

Screening, Identification of an Antagonistic Endophyte to Pathogens of Mulberry Bacterial Diseases from Mulberry Leaves and Its Biocontrol Activity

Biao Wang, Yinghao Pan, Jialan Hou, Yuqi Qi, Aiming Chen, Na Wang*

College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang Jiangsu

Email: biojustwn@126.com

Received: Aug. 20th, 2019; accepted: Sep. 2nd, 2019; published: Sep. 9th, 2019

Abstract

The endophytic bacteria which antagonized the pathogens of mulberry bacterial wilt and mulberry bacterial blight were screened from healthy mulberry leaves, and the biocontrol mechanism was also explored. The endophytic bacteria were isolated and purified from the mulberry leaves which were strictly surface-sterilized by conventional methods. The antagonistic bacteria were screened by the inhibition zone method. At the same time, the organic solvents were used to extract the products of the strain, and the active substance group was analyzed by the inhibition zone method, and the types of active substances were qualitatively analyzed. Results showed that 7 endophytic bacteria were isolated from the three healthy mulberry trees, in which 3 strains antagonized mulberry pathogens, and the strain numbered 381 isolated from 9703 had the strongest effect. Based on morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequence analysis, the strain 381 was identified as *Paenibacillus polymyxa*. The active bacteriostatic substances produced by strain 381 existed mainly in the fermentation broth and could be effectively extracted with ethyl acetate. Qualitative tests indicated that the active bacteriostatic substances may be alkaloids, flavonoids, diterpenes or triterpenes. At the same time, qualitative analysis on the plates showed that the 381 strain could produce organic acids, cellulases and proteases. The results in this paper provided theoretical basis and reference basis for the pollution-free prevention and control of mulberry bacterial diseases.

Keywords

Mulberry, Biocontrol Endophytic Bacteria, Mulberry Bacterial Blight, Mulberry Bacterial Wilt, Antibacterial Activity, Screening, Identification

一种桑树细菌性病原内生拮抗细菌的筛选、鉴定及其生防活性

*通讯作者。

文章引用: 王彪, 潘英豪, 侯佳蓝, 戚昱琦, 陈爱明, 王娜. 一种桑树细菌性病原内生拮抗细菌的筛选、鉴定及其生防活性[J]. 微生物前沿, 2019, 8(3): 110-120. DOI: 10.12677/amb.2019.83014

王 彪, 潘英豪, 侯佳蓝, 戚昱琦, 陈爱明, 王 娜*

江苏科技大学生物技术学院, 江苏 镇江

Email: biojustwn@126.com

收稿日期: 2019年8月20日; 录用日期: 2019年9月2日; 发布日期: 2019年9月9日

摘 要

本文从健康桑树叶片中筛选对桑青枯病和桑疫病病原菌有拮抗作用的内生细菌, 并对其生防机制初步探索。实验利用常规方法从严格表面消毒的桑树叶片中分离纯化内生菌, 采用抑菌圈法筛选拮抗菌; 同时有机溶剂分段萃取拮抗菌产物, 抑菌圈法分析活性物质存在组段, 并定性分析活性物质的种类。结果显示, 从三个品种健康桑树叶片中分离获得7株内生细菌, 其中3株具有拮抗桑树病原菌的作用, 分离自品种9703的编号为381的菌株作用效果最强。结合形态学和生理生化特征以及16S rRNA序列分析鉴定其为多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)。菌株381产生的活性抑菌物质主要存在于发酵液中, 可用乙酸乙酯有效萃取。定性鉴定表明活性抑菌物质可能是生物碱、黄酮、二萜或三萜。同时平板定性分析显示菌株381可产生有机酸、纤维素酶和蛋白酶。研究结果对桑树细菌性病害无公害防治提供理论基础和参考依据。

关键词

桑树, 生防内生菌, 桑疫病, 桑青枯病, 抑菌活性, 筛选, 鉴定

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

植物病害是制约农业生产的主要因素之一, 主要阻碍农作物生长发育, 降低产量和质量, 给农户造成巨大经济损失。农业生产上, 化学农药是防治植物病害的首选方式, 但其长期的不合理使用导致负面问题层出不穷, 如病原菌抗药性增强、环境污染严重、破坏生物多样性以及高毒高残留等[1] [2] [3] [4]。随着人们环保意识以及农产品安全意识的不断增强, 生物防治受到了国内外植物保护工作者的重视。在植物病害生物防治中生防菌是一类重要的防治资源, 其在多种微生物源植物病害防治中起到重要的作用。

细菌、真菌和放线菌均可作为生防菌应用于植物病害的生物防治中[5]-[10]。但细菌具有的存在广泛、群体庞大、繁殖迅速、代谢活动复杂、对病原菌作用方式多样等特点, 使其成为生防菌开发的热点。目前研究者已从不同来源分离并鉴定出多种具有抗植物病原菌活性的生防细菌, 主要包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)和类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)等, 其中以芽孢杆菌属(*Bacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)的生防细菌研究应用最多[11] [12] [13] [14]。

