



## 一株桑树内生拮抗菌的分离、鉴定及发酵条件优化

方翔<sup>1</sup>, 徐伟芳<sup>1</sup>, 牛娜<sup>2</sup>, 欧婷<sup>1</sup>, 王飞<sup>1</sup>, 左伟东<sup>1</sup>, 谢洁<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>家蚕基因组生物学国家重点实验室, 西南大学生物技术学院, 重庆 400715

<sup>2</sup>深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心, 广东 深圳 518000

**摘要:**【目的】利用植物内生拮抗菌防治植物病害是一种有效的生物防治手段。本研究从健康桑树中分离筛选桑椹菌核病拮抗性内生细菌, 为桑椹菌核病生物防治提供优良菌种。【方法】采用组织分离培养法及抑菌圈法分离、筛选桑椹菌核病拮抗性内生细菌; 根据菌体形态、培养特征、生理生化特性及基于16S rDNA序列的系统发育分析, 对抑菌活性显著且稳定的菌株进行菌种鉴定; 进而利用菌丝生长速率法检测活性发酵液的抑菌谱与热稳定性, 并通过单因素及正交试验优化该菌株产生抑菌活性物质的发酵条件。【结果】从健康桑树中共分离获得55株内生细菌, 其中XP-27菌株对核盘菌PZ-2的抑菌活性稳定且拮抗效果明显; XP-27菌株形态、培养特征、生理生化特性与芽孢杆菌属相符, 基于16S rDNA序列的系统发育分析结果显示该菌株与多株甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)的亲缘关系最近, 且处于系统发育树的同一分枝, 故将XP-27菌株鉴定为甲基营养型芽孢杆菌, 命名为*B. methylotrophicus* XP-27; 抑菌谱与热稳定性实验结果表明XP-27菌株对灰霉菌SWU5、腐霉菌SWU3等10种常见植物病原菌具不同程度的抑制作用, 且其发酵滤液热稳定性强; 发酵条件优化结果表明该菌株最佳培养基配方与培养条件为: 牛肉膏1.00%, 淀粉1.50%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.10%, 初始pH值为8.0, 培养温度为30℃, 接种量为7%, 发酵时间为120h。【结论】筛选获得的桑树内生细菌*B. methylotrophicus* XP-27对桑椹菌核病病原菌核盘菌PZ-2具有显著拮抗作用, 可作为开发桑椹菌核病生防制剂的候选菌株。

**关键词:** 桑椹菌核病, 桑树内生菌, 拮抗菌, 发酵优化

桑椹又名桑果、乌椹、桑枣, 为多年生木本植物桑树(*Morus alba* L.)的果实。新鲜桑椹不仅含有丰富的维生素、矿物质等营养成分, 还富含大

量花青素、黄酮等抗氧化活性成分, 对人体具有较好的营养与保健功能<sup>[1-2]</sup>。近年来, 随着我国蚕桑产业多元化发展, 果用桑树资源发展迅速, 初

基金项目: 国家自然科学基金(31601678); 西南大学本科科技创新基金(20163107002)

\*通信作者。Tel: +86-23-68251701; Fax: +86-23-68250191; E-mail: healthjie@163.com

收稿日期: 2018-01-19; 修回日期: 2018-05-30; 网络出版日期: 2018-07-17

步统计我国果桑种植面积已超过 15000 hm<sup>2</sup>[3]。然而,迅速发展的果桑产业面临着桑椹菌核病(俗称白果病)的严重威胁,该病害在重庆、安徽、浙江、广东、广西、台湾等全国各大桑园均有发生,发病率高达 30%–90%<sup>[3–4]</sup>,给果桑生产带来极大经济损失。桑椹菌核病是一种由真菌引起的果桑病害,桑实杯盘菌(*Ciboria shiraiana*)<sup>[5–6]</sup>、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)<sup>[7]</sup>、肉阜状杯盘菌(*Ciboria carunculoides*)<sup>[8]</sup>和桑椹核地杖菌(*Scleromitrua shiraiana*)<sup>[6]</sup>等病原真菌均可引起桑果发病。根据染病桑果发病症状及病原菌的不同,可将桑椹菌核病分为桑椹肥大性菌核病、桑椹小粒性菌核病和桑椹缩小性菌核病,其中肥大性菌核病为主要表现形式<sup>[4]</sup>。目前,生产上防控桑椹菌核病以化学(农药)防治为主,另辅以农业(土壤翻耕,深埋菌核)<sup>[9]</sup>、物理(覆盖地膜)<sup>[10]</sup>等防控手段,但农业及物理防治方法耗时费力,且防效甚微;化学法主要是通过多菌灵或甲基托布津等农药对处于花期的桑果进行喷雾防治<sup>[11–12]</sup>,尽管此法短期内防治效果较好,但易导致农药残留、病原菌产生耐药性、造成环境污染等一系列弊端。近年来,随着人们对食品安全问题的日益重视,使用安全有效的微生物菌剂<sup>[13–14]</sup>防治桑椹菌核病已逐步成为一种极具潜力的防控手段,但利用此法进行菌核病防治的报道整体较少。因此,寻获能够有效抑制菌核病病菌生长的微生物菌种资源已迫在眉睫。

植物内生菌(Endophytes)是指存在于健康植物体内,但不会引起宿主植物发生明显病害的一类微生物菌群<sup>[15]</sup>。内生菌因具有抵御植物病原菌<sup>[16]</sup>、促进宿主植物生长<sup>[17]</sup>、增加宿主植物抗病虫害能力<sup>[18–19]</sup>等功能而被广泛应用于植物病害的生物防治。近年来,有关利用桑树内生菌防治桑

树病害的研究报道表明桑树中存在大量能够抑制桑树病原菌生长的拮抗菌群,这些菌群是开发桑树病原微生物生防制剂的重要菌种来源<sup>[20–23]</sup>。牟志美等从健康桑树叶片中分离获得一株对炭疽病菌具较好抑菌作用的伯克霍尔德氏菌 LU10-1<sup>[20]</sup>;谭广秀从野生型鲁桑枝条分离筛选出的枯草芽孢杆菌 ME1 对多种病原菌拮抗效果显著<sup>[21]</sup>;本实验室前期亦从健康桑树中分离得到多种对金黄色葡萄球菌、白僵菌、绿僵菌、丁香假单胞菌等致病菌有明显抑制效果的内生细菌<sup>[22–23]</sup>。

本研究以一种桑椹肥大性菌核病的病原菌核盘菌<sup>[7]</sup>(*Sclerotinia sclerotiorum*) PZ-2 为靶标,从健康桑树中分离筛选对病菌具有较强抑制作用的内生细菌,测试其抑菌谱与发酵滤液的热稳定性,并优化其抑菌活性物质产生的发酵条件,为利用桑树内生菌进行桑椹菌核病生物防治奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料和培养基

供试桑树材料:2015年9月,于重庆市蚕业科学技术研究院桑园(N 29°50' E 106°25')采伐新伦敦品种2年生健康植株的枝条(离地约1.5–2.0 m),采集的枝条用自来水洗净晾干后,于4℃保存备用。

