



研究报告

温郁金内生拮抗细菌 B-11 的分离及其抑菌活性

曾欣^{1,2} 张亚惠^{1,2} 迟惠荣^{1,2} 孙钟毓^{1,2} 陈卫良^{*1,2} 毛碧增^{*1,2}

1 浙江大学农业与生物技术学院 浙江 杭州 310058

2 农业部作物病虫分子生物学重点实验室 浙江 杭州 310058

摘要:【背景】植物内生菌广泛分布在自然界中,具有巨大的潜在开发与应用价值。【目的】对温郁金内生细菌进行分离鉴定,并从中筛选出具有生防潜能的菌株。【方法】采用常规组织分离法对温郁金根茎内生细菌进行分离并利用 16S rRNA 基因序列分析进行初步鉴定;采用平板对峙法以铁皮石斛炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)为供试菌株对温郁金内生细菌进行拮抗菌的筛选;通过形态学鉴定、生理生化鉴定以及 16S rRNA 基因序列分析,确定拮抗菌株 B-11 的分类地位;以 6 个不同属的植物病原真菌为供试菌株对拮抗菌株 B-11 的抑菌谱进行测定,并研究其对病原菌菌丝的影响;利用特异性平板和 MALDI-TOF-MS 检测技术对拮抗菌株 B-11 产生的抑菌物质进行检测;采用离体叶片接种法研究拮抗菌株 B-11 对铁皮石斛炭疽病菌的防治效果。【结果】从温郁金根茎中分离得到 25 株内生细菌菌株,这些细菌菌株分属于 12 个属,其中芽孢杆菌属为优势菌属,占分离菌株的 28%;通过初筛获得 8 株对 *C. gloeosporioides* 有抑菌活性的菌株,其中菌株 B-11 的抑菌活性最强,经鉴定该菌为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*);抑菌谱测定发现菌株 B-11 能够对供试的属于不同属的 6 种植物病原真菌的菌丝生长具有抑制作用,显微观察发现经对峙培养 6 d 后这 6 种病原菌的菌丝体出现畸形膨大、分枝增多等现象;特异性平板检测结果表明拮抗菌株 B-11 能够产生蛋白酶、 β -葡聚糖酶和嗜铁素,但不产生几丁质酶;MALDI-TOF-MS 检测结果表明拮抗菌株 B-11 能够产生伊枯草素、丰源素和表面活性素 3 种脂肽类抗生素,其中伊枯草素的产量最高;离体叶片接种实验表明,拮抗菌 B-11 的离心去菌发酵液对铁皮石斛炭疽病的防治效率可达 64%。【结论】温郁金根茎含有丰富的内生细菌资源,其内生细菌菌株 B-11 有潜力作为开发抗真菌代谢物和新药物的重要微生物资源。

关键词: 温郁金, 内生细菌, 分离鉴定, 抑菌活性, 贝莱斯芽孢杆菌

Antimicrobial activity of endophytic bacterium strain B-11 isolated from *Curcuma wenyujin*

ZENG Xin^{1,2} ZHANG Ya-Hui^{1,2} CHI Hui-Rong^{1,2} SUN Zhong-Yu^{1,2}
CHEN Wei-Liang^{*1,2} MAO Bi-Zeng^{*1,2}

1 College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China

2 Ministry of Agriculture Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insects, Hangzhou, Zhejiang 310058, China

Abstract: [Background] Endophytes are widely distributed in nature, and have great potential for further

Foundation item: “San Nong Liu Fang” of Zhejiang Province (CTZB-F160728AWZ-SNY1-37)

***Corresponding authors:** Chen Wei-Liang: E-mail: chenwl@zju.edu.cn

Mao Bi-Zeng: Tel: 86-571-88982678; E-mail: maobz@zju.edu.cn

Received: 17-07-2018; **Accepted:** 23-10-2018; **Published online:** 13-11-2018

基金项目: 浙江省“三农六方”科技协作项目(CTZB-F160728AWZ-SNY1-37)

***通信作者:** 陈卫良: E-mail: chenwl@zju.edu.cn

毛碧增: Tel: 0571-88982678; E-mail: maobz@zju.edu.cn

收稿日期: 2018-07-17; **接受日期:** 2018-10-23; **网络首发日期:** 2018-11-13

exploration and application. **[Objective]** To isolate and identify endophytic bacteria of *Curcuma wenyujin* and evaluate their antimicrobial activity. **[Methods]** Endophytic bacteria from rhizome of *C. wenyujin* were separated using routine tissue-separation method and identified by 16S rRNA gene sequences analysis. Their antimicrobial activity against *Colletotrichum gloeosporioides* was tested by confront-culture method. Strain B-11. *C. gloeosporioides* was identified through morphological, physiological, biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequences analysis. Its influence on the hyphae of 6 pathogenic fungi, belonging to different families, was detected. Its antimicrobial components were determined by 4 specific culture mediums and MALDI-TOF-MS. The control efficacy against *C. gloeosporioides* on *Dendrobium officinale* was analyzed by inoculation of leaves *in vitro*. **[Results]** Twenty-five strains of endophytic bacteria, belonging to 12 families, were isolated and *Bacillus* spp. were the dominant species account for 28%. Eight strains showed antagonistic effect against *C. gloeosporioides*. *Bacillus velezensis* strain B-11 inhibited the growth of 6 different pathogenic fungi, with the hyphae inflated, deformed and branches increased. It can produce diverse antifungal substances including protease, β -glucanase and siderophore and lipopeptide. Inoculation experiment *in vitro* found that the cell-free culture of it had a control efficacy of 64% against *C. gloeosporioides* on *D. officinale*. **[Conclusion]** Endophytic bacterium strain B-11 in the rhizome of *Curcuma wenyujin* is an efficient biocontrol agent with potential for antibiotics development.

Keywords: *Curcuma wenyujin*, Endophytic bacterium, Screen and identification, Antimicrobial activity, *Bacillus velezensis*

植物内生菌(Endophyte)是指全生活史或生活史中的某一阶段寄生于植物组织中,并对植物本身不造成明显可见病害及功能改变的微生物,主要包括内生真菌、内生细菌和内生放线菌三类^[1]。对内生菌的研究开始于 19 世纪中期,至今已有一百多年的历史,研究者从高等植物的茎叶化石中发现了与植物相关的微生物,这一研究证明早在地球出现高等植物时,微生物与植物的相互作用就开始演变^[2]。到 20 世纪 90 年代,Stierle 等^[3]从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)韧皮部分离到产紫杉醇的内生真菌安德氏紫杉霉(*Taxomyces andreanae*),掀起了植物内生菌的研究热潮。现代研究发现,植物内生菌除了能够产生与宿主次生代谢产物相似的物质外,还能够产生其他的活性物质,这些活性物质具有促进宿主生长,提高宿主对病虫害、环境胁迫抗性等方面的作用^[4-5]。当前,植物内生菌的研究已经成为植物学、植物保护学、农药学、生药学和中药资源学等多个学科领域的研究热点,其在农业、林业及医药领域具有重要的研究和开发价值。

