

研究报告



新疆药用植物牛至内生细菌多样性与抗菌活性

高磊^{1,3} 刘永红¹ 马金彪¹ Osama Abdalla Abdelshafy Mohamad¹ 李文均^{*1,2} 李丽^{*1}

1 中国科学院新疆生态与地理研究所 荒漠与绿洲生态国家重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830011

2 中山大学生命科学学院 有害生物控制与资源利用国家重点实验室 广东省热带亚热带植物资源实验室 广东 广州 510275

3 中国科学院大学 北京 100049

摘要:【背景】植物内生菌作为微生物群落中一类非常重要的组成部分,在多个领域都有广泛的应用价值,如促进植物生长、抵抗病虫害、生物固氮、降解有毒有害化合物等。【目的】进一步丰富新疆野果林苹果腐烂病害的生防资源以及分析牛至内生细菌多样性特征。【方法】通过纯培养方法,对健康植物牛至组织进行内生细菌的分离纯化,并进行 16S rRNA 基因序列分析;再利用平板对峙法筛选具有抑制苹果腐烂病原菌生长的内生细菌。【结果】共分离到 168 株内生细菌,最终确定为 4 门 5 纲 8 目 12 科 17 属,其中优势属为芽胞杆菌属(*Bacillus*)。由分离实验结果可知, M1 号 TSA 培养基, M5 号组氨酸-棉子糖培养基和 M6 号 NA 培养基是分离牛至内生细菌较为理想的培养基;采自新源县野果林的牛至内生细菌多样性较为丰富,在牛至根部内生细菌种类更多;通过拮抗实验共筛选出 59 株牛至内生细菌具有较好的抑菌效果。【结论】新疆药用植物牛至内生细菌的物种多样性较为丰富,而且富含一批有效抑制野苹果腐烂病原菌生长的内生细菌菌株。因此,本研究在新疆野果林苹果腐烂病的生物防治和药用植物内生细菌种质资源的填补等方面具有重要意义。

关键词: 新疆牛至, 内生细菌, 多样性, 苹果腐烂病, 拮抗作用

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (U1903206, 31670009)

***Corresponding authors:** Tel: 86-991-7823149

E-mail: LI Wenjun: liwenjun3@mail.sysu.edu.cn; LI Li: lili.bobo@outlook.com

Received: 07-06-2020; **Accepted:** 11-08-2020; **Published online:** 14-10-2020

基金项目: 国家自然科学基金(U1903206, 31670009)

***通信作者:** Tel: 0991-7823149

E-mail: 李文均: liwenjun3@mail.sysu.edu.cn; 李丽: lili.bobo@outlook.com

收稿日期: 2020-06-07; 接受日期: 2020-08-11; 网络首发日期: 2020-10-14

Diversity and antagonistic effect of endophytic bacteria isolated from *Origanum vulgare* L. in Xinjiang

GAO Lei^{1,3} LIU Yonghong¹ MA Jinbiao¹ Osama Abdalla Abdelshafy Mohamad¹
LI Wenjun^{*1,2} LI Li^{*1}

1 State Key Laboratory of Desert and Oasis Ecology, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi, Xinjiang 830011, China

2 State Key Laboratory of Biocontrol, Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Resources, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510275, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Background] Endophytes associated with plant have a wide range of applications in various fields, such as promoting plant growth, antagonistic activity, biological nitrogen fixation and degradation of toxic compounds. [Objective] The purpose of this study is to isolate and identify endophytic bacteria associated with *Origanum vulgare* L. and to evaluate their biological control ability against the apple canker disease in Xinjiang Wild Fruit Forest. [Methods] Culture-dependent method and 16S rRNA gene sequencing were used to identify the isolated strains. Endophytic bacteria were screened by plate confrontation method for their ability against the pathogen of apple canker. [Results] In this study, a collection of 168 endophytic bacteria were isolated from *Origanum vulgare* L. and identified based on their 16S rRNA gene sequences as 4 phyla, 5 classes, 8 orders, 12 families and 17 genera. The dominant genus was *Bacillus*. Additionally, the results of isolation of endophytic bacteria from *Origanum vulgare* L. showed that TSA medium (M1) produced the highest diversity of bacteria, followed by NA medium (M6) and then Histidine-Raffinose medium (M5). The diversity of culturable endophytic bacteria from *Origanum vulgare* L. was rich in Xinyuan Wild Fruit Forest. The distribution of endophytic bacteria in root was more plentiful compared to that in stem and leaf. Fifty-nine strains of isolated endophytic bacteria were screened by plate confrontation method for their antagonistic against apple canker. The results demonstrate that a number of endophytic bacteria which can effectively inhibit the growth of pathogenic fungi of apple canker. [Conclusion] The diversity of endophytic bacteria associated with *Origanum vulgare* L. in Xinjiang was rich. In this study, a number of endophytic bacteria which can effectively inhibit the growth of pathogenic fungi of apple canker were screened out. Therefore, the results of this study provide a more abundant and effective source of endophytic bacteria from *Origanum vulgare* L. for biological control of apple canker disease in Xinjiang Wild Fruit Forest.

