

# 华重楼内生菌 SS02 的分离与抗菌活性的初步研究\*

杨正强 张耀兮 陈小静 赵明 王一丁\*\*

(四川师范大学生命科学学院 成都 610068)

**摘要:** 从华重楼 (*Paris polyphylla* var. *Chinensis* Franch) 的地下块茎中分离到一株内生细菌 (SS02), 试验表明其发酵液对 13 种作物致病菌的生长有抑制作用。形态和生理生化特征表明 SS02 属于芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 细菌。扩增、测序得到 SS02 的部分 16S rDNA 序列, GenBank 接收号 AY842144。用 Blastn 调出与菌株 16S rDNA 同源的序列, 用 Clustalw 进行多重序列对比, 用 Phylip 按 Neighbor-Joining 法构建 16S rDNA 系统发育树。菌株 SS02 与 *Paenibacillus daejeonensis* 处于同一分支, 相似性为 97.7%, 将其鉴定为 *Paenibacillus daejeonensis* SS02。

**关键词:** 华重楼, 内生菌, 抗菌谱, 16S rDNA 序列分析

**中图分类号:** Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0054-05

## Studies on the Isolation and Antibiotic Activities of Endophytes in *Paris polyphylla* var. *Chinensis* franch\*

YANG Zheng-Qiang ZHANG Yao-Xi CHEN Xiao-Jing ZHAO Ming WANG Yi-Ding\*\*

(College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610068)

**Abstract:** One endophytic stain SS02 was isolated from the underground stems of *Paris polyphylla* var. *Chinensis* franch. The ferments of SS02 showed antibiosis activities against 13 kinds of the crop causes germs. The characteristics of morphology, physiological and biochemical showed that SS02 belonged to *Bacillus* sp. The 16S rDNA of SS02 was PCR and sequenced. The accession of GenBank is AY842144. The one 16S rDNA phylogenetic tree was constructed by comparing with the published 16S rDNA sequences of the relative bacteria species. In the phylogenetic tree SS02 and *Paenibacillus daejeonensis* was the closest relative with 97.7% sequence similarity. According to the phylogenetic analysis it was identified as *Paenibacillus daejeonensis* SS02.

**Key words:** *Paris polyphylla* var. *Chinensis* Franch, Endophyte, Antibiotic table, 16S rDNA sequence analysis

真菌病害是作物损失的主要原因之一, 80% 作物病害是由病原真菌所引起。对作物真菌病菌害的防治主要依赖化学药剂, 虽然它们对作物增产起了重要作用, 但同时也造成了严重的环境污染。目前倾向于采用生物农药防治真菌病害, 因而寻找抗菌谱广、对人畜无毒、对环境无危害的农用抗生素已成为防治作物真菌病害之一。近年来, 植物内生菌作为一种新的微生物资源引起了广泛的关注, 从内生菌中发现新的活性化合物是植物内生菌研究的一个热点。大量研究表明植物内生菌产生的次生代谢物能够抑制多种微生物, 不仅在抗植物病害方面有重要的意义, 而且可能成为医用抗生素的新资源, 在医药行业同样具有重要的研究价值和应用前景。本文从华重楼中分离得到 1 株可抑制多种植物致病真菌生长的细菌, 并通过形态、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析对菌株进行了鉴定。

\* 四川师范大学校级科研基金资助项目

\*\* 通讯作者 Tel: 028-84766411, E-mail: wwwyiding@vip.tom.com

收稿日期: 2005-06-13, 修回日期: 2005-09-14

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试材料:** 新鲜野生华重楼由四川光大制药公司提供。供试菌株: 绿色木霉 (*Trichoderma viride*)、芦笋茎枯病菌 (*Phoma asparagi* Sacc)、番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、苹果轮纹病菌 (*Physalospora piricala*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、杨树溃疡病菌 (*Dothiorella gregaria*)、小麦全蚀病菌 (*G. graminis* var. *tritici*)、油菜菌核病菌 (*S. sclerotiorum*)、小麦叶锈病菌 (*P. recondita* var. *tritici* Erikss et Henn)、冬瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* Schl. emend. Snyder & Hansen)、稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*)、小麦根腐病菌 (*Bipolaris sorokinia*) 和黄瓜炭疽病菌 (*Colletorichuum lagenarium*)，以上菌株由中国农业科学院作物科学研究所重大工程开放实验室保存。

**1.1.2 试剂:** 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒购于上海华舜生物工程公司；EX Taq 酶和 PCR 相关试剂购于大连 TaKaRa 公司；其余试剂为国产分析纯。

**1.1.3 培养基:** 分离培养基为固体马铃薯培养基，其配方：马铃薯（去皮）：20%，蔗糖：2%，琼脂：1.8%，pH 自然。发酵培养基为液体马铃薯培养基，按文献 [1] 配制。

### 1.2 方法

**1.2.1 内生菌的分离:** 将鲜重楼块茎，洗净泥土，无菌水冲洗 2 次，无菌滤纸吸干水分。常规无菌操作下，75% 乙醇浸泡 1min，水冲洗 3 次，滤纸吸干水分；0.2% 的氯化汞浸泡 5min，水冲洗 10 次，滤纸吸干水分。用无菌解剖刀将已表面消毒的重楼块茎削去表皮，切成 3cm 大小的正方体，置于分离培养基平板内，28℃ 培养 4~8d。待平板有菌长出后，平板划线纯化，直至得到单菌落，斜面保存备用。

