

野生酸枣内生细菌筛选、鉴定及其抑菌活性测定

裴淑兰¹ 刘东³ 刘慧芹^{2,3*} 王远宏^{2*} 韩巨才³ 刘慧平³

(1. 山西林业职业技术学院, 太原 030009; 2. 天津农学院园艺园林学院, 天津 300384;

3. 山西农业大学农学院, 太谷 030801)

摘要: 为广泛开发植物内生菌资源, 采用组织分离法从野生酸枣的根、茎、叶和果实中进行生防菌的分离和筛选, 通过平板对峙法和发酵液法测定了所得菌株对8种植物病原菌的活性, 并利用生物学和分子学方法对所得菌株进行了鉴定。结果显示, 从野生酸枣的根、茎、叶和果实中共分离得到76株内生细菌; 通过对所有菌株进行初筛和复筛, 最终得到8株拮抗作用较强的菌株, 菌株SZG-23、SZG-1、SZY-13和SZS-3对梨黑斑病菌 *Alternaria kikuchiana* 和黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 的抑制作用较强, 抑制率均分别高于82.5%和71.1%, 其中菌株SZG-23的抑制率最高, 达90.3%和72.4%。菌株SZG-23发酵液对8种植物病原菌生长均有一定的抑制作用, 其中对梨黑斑病菌和番茄灰霉病菌 *Bortyris cinerea* 的抑制作用最好, 抑制率分别达92.2%和90.5%。菌株SZG-23的抗利福平突变菌株能在酸枣幼苗中定殖和移动。结合形态观察、生理生化特征及16S rDNA 同源性分析将菌株SZG-23鉴定为解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*, 16S rDNA 序列在GenBank中登录号为KF483660。

关键词: 野生酸枣; 内生细菌; 筛选; 鉴定; 抑菌活性

Study on screening, identification and detection of antibiotic activity of endophytic bacteria from wild jujube

Pei Shulan¹ Liu Dong³ Liu Huiqin^{2,3*} Wang Yuanhong^{2*} Han Jucui³ Liu Huiping³

(1. Shanxi Forestry Vocational Technical College, Taiyuan 030009, Shanxi Province, China; 2. College of Horticulture and Landscape, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 3. Agronomy College, Shanxi

Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China)

Abstract: In order to exploit the resources of endophyte from plants, bio-bacteria were separated and screened from the roots, stems, leaves and fruits in wild jujube with tissue separation method. The activity of the acquired strains on the eight pathogens was determined with the flat plate confrontation method and fermentation method. The obtained strain was identified with biological and molecular methods. The results showed that 76 endophytic bacterial strains were isolated from roots, stems, leaves and fruits in wild jujube. The inhibition of all strains was tested on pathogens through the primary and secondary screening. Finally, there were eight of strong antagonism endophytic bacteria were obtained. Among them, strains of antagonist SZG-23, SZG-1, SZY-13 and SZS-3 were stronger on *Alternaria kikuchiana* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, and inhibiting rate exceeded 82.5% and 71.1%, respectively. Strain SZG-23 had the strongest inhibiting rate on two pathogens, up to 90.3% and 72.4%. Its fermentation broth could inhibit eight kinds of pathogens, and inhibiting rate on *A. kikuchiana* and *Bortyris*

基金项目: 天津市高校中青年骨干创新人才培养计划(J01009030709), 天津市蔬菜现代农业产业体系项目(ITTVRS2017011), 山西省财政支持农业科技成果转化资金(SCZZNCGZH201403)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: wjxlhq@126.com, wangyh@tjau.edu.cn

收稿日期: 2017-03-24

cinerea were the best, up to 92.2% and 90.5%. The mutant strain of strains SZG-23 resisting Rif could colonize and move in jujube seedling. According to morphology, physiological and biochemical characters as well as 16S rDNA sequences, strain SZG-23 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* (GenBank accession number was KF483660).

