

珙桐内生细菌的分离鉴定及系统发育分析

宋培勇^{1*} 李凤华¹ 马莉莉²

(1. 遵义师范学院生物系 贵州 遵义 563002)

(2. 湄潭求是高级中学 贵州 湄潭 564100)

摘要: 用微生物学传统分离培养方法从珙桐茎、叶及叶柄中分离到内生细菌 56 株, 选取 17 株内生菌, 提取其基因组 DNA, 并以此为模板, PCR 扩增其 16S rDNA, 扩增出约 1 500 bp 大小的 DNA 条带, 对 15 株内生菌 16S rDNA 测序, 用 BLAST 软件对测序结果进行相似性比对, 发现 11 株为 *Bacillus* 属, 相似性为 95%–98%; 2 株为 *Lysinibacillus* 属, 相似性为 97% 和 99%; 1 株为 *Bordetella* 属, 相似性为 95%; 1 株为非培养细菌的同源菌, 相似性 96%。芽孢杆菌为珙桐内生细菌优势菌属。通过构建系统发育树发现这 15 株内生菌明显聚为 2 大支。

关键词: 珙桐, 内生细菌, 分离, 鉴定, 系统发育分析

Isolation and phylogenetic analysis of endophytic bacteria in *Davidia involucrate*

SONG Pei-Yong^{1*} LI Feng-Hua¹ MA Li-Li²

(1. Department of Biology, Zunyi Normal College, Zunyi, Guizhou 563002, China)

(2. Qiushi Senior High School, Meitan, Guizhou 564100, China)

Abstract: A total of 56 endophytic bacteria were isolated from the stem, leaves and petioles of *Davidia involucrate* with traditional cultural methods. Of which, 17 endophytic bacteria were selected to carry out succedent molecular studies. About 1 500 bp fragments of 16S rDNA were amplified by PCR method using the extracted genomic DNA as the template. According to sequences analysis and comparison with the data of GenBank by BLAST, eleven endophytic bacteria were classed to *Bacillus* genera, the identities are from 95% to 98%, two were classed to *Lysinibacillus* genera, the identities are 97% and 99%, one were classed to *Bordetella* genus, the identity was 95%, and one was similar to a reported uncultured bacterium, the identity was 96%. *Bacillus* was the dominant genus among the endophytic bacteria in *Davidia involucrate*. The phylogenetic tree showed that the 15 endophytic bacteria clustered two main branches.

Keywords: *Davidia involucrate*, Endophytic bacteria, Isolation, Identification, Phylogenetic analysis

基金项目: 遵义师范学院基金资助项目(No. 2005019)

* 通讯作者: Tel: 86-852-8927815; ✉: py66song@126.com

收稿日期: 2010-04-07; 接受日期: 2010-10-18

植物内生菌是指在其生活史的一定阶段生活在活体植物组织内, 而不引起植物明显病害的微生物^[1]。目前在各种农作物及果树等经济作物中发现的内生细菌已超过 745 种(隶属于 9 个属), 这些内生细菌大多为土壤微生物种类, 其中 *Pseudomonas*、*Bacillus*、*Enterobacter* 及 *Agrobacterium* 为最常见的属^[2]。内生菌对宿主植物具有固氮(主要是内生细菌)、促生长(如分泌 IAA 等植物生长激素物质)、抗逆境(如干旱等)、抗动物(昆虫、线虫、食草哺乳动物等)摄食、抗病原真菌和细菌以及他感等作用^[3]。感染内生菌的植物, 比未感染植株更具生存竞争力。由于植物内生菌所发挥的重要生态和生理作用, 以及作为生防资源和外源基因载体在农业和医药领域中的潜在应用价值, 已成为国内外研究的热点^[4]。

珙桐(*Davidia involucrate* Baill)为我国特有的珙桐科单型属植物, 是第三纪古热带植物区系的子遗种, 亦称为水梨子或鸽子树, 属国家一级保护植物。我国从上世纪 70 年代开始对珙桐进行研究, 但研究不够系统, 有关珙桐的报道主要集中在珙桐群落学、地植物学、人工繁殖技术及引种栽培、种群生态学、生物学、组织化学、组织细胞学和组培、形态和解剖学等方面, 有关生理、遗传、生化等方面鲜有报道^[5]。何映霞等^[6]从珙桐中分离到一株产黄酮内生真菌 *Aspergillus fumigatus*, 每 100 g 干菌丝可产黄酮 31.9 mg。但关于珙桐内生细菌的研究未见相关报道。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 材料: 实验所用珙桐的茎、叶等于 2008 年 5 月从遵义市宽阔水国家级自然保护区采集, 带回实验室后经表面冲洗、消毒等处理, 马上进行内生菌的分离。

