

枯草芽胞杆菌 MG-4 抑制小麦全蚀病菌物质及其性质分析

陈晓萌 王亚杰 李 佳 高同国 张冬冬* 朱宝成*

(河北农业大学生命科学学院, 保定 071000)

摘要: 为明确本实验室筛选并鉴定的枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 菌株 MG-4 分泌物对小麦全蚀病菌的抑制作用及其性质, 采用生长速率法检测了菌株 MG-4 发酵无菌上清液 (cell-free supernatant, CFS) 中抑菌物质的稳定性, 并通过 PCR 扩增抑菌物质合成相关基因, 利用基质辅助激光解吸飞行时间质谱鉴定抑菌物质结构。结果表明, 菌株 MG-4 分泌的抑菌物质在中性及酸性条件下稳定, 在 pH 2~7 时 CFS 相对活性为 98.8%~100.0%; 热稳定性强, 100℃ 处理 30 min 后相对活性仍为 88.5%; 利用胃蛋白酶和胰蛋白酶处理 120 min 后相对活性为 98.8%; CFS 中抑菌物质不能被氯仿、乙醚和乙酸乙酯萃取, 且对这 3 种有机溶剂不敏感; Na^+ 、 K^+ 、 CO_3^{2-} 和 I^- 对 CFS 活性无影响, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ 和 Mn^{2+} 显著抑制 CFS 活性。菌株 MG-4 基因组中含有 *srfAB*、*yndJ*、*bamC*、*fenD*、*ituC* 和 *ituD* 共 6 种抑菌物质合成基因; 将菌株 MG-4 分泌的抑菌物质鉴定为 C14~C15 伊枯草菌素 A、C14~C18 芬芥素 A 和 C14~C17 芬芥素 B。

关键词: 枯草芽胞杆菌; 抑菌物质; MALDI-TOF-MS; 伊枯草菌素 A; 芬芥素

Characterization of antifungal substances of *Bacillus subtilis* MG-4 against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* causing wheat take-all

Chen Xiaomeng Wang Yajie Li Jia Gao Tongguo Zhang Dongdong* Zhu Baocheng*

(College of Life Science, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei Province, China)

Abstract: To identify the properties of antifungal substances of biocontrol bacterium *Bacillus subtilis* MG-4, the stability of MG-4 culture cell-free supernatant (CFS) were detected through the growth rate method, the genes related to the synthesis of antifungal substances were amplified using PCR, and the composition of the antimicrobial substance was identified using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The results showed that the antifungal substance was stable in acidic and neutral environment and remained 98.8%–100.0% of the relative activity in pH 2–7. Meanwhile, MG-4 CFS was relatively thermally stable with 88.5% of the antifungal activity after heated at 100℃ for 30 min. The relative activity remained 98.8% when CFS treated with pepsin and trypsin for 120 min. The antifungal substance was not transferred to the organic solvent phase and the activity did not decrease after treated with organic extraction agents of ether, ethyl acetate and chloroform. The activity of the antifungal substance was not significantly affected by Na^+ , K^+ , CO_3^{2-} , and I^- but significantly inhibited by Mg^{2+} , Ca^{2+} , NO_3^- , SO_4^{2-} , $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$, Mn^{2+} . The genome of MG-4 strain contain six kinds of antibiotic synthesis genes including *srfAB*, *yndJ*, *bamC*, *fenD*, *ituC* and *ituD*. The antifungal substances include C14–C15 iturin A, C14–C18 fengycin A and C14–C17 fengycin B.

基金项目: 河北省自然科学基金(C2014204027, C2015204031), 河北省科学技术研究与发展计划(11220313)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: zhangdongcumt@163.com, zhu2222@126.com

收稿日期: 2017-01-23

Key words: *Bacillus subtilis*; antifungal substance; MALDI-TOF-MS; iturin A; fengycin

小麦全蚀病又称小麦立枯病、黑脚病,由禾顶囊壳小麦变种 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* 感染引起,是一种分布广泛的土传病害,严重危害世界各小麦产区(刘冰等,2007;Keenan et al.,2015)。目前,对全蚀病抗性较好的小麦品种还未发现,也缺乏有效的化学防治方法(Huang et al.,2012;罗晶等,2013)。从目前大力提倡发展可持续农业来看,生物防治具有良好的发展前景,应用枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 控制植物土传病害日益受到关注(Yáñez-Mendizábal et al.,2012)。枯草芽胞杆菌具有分布广、繁殖速度快、环保安全、营养需求简单、分泌多种广谱抑菌物质且可产生抗逆耐热的芽孢等优点(Vater et al.,2002;张冬冬等,2012),还能够在植物微环境中有效定殖以防止病原体感染或诱导植物抗性(Guo et al.,2014;Wang et al.,2014)。Yang et al.(2015a)用枯草芽胞杆菌 YB-05 防治小麦全蚀病,效果优于化学农药;Liu et al.(2009)的田间试验表明,与接种病原菌的对照相比,枯草芽胞杆菌 E1R-j 可使小麦全蚀病的病情指数降低 55.3%。

枯草芽胞杆菌能产生多种脂肽类化合物(Falardeau et al.,2013;Liu et al.,2014)和非脂肽类化合物如抗菌蛋白(Hamdache et al.,2011;Wise et al.,2012)、挥发有机酸类(Gong et al.,2015)及聚酮类化合物(Yang et al.,2015b)等。目前研究比较详细的是低分子量(1.0~1.5 kD)的脂肽类化合物,已经分离出来的有表面活性素、伊枯草菌素和芬芥素(Moyne et al.,2004;Ramkumar et al.,2013;Torres et al.,2016)。这些脂肽类化合物对真菌性植物病原体有直接或间接的抑制作用,但是对植物本身并没有毒性(Stein,2005;Ongena & Jacques,2008)。Patel et al.(2011)和 Guo et al.(2014)报道,伊枯草菌素和芬芥素对真菌性植物病原体表现出强烈的抑制活性,而表面活性素主要对细菌起抑制作用(罗楚平等,2011;Zerrouh et al.,2011;Gordillo & Maldonado,2012)。

