

# 一株拮抗真菌的蛇足石杉内生细菌分离 鉴定及培养条件优化

曾庆桂 朱 笃\* 颜日明 朱 飞 王志兴

(江西师范大学生命科学学院 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室 南昌 330022)

**摘 要:** 从蛇足石杉(*Huperzia serrata*)叶片中分离到一株对小麦赤霉(*Fusarium graminearum*)等多种植物病原真菌有强拮抗作用的内生细菌 H-6。通过形态和培养特性观察、生理生化实验及 16S rDNA 序列分析,初步鉴定该菌属于伯克霍尔德属,命名为 *Burkholderia* sp. H-6。同时还对该菌培养条件进行了优化,得出马铃薯浸出液中添加 2.5%的甘露醇和 0.1%  $\text{NaNO}_3$  有利于细胞生长和抑菌活性的产生,最适培养温度为 28℃,最佳初始 pH4.0。

**关键词:** 蛇足石杉, 内生细菌, 拮抗真菌活性, 鉴定

## Isolation and Identification of Endophytic Bacteria H-6 with High Antifungal Activity from *Huperzia serrata*

ZENG Qing-Gui ZHU Du\* YAN Ri-Ming ZHU Fei WANG Zhi-Xing

(College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Jiangxi Provincial Key Lab of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resources, Nanchang 330022)

**Abstract:** In this study, nearly 200 endophytic bacteria were isolated from different part of *Huperzia serrata*, over 60 bacterium with clear antifungal activity were selected from those cultures. Among them, strain H-6 exhibited the highest antifungal activity which was strongly inhibits the growth of many plant pathogenic fungi such as *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium graminearum*, *Sclerotinia libertiana*, *Phytophthora capsici* Leonia and *Sesame fusarium* wilt. According to the characteristics of morphology, physiology and biochemistry tests and the comparison of 16S rDNA sequence, the strain H-6 was similar to the *Burkholderia*. So strain H-6 was identified as *Burkholderia* sp. H-6. The results also showed that *Burkholderia* sp. H-6 was markedly different from *Burkholderia cepacia* that was applied widely in agriculture as antagonistic bacteria.

The medium and culture conditions of the strain all were optimized by single factor and orthogonal experiments. In the investigation of the culture condition, growth was carried out in a basal medium (potato juice) and gradually supplemented with the various ingredients to be investigated. The major ingredients being investigated included carbon sources and nitrogen sources. The optimal antifungal activity production condition is growth in a medium (potato juice with 2.5% mannitol and 0.1%  $\text{NaNO}_3$ ), initial pH 4.0 at 28℃.

**Keywords:** *Huperzia serrata*, Endophytic bacterium, Antifungal activity, Identification

植物病害 80%以上是由真菌引起的,控制真菌病害对于提高农作物产量极其重要。目前真菌防治主要以化学农药为主,而化学农药引起的环境污染已经对人类健康造成潜在的威胁,因而从中寻找可用作生物农药或者生物肥料的菌种成为当前的研究热点<sup>[1]</sup>。

植物内生菌是一个多样性十分丰富的生物类群。在植物内生菌中,有对植物病原菌产生拮抗而保护植物免受病原菌侵害的卫士,有对宿主体内某些活性成分的形成有重要影响者,也有能产生与宿主相同或相似的生理活性成分者,还有与宿主只是共生或伴生关系而作用不明者等等<sup>[2]</sup>。迄今,从植物中分离可用作生物农药菌种已有较多的研究,已从裸子植物和被子植物中分离到较多能拮抗病害真菌或细菌次级代谢产物的内生菌株<sup>[3-6]</sup>。但相对而言,蕨类植物中的内生菌资源研究报道较少。

