

银杏内生细菌 XZNUM 033 的鉴定及其抗杨树变色真菌活性物质的理化性质

李长根, 曹成亮, 秦盛, 缪倩, 孙勇, 蒋继宏*

(徐州师范大学江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘要:银杏内生细菌 XZNUM 033 对杨树变色真菌—可可球二孢菌具有很强的抑制活性, 通过对该菌株培养液一些理化性质的测定, 结果表明: 培养液在 pH 值为 7.0 时, 其抗可可球二孢菌活性最强, 培养液对温度、光照、紫外线都具有较好的稳定性。根据银杏内生细菌 XZNUM 033 的菌落、菌体形态、革兰氏染色、芽孢染色、生理生化特性以及 16S rRNA 序列分析, 初步把银杏内生细菌 XZNUM 033 定为解淀粉芽孢杆菌。

关键词:木材变色; 内生细菌; 理化性质; 鉴定; 解淀粉芽孢杆菌

中图分类号: S792.95

文献标识码: A

Identification of an Endophytic Bacterium XZNUM 033 from *Ginkgo biloba* L. and Its Physicochemical Characteristic of Anti-sapstain Fungus Activity

LI Chang-gen, CAO Cheng-liang, QIN Sheng, MIAO Qian, SUN Yong, JIANG Ji-hong*

(Key Laboratory for Biotechnology on Medicinal Plant of Jiangsu Province, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, Jiangsu, China)

Abstract: The endophytic bacterium XZNUM 033 has a strong inhibitory activity against poplar sapstain pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. The physicochemical property of the fermentation broth was detected. The result showed that fermentation broth with the pH 7.0 had the strongest anti-fungal activity and was stable against heat, light and ultraviolet. According to the morphological observation, gram staining, spore staining, physicochemical property and the phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence, the strain XZNUM 033 was identified as a known species of the genus *Bacillus amyloliquefaciens*.

Key word: wood sapstain; endophytic bacterium; physicochemical characteristics; identification; *Bacillus amyloliquefaciens*

1878年, Hartig^[1]研究证实, 木材变色是由具有深色菌丝的真菌引起的, 开启了木材变色菌研究的先河, 随后各国学者对变色菌进行了大量的研究和报道。木材变色菌大多属于子囊菌亚门或半知菌亚门, 其中包括常见的球二孢属 (*Lasiodiplodia* Ellis & Everh.)、长喙壳属 (*Ceratocystis* Ellis & Halst)、色二孢属 (*Diplodia* Fr.)、链格孢属 (*Alternaria* Nees ex

Wallroth)、枝孢属 (*Cladosporium* Link ex Gray)等^[2-3]。

杨树是速生丰产树种, 在我国广泛种植, 资源十分丰富; 但杨木纤维结构疏松, 砍伐后易受变色真菌侵蚀, 产生变色, 严重影响木材的美观, 大大降低了其经济价值。杨卫军等^[4]通过对杨木变色菌的分离鉴定, 得到变色菌可可球二孢菌

收稿日期: 2010-02-11

基金项目: 国家自然科学基金(30872028)项目资助

作者简介: 李长根(1985—), 男, 江苏盐城人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。

* 通讯作者: 蒋继宏, 男, 教授, 博士, 主要研究方向: 资源微生物及生物技术. E-mail: jhjiang@xzu.edu.cn

(*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Grill. & Maubl. = *Botryodiplodia theobromae*) 和新月弯孢 (*Curvularia lunata* (Wakker) Boediji), 其中 *L. theobromae* 因生长速度快, 变色迅速等特点, 影响了杨树的价值。许多研究者尝试利用各种微生物抑制变色菌的生长, 目前, 从自然界中筛选出的可用于防治木材蓝变的有细菌^[5]和放线菌^[6]等, 其中的芽孢杆菌属因其种类繁多, 功能也各不相同, 具有营养简单、生长快速、易分离等特点^[7], 已成为生物杀菌剂的首选菌种。

