

4株桫欏内生细菌的分离鉴定及系统发育分析*

宋培勇** 李林 肖仲久 李小霞

(遵义师范学院生命科学学院 遵义 563002)

摘要 为了探索植物桫欏内生细菌及其进化关系,对用植物内生菌一般分离培养方法获得的4株内生细菌,从形态学、生理生化特征以及16S rDNA PCR扩增、测序和BLAST比对等进行了综合鉴定和系统发育分析.根据形态学和生理生化特征以及16S rDNA相似性比对,将内生细菌ASP17和ASL21初步鉴定为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*);将ASL24初步鉴定为*Lysinibacillus*属,而ASL23可能为与*Lysinibacillus*相近但不同的属.系统发育分析表明:4株内生细菌中ASP17和ASL21聚为一支,亲缘关系较近;ASL23和ASL24聚为一支,亲缘关系较近.图2 表2 参21

关键词 桫欏;内生细菌;16S rDNA;分离鉴定;系统发育分析

CLC Q939.103 : Q948.12*2.3

Identification and Phylogenetic Analysis of Four Endophytic Bacteria Isolated from *Alsophila spinulosa**

SONG Peiyong**, LI Lin, XIAO Zhongjiu & LI Xiaoxia

(School of Life Sciences, Zunyi Normal College, Zunyi 563002, China)

Abstract To determine the endophytic bacteria inhabiting *Alsophila spinulosa* and their phylogenetic relationship, integrative identification and phylogenetic analysis was made on 4 strains of isolates with traditional microbiological methods. Based on morphological and biochemical properties and sequencing and comparison results with BLAT, the isolates ASP17 and ASL21 were identified as species *Bacillus thuringiensis*, ASL24 was identified as genus *Lysinibacillus*, while ASL23 possibly belonged to another genus close to *Lysinibacillus*. Among the 4 endophytic bacteria, ASP17 and ASL21 clustered in one branch, while ASP23 and ASP24 clustered in another branch in cladogram. The results revealed that the genetic relationship between ASP17 and ASL21 is closer than between ASP23 and ASP24. Fig 2, Tab 2, Ref 21

Keywords *Alsophila spinulosa*; bacterial endophytes; 16S rDNA; isolation and identification; phylogenetic analysis

CLC Q939.103 : Q948.12*2.3

1992年, Kloepper首次提出了“植物内生细菌”(Endophytic bacteria)的概念,即指能够定殖在健康植物细胞间隙或细胞内,并与寄主植物建立和谐联合关系的一类细菌^[1].根据内生细菌与植物的关系可以将其分为兼性内生细菌和专性内生细菌.根据宿主专一性的不同,又可以将内生细菌分为专一宿主内生细菌和多宿主内生细菌^[2].内生菌具有固氮、促生长、抗胁迫、抗摄食、抗病原真菌和细菌危害以及他感等作用^[2-3].植物内生菌已成为国内外竞相研究的热点.

我国植物种质资源丰富,按照每种植物至少有1种特有的内生菌估算,我国的内生菌资源是极其丰富多样的.我国植物内生菌研究主要集中在一些药用植物、农作物和蔬菜上,对珍稀濒危植物的内生菌目前报道的有红豆杉、珙桐、银杏和香樟等^[4-7].桫欏(*Alsophila spinulosa*)又名树蕨、刺桫欏,属真蕨纲桫欏科桫欏属桫欏亚属,是一种高大的树形蕨类植物^[8].两亿年前,在地球中生代侏罗纪、白垩纪时期曾盛极一时,与大型爬行动物恐龙同生共荣.第四纪冰川期后,

桫欏濒临灭绝,仅少数在适宜环境中生息繁衍,成为当今一种十分珍贵的冰川前期古生孑遗植物,被誉为“蕨类植物之王”、“古生物活化石”.我国曾将其列为I级保护植物,现为II级保护植物.桫欏作为地球历史的见证,对研究古生物、古植物、古地质、古气候、古环境的演变,对探索生物进化的奥秘,都具有重要的研究价值.目前对桫欏的研究报道主要集中在桫欏种群分布、生理生态、组织化学以及引种栽培等方面^[9-11],但有关桫欏内生菌的研究尚未见公开报道.对桫欏内生菌进行了分离鉴定,研究其生物多样性、生物学特征,阐明其与宿主植物的相互关系以及探索其实际应用的可能性等,可以为更好地保护和利用好桫欏这一珍稀野生植物资源提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分离材料 实验所用桫欏叶和叶柄,于2010年9月11日从贵州省赤水桫欏国家级自然保护区采集,带回实验室后,立即进行表面冲洗、消毒等处理及内生菌分离.

