

小麦内生细菌分离培养基的选择

王 刚^{1,2}, 王俊芳^{1,2}, 刘凤英¹, 彭 娟¹

(1. 河南大学 生物工程研究所, 河南 开封 475001; 2. 河南大学 生命科学学院, 河南 开封 475001)

摘要: 分别利用肉汁胨琼脂、营养琼脂、胰酶大豆琼脂、马铃薯葡萄糖琼脂、脑心浸液琼脂、金氏培养基 B、LB 营养琼脂和酵母膏蛋白胨琼脂 8 种常用的细菌分离培养基来分离小麦内生细菌, 以选择适宜的分离培养基, 结果显示, 胰酶大豆琼脂和金氏培养基 B 的分离效果显著优于其他培养基, 马铃薯葡萄糖琼脂和脑心浸液琼脂的分离效果较差。利用选择出的金氏培养基 B 和胰酶大豆琼脂分别对豫东麦区的 7 个小麦品种的内生细菌进行分离, 进一步确认了胰酶大豆琼脂和金氏培养基 B 为分离小麦内生细菌的适宜培养基。

关键词: 内生细菌; 小麦; 培养基; 分离

中图分类号: S512.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)05-0063-04

Screening of Isolating Medium for Wheat Endophytic Bacteria

WANG Gang^{1,2}, WANG Jun-fang^{1,2}, LIU Feng-ying¹, PENG Juan¹,

(1. Institute of Biotechnology, Henan University, Kaifeng 475001, China;

2. College of Life Science, Henan University, Kaifeng 475001, China)

Abstract: Seven isolating media, including Beef extract Peptone Agar (BPA), Nutrient Agar (NA), Tryptic Soy Agar (TSA), Potato Dextrose Agar (PDA), Brain Heart Infusion (BHI), King's medium B (KMB), Luria-Bertani medium (LB) and Yeast extract Peptone Agar (YPA), were utilized to isolate endophytic bacteria from wheat, aiming at screening the optimal media. The results showed that the isolation effect of TSA and KMB was better than that of other media, while the PDA and BHI media had the lowest isolation effect. The two media TSA and KMB were further confirmed to be the optimal media by using eight wheat varieties from eastern part of Henan province to isolate endophytic bacteria.

Key words: Endophytic bacteria; Wheat (*Triticum aestivum*); Medium; Isolation

植物内生细菌是指能定殖健康植物组织内, 并与植物建立了和谐关系的一类微生物^[1]。在农业生产过程中, 由于农药和化肥的大量使用以及农田耕作的单一化, 使植物和土壤中微生物的多样性大为减少。在人们日益重视人与自然和谐相处的今天, 研究和利用植物内生细菌对于替代或减少农药和化肥的使用, 改善农业生态系统, 保持植物微生物生态系统的生物多样性以及开发新的微生物资源都具有重要意义。目前, 国内外研究者已经从包括小麦在内的

多种作物中分离到多种内生细菌。植物内生细菌对植物的作用主要表现为促进植物生长、抑制植物病原、增加植物的抗逆性和他感作用等几个方面^[2]。利用不同的培养基, 尽管已经分离出多种小麦内生细菌, 但是由于培养基营养物质成分、离子浓度、氧化还原电位以及酸碱度等条件的不同, 导致不同的培养基对于微生物具有不同的选择性。为研究小麦内生细菌的多样性和品种特异性, 需要高效、系统地分离小麦内生细菌, 有必要选择出高效的分离培养

收稿日期: 2007-01-25

基金项目: 河南省教育厅自然科学基金(200510475036); 河南大学重点基金(04ZDZR005)

作者简介: 王 刚(1971-), 男, 河南夏邑人, 副教授, 博士, 主要从事植物病害生物防治研究工作。

基和培养基组合。因此,本研究利用国内外已经报道的内生细菌常用分离培养基,比较不同培养基在分离小麦内生细菌能力方面的差异,选择出适宜的培养基或者培养基组合。在此基础上,利用筛选出的培养基实现对豫东麦区 7 个小麦品种内生细菌的高效分离。