目前利用芽胞杆菌进行生物防治的研究较多,但利用其代谢产生的抑菌物质直接进行植物病害防治的研究报道较少。利用抑菌物质可以直接发挥其抑菌抗病作用,所受限制和影响因素较少(Zhang et al.,2017)。本研究以从小麦根际土壤筛选出的对小麦全蚀病菌有显著抑制活性的枯草芽胞杆菌菌株 MG-4 为材料,检测其发酵上清液中抑菌物质性质及合成抑菌物质相关基因,利用基质辅助激光解吸

飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)对抑菌物质进行鉴定,以期为直接利用抑菌物质防治植物病害和开发防治小麦全蚀病的新型生物农药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌种:枯草芽胞杆菌菌株 MG-4 由河北农业大学制药工程实验室分离并保存,小麦全蚀病菌菌株 BD-7 由河北农业大学植物保护学院植物病理实验室惠赠。

培养基:种子培养基:蛋白胨 10 g、葡萄糖 10 g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 ddH_2O 1 L, pH 7.2~7.4;营养琼脂(nutrient agar, NA)固体培养基:牛肉膏 5 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂 20 g、 ddH_2O 1 L, pH 7.2~7.4;营养肉汤(nutrient broth, NB)培养基:NA 固体培养基中不加琼脂;马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、 ddH_2O 1 L。

试剂:胃蛋白酶(1:10 000),美国 Sigma 公司;胰蛋白酶(1:250),美国 Amresco 公司;硫酸链霉素,深圳华药南方制药有限公司;琼脂糖,西班牙 Biowest 公司;DNA 聚合酶,北京康为世纪生物科技有限公司;PCR 引物,生工生物工程(上海)股份有限公司;色谱级甲醇,天津市科密欧化学试剂有限公司; α -氰基-4-羟基肉桂酸,美国 Sigma-Aldrich 公司;其余试剂均为国产分析纯。

仪器:ABI4700 基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪和 2720 PCR 扩增仪,美国 Applied Biosystems (ABI)公司;DYY-6C 型电泳仪,北京市六一仪器厂;RE-52 型旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 菌株 MG-4 无菌上清液抑菌活性检测

将-80℃保存的菌株 MG-4 接种到 NA 斜面培养基,37℃恒温培养过夜,将活化的菌株 MG-4 接种到 NB 培养基中,37℃振荡培养过夜,按照 10% 接种量将发酵液接种到种子培养基中,37℃振荡培养 48 h,发酵液以 8 000 r/min 离心 10 min,回收上清液,0.22 μm 微孔滤膜过滤,回收滤液即为无菌上清液(cell-free supernatant, CFS)。用生长速率法检测 CFS 对小麦全蚀病菌的抑制活性(Zhao et al.,2010)。分别将 3、

5、10、15 mL MG-4 菌株 CFS 与 100 mL PDA 培养基混合,倒平板待凝固后将直径 7 mm 的 BD-7 菌片置于平板中央,28℃培养 7 d 后采用十字交叉法测量菌落直径,分析 CFS 对小麦全蚀病菌的抑制活性。以加无菌水的 PDA 平板作对照,每个处理 3 次重复。

1.2.2 菌株 MG-4 无菌上清液稳定性检测

对 pH 稳定性检测:分别取 CFS 5 mL,用 2 mol/L 的 HCl 或 NaOH 调节 pH 为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,于 37℃水浴保温 1 h。对温度的稳定性检测:分别取 CFS 5 mL 在 40、60、80、100℃水浴处理 30、60 min,迅速放入 4℃冰箱冷却。对蛋白酶稳定性检测:分别在 5 mL CFS 中加入终浓度为 1 mg/mL 的胃蛋白酶和胰蛋白酶,37℃水浴分别保温 30、60、90、120 min。对有机溶剂的稳定性检测:分别向 5 mL CFS 中加入等体积氯仿、乙醚、乙酸乙酯进行萃取,萃取相用旋转蒸发仪将有机溶剂蒸干,用等体积的无菌水悬浮,分别测定萃取相和萃余相的抑菌活性。对无机离子稳定性检测:取 5 mL CFS,分别加入不同量的 NaCl、KCl、MnCl₂、MgCl₂、CaCl₂、KNO₃、

KCO₃、K₂SO₄、KI 和 KH₂PO₄,使 10 种无机盐在 CFS 中终浓度分别为 5、25、50 mg/mL,37℃水浴保温 1 h。上述 5 种处理,以不作处理的 5 mL CFS 为阳性对照(CK₁),无菌水为阴性对照(CK₀),采用 1.2.1 方法测量各处理菌落直径并计算其相对活性(relative activity, RA)。每个处理 3 次重复。 $RA = (\text{阳性对照菌落面积} - \text{不同处理菌落面积}) / (\text{阳性对照菌落面积} - \text{阴性对照菌落面积}) \times 100\%$ 。

1.2.3 菌株 MG-4 合成抑菌物质基因检测

采用常规方法提取菌株 MG-4 基因组 DNA 为模板,扩增选用的引物序列根据已报道的相关基因设计得到(表 1)。根据设计引物的退火温度和扩增片段大小设计 PCR 反应程序。反应体系:10×PCR Buffer 5 μL、2.5 mmol/L dNTP 4 μL、10 μmol/L 上下游引物各 2 μL、5 U/μL DNA 聚合酶 0.25 μL、DNA 1 μL,加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应结束后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物由北京华大基因有限公司进行测序。基因序列在 NCBI 上利用 BLAST 进行同源性比较。

