

茶树上冰核活性细菌的分离、鉴定及防治

孙 健, 何天良, 江昌俊^{1*}

(安徽农业大学茶叶生物化学与生物技术教育部重点实验室, 合肥 230036)

摘 要: 霜冻发生时从茶树上分离到 1 株冰核活性细菌, 该菌株在 -5°C 下在 2 min 内冻滴率达到 85%, 一个冰核产生需要的细胞数约为 5.4×10^3 个, 该菌株具有明显冰核活性。对该菌株进行 16S rDNA 序列对比分析, 判断该菌株为萎蔫短小杆菌 (*Curtobacterium flaccumfaciens*)。在 -5°C 条件下, 药剂防治效率顺序为: 次氯酸钙 > Tween 80 > 藏红 > 亚甲蓝。在同一生态条件下的土壤中分离出 1 株拮抗菌, 经鉴定该菌株为黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)。

关键词: 冰核活性细菌; 鉴定; 药剂防治; 拮抗菌

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)05-0788-04

Identification and control of one strain of ice nucleation active (INA) bacteria isolated from the tea plant

SUN Jian, HE Tian-liang, JIANG Chang-jun

(Key laboratory of Tea Biochemistry and Biotechnology, Education of Ministry, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: One of ice nucleation active (INA) bacteria was isolated from the tea plant when frost occurred, and the freezing percentage of this strain was 85% at -5°C in 2 min. The cells/ice nuclei were about 5.4×10^3 , and the strain shows significant ice nucleation activity. After 16S rDNA sequences of the isolates in GenBank were analyzed, the strain was identified as *Curtobacterium flaccumfaciens*. The efficiency of chemical control order at -5°C was calcium hypochlorite > Tween 80 > saffron > methylene blue. Under the same ecological condition, antagonist bacterium was isolated from the soil, which was identified as *Phanerochaete chrysosporium*.

Key words: INA bacteria; identification; medicament control; antagonistic bacterium

茶树 (*Camellia sinensis*) 冻害的发生受多种因子的影响。多数研究者认为, 茶树低温冻害与低温及其持续时间, 茶树品种以及茶树上附生的微生物有关。冰核活性细菌^[1]的存在使茶树在 $-2 \sim -3^{\circ}\text{C}$ 下细胞水结冰从而诱发冻害。本试验从茶树上分离的 1 株冰核活性细菌, 通过对其鉴定, 使用药剂和拮抗菌对冰核活性细菌的室内防除, 以期对茶树抗冻提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

用于分离冰核活性细菌的材料于秋冬季霜冻发生后采集于安徽农业大学大杨店实验基地茶园。样

品采集范围为整个茶园, 每种茶树采集 10 片老叶。对照菌株为大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。药剂选择次氯酸钙、Tween 80、藏红和亚甲蓝。

1.2 试 验 方 法

1.2.1 冰核细菌的分离 用灭菌小刀切取采集的植物组织, 并切成碎片状后, 再加入无菌水于摇床中以 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 室温下振荡浸洗 1 h, 然后取 $100 \mu\text{L}$ 浸洗液经 10 倍梯度稀释后涂布 KB 平板, 置 24°C 恒温箱中培养 2 d。挑取所生长的单菌落进行划线分离纯化, 用于分离菌株的冰核活性测定和鉴定。

1.2.2 冰核活性的测定 测定冰核活性采用 Vali^[1] 发明, 后又由 Lindow 改进的小液滴冻结法。待移植到试管斜面上的菌落长好后, 用无菌水直接加入

收稿日期: 2011-05-10

作者简介: 孙 健, 男, 硕士研究生。

* 通讯作者: 江昌俊, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: jiangcj@ahau.edu.cn

到斜面上, 配制浓度大约为 10^8 cfu·mL⁻¹ 的细菌悬浮液, 无菌条件下吸取细菌悬浮液 0.2 mL, 滴加到 -5℃ 的测试表面上, 每滴 10 μL, 每个菌株滴 10 滴, 重复 1 次, 排成 2 排, 以未接种的无菌液体培养基和无菌水作对照。如在 30 s 内, 每个重复有 2 滴以上的小液滴冻结成冰, 即可初步认为该菌株在 -5℃ 时具有冰核活性。纯化后再重测 1 次确认, 记下冻滴数, 换算成冻滴率, 并保存纯化后的菌株供进一步研究备用。

