

工业大麻叶片内生细菌分离鉴定及系统发育分析

马 军¹, 汪洪敏^{2,3}, 陈 瑛^{2,4*}, 苑泽宁^{2*}, 张 明¹, 房郁妍¹, 胡莹莹¹,
唐立郦¹

(1. 黑龙江省农业科学院经济作物研究所, 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150086;
3. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266000; 4. 哈尔滨工业大学(深圳校区), 广东 深圳 518000)

摘 要:植物内生菌是重要的微生物资源, 筛选分离植物内生菌对挖掘和利用有益微生物有重要作用。为初步了解工业大麻内生细菌生物多样性, 本研究采用微生物学传统分离培养方法从黑龙江省工业大麻果期叶中分离出的6株菌株进行形态学观察、革兰氏染色观察, 通过16S rDNA序列进行分子鉴定, 并通过BLAST软件同源序列比对构建进化树进行系统发育分析。结果表明: 在获得成功测序的6株菌株中, 其中5株为革兰氏阳性菌, 1株为革兰氏阴性菌, 其形态常见为杆状, 极个别为球状。16S rDNA测序结果采用BLAST软件同源性比对分析, 表明菌株DM02、DM03、DM04、DM05和DM06为 *Bacillus* 属, 相似性99.85%~100%; DM01菌株为 *Acinetobacter* 属, 最高相似性99.93%。通过构建系统发育树, 可以明显地看出这6株内生细菌被划分为2大支。本研究为开发和利用工业大麻内生有益细菌提供理论参考。

关键词:工业大麻; 内生细菌; 分离鉴定; 系统发育分析

中图分类号: S563.3

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)02-0055-05

Isolation, Identification and Phylogenetic Analysis of Endophytic Bacteria in Leaves of Industrial Hemp (*Cannabis sativa*)

MA Jun¹, WANG Hongmin^{2,3}, CHEN Ying^{2,4*}, YUAN Zening^{2*}, ZHANG Ming¹, FANG Yuyan¹, HU Yingying¹,
TANG Lili¹

(1. Institute of Industrial Crops, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 2. College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150086; 3. School of Marine Life, Ocean University of China, Qingdao 26600; 4. Harbin Institute of Technology(Shenzhen), Shenzhen 518000, China)

Abstract: Phytoendophytes are important microbial resources. Isolation and identification of phytoendophytes provide an important base for the utilization of beneficial plant microbes. In order to preliminarily judge the phylogenetic relationship of endophytic bacteria in industrial hemp and further understand its biodiversity, using the traditional isolation and culture method, we isolated six bacteria strains from the leaves of an industrial hemp variety from Heilongjiang Province. The morphological, Gram coloring, 16s rDNA sequences and phylogenetic analysis were carried out. The morphology of the six strains were spherical. Five of them were Gram-positive bacteria, and one was Gram-negative bacterium. 16S rDNA BLAST result indicated that five strains were *Bacillus*, with 99.85%~100% similarity; and the other one was *Acinetobacter*, with 99.93% maximum similarity. By constructing phylogenetic tree, the six endophytic bacteria were obviously aggregated into two branches. The result can provide references for the exploitation and utilization of endophytic bacteria in *Cannabis sativa*.

Key words: *Cannabis sativa*; Endophytic bacteria; Isolation and identification; Phylogenetic analysis

收稿日期: 2020-06-01

基金项目: 黑龙江省政府博士后资助项目(LBH-Z17204); 黑龙江省农业科学院科研基金项目(2018YYYYF033、2019YYYYF010)