蛇足石杉(*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.) 是一种珍贵的药用蕨类植物,属石杉科石杉属<sup>[7]</sup>。迄今有关蛇足石杉资源、药用成分等方面已有较多报道,但有关蛇足石杉内生菌资源的研究方面,仅见 2005 年石玮等从蛇足石杉分离出 4 株内生真菌的报道<sup>[8]</sup>,且尚未有对其价值进一步研究的报道。本实验室从蛇足石杉中分离到了近 200 株内生细菌、150 株内生真菌。在内生菌分离的过程中发现,在近三分之一的经过表面消毒的蛇足石杉碎片中都长出了周围有一黄绿色色素圈的细菌,而且在分离平板上对长出的内生真菌有较强拮抗作用,命名为 H-6。对其进行了病原真菌的拮抗对峙实验,发现它对小麦赤霉(*Fusarium graminearum*)等多种植物病原菌都有强拮抗作用。为此笔者对其进行了形态及生理生化特征分析以及 16S rDNA 分子鉴定,并对其培养条件进行了初步优化,为进一步研究 H-6 和将其应用于生物防治提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

蛇足石杉采自江西省中科院庐山植物园。所用的病原真菌:车前草穗核菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、小麦赤霉(*Fusarium graminearum*)、油菜菌核菌(*Sclerotinia libertiana*)、辣椒根腐菌

(*Phytophthora capsici* Leonia)、芝麻枯萎菌(*Sesame fusarium wilt*)等均由江西农业大学农学院提供;所用的指示菌青霉(*Penicillium*)为本实验室保存。

培养基:分离筛选用的培养基为马铃薯固体培养基(PDA),其组成为:每升培养基含马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g, pH 自然。H-6 菌培养条件优化的基础培养基为马铃薯浸出液。

主要仪器和试剂:PCR 反应的各种试剂均购自上海捷瑞公司,DNA 提取所用试剂均为分析纯。PTC-200 型 PCR 仪(美国 MJ Research 公司);电泳仪及电泳槽(北京六一厂);UVP-8000 凝胶成像系统(美国 Ultra-Violet Products Ltd);2000 型&UV-型分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司)。

### 1.2 内生细菌 H-6 的分离鉴定

**1.2.1 内生细菌 H-6 的分离及其对多种病原真菌的拮抗实验:**样品的表面消毒方法参考文献[9],分离内生细菌的方法参考文献[10],表面消毒效果的检查参考文献[11]的方法进行。另外采用了 Schulz<sup>[11]</sup>的存活试验方法观察表面消毒的效果。

将经单菌落纯化后的内生菌 H-6 点在 PDA 平板(直径 90 mm)直径的一端,病原菌的菌丝柱(直径 5 mm)接在另一端,每菌 3 皿,于室温下(28 ℃)培养一定时间后测定抑菌圈的大小。

**1.2.2 内生细菌 H-6 的培养特征:**将内生细菌 H-6 接种在 PDA 平板上,于 12 h、24 h、48 h 分别进行鞭毛染色、革兰氏染色、夹膜染色、细胞壁染色、芽孢染色、抗酸染色,观察菌体的形态和菌落特征。

**1.2.3 内生细菌 H-6 的生理生化试验:**葡萄糖产气试验、糖醇发酵试验、接触酶试验、柠檬酸盐利用试验、明胶液化试验、淀粉水解试验、耐盐性试验、V-P 测定试验、硝酸盐还原试验、脲酶试验、H<sub>2</sub>S 产生试验、M.R.试验(甲基红)、纤维素分解实验,分别参照文献[12]和[13]的方法进行。

**1.2.4 内生细菌 H-6 16S rDNA 序列分析:**参考文献[14]的方法提取基因组总 DNA,用细菌通用引物 F27/R1492<sup>[15]</sup>进行扩增。PCR 体系为(50 μL):10×PCR 缓冲液 5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL,引物 F27/R1492 (10 μmol/L) 2 μL,模板 DNA(约 50 g/L) 1 μL, Taq 酶 2.5 U,重蒸水 41.5 μL。PCR 扩增条件:94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 40 s, 72 ℃ 90 s, 35 循环;

72 10 min<sup>[16]</sup>。

扩增产物送由上海捷瑞公司克隆测序。将测序结果用BLAST软件与GenBank中的相关属种的16S rDNA序列进行比对,用Bioedit软件以及Mega软件中的Multiple Sequence Alignment、phylogeny进行同源性分析,并构建进化发育树。

