

# 一株毛竹根部内生细菌 SHEN20121 的鉴定 及其对植物病原真菌的抑制作用

周 霄, 申小叶\*, 侯成林

(首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

**摘 要:** 在分离鉴定毛竹(*Phyllostachys edulis*)根部相关内生菌的过程中, 筛选得到具有生物活性的菌株 SHEN20121。通过对其 16S rDNA 序列的分析, 结果显示其与类芽孢杆菌属中 97 个细菌的序列相似性为 97%~99%; 系统学分析显示该菌株与多粘类芽孢杆菌聚在一个分支上, bp 支持率为 100, 因此菌株 SHEN20121 被鉴定为多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*)。通过平板对峙实验证明了菌株 SHEN20121 对多种植物病原真菌: 尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*), 互隔链格孢(*Alternaria alternata*), 立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*), 灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*), 小孢拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis microspora*), 柑橘青霉病菌(*Penicillium italicum*)均具有抑制作用, 其中对灰葡萄孢, 小孢拟盘多毛孢和柑橘青霉病菌的抑菌效果明显, 尤其是首次发现对拟盘多毛孢属病原菌的抑制作用。作者认为该菌在生物农药方面具有潜在的应用价值, 并可能将在植物病害的生物防治方面发挥重要作用。

**关键词:** 多粘类芽孢杆菌; 抗菌活性; 植物病原真菌; 平板对峙实验

中图分类号: Q939.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)05-0828-04

## Identification of endophytic bacterial strain SHEN20121 and its antibiotic activity against multiple plant pathogenic fungi

ZHOU Xiao, SHEN Xiao-ye, HOU Cheng-lin

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048)

**Abstract:** In this paper, a bacterial endophytic strain SHEN20121 was isolated from the roots of *Phyllostachys edulis*, and displayed high bioactivity against plant pathogenic fungi. Appraising with the analyses of 16S rDNA sequencing, the similarities of sequence between the SHEN20121 strain and other 97 registered bacterial strains of *Paenibacillus* were 97%-99%. The sequence alignments and phylogenic analysis showed strain SHEN20121 was closely related to *Paenibacillus polymyxa* and the bootstrap value was 100. SHEN20121 strain was found to have a strong antibiotic activity against six pathogenic fungi including *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternate*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Pestalotiopsis microspora* and *Penicillium italicum* by the dual-culture test. Inhibitory effect on *Botrytis cinerea*, *Pestalotiopsis microspora*, *Penicillium italicum* were particularly significant. It is the first report on the resistance of *Paenibacillus polymyxa* to *Pestalotiopsis microspora*. We concluded that the active strain SHEN20121 has potential ability in restraining plant pathogens and would be exploited as an attractive origins of new drug discovery and plant defense activator in the future.

**Key words:** *Paenibacillus polymyxa*; antibiotic activity; plant pathogens; dual-culture test

多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)是一类产芽孢的革兰氏阳性细菌, 广泛存在于自然界中, 由于其抗菌谱广、发酵性状好、产生的抗菌物质稳定, 既可防治病害又能促进植物生长, 被美国保护

环境署(EPA)列为可应用于商业的微生物种类之一<sup>[1]</sup>。在中国, 多粘类芽孢杆菌被认为是一类对植物非致病性同时具有防病作用和促生作用的极富潜力的生防菌种, 也被农业部列为免做安全鉴定的一