供试病原菌:核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*) PZ-2、桑椹核地杖菌(*Scleromitrua shiraiana*) SXSG-5 为本实验室分离保存。腐霉菌(*Pythium aphanidermatum*) SWU3、灰霉菌(*Botrytis cinerea*) SWU5、大丽花轮枝孢(*Verticillium dahliae*) SWU6、榆梢枯长喙霉(*Ceratocystis ulmi*) SWU10、木霉属菌(*Trichoderma* sp.) SWU11、烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*) SWU20、立枯丝核菌

(*Rhizoctonia solani*) SWU22、链格孢菌(*Alternaria alternata*) SWU26 为本实验室收集保存。

培养基：(1) 发酵培养基(g/L)：淀粉 10.0，胰蛋白胨 10.0， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1，pH 7.0；(2) 碳源基础培养基(g/L)：蛋白胨 10.0，NaCl 1.0，pH 7.0；(3) 氮源基础培养基(g/L)：葡萄糖 10.0，NaCl 1.0，pH 7.0；(4) 无机盐基础培养基(g/L)：葡萄糖 10.0，蛋白胨 5.0，pH 7.0。

## 1.2 桑树内生菌的分离纯化

采用组织分离培养法<sup>[24]</sup>进行内生菌的分离：取长约 5 cm 桑枝茎段，置于 75% 酒精中完全浸没，取出后于酒精灯上点燃，待茎段表面乙醇燃尽后，在培养基上滚一圈，验证消毒是否彻底。随后用无菌刀片将样品分层剖开，切成小块分别置于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、高氏一号培养基(GA)、琼脂培养基(WA)上，于 28 °C 培养，逐日观察，待切口边缘长出细菌时，及时挑取并采用平板划线法进行纯化。

## 1.3 内生拮抗菌的筛选

将获得的内生细菌纯培养物接种于 PDB 培养基，于 28 °C 摇床 180 r/min 恒温培养 4 d，收集发酵液，10000 r/min 离心 30 min，取上清过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜制备无菌发酵滤液。以核盘菌 PZ-2 作为靶标菌株，灭菌 PDB 培养基为对照，采用抑菌圈法<sup>[22]</sup>检测发酵液抑菌活性，筛选对核盘菌 PZ-2 生长具有抑制作用的内生拮抗菌，并选取抑菌活性稳定且效果显著的拮抗菌用于后续研究。发酵液抑菌活性具体检测方法为：在新鲜 PDA 平板中央接种 PZ-2 菌饼，并在距离菌饼中心 30 mm 处用 8 mm 直径的打孔器打孔，孔内加入 200  $\mu\text{L}$  内生细菌无菌上清发酵液，25 °C 培养 1 周，测量抑菌圈直径，以此判断内生细菌发酵液抑菌活性。

## 1.4 内生拮抗菌的鉴定

**1.4.1 菌体培养特征、形态观察及生理生化特征测定**：目标菌株培养特征观察、菌落形态观察以及运动性、淀粉水解、明胶液化、氧化酶、硝酸盐还原等生理生化特性测试等实验，均参照文献[25–27]的方法进行。

**1.4.2 菌体分子生物学鉴定和系统发育分析**：提取目标菌株基因组，并以其为模板，采用引物 27 F：5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R：5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3' 进行 16S rDNA 扩增。PCR 反应条件为：95 °C 5 min；94 °C 30 s，58 °C 30 s，72 °C 60 s，30 个循环；72 °C 10 min。扩增产物送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序，将获得的基因序列拼接后在 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性比较分析，下载同源性较高的菌种序列信息，用 ClustalX 2.0 程序进行多重序列比对，利用 MEGA 6.0 软件邻接法(Neighbor-joining method)进行 1000 次步长计算，构建系统发育树<sup>[28]</sup>。

## 1.5 拮抗菌株发酵液热稳定性检测

将拮抗菌株 XP-27 接种于发酵培养基，参照方法 1.3 制备拮抗菌株无菌上清液，取等量无菌发酵上清液分别在 40、60、80、100 °C 处理 30 min，冷却至室温后，用菌丝生长速率法<sup>[29]</sup>检测其对核盘菌 PZ-2 的抑菌活性。具体方法为，将 PDA 培养基高压灭菌后冷却至 50 °C 左右，以 5% 的比例混入不同温度处理后的拮抗菌无菌发酵上清液制备检测平板，以混入未经热处理的拮抗菌无菌发酵上清液平板作阳性对照，以未加发酵滤液的 PDA 平板作为阴性对照，接入直径 0.5 cm 的核盘菌 PZ-2 菌饼后，置于 25 °C 培养箱中培养 5 d，每处理组 3 个重复。实验结束后，用十字交叉法测量病原菌菌

落直径，根据以下公式(1)计算抑菌率<sup>[30]</sup>。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照组菌落直径(cm)} - \text{测试组菌落直径(cm)}}{\text{对照组菌落直径(cm)}} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

### 1.6 拮抗菌株抑菌谱检测

参照方法“1.5”检测拮抗菌发酵液对核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) PZ-2、桑椹核地杖菌 (*Scleromitruula shiraiana*) SXSG-5 等 10 种植物病原菌的抑菌效果。根据病原菌生长速度，腐霉病菌 SWU3 在培养 2 d 时测定抑菌率，木霉 SWU11 及灰霉病菌 SWU5 在培养 3 d 时测定抑菌率，其余 7 种病原真菌在培养 7 d 时测算抑菌率。

### 1.7 拮抗菌株发酵条件优化

参照方法“1.3”的抑菌圈法检测不同碳氮源对 XP-27 菌株产生抑菌活性物质的影响。参照方法 1.5 的菌丝生长速率法检测其余发酵条件(无机盐、温度、pH、接种量以及发酵时间等)对 XP-27 菌株产生抑菌活性物质的影响，为便于抑菌效果的观察，此处检测平板中所含无菌发酵上清液的比例为 1%。最后采用抑菌圈法对优化后的培养基配方与培养条件进行验证。

**1.7.1 培养基成分优化：**(1) 碳源优化：在其他条件不变的情况下，在碳源基础培养基中分别加入 1.0% 的葡萄糖、麦芽糖、乳糖、玉米粉、淀粉和蔗糖作为碳源，以碳源基础培养基为对照；(2) 氮源优化：在其他条件不变的情况下，在氮源基础培养基中分别加入 1.0% 的 NaNO<sub>3</sub>、KNO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、牛肉膏、蛋白胨、胰蛋白胨、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和酵母浸出粉作为氮源，以氮源基础培养基为对照；(3) 无机盐优化：在其他条件不变的情况下，根据菌体对大量元素和微量元素的需求量不同，对 MgSO<sub>4</sub>、NaCl、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 CaCl<sub>2</sub> 五

种大量元素设置 0.05%、0.10% 和 0.15% 共 3 个浓度梯度，对 MnSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub> 和 FeSO<sub>4</sub> 三种微量元素设置 0.0001%、0.0005% 和 0.0010% 共 3 个浓度梯度，以无机盐基础培养基为对照。

**1.7.2 正交试验：**根据培养基成分单因素实验的结果，选择最佳有机氮源(牛肉膏)、碳源(淀粉)、无机盐(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 MgSO<sub>4</sub>) 共 4 个因素，设置 3 个水平，进行正交试验(表 1)。发酵实验设计 3 次重复，取 3 次实验的平均值作为发酵配方的实验结果。