Key words: wild jujube; endophytic bacteria; screening; identification; inhibition

野生酸枣 *Ziziphus acidojujuba* Cheng et Liu 是鼠李科枣属植物,广泛分布于我国山西、河北、陕西等丘陵地区,为经济价值较高的旱生果树资源。目前人们对酸枣或野生酸枣的研究大多集中于其药理、生理特性、栽培管理、加工、化学成分等方面,而对其病害及防治的研究也只限于枣疯病。野生酸枣对环境适应性强,耐碱、耐寒、耐旱、耐瘠薄,果实富含多种营养成分和微量元素,且果仁可入药(唐蕊和张雪辉,2010)。然而野生酸枣作为山西省重要的野生资源,其天然种群数量和种质资源日趋减少,基于野生酸枣抗性强的特点,在其体内筛选生防菌,保护和开发稀有植物资源将有着重要的现实意义。

目前已经证实内生细菌广泛存在于健康植物体内,可以提高植物抗逆能力,改善系统生态平衡(Chen et al., 1995);具有促生、固氮、防治病虫害、降解重金属、增加宿主植物的他感作用等多种特性(van Loon et al., 1998; 刘慧芹等, 2014; Li et al., 2015),使之成为植物微生态系统中的重要组成部分;同时内生细菌还是良好的外源基因载体,为抗病、杀虫和固氮等外源基因导入植物体内提供了新的途径和方法(Kloepper et al., 2004)。当前植物内生菌的研究在深度及广度上都有很大进展,对于植物内生菌资源的研究更宽泛,从大田作物、蔬菜、果树到中草药(马芸等, 2010; 孙卓和杨利民, 2015)、野生植物(Chen et al., 2012; 史凤玉等, 2013; 徐亚军等, 2013)、低等或湿地植物(Shcherbakov et al., 2013; 郭莹等, 2016)等均有涉猎。表明我国植物资源种类丰富且分布广泛,植物内生菌资源也相应地呈现出多样性。目前关于野生酸枣内生拮抗细菌的研究鲜有报道。本试验根据其药用性及较强的环境适应性和抗病能力,以内生细菌的研究技术为基础,对酸枣的内生细菌进行分离、筛选和鉴定,以期野生植物内生细菌开发利用、生防机制的研究提供理论基础,同时也为拓展野生酸枣资源的保护和利用途径、丰富其保护生物学研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物及肥料:野生酸枣采自于山西省太谷

县范村镇、阳邑乡、胡村镇和修文镇,摘取健康无伤的根、茎、叶和果实装入无菌袋,带回实验室。酸枣苗购买于山西省运城市绛县扬帆苗圃专业合作社,株高为40~70 cm。将土壤与蛭石按2:1配比混合,并加入20 g颗粒控释肥(天津尊荣未来生物科技发展有限公司),置于直径为30 cm的花盆中,将酸枣苗定植于其中,2个月后进行拮抗菌株定殖试验。

病原指示菌:梨黑斑病菌 *Alternaria kikuchiana*、西瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*、辣椒枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*、番茄早疫病病菌 *A. solani*、黄瓜枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*、棉花立枯病菌 *Rhizoctonia solani*、小麦赤霉病菌 *F. gramine-arum*、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*,均由山西农业大学农药实验室提供,并于PDA斜面4℃保存。

培养基:营养琼脂(nutrient agar medium, NA)培养基:牛肉浸膏3.0 g、蛋白胨5.0 g、葡萄糖2.5 g、琼脂18 g、蒸馏水1 L, pH 7.0;溶菌肉汤(lysogeny broth, LB)培养基:胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、NaCl 10 g、琼脂18 g、蒸馏水1 L, pH 7.0,用于内生细菌培养;LB液体培养基:LB培养基去掉琼脂;马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:去皮马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂18 g、蒸馏水1 L, pH 7.0,用于真菌培养(方中达, 1998)。

试剂与仪器:细菌基因组DNA提取试剂盒,北京百泰克生物科技有限责任公司;DNA Marker,北京博迈德科技发展有限公司;27F/1495R引物,北京六合华大基因科技股份有限公司;利福平(Rif),北京中保科农生物技术有限公司。DYY-6D型电泳仪,北京市六一仪器厂;YYS-80E型显微镜,上海仪圆光学仪器有限公司;BYQ6072型PCR仪,杭州博日科技有限公司;SU8010型扫描电镜,天美(中国)科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 野生酸枣内生细菌的分离及筛选方法

分别对酸枣根、茎、叶和果实组织进行无菌水超声波清洗,晾干,切成适合的小块。依次浸泡于75%乙醇2 min、3%次氯酸钠30 s、75%乙醇30 s,每次浸泡后用无菌水冲洗3次。无菌滤纸吸干放入无菌研

钵中,加入10 mL无菌水,研碎后取汁液依次稀释后涂布NA平板,每个浓度3次重复,30℃下培养3~7 d。待平板内长出菌落后,根据菌落的颜色、大小、突起特征等挑取形态差异较为明显的菌落,用平板划线法转接于空NA平板,对新长出的菌落再划线稀释分离2~3次,获得纯培养物,转接NA斜面保存。

