

一株大豆内生拮抗细菌 XZ-2 的分离和分子鉴定

王 波,周润楠,黄忠勤,王 幸,丁震乾,常 勇,周兴根

(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所,江苏 徐州 221131)

摘要:从大豆植株中分离到一株具有广谱抗菌活性的拮抗细菌,命名为 XZ-2。抑菌活性测定显示 XZ-2 对甘薯黑斑病菌、大蒜叶枯病菌等 8 种植物病原真菌均具有较强的抑菌活性,抑菌直径均在 20 mm 以上。采用分光光度法绘制了 XZ-2 的生长曲线,结果显示该菌株在 LB 液体摇培 12 h 时基本达到对数生长期,该生长曲线的绘制为后期 XZ-2 的活性物质发酵条件优化奠定了基础。通过 PCR 扩增 16SrDNA 片段并采用 MEGA 6.0 构建系统发育进化树,初步将该菌株鉴定为多粘类芽孢杆菌。

关键词:多粘类芽孢杆菌;拮抗活性;大豆

中图分类号:Q939.95

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2016.06.0997

Isolation and Molecular Identification of an Endophytic Bacteria from Soybean

WANG Bo, ZHOU Jian-nan, HUANG Zhong-qin, WANG Xing, DING Zhen-qian, CHANG Yong, ZHOU Xing-gen

(Xuzhou Academy of Agricultural Sciences, Xuzhou 221131, China)

Abstract: In this experiment, an endophytic bacteria XZ-2 with broad spectrum antimicrobial activity was isolated from soybean plant. Antibiotic activity assay showed that XZ-2 had strong antibiotic ability against 8 phytopathogenic fungi, and the diameters of inhibition zone were larger than 20 mm. The growth curves of XZ-2 were drawn by spectrophotometric method, the result showed shaking XZ-2 in liquid LB medium for 12 h could basically reach the logarithmic growth phase, the growth curve drawing for XZ-2 may be useful for fermentation conditions optimization in further study. 16SrDNA fragment was amplified by PCR and the phylogenetic tree was constructed by software MEGA 6.0, and then XZ-2 was identified as *Paenibacillus polymyxa*. This study showed that XZ-2 had brilliant biological control application prospect.

Keywords: *Paenibacillus polymyxa*; Antibiotic activity; Soybean

长期以来,植物病原微生物一直威胁着植物的生长发育和生产,化学防治剂的大量使用产生了很多负面影响,如病原微生物产生抗药性、食品安全以及环境污染等,生物防治被认为是化学防治的补充方法。前人研究认为,植物内生菌由于存在于植物体内,不易受外界环境的影响,可以较长时间发挥生物学作用,且具有定殖能力强、防病效果好及增殖和扩散快等优点^[1-2]。同时,它们还可以作为载体转移外源防病抗虫基因,构建多功能内生防工程菌植物疫苗等。因此,从植物内生细菌中筛选植物病害生防菌具有广阔的研究和应用价值^[3-5]。

本研究从大豆健康植物组织中分离到 1 株内生细菌 XZ-2,针对目前农业生产中几种重要的植物病害进行活性测定。大蒜叶枯病病原菌为枯叶格孢腔菌,由于耕作制度和栽培生态环境的不断变化,由该病菌引起的大蒜叶枯病常常大面积发生,造成严重的经济损失^[6];黄瓜灰霉病是随冬季日光温室栽培发展而发生日益严重的病害,主要为害果实,

