

魔芋内生拮抗细菌的分离及其抗菌物质特性研究

周 盈, 陈 琳, 柴鑫莉, 喻子牛, 孙 明*

(华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

摘 要:从魔芋的内生菌中筛选到能抑制魔芋软腐病原菌生长、产芽胞的杆状细菌, 16S rDNA 序列分析表明该菌是一株枯草芽胞杆菌, 命名为 BSn5。BSn5 的胞外蛋白提取液有抗菌活性, 并具有对热不稳定, 对蛋白酶 K 敏感, 对胰蛋白酶不敏感的特性, SDS-PAGE 检测显示该蛋白提取液仅由分子量为 31.6kDa 的蛋白质组成。通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化该蛋白, 纯化的蛋白能够抑制软腐病原菌的生长, 进一步表明该 31.6kDa 蛋白即为该菌的抗菌活性物质。该蛋白与目前所知的枯草芽胞杆菌产生的抗菌物质均不同, 可能是一种新的抗菌蛋白。

关键词: 魔芋; 植物内生菌; 枯草芽胞杆菌; 抗菌蛋白

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2007) 06-1076-04

植物内生菌(endophyte)是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物各种组织和器官内部的真菌或细菌^[1], 属于植物组织内的正常菌群。内生菌广泛分布于多种陆生和水生植物中, 目前已经在许多植物中发现了内生菌^[1,2]。植物内生菌定殖在植物组织间, 受紫外线辐射、温度湿度变化等环境因素的影响较小, 因此与根际微生物及体表微生物相比, 内生菌作为生防剂具有很大的优势, 是重要的植物病害防治菌种资源。目前在棉花^[3,4]、辣椒^[5]和可可树^[6]等作物中都开展了内生菌的研究, 并找到了一些具有生防应用潜力的内生菌^[4,6,7,9], 枯草芽胞杆菌就是其中的一种^[7,9]。

枯草芽胞杆菌不仅是一种自然界广泛存在的非致病菌, 而且也是常见的植物内生菌^[10]。与其它内生细菌相比, 枯草芽胞杆菌能够产生耐热、耐干旱的芽胞, 具有极强的抗逆能力, 作为生防菌剂具有良好的应用前景。目前商品化的内生枯草芽胞菌制剂还处于研发阶段, 但已有多种根际枯草芽胞杆菌的菌剂获得推广应用, 例如我国的“莱丰宁”和美国 Gustafson 公司开发的商业化枯草芽胞杆菌生防菌株 GB-03。枯草芽胞杆菌能够产生多种具有生物活性的代谢产物, 国内外对其抗真菌活性研究较多^[11-14], 而且研究表明抗真菌活性物质大部分为分子量小于 6kDa 的低分子多肽。分离抗菌蛋白的报道较少, 例如, 谢栋等^[15]从强烈抑制苹果轮纹病菌、小麦赤霉病菌和芦笋茎枯病菌等植物病原真菌的枯草芽胞杆菌 BS-98 中纯化出分子量为 59kDa 的抗菌蛋白, 刘进元等^[16]从具有强烈抑制水稻白叶枯病菌特性的枯草芽胞杆菌中分离到分子量为 22.5kDa 的抗菌蛋白。

魔芋软腐病原菌是胡萝卜软腐欧文氏杆菌胡萝卜致病变种(*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*)^[17, 18], 对魔芋产业危害极大。该病原菌寄生范围广, 除侵染魔芋以外, 还可以侵染

十字花科^[19]等多科的植物, 目前尚无有效的防治措施。本研究从魔芋的内生菌中筛选到了软腐病原菌的拮抗细菌, 通过 16S rDNA 序列分析对该菌株进行了鉴定, 并研究了该菌株产生的抗菌物质的特性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品:花魔芋(*Amorphophallus konjac*), 由本研究室周涪博士提供。病原菌胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) SCG1 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α , 本研究室保存。