### 1.3 内生细菌 H-6 最适发酵条件的研究

**1.3.1 培养基组成的确定:** 保持基础培养基其它成分不变,依次改变培养基的碳源、氮源的种类,接种 H-6 菌,于 25 °C, 150 r/min 摇床培养 2 d, 离心收集菌体,测干重;收集上清测定抑菌活性。

确定最佳碳源和氮源后,对最佳碳源和氮源进行  $L_9(3^2)$  的正交优化实验。

**1.3.2 初始 pH 值的确定:** 将优化后的液体培养基的 pH 值分别调节为 3、4、4.5、5、5.5、6、7、8、9、10、10.5,接种 1% 的种子培养液,28 °C、150 r/min 摇床培养 2 d, 离心收集菌体,测干重,收集上清测定抑菌活性。

**1.3.3 培养温度的确定:** 优化后液体培养基,接种 1% 的种子培养液,分别置于 10 °C、20 °C、28 °C、30 °C、33 °C、37 °C、40 °C、45 °C、55 °C, 150 r/min

摇床中培养 2 d 后。离心收集菌体,测干重,收集上清测定抑菌活性。

### 1.4 内生细菌 H-6 活性测定方法

先在 PDA 平板上涂布 50  $\mu$ L 青霉孢子悬浮液,然后用直径 0.5 cm 的无菌打孔器在培养基上打孔(一个作为对照),多个样品处理同时在同一培养皿检测,用无菌镊子取出孔内的培养基,用烧热的小玻璃棒沿着孔壁熔一点培养基封住孔底,防止检测液从培养基的底部流走。再在孔中加入需要检测的 H-6 发酵液上清,平放于 28 °C 恒温培养箱中培养,观察抑菌圈大小<sup>[17]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 拮抗菌的分离筛选

在分离蛇足石杉内生细菌的平板中发现有将近三分之一经过表面消毒后的插片长了同样形态特征的细菌,在该细菌的周围形成一个黄色的色素圈,对该细菌进行多株病原真菌的对峙试验,发现在黄色色素圈内,病原真菌受到较强的抑制作用(图 1)。

