

脂肽类抗生素 fengycin 在枯草芽胞杆菌 NCD-2 菌株抑制番茄灰霉病菌中的功能分析

董伟欣, 李宝庆, 李社增, 鹿秀云, 马平, 郭庆港*

(河北省农林科学院植物保护研究所, 河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心,
农业部华北北部作物有害生物综合治理重点实验室, 保定 071000)

摘要: 枯草芽胞杆菌 NCD-2 菌株及其无细胞发酵液对多种植物病原真菌具有较强的拮抗活性。为了明确 NCD-2 菌株抑菌作用机理, 本研究利用快速蛋白液相色谱技术(FPLC)结合抑菌活性测定, 对 NCD-2 菌株的脂肽类抑菌物质进行分离、纯化, 经质谱鉴定, 该抑菌物质为芬芥素(fengycin)。从 NCD-2 菌株中克隆出 fengycin 合成酶基因 *fenC* 及其上游启动子序列, 通过同源重组技术对 *fenC* 基因进行了内缺失突变, 同 NCD-2 野生型菌株相比, *fenC* 基因缺失突变子丧失了 fengycin 的合成能力, 同时该突变子显著降低了对番茄灰霉病菌的拮抗活性。进一步在离体叶片上比较了 NCD-2 野生型菌株和突变子之间脂肽提取物和菌体细胞对番茄灰霉病的保护作用, 结果发现, 突变子不论是脂肽提取物还是菌体细胞显著降低了对番茄灰霉病的防治作用。

关键词: 枯草芽胞杆菌; 番茄灰霉病菌; fengycin; 突变

The fengycin lipopeptides are major components in the *Bacillus subtilis* strain NCD-2 against the growth of *Botrytis cinerea* DONG Wei-xin, LI Bao-qing, LI She-zeng, LU Xiu-yun, MA Ping, GUO Qing-gang (Plant Protection Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences; IPM Centre of Hebei Province; Key Laboratory of IPM on Crops in Northern Region of North China, Ministry of Agriculture, Baoding 071000, China)

Abstract: The *Bacillus subtilis* strain NCD-2 and its cell-free supernatant showed strong inhibitive activity against the growth of phytopathogens. The NCD-2 lipopeptide extracts showed a strong inhibitive activity against the growth of *Botrytis cinerea*. The major antifungal activity compounds were isolated from the lipopeptides by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC), and identified as fengycin based on the profiles of matrix assisted laser desorption/ionization- time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF). The antifungal activity of fengycin was supported by in-frameless deletion mutagenesis and it targeted to suppress the biosynthesis of fengycin production. Compared to the strain NCD-2 wild type, the fengycin-deficient mutant strain decreased the antifungal capability significantly. Further bioassay indicated that the lipopeptides extracted from the fengycin-deficient mutant not only lost the inhibitive activity against the growth of *B. cinerea in vitro*, but also significantly decreased the control effect against tomato grey mold on detached tomato leaves. The results could be confirmed by assays using bacterial suspension between strain NCD-2 wild type and the fengycin-deficient mutant.

Key words: *Bacillus subtilis*; *Botrytis cinerea*; fengycin; mutagenesis

中图分类号: S476

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2013)04-0401-10

收稿日期: 2012-09-04; 修回日期: 2013-04-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30900962); 国家高技术研究发展计划("863"计划)(2011AA10A205); 河北省财政专项(F12C10036)

通讯作者: 郭庆港, 副研究员, 主要从事植物病害生物防治研究; Tel: 0312-5915677, E-mail: gqg77@163.com

第一作者: 董伟欣, 女, 河北省石家庄人, 主要从事生防细菌的分子遗传学研究。

枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 防治植物病害的机制复杂多样, 主要包括抑菌作用、竞争作用和诱导抗性等。枯草芽胞杆菌可以产生多种抑菌活性物质, 其中脂肽类抗生素是其所产生的主要抑菌物质。脂肽类抗生素由于具有抑菌谱广、热稳定性强、持效期长等优点, 在植物病害防治中具有重要的作用^[1]。表面活性素 (surfactin)、伊枯草菌素 (包括 iturin A、mycosubtilin 和 bacillomycin D) 以及芬芥素 (fengycin) 类抗生素 (fengycin A 和 fengycin B) 是枯草芽胞杆菌产生的三大类脂肽抗生素^[2]。这些抗生素由多酶复合体通过非核糖体途径合成, 一般由 7 (surfactin 和 iturins) 或 10 (fengycins) 个 α -氨基酸组成的环形肽链和 1 个由 13-18 个 -CH₂ 组成的 β -脂肪酸链组成, 并且同一种脂肽类抗生素一般具有 3-5 个同系物, 不同的同系物在脂肪酸链的长度上有所差异^[3]。iturins 和 fengycins 类抗生素对多种植物病原真菌具有较强的拮抗活性^[4,5], surfactin 虽然自身对真菌没有明显的抑菌活性, 但 surfactin 可增强 iturins 或 fengycins 的抑菌活性^[6,7]。除了直接的抑菌活性外, surfactin 和 fengycins 还具有诱导抗病性的作用 (ISR)^[8,9]。