表 1 菌株 MG-4 基因组中抑菌物质合成相关基因引物

Table 1 Related gene primes of antifungal material synthesis from *Bacillus subtilis* MG-4 genome

脂肽抗生素 Antibiotic	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	合成酶基因 Target gene	扩增片段大小 Amplicon size (bp)	引用文献 Reference
表面活性素 Surfactin	110F	GTTCTCGCAGTCCAGCAGAAG	<i>srfAB</i>	308	Joshi & Gardener, 2006
	110R	GCCGAGCGTATCCGTACCGAG			
Yndj	147F	CAGAGCGACAGCAATCACAT	<i>yndJ</i>	212	
	147R	TGAATTTCCGGTCCGCTTATC			
芬芥素 Fengycin	FNDF1	CCTGCAGAAGGAGAAGTGAAG	<i>fenD</i>	293	
	FNDR1	TGCTCATCGTCTTCCGTTTC			
伊枯草菌素 Iturin	ITUCF1	TTCACTTTTGATCTGGCGAT)	<i>ituC</i>	575	
	ITUCR3	CGTCCGGTACATTTTCAC			
	ituD2F	GATGCGATCTCCTTGGATGT	<i>ituD</i>	647	Mora et al., 2011
	ituD2R	ATCGTCATGTGCTGCTTGAG			
枯草杆菌素 Subtilisin	Sbo1F	TCGGTTTGTAACCTCAACTGC	<i>sboA</i>	334	
	Sbo1R	GTCCACTAGACAAGCGGCTC			
杆菌抗霉素 Bacillomycin	bamC2F	CTGGAAGAGATGCCGCTTAC	<i>bamC</i>	850	
	bamC2R	AAGAGTGCGTTTTCTTCGGA			

1.2.4 菌株 MG-4 无菌上清液粗提物活性检测

取 50 mL CFS,用 6 mol/L HCl 溶液调 pH 至 2,4℃冰箱放置过夜,10 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,用 pH 2 的去离子水洗涤沉淀 2 次,并用甲醇萃取 2 次(Guo et al., 2014),即得到粗提物。CFS 甲醇粗提物采用旋转蒸发仪将甲醇蒸干,用等体积无菌水悬浮,通过对峙培养法检测抑菌物质的活性(Clarke et al., 2010; Pretorius et al., 2015)。将 PDA 培养基融

化后加入终浓度为 40 μg/mL 的硫酸链霉素,倒平板待凝固后在距离平板中间 2.5 cm 位置均匀打 4 个直径 7 mm 的孔。将直径 7 mm 的 BD-7 菌片置于平板中央,在其中 3 个孔分别加入 30 μL 粗提物水悬液,另外 1 个孔加入等体积无菌水为对照,重复 3 次。

1.2.5 菌株 MG-4 抑菌物质的 MALDI-TOF-MS 鉴定
菌株 MG-4 的 CFS 甲醇提取物采用 MALDI-TOF-MS 进行检测,通过分析抑菌物质的分子量,推

测其抑菌物质的成分。质谱条件:使用337 nm氮激光源解吸附电离,以 α -氰基-4-羟基肉桂酸饱和溶液为基质,采用反射模式,正离子谱测定样品质谱信息(Velho et al., 2011)。

1.3 数据分析

利用DPS 6.5软件对试验数据进行单因素方差分析,应用最小显著差数(LSD)法检验差异显著性。

2 结果与分析

2.1 菌株MG-4无菌上清液的抑菌活性

菌株MG-4的CFS对小麦全蚀病菌菌株BD-7的抑制作用显著(图1)。PDA培养基中不加入CFS, 28℃培养7 d,菌丝能够长满平板,菌落直径为9.0 cm。向100 mL PDA培养基中加入3 mL CFS,在相同培养条件下菌落直径为4.3 cm,加入5 mL CFS时菌落直径为3.8 cm,加入10 mL CFS时菌落直径为3.4 cm,加入15 mL CFS时菌落直径为3.0 cm。CFS加入量越大,菌株BD-7的菌落直径越小,表明CFS能够抑制小麦全蚀病菌的生长,并且随着CFS加入量的增加,其抑制活性增强。

2.2 菌株MG-4无菌上清液的稳定性

pH 5~7条件下,菌株MG-4 CFS的相对活性为100.0%; pH 2~4时相对活性为98.8%;从pH 8到pH 12,相对活性由98.8%迅速降至2.1%;表明CFS在

中性及酸性条件下稳定,对碱敏感(表2)。在热稳定性方面,加热温度越高时间越长CFS越易失活,40、60、80℃下分别加热15 min, CFS保留全部抑菌活性;80℃加热30 min相对活性为98.8%,100℃加热15、30 min, CFS的相对活性显著下降,分别为92.6%和88.5%(表2)。

胃蛋白酶和胰蛋白酶对CFS活性影响不显著。胃蛋白酶和胰蛋白酶处理30、60、90 min, CFS的相对活性均未发生显著改变,处理120 min后相对活性为98.8%。用等体积的氯仿、乙醚和乙酸乙酯萃取CFS, 萃取余相的相对活性均为100.0%, 萃取相均无抑菌活性,表明抑菌物质不能被氯仿、乙醚和乙酸乙酯萃取,且对这3种有机溶剂不敏感。

