

水葫芦内生细菌的分离与鉴定

蓝江林, 朱育菁, 苏明星, 葛慈斌, 刘 芸, 刘 波

(福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003)

摘 要:采用 20 种不同培养基分离水葫芦内生细菌,利用细菌脂肪酸鉴定技术对水葫芦的内生细菌进行鉴定,研究了水葫芦内生细菌的种类及群落结构。结果表明,共得到 32 个属 56 株内生细菌,种类最多的是微杆菌属(*Microbacterium*),共有 9 种细菌。其次为假单胞菌属(*Pseudomonas*),共有 7 种细菌。芽孢杆菌属(*Bacillus*)有 5 种细菌。其余 23 个属均有 1 种。利用优势度指数分析各培养基分离到内生细菌的多样性,10 号葡萄糖-酵母、淀粉琼脂培养基优势度指数为 0.160 7,分离得到内生细菌种类最多为 9 种;其次是 4 号根瘤菌培养基和 11 号 NA 培养基的优势度指数为 0.125 0, 分离得到的内生菌种类均为 7 种;16 号黄豆芽汁培养基(pH7.2~7.4)和 20 号醋酸菌培养基,优势度指数为 0.089 3,分离获得内生细菌均为 5 种。

关键词:水葫芦;内生细菌

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)06-2423-07

Isolation and Identification of the Endophyte Bacteria from *Eichhornia crassipe*(Mart.)Solms.

LAN Jiang-lin, ZHU Yu-jing, SU Ming-xing, GE Ci-bin, LIU Yun, LIU Bo

(Agricultural Bioresource Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract:Endophyte bacteria were isolated from the plant tissues of *Eichhornia crassipe* (Mart.)Solms by using 20 types of cultural media. The collected 56 bacterial isolates were identified with bacterial fatty-acid identification system to study the population structure of endophyte bacteria inside *E. crassipe*. The endophyte bacteria were classified into 32 genera, while most belonged to *Microbacterium* with 9 isolates, *Pseudomonas* with 7 isolates and *Bacillus* with 5 isolates as well as the other 23 genus had only 1 isolate respectively. Study diversity of endophyte bacteria on culture medium using dominance index, result showed dominance index of glucose, yeast, starch and agar culture medium is 0.160 7, endophyte bacteria is 9 species. Dominance index of Rhizobiumv culture medium and NA culture medium was 0.125 0, had 7 isolate respectively. Next was soybean sprouts juice culture medium (pH 7.2~7.4) and Acetobacter Aceti culture medium, dominance index was 0.089 3, endophyte bacteria was 5 species.

Keywords:*Eichhornia crassipe*(Mart.)Solms; endophyte bacteria

植物内生细菌(Endophyte bacteria)是指能在健康植物组织内栖居,对植物不造成实质性危害而与植物建立了和谐联合(compatible association)关系的微生物^[1]。在自然界的长期进化过程中,宿主与内生菌相互选择,互为条件,形成一种共生或互生的关系。其相互作用还受到环境因子的影响,环境条件和宿主基因

型决定内生菌的遗传多样性^[2]。在宿主的影响下,内生菌的不同亚群会在不同的环境中形成。当宿主植物在环境恶化的情况下,它会选择那些增强其抵抗恶劣环境的内生菌亚群的感染^[3]。植物内生菌是一个生态学的概念^[4],特定的内生菌群落结构能够反映其生长环境的特异性,也就是说,植物内生菌的群落结构特性是反映植物生长环境和生活特性的一个动态指标,那么对植物内生菌群落结构的调控就会直接或间接影响到植物的生长、生存。

水葫芦是凤眼莲(*Eichhorniacrassipe*(Mart.)Solms.)的俗称,又名布袋莲、水荷花、假水仙,是外来入侵物种,繁殖、适应环境的能力很强,大量掠夺其他生物的

收稿日期:2007-12-26

基金项目:福建省发改委重大项目(闽发高技[2005]1061号);福建省财政专项-福建省农业科学院科技创新团队建设基金(STIF-Y03)