1.1.2 引物 CW34667(5'-CTCTCAAAGTACGACCGAGTC-3')和 CW34668(5'-TTCCTCCACTAGGTRGGCGT-3')由奥科生物技术有限责任公司合成。

1.1.3 培养基:分离筛选用培养基为牛肉膏蛋白胨培养基, 其成分为: 每升水含牛肉膏 5g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, pH 7。培养拮抗菌的培养基为 LB (Luria-Bertani) 培养基, 其成分为: 每升水含蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, NaCl 10g, pH 7。

1.1.4 主要试剂和仪器:DNA 凝胶回收试剂盒、PCR 反应用的各种试剂均购自大连 TaKaRa 公司; 蛋白胨、牛肉膏、NaCl、葡萄糖等购自上海生物工程技术有限公司。光学显微镜: Olympus Microscope。

1.2 魔芋内生拮抗细菌的分离和筛选

一年生以上的健康花魔芋(*Amorphophallus konjac*)块茎, 流水清洗表面, 用 0.15% 升汞浸泡 30min, 70% 酒精浸泡处理 2min, 再用无菌水洗 3 次, 晾干后去表皮, 切成小块, 移入愈伤培养基(MS + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L, pH6), 26℃ 暗培养, 弃去微生物污染块茎。无微生物污染的愈伤组织继代 3~4 次, 极少量愈伤组织有细菌污染, 保存备用。

基金项目: 国家“973 项目”(2003CB114201)

* 通讯作者。Tel: 86-27-87283455; E-mail: m98sun@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 周 盈(1982-), 女, 湖北监利人, 硕士研究生, 主要从事芽胞杆菌分子生物学研究。E-mail: zhouying@webmail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2007-03-07; 接受日期: 2007-04-26; 修回日期: 2007-05-10

0.5 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基冲洗含菌愈伤组织,洗液保存备用。平板对峙培养筛选拮抗菌:将约 10^9 cfu/mL (colony forming unit, cfu) 的软腐菌 SCG1 菌悬液 0.2 mL 加入无菌培养皿中,倒入已冷却至 40°C 左右的牛肉膏蛋白胨培养基,充分摇匀,冷却,按 10 倍梯度稀释洗液至 10^{-2} ,涂布平板。 28°C 培养 2d 后选择菌落分布均匀的稀释度观察是否有抑菌圈,保存形成抑菌圈的菌株。

1.3 拮抗菌的内生定殖测定

培养 16 h 的菌液,取 $20\mu\text{L}$ 注入无菌培养的魔芋试管苗茎基部,同时以 *E. coli* DH5 α 作为阴性对照,每个菌种设 3 个重复。试管中培养 40d,取魔芋试管苗根部表面灭菌(方法同 1.2 所述),碾碎,按 10 倍梯度稀释至 10^{-6} ,涂布平板,每个稀释度 3 个重复。 28°C 培养 24h,选择菌落数量适当的稀释度,计算试管苗根内的含菌量。

1.4 拮抗菌的菌种鉴定

拮抗菌经革兰氏简单染色后,置普通光学显微镜下观察。抽提拮抗菌总 DNA,利用 16S rDNA 细菌通用引物 CW34667 和 CW34668 进行 PCR 扩增。扩增产物回收,送至公司测序。测序结果输入 NCBI 中用 Blastn 程序交送 GenBank 库进行比较分析。

1.5 拮抗菌的抑病活性检测

马铃薯洗净表面,用 75%(V/V)乙醇进行表面消毒。在无菌操作台上,用无菌刀片将马铃薯切成厚度约为 1cm 的片状。拮抗菌 BSn5 约 10^9 cfu/mL 的培养菌液, 28°C 浸泡马铃薯切片 30min 后,接种软腐菌 SCG1 约 10^6 cfu/mL 的菌液 $5\mu\text{L}$,同时以不接种软腐菌 SCG1 和接种软腐菌 SCG1 的未浸泡拮抗菌的马铃薯切片作为对照。 28°C 培养 24h,观察马铃薯是否出现软腐病斑及感病的程度。

