

魔芋内生拮抗菌的筛选及鉴定

程海丽, 潘虹, 陈磊, 乐超银*

(三峡大学 生物技术研究中心, 湖北 宜昌 443002)

摘要: 为了从魔芋组织中筛选得到有效抑制魔芋软腐病菌的内生拮抗菌, 采用组织块法从魔芋块茎中分离到 15 株内生细菌, 通过菌株发酵上清液抑菌试验筛选拮抗菌株, 发现其中 5 株对魔芋软腐病具有拮抗作用, 占所筛内生菌的 33%, BS-4、5、8 的抑菌圈较大, 直径在 14~16 mm。魔芋块茎感病试验发现, 抑菌活性较高的 BS-8 菌株发酵上清液能在一定程度上抑制魔芋块茎感病, 经生理生化 and 16S rRNA 基因序列分析鉴定, 证实 BS-8 菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。BS-8 菌株对魔芋软腐病菌具有很好的拮抗性, 可作为一种新的植物生防制剂或工程菌进行更进一步的研究。

关键词: 魔芋; 内生拮抗菌; 筛选; 鉴定; 枯草芽孢杆菌

中图分类号: S435.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)03-0081-05

Screening and Identification of Endogenous Antagonistic Bacteria in *Amorphophalms konjac*

CHENG Hai-li, PAN Hong, CHEN Lei, YUE Chao-yin*

(Biotechnology Research Center of China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract: In this research, endogenous antagonistic bacteria which can effectively inhibit the growth of soft rot pathogen were screened from konjac tissues. Fifteen endogenous bacteria strains were screened by means of tissue method. Five strains were confirmed to have resistance to soft rot disease, three (BS-4, 5, 8) of which were observed with relatively bigger bacteriostasis circles, with diameter of 14—16 mm. The inoculation of pathogen on konjac corm indicated that the fermentation supernatant of BS-8, a strain with relatively higher inhibitory activity, could inhibit the infection of soft rot. The strain was identified as a kind of *Bacillus subtilis* by means of the analysis of physiology and biochemistry and 16S rRNA gene sequence. The BS-8 strain exhibits an obvious antagonism on soft rot pathogen and can be served as a novel plant biocontrol agent or engineering bacterium for further study.

Key words: *Amorphophalms konjac*; endophytic antagonistic bacteria; screening; identification; *Bacillus subtilis*

魔芋作为一种经济作物, 具有广阔的市场和很高的药用、食用价值, 且具有降血压、降血脂功能和低脂肪、高纤维特性。魔芋软腐病的发生和蔓延在一定程度上阻碍了魔芋产业的发展, 严重时造成大面积绝收。国内外大多采用综合防治措施防治魔芋软腐病, 其能在一定程度上减轻病害的发生, 但效果

不是很理想, 不能有效阻止软腐病的蔓延及从根本上解决病源。另外, 长期使用化学合成农药, 不仅会引发病菌产生耐药性, 还会污染环境, 危及食品安全和人类健康。

随着人们对生态农业认识的加深, 生物防治已成为国内外学者的研究热点^[1]。生物防治有利于人

收稿日期: 2013-07-15

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2011CDB184); 宜昌市科学技术研究与开发项目(A09302-17)

作者简介: 程海丽(1988-), 女, 湖北黄冈人, 在读硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: hl19880301@163.com

* 通讯作者: 乐超银(1968-), 女, 湖北宜昌人, 教授, 博士, 主要从事基因工程与植物生物防治研究。E-mail: yuechaoyin@163.com

畜安全及环境保护,不仅成本低廉,且兼防兼治、增产增收,是一种无公害植保新技术,备受人们青睐^[2]。植物内生菌是指在植物生长的一定或全部阶段生活在植物体内,但不表现出外在性状的一类微生物,通常存在于细胞间隙^[3-4]。植物内生菌作为生防因子的优势主要表现在它能定殖于植物体内,相对于其他环境微生物而言,避免了多种外界压力的干扰,更有利于发挥生防效果。目前,关于魔芋内生菌定殖体内的生防效果研究很少。因此,筛选和鉴定具有拮抗魔芋软腐病的内生细菌,以期通过生防途径治理软腐病提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、酶及魔芋块茎 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 和健康魔芋块茎由三峡大学生物技术研究中心保存和提供;pMD19-T载体和Taq酶为TaKaRa公司产品;T4连接酶为Fermentas公司产品。

