

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(3):342–349; 4 March 2010
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

一株番茄青枯病生防菌的鉴定与防病、定殖能力

黎志坤, 朱红惠*

(广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070)

摘要:【目的】采用根系分泌物培养基筛选到一株番茄根际优势细菌 YPP-9。本文分析测定该菌株对植物青枯病菌茄科雷尔氏菌的拮抗作用和控病能力, 及其在番茄根际的定殖能力, 并系统分析该菌株的分类学地位。【方法】以平板双重培养法和温室盆栽试验分别测定菌株对病原菌的拮抗能力和对番茄青枯病的控病能力; 利用变性梯度凝胶电泳技术分析菌株在番茄根际的定殖能力; 以形态学和生理生化特性以及 16S rRNA 基因序列分析确定菌株的分类地位。【结果】菌株 YPP-9 对茄科雷尔氏菌 SSF-4 的平板抑菌带宽为 5 mm, 其盆栽控制番茄青枯病的效果达 63.7%。菌株 YPP-9 在番茄根际具有较好的定殖能力。该菌株培养 24 h 后菌落呈奶酪色, 革兰氏染色阳性, 菌体杆状、大小 $(1.8 - 4.1) \mu\text{m} \times (0.9 - 1.1) \mu\text{m}$, 形成芽孢, 芽孢中生或偏端生且为近似柱形, 孢囊不膨大, 无伴孢晶体, 侧生鞭毛。菌株生长 pH 范围为 pH 5.5–8.5 且最适生长 pH 为 6.0, 生长温度范围为 20℃–45℃ 且最适生长温度为 30℃。The BIOLOG GP2 结果显示该菌为芽孢杆菌属。16S rRNA 基因序列分析显示该菌株与 *Bacillus fumarioli* 的亲缘关系最近且序列相似性为 97%, 且其序列号为 FJ231500。该菌株的 G + C 含量为 41.9%, 甲基萘醌主要类型为 MK-7, 细胞壁脂肪酸的主要种类为 $\text{C}_{14:0}$ iso、 $\text{C}_{15:0}$ iso 和 $\text{C}_{16:0}$ iso 以及 $\text{C}_{16:1\omega7c}$ alcohol 且含量分别为 28.27%、19.59%、12.93% 和 10.88%。【结论】菌株 YPP-9 对茄科雷尔氏菌具有良好的拮抗作用和盆栽控病能力, 且能良好的定殖于番茄根际。分类学上, 该菌株归入芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 并可能是一个新的种。

关键词: 番茄青枯病生防菌; 定殖能力; 分类地位

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0342-08

植物细菌性青枯病 (plant bacterial wilt disease) 是由茄科劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 引起的世界范围内的一种重大细菌性病害, 是许多国家的农业生产中亟待解决的重大难题。青枯菌 (*Ralstonia solanacearum* comb. nov.) 可侵染 44 个科的 450 多种植物, 造成 15%–100% 的产量损失。采用植物根际生防细菌防治该病害符合农业可持续发展的要求, 是目前的研究热点和发展方向^[1-2]。利用土壤中既有的生防微生物防治植物青枯病既能控制病原菌, 又能保护植物, 对环境较好的病害防治方法受到国内外科学界的青睐。我国从 60 年代初就开始了利用拮抗微生物防治发生青枯病的研究^[3], 迄今为止, 已在芽孢杆菌^[4]、链霉菌^[5]、假单胞杆菌^[6]、菌根真菌^[7]中筛选

出大量的具有抑制青枯病效果的菌株。

然而, 利用生防菌防治植物病害存在一个问题, 就是由于培养方法的缺陷, 土壤中真正有功能的占优势的微生物无法分离筛选到, 采用普通平板筛选的拮抗菌株并不一定是土壤中的优势菌, 使得中选菌株在施用过程中由于根际定殖能力弱而防病效果不太稳定。Rainey^[8] 证明了 *Pseudomonas fluorescens* 在根际定殖时, 与营养吸收和分泌有关的基因有高水平的表达。从理论上讲, 能在某种植物根际定殖并维持长时间的菌株, 应该是对该植株根系分泌物非常适应或者能利用根系分泌物作营养的, 只有这些菌才能在根际占有优势。日本的 Yoshitaka^[9] 等对番茄青枯病的抑制土进行检测, 发现 75% 的细菌

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30770067)

* 通信作者。Tel: +86-20-87686803; Fax: +86-20-37656628; E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

作者简介: 黎志坤 (1982–), 女, 广东顺德人, 硕士, 研究方向为植物病理学。E-mail: queenie_lee_cn@163.com

收稿日期: 2009-09-18; **修回日期:** 2009-12-14

是能够利用果胶的 β -Proteobacteria, 而果胶是番茄根系的主要分泌物。其结果还表明, 在抑菌土中, 具有较强根际定殖能力的 β -Proteobacteria 是抑制番茄青枯菌 *R. solanacearum* 繁殖的主要原因。

