得 25 个内生细菌分离株, 基于 16S rDNA 序列系统发育分析其属于 15 个分类单元, 其分属于 3 门 12 属, 其中肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和泛菌属(*Pantoea*)为优势菌属. 培养法得到的内生细菌种群与非培养法差异较大, 仅假单胞菌属(*Pseudomonas*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)为共同菌属, 且培养法得到的内生细菌多样性和均匀度指数(H' 2.54, D 0.91, J 0.79)均高于非培养法(H' 2.21, D 0.84, J 0.48). 采用抑菌圈法, 以 10 株植物病原菌作为指示菌, 结果显示多达 18 株桑树内生细菌对一种或多种病原菌有抑制作用. 综上结果表明, 桑树内生细菌具有丰富的多样性, 并且包含大量具有抗菌活性的菌株, 以桐乡青材料为例, 抗菌活性菌株约占其内生细菌的 72%.

关键词: 桑树内生菌; 非培养法; 培养法; 多样性; 拮抗菌

中图分类号: S888.7

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)01-0036-10

桑树(*Morus alba* L.)适应性强, 几千年来作为家蚕唯一的饲料源, 在全国各省区广泛种植. 由于桑树具有耐寒耐旱耐山火, 可保持水土^[1-2], 萌生能力极强, 对氯气、二氧化硫和硫化氢具较强耐受性^[3]等特性, 因而是生态改良的主要树种. 桑果不仅基础营养物质含量丰富, 而且富含氨基酸、维生素以及白藜芦醇、花青素等抗氧化活性物质^[4], 具有增强人体免疫力、延缓衰老和美容养颜等功效^[5]. 然而, 近年来桑疫病和菌核病等各类病害日趋严重, 而现有针对桑树病害的化学农药防治方法所导致的负面影响亦日益凸显, 严重制约生态桑产业的健康发展, 故寻找高效且绿色环保的桑树病害防治方法已迫在眉睫.

植物内生菌(Endophytes)是生活于健康植物各组织器官的细胞间隙或者细胞内部, 并与宿主植物和谐共处的一类微生物^[6-7]. 作为植物微生态系统的重要组成部分, 内生菌构筑了宿主植物的健康屏障^[8-10], 能够通过合成抗菌活性物质^[11]、竞争性排阻^[12]、促进植物生长^[13]及诱导抗性^[14]等方式增强宿主植物的抗病能力. 近几年, 对桑树内生菌多样性及利用其进行植物病害生物防治方面已有研究, 但主要集中于培养法. 路国兵等人^[15]从不同桑树品种的不同组织中共分离得到内生细菌 229 个分离株, 并从中筛选得到 67 个分离株对桑树炭疽病菌或桑粘格孢菌具有拮抗作用; 谭广秀^[16]从桑枝中分离获得内生细菌 26 个分离株, 并从中筛选出 2 株具有抑菌活性的内生菌. 此外, 本研究小组的研究结果表明桑树内生拮抗菌成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)及特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*)分别对桑细菌性疫病病原菌、桑椹缩小性

① 收稿日期: 2016-06-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31601678); 重庆市基础科学与前沿技术研究院士专项(NO. cstc2015jcyjys80001); 教育部留学回国人员科研启动基金项目(NO. 教外司留 2015-311).

作者简介: 任慧爽(1990-), 女, 河北邢台人, 硕士研究生, 主要从事植物内生菌及其次生代谢产物的研究.

通信作者: 谢洁, 副教授, 硕士研究生导师.

菌核病病原菌有稳定而显著的抑制作用^[17-18]。然而培养法存在一定局限,无法全面客观反映植物内生菌的种群结构。因此,本文采用构建桑树内生细菌 16S rDNA 文库的非培养法和培养法,对桑树内生细菌的多样性进行系统研究,并检测培养法获得的内生细菌对桑疫病病原菌(丁香假单胞菌桑致病变种)等 10 株病原指示菌的拮抗作用,以期阐明内生菌与桑树共生过程中的功能和潜在作用,为利用内生菌进行桑树病害的生物防治提供新的资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试桑树材料

健康桑树桐乡青于 2013 年 7 月取自西南大学生物技术学院实验桑园“桑之源”。

1.1.2 拮抗菌筛选靶标菌株

丁香假单胞菌桑致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *mori*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、终极腐霉(*Pythium ultimum*)、炭疽病菌(*Colletrichum lagenarium*)、腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)、疫霉菌(*Phytophthora nicotianae*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、链格孢菌(*Alternaria* sp.)、轮枝菌(*Verticillium dahliae*)、纹枯病菌(*Thanatephorus cucumeris*),均为本研究小组收集保存。

1.1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯 200.0 g,葡萄糖 20.0 g,琼脂 15.0 g,蒸馏水 1 000.0 mL, pH 自然;马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB):马铃薯 200.0 g,葡萄糖 20.0 g,蒸馏水 1000.0 mL, pH 自然;高氏 I 号培养基(GA):可溶性淀粉 20.0 g, KNO₃ 1.0 g, NaCl 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1000.0 mL, pH=7.2~7.4;水琼脂培养基(WA):琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1 000.0 mL, pH 自然。以上培养基均在 121 °C 温度下灭菌 20 min 备用。

