

四川省6种竹叶部微生物的组成与结构分析

许秀兰¹ 白燕² 刘韩³ 杨春琳¹ 刘应高¹

1. 四川农业大学林学院, 雅安 625014;

2. 四川省自贡市富顺县林业局, 富顺 643200; 3. 四川省甘孜州林业科学研究所, 甘孜 626000

摘要 采用传统林木病理学和现代分子生物学相结合的方法,对四川6种竹叶部微生物多样性和种类组成进行分析。结果表明:竹叶部微生物区系主要由真菌和细菌两大类群组成,且细菌数量高于真菌,但真菌的种类组成明显比细菌丰富;不同竹种间的微生物种群组成差异较大,雅安地区的真菌和细菌种类明显高于宜宾和泸州地区;由分离频率可以看出微生物各类群的分布呈现出季节性差异,在竹叶部持续存在的种群主要是枝孢霉菌 *Cladosporium* sp.、酵母菌 *Saccharomyces* sp.、节菱孢菌 *Arthrinium* sp.、格孢腔菌 *Pleosporales* sp.、芽孢杆菌 *Bacillus* sp.、假单胞杆菌 *Pseudomonas* sp.。

关键词 竹叶; 微生物; 多样性; 种类

中图分类号 S 763.1; S 795 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)04-0053-07

竹子是禾本科(Gramineae)竹亚科(Bambusoideae)的多年生常绿植物,是一类重要的可再生林业资源。竹子具有分布广、用途多、速生丰产、再生能力强、经济价值高等特点^[1]。中国是竹子资源最丰富的国家,现自然分布的竹种有39属500多种^[2]。竹叶作为竹林健康状况的重要指示器官,是微生物生存繁衍的重要场所,也是病原微生物入侵的重要入口。1980年中国学者陈延熙提出植物微生物生态学,主要是研究植物某组织或部位微生物的组成、功能、演替和它们相互间及其与寄主之间的关系^[3]。随着植物病害发生和防治工作的研究与发展,植物微生态防治应运而生^[4]。它是将微生物学与植物病理学、生理学相结合,应用微生态理论防治植物病害,以控制调节微环境、寄主、正常微生物种群与病原物之间的微生态平衡为根本。

为了掌握四川地区竹片的生长情况以及比较不同竹种的微生态差异,笔者以四川地区6种竹片的叶部微生物为研究对象,对可培养微生物种群的季节动态进行了测定,并比较了各竹种叶部微生物之间的差异,旨在为研究竹类植物叶部微生态关系和有益微生物的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样地及样品采集

在四川雅安、宜宾和泸州3个地区,根据竹种设置样地,共计6种竹,即6个试验样地。样地设置:慈竹 *Neosinocalamus affinis*、撑×绿杂交竹 *Bambusa pervariabilis*×*Dendrocalamopsis grandis*(均采自四川雅安);毛竹 *Phyllostachys heterocycla*、硬头黄 *Bambusa rigida*(均采自宜宾蜀南竹海);西凤竹 *Bambusa multiplex*、梁山慈 *Dendrocalamus farinosus*(均采自四川泸州)。每个样地随机设置3个20 m×20 m的两年生及以上的样丛,每个样丛分上、中、下3层的东、南、西、北4个方向分别取3~5片竹叶,共采集36~60片/袋。以季度划分在一年中的1月、4月、7月和10月进行4次采样。

1.2 培养基的选择

真菌的分离及培养为PDA培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,定容至1 000 mL;细菌的分离培养为牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏3 g,蛋白胨5 g,氯化钠5 g,琼脂20 g,定容至1 000 mL;放线菌的分离培养采用改良高氏1号培养基:可溶性淀粉20 g,硝酸钾1 g,磷酸氢二钾0.5 g,琼脂20 g,定容至1 000 mL,pH 7.0。

收稿日期:2013-12-04

基金项目:国家科技支撑计划项目(2008BADC2B01)

许秀兰,博士研究生。研究方向:林木病理学和资源微生物学。E-mail: xuxiulanxxl@126.com

通信作者:刘应高,博士,教授。研究方向:林木病理学。E-mail: lyg927@263.net

1.3 微生物的分离和计数

1) 表面微生物的分离^[5]。每样采集 3 袋叶片, 每袋 36~60 片叶, 每袋随机取 12 片混匀, 将混合均匀的叶片用打孔器取 5 mm×5 mm (5 块/片), 每种样品组织块共计 180 块, 置于 100 mL 无菌水内 25℃ 充分振荡 2 h 后得菌悬液原液。按照十倍稀释法将原液配制成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 倍数, 取原液与各浓度的稀释液 0.1 mL 涂布于 3 种分离培养基, 每种浓度 3 个重复。25~28℃ 培养箱内培养 2~7 d 后观察并计数, 确定分离的最佳浓度。

