

中国红豆杉内生细菌的分离鉴定及活性研究

丁小维 刘开辉 邓百万* 陈文强

(陕西理工学院 生物科学与工程学院 汉中 723001)

摘要: 从中国红豆杉的茎中分离得到两株内生细菌 G18、F19, 通过生物学特性和 16S rDNA 序列分析, 初步鉴定这两株菌分别为假单胞菌属(*Pseudomonas*)和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)细菌。活性研究表明, G18、F19 发酵液均对 3 种病原细菌有抑制作用, 分别对棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)和柑橘炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)有较强的抑制作用。G18 和 F19 分别能降解水杨酸和敌敌畏。

关键词: 中国红豆杉, 内生细菌, 活性研究

Isolation, Identification and Bioactivity Assays of Endophytic Bacteria Associated with *Taxus chinensis*

DING Xiao-Wei LIU Kai-Hui DENG Bai-Wan* CHEN Wen-Qiang

(School of Biological Science & Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001)

Abstract: Two endophytic-bacteria isolates of G18 and F19 were isolated from the stem of *Taxus chinensis*. The G18 and F19 were respectively classified into *Pseudomonas* sp. and *Stenotrophomonas* sp. based on biological characteristics and 16S rDNA sequence analysis. The bioactivity analysis showed that the fermented broths of the G18 and F19 exhibited antagonistic activities against three pathogenic bacteria, and had good antagonistic effectiveness to *Verticillium dahliae* and *Colletotrichum gloeosporioides*, respectively. The G18 can degrade salicylic acid, and the F19 can do dichlorvos.

Keywords: *Taxus chinensis*, Endophytic bacteria, Bioactivity assay

植物内生细菌是从表面消毒的植物组织中分离得到, 或从植物体内部获得的, 能够定殖在健康植物细胞间隙或其内部, 并未使植物的表型特征和功能发生改变的细菌^[1]。内生细菌产生的活性物质可用于抗癌、生防、抗菌等领域^[2]。目前, 药用植物的内生细菌已成为近年微生物资源研究的一个热点。

红豆杉(*Taxus mairei*)又名紫杉、赤柏松, 是含有抗癌药物紫杉醇的珍稀植物^[3]。目前有关红豆杉

内生菌的研究主要集中在内生真菌^[4]方面, 有关红豆杉内生细菌方面的研究报道尚少。本文在研究中国红豆杉内生细菌的过程中, 分离得到 2 株内生细菌 G18 和 F19, 现将其鉴定和活性研究报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料: 中国红豆杉(*Taxus chinensis*)采自

陕西省南郑县小坝乡。供试菌株：金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)、柑橘炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、棉花立枯丝病菌(*Thanatephorus cucumeris*)、稻瘟枯病菌(*Rhizoctonia solani*)和油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)。

1.1.2 培养基：基础培养基为牛肉膏蛋白胨培养基和 CPDA；无机盐培养基^[5]，水杨酸、敌敌畏按实验需要量添加。

1.2 分离

取新鲜的中国红豆杉茎，自来水冲洗 2 h 左右。在超净工作台，无菌水冲洗 2~3 次，75%乙醇浸泡 30 s，无菌水洗 3 次；0.1%升汞浸泡 8 min，无菌水洗 5 次。用无菌解剖刀将韧皮部切割成 0.5 cm 左右的小块，接于牛肉膏蛋白胨培养基中，37℃ 人工气候箱中培养，待材料周围有菌长出后，平板划线纯化单菌落，斜面保存备用。

