

研究报告

丁香内生死亡谷芽孢杆菌 DX78 的分离鉴定及其抑菌成分

冯宇航, 侯凯丽, 杨从军*

青岛农业大学植物医学学院 山东省植物病虫害绿色防控工程研究中心, 山东 青岛 266109

冯宇航, 侯凯丽, 杨从军. 丁香内生死亡谷芽孢杆菌 DX78 的分离鉴定及其抑菌成分[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3928-3938.

FENG Yuhang, HOU Kaili, YANG Congjun. Clove endophyte *Bacillus vallismortis* DX78: isolation, identification, and preliminary study of antimicrobial components[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3928-3938.

摘要:【背景】植物内生菌往往产生与植物相同、相似或新颖的次生代谢产物, 丁香具有广谱优异的抗菌活性, 可从中分离到强抑菌作用的内生细菌。【目的】筛选抑制姜瘟病菌的丁香内生细菌并分离其活性成分。【方法】牛津杯法筛选拮抗内生细菌; 根据 16S rRNA 基因序列鉴定菌株; 有机溶剂萃取、硅胶柱层析和薄层制备色谱分离活性成分; 测定 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 DEPT (135°) 并对分离的活性成分进行结构鉴定; 滤纸片法和菌丝生长速率法测定活性成分抑菌活性。【结果】共分离到 112 株丁香内生细菌, 从叶中分离最多, 占 37.4%。其中 17 株对姜瘟病菌有抑制, DX78 菌株抑制作用最好, 经鉴定为死亡谷芽孢杆菌, 并从其发酵液中追踪分离到邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)。DBP 对姜瘟病菌、猕猴桃溃疡病菌的 MIC 分别为 0.3 mg/disc、0.25 mg/disc; 其还可抑制多种植物病原真菌, 特别对苹果炭疽叶枯病菌、番茄灰霉病菌和苹果腐烂病菌的抑制 EC_{50} 仅分别为 3.751、18.568 和 22.019 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以苹果炭疽叶枯病菌为靶标菌, 戊唑醇抑制毒力约为 DBP 抑制毒力的 4.5 倍, DBP 抑制毒力约为多菌灵抑制毒力的 12.5 倍。【结论】丁香抗病内生细菌丰富, 从死亡谷芽孢杆菌 DX78 中分离的 DBP 对苹果炭疽叶枯病菌抑制作用强, 值得进一步研究。
关键词: 丁香内生细菌; 死亡谷芽孢杆菌 DX78; 邻苯二甲酸二丁酯; 抑菌作用

*Corresponding author. E-mail: yangcj2006@163.com

Received: 2022-12-11; Accepted: 2022-12-23; Published online: 2023-01-31

Clove endophyte *Bacillus vallismortis* DX78: isolation, identification, and preliminary study of antimicrobial components

FENG Yuhang, HOU Kaili, YANG Congjun *

Shandong Engineering Research Center for Environment Friendly Agricultural Pest Management, College of Plant Health and Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

Abstract: [Background] Endophytic microorganisms often produce the same, similar or novel secondary metabolites as host plants. Clove has excellent antimicrobial activities, from which the endophytic bacteria with strong antimicrobial effects could be isolated. [Objective] To screen out clove endophytic bacteria against *Ralstonia solanacearum* and isolate active components. [Methods] The antimicrobial endophytic bacteria were screened out by oxford-cup tests and identified by 16S rRNA sequence analysis. The active components were isolated by organic solvent extraction, silica-gel column chromatography, and preparative thin layer chromatography, and identified by NMR. The inhibitory effects of the active component on pathogens were determined by filtering paper method and mycelial growth rate method. [Results] A total of 112 strains of endophytic bacteria were isolated, and most strains were obtained from leaves, accounting for 37.4%. Seventeen strains showed inhibitory effect on *R. solanacearum*. Among these strains, DX78 demonstrated the strongest activity and was identified as *Bacillus vallismortis*. Dibutyl phthalate (DBP) was isolated from the fermentation broth of DX78. The minimum inhibitory concentrations of DBP against *R. solanacearum* and *Pseudomonas syringae* were 0.3 mg/disc and 0.25 mg/disc, respectively. Furthermore, DBP inhibited plant pathogenic fungi, with the EC_{50} values of 3.751, 18.568, and 22.019 $\mu\text{g/mL}$ against *Glomerella cingulata*, *Botrytis cinerea*, and *Valsa mali*, respectively. With *G. cingulata* as the target fungus, the inhibitory toxicity of tebuconazole was about 4.5 times that of DBP, and the inhibitory toxicity of DBP was about 12.5 times that of carbendazim. [Conclusion] Clove harbors rich antimicrobial endophytic bacteria, and DBP isolated from *B. vallismortis* DX78 has strong inhibitory effect on *G. cingulata*, which is worthy of further study.