1 材料和方法

1.1 供试培养基

肉汁胨培养基(BPA)^[3]:牛肉浸膏 3.0g,蛋白胨 5.0g,酵母提取物 1.0g,琼脂 20g,蒸馏水 1000mL, pH 7.0。

营养琼脂(NA)^[4]:牛肉浸膏 3.0g,蛋白胨 5.0g, NaCl 5.0g, 琼脂 20g; 蒸馏水 1000mL, pH 7.0。

胰酶大豆琼脂(TSA)^[5], Difco 公司产品。

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)^[6]:马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 琼脂 20g; 蒸馏水 1000mL, pH 7.0。

金氏培养基 B (KMB)^[7]:蛋白胨 20g, 甘油 10.0g, K₂HPO₄ 1.5g, MgSO₄ · 7H₂O 1.5g, 琼脂 15g 蒸馏水 1000mL, pH 7.2。

LB 营养琼脂(LB)^[8]:蛋白胨 10.0g, 酵母提取物 5.0g, NaCl 10.0g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000mL, pH 7.0。

酵母膏蛋白胨琼脂(YPM)^[9]:酵母提取物 5.0g, 蛋白胨 10.0g, NaCl 5.0g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000mL, pH 7.0。

脑心浸液琼脂(BHI)^[10], Difco 公司产品。

1.2 利用不同培养基分离小麦内生细菌

从开封市郊区北郊乡麦田中整株采集拔节期健康小麦(品种分别为豫麦 17 号和豫麦 18 号),用自来水轻轻冲掉泥土,晾干后剪去茎叶部,分别称量 2 个品种的根重,之后分别浸入 0.5%(w/v)的升汞中表面消毒 5min,无菌水冲洗 5 次,无菌剪刀剪碎,置于无菌研钵中,加入 10mL 无菌生理盐水,研磨后静置 5min,取上清液经梯度稀释后分别涂布 8 种分离培养基平板,于 28℃培养,同时,分别取 5~6 条完整的小麦根,经表面消毒后在不同的培养基平板上滚动后培养作为对照,检测表面除菌是否彻底。培养 48h 后,分别计数不同平板上出现的菌落,计算 2 个品种单位根重在不同培养基平板上的菌落形成单位(cfu/g 根重),同时,根据不同培养基平板上长出菌落的形态、颜色、大小等挑取不同的单菌落,分别置于相同的培养基上进行比较,以确定分离出

的菌株的不同。3 次重复,每次每个小麦品种根系研磨液的每个稀释浓度涂布 5 个平板。

1.3 豫东麦区 7 个小麦品种小麦内生细菌的分离和初步鉴定

分别从豫东 5 个县(市)采集 7 个品种的拔节期健康小麦植株,根据上述小麦内生细菌的分离方法,经冲洗、称重、表面消毒和研磨等步骤,将研磨液分别涂布最佳的培养基平板和最差的培养基平板,计数不同小麦品种内生细菌在不同培养基上的菌落形成单位,同时根据培养基平板上长出菌落的形态、颜色、大小等挑取不同的单菌落,分别置于相同的培养基上进行比较,以确定分离出的菌株的不同,不同的菌株经反复画线后置于斜面保存。分别利用形态学、生化等方法对分离出的小麦内生细菌进行初步鉴定^[11]。

