

## 2株内生细菌在油菜体内的定殖、 促生长及抗虫性检测

张献芳 文凯 逯晋忠 王圣英 祁高富 赵秀云

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 以水稻和油菜为试验材料, 对内生菌 YY-23 和 SJ-10 进行定殖范围的测定、促生长及抗虫试验, 结果表明: 2株内生菌 YY-23 和 SJ-10 均能在水稻、油菜、小麦、玉米、红菜薹、萝卜等植物体内定殖; 菌液浸种 24 h 后播种, 20 d 后经 YY-23 和 SJ-10 浸种后的油菜鲜质量分别比对照增加了 113.5%、52.5%; SJ-10 在饲喂第 6 天时存活率比对照明显降低, 差异显著 ( $P < 0.05$ ), 而 YY-23 无抗虫活性。

**关键词** 内生细菌; 定殖; 促生长; 抗蚜虫

**中图分类号** S 432.4<sup>+</sup>2; S 565.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)02-0143-05

植物内生细菌是指某些在其生活史的某个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真菌或细菌, 被感染的宿主植物不表现出外在病症, 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性<sup>[1]</sup>。已发现的内生细菌对宿主植物的有益作用有固氮作用、促进植物生长、抗逆境、抗动物摄食、抗病原真菌和细菌等<sup>[2]</sup>。Germida 等<sup>[3]</sup>最早分离到油菜内生细菌, 其中芽胞杆菌属分离几率最高, 为 35.8%。

油菜是我国重要的经济作物, 对国民经济起着举足轻重的作用, 近些年育种家选育出很多品质优、产量高、抗性强的品种, 然而受气候、栽培等条件影响, 油菜病虫害的危害仍相当严重。已有许多关于促生、防病内生细菌的报道, 试验表明巨大芽胞杆菌 (*Bacillus megaterium*) 在油菜盆栽试验中有一定的促生作用<sup>[4]</sup>。蚜虫以刺吸口器在油菜的叶、茎和花梗上吸取植物汁液, 为害严重时使植株萎缩、生长停滞以至枯死<sup>[5]</sup>。蚜虫还是油菜病毒病的主要传播媒介, 在病毒病重发年份油菜感病率高达 70% 以上, 病株平均减产 65%<sup>[6]</sup>。有关内生细菌既促生又抗蚜虫的研究鲜见报道。本文以水稻和油菜为试验材料, 从油菜和水稻中分离具有促生和抗虫活性的内生细菌, 考察分离出的内生细菌在油菜体内的定

殖、促生长及抗蚜虫情况。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

小麦 *Triticum aestivum*, 鄂麦 18; 玉米 *Zea mays* L., 玉农赣花糯一号; 油菜 *Brassica campestris* L., 华油杂四号; 萝卜 *Raphanus sativus* L., 精选短叶十三萝卜; 红菜薹 *Brassica parachinensis* L., 十月红。

#### 1.2 内生细菌的分离

采集水稻(湖北省公安县农田)和油菜(华中农业大学菜地)健康植株, 用自来水充分冲洗表面泥土; 剪成 2 cm × 2 cm 或 2 cm × 4 cm 小块, 先用 75% 乙醇漂洗 5 min; 加入 0.2% HgCl<sub>2</sub> 表面消毒 5 min, 最后用无菌水冲洗 5 次。取最后 1 次的无菌水作对照涂 LB 平板。在无菌条件下, 将组织充分研磨, 然后 2 000 r/min 离心 5 min, 取上清涂 LB 平板, 37 °C 培养 3 d 后挑取细菌单菌落。经纯化后的内生细菌用含 25% 甘油的 LB 液体培养基 -70 °C 保存备用<sup>[7]</sup>, 用于革兰氏染色和菌体形态的观察。从油菜中筛选出 1 株芽胞杆菌 YY-23 及从水稻中筛选出 1 株 G<sup>-</sup> 菌 SJ-10, 分别作为 G<sup>+</sup> 和 G<sup>-</sup> 菌做进一步的抗虫试验。

收稿日期: 2010-05-12

基金项目: 国家“863”计划项目(2006AA10A210)