用不同浓度的无机离子处理CFS, Na^+ 和 K^+ 对CFS活性无显著影响, Mn^{2+} 完全抑制CFS的抑菌活性, Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 均不同程度抑制CFS的活性, Mg^{2+} 浓度从5 mg/mL增加至50 mg/mL时, CFS相对活性从88.5%下降至62.1%, Ca^{2+} 浓度为5 mg/mL时CFS相对活性为74.6%, 50 mg/mL时相对活性为34.9%。 CO_3^{2-} 和 I^- 对CFS的活性无显著抑制作用, SO_4^{2-} 、 NO_3^- 和 $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ 显著抑制CFS活性,其中 $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ 的抑制作用最强, 50 mg/mL时CFS相对活性为37.2%, 50 mg/mL SO_4^{2-} 处理下CFS相对活性为46.0%, 50 mg/mL NO_3^- 处理下CFS相对活性为56.2%。

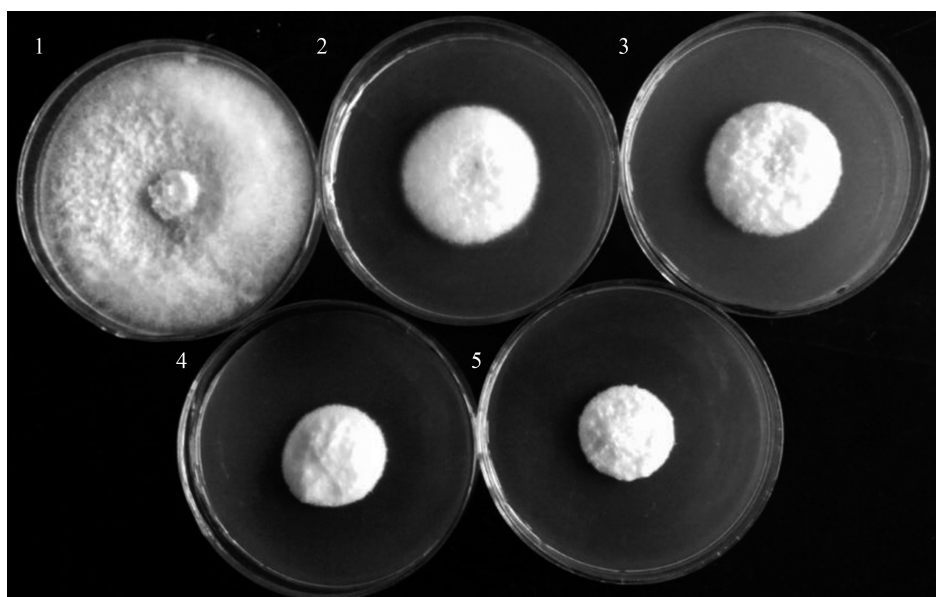


图1 不同体积的菌株MG-4无菌上清液对小麦全蚀病菌的抑制作用

Fig. 1 Antifungal activity of different volumes of the cell-free supernatant from *Bacillus subtilis* MG-4 against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

1~5: 分别为100 mL PDA培养基中添加无菌上清液0、3、5、10、15 mL。1~5: 0, 3, 5, 10 and 15 mL of cell-free supernatant was added to 100 mL of PDA medium, respectively.

表2 温度、pH、蛋白酶、有机溶剂及无机离子对菌株MG-4无菌上清液活性的影响
Table 2 Effects of temperature, pH, protease, organic solvent and inorganic ions on antifungal activity
of *Bacillus subtilis* MG-4 cell-free supernatant

不同处理				菌落直径	相对活性	不同处理				菌落直径	相对活性
Different treatment				CD (cm)	RA (%)	Different treatment				CD (cm)	RA (%)
pH	2			3.9±0.1 e	98.8	无级阳离子 Inorganic cation (mg/mL)	KCl	5		3.8±0.1 h	100.0
	3			3.9±0.1 e	98.8			25		3.8±0.1 h	100.0
	4			3.9±0.1 e	98.8			50		3.8±0.2 h	100.0
	5			3.8±0.1 e	100.0		NaCl	5		3.8±0.0 h	100.0
	6			3.8±0.0 e	100.0			25		3.8±0.1 h	100.0
	7			3.8±0.1 e	100.0			50		3.8±0.0 h	100.0
	8			3.9±0.0 e	98.8		MgCl ₂	5		4.7±0.1 g	88.5
	9			4.6±0.0 d	89.9			25		5.1±0.1 f	82.6
	10			7.2±0.1 c	43.8			50		6.3±0.1 d	62.1
	11			8.5±0.1 b	13.1		CaCl ₂	5		5.6±0.1 e	74.6
	12			8.9±0.1 a	2.7			25		7.1±0.1 c	46.0
								50		7.6±0.1 b	34.9
温度 Temperature	40℃	15 min		3.8±0.1 d	100.0	无级阴离子 Inorganic anion (mg/mL)	MnCl ₂	5		9.0±0.0 a	0.0
		30 min		3.8±0.1 d	100.0			25		9.0±0.0 a	0.0
	60℃	15 min		3.8±0.1 d	100.0			50		9.0±0.0 a	0.0
		30 min		3.8±0.1 d	100.0		CK ₀			9.0±0.0 a	—
	80℃	15 min		3.8±0.0d	100.0					3.8±0.0 h	—
		30 min		3.9±0.1 d	98.8		KNO ₃	5		6.4±0.1 d	60.2
	100℃	15 min		4.4±0.1 c	92.6			25		6.5±0.2 d	58.2
		30 min		4.7±0.0 b	88.5			50		6.6±0.2 d	56.2
	CK ₀			9.0±0.1 a	—		K ₂ CO ₃	5		3.8±0.1 e	100.0
	CK ₁			3.8±0.0 d	—			25		3.8±0.1 e	100.0
蛋白酶 Protease	胃蛋白酶 Pepsin	30		3.8±0.1 b	100.0			50		3.8±0.1 e	100.0
		60		3.8±0.0 b	100.0		KI	5		3.8±0.0 e	100.0
		90		3.8±0.1 b	100.0			25		3.8±0.1 e	100.0
		120		3.9±0.1 b	98.8			50		3.9±0.0 e	98.8
	胰蛋白酶 Trypsin	30		3.8±0.0 b	100.0		K ₂ SO ₄	5		7.1±0.1 c	46.0
		60		3.8±0.1 b	100.0			25		7.2±0.2 c	43.8
		90		3.8±0.1 b	100.0			50		7.1±0.2 c	46.0
		120		3.9±0.1 b	98.8		KH ₂ PO ₄	5		7.6±0.1 b	34.9
	CK ₀			9.0±0.0 a	—			25		7.6±0.1 b	34.9
	CK ₁			3.8±0.0 b	—			50		7.5±0.1 b	37.2
有机溶剂 Organic solvent	氯仿	萃取相OSP		3.8±0.1 b	100.0		CK ₀			9.0±0.0 a	—
		萃取相AP		9.0±0.0 a	0.0					3.8±0.0 e	—
	乙醚	萃取相OSP		3.8±0.0 b	100.0		CK ₁				
		萃取相AP		9.0±0.0 a	0.0						
	乙酸乙酯	萃取相OSP		3.8±0.1 b	100.0						
		萃取相AP		9.0±0.0 a	0.0						
	Chloroform	萃取相AP		9.0±0.0 a	0.0						
		萃取相OSP		9.0±0.0 a	—						
	CK ₀			9.0±0.0 a	—						
	CK ₁			3.8±0.0 b	—						

