

棉花内生细菌数量动态及其对棉花黄、枯萎病菌的拮抗作用

李春宏¹, 邓渊钰³, 赵明文^{2*}, 唐灿明^{1*}, 李顺鹏², 吕海伟²

(南京农业大学¹, 农学院², 生命科学学院, 南京 210095)

(³江苏农科院苏科农化有限公司, 南京 210014)

摘要 【目的】了解棉花内生细菌数量动态, 从棉花中获得拮抗黄、枯萎病菌的内生细菌资源【方法】对棉花根、茎、叶表面灭菌, 采用稀释平板法分离棉花内生细菌; 通过对峙培养法体外鉴定分离的棉花内生细菌对棉花黄、枯萎病菌的拮抗作用, 并对拮抗棉花黄、枯萎病菌的内生细菌 16S rDNA 序列进行了分析【结果】棉花根中内生细菌的数量显著高于茎、叶; 根的苗期总体内生细菌数量低于开花期、吐絮期, 茎、叶中的内生细菌数量在不同生育期呈现一定的波动性, 但趋势性不明显; 6 个棉花品种根中内生细菌平均数量差异并不显著, 但茎、叶中内生细菌数量不同品种间呈现一定程度差异。平板对峙鉴定显示: 棉花根中具有较高比例的拮抗棉花黄、枯萎病菌的内生细菌, 拮抗强致病落叶型黄萎病菌(V107)的内生细菌比例不仅低于枯萎病菌(F108), 而且低于非落叶型黄萎病菌(V396)。同时拮抗棉花黄、枯萎病菌的内生细菌有 44 株, 16S rDNA 分子序列分析表明: 这些拮抗内生细菌的类群包括了两个门(变形杆菌门、拟杆菌门) 8 个属, 其中 10 个菌株与已报道菌株相似性 < 97%, 可能是新的种(属), 优势种群为肠杆菌属(18 株)、泛菌属(15 株)。【结论】棉花的品种、生育期与器官影响棉花内生细菌数量, 棉花拮抗黄、枯萎病菌的内生细菌具有优势种群, 且具多样性。

关键词: 棉花; 内生细菌; 16S rDNA; 棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae* Kleb); 棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporium* f. sp. *Vasinfectum*)

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)09-1196-07

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和器官内部的细菌。被内生细菌感染的宿主植物(至少是暂时)不表现出外在病症, 可通过组织学方法或从严格表面消毒的植物组织中分离, 或从植物组织内直接扩增出微生物 DNA 的方法来证明其内生^[1]。内生细菌主要分布于细胞间与维管束组织, 广泛存在于植物的果实、种子、胚、根、茎、叶中^[2]。内生细菌具有能增强宿主植物抗逆性的特性, 研究者已经从棉花、水稻、小麦、茄子、马铃薯、可可等作物中筛选出许多拮抗病原菌的内生细菌, 并由此开发出一些植物生防菌剂^[3]。

国内外已经对棉花的内生菌的种类、数量动态, 棉花抗病性的诱导进行了一些研究。Misaghi 等从两个栽培品种中分离到 6 个内生细菌种群, 其中欧氏杆菌为其优势菌种^[4]。McInroy 等对棉花的根、茎、叶柄、铃进行了数量动态调查^[5-7], 并从棉花的根、茎中分离到 32 个属的内生细菌^[8], Pamela 和 Kloeppe(2002)研究了具有枯萎病不同抗性的棉花品种对棉花苗期内生菌种类、数量的影响^[9]; 国内学者也对棉花内生细菌的数量、诱导抗性、定殖及其抗性机理^[10-11]进行一些研究。但棉花内生细菌的数量动态规律还需深入与完善, 也缺乏了解棉花内生细菌对棉花主要病害——棉花黄、枯萎病生防潜力

* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-84395602; E-mail: cmtang@yahoo.cn(唐灿明), mwzhao@njau.edu.cn(赵明文)

作者简介: 李春宏(1971-), 男, 江苏盐城人, 博士研究生, 从事棉花遗传育种。E-mail: nnlichunhong@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-03-09; 修回日期: 2009-05-14

的研究。作者通过对棉花4个栽培种关键生长期根、茎、叶的内生细菌数量动态调查和体外内生细菌拮抗黄、枯萎病菌的鉴定,以期为通过内生细菌防治棉花病害提供必要的试验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 培养基:胰蛋白大豆琼脂培养基^[6],马铃薯琼脂培养基^[10]。

