

# 洋葱伯克氏菌基因型的鉴定及其在苜蓿模型上的毒力分析

张立新<sup>1,2</sup>, 宋江华<sup>3</sup>, 谢关林<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036)

(<sup>2</sup>浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029)(<sup>3</sup>安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036)

**摘要:**【目的】证实来自我国农业和医院环境中部分洋葱伯克氏菌的基因型并通过苜蓿植物模型探测不同基因型对人体的可能毒力。【方法】采用洋葱伯克氏菌基因型的 PCR 特异性扩增技术对来源于根围、土壤和医院中的 57 株洋葱伯克氏菌进行了基因型的鉴定, 并利用苜蓿植物模型对这些基因型菌株进行了毒力探测。【结果】获得 4 种不同的基因型, 包括基因型 A、B、C 和 D。来源于医院的基因型 A 菌株以及根围的基因型 B 菌株均对苜蓿幼苗有较强的毒力, 其对苜蓿幼苗的平均发病率分别达到 69%、68% 和 55%, 与农田环境中基因型 C 和 D 对苜蓿幼苗的发病率相比, 表现出显著的差异性。【结论】农田环境中洋葱伯克氏菌的基因型在苜蓿模型上的毒力差异大, 根围的基因型 B 菌株对苜蓿幼苗具有强毒力, 其毒力程度接近于医院致病基因型 A 菌。

**关键词:** 洋葱伯克氏菌; 基因型; 苜蓿; 毒力

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1445-06

洋葱伯克氏菌广泛分布于自然环境中, 包括土壤、水、植物及根围等, 在农业领域中具有生物防治、生物降解和促进植物生长等多种功能<sup>[1]</sup>。同时它也存在于医院环境中, 是临床上重要的人体条件致病菌之一。洋葱伯克氏菌主要感染肺囊性纤维化患者, 导致“洋葱伯克氏菌综合症”, 在国内外已有不少死亡病例<sup>[1, 2]</sup>。该菌在我国临床上的分离率也呈逐年增加趋势, 已成为临床上重要的条件致病菌<sup>[3-5]</sup>。因此, 洋葱伯克氏菌作为生防菌剂在田间的应用已引起国内外高度关注。

近年来的研究表明该菌不是一个种, 而是一组表型相近但基因型不同的菌群, 即洋葱伯克氏菌群 (*Burkholderia cepacia* complex, 简称 Bcc)。到目前为止, 已发现 Bcc 包括 10 个不同的基因型( ~ )<sup>[6-11]</sup>。研究者试图通过发现和挖掘致病基因来区分 Bcc 的致病株和非致病株<sup>[1]</sup>, 但由于采用动物模型(小白鼠)

筛选毒力因子花费昂贵, 而且周期长, 因而延缓了致病因子的发现及其致病机理的研究进展。

当前植物侵染模型被认为是一种有效的研究动物致病细菌的分子致病机制的手段。采用植物模型和动物致病细菌的突变体可以较容易的筛选病菌的毒力因子<sup>[12]</sup>。近年来研究表明苜蓿可以作为评估 Bcc 毒力因子侵染的模型<sup>[13]</sup>。针对国内外自然环境中不同来源 Bcc 基因型的毒力研究相对较少的状况, 本研究拟采用苜蓿植物模型对中国农田环境和医院中的 Bcc 菌株进行毒力探测, 从而为评估不同 Bcc 基因型的安全性提供重要依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 标准菌株 LMG1222 由比利时根特大学国家菌种收藏中心 Swings 教授提供。57 株 Bcc 菌株

基金项目: 国家自然科学基金(30871655, 30671397); 安徽省教育厅自然科学基金(KJ2008B212)