本实验室一直从事番茄青枯病生防菌的筛选工作, 并采用根系分泌物培养基在番茄根际筛选到一批微生物菌株。本研究测定了其中一株 YPP-9 菌株对番茄青枯病的防病效果及其在根际的定殖能力, 同时采用多相分类学对 YPP-9 菌株的系统分类地位进行了初步确定, 为功能微生物的筛选提供了思路, 同时为 YPP-9 菌株的应用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 菌株是从广州市蔬菜研究所花都试验基地的番茄田块的根际土壤分离所得。采用番茄根系分泌物果胶作为唯一碳源的培养基分离得到 4 株对番茄青枯菌有拮抗作用的生防菌, 编号分别为 YPP-9、YPP-19、PM-28、YPG-5。其中菌株 YPP-9 为本论文所要鉴定的菌株, 其他菌株为蕃茄青枯病防治效果和 DGGE 测定中的供试对照菌株。植物青枯病原菌 SSF-4 (*Ralstonia solanacearum*) 由广东省植物保护研究所何自福研究员所供。

1.1.2 主要试剂和仪器: Tris 饱和酚、dNTPs、RNase、CTAB、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、SDS、EDTA、TaqDNA 聚合酶、琼脂粉等购于广州威佳公司; 过硫酸铵、丙烯酰胺、N, N-亚甲双丙烯胺、TEMED、DNA 纯化试剂盒 Wizard DNA Clean-up System 等购于美国 Promega 公司; 引物由上海英骏公司合成; 其他常规分析纯试剂购自环凯公司和广州化学厂等。

冷冻离心机 3K30C, 德国 SIGMA 公司; PCR 扩增仪 GeneAmp PCR system 2400, 德国 PE 公司; 恒温培养箱 GHP-9160, 上海一恒科技公司; 超净工作台 SW-CJ-1F, AIR TECH 公司; 变性梯度凝胶电泳仪 The Dcode™ Universal Mutation system, 美国 Bio-Rad 公司; 凝胶成像系统 BST-20, 英国 UVI 公司。

1.2 菌株拮抗作用测试和防病效果测试

番茄青枯病菌株 SSF-4 培养液 0.1 mL 均匀涂布于 TM 平板上, 放置 30 min, 待表面干燥后分别移入 4 个直径为 5 mm 浸泡过拮抗细菌培养液的滤纸片, 每处理 3 个重复, 30℃ 培养 24–48 h 后观察抑菌圈测试菌株的拮抗作用^[10]。

菌株的防病效果测试采用盆栽试验, 番茄品种为红宝石, 一个处理 5 株植株, 每个处理 6 个重复。等栽种到 3–4 片叶时使用该菌株的发酵液灌根, 每隔 5 d 灌一次, 共 3 次。待第 3 次处理 2 d 后, 番茄苗利用伤根灌接法接种青枯菌^[11], 观察及统计结果。

1.3 DGGE 测定生防菌在土壤中的定殖能力

利用盆栽试验的土壤, 采用修改后的 Bead-Beating 法^[12]对根际土壤微生物总 DNA 进行提取, 并且使用 Wizard DNA Clean-Up system 试剂盒对其进行纯化。菌株的总 DNA 则使用 CTAB 法对其进行抽提。

以提取的基因组总 DNA 作为模板, 采用巢式 PCR 策略, 第一次 PCR 使用细菌 16S rDNA 通用引物 F27^[13]和 V3 高变区 R518, 片段长度约为 500 bp; 第二次 PCR 使用特异性引物 GC-357F 和 518R^[14]对细菌 16S rDNA V3 区进行扩增, 片段长度约为 220–230 bp。

使用美国 Bio-rad 公司的电泳系统进行变性梯度凝胶电泳。使用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 选用的变性剂梯度为 30%–60%, 上样量为 25 μ L PCR 浓缩产物。运行条件: 1 \times TAE 电泳缓冲液中, 恒温 60℃, 80 V 跑 30 min, 180 V 跑 5 h。电泳完毕后, 用 ddH₂O 漂洗凝胶, 再用 5% 的 Goldview 染色 30 min, 在 Image Quant350 (GE health) 成相系统下拍照。

1.4 菌落形态及生化试验

将分离到的菌株在固体培养基上划线, 于 30℃ 培养, 进行表型观察。淀粉水解、明胶液化、氧化酶、接触酶、硝酸盐还原、糖发酵等生化试验参照文献^[15], 其它生化指标采用 BIOLOG 细菌自动鉴定系统进行鉴定。

1.5 菌株的电镜观察

取对数生长期新鲜菌液, 6000 r/min 离心收集菌体, 负染直接观察法用透射电子显微镜观察细胞, 并测量其大小。

1.6 DNA 的 (G + C) mol % 含量测定

采用熔点法 (T_m 值法) 测定 (G + C) mol%^[15–16], 对照菌株为 Escherichia coli K12。

1.7 菌体脂肪酸成分分析

依据微生物流行病学研究所技术标准 (WJA07-2002) 细菌鉴定—细菌脂肪酸分析鉴定法。采用 Agilent 6890 气相色谱仪, 氢火焰离子化检测器 (FID) 及 Agilent 气相色谱化学工作站 (Agilent GC6850 6890) 进行检测, 色谱柱为 1707 柱, 比对软件为 Sherlock Microbial Identification System (MIDI)。

1.8 菌株醌组分分析

菌株醌组分的提取参照 Collins^[17]的方法, 用高效液相 (HPLC) 来分析醌型。

1.9 16S rDNA 序列及系统发育分析

PCR 扩增菌株的 16S rDNA 序列^[13, 18], 引物为 F27 和 R1522。反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 次循环, 72℃ 7 min, 4℃ 下保存。测序由上海英骏生物技术有限公司广州分公司完成。序列登陆 GenBank 获得登录号并且进行同源性比较, 应用 ClustalX^[19]做多序列比对分析,

