

研究报告

# 水稻稻瘟病拮抗菌 L1 鉴定及抑菌特性的初步研究

李永刚<sup>1\*</sup> 宋兴舜<sup>2</sup> 马凤鸣<sup>1</sup> 文景芝<sup>1</sup> 赵雪莹<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学农学院 哈尔滨 150030)

(2. 东北林业大学生命科学院遗传系 哈尔滨 150040)

**摘要:** 本研究对水稻稻瘟病菌的拮抗菌 L1 形态、生理生化特性等进行测定, 结果发现其为杆状细胞、革兰氏阳性、菌落不规则有褶皱、好氧生长、颜色较深等, 初步鉴定为枯草芽孢杆菌; 拮抗菌 L1 培养 5 d 的发酵液抑菌活性最高, 抑菌率为 74.57%; 拮抗菌 L1 对水稻稻瘟病菌的拮抗活性物质对温度不敏感; 拮抗菌 L1 的发酵液用硫酸铵梯度沉淀法提取粗蛋白, 在 50%~60% 硫酸铵饱和度下沉淀的粗蛋白质对水稻稻瘟病菌抑菌效果最好, 平均抑菌半径达 0.51 cm。

**关键词:** 生物防治, 枯草芽孢杆菌, 拮抗蛋白, 鉴定

## Identification and Characterization of an Antagonistic Strain L1 Against *Phyricularia grisea*

LI Yong-Gang<sup>1\*</sup> SONG Xing-Shun<sup>2</sup> MA Feng-Ming<sup>1</sup> WEN Jing-Zhi<sup>1</sup> ZHAO Xue-Ying<sup>1</sup>

(1. Agricultural College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

(2. Department of Genetics, College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

**Abstract:** On the basis of morphological, physiological and biochemical characterization, the antagonistic bacterium strain L1 against *Phyricularia grisea* was identified. The strain L1 was bacilliform, Gram-positive, fuscous and draped colonies, aerobiosis. The result showed that the strain L1 belongs to *Bacillus subtilis*. The antimicrobial activity of fermentation liquid reached the highest after 5 days-old cultures. And inhibitory rate accounted for 74.57%, but it had not changed along with the time increase. The activity effect of antimicrobial substances was insensitive to heat. The filtrated *Bacillus subtilis* strain L1 was precipitated in grades with the ammonium sulfate to draw the antimicrobial proteins and crude proteins were obtained. One crude protein drawn with ammonium sulfate at 50%~60% saturation showed strong antimicrobial activities to *Phyricularia grisea*. Average radius was accounted for 0.51 cm.

**Keywords:** Biological control, *Bacillus subtilis*, Antimicrobial proteins, Identification

稻瘟病, 是一种世界性的水稻病害, 严重影响了水稻的产量和品质, 全球每年因稻瘟病造成的水稻产量损失达 11%~30%<sup>[1]</sup>。目前稻瘟病的防治手段还主要依靠培育抗病品种及化学农药, 但二者都有

很难克服的弊端。从 20 世纪 50 年代起, 人们开始寻求控制稻瘟病的生物防治方法<sup>[2]</sup>。

在病害发生的环境中, 存在大量的对病原菌有拮抗作用的菌株<sup>[3]</sup>。利用拮抗菌防治植物病害是十

分活跃的研究领域之一, 并已显示出良好的应用前景。生防菌的种类繁多, 生产上广泛应用的有真菌、细菌、放线菌和病毒等。在植物病害生防细菌中, 研究较多的是芽孢杆菌, 它是一类重要的微生物资源, 是一类嗜温好氧和兼性厌氧、产生抗逆性内生孢子的杆状腐生细菌。它在自然界中广泛存在, 能够产生对热、紫外线、电磁辐射和某些化学药品有很强抗性的芽孢, 可以耐受各种不良的环境条件<sup>[4]</sup>。芽孢杆菌中用于防治稻瘟病的主要有枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilis*)和蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)等<sup>[5]</sup>。其中, 枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)是研究较为深入的优良生防菌株之一, 是芽孢杆菌属中的主要抗菌蛋白生产菌<sup>[6]</sup>, 能产生 70 多种抗菌物质, 包括脂肽类、肽类、磷脂类、多烯类、氨基酸类和核酸类等多种化合物, 研究较多的是具有极生物工程利用价值的脂肽类和肽类抗生素。

