

桑疫病病原拮抗菌的分离、鉴定及发酵条件优化

张飞官, 高雅慧, 任慧爽, 裘丽源, 左伟东, 周泽扬, 谢洁*

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

摘要: 【目的】从健康桑树内生菌中分离获得对桑疫病病原菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *mori*) 具有显著拮抗作用的菌株, 优化其产生抑菌活性物质的发酵条件, 为其生防利用奠定基础。【方法】从严格表面消毒的桑树根茎中分离内生菌, 采用平板划线法纯化内生菌, 用抑菌圈法筛选拮抗菌; 根据菌株的形态与培养特征、生理生化特性、16S rDNA 序列分析对其进行鉴定。通过单因素试验和正交设计试验优化培养基组分及发酵条件。【结果】从健康桑树中分离获得内生菌 77 株, 其中, 编号为 SWg2 的菌株对桑疫病病原菌具有强而稳定的抑制作用。菌株 SWg2 的形态与培养特征、生理生化特性和泛菌属 (*Pantoea* sp.) 相符, 而 16S rDNA 序列分析结果显示它与成团泛菌 (*P. agglomerans*) 的亲缘关系接近。研究表明其最佳发酵配方和培养条件为: 甘油 (2.00%)、硝酸铵 (2.00%)、 KH_2PO_4 (0.10%) 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.15%), 起始 pH 为 7.5, 装瓶量 20 mL/100 mL, 最适培养温度为 28℃, 转速为 170 r/min, 种子液接种量为 4%, 摇瓶培养 5 d。【结论】经鉴定, 对桑疫病病原具拮抗作用的桑树内生菌 SWg2 为成团泛菌 (*P. agglomerans*), 命名为成团泛菌 SWg2。对其发酵条件进行优化后对桑疫病病原菌显示出更强的拮抗作用。

关键词: 桑疫病, 生防内生菌, 分离, 鉴定, 发酵条件, 优化

中图分类号: S852 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 12-1285-10

蚕桑产业是促进农民增收的传统产业, 作为茧丝生产的重要物质基础, 桑树 (*Morus alba* L.) 资源分布于全国各地, 2008 年仅我国中西部地区桑园面积就已超过 900 万亩^[1]。同时, 作为最早栽培的经济林木, 桑树具有重要的药用价值和园林观赏价值。近年来随着生态桑产业逐步建立, 桑树在防沙治沙、水土保持和石漠化治理中发挥了重要作用^[2]。然而包括桑疫病在内的各类桑树病害给蚕桑业造成的损失逐年增加, 已成为阻碍蚕桑生产可持续发展的主要障碍之一^[3]。桑疫病俗称烂头病, 是全世界范围内比较严重的桑树病害, 该病是由丁香假单胞菌

(*Pseudomonas syringae* pv. *mori*) 引起的细菌性疾病^[4]。根据发病症状可将桑疫病分为断柄型、缩叶型、黑枯型^[5-7]。目前桑疫病的防治除选育抗性品种外, 主要依赖化学农药。化学农药带来的环境污染及农药残留对养蚕业的负面影响已逐渐凸显。本研究从健康桑树内生菌中筛选桑疫病拮抗菌株, 进行桑疫病的生物防治的基础研究, 以期改变化学农药对产业发展带来的负面影响。

植物内生菌 (Endophytes) 是指存在于健康植物各组织器官内部且与宿主植物和谐共处的微生物^[8-9]。作为植物微生态系统的重要组成部分, 内

基金项目: 西南大学基本科研业务费专项资金项目 (XDJK2010C097)

* 通信作者。Tel: +86-23-68250275; Fax: +86-23-68250191; E-mail: healthjie@163.com

作者简介: 张飞官 (1987 -), 男, 四川人, 硕士研究生, 主要从事生物防治研究。E-mail: zfgtianya@gmail.com

收稿日期: 2013-04-25; 修回日期: 2013-06-15

生菌构筑了宿主植物的健康屏障,能够通过合成抗菌活性物质、竞争性排阻及诱导抗性等方式增强宿主植物的抗病性,促进植物健康成长^[10-12],植物内生菌因此成为筛选植物病害生防制剂的重要资源库。桑树内生菌存在于健康桑树各种组织和器官内部,对桑树具有多种生物学功能。2008年,牟志美^[13]等人对不同桑树品种内生真菌种群分布情况的研究结果表明桑树内生真菌具有丰富的生物多样性,其分离获得的114株桑树内生真菌分别归属于镰孢霉属(*Fusarium*)、链格孢属(*Alternaria*)、柱霉属(*Scytalidium*)等21个属。桑树内生细菌主要包括芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、欧文氏菌属(*Erwinia* sp.)、短小杆菌属(*Curtobacterium* sp.)以及洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)^[14-15]等。部分桑树内生细菌不仅能通过抑制桑树病原菌促进桑树幼苗生长,同时对某些家蚕病害也具有很好的防治效果^[15]。系统地开展利用桑树内生菌进行桑树病害生物防治的基础研究将有利于蚕桑产业的可持续发展。

成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)是一群产类胡萝卜素的肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)泛菌属(*Pantoea* sp.)细菌^[16]。成团泛菌在生物固氮、促进植物生长、生物防治以及利用其产微生物絮凝剂处理工业废水方面具有广泛的应用价值^[17-19]。本研究从健康桑树中获得一株对桑疫病病原菌具较强拮抗作用的成团泛菌,并优化了其产生抑菌活性物质的发酵条件,以期利用桑树内生菌进行桑树病害的生物防治奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试病原菌:桑疫病病原菌(*Pseudomonas syringae* pv. *mori*)由江苏大学生命科学研究院王文兵教授提供。

1.1.2 供试桑树材料:健康桑树品种桐乡青取自西南大学实验桑园。

1.1.3 培养基:PDA培养基,高氏一号培养基,察氏培养基, LB培养基。碳源发酵培养基(每1000 mL中含蛋白胨20.0 g, MgSO₄·7H₂O 1.5 g, K₂HPO₄ 1.5 g, 加入0.1%的葡萄糖, pH 7.2-7.4);