鉴于供试植物病原菌中5种为镰孢菌,2种为链格孢菌,因此各选1种为代表作为初筛菌株,即梨黑斑病菌和黄瓜枯萎病菌。采用平板对峙法(方中达,1998)测定分离到的内生细菌对梨黑斑病菌和黄瓜枯萎病菌生长的抑制作用。分别在PDA平板中央接入直径6 mm的生长旺盛的2种病原真菌菌块,在菌块两侧25 mm处点接待筛选细菌菌株,对照以PDA平板上仅接入病原真菌为空白对照,重复3次。28℃倒置培养,每天观察细菌及病原菌生长情况,第5天测定抑菌带宽度,计算抑制率。抑制率=(1-处理菌落直径/对照菌落直径)×100%。

1.2.2 拮抗菌株发酵液抑菌活性测定

采用生长速率法测定待筛细菌发酵液的抑菌作用(方中达,1998)。拮抗菌株经LB液体培养基发酵培养后10 000 r/min离心10 min,上清液经0.22 μm滤膜过滤,获得无菌发酵液。发酵液和PDA培养基按体积比1:9混合后倒平板,接入直径6 mm的新鲜的8种病原真菌菌块。28℃恒温培养5 d后测量菌落直径,计算抑制率。菌丝生长抑制率=(1-发酵液处理菌落半径/对照组菌落半径)×100%。

1.2.3 拮抗菌株抗利福平筛选及其定殖能力测定

参照利福平标记法(刘慧芹等,2014)进行拮抗菌株抗利福平筛选。将培养24 h的拮抗菌株转入含5 g/mL Rif的LB液体培养基中,180 r/min振荡培养3~5 d,待菌体生长后再逐次转接到含10、20、50、100 g/mL Rif的LB液体培养基中,直到菌株可以在100 g/mL浓度下稳定生长,菌落的形态及对病原菌的拮抗作用保持不变,即获得突变菌株。

内生细菌定殖的测定参考灌根法(孙卓和杨利民,2015)进行。将突变菌株的悬浮液浓度调至约为 10^8 CFU/mL,在酸枣幼苗根茎基处略挖出部分土,取100 mL菌悬液浇灌在根周围并覆土,以浇无菌水为对照,环境温度为25~35℃。接种15、30 d后分别在根、茎、叶部进行突变菌株的分离回收。方法参照1.2.1,培养基改为含100 g/mL Rif的NA平板,内生细菌在其上生长3 d后计算菌落数,重复3次。

1.2.4 所得拮抗菌株的鉴定

形态特征观察和生理生化特性测定:参照《常见

细菌鉴定手册》(东秀珠和蔡妙英,2001)对细菌在培养基上的菌落颜色、形态、黏稠性等性状进行描述,用扫描电镜观察内生细菌的菌体形态。采用柠檬酸利用试验、纤维素及淀粉水解试验、接触酶反应、H₂S产生试验、V-P测定试验、MR试验、明胶液化、吡啶产生、耐盐性培养(5%、7% NaCl)试验、碳水化合物利用试验等进行生理生化特性测定。

16S rDNA序列分析及系统发育树构建:细菌基因组DNA试剂盒提取DNA,利用引物27F:5'-AGA-GTTTGATCCTGGCTCAG-3'和1495R:5'-GGTACCCTTGTTACGACTT-3'对拮抗菌株基因组16S rDNA序列进行PCR扩增。50 μL反应体系:10×Buffer 5 μL、2.5 mmol/L dNTP 4 μL、10 μmol/L引物27F/1495R各2 μL、5 U/L *Taq* 酶0.25 μL、模板3 μL、ddH₂O 33.75 μL。反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,48℃退火1 min,72℃延伸2 min,30个循环;72℃延伸10 min。PCR产物由中美泰和生物技术(北京)有限公司测序。所得序列进行BLAST比对分析,利用Mega 5.0软件以邻接法构建系统发育树,进行1 000次Bootstraps检验。

1.3 数据分析

利用SPSS 17.0软件对试验数据进行统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离、筛选和发酵液抑菌活性