2) 内生微生物的分离^[6]。将样品剪成小块, 混匀后称取 5 g 于 75% 乙醇浸泡 60 s, 3% 次氯酸钠消毒 2~3 min, 无菌水冲洗 4 次后用无菌滤纸吸干组织块。将最后一次洗涤用的无菌水涂布在无菌平板上, 保证表面微生物的完全消毒。再将组织块转移到无菌研钵中并混入少量石英砂, 加入 10 mL 无菌水研成匀浆, 洗入无菌三角瓶中, 共加水 50 mL, 摇匀后静置。按照十倍稀释法将上清液配制成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 的稀释液, 取原液与各浓度的稀释液 0.1 mL 涂布于 3 种分离培养基, 每个浓度重复 3 次。25~28℃ 培养箱内培养 2~7 d 后观察并计数, 确定分离的最佳浓度。

3) 微生物计数。采用稀释后的最佳浓度进行菌的分离培养, 细菌和放线菌选取菌落数在 20~200 的培养皿, 真菌选取菌落数在 10~100 的培养皿进行计数及进一步的纯化分离。

$$\text{叶表微生物密度 (cfu/cm}^2\text{)} = \frac{\text{平均每皿菌落数} \times \text{稀释倍数}}{\text{叶片总面积}}$$

$$\text{内生微生物密度 (cfu/g)} = \frac{\text{平均每皿菌落数} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品质量}}$$

1.4 微生物的鉴定

真菌的鉴定采用压片制片法, 参考《真菌的形态和分类》^[7] 和《真菌鉴定手册》^[8]; 细菌以生理生化特征为基础进行鉴定, 参考《植物病原细菌的分类和鉴定》^[9]; 放线菌鉴定主要参考《放线菌及其抗生素分类鉴定指南》^[10]。

对于不产孢或者形态鉴定困难的真菌种类, 进一步采用分子生物学鉴定。用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 提取 DNA, PCR 反应体系为引物 ITS1 2.0 μL 、ITS4 2.0 μL 、ddH₂O 19.0 μL 、DNA 模板 2.0 μL 、2×Taq PCR Master mix 25.0 μL 。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并送至上海生工生物技术公司测序。

对于难以通过形态学鉴定的细菌进行分子生物

学鉴定。用细菌基因组提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 提取 DNA, PCR 反应体系为引物 27f 2.0 μL 、引物 1495r 2.0 μL 、ddH₂O 19.0 μL 、DNA 模板 2.0 μL 、2×Taq PCR Master mix 25.0 μL 。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并送至上海生工生物技术公司测序。

1.5 数据处理

物种丰富度指数选用 Margalef 的丰富度指数 (R) 来衡量微生物多样性变化。计算公式分别为 $R = (S - 1) / \ln N$, 菌株相对分离频率 = (菌株菌落数/分离得到的微生物总菌落数) × 100%。式中 S 为所在样方的物种总数, N 是 S 个物种的总个体数。数据分析采用软件 SPSS 20.0 进行 Pearson 相关系数计算, 并采用软件 Origin 8.5 作图。

2 结果与分析

2.1 竹叶部微生物的数量特征

根据内生微生物及叶表微生物各类群数量所占的百分比得出, 细菌和真菌为叶部主要微生物类群, 且 6 种竹叶部细菌数量大于真菌数量。对叶部各微生物类群的数量进行相关性分析发现, 各竹种叶部的内生微生物总数以及表面微生物总数的分布分别与内生和表面细菌数量之间呈现出显著正相关或者极显著正相关, 这进一步说明了在细菌在叶部微生物数量上占有绝对优势。而放线菌分布则更少, 均仅在夏季的慈竹和撑×绿杂交竹中分离得到 1 株链霉菌属菌 (*Streptomyces* sp.), 其在内生微生物中的百分比分别为 72.29% 和 7.21%; 在表面微生物中的百分比分别为 37.65% 和 15%, 该链霉菌无疑成为夏季慈竹叶部微生物的重要组成类群。对季节不同而引起的叶部微生物数量差异进行方差分析, 结果显示, 季节对细菌数量的影响均表现为显著或极显著, 而对不同地区竹种的真菌分布影响存在差异。雅安地区的表面真菌以及内生真菌数量与季节变化表现为极显著相关, 泸州和宜宾地区的竹叶部内生真菌与季节之间极显著, 而附生真菌均影响不显著。同时, 不同竹种叶部真菌和细菌的数量在季节上的分布也有不同, 除慈竹外, 其余 5 种竹叶部内生细菌数量均在秋季达到最高值; 雅安地区的慈竹和撑×绿杂交竹叶部内生真菌在秋季数量最高, 其余地区的竹种叶部内生真菌则都在冬季表现出最大值。表面真菌和细菌在不同竹种间的季节变化差异较大, 但均在夏秋两季较高。