Keywords: *Origanum vulgare* L., endophytic bacteria, diversity, apple canker, antagonism

近年来, 由于人类活动、病虫害以及苹果腐烂病的影响, 新疆野果林(Xinjiang Wild Fruit Forest)大面积衰退, 丢失大量优质种质资源和基因资源, 造成了严重的经济损失以及环境的破坏^[1]。因此, 加大野果林的保护力度及其资源的合理开发利用显得尤为重要。有研究表明, 植物内生菌(Endophyte)可直接对侵染的病菌或致病因子发起进攻, 从而降解病菌菌丝或致病因子, 达到植物保护的作用^[2-9]。部分植物内生细菌可以产生促进植物生长的物质, 从而促进特定植物生长, 因此, 采

用植物内生细菌防治植物病虫害提高产量更加符合绿色农业发展的需求^[10-11]。因此, 利用内生菌防护野果林的衰退具有可行性。

牛至(*Origanum vulgare* L.)隶属于唇形科牛至属, 在我国仅有牛至一个种分布, 其地理分布范围较广, 主要生长于海拔 500–3 000 m 的山坡、草地、树林和小溪等空旷的地方; 研究表明, 牛至挥发性油主要成分是萜类和酚类, 二者具有抗菌作用, 而且对提高动物抗菌和免疫功能有很好的辅助作用, 其作用机理主要是通过对细菌细胞膜结构的变性

和凝固来实现^[12]。除挥发性油之外,牛至非挥发性油也有特殊的药理作用,目前主要研究的是其抗氧化作用^[13-16]。然而据查阅文献结果显示,目前鲜有牛至内生菌方面的报道。因而本研究对牛至内生细菌的探索 and 开发利用是十分必要的,这不仅对牛至次生代谢活性成分的进一步阐明有重要意义,而且对牛至内生细菌功能的阐明也非常重要,同时可以根据研究成果适当开发其生物价值。本研究主要以牛至为研究对象,分离和纯化其内生细菌,并通过 16S rRNA 基因序列进行系统分类学鉴定,据此分析牛至内生细菌多样性;同时筛选一批具有拮抗苹果腐烂病病原菌的菌株,以期防治新疆野果林苹果腐烂病提供理论依据,并丰富内生菌种质资源库。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株与植物材料

苹果腐烂病病原菌(*Valsa mali*, Y24-4-1)由中国科学院新疆生态与地理研究所极端环境微生物

资源与生态功能研究团队提供。苹果腐烂病病原菌活化接种在 PDA 培养基上,25 °C 培养 7 d,待菌丝长满平板后转放至 4 °C 保存备用。

健康的牛至植物样品于 2018 年采自新疆伊犁地区,采集 3 种不同生境的牛至植株样品,每个样点分别采集其地上组织(茎、叶)和地下组织(根),利用 GPS 记录采样地点的海拔和经纬度,并记录植物所生长的生境以及植被类型等。具体的采样地点和生境特点信息如表 1 所示。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

研究所采用的供试分离培养基及实验编号、名称和配方如表 2 所示。以下 6 种分离培养基的 pH 均在 7.2-7.5 之间。纯化和传代培养采用 TSA 培养基。筛选抗菌培养基采用 PDA 培养基^[4],由 Solarbio 生物公司提供。

胰蛋白胨大豆琼脂 TSA、麦芽浸粉、胰蛋白胨大豆肉汤 TSB,青岛高科园海博生物技术有限公司;酵母粉,上海生工生物有限公司;D-组氨酸、D-棉子糖,北京索莱宝科技有限公司。电热

表 1 植物样品采集地点以及生境特点

Table 1 The information of plant sampling sites and habitat characteristics

序号 Number	样品 Sample	采样地 Area	位置 GPS	海拔 Altitude (m)	小生境 Habitat	样地气温 Temperature (°C)	气候类型 Climate
N1	<i>Origanum vulgare</i> L.	Zhaosu county, Yili, Xinjiang	43°6'43"N, 81°2'50"E	1 796.2	Roadside meadow	20	Cold temperate semi-arid climate
N2	<i>Origanum vulgare</i> L.	Xinjiang Wild Fruit Forest	43°22'41"N, 83°36'25"E	1 427.2	Mountain meadow	28	Continental semi-arid climate
N3	<i>Origanum vulgare</i> L.	Nalati town, Xinyuan county, Yili, Xinjiang	43°21'55"N, 84°21'50"E	2 109.5	Mountain slope	25	Continental semi-arid climate

表 2 牛至内生细菌分离培养基成分

Table 2 Media components for isolation of endophytic bacteria from *Origanum vulgare* L.

培养基编号 Number	培养基名称 Media names	培养基成分 Media components (g/L)
M1	Tryptose Soya Agar (TSA)	Tryptone 15.0, Peptone From Soybean 5.0, NaCl 5.0, Agar 15.0
M2	Luria-Bertani (LB)	Tryptone 10.0, Yeast Extract Powder 5.0, NaCl 10.0, Agar 15.0
M3	ISP 2	Yeast Extract Powder 4.0, Malt Extract 10.0, Glucose 4.0, Agar 20.0
M4	Gause No.1 medium (G1)	Soluble Starch 20.00, KNO ₃ 1.00, K ₂ HPO ₄ 0.50, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.50, NaCl 0.50, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01, Agar 20.00
M5	Histidine-Raffinose (H-R)	Histidine 0.50, Raffinose 2.50, K ₂ HPO ₄ 1.00, MgSO ₄ 0.50, FeSO ₄ 0.01, CaCl ₂ 0.02, Agar 20.00
M6	Nutrient Agar (NA)	Beef Extract 3.0, Peptone 5.0, Glucose 2.5, Agar 18.0

恒温培养箱, 上海天呈实验仪器制造有限公司; 分析天平, Sartorius 公司; 超声波清洗仪, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 植物样品的处理

牛至植物样品处理过程包括植物表面清洗、植物样品消毒、消毒效果检验和植物样品风干粉碎, 最后将粉末密封-20 °C 保存。

具体操作如下: 在清洗植物前将植物的地上和地下部分分开, 分成根(Root)、茎(Stem)、叶(Leaf)。清洗时先用流水将植物表面的泥土冲洗干净, 之后再用超声波清洗仪清洗直至水变清。在消毒阶段, 首先用无菌吸水纸将组织上残留的水吸净, 再剪成 1–2 cm 的小段, 然后用 75% 乙醇消毒 3 min, 无菌清水洗 3 次, 5% 次氯酸钠消毒 5 min, 无菌清水洗 3 次。消毒效果检验时, 吸取最后一次洗涤的无菌水 100 μ L, 涂布于分离培养基平板上, 培养 2 d 观察菌落生长情况, 检验是否消毒合格。将消毒彻底的植物样品在超净台中吹干, 紧接着用消毒灭菌后的捣碎机打碎植物样品并密封于无菌离心管中, 置于-20 °C 保存备用。