收稿日期: 2013-04-16

基金项目: 北京市教育委员会科技计划重点项目(KZ201110028036)和北京市自然科学基金项目(5133033)共同资助。

作者简介: 周 霄, 男, 硕士研究生。E-mail: zhouxiaojj23@126.com

\* 通信作者: 申小叶, 男, 讲师。E-mail: shenxiaoye2008@gmail.com

级菌种<sup>[2]</sup>。多粘类芽孢杆菌突出的特点是能产生抗逆性极强的芽孢, 这有利于芽孢杆菌作为生防菌株的生产、剂型加工及在环境中存活、定殖和繁殖。应用芽孢杆菌防治植物病害具有悠久的历史, 许多优良菌株已被广泛应用于防治果蔬、作物等的真菌及细菌病害。有相关研究表明多粘类芽孢杆菌能产生肽类、蛋白质类、核苷类、吡嗪类和酚类等多种活性物质, 而这些活性物质往往具有防治病原细菌、病原真菌、根结线虫等多种有害微生物的功能<sup>[3-6]</sup>。多粘类芽孢杆菌对多种植物病害具有防治效果, 例如林玲等<sup>[7]</sup>曾报道多粘类芽孢杆菌 Jaas cd 对 12 种植物致病菌具有抑制活性; 陈海英<sup>[8]</sup>发现多粘类芽孢杆菌 CP7 对包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)在内的 9 株病原细菌具有抑菌活性。作者参照传统的方法<sup>[9]</sup>, 在筛选毛竹根部相关内生真菌和细菌的过程中, 筛选得到 1 株具有广泛抑菌效果的内生细菌菌株——SHEN20121, 并对其进行了相关菌种的鉴定和抑菌效果的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株** 菌株 SHEN20121 为本实验室在筛选毛竹(*Phyllostachys edulis*)根部相关内生菌的过程中, 筛选得到的具有生物活性的内生细菌; 植物病原真菌尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*), 互隔链格孢(*Alternaria alternata*), 立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*), 灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*), 小孢拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis microspora*)均由本实验室保存; 柑橘青霉病菌(*Penicillium italicum*)分离于腐烂的柑橘表皮。

**1.1.2 培养基** (1) PDA 培养基: 土豆 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值自然。(2) LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。(3) LB 固体培养基: 在 LB 液体培养基基础上加入 20 g·L<sup>-1</sup> 琼脂粉。

### 1.2 16S rDNA 片段扩增、序列分析及进化树构建

**1.2.1 细菌基因组 DNA 的提取** SHEN20121 菌株用 LB 液体培养基过夜培养后, 离心收集菌体, 菌株的基因组 DNA 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京明日百微科技有限公司)提取。

**1.2.2 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列分析** 采用扩增细菌 16S rDNA 的 1 对保守引物 P<sub>1</sub>: AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG; P<sub>2</sub>: ACG GYT ACC TTG TTA CGA CT 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积为

50 μL, 其中 10×PCR buffer 5 μL, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs 4 μL, 引物各 2 μL, DNA 模板 2 μL, *Taq* DNA 聚合酶(10 000 U·mL<sup>-1</sup>)1 μL, 无菌水 36 μL。PCR 反应条件为 94℃ 3 min; 94℃ 40 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 循环 30 次; 72℃ 10 min, 4℃ 保存。PCR 产物经 10 g·L<sup>-1</sup> 琼脂糖凝胶电泳, 采用 DNA 快速纯化回收试剂盒(北京天根科技有限公司)回收扩增的 DNA 片段后, 送上海生物工程有限公司进行 PCR 产物的直接测序。

**1.2.3 序列比对和系统学分析** 测序得到 SHEN20121 菌株的 16S rDNA 的序列通过 BLAST 程序与 GenBank 中核酸数据进行比对分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。根据序列在 NCBI 数据库同源比对结果, 将相似性高且曾在国内外刊物发表过的多粘类芽孢杆菌 16S rDNA 序列下载, 分别为菌株 SQR-21<sup>[10]</sup>(FJ600406), 菌株 EJS-3<sup>[11]</sup>(DQ120522), 菌株 CE42<sup>[12]</sup>(JN084141), 菌株 JSa-9<sup>[13]</sup>(EU882855), 并选取一些模式菌株, 先通过 clustalx1.83 对序列进行多重序列比对, 再用 MEGA4 软件和 Neighbor Joining 法构建菌株的系统发育树。

### 1.3 SHEN20121 菌株平板对峙实验

**1.3.1 菌株的活化** 将 SHEN20121 菌株从斜面保藏培养基中用划线法转接至 LB 固体平板培养基中活化 24 h。用接种环刮取菌体接种于装有 100 mL LB 液体培养基的 150 mL 三角瓶中, 37℃、180 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 48 h。吸取 100 μL 菌液滴加在 LB 固体平板培养基中央, 用三角棒涂布均匀, 放置 37℃ 培养箱中培养 24 h。将植物病原真菌尖孢镰孢, 互隔链格孢, 立枯丝核菌, 灰葡萄孢, 小孢拟盘多毛孢, 柑橘青霉病菌从平板保藏培养基中用打孔法转接至 PDA 培养基中活化 5 d。