再用 MEGA4.0^[20] 软件以邻位法构建系统发育树, 进行系统进化分析。

2 结果

2.1 平板对峙实验和防病效果

经过平板抑菌试验,所选用的拮抗菌株在 TM 平板上对番茄青枯菌 SSF-4 有抑菌作用,效果较明显,抑菌带宽在达 5 mm(图 1)。

利用该株生防菌的菌悬液以及清水对照分别处理番茄植株,进行番茄青枯病的盆栽防病试验。结果表明(表 1),该菌株的防病效果达 63.7%,统计分析显示差异显著。而且无论在株高、干重还是湿重与对照植株相比都有显著的差异。



图 1 平板抑菌实验
Fig.1 Result of antibacterial experiment.

表 1 菌株 YPP-9 对番茄青枯病的防治效果和对番茄植株生长的影响研究

Table 1 The control efficiency and the growth efficiency to tomato bacterial wilt of stain YPP-9

Treatment	Disease incidence/%	Control efficiency/%	Height/cm	Dry weight/g	Wet weight/g
YPP-9	33.3a	63.7 a	18.88 a	0.38ab	2.59a
YPG-5	41.7b	54.5b	17.84a	0.34abc	0.36ab
YPP-19	66.7c	27.2c	17.35a	0.32bc	1.79bc
PM-28	75d	18.2d	16.15a	0.24cd	1.75bc
Negative Control	91.7e	0e	11.31b	0.17d	1.18c

Note: Means of the different letter are significantly different at DMRT 0.05

2.2 YPP-9 菌株在土壤中的定殖能力

DGGE 图谱能直观的反映出不同番茄根际土壤细菌 16S rDNA 的多样性,即可在分子水平上反映不同番茄根际土壤细菌种群结构多样性。

在 DGGE 指纹图谱中,不同位置的条带代表不同的细菌类群,亮度反映出不同细菌类群相对量的多少,亮度大的一般被认为是该样品中的优势细菌。将处理过 YPP-9 菌液的土壤和纯培养菌株同时进行 DGGE 电泳,同时将其他 3 株采用根系分泌物分离到菌株进行同样的操作和 DGGE 电泳(图 2)。从图 2 可见,各处理土壤样品中细菌类群都有丰富的多样性,优势菌群不尽相同。泳道 5 和泳道 6 是菌株 YPG-5、YPP-9 的 DGGE 图谱,其在所对应的处理土壤中(泳道 4 和泳道 2)也是优势条带,而在清水对照的土壤中不存在。这说明采用根系分泌物从番茄根际筛选到的菌株 YPP-5 和 YPP-9 施用到土壤后能在土壤中占优势地位,表现出一定程度的根际定殖能力。相反的,菌株 PM-28 处理土壤后,DGGE 图谱的结果显示菌株 PM-28(泳道 8)在所对应的在土壤样品中未能占有优势地位,这说明 PM-28 根际定殖能力不强。此外,泳道 7 所对应的 YPP-19 可能在扩增过程中污染了,出现了两个条带,根际定殖能力未能得到证实。

2.3 菌株 YPP-9 的形态和培养特征

菌株 YPP-9 在平板上培养 24 h 后的菌落呈奶

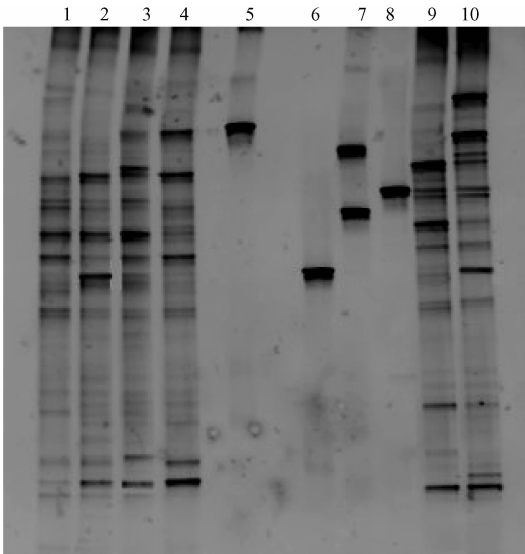


图 2 DGGE 分析 4 株生防菌在土壤中的定殖能力

Fig. 2 Colonized ability in soil of 4 strains by DGGE. Lane 1, tomato soil samples treated by strain PM-28; lane 2, tomato soil samples treated by strain YPP-9; lane 3, tomato soil samples treated by strain YPP-19; lane 4, tomato soil samples treated by strain YPG-5; lane 5, Strain YPG-5; lanes 6, Strain YPP-9; lane 7, Strain YPP-19; lane 8, Strain PM-28; lane 9, tomato soil samples treated by water; lane 10, tomato soil samples treated by mixed strains.