1.1.2 棉花品种:①海岛棉:海岛20,海岛16;②陆地棉:常抗棉,苏棉16;③亚洲棉:亚7113;④草棉:草7005。

1.1.3 病原菌株:棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae* Kleb),强致病落叶型菌株V107和中等致病非落叶型菌株V396;棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporium* f. sp. *Vasinfestum*),菌株F108。供试菌株均由江苏农科院植保所提供。

1.1.4 主要试剂和仪器:胰蛋白大豆琼脂培养基(BD,USA),PCR引物(Invitrogen,上海),细菌基因组DNA小量纯化试剂盒、Ex Taq DNA聚合酶、dNTP、Marker DL2000(TaKaRa公司),Thermal Cycler PCR仪(ABI,USA)。

1.2 棉花内生细菌的分离

2007年5月棉花种植于南京农业大学试验农场,于苗期(6~7片真叶)、开花期和吐絮期将健康的棉花整株取回实验室,用自来水轻轻冲掉泥土,洗净并凉干。根、茎取样按照McInroy和Klopper^[8]的方法进行,叶取倒4~5叶,每个试验3次重复。根、茎、叶样品表面灭菌,内生细菌分离、计数、纯化、保藏参考文献^[6,8]进行,菌落的计数转换成对数值 \log_{10} cfu/g-fw(colony-forming units per gram fresh weight)。

1.3 内生细菌体外抑菌作用测定

内生细菌体外抑菌作用采用异步培养法^[10]测定。

1.4 拮抗黄、枯萎病菌的内生细菌分子生物学鉴定

1.4.1 细菌基因组的抽提依据细菌基因组提取试剂盒说明书进行。

1.4.2 PCR扩增:用扩增细菌16S rDNA的保守引物5'-GGCCTAACACATGCAAGTC-3'(forward)和5'-TACGGYTACCTTGTTTACGAC-3'(reverse)^[12](Moore et al,2006),或者5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(forward)和5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'(reverse)^[13]来扩增拮抗菌株的16S rDNA,扩增片段

长约1.2~1.4 kb。PCR反应体系和反应条件参照文献^[12]进行。扩增产物在1.2%琼脂糖凝胶(终浓度0.5 μ g/mL溴化乙锭)上电泳。

1.4.3 序列分析:PCR产物直接用于测序,PCR产物纯化和测序反应由上海Invitrogen公司完成。测定的序列与Ribosomal Database Project数据库的中序列比对。

2 结果

2.1 棉花内生菌的数量动态

对6个不同棉花品种根、茎、叶在苗期(6~7叶)、开花期、吐絮期的内生细菌数量测定,其结果见表1与表2。Duncan新复极差法检验结果表明($P=0.05$)棉花的品种、生育期与器官,影响棉花内生细菌的数量动态。

2.1.1 棉花不同器官的内生细菌数量动态(表1):根中内生细菌数量波动的幅度在 \log_{10} 4.88~6.79 cfu/g-fw之间,总均值 \log_{10} 5.59cfu/g-fw,茎和叶波动的幅度在 \log_{10} 2.97~5.00 cfu/g-fw和 \log_{10} 2.39~4.60 cfu/g-fw之间,总均值分别为 \log_{10} 3.79,3.70 cfu/g-fw。根中内生细菌的数量显著高于茎和叶片,这种趋势表现在6个棉花品种取样的不同生育期。

2.1.2 棉花不同生育期的内生细菌数量动态:在根中,苗期内生细菌数量波动的幅度在 \log_{10} 4.88~5.55 cfu/g-fw之间,均值5.25cfu/g-fw;开花期数量波动的幅度在 \log_{10} 4.72~6.19 cfu/g-fw之间,均值 \log_{10} 5.32cfu/g-fw;吐絮期数量波动的幅度在 \log_{10} 5.24~6.79 cfu/g-fw之间,均值 \log_{10} 5.98cfu/g-fw。除了亚7113开花期的内生细菌数量低于苗期外,棉花根中苗期的内生细菌数量低于开花期与吐絮期。在茎中,苗期内生细菌数量波动的幅度在 \log_{10} 3.29~4.50 cfu/g-fw之间,均值 \log_{10} 3.88 cfu/g-fw;开花期数量波动的幅度在 \log_{10} 2.97~5.00 cfu/g-fw之间,均值 \log_{10} 3.74cfu/g-fw;吐絮期数量波动的幅度在 \log_{10} 3.04~4.55 cfu/g-fw之间,均值 \log_{10} 3.76cfu/g-fw。在叶中,苗期内生细菌数量波动的幅度在 \log_{10} 2.93~4.13 cfu/g-fw之间,均值 \log_{10} 3.71 cfu/g-fw;开花期数量波动的幅度在 \log_{10} 2.47~4.60 cfu/g-fw之间,均值 \log_{10} 3.59cfu/g-fw;吐絮期数量波动的幅度在 \log_{10} 2.39~4.57cfu/g-fw之间,均值 \log_{10} 3.74cfu/g-fw。棉花不同生育期茎、叶中的内生细菌数量波动不一,趋势性不明显。