—: 无相对活性。表中数据为平均数±标准差。同一处理组中同列数据后不同字母表示经LSD法检验在P<0.05水平差异显著。—: No relative activity; CD: colony diameter; RA: relative activity; OSP: organic solvent phase; AP: aqueous phase. Data are means±SD. Different letters in the same column in the same treatment indicate significant difference at P<0.05 level by LSD test.

2.3 菌株 MG-4 合成脂肽类抗生素相关基因

本试验检测的7种合成脂肽类抗生素相关基因中,菌株MG-4含有*srfAB*、*yndJ*、*bamC*、*fenD*、*ituC*和*ituD*共6种基因,不含*SboA*(图2)。BLAST比对结果显示,其中菌株MG-4的*yndj*与解淀粉芽胞杆菌*B. amyloliquefaciens* FZB42编码YndJ蛋白的基因*yndj*同源性为98%;*srfAB*与解淀粉芽胞杆菌UCMB5036编码表面活性素合成酶的基因*srfAB*同源

性为99%;*ituC*与解淀粉芽胞杆菌UCMB5036编码伊枯草菌素A合成酶C的基因*ituC*同源性为99%;*ituD*与解淀粉芽胞杆菌YNM-3编码丙二酸单酰辅酶A酰基转移酶的基因*ituD*同源性为99%;*fenD*与枯草芽胞杆菌QST713编码芬芥素合成酶的基因*fenD*同源性为100%;*bamC*与枯草芽胞杆菌ATTCAU195编码短杆菌素合成酶C的基因*bamC*同源性为98%。

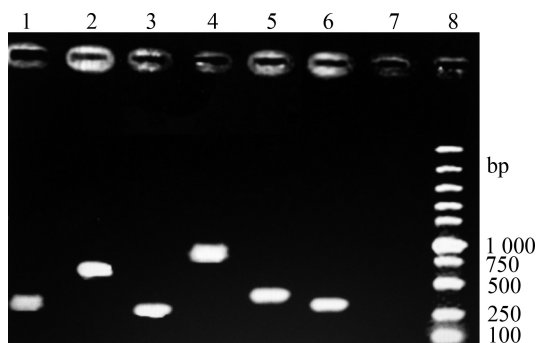


图2 菌株MG-4合成脂肽类抗生素相关基因的PCR扩增检测结果

Fig. 2 Testing results of PCR detection of lipopeptides related genes of strain MG-4

1: *srfAB*; 2: *yndJ*; 3: *bamC*; 4: *fenD*; 5: *ituC*; 6: *ituD*; 7: *sboA*; 8: marker.

2.4 菌株MG-4的CFS粗提物活性及物质结构鉴定

将CFS进行粗提取,抑菌物质易在酸性条件下析出,CFS及其粗提物均能显著抑制小麦全蚀病菌菌株BD-7的增殖(图3)。MALDI-TOF-MS检测结果显示,当质荷比在1000~1200范围内,主要的分子离子峰有1043.54和1057.56对应不同长度碳链脂肪酸 $[M+H]^+$;1065.53和1079.54对应 $[M+Na]^+$,1095.53对应 $[M+K]^+$,以上物质峰与C14~C15伊枯草菌素A离子加成峰一致。当质荷比在1400~

1600范围内,主要的分子离子峰为1435.77、1449.75、1463.81、1477.84、1491.85和1505.88对应不同长度碳链脂肪酸 $[M+H]^+$,1471.78、1485.81、1499.82、1513.85和1527.87对应 $[M+Na]^+$,以上物质峰与不同长度碳链脂肪酸的C14~C18芬芥素A和C14~C17芬芥素B及其离子加成峰一致(图4)。综上所述菌株MG-4代谢产生的抑菌物质为C14~C15伊枯草菌素A、C14~C18芬芥素A和C14~C17芬芥素B。