作者简介:蓝江林(1972—),副研究员,研究方向为生物技术与生物防治。E-mail:lanjianglin2002@yahoo.com.cn

通讯作者:刘 波 E-mail:fzliubo@163.com

生存资源,对生态环境有很大的破坏性,被全世界公认为“十大害草”之一。水葫芦对环境有着其独特的适应力,与其对内生菌种群的选择存在着相互关系。本试验对水葫芦的内生细菌的种类及群落结构特性进行了初步研究,有助于揭示水葫芦对环境适应的机理,为选择科学的防除方法提供研究基础。

本研究对水葫芦内生菌进行分离,并对分离的细菌利用全自动微生物鉴定系统进行鉴定,初步了解水葫芦内生细菌的种类及种群结构,为今后水葫芦的微生物防治研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水葫芦(*Eichhornia crassipe* (Mart.)Solms.),采自福州快安。培养基:根据不同含盐量、不同 pH 值、培养专性差异等条件,共选择 20 种培养基^[9],见表 1。

气相色谱系统:美国 Agilent 6890N 型。包括全自动进样装置、石英毛细管柱及氢火焰离子化检测器。分析软件:美国 MIDI 公司开发的基于微生物细胞脂肪酸成分鉴定的全自动微生物鉴定系统 Sherlock MIS4.5(Microbial Identification System)和 LGS4.5(Library Generation Software)。

1.2 试验方法

1.2.1 样品的制备

水葫芦采自福州快安村。将水葫芦整株用自来水冲洗干净,用吸水滤纸吸干水分,称重。然后整株完全浸入 10%的 KClO₃ 8 min,取出,用无菌水充分淋洗,在灭菌的钵钵中充分研磨,收集匀浆,共 200 mL。梯度稀释至 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵。10⁻² 和 10⁻⁵ 两个浓度每种培养基平板涂布 1 块。10⁻³、10⁻⁴ 两个浓度每种培养基平板涂布 2 块。静置 20 min,30 ℃下倒置培养 24~48 h,统计菌落种类和数量。以组织消毒后用无菌水淋洗的淋洗液作为 CK,如长菌落,则判定研磨液所培养的菌落为非内生菌,丢弃;若 CK 中无菌落,则基本可判定在研磨液中长出的菌落可能是内生菌,纯

化,于 4 ℃的冰箱中保存待用。

1.2.2 内生细菌的纯化

根据菌落形态的不同,挑取不同形态的单菌落分别在 NA 平板以四线法划线培养 48 h。采用 Berger-Parker 的优势度指数对群落优势种进行分析,统计分析各培养基分离的细菌种类数占总分离的细菌种类数的比例。

优势度指数: $D=N/N_r$,其中 N 为各种培养基分离的内生细菌的种类数量, N_r 为分离到内生细菌的全部种类数量。

1.2.3 内生细菌的鉴定

1.2.3.1 脂肪酸提取培养基与试剂

TSBA 培养基:30 g 胰蛋白胍大豆肉汤(Tryptic soy broth,TSB)+15 g 琼脂+1 L 水(TSB 购于 Fisher 公司)。皂化试剂:氢氧化钠 45 g+甲醇 150 mL+水 150 mL;甲基化试剂:6 mol·L⁻¹ 盐酸 325 mL+甲醇 275 mL;萃取试剂:正己烷 200 mL+甲基叔丁基乙醚 200 mL;洗涤试剂:氢氧化钠 10.8 g+水 900 mL(配制方法由 MIDI 公司提供)。

1.2.3.2 脂肪酸的提取

①细菌培养条件:TSBA 平板培养基,四线法划线,培养温度(28±1)℃,培养时间(24±2)h。②获菌:用接种环挑取 3~5 环(约 40 mg 湿重)的菌落置入一个干净、干燥的有螺旋盖的试管中(最佳的获菌区域为第 3 区)。③皂化:加入(1.0±0.1)mL 皂化试剂,拧紧盖子,振荡 5~10 s,放入(95~100)℃的沸水中 5 min,室温冷却,振荡 5~10 s,再水浴 25 min,室温冷却。④甲基化:开盖加入(2.0±0.1)mL 甲基化试剂,拧紧盖子,振荡 5~10 s,(80±1)℃水浴 10 min,移开且快速用流动自来水冷却至室温。⑤萃取:加入(1.25±0.1)mL 的萃取试剂,拧紧盖子,温和混合旋转 10 min,打开管盖,利用干净的移液管取出每个样本的下层水相部分。⑥基本洗涤:加入(3.0±0.2)mL 洗涤试剂,拧紧盖子,温和混合旋转 5 min,打开管盖,利用干净的移液管移出约 2/3 体积的上层有机相到干净的气相色谱

