

菜豆花内生假单胞杆菌的分离与鉴定

董梦洁, 左丹婷, 胡玉, 喻婉清, 韩雪* (江汉大学生命科学学院, 湖北武汉 430056)

摘要 [目的]分离并鉴定菜豆花中的1株内生优势细菌(WBF1)。**[方法]**从菜豆花中分离出1株内生优势细菌WBF1,通过革兰氏染色、16S rDNA及生理生化实验对其进行鉴定。**[结果]**革兰氏染色结果显示该菌为革兰氏阴性杆菌,16S rDNA序列分析显示其为变形杆菌科不动杆菌属假单胞杆菌;其生理生化特征符合假单胞杆菌特性;该菌定植于菜豆花中,生长温度为20~43℃。**[结论]**该菌是菜豆基因工程生防菌宿主菌的良好候选菌株。

关键词 菜豆;内生菌;染色;序列分析

中图分类号 S182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)26-0020-01

The Isolation of an Endogenous *Pseudomonas* sp. from the Bean and Identification

DONG Meng-jie, ZUO Dan-ting, HU Yu, HAN Xue* et al (School of Life Science, Jiangnan University, Wuhan, Hubei 430056)

Abstract [Objective] To isolate and identify an endogenous dominant (WBF1) from the bean flower. [Method] An endogenous dominant (WBF1) isolated from the bean flower was identified by gram staining, 16S rDNA and physiological and biochemical test. [Result] The gram staining result showed it was gram negative bacillus, and the 16S rDNA sequence analysis showed it belonged to *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter*, *Proteus*. The physiological and biochemical characters corresponded with that of *Pseudomonas* sp. The bacterium grew in bean flower, and growth temperature was between 20 and 43℃. [Conclusion] The bacterium was an ideal candidate to be the engineered biocontrol host for the bean.

Key words Bean; Endogenous bacteria; Staining; Sequence analysis

菜豆,又称四季豆、芸豆,其嫩荚是国人喜爱的蔬菜品种。菜豆在美洲已有几千年的栽培史,是当地印第安人的主要蔬菜和粮食作物,大概在16世纪末传入中国,并逐渐形成了一些有中国特色的栽培种和品种^[1]。菜豆开花期至收获期常见的病害有炭疽和锈病,虫害有蚜虫和豆螟,目前对于这些病虫害没有有效的防治方法,传统农药仍然是防治菜豆花期病虫害的主要手段。”治花不治荚”是所有豆科植物预防病虫害的原则,菜豆防治的重点也在于花期的虫害控制。

植物内生菌是指可以定殖于健康植物组织中,而对植物特征及功能均无影响的微生物。内生菌与植物在长期“协同进化”过程中形成了“互利互惠”的关系,内生菌从宿主植物中获得稳定的养分和生长环境^[2-3],不易受外界条件影响^[4-5]。同时,内生菌的次级代谢产物常常帮助宿主抵御虫害及外来微生物的侵害^[6-7]。因此,内生菌是基因工程生防菌非常理想的宿主菌,也是近年来农业微生物研究的新热点。但菜豆中内生菌的研究报道在国内外仍处于空白。鉴于此,笔者从菜豆花中分离出1株内生假单胞杆菌(WBF1),并对该菌进行了鉴定,旨在为利用基因工程生防菌控制菜豆花期病虫害提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 从菜豆花中分离出的1株内生优势细菌WBF1。

1.2 方法

1.2.1 内生菌的分离。菜豆花表面清浄后,采用0.1% HgCl₂、75%乙醇消毒处理,然后无菌研磨,离心,取上清涂布NA培养基,于25℃恒温培养箱中倒置培养48 h,平板得到的单菌落划线纯化并保种。

1.2.2 形态鉴定。菌株活化到对数生长期后,进行革兰氏

染色,油镜观察。

1.2.3 细菌16S rDNA扩增。提取细菌基因组,采用16S rDNA通用引物,引物序列为1492R, 5'-ACGGCTACCTTGT-TACGACTT -3' 和 27F, 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'。PCR反应参数为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,58℃ 45 s,72℃ 45 s,共30个循环;最后72℃ 15 min。

