

骏枣内生防细菌的分离、筛选与鉴定

李雁津 邱服斌* 陈美娟 张海杰

(山西医科大学 公共卫生学院 山西 太原 030001)

摘要: 选择交城骏枣(*Zizyphus jujube* cv. Jiaocheng Junzao)作为分离内生细菌的材料,从中共分离到18株内生菌株,运用平板对峙法从中筛选出5株对大枣病原菌及部分植物病原菌有拮抗作用的内生细菌。抑菌试验结果表明:筛选出的5株细菌对刺盘孢菌 *Colletotrichum gloeosporides*、链格孢菌 *Alternaria alternata*、尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporium*、烟草赤星病菌 *Alternaria longipes*、稻瘟病菌 *Pyricularia oryzae*、人参立枯病菌 *Rhizoctonia solani*、人参菌核病菌 *Sclerotinia schinseng* 和小麦根腐病菌 *Bipolaris sorokiniana* 均有一定的抑菌活性。对这5株内生细菌进行了形态特征观察和生理生化鉴定。

关键词: 枣, 内生细菌, 抑菌活性, 鉴定

Isolation, screening and identification of endophytic antibiotic bacteria from Jun jujube

LI Yan-Jin QIU Fu-Bin* CHEN Mei-Juan ZHANG Hai-Jie

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

Abstract: Jiaocheng Jun jujube (*Zizyphus jujube* cv. Jiaocheng Junzao) was selected as the material to isolate endophytic bacteria. 18 strains of endophytic bacteria were obtained and their antibiotic activity against pathogenic fungi and Oomycetes were evaluated in this study. The antagonistic effects showed that 5 of them expressed antibiotic activity on *Colletotrichum gloeosporides*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporium*, *Alternaria longipes*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia schinseng* and *Bipolaris sorokiniana* to some extent. And morphological performance, physiological and chemical characteristics of 5 antibiotic bacteria were observed.

Keywords: Jujube, Endophytic bacterium, Antibiotic activity, Identification

红枣, 又名大枣。自古以来就被列为“五果”(桃、李、梅、杏、枣)之一, 历史悠久。具有很高的

食用价值和药用价值。据《本草纲目》记载: 大枣有补中气、润心肺、滋补、缓阳血、生津液、通七

窍、助十二经、和百药等作用。大枣的保健及药用价值逐渐被认识,国内外需求量加大。但大枣的生产极易受气象条件和病原生物的侵袭,和其他作物一样,化学农药仍是防治大枣病害的主要措施,但易造成残留污染、诱发病原菌抗药性和伤害非靶标生物等不利影响。在寻求安全有效的防治措施过程中,植物病害的生物防治日益引起人们的关注,健康植物体内存在大量的内生细菌,它们是植物病害生物防治的潜在资源菌^[1]。

许多研究者已从棉花、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^[2-7]。但是,有关枣果内生细菌的研究鲜见报道。本研究以交城骏枣果实作为研究材料,对其内生细菌进行了分离,从中筛选出对多种病原菌具有拮抗活性的内生菌株,从而为进一步利用内生生物防治资源,探索对枣病害安全有效的生物防治措施,开展内生菌生防机制的分子生物学研究奠定了基础^[8]。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 骏枣材料:选用交城骏枣(大枣的一个品种)作为供试材料。直接从枣树上摘取健康无外伤的成熟果实,装入无菌纸袋,带回实验室,4℃低温保藏。

1.1.2 培养基:胰酶大豆琼脂培养基(TSA)、任氏培养基(R2A)、金氏培养基 B (KMB)、肉汁胨培养基(BPA)、LB 培养基、酵母膏蛋白胨琼脂培养基(YPM)、无氮培养基。

1.1.3 供试植物病原菌:尖孢镰刀病菌 *F. oxysporium*, 烟草赤星病菌 *A. longipes*, 稻瘟病菌 *P. oryzae*, 刺盘孢菌 *C. gloeosporides*, 链格孢菌 *A. alternata*, 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。人参立枯病菌 *R. solani*, 人参核病菌 *S. schinseng*, 小麦根腐病菌 *B. sorokiniana*, 由中国医学科学院药用植物研究所丁万隆教授馈赠,在本研究室保存,活化后使用。

