

棉花黄萎病高效拮抗菌 XJUL-6 的筛选鉴定及其特性研究

张洪涛, 于频频, 艾山江·阿布都拉, 徐田枚, 吾甫尔·米吉提*

(新疆大学生命科学与技术学院 乌鲁木齐 830046)

摘 要: 为探讨棉花黄萎病高效拮抗菌的拮抗机制, 从新疆有毒植物焮麻 (*Urtica cannabina* L.) 中筛选出一株对棉花黄萎病具有较强抗性的内生菌 XJUL-6, 对其生物学特性进行初步研究, 结果表明, 36°C ~ 38°C 为最适生长温度, pH6 ~ 8 为最适生长 pH 值。根据其形态特征、生理生化检测、16S rDNA (G + C) mol% 将其鉴定为蜡状芽孢杆菌, XJUL-6 的获得为进一步的研究棉花黄萎病高效拮抗菌的拮抗机制提供了实验材料。

关键词: 内生菌 棉花黄萎病 有毒植物 (G + C) mol% 含量 16S rDNA 焮麻

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2007)06-1084-04

黄萎病素有“棉花癌症”之称。1935 年传入我国, 是比虫害还要难治的病害。黄萎病分布在我国所有植棉区, 发病面积占我国棉田总面积的 50%, 重病田占 70%, 成为影响棉花产量和品质的主要障碍因素^[1]。其病菌可以长时间在土壤中存活并在植物茎秆里由下向上传导, 如同癌细胞在人的血管里扩散一样, 用化学农药防治难以奏效。迄今为止, 在世界上种植的所有“陆地棉”中, 一直没有找到高抗黄萎病的棉花品系, 在世界范围内尚缺乏有效的根治办法^[2, 3]。当前国内外在抗病育种、农业措施和化学防治等方面做了大量工作, 但收效不尽人意。对棉花黄、枯萎病的防治过去主要是利用抗病品种, 但抗病品种存在选育年限长, 抗性单一, 有时农艺性状尚不如感病品种等问题^[4]。目前, 在缺乏有效抗源的情况下, 采用“以菌治菌”的生物防治措施逐渐引起人们的重视, 并被认为是最具有发展潜力的防治方法之一^[5, 6]。因此, 筛选出对棉花黄萎病具有较强抗性的内生菌有着极其重要的意义, 其不仅将为“以菌治菌”的生物防治措施提供高效的菌种, 而且将为培育出新的抗棉花黄萎病品种提供全新的抗病基因资源。

本研究首次对新疆焮麻中的内生菌进行了分离。并以分离出的内生菌为拮抗菌, 以棉花黄萎病等致病真菌为指示菌, 进行拮抗试验, 从中筛选出一株对棉花黄萎病有较强抗性的内生菌 XJUL-6。XJUL-6 的获得为研究棉花黄萎病高效拮抗菌的拮抗机制提供了极好的材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料: 活体焮麻 (*Urtica cannabina* L.), 2006 年 7 月上旬采自新疆塔城地区塔尔巴哈台山。

1.1.2 指示菌: 黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*); 棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*); 西瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp.

niveum); 苹果斑点落叶病菌 (*Alternaria mali*); 葡萄白腐病菌 (*Coniothyrium diplodiella*); 稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*); 番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*); 油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*); 小麦赤霉病菌 (*Gibberella zeae*); 棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*); 玉米小斑病菌 (*Bipolaris maydis*)。以上农作物致病菌均购自中国农业科学院农业资源与农业区划研究所菌种中心。

1.1.3 培养基: LB 培养基、PDA 培养基、马丁氏培养基 (加链霉素抑制细菌生长) 均按文献 [7] 配制。

1.1.4 试剂和仪器: 胰蛋白胨 (Tryptone)、酵母粉 (Yeast extract)、琼脂糖 (Agarose) 购自上海生工生物工程技术服务有限公司产品; 胶回收试剂盒购于上海华舜生物工程公司。TaKaRa Ex Taq™ 酶及其他所需试剂均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。303-1 电热培养箱 (江苏省东台县电器厂); 722 紫外可见分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司); Biometra Tpersonal PCR 扩增仪 (德国 Biometra 公司)。

