

# 黄瓜枯萎病新型抑制蛋白 L37 的研究

郑爱萍 闫 敏 李 平\* 谭芙蓉 郑秀丽 李 壮

(四川省农业生物技术工程研究中心, 成都 611130)

**摘 要:** 从土壤中分离到对黄瓜枯萎病病原菌有抑制作用的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 发酵产物经 DEAE-纤维素、Sephadex G-100 柱层析, 分离到 15 kD 抑菌蛋白 L37, SDS-PAGE 显示纯度达到电泳纯, N-末端氨基酸序列同源性检测结果提示可能是一种新型的抑菌蛋白。蛋白质抑菌结果表明, 对多种病原真菌具有抑制效果, 且对蛋白酶、温度和大部分有机物不敏感, 是稳定的抑菌蛋白。对病原菌菌丝抑制机理研究表明, 抑菌蛋白具有严重扭曲、断裂、阻止生长等抗生效果。应用发酵蛋白产物进行两年大田防效试验表明, 对黄瓜枯萎病防效显著, 最高达到 90%, 具有显著提高产量的作用。

**关键词:** 黄瓜; 黄瓜枯萎病; 枯草芽孢杆菌; 抑菌蛋白; 防治

**中图分类号:** S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 06-1102-03

## Research on New Antagonistic Protein L37 against *Fusarium oxysporum*

Zheng Aiping, Yan Min, Li Ping\*, Tan Furuang, Zheng Xiuli, and Li Zhuang

(Sichuan Provincial Center for Agri-Biotech Research, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** *Bacillus subtilis* inhibiting cucumber wither pathogen was screened from soil. After fermenting, 15 kD antagonistic protein named L37 was got through DEAE-fibrin, Sephadex G-100 chromatography, which proved purified completely through SDS-PAGE. It was probably a new type of antagonistic protein against pathogen by the sequence on the amino N-terminal testing, which could make the normal hypha of pathogen distort, split and inhibit. The control effect could reach 90% against cucumber wither pathogen and improved the yield in field controlling test by fermenting products.

**Key words:** Cucumber; Cucumber wither; *Bacillus subtilis*; Antagonistic protein; Controlling

## 1 目的、材料与方法

镰刀菌 (*Fusarium* sp.) 是许多植物的重要病原菌。以该菌引起的黄瓜枯萎病为例, 一般年份发病率为 20%, 严重时可达 80% ~ 90%, 引起严重减产<sup>[1]</sup>。黄瓜枯萎病生物防治始于 20 世纪 80 年代, 已有应用非致病尖孢镰刀菌、*Paenibacillus* sp.、*Streptomyces* sp.、假单胞菌对其进行防治研究的报道<sup>[2-4]</sup>。本研究对芽孢杆菌产生的镰刀菌抑制蛋白质进行分离、拮抗性检测以及抑制机理的探讨, 应用其发酵生物学特性, 进行黄瓜枯萎病防治。

应用筛选到的 L37 拮抗菌株进行发酵和活性蛋白质的提取, 在发酵滤液中加入 80% 饱和硫酸铵进行蛋白质沉淀, 并进行透析、浓缩, 制得粗提蛋白液, 每处理重复 3 次。应用 DEAE-纤维素柱层析、Sephadex G-100 柱层析对菌株产生的蛋白质进行分步纯化, SDS-PAGE 电泳检测抑菌蛋白的纯度, 并进行电泳回收和蛋白质 N-末端氨基酸序列测定<sup>[5]</sup>。以筛选的拮抗菌株 A54、Y11 为对照, 采用平板打孔法, 28 °C 下培养, 测定各菌株蛋白质的抑菌效果<sup>[6]</sup>, 并检测其对温度、酸碱度、有机溶剂、蛋白酶的敏感性。采取病原菌丝受抑制的部位, 置于普通光学显微镜和扫描电镜下观察其致畸的细胞

收稿日期: 2005 - 03 - 21; 修回日期: 2005 - 05 - 16

基金项目: 国家 '863' 项目 (2002AA212151); 四川 '十五' 科技攻关项目

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: liping@cngk.com)

学效果<sup>[7]</sup>。根据菌株发酵生物学特性,分别进行发酵培养,收集上清液,稀释 500 倍,于大田黄瓜植株开花期开始喷施,间隔 7 d 再喷施,连喷施 3 次。统计 1 茬、2 茬、3 茬黄瓜发病率、结实数、结实率和产量。每个处理 3 个小区 (333 m<sup>2</sup>/区)。统计两年试验结果,采用 MSTATC 软件进行多重比较分析。