1.2.3 总 DNA 制备、PCR 反应扩增 16S rDNA 与序列分析 待测菌株的总 DNA 制备。16S rDNA 的 PCR 采用引物对 27 F 和 1 492 R。设置梯度 PCR 摸索条件。PCR 产物胶回收连接转化测序, 将所测定的序列从 GenBank 数据库中进行 BLAST 分析。

1.2.4 冰核基因的扩增 根据目前已发表的多个 inp 基因^[2-3], 设计 1 对特定的 PCR 反应扩增引物 5'-TGA ATT CCT GGC CGT CTG AGT ACT GC-3' 和 5'-TAG ATC TCC GGA TAT GGC AGC ACG CA-3', 采用梯度 PCR 反应扩增 inp 基因。

1.2.5 药剂的筛选^[4-5] (1) 抑菌圈测定。采用圆形滤纸片法测定。用培养 2 d 的 INA 细菌菌苔, 配制成 5×10^8 个·mL⁻¹ 细菌悬浮液, 在无菌条件下取 0.5 mL 放入无菌培养皿内, 倒入溶化后冷却至 50℃ 左右的培养基, 每皿约 18 mL 摇匀放平; 然后用无菌的滤纸片浸沾供试药剂, 每皿呈等边三角形放置 3 片, 每个处理 3 皿, 放入 25℃ 培养箱里内, 培养 48 h 后, 观测圆形滤纸片的周围是否出现透明圈和透明圈的大小, 以此判定药剂是否有抑菌作用及其强弱程度。

(2) 破坏 INA 细菌冰核活性物质的测定。将 INA 菌株接种在 KB 培养基上, 于 24℃ 培养 48 h 后, 在无菌条件下用灭菌水配成 5×10^8 cfu·mL⁻¹ 浓度的细菌悬浮液, 再用悬浮液将供试药剂稀释成实验设计的倍数, 配制药菌混合液。采用 Vali 小液滴冻结法, 吸取混合液, 无菌条件下滴在平底船型锡箔纸上, 每滴 10 μL, 每个处理 10 滴, 重复 3 次, 并设灭菌水作对照。将锡箔纸漂浮在 -5℃ 的低温酒精液面上, 处理 2 min 后, 记载各处理的冻滴数, 换算成冻滴率(%), 根据冻滴率的高低, 判定各种处理的供试药剂对 INA 细菌冰核活性的破坏有无及其强弱程度差异, 从而判断各种药剂对冰核细菌活性物质(冰核蛋白)的破坏作用。

(3) 触杀作用测定方法。用浓度约为 3×10^8 个·mL⁻¹ 的冰核细菌悬浮液与供试每种药剂配成不同浓度的药菌混合液, 放置 5 h、10 h 后分别取各

个处理的药菌混合液 0.1 mL, 放入培养皿内平板培养基上, 均匀涂抹, 每个处理 3 皿, 设无药菌液作对照, 于 25℃ 下培养 48 h, 观测冰核活性细菌是否生长以及生长差异, 由此判定供试药剂对冰核细菌有无触杀效果及其强弱程度。

1.2.6 拮抗菌的分离与鉴定^[6] 拮抗菌的来源, 从分离出 INA 的植物附近的土壤中分离, 取样范围地表以下 5 cm。

以冰核活性细菌作为指示菌, 将新鲜的冰核菌苔用灭菌水配成浓度约为 5×10^7 个·mL⁻¹ 细菌悬浮液, 无菌条件下取 0.5 mL 放入培养皿内, 再将溶化后冷却到 50℃ 左右的 KB 培养基倒入培养皿内混合摇匀, 制成含菌平板培养基, 采用点接法, 分别用接种针蘸取菌苔, 呈等边三角形点接在平板培养基上, 于 25℃ 下培养 48 h 后, 观测是否产生透明的抑菌圈, 并记载其抑菌半径大小(mm), 以此判明抑菌作用。

2 结果与分析

2.1 冰核细菌的分离与冰核活性的鉴定

从植物组织材料中初筛得到细菌菌株 9 株, 经进一步划线分离后进行冰核活性测定, 发现其中一株分离柱在 -5℃ 条件下在 30 s 试验时间内有 2 个以上液滴发生冻结, 2 min 冻滴率 85%, 而对照大肠杆菌及其他 8 株菌株在 30 s 内均未见冻结液滴发生。菌落表面湿润有光泽, 黄色, 光滑。

