

黄瓜青枯病内生拮抗菌株的分离及 ARDRA 分析

陈 敏¹, 方 序²

(¹杭州师范学院生命科学院 杭州 310012) (²浙江省微生物研究所 杭州 310012)

摘 要 在黄瓜生长的不同阶段从根系分离内生细菌共 469 株。通过青枯菌平板拮抗试验,从中筛选到具明显拮抗作用的菌株 59 株。将内生拮抗菌纯培养物扩增近全长的 16S rDNA 并用限制性内切酶 *Alu* I 对 PCR 产物进行 ARDRA(amplified rDNA restriction analysis)多态性分析,共得到 5 种不同的操作分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU)。其中属于 OTU1 共有 39 株分离物,占内生拮抗菌总数的 66%,为优势种群。进一步通过 ERIC-PCR 指纹图的方法在菌株水平上分析 OTU1 类群。结果表明,OTU1 可分为 12 种不同的菌株,其中菌株 HE-1 和 HE-2 在黄瓜生长的 5 个不同阶段均可分离到。通过标记天然不具有利福平抗性的 HE-1 和 HE-2 菌株,获得抗利福平突变体菌株,回收检测结果表明,在栽培的不同时期,黄瓜植株根内均有 HE-1 和 HE-2 菌株的定殖。经防病效果的盆栽试验,发现 HE-1 和 HE-2 的浸种处理能有效降低黄瓜青枯病的病发率,与对照比较差异显著。因此确定 HE-1 和 HE-2 为黄瓜青枯病生物防治的优良菌株。

关键词: 黄瓜青枯病;内生拮抗菌;ARDRA;ERIC-PCR

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2006)06-0984-04

细菌性青枯病是由 *Ralstonia solanacearum* 引起的一种毁灭性土传病害,发生普遍,危害严重。目前,防治这类植物病害主要是依靠选育植物抗病品种,而生物防治因具有对环境、生态和人类健康安全等优点,仍不失为重要的辅助手段,并发挥着越来越重要的作用^[1]。以往用于黄瓜青枯病防治的生防菌株大都是根际微生物^[2],易受环境的影响而防效不稳定。因此,对黄瓜植株内生菌进行分离,从中筛选出对黄瓜青枯病有显著拮抗作用的内生细菌,对探索新的防治黄瓜青枯病的途径具有重要意义。

Dalmastri 等^[3]曾用纯培养的方法从玉米根部分离了大量菌株,然后用 ARDRA 的方法从中鉴定出 83 株菌株属于 *Burkholderia cepacia*,进一步用 RAPD 指纹图分析技术来分析这些菌株的遗传多样性,发现 *B. cepacia* 属于种内变异相当大的一个种。这种基于 PCR 的技术已成功地应用于对各种不同环境中分离的细菌种群进行基因型的分析研究上^[4,5]。本文通过对不同生长阶段黄瓜根部内生拮抗菌的分离,结合 ARDRA 和 ERIC-PCR 的分析手段,从中确定可用于黄瓜青枯病生物防治的优良菌株。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)购自

CCTCC 菌种保藏中心。

1.1.2 培养基与试剂:LB 培养基:胰化蛋白胨 10g/L,酵母提取物 5g/L,氯化钠 5g/L,琼脂 20g/L, pH7.0~7.5。NA 培养基:牛肉膏 3g,酵母膏 1g,蛋白胨 5g,葡萄糖 10g,琼脂 20g,水 1000mL, pH7.0。PCR 试剂、限制性内切酶等购自 Promega 公司。

1.2 内生菌的分离和纯化

分别在黄瓜栽培的 14d、28d、47d、72d、90d 将植株整个从土壤中取出,抖去土壤用水洗净,取根 10g,用 0.1% 的升汞浸泡 60s 进行表面杀菌处理,然后立即用无菌水冲洗 3 次。将表面杀菌后的根置于无菌的研钵内充分研磨,然后移入装有 90mL 0.1% 焦磷酸钠溶液的三角烧瓶内,充分振荡。取上述处理后的样品适当稀释,取 0.1mL 涂布平板,28℃ 培养。组织杀菌处理后第 3 次冲洗后的无菌水涂布平板进行培养,以有无菌落生长判断材料表面杀菌是否彻底。

