

• 药材与资源 •

基于 16 S rRNA 序列研究华重楼植株可培养内生细菌的多样性

周先治^{1,3}, 高 晖¹, 李 敏², 唐建阳^{1,3*}, 陈 阳¹

1. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003

2. 福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 福建 福州 350001

3. 农业部福州热带作物科学观测实验站, 福建 福州 350003

摘要: 目的 分析华重楼 *Paris polyphylla* 健株和茎腐病感病植株内生可培养内生细菌的多样性。方法 用牛肉膏蛋白胨培养基分离华重楼茎腐病及健康植株根茎、茎、叶等不同部位的细菌, 采用 16 S rRNA 通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增结合 DNA 测序技术, 对分离自华重楼健株及茎腐病植株不同部位的细菌进行初步鉴定。结果 从华重楼的健康植株和感病植株中分离到 11 属 23 种细菌。从健株分离到 4 属 11 种内生细菌, 其中根茎、茎、叶分别分离到 9、10 和 5 种内生细菌。从病株分离得到 10 属 14 种内生细菌, 其中根茎、茎、叶分别分离到 11、8 和 3 种内生细菌。华重楼健株的根茎部内生细菌量最高, 达 2.999×10^5 cfu/g, 叶部内生细菌量较低, 为 7.32×10^4 cfu/g, 华重楼健株根茎、茎、叶中的芽孢杆菌量最高, 比例分别为 73.3%、67.1% 和 81.8%。华重楼病株的茎部内生细菌量最高, 达 2.817×10^5 cfu/g, 叶部内生细菌量较低, 为 2.76×10^4 cfu/g, 华重楼病株的根茎、茎、叶部的假单胞菌量最高, 比例分别为 35.6%、50.3% 和 60.5%。华重楼健株不同部位的多样性指数和均匀度指数均高于病株。结论 华重楼健康植株以芽孢杆菌为优势细菌类群, 华重楼茎腐病植株以假单胞菌为优势细菌类群。华重楼健株相比病株具有更为丰富的内生细菌群落多样性。

关键词: 华重楼; 茎腐病; 内生细菌; 16 S rRNA; 芽孢杆菌; 假单胞菌**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)18-3807-08**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.022Cultivable bacterial diversity of *Paris polyphylla* var. *chinensis* with 16 S rRNA sequence analysisZHOU Xian-zhi^{1,3}, GAO Hui¹, LI Min², TANG Jian-yang^{1,3}, CHEN Yang¹

1. Agricultural Bio-resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China

2. Inspection & Quarantine Technology Center, Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China

3. Fuzhou Tropical Crop Scientific Observation Experimental Station of Ministry of Agriculture, Fuzhou 350003, China

Abstract: Objective To analyze the bacterial diversity in stem rot and healthy plants of *Paris polyphylla* var. *chinensis*. **Methods** Bacterial strains were isolated from rhizomes, stems and leaves of the diseased and healthy plants of *P. polyphylla* var. *chinensis* using beef extract-peptone medium. Using 16 S rRNA universal primers 27F/1492R for PCR amplification, combined with DNA sequencing technology to preliminary identification the bacterial strains. **Results** The bacteria could be divided into 23 microbial species, belonging to 11 genera, isolated from healthy and diseased plants of *P. polyphylla* var. *chinensis*. Eleven endophytic bacteria, belonging to 4 genera were contained from healthy plants, in which there were 9, 10, and 5 species isolated from rhizomes, stems and leaves, respectively. Fourteen endophytic bacteria, belonging to 10 genera were contained from diseased plant, in which there were 11, 8, and 3 species isolated from rhizomes, stems, and leaves, respectively. The content of endophytic bacteria in rhizome of healthy plant was the highest, reached up to 2.999×10^5 cfu/g, while that in leaf was the lowest with 7.32×10^4 cfu/g. The quantities of *Bacillus* species in rhizome (73.3%), stem (67.1%), and leaf (81.8%) of healthy plant were the highest groups, *Pseudomonas* species in rhizome (35.6%), stem (50.3%) and leaf (60.5%) of diseased plants were the highest groups. Shannon-Wiener index and evenness index of healthy plant of *P. polyphylla* var. *chinensis* were higher than that of diseased plants. **Conclusion** The dominant group in the healthy plant of *P.*

收稿日期: 2017-04-26**基金项目:** 省属公益类科研院所基本科研专项 (2014R1018-6, 2015R1018-13); 省属公益类科研院所基本科研专项“重楼病虫害综合防控技术研究示范”; 公益性行业科研专项 (201507002)**作者简介:** 周先治 (1976—), 助理研究员, 主要从事中药材种植方面研究。Tel: (0591)87880041 E-mail: xianzhizhou@126.com***通信作者** 唐建阳 Tel: (0591)87880041 E-mail: tjy836@163.com

polyphylla var. *chinensis* was *Bacillus*, while the dominant groups in the diseased plant of *P. polyphylla* var. *chinensis* was *Pseudomonas*. The population diversity of the cultivable bacteria in healthy plant of *P. polyphylla* var. *chinensis* was more abundant than that of diseased plant.

Key words: *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara; stem rot; endophytic bacteria; 16 S rRNA; *Bacillus* spp.; *Pseudomonas* spp.