1.6 拮抗菌胞外蛋白的提取与纯化

拮抗菌 BSn5 的 LB 培养液 12000r/min 离心 10min,各取 100mL 上清,分别缓慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 达 30%、50% 和 80% 硫酸铵饱和度,12000r/min 4°C 离心 10min,去离子水溶解沉淀。粗提液移至透析袋(截留分子量 8~10kDa)于去离子水中 4°C 透析 48h,定容至原培养液的 1/20 体积。紫外吸收法定量,各取 $100\mu\text{g}$ 蛋白加在 SCG1 的混菌平板上,观察是否产生抑菌圈,SDS-PAGE 凝胶电泳检测蛋白组成。

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 30% 硫酸铵饱和度的蛋白液 $200\mu\text{L}$,取一侧凝胶少许染色,根据显色蛋白带的位置切下剩余凝胶上的该蛋白。切下的凝胶加 2mL 去离子水,碾碎碾碎,离心,取上清,得到不含凝胶碎片的纯化蛋白,另切下相同大小的空白凝胶重复以上步骤,提取液作为阴性对照。取阴性对照和 $50\mu\text{g}$ 纯化蛋白加在同一个 SCG1 的混菌平板上,观察是否产生抑菌圈并记录抑菌圈的直径。

以上操作重复 3 次。

1.7 抑菌蛋白的性质分析

各取 $100\mu\text{g}$ 的 30% 硫酸铵饱和度蛋白液分别用 50°C 、 80°C 、 100°C 和 120°C 处理 30 min,蛋白酶 K、胰蛋白酶 37°C 下处理 60min(酶反应浓度均为 20mg/L),同时以未作处理的蛋

白液为阳性对照,添加等量蛋白酶的去离子水为阴性对照,分别加在 SCG1 的混菌平板上,检测其对软腐菌 SCG1 的抑菌活性,观察是否产生抑菌圈并记录抑菌圈的直径。以上操作重复 3 次。

2 结果

2.1 内生拮抗细菌的筛选、鉴定及内生定殖测定

愈伤组织洗液中的内生菌的数量不多,未稀释洗液涂布平板后可以形成单独的菌落,其中约 1/10 菌落形成了抑菌圈。这些内生拮抗细菌的菌落形态相似,都表现为菌落突起,表面有褶皱,形成的抑菌圈直径都约为 5mm。

随机挑取 25 个单菌落,复经简单染色后,置普通光学显微镜下观察,均为产芽胞的杆状菌。取其中一个菌落,抽提总 DNA,扩增其 16S rDNA,产物大小约为 1.5kb,连接到 pGEM-T easy 载体,转化 *E. coli* DH5 α ,阳性克隆从 CW34668 引物端测序,测得的 681bp 的片段可在 GenBank 库中的各枯草芽胞杆菌 16S rRNA 基因找到同源序列,且相似性(identities)达到 99.0%,确定该菌属于芽胞杆菌科芽胞杆菌属(*Bacillus*),命名为 BSn5。

接种了菌株 BSn5 的魔芋试管苗根部的含菌量分别为 3.7×10^5 cfu、 3.3×10^5 cfu、 4.7×10^5 cfu。接种 *E. coli* DH5 α 的魔芋苗根部没有检测到 *E. coli* DH5 α 。说明菌株 BSn5 为魔芋的内生菌,能够在魔芋根部大量定殖。

2.2 芽胞杆菌 BSn5 的抑病活性检测

从图 1 的结果可以看出:仅接种软腐菌 SCG1,不接种内生菌 BSn5 的马铃薯上出现明显的软腐病斑,而接种内生菌 BSn5 的马铃薯上,软腐菌 SCG1 产生的软腐病斑较小。说明菌株 BSn5 能够较好的降低软腐菌的致病力。

