

## 研究报告

芽孢杆菌 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 对豌豆尖镰孢菌抗菌机理的研究\*刘晓妹<sup>1</sup> 陈秀蓉<sup>2</sup> 蒲金基<sup>3</sup>(华南热带农业大学植物保护学院 儋州 571737)<sup>1</sup>(甘肃农业大学植物保护系 兰州 730070)<sup>2</sup> (中国热带农业科学院环境与植物保护研究所 儋州 571737)<sup>3</sup>

**摘要:** 同、异步培养结果表明: 芽孢杆菌 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 对豌豆尖镰孢菌 (*Fusarium oxysporum* Schl f. sp. *pisi*) 有很强的抑菌作用。经 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 无菌液处理后的病原菌由灰白色变为白色, 气生菌丝增多且纠结成团。抗菌显微特征是: 导致病菌孢子和菌丝体膨大、畸形、原生质凝聚、孢子不萌发或萌发异常、菌丝生长点产生大量泡囊、生长受阻, 后期菌丝体断裂、泡囊破裂、原生质外泄。B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 无菌液中蛋白含量分别为 1795.53μg/mL 和 1345.93μg/mL, 各含一种抗菌蛋白, 其分子量分别为 103.5 kD (B<sub>1</sub>) 和 127.6 kD (B<sub>2</sub>)。

**关键词:** 芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>, 豌豆尖镰孢菌, 抗菌机理

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0001-05

### Antagonism of *Bacillus* spp. B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> Strains Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*

LIU Xiao-Mei<sup>1</sup> CHEN Xiou-Rong<sup>2</sup> PU Jin-Ji<sup>3</sup>(Plant Protection College, SCUTA, Danzhou 571737)<sup>1</sup>(Department of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)<sup>2</sup>(Plant Protection Research Institute, CATAS, Danzhou 571737)<sup>3</sup>

**Abstract:** The antagonism of two strains B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> of *Bacillus* spp. against pea root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* was studied. The result of pairing culture showed that B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> strains of *Bacillus* spp. had strong antifungal activity to the pathogen. The colonial color of the pathogen changed from gray to white, aerial hyphas increased and entangled into group after treatment with the cell-free fermentational filtrate of B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub>. Observation under optical microscope showed that hyphas and spores of the pathogen swelled and distorted with concentrated cytoplasm after treatment, the spores could not germinate or germinated abnormally. A lot of vesicles appeared at the top of the hyphas, and the hyphas stopped growing and broke finally, their cytoplasm spilled from the cell. The cell-free fermentational filtrate of B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> strains contained 1795.53μg/mL and 1345.93μg/mL protein respectively, from which two antifungal proteins of 103.5 kD (B<sub>1</sub>) and 127.6 kD (B<sub>2</sub>) were purified.

**Key words:** *Bacillus* B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, Antagonism

在植物病害生防细菌中, 研究较多的是芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.)。田间应用已证实, 其生防菌剂在稳定性、与化学农药的相容性和在不同植物不同年份防效的一致性等方面明显优于非芽孢杆菌和真菌生防菌剂<sup>[1]</sup>。因此, 多年来国内外学者对它能够成

\* 甘肃省教育局资助项目 (No. 0080761)

收稿日期: 2003-04-09, 修回日期: 2003-07-20

为一种生防因子而寄予了极大的兴趣和关注。其抗菌作用以拮抗、竞争和诱导植物抗性为主<sup>[2]</sup>。产生的抗菌物质主要有抗生素<sup>[3]</sup>、细菌素<sup>[4]</sup>、细胞壁降解酶类<sup>[5]</sup>和其它抗菌蛋白<sup>[6,7]</sup>。本实验中的 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 是笔者从 110 株生防细菌中筛选获得，它对供试的 13 种病原真菌均具有抑制作用，且对其中 8 种的抑制率在 80% 以上，是两株广谱、高效的拮抗菌，但其拮抗机制尚不清楚。为此，笔者以豌豆尖镰孢菌为指示菌，从抗菌作用的显微特征和抗菌物质特性两方面初步研究了 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 的抗菌机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株：**芽孢杆菌 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 由甘肃农业大学植保系植病教研组提供。指示菌豌豆尖镰孢菌由甘肃省农科院植保所何苏琴副研究员提供。