1.1.2 主要试剂和仪器 Tris、EDTA、Tris平衡酚(北京索莱宝科技有限公司);SDS(Sigma);琼脂糖[基因科技(上海)有限公司分装];PCR扩增试剂盒(北

收稿日期 Received: 2012-05-05 接受日期 Accepted: 2012-06-15

*贵州省科学技术基金项目(20082103)资助 Supported by the Science and Technology Foundation of Guizhou (No. 20082103)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: py66song@126.com)

京全市金生物技术有限公司); 16S rDNA PCR扩增引物为27f: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1525r: 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' (由上海捷瑞生物工程有限公司合成). PCR扩增仪为S1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad); WD-9413A 凝胶成像分析仪、DYY-10C型电泳仪(北京市六一仪器厂).

1.2 方法

1.2.1 内生细菌分离 (1) 表面消毒: 参考文献[5]和[12]介绍的方法并作必要改动: 将采集的新鲜桫欏的叶和柄分别用流水冲洗, 风干表面水分, 剪成小块或小段, 用无菌水漂洗2次, 75%酒精浸泡1 min, 再用2% NaClO溶液浸泡3 min, 转入75%酒精中浸泡30 s, 接着用无菌水漂洗3次, 将剪成的叶块和柄段平放于NA平板上, 28 °C培养2-3 d. 取最后一次漂洗液涂布于NA平板作为对照. (2) 内生细菌的分离和纯化: 将NA平板上组织块下和周缘长出的菌落或菌苔用平板划线稀释分离法转接于NA空平板, 待长出单菌落后, 再划线稀释分离1-2次, 最终获得纯培养物, 转NA斜面保存.

1.2.2 形态特征观察 参考文献[13]和[14]介绍的方法对35株纯培养物进行菌落形态、细胞形态(革兰氏染色和芽孢染色)观察, 并根据其形态学特征对分离菌株进行初步分类.

1.2.3 生化特征观察 参考文献[13]、[14]和[15]介绍的方法进行以下生化反应: 糖发酵实验、甲基红试验、V-P试验、硝酸盐还原、柠檬酸盐利用、大分子物质水解、接触酶试验、尿素酶试验.

1.2.4 内生细菌基因组DNA提取 基因组DNA的提取参照文献[16]介绍的方法并根据实际情况适当调整: (1) 取1.5 mL菌悬液放入2 mL的无菌EP管中, 12 000 r/min离心1 min, 弃上清液. (2) 沉淀加530 μL TE缓冲液, 反复吹打使之重悬, 再加40 μL 20% SDS, 混匀, 65 °C水浴1 h. (3) 加入100 μL 5 mol/L NaCl混匀, 再加80 μL CTAB/NaCl混匀, 65 °C水浴10 min. (4) 加入750 μL氯仿/异戊醇(24:1), 混匀, 离心4-5 min, 取上清液. (5) 加入等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)混匀, 离心5 min, 取上清液. (6) 加入0.6倍体积的异丙醇沉淀DNA, 离心, 弃上清液. (7) 50 μL 70%乙醇洗涤DNA, 弃上清液, 干燥. 加50 μL TE缓冲液, 保存.

1.2.5 16S rRNA基因的PCR扩增 PCR反应体系(50 μL): 引物27f 1 μL, 引物1525r 2 μL, PCR Mix 9.5 μL, 模板1 μL, dd H₂O 37.5 μL. 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 50 s, 59 °C 2 min, 72 °C 2 min, 30个循环; 72 °C, 10 min.

1.2.6 测序 选取4株内生细菌的16S rDNA PCR扩增产物交由上海生工生物工程有限公司测序.