2.2 竹叶部微生物种类的季节变化

由表 1 和表 2 可知,6 种竹叶部不论是叶表微生物还是内生微生物,真菌类群的组成结构多样性整体上均高于细菌。3 个地区 6 种竹叶部微生物的种群组成存在很大差异,雅安地区的 2 种竹叶部共分离得到 43 属 60 种真菌、14 属 24 种细菌和放线

菌 1 属 1 种,其种类明显多于宜宾地区的真菌 26 属 33 种、细菌 12 属 17 种,泸州地区的真菌 23 属 32 种、细菌 11 属 17 种。

根据分离鉴定结果可得出竹种间微生物种群的组成差异明显,雅安地区的 2 种竹叶部微生物存在共有物种,而宜宾地区和泸州地区的不同竹种上微

表 1 竹叶部表面微生物优势菌及其分离频率¹⁾

Table 1 Dominant epibiotic microorganism and separating frequency

竹种 Bamboo species	真菌 Fungi	细菌 Bacterium	分离频率/% Separating frequency			
			春 Spring	夏 Summer	秋 Autumn	冬 Winter
慈竹 <i>N. affinis</i>	<i>Cladosporium uredinicola</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	16.36(6.26)	22.69(82.59)	21.66(17.54)	(4.66)
	<i>Microdochium</i> sp. 2	<i>Bacillus cereus</i>	18.93	(0.72)	(15.79)	(2.66)
	<i>Phoma</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	(64.58)	10.15		
	<i>Pleosporales</i> sp. 1	<i>Lysobacter</i> sp.	1.40	10.89	14.17(28.07)	6.33(2.66)
	<i>Pleosporales</i> sp. 2	<i>Ochrobactrum</i> sp.		10.59(1.44)	5.00(15.79)	16.88
	<i>Pleosporales</i> sp. 3	<i>Pseudomonas graminis</i>		32.38(12.09)		(0.67)
	<i>Pseudocercospora fraxini</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.				25.74(74.57)
	<i>Saccharomyces</i> sp. 1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			13.33(22.81)	(0.07)
撑×绿杂交竹 <i>B. pervariabilis</i> × <i>D. grandis</i>	<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(37.84)	18.52(15.63)	(11.64)	(12.35)
	Ascomycete sp.	<i>Bacillus cereus</i>	0.52	(13.02)	17.70(15.75)	
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Leucobacter</i> sp.			11.50(6.85)	(16.05)
	<i>Cladosporium uredinicola</i>	<i>Microbacterium arborescens</i>	43.13(39.94)	(1.74)	(21.92)	3.66
	Davidiellaceae sp.	<i>Pseudomonas geniculata</i>		18.52(62.85)	(5.48)	(3.09)
	<i>Gibberella moniliformis</i>	<i>Pseudomonas graminis</i>		16.67(0.87)	(29.45)	
	<i>Leptoxylum</i> sp.		37.64		6.19	16.67
	<i>Pleosporales</i> sp. 1		1.56	6.94	26.55	
	<i>Pseudocercospora fraxini</i>					57.51
	<i>Trichoderma viride</i>			13.89		
毛竹 <i>P. heterocykla</i>	<i>Arthrinium sacchari</i>	<i>Enterobacter</i> sp.		11.54(20.00)		
	<i>Perenniporia medulla-panis</i>	<i>Pseudomonas poae</i>		19.23	26.67(38.31)	
	<i>Phoma</i> sp.				20.00	
	<i>Pleosporales</i> sp.		4.76		23.33	33.33
	<i>Saccharomyces</i> sp. 3		42.86	11.54	20.00	66.67
	<i>Shiraia</i> sp.		52.38	30.77		
硬头黄 <i>B. rigida</i>	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Curtobacterium citreum</i>		(84.93)	19.71	
	Ascomycete sp.	<i>Curtobacterium</i> sp.		(6.39)	9.86(55.56)	32.91
	<i>Dokmaia monthadangii</i>	<i>Paenibacillus pabuli</i>	21.31		29.58	49.37(31.68)
	<i>Phoma medicaginis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	(11.87)		11.27(35.56)	
	<i>Pleosporales</i> sp.		53.83			
梁山慈 <i>D. farinosus</i>	<i>Arthrotrypis foliicola</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	47.93	(56.91)		
	<i>Arthrinium sacchari</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	3.94	2.27		18.18(51.28)
	Ascomycete sp.	<i>Brevundimonas</i> sp.	3.94	45.36		20.45(38.46)
	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Curtobacterium</i> sp.	(5.88)	24.74	(54.55)	
	<i>Perenniporia medulla-panis</i>	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>		12.99	49.87(13.03)	14.77
	<i>Pestalotiopsis cocculi</i>	<i>Frigoribacterium</i> sp.	(17.65)		32.34	
	<i>Pleosporales</i> sp.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	18.15	6.40	13.34(25.15)	1.14
	<i>Saccharomyces</i> sp. 2					17.05
	<i>Saccharomyces</i> sp. 3		19.92			14.77
	西凤竹 <i>B. multiplex</i>	Ascomycete sp.	<i>Bacillus cereus</i>			20.00
<i>Bionectria ochroleuca</i>		<i>Methylobacterium</i> sp.				14.29(12.90)
<i>Fusarium</i> sp.		<i>Paenibacillus</i> sp.		65.22(100.00)		
<i>Paraphaeosphaeria</i> sp.		<i>Pseudomonas graminis</i>			20.00	(64.52)
<i>Pestalotiopsis microspora</i>		<i>Pseudomonas</i>			(49.36)	14.29
<i>Phoma</i> sp.				10.87		
<i>Phomopsis</i> sp.					20.00	42.86
<i>Saccharomyces</i> sp. 2			24.24			
<i>Saccharomyces</i> sp. 3			57.58	21.74	40.00	28.57

