

桑树内生拮抗细菌 *Burkholderia cepacia* Lu10-1 的分离鉴定及其内生定殖

牟志美¹, 路国兵¹, 冀宪领¹, 盖英萍², 王彦文¹, 高绘菊¹, 查传勇¹

(¹ 山东农业大学林学院, 泰安 271018)

(² 山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018)

摘要:【目的】对从健康桑树叶片中分离到的一株内生拮抗细菌 Lu10-1 进行鉴定, 并探讨该菌株在桑树体内的定殖。【方法】通过形态观察、生理生化指标测定及 16S rRNA 基因序列同源性分析, 结合 *recA* 基因特异引物 PCR 检测法对菌株 Lu10-1 进行分类学鉴定; 以抗利福平(Rif)和氨苄青霉素(Amp)双抗药性为标记, 采用浸种、浸根、涂叶和针刺等方法接种, 测定 Lu10-1 菌株在桑树体内的定殖。【结果】结果表明, 菌株 Lu10-1 属于伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*), 与亲缘关系较近菌株 *B. cepacia* (X80284)的同源性达 98%, 该菌株的 16S rDNA 序列已在 GenBank 中注册, 登录号为 EF546394; Lu10-1 菌株浸种接种后, 菌株在桑苗组织中的数量总体上呈现下降趋势, 到第 20 天后菌量趋于稳定; 细菌浸根接种后, 菌株在茎叶部定殖的菌量均呈现出“先增后降”的趋势。【结论】内生拮抗细菌 Lu10-1 归属于洋葱伯克霍尔德氏菌基因型 (*Burkholderia cepacia* genomovar); 该菌株可在桑树体内长期定殖并传导, 且在定殖过程中菌株的拮抗性未改变; 为将该菌株导入桑树体内进行病害的生物防治提供了理论依据。

关键词: 桑树; 内生细菌; 洋葱伯克霍尔德氏菌; 鉴定; 定殖

中图分类号: Q939.99 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 05-0623-08

茧丝绸是我国的传统出口产品, 年创汇超过 60 亿美元^[1]。桑树(*Morus alba* L.)是蚕茧生产的重要物质基础, 也是我国传统的药用植物。但近年来桑树病害表现出逐年上升的趋势, 尤其是桑炭疽病、桑褐斑病、桑干枯病、桑疫病等对蚕桑业造成的经济损失逐年增加, 已成为阻碍蚕桑生产可持续发展的主要障碍之一^[2]。现阶段对各种桑树病害的防治很大程度上依赖于化学农药的使用, 由此带来的环境污染、农药残留等诸多问题引起人们广泛关注。较之化学防治, 更可行的防治途径是选择抗病品种或进行生物防治。

作为植物微生物生态系统的天然组成成员, 内生细菌

可在植物体内长期定殖, 某些内生细菌可通过产生抗生素、水解酶类等抗菌活性物质在植物体内长期发挥生防作用; 相对于腐生细菌、PGPR 等生防因子, 内生细菌不易受环境条件的影响, 可在植物体内定殖和传导, 更有利于发挥生防作用, 已成为植物病害生物防治上一类极具应用潜能的新的资源菌^[3]。已有研究者从棉花、水稻、烟草、辣椒、番茄、马铃薯等作物中分离到对宿主植物病害具有良好防治效果的内生细菌^[4], 但目前尚未见有桑树内生细菌用于病害生物防治的研究报道。

洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)是广

基金项目: 山东省自然科学基金项目(2007ZRB01872); 山东省科技厅三 O 工程项目(2006851)

作者简介: 牟志美(1950-), 女, 山东栖霞人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物内生细菌应用研究工作。Tel: +86-538-8241315; Fax: +86-538-8249164; E-mail: zmeimu@sdau.edu.cn

收稿日期: 2007-07-30; 修回日期: 2007-11-26

泛存在于自然界的一种革兰氏阴性细菌,在农业领域中具有生物防治、生物降解及促进植物生长等多种生物学功能,有着良好的应用前景^[5]。洋葱伯克霍尔德氏菌种内分为9个基因型,分别为基因型 ~ ,合称为洋葱伯克霍尔德氏菌群(*Burkholderia cepacia* complex,简称 Bcc)。其中,洋葱伯克霍尔德氏菌基因型 和基因型 对人体具有较强的致病性,在农业上应用存在一定的风险^[6];因而对 Bcc 菌株基因型的鉴定既是明确其分类学地位的需要,也是对菌株应用风险评估的一个关键环节。但 Bcc 菌株各基因型之间的 16S rRNA 基因序列相似性很高(98%~99%),仅通过表型及常用细菌 16S rRNA 分子鉴定方法只能将 Bcc 鉴定到种的水平,而无法鉴定到基因型。目前区分 Bcc 菌株各基因型主要采用的方法包括 *recA*-RFLP 分析、*recA* 基因特异引物 PCR 检测、DNA-DNA 同源性分析及全细胞蛋白电泳(PAGE) 检测,相比较而言,*recA* 基因特异引物 PCR 检测法更为简便、灵敏^[7]。

