

# 水浮莲中一株西瓜枯萎病拮抗菌的分离、 筛选及鉴定

于蘋蘋<sup>1</sup> 艾山江·阿不都拉<sup>2</sup> 赵国玉<sup>1</sup> 卡米力·克热木<sup>2</sup> 吾甫尔·米吉提<sup>1\*</sup>

(1. 新疆大学生命科学与技术学院 乌鲁木齐 830046)

(2. 新疆师范大学生命科学与化学学院基因工程室 乌鲁木齐 830054)

**摘要:** 从水浮莲(*Pistia stratiotes* L.)的叶中分离出 1 株对西瓜枯萎病有明显拮抗作用的内生细菌 XJPL-YB-26, 其发酵液上清在 280 nm 处有最大紫外吸收峰。利用软件 Primer 6.0 设计 16S rDNA 引物并对其基因组 DNA 进行扩增并测序得到 XJPL-YB-26 的部分 16S rDNA 序列, GenBank 接收号为 EU251191。经 Blastn 调出与菌株 16S rDNA 同源的序列, 并用软件 MEGA 3.1 按 Neighbor-Joining 方法构建 16S rDNA 系统发育树。菌株 XJPL-YB-26 与 AB271744 处于同一分支, 相似性为 99%, 最终鉴定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。

**关键词:** 水浮莲, 内生菌, 拮抗作用, 鉴定

## Isolation, Screening and Identification of an Antagonistic Bacterial Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* from *Pistia stratiotes* L.

YU Pin-Pin<sup>1</sup> Hasanjan·Abdulla<sup>2</sup> ZHAO Guo-Yu<sup>1</sup> Kamil·Keram<sup>2</sup> Ghopur·Mijit<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046)

(2. College of Life Science and Chemistry, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054)

**Abstract:** One endophytic bacteria named XJPL-YB-26 had obvious antagonistic action against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* was isolated from leaves of *Pistia stratiotes* L., the absorption peak of its metabolizable production is 280 nm. The part 16S rDNA was PCR using the primer designed by Primer 6.0 and sequenced. The accession of GenBank is EU251191. The 16S rDNA phylogenetic tree was constructed by comparing with published 16S rDNA sequences of the relative bacteria species. XJPL-YB-26 and AB271744 was the closest relative with 99% sequence similarity. According to the phylogenetic analysis, it was identified as *Bacillus subtilis*.

**Keywords:** *Pistia stratiotes* L., Endophyte, Antagonistic action, Identification

植物内生菌(endophyte)是指真菌、细菌或放线菌,其生活史的一定阶段或全部阶段生活于植物各组织器官内部或细胞间隙,给活体植物造成不明显或无症状的影响,而且不造成伤害<sup>[1]</sup>。这很可能是由外源微生物侵入植物并在长期的共生过程中形成的<sup>[2]</sup>。植物内生细菌不仅将植物作为栖息场所,而且对寄主植物有促生、防病、固氮等广泛的生物学作用,是植物病害生物防治、内生联合固氮菌筛选、诱导抗病性及转基因载体等功能的天然菌源,具有较高的理论研究价值和实际应用价值,成为微生物学和植物学的又一研究热点<sup>[3-5]</sup>。近几年来,将植物内生菌应用于植物病害防治方面的研究正逐步深入并取得了可喜的成果,因此,将植物内生菌应用于植物病害防治已成为在植物病害生物防治方面极具潜力的又一新途<sup>[6-8]</sup>。

水浮莲(*Pistia stratiotes* L.) 俗称大藻,是一种多年生浮水无茎(退化)草本植物,具有较强的酸碱度耐性,能够正常生长于高浓度有机物废水中并对其高效净化,使病原菌的数量大大减少<sup>[9]</sup>。此外,水浮莲具有天然的杀菌作用,自古以来就被亚洲人作为药材使用。例如:在我国用于治疗皮肤病,在马来西亚用于治疗淋病,在印度用于治疗痢疾<sup>[10]</sup>。水浮莲的生存环境及药用价值决定了其内生菌的特殊性。据此,本研究将水浮莲作为材料进行内生菌的分离以及对农作物致病菌的拮抗菌株筛选。本文首次报道有关水浮莲内生菌的研究。