\*通讯作者: Tel: +86-571-86971412; E-mail: glxie@zju.edu.cn

作者简介: 张立新(1978-), 男, 河北定兴人, 讲师, 博士, 研究方向为植物细菌学。E-mail: zhanglixinjoyce@163.com

收稿日期: 2008-06-23; 修回日期: 2008-08-01

来源于中国的农田环境和医院, 其中 43 株来源于农田环境, 包括玉米和水稻根围, 农田土壤; 14 株来源于临床样本, 主要是痰、血液和深静脉导管, 由中国医科大学附属第一医院、浙江省人民医院和温州市第二人民医院提供。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** *Taq* DNA 聚合酶购自北京鼎国生物技术有限责任公司, 引物由上海生工生物工程技术服务公司合成, 苜蓿种子购买于北京中种草业有限公司。

## 1.2 Bcc 菌株的基因型鉴定

在分离和收集的 57 株 Bcc 菌株中, 其中来源于水稻和玉米根围的 37 株 Bcc 菌已经进行了基因型的鉴定和划分<sup>[14]</sup>, 包括基因型 (*B. cepacia*) 4 株、基因型 B (*B. cenocepacia recA* lineage B) 12 株、基因型 (*B. vietnamiensis*) 18 株、基因型 (*B. pyrrocinia*) 3 株。其它来源于农田土壤和医院的 20 株 Bcc 菌的基因型鉴定在本试验中进行, 采用基因型的 PCR 特异性扩增技术对 Bcc 菌株的基因型进行检测<sup>[15]</sup>。

## 1.3 Bcc 基因型对苜蓿幼苗的毒力测定

**1.3.1 供试细菌的准备:** 将待测的 Bcc 菌株从-70 的低温冰箱内取出, 解冻后, 用划线法将细菌液接种于 NA 培养基平板上活化, 在 28 恒温箱内培养 24~48 h 后, 用接种环挑取少量细菌培养物分别接种到 NA 液体培养基中, 28 下 160 r/min 振荡培养 24~48 h, 取浓度约  $10^8$  CFU/mL 的细菌液接种苜蓿幼苗。

**1.3.2 苜蓿种子处理:** 苜蓿种子参照 Bernier 等<sup>[13]</sup>的方法并结合本实验室条件进行如下处理。将苜蓿种子用 98% 的浓硫酸浸泡 40 min (约 10 mL 浸 300 颗种子), 500 mL 灭菌水冲洗 4~6 次, 然后将种子放于 60 mL 的灭菌水中, 32 150 r/min 振荡培养 6~8 h, 清洗 3~4 次, 同等条件下于 60 mL 的灭菌水中振荡培养过夜, 次日用灭菌水清洗 3~4 次后, 用灭菌的镊子将均匀一致的发芽苜蓿种子摆放到 1% 的水琼脂平板上, 每皿摆放 10 颗种子, 放于人工气候箱中 37、95% 的相对湿度条件下光照黑暗交替培养约 48~72 h, 直至子叶展开。

**1.3.3 苜蓿幼苗接种:** 将已培养好的细菌发酵液 ( $10^8$  CFU/mL) 稀释成  $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$  和 10 CFU/mL 后, 分别取各稀释度的菌悬液 10  $\mu$ L, 针刺接种于苜蓿幼苗子叶上, 每颗苗接种一片子叶, 每细菌重复 3 次, 每重复 20 颗种子, 同时以不接种和接种 0.85% 的生理盐水做为阴性对照。待苜蓿幼苗接种细菌后, 将培养皿放于人工气候箱中 37、95% 的相对湿度下光照

黑暗交替培养, 7 d 后观察和记录幼苗发病症状。

## 1.4 Bcc 菌 BCESM 和 *cblA* 毒力基因的检测

BCESM 和 *cblA* 基因的检测均采用 PCR 特异性扩增技术进行<sup>[16, 17]</sup>。BCESM 基因的特异性引物为 BCESM1 (5'-CCACGGACGTGACTAACA-3') 和 BCESM2 (5'-CGTCCATCCGAACACGAT-3')。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L。PCR 扩增在 PTC-200 扩增仪上进行, 94 3 min, 94 1 min, 63 1 min, 72 2 min, 共 30 个循环, 最后 72 下延伸 10 min。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

