

芦荟内生细菌 LH-01 的鉴定及对病原菌抑菌活性的研究

唐 凝, 赵盛楠, 裴冬丽*

(商丘师范学院生物与食品学院/植物与微生物互作河南省高校重点实验室, 河南 商丘 476000)

摘 要:以库拉索芦荟(*Aloe barbadensis*)为试验材料, 采用平板划线分离法、平板对峙法, 分离芦荟内生细菌并研究其对病原菌葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)、串珠镰刀菌(*Fusarium verticillioides*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、枯萎菌(*Fusarium oxysporum*)和黄萎菌(*Verticillium dahliae*)等的抑菌活性。结果表明, 筛选出的芦荟内生菌株 LH-01 对 5 种病原菌的抑菌率均超过 74%。结合生理生化特征、细胞形态特征、菌落形态特征、16S rDNA 分子鉴定和系统发育分析, 菌株 LH-01 鉴定为枯草芽孢杆菌类群(*Bacillus subtilis* subsp.)的 *Bacillus tequilensis*。

关键词:库拉索芦荟; 内生细菌; 枯草芽孢杆菌; 抑菌活性

中图分类号: Q938.1

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)05-0053-04

Isolation of Endophytic Bacteria LH-01 from *Aloe barbadensis* and Study of the Antibacterial Activity

TANG Ning, ZHAO Shengnan, PEI Dongli*

(Department of Biology and Food Science, Shangqiu Normal University/Key Laboratory of Plant-Microbe Interactions in Henan Province, Shangqiu 476000, China)

Abstract: Strains of endophytic bacteria with antibacterial activity were isolated from *Aloe barbadensis* by the streak plate method and dual-culture inhibition. *Botryosphaeria dothidea*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae* were selected for the antifungal experiment. Inhibition rates for the of LH-01 strain to 5 fungi were all more than 74%. LH-01 strain was identified as *Bacillus tequilensis* through the physiological and biochemical characteristics, cellular and strain morphology, 16S rDNA molecular identification and phylogenetic analysis.

Key words: *Aloe barbadensis*; Endophytic bacteria; *Bacillus subtilis*; Antifungal activity

植物内生菌是在特定阶段或全部生命阶段生活于植物体内, 能普遍存在植物体内, 分布在各器官、各组织的细胞和细胞间隙对植物生长无明显损害, 并与植物建立和谐关系的一类微生物^[1]。植物内生菌既是重要的微生物资源, 也是发现新型天然活性物质的宝贵资源。因此, 对植物内生菌资源的开发与应用是微生物学、植物学、药用植物学、生态学等众多研究领域的热点。

药用植物内生菌是一类存在于植物体内特定环境, 与宿主长期进化、共生, 形成稳定的互利关

系, 并且能产生与宿主植物代谢相同或相似的活性物质, 与药用植物共同作用完成特定功效的一类微生物^[2]。从药用植物体内分离到的拮抗内生菌被多次报道, 从人参中分离 221 株内生细菌中筛选出 3 株致人参根腐病的核盘菌(*Sclerotinia ginseng*)的拮抗菌 Psn52、Psn61 及 Psn214, 抑菌率分别达 80%、68%、76%^[3]。从枸骨(*Ilex cornuta*)不同组织中分离得到 4 个属共 7 种对烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)和稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)具有明显抑制效果的内生细菌^[4]。因此, 对药用植物内生菌的研究、开发和利用, 是进一步挖掘药用资源、提升药用价值的重要手段。

芦荟(*Aloe vera*)为百合科芦荟属多年生草本植物, 作为生药具有 1 000 多年的应用历史。芦荟有护肤保健、消炎抗菌、愈合伤口、抗击癌症的功

收稿日期: 2019-11-01

基金项目: 河南省科技攻关项目(222102110003); 河南省高等学校重点科研项目(23A210029)

