

生防细菌 T132 的鉴定及其对采后柑橘炭疽病的抑制效果

汪茜^{1,3} 胡春锦^{1,2*} 柯仿钢³ 史国英¹ 余功明^{1,3} 黄思良⁴

(1. 广西农业科学院微生物研究所 广西 南宁 530007)

(2. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室 广西 南宁 530007)

(3. 广西大学 农学院 广西 南宁 530005)

(4. 南阳师范学院 生命科学与技术学院 河南 南阳 473061)

摘要: 【目的】柑橘(*Citri*)是世界上重要的果树。由胶孢炭疽菌[*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.)]引起的柑橘炭疽病是柑橘生产的主要病害之一。为探索对采后柑橘炭疽病有效的生防措施,分离鉴定柑橘根围土壤中一株细菌 T132,并研究其特性及生防效果。

【方法】根据菌株 T132 的形态特征、生理生化特性以及 16S rDNA 序列对其进行鉴定;通过连续 8 次在人工培养基上传代培养,测定该菌株的遗传稳定性;采用柑橘果实刺伤挑战接种和拮抗菌液直接浸泡健康果实两种方法研究该菌株对柑橘炭疽病的抑菌防病效果;利用洋葱伯克霍尔德氏菌致病因子的特异性引物检测菌株 T132 是否为潜在的人类致病菌。【结果】菌株 T132 鉴定为越南伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia vietnamiensis*)。连续 8 次在人工培养基上传代培养,菌株 T132 抑制胶孢炭疽病菌生长的能力没有发生明显改变。菌株 T132 对胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides* 引起的柑橘炭疽病有明显的防治作用,刺伤接种的防效为 88.2%,自然发病的防效为 54.9%。未检测到该拮抗菌株有人体致病相关的洋葱伯克霍尔德氏菌致病因子(BCESM)毒力基因。【结论】首次报道对柑橘采后炭疽病具有生防效果、对人类相对安全的越南伯克霍尔德氏菌生防菌株。

关键词: 柑橘炭疽病, 越南伯克霍尔德氏菌, 鉴定, 防效, BCESM 毒力基因

基金项目: 广西自然科学基金项目(No. 2011GXNSFA018076); 广西科研基础平台建设基金项目(No. 10-046-11); 广西农科院科技发展基金重点项目[No. 2007007(Z)]

*通讯作者: Tel: 86-771-3242208; 信箱: huchunjin@gxaas.net

收稿日期: 2012-04-06; 接受日期: 2012-05-29

Characterization of a bacterial strain T132 and its effect on postharvest citrus anthracnose

WANG Qian^{1,3} HU Chun-Jin^{1,2*} KE Fang-Gang³ SHI Guo-Ying¹
YU Gong-Ming^{1,3} HUANG Si-Liang⁴

(1. Microbiology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences,
Nanning, Guangxi 530007, China)

(2. Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Nanning,
Guangxi 530007, China)

(3. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005, China)

(4. College of Life Sciences and Technology, Nanyang Normal University,
Nanyang, Henan 473061, China)

Abstract: [Objective] Citrus (*Citri*) is an economically important fruit crop in the world. The anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. is one of the main diseases in citrus production. For exploring of an effective biocontrol measure against citrus postharvest anthracnose, a bacterial biocontrol strain T132 isolated from the rhizosphere soil of citrus was identified and characterized. The efficacy of the biocontrol strain against citrus postharvest anthracnose disease was evaluated. **[Methods]** Identification of strain T132 was carried out by using 16S rDNA sequence homology comparison as well as morphological, physiological and biochemical characteristics. The antagonistic stability of the strain T132 was determined by continuously transferring it on artificial media for 8 generations. The efficacy of strain T132 in controlling citrus postharvest anthracnose was performed by stab inoculation and naturally infected methods. The use of specific primers detect the strain T132 of the pathogenic factor of *Burkholderia cepacia* as a potential human pathogens. **[Results]** Strain T132 was identified as *Burkholderia vietnamiensis* based on its morphological traits, physiological and biochemical characters as well as 16S rDNA sequence analysis. Less change in the suppressive ability of antagonizing against growth of *C. gloeosporioides* was observed during 8 generations of transfers on artificial media. The strain T132 had significant efficacy in controlling citrus anthracnose disease causing by *C. gloeosporioides*. The average efficacies of the strain T132 in controlling the disease were 88.2% in artificial inoculation test and 54.9% in natural infection test 20 d and 60 d after of the antagonist applications, respectively. It was no virulence gene of *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker (BCESM) existed. **[Conclusion]** This is the first report of *B. vietnamiensis* as a biocontrol agent against citrus postharvest anthracnose disease and the relative safety of biocontrol strains on human.