目前国内外研究较多的洋葱伯克霍尔德氏菌是来自于土壤、水及植物根围等农业环境中,也有从水稻^[8]、柑桔^[9]体内分离到内生性 Bcc 菌株的报道。本研究首次从桑树叶片中分离到一株对多种植物病原菌具有较强拮抗作用的洋葱伯克霍尔德氏菌菌株 Lu10-1,并就该菌株的分类学鉴定及其在宿主体内的定殖研究结果予以报道,为进一步开发利用该内生防资源菌,探求对桑树病害新的生物防治途径提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试病原菌:桑炭疽病菌(*Colletotrichum morifolium*)、桑粘格孢菌(*Septogloeum mori*)、杨树水泡溃疡病菌(*Dothiorella gregaria*)、茶轮斑病菌(*Pestalozzia theae*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfertum)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternate*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、小麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis*)、桑丁香假单孢杆菌(*Pseudomonas syringae* pv. *mori*)、大白菜软腐病菌(*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*)和马铃薯环腐病菌(*Clavibacter michiganens* subsp. *sepedonicum*)由山东农业大学植物病理实验室提供。

1.1.2 供试植物材料:以品种桑育 71-1、湖桑 32 号、陕桑 305 和农桑 14 号的叶片为内生细菌分离材料,

以农桑 14 号无菌试管苗和嫁接苗为内生细菌定殖测试材料。

1.1.3 培养基和缓冲液^[10]:细菌分离用 KB 培养基,培养用 NA 培养基,液体培养用 NB 培养基,真菌培养及拮抗测定用 PDA 培养基;定殖菌株回收测数所用缓冲液为 0.1 mol/L 的 PBS (pH8.0)。

1.1.4 主要试剂和仪器:DNA maker、克隆载体 pMD18-T、DNA 聚合酶、T4 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司;利福平、氨基青霉素均购自上海生工生物工程技术有限公司。BH-2 光学显微镜(Olympus 公司),H-600A 透射电子显微镜(Hitachi 公司),T-Gradient PCR 仪(Biometra 公司)。

1.2 内生细菌菌株的分离和纯化

桑树内生细菌菌株的分离、纯化均按照参考文献[11]进行。

1.3 内生拮抗菌株的筛选及 Lu10-1 菌株抑菌谱的测定

采用对峙培养法筛选内生拮抗菌株:取桑炭疽病菌和桑粘格孢菌菌饼($\Phi=5$ mm)分别置于 PDA 平板中央,将分离到的菌株点接在平板边缘距中心 25 mm 处,每处理重复 3 次,28 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后观察抑菌效果;采用抑菌圈法测定对上述两菌株均具拮抗作用的内生菌株 Lu10-1 对多种植物病原真菌和细菌的抑菌谱:将 Lu10-1 菌株接种到 200 mL NB 培养基中,30 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 96 h,收集发酵液,经 8000 r/min 离心 10 min 后,取上清液用 0.22 μ m 细菌过滤器过滤,无菌滤液用于抑菌谱的测定;制备病原细菌(1×10^8 cfu/mL)和病原真菌(孢子浓度 5.0×10^7 个/mL)菌悬液,分别取 200 μ L 菌悬液涂布 PDA 固体平板培养基,用直径 0.5 cm 的打孔器在平板上打孔,孔中加入 Lu10-1 菌株发酵液无菌滤液,平放于 28 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中培养,3~5 d 后测量抑菌圈大小,每处理重复 3 次。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 菌体形态、培养特征观察及生理生化指标测定:菌体形态观察、菌株培养特征观察、需氧性和运动性测定、生长温度测定、耐盐试验、柠檬酸盐利用试验、触酶试验、脲酶试验、鸟氨酸脱羧酶试验、糖醇类发酵试验、硝酸盐还原试验、亚硝酸盐还原试验、反硝化试验、淀粉水解、精氨酸水解、明胶液化、吲哚试验和 H₂S 产生试验,均参照文献^[10,12]的方法进行。

1.4.2 细菌基因组 DNA 的提取及(G+C)mol%值测定:参照文献[13]的方法提取基因组 DNA,采用

Katayama-Fujimura 等^[14]的方法测定(G+C)mol%值。

1.4.3 16S rRNA 基因序列测定及其系统进化树的构建:以细菌的基因组 DNA 为模板,用细菌 16S rRNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增。引物序列为:R:5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3';F:5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3^[15]。PCR 反应条件为:94 10 min;94 1 min,54 1.5 min,72 2 min,35 个循环;72 10 min。扩增产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳分离,DNA 胶回收试剂盒回收纯化目的片段后,克隆至 pMD18-T 载体,转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在氨苄抗性平板上进行蓝白斑筛选,将阳性克隆寄至上海博亚生物工程有限公司测序。对测序得到的 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 分析([http://](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST),根据 BLAST 分析所获得的 16S rRNA 基因序列,利用 DNAMAN 软件构建系统进化树,使用 Neighbor-Joining 法进行 1000 次步长计算。