张献芳, 硕士研究生, 研究方向: 微生物生物防治。E-mail: zhangxfxzhang@126.com

通讯作者: 赵秀云, 博士, 副教授。研究方向: 微生物生物防治。E-mail: xiuyunzh@mail.hzau.edu.cn

### 1.3 内生细菌在油菜中的定殖回收

1) 抗生素标记。参照何红等<sup>[7]</sup>方法,将 YY-23 逐步诱导至 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  利福平(Rif)的抗性菌株,以此方法再用第 2 种抗生素硫酸链霉素(Str)对 YY-23 进一步诱导抗性标记,最后将菌液在含相应浓度的 2 种抗生素的 LB 固体平板上划线,纯化后将菌株在 4  $^{\circ}\text{C}$  保存 1 周后,接种于不含抗生素的培养基平板上培养,连续培养几代后,再在含 2 种抗生素的 LB 平板上筛选双抗标记菌株,以验证其抗药性的稳定性。SJ-10 具有抗氨基青霉素(Amp)150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的抗性。

2) 回接油菜。YY-23 接于 30 mL 含 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  利福平(Rif)和 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  硫酸链霉素(Str)的 LB 中震荡培养 24 h 后,8 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用无菌水悬浮菌体,配制菌体浓度为  $8 \times 10^6$  cfu/mL 的菌液。制备油菜无菌苗:油菜种子用无菌水常温浸泡 30 h,以稀释 1 000 倍的多菌灵稀释液于 37  $^{\circ}\text{C}$  浸泡 7 h 后,75%乙醇消毒 1 min,最后用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  处理 3 min 并用无菌水清洗,播种于含马铃薯-蔗糖培养基(PSA)的平皿中,25  $^{\circ}\text{C}$  培养,无菌苗用于接种试验<sup>[8]</sup>。①浸种接种。用无菌水配制的 YY-23 菌悬液和无菌水分别浸泡油菜种子 2 h 后,播种于室内装有无菌土的盆中。按常规方法育苗管理,待真叶长出后每隔 1 周取其茎叶进行内生细菌的分离。设 3 个重复,以无菌水浸种为对照<sup>[7]</sup>。②灌根接种。待 PSA 平板上的无菌苗长出 2 片真叶后,移栽到装有无菌土的盆中,取上述菌液和无菌水分别浇灌于各植株根部周围的土壤中,每棵苗浇灌 1 mL 菌液,每隔 7 d 取其茎叶分离内生细菌,分离方法同上“①浸种接种”。③无菌苗接种。待无菌苗长出真叶后,接 100  $\mu\text{L}$  的 YY-23 菌液于无菌油菜苗根部。待真叶完全展开后每隔 3 d 取其茎叶,分离细菌,方法同上“①浸种接种”。SJ-10 回接油菜时菌液的制备与灌根接种按本文“1.3 2)”方法进行。

3) 定殖分离。称取上述各处理植株样品 0.5 g,表面用 75%乙醇漂洗后,用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  浸泡处理 1 min,再用无菌水洗涤 3 次,晾干后加入 1 mL 无菌水磨碎,静置 15 min,然后分别取 100  $\mu\text{L}$  溶液涂于含相应抗生素的 LB 平板上,每处理 3 次重复,37  $^{\circ}\text{C}$  暗培养 24~36 h,根据每平皿生长的菌落数,计算每克鲜质量组织中的细菌数(cfu/g)<sup>[9]</sup>。

### 1.4 定殖范围测定

按照本文“1.3 2)”中“②灌根接种”方法灌根接种,将 YY-23 与 SJ-10 菌液浇灌于多种供试作物中,并在接种 3 d 和 60 d 后进行定殖分离。

### 1.5 促生长试验

参考本文“1.3”方法配制 YY-23 和 SJ-10 菌液和无菌水,分别浸种 24 h 后,播种于室内装有无菌土的盆中,重复 3 次,每组 10 棵苗,20 d 后测定苗的鲜质量、苗高和根长,于 80  $^{\circ}\text{C}$  烘干 3 h 后称干质量<sup>[10]</sup>。

