

银杏内生细菌的分离鉴定及抑菌活性初探

范晓静¹ 黄未¹ 邱思鑫² 胡方平^{1*}

(1. 福建农林大学 植物保护学院 福建 福州 350002)

(2. 福建省农业科学院 作物研究所 福建 福州 350013)

摘 要: 【目的】从银杏(*Ginkgo biloba*)茎叶中分离鉴定内生细菌,测定其体外抑菌活性及对辣椒果疫病的防治效果。【方法】采用平板对峙法筛选出对辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)有拮抗作用的内生细菌,并用平板扣法测定其中一株防治效果较好的内生细菌产生的挥发性物质对辣椒疫霉菌生长的影响。通过生防菌液和病原菌孢子悬浮液喷雾接种辣椒果测定该菌株对辣椒果疫病的防治效果。基于形态特征、生理生化特性、16S rDNA 和 *gyrA* 基因序列同源性分析鉴定该生防菌株。【结果】从银杏的茎和叶中分离获得 9 株内生细菌。平板对峙生长试验结果表明,菌株 W5 对供试的辣椒疫霉菌、稻瘟病菌(*Pyricularia grisea*)、水稻纹枯菌(*Rhizoctonia solani*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、荔枝霜疫霉菌(*Peronophythora litchi*)、荔枝酸腐菌(*Geotrichum candidum*)均有抑制作用,其中对辣椒疫霉菌、稻瘟病菌和荔枝霜疫霉菌的抑菌效果显著,抑菌率分别为 88.9%、86.3%和 90.2%。其产生的挥发性物质能明显抑制辣椒疫霉菌菌丝的生长。对辣椒采后果疫病的防治效果表明,先喷雾接种 W5 菌悬液 24 h 后再接种辣椒疫霉菌孢子悬浮液的防治效果最好,可将辣椒果的保鲜期延长 2–3 d。该菌株被鉴定为解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。【结论】获得了一株对植物病原菌物有良好防治效果的银杏内生解淀粉芽胞杆菌 W5,对辣椒采后果疫病及其他病原真菌的防治具有潜在应用价值。

关键词: 银杏, 内生细菌, 抑菌活性, 挥发性物质, 鉴定

基金项目: 福建省科技厅自然科学基金项目(No. 2010J05049)

*通讯作者: Tel: 86-591-83901188; 信箱: huf@fjau.edu.cn

收稿日期: 2012-11-12; 接受日期: 2013-03-11

Isolation and identification of endophytic bacterial strains from *Ginkgo biloba* and their antimicrobial activities

FAN Xiao-Jing¹ HUANG Wei¹ QIU Si-Xin² HU Fang-Ping^{1*}

(1. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

(2. Crop Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: [Objective] To isolate and identify biocontrol bacterial strains from *Ginkgo biloba* and evaluate their inhibition to *Phytophthora capsici* *in vitro* and control efficacy against fruit phytophthora blight of pepper. **[Methods]** The method of dual culture on agar plate was used for screening the antagonistic endophytic bacteria against *P. capsici*, and the inhibition effect of the volatile substances from a better control effect strain on *P. capsici* was tested by two-sealed-base-plates method. Control efficacy against pepper phytophthora blight was evaluated by spraying bacterial cultures on capsicum fruits. The identification of bacterial strains was based on morphological, physiological, biochemical characteristics and phylogenetic analysis of 16S rDNA and *gyrA* gene sequences. **[Results]** Nine endophytic bacterial strains were isolated from healthy stems and leaves of *Ginkgo biloba*. Among them strain W5 was selected for further study, which had antagonistic action against *P. capsici*, *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Peronophythora litchii*, *Geotrichum candidum* on agar plates, especially to *P. capsici*, *P. grisea* and *P. litchi*, the inhibitory rates were prominent with 88.9%, 86.3% and 90.2%, respectively. The volatile substances produced by strain W5 could significantly inhibit the mycelia growth of *P. capsici*. The control results of fruit phytophthora blight of pepper by strain W5 showed that it could get better protective efficacy when the spore suspension of the pathogen was inoculated 24 h after spraying inoculation with strain W5. And spraying strain W5 could also prolong the fresh period of pepper fruits to 2–3 d than the control. The strain W5 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. **[Conclusion]** An antagonistic *B. amyloliquefaciens* strain W5 was obtained, and it had potential for the biological control of fruit phytophthora blight of pepper and other pathogenic fungal diseases.

Keywords: *Ginkgo biloba*, Endophytic bacteria, Antimicrobial activity, Volatile substances, Identification

1876 年 Pasteu 认为葡萄果实内不会有细菌, 但却在提取的葡萄果汁中发现了细菌^[1], 从此揭开了人们对植物内生菌的研究序幕, 到目前为止, 已在多种植物中分离到了内生细菌^[2–3]。银杏

(*Ginkgo biloba*)是我国特有的世界珍稀名贵树种, 是银杏属现存的唯一生存种。银杏经过上亿年的演化而存活下来, 且在生长期中几乎不感染病虫害, 根据内共生理论学说推测^[4], 与其协同进化