*cblA* 基因的特异性引物为 *cblA*1 (5'-CCAAAGG-ACTAACCCA-3') 和 *cblA*2 (5'-ACGCGATGTCCATC-ACA-3'), PCR 反应体系为 20  $\mu$ L。扩增程序如下: 94 3 min 后 94 1 min, 60 1 min, 72 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 下延伸 10 min。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果

### 2.1 Bcc 基因型的鉴定

采用基因型的 PCR 特异性扩增技术对来源于土壤和医院的 20 株 Bcc 菌进行了基因型鉴定和划分, 共得到了 3 种不同的基因型, 包括基因型、A (*B. cenocepacia recA* lineage A) 和 B (*B. cenocepacia recA* lineage B)。在来源于医院的 14 株 Bcc 菌中, 鉴定到基因型 5 株、基因型 A 9 株; 而在来源于农田土壤的 6 株 Bcc 菌中, 则获得基因型 3 株、基因型 B 3 株。各基因型代表菌 *recA* 基因的 PCR 特异性扩增条带如图 1 所示。

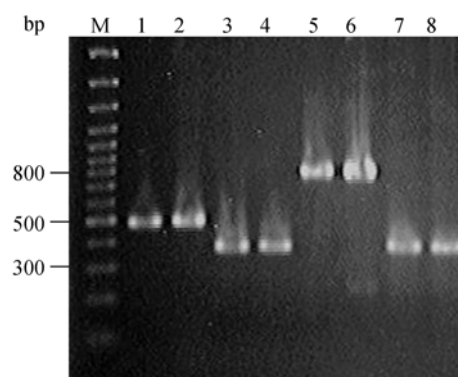


图 1 采用基因型特异性引物扩增的 *recA* 基因片段

Fig. 1 PCR amplicons of the *recA* gene using species-specific primers. 1 and 2, *B. cepacia* strains from soil; 3 and 4, *B. cenocepacia recA* lineage A strains from clinical samples; 5 and 6, *B. cenocepacia recA* lineage B strains from maize rhizosphere; 7 and 8, *B. vietnamiensis* strains from soil; M, 100 bp ladder marker (Fermentas).

## 2.2 Bcc 菌株在苜蓿幼苗上的毒力症状

苜蓿幼苗接种 Bcc 细菌 7 d 后,发病的幼苗表现出接种点周围坏死、黄化和根部短小的症状,而对照幼苗则表现出良好的健康状态(图 2)。在最初用医院致病菌基因型 IIIA 菌株 Y20 和 Y10 进行苜蓿幼苗接种时,分别采用  $10^6 \sim 10^1$  CFU/mL 细菌浓度对苜蓿幼苗接种,接种 7 d 后,以  $10^6$  CFU/mL 的浓度接种,苜蓿幼苗 85% 以上均发病,表现为幼苗黄化,根畸形,接种点坏死;而以  $10^2$  CFU/mL 浓度接种的苜蓿幼苗仅有 40% 发病,发病程度低。因此,试验采用细菌浓度  $10^6$  CFU/mL 来对各种 Bcc 基因型菌株进行苜蓿幼苗接种。

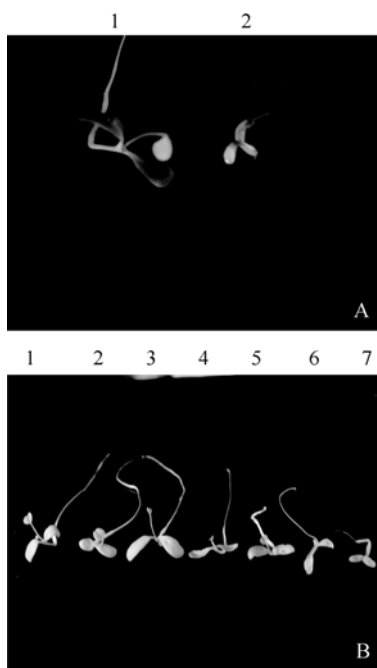


图 2 来源于医院的基因型 IIIA 菌株 Y20 以  $10^6$  CFU/mL 的浓度接种在苜蓿幼苗上的毒力症状

Fig. 2 Symptoms of wounded alfalfa seedlings after inoculation with  $10^6$  CFU/mL of *B. cenocepacia recA* lineage A strain Y20 from clinical samples. In panel A, the seedling of sample 1 was inoculated with saline, and the seedling of sample 2 was inoculated with strain Y20. In panel B, the seedlings of samples 1-3 were inoculated with saline, and the seedlings of samples 4-7 were inoculated with strain Y20.