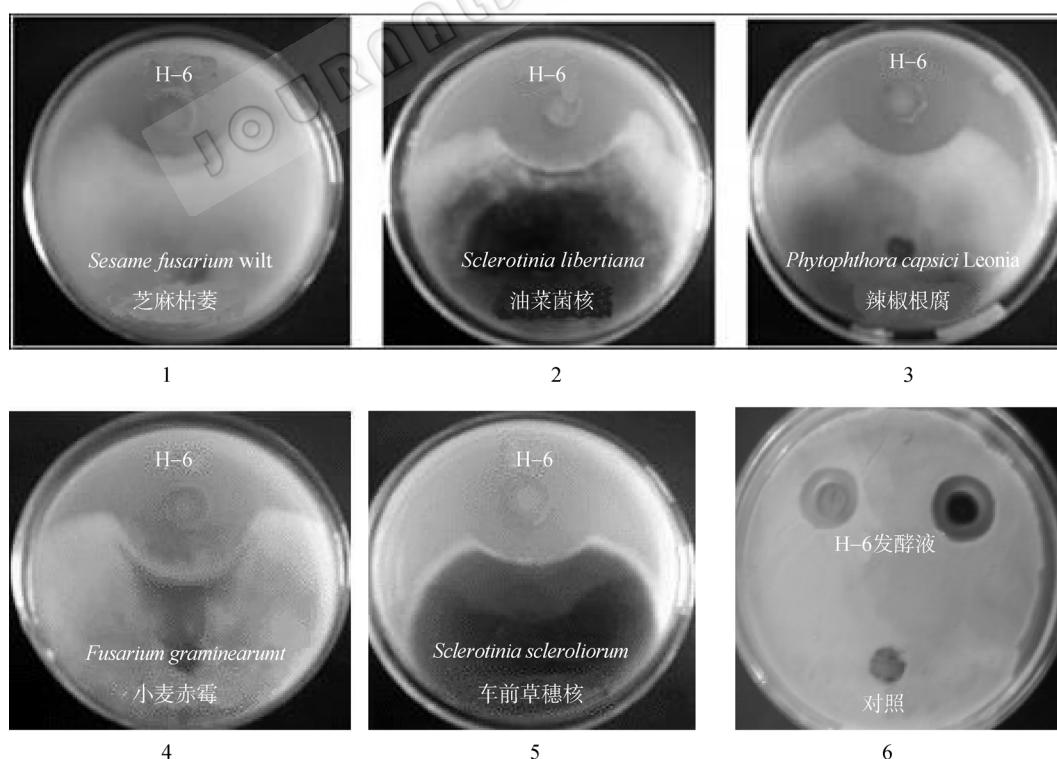


图 1 菌 H-6 对多株真菌的拮抗作用

Fig. 1 Dual culture between endophytes H-6 and pathogens

1-5: Dual culture between endophytes H-6 and pathogens; 6: The antagonistic activity of H-6 fermented filtrate against *Penicillium*

2.2 形态特征和染色结果

内生细菌 H-6 是短杆状革兰氏阴性细菌，有鞭毛，有荚膜。在培养基上形成黄绿色菌落，表面湿润，形成粘液，边缘整齐，菌落扁平，不透明。不同方式的染色结果见表 1。

表 1 内生细菌 H-6 的染色结果	
Table 1 The stain results of H-6	
Stain	Result
Gram staining	—
Flagella staining	+
Capsure staining	+
Cell wall staining	+
Acid-fast staining	—
Spore staining	—

2.3 生理生化特征

明胶液化缓慢，淀粉水解缓慢，纤维素上生长，不产生硫化氢，不产生脲酶，能利用甘油、甘露醇、葡萄糖、果糖、乳糖，几乎不利用麦芽糖和蔗糖(表 2)。

2.4 16S rDNA 同源性的鉴定

以内生菌 H-6 基因组总 DNA 为模板，用细菌的通用引物进行 PCR 扩增，得到约 1.5 kb 的 PCR 产物(图 2)。PCR 产物回收纯化后，经 DNA 测序，序列长度为 1454 bp，将菌株 H-6 的 16S rDNA 序列向 GenBank 进行了提交，其序列登记号为 EF188276。

表 2 H-6 菌株的生理生化特征			
Table 2 The physiological characteristics of H-6			
Characteristics	Result	Characteristics	Result
Sugar utilization		Gelatin liquefaction	+
D-glucose	+	Growth in cellulose	+
D-fructose	+	H <sub>2</sub> S production	—
D-galactose	+	V-P test	—
Mannitol	+	Catalase test	+
Glycerin	+	Urease test	—
Maltose	—	Nitrate reduction	—
Sucrose	—	Salt Resistance	—
Starch hydrolysis	+	M.R.test	+

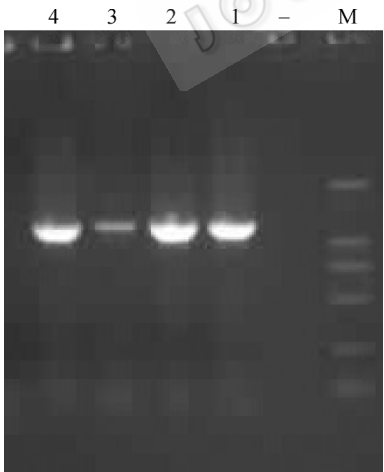


图 2 菌株 H-6 16S rDNA PCR 扩增  
Fig. 2 The 16S rDNA PCR of strain H-6  
M: Marker; 1-4: Sample; -: Negative control

将 H-6 菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 中的序列进行比较，与其同源性最高的菌为伯克霍尔德氏菌属。以 16S rDNA 同源性为基础构建包括 16 株

相关种属细菌(分别属于 *Burkholderia* 和 *Pseudomonas* 属)在内的系统发育树(图 3)。系统发育树中，分离菌株 H-6(EF188276)与 *Burkholderia* sp. wbf1 在同一分支，与 *Burkholderia* sp. wbf1 的序列相似性最大，为 98.28%。而与 *Burkholderia* 属中常用的生防菌洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)亲缘关系相对较远，为 91.23%。