本实验针对银杏内生细菌 XZNUM 033 对 *L. theobromae* 的抑制效果进行研究, 检测培养液的一些理化性质; 通过菌落形态、生理生化特性及 16S rRNA 序列同源性对其进行了鉴定, 旨在为深入研究其抗杨树变色真菌机制以及开发生物农药应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试菌株: 银杏内生细菌 XZNUM 033 由江苏省药用植物生物技术重点实验室提供。

供试病原菌: 杨树变色真菌—*L. theobromae* 由江苏农林职业技术学院赵桂华教授惠赠。

1.2 方 法

1.2.1 银杏内生细菌 XZNUM 033 的培养液制备 将银杏内生细菌 XZNUM 033 菌种接种于 100 mL NB 培养基中, 28 °C 下 140 r·min⁻¹ 震荡培养 72 h, 离心后除去菌体, 浓缩至 1/10 体积后用 0.22 μm 孔径的滤膜过滤备用。

1.2.2 温度对银杏内生细菌 XZNUM 033 培养液抑菌活性的影响 将培养液分别于 60、70、80、90、100 °C 的水浴锅中处理 30 min, 然后取 100 μL 加入到 15 mL 的 PDA 培养基中震荡混匀制平板, 接种 *L. theobromae*, 每处理做 3 皿重复, 然后检测活性。

1.2.3 pH 值对培养液抑菌活性的影响 用 1 mol·L⁻¹ NaOH 和 1 mol·L⁻¹ HCl 将培养液调节成 pH 值 3、4、5、6、7、8、9、10, 将不同 pH 值的培养液放入 4 °C 冰箱中过夜, 然后检测活性。

1.2.4 紫外照射对培养液活性的影响 将培养液放在暗箱中, 用紫外灯 (20 W, 灯皿距 50 cm) 分别照射 15、30、60、90、120 min, 然后检测活性。

1.2.5 光照对培养液活性的影响 将培养液放在

光照培养箱中, 用日光灯 (30W, 灯皿距 50 cm) 照射 1、2、3、4、5、6、7 d, 然后检测活性。

1.2.6 抑制率的计算 用生长速率法测定培养液对 *L. theobromae* 的抑制作用^[8]。以加入不经任何处理的 XZNUM 033 培养液在 PDA 平板上培养的 *L. theobromae* 为对照, 28 °C 恒温培养, 用十字交叉法测量 *L. theobromae* 菌落直径, 计算抑制率^[9]。

1.2.7 银杏内生细菌 XZNUM 033 的鉴定 首先对银杏内生细菌 XZNUM 033 培养性状、菌体形态特征进行观察并进行革兰氏染色、芽孢染色^[10-11]; 采用细菌微量生化反应管试剂盒 (杭州微生物试剂有限公司) 对银杏内生细菌 XZNUM 033 的生理生化进行测试; 然后对银杏内生细菌 XZNUM 033 的 16S rRNA 序列同源性进行测定。银杏内生细菌 XZNUM 033 基因组 DNA 的提取参照文献^[12]; 16S rRNA 保守区域扩增: 采用通用引物 HBR (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 HBF (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。PCR 反应体系为 50 μL, 包括 10 × buffer 5 μL, MgCl₂ 4 μL, dNTP 1 μL, HBR 和 HBF 引物各为 2 μL, Taq 酶 0.5 μL, DNA 模板 2 μL。反应程序为: 94 °C 预变性 2 min, 每个循环包括: 95 °C 变性 30 s、50 °C 复性 1 min、72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物送至上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司测序。16S rRNA 基因测序后, 利用 EzTaxon 在线比对服务 (<http://www.eztaxon.org>) 进行相关有效种的相似性搜索, 确定菌株的属种, 并调出相关细菌的 16S rRNA 基因序列, 用 Clustal X1.8 软件进行序列比对, 随后用 MEGA3.1 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 培养液中活性物质的热稳定性

XZNUM 033 培养液经过不同温度处理后测定其抑菌活性, 结果见图 1。由图 1 可看出: 温度对培养液的生物活性影响不大, 经 60 °C 以上各温度的处理后, XZNUM 033 培养液的抑菌率与对照没有明显的差异, 均在 50% ~ 60% 间, 即使在 100 °C 加热后, 培养液对 *L. theobromae* 的抑制活性也能够维持不变, 表明内生细菌 XZNUM 033 的抑菌活性物质具有耐高温的特性。