造成减产,同时影响瓜条的商品质量^[7];甘薯黑斑病是甘薯栽培和贮藏中的主要病害之一,在世界各地甘薯产区均有发生,其病原菌为甘薯长喙壳菌,主要为害幼苗茎基部及块根组织,引起死苗、烂床、烂窖,我国每年由该病造成的甘薯产量损失为 5% ~ 10%,严重时损失达 20% ~ 50%^[8];瓜类炭疽菌 *Colletotrichum orbiculare* 属半知菌亚门炭疽病属,该病原菌寄生范围较广,可引起丝瓜、西瓜、黄瓜等多种瓜类作物的炭疽病,是瓜类生产中重要的病害之一,全国各地均有分布。甜瓜枯萎病由尖孢镰刀菌甜瓜专化型从根部侵染的系统性病害,对该病害仍以化学防治为主,但因化学药剂的长期使用,防效逐年降低,甚至无法控制^[9];小麦赤霉病是由禾谷镰孢菌引起的世界性流行性病害,是我国小麦生产中最重要病害之一,该病不仅能引起小麦大幅减产,甚至绝收,而且赤霉病菌分泌的毒素一脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON),可致人畜中毒,目前仍无免疫和高抗品种,化学防治是唯一应急措施。然而,

收稿日期:2016-08-19

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04-CES22);优质多抗超高产麦稻新品种徐麦 31、徐 68 优 201 产业化(BA2014074)。

第一作者简介:王波(1982-),男,硕士,助理研究员,主要从事植物病理学研究。E-mail:bobogood2006@163.com。

通讯作者:周兴根(1961-),男,副研究员,主要从事小麦栽培研究。E-mail:zlh-888@163.com。

防治赤霉病可供选择的药剂较少,活性不高,而且用药适期短,对用药技术要求高,现有药剂难以毒杀进入小麦颖壳和籽粒的病菌等,以致小麦赤霉病频繁流行^[10];小麦纹枯病主要是由禾谷丝核菌引起的一种土传真菌病害,近年来,小麦纹枯病在我国呈现明显北移趋势,对北方冬麦区危害日益严重,已成为冬小麦优质高产的严重障碍^[11];棉花黄萎病对世界棉花产业造成严重的经济损失,而大丽轮枝菌是引起这一病害的主要病原菌,目前对棉花黄萎病的防治主要依靠化学农药,从而造成了环境污染及安全问题的频发,生物防治以其对环境友好且对病害的发生有长期的抑制作用等优点引起了学者们的广泛关注^[12]。在本研究中,作者拟采用 PCR 扩增 16S rDNA 片段和系统发育进化树的构建对该 XZ-2 进行分子生物学鉴定。同时测定 XZ-2 对以上 8 种重要农作物病害的病原菌大蒜叶枯病菌 (*Pleospora herbarum* (Pers. ex Fr.) Rabenk), 黄瓜灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*), 甘薯黑斑病菌 (*Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted), 丝瓜炭疽病 (*Colletotrichum orbiculare*), 甜瓜枯萎病 (*Fusarium oxysporum* (Schl.) f. sp. melonis), 小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*), 小麦纹枯病菌 (*Rhizoctonia cerealis* Vander Hoeven), 棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae* Kleb) 等的抑菌活性,以期筛选出具有广谱抗菌活性的生防菌株,为徐淮地区大豆及其他重要农作物的生物防治提供优良的生防资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病原真菌 供试病原菌大蒜叶枯病菌,黄瓜灰霉病菌,甘薯黑斑病菌,丝瓜炭疽病菌,甜瓜枯萎病菌,小麦赤霉病菌,小麦纹枯病菌,棉花黄萎病菌由南京农业大学植物保护学院杀菌剂实验室馈赠并于 PDA 斜面 4℃ 冰箱保存。

1.1.2 培养基 样品中菌株分离及培养使用 LB 液体培养基(胰蛋白胨 10.0 g·L⁻¹, 酵母提取物 5.0 g·L⁻¹, 氯化钠 10.0 g·L⁻¹), LB 固体培养基(LB 液体培养基加琼脂 15 g·L⁻¹), 病原菌对峙试验使用 PDA 固体培养基(土豆 20 g·L⁻¹, 葡萄糖 20 g·L⁻¹, 琼脂粉 15 g·L⁻¹)。

1.2 拮抗菌分离

2014 年 9 月从江苏徐州铜山区班井村大豆种植地中选取无病虫害侵染症状且生长旺盛的徐豆 9 号大豆植株。健康大豆根、茎、叶和豆荚样品的表面先用自来水冲洗 20 min 左右,用纸巾将表面水分

