

禾谷镰刀菌拮抗菌 *Bacillus amyloliquefaciens* AX-3 的分离鉴定及拮抗物质的鉴定

徐丽梅^{1,2*}, 赫丹^{2*}, 王刚², 徐圣佳^{1,2}, 史建荣², 徐剑宏^{1,2**}

(1. 南京农业大学生命科学学院/农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095; 2. 江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地/农业农村部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室/农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(南京)/江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心/江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 南京 210014)

摘要: 禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* 可引起小麦赤霉病, 该病严重威胁我国小麦的质量安全。本研究从生物防治的角度出发, 分离筛选拮抗菌, 研究拮抗菌的拮抗特性和拮抗能力。试验采用系列稀释法和平板对峙法从小麦样品中分离筛选获得禾谷镰刀菌拮抗菌 AX-3, 根据 16S rDNA 基因、*gyrB* 基因序列构建的系统发育进化树以及生理生化特性结果, 菌株 AX-3 被鉴定为解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*。通过平板对峙法测定拮抗谱, 结果显示 AX-3 对多种镰刀菌属病原真菌都具有良好的拮抗特性, 抑菌圈半径为 17~32 mm, 表明 AX-3 具有广谱的拮抗性能。采用柱层析及制备液相色谱法对 AX-3 中的拮抗物质进行分离纯化, 然后使用高分辨质谱及核磁共振的方法对拮抗物质进行结构鉴定表明, 解淀粉芽胞杆菌 AX-3 产生的一种抗菌物质为 macrolactin A。

关键词: 禾谷镰刀菌; 解淀粉芽胞杆菌; 拮抗物质

中图分类号: S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261(2020)01-0125-10

Isolation, Identification of Antagonistic Bacteria AX-3 against *Fusarium graminearum* and Identification of Its Antagonistic Substance

XU Limei^{1,2*}, HE Dan^{2*}, WANG Gang², XU Shengjia^{1,2}, SHI Jianrong², XU Jianhong^{1,2**}

(1. Key Laboratory of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture/College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety-State Key Laboratory Cultivation Base, Ministry of Science and Technology/Key Laboratory for Control Technology and Standard for Agro-product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory for Agro-product Safety Risk Evaluation (Nanjing), Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety/Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: *Fusarium graminearum* can cause Fusarium Head Blight (FHB) which seriously threatens the quality and safety of wheat in China. In this study, from the perspective of biological control, we want to isolate antagonistic bacteria, study the antagonistic characteristics and use it in the biological control of FHB. Antagonistic AX-3 against *Fusarium graminearum* was isolated from wheat samples by serial dilution and confrontation culture. According to phylogenetic tree constructed by 16S rDNA gene and *gyrB* gene sequences and physiological and biochemical characteristics, strain AX-3 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. The antagonistic spectrum of AX-3 was studied by confrontation culture, and the results showed that strain AX-3 had strong antagonistic

收稿日期: 2019-04-16

基金项目: 江苏省农业科技创新基金 (CX(17)1003); 国家自然科学基金 (31872914, U1604234); 国家重点研发计划 (2018YFD0200500)

作者简介: *共同第一作者, 徐丽梅, 硕士研究生, E-mail: 1157810106@qq.com; 赫丹, 实习研究员, E-mail: danhe58@163.com; **通信作者, 教授, E-mail: xujianhongnj@126.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.01.008

activities against many species of *Fusarium* pathogens, and its bacteriostatic circle radius is 150–280 mm, which indicating that AX-3 had broad-spectrum antagonistic properties. The antagonists in the strain AX-3 were separated and purified by column chromatography and preparative liquid chromatography, and then their structures were identified by high-resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The results showed that one of the antagonistic substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* AX-3 was macrolactin A.

Key words: *Fusarium graminearum*; *Bacillus amyloliquefaciens*; antagonistic substance

小麦赤霉病 (*Fusarium head blight*, FHB) 是由禾谷镰刀菌 *F. graminearum* 引起的一种世界性真菌病害^[1]。它不仅造成小麦产量减少, 品质降低, 而且产生的镰刀菌毒素会对人畜健康构成严重威胁^[2,3]。在中国, 赤霉病的发生主要集中于长江中下游和华南冬麦区及东北春麦区东部, 而黄河流域及其他地区在近几年也开始发生并日趋严重^[4-6]。小麦赤霉病的防治手段有化学防治、农业防治和生物防治^[4]。目前, 主要依赖于喷洒化学农药控制病害, 但是长期使用农药导致农药残留超标、病原菌耐药性增加、环境污染等一系列问题^[7-9]。生物防治无残留、无污染、对人畜无害等特点使其具有广泛的应用前景^[6-9]。因此, 分离筛选能够对禾谷镰刀菌高效拮抗作用的菌株, 研制新的生防菌剂并投入生产应用已成为人们关注的热点^[8-10]。

解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 属于芽胞杆菌属, 是一类能够产生淀粉酶使淀粉水解的细菌。据文献报道, 该菌株最早是由 Priest 发现并鉴定的, 20 世纪 80 年代以前很少有解淀粉芽胞杆菌在生物防治方面的报道, 但近年来, 其作为生防菌逐渐被人们认识并且成为研究关注的热点^[11,12]。解淀粉芽胞杆菌能够产生丰富的具有潜在生物防治和其他工业应用价值的抗菌物质, 包括脂肽类、聚酮类、磷脂类、氨基酸类和核酸类等低分子量的抗生素及抗菌蛋白和多肽等活性物质, 可以抑制多种病原, 且具有绿色、安全、高效等优势, 在植物病害生物防治中发挥重要作用^[13-16]。王军华等^[17,18]从土壤中分离到了一株解淀粉芽胞杆菌 Q-12, 营养需求条件简单、环境适应能力强, 它在生长过程中产生的抗菌活性物质可以强烈地抑制镰刀菌、曲霉、青霉、毛霉等引起食物腐败的真菌, 在生物农药、生物肥料或食品防腐剂方面具有很高的应用前景。孙梅等^[19]采用体外抑菌试验、共培养试验的方法筛选了一株对水产病原菌具有拮抗作用的解淀粉芽胞杆菌 JSSW-LA。Sun 等^[20]从中国药用植物黄芩中分离得到菌株 ES-2, 经系统发育和生理特性研究表明, 该菌株为解淀粉芽胞杆菌, 它能够产生 2 个具有广谱抗菌和抗真菌活性的次生代谢产物。Chen 等^[21]从海洋沉积物中筛选到解淀粉芽胞杆菌 SH-B10, 并鉴定它产生的两种抗真菌脂肽。