作者简介: 马 军(1981-), 男, 助理研究员, 博士, 主要从事植物遗传学与微生态研究。

通讯作者: 陈 瑛, 女, 博士, 教授, E-mail: lh6666@126.com

苑泽宁, 女, 博士, 副教授, E-mail: xiaoyuan168ok@163.com

1866年由德国科学家DeBarry最早提出内生菌一词“endophyte”^[1]。1992年, Kloeppel等^[2]得出植物内生菌是指一类能够与寄主植物建立和谐联合关系并能定殖在植物细胞间隙或细胞内的微生物, 可分成内生细菌、内生放线菌、内生真菌三大类。许多研究已证实, 内生细菌存在于活体植物中, 一般不引起宿主植物产生有害病状, 也不使

植物组织结构功能发生明显变化。健康植物体内不同组织器官内存在大量的内生细菌,这些内生细菌不仅生物多样性极其丰富,同时也是植物病害生物防治的潜在资源菌^[3-5]。内生细菌与宿主植物在长时间进化过程中形成了协调共生关系,可产生与宿主植物相似度极高的代谢产物,是筛选结构新颖次级代谢产物的重要资源^[6-7]。此外,很多内生细菌对寄主植物具有促生、抗病、固氮、杀线虫和生物修复等作用^[8-13],目前已被广泛应用于植物病害的生物防治。

大麻(*Cannabis sativa*)又叫汉麻、线麻、野麻和火麻,属于大麻科(*Cannabinaceae*)大麻属(*Cannabis*)一年生直立草本植物。大麻作为中国传统的经济作物,有着悠久的栽培历史,应用在造纸、建材、医药、纺织及食品等多个方面^[14]。世界上种植大麻面积较大的国家主要有乌克兰、加拿大、法国、俄罗斯等,而我国主要以种植纤维用型汉麻为主^[15]。我国大麻的种植主要集中在西北的山西、宁夏和甘肃,西南的四川、云南和贵州,中部的河南、安徽、山东等地区,东北的辽宁、吉林、黑龙江^[16]。工业大麻是一类四氢大麻酚含量极低的低毒大麻。工业大麻籽富含蛋白质、膳食纤维和人体所需的维生素、必需脂肪酸等营养物质,具有一定的保健功能,有较高的经济利用价值^[17]。

目前从植物根际土壤等外部环境中分离筛选植物病害的拮抗微生物已有相关报道。连瑞丽等^[18]采用平板对峙法从麦冬根部分离出金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌三种指示菌的抗菌活性的内生菌。王娇等^[19]采用平板对峙法从七叶树的根茎中分离鉴定出对金黄色葡萄球菌、白色念球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌等靶标菌具有一定抗菌活性的内生细菌。翟大才等^[20]从黄精根状茎发酵液中主要提取抑菌物质,且对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和大肠杆菌均具有显著抑菌效果。牛贞福等^[21]采用菌丝生长速度法从番茄灰霉病病原菌生防菌株筛选出木霉、拟康氏木霉、黑根霉、匍枝根霉,对番茄灰霉病抑制效果较好,其应用前景较为广阔。工业大麻作为一种优质特色、用途广泛的作物资源,国内外关于其内生菌的研究还很少报道。因此尝试采用分离培养技术探索工业大麻叶内生细菌的分离试验方法,并对获得的纯化菌株进行形态学特征和分子鉴定,初步判断其在系统发育过程中的亲缘关系,并了解工业大麻内生微生物生物多样性以及开发利用内生微生物资源提供参考文献。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

在黑龙江省农业科学院试验地选择长势一致、生长健康、叶部无明显病变无虫咬的工业大麻5株,将叶表面灰尘拭净,剪取植株中部成熟叶片放入无菌袋中,送回实验室进行表面消毒。

1.2 培养基

细菌培养采用营养琼脂培养基^[22](Nutrient Agar, NA)和LB肉汤培养基^[22](Luria-Bertani, LB)。

1.3 主要仪器

离心机(WD-2105A 微型离心机),摇床(HZQ-C 空气浴振荡器),显微镜(DMI14000B 倒置显微镜),电子天平(BSA223S),水浴锅(HS-4 恒温水浴)。