**1.7.3 培养条件优化：**基于优化的发酵培养基，检测 XP-27 菌株在不同培养条件下获得发酵液的抑菌效果。(1) 起始 pH：设置 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0 共 8 个起始 pH 值，其他条件一致，接种后于 28 °C、180 r/min 培养 4 d，检测抑菌效果，确定最适起始 pH 值；(2) 温度：设置 20、25、28、30、37、40 °C 共 6 个温度，其他条件一致，接种后置于 180 r/min 培养箱中培养 4 d，检测抑菌效果，确定最适温度；(3) 接种量：设置 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、5.0%、7.0%、9.0% 和 10.0% 共 8 个接种量，其他培养条件一致，在 28 °C、180 r/min 培养 4 d，检测抑菌效果，确定最适接种量；(4) 发酵时间：设置 12、24、36、48、72、96、120、144 h 共 8 个发酵时间，其他培养条件一致，在 28 °C、180 r/min 条件下培养后，检测抑菌活性，确定最适发酵时间。

表 1. L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交因素与水平

Table 1. Factors and levels of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test

Levels	Beef extract/% (A)	Starch/% (B)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /% (C)	MgSO <sub>4</sub> /% (D)
1	0.5	0.5	0.05	0.05
2	1.0	1.0	0.10	0.10
3	1.5	1.5	0.15	0.15

## 2 结果和分析

### 2.1 内生拮抗菌的分离筛选

从健康桑树新伦教(桑树品种)茎中共分离出 55 株内生细菌,以核盘菌 PZ-2 作为指示菌,初筛获得 15 株具有抑菌活性的内生拮抗菌,其中 8 株内生菌抑菌活性较强,复筛确定抑菌效果显著且稳定的 XP-27 菌株(图 1)开展后续研究。

### 2.2 拮抗菌株 XP-27 的鉴定

**2.2.1 形态学鉴定:**将筛选获得的拮抗菌 XP-27 菌株接种至 PDA 培养基,培养 48 h 后,菌落呈圆形,表面及边缘粗糙,呈乳白色,蜡状(图 2-A)。

XP-27 菌株革兰氏与芽孢染色结果表明,该菌体为革兰氏阳性杆状菌株,且能产芽孢(图 2-B、C)。

**2.2.2 生理生化试验:**生理生化试验结果表明,XP-27 菌株能够水解淀粉,液化明胶,还原硝酸盐,过氧化氢酶、卵黄卵磷脂酶以及酪素水解呈阳性,能够在含有 7% NaCl 的培养基中生长,在半固体琼脂培养基中扩散生长表明其具有运动性(表 2)。综合对 XP-27 菌株的生长特性及形态特征观察,判断其为芽孢杆菌属菌株。

**2.2.3 XP-27 菌株 16S rDNA 序列测定及系统发育分析:**将 XP-27 菌株 16S rDNA 扩增产物送至生

工生物工程(上海)股份有限公司测序,得到长度为 1456 bp 的片段,提交该序列相关信息至 GenBank,获得登录号 MF375212,将该序列与 GenBank 中序列进行在线比对,结果显示其与多株 *Bacillus methylotrophicus* 菌株 16S rDNA 序列的同源性高达 99%。基于 16S rDNA 系统发育分析结果显示,XP-27 菌株与登录号为 NR116240、KC790266 及 KC790325 等甲基营养型芽孢杆菌 *Bacillus methylotrophicus* (又名 *Bacillus velezensis*<sup>[31]</sup>)的亲缘关系最近,处于系统发育树的同一分枝(图 3)。

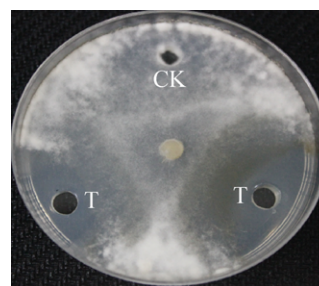


图 1. XP-27 菌株发酵液对核盘菌 PZ-2 生长抑制情况  
Figure 1. Inhibitory effect of fermentation filtrates from strain XP-27 against growth of *Sclerotinia sclerotiorum* PZ-2. CK: PDB medium; T: The fermentation supernatant of XP-27 strain. Observed the results at the second day after inoculation the target strain.

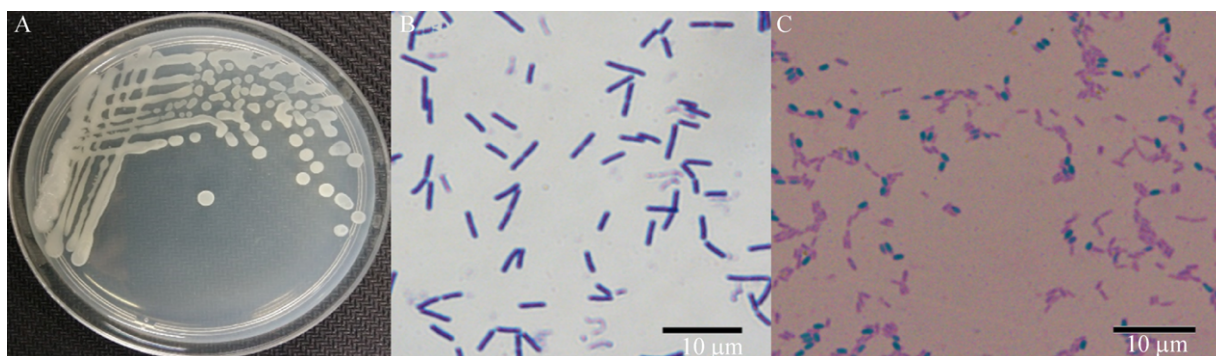


图 2. XP-27 菌株的形态学特征

Figure 2. The morphological features of XP-27 strain. A: the colony characteristic of strain XP-27 on PDA after 48 h cultured; B: Gram stain result; C: spore stain result.

表 2. XP-27 菌株生理生化实验结果

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of XP-27 strain

Test items	Results	Test items	Results
Mannose	-	Gelatine liquefaction test	+
Simon's phosphate	+	Arabinose	-
Semi-solid agar	+	Xylose	-
Gas of glucose	-	Glucose phosphate	-
Peptone hydrolysis	-	Calalase	+
Nitrate reduction	+	7% NaCl	+
Starch hydrolysis	+	Casein hydrolysis	+
Lecithinase	+	Phenylalanine deaminase	-
Triple sugar iron agar	+		

+: positive (growth or reaction); -: negative (no growth or no reaction).