1.2 试验方法

1.2.1 交城骏枣内生细菌的分离、纯化和保存:取完整交城骏枣,用自来水清洗表面后再用无菌水冲洗,晾干称重后浸入 30%的乙醇中 3 min 进行表面消毒,再浸入 2.6%的次氯酸钠溶液中 5 min,之后浸入 30%的乙醇中 30 s,最后用无菌水冲洗 5 次,晾干,用无菌剪刀剪碎,加入无菌水研磨,梯度稀释后分别涂布于胰酶大豆琼脂培养基(TSA)、任氏培养基(R2A)、金氏培养基(KMB)、肉汁胨培养基(BPA)、LB 培养基、酵母膏蛋白胨琼脂培养基(YPM)、无氮培养基,28℃培养箱中倒置培养 3-7 d。同时以最后一次洗涤的水作为对照。根据平板上长出菌落的形态、颜色、大小等挑取不同单菌落,反复划线纯化后接斜面保藏。

1.2.2 拮抗菌的筛选:采用平板对峙法测定内生细菌对病原菌的抑菌活性。分别在 PDA 平板中央接入直径 6 mm 生长旺盛的不同病原菌菌块,再在菌块周围距中心 2/3 处放置灭菌滤纸片,在滤纸片上接种 15 μL 待测菌株的菌液(菌液在 600 nm 处的吸光值在 0.6-0.8 之间),28℃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。

1.2.3 拮抗菌的形态特征观察和生理生化鉴定:用光镜观察了内生细菌的菌体形态,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、氧化酶、淀粉水解、硝酸盐还原、吲哚反应、V-P 试验、耐盐性、最高耐受温度等生理生化特性做了测定^[9-13]。

1.2.4 菌株的 16S rDNA 序列测定:采用菌落 PCR 方法扩增菌株的 16S rDNA 片段^[14]。先在 1.5 mL 离心管中加入 30 μL 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℃、12 000 r/min 离心 5 min,上清液作为 PCR 模板。用细菌 16S rDNA 通用引物 799f (5'-A ACAGGATTAGATACCCTG-3') 和 1492R (5'-GGT TACCTTGTTACGACTT-3')对菌株的 16S rDNA 的部分片段进行扩增。反应体系(50 μL): 10×buffer 5 μL、dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL、引物 799f (10 mmol/L) 2 μL、引物 1492R (10 mmol/L) 2 μL、

Taq 酶(5 U/L) 0.25 μL、3 μL 上清液作为模板、ddH₂O 33.75 μL。PCR 反应程序: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 51 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 8 min。

1.2.5 菌株 16S rDNA 序列系统发育树的构建: 将菌株的核苷酸序列提交至 NCBI 核苷酸序列库进行比对。从 NCBI 核苷酸库中调取已公开发表的核苷酸序列, 用软件 Phylip 3.65 比较菌株的的 16S rDNA 与这些序列间的相似性, 选取与其相似性最高的序列, 用 ClustalX 软件对上述序列进行多序列比对, 之后再用 MEGA 4.1 进化树软件构建系统发育树^[15]。

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离

根据菌落形态、颜色、透明度等特征, 从上述分离内生细菌的培养皿中挑取不同菌落进行纯化, 得到 18 株内生菌株。分别命名为 ju01-ju18。

2.2 拮抗菌的筛选

通过对 18 个菌株进行离体抑菌测定, 病原真菌选用导致枣炭疽病的刺盘胞菌 *C. gloeosporides*、导致枣缩果病及枣铁皮病的链格孢菌 *A. alternata*^[16], 以及部分其他植物病原真菌: 尖孢镰刀菌 *F. oxysporium*、烟草赤星病菌 *A. longipes*、稻瘟病菌 *P. oryzae*、人参立枯病菌 *R. solani*、人参菌核病菌 *S.*

schinseng 和小麦根腐病菌 *B. sorokiniana*, 共得到 5 株对植物病原真菌有拮抗作用的菌株, 占到菌株总数的 27.8%, 抑菌圈半径最大的可达 9.0 mm (表 1、图 1)。