2.5 培养条件的确定

2.5.1 培养基组成：研究表明，H-6 能利用淀粉、乳糖、葡萄糖、甘油、果糖、甘露醇等碳源，基本不利用蔗糖和麦芽糖，其中以甘露醇为碳源时菌体生长最旺。而以葡萄糖、甘油、果糖和甘露醇为碳源时，H-6 都表现出较强的抑菌活性，其中也是以甘露醇为碳源时，抑菌活性最强(图 4)。无论是细菌生物量还是抗菌活性，甘露醇对细菌的贡献都是最大的，所以我们选择甘露醇作为培养基的最佳 C 源。

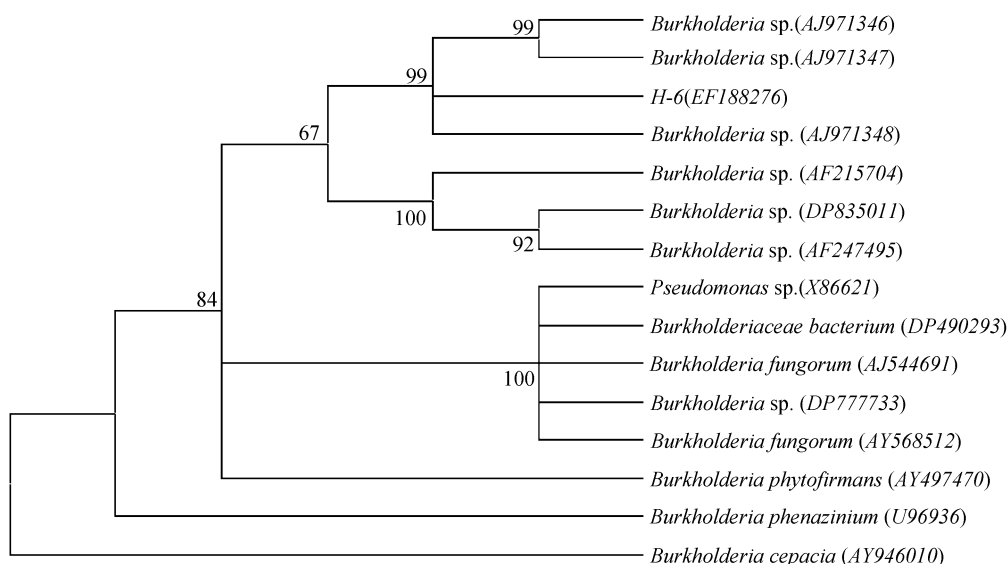


图3 菌株 H-6 的 16S rDNA 全序列的系统发育树形图(括号内为序列登录号)

Fig. 3 Phylogenetic tree derived from the 16S rDNA sequence of strain H-6

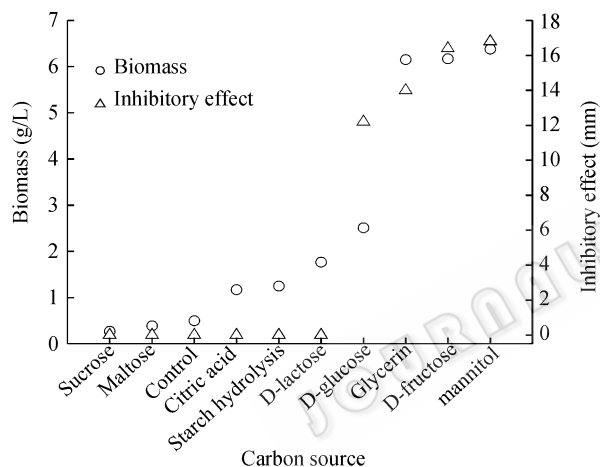


图4 不同碳源对菌体生长及其抗菌物质产生的影响

Fig. 4 Effect of carbon sources on the growth and antimicrobial activity of strain H-6

有机类的氮源既不利于 H-6 的菌体生长, 也不利于其活性产物的产生(图 5)。无机类氮源中,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  也不利于 H-6 的菌体生长和活性产物产生。而在 PDA 培养基中添加尿素和  $\text{NaNO}_3$ , 无论是对细菌生物量还是抗菌活性, 都有较强的促进作用。相比之下, 添加  $\text{NaNO}_3$  时 H-6 的抑菌效果最好, 所以选择  $\text{NaNO}_3$  作为培养基的最佳 N 源。

