

# 第二十五章 拮抗蛋白在植物病害防治中的应用前景

李德葆 朱伟光 陈卫良 陈雄凤  
徐平 葛起新

(浙江农业大学生物技术研究所 杭州 310029)

## 目次

- |                                |                 |
|--------------------------------|-----------------|
| 一、前言                           | 2. 温室盆栽试验       |
| 二、细菌素(拮抗蛋白)的研究历史、现状及其在病害防治中的应用 | 3. 拮抗蛋白的纯化分析    |
| 三、抗米白叶细菌蛋白研究                   | 4. 拮抗蛋白基因的克隆与表达 |
| 1. 拮抗菌株的筛选                     | 四、前景展望          |

## 一、前言

农作物由于各种病害而造成的产量损失可达30—40%。有些化学农药虽能快速有效地达到防治病害的目的,但同时带来了残留、污染、抗药性等一系列问题,不但影响了人类的健康,而且威胁着整个生态系统。对于某些病害尚缺乏有效的农药,生物防治研究因而日益受到重视,70年代尤为活跃。利用自然存在的拮抗细菌抑制植物病害是生物防治的主要手段,在防治植物根部、叶面病害中取得了许多进展。由于利用拮抗细菌进行生物防治的效果容易受到环境因子的影响,不但在生产实际中局限了其应用效果和范围,而且影响了人们对其价值的认识。另一方面,它向研究工作者提出了一个迫切的课题:如何更合理有效地利用这类拮抗菌?我们注意到许多拮抗细菌可产生蛋白质类拮抗物,利用基因工程方法或许可以更有效地利用这类拮抗蛋白,从而开辟生物防治的新途径。

## 二、细菌素(拮抗蛋白)的研究历史、现状及其在病害防治中的应用

细菌素是一类由细菌产生的非增殖性蛋白质,可以抑制同种内不同株系或近缘种细菌的生长。1925年 A. Gratia<sup>[1]</sup>首先在 *E. coli* 中发现了这类物质,1946年定名为 colicin (大肠菌素)。1953年, F. Jacob 等<sup>[2]</sup>用 Bacteriocin (细菌素) 来表示这一类拮抗蛋白。

• 本课题先后得到农业部、国家科委863和美国洛氏基金会资助。

目前已从30多个属近200种细菌中发现了细菌素,其中包括5个属30种左右的植物病原细菌。细菌素的拮抗范围已不局限于同种内的不同株系和近缘种,特别是革兰氏阳性细菌可抑制其它属细菌,这在生产实际中有很大的应用潜力。自1948年来 P. Fredericq<sup>[19]</sup>, G. Ivanovics<sup>[20]</sup>, P. Reeves<sup>[29,30]</sup>, D. E. Bradely<sup>[6]</sup>, J. R. Tagg<sup>[35]</sup>, J. Konisky<sup>[34]</sup>等从不同角度对细菌素进行了论述。D. E. Bradely<sup>[6]</sup>将细菌素分为两大类。第一类:低分子量,对热稳定,对胰蛋白酶敏感。第二类:高分子量,对热敏感,对胰蛋白酶稳定,电镜下可见其结构,又称作缺陷噬菌体。

研究认为,细菌素的作用需要敏感菌表面合适的受体,作用机理有如下四种:①影响细胞膜结构的稳定性,②抑制细胞内蛋白质合成,③抑制或破坏核酸合成,④作为酶激诱导因子,激诱导状态酶,导致细胞自溶。除少数细菌外,大多数细菌素由质粒编码。P. Fredericq 等首先在 *E. coli* K30 上证明质粒 E1-K30 编码 colicin E<sub>1</sub> 合成。现已证实许多 colicin 是由质粒编码。A. P. Pugsly<sup>[28]</sup>, San Millen 等<sup>[11]</sup>, Hernandez Chico 等<sup>[12]</sup>, H. J. J. Nijkamp 等<sup>[26]</sup>已有许多详细的研究报道。目前在8个属以上的细菌中证实质粒编码细菌素。

