

拮抗烟草青枯病菌的烟草内生细菌系统 多样性及趋化性分析^{* 1}

雷春霞¹, 冯云利¹, 奚家勤², 曹永红¹, 李萍¹, 马莉¹, 莫明和¹, 方敦黄³, 杨发祥⁴

(1. 云南大学 生物资源保护与利用重点实验室, 云南 昆明 650091; 2. 中国烟草总公司 郑州烟草研究院, 河南 郑州 450001; 3. 云南省烟草农业科学研究所, 云南 玉溪 653100; 4. 云南省微生物发酵工程研究中心有限公司, 云南 昆明 650217)

摘要: 从来自 3 个烤烟品种 NC297、红大、K326 的 600 株内生细菌中, 以烟草青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 为靶标, 共筛出 55 株拮抗菌, 其对烟草青枯病菌的抑菌圈直径在 1~16 mm 之间. 对这 55 株拮抗性内生细菌的 16S rRNA 基因序列进行 RFLP 分析共产生 6 种带型. 根据 RFLP 带型选取 16 株进行 16S rRNA 基因序列测定和系统发育分析. 结果表明这 55 株拮抗性内生细菌属于 Firmicutes 和 Proteobacteria 两大类群的 6 个种: *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *Bacillus methylophilus*, *Bacillus tequilensis*, *Brevibacillus parbrevis*, *Brevibacillus brevis* 和 *Pseudomonas aeruginosa*. 利用 *cheA* 基因检测方法和平板检测方法共筛选到 3 种具有趋化性的拮抗性内生细菌: *Brevibacillus parbrevis*, *Brevibacillus brevis* 和 *Pseudomonas aeruginosa*.

关键词: 烟草内生细菌; 生物防治; 烟草青枯病; 趋化性

中图分类号: Q 939.92 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2012)01-0099-08

烟草青枯病是由青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的一种烟草重要病害, 国内俗称为“烟瘟”、“半边疯”. 该病害在长江流域及其以南各大烟区普遍发生, 其中广西、广东、福建、湖南、浙江、安徽、四川等省为重灾区^[1]. 2002 年以来, 云南省南部旱地烟区烟草青枯病危害上升速度很快, 局部地块发病率达到 80% 以上, 且常与烟草黑胫病混合发生, 严重时整片烟田植株枯死^[2]. 目前对烟草青枯病的防治主要包括抗病育种, 轮作控制, 化学防治和生物防治, 其中, 土壤熏蒸和施用农用链霉素是主要措施^[3]. 近年来, 出于对环境、生态和人畜健康安全的考虑, 以及绿色烟叶、有机烟叶的兴起, 生物防治迎来了前所未有的发展契机. 利用微生物防治烟草青枯病已有广泛研究, 部分菌株的防治效果令人鼓舞, 具备了产业化应用的潜力. 肖

田等^[4]筛选的弱毒力青枯病菌菌株 Tmjd123, Au-jd82221 对烟草青枯病的室内防效分别高达 58.4% 和 97%. 张秀玉等^[5]筛选的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), SH7 菌株产生一种相对分子质量为 33.6 ku 抗菌蛋白, 对烟草青枯病的温室防效为 70.8%. 张旭等^[6]从湖南嘉禾分离的桥石短芽孢杆菌 (*Brevibacillus choshinensis*) 2-Q-9 菌株亦产生抗菌肽, 对烟草青枯病有较好的抗性. 胡军华等^[7]从重庆黔江烟草田间分离获得的铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) swu3122 菌株, 利用其菌液和活性物质对烟草青枯病的盆栽试验的防效好于农用链霉素 (51.25%), 分别为 60.87% 和 60.32%, 且在烟草根际有较好的定殖能力.

防治土壤病害的生防微生物要发挥其生防功能, 先决条件是该生防菌必须在根际土壤中能有效

* 收稿日期: 2011-10-09

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07102-003)资助; 国家自然科学基金资助项目(31160376, 30970100)资助; 郑州烟草研究院科技项目(122009CZ0420)资助; 云南省应用基础研究计划项目(2011FA002)资助; 昆明市科技局项目(11N010905)资助; 国家发改委绿色农用生物产品专项资助.

作者简介: 雷春霞(1983-), 女, 河南人, 硕士生, 主要从事生物防治方面的研究.

通讯作者: 莫明和(1970-), 男, 贵州人, 研究员, 主要从事植物病害生物防治及环境微生物生态研究, E-mail: minghemo@yahoo.com.cn.