1.2.2 牛至内生细菌的分离、纯化与菌种保藏

采用富集培养后稀释涂布平板法进行菌种分离。取大约 1 g 植物样品并加入 9 mL 无菌水, 研磨均质 10 min。将研磨液加入到 TSB 液体培养基中, 于 30 °C、100 r/min 富集培养过夜, 取富集培养后的样液 1 mL 与 9 mL 无菌水充分混合, 10 倍比依次稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 共 6 个梯度悬浮液。最后分别取 100 μ L 各梯度下的组织悬浮液, 涂布于表 2 中的 6 种分离培养基上, 置培养箱 28 °C 恒温培养。2–3 d 后观察 6 个梯度内生细菌分离情况, 肉眼观察挑选出分离效果较好的 2 个梯度进行后续样品的内生细菌分离。采用分区划线法进行内生细菌的纯化。待分离平板上细菌菌落长出后挑取单菌落接种于 TSA 纯化培养基上, 应用分区划线法进行内生细

菌的纯化。牛至内生细菌的菌株保藏: 用无菌竹签挑取已纯化的内生细菌单菌落, 加入到无菌甘油管中, 保存在-80 °C 冰箱中备用。

1.2.3 牛至内生细菌的菌株鉴定

采用 Chelex-100 法提取内生细菌基因组 DNA, 具体操作步骤: 挑取细菌, 加入含 50 μ L 5% Chelex-100 的 1.5 mL 灭菌 EP 管; 95 °C 加热 10 min; 冷却至室温, 4 °C、12 000 r/min 离心 3 min。上清液即为 DNA 模板, 获得 DNA 模板后立即进行 PCR 扩增 16S rRNA 基因。

16S rRNA 基因的 PCR 扩增所用引物为细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GCTTACCTTGTT ACGACTT-3')。PCR 反应体系(25 μ L): 模板 DNA 2 μ L, 2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 引物 27F (10 μ mol/L) 1 μ L, 引物 1492R (μ mol/L) 1 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 1 min, 56 °C 30 s, 72 °C 2 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序并做拼接处理, 所得到的拼接序列(约 1 500 bp)通过 EzBioCloud (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)数据库进行 16S-based ID 比对, 确定其分类地位, 并利用统计学手段对牛至内生细菌物种多样性进行综合分析^[17]。

1.2.4 苹果腐烂病病原菌高效拮抗细菌的筛选

采用平板对峙法筛选抗苹果腐烂病病原菌的菌株, 将苹果腐烂病病原菌接种在 PDA 平板中央, 在接有病原菌平板的四周 2.5 cm 处划线接种牛至内生细菌, 以接种病原真菌的平板为空白对照组, 25 °C 培养 7 d, 观察内生细菌对病原真菌的拮抗作用, 待空白对照长满培养皿后, 测量病原菌生长直径, 按公式计算内生细菌对苹果腐烂病病原菌菌丝生长的抑制率。抑菌率计算公式(0.5 为开始接种时病原菌的直径, cm)^[4]: 抑菌率(%) =

$$\frac{[(\text{对照菌落直径}-0.5)-(\text{处理菌落直径}-0.5)]}{(\text{对照菌落直径}-0.5)} \times 100。$$

2 结果与分析

2.1 植物样品表面消毒结果检测

取最后一次洗涤的无菌水 100 μL 涂布于分离培养基平板上, 培养 2 d 后观察菌落生长情况, 结果为无任何菌落生长, 表明植物表面消毒彻底。本实验所分离的细菌均来自植物组织内部, 即均为植物内生细菌。

2.2 新疆药用植物牛至内生细菌分离效果最佳培养基探索

为探索牛至内生细菌分离的最佳培养基, 对每种培养基中分离到的内生细菌种类进行统计。统计结果如图 1 所示, TSA 培养基(M1 号)分离到 17 个属内生细菌; NA 培养基(M6 号)分离到 3 个属内生细菌; 组氨酸-棉子糖培养基(M5 号)分离到 3 个属内生细菌; LB 培养基(M2 号)分离到 2 个属内生细菌; 高氏一号培养基(M4 号)分离到 2 个属

内生细菌; ISP2 培养基(M3 号)分离到 1 个属内生细菌。因此, 初步断定 TSA 培养基(M1 号)、组氨酸-棉子糖培养基(M5 号)和 NA 培养基(M6 号)是分离牛至内生细菌较为理想的培养基, 相反, LB 培养基(M2 号)、ISP2 培养基(M3 号)和高氏一号培养基(M4 号)就可能不太适合用于牛至内生细菌的分离。

2.3 新疆药用植物牛至不同组织内生细菌多样性比较

内生细菌在牛至各组织部位具有广泛分布的特点, 即内生细菌在其宿主植物的根、茎、叶中均有分布; 但是也会表现出部分细菌具有组织专一性的特点, 也就是说部分属的菌株仅存在于茎中或者叶片、根中。图 2 比较了牛至不同部位内生细菌的分离效果, 从中可以清晰地看出药用植物牛至内生细菌在其根部分布的多样性多于茎部和叶片。

