

棉花黄萎病拮抗细菌的筛选与抗菌物分析

袁洪水¹, 马平², 李术娜¹, 胡明¹, 朱宝成^{1*}

(1. 河北农业大学 生命科学学院, 保定 071001; 2. 河北省农林科学院 植物保护研究所, 保定 071000)

摘要:对 21 株芽孢杆菌属细菌分别进行了摇瓶震荡培养, 其发酵液上清液用硫酸铵盐析, 杯碟法测定了沉淀物对大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.) 的拮抗活性, 并对其中 6 株具有较强抑菌活性菌株的抗菌物进行了蛋白酶稳定性、热稳定性等分析。结果显示, BDT-25、JJ-5、DHT-12、80b-2、DHT-13 和 JJ-134 菌株的抑菌活性较高; 6 株拮抗细菌发酵液沉淀物均对氯仿敏感, 抗菌物溶液经蛋白酶 K、胰蛋白酶和胃蛋白酶处理后活性丧失或显著下降, 对温度也较敏感, 认为这些抗菌物质为蛋白或多肽类物质。拮抗菌株产生的抗菌蛋白通过抑制大丽轮枝菌孢子萌发和使菌丝体原生质凝集而抑制其生长。

关键词:棉花黄萎病; 大丽轮枝菌; 拮抗细菌; 筛选

中图分类号: S435. 621 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2007)06-0436-04

Screening of Antagonistic Bacteria Against *Verticillium dahliae* and Characteristic Analyses of Antagonistic Substance

YUAN Hong-shui¹, MA Ping², LI Shu-na¹, HU Ming¹, ZHU Bao-cheng¹

(1. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Institute of Plants Protection, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Baoding 071000, China)

Abstract: The *Bacillus* has wide antimicrobial spectrum, which has intensive inhibitory activity against bacteria or fungus caused diseases, thus confer them high potential biological control value. In this paper, the 21 *Bacillus* strains were fermented in shaking, respectively, the extracellular metabolic product were precipitated by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ salting out. The antifungal activity of the extracted substance were determined through cylinder plate method against *Verticillium dahliae* Kleb. The result showed that six strains had bigger inhibition zone and had evident antagonistic activity. So these strains were selected to be further tested. Selected six strains which had highs antagonistic activity, their antagonistic substances characteristic, such as stability to chloroform, proteinase K, trypsin, pepsin and heat were analyzed. It was indicated that all the substance were sensitive to chloroform, there had no inhibition zone appearance.

Key words: cotton *Verticillium* wilt; *Verticillium dahliae*; antagonistic bacterium; screen

由大丽轮枝菌引起的黄萎病是棉花的主要病害, 对棉花产量和品质均造成极大影响^[1-2]。对于棉花黄萎病的防治国内外在抗病育种、农业措施和化学防治等方面均做了大量工作, 目前生物防治被认为是最具有发展潜力的有效防治方法之

一。筛选大丽轮枝菌的拮抗细菌用于生物防治, 或从拮抗菌中分离抗菌蛋白, 克隆抗病基因, 是获得抗病植株的有效手段, 而获得高拮抗活性的菌株是生物防治的基础。

芽孢杆菌具有较广的抗菌谱, 对多种病原菌

收稿日期: 2006-11-29 作者简介: 袁洪水(1963-), 男, 副教授; * 通讯作者: zhu2222@126.com

基金项目: 河北省自然科学基金项目(398152)

的生长均有抑制作用,具有较高的潜在生防利用价值。拮抗细菌通过产生肽类、磷脂类、多烯类和氨基酸等抗菌物质,达到抑制病原菌生长的作用。尤其是肽类抗菌物的发现,为抗病基因工程提供了新的生物资源和抗病基因,是一具有极大应用潜力的微生物类群^[3]。

本文报道了从实验室保存的 21 株芽孢杆菌中,筛选出了 6 株能分泌高活性抗菌物质、对棉花黄萎病有较强拮抗作用的菌株,并研究了其胞外抗菌物质的部分特性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株。大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.), V-190 菌株。芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)拮抗细菌:菌株 BDT-25、BNT-26、CJT-2、DHT-12、DHT-13、DHT-16、DHT-27、DMT-3、HNT-2-113、JJ-5、JJ-102、JJ-134、LBT-261、LBT-330、NCD-2、NZT-2-7、NZT-3-89、NZT-50、SP-8-2、70A-7、80b-2,共 21 株。供试菌株均由河北省农林科学院植物保护研究所植病生防实验室保存。