蘸干,置于超净工作台,75% 酒精漂洗 30 ~ 60 s,再用 3% 的次氯酸钠漂洗 10 ~ 30 s,最后用无菌水漂洗 4 ~ 5 次。在无菌条件下,分别切取大豆的根、茎、叶和豆荚中心组织块,切成 0.5 cm 的小段。将上述各部分组织分别放入灭菌研钵中,充分研磨匀浆后离心取上清,用无菌水稀释成 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 和 10⁻⁴ 4 个浓度梯度,每个浓度梯度的稀释液各取 100 μL,均匀涂布于 LBA 平板中,每个浓度的稀释液涂 3 皿,将平板倒置于 30℃ 培养箱中培养 24 h 以上,观察培养出的菌落形态,挑取平板中不同形态和颜色的菌落重新划线纯化,挑取划线培养的单菌落移入试管斜面 4℃ 保存。

1.3 生长曲线的测定

将 XZ-2 接种于 5 mL LB 液体培养基中,28℃、180 r·min⁻¹ 培养 24 h 作为种子液,以 1% (体积分数) 接种量接种到 LB 液体培养基 (100 mL/250 mL) 中,培养条件为 28℃、180 r·min⁻¹,每隔 4 h 取样 1 次,以 LB 液体培养基为对照,测定 OD₆₀₀ 吸光值,以时间为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制生长曲线。每个样品 3 个重复。

1.4 16SrDNA 扩增及系统发育进化树的构建

XZ-2 的 DNA 采用基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物有限公司)提取。采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 16S rDNA 扩增^[13]。PCR 扩增条件为:94℃ 预变性 2 min; 98℃ 变性 10 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,循环 35 次;72℃ 延伸 5 min。扩增反应体系总体积为 50 μL,其中 KOD buffer 25 μL, dNTP 10 μL, ddH₂O 10 μL, KOD 酶 1 μL, 27F 引物 1.5 μL, 1492R 引物 1.5 μL, 基因组 DNA 模板 1 μL。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳检测,将有特异性条带的扩增产物送生工生物(上海)有限公司进行测序。将测定的序列与 Genbank 中已知序列进行 Blast 同源性比对分析,应用 MEGA 6.0 软件采用邻接法构建系统发育进化树,初步进行该拮抗菌株的系统发育学分析。

1.5 抑菌活性测定

将 XZ-2 接种在 LB 液体培养基中,28℃、180 r·min⁻¹ 振荡活化 24 h 备用。采用平板对峙法,在 PDA 平板中央接种蘸取 XZ-2 菌液的滤纸片,以滤纸片为圆心,左右 2.25 cm 接种 2 个供试病原菌菌碟,使病原菌和滤纸片呈三点一线,以不接种 XZ-2 菌液作为对照,每个处理 3 个重复,将接种供试病原菌和 XZ-2 的平板置于 28℃ 培养箱中培养,待对照中两病原菌菌丝长到平板中央时,记录抑菌直径。

2 结果与分析

2.1 XZ-2 生长曲线测定

采用分光光度法测定了 XZ-2 的生长曲线,如图 1 所示,XZ-2 在 4 h 之前为生长迟缓期;在 12 h 左右达到对数生长期,OD₆₀₀ 约为 0.25;12~24 h 为稳定生长期,OD₆₀₀ 为 0.25~0.3;24 h 之后进入到衰亡期,OD₆₀₀ 逐渐下降。

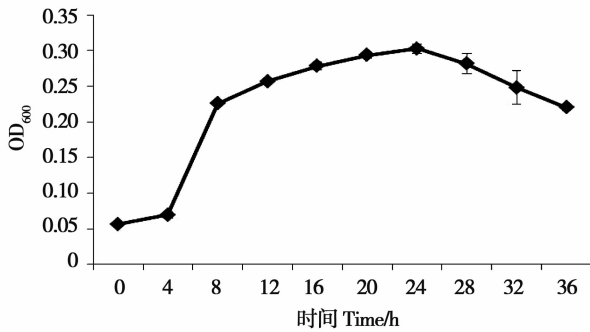


图 1 XZ-2 在 LB 液体培养基中的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of XZ-2 in LB liquid medium