枯草芽胞杆菌 NCD-2 菌株是一株对棉花黄萎病菌和番茄灰霉病菌等多种植物病原真菌具有较强拮抗活性的生防细菌^[10], 以 NCD-2 菌株为活性成分开发的微生物农药“10 亿/克枯草芽胞杆菌可湿性粉剂”已获得农药正式登记。前期研究发现, 该菌株产生的抑菌活性物质具有热稳定性, 并且对

酸、碱和蛋白酶 K 不敏感^[11], 据此推测 NCD-2 菌株产生的抑菌活性物质可能为脂肽类抗生素。本研究以番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 为指示菌, 通过蛋白质液相色谱 (FPLC) 和质谱技术对 NCD-2 菌株产生的抑菌活性物质进行分离鉴定, 通过分子遗传学手段明确抑菌活性物质在 NCD-2 菌株抑制番茄灰霉病菌中的作用。明确 NCD-2 菌株产生的主要抑菌活性物质, 可为 NCD-2 菌株发酵条件的优化以及 NCD-2 菌株的遗传改良提供重要理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与质粒

本研究所用的菌株及质粒见表 1。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 采用 LB 培养基、37℃ 培养; 枯草芽胞杆菌 NCD-2 菌株及其突变子在含有 30% 甘油的 LB (Luria Bertani) 培养基中于 -80℃ 长期保存, 使用前在 LB 固体培养基上 37℃ 活化。根据质粒的抗性, 在 LB 培养基中加入抗生素 (抗生素的终浓度分别为: 氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、红霉素 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。番茄灰霉病菌由本实验室分离并保存。

1.2 引物合成及 PCR 扩增

本研究所用引物均根据枯草芽胞杆菌 NCD-2 菌株基因组序列设计, 引物设计由 Primer premier 5.0 软件完成, 引物名称和序列见表 2。引物合成和序列测定由上海生工生物工程公司完成。PCR 扩增所用 DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术

Table 1 Strains or plasmids used in this study

Strain & plasmid	Characteristics	Source
<i>Bacillus subtilis</i> strain		
NCD-2	Wild type	Laboratory stock
NCD-2 (Δfen)	NCD-2 mutant type, <i>fenC</i> and its promoter were deleted by homologous recombination	This study
<i>Botrytis cinerea</i>	Pathogen of tomato gray mold	Laboratory stock
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>recA/endA/hsdR17 deoR thi2/supE44 gyrA96 relA/</i>	TransGen Biotech
pMAD	<i>E. coli</i> and <i>B. subtilis</i> shuttle vector, temperature-sensitive plasmid, Amp ^r , Ery ^r	Gifted by Dr Zhang Jie
pMAD- Δfen	pMAD containing <i>fenC</i> and promoter deletion structure; Amp ^r , Ery ^r	This study

Note: Amp^r, and Ery^r indicate resistance to Ampicillin and Erythromycin.

Table 2 Primers information

Primer	Sequence of primer (5'3')	Restriction site	Position of primer*
P1	CGC <u>GGATCC</u> GCAGATACGCCGAAGCAC	<i>Bam</i> H I	+2 005 bp
P2	CGC <u>ACGCGT</u> CCGCAACGACGCCATTAG	<i>Mlu</i> I	+161 bp
P3	CGC <u>ACGCGT</u> AAAACAGGTCTGCCGCTAT	<i>Mlu</i> I	-363 bp
P4	CGC <u>GAATTC</u> GGTGACAAACGCAGTGAAT	<i>Eco</i> R I	-2 008 bp

* * *: Position of primer was fixed to the initiation codon of *fenC* gene. Specified restriction sites are underlined.

有限公司的 HiFi DNA 聚合酶;试验所用限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 NCD-2 菌株脂肽类抑菌物质的提取

采用盐酸沉淀和甲醇溶解的方法提取 NCD-2 菌株中的脂肽类物质^[12]。NCD-2 菌株于 5 mL LB 液体培养基中,30℃、180 r/min 培养 12 h,然后以 1% 的接种量转接到 200 mL 3 号培养基中^[13],30℃、180 r/min 培养 48 h。培养结束后,将发酵液于 4℃、8 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,并用 5 mol/L 的 HCl 调节 pH 值至 2.0~2.5,4℃ 静置过夜。次日以 8 000 r/min 离心 20 min,收集沉淀,将沉淀在超净工作台中吹干后用 50 mL 甲醇抽提 2 次,合并抽提液得到脂肽粗提物。

1.4 NCD-2 菌株抑菌活性物质的分离和鉴定

NCD-2 菌株脂肽粗提物过 $\Phi = 0.22 \mu\text{m}$ 细菌过滤器,采用 AKTA Purifier 10 快速蛋白液相色谱(FPLC)对过滤液中抑菌活性物质进行分离和纯化。色谱柱为 SOURCE 5RPC ST 4.6/150 柱。流动相 A 为含 0.065% 三氟乙酸和 2% 乙腈的水溶液,流动相 B 为含 0.05% 三氟乙酸的 80% 乙腈溶液。检测波长为 215 nm,流速为 1 mL/min。梯度洗脱过程为 50 min 内流动相 A 由 100% 到 0。手动收集 FPLC 各组分,收集液利用旋转蒸发仪进行浓缩,利用浓缩液进行抑菌活性测定(方法见 1.6),对具有抑菌活性的组分进行基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析鉴定,根据文献已报道的枯草芽胞杆菌脂肽类抗生素的分子量对 NCD-2 菌株中的抑菌活性物质进行鉴定^[14,15]。