的内生菌也必定有其独特性。已有研究表明银杏体内的内生真菌种群相对比较丰富^[5-6], 并已筛选得到多种具有抗真菌活性的内生真菌菌株^[7-10]。国内外有关银杏内生真菌的研究较多, 内生细菌的研究相对较少。李勃等^[11]从银杏中分离出 16 株内生细菌, 得到一株对甘薯干腐病菌(*Fusarium oxysporum*)、梨黑斑病菌(*Alternaria kikuchiana*)、柑橘绿霉病菌(*Penicillium digitatum*)和苹果青霉病菌(*Penicillium expansum*)等主要水果采后病原具有显著抑制作用的菌株 A97。李长根等^[12-13]采用分离自银杏组织的内生细菌的发酵液提取物来抑制林木变色真菌。本实验室宋美仙^[14]从银杏组织中分离筛选出对萝卜软腐病菌有较强抑制作用的内生细菌。本研究从银杏茎和叶中分离内生细菌, 筛选获得对多种植物病原真菌具有拮抗活性的菌株 W5。该菌株产生的挥发性物质对辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)有较强的拮抗作用, 其发酵菌液对辣椒果疫病具有较好的防治效果, 有望成为开发生物杀菌剂的潜力菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

银杏(*Ginkgo biloba*)样本分别采集于福建省南平市顺昌银杏种植地以及福建农林大学校区内。

辣椒果疫病试验品种为青皮尖椒(*Capsicum annuum* L.)。

辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)、稻瘟病菌(*Pyricularia grisea*)、水稻纹枯菌(*Rhizoctonia solani*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、荔枝霜疫霉菌(*Peronophythora litchi*)、荔枝酸腐菌(*Geotrichum candidum*)均由本实验室分离鉴定保存。

内生细菌分离采用 TSA 培养基(胰蛋白胨

15 g, 大豆胨 5 g, NaCl 5 g, 琼脂 16 g, pH 7.3, 加水至 1 L); 细菌培养采用 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 琼脂 16 g, pH 7.0, 加水至 1 L); 病原真菌培养用 PDA 培养基(马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 18 g, 自然 pH, 加水至 1 L)。

1.2 银杏茎、叶内生细菌的分离纯化

将银杏的茎、叶先用水冲洗干净, 然后随机称取各部分 5 g, 70%酒精浸泡 1 min, 再用 5%次氯酸钠表面消毒 5-10 min (叶片 5 min, 茎 10 min), 无菌水冲洗 3 次, 将洗净的银杏组织印记在 LB 培养基上, 每个处理重复 3 次, 培养 48 h, 观察有无菌落产生, 据此验证此消毒方法是否能全部杀死供试材料表面微生物。样品晾干后移入无菌研钵中, 加 10 mL 无菌水研磨成匀浆, 静置 15 min 后, 各取 50 μ L 涂平板, 每处理重复 3 次, 30 $^{\circ}$ C 黑暗培养 48-72 h, 计算菌落数。根据菌落形态、颜色等挑取不同单菌落, 按常规方法纯化后保存, 供测试鉴定。

1.3 银杏内生拮抗细菌菌株的筛选

采用对峙生长法, 测定所有分离菌株对辣椒疫霉菌的拮抗作用。在直径为 9 cm 的 PDA 平板中央接入活化过的 8 mm 真菌菌丝块, 同时在距中央 2.5 cm 处接入一环培养 24-48 h 的分离菌株菌苔, 24 $^{\circ}$ C 黑暗培养, 设不接种分离菌株的处理为对照。对拮抗效果好的分离菌株进行标号, 仍采用对峙生长法, 进一步测定这些菌株对其他 6 种供试病原真菌的拮抗作用。7 d 后十字交叉法测量抑菌圈直径(mm)和对照处理菌落直径(mm), 并计算抑制率。抑制率的计算公式: 抑制率=[(对照处理菌落直径-处理菌落直径)/对照处理菌落直径] \times 100%

1.4 拮抗细菌对辣椒疫霉菌菌丝的致畸作用

在 PDA 平板培养基上同时接种活化过的拮

抗菌株和辣椒疫霉病原菌, 24 °C 黑暗培养至出现抑菌圈后, 在抑菌圈边缘挑取菌丝, 光学显微镜镜检菌丝生长状况, 同时设不接种拮抗菌株的处理为对照。

1.5 拮抗细菌挥发性物质对辣椒疫霉菌生长的影响

平板对扣法参考文献[15]进行。具体操作方法为: 拮抗菌株在 LB 培养液中 30 °C 培养 48 h, 取 100 μ L 菌液涂布于 LB 平板上, 37 °C 培养 24 h。在 PDA 平板培养基中央接种活化过的辣椒疫霉菌。去掉拮抗菌的培养皿盖, 将 LB 培养皿倒扣在 PDA 培养皿上, 用封口膜将两皿交接处密封, 24 °C 黑暗培养 7 d。对照为按照上述方法对扣的病原菌平板和空白 LB 平板。观察挥发性物质对辣椒疫霉菌的作用。

1.6 拮抗细菌菌株对辣椒采后果疫病的防治

选用新鲜无病辣椒果, 70%酒精表面消毒后, 单果分开放入塑料盆, 每盆放 5 个辣椒果, 设四组处理: 第 1 组处理先喷雾接种浓度为 10^5 孢子/mL 的辣椒疫霉菌游动孢子悬浮液, 以果面布满液体为度, 经过 24 h 之后, 喷雾培养 48 h 的生防菌 W5 菌液($OD_{600}=2$), 24 °C–26 °C 保湿培养; 第 2 组处理同时喷雾接种辣椒疫霉菌游动孢子悬浮液和生防菌 W5 菌液(浓度同上), 同样以果面布满液体为度, 24 °C–26 °C 保湿培养; 第 3 组处理先喷雾生防菌 W5 菌液, 24 h 之后喷雾接种辣椒疫霉菌游动孢子悬浮液(浓度同上), 24 °C–26 °C 保湿培养; 第 4 组处理先喷雾对辣椒果疫病有较好防病效果的内生细菌 TB2 菌液(本实验室筛选^[16], $OD_{600}=2$), 24 h 之后喷雾接种辣椒疫霉菌游动孢子悬浮液(浓度同上), 24 °C–26 °C 保湿培养。每组处理重复 3 次, 第 3 天开始观察发病情况并记录。以清水处理接种病原菌为对照计算防病效果^[17]。