1.3 鉴定

在牛肉膏蛋白胨培养基上，37℃ 培养菌株(G18、F19)24 h，观察菌落形态，并进行革兰氏染色和芽孢染色等。

采用水煮法提取细菌总 DNA^[6]。以细菌通用引物 P1 (5'-3') : GGTTACCTTAGCACTT 和 P2 (5'-3') : AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 扩增 G18 和 F19 的 16S rDNA 序列。PCR 反应体系：DNA 模板约 30.0 ng，10 × PCR 缓冲液 2.0 μL，25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μL，10 mmol/L 的 P1 和 P2 各 2.0 μL，dNTPs(10 mmol/L) 0.5 μL，Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.3 μL，加灭菌双蒸水至 25.0 μL。PCR 反应条件：94℃ 5 min；94℃ 1 min，55℃ 30 s，72℃ 2 min，35 个循环；72℃ 10 min。用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物，纯化的 PCR 产物由上海生工生物技术有限公司进行双向测序。

将所测序列提交到 GenBank 数据库中并进行 Blast 检索，下载同源性较高的数据，生成 Fasta 格式的文件。用 Clusta-X 软件对所得序列进行人工校正及比对分析。利用 Mega3.1 软件构建系统发育树。

1.4 活性研究

1.4.1 抗菌活性测定：采用杯碟法^[7]测定 G18、F19

发酵液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌的抗菌作用。采用滤纸片扩散法^[8]测定其发酵液对棉花黄萎病菌、柑橘炭疽病菌、棉花立枯丝病菌、稻瘟枯病菌和油菜菌核病菌的抗菌作用。

1.4.2 降解水杨酸：将 G18、F19 接入附加一定浓度水杨酸(100 mg/L)的无机盐培养基上，37℃ 倒置培养 48 h，观察 G18、F19 生长情况，初步判断其降解水杨酸能力。

1.4.3 降解敌敌畏：将 G18、F19 接入以敌敌畏(100 mg/L)为唯一碳源的无机盐液体培养基中，37℃，180 r/min 摇床培养，观察液体培养基颜色的变化情况，初步判断其降解敌敌畏的能力。

2 结果

2.1 鉴定

2.1.1 生物学特性：在牛肉膏蛋白胨培养基上培养 24 h 后，观察生物学特性。G18 菌落乳白色、圆形、外形光滑、湿润、不透明、易挑起。细胞短杆状、革兰氏阴性、不产芽孢、α-溶血型。F19 菌落黄色、圆形、中央隆起、外形光滑、湿润、不透明、不易挑起。细胞杆状、革兰氏阴性、不产芽孢、α-溶血型。

2.1.2 系统发育分析：由上海生工生物技术服务有限公司对菌株 G18 和 F19 的 16S rDNA 进行测序，所得序列长度为 1383 bp，序列提交 GenBank 数据库，收录号分别为 EU442267、EU442266。用 Clusta-X 软件对所测菌株 16S rDNA 序列进行人工校正，从 GenBank 上下载的相应数据，采用 Mega3.1 软件，按照 N-J 法聚类，经自举法检验(1000 次重复)，构建系统发育树，如图 1 所示。G18 和假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌聚类于一个分支上，F19 和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)细菌聚类于一个分支上，分别与目前已发表的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)序列同源性为 99%~100%。基于生物学特性和 16S rDNA 序列分析，将 G18 和 F19 分别初步定为假单胞菌属和寡养单胞菌属细菌中的已知种。