表 1 6 个棉花品种 3 个生育期根、茎、叶中内生细菌分离的菌株数及数量显著性检验(mean log cfu/g-fw)

Table 1 Numbers and mean populations (Log₁₀ cfu/g-fw) of endophytic bacteria in root ,stem ,leaf at three stages for six cotton cultivars

Cotton cultivar	Stage	Root		Stem		Leaf	
		EBI	EBP	EBI	EBP	EBI	EBP
Haidao20	seedling	19	5.32b	23	4.03a	18	4.02a
	flowering	25	5.74a	27	4.16a	8	2.47b
	maturing	37	6.00a	31	4.55a	14	2.39b
	mean		5.68		4.24		2.96
Haidao16	seedling	24	5.24b	12	4.06a	23	3.61b
	flowering	26	6.19a	18	3.35ab	15	3.68b
	maturing	49	5.36b	26	3.04b	20	4.57a
	mean		5.59		3.48		3.95
Sumian16	seedling	17	4.88b	23	3.29b	11	4.13a
	flowering	41	5.05b	19	3.02b	29	3.18b
	maturing	31	6.79a	30	4.13a	35	4.08a
	mean		5.57		3.48		3.8
Changkan	seedling	25	5.32b	19	4.04a	26	3.64b
	flowering	23	6.08a	23	2.97b	7	4.60a
	maturing	45	5.44b	33	3.26ab	28	4.27ab
	mean		5.61		3.42		4.17
Cao7005	seedling	18	5.48a	24	4.50a	18	2.93b
	flowering	26	5.57a	14	5.00a	21	4.26a
	maturing	32	5.61a	32	4.36a	15	2.70b
	mean		5.55		4.62		3.3
Ya7113	seedling	33	5.25b	12	3.37a	18	3.97a
	flowering	25	5.32b	30	3.91a	22	3.69a
	maturing	41	5.98a	21	3.23a	24	4.46a
	mean		5.52		3.50		4.04

EBI ,numbers of endophytic bacteria isolate ;EBP ,populations (Log₁₀ cfu/g-fw) of endophytic bacteria . Means followed by the same letter are not significantly different at the 0.05 probability level according to Duncan 's multiple range test .

2.1.3 棉花不同品种间的内生细菌数量动态(表 2) :在根中 ,虽同一品种内不同生育期间的内生细菌数量存在显著差异 ,但 6 个棉花品种根中内生细菌总体数量的平均值在 log₁₀ 5.52 ~ 5.58 cfu/g-fw 之间 ,品种之间的差异并不显著。在茎、叶中 ,棉花不同品种间的内生细菌数量呈现一定程度的差异 ,茎中内

生细菌数量以草 7005 为最高(log₁₀4.62 cfu/g-fw) ,海岛 20 次之(log₁₀ 4.24 cfu/g-fw) ,显著高于其它品种 ;叶中内生细菌数量以常抗棉为最高(log₁₀ 4.17 cfu/g-fw) ,与亚 7113、海岛 16、苏棉 16 差异不显著 ,显著高于草棉(log₁₀3.30 cfu/g-fw) ,海岛 20(log₁₀2.96 cfu/g-fw) 。

表 2 6 个棉花品种根、茎、叶中的内生细菌总的分离菌株数及数量显著性检验(mean log cfu/g-fw)汇总

Table 2 Overall numbers and mean population (Log₁₀ cfu/g-fw) of endophytic bacteria from root ;stem ;leaf of six cotton cultivars at three development stages

Cotton cultivar	Root		Stem		Leaf	
	EBI	EBP	EBI	EBP	EBI	EBP
Haidao20	81	5.68a	81	4.24a	40	2.96b
Haidao16	99	5.59a	56	3.48b	58	3.95a
Sumian16	89	5.57a	72	3.48b	75	3.80a
Changkan	93	5.61a	75	3.42b	61	4.17a
Cao7005	76	5.55a	70	4.62a	54	3.30b
Ya7113	99	5.52a	63	3.50b	64	4.04a
overall mean		5.59		3.79		3.70
Total	537		417		352	

EBI ,numbers of endophytic bacteria isolate ;EBP ,populations (Log₁₀ cfu/g-fw) of endophytic bacteria . Means followed by the same letter are not significantly different at the 0.05 probability level according to Duncan's multiple range test .