1.4 数据分析

将上述不同培养基平板分离统计得到的菌落数以及经对数转化的单位根重菌落形成单位数量数,利用统计软件 SPSS 10.0 进行统计分析,比较不同培养基分离效果的差异

2 结果与分析

2.1 不同培养基分离小麦内生细菌的效果比较

利用不同培养基分离小麦内生细菌,结果显示,无论在数量还是种类上不同平板上长出的内生细菌差异巨大,其中胰酶大豆琼脂和金氏培养基 B 的分离效果最佳,而马铃薯葡萄糖琼脂和脑心浸液琼脂 2 种培养基的分离效果最差(表 1)。同时发现,上述 8 种培养基对 2 种小麦内生细菌分离的菌落数量和菌落种类存在一定的差别,暗示不同小麦内部内生细菌的种类和数量可能存在一定的差别。

表 1 不同培养基对小麦内生细菌的分离效果

培养基	豫麦 17 号		豫麦 18 号	
	菌落形成单位 (Log ₁₀ cfu/g)	菌落种类数 (个)	菌落形成单位 (Log ₁₀ cfu/g)	菌落种类数 (个)
BPA	4.75c	9.21c	3.78c	7.82c
NA	3.23b	7.56b	3.12b	7.60c
TSA	5.87d	13.41d	4.91d	14.02c
PDA	3.11b	4.35a	3.02b	5.33b
KMB	5.64d	14.12d	4.78d	12.95d
LB	4.13c	7.76b	3.45b	8.07c
YPM	4.24c	8.45bc	3.62bc	8.11c
BHI	1.97a	3.70a	1.29a	2.41a

注:不同字母表示 0.05 水平差异显著。下同

2.2 豫东麦区 7 个小麦品种小麦内生细菌的分离和初步鉴定

分别利用分离小麦内生细菌较好的 TSA, KBM 和分离效果较差的 BHI 和 PDA 分别分离来自豫东部分麦区的 7 个小麦品种根系内生细菌, 同时利用形态学和生理生化方法对不同的菌株属进行初步的鉴定, 结果见表 2、表 3。由表 2、表 3 可以看

出, 培养基 TSA 和 KMB 分离出的小麦内生细菌无论从数量上还是种类上都显著优于 BHI 和 PDA 培养基的分离效果, 利用 BHI 和 PDA 分离的菌株, 通过 TSA 和 KMB 培养基都能够分离到, 表明培养基 TSA 和 KMB 为分离小麦内生细菌的适宜培养基。同时发现, 不同小麦品种中内生细菌的数量和种类存在差异。

表 2 不同培养基对不同来源小麦品种内生细菌分离数量的影响

培养基	菌落形成单位 (Log ₁₀ cfu/g)						
	周麦 18	郑麦 9023	济麦 20	开麦 18	豫麦 18 号	新麦 13	豫麦 49 号
TSA	5.85 c	4.67c	5.16c	5.43b	4.22c	4.98c	5.45d
KMB	5.56 c	4.84c	5.01c	5.38b	4.09c	4.79c	4.56c
BHI	2.41a	2.11a	2.28a	2.74a	2.20a	1.81a	2.01a
PDA	3.55 c	3.37b	2.90b	3.06a	3.15b	3.54b	3.45b