Keywords: clove endophytic bacteria; *Bacillus vallismortis* DX78; dibutyl phthalate; antimicrobial activity

植物内生菌长期生活在植物体内的特殊环境中并与宿主协同进化。一方面,植物体为其提供生长必需的能量和营养;另一方面,内生菌又可通过自身的代谢产物或借助于信号传导作用对植物体产生影响^[1-3]。内生菌通过生物控制实现对寄主植物的保护作用,分泌抗菌物质

是其重要的抗生机制,产生的抗菌物质如 2,4-二乙酰间苯三酚、吩嗪羧酸、氧绿菌素、藤黄绿脓菌素、丁酰内酯、乙酰藤黄酚、硝吡咯菌素等可杀死病原菌^[4]。

丁香(*Syzygium aromaticum*)具有抗菌、抗氧化、抗癌、抗炎、抗糖尿病、驱虫杀螨、食品

保鲜等广泛的生理活性^[5-7]。对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、伤寒沙门氏杆菌、苹果腐烂病菌、小麦赤霉病菌、灰葡萄孢菌等许多细菌和真菌抑制作用显著^[8-10]。内生菌存在于所有植物中,种类极其丰富,为具有农药活性的植物内生菌次级代谢产物的研究和开发提供了巨大的资源库,可产生与寄主植物相同或不同的代谢产物^[11]。

基于丁香优异的抗菌活性,以及植物内生菌的普遍性、丰富性和更加多样的代谢产物,本研究以威胁生姜生产最为严重的姜瘟病菌为供试菌,分离筛选具有抑菌活性的丁香内生细菌,追踪分离活性成分,以期为直接开发或仿生合成奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物样品和病原菌

2021年3-5月,于青岛市城阳区多点采集丁香根、茎、叶、花。

姜瘟病菌(*Ralstonia solanacearum*)、猕猴桃溃疡病菌(*Pseudomonas syringae*)、苹果腐烂病菌(*Valsa mali*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、花生白绢病菌(*Sclerotium rolfsii*)、西瓜炭疽病菌(*Colletorichum lagenerium*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、斑点落叶病菌(*Alternaria mali*)、苹果炭疽叶枯病菌(*Glomerella cingulata*)和小麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis*),均由青岛农业大学农药学实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

牛肉膏、蛋白胨、葡萄糖、琼脂,国药集团化学试剂有限公司;DNA抽提试剂盒、DNA琼脂糖凝胶抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;dNTPs,天根生化科技(北京)有限公司;TaqTM DNA多聚酶,MBI公司;碘硝基四唑紫(iodonitrotetrazolium chloride, INT),

上海麦克林生化科技有限公司;N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)、乙醇、次氯酸钠、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇,天津市富于精细化工有限公司;薄层层析硅胶(GF254),青岛海洋化工有限公司;柱色谱硅胶(48-75 μm),山东青岛海洋化工厂;薄层层析硅胶板(GF254),青岛胜海精细硅胶化工有限公司;羧甲基纤维素钠(carboxymethyl cellulose sodium, CMC),天津市巴斯夫化工有限公司;戊唑醇(97.5%),芜湖市多威农化有限公司;多菌灵(97%),海利尔药业集团股份有限公司。

紫外分析仪,杭州齐威仪器有限公司;恒温振荡器,上海一恒科学仪器有限公司;恒温培养箱,上海浦东荣丰科学仪器有限公司;多功能离心机,赛默飞世尔科技公司;核磁共振波谱仪,Brucker公司。

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(nutrient agar medium, NA) (g/L):牛肉膏 5.0,氯化钠 5.0,蛋白胨 10.0,琼脂 20.0;牛肉膏蛋白胨培养基(nutrient broth, NB) (g/L):牛肉膏 5.0,氯化钠 5.0,蛋白胨 10.0;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar medium, PDA) (g/L):马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0,琼脂 20.0。

1.3 丁香内生细菌分离纯化

将丁香样品用流水冲洗干净,剪成0.5 cm×0.5 cm组织块,依次用70%乙醇表面消毒60 s,3.5% NaClO浸泡叶4 min,茎、根5 min,花1 min,70%乙醇浸泡30 s,无菌水漂洗3次。将最后一次漂洗液涂抹于培养基平板上,2-3 d后如有菌落生成,表明消毒不彻底,则丢弃不用。将消毒后的材料放入灭菌的盛有少量石英砂的研钵中,并加入适量0.85% NaCl溶液一起研磨。分别取汁液及其用无菌水稀释成10⁻¹、10⁻²、10⁻³和10⁻⁴浓度的稀释液各100 μL,涂

布于 NA 平板表面。将平板置于 30 °C 黑暗条件下培养, 每日观察, 根据形态、颜色挑取菌落。采用划线法对菌落连续 2-3 次转接纯化。纯化细菌于 4 °C 保存于 NA 斜面上。

1.4 内生细菌发酵滤液抑制姜瘟病菌作用测定

挑取一环 1.3 分离纯化的内生细菌, 接种至装有 30 mL NB 的 100 mL 三角瓶中, 于 30 °C、160 r/min 发酵 1 d。发酵液于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min。上清液经 0.22 μm 细菌过滤器过滤得发酵滤液。在含有姜瘟病菌的 NA 平板表面轻轻放置灭菌牛津杯, 静置 1 min 后向杯中加入 200 μL 发酵滤液, 于 30 °C 培养 24 h, 取出牛津杯, 并用 2 mg/mL INT 水溶液喷雾平板表面, 观察抑菌圈清晰程度, 测量抑菌圈直径大小。