在基础培养基基础上, 采用  $\text{L}_9(3^2)$  正交实验对甘露醇和  $\text{NaNO}_3$  最佳配比进行了研究(表 3)。

实验结果表明(表 4、表 5), 以菌体收获量作为评价指标, 各因素极差大小的顺序是: 甘露醇 >

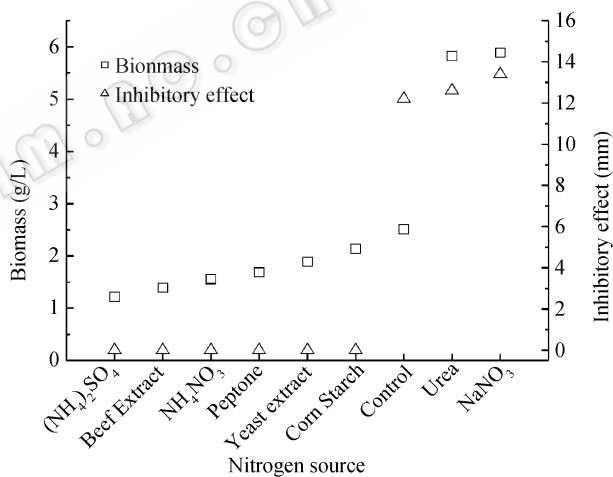


图5 不同氮源对菌体生长及其抗菌物质产生的影响

Fig. 5 Effect of nitrogen sources on the growth and antimicrobial activity of strain H-6

表3 正交设计因素水平表  
Table 3 The factors and levels for the orthogonal design

Level	Factor	
	Mannitol (g/L)	$\text{NaNO}_3$ (g/L)
1	25	2.0
2	20	1.0
3	15	0.5

$\text{NaNO}_3$ , 由此可见, 甘露醇对菌体收获量的影响比  $\text{NaNO}_3$  大; 以抑菌圈直径作为评价指标, 各因素极差大小的顺序是:  $\text{NaNO}_3$  > 甘露醇。由此可见,  $\text{NaNO}_3$  对抗菌活性物质产生的影响大于甘露醇。综合两者

考虑，最优组合为 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>，即在马铃薯浸出液培养基中添加 2.5%甘露醇、0.1%NaNO<sub>3</sub>。

表 4 正交实验与结果				
Table 4 The results of the orthogonal test				
Number	Factor		Response	
	Mannitol (g/L)	NaNO <sub>3</sub> (g/L)	Biomass (g/L)	Inhibitory effect (mm)
1	1	1	5.41	14.5
2	1	2	6.20	17.1
3	1	3	5.92	14.8
4	2	1	4.88	11.8
5	2	2	5.53	14.3
6	2	3	5.26	15.0
7	3	1	5.48	12.5
8	3	2	5.33	14.8
9	3	3	4.35	15.6

表 5 正交实验结果分析				
Table 5 Analysis of the orthogonal test				
	Biomass(g/L)		Inhibitory effect (mm)	
	Mannitol	NaNO <sub>3</sub>	Mannitol	NaNO <sub>3</sub>
K <sub>1</sub>	17.53	15.77	46.4	38.8
K <sub>2</sub>	15.67	17.06	41.1	46.2
K <sub>3</sub>	15.16	15.53	42.9	45.4
k <sub>1</sub>	5.84	5.26	15.5	12.9
k <sub>2</sub>	5.25	5.69	13.7	15.4
k <sub>3</sub>	5.05	5.18	14.3	15.1
R	0.79	0.51	1.8	2.5

2.5.2 初始 pH 的确定：H-6 菌对环境酸碱有较强的适应能力，在 pH 3.0~11.0 范围内均能生长。在 pH4.0~8.0 时，菌体生长旺盛且发酵产生的抗菌物质相对较高，且 H-6 菌体生长与产生活性物质的量呈现正相关，其最适 pH 为 4.0(图 6)。