1.5 Fengycin 合成酶基因缺失突变菌株的构建

根据枯草芽胞杆菌 NCD-2 菌株 fengycin 合成

酶基因序列,利用 Primer Premier 5.0 软件在 fengycin 合成酶基因 *fenC* 的上、下游分别设计 4 条引物,引物名称、位置及所带酶切位点见表 2。以 NCD-2 菌株基因组为模板,分别以 P1/P2 和 P3/P4 引物组合进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物回收纯化后同时利用 *Mlu* I 进行酶切。酶切产物互连后以连接产物为模板,用 P1/P4 引物进行 PCR 扩增。扩增产物用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后插入到 pMAD 质粒 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点间,构建 fengycin 合成酶基因缺失突变载体 pMAD- Δ fen。缺失突变载体经测序验证正确后,采用原生质转化的方法转入枯草芽胞杆菌 NCD-2 菌株中^[16]。参照 Arnaud 等^[17]和 Wang 等^[18]报道的方法筛选 fengycin 合成酶基因缺失突变子。

1.6 对番茄灰霉病菌的抑菌活性测定

采用平板对峙培养法比较 NCD-2 菌株野生型及突变子对番茄灰霉病菌的抑菌活性。在直径 9 cm 的 PDA 培养基中心位置接种直径为 5 mm 的番茄灰霉病菌菌盘,距离灰霉病菌 2 cm 处点接新活化的 NCD-2 野生型菌株及其突变子,25℃ 培养 5~7 d 后比较 NCD-2 野生型菌株及其突变子对番茄灰霉病菌的拮抗活性。

利用牛津杯法比较 NCD-2 菌株野生型及其突变子脂肽提取物对番茄灰霉病菌的拮抗活性。制备 1% PDA(1 L 培养基中含有 10 g 琼脂)培养基作为下层平板,待下层平板完全凝固后(间隔 24 h),在 50℃、100 mL 0.8% PDA 培养基(1 L 培养基中含有 8 g 琼脂)中加入 2 mL 番茄灰霉病菌分生孢子悬浮液(孢子浓度为 10^6 个/mL),轻轻混匀后倒在下层培养基上作为上层平板。待培养基凝固后,在制备好的双层培养基平板上放置 2 个灭菌牛津杯,分别加入 NCD-2 菌株野生型及突变子的脂肽提取液,每个牛津杯中加入 150 μL 脂肽提取

物,25℃静置培养5~7 d后比较 NCD-2 野生型菌株及其突变子的脂肽提取物对番茄灰霉病菌的拮抗活性。

1.7 NCD-2 菌株野生型及其 *fenC* 突变子对番茄灰霉病的防效测定

在番茄离体叶片上分别比较 NCD-2 菌株野生型及其 *fenC* 突变子脂肽提取物和菌体细胞对番茄灰霉病的保护作用。

1.7.1 脂肽提取物对番茄灰霉病的保护作用 选取叶龄相同,大小一致的健康番茄叶片,用无菌水洗净晾干后将超纯水溶解的脂肽提取物均匀喷洒于叶片的正反面,叶片放入铺有湿润滤纸的培养皿中,叶柄用湿润的脱脂棉包裹保湿,在每张叶片中间部位接种直径为 5 mm 的番茄灰霉病菌菌盘,然后将盛有叶片的培养皿放入 25℃光照培养箱中培养,5~7 d 后观察叶片的发病情况,设超纯水为对照。

1.7.2 菌体细胞对番茄灰霉病的保护作用 NCD-2 菌株野生型及其 *fenC* 突变子分别于 200 mL NB (Nutrient Broth) 培养液中 37℃,180 r/min 振荡培养 24 h,10 000 r/min 离心 20 min 收集菌体,并用 30 mL 新鲜的 NB 培养液悬浮菌体,制备菌悬液(菌体浓度约为 10^9 cfu/mL)。选取叶龄相同,大小一致的健康番茄叶片,用无菌水洗净晾干后在菌

悬液中浸泡 1 min,在每张叶片中间接种番茄灰霉病菌菌盘,然后置于 25℃光照培养箱中培养,5~7 d 后观察叶片的发病情况,设新鲜的 NB 培养液处理为对照,每个处理重复 3 皿,每皿 2 张叶片。

2 结果与分析

2.1 NCD-2 菌株中抑菌物质的分离和鉴定

NCD-2 菌株脂肽提取物经 FPLC 分离后呈现 3 组物质(LP-a、LP-b、LP-c),手工收集 3 组物质,分别浓缩定容至 1 mL 后进行抑菌活性测定。结果表明,只有组分 2 物质(LP-b)对番茄灰霉病菌表现出明显的拮抗活性,而组分 1 和组分 3 没有明显拮抗活性(图 1)。将组分 2 物质(LP-b)进行 MALDI-TOF 质谱分析,结果表明,LP-b 中包含 2 种物质,而每种物质又包含 5 种同系物,相邻同系物之间的分子量相差 14 Da,恰好为脂肪酸链-CH₂。LP-b 中的第一种物质分子量分别为 1 447、1 461、1 475、1 489 和 1 503 Da,该物质与 fengycin A 的分子量相匹配;LP-b 中的另一种物质分子量分别为 1 449、1 463、1 477、1 491 和 1 505 Da,该物质与 fengycin B 的分子量相匹配(图 2)。因此,根据分子量推断 NCD-2 菌株产生的主要抑菌活性物质为 fengycins^[19]。