1.7 拮抗细菌菌株的鉴定

以枯草芽孢杆菌标准菌株 BS168 (*B. subtilis*) 为对照菌株。参照东秀珠等^[18]的方法进行鉴定。

细菌基因组 DNA 的制备参考文献[19]的方法。

16S rDNA 序列的 PCR 扩增和序列测定。采用细菌通用引物 27F 和 1492R^[20]进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。反应完成后, 琼脂糖凝胶电泳检测, Omega 公司凝胶回收试剂盒纯化回收 PCR 产物, 将回收产物连接到 pMD18-T 载体, 转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞, 挑取验证正确的阳性克隆子, 委托上海生物工程有限公司测序。

gyrA 基因序列的 PCR 扩增和序列测定。根据文献[21]报道的引物进行 *gyrA* 基因序列的 PCR 扩增; 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物的克隆和测序同上。

DNA 序列测定由上海生工生物工程技术服务有限公司进行。测序得到的 16S rDNA 和 *gyrA* 基因序列利用 GenBank 中的 BLAST 软件进行同源性分析, 采用 MEGA 4.0 软件进行序列比对和聚类分析, Neighbour-Joining (Bootstrap 1 000)法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 拮抗辣椒疫霉菌的内生细菌筛选

从银杏体内分离筛选出 9 株对辣椒疫霉菌能形成抑菌带的拮抗细菌(表 1), 受抑制的病原菌菌落直径为 10.0 mm–38.0 mm, 抑菌带宽为 2.5 mm–9.0 mm, 其中以菌株 W5 的抑菌效果最好, 抑菌带宽达 9.0 mm, 抑菌率高达 88.9%。进一步测定菌株 W5 对其它植物病原真菌的拮抗能力, 结果见表 2。

表 1 筛选菌株对辣椒疫霉菌的抑制作用
Table 1 Inhibition activity of tested strains to *P. capsici*

| 菌株 Strains | 辣椒疫霉菌 <i>P. capsici</i> | | |
|---------------|---|------------------------------|----------------------------|
| | 菌丝扩展直径 Diameters of mycelia spreading (mm) | 抑菌带宽 Inhibition zone (mm) | 抑菌率 Inhibition rate (%) |
| W1 | 18.0 | 5.0 | 80.0 |
| W2 | 18.0 | 8.0 | 80.0 |
| W3 | 18.0 | 7.0 | 80.0 |
| W4 | 24.0 | 4.5 | 73.3 |
| W5 | 10.0 | 9.0 | 88.9 |
| X1 | 14.0 | 8.5 | 84.4 |
| X2 | 38.0 | 2.5 | 57.8 |
| X5 | 22.0 | 4.5 | 75.6 |
| X6 | 16.0 | 8.0 | 82.2 |
| Control | 90.0 | — | — |

表 2 菌株 W5 对测试的几种植物病原真菌菌丝生长的抑制作用
Table 2 Inhibition activity of strain W5 to the tested plant fungal pathogens

| 植物病原真菌 Plant pathogenic fungi | 菌丝扩展直径 Diameters of mycelia spreading (mm) | 抑菌带宽 Inhibition zone (mm) |
|----------------------------------|---|------------------------------|
| 稻瘟病菌 <i>P. grisea</i> | 8.4 | 11.1 |
| 水稻纹枯菌 <i>R. solani</i> | 30.6 | 1.4 |
| 黄瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> | 30.6 | 5.6 |
| 荔枝霜疫霉菌 <i>P. litchii</i> | 8.8 | 11.8 |
| 荔枝酸腐菌 <i>G. candidum</i> | 30.6 | 4.2 |

在平板拮抗实验中, 菌株 W5 对几种测试的植物病原真菌都有不同程度的拮抗作用。除了对辣椒疫霉菌拮抗效果明显外, 对稻瘟病菌和荔枝霜疫霉菌也有很强的拮抗作用, 抑菌率分别为 86.3%和 90.2% (表 2, 图 1), 在接种与培养条件相同的情况下, 病原菌菌丝几乎没有生长。而对水稻纹枯菌、黄瓜镰刀菌和荔枝酸腐菌的拮抗作用较弱, 病原菌包围在拮抗菌周围, 几乎扩展到了整个平板。

2.2 菌株 W5 对辣椒疫霉菌菌丝的致畸作用

镜检结果表明, 对照菌丝生长正常, 菌丝表面光滑, 形状均匀。拮抗菌使辣椒疫霉菌菌丝膨大, 分枝增多, 菌丝体成丛簇状、姜片状, 但未

见有细胞壁消融现象(图 2)。

2.3 菌株 W5 挥发性物质对辣椒疫霉菌的抑制效果

采用平板对扣法证明了菌株 W5 在 LB 培养基上产生的挥发性气体对辣椒疫霉菌菌丝生长有较强的抑制作用(图 3)。培养 7 d 的对照组辣椒疫霉菌菌丝生长正常, 几乎长满整个平板, 而处理组的辣椒疫霉菌菌丝生长缓慢, 受到明显抑制。