1.5 DX78 菌株分子鉴定

用 DNA 抽提试剂盒提取 DX78 菌株基因组 DNA, 采用 16S rRNA 基因序列扩增引物 7F (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3') 和 1540R (5'-A GGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 进行 PCR。PCR 反应体系 (25 μL): DNA (50 ng/μL) 0.5 μL, 10×PFU 缓冲液 (Mg²⁺) 2.5 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μL, *Taq*TM DNA 多聚酶 (5 U/μL) 0.2 μL, ddH₂O 补足 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 并用 DNA 琼脂糖凝胶抽提试剂盒纯化。使用 ABI 3730XL 基因测序仪对纯化片段进行测序。利用 NCBI 上的 BLAST 程序进行 16S rRNA 基因序列相似性鉴定, 用 MEGA 6.0 通过 Kimura 2 参数距离模型和邻接法构建系统发育树。

1.6 DX78 菌株发酵液抑菌成分分离与鉴定

1.6.1 发酵液抑菌成分萃取溶剂筛选

发酵上清液分别用等量石油醚、氯仿、乙

酸乙酯、正丁醇萃取, 采用“滤纸片法”测定各萃取相活性。取萃取相 200 μL 加于直径 6 mm 无菌新华 1 号圆滤纸片上, 待溶剂挥干, 将滤纸片紧贴在含姜瘟病菌的 NA 平板上, 将平板倒置于培养箱, 30 °C 培养 1 d, 用 2 mg/mL INT 水溶液喷雾平板表面。根据抑菌圈清晰程度、直径大小, 确定活性成分萃取溶剂。

1.6.2 发酵液抑菌成分萃取分离

收集 DX78 菌株发酵上清液 50 L, 用等体积乙酸乙酯分次萃取、浓缩。浓缩物均匀拌入硅藻土, 于 40 °C 烘干成粉, 再依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、甲醇萃取, 减压浓缩得各萃取相。采用薄层生物自显影法测定各萃取相活性: 使用毛细管于薄层硅胶板上点样, 各萃取相点样浓度和体积相同, 将点样后的薄层板置于培养皿中, 倒入含姜瘟病菌的 NA 培养基, 使培养基均匀覆盖薄层板不使产生气泡。待培养基固化后, 将培养皿翻转放入培养箱, 30 °C 培养 1 d。取出培养皿, 用 2 mg/mL INT 水溶液喷雾平板表面, 根据抑菌圈清晰程度、直径大小, 确定各萃取相活性。

1.6.3 石油醚萃取相抑菌成分色谱分离与鉴定

对石油醚萃取相硅胶柱层析, 上样 1.8 g, 依次用石油醚、石油醚/乙酸乙酯 (体积比分别为 99:1、95:5、90:10、80:20、60:40)、石油醚/乙酸乙酯/甲酸 (体积比分别为 60:40:2、60:40:4、50:50:4、40:60:4) 梯度洗脱, 甲醇清柱。各流动相 300 mL, 每 20 mL 收集一个馏分。

结合紫外检测和薄层生物自显影, 合并上述馏分, 并对合并馏分 F2 进行制备薄层分离。配制 0.75% CMC 水溶液, 充分溶解后取上清液与薄层层析硅胶以体积质量比 3:1 混匀并研磨至无气泡产生, 铺板, 静置 12 h, 110 °C 活化 1 h, 于薄层板底端 1.5 cm 处挖宽约 2 mm 上样凹槽。F2 充分溶于有机溶剂, 与硅胶拌匀、烘

干后均匀填充至上样槽，压平，展开剂展板，吹干，刮下所需部位，萃取、浓缩。

测定 ^1H 、 ^{13}C 和 DEPT (135°) NMR，并对比文献[12-13]，对分离的活性成分进行结构鉴定。

1.7 活性成分抑菌作用测定

1.7.1 对病原细菌最小抑制浓度(MIC)测定

采用滤纸片法测定活性成分对姜瘟病菌和猕猴桃溃疡病菌的 MIC^[9]。

1.7.2 抑制病原真菌毒力测定

采用抑制菌丝生长速率法将活性成分溶解于 100 μL DMF，加入 30 mL 熔融无菌 PDA，获得所需浓度，再平均倾入 3 个直径 6 cm 灭菌培养皿中制成带毒平板。以加 100 μL DMF 的 PDA 为对照。在平板中央接种直径 0.4 cm 菌饼，并于 28 $^\circ\text{C}$ 黑暗培养。对照组菌落直径超过培养皿直径 2/3 时，采用“十字交叉法”测量菌落直径，以其平均值代表菌落大小。菌落生长抑制率(%)=($C-T$)/($C-0.4$) $\times 100$ ，式中： C 为对照菌落直径(cm)； T 为处理菌落直径(cm)。采用浓度对数几率值直线法，求出抑制病原菌的 EC_{50} 。

1.7.3 与杀菌剂的抑制毒力比较

以 1.7.2 测定的对 DBP 最敏感病原真菌为靶标菌，比较分离的活性成分与戊唑醇、多菌灵的抑制毒力，活性测定方法同 1.7.2。

1.8 数据分析

利用 IBM SPSS 20.0 软件进行回归分析和毒力计算；利用 Microsoft Excel 软件作图。

2 结果与分析

2.1 丁香内生细菌

从丁香各器官共分离纯化到 112 株内生细菌，各器官分离内生细菌的数量从多到少依次为叶、花、茎、根，占总菌株的比例分别为 42.0%、28.6%、26.8%和 2.7%，从叶中分离内生细菌的比例最高(表 1)。