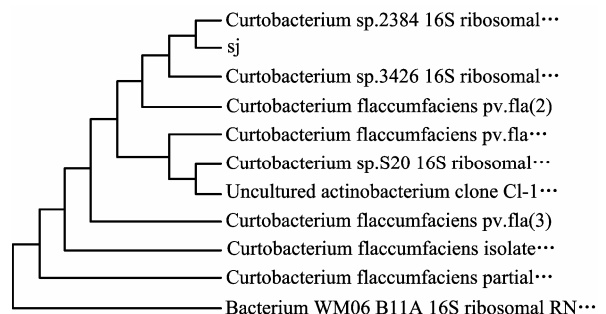


图 1 分离菌株的 16S rDNA 序列聚类分析结果

Figure 1 Cluster analysis of the isolated strain based on the 16S rDNA sequences

2.2 16S rDNA 扩增、序列测定与聚类分析

根据梯度 PCR 结果, 设定退火温度为 54℃。PCR 反应条件为: 94℃ 30 s, 54℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环。PCR 产物 1 500 bp 左右, 经胶回收连接转化, 菌落 PCR 有条带。经对扩增产物测序, 并将所测定的序列从 GenBank 数据库中进行

BLAST 分析(图 1), 鉴定出该菌株为萎蔫短小杆菌 (*Curtobacterium flaccumfaciens*)。

2.3 冰核基因的扩增

用 *inp* 基因保守区序列设计的引物可从中扩增得到约 550 bp 的基因片段, 经序列分析, 证明与已发表的来自于丁香假单胞菌丁香亚种 (*P. syringae* subsp. *syringae*) *inp* 基因具有较高同源性。

2.4 药剂对冰核细菌抑菌圈测定、活性物质破坏和触杀效果

2.4.1 抑菌圈测定 在 25℃ 培养 2 d, 4 种试剂对冰核菌的抑菌圈大小排序为: 次氯酸钙 > Tween 80 > 亚甲蓝 > 藏红 (表 1), 以次氯酸钙最佳。

2.4.2 破坏 INA 细菌冰核活性物质的测定 采用 Vali 小滴冻结法, 对放置 5 h、10 h 的各处理的药菌混合液, 于 -5℃ 和 -7℃ 测定冰核活性结果显

示, 对照冰核细菌 INA 菌液, 除次氯酸钙冻滴率为 20% 左右外 3 个处理的冻滴率与未药剂处理冻滴率相同 (表 1), 说明次氯酸钙对冰核活性物质有明显的破坏作用, 另外 3 种药剂对冰核活性物质没有破坏作用。

2.4.3 触杀作用测定 从表 1 中可以看出次氯酸钙对冰核细菌触杀作用为 100%, 藏红的触杀效果为 95%, 亚甲蓝与 Tween80 对冰核细菌没有触杀作用。

2.5 拮抗菌的分离及鉴定

从土壤中分离出 7 种菌株, 以冰核细菌做指示菌, 分离出一株拮抗菌。菌落表面细腻、白色、丝状。经 16S rDNA 扩增、序列测定与聚类分析, 鉴定菌株为黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)。

表 1 药剂对对冰核细菌抑菌圈测定、活性物质破坏和触杀效果
Table 1 Effect of pesticide on INA bacteria

药剂名称与剂量 Name of drug and its dosage	药菌混合液冻滴率/% Freezing percent				触杀灭菌效果/% Tag sterilization	抑菌圈测定/mm Diameter of inhibition zone
	5 h		10 h			
	-5℃	-7℃	-5℃	-7℃		
次氯酸钙 0.4% Calcium hypochlorite	20	25	20	20	100	3
藏红 0.4% Saffron	85	95	85	95	95	0
亚甲蓝 0.4% Methylene blue	85	100	85	95	0	1.8
Tween 80 0.4%	85	100	85	100	0	1.9
无菌水对照 CK	85	100	85	95	0	0
INA	85	100	85	100		

3 讨论

一般认为^[7-11], 在没有冰核存在的情况下, 纯水可以过冷却到 -40℃ 仍不结冰。冰核作为晶核凝结核分子整齐排列可以催化结冰过程的发生。在各种冰核中, 由冰核细菌形成的生物冰核是活性最强的冰核之一, 因而引起人们的广泛关注。大量研究证明, 在自然界广泛存在着冰核活性细菌 (ice nucleation active bacteria, 简称 INA 细菌) 它可在 -2~-3℃ 下诱发植物细胞水结冰而发生霜冻, 但如果没有冰核细菌存在的植物, 可耐 -6~-7℃ 的低温而不发生冻害。这证明了冰核细菌是诱发和加重植物霜冻的重要因素。使用药剂活拮抗菌防除冰核活性细菌, 可以减轻或控制霜冻。