1.1.2 培养基。LB 琼脂培养基,用于拮抗细菌平板培养与斜面保存;NB 液体培养基,用于拮抗细菌液体发酵;PDA 培养基,用于大丽轮枝菌培养和拮抗菌活性测定^[6]。

1.1.3 试剂。蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶,均为 AMRESCO 公司产品。

1.2 实验方 法

1.2.1 拮抗菌株抗菌物的制备。将实验室保存的拮抗细菌分别接种在 LB 琼脂培养基平板上,30℃ 培养 48 h。挑取单菌落接种于装有 50 mL NB 培养液的 250 mL 三角瓶中,28℃、170 r·min⁻¹ 摇床振荡培养 48 h^[8]。发酵液离心 20 min (6000 r·min⁻¹),取上清液,加入固体硫酸铵至 85% 饱和度,4℃ 下静置 8 h 后,离心 20 min (10000 r·min⁻¹,4℃)。沉淀物用 pH 7.2 磷酸盐缓冲液溶解,相同磷酸盐缓冲液透析(8000 D) 2 d,冷冻干燥,置于-75℃ 冰箱保存。用磷酸盐缓冲液溶解,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,制成 3 g·L⁻¹ 抗菌物溶液,用于拮抗活性测定^[3]。

1.2.2 抗菌物的抑菌活性测定。将大丽轮枝菌在 PDA 平板上 25℃ 培养 7—10 d,在菌落边缘区域刮取孢子,接种于盛有 100 mL PDA 液体培养

基的三角瓶中,25℃、150 r·min⁻¹ 条件下振荡培养 7 d。用无菌纱布过滤并稀释制得含 10⁸ 个孢子·mL⁻¹ 的悬浮液。

取 2 mL 孢子悬液加入 100 mL 融化后冷却至 45℃ 左右的 PDA 培养基中,倒平板,于 25℃ 培养过夜,制成病原菌平板。然后在平板上均匀放置无菌环柱(外径 6.0 mm,内径 5.0 mm,高 10 mm),分别在每个环柱内注入抗菌物溶液 100 μL,每种抗菌物做 3 个重复,以无菌磷酸盐缓冲液为对照,25℃ 培养 3 d,观察大丽轮枝菌的生长情况,并测定抑菌圈直径。

1.2.3 抗菌物的稳定性测定。1)对氯仿的稳定性。抗菌物用 pH 7.2 磷酸盐缓冲液溶解,浓度为 3 g·L⁻¹,与等量氯仿混合振荡处理 60 min,离心,取上层水相,待残留氯仿挥发尽后,以不处理的抗菌物溶液作对照,测定抑菌活性^[6]。2)对蛋白酶的稳定性。抗菌物用 pH 7.2 磷酸盐缓冲液溶解,浓度为 6 g·L⁻¹,分别加入等体积浓度为 1 g·L⁻¹ 的蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶,摇匀,使酶终浓度为 0.5 g·L⁻¹,抗菌物浓度为 3 g·L⁻¹,在 37℃ 下处理 2 h。以不加酶处理的抗菌物溶液为对照,测定抑菌活性^[7]。3)对热的稳定性。浓度为 3 g·L⁻¹ 的抗菌物溶液,分别在 40℃、60℃、80℃、100℃、120℃ 下处理 20 min。以未经热处理的样品为对照,测定抑菌活性^[8]。

1.2.4 抗菌蛋白抑菌机理。1)孢子萌发试验。制备大丽轮枝菌孢子悬液,取 10 μL 孢子悬液与 10 μL BDT-25 菌株抗菌蛋白(0.6 g·L⁻¹)混合,用凹玻片悬滴法培养,定时镜检,无菌水作对照。2)对菌丝生长的作用。制备大丽轮枝菌孢子悬液,液体培养至孢子萌发,取 10 μL 菌丝悬液与 10 μL BDT-25 菌株抗菌蛋白(0.6 g·L⁻¹)混合,以凹玻片悬滴法置于纱布保湿的培养皿中培养,定时镜检,无菌水作对照。