1.1.2 仪器和试剂 主要仪器:PCR仪(PTC-220)购自美国MJ RESEARCH公司;水平电泳仪(DYY-6C)购自北京六一公司;凝胶自动成像系统购自美国BIO-RAD公司;5810低温高速离心机购自德国Eppendorf公司;普通冰箱和BCD-258K超低温冰箱购自中国Haier公司;高压灭菌锅(SS-325)购自日本TOMY公司;BioPhotometer Plus核酸蛋白测定仪购自德国Eppendorf公司;电子天平购自METTLER TOLEDO公司。

主要试剂:0.1 mol/L CaCl₂溶液、CTAB提取缓冲液、NaCl、3% H₂O₂、马尿酸盐、硫化氢、葡萄糖、柠檬酸盐、叠氮化钠等。

1.1.3 培养基 (1)牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏3 g,NaCl 5 g,蛋白胨10 g,H₂O 1 000 mL,pH值7.0~7.2,琼脂粉15~20 g。(2)LB培养基:蛋白胨10 g,酵母提取物5 g,NaCl 10 g,H₂O 1 000 mL,pH值7.0~7.2,琼脂粉15~20 g。

1.2 方法

1.2.1 魔芋内生菌的分离 取多年生健康魔芋块茎,清洗表面的泥沙,削皮,流水冲洗20 min,在无菌操作台上依次用75%乙醇浸泡1 min,无菌水冲洗4~5次,0.1%升汞浸泡处理10 min,无菌水冲洗3次,取最后一次冲洗液100 μ L涂布于牛肉膏蛋白胨培养基上,37 $^{\circ}$ C下培养2 d,检验表面灭菌情况。

取表面灭菌材料,切成1.0 cm \times 0.5 cm块状,

放置于牛肉膏蛋白胨培养皿中,37 $^{\circ}$ C培养1~2 d,待魔芋块周围长出菌落后,根据菌落形态、颜色、干湿度等挑取菌落进行划线分离纯化,将纯化的菌种进行保藏。

1.2.2 魔芋内生拮抗菌的筛选 采用菌株发酵上清液抑菌试验筛选对魔芋软腐病菌有拮抗作用的内生菌。取75 μ L软腐病菌悬液涂布于牛肉膏蛋白胨培养基平板上,待菌液完全被吸收后用孔径为10 mm的打孔器在平板上均匀打孔,将内生菌株发酵液以8 000 r/min离心10 min,每个孔内加入150 μ L内生菌发酵上清液,30 $^{\circ}$ C培养过夜,次日观察有无抑菌圈产生。

将上述平板上显示有抑菌圈的菌株发酵液进行魔芋块茎感病试验。将魔芋表面洗净,用75%乙醇进行表面消毒,在无菌条件下切成大小一致的小块,放入垫有滤纸的培养皿中,加1 mL无菌水在滤纸上,保持平板湿度,在魔芋块中央按一定的比例接入病原菌悬浮液和拮抗菌发酵上清液(1:1、1:2、1:3),同时设置阴性对照(单接无菌水)、阳性对照(单接病原菌悬浮液)和单接拮抗菌发酵上清液3个处理,将平板置于30 $^{\circ}$ C培养箱中,定期观察魔芋块发病情况。

1.2.3 魔芋内生拮抗菌的鉴定

1.2.3.1 菌落和菌体形态观察 将菌株接种于牛肉膏蛋白胨固体培养基上,30 $^{\circ}$ C恒温培养18~24 h,观察菌落的形态、颜色、光泽度、边缘特征、表面特征等。同时挑取少许菌进行革兰氏染色,在光学显微镜下观察菌体的形态、有无芽孢及其芽孢位置等^[5-6]。