2.2 内生细菌的体外拮抗鉴定

根据内生细菌的颜色、形态、大小从 6 个棉花品种的根、茎、叶中分别分离 537、417、352 个菌株(表

2) ,共 1306 个。平板对峙鉴定(表 3)显示 :根、茎、叶中显著拮抗(抑菌半径大于 2mm) V107、V396、F108 的菌株分别为 68、185、170、5、29、32、9、12、15 个 ,累

计拮抗 V107、V396、F108 菌株数分别为 82、226、217 个。根中拮抗 V107、V396、F108 菌株比例为 12.66%、34.45%、31.66% ;茎中拮抗 V107、V396、F108 菌株比例为 1.20%、6.95%、7.67% ;叶中拮抗

V107、V396、F108 菌株比例为 2.56%、3.41%、4.26%。以上结果表明根中拮抗内生细菌远高于茎和叶,拮抗 V107 的内生细菌低于 V396 和 F108。

表 3 内生细菌体外拮抗 V107、V396 和 F108 的鉴定

Table 3 Antagonism toward V107, V396 and F108 of endophytic bacteria

Tissue	Total isolate	Antagonizing toward V107		Antagonizing toward V396		Antagonizing toward F108		Antagonizing toward V107, V396, F108	
		EBI	%	EBI	%	EBI	%	EBI	%
root	537	68	12.66	185	34.45	170	31.66	39	7.26
stem	417	5	1.20	29	6.95	32	7.67	3	0.72
leaf	352	9	2.56	12	3.41	15	4.26	2	0.57
overall total	1306	82	6.28	226	17.3	217	16.62	44	3.37

EBI, numbers of endophytic bacteria isolate.

2.3 拮抗黄、枯萎病菌的内生细菌类群

体外同时拮抗黄(V107、V396)、枯(F108)萎病菌的内生细菌共 44 株,根、茎、叶中分别为 39、3、2 株(表 3)。对这些拮抗内生细菌进行 16S rDNA 序列测定,GenBank 序列号为:FJ205653-FJ205691、FJ644569-FJ644573。经 16S rDNA 序列相似性分析(表 4),这些拮抗内生细菌属于细菌域变形杆菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)中的 8 个属。变形杆菌门占据绝对优势地位,包括了 43 个菌株,变形杆菌门又以 γ 亚群(Gammaproteobacteria)为最多,占 42 个菌株, α 亚群(Alphaproteobacteria)仅 1 株,拟杆菌门 1 株。肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)与泛菌属(*Pantoea* sp.)为优势种群,有 10 株与已报道的可培养菌株的序列相似性低于 97%(从 91.0%到 96.9%之间),这些菌株可能是新的属或种^[14],其分类地位有待于进一步的鉴定。各鉴定属结果描述如下。

肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)具有最多的拮抗内生菌株,共 18 株,存在于所有棉花品种之中。与已报道的菌株 16S rDNA 序列同源性在 97% 上有 11 株, S04、HA01、HB04、C04、C03、C09 与已报道的菌株 16S rDNA 序列同源性相似性分别为 91.9%、94.0%、95.5%、96.1%、96.7%、96.9% 株。泛菌属(*Pantoea* sp.)是除肠杆菌属外具有最多的拮抗内生菌株,共 15 株,与已报道的菌株序列同源性都在 97% 以上,其中 11 株与 *Pantoea agglomerans* 同源性在 97.4-100.0% 之间,在泛菌属中出现频率最高。欧文氏菌属(*Erwinia* sp.)共 6 株,都与 *Erwinia* sp. CU208 同源,但与已报道的菌株相似度除 S03 为 99.5%,其余菌株在 97% 以下。

除了以上出现频率较高的菌以外,还分离到稳杆菌属(*Empedobacter* sp.)、根瘤菌属(*Rhizobium* sp.)

