

357 细菌及其拮抗物质对植物病原真菌的抑制*

湛晓曦 陈卫良 李德葆**

(浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

摘要: *Bacillus cereus* 357 细菌及其分泌的拮抗物质对水稻纹枯病菌和草莓灰霉病菌有较好的拮抗作用。它们可抑制或杀死这两种病原菌的菌丝, 可使菌丝枯萎和产生畸形。357 细菌分泌的拮抗物质还可抑制草莓灰霉病菌孢子的萌发和孢子的形成。该拮抗物质对热、酸、碱等有较高的稳定性。

关键词: *Bacillus cereus* 357 细菌, 拮抗物质, 水稻纹枯病菌, 草莓灰霉病菌

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2003) 04-0067-05

THE ANTAGONISTIC ACTIVITIES OF BOTH *BACILLUS CEREUS* 357 AND ITS ANTAGONISTIC SUBSTANCE AGAINST *BOTRYTIS CINEREA* PERS. AND *RHIZOCTONIA SOLANI*

CHEN Xiao-Xi CHEN Wei-Liang LI De-Bao

(The Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract: *Bacillus cereus* 357 and its antagonistic substance can effectively antagonize *Botrytis cinerea* Pers. and *Rhizoctonia solani*. They can inhibit or kill the hyphae of *Rhizoctonia solani* and *Botrytis cinerea* Pers. In addition, they can inhibit the growth of hyphae, the formation as well as the germination of spore of *Botrytis cinerea* Pers. The antagonistic substance is stable against heat, acid and alkali and enzyme.

Key words: *Bacillus cereus* 357 bacteria, Antagonistic substance, *Botrytis cinerea* Pers., *Rhizoctonia solani*

浙江大学生物技术研究所从杭州地区郊区茄子叶表面分离到一株 *Bacillus cereus* 细菌(命名为 *Bacillus cereus* 357 细菌, 以下简称 357 细菌, 由该菌分泌的拮抗物质简称为拮抗物质)。为了探索 357 细菌及其拮抗物质作为生物农药防治水稻纹枯病菌和草莓灰霉病菌的可能性, 我们作了一些探索性的工作。现把我们部分研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病原真菌和细菌: 水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) 由浙江大学植物保护系植病组提供。草莓灰霉病菌 (*Botrytis cinerea* Pers.) 由本文作者分离自浙江省农业科学院草莓种植园。357 细菌由浙江大学生物技术研究所分离自杭州地区郊区的茄子叶表面。

1.1.2 试剂及培养基: 胰蛋白酶 (Difco 公司)。蛋白酶 K (Promega 公司)。乙醚 (上海马陆专业村制药厂)。用 LB 培养基培养 357 细菌。用 PDA 培养草莓灰霉病菌和水稻纹枯病菌以及 357 细菌。

* 浙江省自然科学基金项目 (No. 300265)
Project Granted by Zhejiang Province Natural Science Fund (No. 300265)

** 联系人 E-mail: lidb@mail. hz. zj. cn

收稿日期: 2002-08-25, 修回日期: 2002-12-03

1.2 方法

1.2.1 拮抗物质的提取: 见文献 [1]。

1.2.2 357 细菌对草莓灰霉病菌和水稻纹枯病菌的抑制作用和致死作用: 两种真菌分别与 357 细菌同步培养于 PDA 平板上 (25℃, 根据需要培养不同时间)。然后分别把抑菌圈边缘处的菌丝转接到不含拮抗物质 PDA 平板上, 培养 3d。若菌丝生长, 判断为抑菌; 若菌丝不生长, 判断为杀菌。另外, 水稻纹枯病菌菌丝培养两周后, 显微镜观察菌丝生长的抑制状态。

1.2.3 拮抗物质对灰霉病菌和水稻纹枯病菌的抑制作用和致死作用: 固体 PDA 培养基在溶化状态下加入拮抗物质 (不同的平板其稀释度分别为 1/10、1/100、1/1,000、1/2,000、1/4,000、1/8,000 和 1/16,000), 混匀 (设生理盐水对照)。培养基固化后分别接种灰霉病菌和水稻纹枯病菌菌丝块, 25℃ 培养 2~3d。把生长受到完全抑制的菌丝块接种到不含拮抗物质的固体 PDA 平板上培养 (培养条件不变)。判断菌丝生长受抑制或发生致死作用的方法同 1.2.2。另外, 把水稻纹枯病菌接种在 PDA 平板上, 并在离菌丝适当位置处打孔 (直径为 0.5cm), 加拮抗物质 20μL, 25℃ 培养, 数 d 后观察结果。