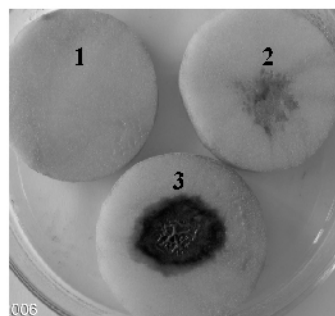


图 1 芽胞杆菌 BSn5 对胡萝卜软腐欧文氏杆菌 SCG1 的抑病活性试验

Fig.1 Detection of inhibitory activity of *Bacillus* BSn5 against pathogen *Erwinia carotovora* SCG1. 1. Potato with water; 2. Potato with BSn5 and SCG1; 3. Potato with SCG1.

2.3 芽胞杆菌 BSn5 胞外蛋白的提取与纯化

等量的 30%、50% 和 80% 硫酸铵饱和度蛋白提取液中,30% 硫酸铵饱和度蛋白提取液较纯,仅有一个可见的蛋白条带,根据迁移率计算该蛋白条带大小为 31.6kDa(图 2)。形成的抑菌圈大小见表 1,表明 80% 硫酸铵饱和度蛋白提取液中的抗菌蛋白的含量最低,其它非抗菌蛋白含量较高,30%

硫酸铵饱和度蛋白提取液中抗菌蛋白的含量最高。非变性凝胶电泳纯化 30% 硫酸铵饱和度蛋白提取液,获得的 50 μ g 蛋白形成的抑菌圈的直径的平均值为 10mm,而阴性对照没有形成抑菌圈。表明 30% 硫酸铵饱和度蛋白提取液中的 31.6kDa 蛋白即为该菌的抗菌活性物质。

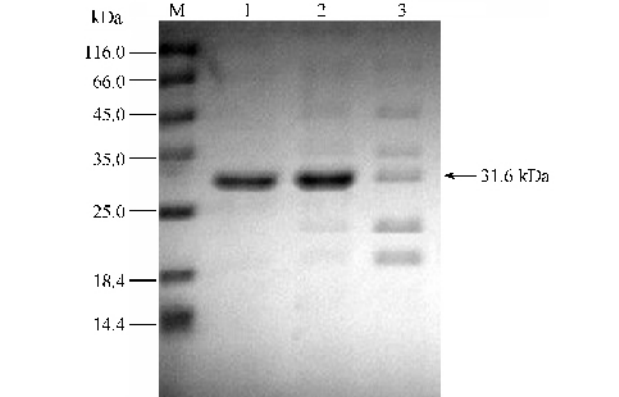


图 2 芽胞杆菌 BSn5 的不同饱和度硫酸铵蛋白提取液的 SDS-PAGE 结果

Fig.2 SDS-PAGE detection of different saturated ammonium sulfate precipitations of *Bacillus* strain BSn5. Marker; 1. 30% saturated ammonium sulfate precipitation of BSn5; 2.50% saturated ammonium sulfate precipitation of BSn5; 3. 80% saturated ammonium sulfate precipitation of BSn5.

2.4 抑菌蛋白的性质分析

未加热处理的蛋白液和 50 $^{\circ}$ C 处理的蛋白液,均形成抑菌圈(表 1) 80 $^{\circ}$ C、100 $^{\circ}$ C 和 120 $^{\circ}$ C 处理的蛋白液,未形成抑菌圈,说明蛋白液中的抗菌物质对较高的温度敏感,仅能耐受 50 $^{\circ}$ C。蛋白酶 K 处理的蛋白液不能形成抑菌圈,表明蛋白酶 K 能够破坏该蛋白的活性。胰蛋白酶处理的蛋白液形成了抑菌圈(表 1),而胰蛋白酶阴性对照不形成抑菌圈,说明蛋白粗提液中的抗菌物质经胰蛋白酶处理后仍然保持活性,对胰蛋白酶不敏感。

表 1 不同处理的 BSn5 蛋白提取液形成的抑菌圈
Table 1 Inhibitory zone of different treatments of extracted protein of BSn5

Treatments		Quantity of protein/ μ g	Average diameter of inhibitory zone/mm
Saturated ammonium sulfate	30%	100	17
	50%	100	16
	80%	100	9
Extracted protein*	50 $^{\circ}$ C	100	17
	80 $^{\circ}$ C	100	0
	100 $^{\circ}$ C	100	0
treated by heat	120 $^{\circ}$ C	100	0
Extracted protein*	Proteinase K	100	0
treated by proteinases	Trypsin	100	17

* 30% saturated ammonium sulfate precipitations.