1.2.7 同源性比对及系统发育分析 登陆NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 利用BLAST将测序结果与GenBank中的已知序列进行比对, 查找相似性最高的菌株, 并根据16S rDNA序列相似性进行分子鉴定. 以4株内生细菌、2株同源性菌株和3株不同属的参比菌株的16S rDNA序列为基础, 用MEG 5.1软件构建出系统发育树.

2 结果与分析

2.1 桫欏内生细菌的分离及初步鉴定

通过植物内生菌一般分离培养方法和平板划线稀释纯化方法从桫欏叶和柄中共分离得内生细菌35株, 其中20株来自柄, 15株来自叶. 革兰氏染色和芽孢染色显微镜观察发现35株内生细菌革兰氏染色阳性, 多数杆状, 少数呈球状; 均产芽孢, 芽孢多为近端生、卵圆形, 极少数为端生、圆形. 从中挑选出4株进行了生化反应(表1). 从表1可以看出: 桫欏内生细菌ASP17和ASL21除在半乳糖发酵、甲基红试验、硝酸盐还原和脂肪水解上存在差异外, 其余各项表现均一致; 而ASL23和ASL24除在半乳糖和木糖发酵上存在差异外, 在V-P试验、甲基红试验、硝酸盐还原和脂肪水解上亦存在差异. 这说明ASP17和ASL21之间在形态学和生理生化特征上更为接近, 而ASL23和ASL24之间相距较远.

2.2 部分菌株16S rDNA的PCR扩增

根据菌株间形态学上的差异, 挑选20株内生细菌, 以其基因组DNA为模板, 用16S rDNA PCR扩增通用引物27f和1525r, 进行PCR扩增, 通过1.6%琼脂糖凝胶电泳检测发现, 除19(ASL11菌株)和20(ASL35菌株)扩增失败外, 其余18株桫欏内生细菌16S rDNA扩增全部获得成功, 扩增出约1 400 bp大小的DNA条带(图1). 19(ASL11菌株)和20(ASL35菌株)扩增失败是由于PCR扩增前加样失误造成的, 后来重新

表1 桫欏内生细菌的形态学鉴定和生理生化反应

Table 1 Morphological and biochemical characteristics of endophytic bacteria from *Alsophila spinulosa*

菌株 Strain	革兰氏反应 Gram stain	形状 Shape	内生孢子 Endospore	发酵试验 Fermentation test							
				葡萄糖 Glucose	半乳糖 Galactose	木糖 Xylose	蔗糖 Sucrose	麦芽糖 Maltose	山梨醇 Sorbitol	甘露醇 Mannitol	甘油 Glycerol
ASP17	+	杆状 Rod-shaped	+	+-	++	--	+-	+-	--	--	--
ASL21	+	杆状 Rod-shaped	+	+-	+-	--	+-	+-	--	--	--
ASL23	+	杆状 Rod-shaped	+	+-	--	--	--	--	--	--	--
ASL24	+	杆状 Rod-shaped	+	+-	+-	--	--	+-	--	--	--
菌株 Strain	V-P 试验 V-P test	甲基红试验 Methyl red test	盐试验 Citrate test	过氧化氢酶试验 Catalase test	硝酸盐还原试验 Nitrate reduction test	尿素酶分解试验 Urase test	脂肪分解试验 Lipolysis test	明胶液化试验 Gelatin liquefaction test	淀粉水解 Amylohydrolysis test		
ASP17	+	+	-	+	-	+	+	+	+		
ASL21	+	-	-	+	+	+	-	+	+		
ASL23	+	-	-	+	-	+	-	-	-		
ASL24	-	+	-	+	+	+	+	-	-		

“+”: 阳性或能利用; “-”: 阴性或不能利用. 糖发酵中“++”表示产酸产气, “+-”表示产酸不产气, “--”表示不产酸不产气

“+” = positive or utilizable; “-” = negative or not utilizable; “++” = producing both acid and gas; “+-” = producing acid but no gas; “--” = producing no acid and gas in saccharides fermentation test