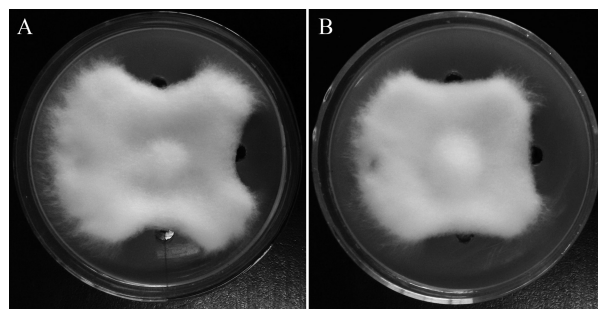


图3 菌株MG-4无菌上清液(A)及其粗提物(B)对小麦全蚀病菌的抑制效果

Fig. 3 Antifungal activity of the cell-free supernatant (A) and its crude extract (B) from *Bacillus subtilis* MG-4 against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

3 讨论

生物防治是植物病害防治的发展趋势(杨蕾等,

2014),芽胞杆菌耐热、耐干旱,还可以在植物微环境中定殖,防止病原体感染或诱导植物抗性,许多芽胞杆菌用于防治植物病害,特别是真菌引起的植物病

害。但芽胞杆菌的田间防治效果受多种因素影响,如能否在植物根系土壤中有效定殖,在土壤环境中能否大量产生抑菌物质等。而利用抑菌物质可以直接发挥其拮抗效应,所受限制因素较少,并且在环境中易分解,安全环保且与环境相容性好,是一种很好的微生物农药资源(Zhang et al., 2017)。本研究系统检测了枯草芽胞杆菌菌株MG-4发酵无菌上清液的活性及其中抑菌物质的性质,菌株MG-4无菌上

清液热稳定性好,在中性及酸性环境中稳定,对 Na^+ 、 K^+ 、 CO_3^{2-} 和 I^- 不敏感,这与王静等(2007)和Wang et al.(2014)的研究结果相似;菌株MG4无菌上清液对胃蛋白酶和胰蛋白酶及有机溶剂乙醚、氯仿和乙酸乙酯不敏感,这与Cui et al.(2012)的研究结果一致。菌株MG-4无菌上清液性质稳定,有利于其工业生产,也为其田间施用能稳定发挥防治效果提供了保障。

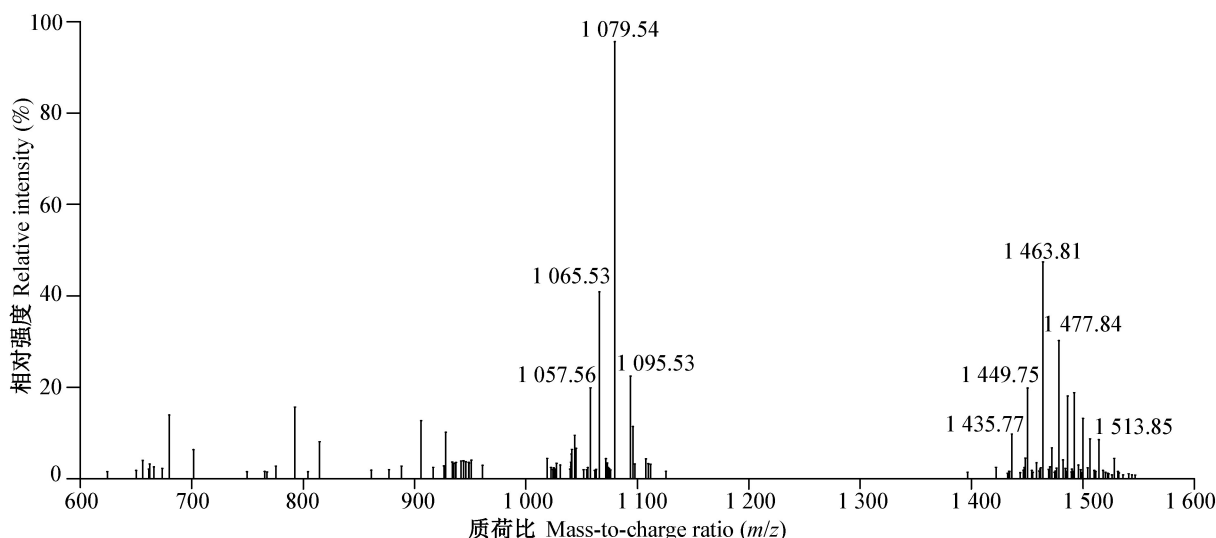


图4 枯草芽胞杆菌MG-4抑菌物质MALDI-TOF-MS分析

Fig. 4 MALDI-TOF-MS analysis of antifungal substances from *Bacillus subtilis* MG-4

利用抗生素合成相关基因的特异性引物对菌株MG-4基因组DNA进行PCR扩增,发现该菌基因组中存在抗生素合成相关基因 *srfAB*、*yndJ*、*bamC*、*fenD*、*ituC*和*ituD*。MALDI-TOF-MS对抑菌物质的分子量进行鉴定,结合PCR扩增结果,推测菌株MG-4所产的抑菌物质中含有C14~C15伊枯草菌素A,可能含有芬芥素A、芬芥素B中的1种或2种。但由于相同质荷比的芬芥素A和芬芥素B只相差2个 $[-\text{CH}_2-]$,故无法通过此一级质谱的分析结果来判定芬芥素的类别,需要进一步研究。据报道,伊枯草菌素和芬芥素具有强抗真菌活性(鲁小城等,2007),其中伊枯草菌素有广谱拮抗真菌活性而对细菌拮抗作用很小,对病毒无作用。如对绿霉病及灰霉病(Ambribo & Trupo, 2017)、小麦赤霉病(Gong et al., 2015)、柑橘褐斑病、苹果干腐病和芒果炭疽病(Arrebola et al., 2010)均有很强的抑制现象。而芬芥素对丝状霉菌有良好的抑制作用,而对酵母和细菌无效;如在棉苗猝倒病(Guo et al., 2014)、小麦赤霉病(Dunlap et al., 2011)及苹果轮纹病(Fan et al., 2017)的防治中起重要作用。结合前人的研究结果,推测