生防细菌可来源于自然保护区原始土壤、极端环境、植物病害的根际土壤以及健康植物组织内部(内生细菌)等多个区域[15]。内生细菌在植物体内定殖、传导, 可系统地分布于植物细胞间隙或细胞内; 与寄主植物具有良好的亲合能力, 有足够的营养物质, 并受到植物组织的保护, 可避免外部恶劣环境的影

响。这些特性使内生细菌成为植物病害生物防治上一类极具应用潜能的资源细菌。

桑树是我国最早栽培的经济林木,除了饲养家蚕外还具有重要的药用、食用、观赏和环保价值。然而包括桑疫病和桑青枯病在内的多种桑树细菌性病害造成的损失逐年增加,已成为阻碍桑资源利用的主要障碍之一[16]。目前桑树病害的防治除选育抗性品种外,主要依赖化学农药,其带来的环境污染和农药残留对养蚕业的负面影响已经逐渐凸显,寻求“绿色防控”已成为必然。

本研究以从健康桑树叶片中分离出的内生细菌为材料,以桑疫病和桑青枯病病原菌为指示菌,从微生物的培养、形态及生理生化指标、分子生物学鉴定和抑菌性入手,探讨桑叶内生细菌对桑细菌性病原菌的抗菌作用。利用桑树内生细菌控制桑树病害,为新型微生物农药的开发提供一定的理论依据,既可减轻化学农药造成的环境污染,又有利于家蚕的健康饲养。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

2.1.1. 供试桑树病原菌

桑青枯病病原菌青枯菌 5 号小种(*Ralstonia solanacearum* race 5)和桑疫病病原菌丁香假单胞杆菌桑致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *Mori*),均由中国农业科学院蚕业研究所桑病研究室提供。

2.1.2. 供试样品桑叶

采自中国农业科学院蚕业研究所国家种质镇江桑树圃的桑树(*Morus alba* L.)上(品种:9703、湖桑 2 号和野生桑)。样品采集后用自封袋密封马上回实验室进行内生细菌分离。

2.1.3. 培养基

KB 培养基, PDA 培养基, GYP 培养基, NB 培养基。休和利夫森二氏培养基(蛋白胨 2.0 g, NaCl 5.0 g, KH_2PO_4 0.2 g, 葡萄糖 10.0 g, 琼脂 6.0 g, 溴百里酚蓝 1.0%水溶液 3 mL, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0~7.2), 甲基红试验培养基(蛋白胨 5.0 g, 葡萄糖 5.0 g, K_2HPO_4 5.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0~7.2), 亚硝酸盐还原试验培养基(牛肉膏 10.0 g, 蛋白胨 5.0 g, 亚硝酸钠 1.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.3~7.4), 明胶培养基(蛋白胨 5.0 g, 明胶 100.0~150.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2~7.4), 产有机酸培养基(葡萄糖 6.0 g, 酵母浸膏 1.0 g, 蛋白胨 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, CaCO_3 1.0 g, 溴甲酚紫微量, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 值 7.2~7.4)。

2.2. 桑叶内生细菌的分离和纯化

将采摘的桑树、湖桑和野生桑三个品种健康成熟桑叶,用蒸馏水洗净,晾干。将桑叶剪成大约 5 cm × 2 cm 的叶段,1.5%次氯酸钠和 75%乙醇依次表面消毒 5 min,取出后无菌水冲洗干净。待水分自然晾干,叶段剪成 1 cm²左右的小块,贴附在 PDA 培养基平板上,28℃恒温条件下培养 3~7 天。将从叶片切口边缘处长出的内生细菌逐个接至新的 PDA 培养基平板上,多次划线分离纯化。根据菌落大小、形态、颜色等进行初步筛选,纯化后菌株编号冷藏保存。将最后一次清洗的无菌水涂板于 PDA 培养基,培养后无菌生长,确保分离菌株为内生菌。

2.3. 桑树病原菌的拮抗菌株筛选

将桑树病原菌和内生细菌分别在 KB 和 PDA 培养基上活化 12 h。无菌水冲洗病原菌平板,获得菌悬液,取 50 μL 菌悬液涂布于 KB 培养基中。将内生细菌点接在涂布好的病原菌平板上,37℃倒置培养 24 h 观察实验结果,并计算相对抑菌圈直径[17]。相对抑菌圈直径 = 抑菌圈直径 - 测试菌直径。

2.4. 内生拮抗菌的鉴定

2.4.1. 内生拮抗菌的形态和生理生化特征

参照《微生物实验》[18]对筛选的内生拮抗菌在 PDA 培养基上培养(37℃, 24 h), 记录菌落的形态、颜色、透明度等, 光学显微镜下观察菌细胞革兰氏染色和芽孢染色反应。经固定、脱水、干燥、镀金后 GeminiSEM 300 场发射扫描电子显微镜观察菌细胞形态。参照《常见细菌系统鉴定手册》[19]对筛选的内生拮抗菌进行生理生化反应测定。