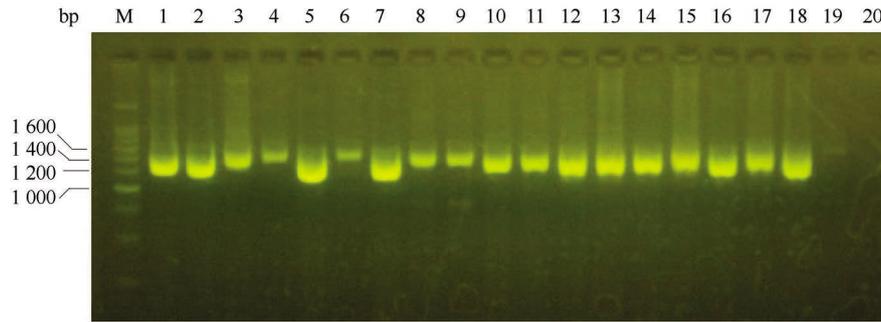


图1 20株内生细菌16S rDNA的PCR扩增结果

Fig. 1 Results of 16S rDNA amplified by PCR

M为200 bp DNA Ladder; 图顶端数字1、4、8、17分别代表菌株ASP17、ASL21、ASL23、ASL24

M indicates 200 bp DNA Ladder. Numbers 1, 4, 8, 17 above the figure represent strains ASP17, ASL21, ASL23, ASL24, respectively

表2 16S rDNA扩增产物序列相似性比对

Table 2 Comparison of 16S rDNA of the four strains

菌株 Strain	来源 Origin	注册号 Accession No.	同源菌株 The nearest type strain	相似性 Identity
ASP17	Petiole	NR043403	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	99%
ASL21	Leaf	NR043403	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	99%
ASL23	Leaf	NR042072	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain DSM 2898	93%
ASL24	Leaf	NR042072	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain DSM 2898	97%

对这两个菌株进行了16S rDNA PCR扩增, 获得了满意的结果。这再次说明通用引物27f和1525r以及所采用的PCR反应体系和扩增程序比较适合用于细菌16S rDNA PCR扩增。

2.3 16S rDNA PCR扩增产物测序

选取ASP17、ASL21、ASL23、ASL24将其PCR扩增产物送上海生工生物工程有限公司测序, 4株细菌测序均得到测序结果。

2.4 同源性比对与分类鉴定

利用4株细菌的测序结果, 登陆NCBI, 利用BLAST软件进行同源性比对, 比对结果见表2。根据相似性 $\geq 98\%$ 作为同种的划分标准, 相似性 $\geq 95\%$ 作为同属的划分标准, 并结合形态学和生化反应特征, 根据文献[17], 可将ASP17和ASL21初步鉴定为*Bacillus thuringiensis*, ASL24可初步鉴定为*Lysinibacillus*属, 而ASL23可能为与*Lysinibacillus*相近但不同的属。

2.5 系统发育分析

对4株内生细菌和2株同源性菌株, 另选取3株参比菌株[*Planococcus rifietoensis* strain M8 (NR_025553), *Planomicrobium okeanokoites* strain IFO 12536 (NR_025864), *Marinibacillus campisalis* strain SF-57 (NR_025716)], 利用MEGA 5.1建系统发育树(图2): ASL23和ASL24及其同源菌株*Lysinibacillus fusiformis* strain DSM 2898聚为一支, 而ASP17、ASL21及其同源菌株*Bacillus thuringiensis* strain IAM 12077和3株参比细菌聚为另一支。但ASL21比ASP17与*Bacillus thuringiensis* strain IAM 12077亲缘关系更近, ASL24比ASL23与*Lysinibacillus fusiformis* strain DSM 2898亲缘关系更近; 另一方面桫欏内生细菌ASP17和ASL21之间比ASL23和ASL24之间亲缘关系更近。这与综合鉴定的结果一致。

3 结论与讨论

通过植物内生菌一般分离培养方法, 从贵州赤水桫欏

国家级自然保护区桫欏的叶和柄中共分离到内生细菌35株。革兰氏染色和芽孢染色镜检观察发现: 革兰氏染色阳性, 均产芽孢。根据形态学和生化反应特征以及16S rDNA测序和BLAST比对, ASP17和ASL21可初步鉴定为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*), ASL24可初步鉴定为*Lysinibacillus*, 而ASL23可能为与*Lysinibacillus*相近但不同的属, 其内生细菌表现出一定的多样性。系统发育分析发现: 4株内生细菌中, ASP17和ASL21关系较近, 与*Bacillus thuringiensis* strain IAM 12077聚为一支, 而ASL23和ASL24关系较近, 与*Lysinibacillus fusiformis* strain DSM 2898聚为一支, 但ASP17和ASL21之间比ASL23和ASL24之间具有亲缘关系更近。