对我国传统药用植物内生菌的研究是获取具有重要研究价值菌株的新途径。张维瑞等^[6]从杜仲(*Eucommia ulmoides*)中分离得到 2 株能够产生绿原

酸的真菌菌株和 11 株具有抑菌活性的真菌菌株。刘雷等^[7]从川麦冬中分离获得了 27 株内生真菌,其中 15 株对白色念珠菌具有抑菌活性。张正杰等^[8]从人参根部分离获得一株甲基营养型芽孢杆菌 B16,该菌对人参锈腐病的保护和治疗效果分别为 64.8%和 58.6%。游景茂等^[9]从白术的根部分离获得一株枯草芽孢杆菌 BZJN1,该菌对白术根腐病具有良好的防治效果,对白术的生长还具有一定的促进作用。温郁金(*Curcuma wenyujin* Y. H. chert et C. Ling)为姜科姜黄属多年生草本植物,始载于《新修本草》,主要分布于浙江温州瑞安,为著名的“浙八味”之一。温郁金是一种“一株三用”的药用植物,其主根茎、侧根茎和块根可分别制成温莪术、片姜黄和郁金 3 种中药材,这 3 种中药材均被收录于《中华人民共和国药典》中^[10]。目前已从温郁金中鉴定出上百种化学成分,现代药理研究结果表明,这些化学成分多具有抗炎镇痛、抗肿瘤等药理活性^[11-13]。目前关于温郁金内生菌的报道多集中在其内生真菌的分离和内生真菌次生代谢产物研究上,现已经分离鉴定出 7 个科共 30 个属的内生真菌,这些内生真菌多具有抑菌活性^[14-15],而关于温郁金内生细菌及其抑菌作用的研究鲜有报道。植物内生菌能够

产生和宿主成分相同或相似的代谢产物^[16],根茎是温郁金的主要药用部位之一,已有研究表明温郁金的根茎具有较强的抑菌活性^[17],为此本实验以温郁金根茎为实验材料对其内生细菌进行了分离鉴定和拮抗细菌的筛选,并对其中抑菌活性最强的一株内生细菌进行了进一步研究,以期温郁金内生拮抗细菌的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

健康温郁金根茎由浙江省丽水市云和县农业局提供。

铁皮石斛炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、藏红花球茎腐烂病菌(*Fusarium oxysporum*)由本实验室分离并保存;油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、棉花立枯丝核病菌(*Rhizoctonia solani*)为浙江大学农学院生物技术研究 所蔡新忠老师馈赠;核桃枝枯病菌(*Botryosphaeria dothidea*)、西瓜蔓枯病菌(*Mycosphaerella melonis*)由浙江省农科院植物保护与微生物研究所方丽老师馈赠。

1.2 培养基

铬奥醇培养基(CAS):取 60.5 mg 铬奥醇溶于 50 mL Fe^{3+} (1 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mmol/L HCl)溶液混合均匀,在搅拌的同时,慢慢地加入十六烷基基溴化铵(HDTMA)溶液(72.9 mg 溶于 40 mL 水)后,调 pH 至 7.0,然后定容至 100 mL,最后将上述溶液灭菌后与 900 mL 培养基(琼脂 20.0 g,蛋白胨 4.5 g,葡萄糖 9.0 g,牛肉浸膏 2.7 g, NaCl 4.5 g, pH 7.0)混合。几丁质酶测定培养基(g/L): $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1.0, KCl 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, 胶体状几丁质 10.0, 琼脂 20.0, pH 7.0。蛋白酶测定培养基(g/L): 脱脂奶粉 15.0, 琼脂 20.0。葡聚糖酶测定培养基(g/L): β -葡聚糖 2.0, NaNO_3 2.0, KH_2PO_4 1.0, KCl 0.5, MgSO_4 0.5, 刚果红 0.05, FeSO_4 0.01, 琼脂 20.0, pH 7.2。Landy-1 培养基: L-谷氨酸钠 14.0 g, 葡萄糖 42.0 g, MgSO_4 0.5 g,

KCl 0.5 g, KH_2PO_4 1.0 g, FeSO_4 0.15 mg, MnSO_4 5.0 mg, CuSO_4 0.16 mg, ddH_2O 1 L, pH 7.0–7.2。

1.3 主要试剂和仪器

实验所用试剂,生工生物工程(上海)股份有限公司和 Sigma-Aldrich 公司。16S rRNA 基因扩增引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,16S rRNA 基因测序由杭州擎科梓熙生物技术有限公司完成。透射电镜, HITACHI 公司; MALDI-TOF-MS, Bruker 公司。

1.4 内生细菌的分离与纯化

将健康的温郁金根茎切成小块,在流水下冲洗 1 h,放入无菌三角瓶中,加入 75%酒精浸泡灭菌 30 s,倒掉酒精,加入 0.1%升汞溶液消毒 15 min (期间晃动 2–3 次),弃升汞溶液,用无菌水冲洗样品 4–5 次去除表面残留的升汞溶液。取最后一次洗涤液作对照,即取 20 μL 的洗涤液涂抹于 LB 平板上,然后将培养皿放在 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 3–5 d,若发现培养皿中无菌落出现,证明该组织表面消毒彻底。取彻底灭菌的组织块放入无菌研钵中,加入 1 mL 无菌水研磨直至浆糊状,静置 10 min,将上清液稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 5 个梯度,各取 20 μL 涂布于 LB 平板,3 次重复,置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 3–5 d,根据菌落形态、颜色挑取分离纯化的单菌落于 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养过夜,用 20% 甘油和菌液按 1:1 比例混合均匀,–40 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 内生细菌的鉴定

取培养过夜的菌液 1.5 mL, 8 000 r/min 离心 1 min,弃上清,用无菌水悬浮沉淀获得菌悬液;用铜网蘸取悬浮液,晾干 2 min,再用 2%磷钨酸(pH 6.7)负染色 2 min,滤纸吸干;在透射电镜下对菌体进行形态特征的观察,加速电压 80 kV, Gatan830 型图像传感器记录细菌形态。参照《常见细菌系统鉴定手册》进行接触酶、氧化酶、卵磷脂酶、甲基红、吲哚、抗生素抗性等生理生化特征的测定^[18]。采用生工生物工程(上海)股份有限公司的 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒进行细菌基因组的提取,然后利用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTG

ATCCTGGCTCAG-3')/1522R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μ L: 2 \times PCR Mix 25 μ L, ddH₂O 19 μ L, DNA 模板 2 μ L, 10 μ mol/L 上游引物 27F 2 μ L, 10 μ mol/L 下游引物 1522R 2 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物纯化后送杭州擎科梓熙生物技术有限公司测序, 测序结果登陆 NCBI 网站进行 BLAST 比对。