2.4.2. 内生拮抗菌 16S rRNA 分子生物学鉴定

将目的菌株接种在 NB 培养基振荡培养 24 h, 采用上海生工(Sangon Biotech)离心柱型细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。以提取的细菌基因组 DNA 为模板, 使用通用引物[20] (上游引物: 5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3'; 下游引物: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')。扩增细菌 16S rRNA 基因。50 μ L 的反应体系: DNA 模板 4 μ L, 10 μ M 引物各 2 μ L, Premix Taq 25 μ L, ddH₂O 17 μ L。PCR 反应条件: 95℃预变性 4 min, 94℃变性 30 s, 50℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 30 个循环后, 72℃延伸 10 min。取 5.0 μ L PCR 产物于 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。PCR 扩增产物委托浙江尚雅生物技术有限公司进行测序。所得的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 数据库中进行比对, 下载同源性较高序列, 利用 MEGA (version 6.06)软件, 使用 N-J 法进行 1000 次步长计算[20], 构建系统发育树。

2.5. 内生拮抗菌抑制桑树病原菌活性产物初步分析

2.5.1. 拮抗菌的特性分析

拮抗菌可通过产生纤维素酶、蛋白酶、有机酸等一系列物质来破坏菌细胞结构, 从而达到抑菌的效果。

产有机酸分析: 将拮抗菌点接在产有机酸培养基平板上, 37℃静止培养 4 d, 观察是否有黄色的降解圈。

产纤维素酶分析: 将拮抗菌点接在含有 0.5%羧甲基纤维素的 1000 mL 的 GYP 培养基平板上, 37℃静止培养 4 d。培养皿中加入 0.2%刚果红染液浸没菌落, 40 min 后倒掉染色液, 再加入 1 mol/L NaCl 脱色 15 min, 观察是否有黄色降解圈[21]。

产蛋白酶分析: 将拮抗菌点接在培养基平板上, 37℃静止培养 3 d。培养皿中加入饱和硫酸铵溶液浸没菌落, 30 min 后倒掉溶液, 观察是否有透明圈。培养基: 1000 mL 的 GYP 培养基(pH 6.0)中加入 8%的 50 mL 的明胶溶液[21]。

2.5.2. 拮抗菌抑制桑树病原菌产物分析

1) 拮抗菌产物的分段有机萃取和抑菌分析

将拮抗菌接种于 PDA 液体培养基中, 37℃、120 r/min 振荡培养 48 h。5000 r/min 常温离心 15 min, 收集发酵液。发酵液依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇四种有机溶剂分段萃取, 收集有机相。将所得的各有机相和水相经旋转蒸发仪 50℃下减压浓缩至干。固体提取物用二甲亚砜溶解成一定浓度, 经 0.22 μ m 微孔滤膜除菌后备用。采用滤纸片法分析各萃取段提取物对桑树病原菌的抑菌效果, 最终确定活性物质所在萃取段。

2) 活性萃取段提取物定性检测

生物碱: 向提取物溶液中加入饱和苦味酸溶液, 有黄色沉淀, 则有生物碱。

二萜: 提取物溶液加水, 再加入 3~4 滴 0.2 mol/L 醋酸铜溶液, 若变绿色则存在二萜。

三萜: 提取物溶液中加入几滴浓硫酸, 摇匀后静置, 若下层变黄则含有三萜。

黄酮：提取物溶液中加入几滴 0.25 mol/L 醋酸铅溶液，有黄色沉淀表明有黄酮的存在。

3. 结果与分析

3.1. 桑树叶片内生细菌的分离纯化

通过微生物传统分离纯化方法从三种健康桑树叶片中分离筛选出 7 株内生细菌，其中桑树品种 9703 分离出 3 株(分别命名为 371、381 和 391)；野生桑中分离出 3 株(分别命名为 B1、B2 和 B3)；湖桑 2 号中分离出 1 株(命名为 CP1)。

3.2. 桑树病原菌的拮抗菌株筛选

以桑树病原菌为靶标菌，对分离到的 7 株内生细菌进行拮抗作用测定。结果表明 7 株内生细菌中有 3 株(381、391 和 B3)具有拮抗桑树病原菌的作用，而编号为 381 的抑菌效果最好(图 1)。381 对桑青枯病病原菌的抑制效果较强，相对抑菌圈直径达到 8.51 ± 0.75 mm；对桑疫病病原菌的抑制效果相对较弱，相对抑菌圈直径为 5.74 ± 0.26 mm。