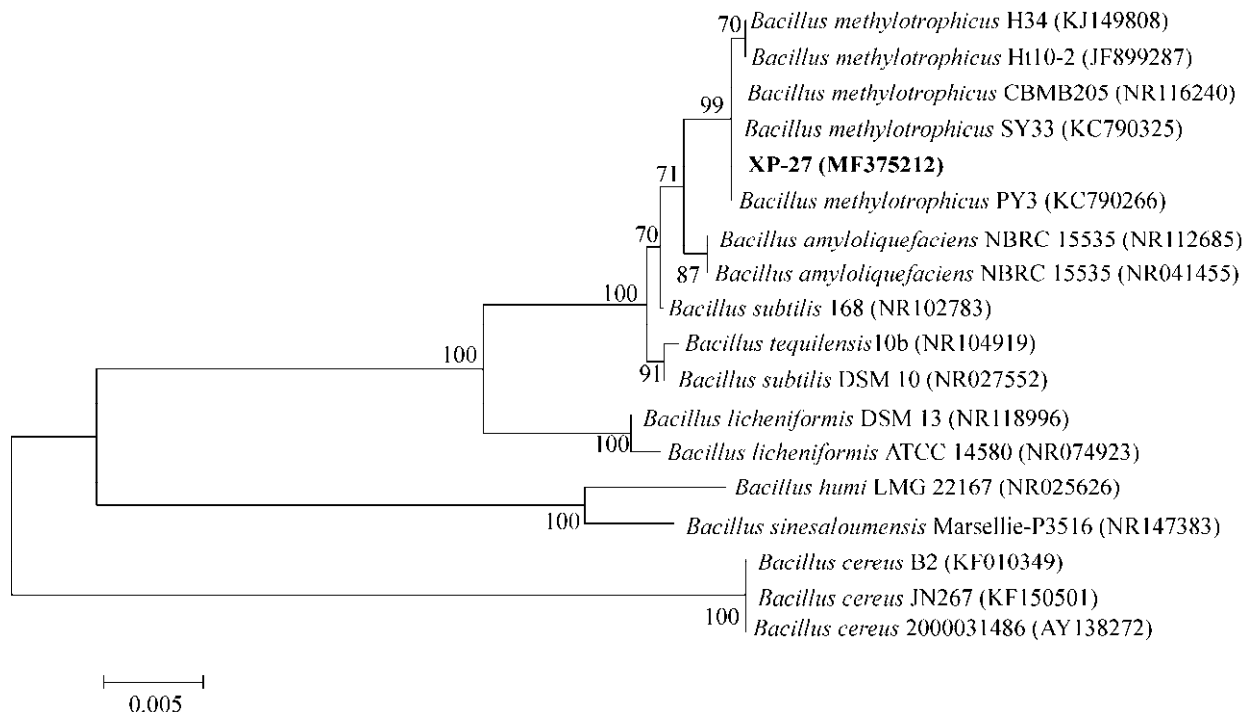


图 3. XP-27 菌株基于 16S rDNA 的系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree of XP-27 strain based on 16S rDNA sequences. Numbers at the nodes represented the bootstrap values based on neighbor-joining analyses of 1000 resampled datasets. Numbers in parentheses represented the sequences' accession number in GenBank. The scale bar indicates 0.5% sequence divergence. Target strain was labeled in bold.

结合 XP-27 菌株的形态学特征、生理生化反应特征,以及基于 16S rDNA 序列的系统发育分析结果,鉴定该菌株为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*),命名为 *B. methylotrophicus* XP-27。

### 2.3 拮抗菌株 XP-27 发酵液热稳定性检测

内生拮抗菌 XP-27 菌株发酵液经 40、60、80 °C 处理 30 min 后,其对核盘菌 PZ-2 的抑菌活性几乎没有改变(图 4-C、D、E),100 °C 处理 30 min 之后,



指示菌有少量菌丝生长(图 4-F), 热稳定性测试结果表明 XP-27 发酵液活性物质具有较强的热稳定性, 这将有利于该菌株应用于桑椹菌核病的田间防治。

### 2.4 拮抗菌株 XP-27 抑菌谱检测

抑菌谱测试结果表明, XP-27 菌株对多种病

原菌具有较强的抑制作用, 尤其对桑椹菌核病病菌桑椹核地杖菌 SXSG-5 和核盘菌 PZ-2 的抑菌效果最为显著, 抑菌率高达 98.23% 和 99.72% (表 3)。因此, XP-27 菌株有望开发成为桑椹菌核病的生防菌株。

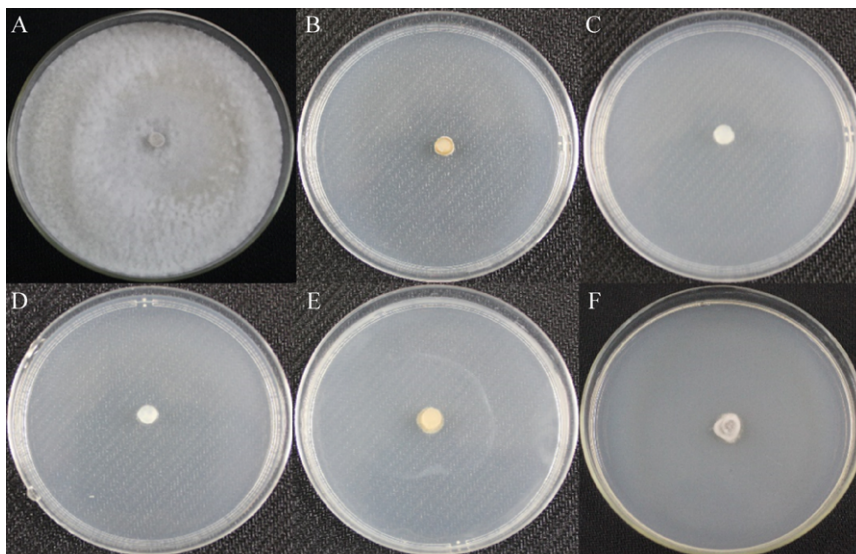


图 4. 不同温度处理 XP-27 菌株无菌发酵液对核盘菌 PZ-2 抑菌效果检测

Figure 4. Assay the inhibitory activity of XP-27 strain cell-free fermentation supernatant after being treated under different temperatures on *Sclerotinia sclerotiorum* PZ-2. A: PDA medium; B: PDA medium+XP-27 strain cell-free fermentation supernatant; C-F: PDA medium+XP-27 strain cell-free fermentation supernatant treated at 40 °C, 60 °C, 80 °C and 100 °C for 30 min respectively. Observed the results at the fifth day after inoculation the target strain.

表 3. XP-27 菌株发酵滤液对多种病原真菌的抑制作用

Table 3. The inhibition of sterile fermentation filtrate of strain XP-27 on plant pathogenic fungi

Pathogen	Inhibition rate/% ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )
<i>Pythium aphanidermatum</i> SWU3 <sup>a</sup>	23.16±1.86
<i>Trichoderma</i> sp. SWU11 <sup>b</sup>	54.04±0.66
<i>Botrytis cinerea</i> SWU5 <sup>b</sup>	77.96±0.69
<i>Rhizoctonia solani</i> SWU22	17.73±0.99
<i>Ceratocystis ulmi</i> SWU10	25.29±1.63
<i>Phytophthora nicotianae</i> SWU20	25.96±0.42
<i>Alternaria alternata</i> SWU26	17.26±3.37
<i>Scleromitrella shiraiana</i> SXSG-5	98.23±1.39
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> PZ-2	99.72±0.16
<i>Verticillium dahlia</i> SWU6	26.09±10.65

Inhibition rate were calculated as a percentage of growth inhibition as compared to control test organism in inoculated 7-day for most organisms (a: 2-day, b: 3-day). Tests were conducted in triplicate and results varied as indicated by standard deviation.