Keywords: Citrus anthracnose, *Burkholderia vietnamiensis*, Identification, Control effect, BCESM gene

柑橘因其营养价值、药用价值及保健价值高而深受消费者青睐。但柑橘病害目前已成为制约柑橘产业化发展的瓶颈。由胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides* 引起的柑橘炭疽病,因其全生育期均可发病,尤以为害果实引起腐烂等造成的损失最大,成为影响柑橘高产、稳产、优质的主要因素之一^[1-2]。目前该病主要通过化学药剂进行防治,但由于药物残留及污染环境等,化学防治已越来越受到限制^[3]。生物防治因有效、安全、无毒、无残留等特性而受到广泛关注,并已有拮抗柑橘炭疽菌生防菌的筛选及对柑橘炭疽病防治的报道^[4-6]。拮抗细菌 T132 是笔者所在实验室从广西柑橘根围土壤分离和筛选的一株能有效防治柑橘采后炭疽病的生防细菌,本研究主要通过细菌学方法及分子生物学技术对该生防细菌进行鉴定,并对其在防治采后柑橘炭疽病上的效果进行了试验,以便为该菌在农业上高效而安全利用打下坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株、仪器、培养基

生防菌株 T132 为从广西柑橘园根围土壤中分离的 571 株微生物中筛选到的柑橘炭疽病菌拮抗菌,经分离纯化后用 NA^[7] 试管斜面保存于 4℃ 冰箱中备用。菌株 T132 的活化培养基为 NA,液体培养基为 NB(不加琼脂的 NA)。

主要试剂和仪器: dNTP Mixture、引物 Primer 1 (F27)和 Primer 2 (R1492),上海生工生物工程技术服务有限公司;立式压力蒸汽灭菌器 LS-B35L 型,江阴滨江医疗设备厂;TLG-16G 型离心机,上海医用分析仪器厂;回转式恒温调速摇瓶柜,上海智城分析仪器制造有限公司;HH-BH-600 电热恒温培养箱,上海跃进医疗器械一厂;光学显微镜 OLYMPUS Bx51,奥林巴斯(北京)销售服务有限公司。

供试植物病原菌:水稻白叶枯病菌 [*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Uyeda & Ishiyama) Swings]、柑橘溃疡病菌 [*Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye]、番茄青枯病菌 [*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.]、大白菜软腐病菌 (*Pectobacterium carotovora* pv. *carotovora* Dye)、柑橘炭疽病菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.]、水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn)、玉米大斑病菌 [*Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs]、玉米小斑病菌 [*Cochliobolus heterostrophus* (Dreschl.) Dreschl.]、茉莉白绢病菌 (*Sclerotium rolfsii* Sacc.)、辣椒炭疽病菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.]菌株 A、香蕉炭疽病菌 [*Colletotrichum musae* (Berk. & Curt) Arx]、冬瓜疫霉 (*Phytophthora drechsleri* Tucker)、龙眼链格孢黑斑病菌 [*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler]、香蕉大灰斑病菌 [*Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn]、香蕉叶缘枯斑病菌 (*Alternaria musae* Bour. et Bat)、杨桃炭疽病菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.]菌株 B。以上植物病原菌均由广西农业科学院微生物研究所保存、提供。菌株在 PDA 培养基上 28℃ 活化培养后供试。

1.2 菌株 T132 的抑菌活性研究

1.2.1 菌株 T132 对柑橘炭疽菌的拮抗作用及其抑菌谱: 采用平板对峙法,在培养皿中央接种培养 7 d 的柑橘炭疽病菌菌饼(直径 5 mm),离该菌饼约 3 cm 处,用接种环沾取培养 48 h 的拮抗菌株 T132,在平板对称两侧各划一条约 3 cm 的细线,以只接菌饼为对照,正放于 28℃ 培养,以仅接种病原菌的平板为对照,重复 3 次,待对照长满皿时测量柑橘炭疽病菌的菌落生长直径,按下式计算菌落生长抑制率:

$$\text{真菌生长抑制率(\%)} = \frac{\text{对照菌落净生长距离} - \text{处理菌落净生长距离}}{\text{对照菌落净生长距离}} \times 100$$

为了解菌株 T132 对植物病原菌是否具有广谱的抑菌活性, 用平板对峙法就菌株对 10 种植物病原真菌和用抑菌圈法^[4]对 4 种植物病原细菌的抑菌活性进行了测定。植物病原细菌的抑制率按下式计算。

$$\text{细菌抑制率}(\%) = \frac{\text{抑菌圈直径}}{\text{培养皿直径}} \times 100$$

公式中培养皿直径为 90 mm。

1.2.2 菌株 T132 抑菌活性检测: 将菌株 T132 在 NB 液体培养基中进行活化(28 °C 培养 2 d), 经活化的细菌培养物(浓度为 2×10^8 CFU/mL)以 1:60 的比例加入到新的牛肉膏蛋白胨液体培养基(NB)中, 置于 30 °C 摇床(190 r/min)培养 3 d。取发酵液分别进行 A (发酵原液)、B (发酵原液经 1×10^5 Pa 高温灭菌 20 min)、C (将发酵原液在 $2.795 \times g$ 下离心 10 min 得到上清液, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 细菌过滤器过滤) 3 种处理, 取 15 μL 的处理液加至无菌的滤纸片(直径 6 mm)上^[8], 以无菌水为空白对照, 采用对峙培养法测定拮抗活性, 指示菌为柑橘炭疽病菌。

1.2.3 菌株 T132 对柑橘炭疽菌菌丝生长的影响: 采用对峙培养法, 在光学显微镜下观察比较柑橘炭疽病菌受抑制菌落的四周边缘菌丝与对照菌落边缘正常菌丝的形态差异。

1.3 菌株 T132 抑菌活性的稳定性

将菌株 T132 在 NA 斜面培养基上连续转接培养 8 次, 每隔 15 d 转接 1 次, 30 °C 培养 24 h, 4 °C 冰箱保存, 用平板对峙法测其抑菌活性的稳定性。