1.4.4 *recA* 基因特异引物 PCR 检测法鉴定 Lu10-1 菌株的基因型:以细菌的基因组 DNA 为模板,用洋葱伯克霍尔德氏菌中各基因型 *recA* 基因的特异引物进行 PCR 扩增。引物共 10 对,包括 Bcc *recA* 基因引物和基因型 I~VIII 引物(表 1)^[16],缺少基因型 IX 引物。PCR 扩增条件为:94 5 min;94 50 s,退火 40 s (各退火温度见表 1),72 60 s,30 个循环;72 5 min。所得 PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳进行分离检测。

表 1 洋葱伯克霍尔德氏菌群(Bcc)中各基因型 *recA* 基因的特异引物
Table 1 Bcc-specific *recA* primers

Species name	Primer name	The sequence of primers(5' 3')	PCR-annealing temperature/	Product size/bp
<i>B.cepacia</i> Complex	BCR1	TGACCGCCGAGAAGAGCAA	58	1 042
	BCR2	CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC		
<i>B.cepacia</i> Genomovar	BCRG11	CAGGTCGTCTCCACGGGGT	62	492
	BCRG12	CACGCCGATCTTCATACGA		
<i>B.cepacia</i> Genomovar	BCRG21	CGGCGTCAACGTGCCGGAT	62	714
	BCRG22	TCCATCGCCTCGGCTTCGT		
<i>B.cepacia</i> Genomovar -A	BCRG3A1	GCTCGACGTTCAATATGCC	62	378
	BCRG3A2	TCGAGACGCACCGACGAG		
<i>B.cepacia</i> Genomovar -B	BCRG3B1	GCTGCAAGTCATCGCTGAA	60	781
	BCRG3B2	TACGCCATCGGGCATGCT		
<i>B.cepacia</i> Genomovar	BCRG41	ACCGGCGAGCAGGCGCTT	64	647
	BCRG42	ACGCCATCGGGCATGGCA		
<i>B.cepacia</i> Genomovar	BCRG51	GGGCGACGGCGACGTGAA	62	378
	BCRG52	TCGGCCTTCGGCACCAGT		
<i>B.cepacia</i> Genomovar	BCRG61	TGACCGCCGAGAAGAGCAA	67	135
	BCRG62	CGAGCGACCGGTTCGAT		
<i>B.cepacia</i> Genomovar	BCRG71	GTCGGGTAAAACCACGCTG	62	810
	BCRG72	ACCGCAGCCGCACCTTCA		
<i>B.cepacia</i> Genomovar	BCRG81	TACGGTCCGGAATCGTCG	61	473
	BCRG82	CGCACCGACGCATAGAAT		

1.5 菌株内生定殖测定

1.5.1 内生细菌 Lu10-1 的抗利福平(Rif)及氨苄青霉素(Amp) 突变菌株的筛选:将供试菌株转入含 5 μ g/mL Rif 的 NA 平板培养基上划线培养,挑取可以生长的突变体菌株,再接入同一 Rif 浓度的 NA 培养基,传代 1 次后转入含 10 μ g/mL Rif 浓度的培养基上,直至筛选出在含有 300 μ g/mL Rif 的 NA 培养基上能稳定生长,菌落形态及对病原菌的拮抗作用等保持不变的 Lu10-1 突变体菌株。将获得的突变菌株以相同

方法进一步筛选得到稳定抗 Amp (300 μ g/mL)的双抗药性突变菌株,命名为 Lu10-1R。

1.5.2 双抗药性突变菌株 Lu10-1R 桑树体内定殖测定接种方法:将双抗药性突变菌株 Lu10-1R 在含 Rif (300 μ g/mL)和 Amp (300 μ g/mL)的 NB 培养基中振荡培养(28 $^{\circ}$ C,180 r/min) 24 h 后用 PBS 缓冲液稀释至约 1.5×10^8 cfu/mL,分别采用以下不同方法接种桑苗。浸种接种:用上述突变菌株培养液和无菌水分别浸泡桑树种子 24 h,用清水洗净种子表面的细菌后转接到

1/2 MS 固体培养基上, 置于 25 °C 恒温箱中培养, 待子叶完全展开后第 1、3、5、7、10、14、21、30 和 45 天取全株进行内生细菌分离; 浸根接种: 用上述突变菌株培养液和无菌水分别浸泡桑树无菌试管苗根部 12 h 后, 将试管苗移栽到无菌土中; 涂叶接种: 用无菌药棉蘸取菌株培养液和无菌水分别涂抹嫁接苗叶片, 接种后保湿 5 天; 针刺接种: 用无菌解剖针在嫁接苗茎部和基部叶片穿刺造成伤口, 用无菌药棉蘸取菌株培养液和无菌水分别敷于伤口处, 接种后保湿 5 天; 分别于浸根、涂叶、针刺接种后第 1、7、14、21、28、35、42 和 49 天取其根、茎、叶进行内生细菌分离。