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 拮抗蛋白的纯化

2.1.1 DEAE-纤维素柱层析 粗提蛋白液经 DEAE-纤维素柱层析后出现 3 个蛋白峰。第 1 个峰值较小,蛋白质的含量较少,经过浓缩检测,不具拮抗活性。第 2 个峰值较高,蛋白质含量高,但没有拮抗活性。第 3 个峰值较低,蛋白质含量不高,但具有活性。

2.1.2 Sephadex G-100 柱层析 将经 DEAE-纤维素柱层析中的第 3 活性峰的层析液收集、浓缩,上 Sephadex G-100 层析柱洗脱后出现 3 个峰。其中,第 1 个峰值较低,蛋白质含量少,不具有拮抗活性;第 2 个峰值较高,蛋白质含量高,同时具有拮抗活性,是拮抗作用的主要蛋白峰;第 3 个峰也较高,但不具有活性 (图 1)。第 2 峰经过再次上样,获得比较单一的洗脱峰,具有很强抑制活性。

2.1.3 SDS-PAGE 和氨基酸测序 L37 菌株的纯化蛋白质样品经 SDS-PAGE 电泳,在电泳中呈现单带 15 kD,达到电泳纯。经 SDS-PAGE 后进行电转和序列测定,结果显示 N-末端序列为 GF-PQND,经过 NCB I 蛋白质 N-末端数据库的搜索,未发现与之同源的蛋白质,提示此蛋白质可能为一新型 N-末端的抑菌蛋白。

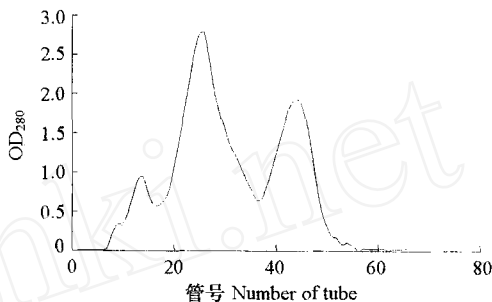


图 1 Sephadex G-100 洗脱曲线

Fig 1 Washing-down curves of Sephadex G-100 chromatography

### 2.2 功能蛋白活性的测定

用硫酸铵沉淀法获得粗蛋白,经过初步纯化的蛋白质进行活性检测,对指示菌水稻纹枯病病原菌具有很强的抑制效果。经平板抑菌谱测定 L37 菌株产生的蛋白质对黄瓜枯萎病、小麦赤霉病病原菌的抑制效果最好,表明该蛋白质具有比较广的抑菌谱。

### 2.3 拮抗蛋白对黄瓜枯萎病病原菌菌丝的致畸效果

试验结果显示,用无菌水处理的对照菌丝生长正常、均匀、有分枝 (图 2)。用拮抗蛋白液进行拮抗的病原菌菌丝生长受到严重抑制,停止生长,菌丝体严重扭曲,有断裂现象,中部和端部的细胞开始明显膨胀呈球形,且球状细胞壁皱缩、干瘪,这可能是内含物外泄后所致,出现空壳现象 (图 2)。由此,可以推断此拮抗蛋白主要是通过对菌丝的这些抑制作用而导致其生长停滞直至死亡。

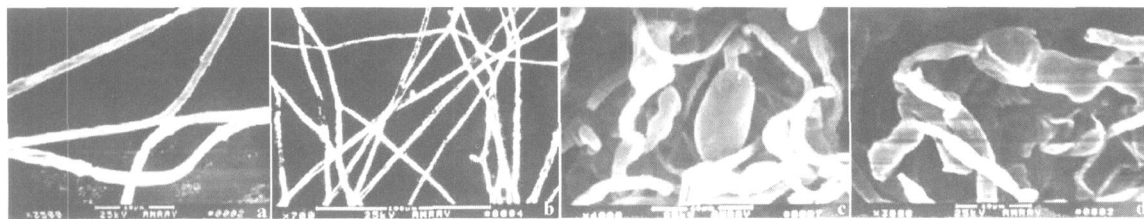


图 2 黄瓜枯萎病病原菌的正常菌丝 (a, b) 与受抑制的菌丝 (c, d)

Fig 2 Normal hyphae of *Fusarium oxysporum* (a, b) and malformation of hyphae of *Fusarium oxysporum* (c, d)

### 2.4 拮抗蛋白的理化性质

拮抗蛋白在 pH 6~8 时活性最大,随着 pH 减小,拮抗活性下降。在碱性条件下拮抗活性变化不明显。表明拮抗蛋白对酸敏感,对碱不敏感。用蛋白酶 K 和胰蛋白酶在正常酶反应条件下,以及用