定殖. 内生细菌(endophytic bacteria)可有效地在植物体内定殖,生存环境较为稳定,是一类潜在的重要生防菌资源.在“植物-微生物”互作系统中,植物根系分泌物作为外源信号物质与微生物的趋化性联合作用,进而影响根际微生物的行为和选择根际微生物种群结构^[8-10].植物根系部分分泌物作为微生物趋化性的信号分子能选择和决定有利于植物生长的根际微生物区系^[11].研究表明组氨酸激酶(CheA)是细菌趋化性的重要元件,拥有CheA编码基因(*cheA*)的微生物都具有趋化特性^[10].Buchan等^[10]首次提出了一种基于*cheA*的分子诊断方法用于检测根际趋化细菌的种群动态变化.这为筛选趋化性生防菌提供了快速的免培养方法,也为检测趋化性生防菌在根际的定殖行为提供了便利.

目前,从烟草内生菌中筛选烟草青枯病拮抗菌已有零星报道,但针对不同烟草品种的内生拮抗菌系统学方面缺乏研究,特别是针对该病原菌的趋化性拮抗菌方面的研究未见报道.本研究从NC297、K326、红大3个烟草品种的烟草青枯病内生生防细菌中,利用*cheA*基因检测和平板趋化检测方法筛选趋化性生防菌,并测定其抗菌效果和分析其系统发育关系.

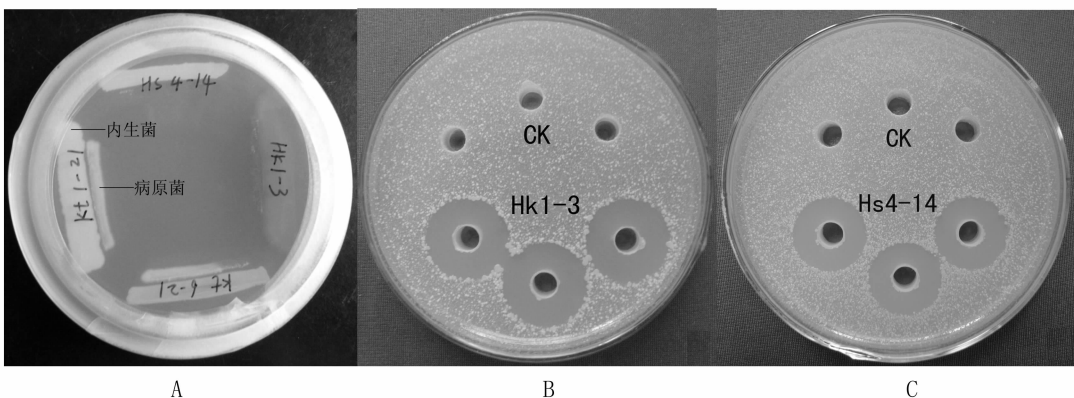
1 材料与方 法

1.1 烟草内生细菌的分离 烟草品种 NC297、

K326、红大的成株健康期烟叶分别采自云南省玉溪市、安宁市的烟草大田.烟叶内生菌的分离参照冯云利等^[12]描述的方法用牛肉膏培养基分离和培养.

1.2 拮抗烟草青枯病菌的内生细菌筛选 初筛时,将4株活化的内生细菌分别划线于牛肉膏培养基平板上,呈方形排列(图1A),平板于32℃倒置培养2d后在各内生菌菌落生长线的内侧边缘划线接种烟草青枯病菌(烟草青枯病由云南省烟草农业科学研究院夏振远研究员提供,用牛肉膏培养基培育),平板32℃下培养2d,挑取具有明显拮抗性的菌株进行复筛.复筛时,将内生细菌接种于盛有10 mL牛肉膏蛋白胨液体培养基的试管($\Phi 18$ mm \times 180 mm)中,于37℃,180 r/min培养2d.取液体培养的烟草青枯病菌悬浮液200 μ L(约 1×10^7 CFU/mL)加入300 mL、冷却至50℃的牛肉膏蛋白胨培养基中,混合后倒平板.待培养基凝固后用直径6.5 mm的打孔器在平板上等距离打孔6个,每孔内加200 μ L(约 10^9 CFU/mL)的拮抗菌的培养液,平板于超净工作台内放置6h以确保大部分菌液扩散到琼脂中,之后将平板于32℃下培养1d后测量抑菌圈直径(图1B,C).每菌株3个重复,以等体积的牛肉膏培养基替代菌液作为对照.