1.6 拮抗细菌的初筛

将筛选到的内生细菌在 LB 固体平板上活化, 选取单菌落接种到 LB 液体培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养箱中振荡培养 24 h 作为菌种, 以 1% 接种量接种内生细菌到新的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 24 h, 获得内生细菌发酵液备用。以 *C. gloeosporioides* 为供试菌株, 采用平板对峙法进行温郁金内生拮抗菌的筛选。

1.7 拮抗菌抑菌谱及其对病原菌菌丝影响的测定

以 *B. dothidea*、*S. sclerotiorum*、*R. solani*、*M. melonis*、*C. gloeosporioides*、*F. oxysporum* 6 个分属于不同属的植物病原菌为供试菌, 采用平板对峙法^[19]测定内生拮抗菌对这 6 种病原菌的抑菌活性。处理组接种 5 μ L 拮抗菌菌液, 以接种 5 μ L 无菌 LB 液体培养基为对照, 重复 3 次, 置于 28 $^{\circ}$ C 恒温光暗交替培养, 每天测量病原菌靠近内生菌一侧的菌丝生长量 (Ra) (图 1), 处理组 Ra 连续测量 3 d 无变化后停止测量, 并用直尺测量生防菌与病原菌间的抑菌带宽度。

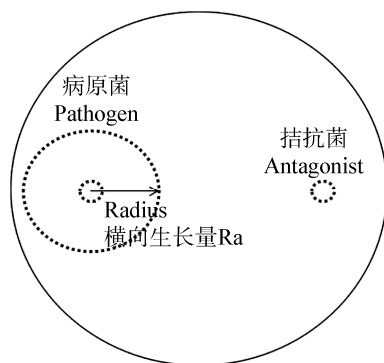


图 1 离体拮抗试验示意图

Figure 1 The diagram of antagonistic test *in vitro*

病原菌与拮抗菌对峙培养 6 d 后, 在显微镜下观察病原菌靠近内生菌一侧菌丝形态的变化, 以不接种拮抗菌的菌丝为对照。在靠近内生菌一侧获得生长受到抑制的菌丝, 转接到新的 PDA 培养基上, 观察被拮抗菌抑制的菌丝是否有再生长能力, 以未经对峙处理的病原菌菌丝为对照。

1.8 拮抗菌抗菌物质检测

拮抗菌产蛋白酶、几丁质酶、 β -葡聚糖酶和嗜铁素的检测参考赵文娟等^[20]的方法。拮抗菌产脂肽类抗生素的检测参照李兴玉等^[21]的方法。

1.9 拮抗菌去菌发酵液对铁皮石斛炭疽病防治效果的测定

为测定筛选的拮抗菌 B-11 对铁皮石斛炭疽病的生防效果, 实验共设计 4 个处理组和 1 个对照组, 具体方法如下: 按 1.5 的方法获得发酵液, 10 000 r/min 高速离心 2 min 获得上清液原液, 即为去菌发酵液, 用无菌 LB 液体培养基梯度稀释获得 1/2 浓度和 1/4 浓度去菌发酵液。选生长健壮 6–8 叶期的铁皮石斛苗, 剪取 3、4 叶位大小一致的叶子, 对照组 A 叶片涂抹无菌 LB 液体培养基; 处理组 B 叶片涂抹德国巴斯夫生产的“健达”(一种用于防治炭疽病的药剂), 使用时按 8 mL 药剂兑 15 L 的水进行稀释; 处理组 C–E 在叶片表面用毛笔分别涂抹 1/4 浓度、1/2 浓度和未经稀释的去菌发酵液。待涂抹液基本晾干后, 用脱脂棉包住叶柄基部进行保湿培养。用无菌刀片在叶片上轻轻的划出 5 mm 左右的口子, 仅划破叶表面, 然后用直径为 5 mm 的打孔器取铁皮石斛炭疽病菌菌落边缘的菌丝, 将有菌丝的一面朝下接种到铁皮石斛叶片伤口上, 每个处理接种 45 个叶片, 以接种无菌 PDA 琼脂块为对照, 20 d 后统计病斑直径和发病率, 并分别计算病斑扩展抑制率和防治效率。采用 Microsoft ExcelTM 进行数据处理, 用 SPSS 进行方差分析, 显著性水平设为 $P < 0.05$ 。

抑制率(%)=(对照病斑直径-处理病斑直径)/对照病斑直径 $\times 100$;

防治效率(%)=(对照发病率-处理发病率)/对照发病率 $\times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 温郁金内生细菌的分离与鉴定

从温郁金的健康根茎中共分离到 25 株内生细菌, 16S rRNA 基因片段扩增和测序表明 25 株内生细菌分别归属于短杆菌属(*Brevibacterium* sp.)、克雷白氏杆菌属(*Klebsiella* sp.)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)和芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)等 12 个属, 其中芽孢杆菌属(7 株)为温郁金内生细菌的优势菌属, 占总分离菌株的 28% (表 1)。

2.2 温郁金内生拮抗细菌的初筛

以 *C. gloeosporioides* 为供试菌对温郁金内生细菌进行抗菌活性测定, 筛选获得 8 株具有不同抗菌效果的菌株, 其中 B-11、B-16、B-17 对 *C. gloeosporioides* 的抑菌效果明显高于其他菌株。抑

菌带宽测量结果见表 2, 统计结果发现温郁金中分离得到的芽孢杆菌属内生细菌普遍具有抗菌活性, 其中内生细菌 B-11、B-16、B-17 对 *C. gloeosporioides* 抑菌带宽依次为 8、8 和 7 mm, 选取菌株 B-11 进行进一步的深入研究。

2.3 内生拮抗菌 B-11 的鉴定

用通用引物 27F 和 1522R 对菌株 B-11 的 16S rRNA 基因序列进行扩增测序, 得到大小为 1 487 bp 的序列, 将序列上传到 GenBank 中获得登录号为 KY078349.1。将该序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对分析, 结果显示其与贝莱斯芽孢杆菌 (CP023414.1)、解淀粉芽孢杆菌(KT961125.1)和枯草芽孢杆菌(HQ711983.1)的相似度均为 99%。为了明确菌株 B-11 的分类地位, 对菌株进行了形态学