常用有机溶剂处理，拮抗蛋白仍保持原有的活性。由此表明，该蛋白质是一类比较稳定的抑菌蛋白，具有在生产上应用的潜在前景。

2.5 发酵产物对田间黄瓜枯萎病的防治效果

两年的试验结果表明，L37发酵液对3茬黄瓜的结实数没有影响，均与对照差异不明显，但发病率均远远低于对照，防效最高可达到90%（表1），2茬、3茬黄瓜的产量均显著高于对照。从防效特征上可以看出L37与农用抗生素（S-26）的差别，抑菌蛋白在2茬表现为较强的防效，3茬防治效果减弱，说明了蛋白质类防治的瞬时性，速度比较快，但持续性较弱的特点。而抗生素类物质十分稳定，且具有部分累积的特点，S-26在防治特点上表现出逐渐增加的趋势。所以在生产应用中，要考虑不同有效物质的特点来确定喷施次数、喷施浓度，才能有效进行黄瓜枯萎病的防治。

表 1 发酵液对黄瓜枯萎病的田间防治  
Table 1 Controlling on cucumber wither away from the disease of fermentation products

处理 Treatment	年 Year	1茬 The first stubble				2茬 The second stubble				3茬 The third stubble			
		结实数 Number of fruit (Num. /plant)	结实质 量 Mass (g)	发病率 Rate of disease (%)	防效 Contro- lling effect (%)	结实数 Number of fruit (Num. /plant)	结实质 量 Mass (g)	发病率 Rate of disease (%)	防效 Contro- lling effect (%)	结实数 Number of fruit (Num. /plant)	结实质 量 Mass (g)	发病率 Rate of disease (%)	防效 Contro- lling effect (%)
L37抑菌肽发酵液	2003	1.45a	40 500a	19.11a	85.20a	0.76a	20 500a	9.60a	90a	0.76a	20 500a	9.60a	90.00a
Fermentation of L37	2004	1.55a	50 029a	17.30a	87.31a	1.50a	24 101a	10.00a	89.2a	0.91a	20 145a	15.00a	82.50a
S-26发酵液	2003	1.39a	25 500b	22.16b	78.00b	1.02b	12 000b	32.10b	68.5b	1.24b	7 000b	10.30b	90.00b
Fermentation of S-26	2004	1.52a	30 700b	25.00b	79.40b	1.31a	13 048b	21.00b	72.3b	1.05a	14 100b	12.10a	87.90b
对照 Control	2003	1.49a	40 400a	60.25c	-	0.91a	9 000c	87.10c	-	0.77a	9 000c	63.40c	-
	2004	1.50a	48 516a	70.15c	-	1.44a	11 915c	85.50c	-	0.87a	10 500c	61.45b	-

参考文献：

1 王拱辰，叶琪铭. 镰刀菌在生物防治中的作用. 中国生物防治，1990，6（2）：80~84  
Wang G C, Ye Q M. Funtion of *Fusarium* in biological control Chinese Journal of Biological Control, 1990, 6（2）：80~84（in Chinese）

2 Paulitz T C, Park C S, Baker R. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. Can J. Microbiol, 1987, 33（1）：349~353

3 Mandeel Q, Baker R. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. Phytopathology, 1991, 81（5）：462~469

4 Yang S S, Kim C H. Studies on cross protection of *Fusarium* wilt of cucumber IV. Protective effect by nonpathogenic isolate of *Fusarium oxysporum* in a greenhouse and fields Plant Pathol, 1996, 12（4）：137~141

5 Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1110~1118

6 范 寰. 防治黄瓜枯萎病拮抗细菌的筛选. 天津轻工业学院学报，2000，22（3）：29~31  
Fan H. Screening of antagonitic bacteria controlling *Fusarium* wilt of cucumber Journal Tianjin Institute of Light Industry, 2000, 22（3）：29~31（in Chinese）

7 许煜泉，唐玮宁，郑有丽，钟仲贤，徐悌惟. 筛选假单胞菌株 M18防治大棚黄瓜枯萎病害. 上海交通大学学报，1999，33（50）：210~213  
Xu Y Q, Tang W N, Zheng Y L, Zhong Z X, Xu T W. Screening *Psudamonas* M18 and control of *Fusarium* wilt of cucumber Journal of Shanghai Jiaotong University, 1999, 33（50）：210~213（in Chinese）