1.3 趋化性生防内生细菌的筛选 用试剂盒提取细菌基因组DNA,以此为模板用*cheA*基因扩增引物P4P5 F和P4P5 R^[10]进行PCR扩增.PCR反应



A:初筛平板显示菌株Hs4-14,Hk1-3具有拮抗性,而菌株Kt1-21和Kt6-21无拮抗性;

B,C:复筛平板上显示拮抗菌Hk1-3、Hs4-14菌株形成的抑菌圈,而培养基对照CK为无拮抗活性

图1 拮抗烟草青枯病菌的烟草内生细菌筛选

Fig.1 Screening of endophytic bacteria from tobacco with antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum* (A: On primary screening plate, strains Hs4-14, Hk1-3 showing antibacterial activities, while strains Kt1-21 and Kt6-21 without antibacterial activity; B, C: On second screening plate, strains Hs4-14 and Hk1-3 forming antibacterial holes, while control using medium not forming the hole)

体系 (25 μL): 10 \times PCR buffer (2.5 mmol/L) 2.5 μL , 10 mmol/L dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL , P4P5R (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , P4P5F (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.25 μL , DNA 1.0 μL , ddH₂O 17.25 μL . PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物.

对扩增出 *cheA* 基因条带的菌株进一步用以 *L*-天冬氨酸、葡萄糖和乙二酸为趋化底物, 通过软琼脂平板法 (swarm plate assay) 和滴定法 (drop assay) 验证其趋化特性^[8].

软琼脂平板法: 将细菌在牛肉膏蛋白胨液体培养基中培养至对数期时 (接种约 8 ~ 10 h), 离心收集菌体, 利用 MM 趋化液^[13] 洗涤菌体 3 次后重悬于 MM 液体中. 吸取 1 mL 菌体悬液加到含 2 mL/L 趋化物、0.16% 琼脂的 MM 培养基平板中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 放置 12 ~ 16 h, 观察趋化性结果.

滴定试验法: 按上述方法制备菌体悬液, 将 5 mL 菌液加入琼脂质量分数为 0.3% 的 MM 培养基平板中, 平板中央加入 0.1 g 趋化物, 室温放置 3 ~ 5 h 后观察结果.

1.4 拮抗烟草青枯病菌的趋化性烟草内生菌系统发育分析 用细菌 DNA 提取试剂盒 (BioTeke Corporation, China, Cat#DP2001) 按说明书提取细菌基因组 DNA. 以试剂盒提取的细菌基因组 DNA 为模板, 采用通用引物 27F (5' - AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG - 3') 和 1492R (5' - GGTACCTTGT-TACGACTT - 3') 扩增 16S rRNA 基因. PCR 反应体系 (50 μL): 10 \times PCR buffer (2.5 mmol/L) 5.0 μL , 10 mmol/L dNTPs (2.5 mmol/L) 4.0 μL , 27F (10 $\mu\text{mol/L}$) 2.0 μL , 1492R (10 $\mu\text{mol/L}$) 2.0 μL , *Taq* DNA 聚合酶 (5 U μL^{-1}) 0.5 μL , DNA 2.0 μL ,

ddH₂O, 34.5 μL . PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. PCR 扩增产物送北京华大基因科技股份有限公司测序. 获得的 DNA 序列提交到 GenBank 核酸数据库. 将测序获得的序列分别与 GenBank 上的序列进行 BLAST 相似性比较并下载与目标序列同源性最高的同源序列. 将目标序列及其同源序列合并保存为单一的 Fasta 文件, 多序列的比对排列依靠软件 Clustal X^[16], 并进行手工校对, 再用 Bioedit 软件对比对结果进行手工调整以提高比对质量. 分别采用 MEGA (版本: 3.1) 软件包中的 Kimura two-parameter 矩阵模型和 Neighbor-joining 法进行亲缘距离的计算和系统发育树的构建, 对 Gap 的处理采用 Pairwise Deletion. 采用重抽样法 (Bootstrapping) 对分枝节点的置信度进行评价, Bootstrap 抽样重复次数为 1 000 次.

2 结果与分析

2.1 拮抗烟草青枯病菌的烟草内生细菌筛选 从 NC297、K326、红大 3 个烟草品种的健康烟叶样品中共纯化出内生细菌 600 株, 通过生物活性测定, 获得对烟草青枯病菌具有抑菌作用的内生菌 55 株, 占内生菌总数的 9.17%. 其中, 来自 NC297 的有 8 株、K326 的有 9 株、红大的有 38 株. 这些菌株的抑菌圈直径在 1 ~ 16 mm 之间 (扣除打孔直径). 其中, 抑菌圈直径为 [0, 2] mm 的有 11 株, 占拮抗菌总数的 20.00%; [2, 4] mm 的有 25 株, 占 45.45%; [4, 6] mm 的 3 株, 占 5.45%; [6, 8] mm 的 3 株, 占 5.45%. [8, 10] mm 的 7 株, 占 12.72%; [10, 12] mm 的 3 株占 5.45%; [12, 14] mm 的 3 株占 5.45%, [14, 16] mm 的 1 株占 1.81% (图 2).