选择菌落数在 30~100 范围的平板,将所有单菌落分别转接划线在相同培养基平板上,分离纯化。最后挑取单菌落,编号后于 4℃ 冰箱中保存。

1.3 拮抗菌株的平皿筛选

青枯菌接种至 NA 液体培养基中,35℃、180r/min 恒温摇床培养 12~24h。

基金项目 杭州师范学院重点科研项目(NO2002XNZ02)

作者简介 陈 敏(1963-),女,浙江绍兴人,副教授,主要从事环境微生物的研究工作。Tel:86-571-28865326 ;E-mail:mchen63@163.com

收稿日期 2006-03-08 ;接受日期 2006-04-11 ;修回日期 2006-06-28

在已冷却至 40℃左右的 NA 培养基中加入青枯病菌悬液(每 200mL 培养基加菌液 1mL)充分摇匀,倒入灭菌培养皿制成平板,冷却后点上待测菌,用无菌水做对照,放在 28℃温箱中培养,观察抑菌圈的有无,记录实验结果。

1.4 PCR 扩增

1.4.1 PCR 反应模板的简易制备:用牙签从平板上挑取单菌落少许,将菌悬于 20μL 无菌水中,封口膜封口,95℃水浴 10min,立即置于冰上,10000 × g 瞬时高速离心,直接取 2μL 上清液作为 PCR 反应模板。

1.4.2 16S rDNA 扩增:真细菌通用引物 P0(5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG)和 P6(5'-CTACGGC TACCTTGTTACGA)用于分离物的 16S rDNA 扩增^[6]。25μL PCR 反应体系。反应过程及条件为:95℃ 90s, 95℃ 30s, 60℃ 30s 和 72℃ 4min,5 次循环;95℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 4min,5 次循环;95℃ 30s,50℃ 30s,72℃ 4min,25 次循环;72℃ 10min,60℃ 10min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.5 ARDRA 分析

取 5μL(约 1.5μg)的 16S rDNA 的 PCR 产物,分别加入 1μL *Hinf* I、2μL 相应的 Buffer 和 12μL 去离子水,使反应体系为 20μL。37℃ 恒温 3 ~ 4h。酶切产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 ERIC-PCR

用 ERIC-PCR 对分离物进行基因组指纹图分析,具体方法参见文献[7]。

1.7 防病效果盆栽试验

种子处理:分离纯化后的菌株接种到 LB 液体培养基中,35℃、180r/min 恒温摇床培养 72h,离心收集菌体,用无菌水洗 3 次,悬浮菌体,浓度调整为 10¹⁰ cfu/mL。黄瓜种子经表面消毒后,在上述菌液中浸泡 12h,对照为无菌水处理。

菜园土经 2 次高温灭菌后用来制备病原土^[8],使其中青枯菌浓度约为 10⁶ cfu/g 土。将以上处理后的种子播于其中,每组 40 粒,分 10 盆栽种。温室光照设置为 30℃、14h 光照和 20℃、10h 黑暗。培养观察出苗率。

1.8 菌株利福平抗性突变体筛选及内生性初测

利福平抗性突变体筛选:将菌株进行天然抗药性的检测^[9]。无利福平天然抗药性的菌株再进行利福平抗性突变体的系统诱导^[9]。

内生性初测:将利福平抗性标记菌株接种在 LB 液体培养基中培养,菌液浓度调整为 10¹⁰ cfu/mL。黄瓜种子经表面消毒后,在上述菌液中浸泡 12h,取出

种子种入土中。分别在栽培的 14d、28d、47d 将植株整个从土壤中取出,按上述内生菌分离纯化的方法取样品涂布于利福平 NA 培养基平板上,回收检测菌落。设置不接菌对照。

2 结果

2.1 内生菌的分离纯化及平板拮抗试验

在黄瓜苗长出真叶后的第 14d、28d、47d、72d、90d,分别取黄瓜根系 10g,洗净后用 0.1% 升汞进行表面消毒,经研磨制成适当稀释液涂布平板,28℃培养。选择菌落数大约在 30 ~ 100 范围的稀释度平板,将同一平板上所有单菌落分别转接划线进行分离纯化,共得到 469 株纯培养物(表 1)。