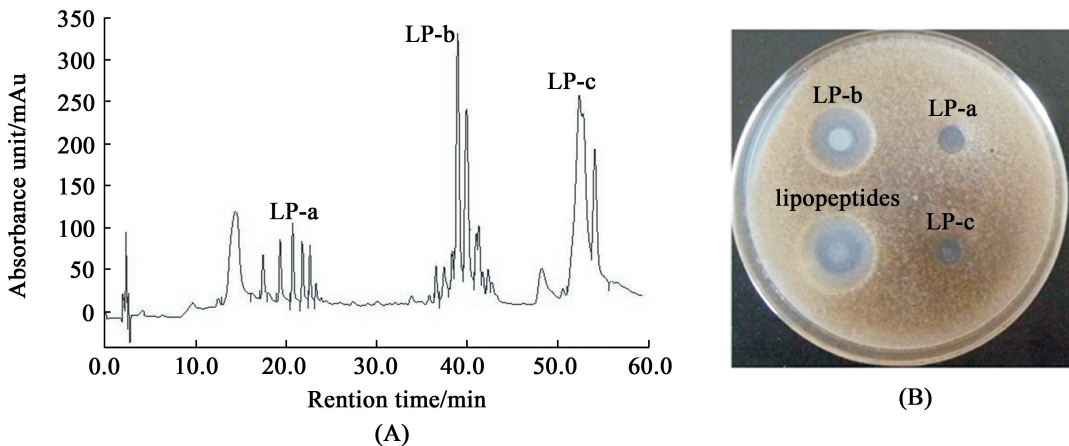


Fig. 1 FPLC chromatogram of antifungal activity compound extracted from the culture of NCD-2 strain (A) and the inhibition capability of active fractions against the growth of *Botrytis cinerea* (B)

a, b and c were three main fractions analyzed by FPLC, respectively, the lipopeptides was the extract from cell-free supernatant of *B. subtilis* strain NCD-2.

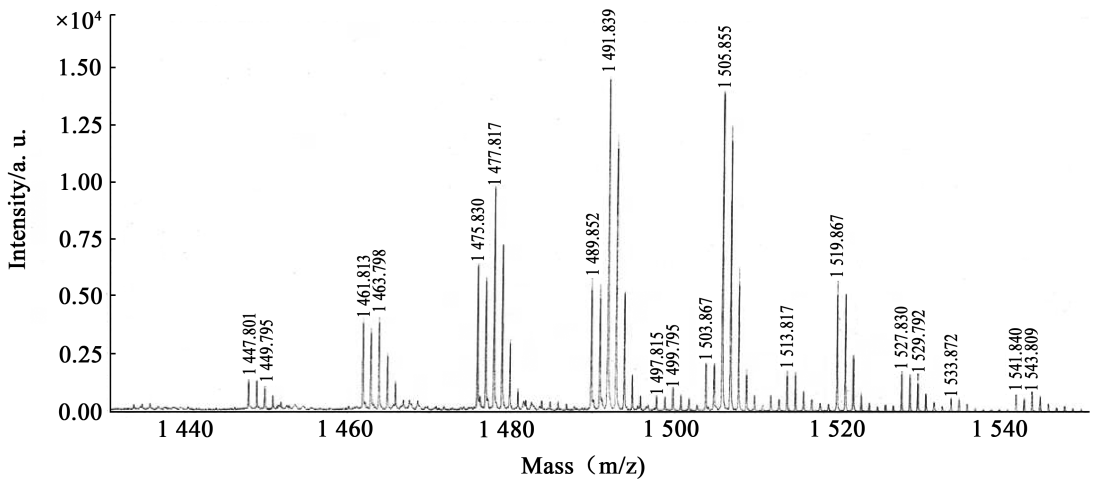


Fig. 2 Mass spectrometry analysis (MALDI-TOF) of the main antifungal activity fractions of *Bacillus subtilis* NCD-2

2.2 NCD-2 菌株 *fenC* 基因缺失突变子的构建

通过对 NCD-2 菌株的全基因组序列进行分析,获得 9.06 kb 的 fengycin 合成酶基因簇的部分序列(GenBank 登录号:GQ906579)。序列比对发现,NCD-2 菌株中的 fengycin 合成酶基因簇序列与枯草芽胞杆菌 168 菌株中 plipastatin(fengycin)合成酶基因簇(AL009126)序列同源性为 95%,与枯草芽胞杆菌 F29-3 菌株中 fengycin 合成酶基因簇(AF087452)序列同源性为 83%。Fengycin 合成酶存在 5 个编码基因,依次为 *fenC*、*fenD*、*fenE*、*fenA* 和 *fenB*^[20],根据 NCD-2 菌株中第一个 fengycin 合成酶基因—*fenC* 基因上下游序列设计 4 条引物,以 NCD-2 野生型菌株基因组为模板,分别利用 P1/P2 和 P3/P4 引物组合进行 PCR 扩增,获得大小为 1 844 bp 和 1 645 bp 的扩增片段。2 个扩增片段经 *Mlu* I 酶切、连接后为模板,利用 P1/P4 引物进行 PCR 扩增,获得大小为 3 489 bp 的扩增片段。同 NCD-2 菌株中的 *fenC* 基因相比,P1/P4 扩增片段中缺少了 524 bp 的片段,缺少的片段中包含 *fenC* 基因及其启动子的部分序列。P1/P4 扩增片段经 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切后,插入同样双酶切的 pMAD 质粒相应位点,即得到 PMAD- Δ fen 缺失突变载体。将构建好的缺失突变载体转入 NCD-2 菌株中进行高温突变筛选,获得红霉素敏