## 1 材料

### 1.1 供实植物

水浮莲(*Pistia stratiotes* L.),由乌孜别克斯坦共和国科学院微生物所提供。

### 1.2 农作物致病菌

黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*);棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*);西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*);苹果斑点落叶病菌(*Alternaria mali*);葡萄白腐病菌(*Coniothyrium diplodiella*);稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*);番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*);油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*);小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*);棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*);玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)。以

上农作物致病菌均购自中国农业科学院农业资源与农业区划研究所菌种中心。

### 1.3 培养基

马铃薯琼脂培养基(PDA),配方参考文献[11]。

### 1.4 扩增引物

primer 1: 5'-atcctggctcaggacgaac-3', primer 2: 5'-cgacttcaccccaatcatct-3',由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

## 2 方法

### 2.1 内生菌分离

取新鲜水浮莲,清洗干净,分别对根和叶子进行表面消毒:(1)根:70%乙醇 10 min,无菌水清洗 3~5 次,每次 3 min,1%次氯酸钠 4 min,无菌水清洗 3~5 次,每次 5 min;(2)叶子:70%乙醇 10 min,无菌水清洗 3~5 次,每次 3 min,1%次氯酸钠 3 min,无菌水清洗 3~5 次,每次 5 min。

无菌研钵研磨,4 层灭菌纱布过滤取滤汁,然后分别取 200  $\mu$ L 于 PDA 平板上,用涂布棒涂匀,于 28  $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 3 d 后计数菌落数,并根据颜色和形态的差异挑取不同菌落,重新在平板上纯化,并于试管中斜面保存、备用。

### 2.2 表面消毒方法的可行性验证

另附 3 组对照:(1)经表面消毒但未研磨的根和叶子;(2)最后一次清洗后的无菌水;(3)操作过程中敞口置于超净工作台里的空白培养基。以上 3 组也同样于 28  $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 3 d。

### 2.3 拮抗实验

2.3.1 致病菌悬液的制备:将农作物致病菌接种于 PDA 液体培养基中,28  $^{\circ}$ C,200 r/min 振荡培养 3 d~5 d。

2.3.2 内生菌悬液的制备:将分离得到的各个内生细菌接种于 PDA 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C,150 r/min 振荡培养 72 h,菌悬液离心(12000 r/min,10 min),取上清,4  $^{\circ}$ C 保存备用。

2.3.3 拮抗实验:1)采用平板扩散法。用打孔器在 PDA 固体培养基中央打孔 5 mm,2%琼脂封底,200  $\mu$ L 致病菌悬液于培养基上涂匀,孔中注入 60  $\mu$ L 上清液;2)采用对峙法。将内生细菌接种于 PDA 平皿中心,距中心 3 cm~4 cm 处接种需要检测的致病菌菌块(直径 5 mm)。

于 28℃ 恒温箱中培养 5 d~10 d, 观察有无抑菌圈并测量其直径。该实验重复 3 次, 直径取平均值。

2.4 生理生化初步鉴定

参照文献[12]。

2.5 分子鉴定

2.5.1 DNA提取：用CTAB法<sup>[13]</sup>提取基因组DNA。

2.5.2 16S rDNA：扩增体系：50 μL 体积中包括 34 μL ddH<sub>2</sub>O, 5 μL Buffer, 5 μL dNTPs, 2 μL primer1, 2 μL primer 2, 2 μL DNA, 0.25 μL Taq酶 5 U/μL; 扩增条件：94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 61.2℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 8 min; 4℃ 终止反应。