表 1 培养基种类
Table 1 Culture medium

编号	培养基	编号	培养基	编号	培养基	编号	培养基
1	嗜盐菌选择性琼脂培养基	6	细菌培养基(ATCC 573)	11	NA 培养基	16	黄豆芽汁培养基 pH7.2~7.4
2	固氮菌培养基	7	Czapek-Dox Agar(ATCC 312)	12	LB 培养基	17	PDA 培养基
3	乳酸菌培养基	8	碱性营养琼脂培养基(DSM 31)	13	高氏 1 号培养基	18	萨氏培养基
4	根瘤菌培养基	9	纤维细菌合成培养基	14	面粉琼脂培养基	19	甘露醇琼脂
5	氧化亚铁硫杆菌培养基	10	葡萄糖、酵母、淀粉琼脂培养基	15	黄豆芽汁培养基	20	醋酸菌培养基

检体小瓶,用于气相检测。

1.2.3.3 脂肪酸的气相色谱检测

在下述色谱条件下平行分析脂肪酸甲酯混合物标样和待检样本:二阶程序升高柱温,170 ℃起始,5 ℃·min⁻¹升至 260 ℃,而后 40 ℃·min⁻¹升温至 310 ℃,维持 90 s;汽化室温度 250 ℃、检测器温度 300 ℃;载气为氢气(2 mL·min⁻¹)、尾吹气为氮气(30 mL·min⁻¹);柱前压 68.95 kPa;进样量 1 μL,进样分流比 100:1。

1.2.3.4 细菌种类鉴定(脂肪酸鉴定法)

系统根据各组分保留时间计算等链长(ECL)值确定目标组分的存在、采用峰面积归一化法计算各组分的相对含量,再将二者与系统谱库中的标准菌株数值匹配计算相似度(similarity index,SI),从而给出一种或几种可能的菌种鉴定结果。一般以最高 SI 的菌种名称作为鉴定结果,但当其报告的几个菌种的 SI 比较接近时,则根据色谱图特征及菌落生长特性进行综合判断。以脂肪酸混合标样校正保留时间。

2 结果与分析

2.1 培养基对水葫芦内生菌分离的特性

试验结果见表 2、图 1。根据不同含盐量、不同 pH 值、培养专性差异等条件,选择 20 种培养基,共分离

鉴定菌株 56 株。pH 值为 8.7、含盐量为 4%的 1 号嗜盐菌选择性琼脂培养基和 pH 值为 2、含盐量为 5.08% 的 5 号氧化亚铁硫杆菌培养基,分离到内生细菌的数量均为 0。13 号高氏 1 号培养基分离到的内生细菌在 TSB 培养基上生长状况较差,无法进行鉴定,鉴定数量为 0。6 号细菌培养基(ATCC 573)、8 号 Czapek-Dox Agar(ATCC 312)、9 号碱性营养琼脂培养基(DSM 31)均有 1 种菌落形态的内生细菌生长,但在 Sherlock MIS4.5 系统中鉴定相似度指数低于 0.3,系统内无可匹配的结果,故鉴定种类数量为 0。10 号葡萄糖、酵母、淀粉琼脂培养基分离获得内生细菌 9 种,优势度指数为 0.160 7。4 号根瘤菌培养基分离获得内生细菌 7 种,优势度指数为 0.125 0。11 号 NA 培养基分离获得内生细菌 7 种,优势度指数为 0.125 0。16 号黄豆芽汁培养基(pH7.2~7.4)分离获得内生细菌 5 种,优势度指数为 0.089 3。20 号醋酸菌培养基分离获得内生细菌 5 种,优势度指数为 0.089 3。从分离鉴定结果来看,20 种培养基中,pH4~9.7,含盐量小于 4%的培养基均可用于水葫芦内生细菌的分离培养。从分离到内生菌生长数量、菌落种类综合考虑,水葫芦内生菌生长适宜的 pH 值在 6.8~7.2 之间,含盐量小于 4%。