感菌株。以敏感菌株及 NCD-2 野生型菌株基因组 DNA 为模板,以 P1/P4 为引物进行 PCR 扩增。结果证明,红霉素敏感菌株的扩增片段较 NCD-2 野生型菌株扩增片段小约 500 bp(图 3),表明该红霉素敏感菌株即为 *fenC* 基因缺失突变菌株,命名为 NCD-2(Δ fen)。

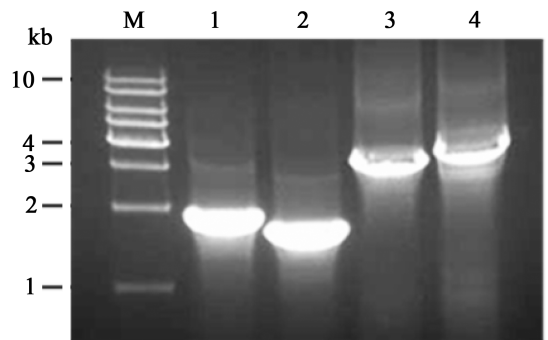
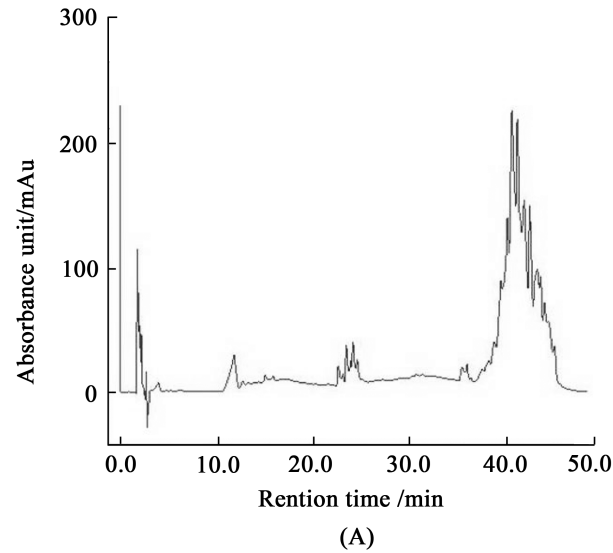


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis analysis of the construction of integrational vectors

Lane M; DNA marker; Lanes 1-2 were PCR fragments amplified by primers P1/P2 and P3/P4 using NCD-2 DNA as template; Lane 3 was PCR fragment amplified by primers P1/P4 using NCD-2 (Δ fen) DNA as template; Lane 4 was PCR fragment amplified by primers P1/P4 using NCD-2 DNA as template.

2.3 NCD-2 菌株野生型及其突变子 NCD-2 (Δfen) 脂肽提取物的高效液相色谱分析

将盐酸沉淀法提取的 NCD-2 野生型菌株及其突变子脂肽类物质,经 FPLC 分析表明,野生型 NCD-2 菌株在 39.41 - 48.95 min 处出现响应峰值,前期研究证实,该峰为 fengycin 检测峰(图 4-A)。与 NCD-2 野生型菌株相比,突变子 NCD-2 (Δfen) 在 39.41 - 48.95 min 处没有出现明显的响应峰值(图 4-B),证明突变子 NCD-2 (Δfen) 丧失了产生 fengycin 的能力。



2.4 NCD-2 菌株及其突变子对番茄灰霉病菌的拮抗活性比较

在 PDA 培养基上比较了 NCD-2 野生型菌株及其突变子对番茄灰霉病菌的抑菌活性。结果发现,NCD-2 野生型菌株对番茄灰霉病菌表现出明显的抑菌活性,而突变子对番茄灰霉病菌的抑菌活性显著降低(图 5-A)。采用牛津杯法比较了野生型 NCD-2 和突变子的脂肽提取物对番茄灰霉病菌的抑菌活性,结果表明,NCD-2 野生型菌株的脂肽提取物对番茄灰霉病菌表现出较强的抑菌活性,而

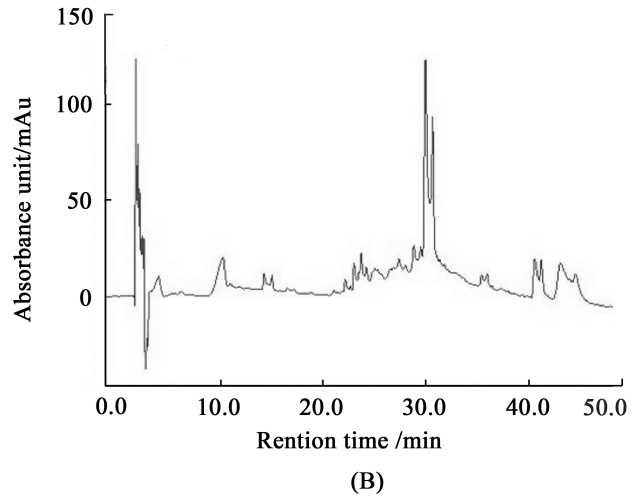


Fig. 4 FPLC analysis of fengycin synthesis from *Bacillus subtilis* NCD-2 wild type strain (A) and fengycin deficient mutant strain NCD-2 (Δfen) (B)