表 1 与 NCBI 数据库中匹配度高的菌株

Table 1 Bacteria closely matching to GenBank sequences

菌株编号 Number of strain	NCBI 上匹配度最高的菌株 Maximum similar strain on NCBI	相似菌株序列号 Accession number of the similar strain	相似度 Similarity (%)
B-1	<i>Brevibacterium epidermidis</i> strain NIOT-Cu-18	KJ575060.1	99
B-2	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain N7	KM349412.1	99
B-3	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain LF-1	EF127829.1	99
B-4	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain KONIH2	CP026285.1	99
B-5	<i>Chryseobacterium</i> sp. CZBRN1	KJ184914.1	100
B-6	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain ISMMS2	CP011305.1	99
B-7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain W8-12	MG905299.1	99
B-8	<i>Kosakonia radicincitans</i> DSM 16656	CP018016.1	98
B-9	<i>Kosakonia oryzae</i> strain RW070	MH010121.1	99
B-10	<i>Kosakonia oryzae</i> strain D4	LT799040.1	99
B-11	<i>Bacillus velezensis</i> strain AS43.3	CP023414.1	99
B-12	<i>Bacillus pumilus</i> strain AB12	JX188071.1	99
B-13	<i>Bacillus pumilus</i> strain BPR1	MF000303.1	100
B-14	<i>Bacillus pumilus</i> strain T246	KC764989.1	99
B-15	<i>Bacillus pumilus</i> strain 3L-6A	EU379276.1	99
B-16	<i>Bacillus</i> sp. strain JHAR2_1	MG757948.1	99
B-17	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain TEB-31	KU143924.1	99
B-18	<i>Leucobacter</i> sp. CSB21	KX289462.1	99
B-19	<i>Leucobacter</i> sp. CSB21	KX289462.1	99
B-20	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain 1D1609	CP026925.1	99
B-21	<i>Alcaligenes</i> sp. AHJ6	KC492705.1	97
B-22	<i>Alcaligenes</i> sp. DN25	KF432837.1	99
B-23	<i>Labrys</i> sp. NR 4-02	KM253115.1	99
B-24	<i>Staphylococcus sciuri</i> strain FDAARGOS_285	CP022046.2	99
B-25	<i>Paenochrobactrum</i> sp. strain JSB23	MG596953.1	99

表 2 温郁金内生细菌对 *C. gloeosporioides* 的抑制作用
Table 2 Inhibitory activity of endophytes isolated from *Curcuma wenyujin* against *C. gloeosporioides*

菌株编号 Number of strain	抑菌带宽 Width of inhibition zone (mm)	菌株编号 Number of strain	抑菌带宽度 Width of inhibition zone (mm)
B-1	5.0	B-14	2.0
B-2	—	B-15	2.0
B-3	—	B-16	8.0
B-4	—	B-17	7.0
B-5	—	B-18	—
B-6	—	B-19	—
B-7	—	B-20	—
B-8	—	B-21	—
B-9	—	B-22	—
B-10	—	B-23	—
B-11	8.0	B-24	—
B-12	3.0	B-25	—
B-13	2.5		

注：—：没有抑制作用。
Note: —: No inhibitory activity.

观察和生理生化测定。透射电镜观察结果发现菌株 B-11 为杆状，周生多鞭毛，大小为(0.94–1.18) μm×(2.93–3.94) μm (图 2)，其形态特征与芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)相符合。菌株 B-11 的生理生化鉴定结果见表 3，其氧化酶、接触酶、V-P 测定、淀粉水解、卵磷脂酶、吡啶实验均为阳性，甲基红为阴性，参照《常见细菌系统鉴定手册》^[18]，根据枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌不能产生卵磷脂酶，确定菌株 B-11 为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。

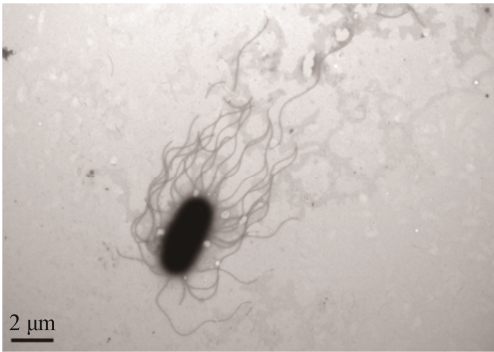


图 2 菌株 B-11 形态特征
Figure 2 Morphological characteristics of strain B-11

表 3 菌株 B-11 的生理生化特性
Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain B-11

生化指标 Physiological and biochemical index	B-11
卵磷脂酶 Lecithinase	+
氧化酶 Oxidase	+
甲基红 Methyl red	—
吡啶 Benzpyrole	+
淀粉水解 Amylolysis	+
接触酶 Catalase test	+
V-P 测定 V-P test	+
25 °C	+
45 °C	+
1% NaCl	+
3% NaCl	+
5% NaCl	+
7% NaCl	+
10% NaCl	+
氯霉素 Chloramphenicol	—
卡那霉素 Kanamycin	—
链霉素 Streptomycin	—
氨苄青霉素 Ampicillin	—

注：+：阳性；—：阴性。
Note: +: Positive; —: Negative.

2.4 拮抗菌 B-11 抑菌谱测定及其对病原菌菌丝的影响

两点对峙法测定菌株 B-11 抑菌谱发现, 菌株 B-11 对分属于不同属的 6 种植物病原真菌均有显著的抑菌效果(图 3 A1-A2), 其对 *B. dothidea*、*S. sclerotiorum*、*R. solani*、*M. melonis*、*C. gloeosporioides*、*F. oxysporum* 的抑菌带宽依次为 5.7 ± 1.2 mm、 17.0 ± 0.8 mm、 16.5 ± 0.7 mm、 13.8 ± 1.4 mm、 19.5 ± 0.1 mm、 11.2 ± 0.5 mm。对峙培养 6 d 后, 在显微镜下观察发现, *B. dothidea*、*S. sclerotiorum*、*R. solani*、*C. gloeosporioides* 4 种病原菌菌丝出现了不同程度的畸形膨大, 而 *M. melonis* 和 *F. oxysporum* 的菌丝分枝较对照明显增

多(图 3 B1-B2)。取对峙培养 6 d 后接近菌株 B-11 一侧的病原菌菌丝块接种到新的 PDA 培养基上培养 3 d, 以未经过对峙培养的菌丝块为对照, 结果发现 *B. dothidea*、*S. sclerotiorum*、*R. solani* 和 *C. gloeosporioides* 的菌丝块均不能正常生长(图 3 C1-C2), 这表明菌株 B-11 对病原菌菌丝具有杀死作用。

2.5 菌株 B-11 抗菌物质检测

利用特异性平板, 通过观察菌落周围是否产生透明圈对菌株 B-11 的蛋白酶、几丁质酶、 β -葡聚糖酶和嗜铁素进行检测。实验结果表明菌株 B-11 能够产生蛋白酶、 β -葡聚糖酶和嗜铁素, 但未检测到几丁质酶(图 4)。