表 1 菌株对植物病原菌的抑制活性 Table 1 Antibiotic activity of strain to pathogenic fungi					
病原真菌 Pathogenic fungi	Inhibition radius (mm)				
	ju03	ju07	ju14	ju16	ju17
刺盘胞菌 <i>Colletotrichum gloeosporides</i>	9.0	7.0	3.0	8.0	2.0
链格孢菌 <i>Alternaria alternata</i>	8.0	1.0	4.0	6.0	2.5
尖孢镰刀病菌 <i>Fusarium oxysporium</i>	7.0	6.0	4.0	3.0	5.0
烟草赤星病菌 <i>Alternaria longipes</i>	7.0	6.0	—	3.0	4.0
稻瘟病菌 <i>Pyricularia oryzae</i>	8.0	6.0	7.0	1.5	6.5
人参立枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	8.0	—	7.0	3.0	7.0
人参菌核病菌 <i>Sclerotinia schinseng</i>	6.0	2.5	5.0	2.0	6.0
小麦根腐病菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	6.0	7.5	2.0	5.0	3.0

2.3 拮抗菌的形态特征观察和生理生化鉴定

通过形态学观察和生理生化特征的测定, 对具有抗菌作用的 5 株内生细菌进行了初步鉴定, 结果见表 2、表 3。

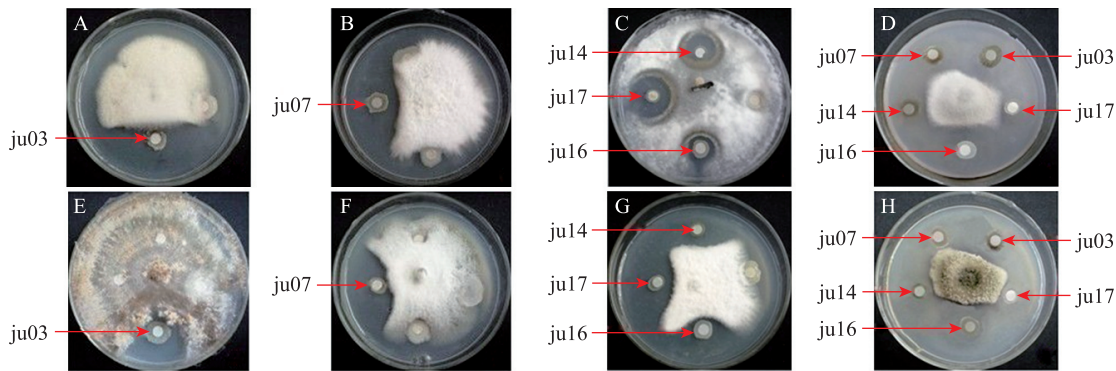


图 1 分离菌株对植物病原真菌的体外抑制活性

Fig. 1 Antibiotic activity of strain to pathogenic fungi in vitro

注: A: 烟草赤星病菌; B: 尖孢镰刀病菌; C: 人参菌核病菌; D: 刺盘胞菌; E: 人参立枯病菌; F: 小麦根腐病菌; G: 稻瘟病菌; H: 链格孢菌。

Note: A: *Alternaria longipes*; B: *Fusarium oxysporium*; C: *Sclerotinia schinseng*; D: *Colletotrichum gloeosporides*; E: *Rhizoctonia solani*; F: *Bipolaris sorokiniana*; G: *Pyricularia oryzae*; H: *Alternaria alternata*.