1.2 内生菌的分离、基因组 DNA 提取及 ERIC-PCR 指纹图谱分析

内生菌的分离采用碾碎法^[8]; 内生菌基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[9]。ERIC-PCR 引物为 (L1: 5'-ATGT AAGTCCTGGGGATTAC-3') 和 (R2: 5'-AAGTAAGTGACTG GGTGAGCG-3'), 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR 采用 40 μL 反应体系, PCR 条件: 94°C 5min, 94°C 30s, 52°C 1min, 65°C 8min, 30 个循环, 65°C 12min, 3°C 停止反应。

1.3 待测样品制备

1.3.1 所分离菌株发酵液的制备: 纯化的菌株接种于 LB 培养液中, 37°C 振荡培养 5d, 4000r/min 离心 10min, 取上清液, 4°C 冰箱保存备用。

1.3.2 致病真菌菌悬液的制备: 将病原真菌在 PDA 液体培养基中, 28°C 下恒温振荡培养 72h, 常温保存备用。

基金项目: 国家自然科学基金 (30560004)

* 通讯作者。Tel: 86-991-8585677; E-mail: gmijit2001@yahoo.com.cn

作者简介: 张洪涛 (1979-) 男, 硕士研究生, 主要从事药用微生物生物技术。E-mail: zhn_zht@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-01-31; 接受日期: 2007-04-20; 修回日期: 2007-07-25

1.4 拮抗菌株的筛选

采用琼脂扩散法^[10]来筛选对病原真菌具有拮抗作用的内生菌。每皿加入 300 μ L(孢子浓度 $\times 10^6$)棉花黄萎病致病菌悬液,涂布均匀。每孔中加入 50 μ L 内生菌(菌体浓度 $\times 10^8$)的发酵液。

1.5 XJUL-6 菌株的生物学特性和生理生化特征

用 LB 培养基,选择不同的温度(30 $^{\circ}$ C ~ 40 $^{\circ}$ C, PH = 7.0),不同 pH 值(5 ~ 12), NaCl 浓度(0% ~ 20%)置于摇床上 130r/min 振荡培养 12h。通过测量发酵液的 OD_{650} 值分析以上因素对 XJUL-6 菌株生长的影响。个体形态特征、菌落形态特征、运动性和生理生化特征观察测定参照文献 [7] 和 [11] 进行。

1.6 XJUL-6 菌株基因组的提取和 (G + C)mol% 测定

采用苯酚氯仿混合提取法^[12]。用高效反相液相色谱仪来测定 XJUL-6 菌株基因组的 (G + C)mol% 含量^[13]。高效液相色谱仪为日本岛津 LC-6AD 高效液相色谱仪,岛津 SPD-10Avp 紫外检测器,Class-VP 数据处理工作站,KromasilC18 柱(5 μ m 250mm \times 4.6mm),流速 1mL/min,检测波长 260nm。移动相为 10% 甲醇,90% 20mmol/L 磷酸二氢钾溶液(pH = 5.6)。

1.7 XJUL-6 菌株 16S rDNA 序列分析

用 CTAB 法所提取的菌株基因组 DNA 为模板^[9]。16S rDNA 的 PCR 引物:L:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';R:5'-ACGCTACCTGTTACGACTT-3',由上海生工生物工程技术有限公司合成;PCR 条件:94 $^{\circ}$ C 3min,94 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 72 $^{\circ}$ C 2min,35 个循环,4 $^{\circ}$ C 终止反应。用购于上海舜舜生物工程公司的胶回收试剂盒回收片段。测序引物为 L:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';R:5'-ACGGCTACCTGTTACGACTT-3',由上海生工生物工程技术有限公司测序。用 Blastn 比较菌株 16S rDNA 与 GenBank 中已登录的序列,调出与菌株 16S rDNA 同源并且已经鉴定的菌种 16S rDNA 序列,并进行比对。