解淀粉芽胞杆菌普遍存在于自然界中, 其自身代谢产物种类繁多, 且能够对多种真菌与细菌产生抑制作用, 具有广谱抑菌性^[15,19], 所以, 其作为生防菌对小麦赤霉病防治具有广阔的应用前景。我们期望能分离筛选到高效的镰刀菌拮抗菌株, 研制新的生防菌剂并投入小麦赤霉病的生物防控应用。本试验从小麦样品中筛选到一株对禾谷镰刀菌具有高效拮抗功能的解淀粉芽胞杆菌 AX-3, 并对其拮抗物质进行分离、纯化与鉴定, 以探索其对禾谷镰刀菌的拮抗机理, 同时采用盆栽试验分析拮抗菌对小麦根际土壤中禾谷镰刀菌的影响, 最终研究其对禾谷镰刀菌的防效, 为解淀粉芽胞杆菌 AX-3 及其代谢产物的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 分离拮抗菌的材料来源 从江苏省各县市采集到 300 余份小麦样品, 装入自封袋中保存备用。

1.1.2 供试菌株 拮抗细菌为解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* AX-3, 为本试验分离获得。禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* GZ3639, 厚垣镰刀菌 *F. chlamyosporum*, 雪腐镰刀菌 *F. nivale*, 茄病镰刀菌 *F. solani*, 禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis*, 灰霉病菌 *Botrytis cinerea*, 番茄早疫病菌 *Alternaria solani*, 轮状镰刀菌 *F. verticillioides*, 禾谷镰刀菌 *F. graminearum*, 黄色镰刀菌 *F. culmorum*, 胶孢镰刀菌 *F. subglutinans*, 燕麦镰刀菌 *F. avenaceum*, 黑附球菌 *Epicoccum nigrum*, 木贼镰刀菌 *F. equiseti*, 三线镰刀菌 *F. tricinctum*, 烟炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporides*, 亚洲镰孢菌 *F. asiaticum* 均为本实验室保存。

1.1.3 培养基及试剂 肉汤培养基(LB, pH 7.2): 蛋白胨 10.0 g/L, 酵母膏 5.0 g/L, NaCl 10.0 g/L (pH 7.2), 固体培养基加入琼脂 15~20 g/L, 121 °C 灭菌 20 min。马铃薯葡萄糖培养基(PDA): 土豆 200 g, 葡萄糖 10 g, 自然 pH, 琼脂 15~20 g, 用蒸馏水定容至 1 L, 将土豆洗净去皮, 切成 1 cm 见方小块, 沸水煮 30 min, 用四层纱布将其过滤后向滤液里加入葡萄糖及琼脂, 溶解均匀后补充蒸馏水至 1 L, 自然 pH, 115 °C 灭菌 30 min。AW (agar and wheat) 培养基: 研磨小麦粒 15 g, 琼脂 15~20 g, 沸水煮 5~10 min 至产生大量浮沫, 自然 pH, 四层纱布过滤 3 次, 用蒸馏水定容至 1 L, 115 °C 灭菌 30 min。绿豆培养基: 绿豆 30 g, 洗净后放入沸水中煮至开花, 用纱布过滤, 自然 pH, 将滤液用蒸馏水补至 1 L, 121 °C 灭菌 20 min。芽孢杆菌培养基 (pH 7.0~7.2): (NH₄)₂HPO₄ 1 g/L, KCl 0.2 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, 酵母膏 0.2 g/L, 琼脂 5 g/L, 葡萄糖 10 g/L, 溴甲酚紫 (0.04%) 15 mL/L, 分装试管, 培养基高度 4~5 cm, 115 °C 灭菌 30 min。酵母粉和蛋白胨购自 OXIOD 公司, 葡萄糖、NaCl、硫代硫酸钠、3%~10%过氧化氢、(NH₄)₂HPO₄、KCl、酵母膏、琼脂、葡萄糖、溴甲酚紫购于南京宁试化学试剂有限公司。连接酶、DNA marker、限制性内切酶、PCR Master Mix 购自 TaKaRa 公司。E.Z.N.A.® Plasmid Midi Kit、OMEGA Gel Extraction Kit、E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit 由南京依贝生物有限责任公司购买。细菌基因组 DNA 提取试剂盒由南京东纳生物科技有限公司购买。蔬菜栽培基质(江苏省明天农牧科技有限公司)。PowerSoil DNA Isolation Kit 提取土壤 DNA 试剂盒(MO BIO)、QuantiFastTMSYBR green 荧光定量 PCR 试剂盒(Qiagen, Germany)、抗生素均购自大连宝生物工程有限公司。硝酸盐还原试验试剂盒、甲基红试剂、卢哥尔氏碘液、明胶均购自北京雷根生物技术有限公司。PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 禾谷镰刀菌拮抗菌的分离筛选与鉴定

1.2.1 禾谷镰刀菌拮抗菌的分离筛选 将活化后的禾谷镰刀菌 GZ3639 转接到 PDA 平板, 25 °C 培养 3~5 d 后接入绿豆培养基中, 25 °C、180 r/min 光照培养 3~5 d, 纱布过滤, 收集滤液, 即为禾谷镰刀菌孢子液, 调节孢子液浓度至 10⁵ 孢子/mL, 放入冰箱保存备用。分别称取 20 g 麦粒样品放入 250 mL 三角瓶中, 用无菌水、75%乙醇浸泡洗涤 2 次, 粉碎机研磨后加入适量无菌水, 摇匀后进行梯度稀释, 取 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 稀释液 100 μL, 分别涂布于 LB、PDA、AW 培养基上, 每个浓度梯度重复 3 次, 30 °C 倒置培养 1~3 d, 获得内生菌。待平板上长出单菌落, 将已备好的孢子液喷于菌落表面, 静置 30 min, 30 °C 倒置培养 2 d, 观察并挑选可产生抑菌圈的单菌落, 重复初筛步骤, 进行拮抗菌的复筛, 连续分离纯化后, 最终得到具有拮抗功能的菌株。取验证有拮抗效果的单菌落进行抑菌效果的对比试验, 每个拮抗菌重复 3 次, 用交叉法测定抑菌圈直径 D 和菌落直径 d, 抑菌圈半径 R = (D - d) / 2, 计算抑菌圈半径 R 与菌落直径 d 的比值^[22], 根据比值的大小确定其抑菌效果。