1)表格数据前者为真菌分离频率,括号中数据为细菌分离频率(表 2 同)。Former data is the value of fungus separation frequency, data in parentheses represents bacterium separation frequency (the same as in Table 2).

表 2 竹叶部内生微生物优势菌及其分离频率

Table 2 Dominant endogenous microorganism and separating frequency

竹种 Bamboo species	真菌 Fungi	细菌 Bacterium	分离频率/% Separating frequency			
			春 Spring	夏 Summer	秋 Autumn	冬 Winter
慈竹 <i>N. affinis</i>	<i>Arthrinium phaeospermum</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(100.00)	(40.87)	36.84(10.30)	15.38(75.71)
	<i>Arthrinium sacchari</i>	<i>Microbacterium</i> sp.	20.00		31.58(69.23)	7.69
	<i>Nigrospora oryzae</i>	<i>Pseudomonas graminis</i>		(33.04)	(30.77)	15.38
	<i>Phomopsis</i> sp.				15.79	
撑×绿杂交竹 <i>B. pervariabilis</i> × <i>D. grandis</i>	<i>Arthrinium phaeospermum</i>	<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	(22.22)			33.33
	<i>Arthrinium sacchari</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(11.11)	(47.14)	10.22(59.52)	5.56(29.85)
	<i>Nemania diffusa</i>	<i>Curtobacterium</i> sp.	(27.78)		10.95	
	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Microbacterium arborescens</i>			41.61	(35.52)
	<i>Pestalotiopsis cocculi</i>	<i>Pseudomonas geniculata</i>	31.25	(18.86)	(4.76)	11.11(0.30)
	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Pseudomonas graminis</i>		(25.93)	33.58(15.87)	11.11(0.30)
	<i>Phomopsis subordinaria</i>					27.78
毛竹 <i>P. heterocycla</i>	<i>Pleosporales</i> sp.		56.25			5.56
	<i>Colletotrichum boninense</i>	<i>Paenibacillus pabuli</i>		100.00	(14.29)	
	<i>Pleosporales</i> sp.	<i>Pseudomonas poae</i>			18.64(42.86)	25.00
	<i>Saccharomyces</i> sp. 1	<i>Staphylococcus pasteurii</i>		(95.24)	25.42	75.00
	<i>Shiraia</i> sp.				33.90	
硬头黄 <i>B. rigida</i>	<i>Xylariales</i> sp. 1				13.56	
	<i>Arthrinium phaeospermum</i>	<i>Achromobacter piechaudii</i>		100.00	(37.04)	
	<i>Nigrospora oryzae</i>	<i>Microbacterium oleivorans</i>				13.33(75.00)
	<i>Phomopsis subordinaria</i>					53.33
梁山慈 <i>D. farinosus</i>	<i>Xylariales</i> sp. 1		50.00			
	<i>Xylariales</i> sp. 2		50.00			20.00
	<i>Arthrinium phaeospermum</i>	<i>Agrobacterium</i> sp.		(17.47)		18.18
	<i>Arthrinium sacchari</i>	<i>Bacillus</i> sp.		100.00		(33.33)
	<i>Ascomycete</i> sp.	<i>Brevundimonas</i> sp.			78.84(2.88)	(33.33)
	<i>Perenniporia medulla-panis</i>	<i>Pseudomonas argentinensis</i>		(51.93)		54.55
	<i>Pleosporales</i> sp.	<i>Pseudomonas poae</i>			21.16(26.34)	
西凤竹 <i>B. multiplex</i>	<i>Xylariales</i> sp.	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	100.00		(66.67)	9.09
	<i>Ascomycete</i> sp.	<i>Bacillus cereus</i>		95.24(1.64)		(33.33)
	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Curtobacterium</i> sp.			(100.00)	28.57
	<i>Phomopsis</i> sp.					57.14
<i>Xylariales</i> sp.					14.29	