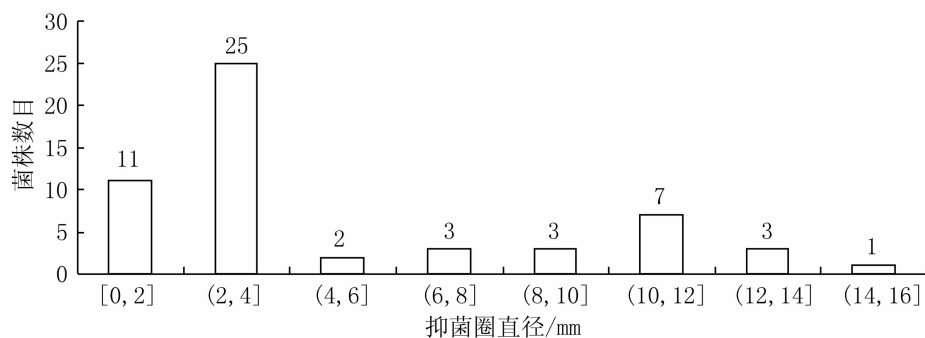


图 2 55 株拮抗烟草青枯病菌的内生细菌在不同抑菌圈范围内的菌株数分布

Fig. 2 The number of the 55 antagonistic endophytic bacteria against *Ralstonia solanacearum* in different inhibition ranges

2.2 拮抗烟草青枯病菌的烟草内生菌系统发育分析 利用引物 27F 和 1492R 扩增出 55 株拮抗菌的 16S rRNA 基因序列,片段大小约 1.5 kb. 这 55 株拮抗菌的 16S rDNA 序列用限制性内切酶 *Msp* I 进行酶切,共产生 6 种 RFLP 带型. 每种 RFLP 带型选取 1~7 株(共 16 株)进行 16S rRNA 基因序列测序,从 Genbank 中选取同源性最高的已知序列以及其它一些常见属中具有代表性的已知种的同源序列作为参考序列,构建系统进化树,系统发育分析结果表明:这 55 株内生拮抗菌归属 Firmicutes 和 Proteobacteria 两大类群(表 1,图 3).

Firmicutes 类群包括了 5 种 RFLP 带型,共代表了 53 株细菌,占拮抗菌总数的 96.33%. 这 53 株内生细菌分属于 *Bacillus* 和 *Brevibacillus* 2 个属,相似性系数 98.42%~99.91%. 其中 *Bacillus* 为优势属,共 3 种 RFLP 带型代表 50 个菌株(占该类群的 94.34%),分属于 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (25 株), *Bacillus methylotrophicus* (21 株), *Bacillus tequilensis* (4 株). 有 3 株拮抗内生菌分别归属 *Brevibacillus* 属的 2 个种: *Brevibacillus parabrevis* (1 株)和 *Brevibacillus brevis* (2 株).