1.2.2 禾谷镰刀菌拮抗菌的鉴定 参照《伯杰氏细菌系统鉴定手册》^[23]与《常见细菌系统鉴定手册》^[24]对菌株 AX-3 进行生理生化测定。AX-3 菌液的获取: 挑取 AX-3 单菌落, 接种到液体 LB 培养基中, 30 °C, 180 r/min, 培养 12 h 即可。需氧性试验: 用一小环菌液穿刺接种到半固体培养基试管中, 穿刺到管底, 30 °C 培养 3~7 d 观察结果; 过氧化氢酶测定: 将菌株 AX-3 接种于肉汤琼脂斜面上, 30 °C 培养 1~2 d, 将 3%~10%过氧化氢加入斜面上, 观察有无气泡产生; 硝酸盐还原试验: 将菌株 AX-3 接种于硝酸盐培养基, 培养 1~4 d, 按照硝酸盐还原实验试剂盒说明书取 0.1 mL 硝酸盐还原试验试剂, 加入培养基中, 立即观察结果; 乙酰甲基甲醇试验 (V-P): 将菌株 AX-3 接种于肉汤培养液中 30 °C 培养 4 d, 取 2 mL 菌液和等量 40% NaOH 混合, 充分振荡, 2~5 min 后观察是否呈红色; 甲基红试验: 按照试剂说明书, 向培养好的菌株 AX-3 菌液中滴加甲基红试剂, 观察颜色变化; 淀粉水解试验: 将菌株 AX-3 接种于肉汤培养基平板上, 30 °C 培养 2~4 d, 形成菌落后, 在平板上滴加卢哥尔氏碘液, 以铺满菌落为度, 观察; 明胶水解试验: 将 AX-3 菌液用接种针穿刺接种于明胶培养基试管中, 20 °C 培养 2~5 d, 观察明胶液化情况; 硫化氢试验: 在含有硫代硫酸钠的培养基中, 沿管壁穿刺接种, 36 °C 培养 24~28 h, 培养基呈黑色为阳性, 阴性应继续培养至 6 d; 糖、醇类发酵试验: 将 AX-3 菌液穿刺接种于芽孢杆菌培养基试管中, 30 °C 培养 2 d, 如果指示剂变黄, 表示产酸, 为阳性, 不变或变蓝(紫)则为阴性。用引物 27F: 5'-AGAGTTTGAT CMTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 扩增 16S rDNA; 引物 UP-1: 5'-GAAGTCAT CATGACCGTTCTGCA-3', UP-2Sr: 5'-GCAGGGTACGGATGTGCGAGCC-3'

扩增 *gyrB* 基因; 16S rDNA 扩增反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。 *gyrB* 基因扩增反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min, 将扩增获得的 PCR 产物送至上海生工测序部测序, 测序所得基因序列登录 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 进行 Blast 分析, 挑选相似度大于 95% 的序列, 用 MEGA5.1 软件进行核酸序列同源性分析, 构建系统发育树^[25]。

1.2.3 禾谷镰刀菌拮抗菌拮抗谱测定 将实验室保存的 16 种常见植物病原真菌活化。准备 PDA 培养基: 在平板上先倒一层薄层 PDA 培养基, 待培养基凝固后, 每个平板在等距离中央约 2.5 cm 的位置放 4 个牛津杯, 再倒 PDA 培养基, 待培养基凝固后形成 4 个距中央等距离, 大小一致的孔。准备拮抗菌 AX-3 菌液, 取 75 μ L 菌液, 加入到 4 个孔里。将活化的病原真菌的平板分别打孔转接至 PDA 平板中央, 以未加拮抗菌的病原菌的平板做对照, 28 °C 培养 5 d, 与对照组比较观察有无抑菌圈, 每个处理设 3 个重复。

1.3 拮抗物质的鉴定

1.3.1 拮抗物质的分离 将菌株 AX-3 接种在含 Amberlite XAD16 非离子型大孔树脂 (2 g/mL) 的 6 L LB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 30 h, 过滤并用去离子水不断冲洗树脂, 最后收集树脂; 向树脂中加入 200 mL 的甲醇解吸液, 30 °C、180 r/min 洗涤 24 h, 过滤并收集解吸液, 重复操作 3 次, 将收集到的解吸液用旋转蒸发器蒸发浓缩称重, 称取 15 g 硅胶粉与浓缩物在研钵中混合搅拌均匀, 用二氯甲烷做搅拌液, 放入通风橱吹干; 加入 2 倍体积的二氯甲烷浸泡, 浸泡液倒入层析柱中, 用二氯甲烷和甲醇 (体积比分别为 100:0、100:2、100:8、100:18、0:100) 的洗脱液洗脱柱子, 每个体积比收集 1 L 洗脱液合并后旋转蒸干, 用甲醇溶解; 吸取 70 μ L 的甲醇溶解物加到 LB 平板上, 喷禾谷镰刀菌孢子液, 30 °C 倒置培养 2 d, 观察拮抗活性; 将有拮抗活性的收集样品过 C18 反相柱, 收集洗脱液, 旋转蒸干后用 450 μ L 甲醇溶解, 分别在已打孔的牛津杯 LB、PDA 培养基的孔中加入甲醇溶解液 10 μ L, 待孔中甲醇完全吸收后喷禾谷镰刀菌孢子液, 30 °C 倒置培养, 观察有无拮抗活性。

1.3.2 拮抗物质的纯化与鉴定 通过高效液相色谱对未知拮抗物质进行全波长扫描, 根据扫描图中的峰值, 选择在 220 和 254 nm 处对未知拮抗物质进行高效液相色谱分析, 流动相为甲醇—水 (V:V=9:31), 流速为 2 mL/min。使用相色谱对拮抗物质进行进一步分离。根据出峰时间图, 物质开始出峰后, 把 8~15 min 的物质, 以 5 s/管的速度收集制备管中流出的液体。最后将第 11~24 管的收集液混合在一起, 25~50 管的收集液混合在一起 (共收集 90 管), 将收集的物质旋转蒸发器蒸干后, 重新用甲醇溶解, 然后进行拮抗性能检测, 收集确定有拮抗性能的收集液备用, 并将收集的物质分两部分, 一部分用氘代甲醇溶解, 一部分用色谱甲醇溶解, 分别进行核磁共振和质谱检测, 核磁共振和质谱检测委托南京大学分析测试中心完成。