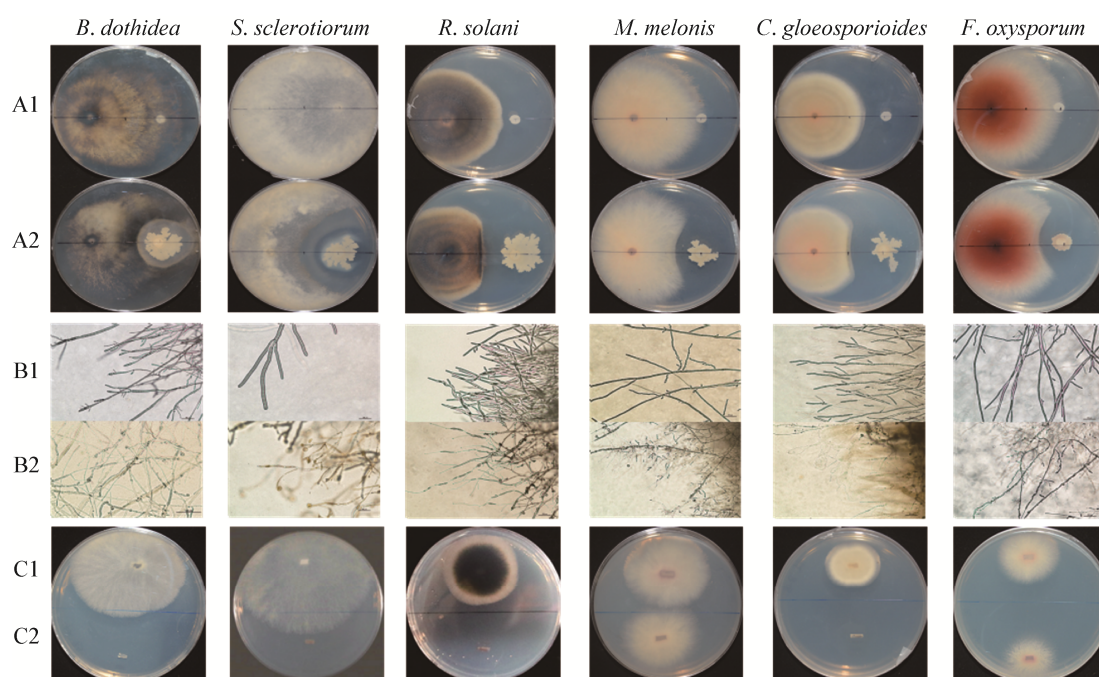


图 3 菌株 B-11 对 6 种植物病原菌的影响

Figure 3 Effect of strain B-11 on colony growth of 6 pathogenic fungus for plant

注: A1、B1、C1 为对照组, A2、B2、C2 为处理组。A1-A2: 与拮抗菌 B-11 对峙培养的 6 种病原菌菌丝生长受到抑制; B1-B2: 与拮抗菌 B-11 对峙培养 6 d 后, *B. dothidea*、*S. sclerotiorum*、*R. solani*、*C. gloeosporioides* 4 种病原菌菌丝畸形膨大, *M. melonis* 和 *F. oxysporum* 菌丝分枝增多; C1-C2: 与拮抗菌 B-11 对峙培养 6 d 后, *B. dothidea*、*S. sclerotiorum*、*R. solani* 和 *C. gloeosporioides* 4 种病原菌的菌丝失去再生能力。

Note: A1, B1 and C1 were the control group, A2, B2 and C2 were the treatment group. A1-A2: Strain B-11 significantly inhibited the colony growth of the 6 pathogenic fungi; B1-B2: The hyphae of *B. dothidea*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* and *C. gloeosporioides* were deformed and the branches of the hyphae of *M. melonis* and *F. oxysporum* increased after confront cultured with strain B-11 for 6 d; C1-C2: The hyphae of *B. dothidea*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* and *C. gloeosporioides* lost their regeneration capacity after confront cultured with strain B-11 for 6 d.

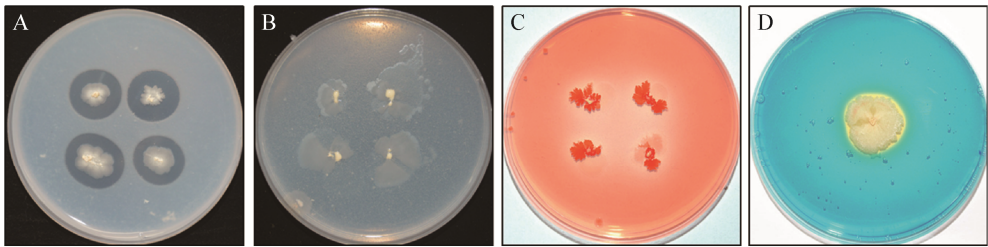


图 4 菌株 B-11 抑菌活性物质检测

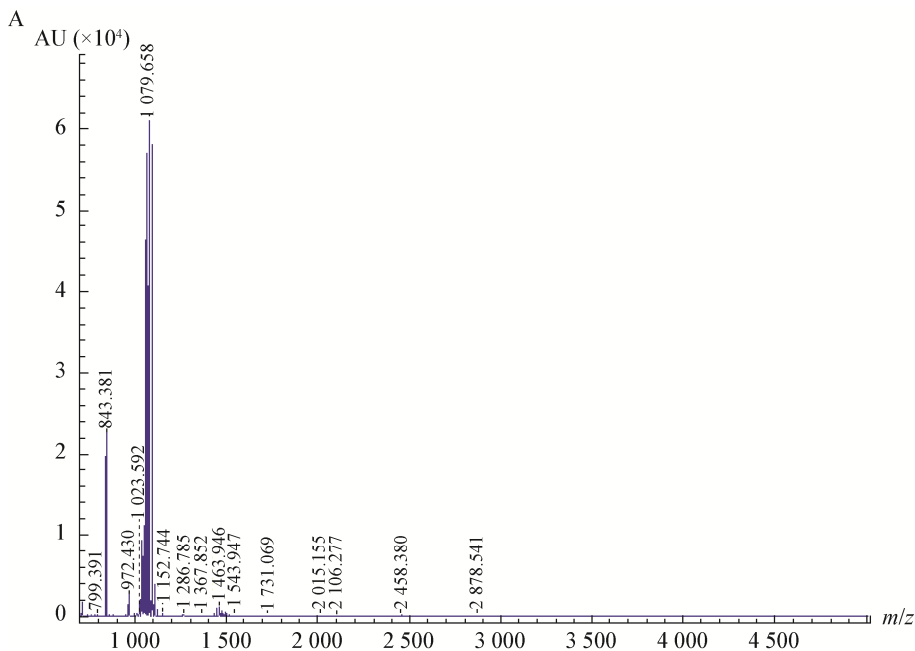
Figure 4 Detection of antifungal components produced by *B. velezensis* B-11

注: A: 产蛋白酶活性; B: 产几丁质酶活性; C: 产 β -葡聚糖酶活性; D: 产嗜铁素活性.
Note: A: Protease; B: Chitinase; C: β -Glucanase; D: Siderophores.