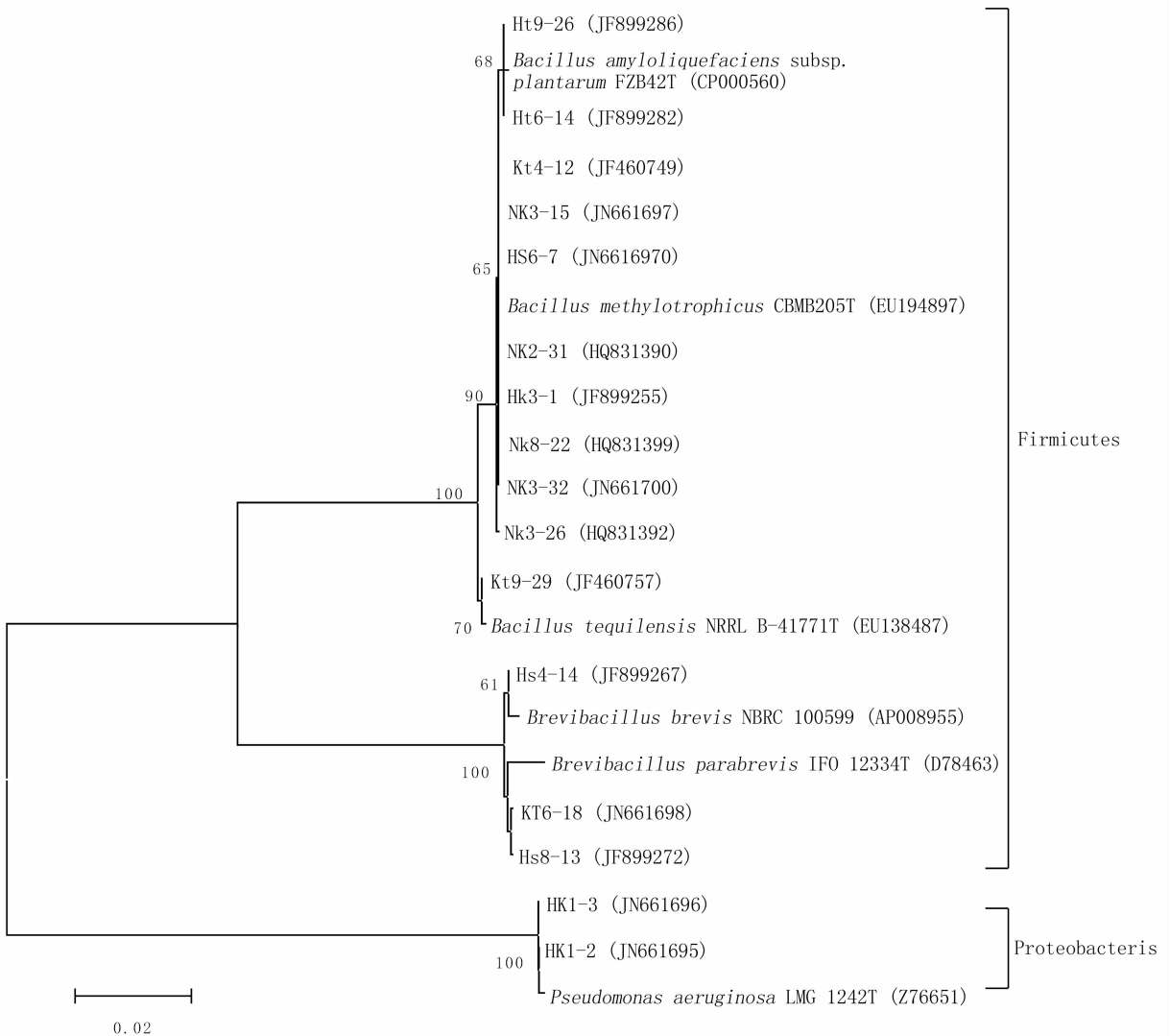


图 3 拮抗烟草青枯病菌的烟草内生细菌 16S rRNA 基因和其近缘种的 NJ 系统发育树(分支上的数值为基于根值 = 1 000 的支持率;比例尺为 0.02 碱基替换率;括号内为序列号)

Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree of nearly complete 16S rRNA gene sequences of the antagonists of *Ralstonia solanacearum* from tobacco endophytic bacteria and their closest phylogenetic relatives (Significance value on each branch is indicated by a bootstrap value calculated for 1 000 subsets; scale bar represents 0.02 substitutions per base position; accession numbers of isolates are given in parenthesis)

Proteobacteria 类群只有 1 种 RFLP 带型、2 个菌株,属于 *Pseudomonas aeruginosa*, 同源性达 99.03% ~ 99.24%.

2.3 拮抗烟草青枯病菌的趋化性内生细菌的分子检测及其趋化测定 利用 *cheA* 基因引物对 16 株经过 16S rRNA 基因序列测定的烟草青枯病菌拮抗性内生细菌进行扩增,结果显示其中的 5 株拮抗菌能扩增出大小为 500 bp 的 *cheA* 基因特征带(表 1,图 4),初步判断这些菌株具有趋化性.为了验证利用 *cheA* 基因筛选趋化性细菌的可行性,进而以 L-天冬氨酸,葡萄糖和乙二酸为趋化底物,用软琼脂平板法和滴定法测定菌株的趋化性.实验结果显示这 5 株产生 *cheA* 特征带的烟草内生细菌对供试的 3 种化合物在趋化平板上都出现明显的趋化圈(图 5),表明这些菌株对测试化合物具有趋化性.这 5 株拮抗性内生细菌分别属于 *Brevibacillus parabrevis* (Kt6-18), *Brevibacillus brevis* (Hs8-13、Hs4-14) 和 *Pseudomonas aeruginosa* (HK1-2、HK1-3) (表 1). 在这 5 株趋化性内生细菌中,除 Kt6-18 菌株分离自烟草品种 K326 外,其余 4 株均分离自红大.