**1.1.2 培养基配方：**NA、PDA 培养基配方见《植病研究法》(方中达, 1998)。

NB 培养液：牛肉胨 3g、蛋白胨 5.0g、葡萄糖 2.5g、水定容至 1,000 mL。

NYDA 培养液：牛肉胨 8g、酵母浸膏 5.0g、葡萄糖 10g、水定容至 1,000 mL。

**1.1.3 试剂：**中分子量标准蛋白试剂为美国进口分装。考马斯亮蓝 R250 为 Fluka 进口分装。葡聚糖凝胶 G-50 为中国上海试剂二厂生产。

### 1.2 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 原液、无菌液的制备和菌量测定

将 NA 斜面活化的 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 用 3mL 灭菌水洗下，接入 40mL NB 培养液中，置 26℃ ~ 28℃、100r/min 摇床上培养 48h 后，即得 B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 菌原液。再按 1:20 比例，将 B<sub>1</sub> 接种于 40mL pH8.0 的 NYDA 培养液中，27 ± 1℃ 下光照培养 72h；将 B<sub>2</sub> 接种于 40mL pH6.0 的 NYDA 培养液中，27 ± 1℃ 振荡 (100r/min) 光照培养 48h；将培养液在 4,000 r/min 离心 15min 后，上清液用细菌过滤器 (滤膜孔径 0.22μm) 过滤，即得无菌液。

### 1.3 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 与指示菌同步、异步培养时的抗菌作用

参照对峙法，将拮抗菌与指示菌分别于 NA、PDA 平板上均匀培养活化后，用打孔器打成直径为 7mm 的菌饼。取拮抗菌 1 块置于 PDA 平板中央 (φ = 9cm)，在距中央 3.5cm 的圆周上等距离接 4 块指示菌，置 26℃ 下培养，5d 后用十字法测定抑菌圈直径。重复 3 次。(1) 同步培养：将 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 与指示菌同时接种于 PDA 平板上；(2) 异步培养：将 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 接种于 PDA 平板中央，在 27 ± 1℃ 条件下培养 12、24、36、48、60h 后，再接指示菌。观察同、异步培养时 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 对指示菌的抑制作用。

### 1.4 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 无菌液对指示菌菌丝生长的影响

设无菌液原液浓度的 50.0%、25.0%、12.5%、6.3%、3.1%、1.6% 等 7 个梯度，各取 2.5mL 于培养皿内，与 10mL 约 45℃ 的 PDA 迅速混匀，冷却后将指示菌菌饼接于中央，置 26℃ 培养，以无菌水为对照。重复 3 次。观察不同浓度对菌丝生长的影响。

### 1.5 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 无菌液对指示菌抗菌作用的显微特征

接指示菌于 PDA 平板上，26℃ 培养 4d。每皿用 10mL 无菌水洗下菌落，经 2 层灭菌纱布过滤后制成孢子、菌丝悬浮液，分别与等量无菌水混匀，以悬滴法制片，26℃ 培养，2、4、6、8、10h 后镜检孢子的形态变化及其萌发率，菌丝细胞壁、原生质等的变化。以无菌水为对照。重复 3 次。将孢子、菌丝形态变化的典型特征在 Motic Imagi 2000 型显微镜 16 × 40 倍下拍照、并保存于电脑。

## 1.6 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 抗菌物质的提纯及其生化测定

**1.6.1 蛋白含量的测定:** 参照文献[8]。取 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 无菌液 0.5mL 加 5mL 考马斯亮蓝混匀, 721 型分光光度计 595nm 下比色, 重复 3 次, 以水为对照。