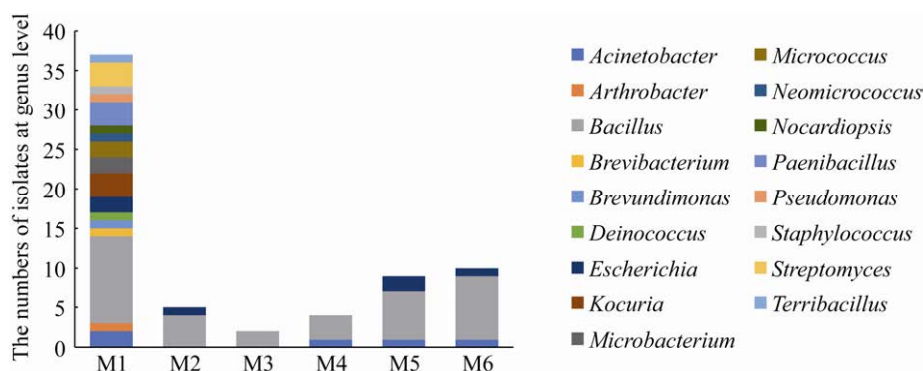


图 1 不同培养基对牛至内生细菌分离效果的比较

Figure 1 Comparison of the isolation effect of endophytic bacteria from *Origanum vulgare* L. using different medium

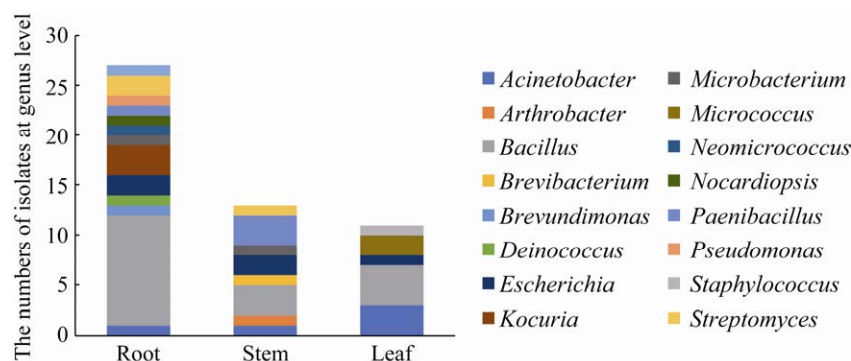


图 2 牛至不同组织内生细菌多样性比较

Figure 2 Diversity comparison of endophytic bacteria in different tissues of *Origanum vulgare* L.

由表 3 可知,从新疆药用植物牛至样品根(Root)中共获得 81 株菌, 分别属于 4 门 6 纲 7 目 10 科 14 属, 其优势度指数为 0.14, 香农指数为 2.65, 均匀度指数为 0.80, 丰富度指数为 6.14, 辛普森指数为 0.86; 从样品茎(Stem)中共获得 53 株菌, 分别属于 3 门 4 纲 5 目 7 科 7 属,其优势度指数为 0.16, 香农指数为 2.14, 均匀度指数为 0.83, 丰富度指数为 3.02, 辛普森指数为 0.84; 从样品叶(Leaf)中共获得 34 株菌, 分别属于 3 门 4 纲 4 目 5 科 5 属, 其优势度指数为 0.19, 香农指数为 2.06, 均匀度指数为 0.80, 丰富度指数为 3.40, 辛普森指数为 0.81。可以看出 3 个组织部位的优势度和均匀度无大的差别, 但根部的丰富度指数明显高于叶和茎。

2.4 不同采样地的新疆药用植物牛至内生细菌多样性比较

牛至中的内生细菌资源十分丰富。从图 3 可以看出,来自不同采样地的牛至样品内生细菌的丰富程度不同, 在属水平上分析, 其中从 N3 获得内生细菌属的数量最多(10 属), 其次是 N1 (9 属), 获得最少属数量的是 N2 (8 属)。然而从表 3 的分离菌株数看, 可以发现 N2 采样地的内生细菌较为丰富一些。

由表 4 统计结果可知, 从 N1 采样地获得的新疆药用植物牛至中分离到 40 株菌, 分别属于 4 门 5 纲 5 目 7 科 9 属, 其优势度指数为 0.13, 香农指数为 2.40, 均匀度指数为 0.84, 丰富度指数为 4.34,

表 3 牛至不同组织内生细菌物种多样性比较
Table 3 Diversity comparison of endophytic bacteria from *Origanum vulgare* L.

不同指标 Index	叶 Leaf	根 Root	茎 Stem
门 Phylum	3	4	3
纲 Class	4	6	4
目 Order	4	7	5
科 Family	5	10	7
属 Genus	5	14	7
菌株 Strains	34	81	53
优势度指数 Dominance index	0.19	0.14	0.16
香农指数 Shannon index	2.06	2.65	2.14
均匀度指数 Evenness index	0.80	0.80	0.83
丰富度指数 Richness index	3.40	6.14	3.02
辛普森指数 Simpson index	0.81	0.86	0.84

辛普森指数为 0.87; 从 N2 采样地获得的牛至中分离到 73 株菌, 分别属于 3 门 4 纲 5 目 7 科 9 属, 其优势度指数为 0.19, 香农指数为 2.36, 均匀度指数为 0.75, 丰富度指数为 5.13, 辛普森指数为 0.81; 从 N3 采样地获得的新疆药用植物牛至中分离到 55 株菌, 分别属于 3 门 4 纲 5 目 7 科 11 属, 其优势度指数为 0.14, 香农指数为 2.43, 均匀度指数为 0.81, 丰富度指数为 4.74, 辛普森指数为 0.86。可以看出 3 个采样地的牛至内生细菌优势度、均匀度和丰富度指数都有一定的差异, N2 采样地的牛至内生细菌优势度要高于 N1 和 N3 两块采样地, N2 采样地的牛至内生细菌均匀度要比其余 2 块采样地低, 但 N2 采样地的牛至内生细菌丰富度指数要高于 N1 和 N3 采样地。