### 1.6 抗蚜虫分析

采用人工全纯营养液及饲养技术饲喂蚜虫,鉴定 YY-23 和 SJ-10 对蚜虫的抗性<sup>[10]</sup>。具体方法为:采用两端开口,直径为 3 cm、长度为 4 cm 的玻璃管为蚜虫饲喂器。将 Parafilm 膜截成 1.5  $\text{cm}^2$  大小,并拉伸使其面积为原来 4 倍,然后覆盖在玻璃管一端,置于紫外灯下照射 15 min,之后在 Parafilm 膜表面加上 150  $\mu\text{L}$  浓度为  $8 \times 10^6$  cfu/mL 菌体(培养好的菌液离心后,去上清,用无菌水重新溶解,再用超声波破碎 40 min)的人工营养液,再在其上另覆盖一层 Parafilm 膜。将蚜虫放入管内,另一端用细纱网罩住,防止蚜虫逃逸。在光照培养箱中饲养,温度( $24 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度为 85%~90%,光周期 16 h/8 h(L/D)。虫源采自大田作物,选用 3 龄蚜虫为供试群体,饥饿 10 h 后,接入玻璃管内,每管内接蚜虫 10 头。每天更换营养液 1 次,同时观察、统计蚜虫数量,并计算存活率。每组处理设置 3 个重复,并设不添加菌体的纯营养液饲喂蚜虫作为对照,人工饲料的配方参考文献[12-13]。

### 1.7 内生细菌形态观察及鉴定

1) 电子扫描电镜样品的制备。在室温下以戊二醛固定内生细菌,挑取内生细菌典型菌落放入戊二醛固定液中,固定 12 h,ddH<sub>2</sub>O 洗 2 次,低速离心收集菌体,分别用 30%、50%、70%乙醇脱水各 15 min,然后置 70%乙醇中,1 d 后打开瓶盖,冷冻干燥,密封放入干燥器中备用。最后,将样品送至华中农业大学电镜(电镜型号为 JSM-6390LV)平台中心进行观察并拍照。

2) 16S rRNA 序列及生理生化测定。对 SJ-10、YY-23 进行菌体 PCR 检测,取 1 mL 培养过夜的细菌菌液,离心去上清后收集菌体,加入 50  $\mu\text{L}$  去离子水煮沸 10 min,离心取上清做模板,PCR 引物为 16S(+):AGAGTTTGATCCTGGCTCAG;反向引

物 16S(-): ACGGCTACCTTGTTACGACT, 2 引物在 16S rRNA 上的间距为 1 500 bp。PCR 反应体系: 10×Buffer Mg<sup>2+</sup> 5.0 μL, 正、反向引物各 2.0 μL, dNTPs 2.0 μL, 菌体 2.0 μL, Taq 酶 0.5 μL, 去离子水补至 50 μL。反应循环: 94℃ 预变性 3 min; 94℃, 45 s, 30 个循环; 57℃, 45 s; 72℃, 45 s; 最后在 72℃ 延伸 10 min。验证正确产物送至金斯瑞生物科技有限公司进行测序, 菌株的 16S rRNA 序列在 NCBI 上进行 Blast 比对分析。

菌株经平板活化后, 参考文献[13]对 SJ-10 和 YY-23 进行生理生化特征试验。

2 结果与分析

2.1 内生细菌分离结果

从油菜的根、茎、叶共分离到 63 株细菌, 发现芽胞杆菌占 30%, 杆菌与阳性菌占优势, 90% 为杆菌, 76% 为阳性菌。只发现 5 株球菌和 1 株弧菌。

从水稻的根、茎、叶中共分离到 66 株细菌, 其中有芽胞的占 41%; 从菌体形态看, 分离到的大多数是杆菌, 占 97%, 并且多数是革兰氏阳性菌, 革兰氏阳性菌占 91%。

2.2 YY-23 和 SJ-10 在油菜体内的定殖回收

用 Rif 与 Str 标记的 YY-23 以浸种、灌根、接种无菌苗 3 种方法(图 1)接种油菜, 均可以在油菜体内分离到 YY-23, YY-23 通过 3 种不同的接种方法均可成功地回接油菜并在油菜体内定殖(图 2)。将 10 μL 菌悬液接种在 2 株无菌苗之间, 均能够沿根部扩展, 推测根系是内生细菌入侵植物的主要部位。由于无菌苗处理培养容器有限, 仅对浸种和灌根 2

种方法接种的油菜苗内生细菌的消长动态进行了研究, 用 YY-23 浸种处理后的油菜苗, 在出芽 6 d 后可回收得到 7×10<sup>2</sup> cfu/g 的内生细菌, 27 d 后仍能回收得到 2×10<sup>2</sup> cfu/g 的内生细菌; 待油菜长出子叶, 灌根接种内生细菌, 3 d 后即可回收得到 1.3×10<sup>4</sup> cfu/g 内生细菌, 39 d 后仍能回收得到 1.6×10<sup>4</sup> cfu/g 内生细菌, 表明 YY-23 可迅速入侵油菜并在油菜体内长期定殖, 随着时间的延长, 菌体浓度和数量无明显变化, 表明 YY-23 在油菜体内较稳定。