1.4 拮抗菌对小麦根际土壤中禾谷镰刀菌的影响

土壤和营养土按 4:1 混合后, 平均分成 18 份 (每份 2.0 kg), 取 3 份混合土壤作空白对照, 将禾谷镰刀菌孢子液 (浓度为 5×10^3 孢子/mL) 均匀的喷洒在剩余的混合土壤上, 多次混匀后, 使得土壤中的孢子终浓度为 60 个/g 土壤, 把这些含有孢子的土壤平均分成 15 份, 3 份作为阳性对照, 3 份加入 60 mL 拮抗菌 AX-3 发酵液 (处理 1), 3 份加入 60 mL 拮抗菌 AX-3 发酵液离心 (4 °C, 1000 r/min \times 10 min) 后的上清液 (处理 2)、3 份加入 50 g 活性炭和 60 mL 拮抗菌 AX-3 发酵液 (处理 3)、3 份加入 60 mL 拮抗菌 AX-3 发酵液及种子包衣剂 (处理 4), 各处理分别和土壤搅拌均匀后播种小麦并放入温室大棚 (25 °C) 中生长, 分别在小麦播种后的第 20 d、第 30 d、第 40 d、第 70 d 采集小麦根部土壤, 按照 PowerSoil™ DNA Isolation Kit 试剂盒说明书的使用方法提取土壤总 DNA, 将提取的土壤总 DNA 作为模板, 采用禾谷镰刀菌特异引物 (引物序列: ITS-Fu-F: 5'-CAACTCCCAAACCCCTGTGA-3'; ITS-Fu-R: 5'-GCGACGATTACCA GTAACGA-3') 进行实时荧光定量 PCR。荧光定量 PCR 反应体系如下: ddH₂O 20 μ L, 10 \times *Taq* buffer (Mg²⁺ plus) 2.5 μ L, 10 \times *Taq* buffer (Mg²⁺ plus) 2.0 μ L, dNTP mixer (10 mmol/L) 2.0 μ L, 正向引物 (10 μ mmol/L) 0.25 μ L, 反向引物 (10 μ mmol/L) 0.25 μ L, *Taq* 酶 (5U/ μ L) 0.125 μ L, 模板 1 μ L; 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 57 °C 20 s, 72 °C 20 s, 32 个循环; 在 Rotor Gene 6000 荧光定量 PCR 仪上进行曲线、标准曲线及熔解曲线的绘制), 通过比较 5 组小麦根际土壤中禾谷镰刀菌的数量, 从而判断不同处理方式下拮抗菌的拮抗效果。

2 结果与分析

2.1 禾谷镰刀菌拮抗菌的分离筛选与鉴定

最终筛选得到一株对禾谷镰刀菌拮抗效果较好的菌株 AX-3 (图 1), 其在固体 LB 培养基上呈乳淡黄色不透明菌落、表面粗糙、有隆起、边缘不规则 (图 2A), 在蔡司扫描电镜 (EVO-LS10) 下呈杆状、圆柱状 (图 2B)。参照《伯杰氏细菌系统鉴定手册》与《常见细菌系统鉴定手册》, 部分生理生化鉴定结果显示为氧气、过氧化氢酶、硝酸盐还原、淀粉水解、明胶水解、糖醇类发酵、接触酶实验均为阳性, 而 V-P、甲基红、硫化氢试验呈阴性 (表 1)。

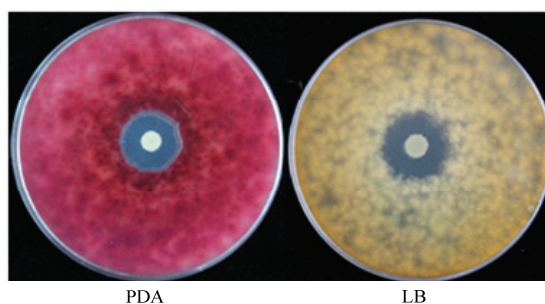
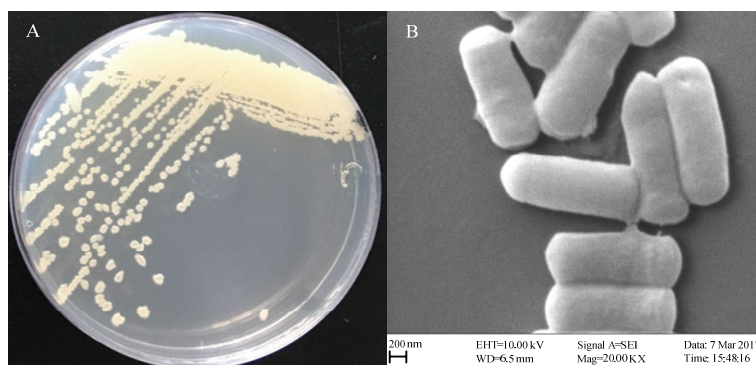


图 1 菌株 AX-3 对禾谷镰刀菌产生的抑菌圈

Fig. 1 Inhibition zone produced by strain AX-3 against *F. graminearum*



A: 菌株 AX-3 在 LB 平板上的菌落形态 Colony morphology of strain AX-3 on LB plate; B: 电子显微镜下的菌株 AX-3 的菌体形态 Morphology of strain AX-3 under electron microscopy

图 2 菌株 AX-3 的菌落形态

Fig. 2 The colony morphology of strain AX-3

表 1 菌株 AX-3 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of AX-3

试验 Test	结果 Result	试验 Test	结果 Result
氧气 O ₂	+	淀粉水解 Starch hydrolysis	+
过氧化氢酶 H ₂ O ₂	+	明胶 Gelatin	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	硫化氢 H ₂ S	-
V-P	-	糖、醇类发酵 Fermentation of sugar and alcohols	+
甲基红 Methyl red	-	接触酶 Contact enzyme	+

注: “+”表示利用或呈阳性反应; “-”即为阴性反应。

Note: “+” indicating utilization or positive reaction; “-” negative reaction.