本研究从水稻根际分离到 1 株对稻瘟病菌具有拮抗作用的菌株, 并对其进行了初步鉴定, 初步测定了其抑菌特性, 为该生防菌的进一步研究和应用打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 水稻拮抗菌株 L1 的鉴定

1.1.1 供试拮抗菌株: 拮抗菌株 L1 由本课题组自水稻根际土壤中分离并保存。

1.1.2 拮抗菌 L1 的鉴定: 菌株的细胞染色、形态特征、培养特征和生理生化分析等主要参考文献<sup>[7]</sup>和<sup>[8]</sup>。

### 1.2 拮抗菌 L1 不同发酵时间对水稻稻瘟病菌菌丝生长的影响

1.2.1 供试菌株: 水稻稻瘟病菌(*Phyricularia grisea*) 由本课题组提供。

1.2.2 拮抗菌 L1 不同发酵时间对水稻稻瘟病菌菌丝生长的影响: 将拮抗菌 L1 接种于 KB 液体培养基中, 振荡培养过夜作为种子液, 按 1% 接种量转接于 KB 液体培养基中(装液量 100 mL/300 mL 三角瓶), 28 170 r/min 振荡培养 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、7 d 和 9 d 后, 湿热灭菌后取滤液加入定量的 PDA 培养基中使终浓度达到 2%, 充分混匀, 倒入 15 mL 灭菌的培养皿中, 待培养基冷却后在平板中央接种直径 0.7 cm 的水稻稻瘟病菌菌碟, 以无菌发酵液为空白对照, 每个处理 3 次重复, 26 培养 120 h 后测定

水稻稻瘟病菌菌落直径, 计算抑菌率。

### 1.3 拮抗菌 L1 发酵液对水稻稻瘟病菌分生孢子萌发的影响

1.3.1 稻瘟病菌分生孢子的准备: 稻瘟病菌在燕麦片培养基产孢培养, 采用穆常青等<sup>[9]</sup>的方法。

1.3.2 供试方法: 拮抗菌 L1 在定量 100 mL KB 液体培养基中(装液量 100 mL/300 mL 三角瓶) 28 170 r/min 振荡培养培养 48 h 的菌液经细菌滤器过滤后分成 2 份, 1 份湿热灭菌, 1 份不处理, 按 5% 的浓度加入稻瘟病菌孢子悬浮液中最终体积为 2 mL, 加入无菌发酵液为空白对照, 观察拮抗菌 L1 发酵液对孢子萌发的影响。

### 1.4 拮抗菌 L1 抗菌粗蛋白质的提取及活性测定

1.4.1 拮抗菌 L1 抗菌粗蛋白质的提取: 参照何青芳蛋白提取方法<sup>[10,11]</sup>略有改进, 将拮抗菌 L1 接种于 KB 液体培养基中, 振荡培养过夜作为种子液, 按 1% 接种量转接于 KB 液体培养基中(装液量 100 mL/300 mL 三角瓶), 28 170 r/min 培养 48 h; 发酵液经滤纸过滤后, 再通过细菌滤器除去菌体, 收集滤液; 抗菌粗蛋白质采用  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分级沉淀法提取, 7 个硫酸铵梯度分别为: 0%~30% (含 30%); 30%~40% (不含 30%); 40%~50% (不含 40%); 50%~60% (不含 50%); 60%~70% (不含 60%); 70%~80% (不含 70%); 80%~100% (不含 80%) 沉淀蛋白; 4 8000 r/min 离心 20 min 收集沉淀, 溶于适量 10 mmol/L 的磷酸钠盐缓冲液(PBS, pH8.0)中; 将蛋白溶液装入处理好的透析袋(截留分子量 12 kD)中, 4 下用同缓冲液透析脱盐。离心弃不溶性沉淀, 上清液即为抗菌粗蛋白, 用于抑菌活性检测。