2.2 16SrDNA 扩增及系统进化树的构建

提取 XZ-2 菌株的基因组 DNA,PCR 扩增 16SrDNA 片段,得到大小约为 1 400 bp 的扩增产物,PCR 产物送交测序。采用 MEGA 6.0 构建系统

发育进化树(图 4),结果显示,XZ-2 菌株与多粘类芽孢杆菌聚集成簇,初步将该菌鉴定为多粘类芽孢杆菌。

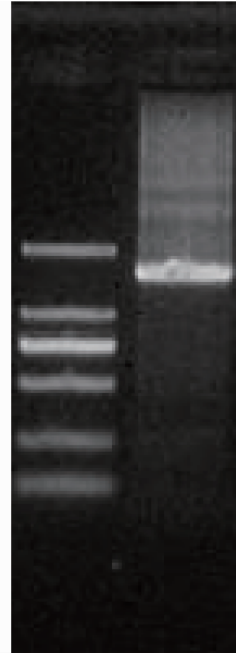


图 2 XZ-2 16SrDNA PCR 扩增产物的电泳图

Fig. 2 Electrophoregrams of 16SrDNA amplified by PCR

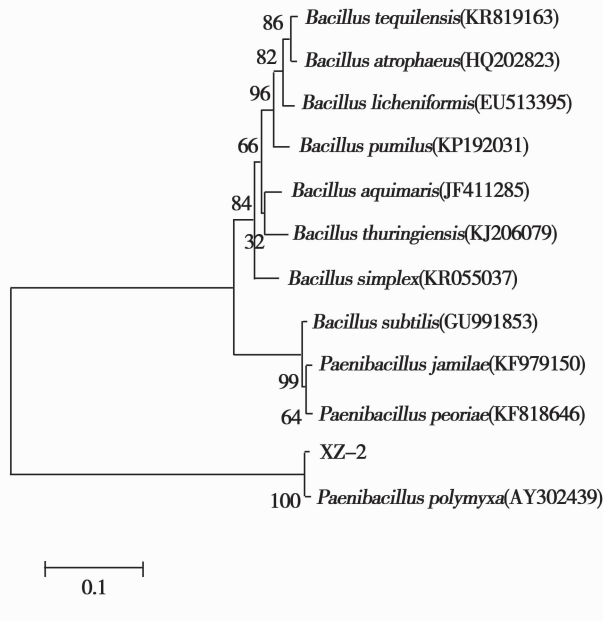


图 3 基于 16SrDNA 序列的 XZ-2 系统发育进化树

Fig. 3 Homology trees of XZ-2 based on sequences of 16SrDNA

2.3 抑菌活性测定

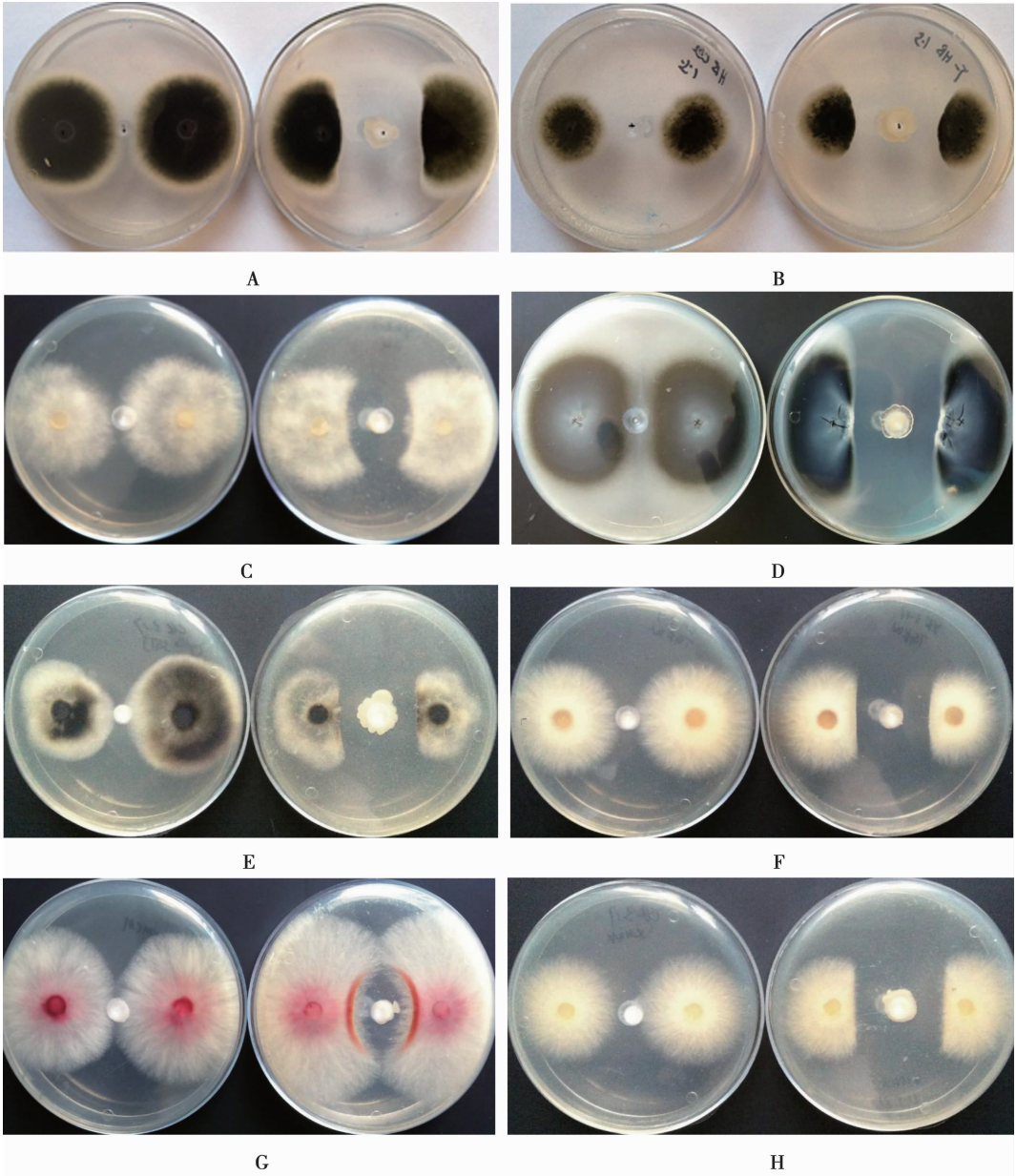
结果显示:XZ-2 对供试的 8 种植物病原真菌均有较强的抑制活性,其中对甘薯黑斑病菌、大蒜叶枯病菌、小麦纹枯病菌以及棉花黄萎病菌的抑菌直径分别为 35.6,31.8,31.8 和 30.3 mm,对丝瓜炭疽

病菌、黄瓜灰霉病菌、甜瓜枯萎病菌和小麦赤霉病菌的抑菌直径分别为 29.0,26.2,25.0 和 21.2 mm (表 1)。抑菌图片如图 2 所示,XZ-2 对 8 种供试植物病原真菌抑制效果很强,均显示出了非常明显的抑菌带(图 2)。

表 1 拮抗细菌 XZ-2 对 8 种植物病原真菌的抑菌活性

Table 1 Inhibitory activities of endophytic bacteria XZ-2 against 8 plant fungal pathogens

病原真菌 Fungal pathogen	平均抑菌带直径 Average width of inhibition zone/mm
大蒜叶枯病菌 <i>Pleospora herbarum</i> (Pers. ex Fr.) Rabenk	31.8
黄瓜灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	26.2
甘薯黑斑病菌 <i>Ceratocystis fimbriata</i> Ellis et Halsted	35.6
丝瓜炭疽病菌 <i>Colletotrichum orbiculare</i>	29.0
甜瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> (Schl.) f. sp. melonis	25.0
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	21.2
小麦纹枯病菌 <i>Rhizoctonia cerealis</i> Vander Hoeven	31.8
棉花黄萎病菌 <i>Verticillium dahliae</i> Kleb	30.3