2.5.3 扩增产物测序：PCR 产物由 TaKaRa 公司测序。

2.5.4 系统发育分析：根据测序结果, 先利用 Blastn 搜索软件从 GenBank 等数据库中调出相关属种菌株的 16S rRNA 基因序列, 并通过软件 MEGA 3.1 采用 N-J 法构建系统进化树。

2.6 拮抗物质的紫外光谱分析

以空白 PDA 液体培养基为对照, 在 220 nm~400 nm 范围内对内生菌株 XJPL-YB-26 的发酵液上清(用蒸馏水按照 1:1 的比例稀释)进行紫外光谱扫描。

3 结果

3.1 内生菌分离

3.1.1 表面消毒方法的可行性验证：观察 3 组对照, 未出现任何菌落, 表明经过表面消毒过程, 植物表面附生菌的影响已经消除, 且超净工作台严格无菌, 所分离的菌株的确来自于植物内部, 与植物组织结合紧密, 该消毒方法是可行的。

3.1.2 分离结果：根据颜色和形态的差异, 在 PDA 上共分离出 28 株内生细菌(其中根中分离出 11 株, 叶中分离出 17 株)。

3.2 拮抗实验

用平板扩散法从所分离出的 28 株内生菌中筛选出 1 株对西瓜枯萎病菌有拮抗作用的内生菌 XJPL-YB-26, 抑菌圈直径为 30 mm(图 1)。

3.3 生理生化初步鉴定

根据文献[12]中鉴定枯草芽孢杆菌的主要生理

生化指标进行检测, 其特征均与枯草芽孢杆菌的主要指标相符合, 这初步表明 3 株菌为枯草芽孢杆菌, 如表 1 所示。

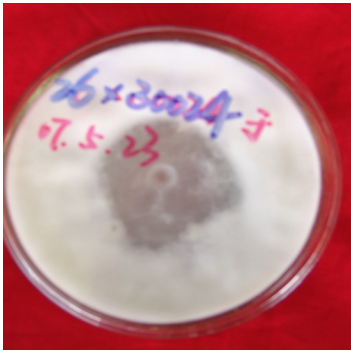


图 1 拮抗菌的拮抗图谱(XJPS-26 对西瓜枯萎病菌)  
Fig. 1 Antagonistic maps of antagonistic bacterial (XJPL-YB-26 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)

表 1 生理生化实验结果 Table 1 Physiological and biochemical result		
鉴别特征	Characteristic	XJPL-YB-50
G		+
形态	Shap	Bacillus
芽孢	Endospore	+
苯丙氨酸脱氢酶	Phenylalanine deaminase	-
V.P		+
厌氧生长	Anaerobic	-
接触酶	Catalase	+
淀粉水解	Amylolysis	+
D-葡萄糖产酸	Oduce acid with D-glucose	+
L-阿拉伯糖产酸	Produce acid with L-gum sugar	+
D-木糖产酸	Produce acid with D-xylose	+
D-甘露醇产酸	Produce acid with D-Mannitol	+
葡萄糖产气	Produce gas with glucose	-
水解酪蛋白	Casein hydrolyzation	+
水解明胶	Gelatin hydrolyzation	+
利用柠檬酸盐	Make use of Citeate	+
利用丙酸盐	Make use of propionate	-
酪氨酸水解	Tyrosine hydrolyzation	+
硝酸盐还原到亚硝酸盐	Niteate deoxidization	+
形成吲哚	Indole	+
生长 pH 6.8 营养肉汤	Growp in pH 6.8 Nutrient broth medium	+
生长 pH 5.7 营养肉汤	Growp in pH 5.7 Nutrient broth medium	+
生长 2% NaCl	Growp in 2% NaCl	+
生长 5% NaCl	Growp in 5% NaCl	+
生长 7% NaCl	Growp in 7% NaCl	+
生长 10% NaCl	Growp in 10% NaCl	+