2.2 内生细菌发酵滤液对姜瘟病菌的抑制作用

在分离的 112 株内生菌中，有 17 株的发酵滤液对姜瘟病菌表现抑菌作用。综合抑菌圈清晰程度和直径大小，DX78 菌株发酵滤液抑菌作用最强，抑菌圈清晰、直径为(15.1 \pm 0.2) mm。因此进一步研究 DX78 菌株抑菌成分(图 1)。

2.3 DX78 菌株 16S rRNA 基因序列鉴定

DX78 菌株 16S rRNA 基因序列为 1 446 个碱基，将其与 GenBank 中已知序列进行局部相似

表 1 分离的丁香内生细菌

Table 1 Endophytic bacteria isolated from clove *Syzygium aromaticum*

菌株编号 Strain No.	分离部位 Plant organs	菌株数 Numbers of strains	占比 Ratio in total strains (%)
DX (1-12, 31-55, 100-109)	叶 Leaf	47	41.9
DX (13-27, 88-99, 110-112)	茎 Stem	30	26.8
DX (28-30)	根 Root	3	2.7
DX (56-87)	花 Flower	32	28.6

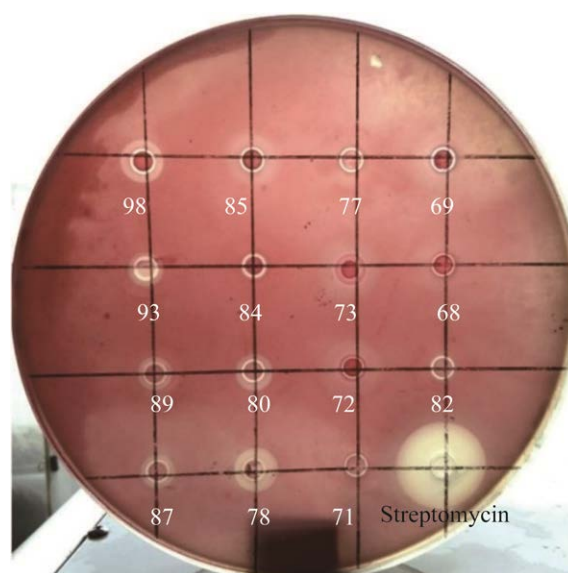


图 1 抑制姜瘟病菌的丁香内生细菌筛选
Figure 1 Screening of clove endophytic bacteria against *Ralstonia solanacearum*.

性比较, 并构建系统发育树(图 2)。根据综合评分、序列覆盖度、随机匹配的可能性、最大序列相似度, 鉴定 DX78 菌株为死谷芽孢杆菌 (*Bacillus vallismortis*), 其在基因库中的登录号为 OP175933。

2.4 DX78 菌株发酵液中抑菌活性成分

DX78 菌株发酵滤液分别以石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 滤纸片法测定各萃取相对姜瘟病菌的抑菌圈大小分别为 0、0、(9.0±0.2)、(9.0±0.3) mm。考虑到大量萃取后浓缩的难易, 选择乙酸乙酯作为活性成分的萃取溶剂。

DX78 菌株发酵上清液 50 L 经乙酸乙酯充分萃取, 浓缩得 11.2 g。对乙酸乙酯各萃取相薄层生物自显影, 活性主要集中在氯仿萃取相和石油醚萃取相。对石油醚萃取相硅胶柱色谱分离, 合并得到 3 个活性馏分, 分别为淡黄色

黏稠油状液体 F1 (163.6 mg)、黄色黏稠油状液体 F2 (106.2 mg)、黄褐色膜状固体 F3 (51.4 mg)。F2 进一步经制备薄层分离得到活性化合物 F2-1 (32.7 mg), 为淡黄色油状液体。

化合物 F2-1 CAS: 84-74-2; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.71 (dd, $J=2.9, 1.5$ Hz, 2H), 7.53 (dd, $J=2.8, 1.8$ Hz, 2H), 4.30 (t, $J=7.5$ Hz, 4H), 1.72 (m, 4H), 1.44 (m, 4H), 0.95 (t, $J=7.5$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 167.84, 132.44, 131.04, 128.96, 65.70, 30.70, 19.32, 13.87; 根据 DEPT (135°), δ (65.70, 30.70 和 19.32) 为 $-\text{CH}_2$ 信号, δ (167.84, 132.44) 为季碳信号, δ (131.04, 128.96) 为 $-\text{CH}$ 信号, δ 13.87 为 $-\text{CH}_3$ 信号。上述数据结合文献[12-13]报道, 判定该 F2-1 为邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP), 结构如图 3 所示。