生物种类组成差异则较大。对这种现象, Elamo 等^[11]解释为内生真菌的分布与物种本身及环境条件息息相关。其次, 6 种竹叶部内生微生物的种类均少于表面微生物的组成种群, 说明许多微生物只在竹叶部表面定殖。

本试验结果显示, 撑×绿杂交竹、硬头黄和梁山慈的叶部微生物数量整体分别高于同一地区的竹种慈竹、毛竹和西凤竹。对因竹种的不同进行叶部微生物数量差异的方差分析结果显示, 竹种对附生微生物类群的影响均为极显著, 而对内生微生物也表现出显著或者极显著的关系。另外, 已有的研究表明, 不同竹种叶片表面可利用的营养物质不同也可导致微生物数量在竹种间的差异^[12]。叶面积大小决定了与外部环境接触面, 以及地理位置等差异都造成叶面小范围的地势特征不同而影响叶面微生物种群结构^[13]。

2.3 竹叶部微生物丰富度的动态变化

Margalef 的丰富度指数(R)是对稀疏种敏感的

指数, 本试验中大多数物种均只在一个季节出现, 相对分离频率也较低, 物种组成上稀疏种较多, 故选用该指数来衡量物种丰富度指数的季节性变化, 结合物种数和微生物数量两个变量, 能较好地反映微生物种群多样性。根据微生物区系中物种和数量特征, 分析 6 种竹微生物物种丰富度随季节的变化趋势(图 1)。

试验结果表明, 微生物的丰富度在季节上表现出较大差异, 且各竹种间的变化趋势也无统一规律。除宜宾地区的毛竹和硬头黄的附生真菌物种丰富度在夏秋两季较大外, 其余竹种微生物类群的丰富度指数大多在秋冬两季达到最高。四川地区春季温度低, 夏季雨水多的气候特征不利于微生物的附着, 秋冬季节相对气候条件干燥凉爽, 多数微生物可附着叶面繁殖, 故致使物质丰富度指数略高。此外, 虽然细菌数量明显高于真菌, 但是真菌的种群组成比细菌丰富, 由 Margalef 指数也明显看出真菌的丰富度指数大于细菌丰富度指数。

