

林天兴, 龚明福, 管岑澜. 拮抗软腐病菌的魔芋内生细菌多样性研究[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(8): 197–198, 206.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.054

拮抗软腐病菌的魔芋内生细菌多样性研究

林天兴, 龚明福, 管岑澜

(乐山师范学院生命科学院/峨眉山生物多样性保护与利用研究所, 四川乐山 614000)

摘要:生活在魔芋组织中的内生细菌具有拮抗魔芋软腐病病菌的潜力。通过组织分离法从魔芋块茎中分离得到内生细菌, 用牛津杯法皿内测试内生细菌对魔芋软腐病菌的拮抗作用, 使用肠杆菌重复居间序列聚合酶链式反应 (enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction, ERIC-PCR) 方法研究其遗传多样性。结果表明, 从魔芋块茎中分离得到 35 株内生细菌, 35 株内生细菌对魔芋软腐病菌均有不同程度的拮抗活性, ERIC-PCR 指纹图谱显示 35 株内生细菌在 Watson 距离为 0.60 时可分为 4 个 ERIC 群和 4 株独立成群菌株, 表明 35 株拮抗性内生细菌的遗传多样性明显。

关键词:魔芋; 内生细菌; 胡萝卜软腐欧文氏菌; 多样性

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0197-02

魔芋 (*Amorphaphallus konjac*) 是天南星科魔芋属单子叶多年生草本植物。魔芋块茎中葡甘聚糖 (KGM) 含量非常丰富, 已被应用于食品、医药、化工行业和农业, 因此魔芋在中国有广泛的栽培。魔芋软腐病是魔芋的主要病害, 已经严重影响到魔芋的生产, 是魔芋产业发展的重要障碍。该病是由胡萝卜软腐欧文氏菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, 简称 Ecc) 引起的细菌性病害^[1], 除了魔芋, Ecc 还可能導致花椰菜、番茄、辣椒、白菜、萝卜、豆科植物及其他植物的软腐病。

芽孢杆菌在自然界存在非常普遍, 可以生产各种抗菌物质, 抑制植物病原菌^[2], 有许多利用芽孢杆菌来生物防治魔芋软腐病的例子^[3-7]。笔者课题组近年来从四川省夹江县、峨眉山和沐川县魔芋块茎中分离得到 35 株内生细菌, 对内生细菌拮抗魔芋软腐病菌的能力进行了测定, 使用总 DNA 序列肠杆菌重复居间序列聚合酶链式反应 (enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction, ERIC-PCR) 方法, 研究了 35 株魔芋拮抗性内生细菌的遗传多样性, 为魔芋软腐病的生物防治提供菌株资源。

1 材料与方法

1.1 魔芋内生细菌的分离

从四川省夹江县、峨眉山、沐川县的魔芋种植区中采集 150 个魔芋的球茎, 每个球茎表面用 0.1% HgCl_2 消毒, 漂洗后用灭菌蒸馏水清洗 5 次。表面消毒的球茎用无菌粉碎机粉碎, 取汁液划线于营养琼脂培养基 (NA, 包括牛肉膏 5.0 g/L, 蛋白胨 10.0 g/L, 氯化钠 5.0 g/L, 琼脂 15.0 g/L) 平板上,

28 °C 恒温培养 3 d 后对单个菌落进一步纯化, 多次重复上述操作, 得到的纯菌落接种到试管斜面中保存备用。最后 1 次球茎表面消毒的水接种在 NA 培养基上, 并在 28 °C 恒温培养箱中培养 72 d 来彻底检查表面消毒是否彻底。