酪色,圆形或不规则形,表面光滑不透明,边缘不整齐,菌落大小 2-3 mm,平板培养 48 h 后开始产芽孢,芽孢中生偏端生为近似柱形(图 3-A);革兰氏

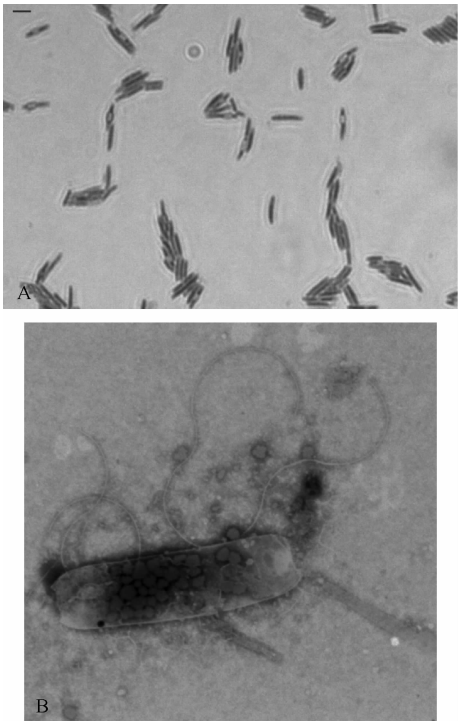


图3 菌株 YPP-9 的光学显微镜照片 (1000 ×) (A) 和透射电镜照片 (10000 ×) (B)

Fig. 3 Optical micrograph (1000 ×) (A) and electron micrograph (10000 ×) (B) of strain YPP-9

染色为阳性,菌体直接负染后在透射电镜下的观察为杆状,测量大小为(1.8 – 4.1) μm × (0.9 – 1.1) μm (图3-B),孢囊不膨大,没有伴孢晶体,侧生鞭毛;在细胞内可观察到颗粒状物质。

2.4 生理生化特征

菌株 YPP-9 能在 20℃ – 45℃ 的温度下生长,其最适生长温度为 30℃。其生长 pH 范围为 pH 5.5 – 8.5,最适生长 pH 为 6.0。该菌不耐盐,当 NaCl 浓度大于 2% 时,生长被抑制。该菌株的 G + C mol% 含量为 41.9%。BIOLÓG 细菌自动鉴定系统进行鉴定的结果发现菌株 YPP-9 属于芽孢杆菌属,但在数据库里没有匹配的结果。结果显示与数据库最相近的 *Bacillus Megaterium* 相似性 Similarity (SIM) 为 0.002,位距 Distance (DIS) 为 30.32。

菌株 YPP-9 的接触酶试验为阳性;不能水解明胶,能水解淀粉;吡啶和 V-P 反应为阴性;不利用柠檬酸盐,在 L-阿拉伯糖产弱酸,不能利用 D-葡萄糖、纤维二糖、松三糖、棉子糖、木糖、D-甘露醇、蜜二糖产酸,在糖类中生长不产气;ONPG、尿素为阳性。菌株 YPP-9 与同源性高的芽孢杆菌属中相关菌种的生理生化特性的比较见表 2。

表 2 芽孢杆菌 YPP-9 的生理生化特征

Table 3 The physiological and biochemical characteristics of YPP-9

Characteristics	YPP-9	1	2	3	4	5	6
Hydrogen peroxide enzyme	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 50℃	–	+	+	+	–	–	+
Anaerobic growth	–	+	+	+	+	+	–
Hydrolysis of:							
Casein	–	+	–	–	+	+	–
Gelatin	–	v	+	–	+	+	+
Storage inclusions	+	–	+	+	v	–	–
ONPG	+	–	–	–	–	–	–
Urease	–	+	+	v	+	+	–
Nitrate reduction to N ₂	–	+	+	v	+	+	–
Acid production from:							
D-Glucose	–	+	+	w	+	+	+
D-Melibiose	–	–	v	+	–	–	v
L-Fucose	–	–	v	+	–	–	–
D-Cellobiose	–	v	+	–	–	–	–
Lactose	–	–	+	+	–	–	v
D-Mannitol	–	v	+	–	+	–	+
Raffinose	–	–	+	v	–	–	v
Ribose	–	v	w	v	w	w	v
Starch	+	–	v	v	+	+	–
Sucrose	–	–	v	v	+	v	+
G + C content(mol%)	41.9	40.0 – 40 – 5	39.6 – 40.1	39.3 – 39.4	39.8 – 40.3	40.1 – 40.4	40.7

Species are listed as : 1, *B. novalis* sp. nov. (Jeroen et al,2004); 2, *B. bataviensis* sp. nov. (Jeroen et al,2004); 3, *B. dretnensis* sp. nov. (Jeroen et al,2004); 4, *B. vireti* sp. nov. (Jeroen et al,2004); 5, *B. soli* sp. nov. (Jeroen et al,2004); 6: *B fumarioli* sp. nov. (Logan et al,2000) + , >85% positive; 2, <15% positive or weakly positive; V, results vary between strains; W, always weak; ND, Not determined