1.1.2 主要试剂和仪器: Tris (北京索莱宝科技有限公司), EDTA (北京索莱宝科技有限公司), CTAB (Ameresco), SDS (Sigma), 琼脂糖[基因科技(上海)有限公司分装], $2\times Taq$ PCR MasterMix 和 200 bp DNA Ladder [天根生化科技(北京)有限公司]; 胶回

收试剂盒 E.Z.N.A*. Gel Extraction Kit (由 Omega Bio-Tek Inc. 提供)。PCR 扩增仪为 DNA Engine peltier Thermal Cycler (Bio-Rad)。WD-9413A 凝胶成像分析仪(北京六一)。引物 27f: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1527r: 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' (由上海捷瑞生物工程有限公司合成)。

1.2 方 法

1.2.1 内生菌的分离: (1) 表面消毒。参考文献[7]介绍的方法: 将采集的新鲜珙桐的茎、叶和叶柄分别用流水冲洗, 风干表面水分, 剪成小块或小段, 无菌水漂洗 2 次, 75%酒精浸泡 1 min, 再用 2% NaClO 溶液中浸泡 3 min, 转入 75%酒精中浸泡 30 s, 接着用无菌水漂洗 3 次, 平放于 NA 平板上, 28 °C 培养 2-3 d。取最后一次漂洗液涂布 NA 平板作为对照。

(2) 内生菌分离和纯化。将 NA 平板上组织块下或周缘长出的菌落或菌苔划线稀释分离 1-2 次直到获得纯培养。

1.2.2 内生菌的形态学鉴定: 从菌落特征、革兰氏染色特征、细胞形态特征等对分离菌株进行初步鉴定。

1.2.3 内生菌基因组 DNA 的提取: 参照文献[8]介绍的水煮法提取细菌总 DNA: 取 1 mL 菌悬液放入 1.5 mL 无菌的 EP 管中, 13 500 g 离心 10 min; 弃上清, 将菌体重新悬浮于无菌水中, 振荡均匀后, 沸水中煮 7 min; 离心, 弃沉淀, 留上清备用。

1.2.4 16S rRNA 基因的 PCR 扩增: PCR 反应体系 50 μ L: 引物 27f 和 1527r 各 1 μ L, $2\times Taq$ PCR MasterMix 25 μ L, 模板 DNA 5 μ L, ddH₂O 18 μ L。

反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 50 s, 59 °C 2 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.2.5 测序: 16S rRNA PCR 扩增产物经试剂盒纯化后交北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。

1.2.6 同源性比对及系统发育树的构建: 登陆 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)利用 BLAST 将测序结果与 GenBank 中的已知序列进行比对, 查找相似性最高的菌种。并用 MEGA4.0 软件进行多序列比对, 构建系统发育树。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

2 结果与讨论

2.1 珙桐内生菌的分离及初步鉴定

通过微生物学传统分离培养和划线稀释分离方法从珙桐茎、叶和叶柄共获得内生菌 56 株, 其中来自茎的 13 株, 叶的 21 株, 叶柄的 22 株。除个别菌株为革兰氏阴性外, 皆为革兰氏阳性, 绝大部分为杆状, 个别为短杆状或球杆状, 见图 1。

2.2 部分菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增

根据菌株间形态学上的差异, 挑选 GT01、GT02、GT04、GT09、GT 13、GT 14、GT 21、GT 23、GT 26、GT 31、GT 32、GT 33、GT 36、GT 39、GT 42、GT 45、GT 56 共 17 株内生菌, 以其基因组 DNA 为模板, 用引物 27f 和 1527r^[9], PCR 扩增 16S rDNA, 通过 1.6% 琼脂糖凝胶电泳, 发现扩增出约 1 500 bp 大小的 DNA 条带(图 2)。大多数条带都比较清晰, 说明扩增效果较好。但 13 号菌株扩增出多条条带, 39 号菌株扩增出 2 条条带, 应为非特异扩增。

从胶中割下约 1 500 bp 大小的条带, 用胶回收试剂盒回收 17 株内生菌的 PCR 扩增产物, 送北京诺赛公司测序, 15 株内生菌获得了测序结果。图 3 为菌株 GT33 的测序结果。