## 2.3 Bcc 菌株在苜蓿幼苗上的毒力测定结果

**2.3.1 同基因型内不同菌株在苜蓿幼苗上的毒力比较:** 采用苜蓿植物模型对 57 株来源于自然环境和医院的 Bcc 菌株进行了毒力测定。由表 1 可以看出,在各基因型 A、B、和 内,大部分菌株对苜蓿幼苗的毒力程度相当,在 5% 水平上没有显著性差异;但在基因型 内,来源于医院和农田环境的 Bcc 菌株对苜蓿幼苗的毒力

表现出显著性差异,医院的基因型 菌株对苜蓿幼苗具有较强的毒力,其对苜蓿幼苗的发病率达到 60%~73%,而农田环境中的基因型 菌株则对苜蓿幼苗的毒力较低,其对苜蓿幼苗的发病率在 30% 以下。

**2.3.2 医院和农田环境中各基因型在苜蓿幼苗上的毒力比较:** 在测试的 4 种基因型中(表 2),农田环境中基因型 V 和 IX 对苜蓿幼苗毒力很低,其对苜蓿幼苗的平均发病率分别为 5% 和 9%,而基因型 B 对苜蓿幼苗毒力很强,对苜蓿幼苗的平均发病率达到 55%,与基因型 和 对苜蓿幼苗的发病率相比,具有显著的差异性 ( $p < 0.01$ );来源于医院的基因型 和 A 均对苜蓿幼苗有较强的毒力,其分别对苜蓿幼苗的平均发病率达到 69% 和 68%,与农田环境中基因型 和 对苜蓿幼苗的发病率相比,均存在显著性差异 ( $p < 0.01$ ),但与基因型 B 对苜蓿幼苗的发病率相比差异不明显 ( $p > 0.05$ )。这说明来源于农田环境的基因型 III B 菌株与医院致病基因型 A 和 的菌株对苜蓿幼苗的毒力相当,表明农田环境中的基因型 B 菌株对人体可能有潜在的毒力。

## 2.4 毒力基因 BCESM 和 *cblA* 的 PCR 检测

对来源于医院的 14 株 Bcc 菌进行了 BCESM 和 *cblA* 两个毒力基因的检测,结果未检测到这两个基因。

## 3 讨论

近年来研究表明,苜蓿可以作为医院呼吸道感染细菌的毒力测定植物模型。Silo-Suh 等<sup>[18]</sup>利用苜蓿和老鼠对人体条件致病菌—铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)进行了毒力试验,并观察到对老鼠产生毒力作用的致病菌株,同样能在苜蓿上表现出相关性的毒力结果。由于植物模型具有周期时间短,不需要特定的设备,易操作等优点,因而不少研究者相继寻找适合的植物模型来替代动物模型。如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)已被作为研究铜绿假单胞菌毒力因子的模型,并证实了致病菌的毒力因子在植物和动物上的致病性均是保守的<sup>[19]</sup>。

为了解我国自然环境中 Bcc 对人体的潜在毒力情况,本研究对分离和收集于水稻和玉米根围、土壤以及医院的 Bcc 菌株在苜蓿植物上进行了毒力测定。结果表明,来自于医院的 Bcc 基因型 A 和 菌株促使苜蓿幼苗子叶产生坏死斑,严重的幼苗黄化或白化,且对苜蓿幼苗的发病率很高。这些 Bcc 菌分离于

表 1 Bcc 菌株在苜蓿幼苗上的毒力  
Table 1 The virulence of *B. cepacia* complex strains tested on alfalfa seedlings