沙雷氏菌属(*Serratia* sp.)、埃希氏菌属(*Escherichia* sp.)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.)各 1 个菌株,都与已报道的菌株序列相似度高于 97% 以上。

3 讨论

棉花内生细菌数量动态分析结果表明,棉花的品种、生育期与器官影响棉花内生细菌的数量。不同时期取样,根内内生菌的数量都高于茎。这与已报到水稻^[15]、番茄^[16]根内的内生细菌多于茎、叶相一致。刘云霞等^[14]在水稻体内细菌的动态研究中认为,除受组织生理、生态特性影响外,根系统是内生细菌进入植物的入口,因为此处有较多植物次生根区生根、机械损伤及病虫危害造成的伤口,因此聚集的内生细菌较多。

总体上,棉花根中内生细菌数量苗期低于开花期与吐絮期,茎、叶中的内生菌数量随生育期进程趋势性不明显。这与黎起秦等^[23]发现番茄内生细菌的总量从苗期到花期数量上升,而从结果期到成熟期数量逐渐下降,McInroy 等^[6]发现甜玉米与棉花根、茎整个生育期内生细菌数量在 \log_{10} 4 到 8 cfu/g-fw, 0 到 7 cfu/g-fw 之间波动不尽相同。6 个棉花品种根中内生细菌平均数量差异并不显著,茎、叶中内生细菌数量呈现一定程度差异。Pamela 和 Klopper^[9]发现不同棉花品种的总内生细菌数量存在差异。前人研究发现宿主植物的基因型、发育期,不同地区的土壤和耕作方式,气候条件等因子^[9,16-17]影响内生细菌群体数量。不同的宿主植物的基因型、发育期及其它生物与非生物因素引起植株具有不同的形态特征和生理状态,因而变化的内生细菌生存的小生境可能导致内生细菌数量的动态变化。我们在开花期、吐絮期取样时,本地处于高温