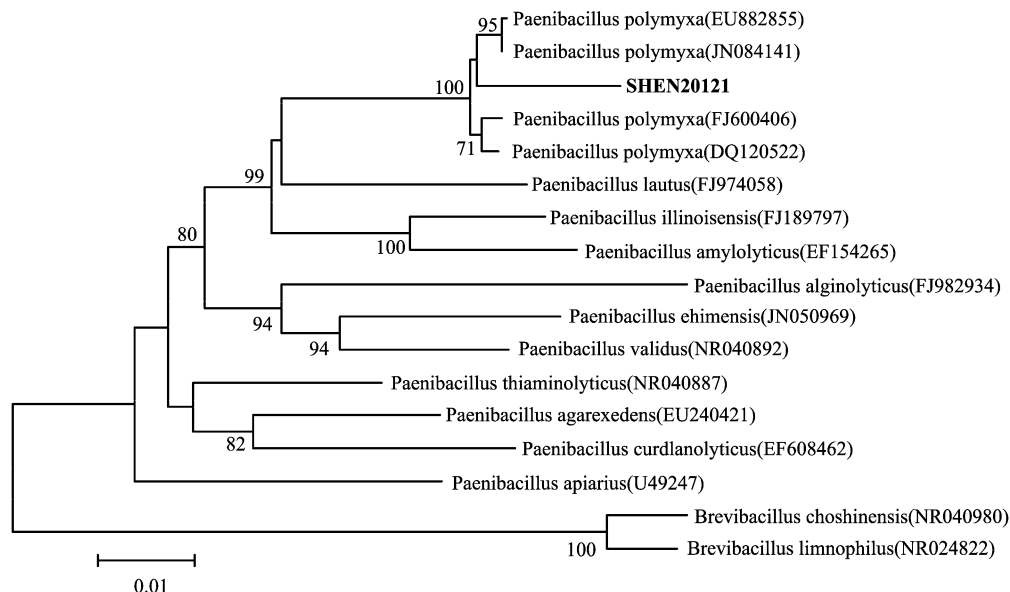
**1.3.2 菌株 SHEN20121 抑菌效果测定** 菌株 SHEN20121 对植物病原真菌尖孢镰孢, 互隔链格孢, 立枯丝核菌, 灰葡萄孢, 小孢拟盘多毛孢, 柑橘青霉病菌的拮抗作用采用平板对峙培养法<sup>[14]</sup>测定, 即在 PDA 平板距中央 25 mm 处两侧平行接入直径为 7 mm、生长旺盛的植物病原真菌菌块, 在病原真菌菌块垂直平分线上用灭菌牙签蘸取菌斑划线, 重复 3 皿, 以不划线的平板为对照, 28℃ 培养 7~8 d, 待对照组两病原真菌菌块接到一起后, 观察实验组抑菌效果并用游标卡尺(0.02 mm)测量实验组的抑菌宽度。

## 2 结果与分析

### 2.1 SHEN20121 菌株的系统发育分析

测序后, 获得 SHEN20121 菌株 16S rDNA 的部分序列 1 454 bp, 将测序得到的碱基序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源序列检测, 结果发现, 在最相近的 100 个序列中, 有 97 个菌株序列均为类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*) 成员, SHEN20121 与

它们的相似性为 97%~99%。系统发育分析表明, SHEN20121 菌株与 4 株曾在国内外期刊发表过的多粘类芽孢杆菌聚成一个进化分支, bp 支持值达到 100(图 1), 序列相似性达到 98%。16S rDNA 序列同源性比较分析是目前国际上通用的细菌鉴定技术, 一般认为 16S rDNA 序列相似性高于 98%, 可以认为是同一个种<sup>[15]</sup>。根据这一理论, SHEN20121 菌株应为多粘类芽孢杆菌。



采用 MEGA 4 软件, 邻位连接法显示菌株 SHEN20121 与相关种的 16S rDNA 序列系统发育树, 进行 1 000 次的相似度重复计算, 图中发育树节点只显示 Bootstrap 值大于 70% 数值, 图例为遗传距离

A neighbor-joining tree showing the 16S rDNA phylogenetic position of strain SHEN 20121 and the relatively species using the software MEGA 4; Bootstrap values greater than 70% are shown in 1 000 replicates, Bar: 0.02 substitutions per nucleotide