Genomovars	Sources	Percentage alfalfa seedlings symptom /%		Genomovars	Sources	Percentage alfalfa seedlings symptom /%	
<i>B. cepacia</i>				<i>B. vietnamiensis</i>			
LMG1222	Onion	33	c	R419	Rice rhizosphere	3	cd
M297	Maize rhizosphere	20	de	R398	Rice rhizosphere	7	bcd
M260	Maize rhizosphere	13	e	R425	Rice rhizosphere	3	cd
M239	Maize rhizosphere	20	de	R440	Rice rhizosphere	3	cd
R389	Rice rhizosphere	17	de	M258	Maize rhizosphere	10	abc
Y6	Hospital, sputum	73	a	M246	Maize rhizosphere	3	cd
T103	Hospital	73	a	R405	Rice rhizosphere	0	d
Y27	Hospital, sputum	67	ab	R428	Rice rhizosphere	7	bcd
Y28	Hospital, sputum	73	a	R430	Rice rhizosphere	13	ab
Y2	Hospital, sputum	60	b	R433	Rice rhizosphere	0	d
S39	Soil	17	de	R388	Rice rhizosphere	13	ab
S189	Soil	27	cd	R414	Rice rhizosphere	0	d
S26	Soil	13	e	R439	Rice rhizosphere	0	d
<i>B. cenocepacia recA</i> lineage B				R449	Rice rhizosphere	0	d
M281	Maize rhizosphere	73	a	R434	Rice rhizosphere	17	a
M292	Maize rhizosphere	67	ab	R418	Rice rhizosphere	7	bcd
M293	Maize rhizosphere	60	ab	R385	Rice rhizosphere	3	cd
M317	Maize rhizosphere	80	a	R386	Rice rhizosphere	7	bcd
R416	Rice rhizosphere	60	ab	S21	Soil	7	bcd
M226	Maize rhizosphere	53	ab	S23	Soil	3	cd
M374	Maize rhizosphere	40	bc	S27	Soil	0	d
M372	Maize rhizosphere	43	bc	<i>B. cenocepacia recA</i> lineage A			
M243	Maize rhizosphere	17	c	Y10	Hospital, sputum	87	a
M364	Maize rhizosphere	53	ab	Y20	Hospital, sputum	87	a
M259	Maize rhizosphere	60	ab	Y14	Hospital, sputum	77	ab
M257	Maize rhizosphere	57	ab	Y24	Hospital, sputum	77	ab
<i>B. pyrrocinia</i>				Y30	Hospital, sputum	67	ab
M301	Maize rhizosphere	13	a	Y25	Hospital, vessels	63	ab
M318	Maize rhizosphere	10	a	Y39	Hospital, sputum	57	bc
M316	Maize rhizosphere	3	a	Y12	Hospital, sputum	63	ab
				Y34	Hospital, blood	37	c

Analysis of variance was performed at 5% level by LSD methods among the same genomovar. The same lowercase represents insignificant at 5% level.

表 2 各基因型在苜蓿幼苗上的毒力分析  
Table 2 Virulence analysis of *B. cepacia* complex genomovars on alfalfa seedlings

Sources	Genomovars	Numbers of strains	Seedlings with symptoms/%
Environment inches	<i>B. cepacia</i>	8	20 ± 7
	<i>B. cenocepacia recA</i> lineage B	12	55 ± 16
	<i>B. vietnamiensis</i>	21	5 ± 5
	<i>B. pyrrocinia</i>	3	9 ± 5
Clinical samples	<i>B. cepacia</i>	5	69 ± 6
	<i>B. cenocepacia recA</i> lineage A	9	68 ± 16

患者的痰、血液和深静脉导管，是免疫力低下患者的重要人体条件致病菌，主要引起患者呼吸道感染性疾病，其对苜蓿幼苗表现出的强毒力，表明了人体上的 Bcc 致病基因型 A 和 的毒力可以在苜蓿上表现出来，这与 Bernier 等<sup>[13]</sup>的研究结果一致。Bcc 基因型是临床上分离率高的致病菌，且致病力最强，曾在 CF 患者间引发洋葱伯克氏菌综合症而导致病人致