2 结果和分析

2.1 内生菌的分离

依据菌株的表型特征,即菌落形态、单细胞形态来对内生菌进行初步分类。分离筛选出的 14 株菌中,细菌 12 株,真菌 2 株,没有发现放线菌。因为真菌数目太少,所以本文主要以从牛肉膏蛋白胨细菌培养基上分离、筛选到的细菌为研究对象,并编号为 XJUL-1 ~ XJUL-12。

2.2 所分离菌株的 ERIC-PCR 指纹图谱分析

从所分离菌株的 ERIC-PCR 指纹图谱中(图 1)可以很明显的看出所分离得到的 12 株大麻内生细菌是完全不同的 12 种菌。

2.3 抗菌谱的测定

对分离自新疆有毒植物大麻的 12 株内生菌通过琼脂扩散法分别进行拮抗实验,从中筛选出 1 株对棉花黄萎病具有较强拮抗的菌株 XJUL-6(表 1),其对棉花黄萎病的拮抗圈直径达 35mm,一株对黄瓜枯萎病有较强抗性的菌株 XJUL-8;一株对西瓜枯萎病有较强抗性的菌株 XJUL-12。

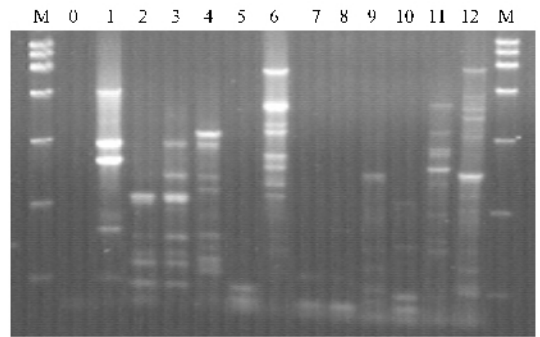


图 1 ERIC-PCR 指纹图谱

Fig.1 The ERIC-PCR fingerprint of isolated bacterial strains from *Urtica cannabina* L.. M. 15000bp DNA ladder; 0. negative control; 1-12. the ERIC-PCR fingerprints of XJUL-1 ~ XJUL-12 genomic DNA.

表 1 XJUL-6 的抗菌谱

Table 1 Antimicrobial spectrum and stability of the fermentation broth of XJUL-6

The name of pathogenic Fungi	antifungal activity
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	N
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	N
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	N
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	N
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	N
<i>Fusarium graminearum</i>	N
<i>Alternaria mali</i> Roberts	N
<i>Verticillium dahliae</i> Kleb.	+++
<i>Coniothyrium diplodiella</i>	N
<i>Bipolaris maydis</i> (Nisik&Miyke) Shoem	N
<i>Pyricularia oryzae</i> Cav.	N

+++ . The diameter of inhibition zone > 20mm; N. no antifungal activity

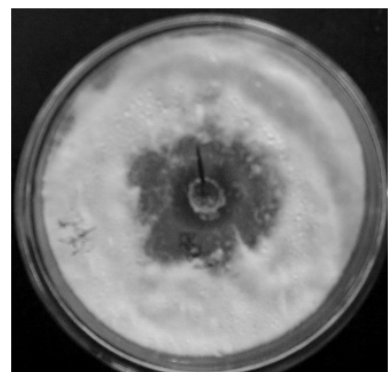


图 2 XJUL-6 对棉花黄萎病的拮抗图(D = 90mm)

Fig.2 The antagonistic map of XJUL-6 against cotton verticillium wilt.