1.1.4 主要试剂和仪器

基因组提取试剂盒 PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent 购自美国 ABI 公司;DNA marker、Taq 酶、dNTP、10×PCR Buffer、Mg²⁺、PMD19-T Vector 载体购自宝生物工程(大连)有限公司;凝胶回收试剂盒购自 AxyGEN 公司;PCR 引物购自南京金斯瑞生物科技有限公司;其余均为国产分析纯。电泳仪、水浴锅均购自北京六一仪器厂,PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品的采集及处理

从实验桑园采集桐乡青的茎,用自来水冲洗干净、晾干、编号后于 4 °C 保存,并及时分离内生菌。

桑树茎表面消毒^[11]:将桑树枝条剪成长度约 5.0 cm 的茎段,置于 75.0% 的乙醇中完全浸湿,取出后于酒精灯上引燃茎表面乙醇,待乙醇燃尽,以此表面消毒的桑枝在空白培养基上滚动,使桑枝每个表面均接触培养基,于 22 °C 温度下培养作为空白对照,验证表面消毒是否彻底。

1.2.2 非培养法对桑树内生细菌多样性分析

采用消毒后桑树茎皮为实验材料,按照文献^[19-20]的方法获得桑树皮总基因组 DNA,以此作为模板,使用细菌 16S rDNA 扩增通用引物 799F:5'-AACAGGATTAGATACCCTG-3'和 1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'进行 PCR 扩增^[19-21]。PCR 反应体系(25 μL):Premix Taq 12.5 μL,引物各 1 μL, DNA 1 μL (20 ng), ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应条件为:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。

16S rDNA 基因文库的构建^[20]:PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳,将 730 bp 左右的条带切下,进行回收纯化,产物与 PMD19-T Vector 载体连接,转化至 E. coli DH 5α 感受态细胞。在含氨苄青霉素(50 μg/mL)的 LB 平板上筛选阳性转化子。用菌落 PCR 的方法,以 PMD19-T 载体上的 M13-47 5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3' 和 M13-48 5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA-3' 为

引物, 验证阳性克隆. PCR 反应体系(25 μL): Premix Taq 12.5 μL , 引物各 1 μL , 菌液 1.5 μL , ddH₂O 9 μL . PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min.

桑树皮内生细菌群落 16S rDNA 文库扩增性 rDNA 限制性酶切片段分析 (ARDRA): 取阳性克隆的菌落 PCR 产物 4 μL 分别用 *Hae* III 和 *Hha* I 内切酶进行酶切分型^[19]. 酶切反应体系(5 μL): *Hae* III 或 *Hha* I (10 U/ μL)0.2 μL , PCR 产物 4 μL , 10 \times Buffer 0.5 μL , ddH₂O 0.3 μL . 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温放置 4 h, 酶切产物用 2.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测. 选取两种限制酶的酶切带型不同的克隆送至金斯瑞生物科技有限公司进行测序.

1.2.3 培养法对桑树内生细菌多样性分析

将经表面消毒的桑树茎置于无菌培养皿内, 用无菌手术刀片分 3 层剖开, 并将所得碎片分别置于 PDA 培养基、GA 培养基和 WA 培养基表面, 22 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 周, 逐日观察. 待茎块边缘长出菌落后, 采用平板划线法进行纯化培养.

利用基因组提取试剂盒获得菌株 DNA, 以此为模板, 用细菌通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 扩增内生细菌 16S rDNA 序列. PCR 反应体系(25 μL): 10 \times PCR Buffer 2.5 μL , Mg²⁺ (1.5 mmol/L)1.5 μL , dNTP(10 mmol/L) 2.0 μL , 引物各 1.0 μL , DNA 1.0 μL , Taq 酶 0.1 μL , ddH₂O 15.9 μL . PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序.

1.2.4 数据分析

通过 NCBI 的 VECTER SCREEN 去除非培养法测序所得的 16S rDNA 基因的载体片段^[21], 将所得到的 16S rDNA 序列在线进行嵌合序列鉴定(<http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>)去除嵌合序列^[22]. 将获得的基因序列用 Blast 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)与数据库中已登记的基因序列进行同源性比较分析, 获得菌种的相似度信息.

采用分离频率(Relative frequency)、香农多样性指数(Shannon-Wiener Biodiversity index, H')、辛普森多样性指数(Simpson's Biodiversity index, D)、丰度(Richness)及皮耶诺均匀度指数(Pielou's evenness index, J)5 个指标^[23]及稀疏曲线(Rarefaction Curve)^[24]对两种方法得到的桑树内生菌多样性进行评价分析比较.

1.2.5 桑树拮抗性内生细菌的发育分析

将分离获得的内生细菌接种于 PDB 培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 96 h; 收获发酵液后 12000 r/min 离心 30 min, 取上清液备用^[17]. 以桑疫病病原菌丁香假单胞菌桑致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *mori*)及其他 9 种常见植物病原真菌为靶标, 灭菌 PDB 培养液作对照, 用抑菌圈法检测桑树内生菌发酵上清液对靶标病原菌的拮抗活性, 筛选桑树内生拮抗菌株.