2.3 同源性比对及系统发育树的构建

利用 NCBI 中的 BLAST 软件对测序结果进行同源性比对搜索, 结果 15 个菌株均找到了其相似性最高的菌株: 11 株为 *Bacillus* 属, 相似性 95%–98%; 2 株为 *Lysinibacillus* 属, 相似性 97% 和 99%; 1 株为 *Bordetella* 属, 相似性为 95%; 1 株为非培养细菌的同源菌, 相似性 96% (表 1)。

对 15 株内生细菌及其 14 株同源菌株的 16S rRNA 序列, 利用 MEGA4.0 构建出系统发育树(图 4): GT21、GT33 和 GT42 聚在一起, 与 *Bacillus subtilis* strain 22 亲缘关系较近; GT23 和 GT36 聚在一起, 与 *Bacillus cereus* strain ZH-3 及 Uncultured bacterium clone ADB-21 亲缘关系较近; GT31、GT26 和 GT02 聚在一起, 与 *Bacillus cereus* strain B1 及 *Bacillus* sp.

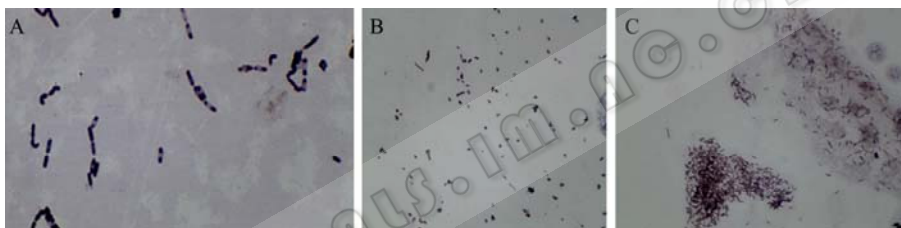


图 1 3 株内生细菌革兰氏染色显微照片

Fig. 1 Microgram of three endophytic bacteria by Gram stain

Note: A: GT01; B: GT36; C: GT42.

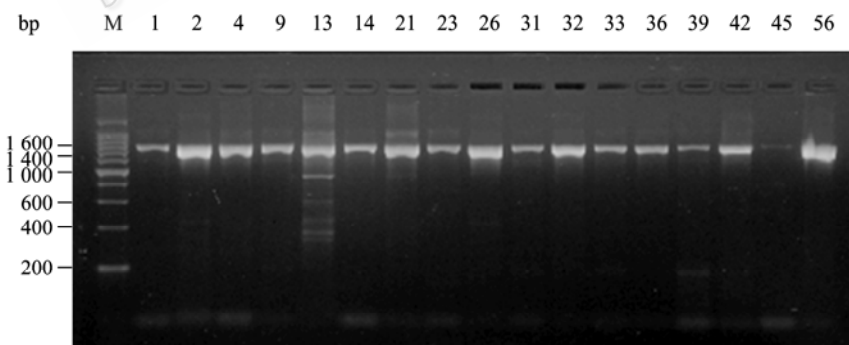


图 2 17 株内生细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 Amplification results of 16S rDNA of 17 endophytic bacteria by PCR

Note: M: 200 bp DNA ladder; 1,2 and so on represent GT01, GT02 and so forth respectively.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

CAAGGCGGCGTGCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGG
 CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG
 TAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTATG
 GATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCC
 GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
 GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTT
 CGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGT
 ACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
 TATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGG
 CTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGAATTCCAT
 GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGT
 AACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
 TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCAC
 TCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGG
 TGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAAC
 CCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
 TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCACCGAGCCGCAACCCTGATCTTAGTGCCATCATTAGTTGG
 GCACTCTAGGGTGACTGCGTGACAACGAGAGTGGGGATGACGTCATCATCATGCCCTATGACCTGG
 CTACCACGTGCTACATGAACGTACAAGAGCTGCAGACGCGAGGTGACTATGTGCGGTGAAGCGTTCT
 CAGTTTCCGGATTGTATAGGCGTGCAACCTCGCTGCCCTCACGTATGCTGAACGT