1.5.3 双抗药性突变菌株 Lu10-1R 的回收与计数 称取上述各处理植株样品 0.2 g, 经 75% 酒精浸泡 30 s 后, 用 0.1% 升汞浸泡灭菌 5 min, 再用无菌水洗涤 6 次, 取灭菌样品在 NA 平板上做印迹检验表面灭菌效果。将样品晾干后剪碎并加入 1 mL 无菌水磨碎, 静置 15 min 后吸取上清液 100 μ L 做梯度稀释 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 分别取 100 μ L 上清液及稀释液涂布含 Rif (300 μ g/mL) 和 Amp (300 μ g/mL) 的 NA 培养基平板, 每稀释浓度重复 3 次, 置于 30 °C 恒温箱中培养 2~3 d 后, 计菌落数。根据每皿出现菌落数折算为每克鲜重组织中的细菌数 (cfu/g)。回收菌株命名为 Lu10-1P。

1.5.4 回收菌株 Lu10-1P 的鉴定及拮抗作用测定 结合原始菌株的主要鉴定指标对回收菌株进行形态观察、常规染色和主要的生理生化指标的测定; 回收菌株拮抗作用的测定方法同 1.3 中所述, 以原始菌株为对照。

2 结果和分析

2.1 内生细菌的分离和拮抗菌株筛选

从各品种桑树叶片中共分离得到内生细菌 116 株, 从中筛选出了 6 株对桑炭疽病菌 (*Colletotrichum morifolium*)、桑粘格孢菌 (*Septogloeum mori*) 均有较明显抑制作用的菌株, 其中, 分离自农桑 14 号叶片中的一株细菌其抑菌带最宽, 拮抗效果最明显, 将其命名为 Lu10-1。进一步测定该菌株对 12 种植物病原真菌和病原细菌的抑菌活性, 发现其抑菌谱较广 (表 2)。因此, 选用 Lu10-1 菌株作进一步的研究工作。

表 2 Lu10-1 菌株的抑菌谱
Table 2 Antimicrobial spectra of strain Lu10-1

Plant pathogens	Width of inhibition zone/mm
<i>Colletotrichum morifolium</i>	26
<i>Septogloeum mori</i>	23
<i>Dothiorella gregaria</i>	11
<i>Pestalozzia theae</i>	16
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp.vasinfectum	25
<i>Rhizoctonia solani</i>	23
<i>Alternaria alternate</i>	16
<i>Botrytis cinerea</i>	20
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	29
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	12
<i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	9
<i>Clavibacter michiganens</i> subsp. <i>sepedonicum</i>	14

2.2 Lu10-1 菌株的菌体形态及菌落特征

Lu10-1 菌株菌落在 NA 平板上呈淡黄色, 圆形、表面光滑、隆起、边缘整齐, 直径 2~4 mm。菌体直杆状, 大小为 (0.5~0.7) μ m \times (1.5~1.8) μ m, 具丛生鞭毛, 革兰氏染色阴性, 无芽孢, 荚膜染色为阴性 (无荚膜), 菌株电镜照片见图 1。

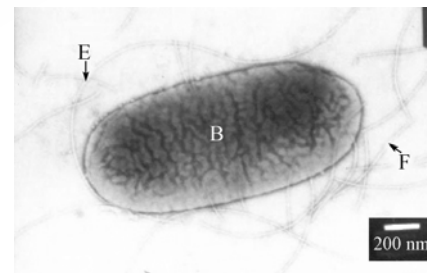


图 1 Lu10-1 菌株的电镜照片 (25000 \times)

Fig. 1 Electron micrograph of strain Lu10-1 (25000 \times). B, Bacterial cell; F, Flagellum.

2.3 Lu10-1 菌株的生理生化特征

生理生化指标测定表明, 该菌株为好氧菌, 厌氧条件下生长微弱; 最适生长温度为 33 °C, 最适 pH 5.7, 能在 2% 的 NaCl 中生长; O/F 测定结果为葡萄糖氧化产酸型; 氧化酶测定结果为弱阳性; 接触酶测定为延迟反应 (2 s 后出现气泡), 该结果可作为鉴定 *B. cepacia* 的一个重要依据而区别于其他近似菌; 该菌株可氧化分解多种单糖、多糖、氨基酸, 并可利用其作为唯一的碳源和氮源; 其它各形态和生理生化特性测定结果均见表 3。

表 3 Lu10-1 菌株的形态及生理生化特性
Table 3 Morphological and physiological characteristics of strain Lu10-1

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Morphology	rod	Voges-Proskauer	-
Mobility	+	Salt Endurance	
Spores	-	2% NaCl	+
Gram stain	-	5% NaCl	-
Requirement for oxygen Growth at	+	Utilization of sodium citrate	+
4	-	Production of indole	+
41	+	Arginine hydrolysis	-
42	-	H ₂ S production	+
O/F test	+	Ornithine decarboxylase	-
Catalase	±	Lysine decarboxylase	+
Oxidase	±	DL-alanine Acid production from	-
Starch hydrolysis	-	D- mannitol	+
Gelatin liquefaction	+	L-arainnose	+
Urease test	+	D-xylose	+
Deoxidization of nitrate	+	Maltose	-
Deoxidization of nitrite	-	(G+C) mol%	60.7
Denitrification	-		

“+” positive (growth or reaction); “-” negative (unavailable no growth or no reaction); “±” weak or delay.