将所得拮抗菌 16S rDNA 基因序列在 GenBank 里进行比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), 下载 GenBank 中同源性较高序列, 利用 CLUSTALX 软件进行聚类分析, 再利用 MEGA4.0 软件, 使用 N-J 法进行 1 000 次步长计算, 构建系统发育树^[17].

2 结果和分析

2.1 桑树内生细菌种群分布

2.1.1 非培养法对桑树内生细菌种群分布分析

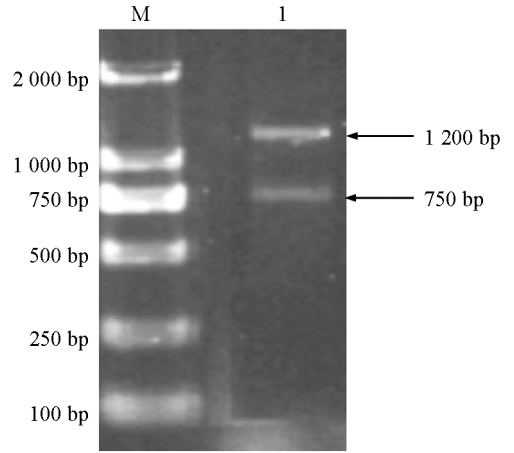
样品总 DNA 提取和 16S rDNA 基因的 PCR 扩增: 提取的桑树皮总 DNA 片段较为完整, 基因组片段大于 15 kb. 通过细菌 16S rDNA 基因特异性 PCR 扩增, 得到大小为 750 bp 左右的目的片段, 同时还扩增出 1 200 bp 左右的片段, 推测可能是桑树线粒体 18S rDNA 的部分序列(图 1). 经表面消毒的桑枝滚动的

培养基在培养后,于 22 °C 温度下培养 72 h, 无菌落生长, 说明实验中得到的结果均为桑树内生菌。

16S rDNA 基因克隆文库阳性转化子的筛选与酶切分析: 从所构建 16S rDNA 基因文库中随机挑取 120 个单菌落, 用质粒上的通用引物 M13-47 和 M13-48 进行菌落 PCR 扩增, 验证阳性克隆, 最终共筛选获得 111 个阳性克隆, 阳性克隆大小约为 900 bp。

阳性克隆 PCR 扩增产物首先用内切酶 *Hae* III 进行酶切, 图谱结果显示共有 6 种带型(图 2), 选择带型相同的克隆, 将其菌落 PCR 产物再次使用内切酶 *Hha* I 进行酶切, 验证其是否的确为同一克隆(图 3)。由图 2 和图 3 可见酶切产物得到片段大小在 100~700 bp 之间, 其总和都接近于未消化的 PCR 产物全长。

经两次酶切比较, 共得到 40 个酶切图谱不同的克隆, 将不同的克隆进行测序。根据酶切图谱和克隆测序结果, 排除嵌合体后, 111 个克隆分为 22 个分类单元(OTUs)。测序后将 16S rDNA 序列提交至 NCBI 数据库 GeneBank 获得登录号 KT766085—KT766118。经 Blast 序列比对, 111 个阳性克隆序列分属于细菌域的 3 个类群: 变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和放线菌门(Actinobacteria), 包括 10 个属(表 1)。



M: 2000 bp marker; 1: 桑树内生细菌 16s rDNA 基因片段的 PCR 扩增结果。

图 1 桑树基因组 DNA 和桑树内生细菌 16s rDNA 基因片段的 PCR 扩增结果

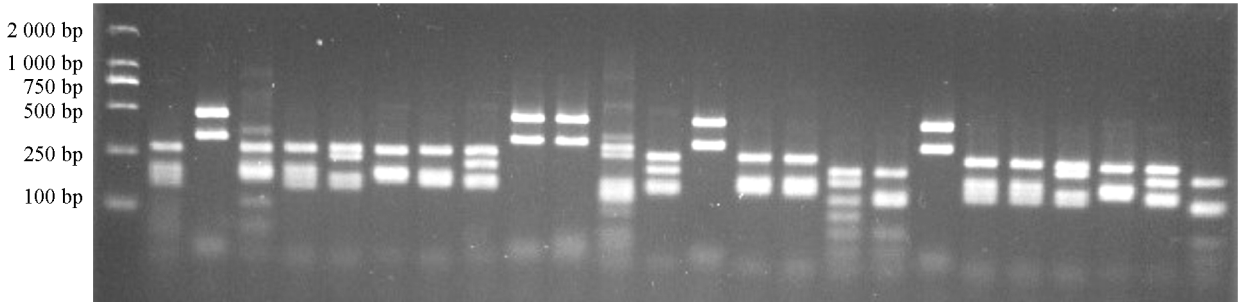


图 2 桑树内生细菌阳性克隆 *Hae* III 酶切图谱(部分)