2 结果与分析

2.1 棉花黄萎病拮抗菌株的筛选

对 21 株拮抗细菌进行液体发酵,用硫酸铵沉淀发酵液中的抗菌物质,通过平板对峙法测定抗菌物的抑菌活性,结果有 9 株拮抗细菌出现了透明抑菌圈(图 1,表 1),说明其抑制大丽轮枝菌孢子萌发和菌丝体生长。其中菌株 BDT-25、JJ-5、DHT-12、80b-2、DHT-13、JJ-134 拮抗作用明显,作为进一步研究对象。



图 1 拮抗菌株的抑菌效果

Fig. 1 The antifungal effect of the antagonistic bacterium strains

表 1 拮抗菌株发酵液抗菌物抑菌活性测定

Table 1 The antifungal activity of the antagonistic substance from the antagonistic bacteria strains

菌株	抑菌圈平均直径/mm
CK	0
BDT-25	18.38
JJ-5	16.88
DHT-12	14.75
80b-2	14.75
DHT-13	14.25
JJ-134	12.50
LBT-330	10.25
JJ-102	10.25
SP-8-2	7.50

注:抑菌圈直径等于无菌环柱外径 6.0 mm 时,记为 0。

表 2 抗菌物经氯仿和蛋白酶处理后的抑菌活性

Table 2 The antifungal activity of the treated antagonistic substance by chloroform and proteinase

菌株	抑菌圈平均直径/mm				
	CK	氯仿	蛋白酶 K	胰蛋白酶	胃蛋白酶
BDT-25	19.30	0	0	0	0
JJ-5	17.00	0	6.21	7.01	0
DHT-12	15.33	0	10.00	0	11.00
DHT-13	15.01	0	6.51	0	12.51
JJ-134	13.10	0	8.16	0	12.50
80b-2	15.65	0	9.00	7.04	7.98

表 3 抗菌物经热处理后的抑菌活性

Table 3 The antifungal activity of the treated antagonistic substance by high temperature

菌株	抑菌圈平均直径 /mm					
	CK	40 °C	60 °C	80 °C	100 °C	120 °C
BDT-25	19.25	8.25	0	0	0	0
JJ-5	16.50	12.75	9.50	8.50	7.46	7.25
80b-2	15.50	13.25	8.25	6.50	0	0
DHT-12	15.25	9.50	9.75	9.50	7.45	0
DHT-13	14.00	13.25	11.25	11.25	7.57	0
JJ-134	12.75	11.50	11.00	10.25	0	0

经上述实验,拮抗菌株,尤其是 BDT-25,发酵液硫酸铵沉淀产物均对氯仿敏感,经蛋白酶 K、

2.2 抗菌物的性质分析

2.2.1 抗菌物对氯仿的稳定性。抗菌物经氯仿处理后测定抑菌活性(表 2)。所有抗菌物经氯仿处理后均没有抑菌圈出现,说明抗菌物对氯仿敏感。

2.2.2 抗菌物对蛋白酶的稳定性。抗菌物经蛋白酶处理后测定抑菌活性(表 2)。BDT-25 菌株抗菌物溶液对 3 种蛋白酶都较敏感,处理后活性完全丧失;JJ-5 菌株抗菌物对胃蛋白酶敏感、DHT-12、DHT-13 和 JJ-134 菌株抗菌物对胰蛋白酶敏感,经酶处理后活性丧失;其它经蛋白酶处理后活性明显下降,但仍保留了部分活性。

2.2.3 抗菌物的热稳定性。抗菌物溶液经加热处理后测定抑菌活性(表 3)。BDT-25 菌株在 40 °C 处理后仅保留部分抗菌活性,60 °C 以上温度处理后活性完全丧失;除 JJ-5 菌株外,其余菌株 120 °C 处理后活性全部丧失;100 °C 处理后还保留部分活性的有 JJ-5、DHT-12 和 DHT-13 菌株;能耐受 80 °C 处理保留部分活性的还有 80b-2、JJ-134 菌株;说明 BDT-25 菌株抗菌物对热不稳定,而 JJ-5 菌株的抗菌物对热处理的稳定性较强。