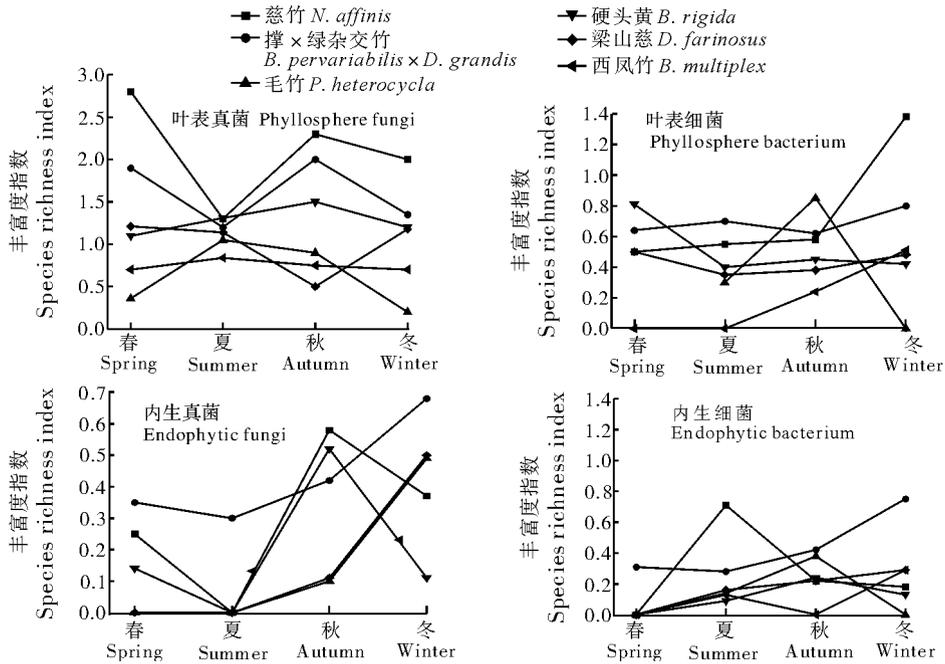


图 1 竹叶部微生物丰富度指数的季节动态

Fig. 1 Seasonal dynamic of species richness index of microorganism on bamboo leaves

2.4 竹叶部主要微生物的分布与季节演替

对竹叶部微生物进行分离鉴定结果显示各类微生物种类繁多,比较 6 种竹优势内生菌(分离频率 ≥ 10%)发现,优势菌在同一竹种上的季节性分布也是有变化的。从表 1 和表 2 中可以看到,各类群微生物组成在四季变化较大,仅在慈竹、梁山竹和西凤竹的叶表各分离得到 1 株优势真菌分别为 *Pleosporales* sp. 1、*Pleosporales* sp.、*Saccharomyces* sp. 3 均能在四季出现,但其在不同季节的分离频率是有高有低的。此外,优势细菌解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 在慈竹和撑×绿杂交竹的附生细菌类群以及内生细菌类群中的四季均可分离得到,且在四季均表现为优势菌。这可能是植物在不同生长时期和生理状态下,微生物的适应性不同而直接导致了种群组成与优势种群在季节上的差异^[14]。

比较优势真菌和细菌可以看出,真菌的种类明显多于细菌,内生微生物的优势菌数量同样也低于附生微生物各类群,这与竹叶部微生物中真菌和细菌的数量组成结果相一致。本试验结果发现,各竹种竹叶部微生物区系中均持续存在的种群主要为 *Cladosporium* sp.、*Saccharomyces* sp.、*Arthrini-*um sp.、*Pleosporales* sp.、*Bacillus* sp.、*Pseudo-*

monas sp.,这些种群在竹叶部微生态系统的动态平衡中占据重要位置。

3 讨论

在采样调查中发现有些常见病虫害的发生,且不同季节不同竹林内的病虫害种类和发生程度均不同,主要虫害为食叶害虫,如竹织叶野螟(*Algedonia coclesalis*)、竹象和蚜虫;主要病害为常见的煤污病,由病原菌 *Neocapnodium tanakae* 等引起。基腐病、叶斑病以及竹丛枝病等在竹林局部也有发生,但调查结果显示,这些病虫害的发生并未对竹林的生长造成严重影响。此外,在分析微生物种群组成时,发现一些竹叶部优势菌为已报道的病原菌,如能引起基腐病和梢枯病的暗孢节菱孢 *Arthrini-*um *phaeospermum* 在雅安慈竹和撑×绿杂交竹上大量存在,但在林间调查时并未发现雅安地区的慈竹和撑×绿杂交竹表现出任何相关病状。已有的研究结果表明:吸附在植物表面的病原菌不一定表现出致病性,叶围细菌与植物病害存在定性和定量的关系,病害的发生与叶围细菌群体水平有关^[15];内生真菌能提高宿主植物对生物胁迫的抗性,表现为阻抑昆虫和食草动物的采食、抵抗病虫害的伤害^[16]。此外,许多植物与微生物都能产生抗生素等物质抵御

多种病虫害,故在叶部也可能存在产抗生素类的微生物,但此推论还有待试验证明。潜在病原菌的存在虽暂时没有引起病害的发生,但由于植物感病是环境、病原物、植物三者共同作用的结果,掌握这些潜在病原微生物在植物体中的数量动态变化和其他微生物之间的关系,可为竹林病害的微生态防治提供科学依据。