氮源发酵培养基(每1000 mL中含甘油10.0 g, MgSO₄·7H₂O 1.5 g, K₂HPO₄ 1.5 g, 加入0.1%的蛋白胨, pH 7.2-7.4)。

1.1.4 主要试剂和仪器: DNA maker、dNTP、DNA聚合酶、PCR产物纯化试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司; PCR引物、克隆载体 pMD19-T、T4连接酶均购自南京金斯瑞生物科技有限公司; 生理生化检测试剂管购自广东环凯生物科技有限公司; 其余均为国产分析纯。恒温摇床、电泳仪均购自北京六一仪器厂, PCR仪购自美国ABI公司, 显微镜购自尼康公司。

1.2 桑树内生菌的分离和纯化

将供试桑树材料用自来水洗净、晾干备用。取用时先将桑树根、茎、叶切成小块(长度约1 cm)用75%的酒精浸泡5 min, 取出后用无菌水冲洗, 待水分蒸干, 分层剖开, 并将其横切面置于固体培养基表面。以最后一次冲洗材料后的无菌水作为对照, 确保分离获得菌株为桑树内生菌。利用平板划线法进行菌种纯化。

将所获得的桑树内生菌用PDA培养基, 在28℃条件下培养4 d, 采用抑菌圈法, 以桑疫病病原菌为供试菌, 相同pH的缓冲液作对照, 从中筛选对桑疫病病原菌具拮抗作用的菌株。并对纯化后的菌株编号保种^[20]。

1.3 桑树内生拮抗菌的菌种鉴定

1.3.1 菌体培养特征和形态观察及生理生化特征测定:菌株培养特征观察、菌体及菌落形态观察、运动性测定、氧化酶试验、柠檬酸盐利用试验、糖发酵试验、硝酸盐和亚硝酸盐还原试验、淀粉水解、VP和MR试验、OF试验和H₂S产生等试验, 均参照文献[21-22]的方法进行。

1.3.2 细菌16S rDNA序列测定及其系统发育树的构建:将目的菌株接种在LB培养基振荡培养12-18 h后, 参照文献[23]的方法提取基因组DNA。以所提DNA为模板, 用细菌16S rDNA基因扩增通用引物进行PCR扩增^[24]。引物序列为27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR反应条件为: 95℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 60 s, 30个循环; 72℃ 10 min。扩增产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳分离, 回收纯化目的片段并与pMD19-T载体连接, 转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞, 在氨苄抗性

平板上进行阳性克隆的筛选, 送至南京金斯瑞生物科技有限公司测序。所得 16S rDNA 基因序列在 GenBank 里进行比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), 下载 GenBank 中同源性较高序列, 利用 MEGA4.0 软件, 使用 N-J 法进行 1000 次步长计算, 构建系统发育树。

1.4 抑菌活性物质热稳定性检测

将筛选出对桑疫病病原菌具有拮抗作用的菌株发酵, 上清液置于 40℃、60℃、80℃、100℃ 水浴处理 30 min, 用抑菌圈法检测经不同温度处理以后的发酵上清液的抑菌活性^[25], 以未加热处理的发酵上清液和灭菌发酵培养基作对照。

1.5 发酵条件优化

1.5.1 不同碳源、氮源、磷酸盐和金属离子对 SWg2 菌株发酵液抑菌活性的影响

在其他培养条件不变的情况下, 以 10.0 g/L 的比例, 分别用葡萄糖、甘油、乳糖、玉米粉、蔗糖、可溶性淀粉、麸皮、麦芽糖为菌株生长提供碳源; 以 20.0 g/L 的比例, 分别用蛋白胨、尿素、豆饼粉、硫酸铵、硝酸铵、胰蛋白胨、牛肉膏、酵母膏为菌株生长提供氮源; 以最佳碳、氮源为基础, 在液体培养基 (无 K_2HPO_4) 中加入磷酸盐 KH_2PO_4 、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 设置 1.0 g/L、1.5 g/L 和 2.0 g/L 共 3 个浓度梯度, 以不加 K_2HPO_4 的液体培养基为对照; 另在液体培养基 (无 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 中加入不同浓度的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、KCl、 $Fe_2(SO_4)_3$ 、 $ZnCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $FeSO_4$ 、NaCl、 $MnCl_2$ 金属盐, 设置 1.0 g/L、1.5 g/L 和 2.0 g/L 共 3 个浓度梯度, 以不加 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的液体培养基为对照, 重复 3 次, 确定最佳碳源、氮源、磷酸盐和金属离子。

1.5.2 营养条件的正交试验: 选择最佳碳源 (甘油)、氮源 (硝酸铵)、磷酸盐 (KH_2PO_4) 和金属离子 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 共 4 个因素, 设置 4 个水平, 如表 1 所示。

表 1. $L_{16}(4^5)$ 正交试验因素与水平

Table 1. Factors and levels of $L_{16}(4^5)$ orthogonal test

Factor	Levels			
	1	2	3	4
Glycerol/% (A)	1.0	2.0	3.0	4.0
NH_4NO_3 /% (B)	1.0	2.0	3.0	4.0
KH_2PO_4 /% (C)	0.1	0.2	0.3	0.4
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ /% (D)	0.05	0.10	0.15	0.20