根据菌落形态、颜色、湿润度等特征,从野生酸枣中分离出76株拮抗细菌,其中根部(G)31株,茎部(J)21株,叶部(Y)17株,幼果(S)部7株,根部分离到的拮抗细菌最多,占40.8%。能产生抑菌带的菌株有27株,抑菌带宽大于15 mm的有8株,编号分别为SZG-1、SZG-13、SZG-23、SZG-25、SZJ-20、SZY-12、SZY-13和SZS-3。这8株菌株的发酵液对梨黑斑病菌和黄瓜枯萎病菌的抑菌活性较为明显,其中菌株SZG-23、SZG-1、SZY-13和SZS-3的抑制率分别高于82.5%和71.1%,菌株SZG-23分离于酸枣树的根部,其发酵液对梨黑斑病菌和黄瓜枯萎病菌的生长抑制率最高,达到90.3%和72.4%(表1)。因此,后续试验选择菌株SZG-23进行。

2.2 菌株SZG-23的抑菌谱

菌株SZG-23发酵液广谱抑菌性测定结果显示,其发酵液对8种植物病原真菌生长均有一定抑制作用,但抑菌作用存在差异(图1)。其中对番茄早疫病菌、梨黑斑病菌和番茄灰霉病菌的抑制效果最好,

抑制率分别为92.2%、90.5%和84.1%，显著高于对其余5种病原菌的抑制率；对西瓜枯萎病菌、黄瓜枯萎病菌和小麦赤霉病菌的抑制作用居中，分别为72.1%、70.8%和72.1%，显著高于对辣椒枯萎病菌和棉花立枯病菌的抑制作用，后二者抑制作用较差，抑制率分别为58.1%和55.6%，均低于60.0%（图2）。鉴于内生细菌SZG-23对病原菌具有良好的抑制作用，且抑菌谱较广，对其进行进一步的研究。

2.3 抗Rif突变菌株筛选及在酸枣中的定殖

通过不同浓度Rif的梯度筛选，获得抗100 g/mL Rif的SZG-23突变菌株，连续培养10代后，其形态及对病原菌的拮抗作用均与其野生菌株相同。经回接后突变菌株可以在酸枣中定殖，15 d时在根、茎、叶中分离到的菌落数分别为82.0、33.3、13.7个，30 d时菌落数分别为42.7、18.7、23.0个。根和茎部的菌落数在30 d时均显著高于15 d时；而在叶部却表现为30 d时的菌落数显著低于15 d时。3个部位分离到的菌株与其野生菌株的形态一致，表明突变菌株不仅能在酸枣中定殖，而且还能在其体内移动。

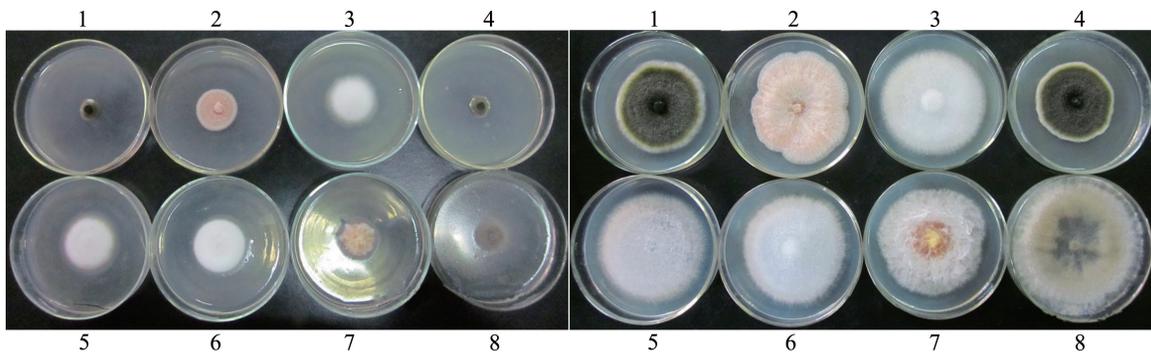


图1 菌株SZG-23对8种植物病原菌的平板抑制作用

Fig. 1 Inhibition of the strain SZG-23 on eight pathogens

1~8: 分别为梨黑斑病菌、西瓜枯萎病菌、辣椒枯萎病菌、番茄早疫病菌、黄瓜枯萎病菌、棉花枯萎病菌、小麦赤霉病菌、番茄灰霉病菌；左图为处理，右图为对照。1~8: *Alternaria kikuchiana*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *A. solani*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Rhizoctonia solani*, *F. graminearum*, *Botrytis cinerea*; the left are the treatments, the right are the control.