目前,竹类作为经济林和生态林已得到大力发展,但研究内容大都集中在品种选育和材质等方面。慈竹分布于四川、贵州、云南、广西、湖南、湖北等地, Sun 等^[17-18] 主要对其木质纤维素性能进行了研究报道,而毛竹则在其力学、材质及生长等方面报道较多^[19-20]。硬头黄竹作为四川本地乡土竹种在造纸和用材上具有较高的资源开拓性^[21],但目前对硬头黄竹的研究较少,且同样只是集中在木质纤维素方面^[22]。梁山慈是四川南部重要的乡土竹种之一,是重要的笋材两用经济竹种,刘广路等^[23]对其生长的养分施入模式进行了试验,研究结果可为其生长的土壤营养管理技术提供科学依据。Hu 等^[24]报道了梁山慈组培苗的快速繁殖,研究结果可为该竹种的遗传转化研究奠定基础。撑×绿杂交竹是经长达 12 年选育出来的优良杂交竹种,是中国国内丛生竹分布区大力推广的栽培竹种。Umali 等^[25]早期对 *Bambusa tuldooides* 的叶内生真菌多样性进行了分析,比较了上秆层和下秆层以及叶龄等不同竹叶中的真菌差异,此后很少有竹类微生物区系及微生物资源的报道。

笔者通过对四川地区 6 个竹种叶部微生物区系的调查研究发现,不同竹种叶部的微生物区系差异较大,且微生物的季节演替保持一定的连续性。在对竹叶部微生物的分析时发现一些拮抗菌的存在,如木霉绿色 *Trichoderma viride*、解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 等。这些拮抗菌微生物具有抑菌谱广、抑菌率高、能促进植物生长等特点。在叶部微生物区系中还发现一些有益微生物,如捕食线虫真菌 *Arthrobotrys foliicola*、角蛋白降解菌 *Stenotrophomonas maltophilia*、产氢细菌 *Klebsiella oxytoca* 等。这些都可为资源微生物的开发与利用提供新途径。保持正常的微生态平衡是防治植物病害的作用机理之一。目前,很多微生态制剂就是以优势种群菌株为主要成分,达到恢复或补充优势种群,使失调的微生态达到平衡状态。微生态防治的发展必先清

楚了解微生态环境中的微生物组成及变化规律,本试验对叶部可培养微生物进行了区系及其动态研究,但许多不可培养的微生物类群尚未知。随着国内外微生物分子生态学研究方法及一些技术手段的不断发展,可为探索微生物的群落多样性和生态功能提供有力帮助,叶际微生物生态的研究将迎来突破性进展^[26]。

四川竹类资源丰富,可在地区经济和生态发展上带来较大利益。但近年来,随着各竹类种植面积的扩大,竹类病害也随之发生^[27-29],严重阻滞了退耕还林的效率。笔者对四川部分地区的竹种叶部微生物区系进行了初步研究,并展望了微生态防治的前景,研究结果可为竹类微生物种群的深入分析和病害微生态的防治工作提供理论依据。本次调查暂未发现四川竹林区有严重的病害发生,但仍需进一步调查与研究,同时提高防控意识。

参 考 文 献

- [1] 傅懋毅,杨校生. 我国竹类研究展望和竹林生境利用[J]. 竹子研究汇刊, 2003, 22(2): 1-8.
- [2] 朱石麟,马乃训,傅懋毅. 中国竹类植物图志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1994.
- [3] 梅汝鸿,徐维敏. 植物微生态学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [4] 李宝聚,王莉,陈捷. 植物病害微生态防治研究[J]. 北方园艺, 2005(6): 89-91.
- [5] 贺稚非,李洪军,徐毅,等. 鲜辣椒微生物区系的研究[J]. 中国酿造, 2008(23): 22-25.
- [6] 袁红旭,周立赖,周锦兰,等. 富贵竹内生细菌群落的生物效应研究[J]. 中国生态农业学报, 2005, 13(1): 95-97.
- [7] 戴芳澜. 真菌的形态和分类[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [8] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 科学出版社, 1979.
- [9] 任欣正. 植物病原细菌的分类和鉴定[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994.
- [10] WAKSMAN S A, IECHEVALER H A. 放线菌及其抗生素分类鉴定指南[M]. 阎逊初, 译. 北京: 科学出版社, 1958.
- [11] ELAMO P, HELANDER M L, SALONIEMI I, et al. Birch family and environmental conditions affect endophytic fungi in leaves [J]. Oecologia, 1999, 118(2): 151-156.
- [12] 毛鑫. 撑×绿杂交竹叶部微生物区系的研究[D]. 雅安: 四川农业大学图书馆, 2010.
- [13] 施雯,张汉波. 叶面微环境和微生物群落[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 761-764.
- [14] 单卫星. 植物附生微生物与叶部病害生物防治研究进展[J]. 生态学杂志, 1992, 11(1): 48-53.
- [15] 崔永三,赵博光,刘云鹏. 植物叶围细菌研究进展[J]. 中国森林病虫害, 2007, 26(3): 18, 26-29.