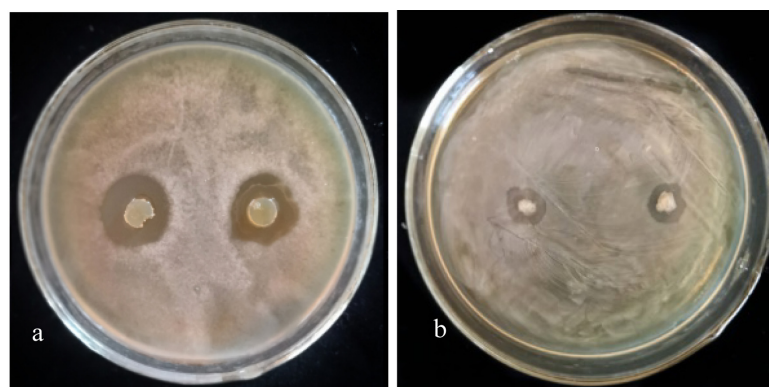


Figure 1. Antimicrobial effects of strain 381 on two pathogens caused mulberry bacterial wilt (a) and mulberry bacterial blight (b)

图 1. 内生拮抗菌 381 对桑青枯病(a)和桑疫病(b)病原菌的抑制效果

3.3. 筛选内生拮抗菌 381 的鉴定

3.3.1. 内生拮抗菌 381 的形态和生理生化特征

菌株 381 在 PDA 培养基上生长良好，37℃ 下培养 20 h 即可形成明显的菌落(图 2)。单个菌落初期呈透明水滴状，后为乳白色粘质圆形，表面湿润光滑，中心凸起，边缘整齐，菌细胞不易挑取。10 × 100 倍光学显微镜下，菌体杆状，革兰氏染色呈可变性，未发现芽孢(图 3)。扫描电子显微镜下菌细胞表面布满褶皱，呈杆状，两端呈圆弧形，未观察到明显的鞭毛和芽孢，大小约 $0.8\sim 2.3 \times 0.2\sim 0.3$ μm (图 4)。

生理生化特性鉴定结果表明(表 1)，菌株 381 能利用蔗糖、甘露醇、麦芽糖、鼠李糖和乳糖等作为碳源和能源。甲基红实验结果呈阴性，结合糖发酵实验可推断，菌株 381 可将糖发酵产的有机酸转化为非酸性末端产物。V-P 试验为阳性，亚硝酸还原反应为阴性。初步鉴定菌株 381 为一种芽孢杆菌。

3.3.2. 内生拮抗菌 381 的系统进化分析

以菌株 381 的基因组 DNA 为模板，用细菌 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增，得到单一条带，产物大小约为 1500 bp，条带清晰。PCR 扩增产物经浙江尚雅生物有限公司序列测定，测得菌株 381 的 16S rRNA 基因序列总长为 1431 bp。序列上传至 NCBI 基因序列分析网站进行同源性分析，并选取与其相近



Figure 2. The colony morphology of strain 381

图 2. 内生拮抗菌 381 的菌落形态

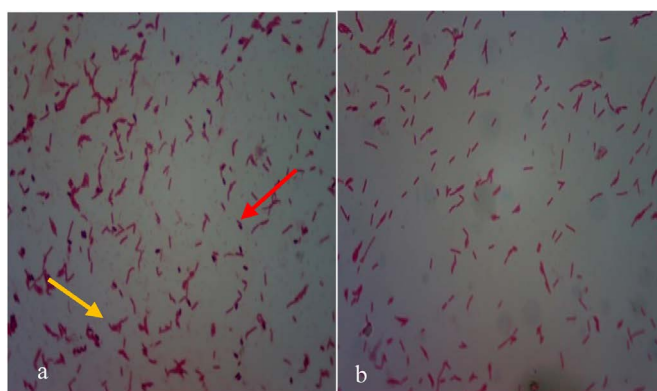


Figure 3. Gram staining (a) and spore staining (b) of strain 381. (Red arrow: Gram positive; Yellow arrow: Gram negative; Magnification: 10×100)

图 3. 内生拮抗菌 381 的革兰氏染色(a)和芽孢染色(b)。(红色箭头: 革兰氏阳性; 黄色箭头: 革兰氏阴性; 放大倍数: 10×100)

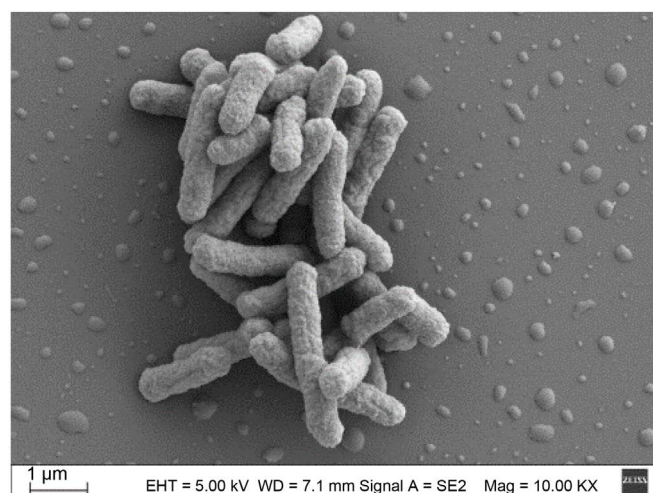


Figure 4. Scanning electron microscope photograph of strain 381

图 4. 内生拮抗菌 381 的扫描电子显微镜照片($\times 10,000$)

Table 1. Main physiological and biochemical characteristics of strain 381
表 1. 内生拮抗菌 381 的主要生理生化特征

测定指标 Item test	结果 Result
蔗糖 Sucrose	+
甘露醇 Mannitol	+
麦芽糖 Maltose	+
鼠李糖 Rhamnose	+
V-P 试验 V-P test	+
明胶 Gelatin	+
乳糖 Lactose	+
甲基红 Methyl red	-
亚硝酸 Nitrous acid	-

注：“+”为阳性反应，“-”为阴性反应；Note：“+”，positive；“-”，negative.