2.4 菌株SZG-23的形态特征

菌株SZG-23在NA培养基上于30℃培养时，初期菌落呈乳白色、圆形、脓状，边缘整齐、中间隆起，表面黏稠；随着培养时间延长，菌落逐渐变干，出现褶皱，颜色变为浅黄色。扫描电镜观察发现，菌株SZG-23的菌体呈杆状，周生鞭毛，大小为0.5~1.5 μm×1.5~2.8 μm（图3）。菌株SZG-23的革兰氏染色呈阳性，可产芽孢，表明其属于芽胞杆菌 *Bacillus* sp.。

2.5 菌株SZG-23的生理生化特征

菌株SZG-23的生理生化试验测定结果显示，柠

表1 从野生酸枣中分离出的拮抗菌株对梨黑斑病菌和黄瓜枯萎病菌的抑制作用

Table 1 Inhibition of eight strains from wild jujube against *Alternaria kikuchiana* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

菌株 Strain	抑制率 Inhibiting rate (%)	
	梨黑斑病菌 <i>A. kikuchiana</i>	黄瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>
SZG-1	89.6±6.2 a	71.2±7.1 ab
SZG-13	85.0±7.8 ab	63.1±5.6 abc
SZG-23	90.3±4.8 a	72.4±3.9 ab
SZG-25	74.2±6.3 b	53.4±9.7 bc
SZJ-20	43.3±6.7 c	21.7±3.8 d
SZY-12	74.2±5.9 b	62.5±7.0 abc
SZY-13	82.5±9.5 ab	71.1±7.5 ab
SZS-3	86.7±5.7 a	73.4±8.9 a

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在P<0.05水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at P<0.05 level by Duncan's new multiple range test.

檬酸盐利用培养基呈碱性（深蓝色）；淀粉水解反应为阳性，可产生淀粉酶；纤维素水解为阴性，不产生相关水解酶；葡萄糖产酸为阳性；接触酶VP（pH 7.0）测定为阳性；亚硝酸盐还原反应为阴性；甲基红反应为阴性；吲哚产生为阴性；V-P测定反应为阳性；明胶液化为阳性；MR试验为阴性；硝酸盐还原为阳性；过氧化物酶反应为阳性；在温度为-10℃与50℃时不能生长，40℃可以生长，30℃为最适生长温度；麦芽糖反应为阳性；氧化酶反应为阴性；乳糖反应为阳性；pH 5.7不能生长，pH 8.0可以生长，最适

pH为7.0;在5% NaCl条件下可以生长,在7% NaCl条件下不能生长。结合形态特征及生理生化特征将菌株SZG-23初步鉴定为解淀粉芽胞杆菌 *B. amylo-liquefaciens*。

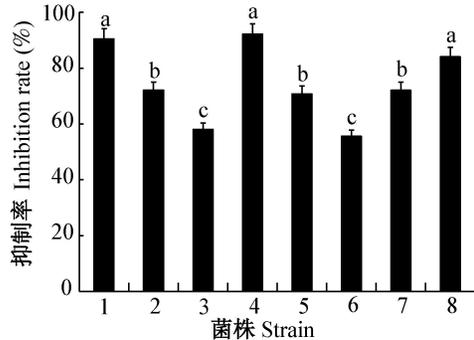


图2 菌株SZG-23对8种病原真菌的抑菌活性

Fig. 2 Inhibition of the strain SZG-23 on eight pathogens

1~8: 分别为梨黑斑病菌、西瓜枯萎病菌、辣椒枯萎病菌、番茄早疫病菌、黄瓜枯萎病菌、棉花枯萎病菌、小麦赤霉病菌、番茄灰霉病菌。图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。1~8: *Alternaria kikuchiana*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *A. solani*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Rhizoctonia solani*, *F. graminearum*, *Botrytis cinerea*, respectively. Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

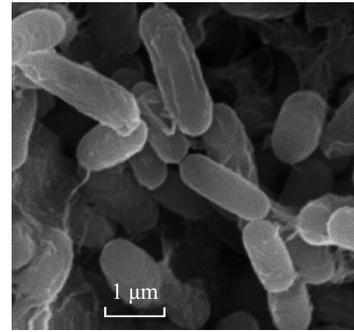


图3 菌株SZG-23的扫描电镜照片

Fig. 3 Photo of strain SZG-23 by scanning electron microscope (SEM)

2.6 菌株SZG-23的16S rDNA序列分析

提取菌株SZG-23的DNA,经PCR扩增后得到大小约为1451 bp的16S rDNA片段。将测序后所得序列上传至GenBank,获得登录号为KF483660, BLAST比对结果显示,菌株SZG-23与解淀粉芽胞杆菌(GU125620)和枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* (GQ199598)的相似度均达到100.0%。