华重楼即七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 是《中国药典》2015 年版入药品种之一, 具有清热解毒、消肿止痛、定肝定惊的功效^[1]。华重楼以根茎入药, 是云南白药、宫血宁、季德胜蛇药等中成药的主要原料药材。近年来, 重楼的价格不断攀升, 野生重楼资源滥采滥挖现象十分严重, 华重楼野生资源日趋匮乏, 市场供需矛盾突出。华重楼的人工林下栽培是实现华重楼资源可持续利用的有效途径。

承天集团在福建省农业科学院专家的的指导下在光泽县开展了华重楼的林下人工栽培, 随着华重楼大面积栽培, 华重楼茎腐病严重威胁华重楼生产, 华重楼茎腐病是由镰刀菌 *Fusarium* spp. 引起的一种土传病害, 该病原菌主要危害华重楼的茎基部, 发病初期在茎基部形成黑褐色病害, 后病斑逐步扩大, 后期导致植株茎部失水变褐, 叶片萎凋, 最高发病率达 30% 以上。华重楼茎腐病作为一种土传真菌病害, 目前尚无十分有效的防治措施。

相对于化学防治, 生物防治具有不污染环境的优点, 利用植物内生菌进行镰刀菌引起的土传真菌病害的防治成为研究热点。令利军等^[2]报道了独角莲 *Typhonium giganteum* Engl. 内生细菌地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* TG116 菌株对黄瓜枯萎病原菌具有良好的抑制作用。畅涛等^[3]研究表明, 高寒草地禾草内生菌萎缩芽孢杆菌 *B. atrophae* B-401 菌株对马铃薯干腐病菌和黄瓜枯萎病菌具有抑制作用。武利勤等^[4]研究发现石斛内生菌甲基营养芽孢杆菌 *B. methylotrophicus* RA 菌株对香蕉枯萎病原菌具有较强抑菌活性。金岩等^[5]报道了 12 株五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 内生拮抗细菌对棉花枯萎病菌具有较好的拮抗作用。卜春亚等^[6]从草莓 *Fragaria ananassa* 中分离到一株枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* SY-4 对草莓根茎腐尖孢镰刀菌具有较好的拮抗作用。杨成德等^[7]发现醉马草 *Achnatherum inebrians* (Hance) Keng 的 4 株内生菌对马铃薯枯萎病原菌具有较好的拮抗作用。植物内生细菌的类群结构因宿主的不同器官、生育期及宿主所处环境的不同而各不相同^[8]。环境对宿主内生

菌亚群具有显著影响, 恶劣环境能导致宿主中抵抗恶劣环境的的内生菌亚群增多^[9]。复杂的内生菌群落结构决定了内生菌的生物学功能。因此, 利用内生菌防治华重楼茎腐病, 必须了解华重楼内生菌群落结构多样性, 研究内生防菌在内生菌中的群落结构差异及功能异质性, 明确内生防菌的作用机制, 才能有效的利用华重楼的内生防菌资源。

有关华重楼内生细菌研究已经成为热点, 涉及医用指向研究^[10-14]和生防菌^[15-17] 2 个方面。医用指向研究方面, 赵明等^[10]从华重楼的地下根茎中分离筛选到 2 株可产生甾体皂苷的内生细菌 SS01 和 SS02, SS01 经鉴定为戴氏西地西菌 *Cedecea davisae*, SS02 为杰米拉类芽孢杆菌 *Paenibacillus daejeonensis*, 可通过比色法测定薯蓣皂苷元量^[11]。陈小静等^[12]从华重楼新鲜块茎中分离到 107 株内生菌, 经初步测定, 有 6 株菌能产生薯蓣皂苷或其他类似物等甾体皂苷, 其中 4 株菌分别属于德克斯氏菌属 *Derxia* sp、芽孢杆菌属 *Bacillus* sp、动性球菌属 *Planococcus* sp、肠杆菌属 *Enterobacter* sp。任智等^[13]从华重楼的地下块茎中分离到 107 株内生菌, 其中菌株 RZ03 和 RZ07 可产生薯蓣皂苷, 经鉴定 RZ03 为乙酰短杆菌 *Exiguobacterium acetylicum*, RZ07 为枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*。张晓杰等^[14]从华重楼的地下根茎中分离到 16 株内生细菌, 其中编号为 SNUS-1 的托氏假单胞菌 *P. tolassii* 能产薯蓣皂苷。生防菌研究方面, 杨正强等^[15]从华重楼的地下根茎中分离到一株内生细菌 SS02, 其发酵液对 13 种作物致病菌具有抑制作用, 经鉴定为杰米拉类芽孢杆菌 *P. daejeonensis*。程媛媛等^[16]发现华重楼内生菌 PEC45 产生的抗菌肽 PCP-1 对玉米弯孢病菌等真菌和大肠杆菌等细菌具有较强的抑菌效果。雍彬等^[17]从华重楼的根茎中分离到 1 株具有较强抑菌活性的内生细菌 Iun35, 经鉴定为枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*, 从该菌株分离的抗菌蛋白 UD35 对玉米纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* Kuha、小麦赤霉病菌 *Gibberella zeae* (Schw.) Petch 等多种菌具有强烈抑制作用。

华重楼茎腐病病株与健康植株的可培养内生菌群落结构差异及多样性方面未见研究, 本研究通

过分离健康与发病华重楼植株的内生细菌,采用 16 S rRNA 进行鉴定,明确华重楼内生细菌群落组成及多态性,为华重楼内生防菌的开发利用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

材料于 2016 年 6 月 15 日采自福建省南平市光泽县崇仁乡崇仁村重楼种植基地种植的健株和病株各 1 株,生长年限 4 年左右,经福建省农业科学院农业生态研究所陈敏健副研究员鉴定为华重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara。

1.2 试剂

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 [生工生物工程(上海)股份有限公司],细菌的 16 S rRNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATAGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGT-TACGACTT-3')^[18]由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应试剂: 10×buffer, dNTP 10 nmol/L, *Taq* 酶 (5 U/μL), 100 bp Marker [生工生物工程(上海)股份有限公司], GoldView 核酸染料 (北京索莱宝科技有限公司)。

1.3 仪器

凝胶成像仪 (UVP Gel Doc-It TS Imaging System, 美国 UVP 公司, 加州)、PCR 仪 (TGradient, Biometra 公司, 德国)、电泳仪 (PowerPac, 美国伯乐公司, 加州)、离心机 (Eppendorf Centrifuge 5418R, Eppendorf AG 公司, 德国)。