2.2 活性研究

2.2.1 抑菌活性：采用杯碟法及滤纸法对菌株发酵液进行抗菌活性研究，结果表明 G18 和 F19 发酵液对 3 种病原细菌均有抑制作用；G18 对棉花黄萎病菌

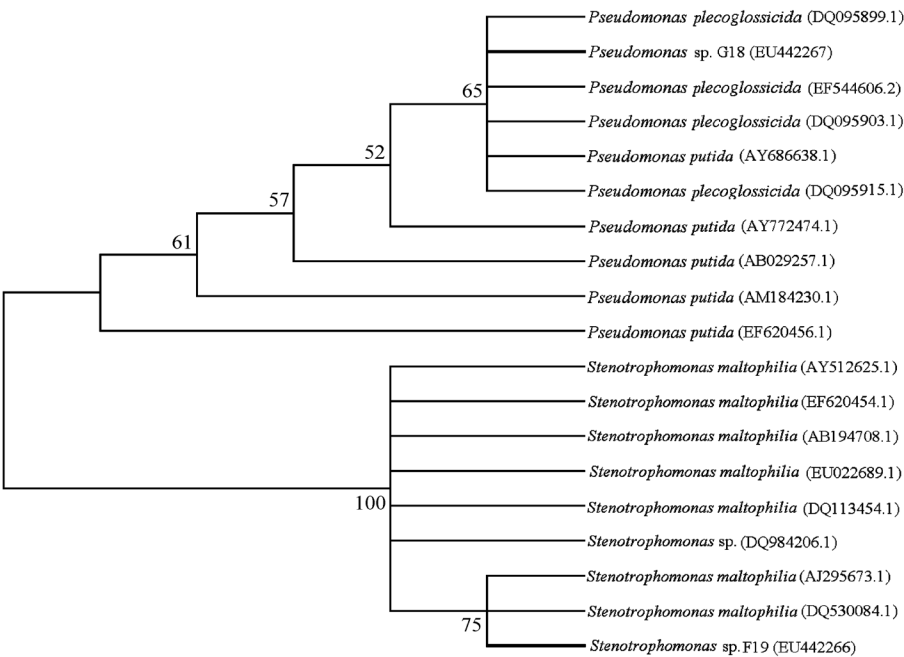


图 1 菌株 G18 和 F19 的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of the G18 and F19 based on 16S rDNA sequences

和柑橘炭疽病菌有抑制作用，对前者的抑制作用更强，抑菌圈半径达到 16 mm 左右，F19 对柑橘炭疽病菌有较强的抑制作用，抑菌圈半径达到 15 mm 左右（表 1）。G18、F19 的抑菌作用可能与其所产生的某些酰胺类抗生素有关^[9]。

表 1 G18、F19 对病原菌的抑制作用 Table 1 The antimicrobial activities of broths of the G18 and F19 against pathogens		
病原菌 Pathogens	菌株 G18 Strain G18	菌株 F19 Strain F19
金黄色葡萄球菌	+	+
枯草芽孢杆菌	+	+
大肠杆菌	++	++
棉花黄萎病菌	+++	-
柑橘炭疽病菌	+	+++
棉花立枯丝病菌	-	-
稻瘟枯病菌	-	-
油菜菌核病菌	-	-

注：+：抑菌直径为 8 mm；++：8 mm~12 mm，+++：13 mm~20 mm，-：无抑菌活性

Note: +: Inhibition diameter 8 mm; ++: Inhibition diameter 8 mm~12 mm; +++: Inhibition diameter 13 mm~20 mm; -: No inhibition activity

2.2.2 对水杨酸的降解能力：将 G18、F19 分别接种到以水杨酸为唯一碳源的无机盐培养基上，培养 48 h 后，在接入 G18 的培养基上有菌落形成，说明

G18 能分解水杨酸，供自身生长。F19 不能在该培养基上生长。

2.2.3 对敌敌畏的降解能力：将 G18、F19 分别接入以敌敌畏为唯一碳源的无机盐液体培养基中，培养 12 d 后，接入 F19 的液体培养基由乳白色变为澄清，出现了少量白色沉淀物，说明该菌株能将敌敌畏降解，而接入 G18 的液体培养基则没有变化。

3 讨论

自 Strobel 等^[10]从短叶红豆杉中分离得到 1 株产紫杉醇的内生真菌以来，红豆杉内生菌的研究已成为国内外学者研究的一个热点，许多内生真菌相继被分离得到^[3,4]。目前，国内有关红豆杉内生细菌的研究报道较少。本研究从中国红豆杉茎中分离得到内生细菌 G18、F19，生物学特性和 16S rDNA 序列分析表明分别属于假单胞菌属细菌和寡养单胞菌属细菌。

植物内生细菌与宿主植物在长期协同进化过程中，对宿主植物具有许多生物学作用，如促进植物对恶劣环境的适应，拮抗环境中病原微生物的侵袭等^[2]。本研究所分离的内生细菌 G18 和 F19 分别可以利用水杨酸和敌敌畏，这可能是由于供试菌株具有降解酶基因，因此在降解环境污染物方面具有潜