表 4 拮抗枯、黄萎病内生细菌菌株的 16S rDNA 序列分析

Table 4 Partial 16S rDNA sequence identification of BAEB

Source	Isolate (accession number)	Nearest relative(accession number)	SI/ %	Microbial group affiliation
Changkan ,root	CK1X FJ205673)	<i>Empedobacter brevis</i> (T) LMG 4011(AM177497)	100.0	<i>Empedobacter</i> sp.
Changkan ,root	CK01(FJ205662)	<i>Enterobacter</i> sp. EB44(FJ194525)	100.0	<i>Enterobacter</i> sp.
Cao7005 ,root	C0X FJ205679)	<i>Enterobacter</i> sp. EB44(FJ194525)	100.0	<i>Enterobacter</i> sp.
Sumian16 ,root	S01(FJ205676)	<i>Enterobacter</i> sp. EB44(FJ194525)	100.0	<i>Enterobacter</i> sp.
Ya7113 ,root	Y0X FJ205691)	<i>Enterobacter</i> sp. EB44(FJ194525)	98.6	<i>Enterobacter</i> sp.
Sumian16 ,root	S0X FJ205677)	<i>Enterobacter</i> sp. AAJX(EF599680)	99.6	<i>Enterobacter</i> sp.
Sumian16 ,stem	S04(FJ644573)	<i>Enterobacter</i> sp. CRR1X(EU169570)	91.9	<i>Enterobacter</i> sp.
Cao7005 ,root	C06(FJ205683)	<i>Enterobacter</i> sp. G1(DQ923474)	99.1	<i>Enterobacter</i> sp.
Cao7005 ,root	C0X FJ205680)	<i>Enterobacter</i> sp. G-2-10-X(EF102826)	96.7	<i>Enterobacter</i> sp.
Changkan ,root	CK11(FJ205672)	<i>Enterobacter</i> sp. GIST-NKstX(EF489445)	99.0	<i>Enterobacter</i> sp.
Cao7005 ,root	C04(FJ205681)	<i>Enterobacter</i> sp. N-5-10(EF102824)	96.1	<i>Enterobacter</i> sp.
Haidao20 ,root	HA0X FJ205654)	<i>Enterobacter</i> sp. 2B2X(EU693562)	100.0	<i>Enterobacter</i> sp.
Haidao20 ,root	HA0X FJ205655)	<i>Enterobacter</i> sp. 2B2X(EU693562)	99.8	<i>Enterobacter</i> sp.
Haidao20 ,root	HA01(FJ205653)	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. cloacae B7(FJ527682)	94.0	<i>Enterobacter</i> sp.
Changkan ,root	CK04(FJ205665)	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. EB89(FJ194527)	100.0	<i>Enterobacter</i> sp.
Haidao16 ,root	HB04(FJ205661)	<i>Enterobacter asburiae</i> G1(EU301774)	95.5	<i>Enterobacter</i> sp.
Changkan ,root	CK14(FJ205675)	<i>Enterobacter asburiae</i> G1(EU301774)	99.4	<i>Enterobacter</i> sp.
Cao7005 ,root	C09(FJ205686)	<i>Enterobacter asburiae</i> G1(EU301774)	96.9	<i>Enterobacter</i> sp.
Haidao20 ,root	HA04(FJ205656)	<i>Enterobacter ludwigii</i> WAB1894(AM184235)	99.0	<i>Enterobacter</i> sp.
Sumian16 ,stem	S0X FJ644571)	<i>Erwinia</i> sp. CU20X(EF522135)	99.5	<i>Erwinia</i> sp.
Changkan ,root	CK0X FJ205666)	<i>Erwinia</i> sp. CU20X(EF522135)	94.6	<i>Erwinia</i> sp.
Changkan ,root	CK06(FJ205667)	<i>Erwinia</i> sp. CU20X(EF522135)	94.4	<i>Erwinia</i> sp.
Haidao20 ,root	HA0X FJ205657)	<i>Erwinia</i> sp. CU20X(EF522135)	93.4	<i>Erwinia</i> sp.
Haidao16 ,root	HB01(FJ205658)	<i>Erwinia</i> sp. CU20X(EF522135)	93.4	<i>Erwinia</i> sp.
Haidao20 ,stem	HA06(FJ644572)	<i>Erwinia</i> sp. CU20X(EF522135)	91.0	<i>Erwinia</i> sp.
Cao7005 ,root	C0X FJ205682)	<i>Escherichia coli</i> RGR1X(DQ118017)	98.5	<i>Escherichia</i> sp.
Ya7113 ,root	Y01(FJ205690)	<i>Klebsiella oxytoca</i> ZFJ-11(EU931550)	99.4	<i>Klebsiella</i> sp.
Changkan ,root	CK0X FJ205669)	<i>Pantoea</i> sp. 09230X(EF522820)	100.0	<i>Pantoea</i> sp.
Changkan ,root	CK0X FJ205668)	<i>Pantoea</i> sp. 09230X(EF522820)	100.0	<i>Pantoea</i> sp.
Changkan ,root	CK0X FJ205664)	<i>Pantoea</i> sp. 09230X(EF522820)	98.7	<i>Pantoea</i> sp.
Changkan ,root	CK0X FJ205663)	<i>Pantoea agglomerans</i> WAB192X(AM184266)	99.4	<i>Pantoea</i> sp.
Cao7005 ,root	C0X FJ205684)	<i>Pantoea agglomerans</i> 8635X(AF157688)	100.0	<i>Pantoea</i> sp.
Changkan ,root	CK0X FJ205670)	<i>Pantoea agglomerans</i> ChDC YPI(AY691543)	99.4	<i>Pantoea</i> sp.
Changkan ,root	CK1X FJ205674)	<i>Pantoea agglomerans</i> WAB187X(AM184212)	99.6	<i>Pantoea</i> sp.
Cao7005 ,root	C1X FJ205689)	<i>Pantoea agglomerans</i> WAB187X(AM184212)	99.6	<i>Pantoea</i> sp.
Haidao16 ,leaf	HB0X FJ644570)	<i>Pantoea agglomerans</i> WAB187X(AM184212)	99.6	<i>Pantoea</i> sp.
Cao7005 ,root	C0X FJ205685)	<i>Pantoea agglomerans</i> WAB187X(AM184212)	99.3	<i>Pantoea</i> sp.
Cao7005 ,root	C1X FJ205687)	<i>Pantoea agglomerans</i> WAB187X(AM184212)	97.9	<i>Pantoea</i> sp.
Cao7005 ,root	C11(FJ205688)	<i>Pantoea agglomerans</i> WAB187X(AM184212)	97.4	<i>Pantoea</i> sp.
Haidao16 ,root	HB0X FJ205659)	<i>Pantoea agglomerans</i> WAB187X(AM184214)	99.0	<i>Pantoea</i> sp.
Changkan ,root	CK1X FJ205671)	<i>Pantoea agglomerans</i> WAB192X(AM184264)	99.0	<i>Pantoea</i> sp.
Cao7005 ,root	C01(FJ205678)	<i>Pantoea dispersa</i> (DQ504305)	100.0	<i>Pantoea</i> sp.
Haidao16 ,root	HB0X FJ205660)	<i>Rhizobium radiobacter</i> DSM 30201(AJ389907)	100.0	<i>Rhizobium</i> sp.
Ya7113 ,leaf	Y0X FJ644569)	<i>Serratia marcescens</i> subsp. marcescens ; HO2-A(AJ297950)	100.0	<i>Serratia</i> sp.