1.4.2 拮抗菌 L1 抗菌粗蛋白质对水稻稻瘟病菌菌丝生长的影响: 制 PDA 平板, 在距离 PDA 平板中央 3 cm 处用内径为 0.7 cm 的打孔器在对称的方向上打 2 个孔, 取 0.03 mL 上述分级提取的粗蛋白注入到每个孔中, 然后在此 PDA 平板中央接种直径为 0.7 cm 水稻稻瘟病菌菌碟, 每个处理 3 个重复, 26 培养 120 h 后测量抑菌的半径, 分析比较不同梯度的沉淀的蛋白质抑菌活性的差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌 L1 的鉴定

根据常见细菌鉴定手册<sup>[7,8]</sup>对拮抗菌 L1 细胞染色、形态特征、培养特征和生理生化分析, 其结果

见表 1。

表 1 拮抗菌 L1 的特性 Table 1 Characters of antagonistic strain L1	
特征 Characters	结果 Results
革兰氏染色(Gram stain)	+
细胞杆状(Bacilliform)	+
芽孢圆形(Spore round)	-
厌氧生长(Anaerobic Growth)	-
明胶水解(Gelatinhydrolysis)	+
水解淀粉(Starchhydrolysis)	+
纤维素酶(Celluase)	-
β-1, 3-葡聚糖酶(β-1,3-Glucanase)	-
卵磷脂水解(Lecithinhydrolysis)	-
接触酶(Catalase)	+
V-P 实验(V-P Test)	+
柠檬酸盐(Citrate)	-
酪蛋白酶(Casease)	+
几丁质酶(Chitinase)	-
苯丙氨酸(Phenylalanine)	-
尿素水解(Urea Hydrolysis)	+
硝酸盐还原酶(Nitrate reductase)	+
2%氯化钠(2% NaCl)	+
5%氯化钠(5% NaCl)	+
7%氯化钠(7% NaCl)	+
10%氯化钠(10% NaCl)	-
10	+
55	-
65	-

注：+：为阳性；-：为阴性  
Note: +: Positive; -: Negative

从表 1 及生长特性可见，在 KB 液体培养基上，菌落是圆或者不规则形，表面不亮，不透明，2 d~3 d 后变厚，菌落上有褶皱、黏着的膜产生，后期颜色变褐。

根据形态特征与化学分类相结合定属的原则，菌株 L1 为革兰氏阳性细菌，好氧生长，细胞直杆状，生芽孢，有侧生鞭毛，可初步确定为芽孢杆菌属 (*Bacillus*)。

根据多相分类，综合培养特征和生理生化特征定种的原则，菌株 L1 的形态特征与培养特征，生理生化特征均与枯草芽孢杆菌相同，故初步鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

2.2 不同时间处理发酵液对水稻稻瘟病菌生长的影响

拮抗菌 L1 液体发酵测定其分泌抗菌次生代谢产物达到最高点的时间，以不同培养时间取样，然后进行湿热灭菌，采用菌丝生长速率法测定其对水稻稻瘟病菌菌丝生长抑制效果，加无菌发酵液作为空白对照，结果见表 2。

从表 2 可见，拮抗菌 L1 培养不同时间的发酵液经湿热灭菌处理后，在 1%的水平上培养 4 d 与 5 d、7 d、9 d 的发酵液对稻瘟病菌菌丝生长抑制率存在显著差异，而与 3 d 的发酵液不存在显著差异，说明培养 5 d 时发酵液中抑菌活性物质含量达最高，达 74.57%，随时间延长抑菌效果不再增加。

表 2 不同处理时间拮抗菌 L1 发酵液对水稻稻瘟病菌菌丝生长的影响 Table 2 Effect of antagonistic strain L1 on mycelium growth of <i>Phyricularia grisea</i>							
培养天数 Cultivate days (d)	菌落直径 Colony diameters (cm)			平均值 Mean (cm)	抑制率 Inhibitory rate (%)	显著水平 Significance level	
	1	2	3			0.05	0.01
CK	3.44	3.50	3.45	3.46		f	E
1	3.12	3.08	3.14	3.11	10.12	e	D
2	2.82	2.76	2.88	2.82	18.50	d	C
3	2.24	2.18	2.28	2.23	35.55	c	B
4	2.24	2.16	2.18	2.19	36.71	c	B
5	0.86	0.90	0.88	0.88	74.57	b	A
7	0.8	0.82	0.84	0.82	76.30	ab	A
9	0.8	0.8	0.8	0.80	76.88	a	A