1.2.3.2 菌株的生理生化鉴定 具体方法参照文献^[7]。

1.2.3.3 菌株的16S rRNA基因鉴定 细菌DNA的提取采用CTAB法^[8]。根据芽孢杆菌保守区域序列设计引物^[9],由上海生工生物工程有限公司合成。内生细菌16S rRNA基因的PCR扩增体系(25 μ L):DNA模板0.5 μ L(30 ng),10 \times PCR Buffer 2.5 μ L,10 mmol/L dNTP 2.0 μ L,10 μ mol/L的Primer 1和Primer 2各0.5 μ L,Taq酶(2.5 U/ μ L)0.5 μ L,ddH₂O 18.5 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,53 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,35个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳,采用上海生工生物工程有限公司的UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒回收目的基因片段。回收产物与载体pMD19-T在16 $^{\circ}$ C连接过夜,将连接产物转化大肠杆菌DH5 α ,稍加离心浓缩,涂布于含有氨苄青霉素

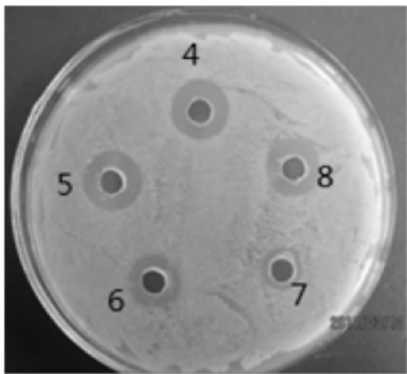
(Amp)的 LB 固体培养基上,倒置于 37 ℃ 培养箱中培养过夜。挑取平板上的单菌落进行 PCR 扩增,根据扩增的结果选择阳性转化子,接种于含有相应抗生素的 LB 液体培养基中,37 ℃ 振荡培养过夜,将菌液送至上海生工生物工程有限公司进行测序。

将内生菌株的 16S rRNA 基因序列输入 NCBI 网站进行 BLAST 比对,选取同属和不同属的模式菌株序列,对菌株 16S rRNA 基因序列构建系统发育树,结果由 MEGA 软件显示。

2 结果与分析

2.1 内生拮抗菌的初筛结果及形态观察

根据菌落形态、颜色、干湿度等初步分析,从魔芋组织块边缘分离纯化出 15 株不同的内生细菌。以魔芋软腐病菌为指示菌,进行内生菌发酵液抑菌试验,根据抑菌圈的大小判断,5 株内生菌对魔芋软腐病菌具有拮抗作用(图 1),占所筛菌株的 33%。其中 BS-4、5、8 菌株发酵液抑菌圈相对较大,直径分别为 14 mm、15 mm、14 mm。对 BS-5 和 BS-8 菌株连续 6 d 取样测定抑菌活性,其均有抑菌圈产生,直径在 14~16 mm。3 株内生菌的菌落形态观察结果见表 1;经番红简单染色后,置光学显微镜下观察,菌体均为杆状、产芽孢。



4、5、6、7、8 为筛选的内生菌
图 1 内生菌发酵上清液抑菌试验结果

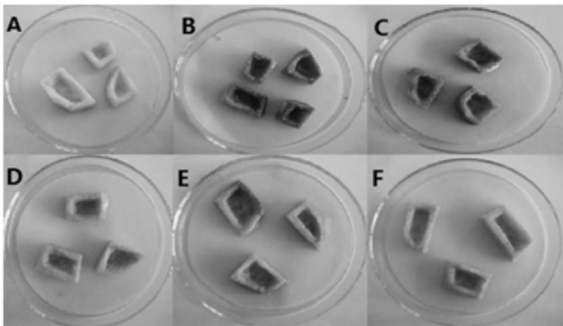
表 1 内生菌菌落形态观察结果

内生菌	菌落表面	边缘	颜色	湿度
BS-4	突脐状,有褶皱	伞状	土黄	湿
BS-5	扩展状	波状	白	干
BS-8	缺刻状,有褶皱	波状	土黄	湿

2.2 内生拮抗菌魔芋块茎感病试验结果

将内生拮抗菌 BS-4、BS-5、BS-8 发酵上清液和魔芋软腐病菌悬浮液按一定比例加入魔芋块中央,3~5 d 后观察魔芋块的发病情况,其中加入 BS-8 发

酵上清液的魔芋块发病较轻且重复性好。单接无菌水的魔芋块(A)未出现变黑变软的迹象;单接软腐病菌悬浮液的魔芋块(B)则严重变黑变软,同时散发出一股浓烈的臭味;单接 BS-8 发酵上清液的魔芋块(F)由白色变成淡黄色,魔芋块未变软;当软腐病菌与发酵上清液比例为 1:1(C)和 1:3(E)时,魔芋块轻微变黑和变软,当两者比例为 1:2 时(D),魔芋块只是变黄而未变黑和变软(图 2)。结果表明:BS-8 菌株发酵上清液能在一定程度上抑制魔芋块茎感病。