本研究中菌株MG-4分泌的伊枯草菌素A和芬芥素对植物病原真菌有广泛的抑菌活性,这将为伊枯草菌素A和芬芥素分离提取的后续试验提供重要的理论支撑。

MALDI-TOF-MS具有高灵敏度、高准确度及高分辨率等特点(谢永丽等,2012),MALDI将检测成分转换为离子信号时,被检测物吸收单一光子使其离子带单一电荷,这为被检测物的分析提供了很大的便捷。当形成的离子进入飞行时间质量分析仪分析得到此物质的质荷比时只需要与数据库保存的不同物质的质荷比进行比对,便可以得出鉴定结果(Sandrin et al., 2013)。另外,MALDI产生的是低电荷的完整气相大分子,可用于检测纯度不高的生物分子。待测组分(包括蛋白质、脂类、多肽等)中含有一些杂质(如较高浓度的盐、非挥发性成分等)并不影响目标物质的测定(Vater et al., 2003)。本研究通过MALDI-TOF-MS进行抑菌物质鉴定时,只经过盐酸沉淀和甲醇萃取等少量纯化步骤,简单提取或者不提取直接进行物质检测分析,可以最大限度保留活性成分,避免其在纯化过程中丢失,使试验结果更加

准确、全面。也有研究者将发酵液过滤后直接进行MALDI-TOF-MS检测分析(Bright et al., 2002)。可见MALDI-TOF-MS分析信息直观、操作简单、快速准确,是一种非常便利的鉴定物质的方法。

总之, MG-4菌株发酵上清液对小麦全蚀病菌有强拮抗作用, 含有高抑菌活性的伊枯草菌素A和芬荠素, 且性质稳定, 这使MG-4菌株发酵上清液在小麦全蚀病防治中有很好的应用前景, 为开发新型生物农药及进行工业化生产提供有力的理论依据及物质支持。

参考文献 (References)

- Ambrico A, Trupo M. 2017. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold. *Postharvest Biology and Technology*, 134: 5–10
- Arrebola E, Jacobs R, Korsten L. 2010. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2): 386–395
- Bright JJ, Claydon MA, Soufian M, Gordon DB. 2002. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *Journal of Microbiological Methods*, 48(2/3): 127–138
- Clarke KG, Ballot F, Reid SJ. 2010. Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under phosphate limitation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(12): 2179–2184
- Cui TB, Chai HY, Jiang LX. 2012. Isolation and partial characterization of an antifungal protein produced by *Bacillus licheniformis* BS-3. *Molecules*, 17: 7336–7347
- Dunlap CA, Schisler DA, Price NP, Vaughn SF. 2011. Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains: antagonists of *Fusarium* head blight. *The Journal of Microbiology*, 49(4): 603–609
- Falardeau J, Wise C, Novitsky L, Avis TJ. 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7): 869–878
- Fan HY, Ru JJ, Zhang YY, Wang Q, Li Y. 2017. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiological Research*, 199: 89–97
- Gong AD, Li HP, Yuan QS, Song XS, Yao W, He WJ, Zhang JB, Liao YC. 2015. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, 10(2): e0116871
- Gordillo MA, Maldonado MC. 2012. Purification of peptides from *Bacillus* strains with biological activity. *Chromatography and Its Applications*, 11: 201–224
- Guo QG, Dong WX, Li SZ, Lu XY, Wang PP, Zhang XY, Wang Y, Ma P. 2014. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiological Research*, 169(7/8): 533–540
- Hamdache A, Lamarti A, Aleu J, Collado IG. 2011. Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus*. *Journal of Natural Products*, 74(4): 893–899
- Huang XQ, Zhang N, Yong XY, Yang XM, Shen QR. 2012. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiological Research*, 167(3): 135–143
- Joshi R, McSpadden Gardener BB. 2006. Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 96(2): 145–154
- Keenan S, Crome MG, Harrow SA, Bithell SL, Butler RC, Beard SS, Pitman AR. 2015. Quantitative PCR to detect *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in symptomatic and non-symptomatic wheat roots. *Australasian Plant Pathology*, 44(6): 591–597
- Liu B, Huang LL, Kang ZS, Qiao HP. 2007. Efficiency and mechanism on endophytic bacteria strains against the take-all disease of wheat. *Journal of Plant Protection*, 34(2): 221–222 (in Chinese) [刘冰, 黄丽丽, 康振生, 乔宏萍. 2007. 小麦内生细菌对全蚀病的防治作用及其机制. *植物保护学报*, 34(2): 221–222]
- Liu B, Qiao HP, Huang LL, Buchenauer H, Han QM, Kang ZS, Gong YF. 2009. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control*, 49(3): 277–285
- Liu JJ, Hagberg I, Novitsky L, Hadj-Moussa H, Avis TJ. 2014. Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens. *Fungal Biology*, 118: 855–861
- Lu XC, Zhao YH, Fang P. 2007. Study on antifungal active substance of *Bacillus subtilis* F-2. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 33(1): 34–39 (in Chinese) [鲁小城, 赵宇华, 方萍. 2007. 枯草芽孢杆菌F-2抗植物病原真菌活性物质的研究. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 33(1): 34–39]
- Luo CP, Liu YZ, Wu HF, Wang XY, Liu YF, Nie YF, Zhang RS, Chen ZY. 2011. Antifungal activity and rice disease biocontrol performance of lipopeptide antibiotic bacillomycin L. *Chinese Journal of Biological Control*, 27(1): 76–81 (in Chinese) [罗楚平, 刘卹洲, 吴荷芳, 王晓宇, 刘永锋, 聂亚锋, 张荣胜, 陈志谊. 2011. 脂肽类化合物 bacillomycin L 抗真菌活性及其对水稻病害的防治. *中国生物防治学报*, 27(1): 76–81]
- Luo J, Zhang X, Huang H, Zhai F, An TC, An DR. 2013. Control effect and mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* Ba-168 on wheat take-all. *Journal of Plant Protection*, 40(5): 475–476 (in Chinese) [罗晶, 张鑫, 黄海, 翟枫, 安天赐, 安德荣. 2013. 解淀粉芽孢杆菌 Ba-168 菌株对小麦全蚀病的防治及其机制. *植物保护学报*, 40(5): 475–476]
- Mora I, Cabrefiga J, Montesinos E. 2011. Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *International Microbiology*, 14(4): 213–223
- Moyne AL, Cleveland TE, Tuzun S. 2004. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiology Letters*, 234(1): 43–49