Y. Hamon<sup>[15,16]</sup>, E. Echandi<sup>[9]</sup>, A. K. Vidaver<sup>[36,39]</sup>等在植物病原细菌的产细菌素特性方面进行了开创性研究。A. Kerr<sup>[22,23]</sup>在澳大利亚首先用产素菌株 *Agrobacterium radiobacter* K84 浸根或浸种处理可降低桃瘤肿99%。L. W. Moore<sup>[25]</sup>在美国同样获得了成功。E. Echandi<sup>[9]</sup>用 *Corynebacterium michiganense* 的产细菌素无奇菌株防治番茄溃疡病获得了成功。J. K. Imler 等<sup>[37]</sup>用 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 4-A 产生拮抗蛋白 Syringacin 4-A 粗提液喷雾菜豆叶面,可防止 *P. phaseolicola* 侵染,浸种大豆可使其免受 *P. glycinea* 为害并促进种子萌发。W. Y. Chen 等<sup>[7]</sup>发现 *P. solanacearum* 的产素无奇株系可有效地控制烟草青枯病的发生。尽管这些产素细菌已有一定的应用价值,但效果易受时空影响,因此只有在利用方式上加以改进,才能充分发挥它们的作用。鉴于前人的经验,1986年起我们就利用产拮抗蛋白(细菌素)的拮抗细菌防治水稻白叶枯病开展了一系列研究。

### 三、抗水稻白叶枯病菌蛋白研究

水稻白叶枯病是一种重要的细菌性病害,在全世界各水稻栽培区普遍发生,每年因此减收10--20%,严重时颗粒无收。由于病原菌经伤口侵入,此病在旱风雨时易造成流行,客观上给农药防治带来困难,同时生产上又缺少真正的抗病良种和有效的农药,因此,探索防治白叶枯病有效途径具有生产上的必要性和迫切性。我们试图从自然界中筛选白叶枯病菌的高效拮抗细菌,分离纯化其产生的拮抗蛋白,克隆表达其拮抗蛋白基因,并将其转移到水稻植株体内以获得对白叶枯病有稳定抗性的转基因植株,解决生产实际问题,并希求藉此从理论上探讨本技术线路在防治植物细菌性病害中的可行性,因此具有一定的理论意义。以下简单介绍一下几年来的工作结果。

#### 1. 拮抗菌株的筛选

来自大气、根围及叶面的700多个细菌分离物中筛选得到130多个拮抗菌株,有些

菌株除了对白叶枯病菌有很强的拮抗作用外,还能抑制茄科青枯病菌、白菜软腐病菌等重要病原细菌,如:*Bacillus cereus* G35<sup>[1]</sup>,*B. subtilis* P11<sup>[2]</sup>,B826<sup>[3]</sup>,*Enterobacter cloacae* B8<sup>[4]</sup>,有些菌株则尚可抑制水稻稻瘟病菌、水稻纹枯病菌,如:A30、B20。部分菌株对白叶枯病菌不同菌株的拮抗作用如表25.1所示。

表25.1 4种拮抗菌对白叶枯病菌不同菌株的拮抗作用

指示菌 拮抗菌	CQX1	COX2	COX3	COX4	COX5	COX6	X26	X61	CNX17	CNX18
B8	3.4	1.0	3.0	4.0	3.2	3.7	3.5	3.4	3.5	3.4
B826	3.0	3.5	3.0	3.5	2.9	3.0	3.0	2.8	2.5	3.0
P11	2.8	2.5	3.0	3.0	2.8	2.8	3.0	2.7	2.4	2.7
G35	1.3	1.5	1.5	2.2	1.9	1.5	2.2	1.4	1.0	1.2

B8: *Enterobacter cloacae*; P11: B826: *Bacillus subtilis*,

G35: *B. cereus*.