## 2.5 XP-27 菌株发酵条件优化

**2.5.1 培养基成分优化：**通过单因素试验检测不同碳源、氮源以及无机盐对拮抗菌株产抑菌活性物质的影响。结果表明，利用所选的 6 种碳源培养的 XP-27 菌株均可产生抑菌活性物质，其中以淀粉为碳源培养该菌株的发酵液抑菌活性最高，抑菌圈大小为 16.84 mm，较对照组提高了 70.34%，其次是蔗糖、乳糖、玉米粉和葡萄糖(图 5-A)，故淀

粉为最适碳源；利用所选 8 种氮源培养 XP-27 菌株均可产生抑菌活性物质，其中牛肉膏为氮源培养该菌的发酵液抑菌活性最高，抑菌圈大小可达 17.22 mm，其次是胰蛋白胨、酵母浸出粉(图 5-B)，故牛肉膏为最适氮源；在选用的 8 种无机盐(5 种大量元素和 3 种微量元素)中，浓度为 0.15% 的  $K_2HPO_4$  最有利于 XP-27 菌株产生抑菌活性物质，其抑菌率可达到 81.40% (图 5-C)。

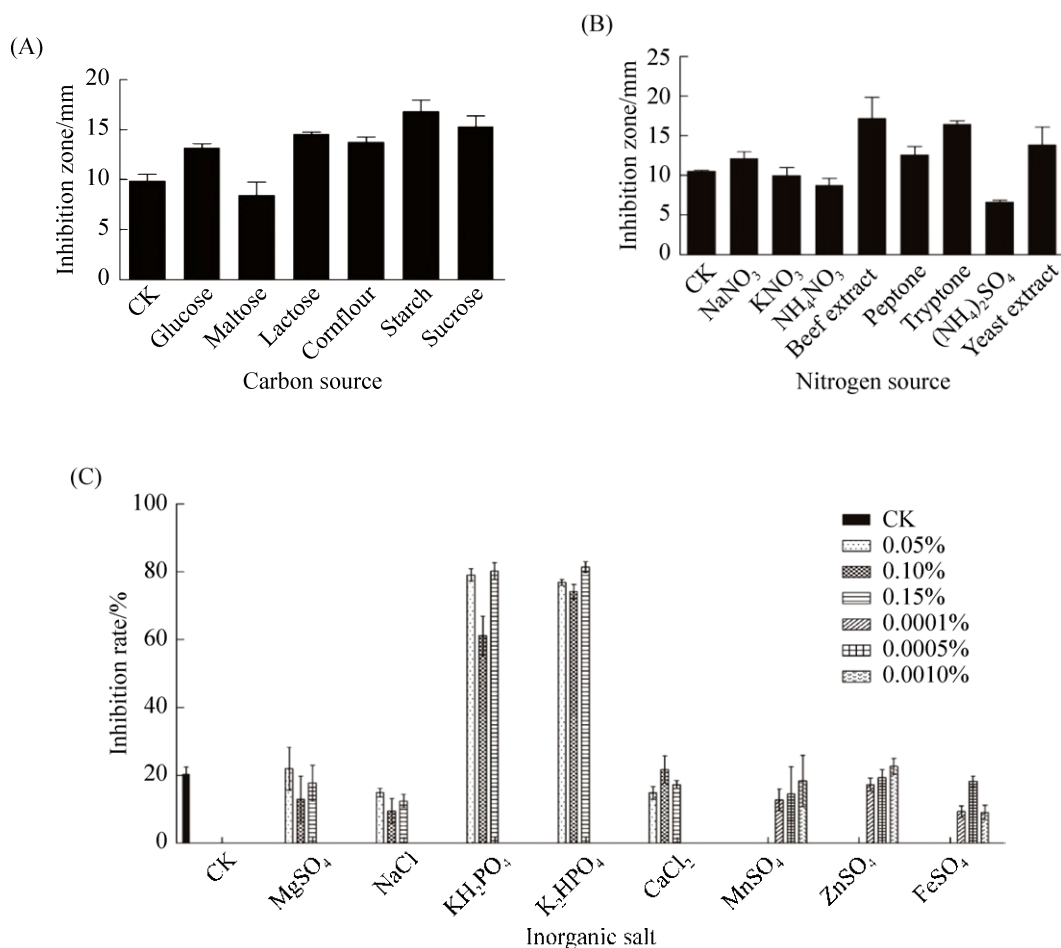


图 5. 不同碳氮源和无机盐对 *B. methylotrophicus* XP-27 发酵液抑菌活性的影响

Figure 5. Effect of different carbon sources, nitrogen sources and inorganic salts on inhibition activity of *B. methylotrophicus* XP-27 sterile fermentation supernatant. A: Different carbon sources; B: Different nitrogen sources; C: Different inorganic salts. Means represent the value of three replicates. Lines above the bars represent standard error (SE) of the mean within the treatments.



**2.5.2 正交试验：**以牛肉膏(A)、淀粉(B)、 $K_2HPO_4$ (C)和  $MgSO_4$ (D)为因素，按  $L_9(3^4)$ 正交表设计 4 因素 3 水平的正交试验，通过测定 XP-27 菌株对桑树病原菌核盘菌 PZ-2 的抑菌活性大小，确定最优发酵配方。正交试验的极差分析表明，4 个因素对核盘菌 PZ-2 的抑菌率的影响为  $A>B>D>C$ ，最佳水平组合是 A2B3C1D2 (表 4)；方差分析结果表明，因素 A 对 XP-27 发酵液抑菌活性影响显著，因此确定培养基的最佳配方为：牛肉膏 1.00%，淀粉 1.50%， $K_2HPO_4$  0.05%， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.10%。

**2.5.3 培养条件的优化：**在确定培养基成分优化结果的基础上，对该拮抗菌株发酵条件进行单因素优化试验。结果表明，不同培养条件对该菌株产生发酵液的抑菌活性影响较大，如图 6 所示。pH 过高或过低，均会显著降低发酵液的抑菌活性，初始 pH 值为 8.0 时抑菌活性最强(图 6-A)；与其他培养

温度相比，菌株在 30 °C 培养，发酵液抑菌活性最强，抑菌率可达 43.51% (图 6-B)；当接种量控制在 7.0%时，发酵液活性达到最大值 53.02% (图 6-C)；同时，菌株发酵时间亦对发酵液抑菌活性影响较大，随着培养时间延长发酵液抑菌活性逐渐增加，待到菌株培养 120 h 时其抑菌活性最强，可达 65.14%，随后培养时间过长抑菌活性呈现下降趋势(图 6-D)。综上所述，拮抗菌株 XP-27 发酵培养基的最适初始 pH 为 8.0，最适培养温度为 30 °C，最适初始接种量为 7.0%，最适培养时间为 120 h。

利用优化后的培养基配方和发酵条件培养 XP-27 菌株，进行优化结果的验证。结果表明，优化后 XP-27 菌株等量发酵上清液的抑菌圈 ( $16.33 \pm 1.86$ ) mm 显著大于 PDB 培养基发酵上清液的抑菌圈 ( $9.17 \pm 1.72$ ) mm，抑菌效果提高了 78.18%。这表明优化后的发酵培养基组成与发酵条件有利于抑菌活性物质的生成。