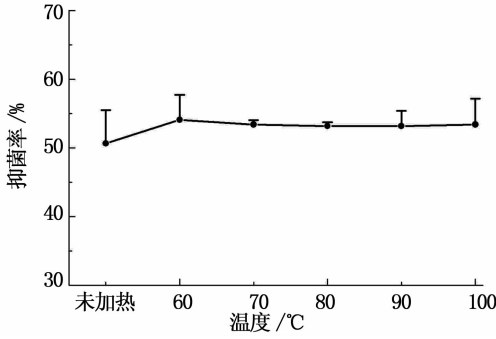


图1 温度对银杏内生细菌 XZNUM 033 培养液抑菌活性的影响

2.2 培养液中活性物质对紫外线照射的耐受力

XZNUM 033 培养液经过紫外照射后测定其抑菌活性,结果见图2。由图2可看出:不同时间的紫外照射对培养液的活性影响不大,即使经过 120 min 的紫外照射, XZNUM 033 培养液的抑菌率与对照没有明显的差异。说明 XZNUM 033 的活性物质在这个时间范围内对紫外不敏感。

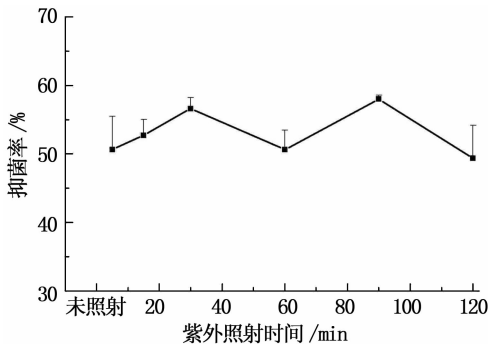


图2 紫外照射对银杏内生细菌 XZNUM 033 培养液抑菌活性的影响

2.3 培养液中活性物质的光稳定性

XZNUM 033 培养液经过日光灯照射后测定其抑菌活性,结果见图3。由图3可看出:光照对培养液的生物活性影响不大,对培养液进行 1~7 d 的光照处理后其抑菌率与对照没有明显的差异,即使第 7 天时,其抑菌率也与对照相当。

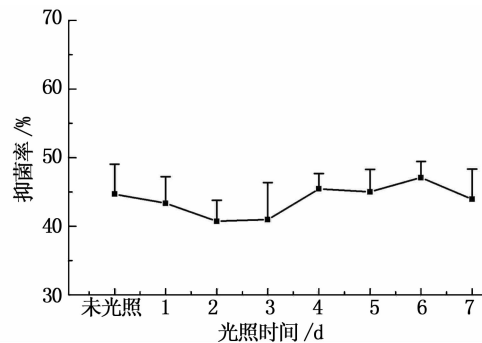


图3 光照对银杏内生细菌 XZNUM 033 培养液抑菌活性的影响

2.4 培养液中活性物质对酸碱的耐受力

XZNUM 033 培养液经过不同 pH 值处理后测定其抑菌活性,结果见图4。由图4可看出:pH 值为 7 时,拮抗物质对 *L. theobromae* 的抑制活性最强,在 pH 值 3~6 间,拮抗物质的活性显著下降,在 pH 值 8~10 间,拮抗物质受 pH 值的影响相对较小。

