

较为接近。在抗菌谱方面, SR-7 除产生亲本产生的抗生素外, 还产生一种亲本不产生的广谱的抗细菌活性物质; SR-T19 与亲本 FR-008 的抗菌谱完全一致, 但其活性强度都明显超过了 FR-008。SR-7 和 SR-T19 及亲本 90-11 和 FR-008 的 37 °C 半固体发酵产物在紫外可见光谱上均可检测到一个相似的末端吸收峰, 而在 28 °C 的发酵物中, 2 个融合子也均能检测到和亲本 RF-008 相似的典型七烯大环内酯吸收峰。这些基本特性均表明融合子 SR-7 和 SR-T19 确系亲本 90-11 和 FR-008 的融合后代。

5 酯酶同工酶和菌体可溶性蛋白 SDS-PAGE 鉴定表明, 融合子 SR-7 和 SR-T19 酯酶同工酶谱上的主要酶带和次要酶带均表现为介于双亲的中间型而又彼此不同; 菌体可溶性蛋白的 SDS-PAGE 图谱也与双亲具有总体上的相似性, 但可分辨的谱带数目和强度都超过了双亲, 同时相互之间又有明显的差异, 显示 2 个融合子均是双亲重组的后代。

6 RAPD 分子标记鉴定表明: 融合子 SR-7 和 SR-T19 的扩增产物中, 与双亲对应的带占 92.31% 和 95.83%, 新生带占 7.69% 和 4.17%, SR-7 和 SR-T19 与亲本 90-11 的遗传距离分别为 0.8329 和 0.5207, 与亲本 FR-008 的遗传距离分别为 0.3814 和 0.2068。从 DNA 分子水平上证实 2 个融合子均是双亲遗传重组的后代, 并较多的继承了亲本之一 FR-008 的特征。

7 防病效果测定表明, 融合子 SR-7 的 37 °C 的发酵产物对棉花立枯病菌在多种植物离体叶片上诱发的腐烂性叶斑病及棉花苗期立枯病具有良好的防治效果, 二者结果一致。同时也表明离体叶片法是早期检测防病效果的一种良好方法。

8 利用融合子 SR-7 的 28 °C 发酵产物浸泡处理萝卜块和大白菜叶片, 获得了良好的防腐效果, 表明 SR-7 用于抗细菌农用抗生素的开发利用可能具有一定的潜力。

9 初步确定融合子 SR-7 抗细菌活性物质产生的适宜条件为采用 5102-1 号培养基, 培养温度 28 °C, 发酵周期 96 h。

10 热稳定性、酸碱稳定性试验及纸层析和纸电泳结果表明, 融合子 SR-7 产生的抗细菌活性物质是一种对热及酸碱较为稳定的强碱性水溶性化合物。

11 将发酵液经草酸酸化处理、活性炭脱色和 732 树脂预处理后, 用 724 树脂吸附, 7% 硫酸解吸, 对 SR-7 抗细菌活性物质进行了初步的分离, 最后通过 717 树脂柱层析获得了精制品。

12 精制品具有广谱的抗 G⁺、G⁻ 细菌活性, 但对各种真菌和酵母菌无活性。

13 精制品与茚三酮、萘酚和 α -萘酚试剂均有呈色反应, 紫外光谱为末端吸收, 表明融合子 SR-7 产生的抗细菌活性物质很可能为一种氨基糖苷类抗生素。

[97- 3]

棉花 PGPR 菌株的分离、筛选、鉴定、 作用机制及其分子生态学研究

STUDIES ON ISOLATION, SELECTION, IDENTIFICATION, MECHANISMS AND
MOLECULAR ECOLOGY OF THE PGPR STRAINS IN COTTON

王春霞 (华中农业大学, 武汉 430070)

Wang Chunxia (Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

(导师: 周 启教授 王道本教授)

(Advisors: Prof. Zhou Qi Prof. Wang Daoben)

本文系统地对棉花 PGPR 菌株的研究。主要包括菌株的分离、筛选、菌种鉴定; 首次用 *gusA* 基因和 *luxAB* 基因导入棉花 PGPR 菌株, 并研究它们在棉苗根际中的分子生态学; 选用代表菌株研究它们对棉苗的防

病促生作用机制; 并发现 PGPR 菌株 CS85 能够诱导棉苗产生抗性, 进一步探讨诱导抗性后的棉苗体内防御酶系统的变化等。现将结果摘要报告如下:

1 从河南、湖北、山东 3 省 14 个地区多年种植棉花的棉田采集棉花根际土样 30 份, 通过盆栽播种棉花并从其根际中分离出 210 株根际细菌纯培养物。

经过一系列室内离体生物测定, 从中选出 87 个重点菌, 进一步测定这些菌株对棉籽发芽率的影响和通过盆栽试验逐步淘汰影响棉籽发芽、抑制棉苗生长或苗病严重的菌株, 最后筛选出 6 株对棉苗具有良好防病促生作用的菌株, 分别定名为 CS85、ZR、PF2、ZS1、S14 和 18。进一步的温室盆栽结果表明: 这 6 个菌株对由棉花苗期主要病原菌(分别是棉花立枯病菌、炭疽病菌和枯萎病、黄萎病菌)引起的棉苗病害均具有一定的防治效果。另外, 还在河南及湖北两地棉田对这 6 个菌株的大田效果进行了初步验证, 结果证明这 6 个菌株均对棉苗表现出一定的促生作用, 对苗期病害的防效可达 43.0%~66.7%。

2 根据这 6 个菌株的形态、培养特征、生理生化特性以及 DNA 中 G+C 摩尔百分比的测定等指标, 将这 6 个菌株初步鉴定为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*, CS85); 恶臭假单胞菌(*P. putida*, ZR); 野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*, ZS1); 蜡质芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, S14); 枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*, 18); 其中 PF2 比较特殊, 暂定为假单胞菌 PF2(*Pseudomonas* sp. PF2)。

3 采用细菌杂交的方法分别成功地用 *gusA* 基因标记 CS85 菌株, 用 *luxAB* 基因标记 CS85 和 ZR 2 个菌株。同亲本菌株相比, 标记菌株 CS85*gusA*、CS85*luxAB* 和 ZR *luxAB* 的特性如拮抗性, 防病促生效果等基本不变。Southern 杂交证明, 导入的外源基因位于标记菌株染色体 DNA 上, 经过连续传代、保藏以及在土壤中回收等, 均证明标记基因在菌体中是非常稳定的。

通过标记菌株在水生菜及不同类型土壤中棉苗根部定殖的原位检测发现, 标记菌株接种棉籽后是定殖在棉苗整个根表上的; 消长动态结果还表明: 标记菌株在棉苗根表的定殖数量在前期均有一个上升过程, 随后逐渐下降, 至出苗后一个月左右, 在棉苗根表上仍能保持一定菌量。

4 6 株 PGPR 菌株对 4 种棉花病原真菌的平板拮抗作用差异很大, 但当它们与立枯病菌在液体培养基中混合培养时, 均对病原真菌菌丝的生长具有很强的抑制作用。选择其中对 4 株病原真菌均无拮抗活性, 并能产生荧光色素的 2 株假单胞菌 CS85 和 ZR 进行深入研究表明: 它们只有在限铁条件下才能产生荧光色素或称嗜铁素, 其紫外吸收峰和已报道的嗜铁素一样均位于 400 nm 处。

通过平板测定化学螯合剂 EDTA、金属离子(Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+})以及 EDTA 和金属离子复合等处理对病原真菌生长的影响发现, EDTA 可以抑制菌丝生长而呈畸形菌落, 而金属离子除 Fe^{3+} 对立枯病菌生长有良好的作用外, 其它均无影响, 但当 EDTA 与金属离子分别复合后, 发现所有测定的金属离子均能解除 EDTA 对炭疽病菌和黄萎病菌的毒害, 而对立枯病菌和枯萎病菌的毒害只有 Mn^{2+} 才能解除。离体叶片试验表明, 由 EDTA 引起的畸形菌落基本丧失了致病能力。

采用平板测定法、混合培养法以及离体叶片的感染试验证明, 菌株 CS85 和 ZR 产生的嗜铁素既不象化学螯合剂 EDTA 那样对病原真菌产生毒害, 也不具有保护叶片免遭病害侵染的能力。

上述研究表明: 菌株 CS85 和 ZR 对棉苗的防病促生机制既不是抗生素, 也不是嗜铁素, 主要是由于它们引起的竞争作用。

5 通过空间隔离的方法, 在离体和活体上分别接种棉花枯萎病菌、立枯病菌和炭疽病菌, 发现 CS85 处理棉籽后可以诱导棉苗对病原真菌产生系统抗性。

对棉苗细胞内苯丙氨酸解氨酶、过氧化物酶同功酶及超氧化物歧化酶等防御酶的电泳分析及活性测定表明: 诱导抗性的棉苗体内苯丙氨酸解氨酶活性明显增加; 过氧化物酶同功酶比对照增加了一条酶带, 这条新酶带主要来自叶片组织内; 而超氧化物歧化酶同功酶的活性则明显下降。表明这些酶活性的增加和下降与棉苗产生抗性有密切的相关性。