A:大蒜叶枯病菌;B:甘薯黑斑病菌;C:黄瓜灰霉病菌;D:棉花黄萎病菌;E:丝瓜炭疽病菌;F:甜瓜枯萎病菌;G:小麦赤霉病菌;H:小麦纹枯病菌;各图左边平板为对照,右边平板为XZ-2处理。

A: *Pleospora herbarum*; B: *Ceratocystis fimbriata*; C: *Botrytis cinerea*; D: *Verticillium dahlia*; E: *Colletotrichum orbiculare*; F: *Fusarium oxysporum* (Schl.) f. sp.; G: *Fusarium graminearum*; H: *Rhizoctonia cerealis*; The left plate of each figure was control, and the right one was treated by XZ-2.

图 4 XZ-2 的抑菌活性测定

Fig. 4 Analysis of antibiotic activity of XZ-2

3 讨论

植物内生菌与宿主植物在长期进化过程中形成了密切的互惠共生关系,具有很强的定殖能力,更重要的是很多内生菌可以产生抗菌等多种生物活性物质,以及很多拮抗微生物同时具有对作物的促生作用等特点从而引起越来越多的关注和重视,用植物内生菌防治植物病原菌已成为研究热点。本文从大豆健康植株中分离到一株内生拮抗细菌,经 16SrDNA 片段扩增以及系统发育进化树的构建初步将该细菌鉴定为多粘类芽孢杆菌,对 8 种植物病原真菌的抑菌活性测定结果表明 XZ-2 对 8 种植物病原真菌均具有非常好的抑制效果,说明 XZ-2 具有广谱高效的抑菌活性,本研究初步显示出 XZ-2 具有很好的生防应用前景。针对甘薯黑斑病、大蒜叶枯病、小麦纹枯病以及棉花黄萎病 4 种 XZ-2 在室内表现出很强抑制活性的病害,有必要进一步采用 XZ-2 进行温室盆栽和田间防治效果研究。

大豆病害生物防治方面,温广月等^[14]报道了生防细菌对大豆疫霉病菌的抑制作用和对大豆的促生作用;郭荣君等^[15]筛选的芽孢杆菌 BH1 对于大豆根腐病的温室防效可达 56.1%。XZ-2 分离自大豆植株中,该菌株对大豆疫霉病、大豆花叶病毒病、大豆孢囊线虫病以及大豆炭疽病等大豆生产中的一些主要病害的防控效果研究将是我们下一步需要重点开展的工作;同时,XZ-2 在大豆植株各个组织中的定殖情况、对大豆的促生作用以及 XZ-2 抑菌活性成分的分离鉴定等也有待于进一步的研究。针对 Yim 等^[16]报道生防菌 *Methylobacterium* spp. 可以调控番茄中病程相关蛋白 (pathogenesis-related protein, PRs) 基因的表达,我们还将分期对田间防治中 XZ-2 处理的样品进行 PRs 基因表达分析,以期研究 XZ-2 的生防机理奠定基础。

参考文献

[1] Chi E H, Suk Y K, Jeong M P. Biocontrol activity of *Paenibacillus polymyxa* AC-1 against *Pseudomonas syringae* and its interaction with *Arabidopsis thaliana* [J]. *Microbiological Research*, 2016, 185: 13-21.

[2] Timmusk S, Grantcharova N, Wagner E G. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 7292-7300.

[3] Ji X L, Lu G B, Gai Y P, et al. Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 65: 565-573.

[4] Sturz A V, Christie B R, Nowak J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2000, 19(1): 1-30.

[5] 杨海莲, 孙晓璐, 宋未. 植物内生细菌的研究 [J]. *微生物学通报*, 1998, 25(4): 224-227. (Yang H L, Sun X L, Song W. The research about plant endophytes [J]. *Microbiology China*,

1998, 25(4): 224-227.)