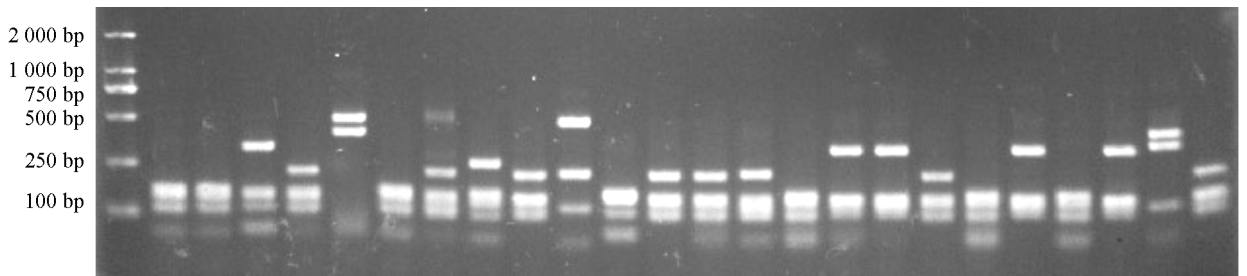


图 3 桑树内生细菌阳性克隆 *Hha* I 酶切图谱(部分)

2.1.2 培养法对桑树内生细菌种群分布分析

采用 PDA 培养基、GA 培养基和 WA 培养基从经严格表面消毒的桐乡青茎中共分离获得内生细菌 25 个分离株。采用细菌通用引物 27F/1492R 分别获得内生细菌的 16S rDNA, 将其序列提交至 NCBI 数据库 GeneBank 获得登录号 KT766060—KT766084。经 Blast 序列比对, 桑树内生细菌 25 个分离株分属于细菌域的 3 个类群: 变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes), 包括 12 个属(表 1)。

表 1 桑树内生细菌种群分布

门	种	分离频率	
		非培养法	培养法
Actinobacteria	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	3.85	—
	<i>Frigoribacterium faeni</i>	1.92	—
Firmicutes	<i>Bacillus cereus</i>	—	4.00
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	—	4.00
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	—	4.00
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	—	4.00
Proteobacteria	<i>Desulfonatronovibrio magnus</i>	0.96	—
	<i>Duganella sacchari</i>	—	4.00
	<i>Enterobacter asburiae</i>	—	4.00
	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	—	20.00
	<i>Enterobacter ludwigii</i>	—	4.00
	<i>Erwinia aphidicola</i>	—	4.00
	<i>Hymenobacter flocculans</i>	1.92	—
	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	—	8.00
	<i>Massilia albidiflava</i>	3.85	—
	<i>Massilia kyonggiensis</i>	0.96	—
	<i>Massilia namucunensis</i>	16.35	—
	<i>Massilia plicata</i>	0.96	—
	<i>Massilia timonae</i>	0.96	—
	<i>Methylobacterium aquaticum</i>	0.96	—
	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	14.42	—
	<i>Methylobacterium goesingense</i>	6.73	—
	<i>Methylobacterium komagatae</i>	0.96	—
	<i>Methylobacterium persicinum</i>	3.85	—
	<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i>	1.92	—
	<i>Methylobacterium tardum</i>	0.96	—
	<i>Mucilaginibacter soli</i>	0.96	—
	<i>Novosphingobium barchaimii</i>	—	4.00
	<i>Pantoea agglomerans</i>	—	12.00
	<i>Peredibacter starrii</i>	0.96	—
	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	1.92	—
	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	—	8.00
	<i>Sphingobacterium caeni</i>	—	4.00
	<i>Sphingomonas melonis</i>	18.27	—
<i>Sphingomonas pruni</i>	13.46	—	
<i>Sphingomonas roseiflava</i>	2.88	—	
<i>Sphingomonas sanguinis</i>	—	8.00	
<i>Xanthomonas campestris</i>	—	4.00	

2.1.3 利用非培养法与培养法分析桑树内生细菌种群分布比较

桑树内生细菌种群多样性分析结果表明, 非培养法和培养法获得的种群分布特征差异显著. 放线菌门(Actinobacteria)为非培养法特有类群, 而厚壁菌门(Firmicutes)仅在培养法中得到; 仅假单胞菌属(*Pseudomonas*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)两个菌属为两种方法获得的共同菌属; 而在种的水平上二者没有得到共同菌种(表 1). 非培养法研究结果显示, 变形杆菌门(Proteobacteria)是该克隆文库中的优势类群, 包含了 96 个克隆. 文库中优势菌属为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、*Massilia* 和甲基杆菌属(*Methylobacterium*), 分别占克隆文库的 18.27%, 16.35% 和 14.42% (表 1). 培养法研究结果表明, 变形杆菌门(Proteobacteria)亦为优势类群, 包含了 20 个内生细菌分离株. 其中肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和泛菌属(*Pantoea*)为优势菌属, 分别占内生细菌总数的 24.00%, 12.00% 和 12.00% (表 1).