表 2 各培养基分离鉴定内生菌种类的数量
Table 2 Species of endophyte bacteria on 20 culture medium

编号	培养基	pH	含盐量/%	种类/个	优势度指数
1	嗜盐菌选择性琼脂培养基	8.7	4.00	0	0.00
2	固氮菌培养基	7.2	0.13	3	0.053 6
3	乳酸菌培养基	7.0	0.20	3	0.053 6
4	根瘤菌培养基	7.2	0	7	0.125 0
5	氧化亚铁硫杆菌培养基	2.0	5.08	0	0.00
6	细菌培养基(ATCC 573)	4.0	0.20	0	0.00
7	Czapek-Dox Agar(ATCC 312)	5.6	0.50	1	0.017 9
8	碱性营养琼脂培养基(DSM 31)	9.7	0.86	0	0.00
9	纤维细菌合成培养基	7.2	3.07	0	0.00
10	葡萄糖、酵母、淀粉琼脂培养基	7.0	0.80	9	0.160 7
11	NA 培养基	7.2	0.50	7	0.125 0
12	LB 培养基	7.0	0.00	3	0.053 6
13	高氏 1 号培养基	7.3	0.03	0	0.00
14	面粉琼脂培养基	7.4	0.00	2	0.035 7
15	黄豆芽汁培养基	6.8	0.00	3	0.053 6
16	黄豆芽汁培养基 pH7.2~7.4	7.3	0.00	5	0.089 3
17	PDA 培养基	7.1	0.00	3	0.053 6
18	萨氏培养基	7.1	0.00	3	0.053 6
19	甘露醇琼脂	7.1	0.00	2	0.035 7
20	醋酸菌培养基	6.8	2.00	5	0.089 3

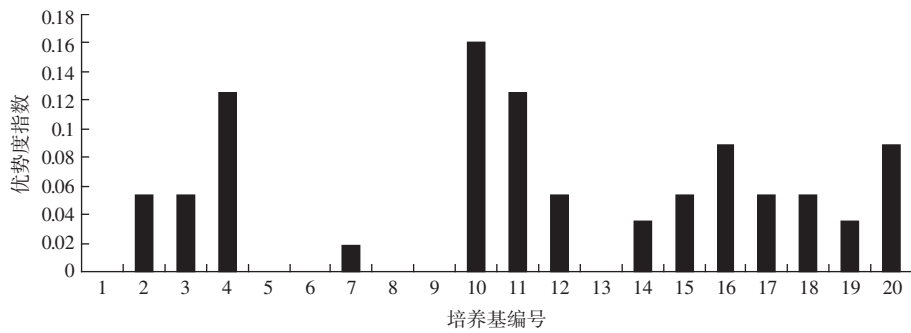


图 1 不同培养基分离水葫芦内生细菌的优势度指数

Figure 1 Dominana index of endophyte bateriaon on culture medium from *Eichhornia crassipe* (Mart.)Solms

2.2 水葫芦内生细菌种类分离与鉴定

试验结果见表 3。水葫芦内生细菌的平均数量约为 $1.21 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。对分离纯化后的 146 株细菌菌株进行鉴定,最终获得 56 种(株)内生细菌。

2.3 水葫芦内生细菌种类结构

试验分离的水葫芦内生细菌种群结构见表 3。56 株细菌分别属于 32 个属。从各属分离到的种类来看,种类最多的是微杆菌属(*Microbacterium*),共有 9 种细菌。其次为假单胞菌属(*Pseudomonas*),共有 7 种细菌。芽孢杆菌属(*Bacillus*)有 5 种细菌。节杆菌属(*Arthrobacter*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)、微球菌属(*Micrococcus*)、泛菌属(*Pantoea*)和红球菌属(*Rhodococcus*)均有 2 种细菌。其余 23 个属各只有 1 种。

2.4 水葫芦内生细菌属的特征描述

根据不同培养基分离到各种细菌的频率,假单胞菌属(*Pseudomonas*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和泛菌属(*Pantoea*)占所分离细菌的 50%以上。生理特性见表 4,菌落形态特性见表 5。

假单胞菌属(*Pseudomonas*)为严格好氧,革兰氏阴性菌,直或微弯杆菌,不产生芽孢,氧化酶阳性或阴性,接触酶阳性。菌落淡黄色,较厚,表面光滑,湿润,有光泽,边缘不圆整。