结果表明, AX-3 的 16S rDNA 与菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* BCRC 11266 的基因序列的最高相似性为 99% (图 3)、其 *gyrB* 基因与菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* XH7T CP002927.51 的 *gyrB* 基

因相似性为 99% (图 4), 结合菌株 AX-3 的生理生化特征, 将该菌株鉴定为解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*。

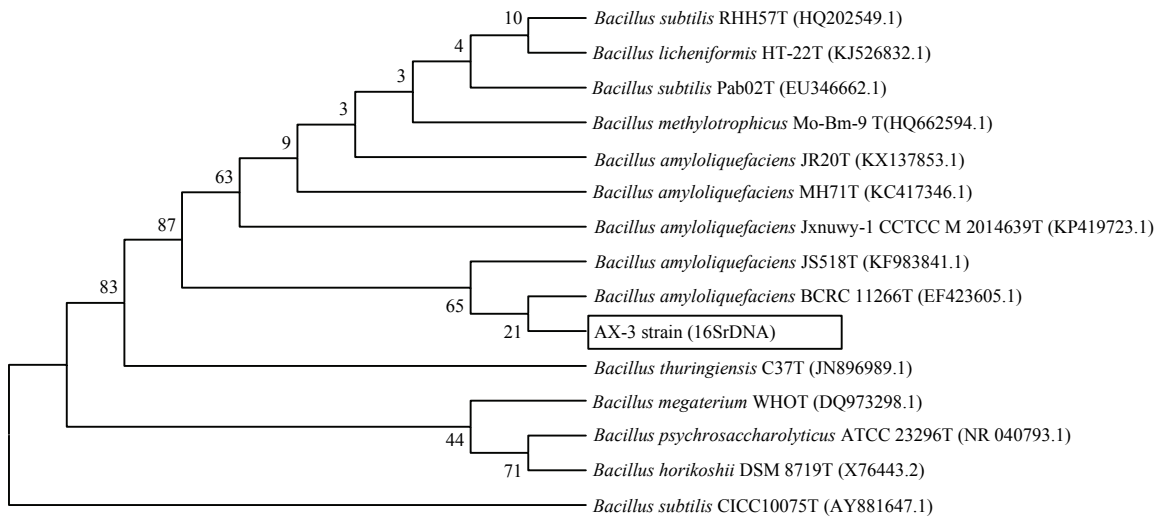


图 3 以 16S rDNA 序列为基础的菌株 AX-3 的系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain AX-3 based on 16S rDNA sequence

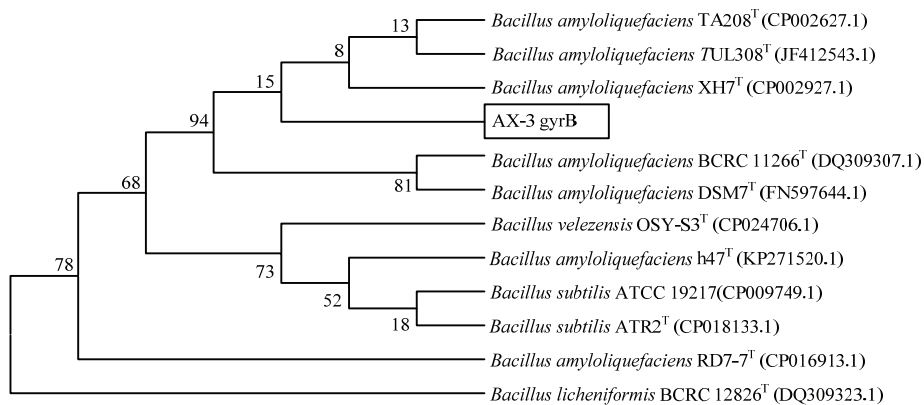


图 4 菌株 AX-3 的 gyrB 基因序列的系统发育进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the gyrB gene sequence of AX-3

以实验室保存的 16 株常见植物病原真菌为标靶, 通过平板对峙试验得到菌株 AX-3 对这些病原菌的拮抗菌谱。结果显示, 菌株 AX-3 对 16 种病原真菌均能产生明显的抑菌效果, 抑菌圈直径均在 17.4 mm 以上。其中对灰霉病菌的抑菌效果最好, 抑菌圈直径为 (30.1±4.1) mm, 黑附球菌次之 (29.4±2.2) mm, 对 11 种常见镰刀菌的抑菌圈直径均在 17.6 mm 以上, 以禾谷镰刀菌、三线镰刀菌和雪腐镰刀菌的抑菌效果最好 (>27.4 mm), 说明菌株 AX-3 具有广谱的拮抗特性 (表 2)。

2.2 拮抗物质的鉴定

从 Amberlite XAD16 非离子型大孔树脂洗脱下来的部分收集液对禾谷镰刀菌具有拮抗活力 (图 5)。对提取的物质进行全波长扫描, 发现可能有 3、4 个拮抗物质存在, 选取拮抗效果较好的组分收集液进行 C18 反相柱层析进一步分离纯化, 分别用 10%、20%、30%、40% 甲醇作为洗脱液进行洗脱, 经验证发现 40% 的洗脱液收集的样品有明显的拮抗圈 (图 6); 通过全波长扫描及高效液相色谱分析, 确定在波长为 254 nm, 流速为甲醇 0.45 mL/min、水 1.55 mL/min 时, 保留时间约为 8 和 11 min 时出现两个活性峰 (图 7), 使用制备液相色谱对拮抗物质进一步分离, 将各峰收集浓缩并进行拮抗性检测结果表明, 两个峰段的物质都有拮抗性 (图 8); 对发现的两种拮抗物质进行鉴定, 其中一个物质 (活性峰 A) 未检测到有效

表 2 拮抗菌株 AX-3 对 16 种病原菌的拮抗效果
Table 2 Antagonistic activities of strain AX-3 against 16 plant pathogens

病原菌 Pathogen	抑菌圈直径 Antibacterial circle diameter (mm)				平均值 Average value (mm)
厚垣镰刀菌 <i>F. chlamydosporum</i>	18.0	17.0	17.5	18.0	17.6±2.4 a
雪腐镰刀菌 <i>F. nivale</i>	26.0	28.0	28.0	27.5	27.4±3.0d
茄病镰刀菌 <i>F. solani</i>	18.5	19.5	18.5	19.5	19.0±2.6 ab
禾谷丝核菌 <i>R. cerealis</i>	27.0	26.5	28.5	26.5	27.1±3.0 d
灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	28.5	30.0	32.0	30.0	30.1±4.1 e
番茄早疫病菌 <i>A. solani</i>	20.0	19.0	20.5	20.0	19.9±2.7 b
轮状镰刀菌 <i>F. verticillioides</i>	25.0	23.0	25.0	24.5	24.4±3.4 c
禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i>	29.0	27.5	27.0	28.0	27.9±2.7 d
黄色镰刀菌 <i>F. culmorum</i>	18.5	19.5	19.0	20.5	19.4±3.8 b
胶孢镰刀菌 <i>F. subglutinans</i>	25.0	23.5	25.0	26.0	24.9±3.6 c
燕麦镰刀菌 <i>F. avenaceum</i>	18.0	19.0	21.0	19.0	19.3±5.7 b
黑附球菌 <i>Epicoccum nigrum</i>	29.0	30.0	28.5	30.0	29.4±2.2 e
木贼镰刀菌 <i>F. equiseti</i>	20.0	18.5	21.0	19.0	19.6±4.9 b
三线镰刀菌 <i>F. tricinctum</i>	28.5	26.0	29.0	27.5	27.8±4.1 d
烟炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporides</i>	27.0	29.0	25.5	27.0	27.1±4.6 d
亚洲镰孢菌 <i>F. asiaticum</i>	20.5	19.0	21.5	20.0	20.3±4.5 b