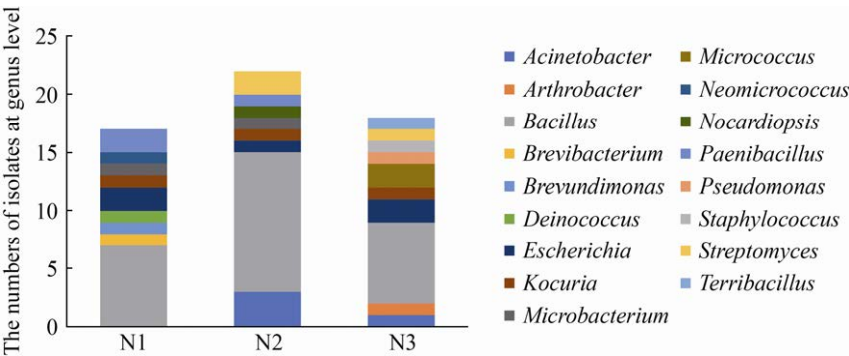


图 3 不同采样地牛至内生细菌多样性比较
Figure 3 Diversity comparison of endophytic bacteria from *Origanum vulgare* L. in different areas

表 4 不同采样地牛至内生细菌多样性比较
Table 4 Diversity comparison of endophytic bacteria from *Origanum vulgare* L. in different areas

不同指标 Index	采样地 Sample area			合计 Total
	N1	N2	N3	
门 Phylum	4	3	3	4
纲 Class	5	4	4	5
目 Order	5	5	5	8
科 Family	7	7	7	12
属 Genus	9	9	11	17
菌株 Strains	40	73	55	168
优势度指数 Dominance index	0.13	0.19	0.14	0.13
香农指数 Shannon index	2.40	2.36	2.43	2.88
均匀度指数 Evenness index	0.84	0.75	0.81	0.77
丰富度指数 Richness index	4.34	5.13	4.74	8.20
辛普森指数 Simpson index	0.87	0.81	0.86	0.87

2.5 新疆药用植物牛至内生细菌分离鉴定及多样性结果分析

研究共分离纯化出 168 株内生细菌并进行 16S rRNA 基因序列测定(序列已经提交到 NCBI 的 GenBank 数据库中, 对应的序列号为 MN704389–MN704554, 有 2 株菌的 16S rRNA 基因序列检测出嵌合序列未得到序列号), 利用 EzBioCloud 数据库初步完成菌株鉴定, 最终鉴定出 4 门 5 纲 8 目 12 科 17 属。由图 4 可以看出, 新疆药用植物牛至的内生细菌中芽胞杆菌属(*Bacillus*)为优势属, 占分

离菌株总数的 67.26%; 其次为埃希氏杆菌属(*Escherichia*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和副链杆菌属(*Paralkalibacillus*), 分别占新疆药用植物牛至内生细菌总数的 8.33%、5.95%和 3.57%。根据表 4 合计可知, 从新疆药用植物牛至样品中共获得 168 株内生细菌, 其总体优势度指数为 0.13, 香农指数为 2.88, 均匀度指数为 0.77, 丰富度指数为 8.20, 辛普森指数为 0.87。

2.6 新疆药用植物牛至内生细菌抗苹果腐烂病原菌结果分析

采用平板对峙方法从分离到的 168 株牛至内生细菌中筛选对苹果腐烂病原菌有拮抗作用的功能菌株, 根据抗菌活性结果显示, 有 59 株菌株对苹果腐烂病原菌表现出了抑制作用。由图 5 具备抑菌能力的代表性牛至内生细菌的抑菌率柱状图显示结果可知, 其中抑菌率高达 81.90%的 *Streptomyces* sp. EGI 125 表现出了对苹果腐烂病原菌的强抑制作用, 筛选到的其他菌株也均表现出较高的抑菌率。图 6 为 7 d 时几株内生细菌的拮抗活性展示图, 从图 6 可以清晰地看到抑菌圈, 说明具有明显的抑制苹果腐烂病原菌生长的特性。例如在图 6B 中有一株 *Bacillus* sp. EGI 10 表现出不错的抗菌活性, 具有明显的抑菌圈。