表 4. *B. methylotrophicus* XP-27 发酵培养基正交设计  $L_9(3^4)$  及试验结果

Table 4. Optimization of culture medium design  $L_9(3^4)$  for *B. methylotrophicus* XP-27 fermentation

Number	A	B	C	D	Antibacterial rate/%
Test 1	1	1	1	1	2.47
Test 2	1	2	2	2	11.73
Test 3	1	3	3	3	46.79
Test 4	2	1	2	3	12.96
Test 5	2	2	3	1	19.51
Test 6	2	3	1	2	77.16
Test 7	3	1	3	2	66.67
Test 8	3	2	1	3	67.28
Test 9	3	3	2	1	71.36
$X_1$	20.330	27.367	48.970	31.113	
$X_2$	36.543	32.840	32.017	51.853	
$X_3$	68.437	65.103	44.323	42.343	
R	48.107	37.736	16.953	20.740	

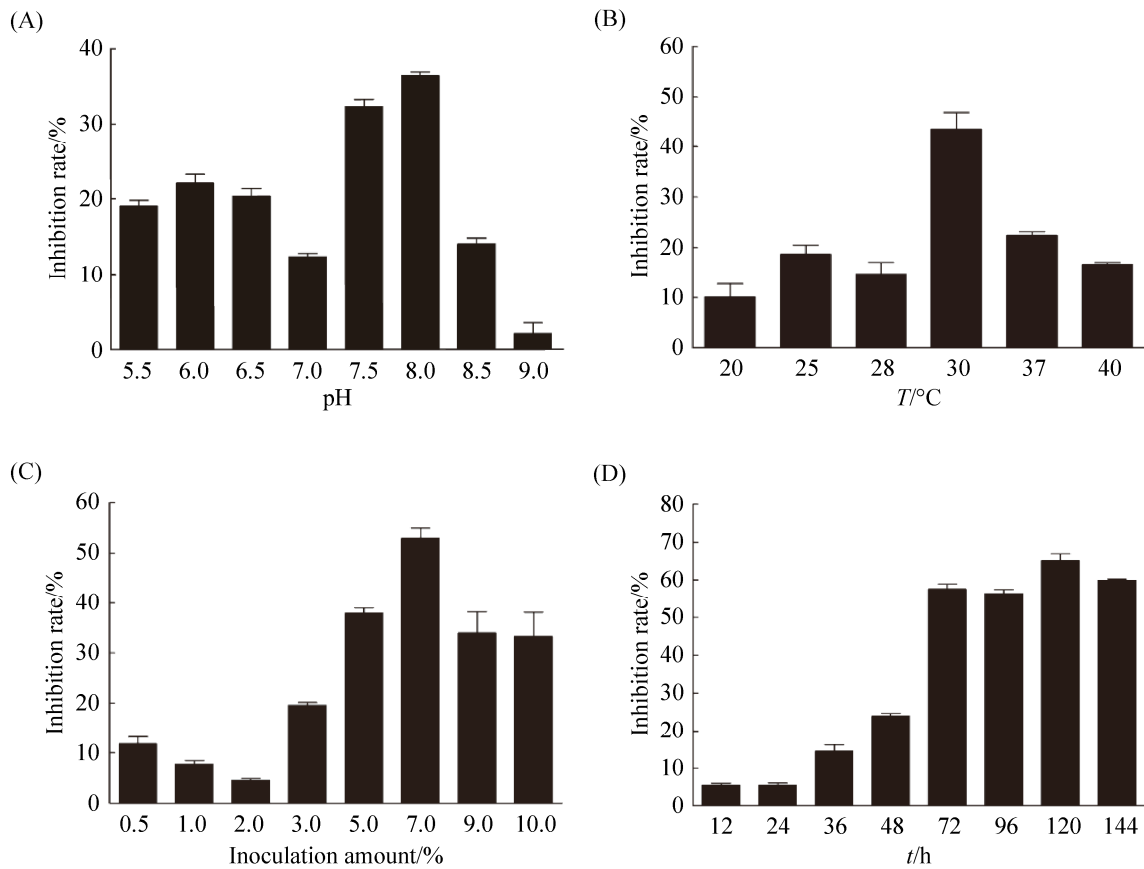


图 6. 不同培养条件对 *B. methylotrophicus* XP-27 发酵液抑菌活性的影响

Figure 6. Effect of different culture conditions on the inhibition activity of *B. methylotrophicus* XP-27 cell-free fermentation supernatant. A: different pH; B: different temperature; C: different inoculation amount; D: different time. Means represent the value of three replicates. Lines above the bars represent standard error (SE) of the mean within the treatments.

### 3 讨论

本研究从桑树品种新伦敦健康植株的茎中，选获 1 株内生拮抗细菌甲基营养型芽孢杆菌 *Bacillus methylotrophicus* XP-27 菌株，其 4 d 无菌发酵液对肥大性桑椹菌核病菌 *S. sclerotiorum* PZ-2 的抑菌率高达 99.72%。*B. methylotrophicus* XP-27 菌株对缩小性桑椹菌核病菌桑椹核地杖菌 *S. shiraiana* SXSG-5 及灰霉菌 *B. cinerea* SWU5 等植物病原菌亦表现出较强的抑菌活性，且其抑菌

活性发酵液具有极强的热稳定性，经 100 °C 处理 30 min 后，抑菌活性无显著改变。

芽孢杆菌是一类好氧或兼性厌氧、能产生抗逆性内生芽孢的杆状细菌，广泛分布于土壤、水体等多种自然环境，亦是常见的植物内生菌。玉米<sup>[32]</sup>、水稻<sup>[33]</sup>等种植物组织中均有芽孢杆菌的分布。本小组前期研究亦从健康桑树中分离获得大量芽孢杆菌，且其为桑树内生细菌的优势种群<sup>[24]</sup>。芽孢杆菌可通过生成抑菌活性物质<sup>[34]</sup>、竞争性排阻<sup>[35]</sup>、诱导宿主植物产生抗病性<sup>[32]</sup>等

多种机理抑制植物病原菌生长,提高宿主植物的抗病抗逆能力。甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)作为芽孢杆菌属的重要种群,广泛分布于各类植物,并发挥着潜在生防作用。武利勤等从石斛中分离出的甲基营养型芽孢杆菌 RA 对石斛黑斑病等 8 种植物病原菌有较强的抑菌效果<sup>[36]</sup>;姜云等从人参中分离出的甲基营养型芽孢杆菌 NJ13 可用于人参锈腐病的防治<sup>[37]</sup>;蔡丽等从茶树中分离出的甲基营养型芽孢杆菌 FH01 对核桃叶枯叶病等多种植物病原菌有很强的抑菌作用<sup>[38]</sup>。本文研究从健康桑树中分离获得的甲基营养型芽孢杆菌 XP-27 菌株,亦展现出对桑椹菌核病的生物防治潜能。