注: 数据为平均值±标准误, 不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著。

Note: Data were presented as mean±SD, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

波谱信号, 另一个拮抗物质 (活性峰 B) 为淡黄色晶体, 其 $[M+Na]^+$ 分子量为 425.2316, 分子式为 $C_{24}H_{34}O_5$, 通过 ^1H-NMR 测定该物质结构, 该物质属于大环内酯类化合物, 并且具有多个长共轭烯烃信号, 在高场区具有一个甲基信号, 同时在低场区有一分子内氢键信号, 通过文献搜索并结合之前的试验结果^[26], 鉴定该物质为 macrolactin A (图 9)。HR-MS: 425.2316 ($[M+Na]^+$, $C_{24}H_{34}O_5Na^+$; calcd. 425.2304)。 ^1H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ H 7.26 (1H, dd, J = 12.0, 15.0 Hz), 6.65 (1H, dd, J = 12.0, 15.0 Hz), 6.27 (1H, dd, J = 10.5, 15.2 Hz), 6.21 (1H, d, J = 12.0 Hz), 6.05 (1H, dd, J = 10.2, 14.4 Hz), 5.92 (1H, d, J = 11.2 Hz), 5.79 (1H, ddd, J = 4.0, 6.8, 15.0 Hz), 5.63 (2H, m), 5.60 (1H, d, J = 12.0 Hz), 5.50 (1H, dd, J = 4.8, 15.0 Hz), 5.44 (1H, m), 5.02 (1H, m), 4.33 (1H, m), 4.22 (1H, m), 3.87 (1H, m), 2.71 (1H, m), 2.43 (1H, m), 2.31 (1H, m), 2.27 (1H, m), 1.71 (1H, m), 1.65 (2H, m), 1.54 (1H, m), 1.38 (1H, m), 1.26 (2H, m), 1.17 (1H, m), 1.00 (3H, d, J = 6.2Hz)。