选用 $L_{16}(4^5)$ 正交表进行正交试验, 抑菌活性

按照 1.2.1 的方法测定, 发酵试验设计 3 次重复, 取 3 次实验的平均值作为发酵配方的试验结果。

1.5.3 培养条件的优化: 基于优化的发酵培养基,

测定 SWg2 菌株在不同培养条件下所得发酵液的抑菌效果。①起始 pH 值对发酵液抑菌活性的影响: 在其它培养条件一致的情况下, 将培养基的起始 pH 值分别调至 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 和 10.0, 接种后 28℃, 170 r/min 下振荡培养 5 d 后, 检测抑菌效果, 确定最适 pH 值; ②装瓶量对发酵液抑菌活性的影响: 在其它培养条件一致的条件下, 在 100 mL 的三角瓶中, 按照 10%、20%、30%、40%、50% 和 60% 的装瓶量配制培养基, 接种后 28℃, 170 r/min 下振荡培养 5 d 后, 检测抑菌效果, 确定最适装瓶量。③培养温度对发酵滤液抑菌活性的影响: 在其它培养条件一致的条件下, 分别以 20℃、25℃、28℃、30℃、32℃、37℃ 和 40℃ 下进行发酵培养, 培养 5 d 后, 检测抑菌效果, 确定最适发酵温度。④接种量对发酵液抑菌活性的影响: 在其它培养条件一致的条件下, 将种子液以 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10% 的接种量加入到基础发酵培养基中, 接种后 28℃, 170 r/min 下振荡培养 5 d 后, 检测抑菌效果, 确定最适接种量。⑤培养时间对发酵液抑菌活性的影响: 在其它培养条件一致的条件下, 摇床培养 0.5 d、1 d、1.5 d、2 d、3 d、4 d、5 d 和 6 d 后检测抑菌效果, 确定最适发酵时间。⑥转速对发酵液抑菌活性的影响: 在其它培养条件一致的条件下, 将培养基在 140 r/min、150 r/min、160 r/min、170 r/min、180 r/min、190 r/min、200 r/min、220 r/min 条件下摇床培养后检测抑菌效果, 测定发酵滤液的抑菌活性。获得的数据以平均值表示, 采用 SPSS11.5 统计软件分析, 组间用 t 检验进行差异显著性比较。

2 结果和分析

2.1 拮抗菌株的分离纯化

采用稀释平板法, 从健康桑树 (桐乡青) 的根、茎、叶中共分离获得 77 株内生菌。通过抑菌圈法进行拮抗菌的筛选, 结果表明其中有 3 株菌 (SWg3-1, SWg3-2 和 SWg2) 具有拮抗桑疫病病原菌生长的作用, 而其中 SWg2 菌株的抑菌效果最好, 发酵上清液对桑疫病病原菌的拮抗作用最显著。

2.2 SWg2 菌株的鉴定结果

2.2.1 形态及培养特征: 桑树内生拮抗菌 SWg2 菌株, 形态及培养特征的检测结果表明: 在 PDA 培养基上菌落呈乳白色, 边缘整齐且光滑, 兼性厌氧生长; 革兰氏染色为阴性, 不具有芽孢 (表 2)。

表 2. 桑树内生拮抗菌 SWg2 菌株的形态及培养特征

Table 2. The morphological and Cultural Features of SWg2 Strain

Test item	Results	Test item	Results
Shape of cell	Rod	Mobility	+
Range of cell	Single	Aerobic feature	Facultative anaerobic
Gram staining	G ⁻	Color of colony	Ivory white
Spore staining	-	Shape of colony	Orderliness

+: Positive; -: Negative.

2.2.2 生理生化特征: 生理生化检测结果表明, SWg2 菌株氧化酶试验、产 H₂S 试验和亚硝酸盐产气试验都呈阴性反应, 能利用麦芽糖、果糖, 不能利用乳糖和淀粉, OF 试验都表现为发酵型, 该菌株可氧化分解多种单糖、多糖, 并可利用其作为唯一的碳源, 结果详见表 3。综述上述测定结果, 初步判断 SWg2 菌株为泛菌属 (*Pantoea* sp.) 菌株。

表 3. 生理生化试验结果

Table 3. Physiological and biochemical characteristics

Test item	Result	Test item	Result
Oxidase	-	Sucrose	-
Catalase	+	Lactose	-
Methyl red	-	Maltose	+
VP test	+	Levulose	+
Citrate	-	Starch hydrolysis	-
H ₂ S production	-	Glucose	+
Deoxidization of nitrate	+	Gas of glucose	-
Deoxidization of nitrite	-	Oxidative fermentation test	F

+: Positive (growth or reaction); -: Negative (no growth or no reaction); F = Fermentation.

2.2.3 16S rDNA 系统发育分析: 以桑树内生拮抗菌 SWg2 基因组 DNA 为模板, 用细菌 16S rDNA 基因扩增通用引物进行 PCR 扩增, 得到一条约 1500 bp 的片段。将回收纯化得到目的片段与 pMD19-T 载体连接, 并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆进行序列测定, 得到 1349 bp 的序列。将其序列相关信息提交到 GenBank, 获得登录号 KC783460, 利用 BLAST 程序与 GenBank 中已登录的基因序列进行比对, 选取与其同源性较高