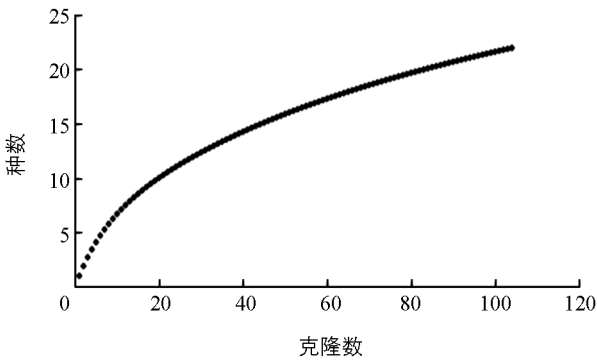
2.2 桑树内生菌的多样性分析

采用香农多样性指数、辛普森多样性指数、丰度、皮耶诺均匀度指数及稀疏曲线对两种方法得到的桑树内生菌多样性进行评价分析比较. 桑树内生细菌 16S rDNA 基因文库包含 111 个阳性克隆, 有 22 个分类单元, 香农多样性指数为 2.21, 辛普森多样性指数为 0.84, 均匀度为 0.48 (表 2), 稀疏曲线趋于平缓(图 4(a)), 说明该克隆文库已基本代表桑树内生细菌群落的微生物多样性. 分离获得的 25 个内生细菌分离株, 有 15 个分类单元, 香农多样性指数为 2.54, 辛普森多样性指数为 0.91, 均匀度为 0.79(表 2), 稀疏曲线仍呈上升趋势(图 4(b)), 说明分离获得内生菌仍较有限, 培养法具有更高的多样性.

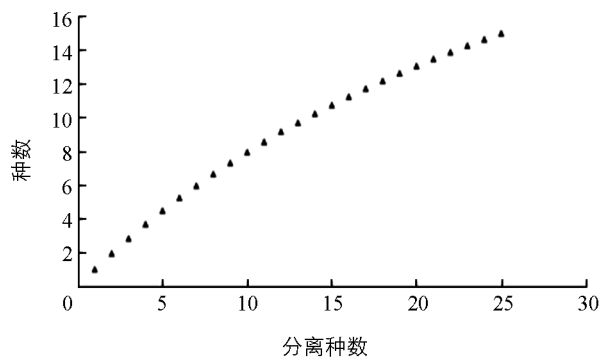
从统计分析可以看出, 桑树内生菌 16S rDNA 克隆文库的库容基本上可反映桑树内生细菌群落的种群多样性, 然而非培养法获得内生菌的丰度虽然高于培养法, 但其多样性和均匀度均不及培养法, 且非培养法稀疏曲线较培养法更趋于平缓, 也就是说采用培养法得到的内生细菌群落复杂性高于非培养法.

表 2 桑树内生细菌多样性分析

指 数	非培养法	培养法	指 数	非培养法	培养法
香农多样性指数(H')	2.21	2.54	丰度	22	15
辛普森多样性指数(D)	0.84	0.91	皮耶诺均匀度指数(J)	0.48	0.79



(a) 非培养法



(b) 培养法

图 4 两种方法得到桑树内生细菌稀疏曲线

2.3 桑树拮抗性内生细菌的初筛及系统发育分析

抑菌圈法检测培养法分离获得的 25 株桑树内生细菌的抑菌活性, 检测结果表明多达 18 株内生细菌分离株对靶标病原菌中的一株或者多株表现出拮抗作用, 占内生细菌的 72%, 其中内生细菌 TPY1 发酵上清液对 5 株指示菌具有拮抗作用, 具有较广谱抑菌活性(表 3). 由此可见, 内生拮抗菌对提高宿主植物抗病性具有一定的作用.

表 3 桑树内生菌株的抑菌试验结果

指 示 菌	内生菌分离株																	
	TGJ1	TGJ2	TGY1	TGY2	TPJ1	TPJ2	TPJ3	TPY1	TPY2	TPY3	TPY5	TPY6	TPY8	TPY11	TPY12	TPY14	TPY16	TPY17
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pythium ultimum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Colletrichum lagenarium</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium solani</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phytophthora nicotianae</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Rhizoctonia solani</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>Alternaria</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Verticillium dahliae</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+

注: +: 抑制; -: 无抑制.

为进一步了解拮抗菌在同一宿主内的进化多样性, 对 18 株内生拮抗细菌进行了系统发育分析. 对 18 株拮抗内生菌的 16S rDNA 序列进行 BLAST 比对、分析, 采用 MEGA4. 0 软件 N-J 法构建系统发育树(图 5).