死<sup>[11]</sup>，在我国临床上也是分离率较高的基因型<sup>[15]</sup>，且在老鼠动物模型和苜蓿植物模型上的毒力呈正相关性<sup>[13]</sup>。因此，我们推断这些 Bcc 致病菌在动物模型老鼠上也应有较强的毒力，其有待于进一步证实。

来源于根围环境中的 Bcc 基因型 B 菌株也导致了苜蓿幼苗子叶黄化、产生坏死斑等，表现出与医院致病菌株相似的毒力症状，对苜蓿幼苗的发病率也很

高,与医院致病基因型 A 菌对苜蓿幼苗的发病率相比差异不显著 ( $p>0.05$ ),这说明在中国农田环境中存在潜在致病的 Bcc 菌株,其对人体造成的风险应该引起重视。然而来源于农田环境的基因型和菌株则对苜蓿幼苗的致病程度很轻,有的菌株没有致幼苗发病。这也提示我们不同的 Bcc 基因型毒力差异很大,其毒力机理以及在基因水平上哪些基因控制毒力,这些均有待于进一步研究。

目前 Bcc 菌的致病因子包括脂肪酶、蛋白酶、溶血素、脂多糖、过氧化氢酶和内毒素等。近年来研究者注意到 Bcc 致病菌株与特定的毒力基因存在相关性<sup>[20]</sup>。BCESM 基因被认为是 Bcc 菌中一种与人体致病性/毒性连锁的遗传标记,对已经注册的洋葱伯克氏菌株,一旦发现该类标记的存在,则撤销注册<sup>[5]</sup>。*cblA* 基因也被认为是特定的毒力基因,且在大多数流行致病菌株中存在<sup>[20]</sup>,但在其它 Bcc 菌中则很少存在<sup>[10]</sup>。本研究也对医院中的 14 株 Bcc 致病菌进行了 BCESM 和 *cblA* 两个毒力基因的检测,结果未发现这两个毒力基因的存在,这可能与分析的菌株数量少有关,也可能源于这些菌株虽然来源于医院中病患者样本,但其不是流行致病菌株,这也可能是导致未检测到 BCESM 和 *cblA* 两个毒力基因的原因。

## 参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 黄朝晖,袁凤京,王华生. 洋葱综合征患者终末消毒方法. 中华医院感染学杂志(*Chin J Nosocomiol*), 2005, 15(4): 380.
- [3] 年华,褚云卓,赵敏,等. 洋葱伯克氏菌监测结果分析. 临床检验杂志(*Journal of Clinical Laboratory Science*), 2000, 18(4): 238–239.
- [4] 尤荣开,陈秀平,蒋贤高,等. 伯克氏菌 86 株的分布与耐药性. 中国抗感染化疗杂志(*China J Infect Chemother*), 2003, 3(1): 34–36.
- [5] 罗远婵,谢关林. 洋葱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): 647–651.
- [6] Payne, GW, Vandamme P, Morgan SH, et al. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 3917–3927.
- [7] Vandamme P, Holmes B, Coenye T, et al. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. – a new twist to an old story. *Research in Microbiology*, 2003, 154: 91–96.
- [8] Coenye T, Lipuma JJ, Henry D, et al. *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51: 271–279.
- [9] Coenye T, Mahenthalingam E, Henry D, et al. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis related isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51: 1481–1490.
- [10] Mahenthalingam E, Bischof J, Byrne SK, et al. DNA-based diagnostic approaches for the identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars and . *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38: 3165–3173.
- [11] Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, et al. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 47(4): 1188–1200.
- [12] Prithviraj B, Weir T, Bais HP, et al. Plant models for animal pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 2005, 7(3): 315–324.
- [13] Bernier SP, Silo-Suh L, Woods DE, et al. Comparative analysis of plant and animal models for characterization of *Burkholderia cepacia* virulence. *Infection and Immunity*, 2003, 71 (9): 5306–5313
- [14] Zhang LX, Xie GL. Diversity and distribution of *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere of rice and maize. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 266: 231–235.
- [15] 张立新,宋幼良,罗远婵,等. 水稻根围和人体洋葱伯克氏菌的基因型比较. 中国水稻科学(*Chinese J Rice Sci*), 2007, 21(4): 431–435.
- [16] Mahenthalingam E, Simpson DA, Speert DP. Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic strains of *Burkholderia cepacia* recovered from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35: 808–816.
- [17] Richardson J, Stead DE, Coutts RHA. Incidence of the *cblA* major subunit pilin gene among *Burkholderia* species. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 196: 61–66.
- [18] Silo-Suh L, Suh SJ, Sokol PA, et al. A simple alfalfa seedling infection model for *Pseudomonas aeruginosa* strains associated with cystic fibrosis shows algT ( $\sigma$ -22) and rhlR contribute to pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99: 15699–15704.
- [19] Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, et al. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*,