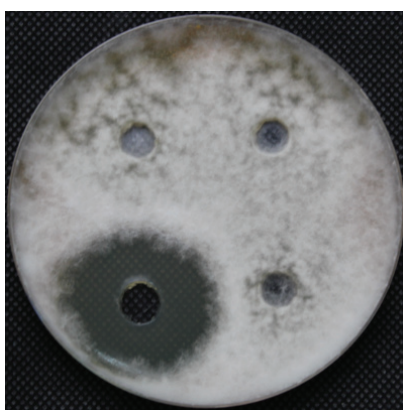


图 5 不同纯化组分的拮抗性

Fig. 5 The antagonistic activities of different purified component

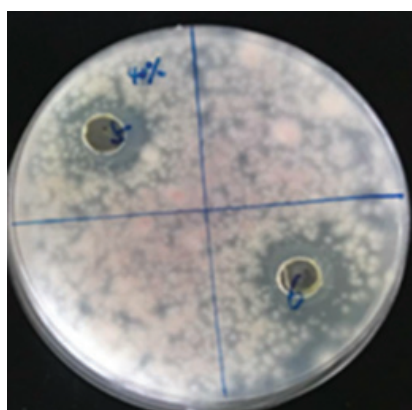


图 6 40%洗脱液收集样品的拮抗性能

Fig. 6 The antagonistic activities of the substance collected by 40% eluent

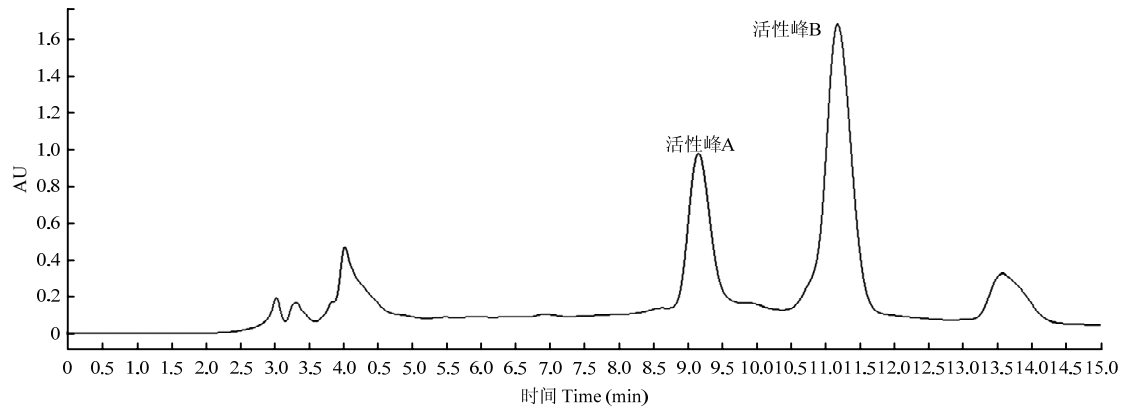


图7 拮抗物质的HPLC制备色谱图

Fig. 7 HPLC preparation chromatogram of antagonistic substances

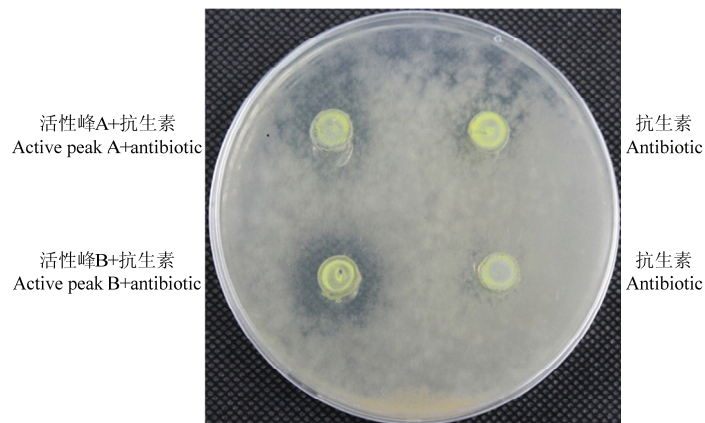


图8 不同活性峰的拮抗性

Fig. 8 The antagonistic activities of different active peaks

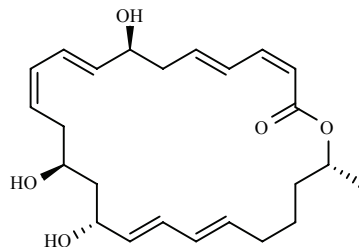


图9 菌株AX-3拮抗物质macrolactin A的结构式

Fig. 9 Structure of strain AX-3 antagonist macrolactin A

2.3 拮抗菌对小麦根际土壤中禾谷镰刀菌的影响

通过测定小麦不同生长阶段根际土壤禾谷镰刀菌的数量,结果表明不同处理方式对小麦根际土壤中禾谷镰刀菌具有不同的拮抗效果。其中使用发酵原液处理和菌液加活性炭一起处理的防治方式效果最好,在小麦种植后的不同生长阶段对禾谷镰刀菌均有较好的拮抗效果(图10)。

3 讨论

小麦赤霉病是一种世界性流行性病害,且危害日益严重,目前,它的防治方法以化学防治、种植抗性品种和加强栽培管理为主的农业防治方式为主。众所周知,小麦抽穗扬花期时的气候条件对赤霉病的发生有很重要的影响,如果小麦抽穗扬花期遇到持续的高温湿雨天气,其病害的发生和流行的概率就会大幅增

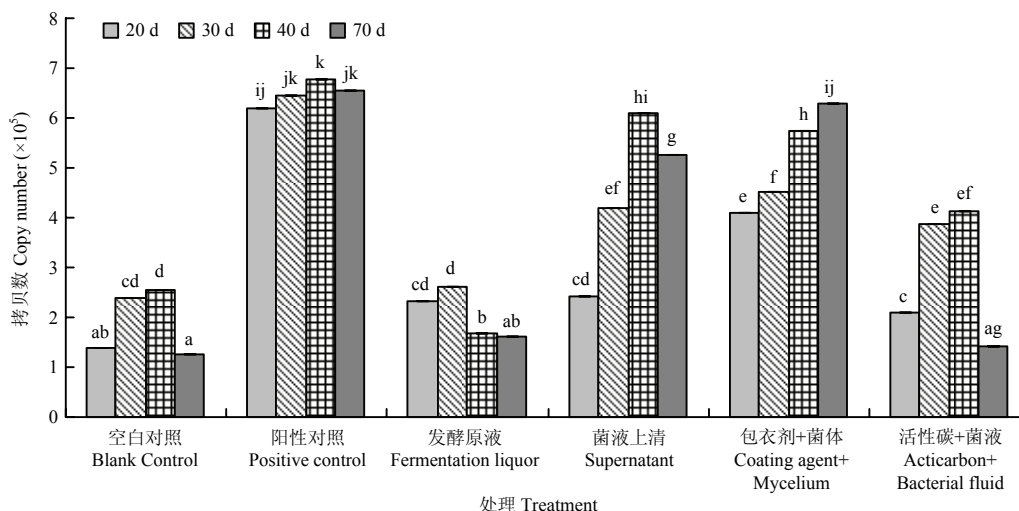


图 10 不同处理方式小麦根际土壤禾谷镰刀菌的拷贝数

Fig. 10 The copies of *F. graminearum* in wheat root soil by different treatments

加, 从而导致化学防治实施困难, 且长期喷洒农药也会造成环境污染及病原菌的抗药性^[27-32]。生物防治因为具有无残留、无污染、对人畜无害等特点, 达到防治效果的同时, 兼具良好的生物安全性的、具有很广泛的应用前景。生物防治的手段, 主要是利用拮抗菌来控制植物病原菌的生长和繁殖, 从而达到较好的防治效果^[33,34]。

本文为明确拮抗菌对禾谷镰刀菌的拮抗机制和实现拮抗菌对小麦镰刀菌生物防治, 分离筛选了 200 余株禾谷镰刀菌拮抗菌株, 并从中挑选了拮抗能力最强的一株, 经 16S rDNA 和 *gryB* 基因鉴定, 确定为解淀粉芽胞杆菌, 命名为 AX-3, 该菌不但对引起小麦赤霉病的禾谷镰刀菌具有很好的拮抗能力, 而且对其他 16 种常见的植物病原菌均具有较强的广谱拮抗能力, 进一步对拮抗菌 AX-3 的拮抗物质进行分离纯化, 采用高分辨质谱和核磁共振的方法, 鉴定出 AX-3 的拮抗物质之一为 macrolactin A。芽胞杆菌是自然界中广泛存在的非致病细菌, 其产生的低分子抗生素以及蛋白或多肽类活性物质对许多植物病原真菌都表现出很强的抑菌活性。它在土壤中的定殖力强, 受外界环境条件的影响较小, 还可以改善土壤菌群结构、提高土壤肥力等^[35]。其中, 解淀粉芽胞杆菌作为芽胞杆菌家族的重要成员, 能够产生耐热、耐旱的孢子, 具有极强的生存力, 在其生长代谢过程中还能够分泌产生抗菌物质, 在小麦、水稻、番茄、油菜等作物病害防治中广泛应用^[36-40], 是生物防治的理想菌株。本研究, 通过盆栽试验进一步研究了 AX-3 拮抗菌的最佳防治方式, 比较了不同施用方式对小麦根际土壤中禾谷镰刀菌数量的影响, 确定采用发酵原液和菌液中添加活性炭一起处理的防治方式, 防治效果较高且持久稳定, 为拮抗菌及拮抗物在小麦赤霉病生物防治方面的应用提供了理论基础。

参 考 文 献

- [1] 夏雨晨, 朱永兴, 马东方, 等. 小麦赤霉病菌拮抗菌的分离及鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2019, 41(1): 33-42.
- [2] 高爽, 梁珍, 邓俊良, 等. 玉米赤霉烯酮和脱氧真菌镰刀菌烯醇对雌性动物的生殖毒性及作用机制[J]. 动物营养学报, 2016, 28(4): 1042-1049.
- [3] Grenier B J, Applegate T. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: Meta-analysis of published experiments in animals[J]. Toxins, 2013, 5(2): 396-430.
- [4] 张洁, 伊艳杰, 王金水, 等. 小麦赤霉病的防治技术研究进展[J]. 中国植保导刊, 2014, 34(1): 24-28.
- [5] 姚金保, 陆维忠. 中国小麦抗赤霉病育种研究进展[J]. 江苏农业学报, 2000, 16(4): 242-248.
- [6] 李小勋, 顾乃杰, 张玉松. 小麦抗赤霉病育种研究进展[J]. 作物研究, 2011, 25(3): 264-268.
- [7] 陈云, 王建强, 杨荣明, 等. 小麦赤霉病发生危害形势及防控对策[J]. 植物保护, 2017, 43(5): 11-17.
- [8] Simpson D R, Weston G E, Turner J A, et al. Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain [J]. European Journal of Plant Pathology, 2001, 107(4): 421-431.