季节,采集地土壤肥沃,植株代谢旺盛,这或许能解释开花期、吐絮期根的内生细菌数量低于苗期,但确切的证据仍有待证实。

Berg 和 Hallmann(2006)^[18]证实植株的根部存在相当数量的对真菌病害具有拮抗作用内生细菌,本试验分离的内生菌平板对峙鉴定显示,根中具有较多的拮抗棉花黄、枯萎病菌的内生细菌菌株。Wyllied 等报道^[19]落叶型菌株和非落叶型菌株除了在致病特征上的差异外,二者在生理特性上也存在着极大差异。我们调查发现,拮抗黄萎病强致病落叶型菌株 V107 的内生菌株不仅低于枯萎病菌 F108,而且低于非落叶型黄萎病菌 V396,因而我们推测,拮抗内生菌数量受到病原菌的不同基因型,生理特性,致病力等因素影响。

为今后进一步利用这些拮抗内生细菌,我们对黄、枯萎病菌都具有拮抗的内生细菌进行了分子鉴定,16S rDNA 分子序列分析显示 44 个拮抗黄、枯萎病的内生菌株包括了 8 个属,优势种群为肠杆菌属 (*Enterobacter*) 和泛菌属 (*Pantoea*),有 10 个菌株与已报道的菌株相似性 < 97%,可能是新的种(属)。前人在对马铃薯^[18]拮抗内生菌研究发现,芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、短小杆菌属 (*Curtobacterium*)、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、链霉菌 (*Streptomyces*) 等通常是拮抗内生菌的优势种群,在 51 个拮抗种群中,包涵了 27 个属。我们的研究也表明拮抗黄、枯萎病的内生细菌不仅具有优势种群,而且存在丰富的多样性。

植物的内部组织为内生细菌提供了良好的保护环境,它的定殖类似于植物维管束病害的病菌,因而内生菌作为生防载体,具有较好的生防潜力^[20]。我们下一步工作需要通过盆栽,大田试验,来研究这些拮抗内生细菌对棉花病害的生防效果。

参考文献

- [1] Stone JK, Bacon CW, White JF. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. // Bacon CW, White JF. Microbial Endophytes. New York: Marcel Dekker, 2000: 3 - 29.
- [2] Hallmann J, Hallmann QA, Mahaffee WF, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology 1997 43: 895 - 914.
- [3] 孔庆科, 丁爱云. 内生细菌作为生防因子的研究进展. 山东农业大学学报(自然科学版) [*Journal of Agricultural University (Natural Science)*] 2001 32(2): 256 - 260.
- [4] Misaghi IJ, Donndelinger CR. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. Phytopathology, 1990, 80: 808 - 811.
- [5] McInroy JA, Klopper JW. Studies on indigenous endophytic bacteria of sweet corn and cotton. // O'Gara F, Dowling DN, Boeste B. Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms, Biotechnology and the Release of GMOs. New York: VCH, 1994: 19 - 27.
- [6] McInroy JA, Klopper JW. Population dynamics endophytic bacteria of in field-grown sweet corn and cotton. Canadian Journal of Microbiology, 1995, 41: 895 - 901.
- [7] McInroy JA, Qi W, Mahaffee WM, et al. Comparative evaluation of endophytic bacteria from Chinese and U. S. cotton cultivars. // Ogoshi A, Kobayashi K, et al. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria—Present Status and Future Prospects. Sapporo Japan: Nakanishi Printing, 1997: 228 - 231.
- [8] McInroy JA, Klopper JW. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. Plant Soil, 1995, 173: 337 - 342.
- [9] Pamela D, Adams PD, Klopper JW. Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton. Plant and Soil, 2002, 240: 181 - 189.
- [10] 罗明, 芦云, 张祥林. 棉花内生细菌的分离及生防益菌的筛选. 新疆农业科学 (*Xinjiang Agricultural Sciences*) 2004 41(5): 277 - 282.
- [11] 兰海燕, 王长海, 宋荣. 棉花内生细菌及其研究进展. 棉花学报 (*Acta Gossypii Sinica*) 2000, 12(2): 105 - 108.
- [12] Moore FP, Tanja T, Borremans B, et al. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. Systematic and Applied Microbiology, 2006, 29: 539 - 556.
- [13] 肖炜, 彭谦, 刘宏伟, 等. 昆明盐矿古老岩盐沉积中的原核生物多样性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) 2007 47(2): 295 - 300.
- [14] 李潞滨, 刘敏, 杨淑贞, 等. 毛竹根际可培养微生物种群多样性分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) 2008 48(6): 772 - 779.
- [15] 刘云霞, 张青文, 周明. 水稻体内细菌的动态研究. 应用生态学报 (*Chinese Journal of Applied Ecology*), 1999, 10(6): 735 - 738.
- [16] 黎起秦, 谢义灵, 林纬, 等. 广西番茄内生细菌的多样性和数量动态. 生物多样性 (*Chinese Biodiversity*), 2006, 14(6): 534 - 540.