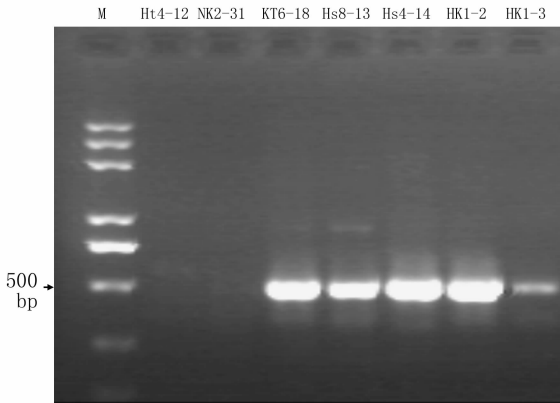


图 4 拮抗性内生细菌的 *cheA* 基因扩增 (M 为 DNA 分子量标记; Ht4-12、NK2-31 菌株未扩增出 *cheA* 基因条带; 其余 5 个菌株扩增出 500 bp 的 *cheA* 基因特征带)

Fig. 4 Amplification of *cheA* gene from antibacterial endophytic bacteria (M represents the DNA maker; Strains Ht4-12 and NK2-31 not produced the band of *cheA* gene; The remaining 5 strains produced characteristic band of *cheA* gene with size of 500 bp)

3 讨论

在烟草青枯病拮抗微生物的研究中,烟草内生

菌因其良好的根际定植能力和安全性而备受关注.尹华群等^[14]从烟草内生菌中筛选的短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*) 009、001 菌株田间对烟草青枯病的防效分别高达 100% 和 84.5%. 易有金等^[15]筛选的烟草内生菌枯草芽孢杆菌 B-001 菌株, 2005 年和 2006 年对烟草青枯病的田间防效在 40.03% ~ 78.14%. 周岗泉等^[16]的研究表明在烟草不同生育期,抗病品种中内生细菌的总数量以及对青枯病菌具有拮抗作用的内生细菌数量均高于感病品种,部分内生细菌具有促进烟草种子萌发和防治烟草青枯病的作用.彭细桥等^[17]从烤烟健康植株中分离的内生细菌 *Bacillus subtilis* H-1, *B. brevis* H-9, H-11 对烟草青枯病的田间防效分别高达 84.3%, 98.7% 和 86.5%. 本研究从 3 个烟草品种 (NC297、红大、K326) 中鉴定出 6 种拮抗烟草青枯病菌的内生细菌: *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *Bacillus tequilensis*, *Brevibacillus parabrevis*, *Brevibacillus brevis* 和 *Pseudomonas aeruginosa*. 其中, *Brevibacillus brevis* 被报道分离自晒黄烟^[18], 其余内生细菌对烟草青枯病的生防特性为本研究首次报道. *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 和 *Bacillus methylotrophicus* 是本研究筛选到的烟草青枯病拮抗菌优势种. *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 能产生与枯草芽孢杆菌类似的抗菌活性物质,包括几丁质酶、抗菌蛋白、伊枯草菌素、表面活性素、芬芥素和杆菌霉素,已广泛用于各种植物真菌病害的防治^[19]. *Bacillus methylotrophicus* 是 2010 年新报道的物种^[20], 该细菌对烟草青枯病菌的拮抗活性为本研究首先报道. 来源于土壤的 *Pseudomonas aeruginosa* 对烟草青枯病菌的拮抗性已被报道^[7], 而本研究发现来自烟草内生菌的物种亦具生防活性.

趋化性生防菌的筛选中,本研究首先通过 *cheA* 基因检测方法筛选出 5 株具有 *cheA* 特征带的菌株,进而以 L-天冬氨酸、葡萄糖和乙二酸为趋化底物,用软琼脂平板法和滴定法确定了这 5 株细菌的趋化性,证实了通过 *cheA* 基因筛选的趋化性细菌的可靠性. 前人的研究显示来自 *Pseudomonas* 和 *Brevibacillus* 的细菌菌株多数具有趋化特性^[10], 本研究印证了这一结果. 值得一提的是,在本研究筛选的 55 烟草青枯病菌拮抗菌中,5 株趋化性内生细菌均具有较强的拮抗性,抑菌圈直径在