1.4 试验方法

1.4.1 大麻叶片的表面消毒

将新鲜的果期工业大麻叶片用自来水冲洗除去叶表面灰尘,在无菌条件下将大麻叶片切成1 cm×1 cm左右的小块,分别采用以下三种方式表面消毒:(1)95%酒精浸泡2 min,75%酒精浸泡5 min,0.1%升汞浸泡5 min,无菌水冲洗3次每次3 min;(2)95%酒精浸泡2 min,75%酒精浸泡10 min,0.1%升汞浸泡5 min,无菌水冲洗15 min;(3)95%酒精浸泡5 min,75%酒精浸泡5 min,0.1%升汞浸泡10 min,无菌水冲洗15 min。待表面消毒完毕后,在无菌条件下将最后一次无菌水冲洗的叶片表面水分吸干后直接放入营养琼脂(NA)培养基中进行分离培养。同时,采用印迹法^[23-24]吸取最后1次无菌水冲洗液涂布于营养琼脂培养基表面,培养48 h观察是否出现菌落,用来检测表面消毒效果并筛选出本实验条件下最佳表面消毒的方法。

1.4.2 内生细菌分离与纯化

采用传统微生物分离方法^[25]进行内生细菌的分离培养。首先将大麻叶片在营养琼脂培养基中培养2~3 d,观察培养基中叶片组织及周缘长出的菌落或菌苔的形态特征。然后,根据平板上菌落的形态、颜色、大小等特点挑取不同的单菌落并将其转入营养琼脂上进行分离、纯化培养,待培养基又长出新菌落时立即挑起进行反复划线,直到菌落外观形态一致为止。最后将获得纯化菌株转接斜面,保藏菌株于4℃冰箱。

1.4.3 内生细菌形态学特征观察

将获得纯化的内生细菌活化后接种于灭菌的

LB肉汤培养,进行革兰氏染色观察^[25]。

1.4.4 细菌分子鉴定

细菌基因组DNA提取参照马文东的方法^[26]。采用16S rRNA基因的通用引物27F(5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')^[27]。PCR反应体系为:H₂O 17.8 μL, 10×Buffer 3 μL, dNTP 2 μL, 上、下游引物各3 μL, DNA模板1 μL, Taq酶0.2 μL, 总体积为30 μL。PCR反应条件为95℃预变性5 min; 95℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 35个循环;最后72℃延伸10 min。扩增

产物回收纯化后送上海生工生物工程有限公司测序,测序结果与GenBank数据库中的已知序列进行BLAST相似性比对,采用MEGA4软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 工业大麻内生细菌的分离及初步鉴定

根据菌株间形态学上颜色、形状、大小的差异选择DM01、DM02、DM03、DM04、DM05、DM06共6株内生细菌(图1)。这6株菌株除DM01为革兰氏阴性外其余5株皆为革兰氏阳性。菌落外观形态多