1.4 菌株 T132 对采后柑橘炭疽病防效试验

1.4.1 刺伤接种: 取新鲜柑橘果实, 先在果实腰部刺伤一伤口(3 mm×3 mm), 在伤口处接种 20 μL 的生防菌悬浮液(2×10^8 CFU/mL), 以无菌水为空白对照, 200 mg/L 浓度的咪鲜胺为阳性对照。接种后将果实放在塑料盒内, 贮于 25 °C, 于

24 h 后在伤口处接种 20 μL 的 10^4 个/mL 炭疽病菌的分生孢子悬浮液, 将塑料盒套上塑料袋保湿(相对湿度约 95%), 于 28 °C 贮藏 24 h 后, 第 2 天开始观察, 每天观察一次, 调查柑橘炭疽病的烂果率及病情指数, 并计算防效。每处理 15 个果实, 重复 3 次。

柑橘果实发病程度分级标准:

0 级: 无病;

1 级: 病斑占果实面积的 5 % 以下;

3 级: 病斑占果实面积的 6%–10%;

5 级: 病斑占果实面积的 11%–25%;

7 级: 病斑占果实面积的 26%–50%;

9 级: 病斑占果实面积的 51% 以上。

$$\text{烂果率}(\%) = \frac{\text{腐烂果数}}{\text{总果数}} \times 100$$

病情指数=

$$\frac{\sum(\text{各级腐烂果数} \times \text{该级代表值})}{\text{总果数} \times \text{最高级代表值}} \times 100$$

防效(%)=

$$\frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100$$

1.4.2 拮抗菌处理对柑橘果实自然发病的防治试验: 柑橘果实分别在 3 种不同液体(2×10^8 CFU/mL 的拮抗菌发酵液、200 mg/L 咪鲜胺、无菌水对照)中浸泡 2 min, 完全晾干后用聚乙烯保鲜膜进行单果包装, 每 15 个果实存放于一个纸箱中。果实的贮藏温度为室温(20 °C–30 °C), 出现病斑后, 每天测定果实的发病率和病情指数。每处理 15 个果实, 重复 3 次。病情分级标准及计算公式见 1.4.1。

1.5 菌株 T132 的鉴定

根据 16S rDNA 同源性、菌体形态特征及生理生化特性对菌株 T132 进行鉴定。

温度试验: 将菌株 T132 移到 NB 培养基中, 置于 4 °C、7 °C、10 °C、13 °C、16 °C、19 °C、

22 °C、25 °C、28 °C、31 °C、34 °C、37 °C、40 °C、43 °C、46 °C、49 °C 恒温箱中培养 3 d, 测 *OD* 值^[9-10], 每处理 3 个重复。

pH 值试验: NB 培养基灭菌后, 将 pH 值调至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0。将拮抗菌株 T132 接入不同 pH 的 NB 培养液中, 摇床(30 °C, 170 r/min)培养 3 d, 测 *OD* 值^[9-10], 每处理 3 个重复。菌株的显微形态、该菌株的其他形态特征及生理生化特性分析按照常规细菌学方法^[9-10]进行。

进行 16S rDNA 同源性分析采用裂解法提取菌株 DNA, 用通用引物 Primer 1 (F27): (5'-AGA GTTTGATCATGGCTCAG-3')和 Primer 2 (R1492) (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[11]进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(75 μ L)为: dNTP mixture 37.5 μ L, F27、R1492 各 2.5 μ L, Template DNA 2.5 μ L, ddH₂O 30 μ L。PCR 反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 55 s, 50 °C 50 s, 72 °C 70 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。反应结束后, 取 5 μ L 反应液与 1 μ L 6 \times Loading buffer 溶液混匀用 1%琼脂糖凝胶电泳检测^[11]。扩增产物经纯化后, 送上海生物工程技术有限公司进行 PCR 产物的直接测序, 测序结果用 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 网页上的 BLAST 程序进行同源性比较, 并用软件 MEGA version 4.0^[12]构建系统发育树。

1.6 菌株 T132 的安全性评价

根据菌株分类鉴定结果对菌株 T132 的安全性进行评价。利用洋葱伯克霍尔德氏菌致病因子 [*B. cepacia* epidemic strain marker (BCESM)] 的特异性引物 BCESM1: 5'-CCACGGACGTGACTAAC-3'; BCESM2: 5'-CGTCCATCCGAACACGA T-3'^[13]检测菌株 T132 是否为潜在的人类致病菌。

PCR 反应体系^[13]为 20 μ L, 包扩 10 μ L dNTP

mixture, BCESM1、BCESM2 各 0.6 μ L, 模板 DNA 1.0 μ L, ddH₂O 7.8 μ L。PCR 扩增在 PTC-200 扩增仪上进行, 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 63 °C 50 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。以广西农科院微生物所保存的一株已证明含有该致病因子的 *B. cepacia* 菌株作为阳性对照, 无菌超纯水为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 菌株 T132 的抑菌活性

2.1.1 菌株 T132 对柑橘炭疽菌的拮抗作用及其抑菌谱: 菌株 T132 对柑橘炭疽病菌具有显著抑菌活性。测定结果表明, 该菌株对柑橘炭疽病菌生长的抑制率可达 80.9% (图 1)。

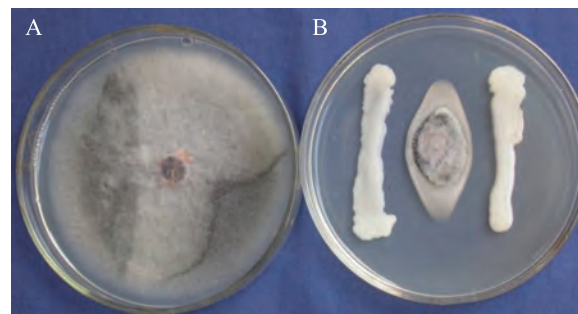


图 1 生防菌株 T132 对柑橘炭疽病菌的抑制作用
Fig. 1 Inhibition of growth of *C. gloeosporioides* by biocontrol strain T132

注: A: 对照; B: 菌株 T132.