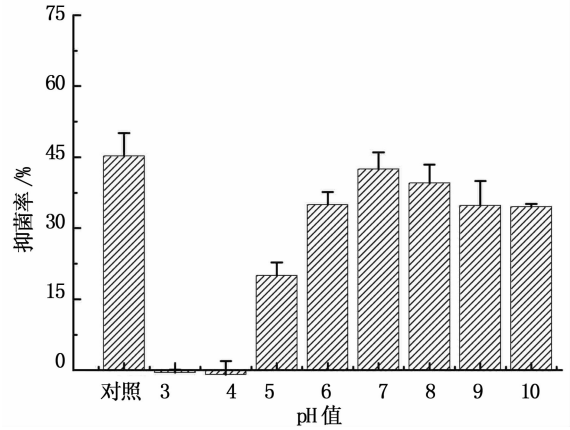


图4 酸碱对银杏内生细菌 XZNUM 033 培养液抑菌活性的影响

2.5 银杏内生细菌 XZNUM 033 的鉴定及进化树的构建

2.5.1 银杏内生细菌 XZNUM 033 的培养性状及菌体形态特征 在 NB 培养基上,菌落呈淡黄色,近圆形,表面干燥,有褶皱,不透明,有黏度,带臭味;革兰氏反应为阳性;可形成内生芽孢,芽孢中生,为椭圆形,稍膨大。电镜下观察,菌体为杆状,大小为 $2 \mu\text{m} \times 0.6 \mu\text{m}$,以二分裂方式进行繁殖(图5)。

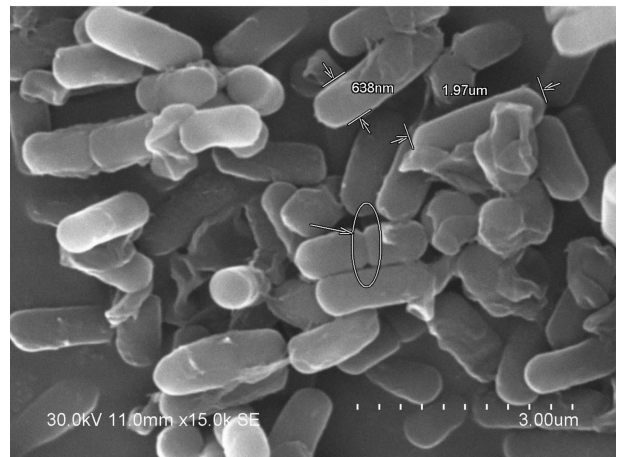


图5 银杏内生细菌 XZNUM 033 扫描电镜图

2.5.2 银杏内生细菌 XZNUM 033 的生理生化特征 生理生化实验鉴定结果见表1。

表 1 银杏内生细菌 XZNUM 033 的生理生化试验结果

测定项目	测定结果
β-半乳糖苷试验	+
七叶苷试验	+
山梨醇试验	-
侧金盏花醇试验	-
木糖试验	-
棉子糖试验	-
尿素试验	±
赖氨酸试验	+
鸟氨酸试验	+
苯丙氨酸试验	-
硫化氢试验	-
过氧化氢试验	+
枸橼酸试验	±
半固体试验	-
明胶试验	+
葡磷胨水试验	-
蛋白胨水试验	-
硝酸盐还原试验	+
氧化酶试验	-

注: + :表示反应呈阳性; - :表示反应呈阴性; ± :表示反应呈弱阳性。

2.5.3 银杏内生细菌 XZNUM 033 的 16S rRNA 序列同源性测定及进化树的构建 对银杏内生细菌 XZNUM 033 的 16S rRNA 序列进行同源性测定,结果表明:XZNUM 033 16S rRNA 保守序列为 1 489 bp。在 EzTaxon 数据库中进行有效种的序列相似性比对(图 6)发现:菌株 XZNUM 033 是芽孢杆菌属成员,与芽孢杆菌属的有效种 *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535 相似性最高(相似性为 99.313%),其次为 *Bacillus subtilis* Subsp. *inaquosorum* (相似性为 99.229%) 和 *Bacillus tequilensis* (相似性为 99.313%)。基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析发现:银杏内生细菌 XZNUM 033 与解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens* (Fukumoto) Priest *et al.*) 独成一个分支,而且自举值较高,同时结合菌落、菌体形态特征及革兰氏染色和芽孢染色反应,初步把银杏内生细菌 XZNUM 033 定为解淀粉芽孢杆菌的一个菌株,它能代谢产生拮抗物质用于防治 *L. theobromae*(图 7)。