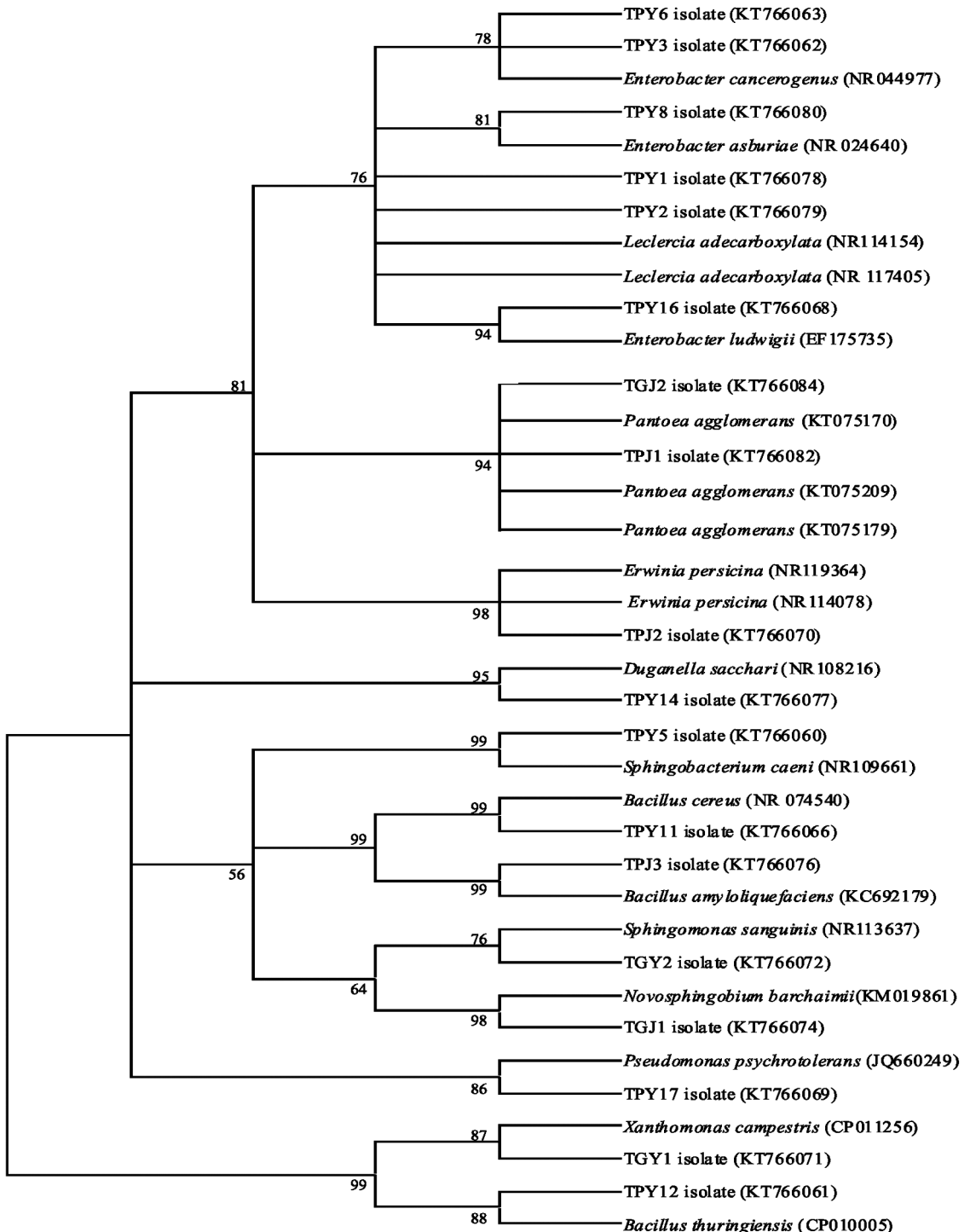


图 5 桑树内生拮抗细菌基于 16S rDNA 序列的 N-J 法系统发育分析

从图 5 可见, 18 株活性菌株在进化发育上分属 11 属. 分离株 TPY3, TPY6, TPY16 为肠杆菌属 (*Enterobacter*), 其中 TPY3 和 TPY6 分离株的同源性达 99%; 分离株 TPY1, TPY2 有 99% 同源性, 与勒克氏菌属 (*Leclercia*) 聚为一类; 分离株 TGJ2 和 TPJ1 属于泛菌属 (*Pantoea*); 分离株 TPJ2 为欧文氏菌属 (*Erwinia*); 菌株 TPY5 为鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium*); 分离株 TPY11 和 TPY12 为芽孢杆菌属

(*Bacillus*); 分离株 TGY2 属于鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*); 分离株 TGJ1 为新鞘氨醇杆菌 (*Novosphingobium*); 分离株 TPY17 属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*); 分离株 TGY1 为黄单胞菌属 (*Xanthomonas*). 结果表明桑树内生拮抗细菌在遗传和类群上表现出较为丰富的多样性特征.

3 讨 论

植物内生菌广泛存在于健康植物体内, 是植物微生态系统的重要组成部分, 对宿主的生长发育起着多种生物学作用. 本研究结合非培养法和培养法对桑树(桐乡青)内生菌的种群组成进行了系统、全面的研究. 为进一步了解桑树内生菌与宿主之间的关系, 探究内生菌在植物体内的生命活动提供了依据, 丰富了桑树内生菌资源. 通常香农多样性指数介于 1.5~3.5 之间^[25], 桑树内生菌培养法与非培养法的指数分别为 2.54 和 2.21, 表明其多样性适中, 与前人的研究相当, 天目山山胡椒叶与茎中内生真菌香农多样性指数分别为 2.63 和 1.83^[26], 乔松松针和茎内生真菌的多样性指数分别为 2.48 和 2.23^[27].