作者简介: 唐 凝(1992-), 男, 助理实验师, 硕士, 主要从事微生物生物技术与植物保护科研工作。

通讯作者: 裴冬丽, 女, 博士, 教授, E-mail: peidongli@126.com

效^[5]。芦荟种类繁多,芦荟属中已发现的种有500余个^[6]。其中库拉索芦荟(*Aloe barbadensis*),又称翠叶芦荟或美国芦荟,原产于中美洲西印度群岛的巴巴多斯岛,其组织中富含芦荟大黄素、芦荟酐、芦荟素A等抗菌化合物,具有较高的药用价值^[6-8]。为进一步提升芦荟的药用价值、发掘其内生菌资源,本试验从河南库拉索芦荟中筛选分离具较强抑菌活性的内生细菌并进行鉴定和抑菌机理的初步探索,旨在为植物内生细菌资源的开发和利用以及植物病原菌的生物防治提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 供试植物与菌株

河南省商丘师范学院温室大棚种植的健康库拉索芦荟。

葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)由河南省植物与微生物互作重点实验室提供,串珠镰刀菌(*Fusarium verticillioides*)和禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)由河南农业大学提供,枯萎病原菌(*Fusarium oxysporum*)和黄萎病原菌(*Verticillium dahliae*)由中国农业科学院棉花研究所提供,以菌核的形式保藏在冰箱中。

1.2 内生菌的分离、纯化

将新鲜的芦荟叶片用自来水冲洗干净,滤纸吸干水分,切成小块转入超净工作台。无菌水冲洗4~5次,75%酒精处理30 s,无菌水冲洗3次,2%次氯酸钠漂洗60 s,无菌水冲洗4~5次^[5]。将表面消毒后的叶片用灭菌研钵研碎,采用无菌水稀释涂布和平板划线分离法进行内生细菌的分离。将纯化分离的细菌于25%的甘油管-20℃保存备用。

1.3 内生菌的抑菌试验

采用平板对峙法进行抑菌试验,选取葡萄座腔菌、串珠镰刀菌、禾谷镰刀菌、枯萎病原菌和黄萎病原菌为指示菌株。

初筛试验方法:无菌条件下,将活化后长满平板的病原真菌用直径为5 mm的打孔器切取,接种于PDA(马铃薯葡萄糖培养基)平板上。在距离中心2.5 cm处接种纯化后的内生细菌,每皿3个重复,接种点成等边三角形。

复筛试验方法:将初筛试验中抑菌效果明显的细菌菌株进行摇瓶培养,用滤膜过滤得到无菌发酵液,涂布在PDA平板上,打孔接种指示真菌,以不涂布发酵液直接接种真菌的菌落为对照组。接种后每隔24 h观察,直到长满平板。测量方法:量取试验组与对照组病原真菌最大直径,计

算当日抑菌率。结果取抑菌率中的最大值^[4,9]。

抑菌率=[(对照菌落直径—处理菌落直径)/对照菌落直径]×100%

1.4 内生细菌的形态及生理生化特性鉴定

参照《伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)》^[9-10]和《常见细菌系统鉴定手册》^[11],进行显微形态和菌落形态的观察和记录。采用KOH裂解法^[12]和甲基红、接触酶、吲哚试验^[13],进行革兰氏细菌分类鉴定和多种生理指标验证。

1.5 16SrDNA基因PCR扩增和系统发育分析

采用CTAB法提取内生细菌全基因组DNA组。PCR选用细菌16S rDNA通用引物,正向引物为27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物为1492R:5'-GGTTACGTTACGACTT-3'。扩增体系为50 μL,包括2×PCR Mix 25 μL, ddH₂O 15 μL, DNA模板5 μL, 27F 2.5 μL, 1492R 2.5 μL。PCR扩增程序首先为94℃变性5 min,然后94℃变性40 s, 53℃复性60 s, 72℃延伸90 s,重复35个循环,72℃延伸10 min^[14]。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,并将其产物送南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。测序结果上传GenBank进行BLAST比对,用Clustal-X1.81进行序列相似性分析,MEGA6.0构建系统发育树,采用Neighbor-joining法构建和Bootstrap(重复1 000次)进行检验。