Note: A: Control; B: Strain T132.

在测定的 10 种植物病原真菌中, 该菌株对 10 种病原真菌的生长抑制率为 69.6%–86.8% (表 1), 在供试几种植物病原细菌中, 拮抗菌 T132 只对同属于黄单胞杆菌属的水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 和柑橘溃疡病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *citri*)有拮抗作用, 对另外 2 种病原细菌不敏感(表 2)。

表 1 拮抗菌对供试病原真菌的抑菌谱
Table 1 Inhibition spectrum of pathogenic fungi by the antagonistic strains

病原真菌 Pathogenic fungi	抑菌率 Inhibition rate (%)
<i>R. solani</i>	69.6fF
<i>E. turcicum</i>	78.0dD
<i>C. heterostrophus</i>	82.3bB
<i>C. gloeosporioides</i> strain A*	66.2gG
<i>S. rolfsii</i>	81.1bcBC
<i>C. musae</i>	86.0aA
<i>C. gloeosporioides</i> strain B**	73.7eE
<i>C. lunata</i>	74.4eE
<i>P. drechsleri</i>	79.2dCD
<i>A. musae</i>	86.8aA
<i>A. alternata</i>	79.7cdCD

注: 表中所列数据是 3 个重复的平均值。同列中大写字母与小写字母分别代表 1% 与 5% 水平的差异显著性。下同。

Note: The data are the averages of 3 replicates. The lowercases and capital letters in the same column represent the significance levels of difference at 5% and 1%, respectively. Similarly hereinafter.

表 2 拮抗菌对供试病原细菌的抑菌谱
Table 2 Inhibition spectrum of pathogenic bacteria by the antagonistic strains

病原细菌 Pathogenic bacteria	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	15.4bB
<i>X. campestris</i> pv. <i>citri</i>	40.6aA
<i>R. solanacearum</i>	0cC
<i>P. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	0cC

2.1.2 菌株 T132 抑菌活性: 以柑橘炭疽菌为指示菌, 测定 3 种不同发酵液(发酵原液、经高温灭菌的发酵原液、发酵原液离心经细菌过滤器得到的上清液)的生物活性。实验结果表明: 菌株 T132 发酵原液经 121 °C 高温处理 20 min 后不表现拮抗活性; 无菌上清液表现出较高的拮抗活性。初步判断无菌滤液中含有拮抗物质, 高温可以使菌株 T132 发酵液中的抑菌活性物质失活。

2.1.3 菌株 T132 对柑橘炭疽菌菌丝生长的影响: 镜检发现, 与生防菌株 T132 对峙培养的柑橘炭疽菌菌落边缘的菌丝形态较正常菌丝发生了显著的变化: 菌丝分枝增多, 部分发生扭曲, 菌丝顶端和中部细胞膨大为圆形或椭圆形, 细胞内含物溢出, 原生质凝集, 有的顶端膨大, 明显聚集成簇且颜色加深(图 2A)。说明菌株 T132 在培养过程中可能向培养基中分泌抑制柑橘炭疽病菌的抗生物质, 造成菌丝形态异常。

2.2 菌株 T132 抑菌活性的遗传稳定性

对菌株 T132 抑菌活性的稳定性测定结果表明, 连续传代培养 8 次, 抑菌率平均为 76.9%, 各移植次数的抑菌率有一定差异。第 5 次移植后, 抑菌率约下降 7 个百分点后基本趋于稳定(图 3), 没有发现在移植培养中菌株 T132 丧失抑菌活性的现象。

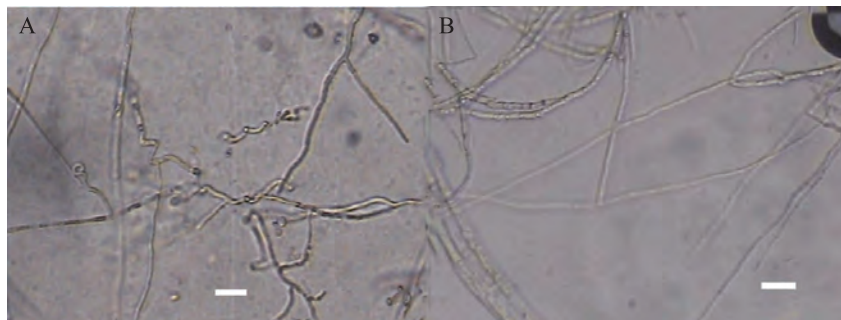


图 2 柑橘炭疽菌正常菌丝和对峙培养的畸形菌丝比较(尺标=20 μm)

Fig. 2 Morphological comparison between normal and abnormal hyphae of *C. gloeosporioides* (scale bars=20 μm)

注: A: 与拮抗细菌 T132 对峙培养的病菌的不正常菌丝; B: 对照的病菌正常菌丝。

Note: A: Abnormal hyphae of the pathogen co-incubated with the antagonist T132; B: Normal hyphae of the control pathogen.