2 方法

2.1 内生细菌的分离、鉴定及系统发育分析

将华重楼植株分为根茎、茎、叶 3 部分,根茎部选取根茎尖到根茎基部分,茎部为茎基部到茎顶部,叶片为所有叶片。将样品用无菌水清洗干净,灭菌滤纸吸干水分,称定质量,75%乙醇消毒 30 s,无菌水清洗 3 次,再用 0.1%的升汞消毒 8 min,无菌水反复清洗,无菌滤纸吸干。称定质量后在无菌研钵中充分研磨,无菌水梯度稀释 100、 1×10^3 、 1×10^4 和 1×10^5 ,取 200 μL 稀释液均匀涂布于 NA 平板上,每梯度 3 个重复,静置 15 min 后,30 °C 倒置暗培养 48 h。根茎据各平板上菌落的形态、色泽、大小、边缘状态、透明度等特征区分不同的菌落类型,分别编号和统计数量,挑取不同类型的单菌落在新的培养基平板上划线培养,直至获得纯培养。甘油冷冻保

存于 -80 °C 冰箱待用。

以组织消毒后的最后淋洗液作为对照,涂 NA 平板培养,如长菌落,则判定研磨液所培养的菌落为非内生菌,丢弃;若对照中无菌落,则基本可判定研磨液中长出的菌落可能是内生菌,纯化后保存待用。

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取华重楼可培养内生细菌基因组 DNA,内生细菌用 LB 液体培养基培养 48 h,细菌浓度达 1×10^9 cfu/mL 以上,取 1.5 mL 菌液用于细菌基因组 DNA 提取,具体提取方法参照试剂盒使用说明。内生细菌 16 S rRNA 基因序列的 PCR 扩增体系和扩增程序参照葛慈斌等^[19]的方法进行。PCR 反应体系 (25 μL): 2.5 μL 10×Buffer、0.5 μL 0.01 mol/L dNTP、引物各 1 μL、0.3 μL (5 U/μL) 的 *Taq* 酶和 1 μL DNA 模板。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物的检测: 取 2 μL PCR 产物,点样于 1.5% 的琼脂糖凝胶中,电压 100 V 电泳 40 min, Gold View 染色,用凝胶成像系统观察结果。扩增产物由上海博尚生物技术有限公司进行测序。在 EzTaxon (<http://eztaxone.ezbiocloud.net/>)^[20]进行序列比对,初步确定各菌株的分类地位,选择参考菌株序列,利用 Mega 6.0 软件^[21],采用 Neighbour-joining (NJ) 方法并以 Jukes-Cantor 模型构建系统发育树^[22-24]。

2.2 内生细菌的种类分布多样性

本研究试验数据统计采用 DPS7.05 统计软件,采用菌落、菌体形态结合分子鉴定结果统计华重楼茎腐病发病植株和健康植株不同部位分离出的内生细菌的种类和数量差异。以分离的内生细菌为样本,以菌株在华重楼不同部位是 (1) 否 (0) 出现为指标,以兰氏距离为尺度进行聚类分析,研究病、健康重楼植株可培养内生细菌分布差异性。

设定 16 S rRNA 基因序列同源性 > 98% 作为同一分类单元,引入多样性指数香农-威纳 (Shannon-Wiener) 指数 (H) 和均匀度指数 (J),对华重楼病健株不同部位的内生细菌的种类和数量多样性进行分析。 H 和 J 的计算公式如下。

$$H = -\sum P_i \ln P_i$$

$$J = -\sum P_i \ln P_i / \ln S$$

S 为分类单元, $P_i = N_i / N$, N_i 为第 i 种内生细菌的平均量, N 为华重楼病健株某个部位的内生细菌平均总量

3 结果与分析

3.1 内生细菌的分离和鉴定

从华重楼植株中共分离到 65 株内生细菌。依据 16 S rRNA 序列比对分析结合形态鉴定, 将 65 株细菌鉴定为 11 属 23 种, 其中假单胞菌属 *Pseudomonas* Migula 3 个种、芽孢杆菌属 *Bacillus* Cohn 9 个种、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus* Ash 1 个种、赖氨酸芽孢杆菌属 *Lysinibacillus* Ahmed 1 个种、嗜冷芽孢杆菌属 *Psychrobacillus* Krishnamurthi 1 个种、葡萄球菌属 *Staphylococcus* Rosenbach 3 个种、短杆菌属 *Brevibacterium* Breed 1 个种、产碱杆菌属 *Alcaligenes* Castellani and Chalmers 1 个种、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* Palleroni and Bradbury 1 个种、肠杆菌属 *Enterobacter* Hormaeche and Edwards 1 个种、勒克氏菌属 *Leclercia* Tamura 1 个种。菌种的 16 S rRNA 序列已在 GenBank 获得序列号 (表 1)。

表 1 华重楼内生细菌的 16 S rRNA 鉴定

Table 1 Identification of endophytic bacteria in *Paris polyphylla* var. *chinensis*