用 SJ-10 菌液灌根接种油菜, 3 d 后在油菜体内可回收得到 2×10<sup>5</sup> cfu/g 内生细菌, 22 d 后仍能回收得到 1.2×10<sup>5</sup> cfu/g 内生细菌。用 SJ-10 菌液浇灌水稻根部, 1 d 后即在水稻体内回收得到 8×10<sup>7</sup> cfu/g 的内生细菌, 22 d 后仍可回收得到 2.1×10<sup>6</sup> cfu/g 内生细菌。由此可知, SJ-10 可同时在油菜和水稻体内定殖, 并且菌体浓度和数量比较高, 推测 SJ-10 能很好地在植物体内生存和繁殖。

2.3 定殖范围

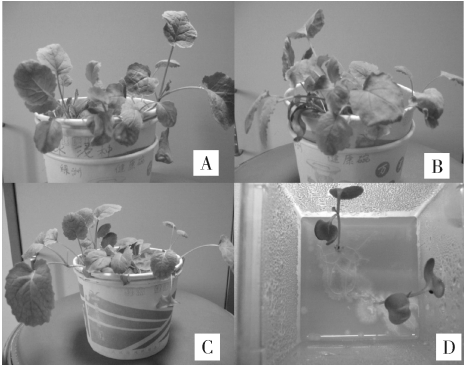
YY-23 和 SJ-10 可以在玉米、小麦、油菜、红菜薹、萝卜中定殖, 接种 60 d 后, 从各供试作物中分离内生细菌, 仍能分离到 YY-23 和 SJ-10。结果表明, YY-23 和 SJ-10 能够在各供试作物中长期定殖。

2.4 促生长作用

YY-23 和 SJ-10 浸种 24 h 再播种, 30 d 后, 分别测定苗的鲜质量、干质量、根长和株高。结果表明, 苗的鲜质量比对照分别增加 113.5% 和 52.5%; 干质量与鲜质量的百分比比对照分别增加 24.14% 和 28.03%; 根长比对照分别增加了 90.97% 和 137%; 株高比对照分别增加 39.68% 和 22.62%。由此可见, YY-23 和 SJ-10 浸种处理后, 对油菜有明显的促生作用。

2.5 抗蚜虫效果

以含有 YY-23 或 SJ-10 菌体蛋白的人工营养液饲喂蚜虫, 测试其抗虫活性。由图 4 可知, 在饲喂的前 5 d, 处理组与对照组中蚜虫的存活率相似, 差异不显著; 在第 6 天时, SJ-10 菌体蛋白饲喂的蚜虫的存活率比 YY-23 和 CK 显著降低, 此时 0.01 < P < 0.05, 差异显著, 此时经过 SJ-10 菌体蛋白处理的蚜虫的存活率为 33.3%, 经过 YY-23 处理的蚜虫存活率为 50.0%, 对照组蚜虫存活率为 56.7%。结果表明, SJ-10 菌体蛋白对蚜虫有一定的毒性和致死效应, 而 YY-23 菌体蛋白对蚜虫无毒性。

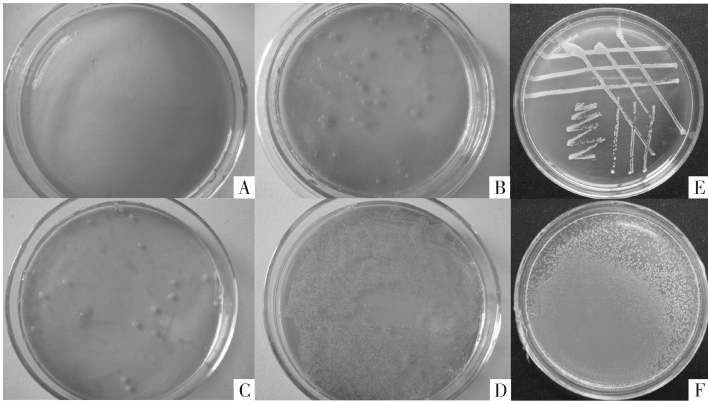


A: CK; B: 浸种 Seed dipping; C: 灌根 Root watering; D: 无菌苗 Aseptic seedling.