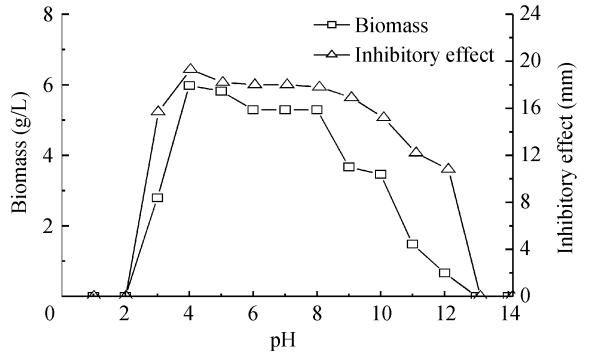


图 6 初始 pH 对菌 H-6 的生长和抗菌活性物质产生的影响  
Fig. 6 Effect of initial pH on the growth and antimicrobial activity of strain H-6

2.5.3 培养温度的确定：H-6 菌对温度也有较强的适应能力，在 10~45℃ 都可以生长。培养温度低于 28℃ 时，随着温度升高，菌体密度和抑菌活性相应增大，28℃ 时菌体含量和抑菌活性达到最大，此后随着温度的继续升高，菌体的生长与抑菌活性迅速下降。因此，H-6 菌最适温度为 28℃ (图 7)。

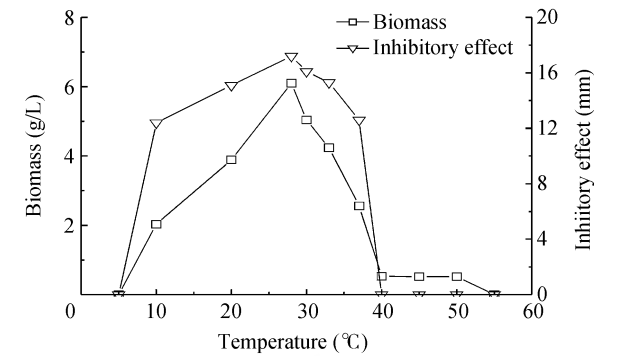


图 7 温度对菌 H-6 的生长和抗菌活性物质产生的影响  
Fig. 7 Effect of temperature on the growth and antimicrobial activity of strain H-6

### 3 讨论

植物是筛选天然药物最主要的原料。近年来有关研究表明，从植物的根、茎、叶、果实等中分离到了很多以前未被人们认识的植物内生菌，而内生菌存在抗菌活性具有普遍性。因此，对这一抗菌活性物质来源的新领域的开发将具有十分重大的经济意义<sup>[2]</sup>。内生细菌 H-6 是从药用植物蛇足石杉叶片中分离，而且在所分离的内生细菌中占有较大的比例，由此可以推测在药用植物蛇足石杉中，存在着丰富的对植物病原菌有拮抗作用的内生菌资源。采用了传统的鉴定和分子鉴定相结合的方法对 H-6 的鉴定，从鉴定结果看，H-6 与 *Burkholderia* 属最为相似，故命名为 *Burkholderia* sp. H-6。目前尚未有报道从蛇足石杉分离到 *Burkholderia* 属的细菌，而且根据聚类分析表明，H-6 与常用的生防菌洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)亲缘关系较远，因此，H-6 极有可能是 *Burkholderia* 属中的一个新种，当然这有待于进一步研究。同时对 H-6 的培养条件进行了优化，结果表明马铃薯浸出液基础培养基中添加 2.5%甘露醇、0.1%NaNO<sub>3</sub>，培养温度 28℃，初始 pH4.0 有利于细菌生长和生物活性物质的合成，这为进一步利用 H-6 作为生防菌提供了实验基础。