1.2 抑制魔芋软腐病菌的拮抗菌筛选

在 NA 板涂布接种 0.1 mL 软腐病菌培养液 ($10^9 \sim 10^{10}$ CFU/mL)。取 4 个规格相同的灭菌牛津杯 (内径 6 mm、外径 8 mm) 均匀插入 NA 板之间并保证牛津杯不能接触到 NA 平板的底部。分装 100 μL 测试供试内生菌液于 3 个牛津杯中。最后 1 个牛津杯中装入 100 μL 的灭菌的菌液作为对照组, 每处理重复 3 次, 28 °C 下培养 48 h 后测量抑菌圈的大小。内生细菌对病原细菌的拮抗活性用菌落抑制大小 (colony inhibited size, CIS) 表示, $\text{CIS} = \text{供试菌株抑菌圈} - \text{牛津杯外径}$ 。

1.3 拮抗性内生细菌 ERIC-PCR 指纹图谱分析

拮抗性内生细菌总基因组 DNA 提取参考徐琳等的方法^[8]。特异性引物选择 ERIC1R 和 ERIC2L^[9], 由上海香农生物工程技术服务有限公司合成。反应体系为 25 μL , 其成分为 10 × 缓冲液 (Biorule) 2.5 μL , MgCl_2 (25 mmol/ μL) 2.0 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μL , ERIC1R (20 pmol/ μL) 0.5 μL , ERIC2L (20 pmol/ μL) 0.5 μL , 添加 13 μL ddH₂O, 增加总 DNA 模板 (40 ~ 80 ng) 4.0 μL 。ERIC-PCR 反应过程参考马溪平等描述的方法^[10]。反应结束采用 1% 琼脂糖凝胶电泳 3.5 h, 凝胶成像, 图像扫描至计算机保存图谱, 在有条带的位置记为“1”, 没有的记为“0”。采用 DPS 软件, 根据组平均连锁聚类法 (UPGMA) 树形聚类图进行 0-1 的聚类分析^[11]。

2 结果与分析

2.1 魔芋内生细菌的分离

从健康魔芋球茎中分离得到 35 株内生细菌, 其中 10 株采自夹江县 (菌株编号为 AKEB01 至 AKEB10), 15 株采自峨眉山 (菌株编号为 AKEB11 至 AKEB25) 及 10 株采自沐川县 (菌株编号为 AKEB25 至 AKEB35)。

收稿日期: 2015-04-08

基金项目: 四川省教育厅资助科研项目 (编号: 15ZA0278、15TD0026)。

作者简介: 林天兴 (1972—), 男, 四川沐川人, 硕士, 副教授, 主要从事微生物资源及微生物与植物间相互关系研究。E-mail: 182476903@qq.com。

通信作者: 龚明福, 博士, 教授, 主要从事微生物资源及微生物与植物间相互关系研究。E-mail: gongmingfu98@163.com。

2.2 抑制魔芋软腐病菌的拮抗菌筛选

从魔芋中分离得到的 35 株内生细菌对魔芋软腐病菌均具有不同程度的拮抗活性(表 1),不同菌株的拮抗活性有显著差异,7 株拮抗性内生细菌(AKEB06、AKEB16、AKEB20、AKEB23、AKEB28、AKEB32、AKEB35)的拮抗活性较强,平均抗菌距离超过 15.0 mm,其中 AKEB06 拮抗活性最强,平均抗菌距离 19.3 mm。

表 1 35 株魔芋拮抗性内生细菌对魔芋软腐病菌的拮抗活性		
菌株	平均抗菌距离 (mm)	标准偏差 (mm)
AKEB01	11.3iG	0.47
AKEB02	8.2klmIJK	0.20
AKEB03	6.4oM	0.36
AKEB04	6.3oM	0.15
AKEB05	8.2klmIJK	0.38
AKEB06	19.3aA	0.15
AKEB07	7.8lmnIJKL	0.36
AKEB08	7.3nL	0.25
AKEB09	8.3klmIJK	0.25
AKEB10	9.8jH	0.42
AKEB11	14.1eD	0.32
AKEB12	8.3klmIJK	0.31
AKEB13	11.7iFG	0.64
AKEB14	11.3iG	0.14
AKEB15	8.4kIJ	0.06
AKEB16	17.7cC	0.47
AKEB17	7.5nKL	0.06
AKEB18	8.5kI	0.25
AKEB19	11.7hiFG	0.32
AKEB20	18.8abAB	0.35
AKEB21	12.8fE	0.31
AKEB22	6.3oM	0.15
AKEB23	17.1dC	0.26
AKEB24	7.3nL	0.20
AKEB25	11.4iG	0.21
AKEB26	12.2ghEF	0.14
AKEB27	8.2klmIJK	0.15
AKEB28	17.5cdC	0.25
AKEB29	7.8mnIJKL	0.38
AKEB30	8.5kI	0.32
AKEB31	11.5iFG	0.30
AKEB32	18.6bB	0.42
AKEB33	12.5fgE	0.15
AKEB34	6.4oM	0.17
AKEB35	17.4cdC	0.32