- Ongena M, Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3): 115–125
- Patel H, Tscheka C, Edwards K, Karlsson G, Heerklotz H. 2011. All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(8): 2000–2008
- Pretorius D, van Rooyen J, Clarke KG. 2015. Enhanced production of antifungal lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of postharvest disease. *New Biotechnology*, 132(2): 243–252
- Ramkumar G, Yu SM, Lee YH. 2013. Influence of light qualities on antifungal lipopeptide synthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* JBC36. *European Journal of Plant Pathology*, 137(2): 243–248
- Sandrin TR, Goldstein JE, Schumaker S. 2013. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrometry Reviews*, 32(3): 188–217
- Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4): 845–857
- Torres MJ, Pérez BC, Petroselli G, Erra-Balsells R, Audisio MC. 2016. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological Research*, 182: 31–39
- Vater J, Kablitz B, Wilde C, Franke P, Mehta N, Cameotra SS. 2002. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12): 6210–6219
- Vater J, Gao XW, Hitzeroth G, Wilde C, Franke P. 2003. “Whole cell”-matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, an emerging technique for efficient screening of bio-combinatorial libraries of natural compounds-present state of research. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 6(6): 557–567
- Velho RV, Medina LFC, Segalin J, Brandelli A. 2011. Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. *Folia Microbiologica*, 56(5): 297–303
- Wang J, Zhao TC, Kong FY, He YQ, Zhang CS. 2007. Characteristics of inhibitive substance produced by *Bacillus subtilis* SH7. *Journal of Plant Protection*, 34(4): 443–444 (in Chinese) [王静, 赵廷昌, 孔凡玉, 何月秋, 张成省, 2007. 枯草芽胞杆菌 SH7 抑菌物质及其特性. *植物保护学报*, 34(4): 443–444]
- Wang Z, Wang Y, Zheng L, Yang X, Liu H, Guo J. 2014. Isolation and characterization of an antifungal protein from *Bacillus licheniformis* HS10. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 454(1): 48–52
- Wise C, Novitsky L, Tsopmo A, Avis TJ. 2012. Production and antimicrobial activity of 3-hydroxypropionaldehyde from *Bacillus subtilis* strain CU12. *Journal of Chemical Ecology*, 38(12): 1521–1527
- Xie YL, Xu ZW, Ma LZ, Gao XW. 2012. Molecular identification of *Bacillus* strains isolated from rhizosphere of *Betula platyphylla* in Qinghai Beishan timberland and its antagonistic activity analysis. *Journal of Plant Protection*, 39(3): 246–252 (in Chinese) [谢永丽, 徐志伟, 马莉贞, 高学文. 2012. 青海北山林场桦树根围芽胞杆菌分子鉴定及其拮抗活性分析. *植物保护学报*, 39(3): 246–252]
- Yáñez-Mendizábal V, Zerrouh H, Viñas I, Torres R, Usall J, Vicente A, Pérez-García A, Teixidó N. 2012. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*, 132: 609–619
- Yang H, Li X, Li X, Yu HM, Shen ZY. 2015a. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin and surfactin by RP-HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(9): 2529–2542
- Yang L, Zhou GY, Liang J, Ni Y, Lü Q, Zhang XY. 2014. Isolation, screening and identification of the endogenous microorganisms antagonizing poplar canker. *Journal of Plant Protection*, 41(4): 438–446 (in Chinese) [杨蕾, 周国英, 梁军, 倪悦, 吕全, 张星耀. 2014. 防治杨树溃疡病内生菌的分离筛选及鉴定. *植物保护学报*, 41(4): 438–446]
- Yang LR, Quan X, Xue BG, Goodwin PH, Lu SB, Wang JH, Du W, Wu C. 2015b. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Biological Control*, 85: 52–58
- Zerrouh H, Romero D, Garcia-Gutierrez L, Cazorla FM, de Vicente A, Pérez-García A. 2011. The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(12): 1540–1552
- Zhang DD, Gao TG, Li HY, Lei BS, Zhu BC. 2017. Identification of antifungal substances secreted by *Bacillus subtilis* Z-14 that suppress *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Biocontrol Science and Technology*, 27(2): 237–251
- Zhang DD, Li SN, Guo XJ, Zhu BC. 2012. Isolation, identification and activity of an antagonistic spore *Bacterium* against cotton *Verticillium* wilt. *Cotton Science*, 24(4): 358–362 (in Chinese) [张冬冬, 李术娜, 郭晓军, 朱宝成. 2012. 一株棉花黄萎病拮抗芽胞细菌的分离鉴定及活性检测. *棉花学报*, 24(4): 358–362]
- Zhao Z, Wang Q, Wang K, Brian K, Liu C, Gu Y. 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology*, 101(1): 292–297

(责任编辑:李美娟)