代表菌株	最相近菌种	登录号	相似性/%
FJAT-hcl-1	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	KY653093	99.86
FJAT-hcl-8	阿氏芽孢杆菌 <i>Bacillus aryabhattai</i>	KY653094	100.00
FJAT-hcl-11	韩国假单胞菌 <i>Pseudomonas koreensis</i>	KY653095	99.86
FJAT-hcl-13	<i>Pseudomonas gessardii</i>	KY653096	99.64
FJAT-hcl-15	暹罗芽孢杆菌 <i>Bacillus siamensis</i>	KY653097	99.86
FJAT-hcl-17	假蕈状芽孢杆菌 <i>Bacillus pseudomycooides</i>	KY653098	98.87
FJAT-hcl-19	<i>Bacillus toyonensis</i>	KY653099	99.93
FJAT-hcl-22	<i>Bacillus glycinifermentans</i>	KY653100	100.00
FJAT-hcl-23	杰米拉类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus jamilae</i>	KY653101	99.58
FJAT-hcl-24	缓慢葡萄球菌 <i>Staphylococcus lentus</i>	KY653102	99.93
FJAT-hcl-25	木糖葡萄球菌 <i>Staphylococcus xylosus</i>	KY653103	100.00
FJAT-hcl-30	简单芽孢杆菌 <i>Bacillus simplex</i>	KY653104	99.86
FJAT-hcl-33	苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	KY653105	100.00
FJAT-hcl-34	蜡状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	KY653106	100.00
FJAT-hcl-36	耐寒短杆菌 <i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	KY653107	99.93
FJAT-hcl-40	粪产碱杆菌粪球菌亚种 <i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	KY653108	100.00
FJAT-hcl-43	堀越氏芽孢杆菌 <i>Bacillus horneckiae</i>	KY653109	99.51
FJAT-hcl-47	梭形赖氨酸芽孢杆菌 <i>Lysinibacillus fusiformis</i>	KY653110	100.00
FJAT-hcl-50	忍冷嗜冷芽孢杆菌 <i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	KY653111	100.00
FJAT-hcl-53	嗜麦芽窄食单胞菌 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	KY653112	99.79
FJAT-hcl-63	路德维希肠杆菌 <i>Enterobacter ludwigii</i>	KY653113	99.29
FJAT-hcl-64	非脱羧勒克菌 <i>Leclercia adecarboxylata</i>	KY653114	99.08
FJAT-hcl-65	松鼠葡萄球菌 <i>Staphylococcus sciuri</i>	KY653115	99.83

3.2 内生细菌的系统发育分析

华重楼内生细菌的系统发育树见图 1。耐寒短杆菌、简单芽孢杆菌、阿氏芽孢杆菌、堀越氏芽孢杆菌聚为一支, 耐寒短杆菌和简单芽孢杆菌亲缘关系较近。假蕈状芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、*B. toyonensis*、苏云金芽孢杆菌聚为一支, *B. toyonensis* 和苏云金芽孢杆菌的亲缘关系较近。涅罗芽孢杆菌、*B. glycinifermentans* 聚为一支。木糖葡萄球菌、缓慢葡萄球菌、松鼠葡萄球菌聚为一分支, 均为葡萄球菌属。嗜冷芽孢杆菌、梭形赖氨酸芽孢杆菌聚为一分支, 杰米拉类芽孢杆菌单独成一支。嗜麦芽窄食单胞菌单独成一支, 与粪产碱杆菌粪球菌亚种的亲缘关系较近。路德维希肠杆菌和非脱羧勒克菌亲缘关系较近, 聚为一分支。韩国假单胞菌、*P. gessardii*、*P. extremorientalis* 聚为一分支, 为假单胞属细菌。

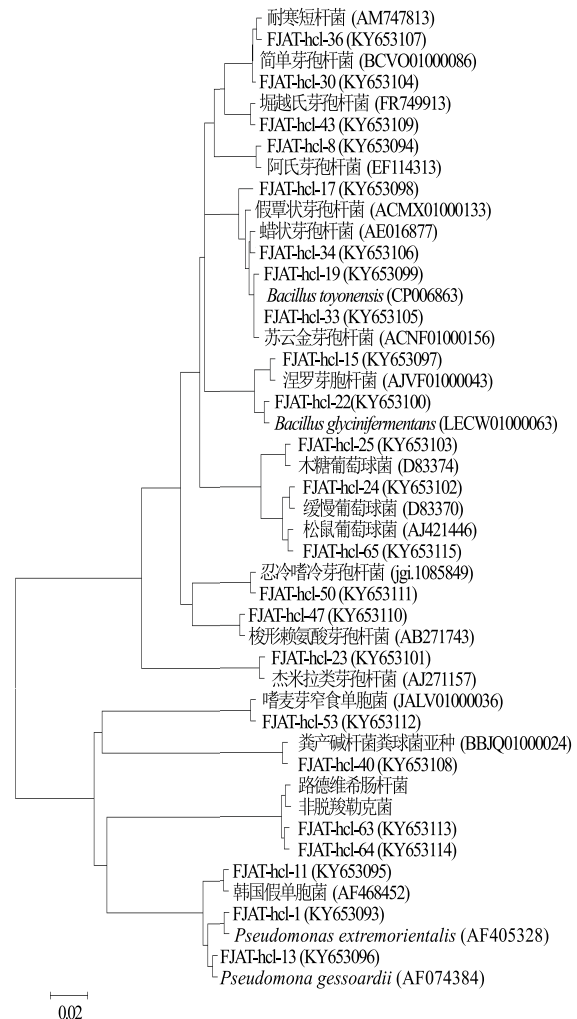


图 1 基于 16 S rRNA 序列构建的华重楼内生细菌的 NJ 树
Fig. 1 NJ phylogenetic tree of endophytic bacteria in *Paris polyphylla* var. *chinensis* based on 16 S rRNA gene sequences

3.3 内生细菌种类的多样性

以分离的 23 种内生细菌为样本,各菌株在不同部位中的出现 (1) 与否 (0) 为指标,以兰氏距离为尺度进行系统聚类分析 (表 2 和图 2)。当 $\lambda = 0.751\ 9$ 时,可将 23 株内生细菌分为 4 个类群。

表 2 华重楼内生细菌的分布

Table 2 Distribution of endophytic bacteria in *Paris polyphylla* var. *chinensis*