微杆菌属(*Microbacterium*)为好氧,革兰氏阳性菌,细长、不规则的杆菌,不产生芽孢,接触酶阳性。菌落不透明,有光泽,黄色。

肠杆菌属(*Enterobacter*)为兼性厌氧,革兰氏阴性菌,长杆状,不产生芽孢,氧化酶阴性。菌落表面光滑,边缘整齐,隆起,不透明,浅黄色。

芽孢杆菌属(*Bacillus*)为需氧或兼性厌氧,革兰氏阳性菌,直杆状,产生芽孢,接触酶阳性。菌落圆形,

隆起,淡黄色。

泛菌属(*Pantoea*)为兼性厌氧,革兰氏阴性菌,直杆状,不产生芽孢,氧化酶阴性,接触酶阴性。菌落圆形,半透明,灰白变浅黄色。

3 结论与讨论

植物内生菌广泛存在并具有丰富的生物多样性,目前已经在多种农作物及果树等经济作物种发现的内生菌已超过 129 种(隶属于 54 个属)。其中假单胞菌属(*Pseudomons*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)以及土壤杆菌属(*Agrobacterium*)为最常见属^[6]。本试验选择 20 种培养基对水葫芦的内生细菌进行分离,共得到 32 个属 56 种内生细菌,说明其种群结构是丰富的。从各属分离到的种类来看,最多的是微杆菌属(*Microbacterium*),共有 9 种细菌。其次为假单胞菌属(*Pseudomonas*),共有 7 种细菌。芽孢杆菌属(*Bacillus*)有 5 种细菌。其余 23 个属均有 1 种。根据不同培养基分离到各种细菌的频率,依次为假单胞菌属(*Pseudomonas*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和泛菌属(*Pantoea*),占所分离细菌的 50%以上。不同的培养基,分离的微生物种类优势度指数不同,10 号葡萄糖、酵母、淀粉琼脂培养基优势度指数为 0.160 7,分离获得内生细菌种类最多为 9 种;其次是 4 号根瘤菌培养基和 11 号 NA 培养基的优势度指数为 0.125 0,分离得到的内生菌种类为 7 种;16 号黄豆芽汁培养基(pH7.2~7.4)和 20 号醋酸菌培养基,优势度指数为 0.089 3,分离获得内生细菌 5 种。优势度反映了各物种种群数量的变化情况,是生态学概念,本试验中尝试用来分析各种培养所分离到的内生细菌的种类多样性,在国内外文献中尚未见相关报道。

