

# 人参内生细菌 ge21 菌株的鉴定及抑菌活性测定

邱服斌<sup>1\*</sup> 李雁津<sup>1</sup> 张晓霞<sup>2</sup> 陈美娟<sup>1</sup> 张海杰<sup>1</sup>

(1. 山西医科大学公共卫生学院 山西 太原 030001)

(2. 中国农业科学院资源与区划研究所 北京 100081)

**摘要:** 从人参根内分离到一株细菌 ge21, 经形态特征观察、生理生化特性测定和 16S rDNA 序列分析, 表明该菌株同已知菌 *Paenibacillus granivorans* 的相似性最高, 为 96.89%, 初步认定为类芽孢杆菌属的一个潜在新种。抑菌试验结果表明, 该菌株对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporium*)、寄生疫霉菌(*Phytophthora parasitica*)、剑麻炭疽病菌(*Colletotrichum agaves*)、烟草赤星病菌(*Alternaria longipes*)、稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)、人参立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、人参疫病菌(*Phytophthora cactorum*)和人参菌核病菌(*Sclerotinia schinseng*)均有一定的抑菌活性。

**关键词:** 人参, 内生细菌 ge21 菌株, 类芽孢杆菌属, 抑菌活性

## Identification and Antibiotic Activity of Endophytic Bacterium Strain ge21 from Ginseng Root

QIU Fu-Bin<sup>1\*</sup> LI Yan-Jin<sup>1</sup> ZHANG Xiao-Xia<sup>2</sup> CHEN Mei-Juan<sup>1</sup> ZHANG Hai-Jie<sup>1</sup>

(1. School of Public and Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

(2. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** A novel bacterium strain, designated ge21, was isolated from the internal tissue of ginseng root. Its taxonomic position was discussed and its antibiotic activity against pathogenic fungi and Oomycetes was evaluated in this study. The strain ge21 had the highest sequence identity with *Paenibacillus granivorans* (96.89%). On the basis of its phenotypic properties and phylogenetic distinctiveness, the strain ge21 was identified as a latent novel species of the genus *Paenibacillus*. The antagonistic effects showed that ge21 expressed antibiotic activity on *Fusarium oxysporium*, *Phytophthora parasitica*, *Colletotrichum agaves*, *Alternaria longipes*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cactorum* and *Sclerotinia schinseng* to some extent.

**Keywords:** Ginseng, Endophytic bacterium strain ge21, *Paenibacillus*, Antibiotic activity

植物内生菌是指能够定殖在植物各种组织和器官的细胞间或细胞内、并与植物建立和谐联合关系的一类微生物<sup>[1]</sup>, 包括真菌和细菌。内生菌具有多种

生物学功能, 能产生多种生物活性物质, 特别是在新的抗菌抗癌物质、抗植物病虫害物质方面, 植物内生菌为我们提供了一类新的微生物资源<sup>[2]</sup>。许多

基金项目: 山西省自然科学基金(No. 2008012010-3); 中国农科院农业资源与农业区划研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(No. 901-10)

\* 通讯作者: Tel: 86-351-4135046; 信箱: fbqiu@126.com

收稿日期: 2009-04-30; 接受日期: 2009-10-23

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

研究者已从棉花、玉米、小麦、油菜、马铃薯、辣椒、葡萄等多种植物分离获得内生拮抗细菌, 这些内生拮抗细菌对许多植物病害具有较好的防治效果<sup>[3]</sup>。有关人参内生细菌的分离鉴定及对病原菌的拮抗活性国内尚未见报道。本研究用多相分类方法对人参根内生细菌 ge21 菌株的分类地位进行了研究, 并对其抑制部分植物病原菌的生长能力作了初步探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 内生细菌 ge21 的分离与培养

实验材料为健康人参(*Panax ginseng* C.A.Mey.) 根部, 采自中国医学科学院药用植物研究所。菌株 ge21 为一株分自人参根组织内部的内生细菌。人参根表面采用乙醇-次氯酸钠联合灭菌, 梯度稀释的方法, 在 LB 固体培养基上划线分离<sup>[4]</sup>, 28°C 培养 72 h, 选择菌落形态、大小、颜色等不一致的菌落划线纯化, 得到纯化菌株, 接斜面置于 4°C 冰箱内保存。ge21 为分离菌株中的一株。

### 1.2 供试植物病原菌

(1) 尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporium* ACCC30373), 来源于云南农业大学植物病理重点实验室。PDA 培养基, 25°C–28°C。