2.4 XJUL-6 菌株的生物学特性

分别单一改变培养起始 pH、培养温度、NaCl 浓度,而其他条件不变,通过测定 XJUL-6 菌发酵液的 OD_{650} 值,对 XJUL-6 菌株的生物学特性进行研究。结果表明,培养起始 pH 值在 4 ~ 10 时, XJUL-6 均能生长,起始 pH 值在 6 ~ 8 时,为最适 pH 值(图 3A),培养温度在 25 $^{\circ}$ C ~ 40 $^{\circ}$ C 时, XJUL-6 均可以生长,温度 36 $^{\circ}$ C ~ 38 $^{\circ}$ C 为 XJUL-6 最适生长温度(图 3B),培养基 NaCl 的浓度为 10% 时, XJUL-6 均可以生长,2% NaCl 浓

度为最适生长浓度(图 3C)。

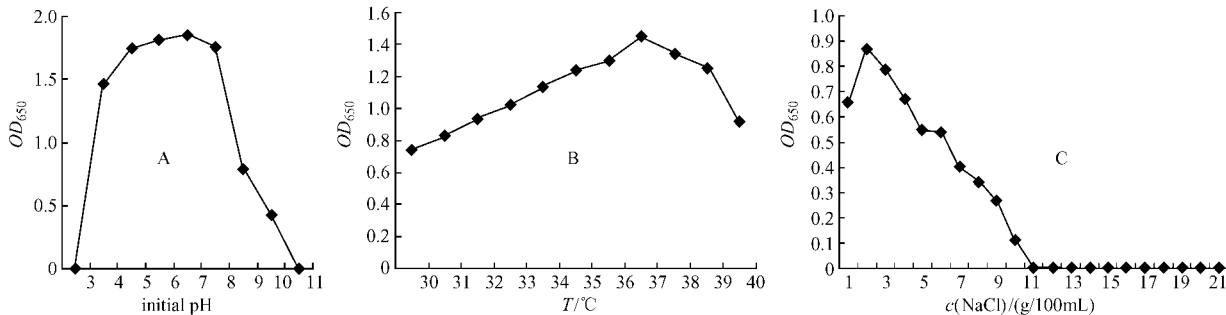


图 3 不同培养条件对 XJUL-6 生长的影响

Fig.3 Effect of different incubation conditions on the growth of XJUL-6. A. Effect of initial pH; B. Effect of temperature; C. Effect of initial NaCl concentration.

2.5 菌落及菌体形态观察

XJUL-6 菌落呈圆形,颜色为白色,表面光滑,边缘整齐。菌体呈直杆状,圆端。革兰氏阳性,每个细胞一个芽孢,芽孢呈柱形,中生不膨大,有鞭毛。

2.6 XJUL-6 生理生化特征

XJUL-6 主要生理生化特征如表 2。

表 2 XJUL-6 生理生化特征
Table 2 Results of morphologic characteristics, physiological and biochemical properties

Analyzer's Performance	Result	Analyzer's Performance	Result
Crystal	-	Citrate utilization	+
Peroxidase	+	propionate utilization	ND
Anaerobic	-	Tyrosine hydrolysis	+
Citrate utilization	+	Phenylalanine ammonia	-
Acidolysis : D-glucose	+	lyase	+
L-Arabinose	-	lecithinase	+
D-mannitol	-	Nitrate reduction	+
Gas production from glucose	-	Indole production	-
Casein hydrolysis	+	NaCl and KCl	-
Glutin hydrolysis	+	need of urea salt	+
Starch hydrolysis	+	Growth in medium pH6.8	+
Growth at NaCl : 2%	+	pH5.7	+
5%	+	Growth at : 5°C	ND
7%	+	10°C	+
10%	+	40°C	+
11%	-	50°C	+
Live with lysozyme	+	55°C	+

" + " positive ; " - " negative ; " ND " not do.