图 1 YY-23 菌株回接油菜

Fig. 1 Re-inoculation rape plants with YY-23





A:YY-23,CK; B:YY-23 浸种 YY-23 after inoculation by seed dipping; C: YY-23 灌根 YY-23 after inoculation by root watering; D:YY-23无菌苗 YY-23 after inoculation by aseptic seedling; E: SJ-10 接种前 SJ-10 before inoculation; F: SJ-10 回收后 SJ-10 isolated from rape by root watering.

图 2 YY-23 和 SJ-10 用不同的方法在油菜内定殖回收

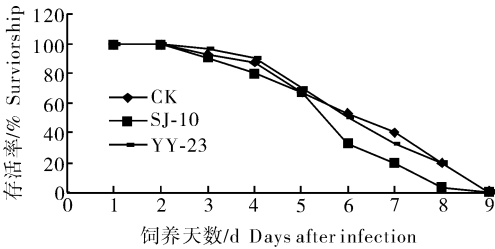
Fig. 2 Isolation YY-23 and SJ-10 from rape plants after re-inoculation rape with different methods



A:CK; B: YY-23 浸种 Dipping seed; C: YY-23 灌根 Root watering.

图 3 YY-23 浸种回接油菜促生长结果

Fig. 3 Promoting growth of rape after inoculation YY-23 by dipping rape seed with bacteria



CK:纯人工营养液 Rearing cotton aphid on an artificially holidic diets; SJ-10:加入浓度为 $8\times10^6$  cfu/mL SJ-10 菌液的人工营养液 Rearing cotton aphid on an artificially holidic diets include 0.1% SJ-10 strain ( $8\times10^6$  cfu/mL); YY-23:浓度为 $8\times10^6$  cfu/mL YY-23 菌液的人工营养液 Earing cotton aphid on an artificially holidic diets include 0.1% YY-23 strain ( $8\times10^6$  cfu/mL).

图 4 内生细菌 YY-23 和 SJ-10 抗棉蚜效果

Fig. 4 The effect of *Aphis gossypii* Glover resistance of YY-23 and SJ-10

2.6 YY-23 菌体形态观察及鉴定

由图 5 可知,YY-23 为芽胞杆菌,并含有菱形伴胞晶体,结合生理生化特征和 16S rRNA 序列鉴定为苏云金芽胞杆菌, NCBI Blast 检测结果表明,

该菌 16S rRNA 与苏云金芽胞杆菌 16S rRNA 有 99%的相似性。生理生化特征鉴定 SJ-10 为肠杆菌属; SJ-10 的 16S rRNA 序列通过 NCBI Blast 比较, 结果表明,该菌 16S rRNA 与产气肠杆菌 99%的相似性。

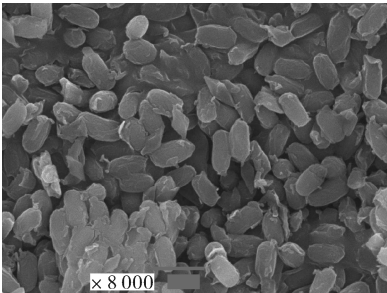


图 5 YY-23 芽胞杆菌扫描电镜图片

Fig. 5 SEM photo of YY-23

3 讨 论

植物内生细菌在植物体内普遍存在,因内生细菌具有在植物体内定殖、繁殖、转移的特点,内生细菌是构建“工程菌”的理想载体,将某些抗病虫基因导入到内生细菌中,能提高植物的抗病虫能力,而植物本身的基因并未发生改变<sup>[14]</sup>。本试验从油菜分离到得 YY-23 和从水稻分离到的 SJ-10 可能具有较好的研究与应用价值。

水稻内生细菌 SJ-10 通过灌根在 22 d 后可以在水稻和油菜中分离到,油菜内生细菌 YY-23 经过 Rif 和 Str 标记通过浸种、灌根和无菌苗都可以在油菜内定殖,在浸种油菜出芽后 27 d 后仍可回收得到,并且通过灌根试验测定定殖范围,2 种内生细菌均