注：+：阳性反应；-：阴性反应  
Note: + : Positive reaction; - : Negative reaction

### 3.4 16S rRNA 基因序列分析

菌株 XJPL-YB-26 的 16S rRNA 基因序列全长为 1410 bp, 此序列已在 GenBank 中注册, 注册号为 EU251191, 将其与从 GenBank 等数据库中调取的与枯草芽孢杆菌相关菌株的 16S rDNA 序列进行比较, 所构建的系统进化树见图 2。系统进化树显示, 菌株 XJPL-YB-26 与 AB271744 构成一个分支, 16S rRNA 序列的同源性达到 99%。

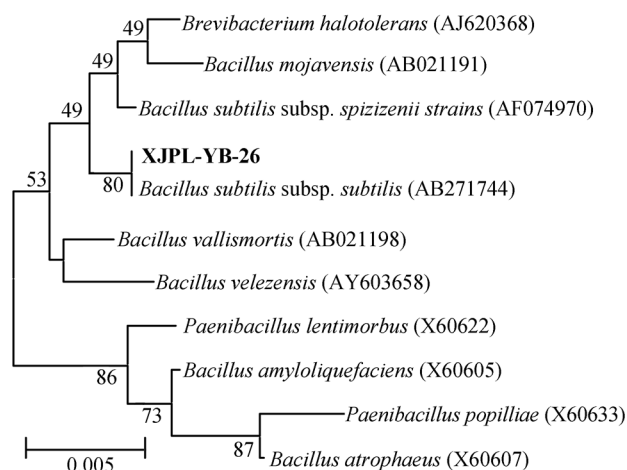


图2 菌株 XJPL-YB-26 以及从 GenBank 等数据库中调集的相关菌株构建的以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树  
Fig. 2 Neighbor-Joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among XJPL-YB-26 and other related strains downloaded from GenBank

### 3.5 拮抗活性物质的紫外光谱分析

水浮莲内生菌株 XJPL-YB-26 的紫外吸收光谱在 280 nm 处有最大吸收峰, 如图 3 所示。

## 4 讨论

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)生长快, 营养简单, 能够形成有较强抗逆性的芽孢, 具有抑制多种植物病害的能力, 又是自然界广泛存在的非致病菌, 对人畜无害, 不污染环境, 是目前应用较广的理想生防菌<sup>[14]</sup>。菌株 XJPL-YB-26 的 16S rRNA 基因序列系统进化树显示, 菌株 XJPL-YB-26 与 AB271744 构成一个分支, 16S rRNA 序列的同源性达到 99%, 其生理生化结果也与 *Bacillus subtilis* 的主要鉴定指标相符, 初步鉴定为 *Bacillus subtilis*。以空白 PDA 液体培养基作对照, 测得水浮莲内生菌 XJPL-YB-26 发酵液上清的紫外吸收光谱在 280 nm 处有最大吸收峰。在拮抗实验过程中还发现, 水浮莲内生菌 XJPL-YB-26 并非抑制菌丝生长直接形成抑菌圈, 而是等致病菌长满整个培养基平板后(大约 3 d~4 d), 孔周围的菌丝才开始慢慢消失而逐渐形成了抑菌圈。初步推测 XJPL-YB-26 对西瓜枯萎病菌的拮抗作用机理很可能是“杀菌”而非简单的“抑菌”, 其拮抗物质及作用机理有待进一步研究。