采用 InforBIOV5.26 软件对与 YPP-9 相似性较高的菌株进行生理生化特征的系统树构建,结果如

图 4 所示,YPP-9 单独聚成一支,与其它相似菌株没有聚成一类。

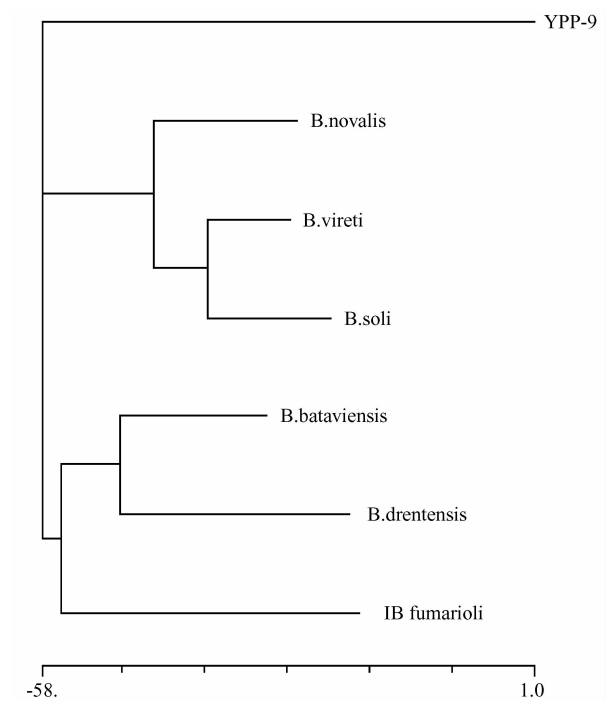


图 4 菌株 YPP-9 生理生化的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree including type strains of YPP-9 based on physiological and biochemical characteristics

2.5 菌株醌组分及细胞壁脂肪酸分析

菌株 YPP-9 的甲基萘醌主要类型为 MK-7,细胞壁脂肪酸主要种类是 C_{14:0} iso、C_{15:0} iso 和 C_{16:0} iso 以及 C_{16:1ω7c} alcohol,含量分别为 28.27%,19.59%,12.93% 和 10.88%。菌株 YPP-9 和同源性高的相关菌种的主要脂肪酸组成见表 3。

2.6 以 16S rDNA 序列同源性为基础的系统发育学分析

菌株 YPP-9 在 GenBank 的序列登录号为 FJ231500,采用 BLAST 将菌株 YPP-9 长 1433 bp 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中已登录的基因序列进行比对,结果发现与菌株 YPP-9 的 16S rDNA 同源性最高的是 *Bacillus djibeloensis*,同源性为 98.1%,但该种不是有效发表的种,在 Jean Euzéby's 的有效分类单元的列表里没有出现(<http://www.bacterio.cict.fr/s/strepto-mycesa.html>)。与芽孢杆菌属的模式菌株 *Bacillus bataviensis*^[21] 和 *Bacillus drentensis*,其同源性均为 97.9%。根据菌株 YPP-9 的 16S rDNA 序列与芽孢杆菌属的 24 个菌种的模式菌株的 16S rDNA 序列做出系统进化树(图 5),结果可见,所选菌株在系统进化树与 *Bacillus fumarioli*^[22] (AJ581126.1)聚成一类,支持度 97.7%,而又不同于其他菌株形成独立分支。

表 3 芽孢杆菌不同种的脂肪酸组成 (%)

Table 3 The physiological and biochemical characteristics of YPP-9

Fatty acid	YPP-9	<i>B. novalis</i>	<i>B. vireti</i>	<i>B. soli</i>	<i>B. bataviensis</i>	<i>B. drentensis</i>	<i>B. fumarioli</i>
iso-C _{14:0}	28.27	5.3	3.1	3.3	6.9	8.7	
C _{14:0}	1.70	3.0	1.6	<1.0	1.5	1.4	
iso-C _{15:0}	19.59	43.9	47.1	42.9	36.9	32.2	51.3
anteiso-C _{15:0}	3.53	31.0	33.6	33.5	20.5	21.8	6.3
C _{16:1ω7c} alcohol	10.88	1.7	<1.0	2.4	2.3	3.1	
iso-C _{16:0}	12.93	2.7	2.5	1.4	2.4	2.1	5.9
C _{16:1ω11c}	4.88	3.2	1.5	3.2	11.3	13.2	
C _{16:0}	4.28	4.8	3.8	1.6	7.7	3.4	
iso-C _{17:1ω10c}	2.41	<1.0	<1.0	4.1	1.7	4.5	1.9
iso-C _{17:0}	1.39	<1.0	2.0	2.6	<1.0	2.6	15.7
anteiso-C _{17:0}	<1.0	1.9	2.7	1.5	1.1	1.1	14.0
C _{18:1ω9c}	2.92	<1.0	<1.0	<1.0	1.3	1.8	
C _{18:0}	1.98	<1.0	<1.0	<1.0	2.7	1.3	

3 讨论

作为防治番茄青枯病生防菌能否在宿主植物根际定殖生长已成为筛选、评定土传病害生防菌的一个重要指标,并最终决定该生防菌的开发利用潜力。菌株 YPP-9 是一株通过分子辅助手段从番茄根际筛选到的微生物菌株,本研究证实该菌株对番茄青枯病具有良好的拮抗效果,在番茄根际具有较好的定殖能力,预示菌株 YPP-9 在番茄青枯病的防治上将具有应用潜力^[23]。