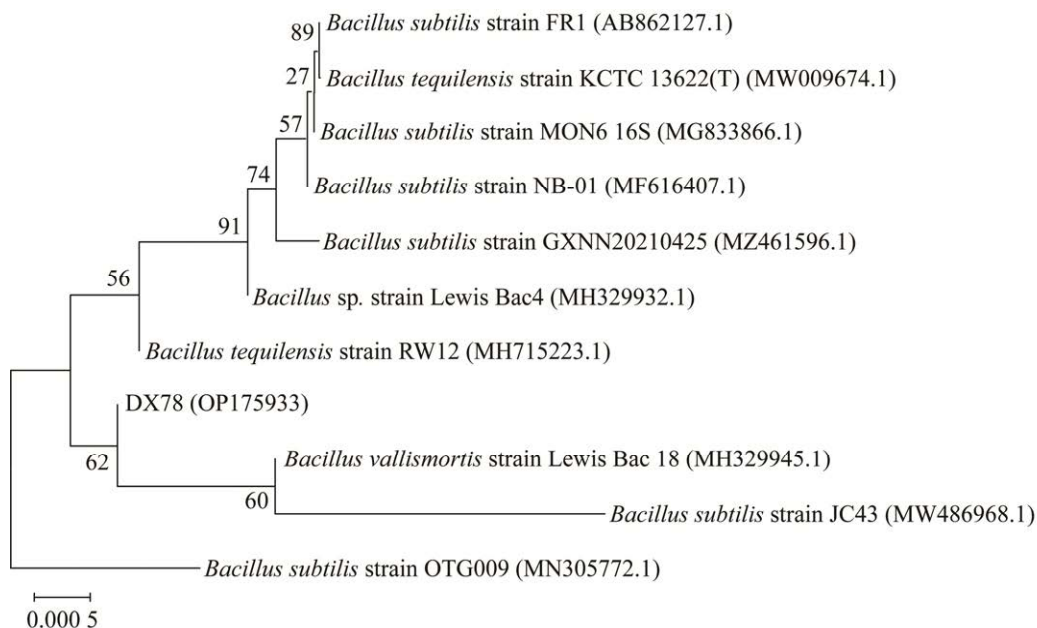


图 2 DX78 菌株 16S rRNA 基因及其近邻序列系统发育关系 括号内数值为菌株在 GenBank 中登录号; 分支点上数字为重复 1 000 次自展值; 标尺 0.000 5 为核苷酸替换率

Figure 2 Phylogenetic relationship of 16S rRNA gene and its neighbor sequence of DX78. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Numbers at the nodes indicate the level of bootstrap values based on 1 000 replications; The scale bar indicates 0.000 5 substitutions per nucleotide position.

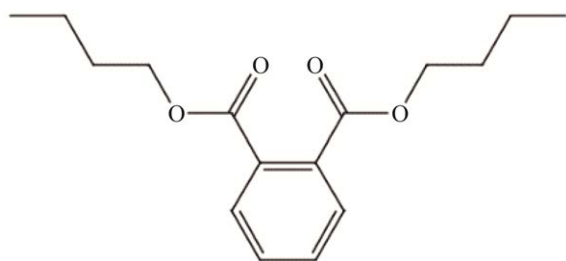


图3 邻苯二甲酸二丁酯化学结构
Figure 3 Chemical structure of DBP.

2.5 邻苯二甲酸二丁酯抑菌作用

2.5.1 DBP对病原细菌的MIC

“滤纸片法”测定DBP对姜瘟病菌和猕猴桃溃疡病菌MIC分别为0.3 mg/disc和0.25 mg/disc,均表现一定抑菌作用(图4)。但与对照链霉素相比这种作用极弱,链霉素在0.03 mg/disc时对上述2个病原细菌的抑菌圈直径仍分别达到(15.0±0.1) mm和(13.8±0.3) mm。

2.5.2 DBP对病原真菌的抑制毒力

DBP对8种农业病原真菌的抑制毒力测定表明,不同真菌对DBP的敏感性存在极大差异。DBP对苹果炭疽叶枯病菌抑制毒力强大, EC_{50} 值仅为3.751 $\mu\text{g/mL}$; DBP对番茄灰霉病菌、苹果腐烂病菌也有强抑制作用,对两者的 EC_{50} 值

仅分别为18.568 $\mu\text{g/mL}$ 和22.019 $\mu\text{g/mL}$; DBP对小麦全蚀病菌的抑制作用最差, EC_{50} 为891.644 $\mu\text{g/mL}$,与对苹果炭疽叶枯病菌抑制毒力相差约240倍(表2,图5)。

2.5.3 DBP与两种杀菌剂对苹果炭疽叶枯病菌的抑制毒力比较

苹果炭疽叶枯病菌对DBP作用敏感,而戊唑醇、多菌灵对苹果炭疽叶枯病菌的抑制 EC_{50} 分别为0.840 $\mu\text{g/mL}$ 和47.524 $\mu\text{g/mL}$ (表3)。戊唑醇抑制毒力约为DBP抑制毒力的4.5倍,而DBP抑制毒力约为多菌灵抑制毒力的12.5倍。DBP对苹果炭疽叶枯病菌的抑制毒力虽弱于戊唑醇,但相差相对较小,且本身 EC_{50} 仅为3.571 $\mu\text{g/mL}$,其抑制毒力远强于广谱杀菌剂多菌灵。

3 讨论与结论

化学合成农药对人类健康和生态安全潜在风险巨大,许多国家已经实施了更严格的农药法规,以减少农业中可用的合成农药^[14-15]。与化学杀菌剂相比,微生物源杀菌剂具有生物活性半衰期短、不易在植物体内积累、不污染环