- [16] 唐雪辉,毛凯,干友民,等.植物内生真菌的应用研究概况[J].草原与草坪,2005(5):16-21.
- [17] SUN S N, LI M F, YUAN T Q, et al. Sequential extractions and structural characterization of lignin with ethanol and alkali from bamboo (*Neosinocalamus affinis*) [J]. Industrial Crops & Products, 2012, 37(1):51-60.
- [18] SUN S N, YUAN T Q, LI M F, et al. Structural characterization of hemicelluloses from bamboo culms (*Neosinocalamus affinis*) [J]. Cellulose Chemistry and Technology, 2012, 46(3/4):165-176.
- [19] XU X J, DU H Q, ZHOU G M, et al. Estimation of aboveground carbon stock of moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens*) forest with a landsat thematic mapper image [J]. International Journal of Remote Sensing, 2011, 32(5):1431-1448.
- [20] 王雪芹,张奇春,姚槐应.毛竹高速生长期土壤碳氮动态及其微生物特性[J].生态学报,2012,32(5):1412-1418.
- [21] 刘广路,范少辉,蔡春菊,等.撑绿杂交竹和硬头黄竹克隆生长特性比较[J].植物学报,2013,48(3):288-294.
- [22] WEN J L, XIAO L P, SUN Y C, et al. Comparative study of alkali-soluble hemicelluloses isolated from bamboo (*Bambusa rigida*) [J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(1):111-120.
- [23] 刘广路,范少辉,张大鹏,等.梁山慈竹生长对养分施入的响应[J].四川农业大学学报,2012,30(4):396-401.
- [24] HU S L, ZHOU J Y, CAO Y, et al. *In vitro* callus induction and plant regeneration from mature seed embryo and young shoots in a giant sympodial bamboo [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(16):3210-3215.
- [25] UMALI T E, QUIMIO T H, HYDE K D. Endophytic fungi in leaves of *Bambusa tuldoidea* [J]. Fungal Science, 1999, 4(1/2):11-18.
- [26] 潘建刚,呼庆,齐鸿雁,等.叶际微生物研究进展[J].生态学报,2011,31(2):583-592.
- [27] 张鑫,余雯雯,束庆龙,等.安徽竹类病(灾)害种类及发生特点[J].安徽农业科学,2011,39(29):17911-17912,17934.
- [28] 李姝江,朱天辉.杂交竹梢枯病菌毒素蛋白纯化及致病力[J].林业科学,2012,48(11):144-149.
- [29] LIANG Z A, CAI J M, LIU X B, et al. Biological characteristics of 11 wilt disease pathogens on hybrid bamboo [J]. Plant Disease and Pests, 2010, 1(4):4-8.

Microflora analysis on six kinds of bamboo leaves in Sichuan Province

XU Xiu-lan¹ BAI Yan² LIU Han³ YANG Chun-lin¹ LIU Ying-gao¹

1. College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Fushun County Forestry Bureau, Zigong City, Sichuan Province, Fushun 643200, China;

3. Ganzi Forestry Science Institute, Sichuan Province, Ganzi 626000, China

Abstract Diversity and species composition of microorganism assemblages on the leaves of 6 species of bamboo located in Sichuan Province were investigated based on the traditional forest pathology and modern molecular biology methods. The results show that fungi and bacteria are the large groups on the leaves. Although the bacterial quantity is larger than the amount of fungi, but the species of fungus are much more abundant than bacterial species. There are large differences among the six bamboo species about the microbial community structure. Ya'an area is obviously higher than that of Yibin and Luzhou area. All kinds of groups present seasonal differences which can be seen from the separating frequency. *Cladosporium* sp., *Saccharomyces* sp., *Arthrinium* sp., *Pleosporales* sp., *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. are the species existing persistently on the leaves. Finally, some biocontrol strains and beneficial microbes and even potential pathogenic microorganisms are obtained from bamboo leaves. In conclusion, this study provides the basis for the screening of bio-control strains, developing microorganism resource and preventing the diseases.

Key words bamboo leaves; microorganism; diversity; species