2.4 生防菌 W5 菌液防治辣椒果疫病的效果

分别采用不同处理测定 W5 生防菌液对辣椒采后果疫病的防治效果(图 4)。结果表明, 生防菌液与病原菌孢子悬浮液接种先后顺序不同, 其

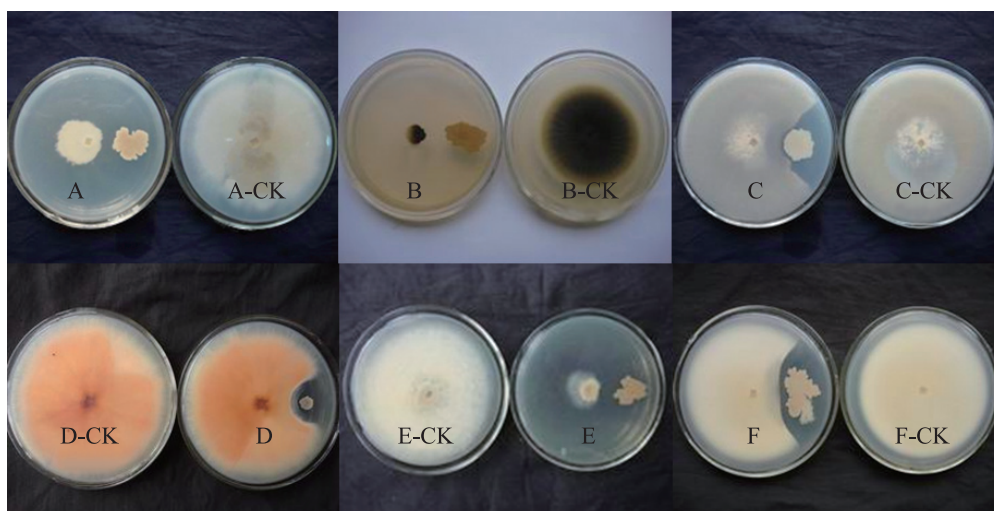


图1 菌株 W5 对测试的几种植物病原真菌的平板拮抗活性

Fig. 1 Antagonistic activity of strain W5 to tested plant fungal pathogens on agar plates

注: A: 辣椒疫霉菌; B: 稻瘟病菌; C: 水稻纹枯菌; D: 黄瓜枯萎病菌; E: 荔枝霜疫霉菌; F: 荔枝酸腐菌.

Note: A: *P. capsici*; B: *P. grisea*; C: *R. solani*; D: *F. oxysporum*; E: *P. litchii*; F: *G. candidum*.

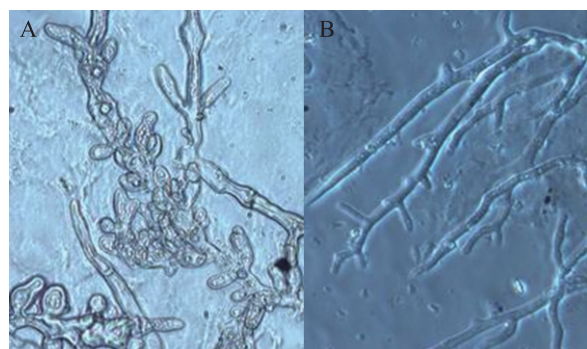


图2 菌株 W5 对辣椒疫病菌菌丝的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effect of strain W5 to the mycelia of *P. capsici*

注: A: 受到抑制的菌丝; B: 正常菌丝.

Note: A: The abnormal hyphae form of *P. capsici*; B: The normal hyphae form of *P. capsici*.

防病效果差异显著($P < 0.05$)。预先接种辣椒疫霉菌 24 h 后接种 W5 菌液, 防治效果最差, 处理 72 h 的防病效果只有 5.01%, 6 d 内的平均防治效果为 6.18%, 对于辣椒采后果疫病的防治几乎不起作用。而先喷雾生防菌液后再接种病原菌, 防治效果显著提高。另外, W5 菌液处理后间隔不同时间接种病菌, 其防病效果也有显著差异。先喷

雾接种 W5 菌液 24 h 后接辣椒疫霉菌, 防治效果最佳, 接种病菌 72 h 未发病, 第 4 天时的防病效果为 79.81%; 喷雾接种 W5 菌液后立即接种辣椒疫霉菌, 72 h 的防病效果仅为 43.98%, 第 4 天的防病效果最高, 为 47.83%。与同样对辣椒采后果疫病有较好生防作用的内生细菌 TB2 的防病效果相比, W5 对辣椒采后果疫病的防治效果略高于生防菌 TB2 的防病效果, 但各时间的防治效果均没有显著差异。

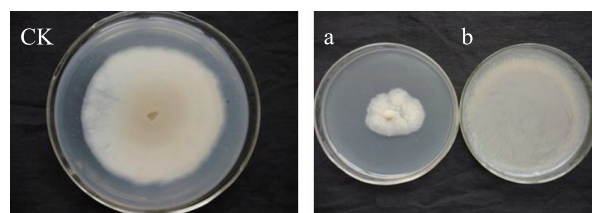


图3 菌株 W5 挥发性物质对辣椒疫病菌菌丝生长的抑制作用

Fig. 3 Inhibitive activity of volatile substances of W5 to the mycelial growth of *P. capsici*

注: a: 受到抑制的辣椒疫霉菌; b: W5 菌株. CK: 未受到抑制的辣椒疫霉菌.