分别把培养 2 d 的纹枯病菌菌丝块 (约 1.0cm²) 接种到不同的 ependorf 管中 (含 1.0mL 液体 PDA, 分别含拮抗物质 1/100、1/1,000、1/2,000、1/4,000、1/8,000 和 1/16,000)。25℃ 摇床培养, 观察生长状态。一周后, 挑取菌丝不生长的 ependorf 管, 8,000 r/min, 离心 10min., 收集菌丝, 生理盐水冲洗 3 遍, 再把菌丝接种到不含拮抗物质的液体 PDA 中培养 (25℃)。若菌丝不生长, 判断为杀菌。对灰霉病菌处理的方法类同。

1.2.4 拮抗物质对灰霉病菌孢子萌发和孢子形成的影响: (1) 对孢子萌发的影响: 在固体 PDA 平板上培养灰霉病菌 (25℃)。孢子形成后, 收集一个平板的孢子使之溶于 100mL 生理盐水中, 4 层纱布过滤除菌丝。生理盐水稀释 10 倍。在溶化的固体 PDA 中分别加入 1/100、1/200、1/400、1/800 和 1/1,600 的拮抗物质, 倒平板。PDA 固化后分别涂布 20μL 孢子液 (设生理盐水对照)。25℃ 培养 2~3d。显微镜下随机取 20 个视野, 计数孢子萌发数。孢子萌发率的公式为: 有拮抗物质的平板上的平均孢子萌发数/对照平板上平均孢子萌发数 × %。(2) 对孢子形成的影响: 将培养 2d 的草莓灰霉病菌菌丝块用灭菌生理盐水洗净 (3 次), 把它们分别置于含 1/100、1/200、1/400、1/800 和 1/1,600 拮抗物质的 100mL 液体 PDA 培养基中 (设生理盐水对照)。25℃ 培养, 约一周出现孢子, 4 层纱布除菌丝, 滤液用生理盐水稀释 100 倍, 取 10μL 作显微镜观察。方法为: 随机取 20 个视野计数孢子。孢子形成率计算公式为: 1 - 拮抗物质处理后孢子形成数/对照孢子数 %。

1.2.5 拮抗物质稳定性: (1) 热稳定性: 把 40μL 的拮抗物质分别置于 5 个 1mL 的 ependorf 管中, 分别在 37℃、50℃、80℃、100℃ 和 120℃ 的条件下处理 20min.。加适量水使体积恢复为 40μL, 混匀。平板中央同步接种水稻纹枯病菌, 在适当位置打孔 (直径为 0.5cm), 分别取 5μL 加入到不同的 PDA 平板孔中。25℃ 培养 2d, 观察并记录抑菌半径 (设生理盐水对照)。(2) 酸碱稳定性: 在 5 个 1mL 的 ependorf 管中分别把 40μL 蒸馏水和 40μL 的 357 细菌拮抗物质相混合, 用 HCl 或 NaOH 分别调 pH 至 pH 1、4、7、9、和 14, 静置过夜, 再调 pH 值至中性, 加适量水使最终体积为 160μL。取 20μL (相当于 5μL 拮抗物质原液), 测活性。(3) 对蛋白酶的稳定性: 在 2 个 ependorf 管中分别加入 40μL 拮抗物质, 适当加热尽可能除去可挥发成分, 再补充适量水使体积恢复为 40μL,

混匀, 然后分别加胰蛋白酶 (5μg/mL) 和蛋白酶 K (5μg/mL), 室温 (约 35℃) 静置 2h, 取 5μL 测活性。(4) 对紫外线的稳定性: 抗紫外线试验在超净工作台 (紫外灯为 20W) 进行。分别取拮抗物质 10μL 置入 5 个 eppendorf 管中, 打开盖子, 用紫外线直接照射, 照射时间分别为 5 min、10 min、15 min、25 min 和 35 min。处理完毕后, 补充适量水使体积恢复为 10μL, 取 5μL 测活性。(5) 拮抗物质活性的有效时间: 把拮抗物质放置 1 周、2 周、3 周和 4 周 (25℃), 分别取 5μL 测活性。以上各种处理后测活性方法均同 1.2.5 (1)。