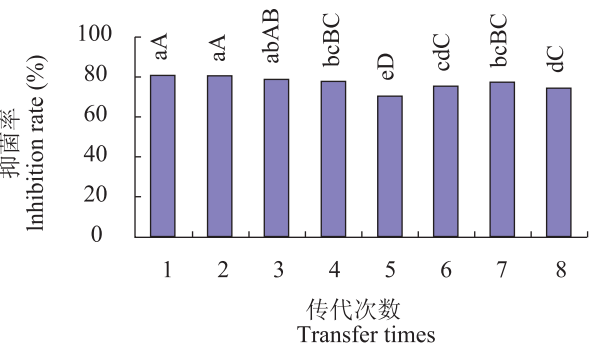


图 3 菌株 T132 抑菌活性的稳定性

Fig. 3 Stability of strain T132 in antimicrobial activity

2.3 菌株 T132 对采后柑橘炭疽病的防效

2.3.1 带伤接种的防效: 柑橘果实刺伤接种后常温存放 20 d, 对照果实的柑橘果实炭疽病发病率

达到 93.3%, 生防菌株 T132 悬浮液(10^8 CFU/mL)处理的发病率为 23.3%, 与对照相比在 5%水平上差异极显著。贮藏 20 d 后, 对照区的病情指数达到 44.1, 大部分果实腐烂, 生防菌株 T132 处理区的病情指数只有 5.2, 从防效来看, 菌株 T132 的防效(88.2%)高于咪鲜胺(85.7%), 但是两者差异不显著(表 3)。

2.3.2 自然感染的防效: 柑橘经处理液浸泡, 室温贮藏 60 d 后, 拮抗菌株 T132 和咪鲜胺处理的烂果率都在 35.0%左右, 与对照的烂果率(73.3%)相比, 存在极显著差异。从防效来看, 菌株 T132 处理对采后柑橘炭疽病的防效(54.9%)高于咪鲜胺处理的防效(49.1%)(表 4)。

表 3 有伤接种下菌株 T132 对柑橘炭疽病的防效			
Table 3 Efficacy of strain T132 in controlling the citrus anthracnose in the case of wounding inoculation			
处理 Treatment	烂果率 Fruit rot incidence (%)	病情指数 Disease index	防效 Control efficacy (%)
T132	23.3 bB	5.2 bB	88.2 aA
咪鲜胺 Prochloraz	16.7 bB	6.3 bB	85.7 aA
CK	93.3 aA	44.1 aA	—

表 4 自然感染下菌株 T132 对柑橘炭疽病的防效			
Table 4 Efficacy of strain T132 in controlling citrus anthracnose under natural infection			
处理 Treatment	烂果率 Fruit rot incidence (%)	病情指数 Disease index	防效 Control efficacy (%)
T132	33.3 cC	28.9 bB	54.9 aA
咪鲜胺 Prochloraz	36.7 bB	32.6 bB	49.1 aA
CK	73.3 aA	64.1 aA	

2.4 菌株 T132 的鉴定

拮抗菌 T132 菌体呈杆状, 长 1.6 μm–1.9 μm, 宽 0.7 μm–0.8 μm, 丛极生鞭毛, 无芽孢, 革兰氏染色阴性。生长温度 16℃–46℃, 最适生长温度 34℃, 生长 pH 3–12, 最适 pH 9.0。在 NA 平板上 28℃培养 2 d, 菌落白色, 直径 3 mm 左右, 圆形, 表面光滑, 平凸, 边缘整齐, 无粘性, 没有可溶性色素产生, 无臭味(图 4)。可利用的碳源为葡萄糖、D-半乳糖、山菊糖、甘露醇、L-阿拉伯糖、

木糖醇, 不可利用的碳源为麦芽糖、可溶性淀粉、海藻糖、乳糖(表 5)。可利用的氮源为 L-赖氨酸、L-光氨酸、L-组氨酸、尿素、硫酸氨、氯化铵; 不可利用的氮源为 DL-天冬酸、L-半胱氨酸、硝酸氨(表 6)。生理生化反应阳性的是淀粉水解、M.R. 试验、硫化氢试验、吐温 80、柠檬酸盐的利用、葡萄糖氧化产酸、明胶水解、接触酶、好氧性; 生理生化反应阴性的是吡啶试验、氧化酶。该菌株可在 2%–10%氯化钠溶液中生长(表 6)。

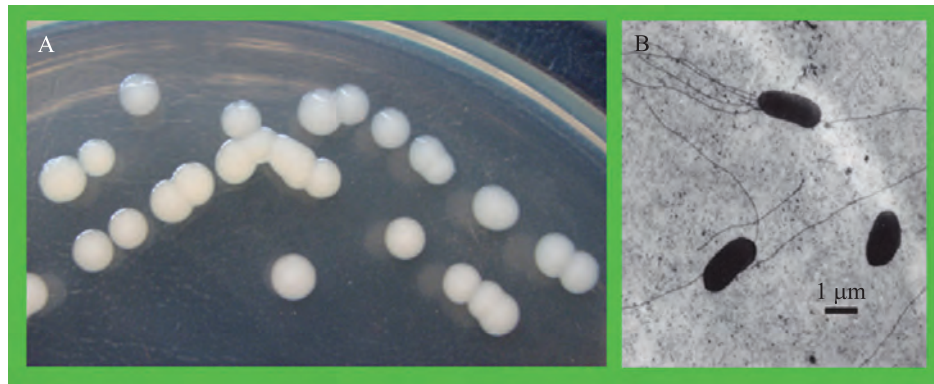


图 4 拮抗菌株 T132 的形态特征

Fig. 4 Morphological characteristics of antagonistic strain T132

注: A: 单菌落; B: 菌体(尺标=1 μm).