将分离的 469 个菌株进行平板拮抗试验,从中筛选出具有明显抑菌圈的内生拮抗菌株 59 株,占所分离内生菌总数的 13%。实验结果表明,在此次试验的黄瓜植株 5 个生长期中,均可分离到内生拮抗菌株,其中在黄瓜栽培期的第 14d,从根系分离的内生细菌数量最少,内生拮抗菌的频率也最低,为 5.2%,而在第 72d,所分离的内生拮抗菌的频率达到最高,为 18.2%。

表 1 内生拮抗菌分离物及 ARDRA 分析							
Table 1 Endogenous antagonistic bacteria and ARDRA analysis							
Day	Presence of antagonistic isolates		No. of antagonistic isolates in :				
	Fraction ^a	%	OTU1	OTU2	OTU3	OTU4	OTU5
14	3/58	5.2	2	1	0	0	0
28	8/83	9.6	5	0	2	0	1
47	18/128	14.1	10	5	1	2	0
72	20/110	18.2	16	3	1	0	0
90	10/70	14.3	6	2	2	0	0
Total	59/469	13.0	39	11	6	2	1

^a Number of endogenous antagonistic bacteria / total number of endogenous bacteria.

2.2 ARDRA 分析

将 59 株内生拮抗菌纯培养物分别制备 PCR 简易模板,扩增近全长的 16S rDNA,并用限制性内切酶 *Alu* I 对 PCR 产物进行 ARDRA(amplified rDNA restriction analysis)多态性分析,结果共得到 5 种不同的操作分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU)(图 1)。根据文献报道,ARDRA 的方法可在 16S rRNA 基因序列上区分细菌种(species)的差异^[6];每一特有的 ARDRA 类型代表了一个操作分类单位(OTU)。用这种方法显示的 OTUs 多样性可用以估计分离物中存在的最低限度的细菌种(species)的数目^[10]。据此,在本研究中,所分离的 59 株内生拮抗菌中至少应存在 5 种不同的细菌种群。其中 OTU1 为优势类群,占内生拮抗菌总数的 66%,并且在此

次试验的黄瓜植株 5 个生长期中均存在 OTU1 类群 (表 1 所示)。

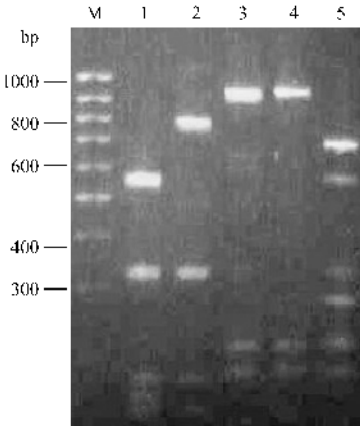


图 1 *Alu* I 酶切 59 株内生拮抗菌株的 16S rDNA PCR 产物后的 ARDRA 类型

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of amplified 16S rDNAs digested with *Alu* I from 59 isolates. M: 100bp DNA ladder; Lane1 ~ 5: ARDRA patterns of strains.

2.3 ERIC-PCR 分析

据报道,利用 ERIC 保守序列^[11]设计的引物对细菌 DNA 进行 PCR 扩增,可以得到反映细菌基因组结构特征的谱带,由此可在亚种和菌株水平鉴定细菌,其精确性超过已报道的其他许多方法^[7]。

据此,进一步通过 ERIC-PCR 指纹图的方法在菌株(strain)水平上分析 OTU1。结果 OTU1 的 39 株分离物共显示了 12 种不同的指纹图类型(图 2)。这一结果表明,OTU1 的 39 株分离物中存在 12 种不同的菌株。

对 39 株菌株的分布情况进行了统计(图 2 下方数据)。值得注意的是,第 1 泳道和第 2 泳道指纹图所代表的 2 种菌株在黄瓜生长的五个不同阶段均可分离到,且数量明显占优,分别为 38% 和 26%,因此将优先考虑作为进一步筛选生物防治用的优良菌株。