内生细菌	健株			病株		
	根茎	茎	叶	根茎	茎	叶
<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	0	0	0	1	1	0
阿氏芽孢杆菌	1	1	0	0	0	0
韩国假单胞菌	0	0	0	0	0	1
<i>Pseudomonas gessardii</i>	0	0	0	1	1	1
涅罗芽孢杆菌	1	1	0	0	0	0
假蕈状芽孢杆菌	0	1	1	0	0	0
<i>Bacillus toyonensis</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Bacillus glycinifermentans</i>	0	0	1	0	0	1
杰米拉类芽孢杆菌	0	0	0	1	1	0
缓慢葡萄球菌	0	0	0	1	0	0
木糖葡萄球菌	0	0	0	0	0	1
简单芽孢杆菌	1	0	1	0	0	0
苏云金芽孢杆菌	0	1	1	0	0	0
蜡状芽孢杆菌	1	1	0	1	0	0
耐寒短杆菌	1	1	0	1	1	0
粪产碱杆菌粪球菌亚种	0	0	0	1	0	0
堀越氏芽孢杆菌	1	1	0	0	0	0
梭形赖氨酸芽孢杆菌	1	1	0	1	1	0
忍冷嗜冷芽孢杆菌	0	1	1	0	0	0
嗜麦芽窄食单胞菌	1	1	0	0	1	0
路德维希杆菌	0	0	0	1	0	0
非脱羧勒克	0	0	0	1	1	0
松鼠葡萄球菌	0	0	0	1	1	0

类群 I 包括假单胞菌 (*P. extremorientalis*、*P. gessardii*)、杰米拉类芽孢杆菌、粪产碱杆菌、路德维希杆菌、非脱羧勒克菌、缓慢葡萄球菌、松鼠葡萄球菌。这些内生细菌均存在于华重楼病株中,其中假单胞菌 *P. extremorientalis*、杰米拉类芽孢杆菌、非脱羧勒克菌、缓慢葡萄球菌、松鼠葡萄球菌在病株的根茎、茎部位均有分布,假单胞菌 *P. gessardii* 在病株的根茎、茎、叶部位均有分布,路德维希杆菌只分布于病株的根茎部。

类群 II 包括阿氏芽孢杆菌、涅罗芽孢杆菌、堀

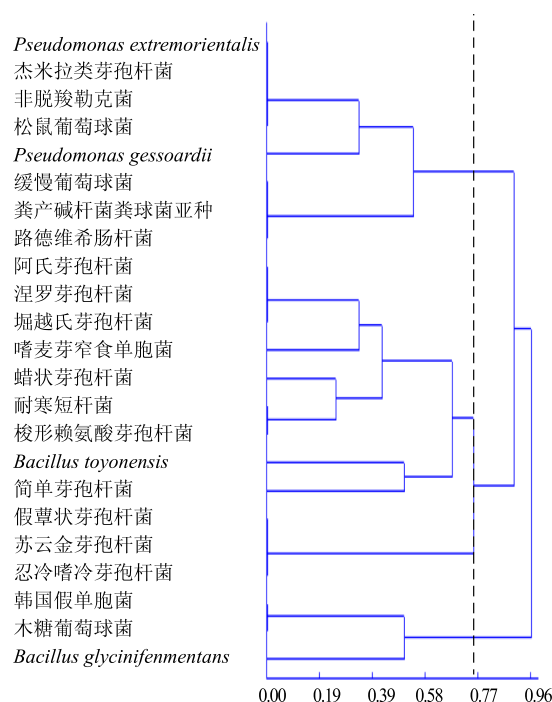


图 2 华重楼内生细菌的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of endophytic bacteria in *Paris polyphylla* var. *chinensis*

越氏芽孢杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、蜡状芽孢杆菌、耐寒短杆菌、梭形赖氨酸芽孢杆菌、芽孢杆菌 *B. toyonensis* 和简单芽孢杆菌。这些菌株在华重楼健株中均有分布,其中梭形赖氨酸芽孢杆菌、耐寒短杆菌在病株的根茎、茎部均有分布,蜡状芽孢杆菌在华重楼病株的根茎部有分布,嗜麦芽窄食单胞菌在华重楼病株茎部有分布。

类群 III 包括忍冷嗜冷芽孢杆菌、假蕈状芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌,这些菌株分布于华重楼健株的茎、叶部位。

类群 IV 包括韩国假单胞菌、木糖葡萄球菌、芽孢杆菌 *B. glycinifermentans*, 这些菌株均存在于华重楼病株叶片中,其中芽孢杆菌 *B. glycinifermentans* 在华重楼健株叶片中也有分布。

3.4 不同部位内生细菌的量

华重楼健株不同部位内生细菌量存在差异,叶、茎和根茎部的内生细菌的平均量分别为 7.32×10^4 、 1.790×10^5 、 2.999×10^5 cfu/g, 根茎部最高,叶部最低。华重楼健株根茎部以芽孢杆菌为优势菌,占根茎部内生细菌总量的 73.3%, 其中涅罗芽孢杆菌平均量最高为 6.33×10^4 cfu/g, 此外,耐寒短杆菌、梭形赖氨酸芽孢和嗜麦芽窄食单胞菌的平均量分别为 3.33×10^4 、 2.00×10^4 、 2.67×10^4 cfu/g; 华重楼健

株茎部以芽孢杆菌为优势菌, 占茎部内生细菌总量的 67.1%, 涅罗芽孢杆菌量最高为 3.00×10^4 cfu/g, 此外, 梭形赖氨酸芽孢杆菌、嗜冷芽孢杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌的量分别为 1.67×10^4 、 0.23×10^4 、 2.00×10^4 cfu/g; 华重楼健株叶部以芽孢杆菌为优势菌, 占叶部内生细菌总量的 81.8%, 其中简单芽孢杆菌的量最高为 2.33×10^4 cfu/g, 忍冷嗜冷芽孢杆菌的量为 1.33×10^4 cfu/g (图 3)。