2.3 拮抗菌 L1 发酵液对水稻稻瘟病菌孢子萌发的影响

拮抗菌L1 液体发酵培养 48 h后用细菌滤器过滤后湿热灭菌(1 × 10<sup>5</sup> Pa)和未灭菌处理的发酵液，加

入到稻瘟病孢子悬浮液中至总体积 2 mL浓度达 5%，加入无菌发酵液为对照，待对照中 70%以上萌发时开始查孢子萌发数，每个处理调查 100 个孢子，结果见表 3。

表 3 拮抗菌 L1 对水稻稻瘟病菌孢子萌发的影响  
Table 3 Effect of antagonistic strain L1 on germination of *Phyricularia grisea* spores

处理方式 Treatments	萌发率 Germinative rate (%)			平均值 Mean (%)	显著水平 Significance level	
	1	2	3		0.05	0.01
过滤 Filtration	56	58	54	56	a	A
湿热灭菌 Moist heat	60	56	52	56	a	A
CK	78	79	76	78	b	B

表 4 拮抗菌 L1 分泌粗蛋白对水稻稻瘟病菌菌丝生长的影响  
Table 4 Effect of strain L1 crude proteins on mycelium growth of *Phyricularia grisea*

不同饱和度 Various saturations	拮抗带宽 Inhibition zone width (cm)			平均值 Average (cm)	显著水平 Significance level	
	1	2	3		5%	1%
0%~30%	0.32	0.34	0.30	0.32	b	B
30%~40%	0.34	0.38	0.36	0.36	bc	BC
40%~50%	0.44	0.38	0.40	0.41	c	C
50%~60%	0.46	0.52	0.56	0.51	d	D
60%~70%	0.16	0.20	0.18	0.18	a	A
70%~80%	0.16	0.18	0.14	0.16	a	A
80%~100%	0.14	0.16	0.12	0.14	a	A

从表 3 可见, 拮抗菌 L1 用细菌滤器过滤后的湿热灭菌和未灭菌处理的发酵液对稻瘟病菌的孢子均有抑制作用, 且无显著差异, 与对照比存在显著差异, 表明活性物质对热不敏感, 处理与对照的萌发率相差较少, 说明拮抗菌 L1 的次生代谢产物中对稻瘟病菌的分生孢子有一定的抑制作用。

#### 2.4 拮抗菌 L1 抗菌粗蛋白质的提取及活性测定

抗菌粗蛋白质采用  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分级沉淀法提取后, 测定其对水稻稻瘟病菌菌丝生长的影响, 结果见表 4。

从表 4 可见, 在硫酸铵 50%~60% (不含 50%) 饱和度和时沉淀蛋白与其它梯度沉淀蛋白的拮抗效果存在显著差异, 其拮抗带宽达 0.51 cm, 明显超出其它饱和度的拮抗效果, 说明在此饱和度下沉淀出的抑菌活性蛋白最多, 为进一步对拮抗菌 L1 抑菌蛋白的纯化与鉴定奠定了基础。

### 3 讨论

经初步鉴定, 拮抗菌 L1 为枯草芽孢杆菌, 进一步鉴定还有待于采用 16S rDNA 的序列测定。

拮抗菌 L1 是从北方寒地水稻根际土壤中分离获得, 因此该菌株将来开发成细菌制剂更能适应于北方农田生态系统的复杂性, 为今后在寒地水稻稻

瘟病的生物防治研究提供了一定的基础。

拮抗菌 L1 的次生代谢产物对稻瘟病菌的抑菌作用主要是通过对菌丝生长进行抑制, 而对分生孢子的萌发影响较小。进一步对稻瘟病菌产孢及分生孢子萌发后芽管伸长等进行测定, 将明确拮抗菌 L1 的次生代谢产物对稻瘟病菌的抑菌机制。