在内生菌与植物长期协同进化的过程中,二者形

表 3 水葫芦内生细菌种类

Table 3 Endophyte bacteria from *Eichhornia crassipe* (Mart.)Solms

属 genus	菌株 strains	种 species	
不动杆菌属	1	<i>Acinetobacter-calcoaceticus</i>	不动杆菌属醋酸钙种
产碱杆菌属	1	<i>Alcaligenes-xylosoxydans-xylosoxydans</i>	木糖氧化产碱杆菌
水生螺旋菌属	1	<i>Aquaspirillum-autotrophicum</i>	
节杆菌属	2	<i>Arthrobacter-globiformis-GC subgroup B</i> <i>Arthrobacter-ureafaciens</i>	球状节杆菌 烟草节杆菌
芽孢杆菌属	5	<i>Bacillus-coagulans</i> <i>Bacillus-laeovolacticus</i> <i>Bacillus-megaterium-GC subgroup A</i> <i>Bacillus-pumilus-GC subgroup B</i> <i>Bacillus-sphaericus-GC subgroup</i>	凝结芽孢杆菌 孢子型乳酸菌 巨大芽孢杆菌 短小芽孢杆菌 C 球形芽孢杆菌
博德特菌属	1	<i>Bordetella-avium</i>	鸟博德特菌
短波单胞菌属	1	<i>Brevundimonas-vesicularis(Pseudomonas vesicularis)</i>	泡囊短波单胞菌
纤维单胞菌属	1	<i>Cellulomonas-flavigena</i>	产黄纤维单胞菌
棒杆菌属	1	<i>Clavibacter-michiganensis-. Sepedonicum</i>	密执安棒杆菌环腐亚种
棒状杆菌属	2	<i>Corynebacterium-diphtheriae-intermedius</i> <i>Corynebacterium-matruchotii</i>	棒状杆菌中间型亚种 棒状杆菌
短小杆菌属	2	<i>Curtobacterium-flaccumfaciens-betae/oortii</i> <i>Curtobacterium-pusillum</i>	萎蔫短小杆菌糖甜菜致病变种
肠杆菌属	1	<i>Enterobacter-gergoviae</i>	日勾维肠杆菌
爱文菌属	1	<i>Ewingella-americana</i>	美洲爱文菌
库克菌属	1	<i>Kocuria-kristinae</i>	克氏库克菌(克氏微球菌)
微杆菌属	9	<i>Microbacterium-barkeri(Aureobacterium , Corynebacterium)</i> <i>Microbacterium-esteraromaticum</i> <i>Microbacterium-esteraromaticumAureobacterium Flavobacteriu)</i> <i>Microbacterium-flavescens(Aureobacterium , Arthrobacter)</i> <i>Microbacterium-hominis</i> <i>Microbacterium-imperiale</i> <i>Microbacterium-lacticum-GC subgroup A</i> <i>Microbacterium-liquefaciens(Aureobacterium liquefaciens)</i> <i>Microbacterium-saperdae(Aureobacterium , Curtobacterium)</i>	(浅黄金杆菌)
微球菌属	2	<i>Micrococcus-luteus-GC subgroup B(includes ATCC 9341)</i> <i>Micrococcus-luteus-GC subgroup C</i>	藤黄微球菌 藤黄微球菌
涅斯捷连科氏菌属	1	<i>Nesterenkonia-halobia(Micrococcus halobius)</i>	盐生内斯特兰克菌
奴卡菌属	1	<i>Nocardia-nova</i>	新星诺卡菌
新鞘脂菌属	1	<i>Novosphingobium-capsulatum(Sphingomonas ,Flavo. capsulatum)</i>	少动鞘氨醇杆菌
类芽胞杆菌属	1	<i>Paenibacillus-macerans(Bacillus)</i>	浸麻芽孢杆菌
泛菌属	2	<i>Pantoea-agglomerans-GC subgroup C (Enterobacter)</i> <i>Pantoea-ananatis/Erwinia uredovora(E.ananatis)</i>	成团泛菌(肠杆菌属) 成团泛菌/噬夏孢欧文氏菌
Paucimonas	1	<i>Paucimonas-lemoignei</i>	
片球菌属	1	<i>Pediococcus-acidilactici (MRSA)</i>	嗜酸片球菌
发光杆菌属	1	<i>Photorhabdus-luminescens-luminescens(Xenorhabdus)</i>	无色杆菌(嗜线虫杆菌属)
假单胞菌	7	<i>Pseudomonas-aeruginosa</i> <i>Pseudomonas-agarici</i> <i>Pseudomonas-fluorescens-biotype A</i> <i>Pseudomonas-putida-biotype A</i> <i>Pseudomonas-putida-biotype B</i> <i>Pseudomonas-putida-biotype B</i> <i>Pseudomonas-vancouverensis</i>	绿脓杆菌 伞菌假单胞菌 荧光假单胞菌同型小种 A 恋臭假单胞菌同型小种 A 恋臭假单胞菌同型小种 B 恋臭假单胞菌同型小种 B*
土壤杆菌属	1	<i>Rhizobium-rubi (Agrobacterium)</i>	根瘤土壤杆菌
红球菌属	2	<i>Rhodococcus-erythropolis/R.globerulus/N.globerula</i> <i>Rhodococcus-rhodnii</i>	红串红球菌 红色红球菌
罗氏菌属	1	<i>Rothia-dentocariosa</i>	龋齿罗氏菌
葡萄球菌属	1	<i>Staphylococcus-epidermidis-GC subgroup B</i>	表皮葡萄球菌
贪噬菌属	1	<i>Variovorax-paradoxus-GC subgroup A(Alcaligenes paradoxus)</i>	贪噬菌(争论产碱菌)
黄色杆菌属	1	<i>Xanthobacter-flavus</i>	
耶尔森氏菌属	1	<i>Yersinia-pseudotuberculosis-GC subgroup A</i>	假结核耶尔森菌