序列的菌株，采用 N-J 法构建系统发育树。根据菌株 381 在 NCBI 数据库上 BLAST 结果，它与类芽孢杆菌属 *Paenibacillus* 具有较高的同源性。由图 5 可以看出，菌株 381 与登录号为 NR 117729.2 的 *Paenibacillus polymyxa* strain DSM 36 菌株位于同一个最小的分支，且同源性为 99.65%，亲缘关系最近。

根据菌株 381 的 16S rRNA 同源性分析结果，并结合其形态和生理生化特征，可鉴定菌株 381 为多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)。

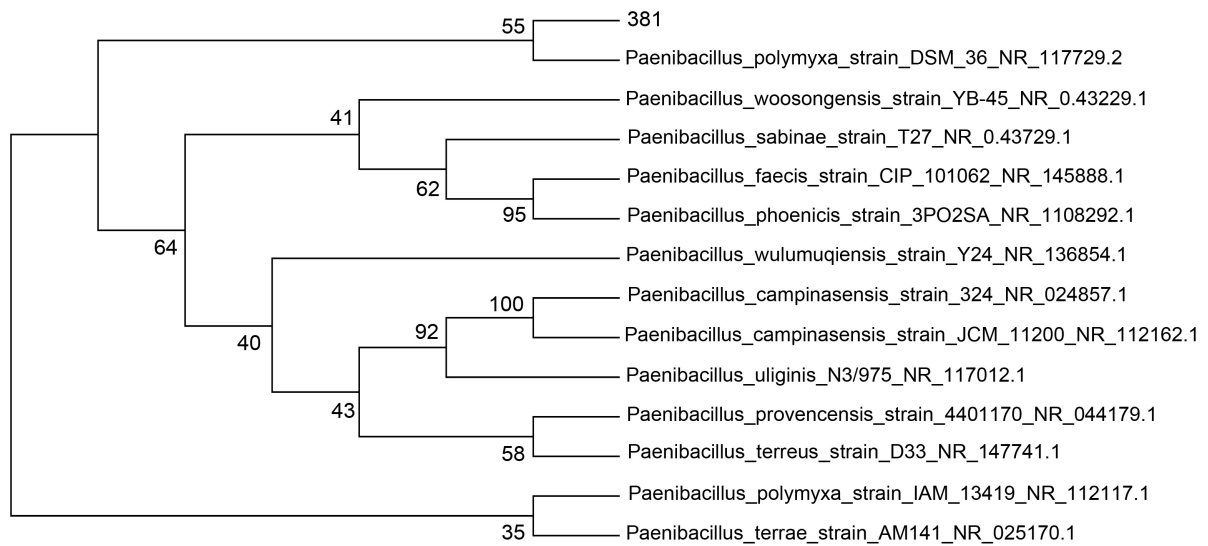


Figure 5. Phylogenetic tree of strain 381 based on 16S rRNA gene sequence
图 5. 依据内生拮抗菌 381 的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

3.4. 内生拮抗菌 381 抑制桑树病原菌产物初步分析

3.4.1. 内生拮抗菌 381 的特性分析

菌株 381 可产生有机酸、蛋白酶和纤维素酶等物质，直接或间接抑制细菌和真菌(菌株 381 对多种真菌性病原菌也有很好的抑制效果，另文叙述)生长(图 6)。

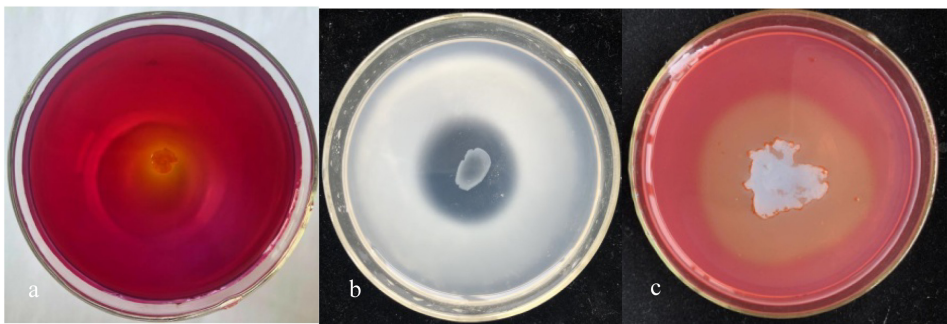


Figure 6. Identification of organic acid (a), protease (b) and cellulase (c) produced by strain 381
图 6. 内生拮抗菌 381 产有机酸(a), 蛋白酶(b)和纤维素酶(c)分析