表 3 不同小麦品种内生细菌的种类及不同培养基的分离效果

品种及来源	内生细菌的种类(属)			
	TSA	KMB	BHI	PDA
周麦 18 (兰考)	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌, 固氮螺菌, 伯克霍尔德菌, 醋酸杆菌, 泛菌, 欧氏杆菌, 黄杆菌, 节杆菌, 微球菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌, 固氮螺菌, 伯克霍尔德菌, 醋酸杆菌, 泛菌, 黄杆菌, 微球菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 泛菌, 欧氏杆菌, 黄杆菌
郑麦 9023 (兰考)	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌, 固氮螺菌, 伯克霍尔德菌, 醋酸杆菌, 泛菌, 欧氏杆菌, 黄杆菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌, 固氮螺菌, 伯克霍尔德菌, 醋酸杆菌, 泛菌, 欧氏杆菌, 黄杆菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 泛菌, 欧氏杆菌
济麦 20 (夏邑)	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌, 固氮螺菌, 伯克霍尔德菌, 醋酸杆菌, 泛菌, 欧氏杆菌, 黄杆菌, 节杆菌, 微球菌, 其他(2 种)	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌, 固氮螺菌, 伯克霍尔德菌, 醋酸杆菌, 泛菌, 黄杆菌, 微球菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 其他(1 种)	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌
开麦 18 (开封)	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌, 固氮螺菌, 伯克霍尔德菌, 醋酸杆菌, 泛菌, 欧氏杆菌, 沙雷氏菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌, 固氮螺菌, 伯克霍尔德菌, 醋酸杆菌, 泛菌, 欧氏杆菌	芽孢杆菌, 假单孢菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 沙雷氏菌
豫麦 18 号 (宁陵)	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌, 欧氏杆菌, 黄杆菌, 节杆菌, 微球菌, 其他 1 种	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌, 固氮螺菌, 伯克霍尔德菌, 醋酸杆菌, 泛菌, 黄杆菌, 微球菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌
新麦 13 (开封)	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌, 固氮螺菌, 伯克霍尔德菌, 醋酸杆菌, 泛菌, 欧氏杆菌, 黄杆菌, 节杆菌, 微球菌, 沙雷氏菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌, 固氮螺菌, 伯克霍尔德菌, 醋酸杆菌, 泛菌, 沙雷氏菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 微球菌, 沙雷氏菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 沙雷氏菌
豫麦 49 号 (商丘)	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌, 固氮螺菌, 伯克霍尔德菌, 醋酸杆菌, 泛菌, 黄杆菌, 节杆菌, 微球菌, 沙雷氏菌, 固氮菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 土壤杆菌, 固氮螺菌, 伯克霍尔德菌, 醋酸杆菌, 泛菌, 黄杆菌, 节杆菌, 微球菌, 固氮菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 克雷伯氏菌, 微球菌	芽孢杆菌, 假单孢菌, 土壤杆菌, 伯克霍尔德菌, 黄杆菌, 固氮菌

3 讨论

本研究利用已经报道的 7 种用于分离植物内生细菌的培养基分离小麦内生细菌, 发现胰酶大豆琼脂和金氏培养基 B 为分离小麦内生细菌的适宜培养基, 利用选择出的 2 种培养基分离到多种小麦内生细菌, 通过研究小麦内生细菌, 不仅对于阐明小麦

和内生细菌互作具有重要的理论价值, 而且对于开发新的微生物资源, 服务于工农业生产也具有应用价值^[12]。同时发现, 不同小麦品种存在的内生细菌存在一定的差异, 暗示小麦品种和内生细菌之间具有相互选择的关系, 需要对来自不同地域的相同小麦品种的内生细菌的种类进行进一步的研究。(下转第 70 页)

表 6 天敌与红花指管蚜的生态位重叠度和关联度的排序

项目	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁
时间生态位重叠度排序	6	11	2	9	4	1	3	8	5	10	7
空间生态位重叠度排序	4	11	3	10	5	2	1	8	7	6	9
时间×空间生态位重叠度排序	5	11	2	10	4	1	3	8	6	9	7
关联度 G(y, X _i)排序	3	11	1	9	6	4	5	7	2	8	10
时间生态位重叠度积分	6	1	10	3	8	11	9	4	7	2	5
空间生态位重叠度积分	8	1	9	2	7	10	11	4	5	6	3
时间×空间生态位重叠度积分	7	1	10	2	8	11	9	4	6	3	5
关联度 G(y, X _i)积分	9	1	11	9	6	8	7	5	10	4	2
总积分	30	4	40	16	29	40	36	17	28	15	15
总积分排序	4	11	1	7	5	1	3	10	6	8	8