2.7 XJUL-6 的 (G + C) mol% 测定

采用高效反相液相色谱来测定 (G + C) mol% 含量。从标准碱基混合液的柱色谱分离图谱(图 3-A)可以看出各峰分离效果良好,其检出时间、峰型和峰面积稳定。

由碱基的毫摩尔数可以得到 XJUL-6 基因组 DNA 的 (G + C) mol% 含量(图 4-B),测得 XJUL-6 的 (G + C) mol% 含量为 38.84 mol%。完全在芽孢杆菌属 DNA (G + C) mol% (32 ~ 69) 之内。

2.8 16S rDNA 序列分析

用细菌 16S rDNA 通用引物对 XJUL-6 的基因组进行 PCR 扩增,扩增产物回收并测序,提交 NCBI 注册(注册号: EF382364)并进行比对,结果显示菌株 XJUL-6 与 *Bacillus cereus*

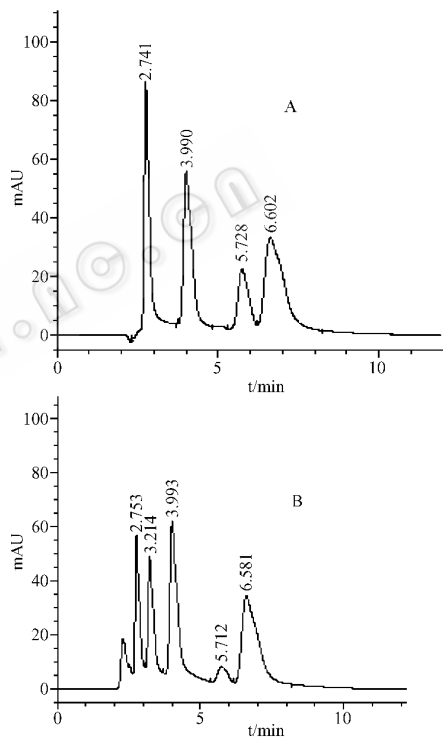


图 4 碱基溶液的分离图谱

Fig.4 Separate map of bases. A. separate map of standard bases; B. separate map of bases from XJUL-6.

p221 的同源性为 98%, 并且与蜡状芽孢杆菌多个种的同源性都是 98%, 如: *Bacillus cereus* clone B305, *Bacillus cereus* strain AH 527, *Bacillus cereus* strain Delaporte 等。

这说明, XJUL-6 应该为蜡状芽孢杆菌。这一结果与上述生理生化测定结果及 (G + C) mol% 结果相一致。因此, XJUL-6 属于蜡状芽孢杆菌。

3 讨论

利用微生物之间的拮抗作用防治植物病害进行生物防治国内外已有较多的研究^[14]。鉴于棉花黄萎病对棉花的危害, 筛选出对棉花黄萎病致病菌具有抗性的生物活性物质逐渐成为国内外专家研究的热点^[15]。XJUL-6 菌株具有较强

的抗棉花黄萎病菌的能力,是一个非常适宜研究拮抗棉花黄萎病菌机制的实验材料。该菌株有望为培育出高抗棉花黄萎病的转基因棉花提供良好的基因资源,具有潜在的生态效益和社会效益。

所分离拮抗菌的来源不是抗病强的棉花植株而是有毒植物大麻,该事实表明,能产生抗真菌活性物质的细菌不仅局限于致病菌所寄生的植物。因此在今后寻找真菌致病菌的拮抗菌时,不应仅仅局限于致病菌所寄生的植物,而应该广域寻找,尤其是那些具有较强抗真菌病菌感染的植物,更应该成为分离、寻找拮抗菌的重要来源之一,并应给予足够的重视。

本研究表明,XJUL-6在室内对棉花黄萎病致病菌病菌具有较强的拮抗作用。至于XJUL-6能否在棉花活体上定植及XJUL-6在活体棉花植株上是否具有同样强的拮抗作用的研究工作正在进行中。