3.4.2. 内生拮抗菌 381 抑制桑树病原菌产物分析

1) 内生拮抗菌 381 不同有机萃取段产物的抑菌效果

菌株 381 发酵液依次经石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇四种有机溶剂分段萃取，旋转蒸发后得到各个萃取段的产物粗提物。40 mg/mL 粗提物抑菌活性测定结果显示(表 2)，乙酸乙酯相粗提物与水相粗提物对桑树病原菌显示出抑菌活性，可以初步确定菌株 381 产生抑菌作用的物质存在于乙酸乙酯相和水相中。

Table 2. Antimicrobial effects of crude extracts in each organic extraction on pathogens
表 2. 各有机萃取段粗提物对病原菌的抑菌效果

病原菌 Pathogen	石油醚相 Petroleum ether phase	二氯甲烷相 Dichloromethane phase	正丁醇相 N-butanol phase	乙酸乙酯相 Ethyl acetate phase	水相 Aqueous phase
青枯菌 5 号小种 <i>Ralstonia solanacearum</i> race 5	-	-	-	+	+
丁香假单胞杆菌桑致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Mori</i>	-	-	-	+	+

注：“+”有抑菌效果，“-”无抑菌效果。Note: “+”, antibacterial activity; “-”, no antibacterial activity.

为进一步验证实验结果，再次测定浓缩干燥得到的乙酸乙酯相和水相菌株 381 产物粗提物的抑菌活性。乙酸乙酯相粗提物在浓度为 40 mg/mL 时对桑青枯病和桑疫病病原菌的抑菌圈直径分别为 3.27 ± 0.51 mm 和 2.54 ± 0.29 mm；水相粗提物在同浓度时对桑青枯病和桑疫病病原菌的抑菌圈直径分别为 5.02 ± 0.40 mm 和 3.47 ± 0.51 mm (图 7)。

2) 乙酸乙酯相和水相抑菌物质定性检测

乙酸乙酯相和水相抑菌物质初步定性检测结果表明乙酸乙酯相中起抑菌作用的物质可能为生物碱、黄酮或二萜类物质(表 3 和图 8(a))；水相中起到抑菌作用的物质可能为三萜类物质(表 3 和图 8(b))。具体的物质种类和结构需要后续实验进一步明确。

4. 讨论

多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)原为多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)，是类芽孢杆菌属的模式种，也是一种相对较新的实验菌[22]。多粘类芽孢杆菌可通过产生抗生素、酶类、黄酮类等多种活性物质直接抑制微生物病原菌生长繁殖；也可产生植物激素、铁载体等促进植物生长，引起植物体一系列的

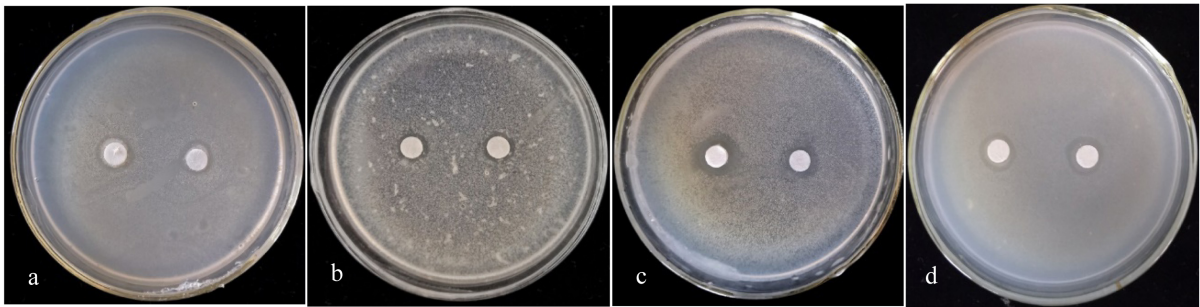


Figure 7. Antimicrobial effects of crude extracts in ethyl acetate phase and aqueous phase of 381 strain on pathogens. (a) and (b): Antimicrobial effects of crude extracts in ethyl acetate phase on pathogens of mulberry bacterial wilt and mulberry bacterial blight, respectively; (c) and (d): Antimicrobial effects of crude extracts in aqueous phase on pathogens of mulberry bacterial wilt and mulberry bacterial blight, respectively

图 7. 乙酸乙酯相和水相粗提物对桑树病原菌的抑菌效果。(a)和(b): 乙酸乙酯相对桑青枯病和桑疫病病原菌; (c)和(d): 水相对桑青枯病和桑疫病病原菌

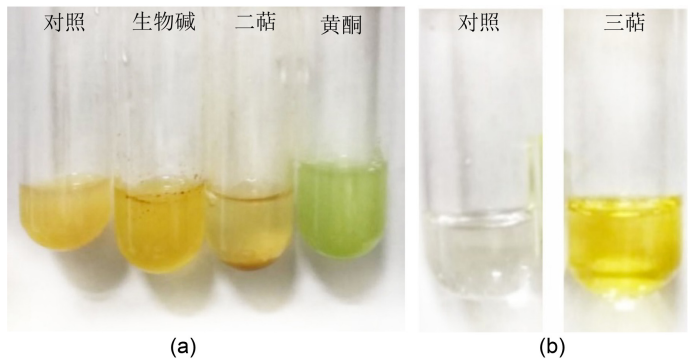


Figure 8. Qualitative tests of bacteriostatic substances produced by strain 381 in ethyl acetate phase (a) and aqueous phase (b)