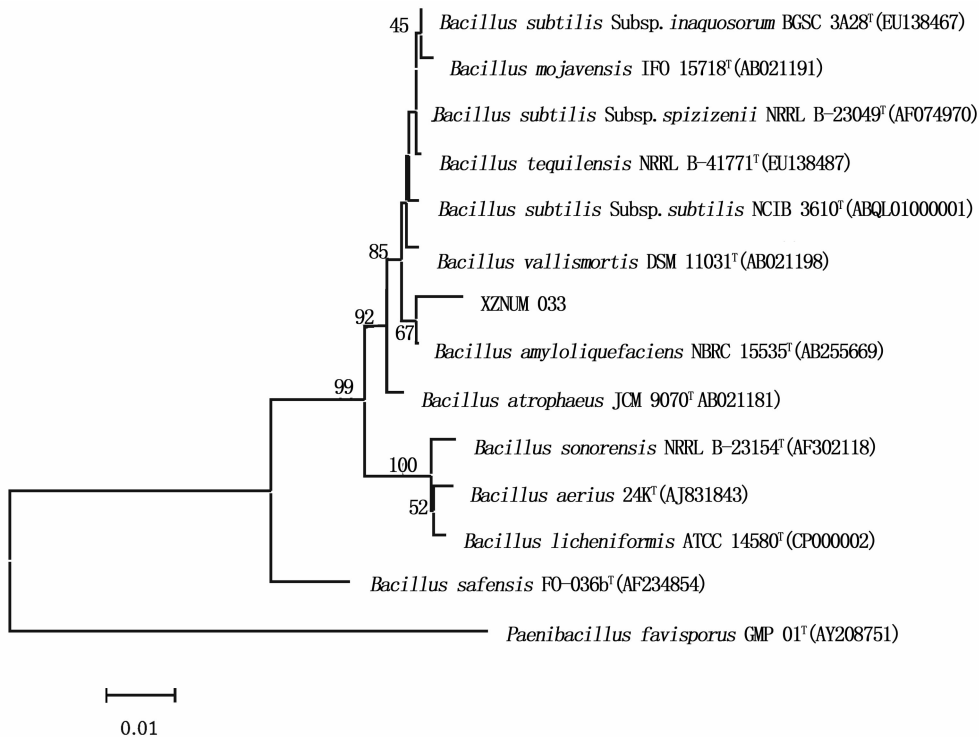


图 6 银杏内生细菌 XZNUM 033 与其相似菌株的系统进化树

3 结果与讨论

研究表明,银杏内生细菌 XZNUM 033 为 1 株解

淀粉芽孢杆菌,它能代谢产生拮抗物质,且这种拮抗物质对温度、光照、紫外线较稳定,而紫外灯的照射强度远大于自然界阳光中的紫外强度。因此,培养

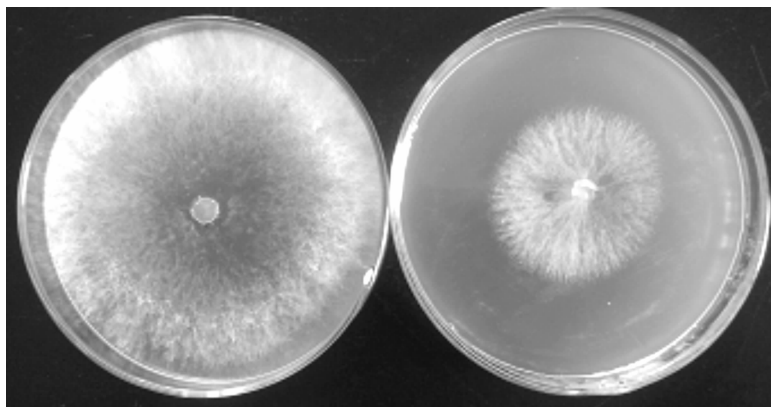


图7 银杏内生细菌 XZNUM 033 对 *L. theobromae* 的抑制作用

液中的活性物质对紫外线的耐受力基本能满足农药使用时自然界阳光中紫外辐射的要求。培养液的 pH 值为 3 和 4 时,对 *L. theobromae* 无抑制作用,因此,在田间试验时,银杏内生细菌 XZNUM 033 培养液应避免与酸性药剂混合使用,以免降低其药用价值。本研究通过离体试验,初步研究了银杏内生细菌 XZNUM 033 培养液中活性物质的抑菌活性,确定了该抗菌活性物质是分泌到胞外的代谢产物。