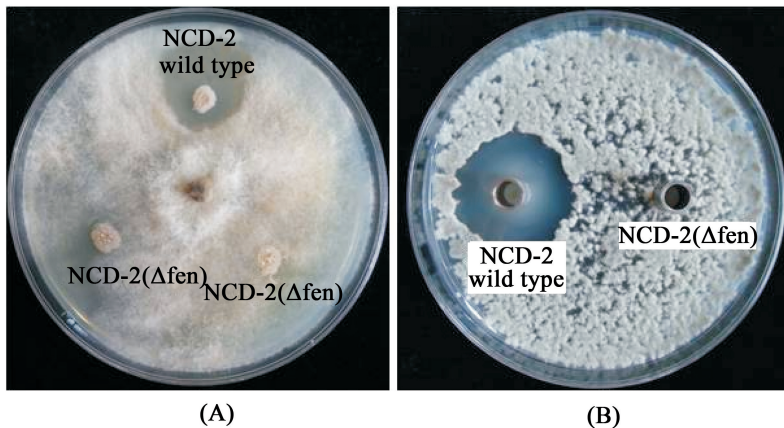


Fig. 5 Inhibition of the growth of *Botrytis cinerea* in vitro

A: Inhibition of the growth of *B. cinerea* by *B. subtilis* NCD-2 wild type and its mutant strain NCD-2 (Δfen);
 B: Inhibition of the growth of *B. cinerea* by the lipopeptides extracted from *B. subtilis* NCD-2 wild type and its mutant strain NCD-2 (Δfen).

突变子的脂肽提取物几乎完全丧失了对番茄灰霉病菌的抑菌活性(图 5-B),证明 fengycin 在 NCD-2 菌株对灰霉病菌的抑制作用中发挥主要功能。

2.5 NCD-2 菌株野生型及其 *fenC* 突变子对番茄灰霉病的防治作用

在离体叶片上比较了野生型 NCD-2 菌株及其突变子脂肽提取物和菌体细胞对番茄灰霉病的防治作用(图 6)。接种 5 d 后,对照处理的叶片出现大面积灰褐色病斑,并且病斑上着生大量灰色霉层。NCD-2 野生型菌株不论是脂肽提取物还是菌体细胞处理的叶片没有明显的发病迹象,而突变子 NCD-2(Δfen)的脂肽提取物或菌体细胞处理的叶片均出现明显的灰霉病斑,尽管相对对照而言病斑面积有所减小,但在灰褐色病斑上面仍然着生大量的灰色霉层。证明在离体叶片上,NCD-2 野生型菌株的脂肽提取物或菌体细胞对番茄灰霉病具有较理想的防治作用,而突变子 NCD-2(Δfen)的脂肽提取物或菌体细胞显著降低了对番茄灰霉病的防治作用。

3 讨论

目前对枯草芽胞杆菌中脂肽类抗生素的鉴定

主要采用液谱分析结合质谱鉴定,根据物质的保留时间和分子量判断物质的性质^[21,22],而通过分子遗传学手段对活性物质进行验证的研究报道较少。本研究从 NCD-2 菌株中分离纯化出一种对番茄灰霉病菌具有较强活性的抑菌物质,液谱分析发现,该物质与解淀粉芽胞杆菌(*B. amyloliquefaciens*) FZB42 菌株中的 fengycins 具有相同的保留时间(结果未列出),经质谱分析发现该物质与 fengycin 的分子量相匹配,据此推断该活性物质为 fengycin 类抗生素。为进一步证明 NCD-2 菌株产生的抑菌活性物质为 fengycin,本研究通过同源重组技术对 NCD-2 菌株中编码 fengycin 合成酶的基因 *fenC* 进行了缺失突变,通过液谱分析证明,突变子丧失了产该抑菌活性物质的能力,据此确认该活性物质为 fengycin。

Fengycin 对多种植物病原真菌,尤其是丝状真菌具有较强的拮抗作用,其作用机理是作用于病原菌细胞壁的一类脂层,从而破坏细胞膜的结构和透性^[5]。目前已有报道证明 fengycin 对番茄灰霉病菌表现较强的拮抗活性,如 Li 等^[23]研究发现,枯草芽胞杆菌 BAB-1 菌株所产生的 fengycin 对番茄灰霉病菌表现较强的拮抗活性,并且造成灰霉病菌