3 讨论

本研究从魔芋内生菌中筛选到一株能够抑制细菌性病害病原菌胡萝卜软腐欧文氏菌的枯草芽胞杆菌,该菌能够明显

降低欧文氏菌的致病力,可用于软腐病生物杀菌剂的研制开发,同时还可能成为构建魔芋内生防病工程菌的受体菌。

已知的枯草芽胞杆菌产生的抗菌物质多为低分子多肽,例如表面活性素(Surfactin);一般能够耐受高温,例如谢海平等^[13]研究的海洋枯草芽胞杆菌产生的抗菌蛋白能够耐 121 $^{\circ}$ C 高温,何红等^[14]研究的枯草芽胞杆菌产生的抗菌蛋白也能够耐 100 $^{\circ}$ C 高温,对蛋白酶处理不敏感。而本研究中的枯草芽胞杆菌产生的抗菌蛋白能够耐受 50 $^{\circ}$ C 处理,对 80 $^{\circ}$ C 以及 80 $^{\circ}$ C 以上的温度敏感,对蛋白酶 K 敏感,分子量为 31.6kDa。显然前人研究的枯草芽胞杆菌抗菌蛋白与本研究中的抗菌蛋白特性是不同的,因此该蛋白可能是一种新的抗菌蛋白。与氨基糖苷类、大环类脂类等非蛋白类抗生素相比,抗菌蛋白的合成途径比较简单,而且该蛋白分子量不大,可以较容易的克隆相应的基因。通过原核体系中的大量表达,可以进一步验证该蛋白的抗菌活性并研究其拮抗作用机制,该研究正在进行中,此外克隆的基因也可作为植物遗传改良的基因资源。

BSn5 这种对胡萝卜软腐欧文氏菌有拮抗作用的细菌,能够作为内生菌存在于魔芋中,其原因值得探究。胡萝卜软腐欧文氏菌造成的魔芋软腐病是魔芋最重要的细菌性病害,在魔芋栽培中广泛存在^[15];内生菌作为生存于植物内部的菌种资源,这种独特的生态位使得内生菌与植物之间存在着紧密地联系,因此推测拮抗内生菌存在的原因是:在长期受到病原菌胁迫的植物组织中,内生菌的种类和数量随着所寄居的植物的内部的生态环境的变化而变化,当植物受到病原菌的侵染时,组织间繁殖着大量的病原菌并发生相应的组织病理反应,植物的内部的生态环境不利于大部分的内生菌的定殖,但是可能存在少量内生菌株能够耐受这种不良环境,这种内生菌株通过产生抗菌物质,抑制病原菌生长,从而提高了宿主的存活几率。本研究中 BSn5 的分离验证了这种推测,并表明可按这条途径去寻找新的抗菌物质。

参 考 文 献

[1] Sturz A, Christie B, Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2000, **19**(1): 1-30.

[2] Denise K, Pat L, Beth N, *et al.* Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(5): 2198-2208.

[3] 吴谨民, 顾本康. 内生菌 73a 在不同抗性品种棉花体内的定殖和消长动态研究. *植物病理学报*, 2001, **31**(4): 289-294.

[4] Chen C, Bauske E, Musson G, *et al.* Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control*, 1995, **5**: 83-91.

[5] 何红, 邱思鑫, 蔡学清, 等. 辣椒内生菌 BS-1 和 BS-2 在植物体内的定殖及鉴定. *微生物学报*, 2004, **44**(1): 13-18.

