

# 甘草内生细菌的分离及拮抗菌株鉴定\*

饶小莉 沈德龙\*\* 李俊 姜昕 李力 张敏 冯瑞华

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 北京 100081)

**摘要** :从乌拉尔甘草健康植株的根茎叶中共分离到内生细菌 98 株,经初步鉴定芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)为优势种群,约占 30%;从不同生长年份甘草的根、茎、叶组织中分离内生细菌种群密度从  $5.0 \times 10^4$  cfu/g ~  $2.9 \times 10^7$  cfu/g 鲜重不等。采用平板对峙方法筛选出 6 株对植物病原菌有明显体外拮抗活性的菌株,通过菌落、菌体形态观察、生理生化反应及 16S rDNA 序列分析,同时结合 Biolog 细菌自动鉴定系统验证,鉴定这 6 株拮抗菌分属萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)、多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、*Paenibacillus ehimensis*。

**关键词** :甘草,内生细菌,抗菌活性,芽孢杆菌,鉴定

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0700-05

## Isolation of Endophytic Bacteria from *Glycyrrhiza* and Identifying of Antagonistic Bacteria\*

RAO Xiao-Li SHEN De-Long\*\* LI Jun JIANG Xin LI Li ZHANG Min FENG Rui-Hua

(Institute of Agricultural Resources and Regional planning, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100081)

**Abstract** 98 endophytic bacteria strains were isolated from different internal tissues of *Glycyrrhiza uralensis* plants collected from Innermongolia region. Results indicated that the population densities of endophytic bacteria ranged from  $5.0 \times 10^4$  cfu/g ~  $2.9 \times 10^7$  cfu/g fresh weight although it varied depending on tissue of the plant. Among these strains, *Bacillus* sp. was the most prevalent endophytic bacterium, which was amount to 30%. Of the 98 isolates, 6 strains exhibited extensive antagonistic activities against pathogenic bacteria. Characterization showed that these bacteria were *Bacillus atrophaeus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus ehimensis*. This study indicated that selected 6 endophytic bacteria strains have potential for biological control of plant disease.

**Key words** :*Glycyrrhiza uralensis*, Endophytic bacteria, Antagonistic bacteria, *Bacillus* sp., Identify

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch. G. Glabra L.)属于豆科甘草属灌木状多年生草本植物,在中药上起着重要作用,享有“美草”、“众药之王”、“十方九草”的美誉,在食品化工和水土保持方面也功不可没。甘草是我国乃至世界上重要的中药材,国内外需求量大。随着野生资源的日渐匮乏,其市场供不应求,在这种供求矛盾的情况下,对甘草资源的保护性利用及人工栽培甘草势在必行,而随着人工甘草种植面积逐年加大,甘草病害成为影响甘草产量和质量的主要限制因素,感染甘草的病害主要有根腐病、锈病、褐斑病、猝倒病、白粉病等<sup>[1]</sup>。而从植物体内筛选的内生细菌在对病害预防方面具有一

定的作用,同时对提高品质也有非常好的效果。

植物内生细菌指定殖在健康植物体内并与植物建立和谐关系的一类微生物。内生细菌可以促进植物对恶劣环境的适应,加强系统的生态平衡,保证寄主植物健康生长。已有许多关于内生细菌作为生防因子的研究,并开发了一些植物生防菌剂。Chen 等从棉花中分离筛选出抗棉花枯萎病的内生细菌菌株,用此内生细菌回接棉花,可以减轻人工接种感染的棉花枯萎症<sup>[2]</sup>。

本文以乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)为研究目标,对甘草内生细菌的多样性及分布规律进行了研究,并就分离内生细菌对病原菌的拮抗特

\* 国家 973 计划资助项目(No.001CB1089),国家自然科学基金资助项目(No.30672616),中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金

\*\* 通讯作者 Tel 010-68975891, E-mail: dlshen@caas.ac.cn

收稿日期:2006-11-21,修回日期 2007-03-15

性进行研究,以期筛选出优良的内生菌株,为甘草内生细菌的应用提供理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试植物

内蒙古包头市固阳县栽培的一年生、两年生、三年生乌拉尔甘草。

#### 1.2 分离内生细菌所用培养基

营养琼脂(NA):牛肉膏 3g,蛋白胨 10g,NaCl 5g,琼脂 18g,蒸馏水 1000mL,pH6.8~7.0。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯 200g,葡萄糖 20g,琼脂 18g,蒸馏水 1000mL。