图3 内生细菌 GT33 的 16S rDNA 测序结果

Fig. 3 Sequencing of 16S rDNA of endophytic bacteria No. 33

表1 16S rDNA 扩增产物序列相似性比对
Table 1 Comparison of the 16S rDNA sequence identity

Strain No.	Origin	Accession No.	The nearest type strain	Identity (%)
GT01	Petiole	EF440288	<i>Bacillus cereus</i> strain M212	96
GT02	Petiole	EU857430	<i>Bacillus cereus</i> strain B1	97
GT04	Petiole	FJ210466	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain Zhou-1	97
GT09	Petiole	GU905015	<i>Bacillus</i> sp. TW1	96
GT 13	Stem	DQ302159	<i>Bordetella</i> sp. J7	95
GT 14	Stem	HM219667	<i>Bacillus cereus</i> strain ZH-3	97
GT 21	Petiole	HM366481	Uncultured bacterium clone ADB-21	96
GT 23	Petiole	EU584547	<i>Bacillus</i> sp. cp-h50	98
GT 26	Stem	GQ199726	<i>Bacillus</i> sp. 210_24	95
GT 31	Stem	EU719665	<i>Bacillus</i> sp. cp-h71	98
GT 32	Stem	FJ435215	<i>Bacillus subtilis</i> strain 22	96
GT 33	Petiole	EF440288	<i>Bacillus cereus</i> strain M212	97
GT 36	Leaf	GQ246654	<i>Lysinibacillus</i> sp. M1T1B8	99
GT 39	Leaf	GU204967	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain Lma3	97
GT 42	Leaf	HM582688	<i>Bacillus altitudinis</i> strain AP-MSU	98