指示菌: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

表中数字为抑菌半径 (cm)。

## 2. 温室盆栽试验

在水稻分蘖期向其叶面喷雾 B826, B8菌液, 然后剪叶接种白叶枯病菌 (CNX18), 结果表明, 它们均可在一定程度上抑制白叶枯病菌的扩展, 防效在10—39%, P11、G35亦有类似结果。用 Tn5 (Km<sup>r</sup>) 标记对利福平 (Raf<sup>r</sup>) 有抗性的 B8菌株<sup>[4]</sup>, 用此具双抗性标记的 B8菌株喷雾水稻, 观察其在叶面的定殖情况。结果表明, B8菌株能在叶面定殖。

## 3. 拮抗蛋白的纯化分析

利用 DEAE-52柱层析和 HPLC 法从 P11、B826、G35、A30等菌株中纯化得到了拮抗蛋白, 1—2μg 的拮抗蛋白即可在平皿拮抗试验中有效地抑制白叶枯病菌的生长。P11-I、P11-II, B826-I、B826-II 在 SDS-PAGE 中均为一条带, 表明无异源亚基, 分子量分别为 11kD、10—12kD、37kD、6—8kD, 部分拮抗蛋白对各种蛋白酶及温度处理的反应如表25.2所示。

表25.2 三种拮抗蛋白对蛋白酶及温度处理的敏感性

	蛋白酶 K	蛋白酶 E	胰蛋白酶	60℃/30分	80℃/30分	100℃/15分	酚
P11-I	+	+	±	-	-	-	+
P11-II	+	+	+	-	-	-	+
B826-I	+	+	±	-	-	-	+

+: 敏感; ±: 部分敏感; -: 不敏感。

经测定: P11-I、P11-II 和 B826-II 三种蛋白无碱性蛋白酶和淀粉酶活性。分别得

到了 P11-1、P11-Ⅱ 二种蛋白的氨基酸组成(见表25.3),二蛋白的氨基酸组成差异不大,有黑线处表示各自特有的氨基酸。

表25.3 P11-1, P11-Ⅱ 两拮抗蛋白的氨基酸组分分析

P11-1,

Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Val
11.90	4.76	7.14	9.52	4.76	11.90	7.14
Ile	Leu	Tyr	Phe	Trp	Arg	
4.76	2.38	11.90	7.14	9.25	7.14	

P11-Ⅱ,

Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala
8.82	2.94	4.41	4.41	8.82	22.05	16.18
Cys	Val	Ile	Leu	Lys	Trp	Arg
2.94	2.94	7.35	8.82	4.41	4.41	1.47

从 G35菌株中纯化得到一拮抗小肽(~3kD),该小肽经蛋白酶(Trypsin-TPCK)处理后得到许多小片段,分析得到了其中3个片段的氨基酸序列(表25.4)(与北大陈章良教授合作)。

表25.4 G35拮抗小肽三个片段的氨基酸序列

1. Tyr-Trp-Ala-Asn-Lys
2. Ile-Leu-Gly-Trp-Ile-Ser-Tyr-Ser Asn-Lys
3. Ser-Ile-Val-His-Pro-Arg

同时还得到了来自 A30菌株的一个蛋白的部分氨基酸序列 (Met-Tyr Met Ile Lys-Trp-Met-Arg-Thr)。

#### 4. 拮抗蛋白基因的克隆与表达

利用  $\lambda$ ZAP Ⅱ, 构建了 P11、B826、A30菌株的基因库, 分别用各拮抗蛋白的单克隆抗体筛选重组克隆, 每一阳性克隆经小量培养, IPTG 诱导产生融合蛋白后测定其活性。B826、A30二菌株的重组克隆产生的融合蛋白有很好的抑菌活性。其中 B826菌株重组子的插入片段能在表达载体 pKK233-2中表达出具有抑菌活性的蛋白质, 经 Western 反应检测, 证实表达蛋白与 B826-1 分子量相近(~37kD), 分析了该片段的限制性酶谱, 并测得了部分核苷酸序列。

#### 四、前景展望

如何经济有效安全合理地将植物病害控制在允许水平以下,一直是各国科学家研究的课题,开展利用拮抗细菌及其拮抗蛋白,结合基因工程技术防治重要病害的研究,可望是解决这一问题的有效途径,这已经为许多人所认识。