2.4 防病效果的盆栽测定

以上经 ERIC-PCR 分析确定的 2 个优势菌株分别编号为 HE-1 和 HE-2,进行防病效果的盆栽测定。盆栽的土壤接种青枯病菌制成病原土,细菌化处理后的种子播于其上,每种处理设置 10 盆共 40 粒。在 20~30℃ 的光照培养条件下,用无菌水处理的对照 20d 后所存健苗数为 10 株,病发率为 75%;而分别用 HE-1 和 HE-2 菌株细菌化处理后的健苗数为 32 株和 28 株,病发率分别为 20% 和 30%,与对照比较病发率均有较大幅度的降低,差异达到显著水平。

2.5 内生性初步测定

通过标记天然不具有利福平抗性的 HE-1 和 HE-2 菌株,获得抗利福平突变菌株。对此抗性突变菌株的培养性状和拮抗性进行测定,结果表明,其培养性状和拮抗性与原始菌株相同。分别将 HE-1 和

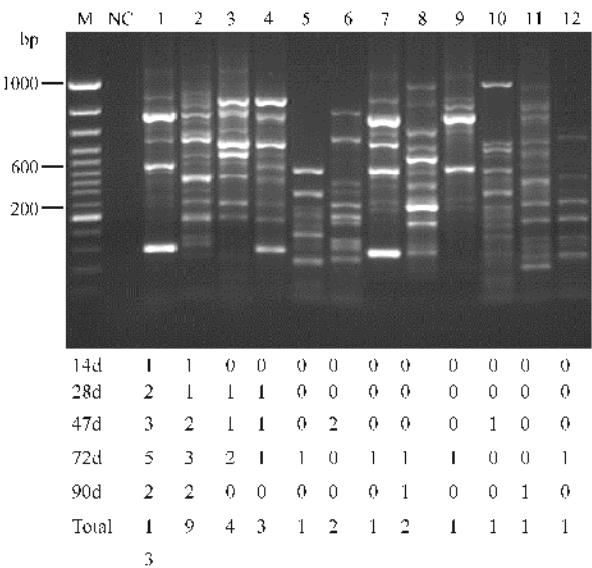


图 2 OTU1 不同菌株 ERIC-PCR 指纹分析凝胶图

Fig.2 Electrophoretic patterns obtained by ERIC-PCR analysis of strains from OTU1. M: 100bp DNA ladder; Lane1 ~ 12: ERIC-PCR patterns of strains. The numbers of isolates for each ERIC-PCR pattern are reported below the gel.

HE-2 抗利福平突变菌株用浸种法接种黄瓜种子,回收检测结果表明,在栽培的不同时期,植株根内均有 HE-1 和 HE-2 菌株的定殖,初步说明了 HE-1 和 HE-2 菌株确实为黄瓜植株根部的内生菌。

3 讨论

利用内生细菌防治作物病害是一个新兴的领域。植物内生菌作为植物微生态系统中的天然组成部分,它们的存在对加强植物对环境的适应性具有重要意义。一些内生细菌不但可以抑制病原菌,而且可以促进宿主的生长,有关这方面的研究已成为一个热点^[12~14]。

本研究采用的技术路线是(1)在 ARDRA 分析的基础上将分离的菌株首先归类(种水平上)(2)将每种 ARDRA 类型的代表菌株的 16S rRNA 进行测序分析,便可鉴定为细菌的某个种(将由后续工作完成)(3)通过 ERIC-PCR 指纹图技术进一步分析同属一个种的不同菌株(4)在以上分析基础上,将黄瓜生长的各个不同阶段均可分离到的优势菌株作为优先考虑的生防菌株。以上方法最突出的优点是它的简便和快速性,同时又不失其准确性。16S rRNAs 是一类公认非常有价值的研究微生物系统发育的分子指针,对 16S rDNA 的 PCR 产物的 RFLP 分析就称为 ARDRA(amplified rDNA restriction analysis)。这种方法对所扩增的 16S rDNA 片段不需要任何序列信息即可进行类型划分,再结合 ERIC-PCR 的分子多样性的鉴定便可取代传统的用表型和生理生化反应的分析方法。初步进行的内生性测定和防病效果盆