- 1995, 268: 1899–1902.
- [20] Clode FE, Kaufmann ME, Malnick H, *et al.* Distribution of genes encoding putative transmissibility factors among epidemic and nonepidemic strains of *Burkholderia cepacia* from cystic fibrosis patients in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38: 1763–1766.

## Identification of the *Burkholderia cepacia* complex genomovars and their virulence in an alfalfa infection model

Lixin Zhang<sup>1, 2</sup>, Jianghua Song<sup>3</sup>, Guanlin Xie<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

<sup>2</sup> Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

<sup>3</sup> College of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

**Abstract:** [Objective] To confirm *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) genomovars from agricultural niches and clinical samples, and to evaluate their possible virulence to human body on alfalfa infection model in China. [Methods] A total of 57 Bcc strains were isolated and collected from the rhizosphere, soil and clinical samples in China. The genomovars composition of the Bcc strains was analyzed by species-specific PCR tests, and the virulence of the Bcc strains was tested on alfalfa seedlings. [Results] Four genomovars of the ten genomovars were detected among the Bcc strains, including *B. cepacia* (genomovar ), *B. cenocepacia* (genomovar ), *B. vietnamiensis* (genomovar ) and *B. pyrrocinia* (genomovar ). Bcc genomovars A from clinic, and genomovar B from rhizosphere were the most virulent in the alfalfa infection model, and caused symptoms in 69%, 68% and 55% of seedlings, respectively. There were significant variances in the mean percentage of seedlings with symptoms for genomovars I, A and B compared to those for genomovar and . [Conclusion] There was difference in the ability to cause disease in alfalfa for different genomovar strains from agricultural niches. The strains of Bcc genomovar B from rhizosphere were more virulent similar to those of Bcc genomovar A from clinic.

**Keywords:** *Burkholderia cepacia* complex; genomovar; alfalfa; virulence

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370951; 30671397) and the Natural Science Foundation of Anhui Educational Department (KJ2008B212)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-86971412; E-mail: glxie@zju.edu.cn

Received: 23 June 2008/Revised: 1 August 2008

### 《微生物学报》对摘要的写作要求

2007年12月修定

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论，并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围，采用的手段和方法，得出的结果和重要的结论。在结果和讨论中应写明本文的创新之处。
2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
3. 英文摘要的撰写要点：英文摘要的内容应与中文摘要一致，但比中文摘要更详尽。要求在文中给出[Objective]、[Methods]、[Results]、[Conclusion]等 words。英文摘要完成后，务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的，即使学术上可以达到刊出的水平，本刊也将推迟发表。
  - (1) 在英语摘要中，不要使用任何汉字字符，包括标点、括号、温度、希腊字母等。
  - (2) 建议使用第一人称，以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
  - (3) 建议用主动语态，被动语态表达拖拉模糊尽量不用，这样可以免好多长句，以求简单清晰。
  - (4) 摘要应当使用过去时态，语法正确，句子通顺。
  - (5) 摘要中不用缩写语，除非是人人皆知的，如：DNA，ATP 等。
  - (6) 句子的开头处最好不要使用数字。