**1.6.2 抗菌蛋白的提纯:** (1) 抗菌蛋白活性的测定: 在 PDA 平板上加 1mL 指示菌液, 涂匀后于平板中央打孔, 在孔中加各粗提液 100 $\mu$ L, 26 $^{\circ}$ C 下培养 4d 后测定抑菌圈直径。重复 3 次。(2) 抗菌蛋白粗提液的制备: 参照文献[9]。取 50mL B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 无菌液, 用 30%、40%、50%、60%、70%、80% 饱和度的硫酸铵分段盐析, 搅匀, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 过夜, 4,000 r/min 离心 30min, 沉淀用 2mL 20 mmol/L PBS (pH6.8) 溶解, 透析过夜, 即得抗菌蛋白粗提液, 测定其抗菌活性, 确定最佳盐析饱和度。(3) 抗菌蛋白的纯化: 称 6g Sephadex G-50 浸泡过夜, 溶胀后, 装柱 ( $\phi$ 1.6 $\times$ 30cm), 用 3 倍柱体积的 PBS 平衡。取 1mL 经 70% 饱和度盐析获得的抗菌蛋白粗提液上样, 用 PBS 洗脱, 流速 1.5mL/5min, 收集 A<sub>280</sub> 脱洗液。一部分用来测定其抗菌活性, 另一部分用 PEG6000 浓缩, 即得纯化的蛋白液。

**1.6.3 抗菌蛋白质分子量及活性测定:** 按朱广廉<sup>[10]</sup>方法进行 SDS-PAGE 圆盘电泳。以中分子量蛋白为标准, 在凝胶成像系统 (GIS) 中拍照并计算分子量。在凝胶柱上均匀喷布指示菌悬液 (10<sup>5</sup> 个孢子/mL), 48h 后观察其生长情况, 确定蛋白带活性。

## 2 结果

### 2.1 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 与指示菌同步、异步培养时的抗菌作用

对峙法测定表明 (表 1): 同步与异步培养之间的抗菌效果存在差异。同步接种时, B<sub>1</sub> 抑菌圈直径为 33.3mm, B<sub>2</sub> 抑菌圈直径为 29.2mm。拮抗菌提前接种时间越长, 抑菌圈直径越大, 抗菌效果越强。如先拮抗菌, 培养 60h 后再接指示菌, B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 的抑菌圈直径分别为 45.5mm、42.3mm。较同时接种的抑菌圈直径增加 12.2mm 和 13.1mm。可能由于随拮

表 1 同步、异步培养时的抗菌作用

处理	培养时间差 (h)	B <sub>1</sub>		B <sub>2</sub>	
		抑菌圈直径 (mm)	F <sub>0.05</sub>	抑菌圈直径 (mm)	F <sub>0.05</sub>
同步	0	33.3	c	29.2	d
	12	35.0	c	34.7	c
	24	37.8	bc	34.7	c
异步	36	39.2	b	37.3	bc
	48	41.0	b	38.0	b
	60	45.5	a	42.3	a

抗菌培养时间的延长, 抗菌物质在培养基内逐渐扩散和积累, 抑制了指示菌的生长。

### 2.2 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 无菌液对指示菌菌丝生长的影响

两菌无菌液对指示菌菌丝生长的影响基本一致, 随浓度升高, 菌丝生长减慢。与对照相比, 菌落颜色明显由灰白色变为白色, 气生菌丝增多且纠结成团。

### 2.3 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 无菌液对指示菌抗菌作用的显微特征

悬滴法观察表明: 用 50% B<sub>1</sub> 或 B<sub>2</sub> 无菌液处理 2~4h 后, 少数豌豆尖镰孢病菌菌丝扭曲、顶端出现泡囊, 生长受阻 (图 1-1); 处理 6~8h, 病菌有些分生孢子中部缢缩, 原生质凝聚于两端 (图 1-2), 大多数菌丝顶端产生大量泡囊, 原生质明显凝集于泡囊内 (图 1-3); 处理 10h 后, 孢子膨大呈球状、细胞壁变薄, 部分细胞壁崩解, 有些孢子萌发产生的芽管短粗、其上有小泡囊产生 (图 1-4)。菌丝断裂、泡囊破裂, 原生