- [17] Mocali S , Bertelli E , Cello FD , et al. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. *Research in Microbiology* 2003 , 154 : 105 – 114 .
- [18] Berg G , Hallmann J. Control of Plant Pathogenic Fungi with Bacterial Endophytes. // Schulz B , Boyle C , Sieber TN. Microbial Root Endophytes. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag , 2006 : 53 – 67 .
- [19] Wyllied TD , Devay JE. Growth characteristics of *Verticillium albo-atrum* and *Vnigrescens*. *Phytopathology* , 1970 , 60 : 907 – 910 .
- [20] 易龙 , 肖崇刚 , 马冠华 , 等. 防治烟草赤星病有益内生细菌的筛及抑菌作用. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)* 2004 44(1) : 19 – 22 .

Population dynamics and antagonism toward *Fusarium oxysporium* f. sp. Vasinfectum. and *Verticillium dahliae* Kleb of endophytic bacteria from cotton

Chunhong Li¹ , Yuanyu Deng³ , Mingwen Zhao^{2*} , Canming Tang^{1*} , Shunpeng Li² , Haiwei Lv²

(¹ College of Agronomy , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

(² College of Life Sciences , Nanjing Agricultural University Key Laboratory for Microbiological Engineering of the Agricultural Environment , Ministry of Agriculture , Nanjing 210095 , China)

(³ Jiangsu Suke Agrobiochemical Co. Ltd , Nanjing 210014 , China)

Abstract [Objective] To explore population dynamics of endophytic bacteria and obtain antagonistic endophytic bacteria toward *Verticillium dahliae* Kleb (Vd) , *Fusarium oxysporium* f. sp. Vasinfectum (Fov) from cotton. **[Methods]** Root , stem and leaf samples were surface-disinfested , and subsequently used to isolate endophytic bacteria by diluting plate counting method. We assayed antagonism of the isolated endophytic bacteria toward three pathogens : Vd (V107 , which is a highly virulent defoliating isolate and V396 , which is a mildly virulent non-defoliating isolate) , Fov (F108) using a dual culture method , and analyzed the 16S rDNA sequence of doubly antagonistic endophytic bacteria (DAEB) isolates toward both Vd and Fov. **[Results]** The population size of endophytic bacteria in root was significantly larger than that in leaf and stem. The populations at seedling stage were generally lower than those at the flowering/maturing stage in root , the populations in stem and leaf were fluctuant at different development stages , but variation law was not observed obviously. Furthermore , although no significant differences of the population densities in root were found among 6 cotton cultivars , the population densities in stem and leaf showed cultivar differences. The proportion of endophytic bacteria antagonizing Vd (V₁₀₇ , V₃₉₆) and Fov (F₁₀₈) in root was higher than that in stem/leaf , moreover , the amount of endophytic bacteria antagonizing toward V107 was less than that toward V396/F108. Based on 16S rDNA sequence analysis , all 44 DAEB isolates consisted of two phyla i. e. , Bacteroidetes (1 out of 44) and Proteobacteria (43 out of 44) , and fell into 8 genera. The genus *enterobacter* (18 out of 44) and *Pantoea* (15 out of 44) were predominant. Notably , ten DAEB isolates demonstrated < 97% sequence similarity with the most similar sequences of strain deposited in the Ribosomal Database , these DAEB isolates might be potential novel species. **[Conclusion]** This article suggested that plant genotype , development stage , and tissue influenced the population of endophytic bacteria. We discovered that DAEB with predominant and various genus existed in cotton. Endophytic bacteria in cotton could serve as a pool for discovering biocontrol agent toward cotton pathogens.

Keywords : cotton ; endophytic bacteria ; 16S rDNA ; *Fusarium oxysporium* f. sp. Vasinfectum ; *Verticillium dahliae* Kleb

(本文责编 : 王晋芳)

* Corresponding authors. Tel/Fax : + 86-25-84395602 ; E-mail : cmtang@ yahoo. cn (Canming Tang) , mwzhao@ njau. edu. cn (Mingwen Zhao)