[6] 程晓兰, 程智慧, 邹燕. 大蒜叶枯病抗性鉴定方法的筛选 [J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(1): 26-30. (Cheng X L, Cheng Z H, Zou Y, et al. The selection of garlic tip blight resistant methods [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2010, 29(1): 26-30.)

[7] 岳东霞, 张要武, 韩桐华. 盐胁迫下芽孢杆菌对黄瓜灰霉病的防治作用 [J]. *华北农学报*, 2011, 26(1): 196-199. (Yue D X, Zhang Y W, Han T H. Biological suppression of grey mold of cucumber by *Bacillus* RC1 under saline soil conditions [J]. *Acta Agriculturae Boreali-sinica*, 2011, 26(1): 196-199.)

[8] 杨冬静, 孙厚俊, 赵永强. 甘薯黑斑病菌的生物学特性研究及室内药剂筛选 [J]. *西南农业学报*, 2013, 6(26): 2336-2339. (Yang D J, Sun H J, Zhao Y Q, et al. Biological characteristics of *ceratocystis fimbriata* and selection of fungicides in laboratory [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 6(26): 2336-2339.)

[9] 赵杰, 庄隽怡, 唐亚芹, 等. 甜瓜枯萎病菌的生物学特性及防治药剂的室内筛选 [J]. *上海农业学报*, 2010, 26(1): 129-132. (Zhao J, Zhuang J Y, Tang Y Q, et al. Biological characteristics of muskmelon *fusarium* pathogen and indoor screening of fungicides [J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2010, 26(1): 129-132.)

[10] Luo Q Q, Xu J Q, Hou Y P. PIRA-PCR for detection of *Fusarium graminearum* genotypes with moderate resistance to carbendazim [J]. *Plant Pathology*, 2009, 58(5): 882-887.

[11] 齐永志, 李海燕, 苏媛, 等. 小麦纹枯病菌对噻唑酰胺的敏感性及其抗性突变体的主要生物学性状 [J]. *农药学报*, 2014, 16(3): 271-280. (Qi Y Z, Li H Y, Su Y, et al. Sensitivity to trifluzamide and main biological characteristics of resistant mutants of *Rhizoctonia cerealis* [J]. *Chinese journal of pesticide science*, 2014, 16(3): 271-280.)

[12] 王全, 王占利, 高同国, 等. 响应面法对解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 12-7 产抗菌蛋白条件的优化 [J]. *棉花学报*, 2016, 28(3): 283-290. (Wang Q, Wang Z L, Gao T G, et al. Antagonistic protein producing condition optimization of antagonistic strain *bacillus amyloliquefaciens* 12-7 against *verticillium dahliae* kleb. Using response surface methodology [J]. *Cotton Science*, 2016, 28(3): 283-290.)

[13] Lane D J. 16S/23S rRNA sequencing [M]//Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic acids techniques in bacterial systematics*. chichester. America: John Wiley & Sons, 1991: 115-147.

[14] 温广月, 许艳丽, 李春杰, 等. 6 株生防细菌对大豆根腐病防治效果的初步评价 [J]. *大豆科学*, 2005, 24(2): 121-125. (Wen G Y, Xu Y L, Li C J, et al. Evaluation of six potential biocontrol against soybean root rot [J]. *Soybean Science*, 2005, 24(2): 121-125.)

[15] 郭荣君, 刘杏忠, 杨怀文, 等. 芽孢杆菌 BH1 防治大豆根腐病的效果及机制 [J]. *中国生物防治*, 2003, 19(4): 180-184. (Guo R J, Liu X Z, Yang H W, et al. Mechanism of rhizobacteria BH1 (*Bacillus* sp.) to suppress soybean root rot disease caused by *fusarium* spp [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2003, 19(4): 180-184.)

[16] Yim W J, Kim K Y, Lee Y W, et al. Real time expression of ACC oxidase and PR-protein genes mediated by *Methylobacterium* spp. in tomato plants challenged with *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171: 1064-1075.