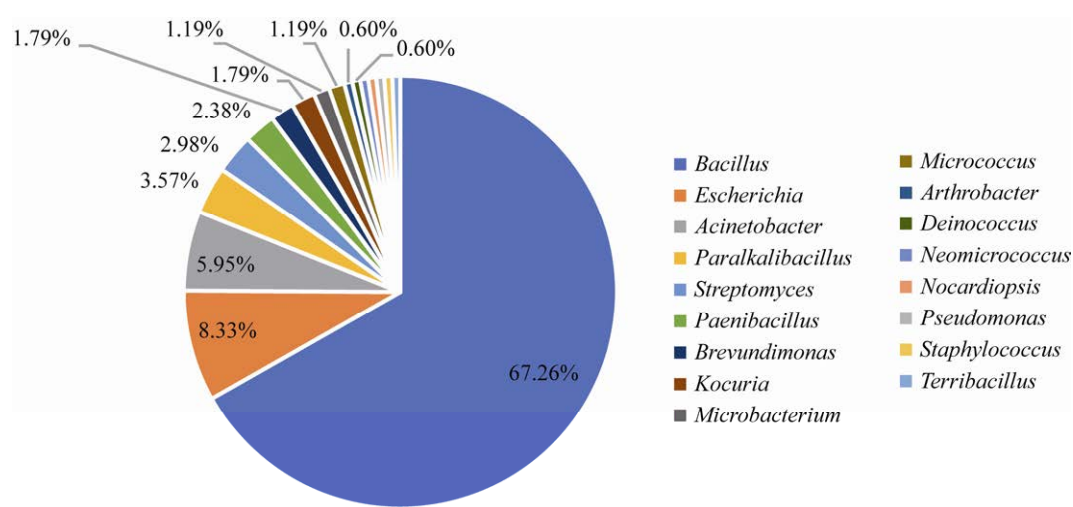


图 4 内生细菌各属占总菌株数的百分比
Figure 4 Percentage of endophytic bacteria in total strains

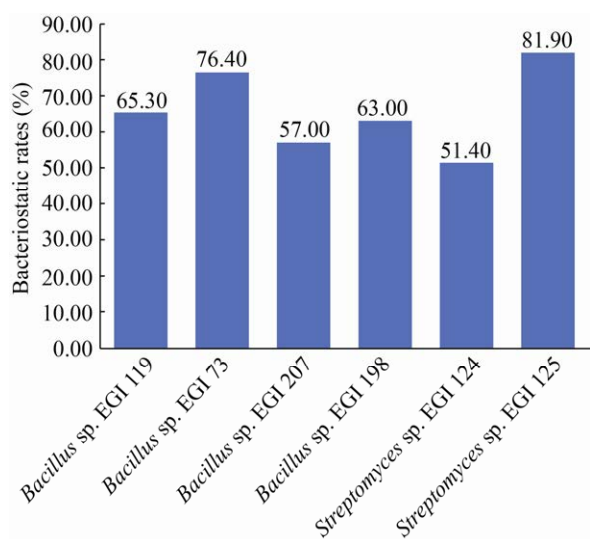


图5 具备抑菌能力的代表性牛至内生细菌抑菌率
Figure 5 Bacteriostatic rate of representative endophytic bacteria from *Origanum vulgare* L.

统计结果显示,具有抑菌功能的牛至内生细菌只包含在2个属 *Bacillus* 和 *Streptomyces* 中。其中,平均抑菌率为 65.04% 的 *Bacillus* 占抑菌菌株总数的

的 96.61%; 平均抑菌率为 66.70% 的 *Streptomyces* 占抑菌菌株总数的 3.39%。

采用单因素方差分析比较不同菌株拮抗活性的差别,从而检验不同菌株拮抗活性之间的差别是否有统计学意义,统计分析利用 SPSS 软件进行^[18]。通过方差齐性检验结果可以看出,方差齐性检验计算出的概率 P 值为 0.841,在给定显著性水平 α 为 0.05 的前提下检验通过,即不同的抑菌率是来自相同方差的不同总体,满足方差分析的前提。再根据单因素方差分析结果显示,组间偏差平方和为 0.133,自由度为 18,组内偏差平方和为 0.176,自由度为 41;总偏差平方和为 0.308,总自由度为 59。组间、组内的均方分别为 0.007、0.004,两者的比值 F 分布的观测值是 1.723,其对应的概率 P 值为 0.075,在给定显著性水平 $\alpha=0.05$ 的前提下,由于 P 值大于 α ,因此不拒绝原假设,即认为不同属菌株间的抑菌率没有显著差异。

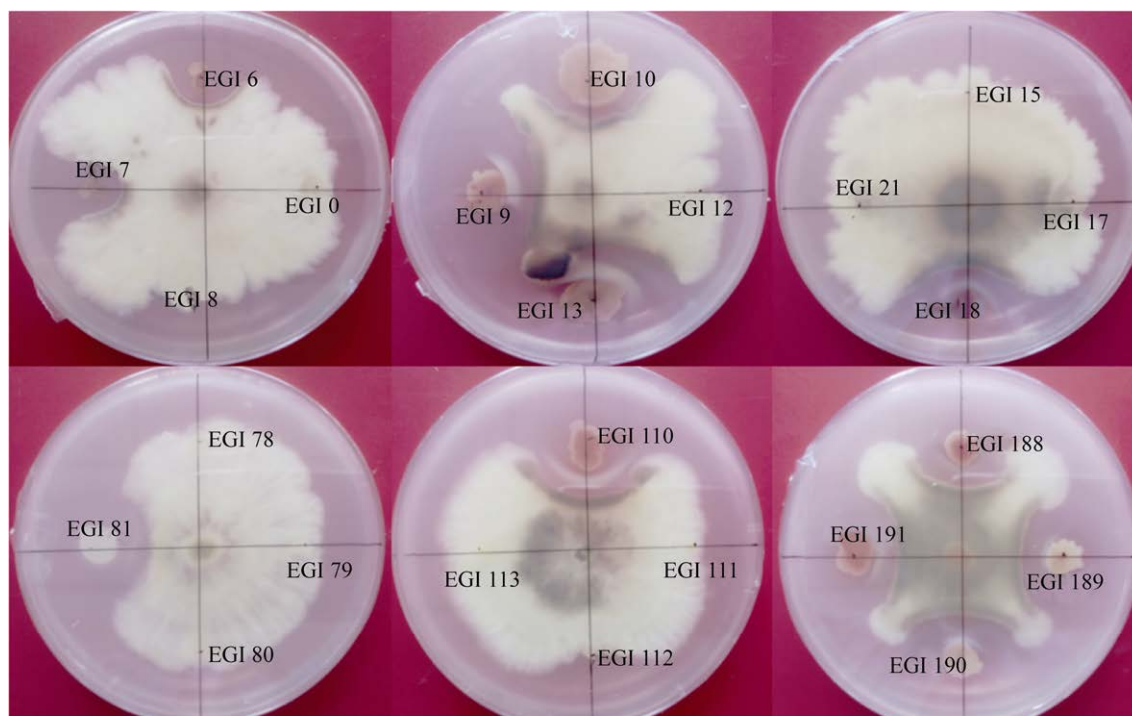


图6 部分内生细菌拮抗效果展示图
Figure 6 Display of the antagonistic effect of endophyte

3 讨论与结论

3.1 牛至内生细菌多样性结果讨论

由于在纯培养分离内生细菌多样性研究中,内生细菌的出菌率对于多样性分析的影响非常大,因此在分离实验过程中许多研究者采取各种方式处理植物样品,目的就是为了使植物体内的内生细菌尽可能多地释放出来。本研究采用的方式是将植物样品消毒、晾干打碎成粉末,再经过研磨处理,最后将研磨液加到 TSB 液体培养基中 120 r/min 摇床富集培养 12 h,之后再进行稀释涂布平板。通过实验结果可以看出我们分离出较多的牛至内生细菌,说明采用富集培养的方式是一种有效分离牛至内生细菌的手段。这可能是因为富集培养使那些在数量上不占优势的内生细菌有一定的提升,最终在涂布平板后可以长出单菌落。