系统发育树结果显示,菌株SZG-23与解淀粉芽胞杆菌(GU125620)和枯草芽胞杆菌(GQ199598)聚为一类,在系统发育上亲缘关系较近(图4)。结合形态特征观察及生理生化试验,确定菌株SZG-23为解淀粉芽胞杆菌。

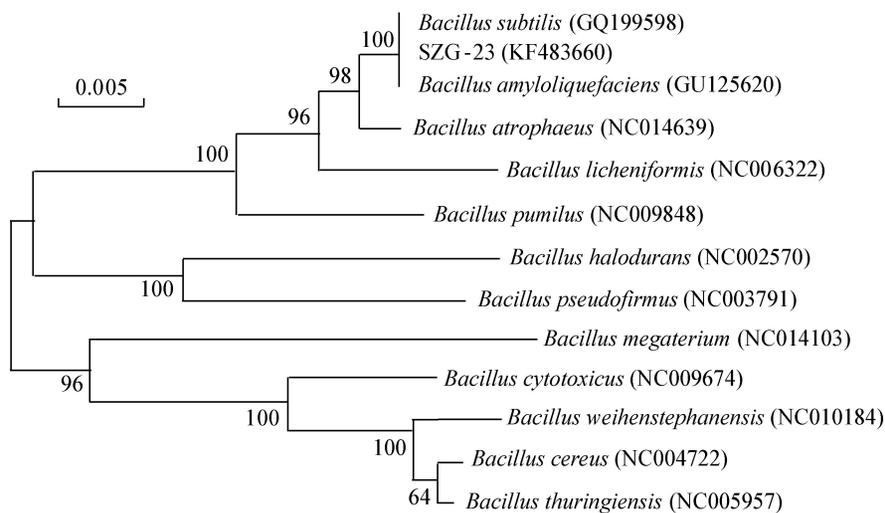


图4 基于16S rDNA序列构建菌株SZG-23及其它相关菌株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of SZG-23 strain and other related strains based on 16S rDNA sequences

3 讨论

内生细菌的筛选与植物的年龄、生长环境、抗病虫、食用和药用价值等密切相关(顾沛雯,2009)。许多野生植物正是具备了生长时间长、抗逆性强、生长

环境复杂、有食用或药用价值等特性,因而成为筛选内生细菌新的植物资源。本研究以野生酸枣为宿主植物,进行了内生细菌的分离,从根部分离到的最多,为31株,占总数的40.8%,其次是茎、叶、果。可见酸枣中的内生细菌一般较多地分布在根部。有些

研究也认为内生细菌在林木组织中的分布也以根部最多,茎部次之,叶部较少(顾沛雯,2009)。本研究发现,从酸枣中分离到的内生细菌对梨黑斑病菌和黄瓜枯萎病菌的抑制作用较强的有8株,其中4株来自于根部,菌株SZG-23的发酵液对8种病原真菌均有较高的抑制活性,抑菌谱广,表现出了一定的生防潜力。大多研究报道,室内抑菌试验与盆栽防效试验通常具有一致性(杨蕾等,2014;张斌等,2015)。本试验缺少盆栽防效试验环节,在后期研究中还需完善。

不论是土壤中的还是内生的拮抗细菌大多都能在植物体内定殖,这是生防细菌发挥其生防作用的主要表现之一。目前,内生细菌定殖的追踪与监测多采用抗生素标记和基因标记,基因标记更能反映细菌在植物体内的传导过程,并能够直观反映定殖数量变化;抗生素标记方法简单方便易于操作,仍被广泛使用(刘邮洲等,2014)。本试验采用了抗生素标记法,用灌根方式对内生细菌SZG-23进行回收接种,15 d时在根部已检测到较多的菌落数,而茎和叶中则依次减少,表明了菌株SZG-23可以从酸枣根部侵入和定殖,而且可以到达根皮层,随后进入导管,借着蒸腾作用向植物的其它部位扩展(Bellone et al., 1997);30 d时根、茎部的菌落数明显下降,而叶部则明显上升,表明菌株SZG-23在酸枣中呈现出新的分布状态,这可能是由于内生细菌通过蒸腾作用使得根部细菌减少而叶部的细菌增多,也可能是由根际真菌携带而达到侵染和重新分布的目的(路国兵等,2007)。不可否认的是,内生细菌在植物体内的分布也会因植物内部的环境、各器官的营养水平、内生细菌的种类、外界的温湿度以及地理位置、生态条件、甚至二者基因型的不同而存在差异(Ahlholm et al., 2002; Kumar & Hyde, 2004)。由于本研究中用的是酸枣幼苗,没有花和果实器官,使得菌株SZG-23在植物体内的移动规律有待进一步研究。