1.2.4 序列分析。应用Blastn程序在核酸序列数据库GenBank中搜索与测序结果相似的序列,并应用软件Mega 5.0进行分析,得到该菌种属情况。

1.2.5 生长温度范围考察。菌落涂布LB固体平板,置于不同温度培养箱中培养,观察并记录菌落生长情况。

1.2.6 生理生化实验。菌落过夜活化,对数生长期的菌体进行糖发酵实验、H₂S产生实验、V.P实验、吲哚实验、柠檬酸盐利用实验、淀粉水解实验和油脂水解实验。

2 结果与分析

2.1 革兰氏染色 分离到的内生菌菌体在油镜下为革兰氏阴性短杆状菌(图1)。



图1 革兰氏染色结果

Fig.1 The result of gram staining

2.2 16S rDNA测序结果 Mega软件分析结果显示,分离的内生菌16S rDNA序列与不动杆菌属中的变形杆菌纲假单胞菌目菌的序列相似度达99%,因此,该内生菌属于假单胞杆菌目,变形杆菌纲,不动杆菌属。

基金项目 湖北省教育厅指导性项目(B2014080);湖北省蔬菜豆类工程技术中心开放基金项目(201412)。

作者简介 董梦洁(1995-),女,湖北武汉人,本科生,专业:生物技术。
*通讯作者,副教授,博士,从事微生物学研究。

收稿日期 2016-08-05

(下转第44页)

感,提取温度的升高,加速橙皮若查尔酮的氧化,会降低粗产品的收率,因此提取温度确定为 30 ℃。

2.3 正交试验 正交试验及极差分析结果如表 2 所示,可知 4 个因素对橙皮苷提取得率的影响大小依次为 A、B、D、C,即提取时间、碱用量、提取温度、料液比,其中 A、B 为主要影响因素,可以选出最佳水平为 A₁B₃C₂D₂,即提取时间 0.5 h,碱用量 0.08 g,料液比为 1:30 g/mL,提取温度 30 ℃。

表 2 正交试验结果
Table 2 Orthogonal experiment results

试验号 No.	因素 Factor				峰面积 Peak area
	A//h	B//g	C//g/mL	D//℃	
1	0.5	0.04	1:20	25	31 890
2	0.5	0.06	1:30	30	29 923
3	0.5	0.08	1:40	40	38 869
4	1.0	0.04	1:30	40	23 964
5	1.0	0.06	1:40	25	24 798
6	1.0	0.08	1:20	30	22 781
7	2.0	0.04	1:40	30	23 186
8	2.0	0.06	1:20	40	31 054
9	2.0	0.08	1:30	25	37 886
K ₁	100 682	79 040	85 725	94 574	
K ₂	71 543	85 775	91 773	95 890	
K ₃	92 126	99 536	86 853	86 853	
R	29 139	20 496	6 048	9 037	

2.4 验证试验 在正交试验得出的优化工艺条件下进行了 3 次重复试验验证,最佳提取条件下橙皮苷的峰面积为 38 996,RSD 值为 2.3%。因此可得,优选的条件稳定可行,重复性好,该最佳工艺条件合理。经过计算得出,粗产品的收率为 4.5%。

3 结论与讨论

该试验通过对碱的种类、碱的添加量、料液比、提取时间

(上接第 20 页)

2.3 生理生化实验结果 分离得到的内生假单胞菌,其糖发酵、V.P、柠檬酸和油脂分解实验结果为阳性,淀粉水解、H₂S 产生、吡啶实验结果为阴性。

2.4 菌落生长温度范围 菌体在温度 20~43 ℃ 生长情况良好。

3 结论与讨论

该研究分离得到 1 株菜豆花的内生假单胞杆菌,该菌可以在菜豆花中定殖,在各期花中属于优势菌株,但在菜豆其他部位未分离到。该内生菌的生长温度为 20~43 ℃,与菜豆开花结荚的温度吻合。16S rDNA 序列显示,该内生菌为假单胞菌目,变形杆菌纲,不动杆菌属。该菌生理生化特征符合假单胞杆菌的特性。研究报道,假单胞菌可以通过产生抗生物物质使植物抵御病害,并且其次级代谢产物可促进植物吸收和生长^[8];同时假单胞菌具有帮助植物抗磷、耐镉等对抗重金属的特性^[9],是植物益生菌及抗虫害菌的理想菌株。因此,通过基因工程的方法转入杀虫的基因,并利用该菌可