A 代表阴性对照(单接无菌水); B 代表阳性对照(单接软腐病原菌);
C、D、E 代表软腐病菌和发酵上清液的比例分别为
1:1、1:2、1:3; F 代表单接发酵上清液

图 2 拮抗菌 BS-8 的魔芋块茎感病试验结果

2.3 内生拮抗菌 BS-8 的生理生化鉴定结果

由表 2 可以看出,菌株 BS-8 的生理生化试验结果与枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌有很大的相似性,但 BS-8 菌株的 V-P 试验呈现阳性,地衣芽孢杆菌则呈现阴性;BS-8 菌株对苯丙氨酸和柠檬酸的利用呈现阴性,而枯草芽孢杆菌则呈现阳性。因此,初步认为 BS-8 菌株为芽孢杆菌属细菌。

表 2 菌株 BS-8 与其他芽孢杆菌的生理生化
试验结果比较

生理生化试验	BS-8 菌株	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌
革兰氏反应	阳性	阳性	阳性
细胞形态	杆状/有芽孢/中生	杆状/有芽孢/中生	杆状/有芽孢/中生
伴胞晶体	无	无	无
鞭毛	少量	少量	少量
厌氧生长	+	+	+
耐酸碱度(pH 值 5.7)	+	+	+
耐 NaCl(7%以上)	+	+	+
接触酶试验	+		
V-P 试验	+	+	-
淀粉水解试验	+	+	+
纤维素水解试验	-		
硝酸盐还原试验	+	+	+
吲哚产生试验	+		
苯丙氨酸脱氨酶试验	-	+	-

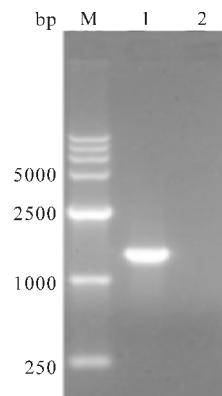
续表 2 菌株 BS-8 与其他芽孢杆菌的生理生化试验结果比较

生理生化试验	BS-8 菌株	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌
石蕊牛奶试验	+(胨化)		
马尿酸盐水解	—		
明胶液化	+		
H ₂ S 试验	+		
葡萄糖产酸试验	+	+	+
柠檬酸盐利用试验	—	+	+
对叠氮化钠利用试验	—	—	—

注：“+”表示阳性，“—”表示阴性。

2.4 内生拮抗菌 BS-8 的 16S rRNA 基因鉴定结果

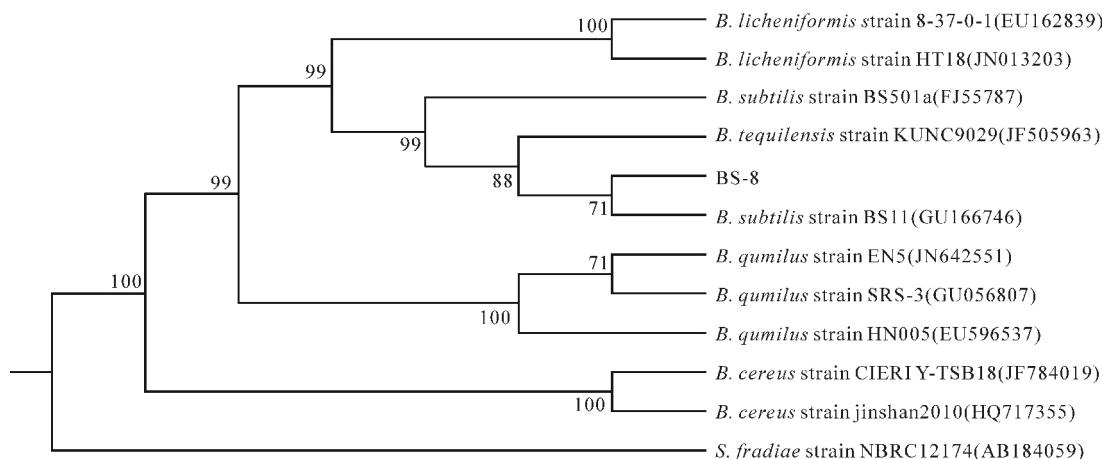
根据芽孢杆菌 16S rRNA 基因保守序列设计引物,以 BS-8 菌株 DNA 为模板,PCR 扩增相应目的条带,如图 3 所示,在 1 500 bp 左右产生明显的条带,条带清晰且单一,与预期目标大小一致。