16S rDNA序列分析已广泛应用于细菌鉴定和系统分类研究中。本研究通过细菌16S rDNA序列分析和BLAST比对发现,菌株SZG-23与解淀粉芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌的相似性达100.0%。解淀粉芽胞杆菌与枯草芽胞杆菌亲缘性很高,在形态特征和培养形状上难以区分,但在生理生化反应中,解淀粉芽胞杆菌可利用乳糖,枯草芽胞杆菌则不能利用乳糖(Welker & Campbell, 1967)。因此,通过菌落特征及形态学观察、生理生化指标、16S rDNA序列分析,菌株SZG-23被鉴定为是解淀粉芽胞杆菌。

但是在亲缘关系很近的分类类群间,由于序列间的相似度太高,16S rDNA/RNA基因序列分析往往容易失效(Christensen et al., 1998)。随着分子生物学技术的发展,通过核酸(G+C)%、DNA-DNA杂交分析以及水解酶性质,以及利用基因*yjaR*、*yjaO*、*tetL*、*tetB*在2种芽胞杆菌中排列顺序的差异(Welker & Campbell, 1967),以及编码蛋白的基因*gyrA*、*gyrB*、*ropD*在枯草芽胞杆菌中的特异性(Yamamoto & Harayama, 1998; Chun & Bae, 2000),可对二者在分子水平上进行更加准确地鉴定。

参考文献 (References)

- Ahlholm JU, Helander M, Lehtimäk S, Wäli P, Saikkonen K. 2002. Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions. *Oikos*, 99(1): 173-183
- Bellone CH, de Bellone SDVC, Pedraza RO, Monzon MA. 1997. Cell colonization and infection thread formation in sugar cane roots by *Acetobacter diazotrophicus*. *Soil Biology & Biochemistry*, 29(5/6): 965-967
- Chen C, Bauske EM, Musson G, Rodriguezkabana R, Kloepper JW. 1995. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control*, 5(1): 83-91
- Chen WM, Tang YQ, Mori K, Wu XL. 2012. Distribution of culturable endophytic bacteria in aquatic plants and their potential for bioremediation in polluted waters. *Aquatic Biology*, 15(2): 99-110
- Christensen H, Nordentoft S, Olsen JE. 1998. Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on rRNA sequence. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(2): 605-610
- Chun J, Bae KS. 2000. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequence. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78(2): 123-127
- Dong XZ, Cai MY. 2001. Systematic identification of common bacteria manual. Beijing: Science Press (in Chinese) [东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社]
- Fang ZD. 1998. Research methods of plant diseases (3rd edition). Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [方中达. 1998. 植物研究方法(第3版). 北京: 中国农业出版社]
- Gu PW. 2009. Plant endophyte and its secondary metabolites in the application of producing bio-pesticides. *Journal of Agricultural Sciences*, 30(3): 56-59 (in Chinese) [顾沛雯. 2009. 植物内生菌及其代谢产物在生物农药创制中的应用. 农业科学研究, 30(3): 56-59]
- Guo Y, Qin YY, Ju TC, Leng S, Wu D, Li MT. 2016. Isolation and characterization of a strain endophytic bacterium in *Myriophyllum spicatum* and its solubilization of phosphate. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 36(12): 4352-4360 (in Chinese) [郭莹, 秦玉莹, 鞠天琛, 冷粟, 吴迪, 李明堂. 2016. 一株穗花狐尾藻内生菌的分离鉴定及其溶磷特征研究. 环境科学学报, 36(12): 4362-4360]
- Kloepper JW, Ryu CM, Zhang S. 2004. Induced systemic resistance