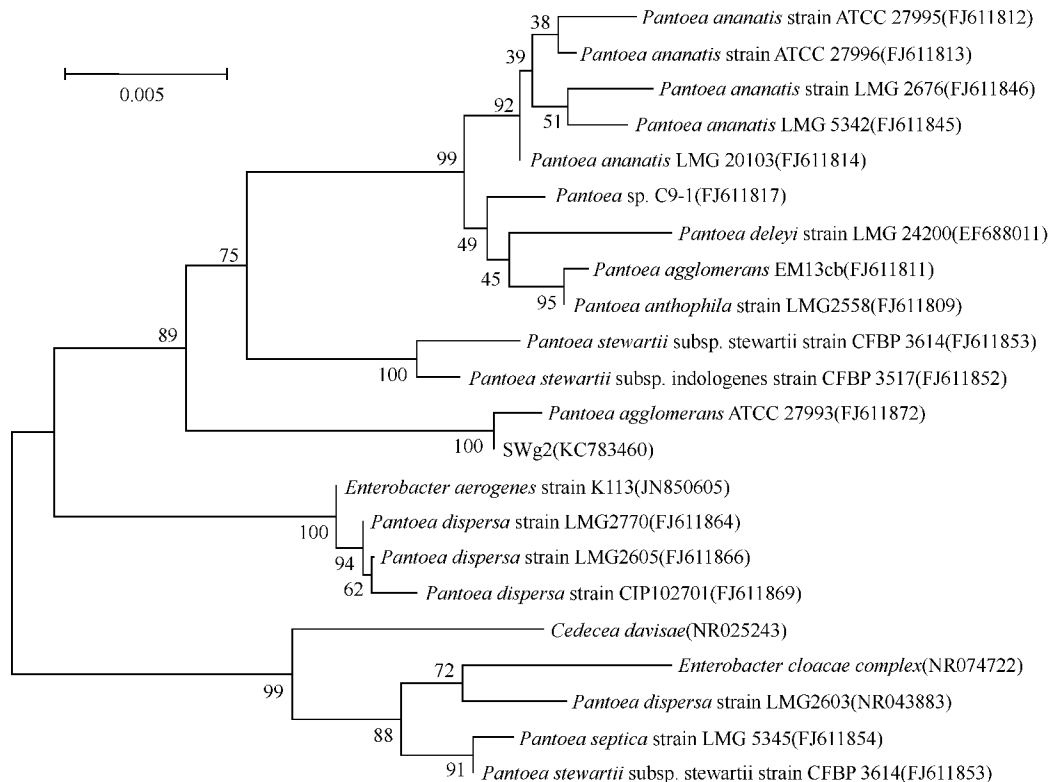


图 1. 依据 16S rDNA 基因序列构建 SWg2 菌株的系统发育树

Figure 1. Phylogenetic tree of strains SWg2 and other related strains downloaded from GenBank. Numbers at nodes indicate levels of bootstrap support (%) based on 1000 resampled datasets, and only those branches with greater than 50% bootstrap support are labeled. Bar: 0.05% sequence divergence. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank.

且已定名的菌株的相关序列信息,进行系统发育分析,用 MEGA4.0 中的 N-J 法构建系统进化树(图 1)。系统发育分析结果表明,SWg2 菌株与肠杆菌科中泛菌属的遗传进化距离最近,与 *Pantoea* sp. 同处于一个最小的分支,与已知菌株 *Pantoea agglomerans* ATCC 27993 (FJ611872)^[26] 的同源性达到 98% 以上。

根据拮抗菌株 SWg2 的菌体形态、培养特征及生理生化特征测定结果,并结合基于 16S rDNA 的系统发育分析,将该桑树内生拮抗菌 SWg2 鉴定为成团泛菌(*P. agglomerans*),命名为成团泛菌 SWg2。

2.3 活性物质热稳定性检测

热稳定性检测结果表明 SWg2 菌株活性发酵液经 40℃、60℃、80℃、100℃ 处理 30 min 后,其抑菌活性与未经处理的发酵液相比未见明显变化,结果如图 2 所示。SWg2 所产生的桑疫病抑菌活性成分的耐热性将有利于其在桑疫病生物防治中的应用。

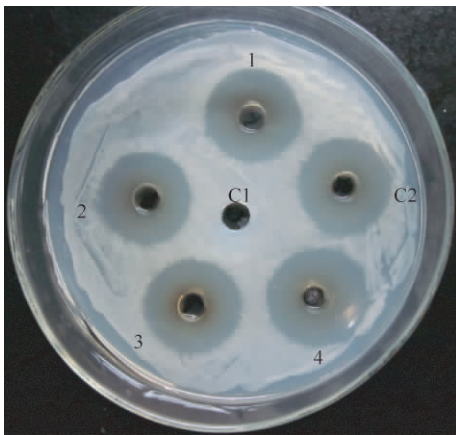


图 2. SWg2 抑菌活性发酵液耐热性检测

Figure 2. Detection of heat resistant of SWg2 Strain metabolites. 1-4 Fermentation supernatant of SWg2 strain incubated at 40℃, 60℃, 80℃, 100℃ for 30 min, C₁ Liquid broth. C₂ Fermentation Supernatant of SWg2 strain.

2.4 拮抗菌株 SWg2 的发酵条件优化

2.4.1 不同碳、氮源对 SWg2 发酵液抑菌活性的影响:

以所选 8 种碳源的培养基得到的 SWg2 菌株发酵滤液对桑树细菌性疫病均有一定的抑菌活性,其中以甘油为碳源的发酵液抑菌效果最好,抑菌圈大小均在 18.00 mm 左右,大于基础发酵培养基的抑菌圈(11.67 mm),其次是葡萄糖,而乳糖、麦芽糖、蔗糖、玉米粉和麸皮的抑菌活性较差(图 3-A)。因此,选用甘油作为碳源。以所用 8 种为氮源的培养基得

到的 SWg2 菌株发酵滤液对桑树细菌性疫病均有一定的抑菌活性,其中以硝酸铵为氮源的发酵液具有最好的抑菌效果,抑菌圈为 19.00 mm,其次是酵母膏,而蛋白胨、硫酸铵、豆饼粉的抑菌活性较差(图 3-B)。因此,选用硝酸铵作为氮源。

2.4.2 菌株 SWg2 营养条件的正交试验:

以甘油(A)、硝酸铵(B)、KH₂PO₄(C)和 MgSO₄·7H₂O(D)为因素,按 L₁₆(4⁵)正交表设计 4 因素 4 水平的正交试验,测定 SWg2 的发酵液对桑树细菌性疫病的抑菌活性,确定发酵配方。

正交试验的极差分析表明,4 个因素对桑树细菌性疫病的抑制率为 A > D > C > B,最佳水平组合为 A2B2C1D3;方差分析结果表明,因素 A 对桑树细菌性疫病的影响显著(表 4)。因此,确定培养基配方为:甘油(20.0 g/L)、硝酸铵(20.0 g/L)、(KH₂PO₄(1.0 g/L)和 MgSO₄·7H₂O(1.5 g/L))。