理想生防菌不仅要求拮抗能力强,而且要求生活力强,能在寄主植株根部和土壤中定殖。目前对于生防菌的根际定殖能力研究,国内外做了相关的研究,植物根际的微生物的定殖检测方法一般有天然抗生素抗性的标记,外来基因标记,DNA 和 RNA 探针以及免疫学方法^[24]。当菌株没有选择标记时,天然抗生素抗性就较实用^[25],应用相当广泛。Jaleed、黎起秦、盛下放等^[26-27]采用抗生素标记拮抗菌,种群密度比较法来确定其在植物根际的定殖能力。但同一生境中具有相同抗生素抗性的土著菌严

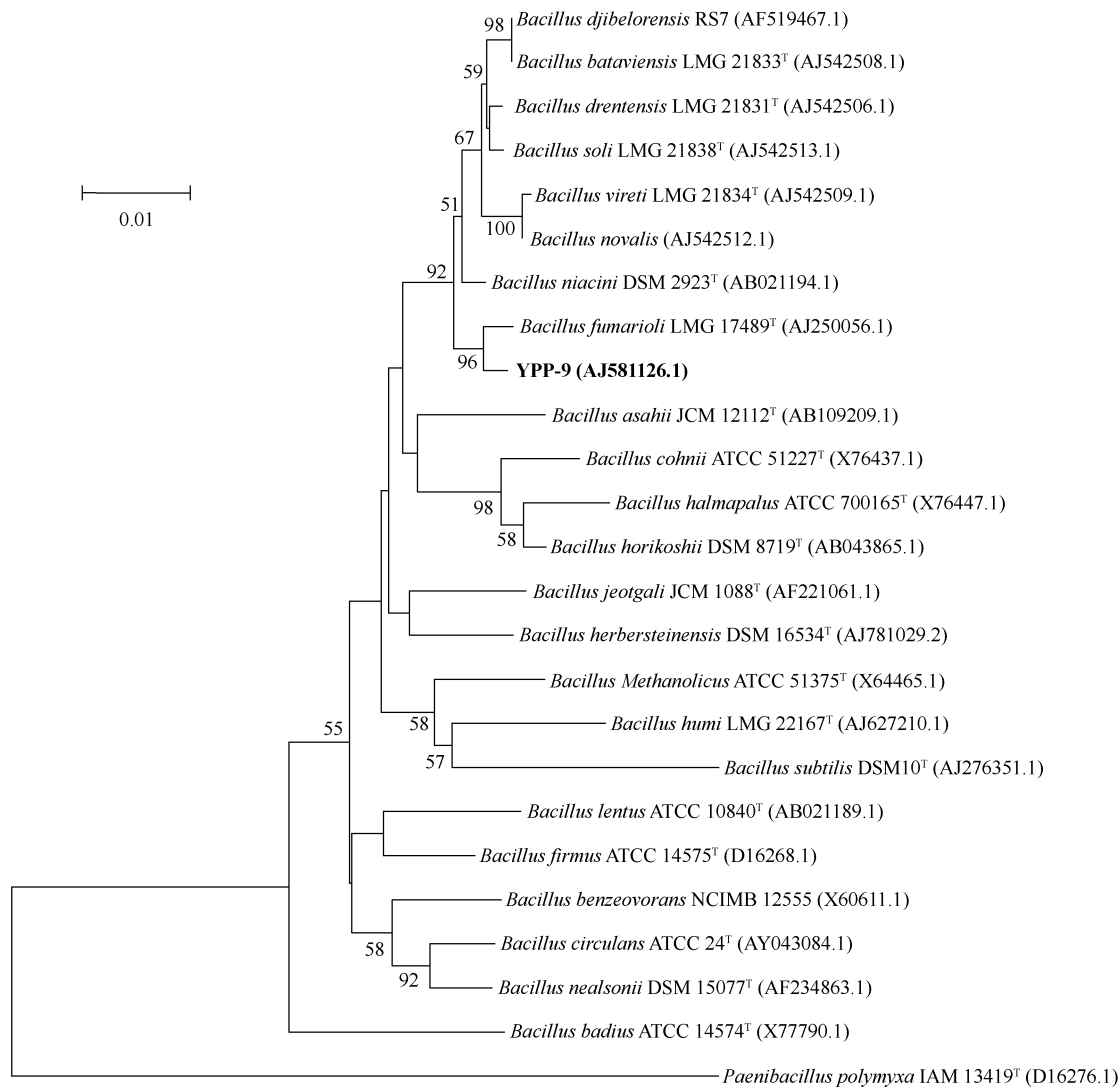


图5 菌株 YPP-9 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree including type strains of YPP-9 based on 16S rDNA sequence.

重干扰了其检测根际菌的可靠性^[28]。随着分子生物学向微生物生态学的渗透,基因标记技术的建立与发展起来,Wilson 等揭示了用报告基因 β -半乳糖苷酶(*lacZ*) 原位检测也有相同的缺陷,而 β -葡糖苷酸酶 *GusA* 标记系统虽检测灵敏简便但用组织化学染色检测 *GusA*,反应产物会在酶表达位点积累扩散,扩散效应使得对细菌的定位不够精确。*LuxAB* 标记系统也因干扰小而受重视,国内发光酶基因 *luxAB* 标记荧光假单胞菌和巨大芽胞杆菌^[29] 来研究其在植物根际定殖规律的报道,但会受到除了土著微生物的因素及接种菌株本身的特性等的制约,而且 *LuxAB* 催化醛发光产生的信号弱,难以检测到单个发光的细菌。*gfp* 标记系统克服以上缺点,已被成功地用于监测细菌在植物根部定殖^[30-32],虽然有良好的前景,可仍然存在着激发波长影响检测 GFP、紫外对 GFP 的破坏、荧光强度的非线性性质等一系