[6] Marciano R, Rute T, Alan W, *et al.* Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' Broom Disease.

- [7] Ednar G , Cames M , Carmen N , *et al.* Biological control of black rot(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology* , 2002 , **108** : 317 – 325.
- [8] Susanne J , Beate V , Lucienne M , *et al.* Characterization of *Bacillus* strains from apple and pear trees in South Africa antagonistic to *Erwinia amylovora* . *FEMS Microbiology Letters* , 2002 , **21** : 247 – 252.
- [9] Cavaglieri L , Orlando J , Rodrigue M , *et al.* Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology* , 2005 , **156** : 748 – 754.
- [10] Lilley A , Fry J , Bailey M , *et al.* Comparison of aerobic heterotrophic taxa isolated from root domains of mature sugar beet. *FEMS Microbiology Ecology* , 1996 , **21** : 231 – 242.
- [11] Landy M , Warren G , Roseman S , *et al.* Bacillomycin , an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* , 1948 , **67** : 539 – 541.
- [12] Kudryashova E , Vinokurova N , Ariskina E. *Bacillus subtilis* and phenotypically similar strains producing Hexaene antibiotics. *Applied Biochemistry and Microbiology* , 2005 , **41** (5) : 486 – 489.
- [13] 谢海平 , 黄 晖 , 黄登峰 , 等. 海洋枯草芽孢杆菌 BS-1 产生多种抗真菌活性物质. 中山大学学报(自然科学版) , 2003 , **42** (3) : 122 – 123.
- [14] 何 红 , 蔡学清 , 关 雄 , 等. 内生菌 BS-2 菌株的抗菌蛋白及其防病作用. 植物病理学报 , 2003 , **33** (4) : 373 – 378.
- [15] 谢 栋 , 彭 憬 , 王津红 , 等. 枯草杆菌芽孢杆菌抗菌蛋白 X 98 III 的纯化与性质. 微生物学报 , 1998 , **38** (1) : 13 – 19.
- [16] 刘进元 , 潘乃穗 , 陈章良. 抗菌蛋白 LC II B 的纯化及性质. 微生物学报 , 1993 , **33** (4) : 268 – 273.
- [17] 周 昌 , 严 顺 , 鲁红学 , 等. 魔芋病害近年持续发生流行原因分析及对策. 中国植保导刊 , 2004 , **8** : 45 – 48.
- [18] 黄俊斌 , 仁 胜 , 赵纯森 , 等. 魔芋软腐病病原菌的鉴定及生物学特性初步研究. 华中农业大学学报 , 1999 , **18** (5) : 413 – 415.
- [19] 李红军 , 冷德训 , 韶 梅. 十字花科蔬菜细菌性病害发生及综合防治技术. 中 2 国果菜 , 2005 , **5** : 30 – 30.

Isolation of endophytic antagonistic bacterium from *Amorphophallus konjac* and research on its antibacterial metabolite

ZHOU Ying , CHEN Lin , CHAI Xin-li , YU Zi-niu , SUN Ming*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China)

Abstract : An endophytic antagonistic bacterium was isolated from *Amorphophallus konjac* calli. In order to identify this bacterium , 16S rDNA was amplified and partially sequenced. Sequence comparison showed that this sequence has the highest similarity to that in *Bacillus subtilis* with 99.0% identities. That demonstrated this bacterium belongs to *Bacillus subtilis* , named BSn5. The extracted extracellular protein from strain BSn5 had antibacterial activity against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* , which was unstable after heated , sensitive to proteinase K and resistant to trypsin. There was only a 31.6kDa protein component as by SDS-PAGE detection. Nondenaturing polyacrylamide gel was used to purify this protein. The purified 31.6kDa protein exhibited inhibitory activity against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* . This protein is different from all known metabolites from *Bacillus subtilis* , suggesting that it may be a novel antibacterial protein.

Keywords : *Amorphophallus konjac* ; plant endophyte ; *Bacillus subtilis* ; antibacterial protein