#### 1.3 内生细菌的分离和计数

内生细菌的分离和计数方法见参考文献[3]并略有修改。称取甘草根、茎、叶各 1g,自来水冲洗干净,75%乙醇浸泡 5min,2% NaClO 溶液浸泡 10min(其中根浸泡 20min),无菌水冲洗 4 次,置于灭菌研钵中研磨,将磨碎的组织加到含 0.85% 灭菌生理盐水和灭菌玻璃珠的锥形瓶中,旋涡震荡 1min,将上清倒入灭菌离心管中沉淀,上清梯度稀释并各取 0.1mL 涂 NA 和 PDA 平板,每处理 3 个重复。同时,将最后一次冲洗的无菌水也取 0.1mL 涂平板,作为对照。所有平板 28℃ 黑暗培养。将平板上的单菌落计数并在相应平板上划线分离,直至得到纯的单菌落,保存在斜面上备用。

当对照平板无菌生长时,表明表面消毒干净。

#### 1.4 供试病原菌

本研究使用的病原菌均来自中国农业科学院植物保护研究所,编号见表 1。由于难于获得从甘草植株中直接分离的病原菌作为实验材料,因此选

择了这 8 株应用较广泛的病原菌作为指示菌,以筛选具有拮抗性能的内生细菌。

#### 1.5 内生细菌体外抑菌作用测定

采用异步培养法于 PDA 平板中央接种直径 5mm 的病原菌菌饼,27℃ 培养 24 h 后在距离菌饼 2cm 处接种分离的内生细菌,27℃ 恒温箱中培养,同时以不接菌为对照。当对照长至培养皿边缘时,测量抑菌圈大小。

#### 1.6 内生拮抗细菌的鉴定

1.6.1 常规鉴定:内生细菌的菌落、菌体形态观察及生理生化测定见东秀珠著《常见细菌系统鉴定手册》。

1.6.2 Biolog 自动分析仪鉴定:内生拮抗细菌用美国 Biolog 公司的 Microstation System 微生物自动鉴定系统 4.0 版进行鉴定。

1.6.3 16S rDNA 测序:提取内生细菌的基因组 DNA,进行 16S rDNA-PCR 序列扩增,扩增产物交由上海生物工程技术服务有限公司进行测序。然后将 16S rDNA 序列在 [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 网站中进行 Blast 比对分析。

### 2 结果与分析

#### 2.1 甘草各组织中内生细菌的种群密度

对一年生、两年生和三年生内蒙乌拉尔甘草健康植株根、茎、叶等组织中的内生细菌进行了分离和数量测定(见表 2)。从表 2 可以看出,甘草根、茎、叶等组织内存在大量内生细菌,不同组织中内生细菌的分布密度不同。根中的内生细菌数量为  $1.0 \times 10^5$  cfu/g ~  $3.5 \times 10^5$  cfu/g 鲜重;茎中为  $5.0 \times 10^4$  cfu/g ~  $2.9 \times 10^7$  cfu/g 鲜重;叶中为  $2.4 \times 10^5$  cfu/g ~  $1.8 \times 10^6$  cfu/g 鲜重。根和叶中的内生细菌分布密度差异不大,而在茎中的分布密度差异较大。

表 2 甘草不同年份不同组织内生菌的数量(cfu/g 鲜重)

|        | 叶 leaf            | 茎 stem            | 根 root            |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------|
| NM I * | $1.8 \times 10^6$ | $5.0 \times 10^4$ | $1.7 \times 10^5$ |
| NM II  | $4.2 \times 10^5$ | $8.0 \times 10^4$ | $3.5 \times 10^5$ |
| NM III | $2.4 \times 10^5$ | $2.9 \times 10^7$ | $1.0 \times 10^5$ |

\* NM I 内蒙一年生甘草, NM II 内蒙两年生甘草, NM III 内蒙三年生甘草。

从不同年份甘草的不同组织中分离、纯化得到内生细菌 98 株。对部分分离率较高的菌株的菌体

| 表 1 本研究使用的供试病原菌株编号 |                                                                                         |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 编号                 | 病原菌菌株                                                                                   |
| BY1                | 西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporium</i> f. sp. <i>niveum</i>                                  |
| BY2                | 烟草赤星病菌 <i>Alternaria longipes</i> (Ellis et Everhart) Tisdale et Wadkins                |
| BY3                | 小麦根腐病菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Shoem                                       |
| BY4                | 棉花立枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn                                                   |
| BY5                | 棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporium</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (Atkinson) Snyder et Hansen |
| BY7                | 黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporium</i> f. <i>cucumerinum</i> Qwen                            |
| BY8                | 玉米大斑病菌 <i>Helminthosporium turcium</i>                                                  |
| BY9                | 小麦纹枯病菌 <i>Pellicularia gramineum</i> Ikata et Matsumura                                 |