Note: A: Single colonies; B: A bacterial cell (scale bar=1 μm)

表 5 拮抗菌株 T132 对碳、氮源的利用

Table 5 Utilization of different compounds by antagonistic strain T132

碳源 Carbon	利用 Utilization	氮源 Nitrogen	利用 Utilization
葡萄糖 Glucose	+	L-赖氨酸 L-lysine	+
麦芽糖 Maltose	-	L-光氨酸 L-cystine	+
可溶性淀粉 Soluble amylum	-	DL-天冬酸 DL-aspartic acid	-
D-半乳糖 D-galactose	+	L-组氨酸 L-histidine	+
山菊糖 Inulin	+	L-半光氨酸 L-cysteine	-
甘露醇 Mannose	+	硝酸铵 Ammonium nitrate	-
L-阿拉伯糖 L-arabinose	+	尿素 Urea	+
木糖醇 Xylitol	+	硫酸铵 Ammonium sulphate	+
海藻糖 Trehalose	-	氯化铵 Ammonium chloride	+
乳糖 Lactose	-		

注: +: 阳性; -: 阴性.

Note: +: Positive; -: Negative.

表 6 拮抗菌株 T132 的生理生化反应

Table 6 Physiological and biochemical reactions of antagonistic strain T132

测试项目 Item tested	反应 Reaction	测试项目 Item tested	反应 Reaction
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	氧化酶 Oxidase	-
甲基红试验 M.R.	+	接触酶 Contact enzyme	+
硫化氢试验 H ₂ S test	+	好氧性 Aerobic property	+
吲哚试验 Indole product	-	Growth in 2.0% NaCl	+
吐温 80 Tween 80	+	Growth in 3.5% NaCl	+
柠檬酸盐的利用 Sodium hydrolysis	+	Growth in 5.0% NaCl	+
葡萄糖氧化发酵 D-glucose	-	Growth in 7.0% NaCl	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	Growth in 10.0% NaCl	+

注: +: 阳性; -: 阴性.

Note: +: Positive; -: Negative.

以 F27 和 R1492 为引物, 对菌株 T132 的基因组进行 PCR 扩增, 得到约 1.4 kb 的 16S rDNA 片段, 共测得该菌株 16S rDNA 序列 1 402 个碱基, 已在 GenBank 登录(登录号 GU573900)。采用 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 网页上的 BLAST 程序进行比较分析, 发现菌株 T132 与多株越南伯克霍尔德氏菌株(登录号分别为 EU024180、FJ436055 等)的最大同源性为 99%。用软件 MEGA version 4.0 将菌株 T132 与来自 GenBank 的 14 株细菌一起构建基于 16S rDNA 序列的系统发育树。该系统发育树显示, 菌株 T132 与 11 株伯克霍尔德氏菌属 *Burkholderia* sp. 在 100% Bootstrap 水平上相聚一群(图 5), 而与越南伯克霍尔德氏菌(登录号 EU024180)的亲缘关系最近, 表明该生防菌株 T132 与越南伯克霍尔德

氏菌具有最高的遗传相似性。

从以上形态学特征和生理生化反应, 结合 16S rDNA 序列分析结果, 将菌株 T132 鉴定为越南伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia vietnamiensis*)。

2.5 菌株的安全性检测

根据分类鉴定结果, T132 菌株属于洋葱伯克霍尔德氏菌群(Bcc)。有些 Bcc 是人体的机会病原菌, 能引发败血症、心内膜炎、肺炎、伤口感染等, 能感染囊肿性纤维化病患者导致洋葱伯克霍尔德氏菌综合症甚至致死^[14], 其中存在 BCESM 因子的 Bcc 对人体产生致病性的概率较大^[15]。采用 PCR 方法特异性扩增 BCESM 毒力基因, 结果 T132 菌株中未检测到该致病因子(图 6)。因此, 推断拮抗细菌 T132 是对人类相对安全的生防菌株。