植物内生菌是一种潜在的重要的微生物资源, 能促进宿主植物生长、增强植物抗逆性以及增强其抗病虫害能力等, 有望开发成植物生长促进剂和生物农药。如苏云金芽孢杆菌由于能产生 δ 内毒素对昆虫幼虫起毒杀作用而成为当今应用最广泛的细菌杀虫剂。卢兰兰等从滇池蓝藻水华集聚区分离到的一株溶藻细菌DC-L14, 经16S rDNA序列分析鉴定为*Lysinibacillus fusiformis*, 能分泌非蛋白类溶藻物质^[18]。何敏艳从电镀废水中分离到一株高效铬还原菌*Lysinibacillus fusiformis* ZC1^[19], 据称*L. fusiformis* ZC1是至今为止已经报道的铬(VI)还原效率最高的细菌, 并且其还有多种重(类)金属抗性。桫欏生长环境海拔低、温度较高、湿度较大, 适合藻类生长, 从桫欏叶中分离到的内生细菌ASL24是否也有溶藻作用, 以及其是否具有增加宿主植物桫欏抗重金属胁迫的功能等值得深入研究。

据报道, 内生菌在宿主植物科、种以及组织水平上都存在着一定的专一性, 但由于试验所采用内生菌分离培养技术是沿袭了传统的微生物学分离培养方法, 能够分离到的微生物是极其有限的。这次从桫欏分离到的内生细菌总数较少, 加之送去测序的仅有4株, 所以是否存在其特有的内生菌

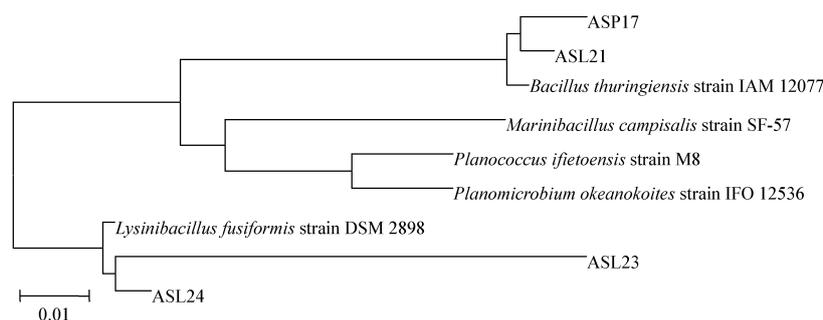


图2 基于16S rRNA序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences

标尺, 1%的序列分歧 Bar, 1% sequence divergence

群, 还有待进一步研究. 2006年, 中国科学院昆明植物研究所曾英研究组构建了世界首例植物内(共)生菌宏基因组文库^[20], 开创了植物内(共)生菌宏基因组研究的先河. 由于内生菌可产生与宿主植物相同的活性物质或其前体^[20-21], 利用能产活性物质或其前体的内生菌, 通过微生物发酵生产新型活性物质, 创制高效、绿色环保的新药, 或利用现代生物工程技术, 直接克隆有关基因或基因簇, 构建基因工程菌, 实现活性物质的工业化生产, 必将成为未来内生菌研究新的热点和重点.

参考文献 [References]