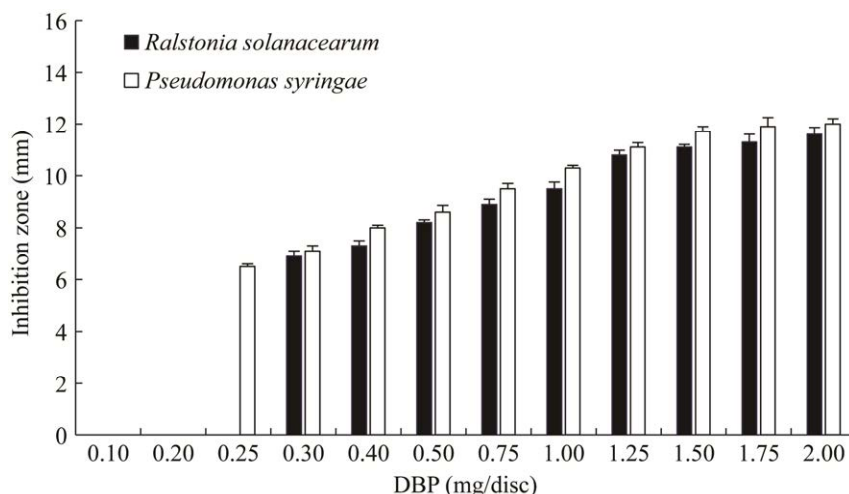


图4 DBP对两种病原细菌的MIC测定
Figure 4 MIC determination of DBP against two pathogenic bacteria.

表 2 邻苯二甲酸二丁酯对 8 种病原真菌的抑制毒力

Table 2 Inhibitory toxicity of DBP against eight pathogenic fungi

病原菌 Pathogens	毒力方程 Regression equation	相关系数 <i>r</i>	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	EC_{50} 的 95% 置信限 95% confidence interval ($\mu\text{g/mL}$)
苹果腐烂病菌 <i>Valsa mali</i>	$1.523x+2.955$	0.961	22.019	17.567–26.617
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	$0.963x+2.505$	0.954	389.511	218.741–1172.371
花生白绢病菌 <i>Sclerotium rolfsii</i>	$1.085x+2.436$	0.981	231.188	160.642–405.098
西瓜炭疽病菌 <i>Colletorichum lagenerium</i>	$1.090x+2.902$	0.942	83.993	64.584–199.556
番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	$0.971x+3.768$	0.980	18.568	14.014–27.051
苹果斑点落叶病菌 <i>Alternaria mali</i>	$0.863x+3.238$	0.970	110.091	77.213–184.201
苹果炭疽叶枯病菌 <i>Glomerella cingulata</i>	$1.215x+4.303$	0.944	3.751	2.460–5.421
小麦全蚀病菌 <i>Gaeumannomyces graminis</i>	$0.840x+2.521$	0.945	891.644	369.714–6 693.665

境、往往有新颖的结构、作用机理独特、不易诱发病原抗性、在防治植物病时还能刺激植物生长或诱导系统抗性等优点^[16]。植物内生菌种类极其丰富,宏基因组学研究推测其总数达到数百万种,因此从植物内生菌中筛选具有抗菌活性的微生物前景广阔^[17]。

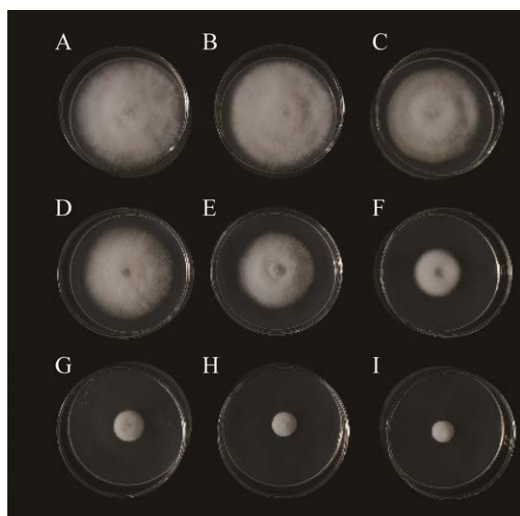


图 5 DBP 对苹果炭疽叶枯病菌的抑制毒力测定
A: 空白对照. B: DMF 对照. C–I: 分别表示 DBP 浓度为 0.625、1.25、2.5、5.0、10.0、20.0 和 40.0 $\mu\text{g/mL}$
Figure 5 Determination of the inhibitory toxicity of DBP against *Glomerella cingulate*. A: Blank control. B: DMF control. C–I: DBP concentration was 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 and 40.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

研究表明,丁香内生菌极其丰富。尹然从紫丁香根、茎、叶中分离到 4 022 株内生真菌,鉴定出 3 611 株,属于 5 个目 8 个科 17 个属,其中曲霉属(*Aspergillus*)和镰孢属(*Fusarium*)为优势属^[18]。Adelina 等从丁香花中分离到 5 株内生真菌,对引起龋齿的变形链球菌(*Streptococcus mutans*)和牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)具有活性,其中 IFBC-01 菌株活性最强^[19]。刘丽娟等从紫丁香的花、树皮和叶中分离到 9 种内生细菌,其中 5 种革兰氏阳性菌,包括 1 种球菌和 4 种杆菌;4 种革兰氏阴性菌均为杆菌,以及 4 种内生真菌^[20]。Dwimartina 等从丁香根、茎、叶和花中分离到 46 株内生细菌,其中 24 株能产生吡啶乙酸,23 株对青枯菌 *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* 具有抑制作用,这些菌分属枯草芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌^[21]。Sepriana 等从丁香树皮中分离到 29 株内生细菌,其中 6 株能抑制金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*),3 株抑制金黄色葡萄球菌和变形链球菌,鉴定表明这些具有抑制活性的内生细菌最可能是蜡状芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefasiens*)^[22]。本研究共分离到 112 株内生细菌,17 株对姜瘟病菌具有不同程度的抑制作用。可以看出,丁香植株中