Note: a: The inhibited *P. capsici*; b: W5. CK: The normal *P. capsici*.

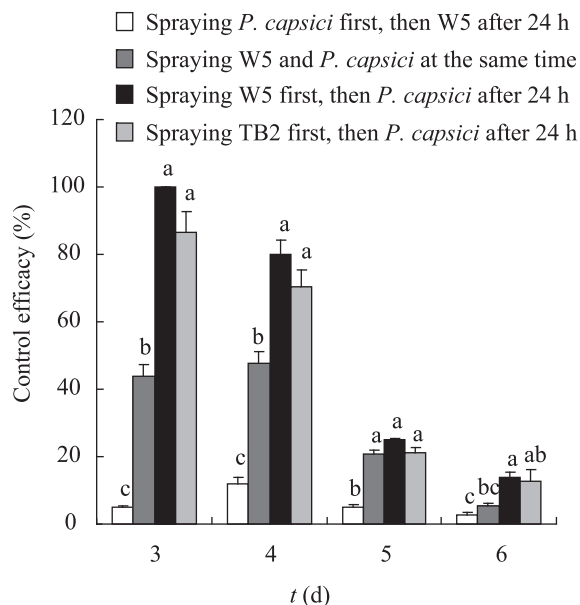


图4 生防菌液对辣椒果疫霉病菌的防治效果

Fig. 4 Control efficacy of strain W5 cultures to the phytophthora blight of pepper fruits

注: 柱形图上不同字母表示 0.05 水平上显著差异(Duncan's 新复极差测验).

Note: Mean values with different letters on the column are significantly different by Duncan's multiple range test at the $P < 0.05$ levels.

2.5 菌株 W5 的鉴定

2.5.1 菌株 W5 的菌体形态、菌落特征及生理生化特性:

菌株 W5 在平板上的菌落前期为圆形、乳白色、半透明、略凸起、边缘整齐, 后期为近圆形、灰白色、干燥、不透明、边缘波浪状。革兰氏染色阳性, 菌体短杆状, 产芽孢, 芽孢卵圆形, 在菌体中央, 鞭毛周生。生理生化测定结果显示: 菌株 W5 最适生长温度为 28°C – 37°C , 耐高温, 50°C 仍然可以生长, 但不耐低温, 20°C 以下长势缓慢或不生长; 能在 10% NaCl 的水溶液中生长; 能利用 D-葡萄糖, 但不产气; 接触酶反应呈阳性; 苯丙氨酸脱氨酶反应呈阴性; 能利用丙二酸盐, 但不利用柠檬酸盐; 能利用 D-木糖、D-甘露醇和 L-阿拉伯糖等产酸; 能水解淀粉, 但不能液化明胶; 能将硝酸盐还原到亚硝酸盐, 但不能生成吡啶; 甲基红测定呈阴性, 而 V-P 测定

呈阳性。根据形态特征和生理生化特征, 初步将菌株 W5 归于芽胞杆菌属。

2.5.2 菌株 W5 的 16S rDNA 和 *gyrA* 基因序列测定及系统发育分析: 16S rDNA 和 *gyrA* 基因扩增产物经克隆和测序分析, 得到的长度分别为 1 513 bp 和 1 025 bp。16S rDNA 序列 BLAST 结果表明, 菌株 W5 与枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*)和解淀粉芽胞杆菌(*B. amyloliquefaciens*)的 16S rDNA 序列具有很高的同源性, 其序列相似性皆为 99%。构建的 16S rDNA 序列系统发育树(图 5)表明菌株 W5 与解淀粉芽胞杆菌聚在同一个进化分支, 但分支处自展值相对较低, 无法将其确定到种。

以 *gyrA* 基因序列比对结果构建的系统发育树表明(图 6), 解淀粉芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌清晰地区分为两个分支, 而 W5 菌株与选取的解淀粉芽胞杆菌聚为一类。

综合 16S rDNA 和 *gyrA* 基因序列分析以及生理生化的鉴定结果, 确定 W5 菌株为解淀粉芽胞杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。

3 讨论

从银杏中分离内生真菌抑制植物病原菌或利用银杏中分离的内生真菌获得生理活性物质的研究已经有不少, 但关于银杏内生细菌的研究却相对较少。本试验从银杏的茎和叶中分离到一株对植物病原真菌有较广的拮抗谱、且抑菌效果较好的内生细菌菌株 W5。

目前已确定的枯草芽胞杆菌组成员主要包括 *B. subtilis* subsp. *subtilis*、*B. licheniformis*、*B. amyloliquefaciens*、*B. mojavensis*、*B. atrophaeus*、*B. subtilis* subsp. *spizizenii* 等, 它们的核糖体 RNA 序列具有很高的同源性, 很难通过 16S rDNA 序列分析、表型和生理生化特征予以区分^[22]。*gyrA* 基因是编码细菌 DNA 促旋酶(Gyrase)的 A 亚单

