

大蒜内生菌的分离及其抑菌作用的研究

韦智钟,刘梦雅,李 真,周宜君

(中央民族大学 生命与环境科学学院,北京 100081)

摘要:为了开发大蒜的生物防治应用,以大蒜为材料,使用不同培养基分离大蒜内生菌,研究大蒜内生菌代谢产物的抑菌效果。结果表明:从广西产大蒜中分离出 28 株内生菌,其中 5 株内生菌的代谢产物对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)具有较好的抑菌效果,其形态与生理生化特点均不同。

关键词:大蒜;内生菌;尖孢镰刀菌;生物防治

中图分类号:S633.4

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)12-0005-04

植物内生菌(Endophyte)是指存活于健康植物组织内部,而又不引发宿主植物表现出明显感染症状的微生物类群,主要包括真菌、细菌和放线菌^[1-2]。国内外关于内生菌的研究已经有 100 多年的历史,在目前研究过的所有植物中均发现有内生菌,对植物内生菌抑菌作用的研究也有相关报道^[3-7]。大蒜(*Allium sativum* L.)是百合科葱属植物,有“地里长出来的抗生素”的美称,具有天然广谱抗菌特性^[8]。崔北米等^[9]对大蒜内生菌进行了初步研究,分离得到的内生菌主要为细菌;谢永芳等^[10]提取了大蒜内生菌抑菌蛋白,并对抑菌作用进行了评价。尽管如此,目前国内外对大蒜抗菌作用的研究主要集中在大蒜的提取物上,对内生菌的研究相对较少。

尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)是一种世界性分布的土传病原真菌,寄主范围广泛,可引起瓜类、茄科、香蕉、棉、豆科及花卉等 100 多种植物枯萎病的发生,对农业生产危害极大。目前,以生物防治为主导的综合防治措施已用于防治枯萎病的研究中^[11]。该研究于 2012 年 3~12 月进行,试验选取了两种不同产地的大蒜为材料进行内生菌的分离,选取尖孢镰刀菌等作为试验菌种检测其代谢物的抑菌效果,旨在为大蒜内生菌的研究和尖孢镰刀菌的生物防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大蒜(*Allium sativum* L.)分别产自广西来宾市武宣县花颜村及湖南张家界市武陵源区;尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*, 编号 30373)与苹果黑腐皮壳菌(*Valsamali*, 编号 36137)购于中国农业科学院中国农业微生物菌种保藏中心;大肠杆菌(*Escherichiacoli*)和四联球菌(*Micrococcus tetragenus*)为中央民族大学生物实验中心保存菌种。

分离试验培养基分别为牛肉膏蛋白胨培养基、PDA 培养基及高氏 I 号培养基;生理生化试验培养基为淀粉培养基、明胶培养基和葡萄糖蛋白胨水培养基。

1.2 方法

1.2.1 内生菌分离 将两种不同产地的健康白皮大蒜去皮,用自来水冲洗 10 min,1%的次氯酸钠溶液浸泡 10 min,75%的乙醇漂洗 60 s,无菌生理盐水反复冲洗 3 次。取最后一次冲洗的无菌生理盐水分别涂布于试验所用的牛肉膏蛋白胨培养基、PDA 培养基和高氏 I 号培养基上,28℃下培养 1 d。证实无菌后进行后续实验。

将经过表面消毒处理的大蒜样品与无菌生理盐水按比例(W/W,大蒜:无菌生理盐水=1.0:2.5)混合,碾碎后静置 15 min,进行 10 倍梯度稀释,得 10^{-1} 、 10^{-2} 及 10^{-3} 浓度的提取液。取各梯度的提取液 0.2 mL 分别涂布在牛肉膏蛋白胨、PDA 和高氏 I 号培养基上,28℃培养 3 d。分别挑取各平板上菌落细胞再接种于对应的新配制的培养基上,28℃富集培养 3 d。