非培养法和培养方法对桐乡青内生细菌种群组成差异较大, 仅有两个共同菌属, 且有不同的优势种群. 通过构建文库得到的细菌菌落丰富度高于分离培养方法, 然而多样性指数显示培养法得到的内生菌多样性要高于非培养法, 该结果表明尽管传统分离培养得到的菌株数较少, 但其组成较为复杂, 结合稀疏曲线可知, 利用分离培养法对桑树内生细菌多样性的研究具有更高的潜力. Impullitti 等人^[24]对大豆内生真菌多样性研究及 Mariana 等人^[28]对水果中内生细菌多样性研究, 均得到培养法多样性指数高于非培养法. 其原因可能是非培养法存在的限制因素: 首先, 总基因组提取需大量的植物组织, 会造成总 DNA 中糖类、盐等杂质对后续的 PCR 扩增造成干扰^[29]; 其次, 总基因组在进行特异性扩增时存在 PCR 偏好性^[24, 30]; 第三, 某些菌株在植物内的浓度过小, 非培养法无法检测^[28-29]; 第四, 本研究所构建的克隆文库只包含了 16S rDNA 的部分片段, ARDRA 分型准确性有所下降^[22]; 最后, 由于实验条件限制, 木质部无法被液氮速冻研磨, 本研究非培养法仅取桐乡青韧皮部进行试验, 可能会造成其多样性下降. 虽然非培养法存在上述局限性, 但传统分离方法亦存在菌株对培养基的选择性、不可培养菌株的存在、某些菌株生长缓慢竞争力差被生长迅速的菌株淘汰等技术问题. 有多个研究报道表明, 非培养法与培养法得到的内生菌种结构不一致甚至互补^[29-32]. 因此非培养方法和培养方法结合使用可更有效、全面地研究植物内生菌的多样性, 更有利于探索内生菌与宿主之间的作用.

本研究从 25 个分离株中共筛选得到 18 株对一株或多株病原菌具有抑制作用的桑树拮抗性内生细菌, 占菌株总数的 72%. 其中有些菌株表现出较广的抑菌谱及较强抑菌活性, 具有作为生物防治菌的潜能. 以上结果为进一步利用内生菌防菌资源, 探索对植物病害的安全有效的生物防治措施提供了材料及依据. 但拮抗菌的生物防治效果如何, 尚需测定其在桑树体内的定殖力、持久性和回接后对桑树生长的影响, 以及通过防病效果的田间试验等加以证实, 也将是下一步研究的重点.

参考文献:

- [1] SUSHEELAMA B N, 张 林. 桑树种质的抗旱性评估 [J]. 国外农学(蚕业), 1992(1): 34-36.
- [2] 张光灿, 杨吉华, 赵新明, 等. 桑树根系分布及水土保持特性的研究 [J]. 蚕业科学, 1996, 23(1): 59-60.
- [3] 买买提依明, 徐 立, 夏庆友, 等. 新疆维吾尔自治区桑树自然分布区域的地理生态环境及桑树形态特征 [J]. 蚕业科学, 2008, 34(2): 294-297.
- [4] 黄君霆, 朱万民, 夏建国, 等. 中国蚕丝大全 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1996: 854-855.
- [5] 王储炎, 范 涛, 桂仲争, 等. 桑椹食品的开发探讨 [J]. 食品工业, 2011(3): 95-98.
- [6] BARRAQUIO W L, REVILLA L, LADHA J K. Isolation of Endophytic Bacteria Diazotrophic Bacteria from Wetland Rice [J]. Plant and Soil, 1997, 194(1): 15-24.
- [7] HANADA R E, POMELLA A W, COSTA H S, et al. Endophytic Fungal Diversity in Theobroma Cacao (Cacao) and *T. grandiflorum* (Cupuacu) Trees and Their Potential for Growth Promotion and Biocontrol of Black-Pod Disease [J].