形态特征、培养性状、生理生化反应等进行了测定。根据测定结果,芽孢杆菌属是本实验中所分离的优势菌,约占 30%,实验中也分离到黄单孢菌属、短小杆菌属等(数据未列),从不同年份甘草的根、茎、叶中分离的内生细菌的主要类群差异不大。

## 2.2 甘草内生拮抗细菌的筛选

用异步培养法在 PDA 平板上测定了 98 株内生细菌菌株对西瓜枯萎病和烟草赤星病菌等 8 种病原菌的体外拮抗活性。有 23 株内生细菌表现出对

一种或几种病原菌具有拮抗活性,抑菌半径从 1 mm 到 13 mm 不等,其中的 6 株内生细菌对试验的 8 种病原菌表现出较好的抑菌活性(图 1),对 8 种病原菌的抑菌半径都达到了 7 mm 以上,特别是 IS5 对黄瓜枯萎病菌、棉花枯萎病菌的抑菌半径都达到了 13.0 mm,抑菌率达到 65%,对病原菌的扩展具有明显的抑制作用,II R8 对烟草赤星病菌、黄瓜枯萎病菌的抑制半径也分别达到了 10.3 mm 和 9.6 mm。

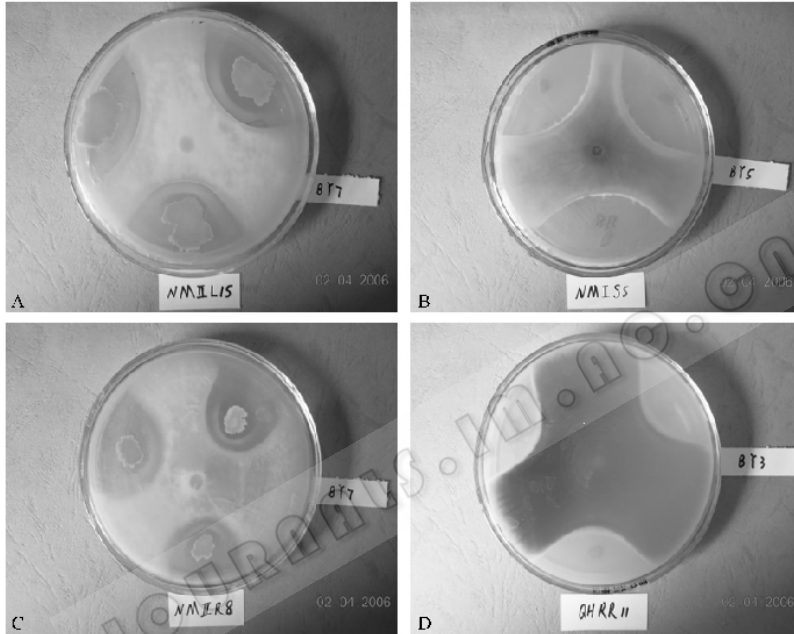


图 1 内生细菌对病原菌的抑制作用

A: II L15 对黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporium* f. *cucumerinum* Qwen 的抑制作用; B: IS5 对棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporium* f. sp. *vasinfectum* (Atkinson) Snyder et Hansen 的抑制作用; C: II R8 对黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporium* f. *cucumerinum* Qwen 的抑制作用; D: IR11(原编号为 RR11)对小麦根腐病菌 *Bipolaris sorokiniana*(Sacc.) Shoem 的抑制作用

## 2.3 拮抗菌的鉴定

### 2.3.1 拮抗菌株的形态及生理生化反应

对筛选的 6 株菌进行常规的形态及生理生化试验,结果见表 3。

根据菌落、菌体形态观察及生理生化反应,初步确定 IR10、IR11 属于多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*),IS5 属于 *P. ehimensis*。

另外 3 株拮抗菌 II L8、II L15 和 II R8 根据其在 TGY(tryptone glucose yeast extract)和 GG(glycerol glutamate)固体培养基上生长是否产生色素进行鉴定,这是因为萎缩芽孢杆菌在 TGY 和 GG 中都产生褐色色素,而枯草芽孢杆菌在这两种培养基上则无色素产生<sup>[4]</sup>,据此初步鉴定 II L8、II L15 属于萎缩芽

孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*),II R8 属于枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。

2.3.2 Biolog 鉴定和 16S rDNA 测序:由于 II L8 与 II L15 及 IR10 与 IR11 在菌落、菌体形态方面一致,并且各项生理生化反应完全一样,因此分别选择了 II L15、IR11 和另外的两株菌 IS5、II R8 进行了 16S rDNA 序列分析。同时,采用 Biolog 细菌自动鉴定仪进行了验证(结果见表 4)。

从表 4 中可以看出,采用常规方法鉴定的结果与 16S rDNA 序列分析结果完全一致,而对 II R8 和 IR11 两株菌 Biolog 细菌自动鉴定仪也给出了同样的结果。对于另外两株菌,由于所使用的 Biolog 细菌自动鉴定仪(4.0 版本)数据库中也没有 *Bacillus*

atrophaeus、Paenibacillus ehimensis 这两种菌 ,因此无法对 II L15、IS5 的鉴定结果进行验证 ,但从另一方面可以得出 ,采用常规方法并结合 16S rDNA 序列分析对细菌进行鉴定是可行的。综合 3 种细菌鉴定方法 ,将 6 株拮抗菌分别鉴定为 :II L15、II L8 菌株

属于萎缩芽孢杆菌( Bacillus atrophaeus ) IS5 菌株属于 Paenibacillus ehimensis、II R8 菌株属于枯草芽孢杆菌( Bacillus subtilis ) IR11、IR10 属于多粘类芽孢杆菌( Paenibacillus polymyxa )

表 3 拮抗菌株的特征\*

|          | II L15      | II L8       | IS5         | II R8       | IR10        | IR11        |
|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 芽孢形状     | 椭圆          | 椭圆          | 椭圆          | 椭圆          | 椭圆          | 椭圆          |
| 孢囊膨大     | -           | -           | +           | -           | +           | +           |
| 大小( μm ) | 0.7~0.8×2~3 | 0.7~0.8×2~3 | 0.4~0.6×1~4 | 0.7~0.8×2~3 | 0.6~0.8×2~5 | 0.6~0.8×2~5 |
| 革兰氏染色    | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| 厌氧生长     | -           | -           | -           | -           | +           | +           |
| 接触酶      | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| 氧化酶      | -           | -           | +           | -           | -           | -           |
| 硝酸盐还原    | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| 产生 吡啶    | -           | -           | +           | -           | -           | -           |
| V-P 测定   | +           | +           | -           | +           | +           | +           |
| 水解 酪朊    | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| 淀粉       | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| 脲素       | NT          | NT          | -           | +           | -           | -           |
| 卵黄卵磷脂    | -           | -           | -           | -           | -           | -           |
| 利用 柠檬酸盐  | +           | +           | -           | +           | -           | -           |
| 丙酸盐      | -           | -           | -           | -           | -           | -           |
| 苯丙氨酸     | -           | -           | -           | -           | -           | -           |
| 生长 pH5.7 | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| 2% NaCl  | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| 5% NaCl  | +           | +           | -           | +           | -           | -           |
| 7% NaCl  | +           | +           | -           | +           | -           | -           |
| 10% NaCl | +           | +           | -           | +           | -           | -           |
| 45℃      | +           | +           | +           | +           | -           | -           |
| 50℃      | +           | +           | -           | +           | -           | -           |
| 55℃      | -           | -           | -           | -           | -           | -           |
| 发酵 蔗糖    | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| L-阿拉伯糖   | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| D-果糖     | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| D-葡萄糖    | +           | +           | +           | NT          | +           | +           |
| D-木糖     | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| 甘露醇      | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| 乳糖       | -           | -           | -           | -           | +           | +           |

\* + 菌株反应阳性 , - 菌株反应阴性 ,NT( not tested )未测定

表 4 三种方法对菌株鉴定结果

| 菌株编号  | 菌株在 GenBank 中的登记号 | 16S rDNA 序列在 GenBank 中的比对结果             |      | Biolog 鉴定结果                   | 生理生化鉴定结果                       |
|-------|-------------------|-----------------------------------------|------|-------------------------------|--------------------------------|
|       |                   | 最高相似度菌株名称                               | 相似度  |                               |                                |
| Ⅱ L15 | EF025573          | <i>Bacillus atrophaeus</i> SCH0408      | 100% | /                             | <i>Bacillus atrophaeus</i>     |
| IS5   | EF025575          | <i>Paenibacillus ehimensis</i> KCTC3748 | 99%  | /                             | <i>Paenibacillus ehimensis</i> |
| Ⅱ R8  | EF025574          | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633       | 99%  | <i>Bacillus subtilis</i>      | <i>Bacillus subtilis</i>       |
| IR11  | EF080816          | <i>Paenibacillus polymyxa</i> AY359632  | 99%  | <i>Paenibacillus polymyxa</i> | <i>Paenibacillus polymyxa</i>  |