2 结果与分析

2.1 内生菌的抑菌试验

将表面消毒研碎的新鲜芦荟稀释涂布LB平板,随机挑选形态不同的单菌落进行划线分离与纯化,获得37株内生细菌。采用指示菌株进行抑菌试验,抑菌试验初筛效果明显的菌株编号为LH-01~LH-10。进一步进行复筛试验,统计复筛抑菌率,LH-01菌株抑菌活性最为明显。复筛抑菌率见表1。

表1 菌株LH-01抑菌试验复筛数据表

编号	病原菌名称	复筛抑菌率(%)
1	葡萄座腔菌	76.0
2	串珠镰刀菌	75.0
3	禾谷镰刀菌	75.3
4	枯萎病原菌	74.6
5	黄萎病原菌	75.0

2.2 菌株菌落形态观察及生理生化试验

LH-01菌落形态见图1,生理生化结果见表

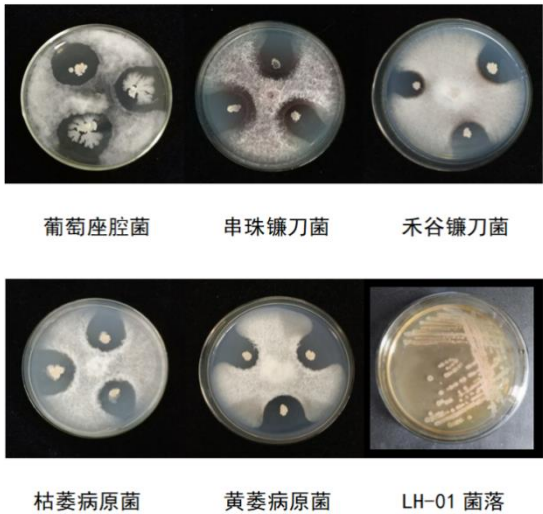


图1 菌株 LH-01 初筛抑菌试验

2. LH-01 菌株在 LB 固体培养基上菌落形态为淡黄色透明、干燥或湿润,综合分析菌落形态和生理生化指标符合枯草杆菌属细菌特征。

表2 菌株生理生化试验结果及细胞特征

生化试验	标准菌株 (枯草芽孢杆菌)	LH-01
菌落形态	淡黄色、湿润、透明	淡黄色、湿润、透明
芽孢	+	+
菌体形态	杆状	杆状
革兰氏试验	阳性	阳性
甲基红试验	红色	红色
接触酶试验	有气泡	有气泡
吡啶试验	红色	红色
荧光试验	+	+

2.3 内生菌 LH-01 分子鉴定

对菌株 LH-01 菌株的 16S rDNA 进行提取、PCR 扩增,获得单一的条带,凝胶电泳图谱见图 2。LH-01 菌株的 16S rDNA 测序结果长度为 1 415 bp。将序列上传 NCBI 与 GenBank 数据库序列比对,与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus tequilensis*) (AYTO01000043) 的相似度为 99.93%。通过 Genbank 数据比对,进行系统发育分析(见图 3),分离