**1.2.2 待测样品制备:** 将分离得到的菌株，接入发酵培养基中 28℃，150r/min 振荡培养。培养至 96h 取培养液 1mL，1,000r/min 离心 5min，上清为待测样品。

**1.2.3 抗菌活性测定:** 采用杯碟法测定样品抗真菌活性。接种供试真菌于马铃薯培养基 (PDA) 平板中央，28℃ 培养至菌落直径长为 3cm 左右，取出置 4℃ 冰箱备用。在离菌丝前沿 5mm 处放置灭过菌的牛津杯，取样品 100μL 加入其内，每平板以无菌蒸馏水或上柱缓冲液为对照，28℃ 培养 8~72h 后，观察真菌菌丝生长受抑制情况。

**1.2.4 菌株形态和生理生化特征研究:** 菌株 SS02 形态学观察和生理生化实验参照文献 [2] 进行。

**1.2.5 PCR 扩增:** 按试剂盒操作说明书提取细菌基因组 DNA 为模板，以 27F (5' - AGAGTTTGATCATGGCTCAG -3') 和 1540R (5' - AAGGAGGTGATCCAACCGCA-3') 为上、下游引物<sup>[3]</sup> 扩增各菌株的 16S rDNA。PCR 反应体系：Ex Taq 酶 0.3μL、dNTP 4μL、DNA 模板 1μL、上游引物 (17μmol/L) 1.3μL、下游引物 (22μmol/L) 1μL、10× Buffer 5μL、双蒸水 33.4μL。反应条件：95℃ 5min；94℃ 1min，55℃ 1min，72℃ 4min，循环 30 次；72℃ 15min。用胶回收试剂盒回收片段，由上海生物芯片工程公司测序。测序引物为 27F、518F (5' - CAGCAGCCGCGGTAATACGG -3') 和 1540R。

**1.2.6 16S rDNA 序列分析:** 用 Blastn 比较菌株 16S rDNA 与 GenBank 中已登录的序列，调出与菌株 16S rDNA 同源并经过菌种鉴定的序列，用 Clustalw 进行多重序列对比，用软件 Phylip 按 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

## 2 结果

### 2.1 内生菌的分离

按方法从华重楼地下块茎中分离得到 107 株内生菌, 分离过程中发现一株菌 (编号为 SS02) 强烈抑制同平板上的其他菌的生长。

### 2.2 抗菌谱的测定

制备 SS02 的发酵液, 同时接种供试菌株, 测定 SS02 对供试菌株的作用 (表 1)。

表 1 SS02 对致病真菌的抑制作用

致病真菌	活性	致病真菌	活性
芦笋茎枯病菌	++	油菜菌核病菌	+++
番茄灰霉病菌	++	小麦叶锈病菌	++
苹果轮纹病菌	+++	冬瓜枯萎病菌	+++
棉花枯萎病菌	+	稻瘟病菌	++
杨树溃疡病菌	++	小麦根腐病菌	+
小麦全蚀病菌	+	绿色木霉	+++
黄瓜炭疽病菌	+		

注: +++ 表示活性较强, ++ 表示活性强, + 表示有活性

### 2.3 菌株形态和生理生化特征

菌株 SS02 的形态特征与生理生化试验结果见表 2, 检索文献 [4] 初步确定 SS02 为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 细菌。

### 2.4 DNA 提取和 PCR 扩增

从生长旺盛的菌株体内得到了细菌的总 DNA, 用引物 27F 和 1540R 进行 PCR 扩增, 得到一条约为 1.5kb 带, 结果见图 1。

表 2 菌株形态和生理生化特征

	SS02
菌体形态	长杆状
排列方式	链状
菌体大小	长: $4.5\mu\text{m} \sim 5\mu\text{m}$ 宽: $0.5\mu\text{m} \sim 0.75\mu\text{m}$
芽孢	有
革兰氏染色	+
氧化酶实验	-
过氧化氢酶实验	-
产生吡啶实验	+
酪素水解实验	+
明胶水解实验	+
硝酸盐还原实验	+
甲基红实验	+
淀粉水解实验	+
从甘油产生二羟基丙酮实验	-
葡萄糖发酵实验	发酵型产酸
V.P 实验	+

注: + 表示阳性, - 表示阴性

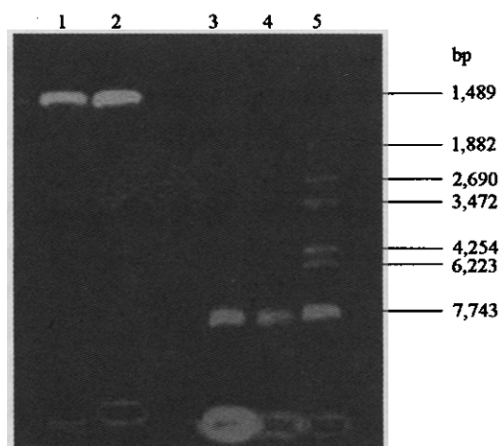


图 1 PCR 和总 DNA 提取琼脂凝胶电泳  
1、2 菌株 SS02 PCR 扩增的条带, 3、4 菌株 SS02 的总 DNA 条带, 5 Markes ( $\lambda$ -DNA/EcoT14)