3 讨论

本实验表明,甘草根、茎、叶组织中均存在大量内生细菌,不同年份内生细菌数量不同,各组织内生细菌的密度也不同,范围在  $5.0 \times 10^4$  cfu/g ~  $2.9 \times 10^7$  cfu/g 鲜重之间。在分离的内生细菌中芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)的分离频率最高,为优势种群。罗明等从棉花中分离到芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、黄单孢菌属(*Xanthomonas* sp.)、假单孢菌属(*Pseudomonas* sp.)、欧文氏菌属(*Erwinia* sp.)和短小杆菌属(*Curtobacterium* sp.),其中芽孢杆菌属也为优势种群<sup>[5]</sup>。

从分离的内生细菌中筛选出 6 株对西瓜枯萎病和烟草赤星病菌等 8 种植物病原菌有体外拮抗活性的菌株,表明其抑菌范围较广。本实验采用 3 种方法对 6 株拮抗菌进行鉴定,获得了较为一致的结论。对于 Ⅱ L15、IS5 菌株,采用常规的生理生化试验与 16S rDNA 序列测定结果是相吻合的。而对 Ⅱ R8、IR11 这两株菌采用 3 种不同的方法进行鉴定,获得的结果是一致的。因此,在进行菌株鉴定时要采用多种方法综合考虑以便得到更加准确的结果。这 6 株拮抗菌经鉴定分属以下 4 个种,Ⅱ L8、Ⅱ L15 为萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)、IS5 为 *Paenibacillus ehimensis*、Ⅱ R8 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、IR10、IR11 为多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)。本文中从乌拉尔甘草中分离的萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)和 *Paenibacillus ehimensis* 作为内生细菌还未见报道。

Andrews 认为植物内生细菌系统地分布于植物的不同组织中,有充足的营养物质(碳源、氮源等),同时受到植物组织的保护作用,不受外部恶劣环境如强烈日光、紫外线、暴风雨等的影响而具有稳定的生态环境,相对于腐生细菌更易于发挥生防作用<sup>[6]</sup>。据报道,*Paenibacillus* 属的一些种能产生抵抗细菌的物质,如多粘菌素、酚杆菌素等,有的还产生抑制真菌的物质<sup>[7]</sup>。芽孢杆菌对豌豆尖镰孢菌(*Fusarium oxysporium* Schl f. sp. *pisi*)有很强的抑制作用<sup>[8,9]</sup>。Dagmar 也指出,枯草芽孢杆菌有着极为广泛的用途,其中重要的一点就是作为生防菌<sup>[10]</sup>。本实验筛选的部分菌株表现出较强的抑菌活性,具有作为生防菌的潜能,但其拮抗机制及产生的抗菌物质种类有待进一步研究。

参考文献

[ 1 ] 乔世英,成树春,王志本. 中国甘草. 北京:中国农业科学技术出版社,2004. pp. 205 ~ 208.

[ 2 ] Chen C E, Bauske M, Musson G, et al. Biological Control, 1995, 5 (1): 83 ~ 91.

[ 3 ] Welington L A, Joelma M, Walter M, et al. Appl Env Microbio, 2002, 68(10): 4906 ~ 4914.

[ 4 ] Nakamura L. K. Int J Syst Bacterial, 1989, 39(3): 295 ~ 300.

[ 5 ] 罗明,芦云,张祥林. 新疆农业科学, 2004, 41(5): 277 ~ 282.

[ 6 ] Andrews J H. Can J Plant Pathol, 1990, 12(3): 300 ~ 307.

[ 7 ] Dal S K, Cheol Y B. Inter J Syst Evolu Micro, 2004, 54: 2031 ~ 2035.

[ 8 ] 刘晓妹,陈秀容,蒲金基. 微生物学通报, 2004, 31(3): 1 ~ 5.

[ 9 ] 王刚,李志强. 微生物学通报, 2005, 32(2): 20 ~ 24.

[ 10 ] Dagmar F. Inter J Syst Evolu Micro, 2001, 51: 35 ~ 37.