图 8. 乙酸乙酯相(a)和水相(b)抑菌物质的定性检测

Table 3. Qualitative test results of bacteriostatic substances of strain 381

表 3. 内生拮抗菌 381 抑菌物质定性检测结果

乙酸乙酯相 Ethyl acetate phase	结果 Result	水相 Aqueous phase	结果 Result
生物碱 Alkaloid	+	生物碱 Alkaloid	-
黄酮 Flavonoids	+	黄酮 Flavonoids	-
二萜 Diterpene	+	二萜 Diterpene	-
三萜 Triterpene	-	三萜 Triterpene	+

注: “+”表示含有该物质, “-”表示不含此物质。Note: “+”, substance; “-”, no substance.

生理生化变化, 间接提高植物抗病性[22] [23] [24] [25] [26]。同时, 由于其在植物体上的定殖能力和对环境的适应性极强, 对人畜安全 and 无污染等优点, 已被广泛应用于植物病害生物防治。美国环保署(EPA)将其列为可在商业上应用的微生物之一[22], 也被我国农业部列为免做安全鉴定的一级菌种。但是多粘类芽孢杆菌作为桑树内生菌用于桑树微生物病害的生物防治的相关研究未见报道。

本研究从三个品种健康桑树叶片中分离获得一株对桑青枯病和桑疫病病原菌具有明显拮抗作用的内生细菌 381 菌株。结合 381 菌株形态特征、生理生化特征以及基于 16S rRNA 的系统发育分析结果, 将 381 菌株鉴定为多粘类芽孢杆菌。实验从三种健康桑树叶片中仅分离得到 7 种内生细菌, 数量有限, 这

可能与样本来源地单一有关。以最后一次表面冲洗的无菌水作为阴性对照,从中未发现可培养的任何细菌,表明筛选的内生细菌并不是从空气、土壤或其他环境因素带入的污染微生物。菌株 381 除了对桑青枯病和桑疫病病原菌有一定的抑菌效果外,对辣椒疫病、核盘菌、串珠链胞菌等也有较好的抑制作用(另文叙述)。本研究取得的结果为利用多粘类芽孢杆菌进行桑树细菌源微生物病害的生物防治奠定了实验基础。

抗菌活性物质作为生防菌发挥生防作用的物质基础,其结构、性质、结构与功能的关系、产量等都影响着菌株的实际应用效果。菌株 381 产生的活性抑菌物质存在于发酵液中,可用乙酸乙酯有效萃取,但仍有部分数量或者种类存在于水相中。初步定性分析产生的物质可能是生物碱、黄酮、二萜或三萜。同时平板定性分析显示 381 菌株可产生有机酸、纤维素酶和蛋白酶。生物碱、黄酮、二萜和三萜对微生物均有一定的抑制作用[27] [28] [29] [30]。有机酸是一类具有酸性的有机化合物,可通过能量竞争、透化细菌外膜、提高胞内渗透压、抑制生物大分子合成、诱导宿主产生抗菌肽等多个方面抑制细菌的生长[31]。蛋白酶可水解蛋白质肽链,从而破坏细胞膜结构。纤维素酶可有效降解纤维素,达到破坏细胞壁目的。这些结果表明菌株 381 产生的抑菌活性物质具有多样性,彼此间协同作用对多种病原菌起着抑制作用。

本实验仅在实验室中获得对桑树病原菌具有拮抗作用的内生菌株,并对其抑菌活性物质初步鉴定。381 菌株对病原菌的抑制机制、在桑树内的定殖繁殖规律、大田中对桑树病害的防控效果及防控机制、与其他生物间的作用关系、活性物质的种类等尚需进一步实验明确。