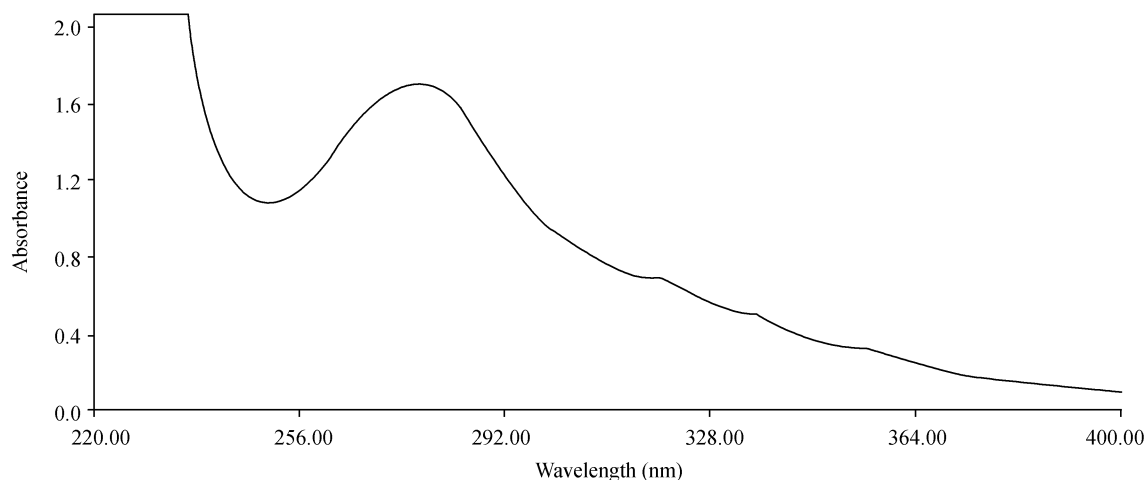


图3 XJPL-YB-26 发酵液的紫外吸收光谱  
Fig. 3 Fermentation liquid's absorption spectra in fermentation about XJPL-YB-26

## 参考文献

[1] PeNni O. Fungal endophytes of tree leaves. Andrews JH, Hirano SS, eds. New York: Springer Verlag, 1991,

pp.179-197.

[2] Agustina Gentile, Maria Susana Rossi, Daniel Cabral, et al. Origin, divergence, and phylogeny of epichlo endophytes of native Argentine grasses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, **35**: 196-208.

- [3] 孔庆科, 丁爱云. 内生细菌作为生防因子的研究进展. 山东农业大学学报(自然科学版), 2001, 32(2): 256-260.
- [4] 杨海莲, 孙晓璐, 宋 未, 等. 植物内生细菌的研究. 微生物学通报, 1998, 25(4): 224-226.
- [5] 杨海莲, 孙晓璐, 宋 未, 等. 植物根际促生细菌和内生细菌的诱导抗病性的研究进展. 植物病理学报, 2000, 30(2): 106-109.
- [6] 孙 勇, 曹小迎, 于平儒, 等. 植物内生细菌 Y-33 对 6 种植物病原菌的抑制作用. 江苏农业科学, 2004, 4: 78-79.
- [7] 苗则彦, 刘奎华, 刘长远, 等. 我国植物内生细菌对病虫害防治现状研究. 辽宁农业科学, 2003, 6: 31-32.
- [8] 闫孟红, 蔡正求, 韩继光, 等. 植物内生细菌在防治植物病害中的应用现状. 生物技术通报, 2004, 30: 8-12, 22.
- [9] 吾甫尔·米基提, 阿布都克里木·热合曼, 艾尔肯·热合曼, 等. 引种水浮莲(*Pistia stratiotes* L.)适应性的初步研究. 新疆大学学报(校庆增刊), 1995, 12: 70-73.
- [10] . . . . . (*Pistia stratiotes* L.) , 1986, 3: 49-51.
- [11] 钱存柔, 黄仪秀主编. 《微生物学实验教程》. 北京: 北京大学出版社, 2003, p.215.
- [12] 布坎南 RE, 吉本期 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984, pp.62-65.
- [13] 林加涵, 魏文铃, 彭宣宪. 现代生物学实验(下册). 北京: 高等教育出版社, 2001, pp.98-103.
- [14] Emmert EAB, Handelsman J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol Letters*, 1999, 171: 1-9.

稿件书写规范

## 专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学各分支学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 最好包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势。即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。