本试验针对 1 株从茶树上分离的冰核细菌, 对其进行鉴定, 药剂和拮抗菌防除。分离的菌株鉴定结果为萎蔫短小杆菌 (*Curtobacterium flaccumfaciens*)。试验药剂中次氯酸钙的效果最好, 次氯酸

钙能有效抑制此株冰核细菌, 能够很好的触杀冰核细菌并且破坏冰核活性物质。在同一生态条件下, 筛选出的一株对冰核细菌有拮抗作用的拮抗菌鉴定为黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)。通过药剂和拮抗菌防除冰核活性细菌试验, 可以为其他种类冰核活性细菌的防除和利用提供理论依据。

参考文献:

- [1] Vali G. Quantitative evaluation of experimental results on the heterogenous freezing of super cooled liquids[J]. Journal Atmospheric Science, 1971, 28: 402-409.
- [2] 赵廷昌, 孙福在, 姜大志, 等. 冰核微生物中冰核基因重复序列 PCR 分析[J]. 微生物学通报, 2001, 28(3): 40-45.
- [3] 刘静, 陈庆森. 冰核活性细菌基因的研究进展及其应用[J]. 生物技术, 2006, 16(2): 82-85.
- [4] 孙福在, 赵廷昌, 牟丰盛, 等. 生防菌和药剂除冰核细菌防御玉米霜冻研究[J]. 自然灾害学报, 2003, 12(4): 115-119.

- [5] 崔汝强, 姬广海, 张世珖. 冰核活性细菌拮抗菌株的筛选[J]. 云南农业大学学报, 2004, 19(5): 528-531.
- [6] 刘涛, 雷思勤, 王跃进. 含氯消毒剂抗冻剂的研究[J]. 中国消毒学杂志, 2008, 25(4): 377-378.
- [7] 孙福在, 赵廷昌. 冰核细菌生物学特性及其诱发植物霜冻机理与防霜应用[J]. 生态学报, 2003, 23(2): 336-345.
- [8] 胡芸, 李茜茜, 蔡皓, 等. 1 株高冰核活性细菌的分离及鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(2): 243-247.
- [9] SCHNELL R C, VALI G. World-wide source of leaf-der freezing nuclei [J]. Nature, 1973, 212 - 213.
- [10] Lindow SE. *Erwinia herbicola*: a bacterial ice nucleus active in increasing frost injury to corn[J]. Phytopathology, 1978(3): 523-527.
- [11] 高玳珍. 茶树冻害及防冻技术的研究进展[J]. 湖南农学院学报, 1995, 14(2): 129-133.

本刊外聘编委 黎志康研究员

中国农业科学院农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程首席科学家、国际水稻研究所驻中国代表科学家和全球水稻分子育种协作网协调科学家。

专业特长: 植物分子遗传学(基因定位、数量性状遗传作图、植物分子标记辅助育种、功能等位基因发掘和复杂农艺性状的功能基因组研究)及其在水稻育种、遗传和进化中的应用。国际动植物基因组年会植物分子育种分会的主持人, 国际遗传学大会 Invited Speaker。是美国科学促进协会会员, 美国遗传学学会会员, 美国作物科学学会会员。

1974 年 10 月 - 1977 年 9 月就读于安徽农业大学, 1980 年 9 月 - 1983 年 8 月在中国农业科学院学习, 获硕士学位, 1985 年 1 月 - 1989 年 7 月在美国加州大学戴维斯校区学习, 获博士学位。1997 年 11 月 - 2003 年 7 月在国际水稻研究所遗传育种系任高级研究员, 2003 至今在中国农业科学院作物科学研究所工作, 任水稻分子遗传和育种研究员。

在国外曾主持过 8 个项目的研究, 总研究经费额达 300 多万美元。曾设计、策划并主持了有 11 个国家和 31 个院所参加的“全球水稻分子育种计划”, 取得了重大的进展。目前主持的在研项目包括来自美国洛克菲勒基金的项目 2 项、国际农业研究中心挑战计划 1 项, 总研究经费额达 170 多万美元。此外还主持或承担国家科技部 973、863 和农业部 948 项目 3 项, 总研究经费额达 700 万人民币。