M, Marker 15000; 1, BS-8 菌株; 2, 阴性对照

图 3 BS-8 菌株 16S rRNA 基因扩增产物电泳图谱

由图 4 可知,内生芽孢杆菌 BS-8 与 GenBank 上枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BS11 (登录号: GU166746) 处于同一分支,利用 DNAMAN 软件进行序列比对,发现两者的相似性高达 99.64%,说明该内生拮抗菌属于枯草芽孢杆菌。



各分支结点处的数据表示两分支间同源可信度的百分数

图 4 内生芽孢杆菌 BS-8 的 16S rRNA 基因系统发育树

3 结论与讨论

本试验采用组织块法从魔芋块茎中分离到 15 株内生细菌,其中 5 株对魔芋软腐病具有拮抗作用,占所筛菌株的 33%。其中 BS-4、5、8 菌株发酵液抑菌圈相对较大,直径为 14~16 mm,光学显微镜下观察其菌体均为杆状、产芽孢。经魔芋块茎感病试验观察到,BS-8 菌株的发酵上清液能在一定程度上抑制魔芋块茎感病,经生理生化试验和 16S rRNA 基因分析鉴定,证实 BS-8 菌株为枯草芽孢杆菌。

植物内生菌的筛选方法有研磨法和组织块法。在分离植物内生菌过程中,最佳的表面灭菌和分离培养条件是筛选内生菌的关键,表面灭菌不彻底会

造成所分离的菌株不是内生菌,而过度的表面灭菌会造成部分内生菌被杀死,最佳的培养条件能最大限度获得较多的内生菌。在检测表面灭菌是否彻底时,常采用组织印迹检测和最后一次洗涤液检测 2 种方法,初步验证所筛菌株不是杂菌^[10]。本试验采用组织块法分离魔芋内生菌,仅获得 15 株,与其他一些植物如马铃薯^[11]、烟草^[12]、辣椒^[13]等中筛选出 100 多株相比,筛选的内生菌较少,可能与魔芋表面消毒、魔芋本身较高的葡甘聚糖含量等有关。葡甘聚糖具有较强的成膜性,所形成的膜屏障能阻碍 O₂ 的流通,通常应用于果蔬保鲜,具有防腐作用^[14-15]。分析可能是葡甘聚糖的这种特性使得在分离魔芋内生菌时存在一定的难度,导致不能 (下转第 88 页)

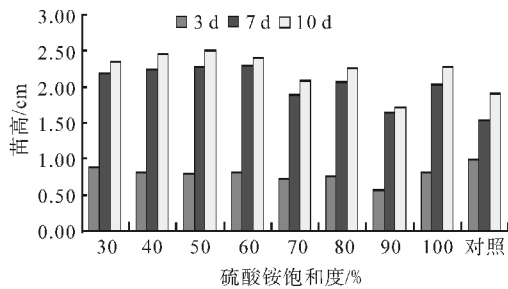


图 6 不同硫酸铵盐析蛋白质溶液对小白菜苗高的影响

综上可知,桃褐腐病菌蛋白的硫酸铵盐析组分中大多数对小白菜的根长和苗高具有较好的促进作用,而对小白菜的发芽率没有明显的促进作用。其中,硫酸铵饱和度为 40%、50%、60% 3 个处理对小白菜根长和苗高的促进作用均比较明显,并且 40% 处理对小白菜的发芽率也有一定的促进作用。说明在饱和度为 40%、50%、60% 的硫酸铵盐析得到的桃褐腐病菌蛋白组分中含有对小白菜生长具有促进作用的激活蛋白。

3 结论与讨论

本试验采用硫酸铵盐析的方法对桃褐腐病菌的总蛋白进行了粗分离,并分析了各盐析组分对小麦和小白菜种子发芽和生长的影响,结果表明:硫酸铵饱和度为 60% 时,桃褐腐病菌蛋白质量浓度最高,可达 1 403.0 $\mu\text{g/mL}$,饱和度为 100% 的硫酸铵盐析得到的桃褐腐病菌蛋白质量浓度最低,仅为 197.6 $\mu\text{g/mL}$ 。