参 考 文 献

- [1] 石磊岩. 棉花黄萎病灾害因素分析. 中国棉花, 1999, 26(7): 8-9.
- [2] 马存, 简桂良, 孙文姬. 我国棉花抗黄萎病育种现状、问题及对策. 中国农业科学, 1997, 30(2): 58-64.
- [3] 张桂寅, 徐领会, 马峙英, 等. 棉花抗黄萎病种质资源筛选. 中国棉花, 1999, 26(8): 8-11.
- [4] 鹿秀云, 马平, 李社增, 等. 防治棉花黄萎病的生防细菌 NCD-2 的田间效果评价及其鉴定. 植物病理学报, 2005, 35

(5): 451-455.

- [5] 马社增, 马平, 刘杏忠, 等. 利用拮抗细菌防治棉花黄萎病. 华中农业大学学报, 2001, 20(5): 422-425.
- [6] 厉云, 张天宇, 李雪玲. 利用拮抗细菌防治棉花黄萎病. 棉花学报, 2003, 15(1): 26-28.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 张洪涛, 徐田枚, 艾山江, 等. 新疆有毒大麻内生菌的分离及 AP-PCR 与 ERIC-PCR 分析. 中国微生物学杂志, 2007, 19(3): 25-27.
- [9] 林加涵, 魏文铃, 彭宣宪. 现代生物学实验(下册). 北京: 高等教育出版社, 2001: 98-103.
- [10] 黎起明, 罗宽, 林纬, 等. 番茄青枯病内生拮抗细菌的筛选. 植物病理学报, 2003, 33(4): 364-367.
- [11] Holt JG., Krieg NR, Sneath PHA, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: The willimas&wilkins co, 1994.
- [12] 林万暇主编. 细菌分子遗传学分类鉴定法. 上海: 上海科学技术出版社, 1990: 58-104.
- [13] 邓爱华, 王宁, 易霞, 等. 反相高效液相色谱法测定 *Bacillus clausii* 的 DNA(G+C)mol%, 生物技术, 2006, 16(4): 42-45.
- [14] John Whipps M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 2003, 56: 487-451.
- [15] 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. 微生物学通报, 2005, 32(4): 42-46.

Characteristics and identification of an Antagonistic XJUL-6 Against Cotton Verticillium Wilt

ZHANG Hong-tao, YU Pin-pin, H·Abudula, XU Tian-mei, G·Mijit*
(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: In order to probe into the antagonistic mechanism of bacteria against *Verticillium dahliae kleb.*, twelve endophytic bacterial strains were isolated from the *Urtica cannabina L.* in XinJiang. Through antagonistic experiments, the antagonistic charts of the twelve endophytic bacterial strains against eleven crop diseases have been obtained, respectively and the XJUL-6 which has higher antagonistic activity against *Verticillium dahliae kleb.* was screened from the endophytes with the Joan-board diffusion method. The optimum growing temperature range of XJUL-6 is 36°C ~ 38°C, and the optimum growing pH is pH6-8. Phylogenetic analysis of the XJUL-6 based on comparison of 16S rRNA sequence revealed that it is closely related to *Bacillus cereus* p221 with 98% identity. Moreover, the (G+C)mol% content of the genomic DNA was 38.84 mol% for XJUL-6. According to the observation of the morphology, the study of the physiological and biochemical, 16S rDNA and (G+C)mol% content, the XJUL-6 was identified as a new members of the species *Bacillus cereus*. The XJUL-6 will offer potential material for studying the mechanism of bacteria against *verticillium dahliae kleb.* in cotton.

Keywords: endophyte; *verticillium dahliae kleb.*; poisonous plant; (G+C)mol% content; 16S rDNA; *Urtica cannabinal*

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (30560004)

* Corresponding author. Tel 86-9918585677; E-mail: gmijit@yahoo.com.cn

Received: 31 January 2007/Accepted: 20 May 2007/Revised: 25 July 2007