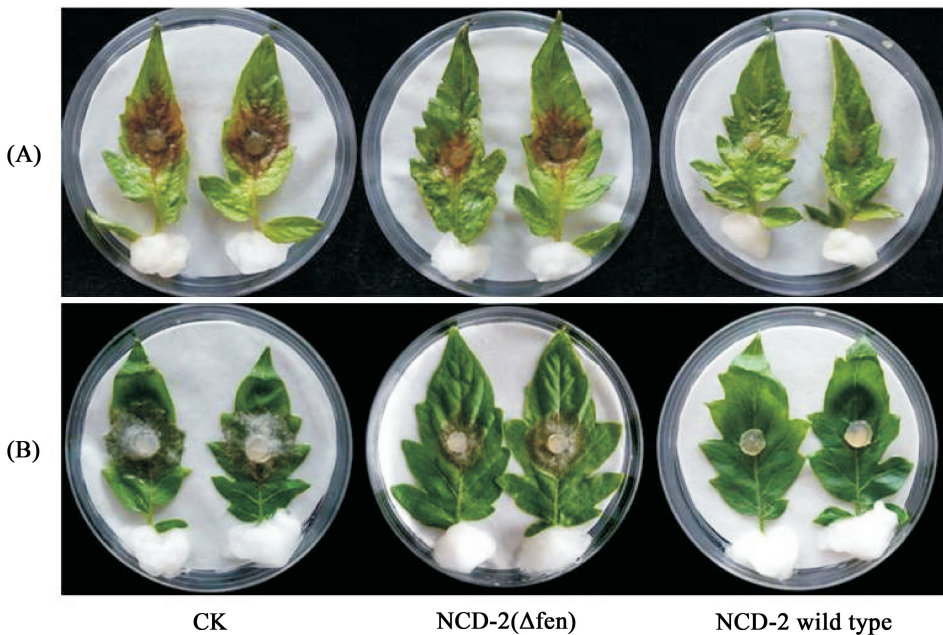


Fig. 6 Control of tomato gray mold by the lipopeptides (A) and bacterial suspension (B) from *Bacillus subtilis* NCD-2 wild type and its mutant *in vivo*

菌丝膨大、畸形,部分原生质体外渗, Toure 等^[24]也发现 fengycin 对灰霉病菌具有抑菌活性。然而由于这些生防菌株同时产生多种抑菌物质,如 surfactin、iturin A、bacillomycin D 和 mycosubtilin 等,因此无法明确 fengycin 在生防枯草芽胞杆菌抑菌功能中所发挥的作用。通过分子遗传学手段,对生防菌株中抑菌物质的编码基因进行突变,比较野生型生防菌株和突变子对病原菌的抑菌活性,可确定生防菌中发挥主要抑菌作用的活性物质^[25]。解淀粉芽胞杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) C06 菌株同时产生脂肽类抗生素 bacillomycin D 和 fengycin,通过基因突变技术分别获得丧失 bacillomycin D 和 fengycin 合成能力的突变子,抑菌活性测定表明, fengycin 在 C06 菌株抑制褐腐病菌 (*Monilinia fructicola*) 发挥主要作用^[26]。Yanez-Mendizabal 等^[27]研究发现,尽管枯草芽胞杆菌 CPA-8 菌株可以产生 fengycin、iturin A 和 surfactin 等多种脂肽类抗生素,但丧失 fengycin 合成能力的突变子完全丧失了对 *M. fructicola* 的抑菌活性,该结果同样证明 fengycin 在抑菌活性中发挥主要的作用。本研究对 NCD-2 菌株中 fengycin 合成酶基因 *fenC* 进行了缺失突变,结果发现,同野生型 NCD-2 菌株相比,丧失产 fengycin 的突变子显著降低了对番茄灰霉病菌的拮抗活性;进一步在离体叶片上比较了 NCD-2 菌株野生型及其突变子的脂肽提取物对番茄灰霉病的防治作用,结果证明,同 NCD-2 菌株野生型相比,其突变子的脂肽提取物也丧失了对番茄灰霉病的防治作用。由此说明, fengycin 在枯草芽胞杆菌 NCD-2 菌株抑制灰霉病菌生长以及防治番茄灰霉病中发挥了主要作用。

枯草芽胞杆菌基因组中大约 5% 的基因用于编码抑菌物质^[31],其中包括脂肽类抗生素,如 fengycin、surfactin、iturin A、bacillomycin D、mycosubtilin 等,但这并不意味着同一菌株在生长代谢过程中能够同时产生这些抑菌物质,某些抗生素编码基因或其启动子只有在某些特定的生长阶段或特定环境下才表达^[28]。通过对 NCD-2 菌株的全基因组序列进行分析发现, NCD-2 菌株基因组中存在多个脂肽类物质的编码基因簇,其中包括编码 surfactin 的 *sf* 基因簇、编码 bacillomycin D 的 *bmy* 基因簇、编码 fengycin 的 *fen* 基因簇以及编码 bacillaene 的 *pks* 基因簇,由于本研究采用了适合

fengycin 合成的 3 号培养基(数据未发表),因此 NCD-2 菌株的脂肽提取物中主要为 fengycin。但本研究发现,缺失 *fenC* 基因的突变子虽然丧失了 fengycin 的合成能力,但突变子中产生了一种新的物质, FPLC 结果发现,该物质与 bacillomycin D 的保留时间基本一致,质谱分析结果发现该物质与 bacillomycin D 具有一致的分子量(结果未列出),因此推测,缺失突变 *fenC* 基因造成 fengycin 合成能力丧失,但增加了突变子中 bacillomycin D 的合成。通过 RT-PCR (reverse transcription PCR) 技术分析突变 *fenC* 基因后 bacillomycin D 合成酶基因的表达情况,将会从分子水平明确 *fenC* 基因对 bacillomycin D 合成能力的影响。

参考文献

- [1] Montesinos E. Antimicrobial peptides and plant disease control [J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 270 (1): 1–11.
- [2] Jacques P. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. [J]. Biosurfactants, 2011, 20: 57–91.
- [3] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions [J]. Molecular Microbiology, 2005, 56(4): 845–857.
- [4] Arrebola E, Jacobs R, Korsten L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(2): 386–395.
- [5] Deleu M, Paquot M, Nylander T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes [J]. Biophysical Journal, 2008, 94 (7): 2667–2679.
- [6] Maget-Dana R, Thimon L, Peypoux F, et al. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A [J]. Biochimie, 1992, 74(12): 1047–1051.
- [7] Tao Y, Bie X, Lv F, et al. Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of commercial surfactin against *Rhizopus stolonifer* [J]. The Journal of Microbiology, 2011, 49(1): 146–150.