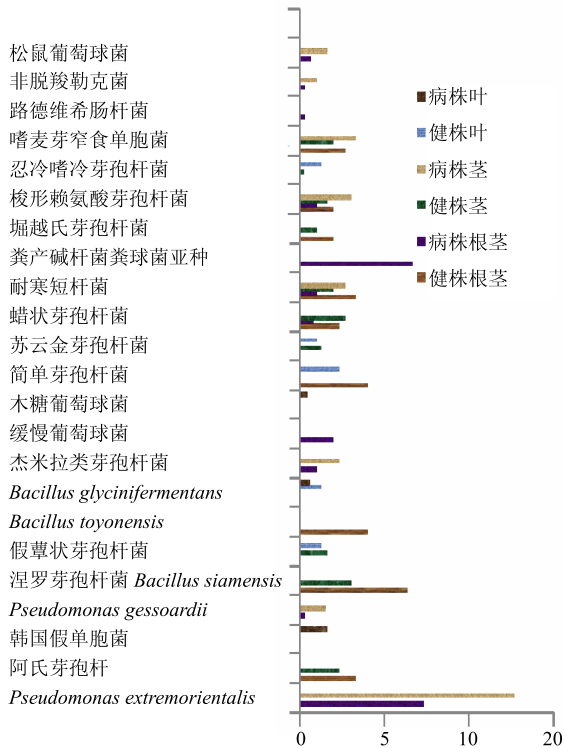


图 3 华重楼不同部位内生细菌的量

Fig. 3 Number of endophytic bacteria in different parts of *Paris polyphylla* var. *chinensis*

华重楼病株不同部位内生细菌量存在差异, 叶、茎和根茎部的内生细菌的平均量分别为 2.76×10^4 、 28.17×10^4 、 21.43×10^4 cfu/g, 其茎部内生细菌量显著高于叶部和根茎部。华重楼病株叶部以假单胞菌为优势菌, 假单胞菌占叶部内生细菌总量的 60.5%, 其中韩国假单胞菌的量为 1.67×10^4 cfu/g, 芽孢杆菌 *B. glycinifermentans* 和木糖葡萄球菌的量分别为 0.57×10^4 、 0.47×10^4 cfu/g; 华重楼病株的茎部以假单胞菌为优势菌, 假单胞菌占茎部内生细菌总量的 50.3%, 其中假单胞菌 *P. extremorientalis* 的量最高达 12.67×10^4 cfu/g, 此外, 杰米拉类芽孢杆菌、耐寒短杆菌、梭形赖氨酸芽孢杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、非脱羧勒克菌、松鼠葡萄球菌的平均量分别为 2.33×10^4 、 2.67×10^4 、 3.00×10^4 、 3.33×10^4 、

1.00×10^4 、 1.67×10^4 cfu/g; 华重楼病株根茎部以假单胞菌和粪产碱杆菌为优势菌, 假单胞菌占根茎部内生细菌总量的 35.6%, 粪产碱杆菌占根茎部内生细菌总量的 31.1%。此外, 杰米拉类芽孢杆菌、缓慢葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌、耐寒短杆菌、梭形赖氨酸芽孢杆菌、路德维希肠杆菌、非脱羧勒克菌和松鼠葡萄球菌的量分别为 1.00×10^4 、 2.00×10^4 、 0.80×10^4 、 1.00×10^4 、 0.33×10^4 、 0.33×10^4 、 0.67×10^4 cfu/g (图 3)。

3.5 不同部位内生细菌的分布多样性

依据 16 S rRNA 相似性 $< 98\%$ 时作为不同的分类单元进行多样性指数计算, 结果显示, 分离自华重楼病健株不同部位的 65 株内生细菌可以分为 23 个分类单元。华重楼不同部位内生细菌分布多样性见表 3, 华重楼健康和患病植株不同部位的多样性指数和均匀度指数大小依次为健株根茎 $>$ 健株茎 $>$ 病株根茎 $>$ 病株茎 $>$ 健株叶 $>$ 病株叶。

表 3 华重楼不同部位内生细菌的分布多样性

Table 3 Diversity of endophytic bacteria isolated from different parts of *Paris polyphylla* var. *chinensis*

部位	丰富度	内生细菌量/(cfu·g ⁻¹)	H	J
健株根茎	9	2.999×10^5	3.071 2	0.968 9
病株根茎	11	2.143×10^5	2.596 8	0.750 7
健株茎	10	1.790×10^5	3.161 2	0.951 6
病株茎	8	28.17	2.484 2	0.828 1
健株叶	5	7.32	2.259 1	0.973 0
病株叶	4	2.76	1.448 3	0.724 1

4 讨论

16 S rRNA 基因序列是原核微生物种类鉴定最常用的分子标记。本研究首次基于 16 S rRNA 序列对华重楼健康植株和茎腐病发病植株不同部位的可培养内生细菌进行了研究, 从华重楼健康植株和茎腐病发病植株的根茎、茎、叶等部位分离到了 11 属 23 种细菌。华重楼健株的根茎、茎、叶部的内生细菌主要是芽孢杆菌属细菌。芽孢杆菌属细菌也是云南重楼 *P. polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.^[25]、三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen^[26]、水稻 *Oryza sativa* L.^[27]、玉米 *Zea mays* L.^[28] 等植物中的优势细菌种群。在华重楼内生防菌研究方面, 杨正强等^[15] 从华重楼根茎中分离到的内生芽孢杆菌 SS02 对 13 种作物致病菌具有抑制作用; 雍彬等^[17] 从华重楼根茎中分离到的内生枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* Iun35 对镰刀菌等多种病