(2) 寄生疫霉菌 (*Phytophthora parasitica* ACCC30041), 来源于中国农科院植保所。PDA 培养基, 24°C–28°C。

(3) 剑麻炭疽病菌 (龙舌兰刺盘孢, *Colletotrichum agaves* ACCC30011), 来源于广西热带作物研究所。PDA 培养基, 24°C–28°C。

(4) 烟草赤星病菌 (长柄链格孢, *Alternaria longipes* ACCC30002), 来源于山东烟草研究所。PDA 培养基, 24°C–28°C。

(5) 稻瘟病菌 (稻梨孢, *Pyricularia oryzae* ACCC30320), 来源于中国农科院土肥所。Czapeks 琼脂培养基, 25°C–28°C。

(6) 人参立枯病菌 (*Rhizoctonia solani* Kuhn)。

(7) 人参疫病菌 (*Phytophthora cactorum*)。

(8) 人参锈腐病菌 (*Cylindrocarpon destructans*)。

(9) 人参菌核病菌 (*Sclerotinia schinseng*)。

前 5 种由中国农业科学院中国农业微生物菌种保藏管理中心提供, 其余由中国医学科学院药用植物研究所丁万隆教授馈赠。

### 1.3 ge21 菌株的形态特征观察、生理生化特性和脂肪酸组成的测定

用光镜及电镜观察了 ge21 的菌体形态, 并对其在 LB 固体培养基上生长的菌落形态做了描述。对接触酶、卵磷脂酶、V-P 试验、生长温度、淀粉水解、硝酸盐还原、脲酶、氧化酶、精氨酸双水解、脂酶(Tween 80)、吡啶反应、产糊精、水解马尿酸等生理生化特性做了测定<sup>[5-9]</sup>。采用 BIOLOG(Gram Positive Identification Test Panel: GP2 MicroPlate)系统测定其碳源利用。用 MIDI 微生物鉴定系统分析其脂肪酸组成<sup>[10]</sup>。

### 1.4 ge21 菌株抑菌活性的测定

采用平板对峙法测定 ge21 对病原菌的抑菌活性: 分别在 PDA 平板中央接入直径 6 mm 的生长旺盛的不同的病原菌菌块, 再在离菌块 2 cm 的位置放置灭菌滤纸片, 在滤纸片上接种 15  $\mu$ L 待测菌株 ge21 的菌液, 28°C 倒置培养, 定时观察细菌及病原菌的生长情况, 测定抑菌半径。

### 1.5 ge21 菌株的 16S rDNA 序列测定

采用菌落 PCR 的方法扩增 ge21 的 16S rDNA 片段<sup>[4]</sup>。先在 1.5 mL 离心管中加入 30  $\mu$ L 无菌水, 用灭菌牙签挑取少量菌体于水中制成悬液, 煮沸 10 min, 迅速放入冰中 5 min, 4°C 12000 r/min 离心 5 min, 上清液作为 PCR 模板。用细菌 16S rDNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')对 ge21 的 16S rDNA 的部分片段进行了扩增。反应体系(50  $\mu$ L): 10 $\times$ buffer (5  $\mu$ L)、dNTP (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L、引物 27F (10 mmol/L) 2  $\mu$ L、引物 1492R (10 mmol/L) 2  $\mu$ L、Taq 酶(5 U/L) 0.25  $\mu$ L、3  $\mu$ L 上清液作为模板、ddH<sub>2</sub>O 33.75  $\mu$ L。PCR 反应程序: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 48°C 1 min, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 10 min。将扩增片段克隆到载体 Top10 (天根公司), 用蓝白筛选的方法选取阳性克隆, 委托上海生物工程公司以 T7 和 SP6 作为测序引物双向测序, 用该公司提供的软件 Chrosmas 拼接。

### 1.6 ge21 菌株 16S rDNA 序列系统发育树的构建

将 ge21 的核苷酸序列提交至 NCBI 核苷酸序列库进行比对, 结果表明 ge21 与已知的类芽孢杆菌的同源性最高。从 NCBI 核苷酸库中调取已公开发表的类芽孢杆菌属 90 个种和 2 个亚种的核苷酸序列, 用软件 Phylip 3.65 比较 ge21 的 16S rDNA 与这些序