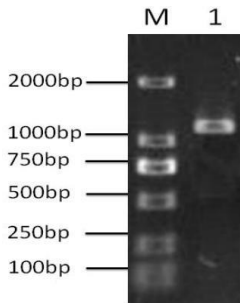


图2 LH-01 菌株 16S rDNA PCR 产物电泳图谱

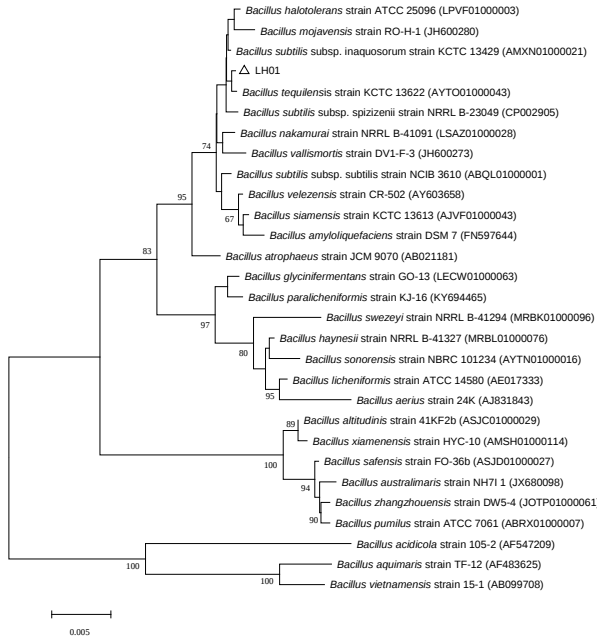


图3 筛选菌株 LH-01 的 16S rDNA 序列的系统发育树

菌株 LH-01 与枯草芽孢杆菌聚在一支。因此, LH-01 菌株鉴定为枯草芽孢杆菌类群。

3 讨论

芦荟种质资源丰富,具有良好的抑菌功能,是护肤品、化妆品重要的植物原料。对其内生细菌的分离研究在开发抑菌生物制剂方面具有重要价值。本试验从库拉索芦荟组织中分离得到 1 株具有极强广谱抗性的菌株 LH-01,对葡萄座腔菌、串珠镰刀菌、禾谷镰刀菌、枯萎病原菌和黄萎病原菌 5 种指示真菌均具有 70% 以上的抑菌率。经过形态生理生化以及分子鉴定,最终确定该菌株属于枯草芽孢杆菌类群。芽孢杆菌作为生防菌株防治植物病害方面的研究和应用,国内外学者进行大量报道^[15-16]。芽孢杆菌生防机制多种多样,普遍认为有营养和空间位点竞争作用、拮抗作用、溶菌作用、分泌抗菌物质、诱导植物抗病性等方式,通过以上多种方式共同作用表现出较强的防治效果^[17-18]。

利用芽孢杆菌防治植物病害具有广阔的应用前景,国内外均已实现其作为生防制剂在农业上的应用。例如,美国已将 3 株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和 1 株解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 列为环保局 (EPA) 商品化生产应用许可范围内,用于防治蔬菜和水果的霜霉病、灰霉病、白粉病、疫病等病害。云南农业大学和中国农业大学共同研制的枯草芽孢杆菌可湿性粉剂“百抗”(10 亿孢子/g),用于防治水稻纹枯病、烟草

黑胫病和三七根腐病,已获作为微生物农药在农业农村部登记注册,累计推广面积超过4 667 hm²[19-20]。实践证明,芽孢杆菌生防制剂在农业生产实现大范围应用虽然仍存在问题,如定植的稳定性、抗菌物质的复杂性及外界环境的多样性影响等[18]。但芽孢杆菌生防制剂具备无毒、无残留、对人畜安全、环境相容性好等传统农药无法实现的优点[21],随着对食品和生态安全要求的日益严格,芽孢杆菌生防制剂必将会有广阔的应用前景。

本研究从药用植物库拉索芦荟中分离得到一株具有显著抑菌效果的枯草芽孢杆菌,将为生防制剂的开发和应用提供宝贵的微生物资源,后期将进一步展开该枯草芽孢杆菌抗菌物质的分离及抗菌的分子机理研究。

参考文献:

- [1] Archana G R F S. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp.[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(11): 4544-4450
- [2] 李 军,李 白,高广春.药用植物内生菌抑菌作用研究进展[J].浙江农业科学,2017,58(11): 1989-1992.
- [3] 卢占慧,周如军,袁 月,等.人参内生拮抗细菌分离鉴定及其对人参菌核病抑菌作用研究[J].中国植保导刊,2016, 36(3): 5-10.
- [4] 赵龙飞,徐亚军,赖心河,等.枸骨益生菌的筛选及其抑菌作用[J].应用生态学报,2015,26(5): 1553-1562.
- [5] 尹建雯,陈有为,杨丽源,等.芦荟植物内生真菌的研究 I. 内生真菌的分离及鉴定[J].微生物学杂志,2004,24(1): 25-26.
- [6] 尹建雯,陈有为,李治滢,等.芦荟植物内生真菌的研究 II. 抗菌活性初探[J].微生物学杂志,2004,24(2): 30-33.
- [7] 华 春.库拉索芦荟的抑菌作用[J].南京师大学报(自然科学版),2004,27(1): 90-93.
- [8] 王莉衡,柯 杨,强 毅,等.芦荟内生菌内生哈茨木霉 LH-7 对植物病原菌的抗性[J].应用生态学报,2014,25(4): 1130-1136.
- [9] 布坎南 R E,吉本斯 N E.伯杰氏细菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,1984: 729-759.
- [10] 张金花,王博文,丁 岩,等.转基因大豆种质资源对大豆疫霉根腐病的抗性评价[J].东北农业科学,2019,44(4): 43-45,49.
- [11] 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: 349-370.
- [12] 杨本寿,苗翠苹,张建华,等.飞龙斩血内生菌种群分布及抑菌活性检测[J].微生物学报,2014,54(3): 276-284.
- [13] 王树雪,魏艳敏,尚巧霞,等.三株拮抗细菌的鉴定及抑菌作用研究[J].中国生物防治学报,2013,29(4): 647-654.
- [14] 关欢欢,许华民,李寿如,等.蛭石基质中马铃薯疮痂病防治后可培养菌群的变化分析[J].东北农业科学,2020,45(5): 57-61.
- [15] 徐洪宇,孙兴权,张 强,等.枯草芽孢杆菌有机肥对土壤条件及烤烟产质量的影响[J].湖南农业科学,2017(7): 55-58.
- [16] 陈立华,常义军,王长春,等.枯草芽孢杆菌 D9 生物有机肥对连作芦蒿扦插苗枯萎病病害防控研究[J].农业资源与环境学报,2016,33(1): 66-71.
- [17] 黄 曦,许兰兰,黄荣韶,等.枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展[J].生物技术通报,2010(1): 24-29.
- [18] 齐爱勇,赵绪生,刘大群.芽孢杆菌生物防治植物病害研究现状[J].中国农学通报,2011,27(12): 277-280.
- [19] 孙光忠,彭超美.微生物杀菌剂及其混配剂防治水稻纹枯病的田间药效试验[J].农药科学与管理,2008(11): 33-34.
- [20] 陈志谊.芽孢杆菌类生物杀菌剂的研发与应用[J].中国生物防治学报,2015,31(5): 723-732.
- [21] 宋本超,赵冬梅,杨志辉,等.解淀粉芽孢杆菌 Z17-2 的发酵条件优化[J].东北农业科学,2021,46(2): 47-51.

(责任编辑:王 昱)

(上接第 46 页)

- [10] 陈智涛,刘德浩,廖文莉,等.不同基质对苦郎树嫩枝扦插的影响[J].安徽农业科学,2020,48(4): 106-107,111.
- [11] 杜丽敏,陈 培,陈显臻,等.不同因子对树葡萄扦插生根影响研究[J].中国南方果树,2019,48(1): 59-61,88.
- [12] 王 丽,张亚菲,黄俊华,等.不同基质对新疆圆柏扦插生根能力的影响[J].江苏农业科学,2019,47(11): 177-181.
- [13] 邱子文,林永盛,向旭文,等.基质和生根剂处理对千层金扦插繁育的影响[J].森林与环境学报,2020,40(6): 648-653.
- [14] 罗素梅,周勇辉,张远福,等.不同扦插基质对金边瑞香扦插生根的影响[J].南方林业科学,2020,48(5): 41-43,61.
- [15] 熊明彪,田应兵,熊晓山,等.钾肥对冬小麦根系营养生态的影响[J].土壤学报,2004(2): 285-291.
- [16] 刘子琪,华利民,陈 玥,等.钾肥对水稻秧苗素质及营养吸收的影响[J].辽宁农业科学,2020(1): 45-48.

(责任编辑:刘洪霞)