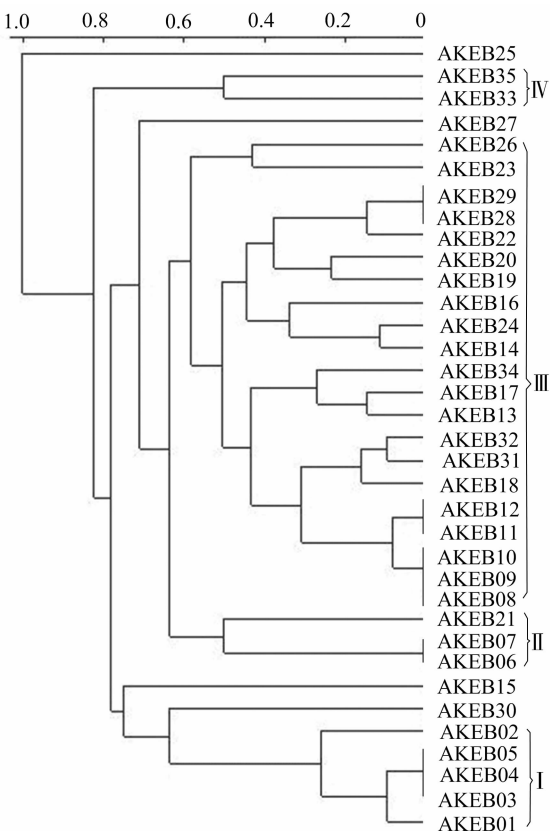
注:同列不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示处理间差异极显著($P<0.01$)。

2.3 拮抗性内生细菌的 ERIC-PCR 指纹图谱分析

对从魔芋分离得到的 35 株拮抗性内生细菌菌株进行了 ERIC-PCR 扩增,结果表明所有测定菌株的 ERIC-PCR 图谱大多是 5~10 条色带,其条带分布各异,大小介于 100~2 500 bp 之间。

35 株拮抗细菌的 ERIC-PCR 图谱(图 1)显示,当 Watson 距离为 1.00 时,所有的测试菌株聚集在一起。当 Watson 距离为 0.60,参试菌株可分为 4 个 ERIC-PCR 群,另外有 4 个菌株(AKEB15、AKEB25、AKEB27、AKEB30)独立为群。4

个 ERIC 群分别命名为 I、II、III、IV,每个群中的菌株数依次为 5、3、21、2,中心株分别为 AKEB04、AKEB06、AKEB28、AKEB35。



符号 I 到 IV 是 ERIC 群的编号,数轴的值表示 Watson 距离
图 1 35 株魔芋拮抗性内生细菌 ERIC-PCR 树状图

3 结论

从健康魔芋球茎中分离得到 35 株内生细菌菌株,这些内生细菌对魔芋软腐病菌均有不同程度的拮抗活性,其中 7 株抗菌距离超过 15.00 mm。ERIC-PCR 分析表明,当 Watson 距离 0.60 时,35 株拮抗性内生细菌菌株可分为 4 个 ERIC 群和 4 个独立成群的菌株,当 Watson 距离为 1.00 时所有测试菌株聚集在一起。研究结果表明拮抗性内生细菌存在遗传多样性。

目前,拮抗细菌性病原的物质大多基于体外抗菌法从草药及其提取物中筛选获得,从魔芋中分离得到的内生细菌菌株表现出较好的拮抗活性,并且多样性明显,因此,从魔芋内生细菌中筛选具有软腐病抗性的内生细菌菌株资源非常丰富。

参考文献:

[1] Toth I K, Bell K S, Holeva M C, et al. Soft rot erwiniae: from genes to genomes[J]. Molecular plant pathology, 2003, 4(1): 17-30.
[2] Tamehiro N, Okamoto - Hosoya Y, Okamoto S, et al. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, 46(2): 315-320.