2.4.3 培养条件的优化:

在确定发酵培养基配方的基础上,通过单因素试验对发酵条件进行了优化。结果表明一定范围内单位体积发酵液的抑菌活性随着初始 pH 的增加、装瓶量的增大、培养温度的上升、转速的加快、接种量的增多以及培养时间的延长而增强,如图 4 所示。初始 pH 为 7.5 时,单位体积发酵液的抑菌活性最强(图 4-A),随着初始 pH 的继续升高,菌株产活性物质的能力逐渐下降。装瓶量 20 mL/100 mL 时,单位体积发酵液的抑菌活性最强(图 4-B)。28℃ 为成团泛菌 SWg2 菌株产生抑菌活性物质的最适温度(图 4-C)。摇床转速为 170 r/min(图 4-D),种子液接种量控制在 4%(图 4-E),同时恒温振荡培养 5 d(图 4-F),发酵液的活性达到最大值。转速太慢,溶氧量不足,而转速太快会造成细胞破裂;接种量太大,细菌衰退期提前,接种量太少,延迟期时间增加;培养时间太长细胞生长停滞,并出现自溶。综上所述,培养基的起始 pH 为 7.5,装瓶量 20 mL/100 mL,培养温度 28℃,转速 170 r/min,种子液接种量 4% 以及恒温振荡培养 5 d 为成团泛菌 SWg2 菌株产生桑疫病抑菌活性物质的最佳发酵培养条件。

2.4.4 发酵条件优化后的验证试验:

利用确定的发酵培养基配方和优化后的发酵条件,对成团泛菌 SWg2 菌株发酵,重复 3 次,收集发酵液,以桑树细菌性疫病为供试菌,利用抑菌圈法验证优化实验结果。结果表明:优化后成团泛菌 SWg2 菌株所产活性物

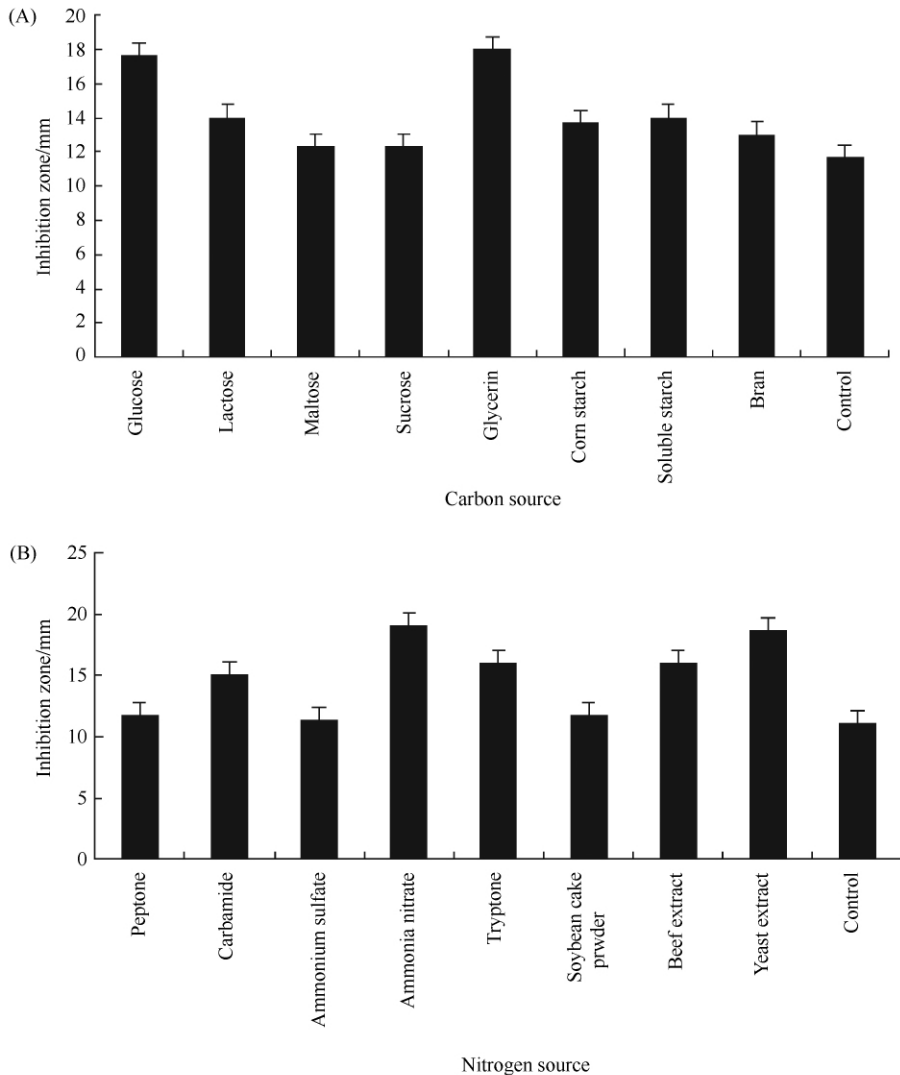


图 3. 不同碳氮源对菌株 SWg2 发酵滤液抑菌活性的影响

Figure 3. Effect of different carbon sources and nitrogen on inhibition activity of submerged cultured SWg2. A: different carbon sources, B: different nitrogen sources, Means represent the values of three replicates. Lines above the bars represent standard error (SE) of the mean within the treatments.