列间的相似性, 选取了与 ge21 相似性最高的 15 个菌株的序列, 用 Clustal X 软件对上述序列进行多序列比对, 之后再用 MEGA 4.0 进化树软件构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 ge21 菌株的形态、生理生化特性及脂肪酸组成

ge21 为杆状 $[(1-3.3) \mu\text{m} \times (0.5-1.3) \mu\text{m}]$ , 周生鞭毛(图 1), 端生芽孢(图 2)。形态学观察和生理生化部分特征见表 1。ge21 菌落呈乳白色至浅黄色, 菌落偏小, 直径约 2 mm-4 mm, 圆形, 边缘不整齐, 微隆, 不透明。为革兰氏阳性兼性厌氧菌, 接触酶、卵磷脂酶、V-P 试验、淀粉水解试验、硝酸盐还原阳性; 脲酶试验、氧化酶、精氨酸双水解试验、脂酶(Tween 80)、吲哚反应、产糊精结晶试验阴性, 不能水解马尿酸, 可在含 NaCl 0-5%的培养基中生长, 可耐受的温度范围是 0°C-45°C, 最适生长温度为 28°C, 最适 pH 为 7.4。采用 BIOLOG 法测定其碳源利用的结果表明: ge21 能以  $\beta$ -环式糊精、糊精、吐温 40、L-阿拉伯糖、熊果甙、D-纤维二糖、D-果糖、D-半乳糖、 $\alpha$ -D-葡萄糖、 $\alpha$ -D-乳糖、麦芽糖、麦芽三糖、D-甘露糖、D-蜜二糖、3-甲基葡萄糖、 $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷、帕拉金糖、D-假果糖、D-棉子糖、D-核糖、水杨苷、水苏糖、蔗糖、D-海藻糖、松二糖、D-木糖、丙酮酸、丙三醇作为唯一碳源提供能量。其主要脂肪酸组成为 anteiso-C<sub>15:0</sub>(60.89%)、anteiso-C<sub>17:0</sub>(9.55%)、iso-C<sub>16:0</sub>(7.63%)、C<sub>16:0</sub>(6.76%)、iso-C<sub>15:0</sub>(4.98%)、wllc-C<sub>16:1</sub>(2.57%)、iso-C<sub>17:0</sub>(2.15%)、C<sub>14:0</sub>(2.04%)、iso-C<sub>14:0</sub>(1.85%)、C<sub>17:0</sub>(0.92%)、w7c alcohol-C<sub>16:1</sub>(0.49%)和 C<sub>9:0</sub>(0.16%)。

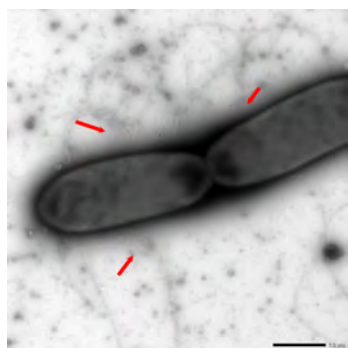


图 1 ge21 透射电镜照片(示周生鞭毛)

Fig. 1 Transmission electron microscope images showing flagellum



图 2 ge21 光镜照片(示芽孢)

Fig. 2 Microscopic images showing endospores

表 1 ge21 菌株的形态特征及生理生化特性  
Table 1 Morphological performance, physiological and chemical characteristics of the strain ge21

试验项目 Test items	结果 Results
Gram stain	+
Cell shape	Rod
Endospores	+
Catalase	+
Lecithinase	+
Voges-Proskauer test	+
Amylohydrolysis	+
Nitrate reduction test	+
Anaerobic growth	Facultative anaerobe
Urease	-
Oxidase	-
Arginine dihydrolase	-
Esterase(Tween 80)	-
Indole reaction	-
Produce crystalline dextrin	-
Hippurase	-
Growth in NaCl	0-5%
Optimum temperature	28°C

### 2.2 ge21 的 16S rDNA 序列分析

16S rDNA 的 PCR 结果表明, 扩增产物大小接近 1500 bp(图 3), 实际长度为 1422 bp。测序结果在 GenBank 的登录号为 EF503618。相似性研究结果表明, 菌株 ge21 的 16S rDNA 序列同公开发表的类芽孢杆菌同源较高, 但均低于 97%, 其中与 *Paenibacillus granivorans* 的相似性最高, 为 96.89%。

### 2.3 ge21 菌株的系统发育分析

通过多序列比对, 系统发育学分析, ge21 同已知的类芽孢杆菌属中的模式种聚在一起(图 4)。表明 ge21 属类芽孢杆菌属中的一员, 且与 *Paenibacillus*