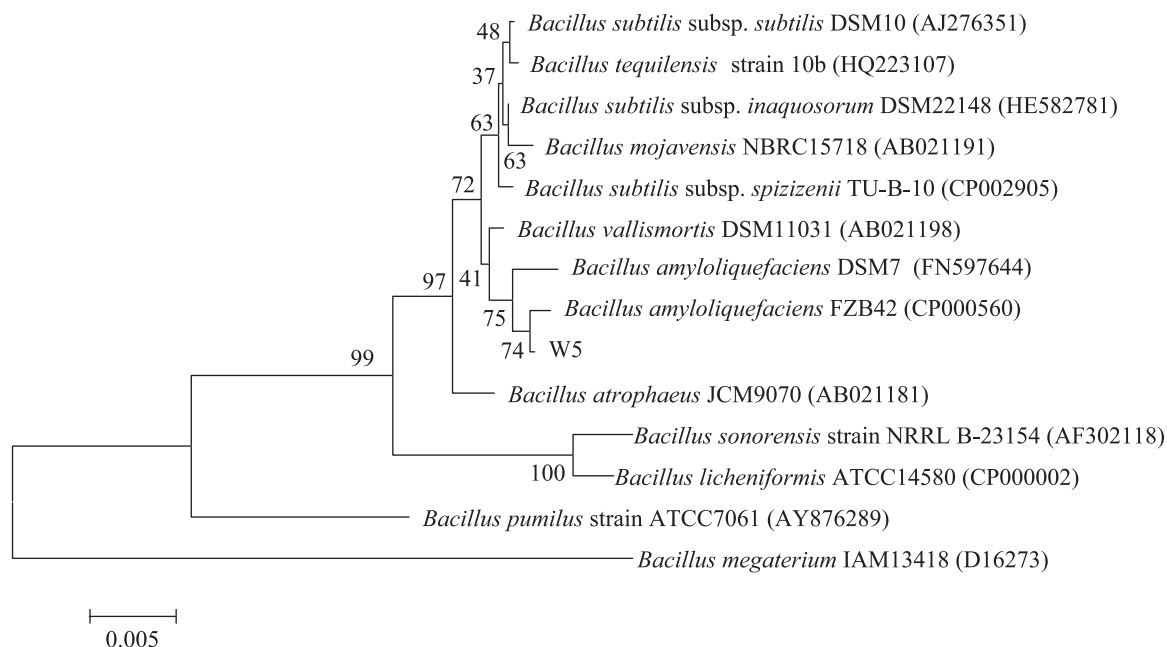
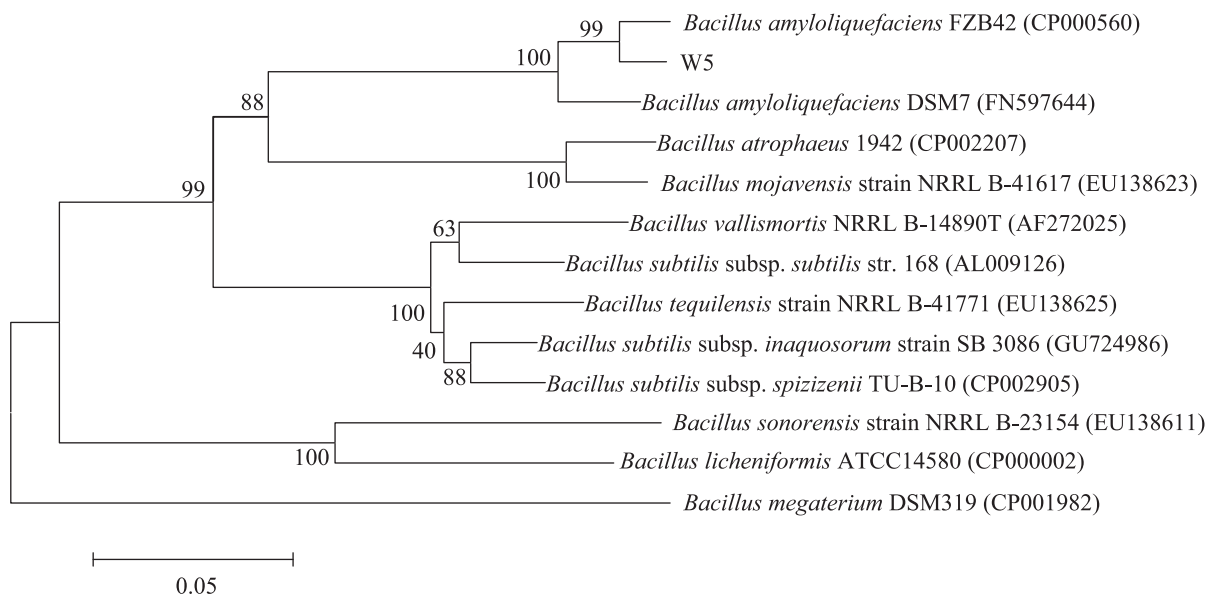


图 5 基于 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 5 Neighbour-Joining phylogenetic tree based on partial 16S rDNA sequences

注: 序列的 GenBank 登录号列于括号中; 自展值标注在分支上; 标尺所示长度为 0.005 核苷酸置换率; 下同.

Note: GenBank accession numbers are shown in parentheses. Numbers on branch nodes are bootstrap values. Bar 0.005 substitutions per nucleotide position. The same as below.