图 1 SHEN20121 菌株系统发育树状图

Figure 1 Phylogenetic tree of 16S rDNA of strain SHEN20121

表 1 多粘类芽孢杆菌 SHEN20121 的抑菌活性

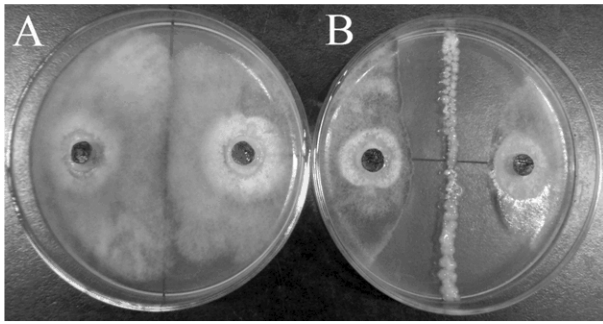
Table 1 The antibiotic activity of *Paenibacillus polymyxa* strain SHEN20121

菌株名称 Name of strain	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone	菌株名称 Name of strain	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone
尖孢镰孢 <i>Fusarium oxysporum</i>	17.7±0.9	灰葡萄孢 <i>Botrytis cinerea</i>	24.2±2.3
互隔链格孢 <i>Alternaria alternata</i>	15.4±0.9	小孢拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis microspora</i>	23.0±1.1
立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	—	柑橘青霉病菌 <i>Penicillium italicum</i>	21.2±0.6

### 2.2 SHEN20121 菌株对 6 种植物病原真菌的抑菌效果

通过多粘类芽孢杆菌 SHEN20121 与 6 种植物病原真菌对峙拮抗实验来检测多粘类芽孢杆菌 SHEN20121 的抑菌效果。平板对峙实验结果见表 1, 从表 1 中可知, SHEN20121 对尖孢镰孢, 互隔链格孢, 灰葡萄孢, 小孢拟盘多毛孢, 柑橘青霉病菌均有明显的抑制作用, 产生了明显的抑菌带, 其中对灰葡萄孢、小孢拟盘多毛孢和柑橘青霉病菌的抑制

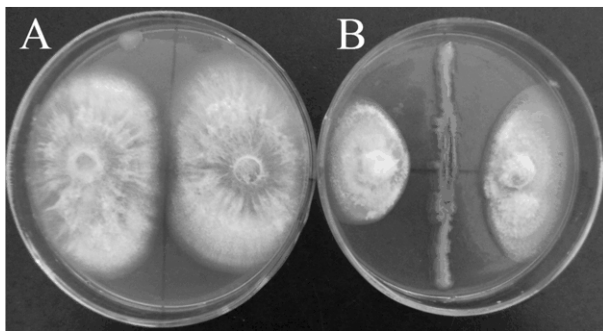
作用尤其明显, 抑菌带宽度分别达到 24.2 mm±2.3 mm(灰葡萄孢, 图 2), 23.0 mm±1.1 mm(小孢拟盘多毛孢, 图 3)和 21.2 mm±0.6 mm(柑橘青霉病菌, 图 4); 对尖孢镰孢, 互隔链格孢的抑制效果相对较弱, 抑菌带直径分别为 17.7 mm±0.9 mm 和 15.4 mm±0.9 mm。近年来, 国内外已经报道了多种具有丰富生物活性的多粘类芽孢杆菌, 其不同的菌株往往具有不同的抗菌活性, 可用于多种植物病害的防治。比如赵德立等<sup>[16]</sup>报道植物内生多粘类芽孢菌



A: 对照组; B: 菌株 SHEN20121 与灰葡萄孢平板对峙实验结果

A: Control check (CK); B: The result of the dual-culture test between strain SHEN20121 and *Botrytis cinerea*

图 2 多粘类芽孢杆菌 SHEN20121 菌株对灰葡萄孢抑制作用  
Figure 2 The antibiotic activity of *Paenibacillus polymyxa* strain SHEN20121 against *Botrytis cinerea*

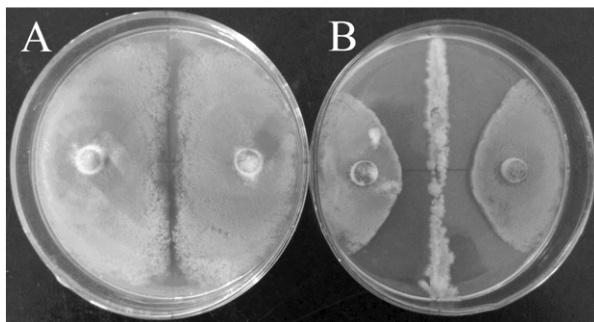


A: 对照组; B: 菌株 SHEN20121 与小孢拟盘多毛孢平板对峙实验结果

A: CK; B: The result of the dual-culture test between strain SHEN20121 and *Pestalotiopsis microspora*