在的应用价值。G18 和 F19 菌株发酵液对 3 种病原细菌和某些病原真菌表现出较强的抑制作用, 具有作为生防菌的潜力, 但其产生的抗生素类物质有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews JH, Hirano SS eds. *Microbial Ecology of Leaves*. New York: Springer-Verlag, 1991, pp.179-197.
- [2] 李 强, 刘 军, 周东坡, 等. 植物内生菌的开发与研究进展. *生物技术通报*, 2006, 3: 33-37.
- [3] 张炯炯. 红豆杉植物资源的开发利用. *生物学杂志*, 2000, 17(4): 30-31.
- [4] 周东坡, 平文祥, 孙剑秋, 等. 紫杉醇产生菌分离的研究. *微生物学杂志*, 2001, 21(1): 18-20.
- [5] 何 健, 蒋建东, 贾开志, 等. 外源甜菜碱提高恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) DLL-1 耐盐性的研究. *微生物学报*, 2006, 46(1): 154-157.
- [6] 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. *微生物学报*, 2004, 44(1): 13-18.
- [7] 周德庆. *微生物学实验手册*. 上海: 上海科学技术出版社, 1986, pp.121-123.
- [8] 申屠旭萍, 陈宵蜂, 俞晓平. 银杏中抗病原真菌的内生真菌的分离筛选. *浙江农业学报*, 2006, 18(5): 308-312.
- [9] Girlanda M, Perotto S, Moenne-Loccoz Y. Impact of bio-control *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and a genetically modified derivative on the diversity of culturable fungi in the cucumber rhizosphere. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(4): 1851-1864.
- [10] Strobel G, Stierle A, Stierle D. *Taxomyces andreana*: a proposed new taxon for a bulbififerous by phomycete associated with pacific yew(*Taxus brevifolia*). *Mycotaxon*, 1993, 38(3): 214.

征订启事

欢迎订阅 2009 年《植物保护》杂志

《植物保护》创刊于 1963 年, 由中国植物保护学会和中国农业科学院植物保护研究所主办, 为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、“中国期刊方阵”双百期刊, 曾荣获中国科协优秀科技期刊奖、全国优秀科技期刊奖, 北京市全优期刊奖、国家期刊奖提名奖等多个奖项。收录的数据库有英国《CABI 文献数据库》、《Agrindex (FAO)》、美国《化学文摘》(CA)、《中国科学引文数据库》、《中文科技期刊数据库》、《生物学术文摘》、《万方数据—数字化期刊群》、《中国农业文摘数据库》、《中国科技论文与引文数据库》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊网》。本刊主要刊登有关植物病理、农林业昆虫、杂草及鼠害等农作物有害生物、植物检疫、农药等植物保护学科各领域原始研究性论文和具有创新性、实用性技术成果文章。设有专论与综述、研究报告、调查研究、基础知识、实验技术、国外植保、争鸣、应用与交流、病虫新动态、学会动态与信息、新书新产品介绍等栏目。

竭诚欢迎全国各地科研院所研究人员、大专院校教师及研究生、各级植保科技工作者等踊跃订阅。欢迎广大作者踊跃投稿! 并欢迎咨询洽谈广告业务!

本刊为双月刊, 大 16 开, 160 页, 铜版纸印刷。每期定价 25.00 元, 全年 150.00 元。邮发代号: 2-483, 全国各地邮局均可订阅。直接在本刊编辑部订阅, 可享受 9 折优惠价, 全年 135 元, 若需挂号, 每期另加 3 元。联系地址: 北京圆明园西路 2 号中国农科院植保所《植物保护》编辑部 邮编: 100193

电话: 010-62819059, 62815914 传真: 010-62815914

E-mail: zwbh1963@263.net 网址: www.plantprotection.ac.cn 联系人: 王 音 高洪荣