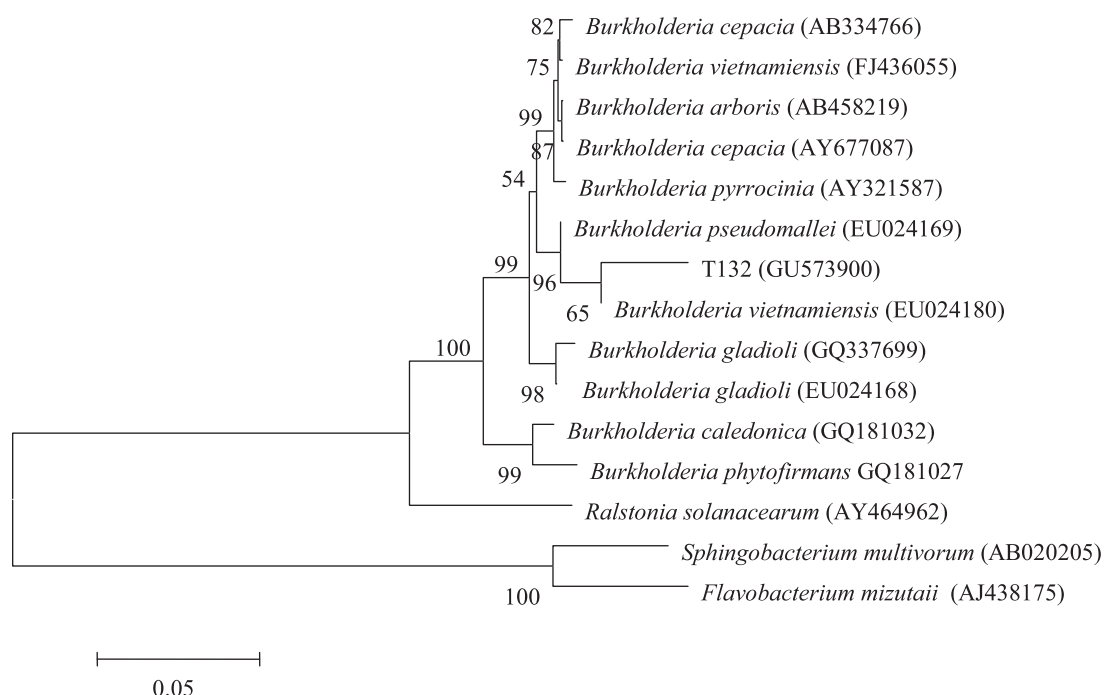


图 5 基于 16S rDNA 序列同源性的 T132 菌株系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence homology of strain T132

注: 括号中为相关细菌的 GenBank 的登录号; 分支位置中的数字表示 Bootstrap 支持率; 尺标表示每个核苷酸位点上的 0.05 替换值。

Note: The numbers in parentheses represent the sequence accession numbers in GenBank. The numbers in each branch points denote the percentages supported by bootstrap. The scale bar represents 0.05 substitutions per nucleotide position.

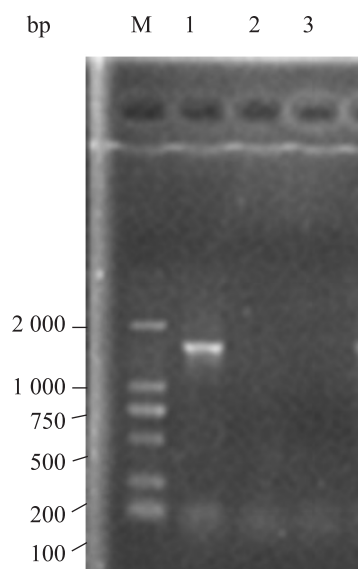


图 6 Bcc 菌 BCESM 基因的 PCR 扩增片段

Fig. 6 PCR amplicons of the BCESM

注: 1、2、3: 阳性对照、T132、无菌水对照; M: DNA marker 2000.

Note: 1, 2 and 3: Positive control, T132 and aseptic water; M: DNA marker 2000.

3 讨论

本研究筛选获得的越南伯克霍尔德氏菌来自柑橘根围土壤, 该菌在柑橘离体防效试验中, 对柑橘炭疽病有较好的抑制效果。近年来国内外开展了许多对柑橘采后病害生物防治的研究^[16-21], 但对柑橘炭疽病的生物防治生防研究鲜有报道。

菌株 T132 形态直杆状, 由单极生鞭毛或丛毛运动, 革兰氏阴性, 需氧, 可氧化分解单糖、双糖、多糖, 并可利用作为唯一的碳源和氮源, 这些特征与《常见细菌系统鉴定手册》^[10]上伯克霍尔德氏菌的描述一致, 但是仅根据形态特征很难将其鉴定到种, 且其种间的生理生化特征有的报道不全, 有的未见报道, 因此无法根据传统方法将其鉴定到种。根据 16S rDNA 序列对比结果发现, 菌株 T132 与伯克霍尔德氏菌属的 *Burkholderia vietnamiensis*、*Burkholderia arboris*、*Burkholderia cenocepacia*、*Burkholderia cepacia*

同源性高达 99%, 结合系统发育树(图 5)来看, 菌株 T132 与 *Burkholderia vietnamiensis* 的亲缘关系最近, 因此可以将其鉴定为越南伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia vietnamiensis*)^[10]。但菌株 T132 与种内的一些菌株的特征有点不同, 如其氧化酶反应为阴性, 可能是由该菌株的生态差异造成, 或是另有原因。

目前已有研究证明, 越南伯克霍尔德氏菌 (*B. vietnamiensis*) 对多种作物不管是真菌性病害还是细菌性病害都有良好的防效。该菌具有固氮、解磷、解钾能力, 能够拮抗多种植物疾病, 并已成功地商业化生产。山东省微生物重点实验室前期分离得到的具有多种功能的生防微生物越南伯克霍尔德氏菌 B418, 已广泛应用于田间, 给企业及农业生产都带来了较好的收益^[22]。目前, 国内仅有广东海洋大学的袁红旭等^[6]从柑橘果实中分离出 2 株内生细菌 G1、G16 可降低柑橘果实的柑橘炭疽病发病率, 初步鉴定 2 株内生细菌为短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus* sp.), 还未鉴定到种。迄今为止, 还没有报道越南伯克霍尔德氏菌 (*B. vietnamiensis*) 对柑橘炭疽病甚至对果实采后病害的研究, 这在国内外尚属首次, 属于果实采后病害防治的新拮抗菌。

今后随着培养与施用条件的进一步优化, 提高该生防菌防效的潜力还是存在的。然而, 生防菌不等于无毒性, 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^[23]。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, 针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^[24]。本试验对拮抗菌 T132 进行了 BCESM 毒力基因检测, 结果未发现该毒力基因的存在。目前可初步认为它是生物安全性菌株。然而生产上利用活菌体与利用代谢产物的方法和途径等各不相同, 因此, 菌株 T132 要最终在生产上推广应用, 还面