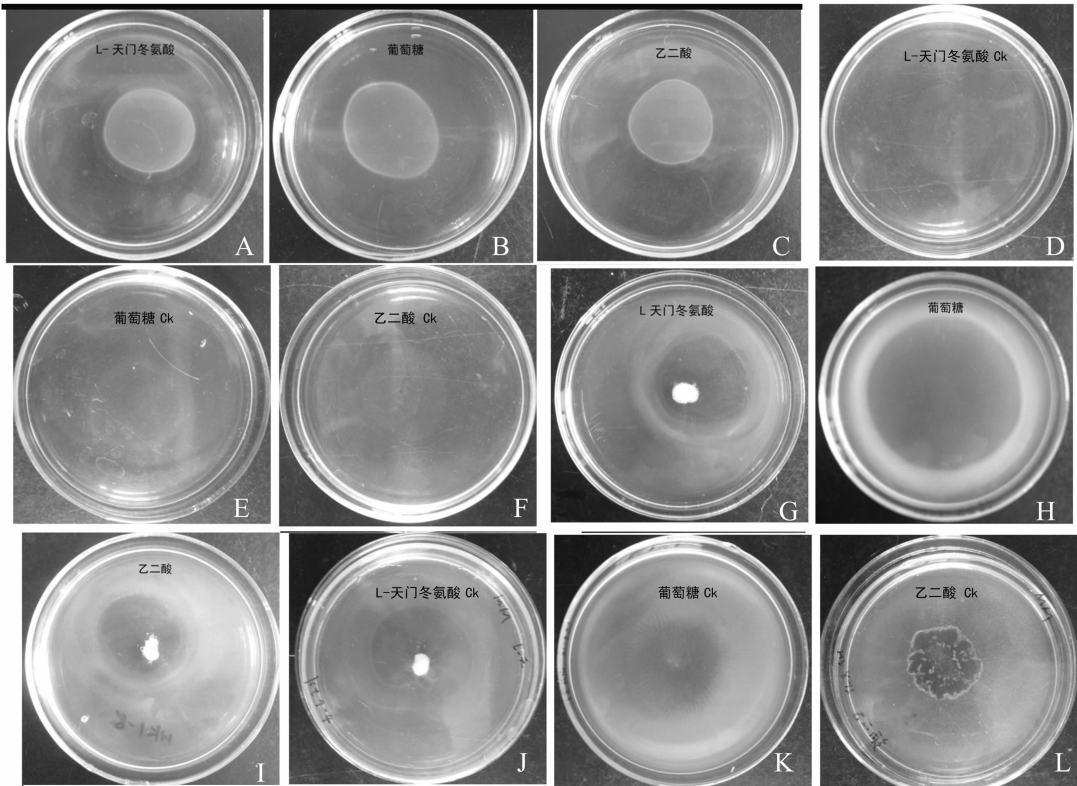


图 5 软琼脂平板法 (A ~ F) 和滴定法 (G ~ I) 分析趋化性菌株 *Pseudomonas aeruginosa* HK1 - 3 及对照菌株 *B. methylotrophicus* NK2 - 31 (CK) 对 L - 天门冬氨酸、葡萄糖和乙二酸的趋化性

Fig. 5 Chemotaxis assays of chemotactic strain *Pseudomonas aeruginosa* HK1 - 3 and its control strain *B. methylotrophicus* NK2 - 31 towards L - aspartic acid, glucose and ethanedioic acid using soft - agar plate (A—F) and drop assay (G—I)

9.67 ~ 13 mm, 值得进一步研究其田间对该病害的防治效果及根际定殖能力, 为研发新型生防菌剂奠定基础。

参考文献:

- [1] 徐树德, 尚志强, 秦西云. 烟草青枯病研究进展[J]. 天津农业科学, 2010, 16(4): 49-53.
- [2] 刘勇, 秦西云, 王敏, 等. 云南省烟草青枯病危害调查与病原菌分离[J]. 中国农学通报, 2007(4): 311-314.
- [3] 霍沁建, 张深, 王若焱. 烟草青枯病研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, 23(8): 364-368.
- [4] 肖田, 肖崇刚, 邹阳, 等. 青枯菌无致病力菌株对烟草青枯病的控病作用初步研究[J]. 植物保护, 2008, 34(2): 79-82.
- [5] 张秀玉, 孔凡玉, 王静, 等. 枯草芽孢杆菌 SH7 抑菌蛋白的分离纯化及对烟草青枯病菌的抑制作用[J]. 中国烟草科学, 2010, 31(1): 13-15.
- [6] 张旭, 陈武, 杨玉婷, 等. 青枯菌拮抗菌 2-Q-9 的分子鉴定及抑菌相关基因的克隆[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2009, 35(3): 233-236.
- [7] 胡军华, 张伏军, 蓝希钳, 等. 烟草根际细菌铜绿假单胞菌 swu3122 的定殖能力及其烟草青枯病的防治作用[J]. 植物保护, 2009, 35(5): 89-94.
- [8] BADRI D V, VIVANCO J M. Regulation and function of root exudates [J]. Plant Cell Environ, 2009, 32(6): 666-681.
- [9] ENNIS P G, MILLER A J, HIRSCH P R. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2010, 72(3): 313 - 327.
- [10] BUCHAN A, CROMBIE B, ALEXANDRE G M. Temporal dynamics and genetic diversity of chemotactic - competent microbial populations in the rhizosphere [J]. Environ Microbiol, 2010, 12(12): 3 171-3 184.
- [11] BÜCKING H, ABUBAKER J, GOVINDARAJULU M, et al. Root exudates stimulate the uptake and metabolism of organic carbon in germinating spores of *Glomus intraradices* [J]. New Phytol, 2008, 180(3): 684-695.
- [12] 冯云利, 奚家勤, 马莉, 等. 烤烟品种 NC297 内生细菌中拮抗烟草黑胫病的生防菌筛选及种群组成分析[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2011, 33(4): 488-