1.2.2 内生菌的抑菌效果评价 内生菌的代谢物制备。将分离得到的内生菌分别接种到新配制

收稿日期:2013-06-21

基金项目:国家民委教学改革与质量建设研究资助项目(11005);北京市基础性学科专业人才培养模式改革资助项目(2011);国家级实验教学示范中心资助项目(2012);国家大学生创新训练资助项目(GCCX2012110037)

第一作者简介:韦智钟(1991-),男,广西壮族自治区武宣县人,在读学士,从事生物资源利用研究。E-mail:weizhizhong 52@163.com。

通讯作者:周宜君(1964-),女,福建省福州市人,博士,教授,从事生物学教学与生物资源利用研究。E-mail:zhouyijun@muc.edu.cn。

的对应的牛肉膏蛋白胨、PDA 和高氏 I 号的液体培养基中, 28℃ 振荡培养 12 h, 发酵液 5 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液。

检测平板的制备: 分别制备尖孢镰刀菌、苹果黑腐皮壳菌、大肠杆菌和四联球菌的菌悬液, 取 0.2 mL 涂布接种于牛肉膏蛋白胨、PDA 和高氏 I 号平板上。

以直径为 6 mm 的无菌滤纸片吸附 100 μL 发酵液, 放置于制备好并接种受试菌的平板上, 以 100 μL 的无菌生理盐水作为空白对照。28℃ 培养 24 h, 观察并测量抑菌圈大小。

1.2.3 菌株鉴定 选取对尖孢镰刀菌具有较强抑菌效果的大蒜内生菌株进行革兰氏染色, 油镜

下观察菌体形态。采用涂布法接种并观察菌落形态。对菌株进行淀粉水解、明胶水解和产酸能力(甲基红试验)鉴定。

2 结果与分析

2.1 内生菌分离

分别采用 3 种培养基对广西产和湖南产的大蒜进行内生菌的分离。由表 1 可以看出, 两种不同产地的大蒜中分离得到的大蒜内生菌数量和种类不同, 表明不同产地的大蒜内生菌的种类有差异, 其中广西产大蒜内生菌种类多。因为使用牛肉膏蛋白胨培养基从广西产大蒜中分离出较多细菌, 说明广西产大蒜所分离的内生菌中细菌为优势菌。

表 1 不同种类培养基分离大蒜内生菌的菌落数

Table 1 The colony count of garlic endophytes isolating in different culture mediums

培养基 Mediums	菌落数/个 Colony count	
	广西产大蒜 Garlic in Guangxi	湖南产大蒜 Garlic in Hunan
牛肉膏蛋白胨培养基 Beef extract peptone agar medium	20	3
PDA 培养基 PDA medium	7	2
高氏 I 号培养基 Gauze's medium No. 1	1	0
总数 Total	28	5

2.2 大蒜内生菌拮抗性分析

分别选取尖孢镰刀菌、苹果黑腐皮壳菌、大肠杆菌和四联球菌作为受试菌株, 采用滤纸片法对所分离的大蒜内生菌的代谢物进行拮抗性试验。结果表明, 分离出的内生菌对大肠杆菌、苹果黑腐皮壳菌和四联球菌均没有明显的抑制效果, 而对尖孢镰刀菌具有抑制作用。所分离的具有抑制作用的菌株来自广西产大蒜, 共筛选出 5 株大蒜内生菌的代谢产物对尖孢镰刀菌具有抑制效果的菌株, 分别命名为 D-1、D-2、D-3、D-4、D-5, 采用滤纸片法检测抑菌效果。以抑菌圈直径 ≥ 6.5 mm 作为判断抑菌效果的标准, 分离的 5 株内生菌菌株

对尖孢镰刀菌抑菌效果不同(见表 2)。D-1 菌株对尖孢镰刀菌的抑制效果最好, 抑菌圈直径为 (8.50 ± 1.14) mm; 其次为 D-3 和 D-4 菌株, 抑菌圈直径分别为 (7.67 ± 0.42) mm 和 (7.57 ± 0.40) mm; D-2 和 D-5 的抑菌圈直径分别为 (7.33 ± 0.12) mm 和 (7.13 ± 0.12) mm, 与前 3 个菌株相比, 其抑菌效果相对较小。