本实验采用了 6 种不同培养基的目的也是为了能够充分地分离植物中各种营养型内生细菌,因为不同细菌所需的营养物质不同,所以用不同种类的培养基分离内生细菌可以提高内生细菌的出菌率,以便尽可能多地分离出植物体内的可培养内生细菌。

本研究分离纯化出的 168 株内生细菌经过鉴定属于 17 属,其中属于芽胞杆菌属的内生细菌占比最大(67.26%),为优势属。可能是因为芽胞杆菌属在环境中大量存在,经过长时间与环境的磨合能够轻松进入植物体内并大量定殖,而且可以迅速建立起与宿主植物之间互惠互利的共生关系。大量的研究都发现植物体内的芽胞杆菌资源极其丰富,它们占据了比较有利的生态位并广泛地定殖于植物体内(包括根、茎、叶、花、果实等),并且其为植物提供了许多益处,比如促进植物生长、提高宿主植物抗逆性以及与植物联合修复环境等^[19]。

有研究表明,植物内生菌物种丰富度与许多因素相关,比如植物样品本身的生长状况、采样地的自然地理条件等^[20],本研究结果显示从新疆伊犁

新源县野果林(N2)所采的牛至样品中分离出的内生细菌种的数量(种水平)均多于其他 2 个采样地,说明 N2 采样地的牛至具有更加丰富的内生细菌多样性。这可能与 N2 采样地的自然条件有关,与其他 2 个采样地相比, N2 采样地具有更加适合细菌生长的气温(28 °C)。同时研究结果也能够直观地反映出牛至内生细菌在其根部分布更多,这也可以间接地说明内生菌的“外生学说”有一定的依据,内生菌的“外生学说”意思是说植物内生菌是植物根际微生物经过缓慢地迁移,最终在植物体内定殖并与宿主建立起互惠互利的共生关系^[21]。

3.2 牛至内生细菌抗菌活性结果讨论

平板对峙法是一种体外筛选拮抗病原菌十分有效而且简便的方法。本实验在分离到的 168 株牛至内生细菌中利用平板对峙培养法筛选到了 59 株具有抑菌效果的内生细菌,其中大多数菌株属于芽胞杆菌属,也有少数属于链霉菌属。我们筛选出的这一批内生细菌在新疆野果林苹果腐烂病防治工作中有很大的应用前景,在防护新疆野果林衰退方面具有很大的潜力及可行性。一直以来链霉菌属是拮抗病原菌的重要来源,同时也是不少抗生素的重要产生菌^[21]。初步猜测筛选到的 2 株链霉菌属的内生细菌抑菌机理是通过向培养基中分泌抗生素,从而抑制病原真菌(苹果腐烂病原菌)的生长。另外,有文献研究表明枯草芽胞杆菌的抑菌机理有 2 种情况:一是通过向培养基中分泌特殊物质,二是通过直接作用抵抗病原真菌的生长^[22]。本实验筛选的有抑菌作用的菌株其具体抑菌机理还需要进一步的研究。

REFERENCES

- [1] An XL, Zhou Y. Conservation, rational development and utilization of wild fruit forest resources in Yili district, Xinjiang[J]. Journal of Jiangsu Forestry Science and Technology, 2009, 36(4): 35-37 (in Chinese)
安兴林, 周英. 新疆伊犁区域野果林资源保护及合理开发利用[J]. 江苏林业科技, 2009, 36(4): 35-37
- [2] Xu M, Wang JY, Hu JL, Cui M, Li MX, Chen X, Guo QX, Ma LJ. Action of plant endophytes on soybean growth and