质外泄(图1-5)。此时孢子萌发率分别为11% ( $B_1$ )和2% ( $B_2$ ),而对照萌发率为87%,可见 $B_1$ 、 $B_2$ 无菌液明显抑制孢子萌发。对照孢子、菌丝体原生质分布均匀、形态正常(图1-5、1-6)。

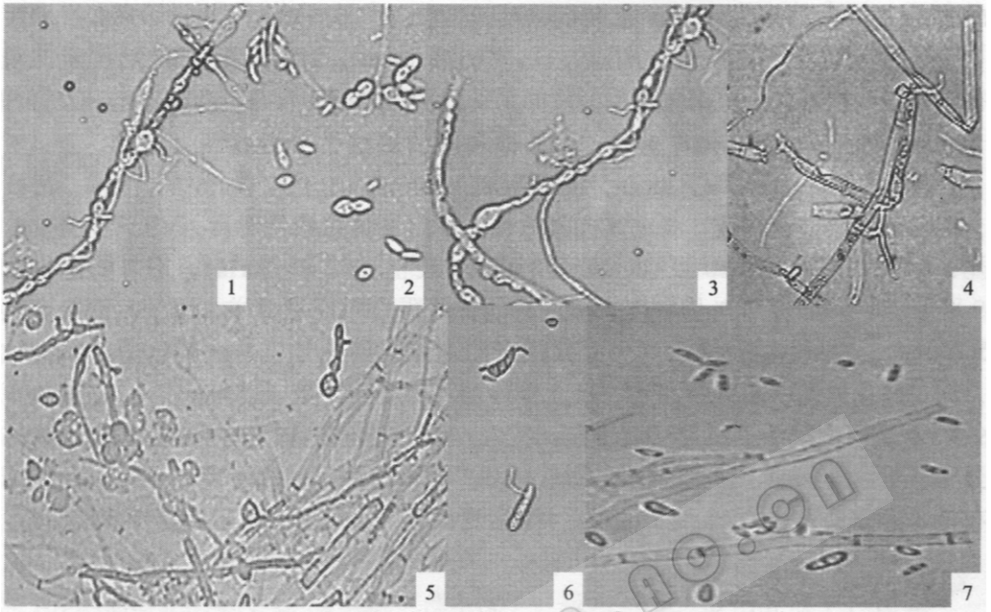


图1  $B_1$ 、 $B_2$  无菌液对豌豆尖镰孢病菌作用的显微特征(640×)

- 1 菌丝扭曲、泡囊出现, 2 孢子中部缢缩、原生质凝集, 3 菌丝上出现大量泡囊、原生质凝集, 4 孢子萌发异常、细胞壁崩解、原生质外泄, 5 菌丝断裂, 6、7 正常孢子和菌丝

### 2.4 $B_1$ 、 $B_2$ 抗菌物质的提纯及其生化测定

2.4.1 蛋白含量的测定: 无菌液中蛋白含量分别为  $1795.53\mu\text{g/mL}$  和  $1345.93\mu\text{g/mL}$ 。

2.4.2 抗菌蛋白的提纯: (1) 硫酸铵分段盐析饱和度的确定:  $B_1$  和  $B_2$  活性物质在30%~70%范围内随饱和度提高而增大,至70%时抑菌圈直径达最大,说明70%硫酸铵饱和度是提取大量抗蛋白的最佳浓度(图2)。(2) Sephadex G-50 柱层析:  $B_1$  和  $B_2$  的粗提蛋白液过 Sephadex G-50 凝胶柱后,其脱洗液在280nm下均只有1个明显的吸收峰,经测定其抗菌活性与该吸收峰相吻合,说明 $B_1$ 、 $B_2$  粗提蛋白液中分别含有一种抗菌蛋白(图3)。