2 结果

2.1 357 细菌对灰霉菌菌和水稻纹枯病菌菌丝的抑制作用或致死作用

分别把与 357 细菌共培养 1~2d 的抑菌圈处的水稻纹枯病菌和灰霉菌菌丝接种于不含拮抗物质的 PDA 平板上, 菌丝仍可以生长 (判断为抑菌)。而同样方法培养两周的抑菌圈处的水稻纹枯病菌和灰霉菌菌丝用相同方法接种, 菌丝不生长 (判断为杀菌)。

2.2 拮抗物质对灰霉菌菌和水稻纹枯病菌菌丝的抑制作用和致死作用

在含拮抗物质分别为 1/10、1/100、1/1000、1/2000、1/4000 倍和 1/8000 的固体 PDA 平板上, 水稻纹枯病菌和灰霉菌菌的生长均受到抑制, 在 1/16, 000 的固体 PDA 平板上

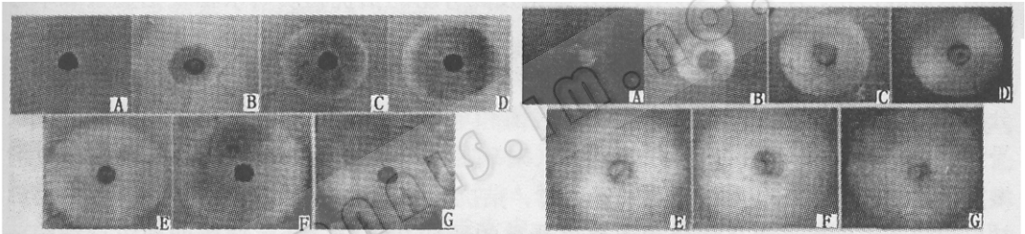


图 1 拮抗物质对草霉灰霉菌菌的抑制作用
A、B、C、D、E、F 和 CK 分别为在含 1/100、1/100、1/1、000、1/2,000、1/4,000、1/8,000 和 1/16,000 拮抗物质的 PDA 中以及在对照 PDA 中的生长抑制状态 (对照 CK 生长直径为 3.7cm)

图 2 拮抗物质对灰霉菌菌的抑制作用
A、B、C、D、E、F 和 CK 分别为在含 1/1,000、1/2,000、1/4,000、1/8,000 和 1/16,000 拮抗物质的 PDA 中以及在对照 PDA 中的生长抑制状态 (CK 对照生长直径为 4.2 cm)

灰霉菌菌丝的生长还受到抑制 (图 1 和图 2 均未出现 1/10 稀释度的抑菌情况)。另外, 把含 1/10 和 1/100 拮抗物质的 PDA 平板上的灰霉菌菌丝和水稻纹枯病菌菌丝转移到一个无拮抗物质的 PDA 平板上培养数 d, 这两种真菌均不生长。液体 PDA 培养结果也相同 (据此判断, 10 倍和 100 倍稀释度的拮抗物质可杀死这两种病原真菌)。