在各种分离到的蛋白组分中,饱和度为 40%、50%、60% 的硫酸铵盐析得到的蛋白组分对小麦和小白菜种子的发芽和生长具有促进作用,说明这些组分中含有对小麦和小白菜生长具有促进作用的激活蛋白。

前人的研究表明,激活蛋白大多为 15~60 kD 的蛋白质或糖蛋白,其通过植物信号转导,引起一系列与植物生长和抗病相关的酶活变化,从而表现抗病增产作用^[7]。因此,为了更好地利用桃褐腐病菌的激活蛋白,还需要对其纯化方法和诱导抗病促生的机制做进一步研究。

参考文献:

- [1] 邱德文,杨秀芬. 蛋白质农药研究与进展[J]. 农药论坛,2007(3):13-15.
- [2] 吴林森. 生物农药发展现状与加大研发力度的探讨[J]. 中国林副特产,2005(3):78.
- [3] 邱德文. 植物免疫与植物疫苗——研究与实践[M]. 北京:科学出版社,2008.
- [4] 邱德文. 微生物蛋白农药研究进展[J]. 中国生物防治,2004,20(2):91-94.
- [5] 张云华,邱德文,张立军,等. 灰葡萄孢菌激活蛋白 PE-BC2 的生物功能[J]. 植物保护学报,2008,35(2):123.
- [6] 徐锋,杨勇,谢馥交,等. 稻瘟菌激活蛋白对植物生长及其生理活性的影响[J]. 华北农学报,2006,21(5):1-5.
- [7] Chen M, Zeng H, Qiu D, et al. Purification and characterization of a novel hypersensitive response-inducing elicitor from *Magnaporthe oryzae* that triggers defense response in rice[J]. PLoS ONE, 2012, 7(5):e37654.

(上接第 84 页) 有效分离魔芋体内的全部内生菌,这其中还包括一些不能培养的内生菌。

参考文献:

- [1] 薛婷,李喜宏,陈丽,等. 蒜薹采后灰霉病害及生防拮抗菌的筛选研究[J]. 食品科学,2006,27(6):220-222.
- [2] 姜钰,董怀玉,徐秀德,等. 放线菌在植病生防中的研究进展[J]. 杂粮作物,2005,25(5):329-331.
- [3] Schmeda-Hirschmann G, Hormazabal E, Rodriguez J A, et al. Cycloaspeptide and pseurotin A from the endophytic fungus *Penicillium* [J]. Z Naturforsch, 2008, 63(5/6):383-388.
- [4] Azevedo J L, Araujo W L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plant [M] // Ganguli B N, Deshmukh S K. Fungi: Multifaceted microbes. Boca Raton: CRC Press, 2007:189-207.
- [5] 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,2005:16-120.
- [6] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海:复旦大学出版社,1990:60-65.
- [7] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科

- 学出版社,2001:265-270.
- [8] 申煌煌,李刚. 分子生物学实验方法与技巧[M]. 广州:中山大学出版社,2010:134-135.
- [9] 刘海军,乐超银,邵伟,等. 一株高产蛋白酶芽孢杆菌的鉴定[J]. 中国酿造,2009(9):18-20.
- [10] 何佳,刘笑洁,赵启美,等. 植物内生真菌分离方法的研究[J]. 食品科学,2009,30(15):180-183.
- [11] Lahlali R, Hijri M. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants[J]. Research Letter, 2010, 311:152-159.
- [12] Long H H, Sonntag D G, Schmidt D D, et al. The structure of the culturable root bacterial endophyte community of *Nicotiana attenuata* is organized by soil composition and host plant ethylene production and perception[J]. New Phytologist, 2010, 185(2):554-567.
- [13] 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.
- [14] 张佳琪,黄灏,吕远平,等. 改性魔芋葡甘聚糖涂膜在果蔬保鲜上的应用研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(23):14350-14351,14356.
- [15] 张忠良,鲁周民,李文华. 魔芋葡甘聚糖在板栗保鲜中的应用[J]. 中国农学通报,2005,21(2):83-84.