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

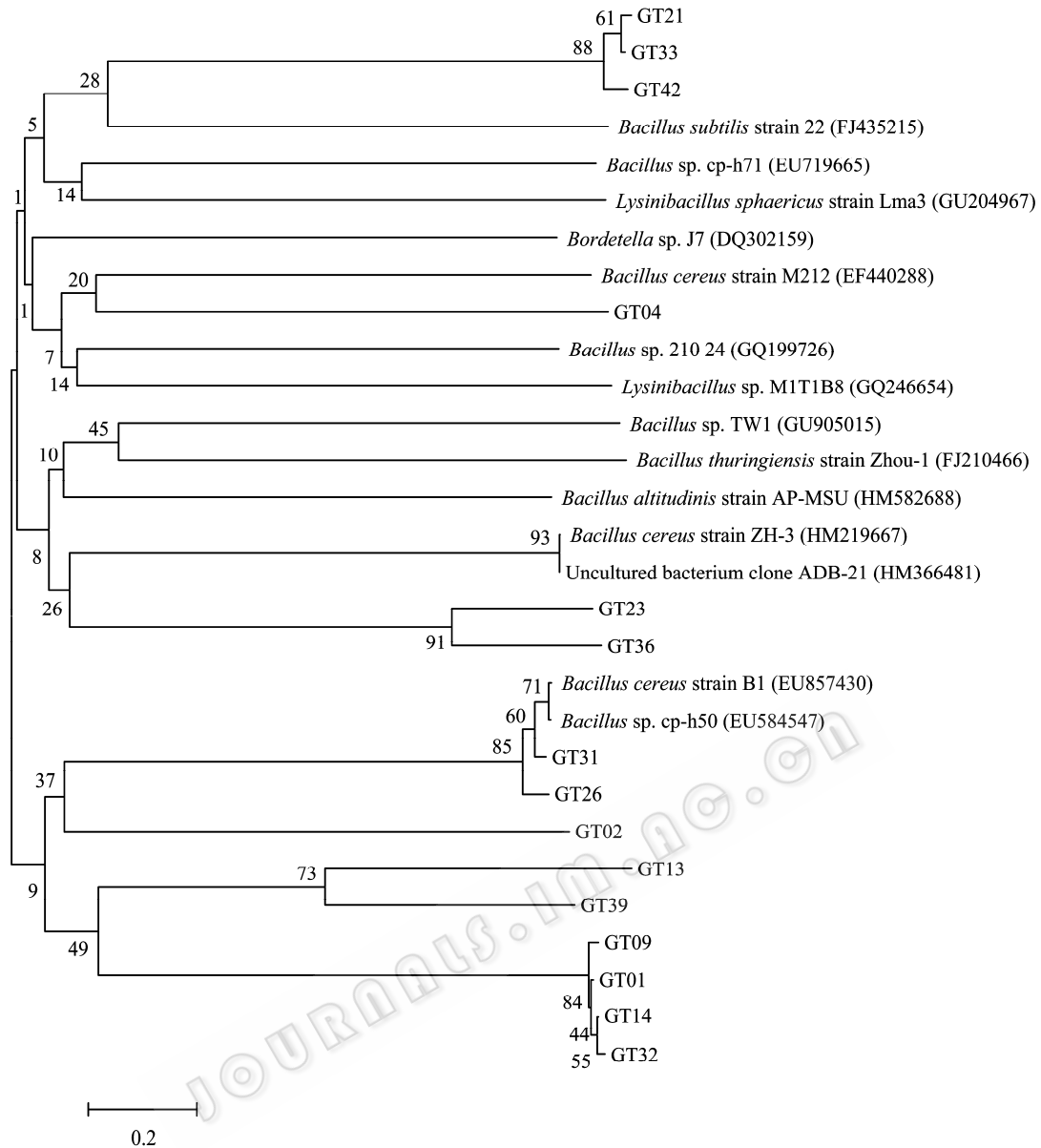


图 4 15 株内生细菌及其同源菌株基于 16S rRNA 序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree derived from 16S rRNA sequences of 15 endophytic bacteria and the nearest type strains

Note: The numbers at the nodes are bootstrap values. The numbers in the brackets are accession numbers.

cp-h50 亲缘关系较近; GT13 和 GT39 聚在一起, 亲缘关系较近; GT09、GT01、GT14、GT32 聚在一起, 亲缘关系较近; GT04 和 *Bacillus cereus* strain M212 亲缘关系较近。

3 结论

通过传统的微生物学分离培养方法从遵义市宽

阔水国家级自然保护区野生珙桐的茎、叶和叶柄中共分离到 56 株内生细菌, 根据形态学差异挑取 17 株细菌提取基因组 DNA, PCR 扩增 16S rRNA, 通过对 15 株内生菌的测序结果进行 BLAST 比对, 发现这些内生细菌绝大多数为芽孢杆菌属, 如蜡状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和高地芽孢杆菌等; GT13 为 *Bordetella* 属; GT36 和 GT39

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

为 *Lysinibacillus* 属; GT21 与非培养菌株同源。芽孢杆菌为珙桐内生细菌优势菌属。通过构建系统发育树, 可以看出这 15 株内生细菌明显的聚为 2 大支。

4 展望

植物内生菌是宝贵的微生物资源, 如苏云金芽孢杆菌由于能产生 δ 内毒素, 对鳞翅目等昆虫的幼虫有毒杀作用而用以制造生物农药, 是常用的生防资源菌。另外, 内生菌在与宿主植物长期的共进化过程中, 可能获得部分宿主植物的基因, 从而产生与宿主植物相同或相似的生物活性物质, 这一发现提示人们可以不用砍伐植物而可以从其内生菌中去筛选目的菌株, 通过微生物发酵生产对人类有价值的生物活性物质, 例如 1993 年, Stierle 等^[10]首次报道从太平洋紫杉中分离出产紫杉醇的内生真菌 (*Taxomyces andreanae*), 2008 年, 何映霞等^[6]报道从珙桐中分离到产黄酮内生真菌 *Aspergillus fumigatus*, 这些无疑为内生菌研究及其应用展现了诱人的前景。

参 考 文 献

- [1] 姜怡, 杨颖, 陈华红, 等. 植物内生菌资源[J]. 微生物学通报, 2005, 32(6): 146-147.
- [2] 邹文欣, 谭仁祥. 内生菌的生物多样性及其应用//季承森. 植物科学进展[M]. 第 2 卷. 北京: 中国高等教育出版社, 1999: 183-190.
- [3] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881-892.
- [4] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题[J]. 生态学杂志, 2004, 23(2): 86-91.
- [5] 胡进耀, 苏智先, 黎云祥. 珙桐生物学研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(4): 15-19.
- [6] 何映霞, 冉雪琴, 王嘉福. 珙桐产黄酮内生真菌的分离和鉴定[J]. 贵州农业科学, 2008, 36(3): 3-6.
- [7] 杨瑞先, 孙广宇, 张荣, 等. 油菜内生细菌 16S 核糖体 DNA 的 RFLP 分析[J]. 微生物学报, 2005, 45(4): 606-609.
- [8] 陶天申, 杨瑞馥, 东秀珠. 原核生物系统学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 63.
- [9] Rainey FA, Ward-Rainey N, Kroppenstedt RM, et al. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(4): 1088-1092.
- [10] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216.