- stress tolerance[J]. *Soybean Science*, 2017, 36(6): 965-969, 977 (in Chinese)
- 徐萌, 王金缘, 胡金丽, 崔曼, 李梦雪, 陈熙, 郭晴雪, 马莲菊. 植物内生菌对大豆促生长和抗胁迫作用的研究进展[J]. *大豆科学*, 2017, 36(6): 965-969, 977
- [3] Zhang JL, Qin YL, Xiong ZJ, Zhao GZ, Zhu WY, Zhao LX, Xu LH. The selective isolation of endophytic actinomycetes[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(7): 1305-1313 (in Chinese)
- 张金丽, 秦玉丽, 熊子君, 赵国振, 朱文勇, 赵立兴, 徐丽华. 植物内生放线菌的选择性分离[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(7): 1305-1313
- [4] Su B, Yao PL, Liu XY, Jiang H, Wang MZ, Ding T. Antagonistic effect of endophytic bacterial strain isolated from *Eucommia ulmoides* on phytopathogen[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2018, 45(6): 1112-1118 (in Chinese)
- 苏博, 姚沛琳, 刘小阳, 姜华, 王明智, 丁婷. 杜仲内生细菌对植物病原菌的拮抗作用[J]. *安徽农业大学学报*, 2018, 45(6): 1112-1118
- [5] Huang XH, Li S, Tan ZJ, Xie BY, Wu CR, Yang YC. Progress of study on endophytic actinomycetes in plant[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(1): 42-46 (in Chinese)
- 黄晓辉, 李珊, 谭周进, 谢丙炎, 伍参荣, 杨友才. 植物内生放线菌研究进展[J]. *生物技术通报*, 2008(1): 42-46
- [6] Chen HH, Yang Y, Jiang Y, Tang SK, Xu LH. The isolation of endophytic actinomycetes from plants[J]. *Microbiology China*, 2006, 33(4): 182-185 (in Chinese)
- 陈华红, 杨颖, 姜怡, 唐蜀昆, 徐丽华. 植物内生放线菌的分离方法[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(4): 182-185
- [7] Cao LX, Zhou SN. Studies on endophytic actinomycetes in plants[J]. *Microbiology China*, 2004, 31(4): 93-96 (in Chinese)
- 曹理想, 周世宁. 植物内生放线菌研究[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(4): 93-96
- [8] Chen WQ, Peng H, Deng BW, Xie XC, Kong YN, Xia CC, Liu ZD, Liu XH. Study on isolation and antimicrobial effect of endophytic actinomycetes in *Polygonum cuspidatum*[J]. *Journal of Shaanxi University of Technology (Natural Science Edition)*, 2012, 28(6): 61-67 (in Chinese)
- 陈文强, 彭浩, 邓百万, 解修超, 孔亚男, 夏聪聪, 刘兆迪, 刘小红. 药用植物虎杖内生放线菌的分离及抑菌活性的研究[J]. *陕西理工学院学报: 自然科学版*, 2012, 28(6): 61-67
- [9] Ge HL, Chen L, Ji XE, Gao ZM. Research progress on endophytic bacteria as a biocontrol factor[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2006, 35(11): 12-15 (in Chinese)
- 葛红莲, 陈龙, 纪秀娥, 高智谋. 植物内生细菌作为生防因子的研究进展[J]. *河南农业科学*, 2006, 35(11): 12-15
- [10] Yan MH, Cai ZQ, Han JG, Sun L, Song W. The applied research of endophytic bacteria in biological control of plant disease[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2004(3): 8-12, 22 (in Chinese)
- 闫孟红, 蔡正求, 韩继刚, 孙磊, 宋未. 植物内生细菌在防治植物病害中的应用研究[J]. *生物技术通报*, 2004(3): 8-12, 22
- [11] Qin LP, Huang SL, Li YR. Research progress in *Endophytic diazotroph*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(2): 150-152, 159 (in Chinese)
- 覃丽萍, 黄思良, 李杨瑞. 植物内生固氮菌的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2005, 21(2): 150-152, 159
- [12] Han F, Liu YE, Zhao ZD, Chen Q, Yang M, Shu JC, Xu HL. Analysis of volatile oil of 'underground part' of *Origanum vulgare* L. by GC-MS[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2015, 35(20): 1836-1839 (in Chinese)
- 韩飞, 刘友儿, 赵志冬, 陈泣, 杨明, 舒积成, 许汉林. 气相色谱-质谱分析牛至药材“地下部分”所得挥发油的化学成分[J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(20): 1836-1839
- [13] Li JJ, Li RT. Research status of *Origanum vulgare* L.[J]. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory*, 2013, 30(1): 171-176 (in Chinese)
- 李俊杰, 李蓉涛. 牛至的研究现状[J]. *光谱实验室*, 2013, 30(1): 171-176
- [14] Wu HQ, Liu YE, Qin MM, Zhou ZY, Zhao ZD, Han F, Ai ZF. GC-MS analysis on volatile oils from underground part of *Origanum vulgare* L.[J]. *Medicinal Plant*, 2016, 7(1/2): 1-3
- [15] Züleyha Ö, Turgut K, Selami S, Cenk P. Effect of different drying methods and development stages on the essential oil chemical composition of aerial parts of *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (link) Letsw[J]. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 2018, 21(5): 1403-1409
- [16] Taleb MH, Abdeltawab NF, Shamma RN, Abdelgayed SS, Mohamed SS, Farag MA, Ramadan MA. *Origanum vulgare* L. essential oil as a potential anti-acne topical nanoemulsion — *in vitro* and *in vivo* study[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2164
- [17] Liu YH, Guo JW, Zhang YG, Li L, Zulpiya M, Abdalla Abdelshafy Mohamed O, Dong ZY, Gulsimay A, Li WJ. Endophytic bacteria and growth promoting characteristics associated with two medicinal plants of *Ferula*[J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 38(5): 51-59 (in Chinese)
- 刘永红, 郭建伟, 张永光, 李丽, 祖丽皮亚木·木沙尔, Osama Abdalla Abdelshafy Mohamed, 董周焱, 古丽斯玛

- 依·艾拜都拉, 李文均. 2 种药用阿魏植物内生细菌及促生属性比较[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(5): 51-59
- [18] Zulpiya M, Li L, Guo JW, Gulsumay A, Osama M. Antimicrobial spectrum of endophytic bacteria from *Glycyrrhiza* spp. against four phytopathogens and its phylogenetic analysis based on 16S rRNA[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2018, 27(9): 1367-1374 (in Chinese)
- 祖丽皮亚木·木沙尔, 李丽, 郭建伟, 古丽斯玛依·艾拜都拉, Osama M ohamed. 甘草内生细菌对 4 种植物病原菌的抑菌谱及其 16S rRNA 系统发育分析[J]. 西北农业学报, 2018, 27(9): 1367-1374
- [19] Gong GL, Wang L, Wang XY, Zhang D, Wu M, Tian L. Research advances in plant endophytes Bacillaceae[J]. Journal of Biology, 2020, 37(3): 91-95 (in Chinese)
- 龚国利, 王亮, 王旭阳, 张帝, 吴咪, 田露. 植物内生芽孢杆菌的研究进展[J]. 生物学杂志, 2020, 37(3): 91-95
- [20] Yu J, Yu ZH, Liu XB, Wang GH. Diversity and growth promoting effects of endophytic bacteria in plant roots[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(13): 169-175 (in Chinese)
- 喻江, 于镇华, 刘晓冰, 王光华. 植物根组织内生细菌多样性及其促生作用[J]. 中国农学通报, 2015, 31(13): 169-175
- [21] Li Q, Liu J, Zhou DP, Zhu J. Advance on exploitation and research of endophyte[J]. Biotechnology Bulletin, 2006(3): 33-37 (in Chinese)
- 李强, 刘军, 周东坡, 朱婧. 植物内生菌的开发与研究进展[J]. 生物技术通报, 2006(3): 33-37
- [22] Zulpiya M. Diversity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plant of *Thymus* in Xinjiang and their pathogen antagonism[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang University, 2018 (in Chinese)
- 祖丽皮亚木·木沙尔. 新疆药用植物百里香内生放线菌的多样性与抗菌活性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学硕士学位论文, 2018