表3 DBP与两种杀菌剂对苹果炭疽叶枯病菌的抑制毒力

Table 3 Inhibitory toxicity of DBP and two fungicides against *Glomerella cingulata*

Compounds	毒力方程 Regression equation	相关系数 <i>r</i>	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	EC_{50} 的95%置信限 95% confidence interval ($\mu\text{g/mL}$)
邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	$1.215x+4.303$	0.944	3.751	2.460–5.421
戊唑醇 Tebuconazole	$1.007x+5.076$	0.995	0.840	0.659–1.103
多菌灵 Carbendazim	$3.038x+0.032$	0.992	43.222	39.572–47.637

存在丰富的内生菌，抑菌资源丰富。综合抑菌圈大小和抑菌圈清晰程度，从花中分离到的DX78菌株抑菌作用最强，经鉴定为死亡谷芽孢杆菌(*Bacillus vallismortis*)。

利用姜瘟病菌进行活性追踪，从死亡谷芽孢杆菌发酵液中分离到DBP，对姜瘟病菌、猕猴桃溃疡菌的MIC分别为0.3 mg/disc、0.25 mg/disc，DBP对两种细菌抑制作用较弱。但进一步测定DBP对8种重要农业病原真菌的抑制毒力表明，DBP对苹果炭疽叶枯病菌表现强抑制作用， EC_{50} 仅为3.75 $\mu\text{g/mL}$ ，对苹果腐烂病菌、番茄灰霉病菌也有较强抑制， EC_{50} 分别为22.02 $\mu\text{g/mL}$ 和18.57 $\mu\text{g/mL}$ 。与戊唑醇和多菌灵相比，DBP对苹果炭疽叶枯病菌的抑制毒力弱于戊唑醇，但远强于多菌灵，抑制毒力约为多菌灵的12.5倍，开发潜力极大。DBP已在真菌、放线菌等微生物的次级代谢产物中多次分离得到。从*Streptomyces nasri* submutant H35发酵滤液中分离出DBP，对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、荧光假单胞菌有弱的抑制，抑制浓度均在300 $\mu\text{g/mL}$ 以上；对革兰氏阴性的大肠杆菌，以及酿酒酵母、烟曲霉菌无抑制活性^[13]。从东乡野生稻分离两株放线菌*Streptomyces* sp. PRh5和FRo2的发酵液对多种细菌和农业病原真菌表现不同抑制作用，并均从其发酵液中追踪分离到DBP^[23-24]。从茵陈内生细菌醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*) KMB-32中分离纯化到DBP并测

定出其对金色葡萄球菌有较强的抑制作用，500 $\mu\text{g/mL}$ 条件下抑制率为47.52%^[25]。DBP在微生物代谢产物中越来越多地分离得到，对不同病原菌的抑制活性差异显著，因此极有必要开展DBP抑菌活性筛选，否则可能导致活性漏筛，正如本研究中发现DBP对苹果炭疽叶枯的强抑制活性，DBP对苹果炭疽叶枯病菌的作用机理值得进一步研究。

REFERENCES

- [1] RYAN RP, GERMAINE K, FRANKS A, RYAN DJ, DOWLING DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 278(1): 1-9.
- [2] BASTIAS DA, ALEJANDRA MARTÍNEZ-GHERSA M, BALLARÉ CL, GUNDEL PE. *Epichloë* fungal endophytes and plant defenses: not just alkaloids[J]. Trends in Plant Science, 2017, 22(11): 939-948.
- [3] MISHRA A, SINGH SP, MAHFOOZ S, SINGH SP, BHATTACHARYA A, MISHRA N, NAUTIYAL CS. Endophyte-mediated modulation of defense-related genes and systemic resistance in *Withania somnifera* (L.) dunal under *Alternaria alternata* stress[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(8): e02845-e02817.
- [4] 郝晓娟. 植物内生菌[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010.
HAO XJ. Endophytic Bacteria[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2010 (in Chinese).
- [5] BATIHA GES, ALKAZMI LM, WASEF LG, BESHBIHY AM, NADWA EH, RASHWAN EK. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities[J]. Biomolecules, 2020, 10(2): 202.