栽培试验的结果表明,用这种方法筛选得到的优势菌株 HE-1 和 HE-2 能在不同生长时期的黄瓜植株根内定殖,且其抗病性比较对照均有显著的提高,证明本研究所采用的技术路线不仅简便快速,同时又切实可行。有关 HE-1 和 HE-2 菌株的分类鉴定、内生定殖和消长动态、回接测试以及生长特性、田间生防效果等将由后续工作完成。

参 考 文 献

- [1] 陈中义,张 杰,黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究. 植物病理学报, 2003, **33**(2): 97-103.
- [2] 陈晓斌,张炳欣,楼兵干,等. 运用生色基因标记黄瓜根围促生菌(PGPR)筛选菌种. 微生物学报, 2001, **41**(3): 287-292.
- [3] Tabacchioni S, Chiarini A. Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. *Microbial Ecol*, 2000, **40**: 169-176.
- [4] Cello FD, Bevivino A, Chiarini L, et al. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4485-4493.
- [5] Bergsma-Vlami M, Prins ME, Staats M, et al. Assessment of genotypic diversity of antibiotic-producing *Pseudomonas* species in the rhizosphere by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(2): 993-1003.

- [6] Vaneechoutte M, Rossau R, Vos PD, et al. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA - restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Letters*, 1992, **93**: 227-234.
- [7] 赵立平,肖 虹,李艳琴,等. ERIC-PCR:一种快速鉴别环境细菌菌株的方法. 应用与环境生物学报, 1999, **5**: 30-33.
- [8] 陈晓斌,张炳欣,楼兵干,等. 根围促生菌对黄瓜幼苗的促生效应与防病作用. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 1999, **25**(6): 578-582.
- [9] 吴蔼民,顾本康,傅正擎,等. 内生菌 73a 在不同抗性品种棉花体内的定殖和消长动态研究. 植物病理学报, 2001, **31**(4): 289-294.
- [10] Dunbar J, White S, Forney L. Genetic diversity through the looking glass: effect of enrichment bias. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 1326-1331.
- [11] Per W, Ann-Christin A, Mats F. Biomonitoring complex microbial communities using random amplified polymorphic DNA and principal component analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, **28**: 131-139.
- [12] 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. 微生物学报, 2005, **45**(5): 776-779.
- [13] Essaid AB, Sabine G, Jerzy N, et al. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis inerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control*, 2002, **24**(2): 135-142.
- [14] 黎起秦,罗 宽,林 纬,等. 番茄青枯病内生拮抗菌的筛选. 植物病理学报, 2003, **33**(4): 364-367.

Isolation and ARDRA analysis of cucumber entophytic antagonists against *Ralstonia solanacearum*

CHEN Min^{1*}, FANG Xu²

(¹ School of Life Science, Hangzhou Normal College, Hangzhou 310012, China)

(² Zhejiang Institute of Microbiology, Hangzhou 310012, China)

Abstract Cucumber bacteria wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*, is one of soilborne plant diseases of worldwide origin. Biological control is considered the most environment-safe and efficacious approaches to control this disease. In this study, a total of 469 entophytic bacteria were isolated from cucumber plant roots at different growth stages and 59 of these isolates were shown antagonistic against *Ralstonia solanacearum*. An analysis of the level of biodiversity of the isolates at the species level was performed by comparing the *Alu* I restriction patterns of the 16S ribosomal DNAs (rDNAs) amplified by PCR from 59 isolates. This comparison was allowed to cluster the isolates into 5 operational taxonomic units (OTU), which were dominated by OTU1 group accounting for 39 isolates. This dominant OTU1 group was further investigated by a genomic fingerprinting technique, ERIC-PCR. The results indicated that there were 12 different ERIC-PCR types present among OTU1 groups. Isolates HE-1 and HE-2, which belonged to OTU1 and originated from all plant growth stages, were used to test the effect of biocontrol on the cucumber wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. Results showed that while the growth of seedlings was promoted, the disease was suppressed too. As these strains are the same genotype, it can be hypothesized that if they were included in an inoculum, they would efficiently colonize the cucumber and protect the plant in whole growing season. Thus, the strains described here could be used in future screening programs for target biocontrol agents. The results of this study have practical importance in the context of using biocontrol agents to protect plants against rhizosphere pathogens.

Keywords : Cucumber wilt ; Entophytic bacterium ; ARDRA ; ERIC-PCR