从我们得到结果来看,*Bacillus* 属的菌体在拮抗细菌中占了很大比例,它们在自然界是以腐生菌的方式存在的,因此具有很大的安全性。在该属细菌中,拮抗蛋白的研究主要集中在来自 *B. megaterium* 的 Megacins (Ivanovics 等<sup>[19]</sup>、Holland 等<sup>[18]</sup>、Ozaki 等<sup>[27]</sup>) 和来自 *B. stearotheophilus* 的 Thermocins (Shafia<sup>[32]</sup>、Yule 等<sup>[42]</sup>; Sharp 等<sup>[33]</sup>; von Tersch 等<sup>[10,11]</sup>, Stahl<sup>[34]</sup>), 有关 *B. subtilis* 的拮抗蛋白研究不多,利用具有这种性质的 *B. subtilis* 防治植物病害则更少。因此,开展这方面研究同时具有理论上的必要性。研究发现, *B. subtilis* B826、P11 等除产生蛋白外,还可产生多种拮抗物,这在直接应用菌体防治病害中可能比较有利。另外,得到的拮抗蛋白活性很强,1—2 $\mu$ g 就能在平皿抑菌试验中有效地抑制病原菌的生长,这一特性在以后转基因植株研究中无疑是很有价值的。

R. C. Gueldner<sup>[14]</sup>报道,从 *B. subtilis* 中提取的抗真菌小肽 Iturins 可抑制果树褐斑病 (*Monilinia fructicola*) 的生长, *B. subtilis* 作为一种拮抗菌,主要用于防治水果的产后病害 C. S. Anuratha<sup>[13]</sup>报道,用 *P. fluorescens* 细菌伴水稻种子,可使水稻前期白叶枯病发病严重度下降 10—60%。结合我们的研究结果,可以认为利用拮抗菌及其拮抗蛋白是病害防治的一种方法。

一般而言,在叶面生态环境中,温度、湿度变化剧烈,营养缺乏,强烈的紫外辐射及雨水的冲洗对拮抗菌在叶表的定殖和繁殖是极为不利的,这是拮抗菌防治叶面病害效果低于防治根部病害的主要原因之一。通过双标记 B8 菌株进行的该菌在水稻叶面定殖、繁殖、抗病效果的温室盆栽研究,我们认为直接喷施 B8 菌株防治白叶枯病应用于大田生产是值得进一步研究的,而且 B8 菌株本身就是从水稻叶面分离下来的。

纵观前人和目前的工作结果,我们提出防治水稻白叶枯病的几条可能途径:①选用合适的拮抗菌直接在大田施用;②分离合适的拮抗物,以一定的方式直接用于大田;③克隆拮抗蛋白基因,将此基因转移到水稻叶面的优势定殖菌或能在水稻叶面上定殖、繁殖的细菌中,以抑制病原细菌的侵入,或将此基因转移到水稻植株中,获得转基因的抗病品种,从而减少或杜绝白叶枯病的发生。其中将拮抗基因转移到水稻中以获得抗性品种无疑是更有效地利用拮抗蛋白并发挥其作用的途径。由于这方面尚无成功的先例,因而在理论上具有一定的探索性,其中会遇到许多问题。例如:①拮抗蛋白在植株体内的杀菌活性,②拮抗蛋白表达部位与细菌繁殖扩展部位的吻合程度,③拮抗蛋白表达时间,④毒性问题等等。有待于在以后的工作中不断解决。可以相信随着基因工程技术的不断发展,拮抗菌及其拮抗蛋白在植物病害防治中将会发挥越来越大的作用,同时可根据病害的特点,选择最合适的方法。

#### 参考文献

田集伟光等,浙江农业大学学报,16 (1990), 345—350.