列的问题^[33]。本研究采用 DGGE 的方法通过样品中的优势细菌直观反映出该菌株在土壤中的存在情况,直观并且时间短,具有一定的创新性。

菌株 YPP-9 在菌体形态、生理生化特性、化学分类特征和 16S rDNA 序列等方面均与 *B. drementensis* 和 *B. bataviensis* 等模式菌具有的相似性。例如细胞均为革兰氏阳性、接触酶为阳性、不能利用乳糖和核糖。但是已报道很多芽孢杆菌都不能产生尿素酶,该菌株具有这能力,与其他的同源性高的芽孢杆菌有一定的差异。YPP-9 甲基萘醌主要类型为 MK-7,与其他的芽孢杆菌属的醌组分类型一致。细胞壁脂肪酸主要种类是 $C_{14:0}$ iso、 $C_{15:0}$ iso 和 $C_{16:0}$ iso 以及 $C_{16:1\omega7c}$ alcohol,不饱和脂肪酸含量和饱和脂肪酸的含量与其他几株同源性高的模式菌的脂肪酸类型都存在一定的差异。这可能与细菌的脂肪酸组成和含量会随着培养条件和培养时间而改变有关。YPP-9

的 16S rDNA 同源性与芽孢杆菌属的模式菌株 *Bacillus bataviensis* 和 *Bacillus drentensis* 均为 97% , 由此可见菌株 YPP-9 应归属与 *Bacillus* sp. , 从系统发育地位分析, 虽然菌株 YPP-9 的 16S rDNA 序列与 *Bacillus bataviensis* 和 *Bacillus drentensis* 同源性最高, 但是它又与 *Bacillus fumarioli* (AJ581126.1) 聚成一类, 支持度 96% , 而又不同于其他菌株形成独立分支。因此 YPP-9 可能为芽孢杆菌属的一个新种。

参考文献

- [1] Stura A, Matheson B. Population of endophytic bacteria which influence host-resistance to Erwinia induced bacterial soft rot in potato tubers. *Plant and Soil*, 1996, 184: 265-271.
- [2] 王羽, 肖崇刚. 番茄青枯病病菌无致病力菌株的分离和控病研究. 西南农业大学学报 (*Journal of Southwest Agricultural University*), 2004, 26 (4): 426-428.
- [3] 李广存, 金黎平, 谢开云, 等. 马铃薯青枯病研究进展. 中国马铃薯 (*Chinese Potato*), 2004, 18(6): 350-354.
- [4] 黎起秦, 罗宽, 林纬, 等. 内生菌 B47 的定殖能力及其对番茄青枯病的防治作用. 植物保护学报 (*Acta Phytophylacica Sinica*), 2006, 33(4): 363-368.
- [5] El-Abyad MS, El-Sayed MA, El-Shanshoury AR, et al. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. *Plant and Soil*, 1993, 149: 185-195.
- [6] Anuratha CS, Gnanamanickam SS. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria. *Plant and Soil*, 1990, 124: 109-116.
- [7] 朱红惠, 姚青, 李浩华, 等. 丛枝菌根真菌对番茄根系酚类物质和青枯菌种群数量的影响. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2004, 31(1): 1-5.
- [8] Rainey RB. Adaptation of *Pseudomonas fluorescents* to the plant rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 64(1): 243-257.
- [9] Yoshitaka S, Masaya N, Tomoko O, et al. Comparison of Bacterial Community Structures in the Rhizoplane of Tomato Plants Grown in Soils Suppressive and Conducive towards Bacterial Wilt. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9): 3996-4001.
- [10] 姜英华, 胡白石, 刘凤权. 植物土传病原菌拮抗细菌的筛选与鉴定. 中国生物防治 (*Chinese Journal of Biological Control*), 2005, 11(4): 260-264.
- [11] 赵凯, 肖崇刚, 孔德英. 内生细菌对番茄青枯病的控病作用及抗菌谱. 西南农业大学学报 (*Journal of Southwest Agricultural University*), 2006, 4(28): 314-318.
- [12] Yeates C, Gillings MR, Davison AD, et al. Veal DA Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological procedures online*, 1998, 1: 40 - 47.
- [13] Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, et al. Gene organization and primary structure of a ribosomal DNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 1981, 48: 107 - 127.
- [14] Muyzer G, De-Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社. 2001.
- [16] Mesbah M, Premachandran U, Whitman W. Precise measurement of the G + C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1989, 39: 159-167.
- [17] Collins MD, Pirouz T, Goodfellow M, et al. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *Journal of General Microbiology*, 1977, 100: 221-230.
- [18] Brunel B, Givaudan A. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR amplified 16S rRNA gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 574-580.
- [19] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876 - 4882.
- [20] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004, 5: 150-163.
- [21] Jeroen H, Bram V, Niall A, et al. *Bacillus novalis* sp. nov., *Bacillus vireti* sp. nov., *Bacillus soli* sp. nov., *Bacillus bataviensis* sp. nov. and *Bacillus drentensis* sp. nov., from the Drentse A grasslands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004, 54: 47 - 57.
- [22] Logan N, Lebbe L, Hoste B. et al. Aerobic endospore-forming bacteria from geothermal environments in northern Victoria Land, Antarctica, and Candlemas Island, South Sandwich archipelago, with the proposal of *Bacillus fumarioli* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50: 1741 - 1753.
- [23] Howell CR. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 2002, 87 (1): 4-10.
- [24] 张炳欣, 张平. 植物根围外来微生物定殖的检测方法. 浙江大学学报 (*Journal of Zhejiang University*), 2000, 26 (6): 624-628.
- [25] 张玉勋, 王道本, 彭于发. 生防细菌 D93 菌株在小麦根部定殖的研究. 华中农业大学学报 (*Journal of huazhong Agricultural University*), 1996, 15(1): 18-23.