临许多问题需要深入研究,包括代谢产物的毒性检测,生防菌培养条件的优化及其制剂化、活性代谢产物的纯化与鉴定等。

菌株 T132 的作用方式明显是产生抗菌素,在平板对峙实验中产生明显的拮抗带,且在产生的抗生素初步研究中发现,无菌滤液对柑橘炭疽病菌的抑制作用也相当显著,说明抗菌物质存在于上清液中;菌株 T132 作用于柑橘炭疽菌的作用机理主要有两种方式:(1)造成细菌畸形,出现囊泡,肿胀;(2)造成菌丝原生质体从胞壁溶解处泄漏,菌丝断裂成段,继而消融。综上所述,拮抗菌主要是引起病原菌细胞壁的破坏,导致病原菌菌丝畸形和瓦解。由于时间所限,本研究对拮抗方式的研究还不够深入,尚有一些问题未搞清楚。例如:拮抗菌培养液中是哪些因素在起作用,是菌体还是代谢物?进一步的研究可对培养滤液、滤液中各个成分、菌体分别进行测试,深入剖析拮抗菌的作用机制。

本研究筛选得到的越南伯克霍尔德氏菌 T132 对柑橘采后炭疽病的防效(无论是刺伤接种还是果实自然发病)都高于咪鲜胺,在柑橘贮藏保鲜上有较大的开发利用前景,有必要进行扩大化贮藏试验,并探索将菌株 T132 与其它防腐保鲜措施相结合,进行优化贮藏试验,提高其保鲜效果。





参 考 文 献

- [1] 赖传雅. 农业植物病理学(华南本)[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2008: 212-224.
- [2] 汪茜, 胡春锦, 柯仿钢, 等. 柑橘炭疽病生物防治研究进展[J]. 广西农业科学, 2010, 41(4): 341-344.
- [3] Zhu Z, Zhang ZQ, Qin GZ, et al. Effects of brassinosteroids on postharvest disease and senescence of jujube fruit in storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2010, 56(1): 50-55.
- [4] 汪茜, 胡春锦, 柯仿钢, 等. 生防菌株1404的鉴定及其对采后柑橘炭疽病的防治效果[J]. 微生物学报, 2010, 50(9): 1208-1217.
- [5] 汪茜, 胡春锦, 黄思良, 等. 生防细菌1505的鉴定及其对采后柑橘炭疽病的抑制效果[J]. 西南农业学报, 2011, 24(2): 579-585.
- [6] 袁红旭, 陈勇明, 何财能, 等. 拮抗炭疽病的柑橘内生细菌的分离与筛选[J]. 果树学报, 2005, 22(5): 511-513.
- [7] 方中达. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [8] 徐雪莲. 果蔬采后病害拮抗细菌的筛选及研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2004.
- [9] 任欣正. 植物病原细菌的分类和鉴定[M]. 北京: 农业出版社, 1994.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 57-59.
- [11] 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[J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 9-17.
- [12] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [13] 张立新, 苏婷, 谢关林. 洋葱伯克氏菌群不同基因型菌株对几种重要植物病原真菌的抑制作用及其潜在致病性[J]. 中国生物防治, 2009, 25(1): 25-29.
- [14] 张立新, 谢关林, 楼妙苗. 洋葱伯克氏菌作为植物病害生防菌的研究进展及其风险评价[J]. 中国生物防治, 2006, 22(4): 260-264.
- [15] Parke JL, Gurian-Sherman D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains[J]. Annual Review of Phytopathology, 2001, 39: 225-258.
- [16] 龙超安, 邓伯勋, 何秀娟. 柑橘青、绿霉病高效拮

- 抗菌34-9的筛选及其特性研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38(12): 2434-2439.
- [17] 张红印, 蒋益虹, 郑晓冬, 等. 酵母菌对果蔬采后病害防治的研究进展[J]. 农业工程学报, 2003, 19(4): 23-27.
- [18] Droby S, Chalutz E, Wilson CL, et al. Characterization of the biocontrol activity of *Deharyomyces hansenii* in the control on *Penicillium digitatum* on grapefruit[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1989, 35(8): 794-800.
- [19] Bull CT, Wadsworth ML, Sorensen KN, et al. Syringomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons[J]. Biological Control, 1998, 12(2): 89-95.
- [20] Zhang HY, Zheng XD, Xi YF. Biological control of postharvest blue mold of oranges by *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner[J]. BioControl, 2005, 50(2): 331-342.
- [21] Long CA, Wu Z, Deng BX. Biological control of *Penicillium italicum* of citrus and *Botrytis cinerea* of grape by strain 34-9 of *Kloeckera apiculata*[J]. European Food Research and Technology, 2005, 221(1/2): 197-201.
- [22] 陈凯, 李纪顺, 杨合同, 等. 越南伯克霍尔德氏工程菌株 B418-37的温室防病增产效果[J]. 山东农业科学, 2008, (7): 58-60.
- [23] 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[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(5): 1763-1766.
- [24] 罗远婵, 谢关林. 洋葱伯克氏细菌是我们的敌人还是朋友?[J]. 微生物学报, 2005, 45(4): 647-652.

征订启事

2012 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订

	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 58.00 元, 年价 696 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: 010-64806142; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量。