3 结论

对徐州地区红花指管蚜及其天敌时空生态位研究结果表明,红花指管蚜及其天敌的时间生态位宽度较小而空间生态位宽度较大,说明这些昆虫种群的发生有高峰期明显和全株分布的特点。红花指管蚜的时动空间生态位宽度与种群密度相关显著;天敌中七星瓢虫和草间小黑蛛的时间×空间生态位宽度较大,说明它们发生期较长、活动范围较广;大草蛉、龟纹瓢虫、蚜茧蜂、食蚜蝇、草间小黑蛛和七星瓢虫与红花指管蚜时间生态位重叠度指数和相似性指数均较大。蚜茧蜂、大草蛉、龟纹瓢虫、食蚜蝇和七星瓢虫空间生态位重叠度指数和相似性指数均较大,与红花指管蚜的时间×空间生态位重叠度,大草蛉、龟纹瓢虫、蚜茧蜂、食蚜蝇、七星瓢虫和草间小黑蛛显著较大。红花指管蚜数量与天敌数量的关联度:龟纹瓢虫>草间小黑蛛>七星瓢虫>大草蛉>

蚜茧蜂>食蚜蝇>小花蝽>八斑球腹蛛>黑襟毛瓢虫>三突花蛛>异色瓢虫。根据天敌与红花指管蚜时间生态位重叠度、空间生态位重叠度、时间×空间生态位重叠度、关联度总积分排序结果可知:龟纹瓢虫=大草蛉>蚜茧蜂>七星瓢虫>食蚜蝇>草间小黑蛛>黑襟毛瓢虫>八斑球腹蛛=三突花蛛>小花蝽>异色瓢虫。这些研究结果对深入探讨红花指管蚜种间竞争关系及天敌的合理评价提供了参考依据。

参考文献:

[1] 周夏芝,李磊,音正兵,等.桃一点叶蝉及其天敌类群时空生态位分析[J].安徽农业大学学报,2003,30(2):202—205.
[2] 胡长效,张广花,杨培,等.梨二叉蚜及其天敌时空生态位研究[J].江苏农业科学,2006(6):175—178.
[3] 毕守东,邹运鼎,陈高潮,等.各种天敌对麦长管蚜和麦二叉蚜种群数量影响程度的研究[J].安徽农业大学学报,2000,27(2):112—115.

(上接第 65 页)

参考文献:

[1] Kloepper J W, Beauchamp C J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1992, 38: 1219—1232.
[2] Cindy L, Jaco V, Fiona P, et al. Endophytic bacteria and their potential applications[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2002, 21(6): 583—606.
[3] 袁军,孙福在,田宏先,等.防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选[J].微生物学报,2002,42(3): 270—274.
[4] 易龙,肖崇刚,马冠华,等.防治烟草赤星病有益内生细菌的筛选及抑菌作用[J].微生物学报,2004,44(1): 19—22.
[5] Júlia K S, Welington L A, Rodrigo M, et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion [J]. Environmental Microbiology, 2004, 6(12): 1244—1251.
[6] 乔宏萍,黄丽丽,康振生.小麦内生细菌及其对根茎部主要病原真菌的抑制作用[J].应用生态学报,2004,17(4): 690—694.
[7] 何红,蔡学清,洪永聪,等.辣椒内生细菌的分离及拮抗菌的筛选[J].中国生物防治,2002,18(4): 171—175.
[8] 王刚,李志强.小麦内生细菌的分离及其对小麦纹枯菌的拮抗作用[J].微生物学通报,2005,32(2): 20—24.
[9] Kazuhisa T, Yoshitaka K, Seiji T, et al. Evaluation of the endophyte *Enterobacter cloacae* SM10 Isolated from spinach roots for biological control against Fusarium Wilt of Spinach [J]. Journal of General Plant Pathology, 2001, 67(1): 78—84.
[10] Katarina C, Hojka K, Maja R, et al. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 244(2): 341—345.
[11] 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.
[12] 韩继刚,宋未.植物内生细菌研究进展及其应用潜力[J].自然科学进展,2004,14(4): 374—379.