2.4 16S rRNA 基因序列测定及其系统发育树的构建
以细菌的基因组 DNA 为模板, 用细菌通用引物进行 PCR 扩增, 得到一条约 1500 bp 的 DNA 片段, 回收该片段进行测序, 序列长度为 1509 bp, 在 GenBank 中的登录号为 EF546394。将该碱基序列对 NCBI 数据库进行 BLAST, 从结果中选取 9 株具有代表性的菌株, 以 16S rRNA 基因序列同源性为基础, 利用 DNAMAN 软件构建系统发育树 (图 2)。菌株

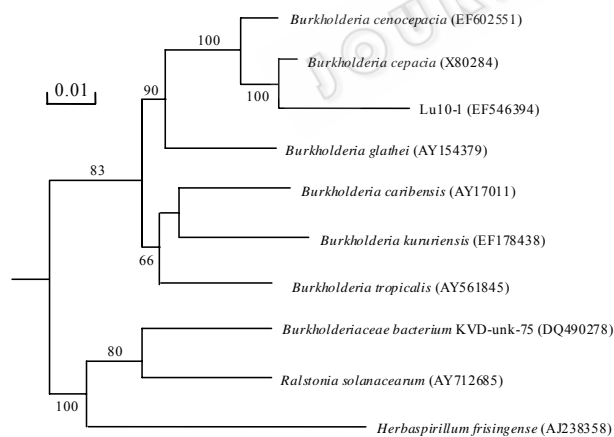


图 2 依据 16S rRNA 基因序列构建的菌株 Lu10-1 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the strain Lu10-1 based on 16S rRNA gene sequence. Numbers at the nodes are the bootstrap confidence values obtained after 1000 replicates. Support values lower than 50% are not indicated. The number of substitutions per site is indicated by the bar at the top left of phylogeny. Phylogenetic trees were generated by the neighbor-joining method based on the two-parameter Kimura correction of evolutionary distances. The GenBank accession numbers for nucleotide sequence data are shown in the brackets.

Lu10-1 的遗传进化距离与伯克霍尔德氏菌属最近, 与洋葱伯克霍尔德氏菌同处于一个最小的分支, 与已知菌株 *B. cepacia* (X80284) 的同源性达到 98%。结合 Lu10-1 菌株的形态特征、培养特征及生理生化指标测定等表型鉴定结果, 鉴定 Lu10-1 菌株为洋葱伯克霍尔德氏菌。

2.5 Lu10-1 菌株的基因型鉴定

recA 基因 Bcc 引物(BCR1/BCR2)PCR 对 Lu10-1 菌株的检测结果表明, 在 1 000 bp 左右出现一条较清晰的条带, 进一步确定该菌株为洋葱伯克霍尔德氏菌, 与表型及 16S rRNA 基因测序结果相一致。对 Lu10-1 菌株的基因型鉴定通过 Bcc 各基因型 *recA* 特异引物扩增法进行, 各引物对只能特异识别对应的基因型。结果表明, 只有引物对 BCRG11 和 BCRG12 才能特异识别 Lu10-1 菌株的基因组 DNA 作为模板进行的扩增反应(特异条带约 500 bp), 其他引物对的扩增反应均无特异条带出现, 据此鉴定 Lu10-1 菌株的基因型为 型。

2.6 内生细菌 Lu10-1 桑树体内定殖测定

2.6.1 双抗药性突变菌株 Lu10-1R 的筛选: 按 1.5.1 所述方法筛选出稳定抗 Rif (300 μ g/mL) 和 Amp (300 μ g/mL) 的双抗药性突变菌株, 其菌落形态与原始菌株基本一致。
2.6.2 不同方法接种双抗标记菌株 Lu10-1R 在桑树体内的定殖测定: 双抗突变菌株 Lu10-1R 培养液分别用浸种、浸根、涂抹、针刺等方法接种桑树结果表明(表 4), 用上述方法接种, 均可在桑树体内分离回收到目标菌株, 而对照中均未出现任何细菌菌落。由此可见, 用双抗标记法检测菌株 Lu10-1R 在桑树体内的定殖是可行的。

表 4 不同方法接种双抗标记菌株 Lu10-1R 在桑树体内的分离结果
Table 4 Isolation of Lu10-1R strain with dual-resistant label from mulberry by different inoculation methods

Inoculation methods	The isolating results of Lu10-1R strain					
	Root	Water CK	Stem	Water CK	Leaf	Water CK
Seed dipping	+	-	+	-	+	-
Root dipping	+	-	+	-	+	-
Leaf daubing	-	-	-	-	+	-
Stem and leaf scathing	-	-	+	-	+	-

“+” stands for that the bacteria isolated from mulberry tissue; “-” presents that the bacteria not isolated from mulberry tissue.