- [6] HU Q, ZHOU MF, WEI SY. Progress on the antimicrobial activity research of clove oil and eugenol in the food antiseptics field[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(6): 1476-1483.
- [7] HARO-GONZÁLEZ JN, CASTILLO-HERRERA GA, MARTÍNEZ-VELÁZQUEZ M, ESPINOSA-ANDREWS H. Clove essential oil (*Syzygium Aromaticum* L. Myrtaceae): extraction, chemical composition, food applications, and essential bioactivity for human health[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2021, 26(21): 6387.
- [8] YANG CJ, GAO Y, DU KY, LUO XY. Screening of 17 Chinese medicine plants against phytopathogenic fungi and active component in *Syzygium aromaticum*[J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2020, 127(2): 237-244.
- [9] TAHA YASSIN M, ABDULRAHMAN AL-ASKAR A, ABDEL-FATTAH MOSTAFA A, EL-SHEIKH MA. Bioactivity of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry extracts as potential antimicrobial and anticancer agents[J]. Journal of King Saud University - Science, 2020, 32(8): 3273-3278.
- [10] 张杰, 王春梅, 程罗根, 陈浩, 石志琦. 丁香酚对灰葡萄孢的抑制作用研究[J]. 农药学报, 2008, 10(1): 68-74.
ZHANG J, WANG CM, CHENG LG, CHEN H, SHI ZQ. Inhibition activity of eugenol to *Botrytis cinerea*[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2008, 10(1): 68-74 (in Chinese).
- [11] 胡桂萍, 郑雪芳, 尤民生, 刘波. 植物内生菌的研究进展[J]. 福建农业学报, 2010, 25(2): 226-234.
HU GP, ZHENG XF, YOU MS, LIU B. Recent advances in research on endophytes[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2010, 25(2): 226-234 (in Chinese).
- [12] 侯柄竹, 王树芳, 马焕普, 刘志民. 桃根癌病菌拮抗放线菌抑菌物质的分离纯化与结构鉴定[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1186-1192.
HOU BZ, WANG SF, MA HP, LIU ZM. Identification of antimicrobial composition isolated and purified from antagonistic actinomycetes against *Agrobacterium tumefaciens* of peach[J]. Microbiology China, 2013, 40(7): 1186-1192 (in Chinese).
- [13] El-Naggar MYM. Dibutyl phthalate and the antitumor agent F5A1, two metabolites produced by *Streptomyces nasri* submutant H35[J]. Biomedical Letters, 1997, 55: 125-131.
- [14] ARAMJOO H, FARKHONDEH T, ASCHNER M, NASERI K, MEHRPOUR O, SADIGHARA P, ROSHANRAVAN B, SAMARGHANDIAN S. The association between diazinon exposure and dyslipidemia occurrence: a systematic and meta-analysis study[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(4): 3994-4006.
- [15] BUDZINSKI H, COUDERCHET M. Environmental and human health issues related to pesticides: from usage and environmental fate to impact[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25(15): 14277-14279.
- [16] RAAIJMAKERS JM, VLAMI M, de SOUZA JT. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, 81(1): 537.
- [17] RINKE C, SCHWIENTEK P, SCZYRBA A, IVANOVA NN, ANDERSON IJ, CHENG JF, DARLING A, MALFATTI S, SWAN BK, GIES EA, DODSWORTH JA, HEDLUND BP, TSIAMIS G, SIEVERT SM, LIU WT, EISEN JA, HALLAM SJ, KYRPIDES NC, STEPANAUSKAS R, RUBIN EM, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter[J]. Nature, 2013, 499(7459): 431-437.
- [18] 尹然. 哈尔滨市紫丁香内生真菌组成的初步研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2017.
YIN R. Endophytic fungi of the preliminary study in Harbin[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2017 (in Chinese).
- [19] ADELINA N, FITRIANA F, NAID T, SENIWATI S, SEPTIYANTI S. Isolation and test of anti-bacterial activity of endophytic fungi in clove flowers (*Syzygium aromaticum* L.) in inhibiting bacteria causes of dental caries[J]. Window of Health: Jurnal Kesehatan, 2019: 148-154.
- [20] 刘丽娟, 贾金如, 王洪伟. 紫丁香内生菌分离与培养[J]. 农村经济与科技, 2014, 25(10): 39-41.
LIU LJ, JIA JR, WANG HW. Isolation and culture of endophytic bacteria from *Syringa oblata*[J]. Rural Economy and Science-Technology, 2014, 25(10): 39-41 (in Chinese).
- [21] DWIMARTINA F, ARWIYANTO T, JOKO T. Potential of endophytic and rhizobacteria as an effective biocontrol for *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii*[J]. Asian Journal of Plant Pathology, 2017, 11(4): 191-198.
- [22] SEPRIANA C, JEKTI DSD, ZULKIFLI L. Bakteri

- endofit kulit Batang tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) Dan kemampuannya sebagai antibakteri[J]. Jurnal Penelitian Pendidikan IPA, 2017, 3(2): 52-59.
- [23] 包建莹, 张志斌, 肖依文, 汪涯, 颜日明, 朱笃. 东乡野生稻内生放线菌 *Streptomyces* sp. PRh5 抑菌活性次级代谢产物研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(11): 1933-1938, 2008.
BAO JY, ZHANG ZB, XIAO YW, WANG Y, YAN RM, ZHU D. Antibacterial and antifungal secondary metabolites produced by endophytic actinomycete *Streptomyces* sp. PRh₅ from Dongxiang wild rice[J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30(11): 1933-1938, 2008 (in Chinese).
- [24] 张志斌, 敖武, 熊瑶瑶, 颜日明, 汪涯, 朱笃. 内生拮抗放线菌 FRo2 的鉴定及抑菌活性物质的分离[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1574-1581.
ZHANG ZB, AO W, XIONG YY, YAN RM, WANG Y, ZHU D. Identification of antagonistic endophytic actinomycete FRo2 and isolation of its antimicrobial composition[J]. Microbiology China, 2014, 41(8): 1574-1581 (in Chinese).
- [25] 鲍永毅. 茵陈内生细菌分离纯化及次级代谢产物活性的研究[D]. 洛阳: 河南科技大学硕士学位论文, 2020.
BAO YY. Isolation and purification of endophytic bacteria from *Artemisia capillaria* and bioactivity study of secondary metabolites[D]. Luoyang: Master's Thesis of Henan University of Science and Technology, 2020 (in Chinese).