- and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11): 1259–1266
- Kumar DS, Hyde KD. 2004. Biodiversity and tissue-specificity of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Divers*, 17: 69–90
- Li YL, Gu YL, Li J, Xu MZ, Wei Q, Wang YH. 2015. Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers in Microbiology*, 6: 883
- Liu HQ, Han JC, Zhao TC, Wen XZ, Liu Y, Liu HP, Wang YH. 2014. Screening, identification and bio-control of antagonistic endophytic bacteria from fruit trees. *Acta Horticulturae Sinica*, 41(2): 335–342 (in Chinese) [刘慧芹, 韩巨才, 赵廷昌, 温祥珍, 刘艳, 刘慧平, 王远宏. 2014. 果树内生拮抗细菌的筛选、鉴定及生防作用研究. *园艺学报*, 41(2): 335–342]
- Liu YZ, Liang XJ, Qiao JQ, Zhang RS, Chen ZY. 2014. *Bacillus subtilis* PTS-394 labeled by green fluorescent protein and its colonization. *Journal of Plant Protection*, 41(4): 416–422 (in Chinese) [刘卹洲, 梁雪杰, 乔俊卿, 张荣胜, 陈志谊. 2014. 枯草芽胞杆菌 PTS-394 的 GFP 标记及其定殖能力. *植物保护学报*, 41(4): 416–422]
- Lu GB, Zhang Y, Ji XL, Mu ZM, Gao HJ, Wu XD. 2007. Recent advance on the approaching and colonization of endophytic bacteria. *Biotechnology Bulletin*, (3): 88–92 (in Chinese) [路国兵, 张瑶, 冀宪领, 牟志美, 高绘菊, 吴绪东. 2007. 植物内生细菌的侵染定殖规律研究进展. *生物技术通报*, (3): 88–92]
- Ma Y, Xie ZL, Li DY, Ma ZJ. 2010. The research on the diversity of endophytic bacteria in Qinghai-Tibet Plateau medicinal plant. *Biotechnology Bulletin*, (6): 234–239 (in Chinese) [马芸, 谢占玲, 李德英, 马志杰. 2010. 青藏高原药用植物内生细菌多样性研究. *生物技术通报*, (6): 234–239]
- Shcherbakov AV, Bragina AV, Kuzmina EY, Berg C, Muntyan AN, Makarova NM, Malfanova NV, Cardinale M, Berg G, Chebotar VK, et al. 2013. Endophytic bacteria of *Sphagnum* mosses as promising objects of agricultural microbiology. *Microbiology*, 82(3): 306–315
- Shi FY, Wu YP, Zhang RJ, Wu N, Zhu YB. 2013. Diversity and nematocidal activity of the endophytic bacteria in the wild soybean *Glycine soja*. *Journal of Plant Protection*, 40(4): 327–332 (in Chinese) [史凤玉, 武云鹏, 张瑞敬, 吴楠, 朱英波. 2013. 野生大豆内生细菌多样性及其杀线虫活性分析. *植物保护学报*, 40(4): 327–332]
- Sun Z, Yang LM. 2015. Screening and identification of antagonistic bacteria against *Panax ginseng* pathogeny fungus. *Journal of Plant Protection*, 42(1): 79–86 (in Chinese) [孙卓, 杨利民. 2015. 人参病原菌拮抗细菌的分离筛选与鉴定. *植物保护学报*, 42(1): 79–86]
- Tang R, Zhang XH. 2010. Value of *Zizyphus spinosa* and its further exploitation and utilization. *Deciduous Fruits*, (6): 23–24 (in Chinese) [唐蕊, 张雪辉. 2010. 浅谈野生酸枣的价值与开发利用. *落叶果树*, (6): 23–24]
- van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CM. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 453–483
- Welker NE, Campbell LL. 1967. Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 94(4): 1124–1130
- Xu YJ, Zhao LF, Chen P, Jiang XR, Wei GH. 2013. Isolation, screening and characterization of phytopathogen antagonistic endophytes from wild *Artemisia argyi*. *Acta Ecologica Sinica*, 33(12): 3697–3705 (in Chinese) [徐亚军, 赵龙飞, 陈普, 蒋晓瑞, 韦革宏. 2013. 植物病原菌拮抗性野生艾蒿内生菌的分离、筛选和鉴定. *生态学报*, 33(12): 3697–3705]
- Yamamoto S, Harayama S. 1998. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(3): 813–819
- Yang L, Zhou GY, Liang J, Ni Y, Lü Q, Zhang XY. 2014. Isolation, screening and identification of the endogenous microorganisms antagonizing poplar canker. *Journal of Plant Protection*, 41(4): 438–446 (in Chinese) [杨蕾, 周国英, 梁军, 倪杨, 吕全, 张星耀. 2014. 防治杨树溃疡病内生菌的分离筛选及鉴定. *植物保护学报*, 41(4): 438–446]
- Zhang B, Qiao JQ, Liang XJ, Liu YZ, Chen ZY. 2015. Evaluation of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Plant Protection*, 42(3): 353–361 (in Chinese) [张斌, 乔俊卿, 梁雪杰, 刘卹洲, 陈志谊. 2015. 番茄枯萎病菌和青枯病菌拮抗细菌的评价. *植物保护学报*, 42(3): 353–361]

(责任编辑:李美娟)