另外,浸根接种和针刺接种的分离结果表明,在桑苗的未接种部位及新生组织中能分离回收到内生细菌 Lu10-1P,证实了该内生细菌能够在桑树体内不同组织之间转移和传导。但在涂抹叶片、针刺茎叶接种的植株根部组织中未分离到目的菌株,可能由于菌株在桑树体内主要是自下而上传导的。

2.6.3 浸种接种检测菌株在桑树体内的消长动态:双抗标记菌株 Lu10-1R 培养液浸种接种的分离结果表明(图 3),菌液接种后从植株的根、茎和叶中均检测到菌株,无菌水对照和印迹平板上均未发现细菌菌落。菌液浸种接种后,菌株在植株体内的消长动态测定表明,从子叶完全展开后第 1 天开始,菌株在桑苗组织中的数量总体上呈现下降趋势,到第 20 天后菌量趋于稳定,定殖菌量约为 180 cfu/g。另外,到第 45 天还能从组织中分离到相当数量的细菌,说明 Lu10-1R 菌株能够在桑树体内长期定殖而不对桑树组织造成病害。

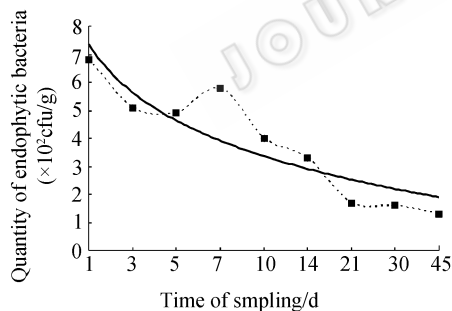


图 3 浸种接种 Lu10-1R 菌株在桑树幼苗体内的消长动态
Fig. 3 Population fluctuation of Lu10-1R strain in mulberry by dipping seed inoculation. Data denote the bacterial quantity in 1 g of fresh mulberry tissue

2.6.4 浸根接种检测菌株在桑树体内的消长动态:双抗标记菌株 Lu10-1R 培养液浸根接种的分离结果表明(图 4),菌液接种后从植株的根、茎和叶中均能检测到目标菌株,无菌水对照和印迹平板上均未发现细菌菌落。细菌浸根接种后在植株体内的消长动态测定表明,随着桑树幼苗的生长,菌株在根部定殖的菌量

整体上呈下降趋势,而在茎叶部定殖的菌量均呈现出“先增后降”的趋势,到后期各组织中菌量基本趋于稳定,根中定殖菌量约为 5.1×10^3 cfu/g,茎叶中约为 3.1×10^3 cfu/g。浸根接种后在第 1 天便能在茎叶中分离到少量目的菌株,随着植物的生长,菌株在根、茎和叶各组织中不断繁殖直到一个稳定水平。试验结果证明 Lu10-1R 菌株不但可以在桑树体内定殖,并且能以较快的速度在宿主体内传导。

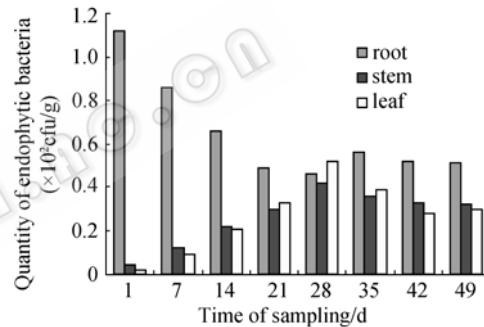


图 4 浸根接种 Lu10-1R 菌株在桑树幼苗体内的消长动态
Fig. 4 Population fluctuation of Lu10-1R in mulberry by dipping root inoculation. Data denote the bacterial quantity in 1 g of fresh mulberry tissue.

2.6.5 回收菌株常规鉴定及拮抗作用测定:形态观察、常规染色和主要生理生化指标的测定表明,回收

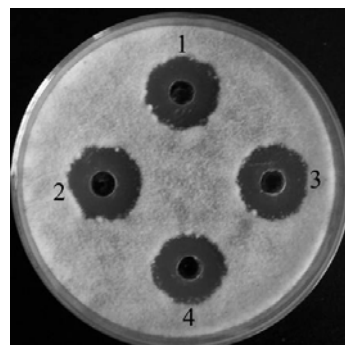


图 5 Lu10-1 原始菌株及回收菌株对桑炭疽病菌的拮抗作用
Fig. 5 Antagonism to *Colletotrichum morifolium* of wild and re-isolated Lu10-1 Strain. 1. Aseptic filtrate of wild Lu10-1 strain; 2-4. Aseptic filtrate of the Lu10-1 strain re-isolated from mulberry root, stem and leaf, respectively.