图 3 多粘类芽孢杆菌 SHEN20121 菌株对小孢拟盘多毛孢抑制作用

Figure 3 The antibiotic activity of *Paenibacillus polymyxa* strain SHEN20121 against *Pestalotiopsis microspora*



A: 对照组; B: 菌株 SHEN20121 与柑橘青霉菌菌平板对峙实验结果

A: CK; B: The result of the dual-culture test between strain SHEN20121 and *Penicillium italicum*

图 4 多粘类芽孢杆菌 SHEN20121 菌株对柑橘青霉菌的抑制作用

Figure 4 The antibiotic activity of *Paenibacillus polymyxa* strain SHEN20121 against *Penicillium italicum*

对柑橘青霉病具有抑制效果; 王智文等<sup>[17]</sup>报道了 Cp-S316 菌株对植物病原真菌烟草赤星病菌有较强的抑杀作用; 陈雪丽等<sup>[18]</sup>曾报道 BRF-1 对黄瓜尖孢镰孢具有明显的抑制效果; 童蕴慧等<sup>[19]</sup>和 Helbig<sup>[20]</sup>也发现了对灰霉病有拮抗作用的多粘类芽孢杆菌。宋小双等<sup>[21]</sup>曾通过平板对峙培养法测定多粘类芽孢杆菌 SB-SF5 对苗木立枯病病原真菌——立枯丝核菌有较强的抗性。据作者所知, 多粘类芽孢杆菌对拟盘多毛孢类病原真菌的抑制作用, 目前还没有相关报道的出现。拟盘多毛孢类病原真菌, 是在自然界广泛存在的真菌病害, 其中的很多种类可引起严重的植物病害。比如枇杷拟盘多毛孢 (*Pestalotiopsis eriobotryfolia*) 引起的灰斑病是枇杷叶斑病中最严重的病害<sup>[22]</sup>, 核桃病害病原菌 (*Pestalotiopsis* sp.) 在大理州的优质核桃主产区曾经造成严重的危害<sup>[23]</sup>, *P. theae* 和 *P. guepinii* 菌侵染茶树, 可引起轮斑病与灰斑病, 最终导致茶叶产量的降低与品质的下降<sup>[24]</sup>。在本文中, 多粘类芽孢杆菌 SHEN20121 平板对峙实验的结果显示, 该菌株分泌的活性物质具有广谱拮抗多种植物病原真菌的活性, 尤其是明显抑制了拟盘多毛孢类病原真菌的生长, 拓展了多粘类芽孢杆菌在生物防治方面的适用范围, 并且为进一步发现新的相关生物活性物质奠定了基础。

### 3 结论

在构建系统发育树中, SHEN20121 菌株与 *Paenibacillus polymyxa* 形成一个进化分支并且 bp 支持高达 100, 序列相似性达到 98% 以上, SHEN20121 应属于多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*)。通过平板对峙培养发现, 多粘类芽孢杆菌 SHEN20121 菌株可有效抑制尖孢镰孢, 互隔链格孢, 灰葡萄孢, 小孢拟盘多毛孢和柑橘青霉菌的生长, 形成明显的抑菌带。说明该菌株在平板上生长的过程中, 分泌的活性代谢产物可以抑制真菌的生长, 其中对灰葡萄孢, 柑橘青霉菌, 小孢拟盘多毛孢的抑制效果最为明显, 这表明了多粘类芽孢杆菌 SHEN20121 在农业防治灰葡萄孢, 柑橘青霉菌, 小孢拟盘多毛孢等病原真菌造成的植物病害方面具有潜在的应用价值, 在将来有望开发为适合于生物防治的有效药剂。

### 参考文献:

- [1] Bent E. Surface colonization of lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*) roots by *Pseudomonas fluorescens* and *Paenibacillus polymyxa* under antibiotic conditions [J].