图 6 基于 *gyrA* 基因序列构建的系统发育树Fig. 6 Neighbour-Joining phylogenetic tree based on partial *gyrA* gene sequences

位基因,该基因有着与 16S rDNA 基因相似的特点,但进化速率比 16S rDNA 更快,已被用于菌株的鉴定和分类,可以检测到种水平。Rooney 等^[23]利用 *gyrA* 基因对枯草芽孢杆菌的不同菌株进行多样性分析。喻国辉等^[24]利用 16S rDNA 结合 *gyrA* 和 *gyrB* 基因对生防芽孢杆菌 R31 进行了快速鉴定。本试验通过形态观察、生理生化指标测定初步将菌株 W5 归于芽孢杆菌属。同时,通过 16S rDNA 序列和 *gyrA* 基因序列确定了菌株 W5 的系统发育地位,鉴定 W5 菌株属于解淀粉芽孢杆菌。

平板拮抗试验中,菌株 W5 对疫霉菌、稻瘟菌和霜疫霉菌有很强的拮抗能力。但是对于纹枯菌、镰刀菌和酸腐菌的拮抗效果一般。在对 6 种供试病原真菌以及菌株 W5 的接种和培养参数基本相同的条件下,试验观察发现,病原菌生长的快慢直接影响到菌株 W5 的抑菌能力,对于生长较慢的疫霉菌、霜疫霉菌和稻瘟病菌, W5 的拮抗能力强。而对于长势较快的纹枯菌、镰刀菌和酸腐菌, W5 的拮抗能力弱。由此作者推测, W5 菌的抑制效果取决于菌体分泌物的扩散速度,当菌株 W5 分泌物的扩散速度大于病原菌的生长速度时,病原菌在生长初期就受到抑制,拮抗效果相应明显,当菌株 W5 分泌物的扩散速度小于病原菌的生长速度时,病原菌生长中后期才受到抑制,其抑制的范围比较小,效果也就不明显。

近年来,国内外关于微生物所产生挥发性气体的抑菌研究逐渐增多。周翠等^[25]报道了分离自石榴果实中的一株枯草芽孢杆菌所产生的挥发性物质对几种常见林果病原菌的抑菌作用,发现该挥发性物质对不同病原菌菌丝生长具有一定的抑制作用,其中对杨树溃疡病菌 (*Botryosphaeria dothidea*) 的抑制率达 60%。且挥发性物质对不同病原菌的抑菌效果和作用方式

不同。陈华等^[26]研究表明,枯草芽孢杆菌 JA 的挥发性物质对灰葡萄孢霉菌 (*Botrytis cinerea*) 的抑制率几乎达到 100%。Vespermann 等^[27]测定了 9 株细菌挥发性代谢物对立枯丝核菌 (*R. solani*) 菌丝生长的抑制作用,各供试菌株所产生的挥发性物质均表现出不同程度的拮抗作用,其中枯草芽孢杆菌 B2 等 7 个菌株对立枯丝核菌的抑制率高达 80%–99%。本实验在光学显微镜下可明显观察到受生防菌株 W5 抑制的疫霉菌菌丝变形致畸。为了进一步证实菌株 W5 起抑菌作用的是挥发性物质,我们还进行了菌株 W5 发酵上清液对辣椒疫霉菌菌丝的抑制试验(结果未发表)。结果表明,上清液对菌丝的抑制作用不明显。在加入上清液的 2 天内,可以观察到辣椒疫霉菌菌落受到抑制,但抑制作用随之减弱。结合平板拮抗试验的结果,只接种疫霉菌、稻瘟菌和霜疫霉菌,其菌丝可以向平板四周不同程度地生长。而接种 W5 菌株的对峙平板上,病原真菌菌丝几乎没有生长,整个接种菌块受到抑制,由此作者认为 W5 菌株起抑制作用的主要物质应该是挥发性成分。平板对扣法的实验结果表明,解淀粉芽孢杆菌 W5 所产生的挥发性物质确实对辣椒疫霉菌菌丝生长有抑制作用,且抑制效果显著。

Leelasuphakul 等^[15]研究发现,芽孢杆菌对仓储水果的抑菌效果主要得益于其挥发性抗菌物质的产生。与不能产生挥发性抗菌物质的生防菌相比,产生挥发性物质的生防菌通过在空气中扩散其挥发性抗菌物质杀灭病原菌,而不用直接喷洒或涂抹于水果、蔬菜等一些需要储存保鲜的食品上,更有利于食品安全。2002 年,美国 AgreQuest 公司以分离自锡兰肉桂的内生真菌 *Muscodor albus* 为基础,独家推出世界上第一种能够提高植物抗真菌病害能力的真菌熏蒸剂^[28]。本试验初步研究了解淀粉芽孢杆菌 W5 所产生挥发性物质的抗菌效果,为我国新型生物源农药的