质的抑菌圈 (23.18 mm) 明显大于优化前利用 PDA 培养基发酵所产生的抑菌圈 (12.67 mm), 也大于利用牛肉膏蛋白胨培养基发酵所产生的抑菌圈 (11.12 mm), 抑菌效率分别提高了 182.95% 和 208.45%, 表明此优化的发酵培养基和培养条件有利于活性物质的提高。

3 讨论

成团泛菌可通过产生抗菌肽^[27]、几丁质酶^[28]以及小分子抗生素^[29]等抑菌活性物质抑制植物病

原微生物生长繁殖。作为常见植物内生细菌,成团泛菌对多种植物病原菌具有显著拮抗作用。例如:从冬枣表面分离获得的成团泛菌 B501 菌株对冬枣黑斑病菌 (*Alternaria alternata*) 具有明显的生物防治作用^[30];云雾龙胆内生成团泛菌 XJ01 菌株发酵上清液对黄瓜褐斑病菌 (*Corynespora cassicola*) 具有较强的拮抗作用^[31];分离自大豆叶片的成团泛菌 C9-1 菌株能有效抑制梨火疫病菌 (*Erwinia amylovora*) 生长^[27]。同时,由于其在植物体上的定殖能力和对环境的适应性极强,成团泛菌已被广泛应用于植物病害生物防治。目前,成团泛菌 E35 已作为商业化产

表 4. 菌株 SWg2 发酵培养基正交设计 $L_{16}(4^5)$ 及试验结果Table 4. Optimization of culture medium design $L_{16}(4^5)$

for Bacteria strain SWg2 fermentation

Number	A	B	C	D	Inhibition zone diameter/mm
1	1	1	1	1	16.33
2	1	2	2	2	12.67
3	1	3	3	3	17.33
4	1	4	4	4	11.67
5	2	1	2	3	14.67
6	2	2	1	4	18.33
7	2	3	4	1	15.33
8	2	4	3	2	11.33
9	3	1	3	4	10.67
10	3	2	4	3	13.33
11	3	3	1	2	11.33
12	3	4	2	1	12.33
13	4	1	4	2	12.00
14	4	2	3	1	11.00
15	4	3	2	4	10.00
16	4	4	1	3	12.33
X_1	14.50	13.42	14.58	13.75	
X_2	14.92	13.83	12.42	11.83	
X_3	11.92	13.50	12.58	14.42	
X_4	11.33	11.92	13.08	12.67	
R	3.58	1.92	2.17	2.58	

Means based on three replicates followed by the same letters within each column were not significantly ($P < 0.05$) different according to Duncan's multiple range test.

品,用于果园中苹果和梨火疫病的生物防治^[31]。但是成团泛菌作为桑树内生菌用于桑疫病生物防治的相关研究至今未见报道,本研究从健康桑树中分离获得一株对桑疫病病原菌具有显著拮抗作用的内生细菌 SWg2 菌株。综合 SWg2 菌株形态学特征、生理生化特性以及基于 16S rDNA 的系统发育分析结果,将 SWg2 菌株鉴定为成团泛菌。为确保分离获得的生防内生菌在温度较高的田间环境也能发挥生防作用,本研究检测了 SWg2 菌株活性发酵上清液的抗热性,试验结果表明成团泛菌 SWg2 菌株抑菌活性物质经 100℃ 处理 30 min 后,抑菌活性几乎不受影响。较高的耐热性将有利于 SWg2 菌株在实际生产中防治桑疫病。本研究取得的研究结果为利用成团泛菌进行桑疫病生物防治奠定了坚实的实验基础。

抗菌活性物质通常作为生防菌发挥生物防治作用的物质基础,其产量的高低影响着生防菌株的实际应用效果。发酵是获得大量微生物活性代谢产物的基础,微生物代谢产物的类型和产量与其培养条件密切相关。本研究采用单因素和正交试验进行 SWg2 菌株发酵条件的优化,获得了优化的培养基配方和培养条件,优化后发酵液的抑菌活性显著提

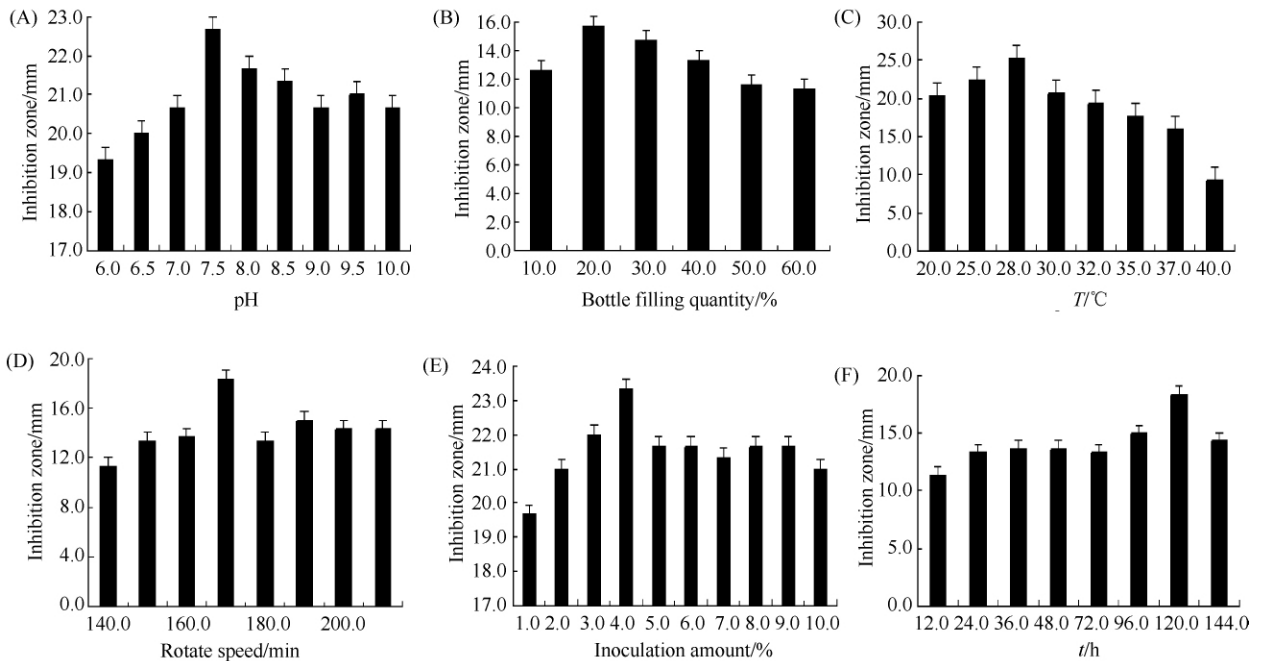


图 4. 不同培养条件对菌株 SWg2 发酵滤液抑菌活性的影响

Figure 4. Effect of different condition on inhibition activity of submerged cultured SWg2. A: different pH; B: different bottle filling quantity; C: different temperature; D: different rotate speed; E: different inoculation amount; F: different time, Means represent the values of three replicates. Lines above the bars represent standard error (SE) of the mean within the treatments.