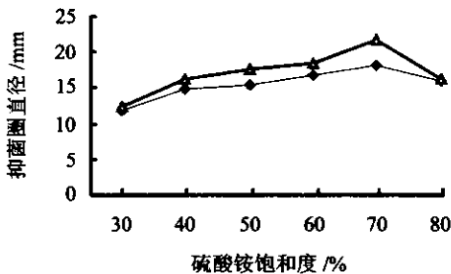


图2 硫酸铵饱和度对提取抗菌蛋白活性的影响

◆  $B_1$ , ▲  $B_2$

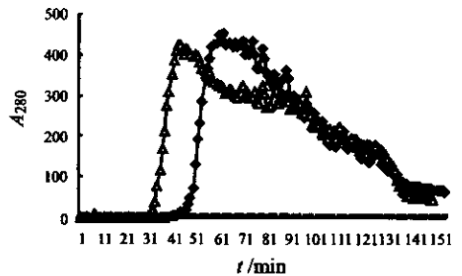


图3 抗菌活性物质 Sephadex G-50 柱层析图

◆  $B_1$ , ▲  $B_2$

**2.4.3 抗菌蛋白分子量及活性测定:** 经 SDS-PAGE (图 4),  $B_1$  和  $B_2$  的蛋白带均只有一条, 其分子量分别为 103.5 kD、127.6 kD, 活性测定表明  $B_1$ 、 $B_2$  两条蛋白带都有抗菌作用。



图 4  $B_1$ 、 $B_2$  抗菌蛋白 SDS-PAGE 图谱  
1  $B_1$  抗菌蛋白, 2 中分子量标准蛋白,  
3  $B_2$  抗菌蛋白

### 3 讨论

芽孢杆菌的蛋白类抗菌物质主要有细菌素、细胞降解酶如几丁质酶和葡聚糖酶和一些未鉴定的抗菌蛋白<sup>[4-7]</sup>, 其分子量都小于 60 kD。本试验  $B_1$ 、 $B_2$  抗菌蛋白的分子量都大于 100 kD, 是否是一种新的抗菌物质, 尚待研究。

经试验测定: 用 70% 硫酸铵饱和度沉淀法提取抗菌蛋白后, 所剩的上清液中仍有很强的抗菌活性, 说明两拮抗菌的抗菌物质除抗菌蛋白外, 可能还含有其它抗菌物质。

试验初步确定两拮抗菌的抗菌物质中含有抗菌蛋白, 能否通过基因工程手段来克隆相应的抗菌蛋白基因, 将其导入寄主植物或其它竞争性强的土壤习居菌中, 或对拮抗菌进行定性遗传改造, 来克服直接用拮抗菌防治病害时由于环境和拮抗菌定殖等原因导致防效不理想的困难, 尚待探索。

### 参 考 文 献

- [1] Elliott M L. *Pest Manag Sci*, 2001, 57 (8): 695 ~ 706.
- [2] 包建中, 古德祥主编. 中国生物防治. 太原: 山西科技出版社, 1998. 505 ~ 506.
- [3] Michiko M N, Peter Z. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1990, 10 (3): 223 ~ 240.
- [4] Zheng G, Fslavik M. *Lett Appl Bacterial*, 1999, 28: 363 ~ 367.
- [5] Tank H, Watanabe T. *J Ind Microbiol*, 1995, 14 (6): 478 ~ 483.
- [6] 童有仁, 马志超, 陈章良, 等. 微生物学报, 1999, 39 (4): 339 ~ 43.
- [7] 刘颖, 徐庆, 陈章良. 微生物学报, 1999, 39 (5): 441 ~ 447.
- [8] 西北农业大学主编. 基础生物化学. 西安: 陕西科学技术出版社, 1986.
- [9] 张树政. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1982.
- [10] 朱广廉、杨中汉. 植物生理学通讯, 1982, 2: 43 ~ 47.