- [2] 刘晓光等, 中国农业生物技术, 1989, 118—125.
- [3] 陈卫良等, 浙江农业大学学报, 16 (增刊2 1990), 61—67.
- [4] 徐平等, 浙江农业大学学报, 18 (1992) 115—119.
- [5] Anuratha, C. S., *International Rice Res. Newsletter*, 12 (1987), 176.
- [6] Bradely, D. E., *Bact. Rev.*, 31 (1967), 230—314.
- [7] Chen, W. Y. et al., *Phytopathol.*, 72 (1982), 310—313.
- [8] Echandi, E., (Abstr) Ann. Meeting Am. Phytopathol. Soc. Aug. 10—14, 1975, No. 154.
- [9] Echandi, E., *Phytopathol.*, 66 (1976), 430—432.
- [10] Fredericq, P., *Rev. Belge Pathol. Med. Exp.*, 19 (suppl 4, 1948), 1—107.
- [11] Fredericq, P. and Betz-Bareau, C. R. *Seanc. Soc. Biol.*, 147 (1953), 1653—1656.
- [12] Gratia, A., *C. R. Seanc. Soc. Biol.*, 93 (1925), 1040—1041.
- [13] Gratia, A. and Fredericq, P., *C. R. Seanc. Soc. Biol.*, 140 (1946), 1032—1033.
- [14] Gueldner, R. C., *J. Agric. and Food Chem.*, 36 (1988), 366—370.
- [15] Hamon, Y. and Peron, Y., *C. R. Acad. Sci.*, 253 (1961), 913—915.
- [16] Hamon, Y. and Peron, Y., *C. R. Acad. Sci.*, 254 (1962), 2868—2870.
- [17] Hernandez-Chico, C. et al., *J. Bacteriol.*, 167 (1986), 1056—1058.
- [18] Holland, I. B. and Roberts, C. F., *J. Gen. Microbiol.*, 35 (1961), 271—285.
- [19] Ivanovics, G. and Alfoldi, L., *Nature (London)*, 174 (1954), 465.
- [20] Ivanovics, G., *Bact. Rev.*, 26 (1962), 108—118.
- [21] Jacob, F. et al., *Annls. Inst. Pasteur Paris*, 84 (1953), 222—224.
- [22] Kerr, A., *J. Appl. Bacteriol.*, 35 (1972), 493—497.
- [23] Kerr, A. and Htay, K., *Plant Pathol.*, 4 (1974), 37—44.
- [24] Konisky, J., *Ann. Rev. Microbiol.*, 36 (1982), 125—144.
- [25] Moore, L. W. and Warren, G., *Ann. Rev. Phytopathol.*, 17 (1979), 163—179.
- [26] Nijkamp, H. T. et al., *Plasmids*, 16 (1986), 135—160.
- [27] Ozaki, M. et al., *Biken, J.*, 19 (1966), 201—213.
- [28] Pugsly, A. P., *J. Bacteriol.*, 158 (1984), 523—529.
- [29] Reeves, P. R., *Bact. Rev.*, 29 (1965), 24—45.
- [30] Reeves, P. R., *The Bacteriocin Molecular biology, biochemistry and Biophysics*, VII Springer Verlag, New York, 1972.
- [31] San Millen, J. L. et al., *J. Bacteriol.*, 163 (1985), 275—281.
- [32] Shafia, F., *J. Bacteriol.*, 92 (1966), 524—525.
- [33] Sharp, R. J. et al., *J. Gen. Microbiol.*, 111 (1979), 449—451.
- [34] Stahl, S., *Arch. Microbiol.*, 151 (1989), 159—165.
- [35] Tagg, J. R., *Bact. Rev.*, 40 (1976), 722—756.
- [36] Vidaver, A. K. et al., *Can. J. Microbiol.*, 18 (1972), 705—713.
- [37] Vidaver, A. K., *Ann. Rev. Phytopathol.*, 14 (1976), 451—465.
- [38] Vidaver, A. K. and Bucknen, S., *Can. J. Microbiol.*, 24 (1978), 14—18.
- [39] Vidaver, A. K., *Plant Dis.*, 67 (1983), 471—475.
- [40] von Tersch, M. A. and Carlton, B. C., *J. Bacteriol.*, 155 (1983), 866—871.
- [41] von Tersch, M. A. and Carlton, B. C., *J. Bacteriol.*, 160 (1984), 854—859.
- [42] Yule, R. and Bridge, B. D., *Can. J. Microbiol.*, 22 (1976), 1743—1750.