- [26] Jaleed S , Ahmad JS , Baker R. Rhizosphere competence of *Trichoderma hamatum*. *Phytopathology*, 1987, 77 (2) : 182-189.
- [27] 盛下放. 硅酸盐细菌 NBT 菌株在小麦根际定殖的初步研究. 应用生态学报 (*Chinese Journal of Applied Ecology*), 2003, 14(11) : 1914-1916.
- [28] Kloepper JW, Beauchamp CJ. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 1992, 38: 1219-1232.
- [29] 刘健, 李俊, 姜昕, 等. 巨大芽胞杆菌 luxAB 标记菌株的根际定殖研究. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2001, 28(6) : 1-4.
- [30] Wilson KJ. Molecular techniques for the study of rhizobial ecology in the field. *Soil Biology and Biochemistry*. 1995, 27: 501-514.
- [31] Egner T, Hurek T, Reinhold-Hurek B. Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotrophs, on rice roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 1998, 11: 71-75.
- [32] 董越梅, 安千里, 李久蒂, 等. 利用 GFP 和抗性双类型标记监测联合固氮菌在玉米根际的定殖. 应用与环境生物学报 (*Chinese Journal of Applied Environment Biology*), 2000, 6 (1) : 61-65.
- [33] 李世贵, 吕天晓, 顾金刚, 等. 绿色荧光蛋白在微生物根际定殖研究中的应用. 生物技术通报 (*Biotechnology Bulletin*), 2009, 2: 34-37.

Identification, colonization and disease prevention capacity of an antagonistic bacterium against *Ralstonia Solanacearum*

Zhikun Li, Honghui Zhu *

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou Provincial Open Laboratory of Microbial New Application Technique, Guangzhou 510070, China)

Abstract: [Objective] To isolate a bacterial strain YPP-9, dominantly colonizing the rhizosphere of tomato using root exudate medium. In this study, we investigated the antagonism and disease-controlling effect against *Ralstonia solanacearum*, evaluated the ability to colonize the rhizosphere of tomato, and further analyzed the phylogeny of YPP-9. [Methods] To evaluate the antagonism against *R. solanacearum* and the biocontrol on tomato bacterial wilt by YPP-9 respectively employing plate culture method and pot experiment in green house. We analyzed the rhizosphere colonization of YPP-9 by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, and also identified the taxonomic position of YPP-9 using morphological and chemotaxonomic characteristics together with 16S rRNA gene phylogenetic analysis. [Results] YPP-9 suppressed the growth of *R. solanacearum* (strains SSF-4) in vitro with the inhibition zone of 5 mm. The disease-control efficiency against tomato bacterial wilt in pot was 63.4%. YPP-9 also colonized the rhizosphere of tomato well. The colonies were cream in colour after 24 h culture. Cells were gram-positive, rods ($1.8 - 4.1 \mu\text{m} \times 0.9 - 1.1 \mu\text{m}$) and formed endospores. Endospores were mainly ellipsoidal to cylindrical and lied in subterminal, and occasionally paracentral, positions in no swollen sporangia. No crystal protein. The pH range for YPP-9 growth was 5.5 - 8.5 with the optimum at pH 6.0, and the temperature for YPP-9 growth was 20 to 45 degrees with the optimum at 30 degrees. The results of BIOLOG GP2 showed that YPP-9 was *Bacillus*. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequence revealed that YPP-9 was the most closely related to *Bacillus fumarioli*, with the sequence similarity of 97.7%. The sequence number was FJ231500. The DNA G + C content was 41.9%. The major menaquinone was MK-7. The dominant fatty acids in cell wall were $\text{C}_{14:0}$ iso, $\text{C}_{15:0}$ iso, $\text{C}_{16:0}$ iso and $\text{C}_{16:1\omega7c}$ alcohol, with the contents of 28.27%, 19.59%, 12.93% and 10.88%, respectively. [Conclusion] Bacterium YPP-9 strongly inhibited *R. Solanacearum* in vitro and efficiently suppressed the disease development in pot experiment. YPP-9 also colonized the tomato rhizosphere well. Taxonomically, YPP-9 is affiliated to *Bacillus*, and probably a novel species.

Keywords: antagonistic; colonization; taxonomic position

(本文责编:张晓丽)

Support by the National Natural Science Foundation of China(30770067)

* Corresponding author. Tel: +86-20-87676803; Fax: +86-20-37656629; E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

Received: 18 September 2009/Revised: 14 December 2009