近年来,为防止农作物受真菌类病原菌的侵害,国外一些研究所利用洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)等生防菌研制出各种生物杀菌剂<sup>[18,19]</sup>。*B. cepacia*作为生物杀菌剂可以用于防治多种病害,如引起的多种农作物以及森林苗木的根腐、茎腐、猝倒和纹枯等<sup>[20]</sup>。目前认为*B. cepacia*防治土传病害的机制主要是由于它产生了抗真菌的抗生素和铁载体等代谢物。其中抗生素有Cepacin、Cepaciamid、Phenazine、Xylocandins (Cepacidines)、Phenylkrololes、Pseudanes (Quinolinones)和Pyrrolnitrin等,铁载体包括水杨酸 Omibactins、Pyochelin 和 Cepabactin<sup>[21]</sup>。此外,也有学者认为*B. cepacia*的一些菌株产生的细胞壁降解酶、IAA 以及一些菌株的固氮作用也与其防治土传病害的能力有关<sup>[22]</sup>。研究表明,H-6在PDA固体培养基中分泌一种黄色的物质,该物质在菌的周围形成一个规则的圆形,在该物质形成的圈内,真菌完全受到抑制。这表明菌H-6也能分泌抗真菌的代谢物,因此进一步对该菌抑菌机理以及其拮抗物质化学结构的研究,将极有可能为植物病害的生物防治提供新的思路。

## 参 考 文 献

- [1] 权春善,王军华,徐洪涛,等.一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究.微生物学报,2006,46(1):7-12.
- [2] 谷 苏,邵 华,蒋晓华,等.药用植物内生真菌多样性及其活性成分的潜在应用价值.中国药理学杂志,2001,36(1):14-15.
- [3] Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *J Natural Product Reports*, 2001, 18(4): 448-459.
- [4] Shimizu M, Nakagawa Y, Sato Y, et al. Studies on endophytic actinomycetes (I): *Streptomyces* sp. isolated from *Rhododendron* and its antifungal activity? *J Gen Plant Pathol*, 2002, 66(4): 360-366.
- [5] 纪丽莲,张强华,崔桂友.芦竹内生真菌 F0238 对植物病原菌的拮抗作用.微生物学通报,2004,31(2):82-86.
- [6] 孙力军,陆兆新.植物内生菌抗菌活性物质研究进展.食品与发酵工业,2005,31(2):78-82.
- [7] 鲁润龙,周忠泽,鲍时来,等.药用植物蛇足石杉的生物学特性.中国科学技术大学学报,1999,29(1):118-121.
- [8] 石 玮,罗建平,丁振华,等.千层塔内生真菌分离鉴定的初步研究.中草药,2005,36(2):281-283.
- [9] 曹理想,田新莉,周世宁.香蕉内生真菌、内生放线菌的类群分析.中山大学学报,2003,42(2):70-73.
- [10] 宋子红,丁立孝,马伯军,等.花生内生菌的种群及动态分析.植物保护学报,1999,26(4):309-314.
- [11] Schulz B, Wanke U, Draeger S. Endophytes from herbaceous and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *J Mycological Research*, 1993, 97(12): 1447-1450.
- [12] Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [13] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册.北京:科学出版社,2001.
- [14] Frederick MA, Roger B, Robert EK, et al. *Short Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons, 1995, pp. 11-13.
- [15] Devereux R, Hines ME, Stahl DA. S Cycling: Characterization of Natural Communities of Sulfate-Reducing Bacteria by 16S rRNA Sequence Comparisons. *J Microb Ecol*, 1996, 32(3): 283-292.
- [16] Sambrook J. *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [17] Belofsky GN, Anguera M, Jensen PR, et al. Oxepinamides A-C and fumiquinazolines H-I: bioactive metabolites from a marine isolate of a fungus of the genus *Acremonium*. *J Chemistry*, 2000, 6(8): 1355.
- [18] Cartwright DK, Benson DM. *Pseudomonas cepacia* strain 5.5B and method of controlling *Rhizoctonia solani*. *USA Patent*: 5288633, 1994.
- [19] Lacy DE, Spencer DA, Goldstein A, et al. Chronic granulomatous disease presenting in childhood with *Pseudomonas cepacia* septicemia. *J The Journal of Infectious Diseases*, 1993, 27(3): 301-304.
- [20] 谢关林,金扬秀,徐传雨,等.我国水稻纹枯病拮抗细菌种类研究.中国生物防治,2003,19(4):160-170.
- [21] Jennifer LP, Doug GS. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *J Ann Rev Phytopathol*, 2001, 39: 225-258.
- [22] Alison H, Govan J, Richard G. Could the agricultural use of *Burkholderia cepacia* pose a threat to human health? *J Emerging Infectious Diseases*, 1998, 4(2): 221-227.