抑菌活性物质的生成是生防菌株发挥防病功能的重要机制之一,而活性物质的生成效率不仅与菌株自身遗传特性相关,亦受菌株培养条件影响。为提高 XP-27 菌株抑菌活性物质的产量,本研究对其发酵培养基成分和培养条件进行优化,优化后的培养基成分和培养条件能够显著提高 XP-27 菌株等量发酵液的抑菌活性。后续研究将在本文研究基础上,分离纯化 *B. methylotrophicus* XP-27 菌株抑菌活性发酵液的主要抑菌活性成分,深入探究该菌株对菌核病菌具有抑制作用的相关机理,并评估其用于桑椹菌核病生物防治的安全性及田间防病效果,为在生产中利用该菌株进行桑椹菌核病的生物防治奠定坚实的研究基础。

## 参 考 文 献

- [1] Liang GQ, Wu JJ, Shen W, Lu CX, He J. Nutritional analysis and evaluation of mulberry fresh fruit. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2011, (16): 320–321, 325. (in Chinese)  
梁贵秋, 吴婧婧, 沈蔚, 陆春霞, 何骥. 桑椹鲜果的营养分析与评价. 现代农业科技, 2011, (16): 320–321, 325.
- [2] He L, Hu JH, Xu L, Yao TS, Ran C, Li HJ, Liu HQ, Lei HD. Identification and biological characteristics of pathogen of mulberry disease. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2010, 23(3): 760–763. (in Chinese)  
贺磊, 胡军华, 徐立, 姚廷山, 冉春, 李鸿筠, 刘浩强, 雷慧德. 一株桑椹致病菌的鉴定及其生物学特性研究. 西南农业学报, 2010, 23(3): 760–763.
- [3] Kuai YZ, Wu FA. A review on pathogens of mulberry fruit sclerotiniosis and its control technology. *Science of Sericulture*, 2012, 38(6): 1099–1104. (in Chinese)  
蒯元璋, 吴福安. 桑椹菌核病病原及病害防治技术综述. 蚕业科学, 2012, 38(6): 1099–1104.
- [4] Lü RH, Zhao AC, Yu J, Wang CH, Liu CY, Cai YX, Yu MD. Biological and epidemiological characteristics of the pathogen of hypertrophy sorosis scleroteniosis, *Ciboria shiraiana*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(3): 388–398. (in Chinese)  
吕蕊花, 赵爱春, 余建, 王传宏, 刘长英, 蔡雨翔, 余茂德. 桑椹肥大性菌核病病原菌生物学特性及流行性. 微生物学报, 2017, 57(3): 388–398.
- [5] Hu JH, Cai YX, Zhou SJ, Zhang JC, Zhang HL, Chen YB, Li PM, Ying GM. Diversity of mulberry sclerotinose pathogen and ITS analysis. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition)*, 2011, 24(3): 20–23. (in Chinese)  
胡君欢, 蔡岳兴, 周书军, 张建成, 张慧丽, 陈银宝, 李培民, 应国铭. 宁波桑果基地菌核病菌的多样性与 ITS 初步分析. 宁波大学学报(理工版), 2011, 24(3): 20–23.
- [6] Hong SK, Kim WG, Sung GB, Nam SH. Identification and distribution of two fungal species causing sclerotial disease on mulberry fruits in Korea. *Mycobiology*, 2007, 35(2): 87–90.
- [7] Lü RH, Zhao AC, Li J, Wang XL, Yu YS, Lu C, Yu MD. Biological study of hypertrophy sorosis scleroteniosis and its molecular characterization based on LSU rRNA. *African Journal of Microbiology Research*, 2013, 7(26): 3405–3411.
- [8] Sultana R, Ju HJ, Chae JC, Kim K, Lee KJ. Identification of *Ciboria carunculoides* RS103V, a fungus causing popcorn disease on mulberry fruits in Korea. *Research in Plant Disease*, 2013, 19(4): 308–312.
- [9] Ren JQ, Zeng XL, Chen L, Qiu SC, Yang Y, Zhang MH, Zheng ZY. Advances in integrated control of mulberry fruit sclerotiniosis. *Science of Sericulture*, 2017, 43(4): 699–703. (in Chinese)  
任杰群, 曾秀丽, 陈力, 邱诗春, 杨义, 张明海, 郑章云.

- 桑椹菌核病综合防治技术研究新进展. *蚕业科学*, 2017, 43(4): 699–703.
- [10] Abudu Rosuli-Kurban, Shi ZM, Mamat Imin-Ayoufu, Shi CY, Lv HR, Liu YZ. The impact of plastic film mulching on the white mulberry fruit disease and fruit quality. *Hubei Agricultural Sciences*, 2016, 55(22): 5846–5848, 5857. (in Chinese)  
阿布都肉苏力·库尔班, 师志敏, 麦麦提依明·阿尤甫, 石彩云, 吕化荣, 刘永忠. 果桑地表覆膜对桑白果病发病及果实品质的影响. *湖北农业科学*, 2016, 55(22): 5846–5848, 5857.
- [11] Ye MQ, Kuang ZS, Zhao XJ, Yang Q, Li QR, Xiao Y, Wang ZJ, Dai FW, Luo GQ. Screening of fungicide to control *Ciboria carunculoides* under laboratory conditions. *Pakistan Journal of Zoology*, 2014, 46(1): 53–59.
- [12] Ju WT, Kim HB, Sung GB, Park KY, Kim YS. Mulberry popcorn disease occurrence in Korea region and development of integrative control method. *International Journal of Industrial Entomology*, 2016, 33(1): 36–40.
- [13] Sultana R, Kim K. *Bacillus thuringiensis* C25 suppresses popcorn disease caused by *Ciboria shiraiana* in mulberry (*Morus australis* L.). *Biocontrol Science and Technology*, 2016, 26(2): 145–162.
- [14] Ye MQ, Yue HL, Luo GQ, Yang Q, Kuang ZS. Effect of a fungal pathogen, *Trichoderma hamatum*, on growth and germination of *Ciboria carunculoides* under laboratory conditions. *Pakistan Journal of Zoology*, 2014, 46(5): 1377–1384.
- [15] Bacon CW, White JF. Microbial endophytes. New York: Marcel Dekker, 2000.
- [16] Xie J, Strobel GA, Feng T, Ren HS, Mends MT, Zhou ZY, Geary B. An endophytic *Coniochaeta velutina* producing broad spectrum antimycotics. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(6): 390–397.
- [17] Amaran N, Jayakumar V, Kumar K, Thajuddin N. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annuum*) seedling growth. *Annals of Microbiology*, 2012, 62(2): 805–810.
- [18] Santhanam R, Baldwin IT, Groten K. In wild tobacco, *Nicotiana attenuata*, variation among bacterial communities of isogenic plants is mainly shaped by the local soil microbiota independently of the plants' capacity to produce jasmonic acid. *Communicative & Integrative Biology*, 2015, 8(2): e1017160.
- [19] Santhanam R, Luu VT, Weinhold A, Goldberg J, Oh Y, Baldwin IT. Native root-associated bacteria rescue a plant from a sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(36): E5013–E5020.
- [20] Mu ZM, Lu GB, Ji XL, Gai YP, Wang YW, Gao HJ, Zha CY. Identification and colonization of an antagonistic endophytic *Burkholderia cepacia* Lu10-1 isolated from mulberry. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(5): 623–630. (in Chinese)  
牟志美, 路国兵, 冀宪领, 盖英萍, 王彦文, 高绘菊, 查传勇. 桑树内生拮抗细菌 *Burkholderia cepacia* Lu10-1 的分离鉴定及其内生定殖. *微生物学报*, 2008, 48(5): 623–630.
- [21] Tan GX, Wu QY, Jia JQ, Gui ZZ, Du JJ, Chen L. Isolation, identification and antibacterial activity of an endophytic bacterial strain in mulberry. *Science of Sericulture*, 2012, 38(3): 412–417. (in Chinese)  
谭广秀, 吴琼英, 贾俊强, 桂仲争, 杜金娟, 陈炼. 一株桑树内生拮抗细菌的分离鉴定与抑菌活性. *蚕业科学*, 2012, 38(3): 412–417.
- [22] Xie J, Xia T, Lin LP, Zuo WD, Zhou ZY. Isolation and identification of an antagonistic endophytic bacterial strain from mulberry. *Science of Sericulture*, 2009, 35(1): 121–125. (in Chinese)  
谢洁, 夏天, 林立鹏, 左伟东, 周泽扬. 一株桑树内生拮抗细菌的分离鉴定. *蚕业科学*, 2009, 35(1): 121–125.
- [23] Xie J, Ren HS, Tang CM, Zuo WD, Chen J, Huang CS, Wang ZJ, Dai FW, Zhou ZY. Identification of a mulberry endophytic bacterium and its antagonistic activity on *Scleromitula shiraiana*. *Science of Sericulture*, 2015, 41(5): 815–824. (in Chinese)  
谢洁, 任慧爽, 唐翠明, 左伟东, 陈洁, 黄传书, 王振江, 戴凡炜, 周泽扬. 一株桑树内生细菌的鉴定和对桑椹核地杖菌的拮抗作用. *蚕业科学*, 2015, 41(5): 815–824.
- [24] Ren HS, Xu WF, Wang AY, Zuo WD, Xie J. Research on biodiversity of endophytic bacteria and the antagonistic endophytes in mulberry. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2017, 39(1): 36–45. (in Chinese)  
任慧爽, 徐伟芳, 王爱印, 左伟东, 谢洁. 桑树内生细菌多样性及内生拮抗活性菌群的研究. *西南大学学报(自然科学版)*, 2017, 39(1): 36–45.