菌株的菌落特征、菌体形态、染色结果及主要的生理生化特性均与原始菌株相同。以原始菌株为对照,测定了回收菌株无菌发酵滤对桑炭疽病菌(*Colletotrichum morifolium*) 和桑丁香假单胞杆菌(*Pseudomonas syringae* pv. *mori*)等 12 株供试病原菌的拮抗作用,结果表明,回收菌株 Lu10-1P 对植物病原菌仍保持着较强的拮抗作用(图 5)。回收菌株常规鉴定及拮抗作用测定结果说明以双抗药性标记法检测 Lu10-1 菌株在宿主主体内的定殖方法可行、结果可靠,为将该菌株接种到桑树体内发挥生防作用提供了重要依据。

3 讨论

洋葱伯克霍尔德菌可产生硝吡咯菌素、吩嗪、苯基吡咯、Cepaciamide A、Cepacidine A 等多种次生代谢物质而发挥生防作用^[17,18]。自 20 世纪 80 年代,Bcc 开始作为生物杀虫剂和生物杀菌剂先后在美国正式注册,如 Type wisconsin、Deny、Blue circle 等;该菌在我国也主要作为生物农药在使用,于 1996 年注册了类似的生物产品——“亚宝”^[19]。Parke 等^[20]报道 Bcc 菌株可用于防治腐霉病和立枯病等土传病害,以及苹果灰霉病、梨青霉病和桃褐腐病等多种植物茎叶部病害。本文中 *B. cepacia* Lu10-1 是作者从桑树叶片中分离得到的内生拮抗细菌,其对 9 株供试植物病原真菌、2 株革兰氏阴性及 1 株革兰氏阳性病原细菌均表现出较好的抗菌活性;室内防治试验发现,先接种 Lu10-1 菌株,5 天后针刺接种桑炭疽病菌、桑粘格孢菌的桑树植株发病率明显低于只接种病原菌的植株,初步证明了 Lu10-1 菌株在桑树体内也具有良好的防效。国内外关于植物内生性 Bcc 菌株的研究报道不多,且未见关于内生性菌株的抗菌机制的研究。初步研究发现,Lu10-1 菌株发酵性状良好,抗菌谱广,但抗菌物质热稳定性较差,抗菌物质特性与目前关于 Bcc 菌株抗菌代谢产物的报道存在差异^[17];另外,与植物表生等其他来源的 Bcc 菌株相比,Lu10-1 菌株定殖于植物组织内部,避开温度、紫外线、营养贫乏等不利因素的影响,相对安全稳定的生存环境、营养来源可能会影响到该菌的抗菌机制,特别是抗菌代谢物的类型。因而,Lu10-1 菌株分泌的抗菌物质可能与其它来源的 Bcc 生防菌株不同,其具体的抗菌机理还有待于进一步的研究。

Bcc 除了在农业上展示出良好应用前景之外,一些 Bcc 菌株还是植物病原菌、人体条件致病菌以及诱发植物霜冻的冰核细菌^[16]。因此,Lu10-1 菌株是否

是致病菌,将直接关系到其能否作为生防菌进行开发应用。本研究采用 *recA* 基因特异引物 PCR 检测法鉴定 Lu10-1 菌株为 *Burkholderia cepacia* genomovar ,而非包含人体条件致病菌株的 genomovar、^[21];菌株的内生定殖测定试验证明了该菌株对桑树没有任何致病性,除此之外作者还对家蚕和小鼠进行了致病性测定试验,结果表明菌株对其生长发育无不良影响。作者下一步拟对该菌株进行系统的应用风险评估,以期菌株在桑树乃至其它经济作物、农作物上的生防应用提供依据。

John 等^[22]首次报道从棉花、玉米等的不同组织中分离到内生洋葱伯克霍尔德氏菌,丰富了人们对 Bcc 菌株生物多样性的认识,但并未阐明 Bcc 菌株的分类地位;近年,陆续有研究者从不同植物中分离到内生 Bcc 菌株,但均未涉及菌株的内生定殖规律研究。本研究采用 Lu10-1 菌株的抗药性标记法,证明了菌株可进入桑树体内长期定殖,确认了该洋葱伯克霍尔德氏菌菌株的内生性;此外,试验定量地研究了菌株在植物体内的动态变化,证实了该内生菌株能够在宿主整个体内转移传导。研究结果为系统开展内生拮抗菌株 Lu10-1 在桑树上的生物防治提供了依据。但由于抗药性标记法的局限性,本研究中作者无法掌握细菌进入宿主的过程、主要侵入位点、定殖部位及传导途径等具体的侵染定殖规律。为此,作者用 GFP 基因标记了 *Burkholderia cepacia* Lu10-1,结合激光共聚焦显微镜观察该菌的侵染定殖规律,以更为直观的方法揭示内生细菌的内生现象和内生机制,研究正在进行中。