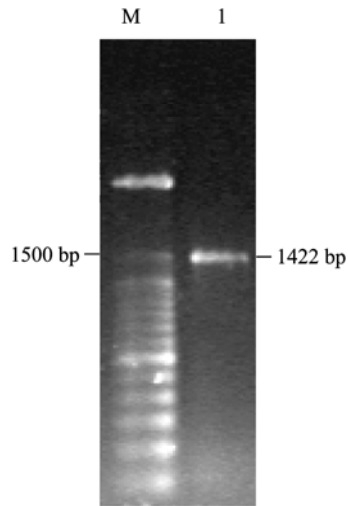


图3 PCR 扩增片段

Fig. 3 PCR products

Note: M: Marker; 1: Sample.

*granivorans* 的亲缘关系最近。

#### 2.4 ge21 菌株的抑菌活性

用对峙生长法测定 ge21 对植物病原真菌和卵菌的抑菌活性。结果(表 2 和图 5)表明, ge21 对 6 株植物病原真菌和 2 株植物病原卵菌均具有一定的拮抗活性。

表 2 ge21 菌株对植物病原真菌和卵菌的抑菌活性  
Table 2 Antibiotic activity of strain ge21 to pathogenic fungi and Oomycetes

Pathogenic fungi	Inhibition radius (mm)
<i>Fusarium oxysporium</i>	6.2
<i>Phytophthora parasitica</i>	6.5
<i>Colletotrichum agaves</i>	11.0
<i>Alternaria longipes</i>	8.3
<i>Pyricularia oryzae</i>	10.8
<i>Rhizoctonia solani</i>	14.3
<i>Phytophthora cactorum</i>	7.2
<i>Sclerotinia schinseng</i>	17.1

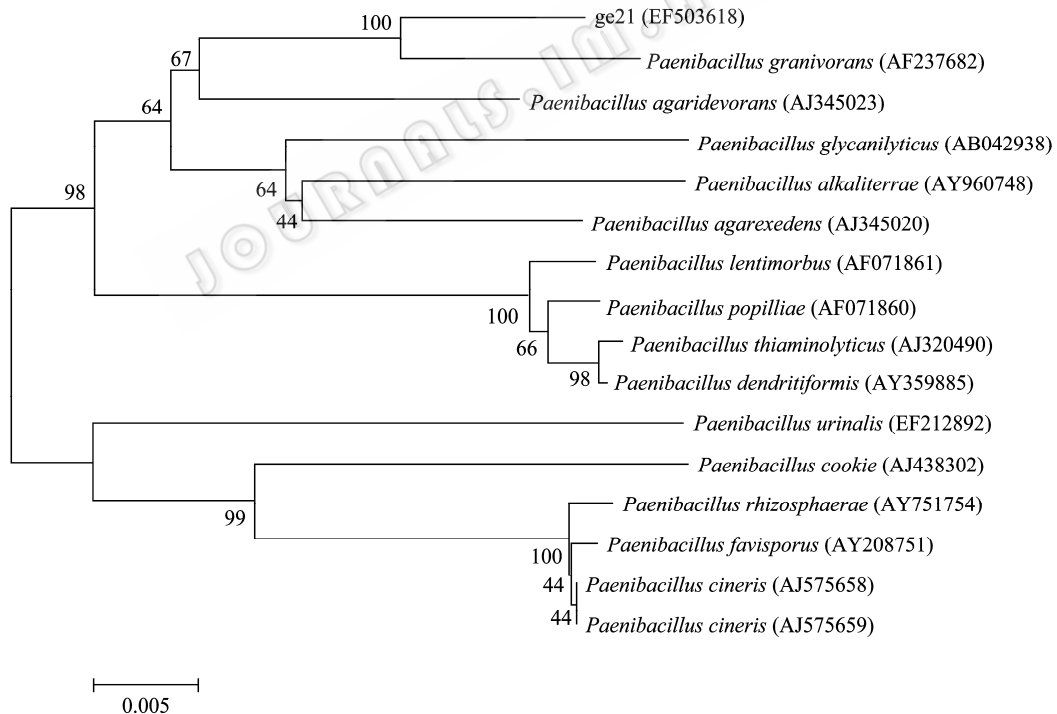


图4 邻接法构建的 ge21 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of selected strains