表 2 5 株内生细菌菌株的菌落形态特征
Table 2 The main morphological performance of 5 endophytic bacterial strains

菌株 Strain	颜色 Colour	形状 Form	大小 Size (mm)	光泽 Blare	透明度 Transparency	隆起 Hunch	边缘 Edge
ju03	乳白色	不规则	2.0-6.0	无	半透明	扁平	不整齐
ju07	粉红色	圆形	0.1-2.0	有	不透明	隆起	整齐
ju14	乳白色	圆形	3.0-6.0	有	半透明	隆起	整齐
ju16	黄色	圆形	3.0-4.0	有	不透明	隆起	整齐
ju17	白色	圆形	0.1-1.0	有	不透明	隆起	不整齐

表 3 5 株内生细菌菌株的主要生理生化特性
Table 3 The main physiological and chemical characteristics of 5 endophytic bacterial strains

测定项目 Tested items	ju03	ju07	ju14	ju16	ju17
菌体形态 Bacteria morphology	杆状	杆状	杆状	球状	杆状
革兰氏反应 Grams stain	-	-	+	+	-
接触酶反应 Catalase test	-	+	-	+	+
氧化酶反应 Oxidase test	+	+	+	+	-
淀粉水解试验 Starch hydrolysis	+	-	+	+	-
硝酸盐还原反应 Nitrate reduction	+	+	+	-	+
吲哚试验 Indole test	+	-	+	-	-
V-P 测定 V-P test	+	+	+	+	+
耐盐性 Salt tolerance	0-7.0%	0-8.0%	0-6.0%	0-6.0%	0-5.0%
最高耐受温度 Maximum tolerable temperature (°C)	43	42	43	45	40

2.4 16S rDNA 序列分析及系统发育树的构建

16S rDNA 的 PCR 结果表明,扩增产物大小接近 700 bp。相似性研究结果表明,菌株 ju03 的 16S rDNA 序列同公开发表的不动杆菌属同源性较高,为 98%,菌株 ju07 的 16S rDNA 序列同公开发表的节杆菌属同源性较高,为 98%,菌株 ju14 的 16S rDNA 序列同公开发表的 *Lysinibacillus* 属同源性较高,为 99%,菌株 ju16 的 16S rDNA 序列同公开发表的鲍曼不动菌属同源性较高,为 99%,菌株 ju17 的 16S rDNA 序列同公开发表的类芽孢杆菌属同源性较高,为 99%。

根据东秀珠等^[9]对细菌形态学及生理生化的描述,并结合 16S rDNA 序列分析,初步确定 ju03 和 ju16 为不动杆菌,ju07 为节杆菌,ju14 为 *Lysinibacillus* 菌,ju17 为类芽孢杆菌。序列分析结果与传统方法鉴定结果一致。

通过多序列比对,系统发育学分析,用 MEGA 4.1 进化树软件构建系统发育树(图 2)。

3 讨论

植物病害的生物防治研究已有很长的历史,利用拮抗微生物防治植物病害也有一些成功的例子,如 1926 年 Sanford 报道土壤中某些拮抗性微生物对于土传病原菌具有抑制性^[17],但分离自土壤和根际土壤的拮抗微生物由于受到环境条件的影响,防病效果往往不够稳定。植物内生细菌由于可在植物体内定殖,处于一个相对稳定的生态环境中,受到外部环境条件的影响相对较小,因而可能会比外部环境中的微生物具有更好的防病效果。目前已从不同植物中分离到许多对植物病害具有防病效果的内生细菌。本研究从交城骏枣内分离到 18 株内生菌株,经体外实验研究证实,其中有 5 株细菌对部分植物病原真菌具有较好的拮抗活性,为今后植物病原菌生防研究提供了新的菌种资源。因内生细菌对病原真菌的生防作用受环境等因素的影响,如应用于生物防治的生产实践还需植物体内定殖力、持久性、回接、喷洒等田间试验研究。