- Kloepper JW, Beauchamp CJ. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria [J]. *Can J Microbiol*, 1992, **38** (12): 1219-1232
- 池振明. 现代微生物生态学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2010. 190-191
- 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, **43** (9): 881-892 [Zou WX, Tan RX. Recent advances on endophyte research [J]. *Acta Bot Sin*, 2001, **43** (9): 881-892]
- 周东坡, 平文祥, 孙剑秋, 周晓辉, 刘晓兰, 杨德柱, 张建平, 郑喜群. 紫杉醇产生菌分离的研究[J]. 微生物学杂志, 2001, **21** (1): 18-19, 32 [Zhou DP, Ping WX, Sun JQ, Zhou XH, Liu XL, Yang DZ, Zhang JP, Zheng XQ. Isolation of taxol producing fungi [J]. *J Microbiol*, 2001, **21** (1): 18-19, 32]
- 宋培勇, 李风华, 马莉莉. 珙桐内生细菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 微生物学通报, 2011, **38** (1): 8-13 [Song PY, Li FH, Ma LL. Isolation and phylogenetic analysis of endophytic bacteria in *Davidia involucrate* [J]. *Microbiol China*, 2011, **38** (1): 8-13]
- 王松, 游玲, 李涛, 魏琴, 王涛. 香樟产芽孢内生细菌的系统发育多样性[J]. 微生物学通报, 2010, **37** (8): 1123-1129 [Wang S, You L, Li T, Wei Q, Wang T. Phylogenetic diversity of spore-forming endophytic bacteria isolated from *Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl [J]. *Microbiol China*, 2010, **37** (8): 1123-1129]
- 王梅霞, 陈双林, 闫淑珍, 霍娟. 一株产黄酮银杏内生真菌的分离鉴定与培养介质的初步研究[J]. 南京师范大学学报(自然科学版), 2003, **26** (1): 106-110 [Wang MX, Chen SL, Yan SZ, Huo J. A preliminary study on the isolation, identification and media of an endophytic fungus producing flavones [J]. *J Nanjing Norm Univ (Nat Sci)*, 2003, **26** (1): 106-110]
- 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 1982
- 何琴琴. 赤水桫欏保护区桫欏种群分布的现状 & 保护对策[J]. 绿色科技, 2011 (5): 40-41
- 原焕英, 江洪, 余树全. 桫欏生态系统的土壤呼吸特征[J]. 生态学报, 2009, **29** (6): 3316-3321 [Yuan HY, Jiang H, Yu SQ. The soil respiration of *Alsophila spinulosa* ecosystems [J]. *Acta Ecol Sin*, 2009, **29** (6): 3316-3321]
- 陈封政, 向清祥, 李书华. 孑遗植物桫欏叶化学成分的研究[J]. 西北植物学报, 2008, **28** (6): 1246-1249 [Chen FZ, Xiang QX, Li SH. Chemical constituents in the leaves of *Alsophila spinulosa* [J]. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 2008, **28** (6): 1246-1249]
- 杨瑞先, 孙广宇, 张荣, 陈立军. 油菜内生细菌16S核糖体DNA的RFLP分析[J]. 微生物学报, 2005, **45** (4): 606-609 [Yang RX, Sun GY, Zhang R, Chen LJ. 16S rDNA RFLP analysis of endophytic bacteria from *Brassica napus* [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2005, **45** (4): 606-609]
- 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 1999
- 黄秀梨, 辛明秀. 微生物学实验指导[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2008
- 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl A. Short Protocols in Molecular Biology [M]. 4th ed. Beijing: Science Publishing House, 2005
- 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
- 卢兰兰, 李根保, 沈银武, 刘永定. 溶藻细菌DC-L14的分离、鉴定与溶藻特性[J]. 应用与环境生物学报, 2009, **15** (1): 106-109 [Lu LL, Li GB, Shen YW, Liu YD. Isolation, identification and characterization of blue-green algae-lysing strain DC-L14 from Lake Dianchi, China [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2009, **15** (1): 106-109]
- 何敏敏. 高效铬还原菌 *Bacillus cereus* SJ1 和 *Lysinibacillus fusiformis* ZC1 的铬还原特性和全基因组序列分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010 [He MY. Characterization and genomic analysis of high chromate-reducing strains *Bacillus cereus* SJ1 and *Lysinibacillus fusiformis* ZC1 [D]. Wuhan: Central China Agricultural University, 2010]
- Jiao JY, Wang HX, Zeng Y, Shen YM. Enrichment for microbes living in association with plant tissues [J]. *J Appl Microbiol*, 2006, **100** (4): 830-837
- Strobel G, Stierle A, Stierle D. *Taxomyces andreanae* a proposed new taxon for a bulbilliferous associated with pacific yew (*Taxus brevifolia*) [J]. *Mycotaxon*, 1993, **40** (7): 71-80