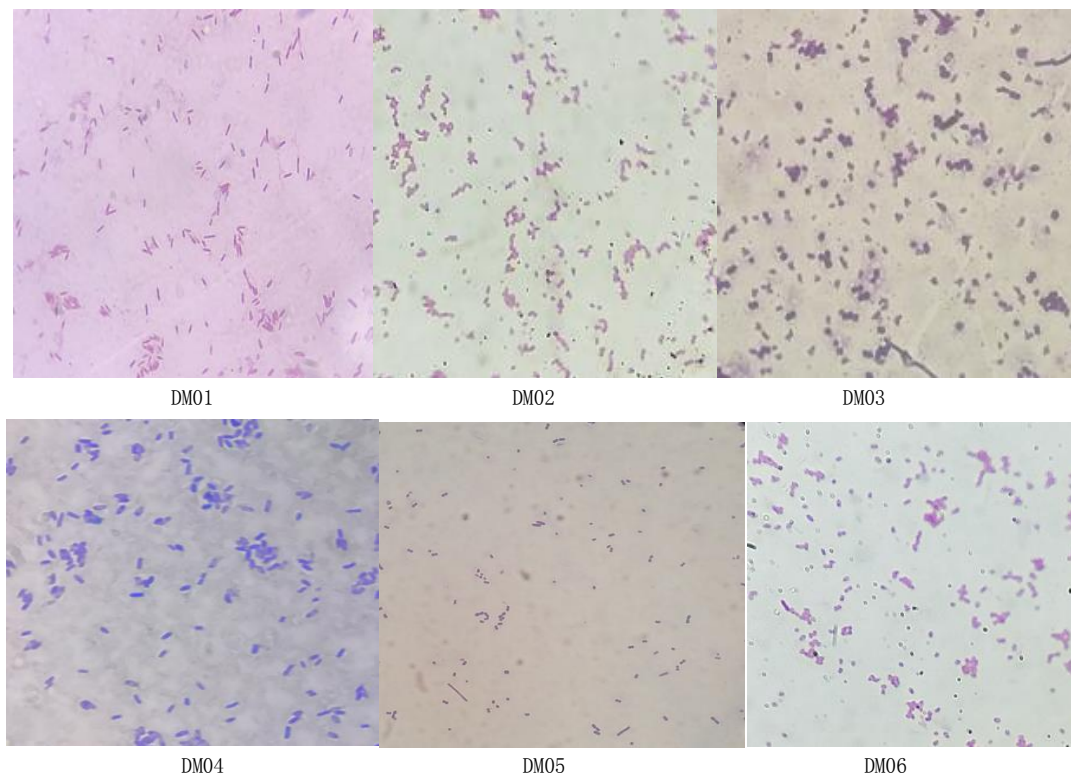


图1 内生细菌革兰氏染色显微图片

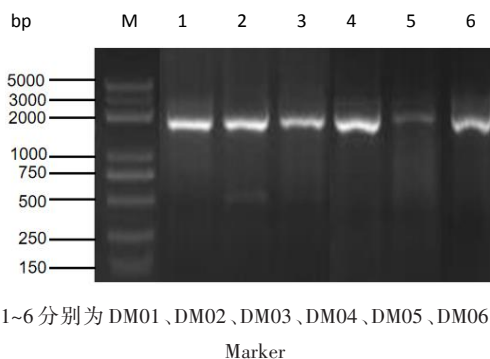
为白色、黄色,边缘形状黏稠,个别呈现褶皱。在显微镜下发现形态常见为杆状,极个别为球状。

2.2 16S rDNA序列扩增与测序

用引物27F和1492R通过PCR扩增出6株内生细菌16S rDNA序列,通过1%琼脂糖凝胶电泳检验(图2),发现扩增出1 750 bp左右单一条带,6条扩增条带都比较清晰,说明扩增效果较好,但DM05菌株扩增条带较浅。将PCR产物回收、测序,这6株内生细菌的双向测序均能成功拼接获得测序结果。

2.3 同源性对比及系统发育树的构建

测序结果利用NCBI中的BLAST软件进行同源性分析,结果如表1所示。5株为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),相似性99.85%~100%;1株为不动杆



注:1~6分别为DM01、DM02、DM03、DM04、DM05、DM06;M为Marker

图2 6株内生细菌16S rDNA的PCR扩增结果

菌属(*A. sp.*),最高相似性99.93%。DM01菌株是不动杆菌属(*A. sp.*)—未知种,菌株DM02为索诺拉沙漠芽孢杆菌(*Bacillus sonorensis*),菌株DM03为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*),菌株DM04与贝莱斯芽