- Fungal Biology, 2010, 114(11/12): 901–910.
- [8] ARNOLD A E, MEIJIA L C, KYLLO D, et al. Fungal Endophytes Limit Pathogen Damage in a Tropical Tree [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(26): 15649–15654.
- [9] GOND S K, BERGEN M S, TORRES M S, et al. Endophytic *Bacillus* spp. Produce Antifungal Lipopeptides and Induce Host Defence Gene Expression in Maize [J]. Microbiological Research, 2015, 172: 78–87.
- [10] HODGSON S, de CATES C, HODGSON J, et al. Vertical Transmission of Fungal Endophytes is Widespread in Forbs [J]. Ecology and Evolution, 2014, 4(8): 1199–1208.
- [11] XIE J, STROBEL G A, MENDES M T, et al. Colophora Aceris, a Novel Antimycotic Producing Endophyte Associated with Douglas Maple [J]. Microbial Ecology, 2013, 66(4): 784–795.
- [12] MARTINUZ A, SCHOUTEN A, SIKORA R A. Systemically Induced Resistance and Microbial Competitive Exclusion: Implications on Biological Control [J]. Phytopathology, 2012, 102(3): 260–266.
- [13] VENDAN R T, YU Y J, LEE S H, et al. Diversity of Endophytic Bacteria in Ginseng and Their Potential for Plant Growth Promotion [J]. The Journal of Microbiology, 2010, 48(5): 559–565.
- [14] CONN V M, WALKER A R, FRANCO C M. Endophytic Actinobacteria Induce Defense Pathways in Arabidopsis Thaliana [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2008, 21(2): 208–218.
- [15] 路国兵, 冀宪领, 张 瑶, 等. 桑树内生细菌的分离及生防益菌的筛选 [J]. 蚕业科学, 2007, 33(3): 350–354.
- [16] 谭广秀. 具有抑菌活性的桑树内生菌的分离鉴定及其抑菌物质的研究 [D]. 镇江: 江苏科技大学, 2012.
- [17] 张飞官, 高雅慧, 任慧爽, 等. 桑疫病病原拮抗菌的分离、鉴定及发酵条件优化 [J]. 微生物学报, 2013, 53(12): 1285–1294.
- [18] 谢 洁, 任慧爽, 唐翠明, 等. 一株桑树内生细菌的鉴定和对桑榭核地杖菌的拮抗作用 [J]. 蚕业科学, 2015, (5): 815–824.
- [19] 邱服斌. 培养方法与非培养方法对人参根内生细菌的研究 [D]. 北京: 首都师范大学, 2007: 3–8.
- [20] 程晓燕, 李文军, 王 芸, 等. 新疆野生胀果甘草内生细菌多样性的非培养初步分析 [J]. 微生物学报, 2009, 49(6): 718–725.
- [21] CHELIUS M K, TRIPLETT E W. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association With the Roots of *Zea mays* L. [J]. Microbial Ecology, 2001, 41(3): 252–263.
- [22] 孙 磊. 非培养方法和培养方法对水稻内生细菌和根结合细菌的研究 [D]. 北京: 首都师范大学, 2006: 29–30.
- [23] 吴晓菡. 几种樟科和木兰科植物内生真菌多样性比较研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2011.
- [24] IMPULLITTI A E, MALVICK D K. Fungal Endophyte Diversity in Soybean [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(5): 1500–1506.
- [25] GAZIS R, CHAVERRI P. Diversity of Fungal Endophytes in Leaves and Stems of Wild Rubber Trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru [J]. Fungal Ecology, 2010, 3(3): 240–254.
- [26] 吴晓菡, 李文超, 秦路平. 天目山山胡椒不同部位内生真菌组成及多样性分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(2): 107–113.
- [27] QADRI M, RAJPUT R, ABDIN M Z, et al. Diversity, Molecular Phylogeny, and Bioactive Potential of Fungal Endophytes Associated with the Himalayan Blue Pine (*Pinus wallichiana*) [J]. Microbial Ecology, 2014, 67(4): 877–887.
- [28] DIAS M, da CRUZ PEDROZO MIGUEL M G, DUARTE W F, et al. Epiphytic Bacteria Biodiversity in Brazilian Cerrado Fruit and Their Cellulolytic Activity Potential [J]. Annals of microbiology, 2015, 65(2): 851–864.
- [29] GUO L D, HYDE K D, LIEW E C. Detection and Taxonomic Placement of Endophytic Fungi within Frond Tissues of *Livistona chinensis* Based on rDNA Sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 20(1): 1–13.
- [30] ARNOLD A E, HENK D A, EELLS R L, et al. Diversity and Phylogenetic Affinities of Foliar Fungal Endophytes in Loblolly Pine Inferred by Culturing and Environmental PCR [J]. Mycologia, 2007, 99(2): 185–206.
- [31] ZHOU S L, YAN S Z, LIU Q S, et al. Diversity of Endophytic Fungi Associated with the Foliar Tissue of a Hemi-Parasitic Plant *Macrosolen cochinchinensis* [J]. Current Microbiology, 2015, 70(1): 58–66.

- [32] ALLEN T R, MILLAR T, BERCH S M, et al. Culturing and Direct DNA Extraction Find Different Fungi From the Same Ericoid Mycorrhizal Roots [J]. *New Phytologist*, 2003, 160(1): 255–272.

Research on Biodiversity of Endophytic Bacteria and the Antagonistic Endophytes in Mulberry

REN Hui-shuang, XU Wei-fang, WANG Ai-yin,
ZUO Wei-dong, XIE Jie

School of Biotechnology, Southwest University/State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Chongqing 400715, China

Abstract: In order to lay a good foundation for the exploration and utilization of mulberry endophyte resources, the biodiversity of endophytes in mulberry was investigated and antibiotic endophytes were obtained in this study. A 16S rDNA clone library was constructed by the culture-independent approach, and the community characteristics of mulberry endophytes in Tongxiangqing (a variety of mulberry) were investigated in combination with the tissue isolation culture method. Using common plant pathogens as the target, antagonistic endophytes were screened out. The results obtained with the culture-independent method showed that the 111 positive clones in the library constructed belonged to 22 operational taxonomic units, involving 10 genera of 3 phyla. Among them, *Sphingomonas*, *Massilia* and *Methylobacterium* were the dominant populations. Twenty-five isolates were obtained from mulberry stems with the culture-dependent method on different media. They were classified into 15 operational taxonomic units, involving 12 genera of 3 phyla, with *Enterobacter*, *Bacillus* and *Pantoea* being the dominant genera. The populations of endophytic bacteria obtained through the culture-dependent method were quite different from those gained through the culture-independent method. Only *Pseudomonas* and *Sphingomonas* were common genera between them. Furthermore, both the biodiversity index and the evenness index of endophytic bacteria obtained through the culture-dependent method ($H' 2.54$, $D 0.91$, $J 0.79$) were higher than those by the culture-independent method ($H' 2.21$, $D 0.84$, $J 0.48$). Based on the results of an antagonism assay of 10 pathogens, as much as 18 endophytic bacteria in mulberry showed inhibitory activity on one or more pathogens. It is concluded from what is stated above that endophytic bacteria in mulberry have great biodiversity and contain a large number of strains with antimicrobial activity (72% of the total).

Key words: mulberry endophytes; culture-independent method; culture-dependent method; biodiversity; antagonistic endophytes

责任编辑 潘春燕