参 考 文 献

- [1] 向仲怀. 中国家蚕基因组与 21 世纪丝绸之路. 蚕业科学 (*Acta Sericologica Sinica*), 2003, 29 (4): 321-322.
- [2] 孙绪良, 刘振宇. 桑树病虫害防治. 北京: 中国农业科技出版社, 1996, 185-189.
- [3] Barraquio WL, Revilla L, Ladha JK. Isolation of endophytic bacteria diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant and Soil*, 1997, 194: 15-24.
- [4] 石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展. 生态学报 (*Acta Ecologica Sinica*), 2006, 26(7): 2395-2400.
- [5] sCoenye T, Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*, 2003, 5 (9): 719-729.
- [6] 罗远婵, 谢关林. 伯克氏细菌是我们的敌人还是朋友? 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45(4): 647-652.
- [7] Peter ARV. Polyphasic Taxonomy Inpractice: the *Burkholderia cepacia* challenge. *WFCC Newsletter*, 2001, 34: 17-25.
- [8] Ramesh KS, Ravi PNM, Hemant KJ, et al. Isolation and identifi-

- cation of natural endophytic rhizobia from rice (*Oryza sativa* L.) through rDNA PCR-RFLP and sequence analysis. *Current Microbiology*, 2006, 52 (2): 345–349.
- [9] 谭小艳, 黄思良, 任建国, 等. 柑桔溃疡病内生拮抗细菌 Bc51 的研究. *植物病理学报*(*Acta Phytopathologica Sinica*), 2007, 7 (1): 9–17.
- [10] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986, 65-70, 178–180.
- [11] 路国兵, 冀宪领, 张瑶, 等. 桑树内生细菌的分离及生防益菌的筛选. *蚕业科学*(*Acta Sericologica Sinica*), 2007, 33(3): 346–351.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 267–295.
- [13] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学技术出版社, 2001, pp36–39.
- [14] Katayama-Fujimura Y, Komatsu Y, Kuraishi H, *et al.* Estimation of DNA base composition by high performance liquid chromatography of its nuclease P1 hydrolysate. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1984, 48: 3169–3172.
- [15] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697–703.
- [16] Eshwar M, Teresa A, Joanna B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nature Review Microbiology*, 2005, 3(2): 144–156.
- [17] Banna N, Winkelmann G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 85(1): 69–781.
- [18] Alison H, Govan J, Richard G. Could the agricultural use of *Burkholderia cepacia* pose a threat to human health? *Emerging Infectious Diseases*, 1998, 4: 221–227.
- [19] 张立新, 谢关林, 罗远婵. 洋葱伯克氏菌在农业上应用的利弊探讨. *中国农业科学*(*Scientia Agricultura Sinica*), 2006, 39(6): 1166–1172.
- [20] Parke JL, Gurian-Scherman D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual Review of Phytopathology*, 2001, 39: 225–258.
- [21] Eshwar M, Jocelyn B, Sean KB, *et al.* DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars and . *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38: 3165–3173.
- [22] John AM, Joseph WK. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and soil*, 1995, 173: 337–342.

Identification and colonization of an antagonistic endophytic *Burkholderia cepacia* Lu10-1 isolated from mulberry

Zhimei Mu^{1*}, Guobing Lu¹, Xianling Ji¹, Yingping Gai²,
Yanwen Wang¹, Huiju Gao¹, Chuanyong Cha¹

⁽¹⁾College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

⁽²⁾College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

Abstract: [Objective] To identify and colonize an antagonistic bacterium, Lu10-1, isolated from the healthy mulberry. [Methods] Strain Lu10-1 was identified based on the analysis of its 16S rRNA gene sequence homology, the physiological and biochemical characteristics, and the *recA* gene sequence comparison. A spontaneous Lu10-1 mutant tolerant to rifampicin and ampicillin were isolated by gradually increasing the concentration of the two antibiotics. The mutants were used to assess the ability of Lu10-1 to colonize mulberry by different inoculation approaches, including stem and leaf acupuncture, seed soaking, root soaking and leaf daubing. [Results] Lu10-1 belonged to *Burkholderia*. In the phylogenetic tree, Lu10-1 was the closest relative to *B. cepacia* (X80284) with more than 98% sequences similarity. The 16S rDNA sequences of Lu10-1 have been registered at GenBank database under the accession number EF546394. Moreover, our results also indicated that the population of strain Lu10-1 living in the mulberry tissues decreased as a whole after the treatment of seed soaking. The bacterial density inside the mulberry seedling tissues decreased to a steady level 20 days after germination. The population of strain Lu10-1 in mulberry leaves and stems after the treatment of root soaking increased first and then decreased. [Conclusion] The strain Lu10-1 fell into *Burkholderia cepacia* genomovar I as a single species. Furthermore, the strain Lu10-1 could colonize and transmit in mulberry, while its resistance to plant pathogen was not changed during the process of colonization compared to the original strains. Taken together, we suggest that *Burkholderia cepacia* Lu10-1 will play an important role in the biological control of mulberry disease.

Keywords: mulberry; endophytic bacteria; *Burkholderia cepacia*; identification; colonization

Supported by the Natural Science Foundation of Shandong (2007ZRB01872) and the Science and Technology Department Foundation of Shandong Province (2006851)

*Corresponding author. Tel: +86-538-8241315; Fax: +86-538-824164; E-mail: zmeimu@sdau.edu.cn

Received: 30 July 2007/ Revised: 26 November 2007