可以在玉米、小麦、红菜薹和萝卜中定殖,表明 2 株内生细菌可在多种植物内长期稳定地定殖,并且菌体数量不会随时间延长而迅速降低,这也为利用内生细菌表达外源蛋白以提高植物抗逆性、改善植物品质和产量奠定了一定的基础,该研究为将来在植物体内长期表达目的蛋白、使目的蛋白长期存在于植物体内而发挥作用提供了较好的菌株。促生长试验结果表明,YY-23 和 SJ-10 经过浸种 24 h,对油菜有明显的促生作用。抗蚜虫试验结果表明,SJ-10 可以明显地降低蚜虫的存活率。但是,在田间复杂的环境下 2 种内生细菌能否表现出促生及抗蚜虫效果仍需要进一步的田间试验。2 种内生细菌具有潜在的应用价值,可分别作为革兰氏阳性内生细菌和革兰氏阴性内生细菌表达外源基因的宿主菌,在植物体内表达多种可改善植物抗逆性、提高其品质及改良其性状的外源蛋白,具有较大的应用前景。

参 考 文 献

[1] STONE J K,BACON C W,WHITE J F J R. An overview of endophytic microbes; endophytism defined[C]. Microbial Endophytes, New York; Marcel Dekker, 2000; 3-29.  
[2] 邹文欣,谭仁祥. 植物内生细菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881-892.  
[3] GERMIDA J J, SICILIANO S D. Taxonomic diversity of bacte-

ria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars[J]. Biol Fertil Soils, 2001, 33(4): 410-415.  
[4] 胡小加,江木兰,张银波. 巨大芽胞杆菌在油菜根部定殖和促生作用的研究[J]. 土壤学报, 2004, 41(6): 945-948.  
[5] 陈国华,高军. 长江流域油菜病虫害发生及综合防治技术[J]. 中国种业, 2008(10): 64-65.  
[6] 江守国. 预防油菜病毒病的关键在于阻截蚜虫[J]. 现代农业科技, 2007(11): 75.  
[7] MISAGHI I J, DONNDELINGER C R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants[J]. Phytopathology, 1990, 80(9): 808-811.  
[8] 何红,邱思鑫,蔡学清,等. 辣椒内生细菌 BS-1 和 BS-2 在植物体内的定殖及鉴定[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 13-17.  
[9] 张志元,官春云. 油菜无菌苗培养前的种子消毒技术[J]. 中国油料作物学报, 2005, 27(1): 88-90.  
[10] 蔡学清,何红,胡方平. 双抗标记测定枯草芽孢杆菌 BS-2 和 BS-1 在辣椒体内的定殖动态[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2003, 32(1): 41-45.  
[11] 李彩霞,高丽锋,高玲玲,等. 全纯人工营养液饲养蚜虫的研究[J]. 山西农业大学学报, 1997, 17(3): 225-228.  
[12] FIGUEROA C C, SIMON J C, GALLIC J F L, et al. Molecular markers to differentiate two morphologically-close species of the genus *Sitobion*[J]. Entomol Exp Appl, 1999, 92: 217-225.  
[13] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 43-65.  
[14] 石晶盈,陈维信,刘爱媛. 植物内生细菌及其防治植物病害的研究进展[J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2395-2401.

Colonization, promotion growth and aphid bioassay of endophytic bacterium YY-23 and SJ-10 in rape

ZHANG Xian-fang WEN Kai LU Jin-zhong WANG Sheng-ying QI Gao-fu ZHAO Xiu-yun  
College of Life Science and Technology/State Key Laboratory of Agricultural Microbiology,  
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** Using rape and rice as explants, the colonization range, promotion of growth and aphid bioassay of the endophytic bacterium YY-23 and SJ-10 were tested in laboratory. The results showed that the two strains were able to colonize in rape, rice, wheat, maize, Chinese kale, navet, etc. Rape seeds were dipped for 24 h with YY-23 and SJ-10, then sowed. 20 days later, the fresh weight of rape plants treated by YY-23 and SJ-10 was increased by 113. 5% and 52. 5%, respectively. The survival rate of aphid in SJ-10 group was lower than CK on the sixth day, the difference was significant ( $P<0. 05$ ). However, YY-23 expressed no resistance to aphid. Therefore, the two strains could stably colonize and promote growth of plant. SJ-10 had insecticidal effect on aphid.

**Key words** endophytic bacteria; colonization; promoting growth; aphid resistance

(责任编辑:陆文昌)