## 2.5 16S rDNA 系统发育分析

委托上海生物芯片工程公司测得 SS02 的部分 16S rDNA 上游 539bp、下游 644bp (GenBank 接收号为 AY842144)。Blastn 比较发现 SS02 的 16S rDNA 上、下游序列分别与多株芽孢杆菌的 16S rDNA 相似, 调出分别与 16S rDNA 上、下游序列相似并经过鉴定的菌株的 16S rDNA 序列, 用 Clustalw 进行多重序列对比, 用软件 Phylip 按 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 结果见图 2。由图 2 可知 SS02 的 16S rDNA 上、下游序列分别与 AF391124 (*Paenibacillus daejeonensis*) 处于同一分支, 用 ClustalW 比对计算 SS02 的部分 16S rDNA (1183bp) 与 AF391124 的同源性, 结果为 97.7%, 表明 SS02 与 *Paenibacillus daejeonensis* 同种, 命名为 *Paenibacillus daejeonensis* SS02。

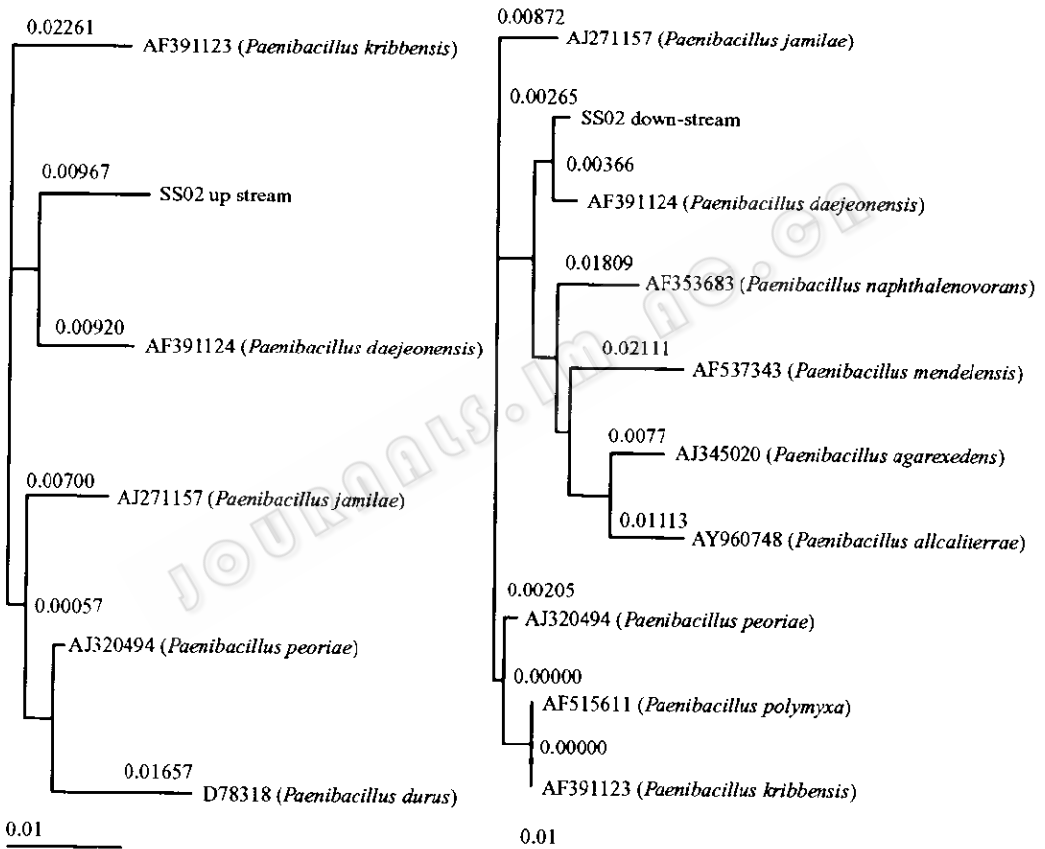


图 2 SS02 的 16S rDNA 系统发育树

**致谢** 中国农业科学院作物科学研究所重大工程开放实验室潘映红等老师提供了试验菌株, 冯定胜、张晓洁在实验中做了部分工作, 特致感谢。

## 参考文献

- [1] 黄秀梨. 微生物学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1996. 114.
- [2] 张纪忠. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990. 93 ~ 105.
- [3] 刘志恒. 现代微生物学. 北京: 科学出版社, 2002. 62 ~ 63.
- [4] BUCHANAN R E, GIBBONS N E. 伯杰细菌鉴定手册. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译 (第 8 版). 北京: 科学出版社, 1984.
- [5] Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, et al. Crop Science, 1997, 276: 726 ~ 733.