原菌具有抑制作用。本实验中分离到的多种芽孢杆菌为华重楼茎腐病生防菌的筛选奠定了良好基础。本研究中, 华重楼健康植株的芽孢杆菌量和种类上高于茎腐病发病植株, 健康与患病植株体内的芽孢杆菌种类和数量上的差异可能是植株能否保持健康的关键所在。芽孢杆菌的芽孢具有抗逆性(耐热、抗旱、抗紫外线和有机溶剂)强的特性, 同时芽孢杆菌在生长过程中能在寄主根茎、叶围定殖, 与病原菌竞争营养和侵染位点, 分泌抗菌物质、抑制病原菌生长; 诱导植物产生系统抗病性、抵御病原菌入侵, 从而达到生物防治的目的^[29]。芽孢杆菌在华重楼健康植株根茎、茎部定殖, 或可通过分泌抗菌物质、抑制茎腐病病原菌生长, 或可与茎腐病病原菌展开营养和侵染位点竞争, 健康植株根茎部的芽孢杆菌可有效阻止茎腐病病原菌的侵染和定殖, 而健康植株茎部的大量芽孢杆菌则可有效阻止茎腐病病原菌在植株体内的传导, 从而达到保持植株健康的目的。有关华重楼内生芽孢杆菌在植株体内的定殖或生防机制还有待深入研究。华重楼茎腐病病株以假单胞菌为优势细菌类群。罗文富等^[30-31]研究了三七根茎腐病, 发现假单胞菌是该病的初始和主要病原, 真菌腐皮镰孢和细链格孢为继入病原。本研究中, 假单胞菌在华重楼植株根茎茎部的大量定殖是否有利于镰刀菌类真菌的侵染, 进而导致华重楼茎腐病发生还有待研究。

华重楼健株和茎腐病发病植株都有分布的菌株 FJAT-hcl-36、FJAT-hcl-47、FJAT-hcl-53 与耐寒短杆菌、梭形赖氨酸芽孢和嗜麦芽窄食单胞菌的相似性均达 99.0% 以上。这 3 种细菌在华重楼内生细菌中首次分离鉴定。华重楼茎腐病株根茎部位分离到的 FJAT-hcl-40 和 FJAT-hcl-63 与粪产碱杆菌 *A. faecalis* subsp. *faecalis* 和路德维希肠杆菌 *E. ludwigii* 的相似性分别为 100.0% 和 99.29%, 这 2 种细菌是华重楼根腐病的病原。华重楼病株分离到的 FJAT-hcl-24、FJAT-hcl-25、FJAT-hcl-64、FJAT-hcl-65 与缓慢葡萄球菌 *S. lentus*、木糖葡萄球菌 *S. xylosus*、非脱羧勒克菌 *L. adecarboxylata*、松鼠葡萄球菌 *S. sciuri* 的相似性都在 99.0% 以上, 这 4 种细菌都是重要的动物源致病菌^[32-36]。有关这些细菌在华重楼植株中的定殖特性还有待研究。

生物多样性是生态系统稳定和健康发展的重要衡量指标^[37]。刘政等^[38]研究发现感染黄萎病棉株内生细菌种类多样性下降。本研究结果表明, 华重楼健株的内

生细菌群落多样性要高于茎腐病发病植株。物种多样性反映了群落中物种的丰富度、变化程度或均匀度, 也反映了不同环境条件与群落的相互关系; 物种多样性指数和物种丰富度有关, 也和物种的个体数有关, 当物种丰富度相差不大时, 物种的个体数决定多样性指数、生态优势度和均匀度的变化^[39]。华重楼健株分离到 4 属 11 种内生细菌, 根茎、茎、叶分别分离到 9 种、10 种和 5 种内生细菌, 从华重楼茎腐病病株中分离到 10 属 14 种细菌, 其中根茎、茎、叶分别分离到 11 种、8 种和 3 种内生细菌。华重楼健株的根茎部的丰富度、均匀度均高于患病植株, 有可能与健康植株的根茎部内生菌平均量 (2.999×10^5 cfu/g) 显著高于患病植株根茎部 (2.143×10^5 cfu/g) 且每种内生细菌的数量较为接近有关。就内生细菌在华重楼不同部位的数量来看, 华重楼健株的根茎部内生细菌量最高, 华重楼病株叶部内生细菌量最低 (2.76×10^4 cfu/g)。华重楼病株的茎部内生细菌量显著高于健株。

本研究利用分离培养的方法获得华重楼的可培养内生细菌, 采用 16 S rRNA 基因序列对内生细菌进行了初步鉴定, 从种类和数量上全面分析了华重楼可培养内生细菌的群落结构特性, 由于植物内生菌 90% 以上是不可培养的, 这些结果尚无法全面揭示华重楼的内生细菌的群落特性。宏基因组技术不依赖于微生物的培养, 可采用宏基因技术构建华重楼植株不同部位的内生细菌的 16 S rRNA 序列测序文库, 通过生物信息学分析等进一步揭示华重楼内生细菌的群落多样性。有关华重楼健株和茎腐病发病植株内生细菌的多样性, 还需要取不同发病级别的植株进行系统验证。华重楼内生细菌的定殖特性、互作关系及在华重楼植株生长代谢过程中的功能等还有待研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 令利军, 雷 蕾, 冯 蕾, 等. 独角莲内生细菌 TG116 的分离鉴定及抑菌特性研究 [J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2014, 50(5): 91-97.
- [3] 畅 涛, 王涵琦, 杨成德, 等. 高寒草地禾草内生细菌 B-401 的鉴定及生物防治潜力评价 [J]. 草业学报, 2014, 23(4): 282-289.
- [4] 武利勤, 顾海科, 王 青, 等. 石斛内生甲基营养芽孢杆菌的拮抗和促生作用研究 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(8): 200-206.
- [5] 金 岩, 孙晶波, 高 洁. 五味子中内生拮抗活性细菌的分离与筛选 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 996-1001.