为了确定菌株 B-11 是否产生脂肽类抗生素, 利用 MALDI-TOF-MS 技术进行了检测, 检测结果见图 5A。由于表面活性素和伊枯草菌素的分子离子峰集中于 m/z 1 000–1 100, 而丰源素化合物信号集中于 m/z 1 400–1 500, 因此对图 5A 中这两个部分分别放大得到图 5B 和图 5C。参照李兴玉等^[21]的鉴定方法对菌株 B-11 产脂肽类化合物进行鉴定, 鉴定结果见表 4, 检测结果表明拮抗菌 B-11 能够产生丰富的脂肽类抗生素, 包括伊枯草素、丰源素和表面活性素三类, 其中伊枯草素的出峰值最高, 产量明显高于其他两种脂肽类。

2.6 拮抗菌株 B-11 对铁皮石斛炭疽病的防病效果测定

通过离体叶片接种实验测定拮抗菌株 B-11 去菌发酵液对铁皮石斛炭疽病的防治效果发现, 经拮抗菌株 B-11 去菌发酵液处理的叶片其病斑直径和发病率均显著低于对照组和农药“健达”处理组, 其病斑扩展抑制率和防治效率可达 73%和 64%。1/2 浓度去菌发酵液的防效与去菌发酵液处理基本相当, 1/4 浓度去菌发酵液的防效则明显下降。上述结果表明, 拮抗菌 B-11 去菌发酵液对铁皮石斛炭疽病具有良好的防治效果(表 5)。



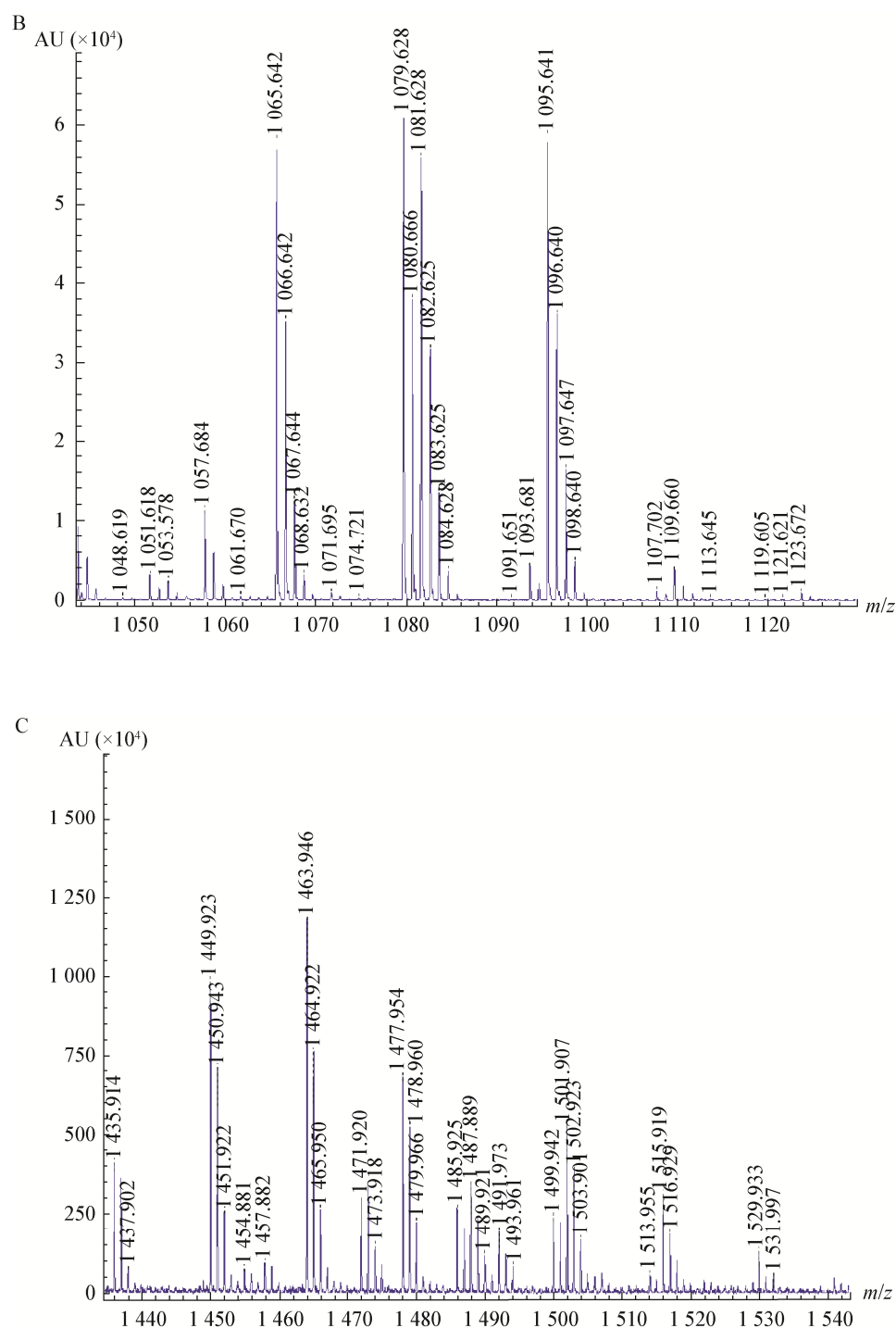


图 5 菌株 B-11 MALDI-TOF-MS 检测脂肽类化合物的质谱图

Figure 5 MS chromatograms of lipopeptides from strain B-11 by whole cell *in situ* MALDI-TOF-MS

注：A：菌株 B-11 m/z 800–3 000 质谱图；B：质谱图 A 中 m/z 1 000–1 100 局部放大；C：质谱图 A 中 m/z 1 400–1 500 局部放大。

Note: A: MS chromatograms of lipopeptides for strain B-11 of m/z 800–3 000; B: Enlargement for A of m/z 1 000–1 100; C: Enlargement for A of m/z 1 400–1 500.

表 4 菌株 B-11 伊枯草素、丰源素、表面活性素检测结果分析
Table 4 Analysis of iturins, fengycins and surfactins from strain B-11

质核比 <i>m/z</i>	离子型 Ionic type	化合物 Compound
Iturins		
1 053.5	[M+Na] ⁺	Bacillomycin D (C ₁₁)
1 067.5, 1 083.5	[M+Na] ⁺ , [M+K] ⁺	Bacillomycin D (C ₁₂)
1 081.5, 1 097.5	[M+Na] ⁺ , [M+K] ⁺	Bacillomycin D (C ₁₃)
1 095.5, 1 111.6	[M+Na] ⁺ , [M+K] ⁺	Bacillomycin D (C ₁₄)
1 109.5	[M+Na] ⁺	Bacillomycin D (C ₁₅)
1 066.7, 1 082.6	[M+Na] ⁺ , [M+K] ⁺	ItutinC (C ₁₁)
1 080.7, 1 096.6	[M+Na] ⁺ , [M+K] ⁺	ItutinC (C ₁₂)
1 098.6	[M+H] ⁺	ItutinC (C ₁₅ with a double bond)
Fengycins		
1 435.8, 1 457.8	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺	FengycinA (C ₁₄)
1 449.8, 1 487.7, 1 471.7	[M+H] ⁺ , [M+K] ⁺ , [M+K] ⁺	FengycinA (C ₁₅)
1 463.8, 1 485.8, 1 501.7	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ , [M+K] ⁺	FengycinA (C ₁₆)
1 477.8, 1 499.8, 1 515.6	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ , [M+K] ⁺	FengycinA (C ₁₇)
1 491.9, 1 513.8, 1 529.8	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ , [M+K] ⁺	FengycinA (C ₁₈)
Surfactins		
1 044.6, 1 060.6	[M+Na] ⁺ , [M+K] ⁺	Surfactin (C ₁₂)
1 058.7, 1 074.6	[M+Na] ⁺ , [M+K] ⁺	Surfactin (C ₁₃)