参考文献

- [1] 王智. 辽宁省不同地区番茄灰霉病菌抗药性研究[D]: [硕士学位论文]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.
- [2] 张静静. 吉林省主要城市城郊土壤-蔬菜系统中有机氯农药残留及风险研究[D]: [博士学位论文]. 长春: 中国科学院研究生院(东北地理与农业生态研究所), 2016.
- [3] 李晓强, 孙跃先, 叶光祚, 等. 使用化学农药对农业生物多样性的影响[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2008, 30(S2): 365-369.
- [4] 卜元卿, 孔源, 智勇, 等. 化学农药对环境的污染及其防控对策建议[J]. 中国农业科技导报, 2014, 16(2): 19-25.
- [5] 黄丽丹, 陈玉惠. 生防菌及相关生物技术在植物病害防治中的应用[J]. 西南林学院学报, 2006, 26(1): 85-89.
- [6] 杨依军, 王勇, 杨秀荣, 等. 拮抗木霉菌在生物防治中的作用[J]. 天津农业科学, 2000, 6(3): 29-33.
- [7] 乔宏萍. 重寄生放线菌 F46 和 PR 的生物学习性及对果蔬采后病害的控制作用[D]: [硕士学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003.
- [8] Prado, S., Nay, B. and Kunz, C. (2015) *Paraconiothyrium variabile*, an Ascomycete Endophyte, Suppresses Mycotoxin Production in the Plant Pathogen *Fusarium oxysporum*. *Journal of Medical Mycology*, **25**, 96-97. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.02.005>
- [9] Romeralo, C., Santamaría, O., Pando, V., et al. (2015) Fungal Endophytes Reduce Necrosis Length Produced by *Gremmeniella abietina* in *Pinus halepensis* Seedlings. *Biological Control*, **80**, 30-39.
- [10] Larran, S., Simón, M.R., Moreno, M.V., Siurana, M.P.S. and Perelló, A. (2016) Endophytes from Wheat as Biocontrol Agents against Tan Spot Disease. *Biological Control*, **92**, 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.002>
- [11] Sivasakthi, S., Usharani, G. and Saramraj, P. (2014) Biocontrol Potentiality of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A Review. *African Journal of Agricultural Research*, **9**, 1265-1277.
- [12] Villegas-Escobar, V., Ceballos, I., Mira J.J., et al. (2013) Fengycin C Produced by *Bacillus subtilis* EA-CB0015. *Journal of Natural Products*, **76**, 503-509. <https://doi.org/10.1021/np300574v>
- [13] Lee, J.Y., Shim, J.M., Yao, Z.H., et al. (2016) Antimicrobial Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* EMD17 Isolated from Cheonggukjang and Potential Use as a Starter for Fermented Soy Foods. *Food Science and Biotechnology*, **25**, 525-532. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0073-z>
- [14] Kilani-Feki, O., Khiari, O., Culioli, G., et al. (2010) Antifungal Activities of an Endophytic *Pseudomonas fluorescens* Strain Pfl1TZ Harboring Genes from Pyoluteorin and Phenazine Cluster. *Biotechnology Letters*, **32**, 1279-1285. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0286-9>

- [15] 韩长志. 植物病害生防菌的研究现状及发展趋势[J]. 中国森林病虫, 2015, 34(1): 33-37+25.
- [16] 吴福安. 桑树细菌性病害的识别与防治[J]. 中国蚕业, 2010, 31(1): 98-100.
- [17] 章苗. 两株无患子内生真菌次生代谢产物及其抗菌活性研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江工业大学, 2017.
- [18] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [19] 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: 349-388.
- [20] 张飞官, 高雅慧, 任慧爽, 等. 桑疫病病原拮抗菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学报, 2013, 53(12): 1285-1294.
- [21] Sunitha, V.H., Nirmala, D.D. and Srinivas, C. (2013) Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants. *World Journal of Agricultural Sciences*, **9**, 1-9.
- [22] 王刘庆, 王秋影, 廖美德. 多粘类芽孢杆菌生物特性及其机理研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(11): 158-163.
- [23] He, Z.G., Kislá, D., Zhang, L.W., *et al.* (2007) Isolation and Identification of a *Paenibacillus polymyxa* Strain that Co-produces a Novel Antibiotic and Polymyxin. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 168-178. <https://doi.org/10.1128/AEM.02023-06>
- [24] Ariza, A., Eklof, J.M., Spadiut, O., *et al.* (2011) Structure and Activity of *Paenibacillus polymyxa* Xyloglucanase from Glycoside Hydrolase Family 44. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 33890-33900. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.262345>
- [25] 龚春燕, 张道静, 魏鸿刚, 等. 多粘类芽孢杆菌 HY96-2 发酵液化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(3): 379-381.
- [26] Raza, W. and Shen, Q.R. (2010) Growth, Fe^{3+} Reductase Activity, and Siderophore Production by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 under Differential Iron Condition. *Current Microbiology*, **61**, 390-395. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9624-3>
- [27] 王梦远, 马昭, 刘晓婷, 等. 中药生物碱体外抑菌作用研究[J]. 畜牧兽医杂志, 2017, 36(3): 7-9.
- [28] 靳蕊, 徐敏纹, 刘莹, 等. 黄酮类化合物的抑菌作用及其机制的研究[J]. 继续医学教育, 2016, 30(8): 152-154.
- [29] 刘高强, 章春莲, 彭广生. 赤芝菌体中三萜抑菌作用研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2578-2579.
- [30] 王洋. 粗榧种子中的抗菌二萜[J]. 国外医学(中医中药分册), 2005, 27(1): 54-55.
- [31] 张军, 田子罡, 王建华, 等. 有机酸抑菌分子机理研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(3): 323-328.