研制提供了菌源。至于这种挥发性物质的产生条件、化学成分、作用机理以及稳定性还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Pasteur L. Études sur la bière, ses maladies, causes qui les provoquent, procédé pour la rendre inaltérable[M]. Paris: Gauthier-Villars, 1876, 54-57.
- [2] 石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2395-2400.
- [3] Rosenblueth M, Martinez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(8): 827-837.
- [4] Margulis L. Origin of Eukaryotic Cells[M]. New Haven: Yale University Press, 1970.
- [5] 樊有赋, 陈晔, 柳闽生, 等. 银杏内生真菌种群多样性的研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(34): 10953-10954, 10984.
- [6] 韩晓丽, 康冀川. 银杏内生真菌的分离鉴定及种群分布[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(12): 142-146.
- [7] 郭建新, 孙广宇, 张荣, 等. 银杏内生真菌抗真菌活性菌株的分离和筛选[J]. 西北农业学报, 2005, 14(4): 14-17.
- [8] 邓振山, 赵龙飞, 张薇薇, 等. 银杏内生真菌的分离及其对苹果腐烂病病原菌的拮抗作用[J]. 西北植物学报, 2009, 29(3): 608-613.
- [9] 柏钰, 程遥, 郭正彦, 等. 银杏内生真菌 T4 抑菌活性及生物学特性的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(6): 831-837.
- [10] 黄蓉, 肖炎农, 黄永兵, 等. 银杏内生真菌拮抗灰霉菌的初步研究[J]. 江西农业学报, 2007, 19(2): 60-62.
- [11] 李勃, 马瑜, 党永. 银杏中内生细菌的分离鉴定[J]. 果树学报, 2010, 27(4): 566-569.
- [12] 李长根, 曹成亮, 秦盛, 等. 银杏内生细菌 XZNUM033 的鉴定及其抗杨树变色真菌活性物质的理化性质[J]. 林业科学研究, 2010, 23(5): 708-712.
- [13] Yuan B, Wang Z, Qin S, et al. Study of the anti-sapstain fungus activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CGMCC 5569 associated with *Ginkgo biloba* and identification of its active components[J]. Bioresource Technology, 2012, 114: 536-541.
- [14] 宋美仙. 抗萝卜细菌性软腐病的银杏内生细菌的初步研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2011.
- [15] Leelasuphakul W, Hemmanee P, Chuenchitt S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2008, 48(1): 113-121.
- [16] 邱思鑫, 何红, 阮宏椿, 等. 内生芽孢杆菌 TB2 防治辣椒疫病效果及其机理初探[J]. 植物病理学报, 2004, 34(2): 173-179.
- [17] 邱思鑫. 防病、促生植物内生芽孢杆菌的研究[D]. 福州: 福建农林大学博士学位论文, 2004.
- [18] 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, 349-398.
- [19] 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): 13-18.
- [20] William GW, Susan MB, Dale AP, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [21] Chun J, Bae KS. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2000, 78(2): 123-127.
- [22] 周林, 程萍, 沈汉国, 等. 1 株广谱抗真菌芽孢杆菌 TR21 的鉴定[J]. 热带作物学报, 2010, 31(4): 605-609.
- [23] Rooney AP, Price NP, Ehrhardt C, et al. Phylogeny

and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(10): 2429–2436.

- [24] 喻国辉, 牛春燕, 陈远凤, 等. 利用 16S rDNA 结合 *gyrA* 和 *gyrB* 基因对生防芽孢杆菌 R31 的快速鉴定[J]. 中国生物防治, 2010, 26(2): 160–166.
- [25] 周翠, 乔鲁芹, 金静, 等. 一株枯草芽孢杆菌挥发性物质的抑菌作用初步研究[J]. 农药学学报, 2011, 13(2): 201–204.

- [26] 陈华, 郑之明, 余增亮, 等. 枯草芽孢杆菌 JA 脂肽类及挥发性物质抑菌效应的研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 1–4.
- [27] Vespermann A, Kai M, Piechulla B. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(17): 5639–5641.
- [28] 汪开. 美国 AgraQuest 生物技术公司首次推出真菌熏蒸剂[J]. 生物技术通报, 2003(4): 51.

科技信息摘录

癌症基因图揭开细胞变异神秘面纱

英国研究人员提出了首个有关肿瘤形成的突变过程综合图谱, 该图一共呈现了 20 余种基因突变的结构模型, 这些结构要么三三两两进行组合构成了 30 种不同类型的癌症, 包括常见的脑癌、血癌、肺癌等。这一新研究发现在未来可能有助于治疗和预防大量癌症。相关研究论文发表在 8 月 15 日出版的《自然》杂志上。通过研究 7 000 多位常见癌症患者的基因组, 研究小组发现了 21 个所谓的 DNA 突变过程的“标记”。

参与研究的韦尔科姆基金会桑格研究所的塞雷娜·尼克-扎因说: “这是迈向揭示癌症形成过程的重要一步。通过详细分析, 我们可以利用深藏于癌症 DNA 中的海量信息, 帮助我们了解癌症发生的机制和原因。”所有的癌症都是由人身体细胞内发生的 DNA 突变所引起的。

研究小组分析了全球 7 042 位癌症患者(涵盖了 30 种癌症类型)的基因码, 试图弄清突变过程的标记。研究人员发现所有的癌症都具有两个或以上的标记, 这反映出在癌症形成中有各种过程协同起作用。研究人员还发现不同癌症的突变过程数量有所差异。他们称, 卵巢癌的形成是由两个突变过程构成的, 而肝癌的形成则有 6 个突变过程。一些突变标记存在于多个癌症类型中, 而另一些则仅存在于某一种癌症类型中。在 30 种癌症类型中, 有 25 种具有与衰老相关的突变过程导致的标记。

在分析众多常见癌症的形成原因时, 研究小组还发现了一个导致 DNA 突变的酶家族, 名为 APOBECs, 它与超过一半的癌症类型有关。当人体对病毒感染做出反应时, APOBECs 酶会被激活。研究人员称, 生成的标记有可能是这些酶发挥保护细胞抵御病毒的作用时对人类基因组造成的间接损害。

——摘自《中国生物技术信息网》2013/8/27
<http://www.biotech.org.cn/information/110825>