- [25] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [26] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [27] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验. 第 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [28] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697–703.
- [29] 方中达. 植病研究方法. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [30] Sun GZ, Yao T, Feng CJ, Chen L, Li JH, Wang LD. Identification and biocontrol potential of antagonistic bacteria strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and their growth-promoting effects on *Brassica napus*. *Biological Control*, 2017, 104: 35–43.
- [31] Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, Rooney AP. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(3): 1212–1217.
- [32] Gond SK, Bergen MS, Torres MS, White Jr JF. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological Research*, 2015, 172: 79–87.
- [33] Shrestha BK, Karki HS, Groth DE, Jungkhun N, Ham JH. Biological control activities of rice-associated *Bacillus* sp. strains against sheath blight and bacterial panicle blight of rice. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146764.
- [34] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(4): 845–857.
- [35] Pérez-García A, Romero D, de Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(2): 187–193.
- [36] Wu LQ, Gu HK, Wang Q, Shang HZ, Liu GJ, Bao F. Antagonistic efficacy and growth-promoting effect of *Bacillus methylotrophicus* isolated from *Dendrobium huoshanense*. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(8): 200–206. (in Chinese)  
武利勤, 顾海科, 王青, 尚宏忠, 刘桂君, 包放. 石斛内生甲基营养芽胞杆菌的拮抗和促生作用研究. *生物技术通报*, 2016, 32(8): 200–206.
- [37] Jiang Y, Yin W, Chen CQ, Tian L, Xu P. Identification and optimized fermentation condition of an endophyte antagonistic bacteria NJ13. *Agrochemicals*, 2013, 52(2): 97–101. (in Chinese)  
姜云, 尹望, 陈长卿, 田磊, 许朋. 人参内生拮抗细菌 NJ13 的鉴定及发酵条件. *农药*, 2013, 52(2): 97–101.
- [38] Cai L, Ou YQ, Hou XZ, Wang JL, Fu L. Isolation and identification of endophytic bacteria from Fenghuang Dancong tea. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(10): 246–250. (in Chinese)  
蔡丽, 欧燕清, 侯小桢, 王金良, 傅力. 凤凰单丛茶内生拮抗细菌的筛选与鉴定. *食品工业科技*, 2016, 37(10): 246–250.

# Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic endophytic bacterium from mulberry

Xiang Fang<sup>1</sup>, Weifang Xu<sup>1</sup>, Na Niu<sup>2</sup>, Ting Ou<sup>1</sup>, Fei Wang<sup>1</sup>, Weidong Zuo<sup>1</sup>, Jie Xie<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

<sup>2</sup> Food Inspection and Quarantine Technical Center of Shenzhen Entry and Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

**Abstract:** [Objective] Application of antagonistic endophyte is a potential strategy for biological control of plant diseases. In this study, the antagonistic endophytic bacteria were isolated and screened from healthy mulberry, to provide candidate strains for the biological control of mulberry fruit sclerotiniase. [Methods] Tissue isolation method was used to isolate the endophytic bacteria from healthy mulberry tissues. The endophytic bacterium with strong and stable antagonistic activity on the pathogens of mulberry fruit sclerotiniase was screened by inhibition zone method. The antagonistic bacterium was identified through morphological features, cultural, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA phylogenetic analysis. Antimicrobial spectrum and thermal stability of cell-free fermentation supernatant were assayed by mycelial growth rate. The fermentation conditions and medium composition were optimized through single factor and orthogonal experiment. [Results] In total 55 endophytic bacteria were isolated from healthy mulberry. Among them, strain XP-27 was found to have strong and stable antagonistic activity against *Sclerotinia sclerotiorum* PZ-2 (the pathogen of mulberry fruit sclerotiniase). Morphological features, cultural, physiological and biochemical characteristics indicated that XP-27 belongs to genus of *Bacillus*. Based on 16S rDNA phylogenetic analysis, XP-27 was close to the *Bacillus methylotrophicus* and within the same clade with several strains of *Bacillus methylotrophicus*. Therefore, strain XP-27 was identified as *Bacillus methylotrophicus*, and named to be *B. methylotrophicus* XP-27. Antimicrobial spectrum assayed results showed that strain XP-27 had variously antagonistic activity on 10 plant pathogens and had excellent heat stability. The results of fermentation optimization showed that the optimal medium was composed of 1.00% beef extract, 1.50% starch, 0.05% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.10% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and the optimal culture conditions were inoculation size of 7% for 120 h at 30 °C with initial pH 8.0. [Conclusion] The above results indicated that mulberry endophytic bacterium *B. methylotrophicus* XP-27 has strong antagonistic activity on *S. sclerotiorum* PZ-2, being a candidate strain for developing the biological control agent against mulberry fruit sclerotiniase.

**Keywords:** mulberry fruit sclerotiniase, mulberry endophyte, antagonistic bacterium, fermentation optimization

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31601678) and by the Undergraduate Science and Technology Innovation Fund of Southwest University (20163107002)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68251701; Fax: +86-23-68250191; E-mail: healthjie@163.com

Received: 19 January 2018; Revised: 30 May 2018; Published online: 17 July 2018