高。后续研究将在此优化基础上,采用生物化学及分子生物学等方法对其代谢过程进行深入研究,阐明发酵培养基中各成分的利用情况与活性物质生产之间的关系,进一步提高活性物质的产率,并通过温室盆栽控病试验以及大田试验进一步检测发酵活性物质对桑疫病的防治效果^[32]。本研究属首次对成团泛菌的发酵条件进行优化,但尚未考虑交互作用和发酵成本,故后续研究将兼顾成本和交互作用,得到更优和更廉价的发酵条件,以降低成本、便于推广应用。

参考文献

- [1] Zhang F. Study on the effect of the cocoon and silk industry transfer to the central and western regions of China during the 11th five-year plan. *Silk*, 2011, 48 (3) : 59-62. (in Chinese)
张放军. “十一五”中国中西部茧丝绸产业转移成效探析. *丝绸*, 2011, 48 (3) : 59-62.
- [2] Qin J, He N, Huang X, Xiang Z. Development of mulberry ecological industry and sericulture. *Science of Sericulture*, 2010, 36 (6) : 984-989. (in Chinese)
秦俊,何宁佳,黄先智,向怀怀. 桑树生态产业与蚕业的发展. *蚕业科学*, 2010, 36 (6) : 984-989.
- [3] Kuai Y. Research progress in mulberry pathogenic prokaryotes and their diseases (I). *Science of Sericulture*, 2012, 38 (1) : 152-164. (in Chinese)
蒯元璋. 桑树病原原核生物及其病害的研究进展(I). *蚕业科学*, 2012, 38 (1) : 152-164.
- [4] Young JM, Bull CT, De Boer SH. Classification, nomenclature, and plant pathogenic bacteria a clarification. *Phytopathology*, 2001, 91 (7) : 616-620.
- [5] Mao J, Du H, Pu G, Tan S. Study on the broken leafstalk type of mulberry bacterial disease. *Science of Sericulture*, 1999, 25 (4) : 203-207. (in Chinese)
毛建萍,堵鹤鸣,浦冠勤,谭书生. 桑断柄型细菌性疫病的研究. *蚕业科学*, 1999, 25 (4) : 203-207.
- [6] Dai H, Zhou S, Du H, Li G. About the black mulberry bacterial blight-shrink disease research. *Science of Sericulture*, 1980, 6 (3) : 150-154. (in Chinese)
戴荷芳,周水良,堵鹤鸣,李国喜. 关于桑树细菌性黑枯病-缩叶型病的研究. *蚕业科学*, 1980, 6 (3) : 150-154.
- [7] Du H, Li G, Dai H, Zhou S. Research on black mulberry bacterial blight pathogen. *Science of Sericulture*, 1979, 5 (3) : 152-158. (in Chinese)
堵鹤鸣,李国喜,戴荷芳,周水良. 关于桑树细菌性黑枯病病原菌的研究. *蚕业科学*, 1979, 5 (3) : 152-158.
- [8] Barraquio WL, Revilla L, Ladha JK. Isolation of endophytic bacteria diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant and Soil*, 1997, 194 (1-2) : 15-24.
- [9] Hanada RE, Pomella AW, Costa HS, Bezerra JL, Loguercio LL, Pereira JO. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuacu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biology*, 2010, 114 (11-12) : 901-910.
- [10] Li HM, Sullivan R, Moy M, Kobayashi DY, Belanger FC. Expression of a novel chitinase by the fungal endophyte in *Poa ampla*. *Mycologia*, 2004, 96 (3) : 526-536.
- [11] Martinuz A, Schouten A, Sikora RA. Systemically induced resistance and microbial competitive exclusion: implications on biological control. *Phytopathology*, 2012, 102 (3) : 260-266.
- [12] Regupathy TV, Young JY, Sun HL. Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. *The Journal of Microbiology*, 2010, 48 (5) : 559-565.
- [13] Mu Z, Lu G, Ji X, Gai Y, Wang Y, Gao H, Cha C. 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.
- [14] Gao H, Fu X, Dong F, Tang F, Wang Y, Mu Z. Effects of mulberry antagonistic endophytic bacterium *Bacillus subtilis* L144 on growth promotion and nutrition metabolism of plants. *Science of Sericulture*, 2010, 36 (2) : 0214-0220. (in Chinese)
高绘菊,付信芝,董法宝,唐芬芬,王彦文,牟志美. 桑树内生拮抗细菌枯草芽孢杆菌 L144 对植物生长及营养代谢的影响. *蚕业科学*, 2010, 36 (2) : 0214-0220.
- [15] Dong F, Mu Z, Yu Q, Zhao K, Liu Z, Wang Y, Gao H. Control effect and bacteriostasis of mulberry endophytic bacterium *Burkholderia cepacia* Lu10-1 on silkworm septicemia. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23 (11) : 3109-3115. (in Chinese)
董法宝,牟志美,于奇,赵凯,刘朝阳,王彦文,高绘菊. 桑树内生洋葱伯克霍尔德氏菌对家蚕黑胸败血病的防