- [8] Ongena M, Duby F, Jourdan E, *et al.* *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(5): 692–698.
- [9] Ongena M, Jourdan E, Adam A, *et al.* Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(4): 1084–1090.
- [10] Li S Z, Lu X Y, Ma P, *et al.* Evaluation of biocontrol potential of a bacterial strain NCD-2 against cotton verticillium wilt in field trials (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathology Sinica (植物病理学报)*, 2005, 35(5): 451–455.
- [11] Meng L H, Li S Z, Guo Q G, *et al.* Primary analysis on the antifungal activity of the protein produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 against *Verticillium dahliae* (in Chinese) [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica (华北农学报)*, 2008, 23(1): 189–193.
- [12] Wei Y H, Wang L C, Chen W C, *et al.* Production and characterization of fengycin by indigenous *Bacillus subtilis* F29-3 originating from a potato farm [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11(11): 4526–4538.
- [13] Liu N, Guo Q G, An H, *et al.* Identification of biocontrol bacterial strain BAB-1 against tomato grey mold and optimization of fermentation conditions (in Chinese) [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology (中国农业科技导报)*, 2009, 11(2): 56–62.
- [14] Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens [J]. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8(63): 1–12.
- [15] Leenders F, Stein T H, Kablitz B, *et al.* Rapid typing of *Bacillus subtilis* strains by their secondary metabolites using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of intact cells [J]. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 1999, 13(10): 943–949.
- [16] Martin P, Lohr J, Dean D. Transformation of *Bacillus thuringiensis* protoplasts by plasmid deoxyribonucleic acid [J]. *Journal of Bacteriology*, 1981, 145(2): 980–983.
- [17] Arnaud M, Chastanet A, Debarbouille M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(11): 6887–6891.
- [18] Wang Y, Deng C, Peng Q, *et al.* Effect of quorum sensing response regulator *nprR* deletion on expression of Cry protein in *Bacillus thuringiensis* (in Chinese) [J]. *Acta Microbiological Sinica (微生物学报)*, 2010, 50(11): 1550–1555.
- [19] De Faria A F, Stefani D, Vaz B G, *et al.* Purification and structural characterization of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis* LSFM-05 grown on raw glycerol [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2011, 38(7): 1–9.
- [20] Wu C Y, Chen C L, Lee Y H, *et al.* Nonribosomal synthesis of fengycin on an enzyme complex formed by fengycin synthetases [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282: 5608–5616.
- [21] Hu L B, Shi Z Q, Zhang T, *et al.* Fengycin antibiotics isolated from B-FS01 culture inhibit the growth of *Fusarium moniliforme* Sheldon ATCC 38932 [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 272(1): 91–98.
- [22] Vater J, Kablitz B, Wilde C, *et al.* 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 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12): 6210–6219.
- [23] Li B Q, Lu X Y, Guo Q G, *et al.* Isolation and identification of lipopeptides and volatile compounds produced by *Bacillus subtilis* strain BAB-1 (in Chinese) [J]. *Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学)*, 2010, 43(17): 3547–3554.
- [24] Toure Y, Ongena M, Jacques P, *et al.* Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis*

- cinerea* on apple [J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(5): 1151–1160.
- [25] Zeriouh H, Romero D, Garcia-Gutierrez L, *et al.* The Iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2011, 24(12): 1540–1552.
- [26] Liu J, Zhou T, He D, *et al.* Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola* [J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2011, 20(1): 43–52.
- [27] Yanez-Mendizabal V, Zeriouh H, Vinas I, *et al.* Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides [J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 132(4): 1–11.
- [28] Ke W J, Chang B Y, Lin T P, *et al.* Activation of the promoter of the fengycin synthetase operon by the UP element [J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(14): 4615–4623.

责任编辑:于金枝

欢迎订阅《植物病理学报》

《植物病理学报》是中国植物病理学会主办的全国性学术刊物,“中国科技核心期刊”。主要刊登植物病理学各分支未经发表的专题评述、研究论文和研究简报等,以反映中国植物病理学的研究水平和发展方向,推动学术交流,促进研究成果的推广和应用。

本刊现已被英国农业与生物技术文摘(CAB)、联合国粮农组织 AGRIS 等收录。据《中国科技期刊引证报告》(2012 年版)统计结果,《植物病理学报》影响因子 0.836。荣获首届《中国学术期刊检索与评价数据规范》(CAJ-CD)执行优秀期刊奖和 2012 中国国际影响力优秀学术期刊奖。

本刊为双月刊,每期定价 30 元,全年 6 期共 180 元。

邮发代号:82-214。欢迎投稿,欢迎订阅。

编辑部地址:北京市海淀区圆明园西路 2 号 中国农业大学植保楼 406 室

邮编:100193

电话:(010) 6273 2364

E-mail:zwblxb@cau.edu.cn。