表 1 16S rDNA 序列比对结果

编号	菌株	来源	同源菌株	注册号	相似性
DM01	NA1Y 叶离	叶	<i>Acinetobacter sp</i>	MH368121.1	99.93%
DM02	KD3-1-1	叶	<i>Bacillus sonorensis</i>	MH373534.1	100%
DM03	KD3-1-2	叶	<i>Bacillu subtilis</i>	MT271990.1	100%
DM04	NA1Y 叶①	叶	<i>Bacillus velezensis</i>	MT538583..1	99.85%
DM05	NA1Y 叶②	叶	<i>Bacillus subtilis</i>	MN093877.1	99.86%
DM06	NA2Y 叶①	叶	<i>Bacillus subtilis</i>	MN945444.1	100%

孢杆菌 (*B. velezensis*) 亲缘关系最近,DM05 菌株与枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 亲缘关系最近,DM06 菌

株为枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)。由系统发育树 (图 3、图 4) 可以看出这 6 株内生细菌划分为 2 个大

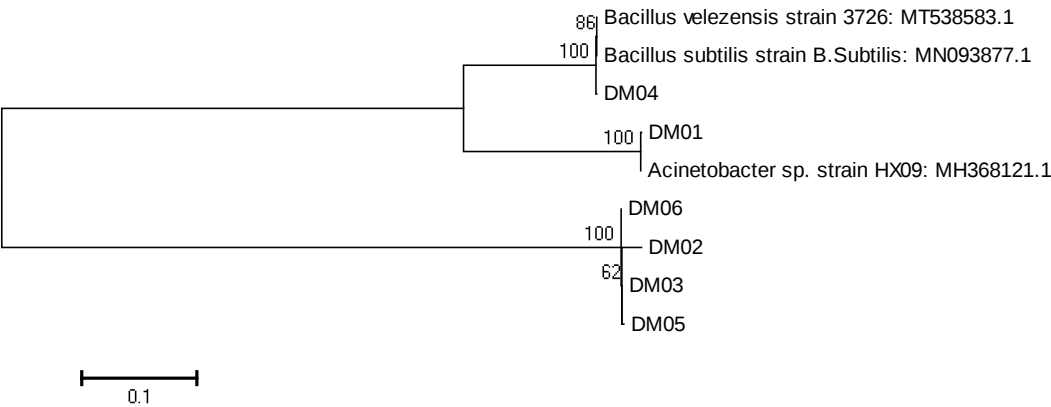


图 3 相邻连接树结果

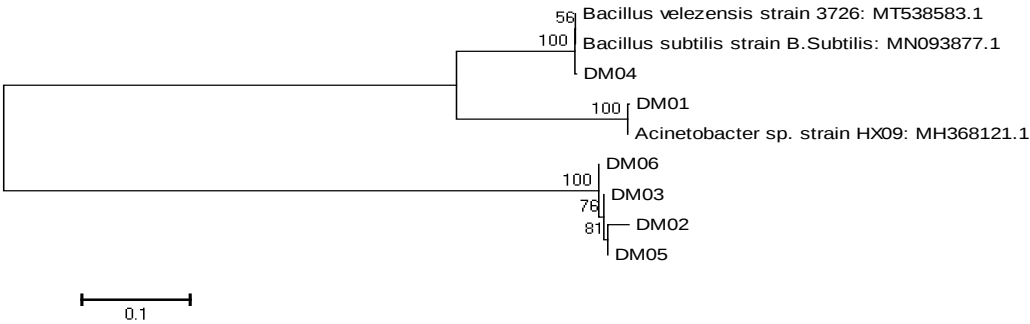


图 4 最大似然系统发育树结果

分支,表明它们从两个不同的共同祖先进化形成。

3 讨 论

本试验首先通过不同预处理方法对大麻叶片进行表面消毒,结果表明,95%酒精浸泡 2 min,75%酒精浸泡 5 min,0.1% 升汞浸泡 5 min,无菌水冲洗 3~4 次处理效果最佳。通过观察未涂布、涂布最后一次清洗无菌水的分离培养基中生长状态,这两种条件下的培养基中未发现有菌落生长,表明叶片表面消毒彻底,进而证实实验中分离出的细菌均来自叶片组织内部。此外从环保角度考虑,植物表面消毒建议用其他消毒剂来代替升汞。