- 496.
- [13] RANI M, PRAKASH D, SOBTI RC, et al. Plasmid – mediated degradation of O – phthalate and salicylate by *Moraxella* sp. [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 1996, 220: 377-381.
- [14] 尹华群, 易有金, 罗宽, 等. 烟草青枯病内生拮抗细菌的鉴定及小区防效的初步测定[J]. *中国生物防治*, 2004, 20 (3): 219- 220.
- [15] 易有金, 尹华群, 罗宽, 等. 烟草内生短芽孢杆菌的分离鉴定及对烟草青枯病的防效[J]. *植物病理学报*, 2007, 37(3): 301-306.
- [16] 周岗泉, 张建华, 陈泽鹏, 等. 烟草内生细菌及其对烟草青枯病的生物防治研究[J]. *中国烟草学报*, 2008, 14(2): 31-34.
- [17] 彭细桥, 周国生, 邓正平, 等. 烟草青枯病内生拮抗菌的筛选、鉴定及其防效测定[J]. *植物病理学报*, 2007, 37(6): 670-674.
- [18] 周燕, 成志军, 易有金, 等. 晒黄烟内生菌株筛选及对青枯病生物防治[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2005, 31(5): 500-501.
- [19] KOUMOUTSI A, CHEN XH, HERME A, et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42 [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186: 1 084-1 096.
- [20] MADHAIYAN M, POONGUZHALI S, KWON SW, et al. *Bacillus methylotrophicus*. nov. a novel species of methanol utilizing, plant – growth promoting bacterium isolated from rice [J]. *Int J Syst Evol Micr*, 60 (24): 903-908.

Phylogenetic diversity of the antagonistic endophytic bacteria of tobacco against *Ralstonia solanacearum* and their chemotaxis analysis

LEI Chun-xia¹, FENG Yun-li¹, XI Jia-qin², CAO Yong-hong¹, LI Ping¹,
MA Li¹, MO Ming-he¹, FANG Dun-huang³, YANG Fa-xiang⁴

(1. Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio – Resources, Yunnan University, Kunming 650091, China;

2. Zhengzhou Tobacco Research Institute of CNTC, Zhengzhou 450001, China;

3. Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Science, Yuxi 653100, China;

4. Yunnan Microbial Fermentation Engineering Research Center Co., Ltd., Kunming 650217, China)

Abstract: A total of 55 strains with antagonistic activities against tobacco pathogen *Ralstonia solanacearum* were screened from 600 endophytic bacteria isolated from three tobacco varieties, which were NC297, Hongda and K326. Bioassay results in vitro showed that these antagonists exhibited different antibacterial activities to the pathogen with inhibited hole of 1—16 mm in diameter. The 55 antagonists were represented by 6 RFLP patterns. 16 representative isolates, 1—3 strains from each RFLP patterns, were selected for 16S rRNA sequencing. Phylogenetic analysis placed the 55 antagonistic bacteria into 6 species of *Firmicutes* and *Proteobacteria*: *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus tequilensis*, *Brevibacillus parabrevis*, *Brevibacillus brevis* and *Pseudomonas aeruginosa*. Three species of endophytic bacteria, (*Brevibacillus parabrevis*, *Brevibacillus brevis* and *Pseudomonas aeruginosa*) showed chemotactic activity by methods of *cheA* gene amplification and plate assay.

Key words: endophytic bacteria of tobacco; biological control; *Ralstonia solanacearum*; chemotaxis