2.3 大蒜内生菌的菌株鉴定分析

对拮抗性试验(以尖孢镰刀菌为受试菌)筛选出的 5 株大蒜内生菌进行革兰氏染色, 观察其细胞形态, 由图 1 可知, 5 株菌株具有不同的个体形态和排列方式, 可以将其分为两类: 杆菌(D-1, D-3,

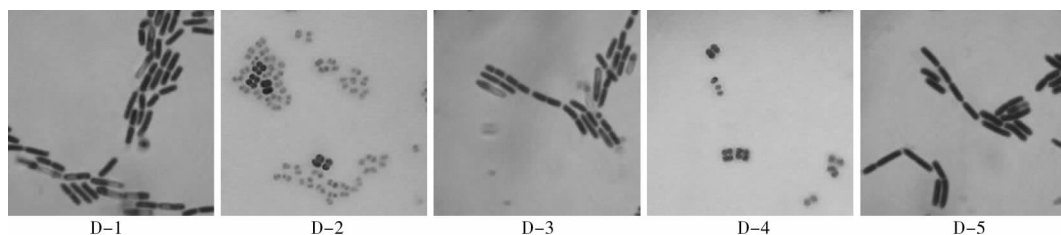


图 1 分离的 5 株大蒜内生菌的个体形态(1 000×)

Fig. 1 The forms of five garlic endogenous bacteria strains(1 000×)

D-5)和球菌(D-2,D-4),都属于革兰氏阳性菌,其中D-1,D-3为芽孢杆菌。将5个菌株分别划线接种于牛肉膏蛋白胨培养基上,37℃培养24 h,观察其群体生长特征,可以看出5株菌株菌落形态不同,其中D-2和D-4能够产生有颜色的代谢产物(见图2)。

对分离的5株大蒜内生菌分别进行淀粉水解、明胶水解及产酸能力(甲基红试验)等生理生化试验(见图3)。从图3中可以看出,分离的5

株内生菌株中,D-2、D-3和D-5具有淀粉水解环,表现为阳性,说明具有较强的产生淀粉酶能力,而D-1、D-4不产生淀粉酶,为阴性(图3A)。D-1、D-2和D-3产生明胶液化现象,表现为阳性,说明具有较强的产生明胶水解酶的能力,而D-4明胶液化能力较弱,D-5不产生明胶水解酶,为阴性(图3B)。图3C为甲基红试验结果,结果表明,D-1、D-2和D-3具有较强的产酸能力,而D-4和D-5产酸能力较弱。

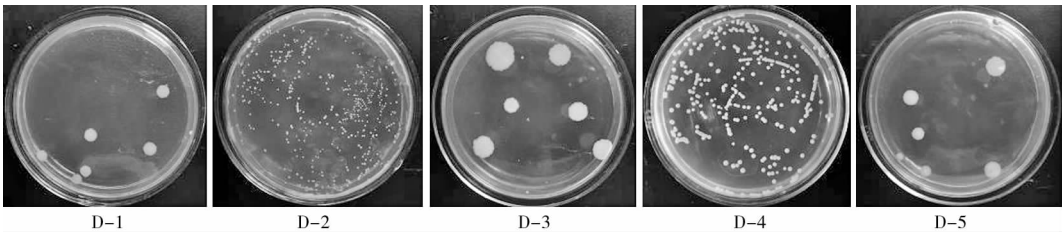


图2 5株大蒜内生菌的菌落形态
Fig. 2 The colony morphology of five garlic endogenous bacteria strains