表 5 菌株 B-11 去菌发酵液对铁皮石斛炭疽病的防治效果
Table 5 The protection of strain B-11 cell-free culture on *Dendrobium officinale* against *C. gloeosporioides*

处理 Treatment	病斑直径 Diameter of speckle (mm)	抑制率 Inhibition rate (%)	发病率 Disease incidence (%)	防治效率 Control efficacy (%)
对照 Control	4.58±1.34a	—	100	—
健达 Jianda	2.93±1.99b	36	76	24
1/4 浓度去菌发酵液 1/4 Concentration of cell-free culture	1.73±1.78c	62	51	49
1/2 浓度去菌发酵液 1/2 Concentration of cell-free culture	1.20±1.69c	74	36	64
去菌发酵液 Cell-free culture	1.24±1.72c	73	36	64

注：不同字母表示差异显著 $P<0.05$ 。—：此项无。
Note: Different small letters are significantly different at 0.05 level $P<0.05$. —: No this index.

3 讨论与结论

本研究从温郁金根茎中共分离获得了 25 株内生细菌，这些内生细菌属于短杆菌(*Brevibacterium* sp.)、克雷白氏杆菌属(*Klebsiella* sp.)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)和芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)等 12 个不同的属，该实验结果表明温郁金根茎中内生细菌资源丰富，且具有较大的开发价值。植物内生菌普遍存在于植物的根、茎、叶、花和果实等

器官中，在宿主不同器官的分布表现出明显差异^[22]。王艳红等^[23]以温郁金根、茎、叶为实验材料对温郁金内生真菌进行了分离和鉴定，发现一些内生真菌的分布表现出一定的组织专一性，例如顶毛单胞霉属和星刺壳孢属仅分布在温郁金的茎部，而在其根和叶部则没有分布。本研究以温郁金根茎部内生细菌为研究对象进行了初步研究，内生细菌在温郁金茎、叶中的分布差异值得进一步研究。

在分离获得温郁金内生细菌的基础上,本研究以铁皮石斛炭疽病菌为供试菌进行了拮抗菌的筛选,获得8株具有抑菌活性的细菌,其中菌株B-11抑菌效果最强,经鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)。*B. velezensis*属于芽孢杆菌属,该菌首次发现于西班牙马拉加的一种称为“Vélez”的河流生物中^[24],已有研究发现,*B. velezensis*是一种在植物中广泛存在的内生细菌,该菌对小麦白粉病菌、甘蓝黑斑病菌等多种植物病原菌具有生防效果^[25-26],在生物防治方面具有巨大的应用潜能。本研究分离到的*B. velezensis* B-11菌株与分属于6个属的代表性病原菌进行对峙培养,结果发现均能产生明显的抑菌带,在靠近抑菌带一侧的病原菌菌丝产生畸形、分枝增多等现象,其中4种病原菌菌丝失去再生能力。结果表明该内生菌株具有较广的抑菌谱和较强的抑菌活性,说明温郁金内生细菌可作为生防菌的新来源,为温郁金内生细菌资源的开发提供了依据。

拮抗菌抑菌作用与其能够产生丰富的代谢产物密切相关,芽孢杆菌属拮抗细菌可通过产生抗生素(脂肽抗生素、硫醚抗生素等)和各种酶(纤维素酶、几丁质酶、葡聚糖酶、溶菌酶等)来实现对病原菌的有效控制^[27-28]。通过实验发现,拮抗菌*B. velezensis* B-11能够产生蛋白酶、 β -葡聚糖酶和嗜铁素但不产生几丁质酶,同时菌株B-11还能够产生丰富的脂肽类抗生素,包括包括伊枯草素、丰源素和表面活性素三类,其中伊枯草素的出峰值最高,产量明显高于其他两种脂肽类。Xu等^[29]克隆了菌株*B. velezensis* ZJ20中 β -1,3-1,4-葡聚糖酶基因,并在大肠杆菌中成功表达,通过蛋白纯化发现由*B. velezensis* ZJ20产生的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶具有溶菌作用。表面活性素(Surfactin)是脂肽类抗生素的一种,从海洋细菌*B. velezensis* H3中分离得到的Surfactin能够抑制多种植物致病细菌的生长^[30]。

铁皮石斛炭疽病是危害铁皮石斛的主要病害之一,本研究以其病原菌*C. gloeosporioides*为接种体,以巴斯夫(中国)有限公司近年推出的炭疽病防

治药剂“健达”为对照^[31],利用离体叶片接种实验测试了菌株*B. velezensis* B-11对铁皮石斛炭疽病的防治效果,研究发现*B. velezensis* B-11去菌发酵液对铁皮石斛炭疽病的防治效率为64%,其防治效率高于农药健达。已有研究发现*B. velezensis*能够用于大叶黄杨炭疽病的防治^[32],而其用于铁皮石斛炭疽病的防治则未见报道,本研究为铁皮石斛炭疽病的生物防治提供了研究基础。当然,本研究采用离体叶片接种,所用的是去菌发酵液及1/2浓度和1/4浓度的去菌发酵液,这与实际生产应用还有距离。下一步将开展*B. velezensis* B-11菌株在植物体内的定殖情况、对植物生长的影响、制备工艺以及田间防病效果等工作,为温郁金生防内生菌资源的开发提供科学依据。