据报道,解淀粉芽孢杆菌能产生多种抑制植物病原真菌的抗菌物质,因而,在生物防治中起着重要的作用^[13-14],而且还能很好地抑制多种食物腐败真菌和致病菌的生长,可作为天然防腐剂加以利用^[15]。本试验用解淀粉芽孢杆菌来抑制 *L. theobromae*,对于拓宽解淀粉芽孢杆菌的生物防治范围具有一定的意义。

目前,林业生产中受林木变色真菌的危害较大,寻找具有拮抗林木变色真菌的微生物,不仅有助于林业木材变色真菌的生物防治,减少化学农药的使用,而且能够起到保护环境和生态系统的平衡,减少农药污染对人类的危害。至今,人们已从不同细菌类型和细菌菌株中分离得到拮抗物质,其中一部分是低分子量的抗生素,也有一些分子量较大的蛋白抗菌物质^[16]。在我国,杨木变色已成为生物防治的一个新兴课题,用生物防治来控制或防治杨木变色的优点是不污染环境、不破坏生态平衡,有利于杨树和杨木加工业的持续发展^[17]。因此,寻找优质生物防治菌是首要问题。

参考文献:

[1] Hartig R. Die Zersetzungsercheinungen des Holzes der Nadelholzbaume und der Eiche in forstlicher[M]. Berlin:Julius Springer,1878:151
[2] Uzunovic A, Yang D Q, Gagne P, et al. Fungi that cause sapstain in

Canadian softwoods[J]. Can J Microbiol, 1999 (45): 914 - 922
[3] Yang D Q. Isolation of wood-inhabiting fungi from Canadian hardwood logs[J]. Can J Microbiol,2005 (51): 1 - 6
[4] 杨卫君,王有科,赵桂华,等. 杨木变色菌的分离鉴定及其生物学特性的研究[J]. 湖北农业科学,2009, 48(5): 1225 - 1228
[5] Bruce A, Stewart D, Verrall S. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sapstain fungi[J]. International Biodeterioration & Biodegradation,2003 (51): 101 - 108
[6] Croan S C, Highley T L. Biological control of sapwood-inhabiting fungi by living bacterial cells of *Streptomyces riosus* as a bioprotectant [R]. International Research Group on Wood Preservation. Document No. IPG/WP/1564 - 92,1992
[7] Hortencia G M V, Victor O P. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs[J]. Scientia Horticulturae, 2007, 113: 103 - 106
[8] 王春明,金秀琳,何苏琴. 花椰菜黑斑病原鉴定及 6 种杀菌剂的室内药效测定[J]. 甘肃农业科技,2009(1): 17 - 19
[9] 于平儒,邵红军,冯俊涛,等. 62 种植物样品对菌丝活性的测定 [J]. 西北农林科技大学学报, 2001, 29 (6): 65 - 69
[10] 陈金春,齐虹,郑焕海. 环境污染微生物学实验指导[M]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2006: 48 - 157
[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: 57 - 59
[12] Ausubel F, Brent R, Kingston R E, et al. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖,王海林,译. 北京:科学出版社, 1998: 39 - 40
[13] Swinburne T R. The potential value of bacterial antagonists for the control of apple canker[J]. Ann ApplBiol, 1978, 89: 94 - 96
[14] Utkhede R S, Smith E M. Promotion of apple tree growth and fruit production by the EBW-4 strain of *Bacillus subtilis* in apple replant disease soil[J]. Can J Microbiol, 1992, 38: 1270 - 1273
[15] 潘恩霖. 微生物作为天然防腐剂的 application 和展望[J]. 南平师专学报, 2001, 20(2): 68 - 70
[16] 成丽霞,彭兵,李天金,等. 一株具有光谱抗真菌活性细菌菌株的分离鉴定及拮抗物的理化特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(3): 365 - 370
[17] 赵桂华,李德伟,李永成,等. 杨木边材变色菌的生物防治[J]. 福建林学院学报, 2007, 27(2): 134 - 137