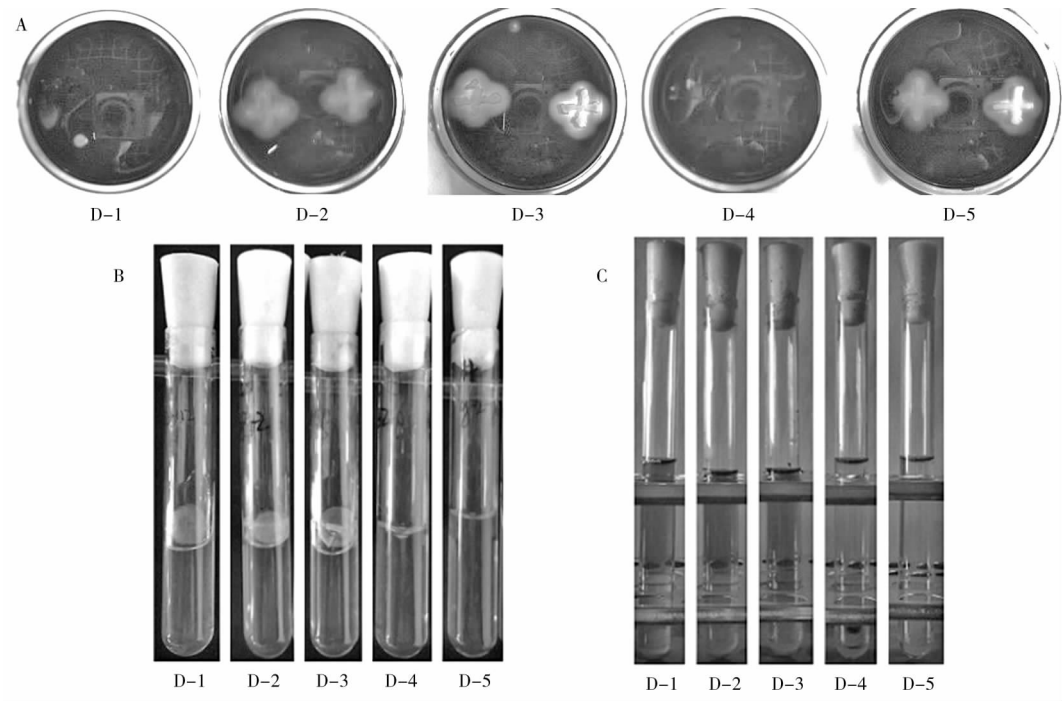


图3 5株大蒜内生菌生理生化试验
A. 淀粉水解;B. 明胶液化;C. 甲基红试验
Fig. 3 The physiological and biochemical tests of five garlic endogenous bacteria strains
A. Amylolytic test; B. Gelatin liquefaction; C. Methyl red test

从表2中可以看出,广西产的大蒜中分离的对尖孢镰刀菌有抑制效果的5株内生菌具有不同

的细胞形态和生理生化特征,属于5种不同种类的菌种。

表 2 5 株大蒜内生菌株的形态和生理生化特征

Table 2 The morphology, physiology and biochemistry characteristics of five garlic endogenous bacteria strains

菌株号 No.	抑菌效果/mm Bacteriostatic effect	革兰氏染色 Gram stain	芽孢 Spore	菌体形态 Bacteria forms	淀粉水解 Amylolysis	明胶水解 Gelatin liquefaction	甲基红试验 Methyl red test
D-1	8.50±1.14	+	+	杆菌	—	+	+
D-2	7.33±0.12	+	—	球菌	+	+	+
D-3	7.67±0.42	+	+	杆菌	+	+	+
D-4	7.57±0.40	+	—	球菌	—	+	+
D-5	7.13±0.12	+	—	杆菌	+	—	+

注: + 表示为阳性, — 表示为阴性。

Note: + shows positive, — shows negative.