表 4 水葫芦主要内生细菌生理特征

Table 4 Physiologic characteristics of endophyte bacteria from <i>Eichhornia crassipe</i> (Mart.)Solms						
属 genus	形态 shape	革兰氏反应 G+/G-	芽孢 Spore	接触酶 contact enzyme	氧化酶 Oxidase	需氧性 oxygen demand
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	直或微弯的杆菌	-	-	+	+/-	好氧
微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	细长、不规则杆菌	+	-	+		好氧
肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	长杆菌	-	-		-	好氧/兼性厌氧
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	直杆状	+	+	+		好氧/兼性厌氧
泛菌属 <i>Pantoea</i>	直杆状	-	-	-	-	兼性厌氧

表 5 水葫芦主要内生细菌菌落形态特征

Table 5 Morphological characteristics of endophyte bacteria colony from <i>Eichhornia crassipe</i> (Mart.)Solms					
属 genus	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	泛菌属 <i>Pantoea</i>
菌落 colony	淡黄色,较厚,表面光滑,湿润,有光泽,边缘不圆整。	不透明,有光泽,黄色。	表面光滑,边缘整齐,隆起,不透明,浅黄色	圆形,隆起,淡黄色	圆形,半透明,灰白变浅黄色
菌落 colony					

成了稳定的生态关系，内生菌-宿主之间处于动态的平衡。植物体为内生菌提供生长必需的能量和营养，内生菌又可通过自身的代谢产物或借助于信号传导作用对植物体产生影响。研究表明内生菌能够促进植株生长^[7],许多内生菌可产生 IAA、吲哚乙腈以及细胞激动素等植物生长激素。还可增进宿主植物对氮、磷等营养元素的吸收。此外内生菌可提高植株对环境胁迫的抗性^[8]。

一般认为,植物内生细菌作为植物微生态系统中天然组成成分,它们可能促进了寄主植物对环境的适应,加强了系统的生态平衡^[9]。这种相互依存、互相制约的关系,是内生细菌应用研究的基础。目前利用内生菌作为新的生防因子是目前生防研究的一个热点,研究主要集中在内生菌作为病害防治、促生因子等方面^[10-13]。在本试验所分离到的内生菌已经有许多属的菌株作为生防菌加以开发利用。如假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[10,14-15],芽孢杆菌(*Bacillus*)^[7,16],泛菌属 (*Pantoea*)^[16]等。

植物内生菌的分布与群落结构不仅与植物的种类、基因型有关,还与植物的生长阶段、环境条件有关。不同的植物、同种植物不同的生长阶段、不同的生长环境等分离出的内生菌种类菌不同,表现出复杂的多态性。那么,这样的多态性差异可以成为物种生长环境的一种特殊标记。也就是说,在某种环境条件下

生长的同种寄主植物,其内生菌的种类或菌落结构一定有相似的特性;反之,具有相似内生菌种类或群落结构特性的寄主植物,其生长环境也是类似的。

水葫芦为外来入侵物种,在我国南方水域已泛滥成灾,其内生细菌作为水葫芦微生态系统中天然组成成分,独特的群落结构在营养竞争、生态位竞争、促进抗逆反应等方面促进了水葫芦对环境的适应,从而加强水葫芦和生存环境系统间的生态平衡,使水葫芦更能适应环境而获得更好的生长。了解了水葫芦内生菌的种类及群落结构特性,一方面,我们可以利用这种特性标记其外部生长环境,动态监测水葫芦生长环境的变化;另一方面,从内生菌群落结构的改变而干扰或控制水葫芦的过度生长泛滥,不失为水葫芦防治的新思路。本研究结果所分离到的水葫芦内生细菌共 32 个属 56 种,呈现出多样性和复杂性,每个种属的内生细菌在群体结构中的作用如何,又是何影响其寄主生长,如何利用这些生防因子进行水葫芦进行防控等,都是要继续深入研究的课题。

参考文献:

[1] Di Fiore. Endophytic bacteria their possible role in the host plant[C]//Ist-van F, et al. eds. Azospieillum VI and related microorganisms: Genetics. Physiology, Ecology. Heidelberg: Springer, 1995.169.