- [6] 卜春亚, 孙 晔, 张天蔚, 等. 一株草莓根茎腐尖孢镰刀菌拮抗内生细菌的分离鉴定及抑菌特性 [J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(2): 300-304.
- [7] 杨成德, 王 颖, 王玉琴, 等. 东祁连山高寒草地几株醉马草内生细菌的生物功能评价及鉴定 [J]. 草业学报, 2014, 23(5): 249-255.
- [8] Mocali S, Bertelli E, Di C, *et al.* Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs [J]. *Res Microbiol*, 2003, 154(2): 105-114.
- [9] Keel C, Defago G. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: Mechanisms and ecological impact [A] // Gange A C, Brown V K. *Multitropic Interactions in Terrestrial System* [M]. Oxford: Blackwell Science, 1997.
- [10] 赵 明, 贺声蓉, 陈小静, 等. 产甾体皂甙华重楼内生菌的筛选与鉴定 [J]. 微生物学报, 2005, 45(5): 776-779.
- [11] 任 智, 张晓喻, 冯定胜, 等. 两种华重楼内生菌的发酵产物中薯蓣皂苷的检测 [J]. 四川食品与发酵, 2006, 42(4): 54-55.
- [12] 陈小静, 冯定胜, 赵 明, 等. 四种华重楼内生细菌的初步研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2005, 42(8): 827-830.
- [13] 任 智, 张晓喻, 祝 凯, 等. 产薯蓣皂苷华重楼内生菌的筛选与鉴定 [J]. 微生物学杂志, 2007, 27(2): 6-9.
- [14] 张晓杰, 查岭生, 陈小静, 等. 一株产重楼皂苷内生细菌的分离与鉴定 [J]. 微生物学通报, 2006, 33(5): 84-88.
- [15] 杨正强, 张耀兮, 陈小静, 等. 华重楼内生菌 SS02 的分离与抗菌活性的初步研究 [J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 54-57.
- [16] 程媛媛, 雍 彬, 张 超, 等. 华重楼内生菌抗菌肽的分离纯化及其特性 [J]. 微生物学报, 2009, 49(4): 498-503.
- [17] 雍 彬, 张 超, 马沁沁, 等. 华重楼内生菌 Iun35 的分离及其抗菌蛋白的性质 [J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(4): 537-540.
- [18] Delong E F. Archaea in coastal marine environments [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1992, 89(12): 5685-5689.
- [19] 葛慈斌, 刘 波, 车建美, 等. 武夷山地衣表生和内生芽孢杆菌种群的多样性 [J]. 微生物学报, 2015, 55(5): 551-563.
- [20] Kim O S, Cho Y J, Lee K, *et al.* Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2012, 62: 716-721.
- [21] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30: 2725-2729.
- [22] Jukes T H, Cantor C R. Evolution of protein molecules [C] // Munro H N. *Mammalian Protein Metabolism* [M]. Academic Press, New York: 1969.
- [23] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap [J]. *Evolution*, 1985, 39: 783-791.
- [24] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406-425.
- [25] 魏 娟, 何东旭, 李国红, 等. 云南重楼内生细菌的分离鉴定及系统发育分析 [J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(2): 165-169.
- [26] 张智慧, 张倩茹, 付晓萍, 等. 基于 16S rDNA 序列分析研究根腐病三七根内可培养细菌的多样性 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 415-419.
- [27] 黎起秦, 焦 成, 农 倩, 等. 广西水稻内生细菌的动态分布及其对水稻纹枯病菌的拮抗作用 [J]. 中国生物防治学报, 2010, 26(3): 312-319.
- [28] 刘 洋, 左 山, 邹媛媛, 等. 杂交玉米农大 108 及其亲本种子内生细菌群落的多样性 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(23): 4763-4771.
- [29] 陈志谊. 芽孢杆菌类生物杀菌剂的研发与应用 [J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 723-732.
- [30] 罗文富, 喻盛甫, 贺承福, 等. 三七根腐病病原及复合侵染的研究 [J]. 植物病理学报, 1997, 27(1): 85-91.
- [31] 罗文富, 喻盛甫, 黄 琼, 等. 三七根腐病复合侵染中病原细菌的研究 [J]. 云南农业大学学报, 1999, 14(2): 123-127.
- [32] 刘富来, 冯翠兰. 熊果酸柠檬苦素合剂对防治小鼠缓慢葡萄球菌病的实验研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(10): 813-816.
- [33] 刘 青, 赵铭武, 曹鑫磊, 等. 血鸚鵡鱼木糖葡萄球菌的分离鉴定和耐药性研究 [J]. 水产科学, 2016, 35(2): 174-178.
- [34] 姜 兰, 劳海华, 简 清, 等. 罗氏沼虾木糖葡萄球菌 Xia-5[#]菌株的分类鉴定 [J]. 水产学报, 2004, 28(5): 124-129.
- [35] 赵 敏, 李 智, 于永春, 等. 松鼠葡萄球菌抑制屋尘螨引起的混合型气道炎症反应 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(17): 2224-2228.
- [36] 巴翠玉, 赵福广, 张培军, 等. 洛氏鳕非脱羧勒克菌的分离鉴定与药敏试验 [J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(9): 99-101.
- [37] 张全国, 张大勇. 生物多样性与生态系统功能: 最新的进展与动向 [J]. 生物多样性, 2003, 11(5): 351-363.
- [38] 刘 政, 李 燕, 孙 艳, 等. 重病田和无病田棉花根组织中细菌群落结构的差异 [J]. 棉花学报, 2016, 28(2): 170-178.
- [39] 葛慈斌, 郑 榕, 刘 波, 等. 武夷山自然保护区土壤可培养芽孢杆菌的物种多样性及分布 [J]. 生物多样性, 2016, 24(10): 1164-1176.