及提取温度等因素的研究,确定了影响柑橘皮中橙皮苷提取的因素。研究确定了柑橘皮中橙皮苷提取的最佳工艺条件为:30 ℃下,1 g 的橙皮粉中加入 30 mL 蒸馏水,0.08 g Ca(OH)₂,搅拌浸提 0.5 h。与热水提取法、醇溶剂提取法、双水相提取法等方法相比,碱浸酸析法具有试剂简单、提取率高、成本低等优点,可作为工业化生产提取柑橘皮中橙皮苷的首选工艺。

参考文献

[1] 刘明,常庆,杨鹏,等. 橙皮苷提取工艺的研究进展[J]. 杭州化工,2011(4):11-13.
[2] MARDER M, VIOLA H, WASOWSKI C, et al. 6-Methylapigenin and hesperidin: New valeriana flavonoids with activity on the CNS[J]. Pharmacology, biochemistry and behavior, 2003, 75: 537-545.
[3] GROLMANN K, MANTHEY J A, CAMERON R. Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures[J]. Carbohydrate research, 2000, 328: 141-146.
[4] 刘学仁,张莹,林志群. 橙皮苷和橙皮素生物活性的研究进展[J]. 中国新药杂志,2011,20(11):329-333.
[5] 李玉山. 橙皮苷研究新进展[J]. 科技导报,2009,27(22):108-120.
[6] 史德芳,高虹,程薇,等. 橙皮苷生理活性功能及其提取工艺研究进展[J]. 安徽农业科学,2008,36(10):3936-3938.
[7] 朱思明,于淑娟,杨连生. 功能性橙皮苷的提取与化学改性研究进展[J]. 中国食品添加剂,2005(4):1-4.
[8] 贾亚伟,丁玉,朱红菊. 橙皮苷提取工艺研究进展[J]. 中国科技论文在线,2011,6(3):211-214.
[9] 曲学燕,杜欢欢,蒋景龙,等. 汉中主要推广种植柑橘综合品质的分析评价[J]. 湖北农业科学,2015,54(17):4284-4287.
[10] 田勇. 我国柑桔分布情况简介[J]. 保鲜与加工,2002,2(2):32.
[11] 吕贻胜. HPLC 法测定陈皮中橙皮苷含量[J]. 安徽医药,2007,11(9):796-797.
[12] 常庆,刘明,杨鹏,等. 正交优化提取陈皮中橙皮苷的工艺研究[J]. 化工技术与开发,2011,40(11):33-36.
[13] 朱玉昌,周大寨,王成. 甜橙皮中橙皮苷提取工艺[J]. 食品科学,2010,31(22):264-267.
[14] 王灵果. 柑桔果皮中橙皮苷提取与精制工艺研究[D]. 开封:河南科技大学,2013.
[15] 王建安,江海,陈文强,等. 柑桔组织中橙皮苷的分析[J]. 湖北农业科学,2013,52(7):1659-1662.

以在菜豆花中特异性地定殖和繁殖,其生长繁殖对植株生长无不良影响的特点,使其有望成为菜豆基因工程生防菌宿菌株的理想候选菌株。

参考文献

[1] 张箭. 菜豆:四季豆发展传播史研究[J]. 农业考古,2014(4):218-229.
[2] BABALOLA O O. Beneficial bacteria of agricultural importance[J]. Biotechnol Lett, 2010, 32(11):1559-1570.
[3] SOLTER L F, MADDOX J V, VOSSBRINCK C R. Physiological host specificity: A model using the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) and microsporidia of row crop and other stalk-boring hosts[J]. J Invertebr Pathol, 2005, 90(2):127-130.
[4] 杨威,刘苏冈,郭坚华. 细菌定殖能力与其生物防治功能相关性研究进展[J]. 中国生物防治,2010,26(S1):90-94.
[5] 徐玲玲,单庆红,郭斌. 植物内生菌研究进展及应用展望[J]. 安徽农业科学,2013,41(13):5641-5643,5709.
[6] 刘峰,蒋宇扬,刘世英,等. 植物内生菌抗虫工程研究进展[J]. 生物技术通讯,2004,15(4):417-419.
[7] 陈泽斌,靳松,张永福,等. 植物内生菌生物防治研究进展及存在的问题[J]. 昆明学院学报,2014,36(3):40-42.
[8] 汪来发,邱德勋. 假单胞杆菌防治植物病害的研究进展[J]. 陕西林业科技,1997,68(4):60-61,68.
[9] 陈雪姣,郭雪玲,南昊,等. 一株耐镉假单胞杆菌的分离鉴定及其对镉的吸附研究[J]. 湖北农业科学,2016,55(8):2765-2768,2773.