REFERENCES

- [1] Hallmann J, Quadtt-Hallmann A, Mahaffee WF, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(10): 895-914
- [2] Redecker D, Kodner R, Graham LE. Glomalean fungi from the Ordovician[J]. Science, 2000, 289(5486): 1920-1921
- [3] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Pacific yew*[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216
- [4] Gamboa MA, Laureano S, Bayman P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter?[J]. Mycopathologia, 2003, 156(1): 41-45
- [5] Wäli PR, Ahlholm JU, Helander M, et al. Occurrence and genetic structure of the systemic grass endophyte *Epichloë festucae* in fine Fescue populations[J]. Microbial Ecology, 2007, 53(1): 20-29
- [6] Zhang WR, Guo XC, Li Q, et al. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from leaf and fruit of *Eucommia ulmoides*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(16): 2921-2926 (in Chinese)
张维瑞, 郭秀春, 李钦, 等. 杜仲叶和果实中内生真菌的分离及抑菌活性[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2921-2926
- [7] Liu L, Pan F, Yang YB, et al. Isolation and identification of fungal endophytes from *Ophiopogon japonicus* and their antimicrobial activities[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(8): 1382-1391 (in Chinese)
刘雷, 潘峰, 杨远兵, 等. 川麦冬内生真菌分离和鉴定及抑菌活性初步研究[J]. 中草药, 2016, 47(8): 1382-1391
- [8] Zhang ZJ, Han JX, Liu XZ, et al. Optimization of B16 endophytic strain culture for its control of ginseng *Cylindrocarpon destructans*[J]. Microbiology China, 2017, 44(11): 2698-2707 (in Chinese)
张正杰, 韩金秀, 刘学周, 等. 内生菌株 B16 发酵条件优化

- 及其对人参锈腐病的防效[J]. 微生物学通报, 2017, 44(11): 2698-2707
- [9] You JM, Xiong K, Mu S, et al. Identification of endophytic bacteria BZJN1 and research on biological control of root rot of *Atractylodes macrocephala*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(3): 478-483 (in Chinese)
游景茂, 熊坤, 穆森, 等. 内生细菌 BZJN1 的鉴定及对白术根腐病的生物防治研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 478-483
- [10] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015 (in Chinese)
国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015
- [11] Lou Y, Zhao F, He H, et al. Guaiane-type sesquiterpenes from *Curcuma wenyujin* and their inhibitory effects on nitric oxide production[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2009, 11(8): 737-747
- [12] Yang L, Wei DD, Chen Z, et al. Reversal of multidrug resistance in human breast cancer cells by *Curcuma wenyujin* and *Chrysanthemum indicum*[J]. Phytomedicine, 2011, 18(8/9): 710-718
- [13] Zeng X, Lian ML, Mao BZ. The research progress in chemical components, pharmacological activity and main pathogenic diseases in *Curcuma wenyujin*[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2017, 24(6): 554-560 (in Chinese)
曾欣, 练美林, 毛碧增. 温郁金化学成分、药理作用及病害研究进展[J]. 药物生物技术, 2017, 24(6): 554-560
- [14] Yan J, Qi N, Wang S, et al. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi from traditional medicinal plant *Curcuma wenyujin*[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2014, 8(2): 1701-1705
- [15] Yan J, Qi NB, Wang SP, et al. Characterization of secondary metabolites of an endophytic fungus from *Curcuma wenyujin*[J]. Current Microbiology, 2014, 69(5): 740-744
- [16] Chen L, Liang ZN, Zhu H. Research advances in the studies of plant endophytic[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(8): 30-34 (in Chinese)
陈龙, 梁子宁, 朱华. 植物内生菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(8): 30-34
- [17] Huang HF, Zheng CJ, Mo ZR, et al. Antibacterial sesquiterpenoids from the petroleum ether extract of *Curcuma wenyujin* Dreg[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2016, 52(3): 527-530
- [18] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
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
- [19] Matarese F, Sarrocco S, Gruber S, et al. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*[J]. Microbiology, 2012, 158(1): 98-106
- [20] Zhao WJ, Fu B, Xu SY, et al. Antagonism of biocontrol bacteria SF1103 and SF1104 on wilt pathogen in *Cucumber*[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2017, 26(10): 1537-1543 (in Chinese)
赵文娟, 付博, 徐升运, 等. 生防菌 SF1103、SF1104 对黄瓜枯萎病菌的拮抗作用[J]. 西北农业学报, 2017, 26(10): 1537-1543
- [21] Li XY, Mao ZC, Wu YX, et al. Rapid detection of cyclic lipopeptide metabolites from *Bacillus*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2014, 44(6): 718-722 (in Chinese)
李兴玉, 毛自朝, 吴毅歆, 等. 芽孢杆菌环脂肽类次生代谢产物的快速检测[J]. 植物病理学报, 2014, 44(6): 718-722
- [22] Fang XM, Bai JL, You XF, et al. Endophytic bacteria diversity of *Aspidistra Ker-Gawl.* and their antimicrobial activities[J]. Microbiology China, 2018, 45(4): 836-847 (in Chinese)
方晓梅, 柏菁璘, 游雪甫, 等. 蜘蛛抱蛋属植物内生细菌的多样性及其抗菌活性筛选[J]. 微生物学通报, 2018, 45(4): 836-847
- [23] Wang YH, Wang H, Xu L, et al. Isolation and identification of endophytic fungi from *Curcuma aromatica Salisb*[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2009, 20(11): 2803-2806 (in Chinese)
王艳红, 汪洪, 徐磊, 等. 温莪术内生真菌的分离及其分类鉴定[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(11): 2803-2806
- [24] Ruíz-García C, Béjar V, Martínez-Checa FI, et al. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(1): 191-195
- [25] Cai XC, Liu CH, Wang BT, et al. Genomic and metabolic traits endow *Bacillus velezensis* CC09 with a potential biocontrol agent in control of wheat powdery mildew disease[J]. Microbiological Research, 2017, 196: 89-94
- [26] Li S, Du ST, Li CY. Screening and Identification of the antagonistic strain DL-59 of *B. velezensis* against *A. brassicae* and biocontrol efficiency[J]. Frontiers of Agriculture in China, 2011, 5(4): 581-587
- [27] Nakamura N, Nakano K, Sugiura N, et al. A novel cyanobacteriolytic bacterium, *Bacillus cereus*, isolated from a Eutrophic Lake[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003, 95(2): 179-184
- [28] Wang J, Zhang L, Teng KL, et al. Cerecidins, novel lantibiotics from *Bacillus cereus* with potent antimicrobial activity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(8): 2633-2643
- [29] Xu T, Zhu TH, Li SJ. β -1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus velezensis* ZJ20 exerts antifungal effect on plant pathogenic fungi[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(2): 26
- [30] Liu XY, Ren B, Chen M, et al. Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H3[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(5): 1881-1893
- [31] Zhang YG, Ni H, Zhou YY, et al. Effects of meteorological conditions on strawberry anthrax and drug control tests[J]. Chinese Horticulture Abstracts, 2016, 32(8): 51-54 (in Chinese)
张叶根, 倪航, 周洋洋, 等. 气象条件对草莓炭疽病的影响及药剂防治试验[J]. 中国园艺文摘, 2016, 32(8): 51-54
- [32] Huang L, Li QC, Hou Y, et al. *Bacillus velezensis* strain HYE5-6 as a potential biocontrol agent against anthracnose on *Euonymus japonicus*[J]. Biocontrol Science and Technology, 2017, 27(5): 636-653