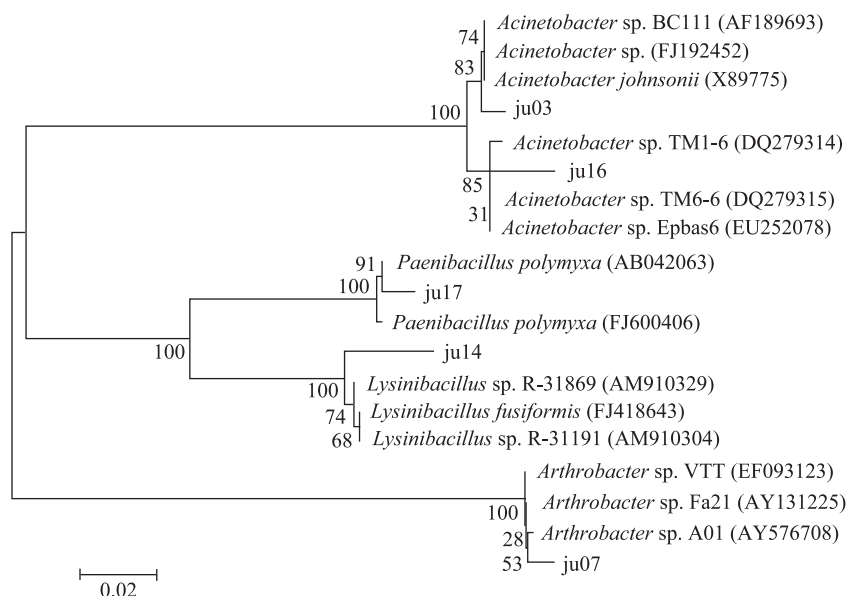


图2 邻接法构建的16S rDNA序列系统发育树

Fig. 2 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, 0.02 substitutions per nucleotide position.

参考文献

- [1] 位增辉, 罗丽, 王远路, 等. 辣椒内生细菌的分离与拮抗菌株的筛选[J]. 青岛农业大学学报: 自然科学版, 2007, 24(3): 182-184.
- [2] 兰海燕, 王长波, 宋未. 棉花内生细菌及其研究进展[J]. 棉花学报, 2000, 12(2): 105-108.
- [3] 袁平, 孙福右, 田宏先, 等. 防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选[J]. 微生物学报, 2002, 42(3): 270-274.
- [4] 何红, 蔡学清, 洪永聪, 等. 辣椒内生细菌的分离及拮抗菌的筛选[J]. 中国生物防治, 2002, 18(4): 171-175.
- [5] 杨海莲, 孙晓璐, 宋未, 等. 植物内生细菌的研究[J]. 微生物学通报, 1998, 25(4): 224-227.
- [6] Fisher PJ, Pertin O, Scott HML. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.)[J]. New Phytologist, 1992, 12(2): 299-305.
- [7] Bell CR, Dickie GA, Harvey WLG, et al. Endophytic bacteria in grapevine[J]. Can J Microbiol, 1995, 41(1): 46-53.
- [8] 路国兵, 冀宪领, 张瑶, 等. 桑树内生细菌的分离及生防益菌的筛选[J]. 蚕业科学, 2007, 33(3): 350-354.
- [9] 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: 353-385.
- [10] Uetanabaro AP, Wahrenburg C, Hunger W, et al. *Paenibacillus agarexedens* sp. nov., nom. rev., and *Paenibacillus agaridevorans* sp. nov.[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53(4): 1051-1057.
- [11] Yoon JH, Kang SJ, Yeo SH, et al. *Paenibacillus alkaliterrae* sp. nov., isolated from an alkaline soil in Korea[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55(6): 2339-2344.
- [12] Takeda M, Suzuki I, Koizumi JI. *Paenibacillus hodogayensis* sp. nov., capable of degrading the polysaccharide produced by *Sphaerotilus natans*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55(2): 737-741.
- [13] Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, et al. *Paenibacillus phyllosphaerae* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the phyllosphere of *Phoenix dactylifera*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55(2): 743-746.
- [14] Qiu FB, Huang Y, Sun L, et al. *Leifsonia ginsengi* sp. nov., isolated from ginseng root[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(2): 405-408.
- [15] 邱服斌, 李雁津, 张晓霞, 等. 人参内生细菌 ge21 菌株的鉴定及抑菌活性测定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(1): 43-47.
- [16] 魏天军, 魏象廷. 中国枣果实病害研究进展[J]. 西北农业学报, 2006, 15(1): 88-94.
- [17] 洪鹏翔, 邱思鑫, 陈航, 等. 4种茄科作物内生细菌的分离及拮抗菌的筛选[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2007, 36(4): 347-351.