- Plant and Soil, 2002, 241(2): 187-196.
- [2] 宋永燕, 李平, 郑爱萍, 等. 生防细菌 LM-3 的鉴定及其抗菌蛋白的研究[J]. 四川大学学报, 2006, 43(5): 1110-1115.
- [3] Beatty P H, Suan E J. *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. Canadian[J]. Journal of Microbiology, 2002, 48: 159-169.
- [4] Jeon Y H, Chang S P, Hwang I G, et al. Involvements of growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* in root rot of stored Korean ginseng[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, 13: 881-891.
- [5] 童蕴慧, 郭桂萍, 徐敬友, 等. 拮抗细菌对番茄植株抗灰霉病的诱导[J]. 中国生物防治, 2004, 20: 187-189.
- [6] 赵德立, 曾林子, 李晖, 等. 多粘类芽孢杆菌 JW-725 抗菌活性物质及其发酵条件的初步研究[J]. 植物保护, 2006, 32: 47-50.
- [7] 林玲, 金中时, 马长文, 等. 棉花黄萎病生防内生细菌 Jaas cd 的鉴定及田间防效[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(1): 65-69.
- [8] 陈海英, 林健荣, 宋家清, 等. CP7 菌株的抗菌活性及菌种鉴定[J]. 中国生物防治, 2007, 23: 16-21.
- [9] 王玉君, 崔晋龙, 苏红, 等. 远志内生真菌抑菌活性筛选[J]. 微生物学通报, 2009, 6(3): 404-411.
- [10] Raza W, Yang W, Wu H, et al. Isolation and characterisation of fusaricidin-type compound-producing strain of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 active against *Fusarium oxysporum* f.sp. *neivium*[J]. Eur J Plant Pathol, 2009, 125(3): 471-483.
- [11] Lu F, Sun L, Lu Z, et al. Isolation and identification of an endophytic strain EJS-3 producing novel fibrinolytic enzymes[J]. Curr Microbiol, 2007, 54 (6): 435-439.
- [12] Sun Z B, Yuan X F, Wang Y X, et al. Diversity of culturable entophytic bacteria in cucumber leaves at blossoming and fruiting stages[J]. Microbiology, 2012, 39(6): 764-772.
- [13] Deng Y, Lu Z, Lu F, et al. Identification of LI-F type antibiotics and di-*n*-butyl phthalate produced by *Paenibacillus polymyxa*[J]. J Microbiol Methods, 2011, 85(3): 175-182.
- [14] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 195-246.
- [15] Fry N K, Warwick S, Saunders N A, et al. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family legionellaceae [J]. Journal of General Microbiology, 1991, 137: 215-222.
- [16] 赵德立, 曾林子, 李晖, 等. 多粘芽孢杆菌 Jw-725 抗菌活性物质及其发酵条件的初步研究[J]. 植物保护, 2006, 32(1): 47-50.
- [17] 王智文, 刘训理, 何亮, 等. Cp-S316 菌株发酵培养基的优化及其对烟草赤星病菌的抑制作用[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(2): 723-728.
- [18] 陈雪丽, 王光华, 金剑, 等. 多粘类芽孢杆菌 BRF-1 和枯草芽孢杆菌 BRF-2 对黄瓜和番茄枯萎病的防治效果[J]. 中国生态农业学报, 2008, 16(2): 446-450.
- [19] 童蕴慧, 纪兆林, 徐敬友. 灰葡萄孢拮抗细菌营养与发酵配方的研究[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2002, 23(4): 79-83.
- [20] Helbig J. Biological control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. in strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (isolate 18191) [J]. J Phvtopathology, 2001, 149: 265-273.
- [21] 宋小双, 邓勋, 马晓乾, 等. 针叶苗木立枯病拮抗细菌 SB-SF5 的分离与鉴定[J]. 林业科技, 2008(33): 30-33.
- [22] 陈福如, 杨秀娟. 福建省枇杷真菌性病害调查与鉴定[J]. 福建农业学报, 2002, 17(3): 151-154.
- [23] 马建鹏, 涂国信, 孔暄, 等. 核桃病害病原菌 *Pestalotiopsis* sp. 的防治研究[J]. 林业调查规划, 2010, 35(6): 93-95.
- [24] 陈玉森, 刘伟, 叶乃兴, 等. 茶轮斑病菌与灰斑病菌的特性比较及致病观察[J]. 茶叶科学, 2009, 29(6): 449-455.