MDA 是脂质过氧化的主要产物之一,其含量可以反映脂质过氧化程度^[19],植物器官衰老或在逆境下遭受伤害,发生膜脂过氧化作用。休眠期较高 MDA 含量,表明低温对根系和枝条体造成了一定伤害,作为应对机制,根系和枝条作出积极响应,如膜组分的变化以及清除过氧化氢、超氧阴离子自由基等有毒物质,这些机制可能参与休眠的调控。试验结果表明,休眠期(11月8日至12月28日), $T_{20\text{℃}}$ 、CK 处理下葡萄根系和枝条随着外界低温的来临逐渐进入休眠,MDA 含量迅速上升,并稳定在较高水平,枝条丙二醛含量低于根系。这可能是未休眠的根系和枝条发生的一系列生理生化变化,为进入休眠做准备,这种变化可从膜透性上反映出来。升温后(12月28日后),根系和枝条丙二醛含量均呈下降趋势, $T_{20\text{℃}}$ 处理下根系丙二醛含量急速下降,CK 则缓慢下降,与李政红等的研究结果^[8]相似。

超氧化物歧化酶(SOD)是一种植物体内抗氧化系统中重要的酶,是典型的诱导酶^[20-22],它能催化超氧阴离子自由基产生过氧化氢,防止氧自由基破坏细胞的组成和结构,保护细胞免受氧化损伤。因此,SOD 具有保护生物体免受活性氧伤害的能力。在本试验中,随着休眠进程的继续,根系和枝条 SOD 活性升高,产生大量或过量的 H_2O_2 ,进入萌芽期后 SOD 活性有所降低。在萌芽期, $T_{20\text{℃}}$ 处理根系和枝条 SOD 活性低于 CK 处理。这可能是 $T_{20\text{℃}}$ 处理减少了根系和枝条内活性氧的形成,活性氧浓度降低,SOD 活性相应降低;而 CK 处理土壤温度较低,增加了根系和枝条内活性氧含量,SOD 是一种诱导酶,为了消除芽体内合成的活性氧,低温诱导了 SOD 的大量合成,从而提高了 SOD 活性。植物生长发育过程中休眠具有重大的意义,因此在休眠期间一定会发生一系列不同于生长期间的生理生化变化,可能是由于不同生理生化变化导致植株由休眠逐渐进入萌芽。

参考文献:

- [1]曾 骤. 果树生理学[M]. 北京:北京农业大学出版社,1992: 21-41.
- [2]张风敏,官美英,梁树乐. 果树设施栽培中存在的问题及对策[J]. 河北果树,2003(3):4-5.
- [3]姜卫兵,韩浩章,汪良驹,等. 落叶果树需冷量及其机理的研究进展[J]. 果树学报,2003,20(5):364-368.
- [4]江泽平. 栓皮栎芽休眠解除过程的模拟[J]. 地理研究,1994, 13(1):43-50.
- [5]江泽平. 温带木本植物芽休眠的解除与温度[J]. 林业学,1995, 31(2):160-168.
- [6]韩浩章,姜卫兵,费宪进,等. 葡萄和油桃自然休眠解除过程中 H_2O_2 含量和抗氧化酶活性的变化[J]. 南京农业大学学报, 2007,30(1):50-54.
- [7]王连荣. 土壤温度对温室早露蟠桃休眠及升温期生理生化的影响[D]. 保定:河北农业大学,2003.
- [8]李政红,高东升. 休眠期曙光油桃芽电导率及丙二醛含量的变化[J]. 安徽农业科学,2009,36(24):10340-10343.
- [9]王世平,费全风,秦卫国,等. 根域加温对促成栽培绯红葡萄生长发育的影响[J]. 果树学报,2003,20(3):182-185.
- [10]邹 琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2010.
- [11]黄卓烈,林韶湘,谭绍满,等. 按树等植物吲哚乙酸氧化酶活性变化与插枝生根的比较研究[J]. 林业科学研究,1996,9(5): 510-516.
- [12]Young E, Werner D J. 6-BA applied after shoot and/or root chilling and its effect on growth resumption in apple and peach[J]. HortScience,1986,21(2):280-281.
- [13]高东升,束怀瑞,李宪利. 几种适宜设施栽培果树需冷量的研究[J]. 园艺学报,2001,28(4):283-289.
- [14]冈本五郎. 果实发育及其调节[M]. 养贤堂,1996:14-31.
- [15]久保田尚浩,江川俊之,村和夫. 加温期のなるブドウ‘マスカ ット オブ アレキサンドリア’の根の生 及びその活性に及ぼす影[J]. 園芸学会,1987,56:280-286.
- [16]Kliewer W M. Effect of root temperature on budbreak, shoot growth, and fruit - set of ‘Cabernet Sauvignon’ grapevines[J]. American Journal of Enology and Viticulture,1975,26(2):82-89.
- [17]余叔文,汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 北京:科学出版社,2001:381.
- [18]欧阳汝欣. 温度对芽休眠及开花坐果的影响[D]. 保定:河北农业大学,2002.
- [19]王令霞,吴志祥,王家保,等. 芒果花期内源激素含量的变化[J]. 热带作物学报,2005,26(1):60-62.
- [20]和华龙,黄 华,薛建辉. 模拟酸雨和富营养化复合胁迫对水葫芦抗氧化酶的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):430-432.
- [21]陈美静,刘倚雯,张宝龙,等. 不同预处理对 PEG 胁迫下水稻幼苗抗氧化系统的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):76-78.
- [22]孙佳佳,张其安,江 力,等. 3 种不同耐寒番茄品系的生理特性研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(5):2315-2317.

(上接第 198 页)

- [3]Dong Y H, Xu J L, Li X Z, et al. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum - sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(7):3526-3531.
- [4]周 盈,陈 琳,柴鑫莉,等. 魔芋内生拮抗细菌的分离及其抗菌物质特性研究[J]. 微生物学报,2007,47(6):1076-1079.
- [5]韩冬梅,班慧芳,余子全,等. 新型抑菌蛋白 APn5 抑制胡萝卜软腐欧文氏菌[J]. 微生物学报,2008,48(9):1192-1197.
- [6]张丽辉,王永吉,廖 林,等. 生防菌 06-4 对魔芋软腐病的防治及机理的初步研究[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2011, 37(3):286-289.

- [7]吴金平,刘晓燕,张静柏. 一株魔芋软腐病拮抗菌的分离鉴定及其活性物质的研究[J]. 中国农学通报,2011,27(24):302-306.
- [8]徐 琳,徐佳洁,刘巧莉,等. 西北部分地区苦马豆根瘤菌的遗传多样性[J]. 生物多样性,2009,17(1):69-75.
- [9]Lin T X, Li C, Gong M F. Genetic diversity of antagonistic endophytic bacteria isolated from *Sophora alopecuroides* [J]. Plant Diseases and Pests, 2011, 2(4):6-8, 33.
- [10]马溪平,邱 媛,徐成斌,等. 制药废水处理系统微生物群落动态变化的 ERIC-PCR 指纹图谱分析[J]. 辽宁大学学报:自然科学版,2008,35(2):158-161.
- [11]唐启义,冯明光. DPS 数据处理系统——实验设计、统计分析及模型优化[M]. 北京:中国科学出版社,2007:121-127.