在分离筛选到的 6 株内生细菌中有 5 株为芽孢杆菌属 (*Bacillus sp.*),1 株为不动杆菌属 (*Ac-*

netoberact sp.)。芽孢杆菌是革兰氏阳性菌,需氧或兼性厌氧产生芽孢,细胞呈直杆状,在生防机制上主要表现在竞争作用、抗生作用、溶菌作用和促进植物生长等方面^[28]。目前,芽孢杆菌在黄瓜、辣椒、水稻、小麦、玉米等多种农作物上表现出很好的病害防治效果^[29-30]。生防芽孢杆菌类生物制剂除对控制植物病害具有高效性外,还具有对人畜无毒、无致病性、抑菌高效性、环境较好的相容性、植物病原菌抗性不强、生产成本相对比较划算等优点,必将产生巨大的生态、经济、社会效益,其应用前景在现代农业也较为广阔^[31]。不动杆菌是革兰氏阴性菌,可以在 16~43 ℃ 生长。可作为重要的线虫生物防治资源并在临床、药理等领域广泛应用,还可作为理想宿主菌株用于生

理生化检测^[32-34]。通过同源序列相似性比对发现工业大麻的叶片内生细菌中DM01与*Acinetobacter* sp. 同源性最大,芽孢杆菌属的5株细菌包含索诺拉沙漠芽孢杆菌(*B. sonorensis*),贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*),枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)三个种。

4 结 论

本试验条件下大麻叶表消毒时采用95%酒精浸泡2 min,75%酒精浸泡5 min,0.1%升汞浸泡5 min,无菌水冲洗3~4次的组合对大麻叶片表面消毒比较彻底,可以有效提高叶内生细菌分离效率。对6株细菌进行形态、革兰氏染色及16S rDNA的PCR鉴定,结果表明,其中5株为革兰氏阳性菌,1株为革兰氏阴性菌。外观形态多为白色、黄色,边缘形状黏稠呈褶皱状。16S rDNA序列同源性相似性对比结果表明,5株为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),1株为不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)。通过构建系统发育树将分离获得的6株内生细菌划分为2大支。上述研究结果可为进一步开发利用大麻内生细菌资源提供依据和参考。

参考文献:

- [1] DeBary A, Woronin M, Rothrock J T. Beitrage zur Morphologie und Physiologie der Pilze[J]. International Journal of Plant Sciences, 1882, 7(7):81-84.
- [2] Kloepper J W, Beauchamp C J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1992, 38 (12): 1219-1232.
- [3] 国 辉,毛志泉,刘训理.植物与微生物互作的研究进展[J].中国农学通报,2011,27(9):28-33.
- [4] 方珍娟,张晓霞,马立安.植物内生菌研究进展[J].长江大学学报(自然科学版),2018,15(10):41-45.
- [5] 何玲敏,叶建仁.植物内生细菌及其生防作用研究进展[J].南京林业大学学报(自然科学版),2014,38(6):153-159.
- [6] 李 强,刘 军,周东坡,等.植物内生菌的开发与研究进展[J].生物技术通报,2006(3):33-37.
- [7] 姜 云,陈长卿,尹 望.药用植物内生菌及其产生活性物质的应用研究[J].吉林农业科学,2013,38(4):94-96.
- [8] 彭 双,闫淑珍,陈双林.具杀线虫活性植物内生细菌的筛选和活性产物[J].微生物学报,2011,51(3):368-376.
- [9] 葛江丽,施汉钰,刘桂棋,等.水稻根际固氮菌分离及最适培养条件研究[J].东北农业科学,2018,43(4):53-56.
- [10] 李统华,冯中红,杨成德.高寒草甸牧草内生解淀粉芽孢杆菌261MY6生防潜力评价[J].草地学报,2019,27(2):452-458.
- [11] 陈 龙,梁子宁,朱 华.植物内生菌研究进展[J].生物技术通报,2015,31(8):30-34.
- [12] 刘丽辉,彭桂香,黄淑芬,等.落地生根内生固氮菌多样性和促生特性[J].微生物学通报,2019,46(10):2538-2547.
- [13] 叶晓婉,张桂丽,戚贺飞,等.明党参内生菌对苯磺隆的生理降解作用[J].江苏农业科学,2020,48(9):287-292.
- [14] Li H L. The origin and use of cannabis in eastern Asia linguistic-cultural implications[J]. Econom Botany, 1974, 28(3): 293-301.
- [15] 张晓艳,孙宇峰,曹 焜,等.黑龙江省工业大麻育种现状及展望[J].作物杂志,2019(3):15-19.
- [16] 郭 丽,王明泽,王殿奎,等.工业大麻综合利用研究进展与前景展望[J].黑龙江农业科学,2014(8):132-134.
- [17] Struik P C, Amaducci S, Bullard M J, et al. Agronomy of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) in Europe[J]. Industrial Crops & Products, 2000, 11(2): 107-118.
- [18] 连瑞丽,李宇伟,王宇静,等.麦冬内生菌筛选的初步研究[J].现代牧业,2019,3(3):23-27.
- [19] 王 娇,解修超,邓百万,等.七叶树内生细菌的分离鉴定及生物活性研究[J].黑龙江农业科学,2017(11):71-75.
- [20] 翟大才,房 震,吕彩云,等.黄精内生菌枯草芽孢杆菌HJ-2的抑菌活性研究[J].农业生物技术学报,2019,27(9):664-672.
- [21] 牛贞福,国淑梅,张温凯,等.防控番茄灰霉病的化学药剂和生防菌株筛选研究[J].东北农业科学,2016,41(3):41-45.
- [22] 黄秀梨,辛明秀.微生物学实验指导(第2版)[M].北京:高等教育出版社,2008:1.
- [23] 王文倩,魏 颖,王 宇,等.蛋白免疫印迹法检测小分子蛋白的实验条件优化研究[J].现代生物医学进展,2015,15(7):1230-1232.
- [24] 王丽娜,葛凌云,董彩华,等.双向电泳及免疫印记法对囊尾蚴囊液抗原的分析、纯化及鉴定[J].中国热带医学,2003(6):717-719.
- [25] 钱存柔,黄仪秀.微生物实验教程(第2版)[M].北京:北京大学出版社,2008:23-26.
- [26] 马文东.水稻基因组DNA提取方法的研究[J].黑龙江农业科学,2014(1):7-11.
- [27] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [28] 姜莉莉,陈彦闯,辛明秀.枯草芽孢杆菌在防治植物病害上的应用及研究进展[J].安徽农学通报(上半月刊),2009,15(7):37-39,110.
- [29] 杨瑞先,蔡学清,范晓静,等.内生芽孢杆菌防治植物病害的应用及作用机制研究进展[J].武夷科学,2012,28(00):106-113.
- [30] 邓进超,关一鸣,吴连举,等.人参锈腐病菌拮抗菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J].东北农业科学,2017,42(3):31-38.
- [31] 郭继平,马 光,王芳芳,等.解淀粉芽孢杆菌在葡萄叶片上的定殖能力研究[J].吉林农业科学,2015,40(4):90-93.
- [32] 田士靖.具有杀线虫活性的约氏不动杆菌MB44全基因组分析[D].武汉:华中农业大学,2017.
- [33] 韩 雪,熊燕妮,江瑞晶,等.一株豇豆花苞内生不动杆菌的分离鉴定[J].江汉大学学报(自然科学版),2015,43(5):398-400.
- [34] 张晓玲,于翠香.多重耐药鲍曼不动杆菌治疗药物的研究进展[J].医学综述,2013,19(21):3968-3970.

(责任编辑:刘洪霞)