- 治及抑菌作用. 应用生态学报, 2012, 23 (11) : 3109-3115.
- [16] Shen D, Feng Y, Song W. Biological function diversity of *Enterobacter agglomerans* and its newest advance in classification. *Journal of Microbiology*, 2002, 22 (1) : 40-42. (in Chinese)
沈德龙, 冯永君, 宋未. 成团肠杆菌的生物功能多样性及其分类最新进展. 微生物学杂志, 2002, 22 (1) : 40-42.
- [17] Kim YC, Leveau J, Gardener BM, Pierson EA, Pierson III LS, Ryu CM. The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (5) : 1548-1555.
- [18] Quecine MC, Araújo WL, Rossetto PB, Ferreira A, Tsui S, Lacava PT, Mondin M, Azevedo JL, Pizzirani-Kleiner AA. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (21) : 7511-7518.
- [19] Yang J. Study on treatment of stone wastewater using microbial flocculant produced by *Pantoea agglomerans*. *Hebei Chemical Engineering and Industry*, 2013, 36 (2) : 60-62. (in Chinese)
杨劲峰. 成团泛菌产微生物絮凝剂处理石料废水的研究. 河北化工, 2013, 36 (2) : 60-62.
- [20] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验. 第4版. 北京: 高等教育出版社, 2000: 267-268
- [21] 周德庆. 微生物学教程. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 356-357.
- [22] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 370-398.
- [23] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验. 第4版. 北京: 高等教育出版社, 2000: 149-152.
- [24] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173 (2) : 697-703.
- [25] Xie J, Xia T, Lin L, Zuo W, Zhou Z. Isolation and identification of an antagonistic endophytic bacterial strain from mulberry. *Science of Sericulture*, 2009, 35 (1) : 121-124. (in Chinese)
谢洁, 夏天, 林立鹏, 左伟东, 周泽扬. 一株桑树拮抗内生菌的分离鉴定. 蚕业科学, 2009, 35 (1) : 121-124.
- [26] Fabio Rezzonico, Theo HM Smits, Emilio Montesinos, Jürg E Frey Brion Duffy. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC Microbiology*, 2009, 204 (9) : 1471-2180.
- [27] Sammer UF, Völksch B, Möllmann U, Schmidtke M, Spiteller P, Spiteller M, Spiteller D. 2-amino-3-(oxirane-2, 3-dicarboxamido)-propanoyl-valine, an effective peptide antibiotic from the epiphyte *Pantoea agglomerans* 48b/90. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (24) : 7710-7717.
- [28] Chernin L, Brandis A, Ismailov Z, Chet I. Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. *Current Microbiology*, 1996, 32 (4) : 208-212.
- [29] Kamber T, Lansdell TA, Stockwell VO, Ishimaru CA, Smits TH. M, Duffy B. Characterization of the biosynthetic operon for the antibacterial peptide herbicolin in *Pantoea vagans* biocontrol strain C9-1 and incidence in *Pantoea* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (12) : 4412-4419.
- [30] Xue M, Zhang L, Zhang J, Tang W. Identification of bacterial strain B501 and its biocontrol activity against black spot on jujube fruits. *Chinese Journal of Biological Control*, 2008, 24 (2) : 122-127. (in Chinese)
薛梦林, 张力群, 张继澍, 唐文华. 拮抗菌 B501 的鉴定及其对采后冬枣黑斑病的抑制效果. 中国生物防治, 2008, 24 (2) : 122-127.
- [31] Huang H, Li X, Yang H, Lu X, Liu C. Identification of endophyte XJ01 and antagonism on the *Corynespora cassiicola*. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2012, 27 (4) : 158-162. (in Chinese)
黄海东, 李晓雁, 杨红澎, 卢显芝, 刘畅. 内生菌 XJ01 的分离鉴定及其对黄瓜黑斑病菌的拮抗作用. 华北农学报, 2012, 27 (4) : 158-162.
- [32] Hu H, Ochi K. Novel approach for improving the productivity of antibiotic producing strains by inducing combined resistant mutations. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (4) : 1885-1892.

Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic endophyte to mulberry bacterial blight

Feiguan Zhang, Yahui Gao, Huishuang Ren, Liyuan Qiu, Weidong Zuo, Zeyang Zhou, Jie Xie*

College of Biotechnology, Southwest University, State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] Antagonistic endophytic strains with strongly inhibitory activity to mulberry bacterial blight (*P. syringae* pv. *mori*) were isolated from mulberry endophytes. we identified the antagonistic endophyte and optimized the fermentation conditions. [Method] Streak plate method was used to separate the endophytes from healthy mulberry tissues after strict surface disinfection. Antagonistic endophytes were screened out through inhibition zone method. Strain SWg2 was identified by morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis. The conditions of fermentation and medium composition were optimized through single factor and orthogonal experiment. [Result] In total 77 endophytic strains have been isolated from healthy mulberry. SWg2 showed strong and stable antagonistic activity to mulberry bacterial blight. The morphological, cultural, physiological, and biochemical characteristics assays indicated that SWg2 belongs to *Pantoea* sp. The 16S rDNA sequence phylogenetic analysis reveals that SWg2 appeared a sister lineage to *P. agglomerans*. The optimized culture conditions of strain SWg2 were liquid volume 20 mL in 100 mL flask, 170 r/min at 28°C, inoculation size of 4% for 5 d with a medium of 2.0% glycerol, 2.0% NH₄NO₃, 0.1% KH₂PO₄, 0.15% MgSO₄•7H₂O at initial pH of 7.5. [Conclusion] The antagonistic endophytic strain SWg2 to mulberry bacterial blight was identified as *P. agglomerans*. SWg2 strain shows stronger antagonistic action to mulberry bacterial blight under optimized fermentation conditions.

Keywords: mulberry bacterial blight, antagonistic endophyte, isolation, identification, fermentation condition, optimization

(本文责编:王晋芳)