胰蛋白酶和胃蛋白酶处理后活性丧失或显著下降,对温度敏感,认为这些抗菌物为蛋白或多肽类

物质。

2.3 抗菌蛋白的抗菌机理

2.3.1 抗菌蛋白对大丽轮枝菌孢子萌发的影响。

抗菌蛋白处理大丽轮枝菌 3 d 后,在显微镜下观察,发现大多数孢子萌发被抑制,少数孢子的发芽点细胞变大,有圆状泡状物形成;但 4 d 后孢子长出的幼嫩菌丝溶解,泡状物消融、崩解。

2.3.2 抗菌蛋白对大丽轮枝菌菌丝生长的抑制作用。

在显微镜下观察,处理 3 d 后大丽轮枝菌菌丝顶端及中部膨大,透明度降低,原生质凝集,泡状物增多,膨大物增大;4 d 后,菌丝顶端及中部泡状物破裂,菌丝体凝集后出现溶解,细胞质外溢。此时,固体对峙培养的培养基上出现了透明抑菌圈。8 d 后在抑菌圈周围部分菌丝出现微菌核,并且随着时间的延长微菌核的范围逐渐扩大。

3 讨论

自从 1952 年 Babad 等人从枯草芽孢杆菌培养液中分离出抗菌肽以来,相继分离出了多种抗菌肽^[9],在植物病害的生物防治上显现出很大的应用前途^[10]。

本研究中对抗菌物的制备是按照蛋白质的主要特性进行的,分离供试芽孢杆菌的发酵液,其中 6 个菌株的硫酸铵盐析物对 *V. dahliae* Kleb. 有较强的拮抗作用。对抗菌物进行氯仿稳定性、蛋白酶稳定性、热稳定性的试验分析,结果抗菌物对氯仿敏感,经蛋白酶 K、胰蛋白酶和胃蛋白酶都处理后活性丧失或显著下降,对温度也较为敏感,证明这些抗菌物是蛋白或肽类可能性极大。而其余菌株的发酵液粗提物无抑菌活性,原因可能是所产抗菌物质为非蛋白类物质,或性质不稳定而在处理过程中失活,或是蛋白浓度过低未表现出来,也可能其拮抗作用是因营养竞争造成的。

对抗菌物质抗菌机理的研究表明,抗菌蛋白

具有抑制孢子萌发和溶解菌丝体使原生质外溢作用,从而抑制大丽轮枝菌生长,因此可以作为生防制剂用于防治棉花黄萎病。另外,为从拮抗菌中纯化其抗菌蛋白,克隆出抗病基因,进一步构建基因工程菌株或获得转基因植物奠定了基础。

参考文献:

- [1] 徐显. 棉花抗黄萎病育种研究现状及对策[J]. 河北农业科学, 2004, 8(2): 95-97.
- [2] 李社增, 马平, 刘杏忠, 等. 利用拮抗细菌防治棉花黄萎病[J]. 华中农业大学学报, 2001, 5(10): 422-425.
- [3] 李木娜, 杜红方, 袁洪水, 等. 棉花黄萎病拮抗细菌 LC-04 菌株的抗菌蛋白产生条件研究[J]. 棉花学报, 2006, 18(4): 233-237.
- [4] 周艳芬, 杜红方, 袁洪水, 等. 棉花黄萎病拮抗蛋白的分离与纯化[J]. 棉花学报, 2007, 19(2): 98-101.
- [5] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [6] 沈锦玉, 尹文林, 曹铮, 等. 枯草芽孢杆菌 B115 抗菌蛋白的分离纯化及部分性质[J]. 水生生物学报, 2005, 29(6): 689-693.
- [7] 齐东梅, 梁启美, 惠明, 等. 棉花枯萎、黄萎病拮抗芽孢杆菌的抗菌蛋白特性[J]. 微生物学通报, 2005, 32(4): 42-46.
- [8] 何青芳, 陈良, 马志超. 枯草芽孢杆菌 A30 菌株产生的拮抗肽的分离纯化与理化性质研究[J]. 中国水稻科学, 2002, 16(4): 361-365.
- [9] KAJIMURA Y, Sugiyama M, Kaneda M. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2[J]. J Antibiotics, 1995, 48(10): 1095-1103.
- [10] EMMERT E A B, Handelsman J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective[J]. FEMS Microbiol Letters, 1999, 171: 1-9. ●