2.3 357 细菌及其拮抗物质对水稻纹枯病菌菌丝生长形态的影响

抑菌圈处的菌丝枯萎、褶皱并严重变形。拮抗物质也可使水稻纹枯病菌发生枯萎、褶皱并严重变形 (图 3)。

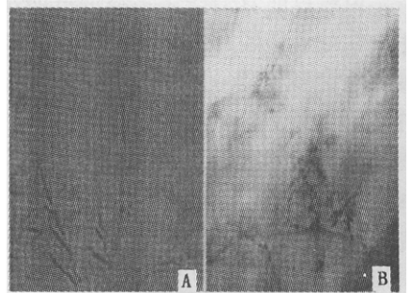


图 3 拮抗物质对纹枯病菌菌丝生长形态的影响
A 正常生长的菌丝, B 因受拮抗物质的影响而枯萎变形的菌丝

2.4 拮抗物质对灰霉菌孢子萌发、孢子形成的影响

2.4.1 拮抗物质对灰霉菌孢子萌发的抑制率随浓度的增加而增大, 400倍稀释的拮抗物质可完全抑制灰霉菌孢子的萌发(见表1)。

表1 拮抗物质对真菌孢子萌发的影响

稀释倍数	对照	1/1,600	1/800	1/400	1/200	1/100
孢子数	22	19	9	0	0	0
萌发率	100%	86%	42%	0	0	0

2.4.2 357细菌拮抗物质对灰霉菌孢子形成的影响: 稀释200倍的拮抗物质完全抑制孢子的形成。稀释400倍的拮抗物质对孢子形成的抑制率为72%。

2.4.3 357细菌拮抗物质的稳定性: 357细菌拮抗物质经蛋白酶、高温、酸碱和紫外线照射等处理以后, 其拮抗活性无明显变化, 说明拮抗物质有较高的稳定性。

3 讨论

本文作者曾研究过357细菌及其分泌的拮抗物质对植物真菌的抑菌谱, 结果表明, 其抑菌谱较广^[1]。本文结果表明, 357细菌及其分泌的拮抗物质对水稻纹枯病菌和草莓灰霉病菌有较强的抑制作用。

某些 *Bacillus cereus* 属细菌产生的拮抗物质可抑制一些植物病原真菌。357细菌及其分泌的拮抗物质较短时间处理水稻纹枯病菌和草莓灰霉病菌菌丝可使它们的菌丝生长受到抑制, 较长时间处理则可杀死菌丝; 对病原菌丝生长的抑制率随拮抗物质浓度的增加而增加, 当拮抗物质浓度达到一定时, 拮抗物质可杀死病菌。357细菌及其分泌的拮抗物质还可使水稻纹枯病菌菌丝发生严重的畸变和皱缩。拮抗物质处理纹枯病菌菌丝后, 菌丝有溶解现象(结果未显示)。357细菌及其拮抗物质还可有效地抑制草莓灰霉病菌孢子的形成和孢子的萌发。上述结果推断, 357细菌拮抗物质对病原真菌的拮抗作用可能有多种机制。

对照实验排除了拮抗物质中可能残留的乙醚对有关实验数据的影响。

虽然目前有一些化学药剂可防治草莓灰霉病, 但效果有限, 还污染环境。长期和单一性使用井冈霉素已使一些地区的水稻纹枯病原菌对其产生了抗药性^[4]。近年来, 国内外许多学者一直在努力探索用拮抗细菌(或其它微生物)防治上述病害的可能性并已筛选到了一些有希望的菌株^[5-8]。筛选并积累对上述病害有较好的拮抗作用的微生物是防治该病害的基础性工作。本文结果表明, 在开发防治这两种病害的生物农药方面, 357细菌及其分泌的拮抗物质可能有较好的潜力。有人曾用357细菌活菌喷洒小麦, 结果表明357细菌对小麦白粉病有一定的防治作用(未发表)。我们下一阶段的工作重点之一, 是用357细菌活菌(或拮抗物质)喷洒草莓和水稻以获取田间防治水稻纹枯病菌和草莓灰霉病的试验数据。判断357细菌及其分泌的拮抗物质作为生物农药开发价值的最终标准应该是田间试验所获得的数据,

357细菌分泌的拮抗物质有很好的稳定性; 我们以前的研究还表明, 该拮抗物质是一个脂溶性较好的物质。稳定性和一定的脂溶性对于生物农药来说都是较理想的性质(植物叶子表面有相当的疏水性)。

我们已纯化了357细菌的拮抗物质,并测定了该物质分子量(分子量为402)和分子式(分子式为 $C_{27}H_{46}O_2$)。根据其紫外吸收谱、红外吸收谱和分子式等性质,已初步确定该拮抗物质为一种新物质(未发表)。

参 考 文 献

- [1] 洪晓曦, 陈卫良, 李德葆. 浙江大学学报, 2000, 26 (5): 489~492.
- [2] Suh L S, Lethbridge B, Raffel S J, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60: 2023~2030.
- [3] Stab E V, Jacobson L M, ndelsman J H. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60: 4404~4412.
- [4] 郑爱萍, 李平, 王玲霞, 等. 西南农业学报, 2002, 14 (1): 78~81.
- [5] 陈志谊, 许志刚, 高泰东, 等. 中国水稻科学, 2000, 14 (2): 98~102.
- [6] 孟庆忠, 刘志恒, 王鹁影, 等. 沈阳农业大学学报, 2000, 32 (5): 376~381.
- [7] Lee J Y, Hwang B K. J Microbiol, 2002, 48 (5): 407~417.
- [8] Bordoloi G N, Kumari B, Guha A, *et al.* Pest Manag Sci, 2002, 58 (3): 297~302.