[2] Ahlholm J U, Helander M, Henriksson J, et al. Environmental conditions and host genotype direct genetic diversity of *Venturia ditricha*, a fungal

- endophyte of birch trees[J]. *Evolution Int J Org Evolution*, 2002, 56(8): 1566–1573.
- [3] Siciliano S D, Fortin N, Mihoc A, et al. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(6): 2469–2475.
- [4] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题[J]. 生态学杂志, 2004, 23(2): 86–91.
- WEN Cai-yi, WU Yuan-hua, TIAN Xiu-ling. Recent advances and issues on the endophyte [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2004, 23(2): 86–91.
- [5] 146 种培养基配方(细菌培养基和植物培养基)[EB/OL]. <http://www.bioon.com/experiment/plant2/159568.shtml>
- [6] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881–892.
- ZOU Wen-Xin, TAN Ren-Xiang. Biological and chemical diversity of endophytes and their potential applications[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(9): 881–892.
- [7] 马 艳, 赵江涛, 常志州, 等. 西瓜内生枯草芽胞杆菌 BS211 的拮抗活性及盆栽防效[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(4): 388–393.
- MA Yan, ZHAO Jiang-tao, CHANG Zhi-zhou, et al. Antagonistic activity of an endophytic strain BS211 of *Bacillus subtilis* and its biocontrol efficacy against *Fusarium wilt* of watermelon[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2006, 22(4): 388–393.
- [8] Li Cheng-sen. Advances in plant sciences[M]. Vol. 2. Beijing: China Higher Education Press, 1999. 183–190. (in Chinese)
- [9] 王万能, 全学军, 谢应宇. 植物病害生物防治与微生态学[J]. 中国植保导刊, 2005, 25(3): 7–9.
- WANG Wan-neng, Quan Xue-jun, XIE Ying-yu. Biological control of plant diseases and micro-ecology [J]. *China Plant Protection*, 2005, 25(3): 7–9.
- [10] Ravel F, Courty C, Coret A, et al. Beneficial effects of *Neotyphodium lolii* on the growth and the water status in perennial ryegrass cultivated under nitrogen deficiency or drought stress[J]. *Agronomie*, 1997, 17: 173–181.
- [11] 何 红, 蔡学清, 兰成忠, 等. 辣椒内生菌 BS-2 在白菜体内的定殖、促生和防炭疽病作用[J]. 植物保护学报, 2004, 31(4): 347–352.
- HE Hong, CAI Xue-qing, LAN Cheng-zhong, et al. Colonization, promotion growth and biocontrol for anthracnose of endophytic bacterium BS-2 from *Capsicum annuum* in cabbage [J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2004, 31(4): 347–352.
- [12] 何 红, 蔡学清, 洪永聪, 等. 内生菌 BS-2 对蔬菜立枯病的抑制效果[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2004, 33(1): 17–20.
- HE Hong, CAI Xue-qing, HONG Yong-cong, et al. Inhibition of *Bacillus subtilis* BS-2 on vegetable damping-off disease [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2004, 33(1): 17–20.
- [13] 傅正擎, 夏正俊, 吴霭民, 等. 内生菌对棉花黄萎病病菌及毒素的抑制作用和对棉花的促生作用[J]. 植物病理学报, 1999, 29(4): 374–375.
- FU Zheng-qing, XIA Zheng-Jun, WU Ai-min, et al. Inhibition of mycelial growth and toxin production of *Verticillium dahliae* and growth-promotion of cotton by endophytic bacteria[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1999, 29(4): 374–375.
- [14] 刘国奇, 蒋如璋. 韭菜根际荧光假单胞菌株的分离和初步研究[J]. 微生物学通报. 1999, 26(3): 189–192.
- LIU Guo-qi, JIANG Ru-zhang. Isolation and preliminary study on *Pseudomonas fluorescens* rhizobacterial strain from Chinese chives[J]. *Microbiology*, 1999, 26(3): 189–192.
- [15] 黎起秦, 谢义灵, 林 伟, 等. 广西番茄内生细菌的多样性和数量动态[J]. 生物多样性, 2006, 14(6): 534–540.
- LI Qi-qin, XIE Yi-ling, LIN Wei, et al. Distribution and diversity of endophytic bacteria in tomato plants from Guangxi [J]. *Biodiversity Science*, 2006, 14(6): 534–540.
- [16] 洪永聪, 胡方平, 黄晓南. 成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)对稻谷的致病性[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2002, 31(1): 1–3.
- HONG Yong-cong, HU Fang-pin, HUANG Xiao-nan. Pathogenicity of *Pantoea agglomerans* on rice seed[J]. *Journal of Fujian Agricultural and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2002, 31(1): 1–3.