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

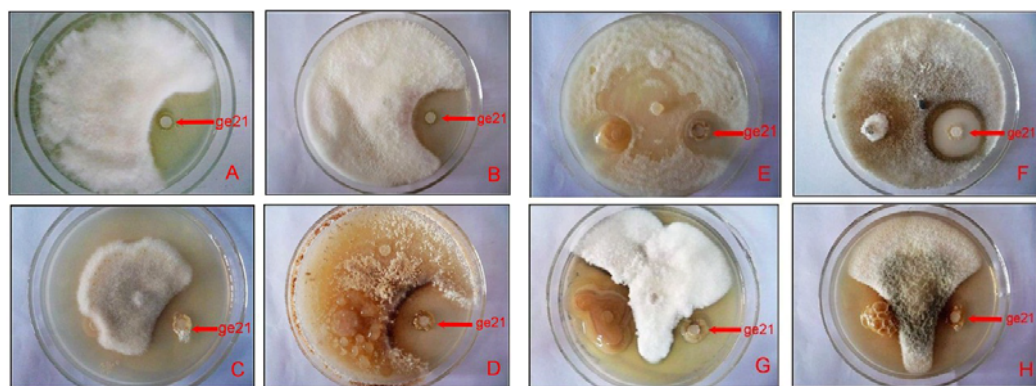


图5 ge21 对植物病原真菌和卵菌的抑制作用

Fig. 5 Antibiotic activity of ge21 against the pathogenic fungi and Oomycetes

注: A: 尖孢镰刀病菌; B: 稻瘟病菌; C: 剑麻炭疽病菌; D: 人参立枯病菌; E: 人参疫病菌; F: 人参菌核病菌; G: 寄生疫霉病菌; H: 烟草赤星病菌.

Note: A: *Fusarium oxysporium*; B: *Pyricularia oryzae*; C: *Colletotrichum agaves*; D: *Rhizoctonia solani*; E: *Phytophthora cactorum*; F: *Sclerotinia schinseng*; G: *Phytophthora parasitica*; H: *Alternaria longipes*.

### 3 结论与讨论

根据同源性比对, 系统发育树的构建, 结合形态学、生理生化特征分析, 菌株 ge21 为类芽孢杆菌属的一员。又因其与已知菌相似性低于 97%, 表明 ge21 极有可能是该属中的一个潜在新种<sup>[11]</sup>。

经对峙实验发现, ge21 对包括人参病原菌在内的多种植物病原真菌和卵菌具有一定的体外抑菌活性。尽管如此, 毕竟体内外的环境有很大不同, 对其能否应用于生产实践来防治植物病原菌, 还需做进一步的实验室和田间实验验证。

### 参考文献

- [1] Kleopffer JW, Schippers B, Bakker PAHM. Proposed elimination of the term endorhizosphere. *Phytopathology*, 1992, **82**(7): 726–727.
- [2] 何劲, 刘蕴哲, 康冀川. 植物内生菌及其在农业和医学上的用途. *贵州农业科学*, 2006, **34**(3): 113–115.
- [3] 朱凤, 陈夕军, 童蕴慧, 等. 水稻内生细菌的分离及其拮抗性与其潜在致病性测定. *中国生物防治*, 2007, **23**(1): 68–72.
- [4] Qiu FB, Huang Y, Sun L, et al. *Leifsonia ginseng* sp. nov. isolated from ginseng root. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007(**57**): 405–408.
- [5] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 353–385.
- [6] Uetanabaro AP, Wahrenburg C, Hunger W, et al. *Paenibacillus agarexedens* sp. nov., nom. rev., and *Paenibacillus agaridevorans* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, **53**(4): 1051–1057.
- [7] Yoon JH, Kang SJ, Yeo SH, et al. *Paenibacillus alkaliterrae* sp. nov., isolated from an alkaline soil in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**(6): 2339–2344.
- [8] Takeda M, Suzuki I, Koizumi J. *Paenibacillus hodogayensis* sp. nov., capable of degrading the polysaccharide produced by *Sphaerotilus natans*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**(2): 737–741.
- [9] Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, et al. *Paenibacillus phyllosphaerae* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the phyllosphere of *Phoenix dactylifera*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**(2): 743–746.
- [10] Kaempfer P, Kroppenstedt RM. Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol*, 1996, **42**(10): 989–1005.
- [11] Fry NK, Warwick S, Saunders NA. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae. *J Gen Microbiol*, 1991, **137**(5): 1215–1222.