3 结论与讨论

本研究采用 3 种培养基从大蒜中成功地分离出了内生菌。在相同条件下, 广西产大蒜分离的内生菌数量高于湖南产大蒜。王坚等^[12]研究发现, 生长在热带或亚热带地区的植物与生长在较干燥或寒冷环境下的植物相比, 前者中内生菌的数量和种类多。王娜娜^[13]对拮抗性大蒜内生细菌的多样性及其促植物生长特性的研究也表明, 不同产地大蒜的内生菌种类存在差异。从广西产大蒜中分离得到的内生菌以内生细菌居多, 说明细菌是大蒜内生菌中的优势菌, 与崔北米等^[9]的研究结果一致。该研究从大蒜中分离出了真菌与放线菌, 也说明大蒜中存在这两种类型菌。

通常认为植物内生细菌一个重要的生防机制是产生水解酶类, 这些水解酶与植物抗真菌能力有密切关系, 因为真菌细胞壁的主要组成成分是几丁质和葡聚糖。这些水解酶可以降解真菌的细胞壁或其它致病因子, 如毒素等, 以此达到防病效果^[7,14-15]。以尖孢镰刀菌作为受试菌, 对从大蒜中分离出的内生菌的代谢物进行拮抗性试验, 分离出 5 株具有抑菌作用的菌株, 淀粉水解酶和明胶水解酶及产酸能力的试验表明, 分离到的 5 株内生菌中都有产生水解酶的能力, 其中 D-2 和 D-3 能够产生两种水解酶, 推断其抑制尖孢镰刀菌的生长, 可能与产生胞外水解酶类有关。谢永芳等^[10]对大蒜内生菌抑菌蛋白的研究也表明, 大蒜内生菌可以产生具有抑菌作用的抑菌蛋白, 这些产生抑菌蛋白的内生菌可以水解明胶和淀粉, 与该研究结果一致。因此, 可以得出 D-1, D-2 和 D-3 菌株具有较强的产酸能力。已有研究认为植物抗菌内生菌产生的抗菌物质多种多样, 包括脂多

肽、酮内酯、生物碱、炭疽菌酸、新型环肽抗生素、二萜化合物等及其一些抗菌酶类^[14,16]。该研究所分离的内生菌的抑菌作用是否存在这些抗菌物质及其抑菌机制等还有待进一步研究。

由致病性尖孢镰刀菌侵染引起的植物枯萎病是一种世界性的土传真菌病害。目前防治枯萎病的主要方法在防治中的效果不太理想, 而以生物防治为主导的综合防治措施的研究效果显著^[11]。鉴于分离出的内生菌对尖孢镰刀菌具有较好的抑菌效果, 对枯萎病的生防研究有一定的参考价值。此外, 该研究的试验结果表明, 分离到的内生菌株对大肠杆菌没有抑菌效果, 食用含有这些内生菌的大蒜不会对人类肠道的大肠菌群产生负面影响。此外, 内生菌对宿主植物的致病性还有待研究。

参考文献:

- [1] 李端, 郭利伟, 郭伟云, 等. 抗肿瘤药用植物及其内生菌活性代谢产物的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(16): 7508-7509.
- [2] 陈雪英, 都晓伟, 李滨. 内生菌与药用植物活性成分相关性研究进展[J]. 国外医药, 植物药分册, 2008, 23(2): 47-52.
- [3] 龙新宪, 陈雪梅, 陈亚刚, 等. 内生细菌及其在强化宿主植物修复污染土壤中的应用[C]//中国农业科技服务协会. 2010 全国菌物研究新技术与行业发展研讨会论文集. 昆明: 中国农业科技服务协会, 2010: 65-69.
- [4] 赵旭, 常思静, 景春娥, 等. 我国植物内生菌研究进展[J]. 中国沙漠, 2010, 30(1): 87-91.
- [5] 张祺玲, 杨宇红, 谭周进, 等. 植物内生菌的功能研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(7): 28-34.
- [6] 胡桂萍, 郑雪芳, 尤民生, 等. 植物内生菌的研究进展[J]. 福建农业学报, 2010, 25(2): 226-234.
- [7] 窦瑞木. 植物内生菌及其防病作用研究进展[J]. 河南农业: 教育版, 2008(3): 31-32.
- [8] 苏凤贤. 大蒜汁生物抑菌特性的研究[D]. 陕西: 陕西师范大学, 2007: 1, 13, 19-21.