拮抗菌 L1 抗菌物质采用  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分级沉淀法提取, 不同梯度下的粗蛋白抑菌效果存在显著差异, 说明拮抗菌 L1 的次生代谢产物中有蛋白起拮抗作用, 并且可能是多种蛋白, 这为今后蛋白纯化和鉴定提供了依据。

拮抗菌 L1 的抑菌活性物质对高温不敏感, 说明其抑菌活性物质可能为小分子量物质, 且可能与抗菌蛋白的高级结构无关。因此在今后的研究中就可利用拮抗菌 L1 分泌的抗菌物质对高温稳定的特性, 采用高温处理除去大量的杂蛋白, 然后再进行纯化, 试验过程将会简单, 容易操作, 在材料上为进一步研究该蛋白提供了保证<sup>[12-15]</sup>。下一步将对拮抗蛋白进行纯化, 期望通过对该蛋白进行氨基酸组成分析及 N-末端的氨基酸测序, 以此设计探针, 构建该菌的 cDNA 文库, 以期最终克隆该基因, 为水稻稻瘟病基因工程打下基础。

## 参 考 文 献

- [1] 刘占领, 雷财林, 程治军, 等. 稻瘟病水稻稻瘟病抗性基因定位与克隆研究进展. 作物杂志, 2007, 3: 16–19.
- [2] Kawamata H, Narisawa K, HashiSa T. Suppression of rice blast by phylloplane fungi isolated from rice plants. *Journal of General Plant Pathology*, 2004, 70(2): 131–138.
- [3] Cottyn B, Regalado E, Lanoot B, *et al.* Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathology*, 2001, 91: 282–292.
- [4] 王 静, 赵廷昌, 孔凡玉, 等. 枯草芽孢杆菌 SH7 抑菌物质及其特性. 植物保护学报, 2007, 34(4): 443–444.
- [5] 余 建, 张志元, 高必达. 细菌在植物病害生物防治中的应用. 江西农业学报, 2007, 19(8): 53–55.
- [6] T Foldes, I Banhegyi, Z Herpai, *et al.* Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic food borne pathogenic and spoilage micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89(5): 840–846.
- [7] 东秀株, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.44–65.
- [8] RE 布坎南, NE 吉本斯, 等. 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984, pp.729–733.
- [9] 穆常青, 刘 雪, 陆庆光, 等. 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株对稻瘟病的防治效果及定殖作用. 植物保护学报, 2007, 34(2): 123–128.
- [10] 何青芳, 陈卫良, 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. 中国水稻科学, 2002, 16(4): 361–365.
- [11] 刘永峰, 陈志谊, 张 杰, 等. 枯草芽孢杆菌 B2916 胞外抗菌蛋白质的性质. 江苏农业学报, 2005, 21(4): 288–293.
- [12] 牛卫宁, 郭蔼光. 银杏种仁中抗菌蛋白的纯化及性质. 西北植物学报, 2003, 23(9): 1545–1549.
- [13] 林 东, 徐 庆, 刘忆舟, 等. 枯草芽孢杆菌 SO113 分泌蛋白的抑菌作用及抗菌蛋白的分离纯化. 农业生物技术学报, 2001, 9(1): 77–80.
- [14] 刘 静, 王 军, 姚建铭, 等. 枯草芽孢杆菌 JA 抗菌物特性的研究及抗菌肽的分离纯化. 微生物学报, 2004, 44(4): 511–514.
- [15] 宋永燕, 李 平, 郑爱萍, 等. 生防细菌 LM-3 的鉴定及其抗菌蛋白的研究. 四川大学学报(自然科学版), 2006, 43(5): 1110–1115.

稿件书写规范

## 论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写  $\bar{x}$ , 不用大写  $X$ , 也不用 *Mean*。标准差用英文小写  $s$ , 不用 *SD*。标准误用英文小写  $s_{\bar{x}}$ , 不用 *SE*。 $t$  检验用英文小写  $t$ 。 $F$  检验用英文大写  $F$ 。卡方检验用希文小写  $\chi^2$ 。相关系数用英文小写  $r$ 。样本数用英文小写  $n$ 。概率用英文大写  $P$ 。