- [9] Blandino M, Minelli L, Reyneri A. Strategies for the chemical control of *Fusarium* head blight: Effect on yield, alveographic parameters and deoxynivalenol contamination in winter wheat grain[J]. *European Journal of Agronomy*, 2006, 25(3): 193-201.
- [10] 蔺国强, 廖玉才, 宫安东, 等. 禾谷镰刀菌拮抗菌的筛选与鉴定[J]. *华中农业大学学报*, 2013, 32(3): 28-32.
- [11] 秦楠. 解淀粉芽孢杆菌 HRH317 抗菌蛋白鉴定及抑菌机理研究[D]. 晋中: 山西农业大学, 2015.
- [12] Priest G, Goodfellow M, Todd C. A numerical classification of the genus *Bacillus*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1988, 134(7): 1847-1882.
- [13] 严婉荣, 肖敏, 陈圆, 等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌脂肽研究进展[J]. *北方园艺*, 2018(7): 162-167.
- [14] 夏京津, 陈建武, 宋怿, 等. 解淀粉芽孢杆菌 HE 活性成分鉴定及抗菌特性分析[J]. *南方水产科学*, 2019, 15(3): 41-49.
- [15] 闫晓妮, 马天有, 杜仁佳, 等. 解淀粉芽孢杆菌胞外抑菌活性物质研究现状[J]. *中国微生态学杂志*, 2018, 30(2): 229-234, 249.
- [16] 桑建伟, 杨扬, 陈奕鹏, 等. 内生解淀粉芽孢杆菌 BEB17 脂肽类和聚酮类化合物的抑菌活性分析[J]. *植物病理学报*, 2018, 48(3): 402-412.
- [17] 王军华, 权春善, 徐洪涛, 等. 解淀粉芽孢杆菌 Q-12 抗真菌特性的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2006, 32(6): 47-50.
- [18] 权春善, 王军华, 徐洪涛, 等. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J]. *微生物学报*, 2006, 46(1): 7-12.
- [19] 孙梅, 张维娜, 高亮, 等. 解淀粉芽孢杆菌 JSSW-LA 的分离鉴定及对病原菌拮抗特性[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(4): 275-279.
- [20] Sun L, Lu Z, Bie X, *et al.* Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 2006, 22(12):1259-1266.
- [21] Chen L, Wang N, Wang X, *et al.* Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(22): 8822-8827.
- [22] 徐剑宏, 王建伟, 胡晓丹, 等. 小麦赤霉病菌拮抗菌 AF0907 的分离鉴定及其拮抗特性[J]. *江苏农业学报*, 2013, 29(3): 517-522.
- [23] 东秀珠, 蔡妙英. 《常见细菌系统鉴定手册》[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [24] 布坎南, 吉本斯. 《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [25] 王瑶, 赵月菊, 邢福国, 等. 禾谷镰刀菌拮抗菌株的筛选及鉴定[J]. *核农学报*, 2017, 31(6): 1128-1136.
- [26] Chen H, Wu M B, Chen Z J. Enhancing production of a 24-membered ring macrolide compound by a marine bacterium using response surface methodology[J]. *浙江大学学报(英文版)*, 2013, 14(4): 346-354.
- [27] 姚克兵, 庄义庆, 尹升, 等. 江苏小麦赤霉病综合防控关键技术研究[J]. *植物保护*, 2018, 44(1): 205-209.
- [28] 李海军, 孙苏阳, 王永军, 等. 小麦赤霉病发生原因与防治措施[J]. *农技服务*, 2008, 25(9): 78, 87.
- [29] 管章玲, 辛海峰, 李建宏, 等. 小麦赤霉病的微生物防治研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(2): 94-96.
- [30] 程顺和, 张勇, 别同德, 等. 中国小麦赤霉病的危害及抗性遗传改良[J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(5): 938-942.
- [31] 陈云, 王建强, 杨荣明, 等. 小麦赤霉病发生危害形势及防控对策[J]. *植物保护*, 2017, 43(5): 11-17.
- [32] 陈亮, 李瑞静, 秦素雅, 等. 小麦赤霉病拮抗菌株筛选及其抑制作用研究[J]. *中国植保导刊*, 2017, 37(5): 12-17.
- [33] 彭清忠, 张惟材, 朱厚础. 枯草杆菌表达系统的研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2001, 12(3): 220-225.
- [34] Tareq F S, Kim J H, Lee M A, *et al.* Antimicrobial gageomacrolactins characterized from the fermentation of the marine-derived Bacterium *Bacillus subtilis* under optimum growth conditions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(14): 3428-3434.
- [35] 陈亮, 李瑞静, 秦素雅, 等. 小麦赤霉病拮抗菌株筛选及其抑制作用研究[J]. *中国植保导刊*, 2017, 37(5): 12-17.
- [36] 戴富明, 周世明. 防治小麦赤霉病微生物菌株的筛选与利用[J]. *植物保护学报*, 1995, 22(2): 112-116.
- [37] Huang H Y, Wu Z Q, Tian C M, *et al.* Identification and characterization of the endophytic bacterium *Bacillus atrophaeus* XW2, antagonistic towards *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(3): 1361-1371.
- [38] Sawano Y, Miyakawa T, Yamazaki H, *et al.* Purification, characterization, and molecular gene cloning of an antifungal protein from *Ginkgo biloba* seeds[J]. *Biological Chemistry*, 2007, 388(3): 273-280.
- [39] 张娟, 杨彩梅, 曹广添, 等. 解淀粉芽孢杆菌及其作为益生菌的应用[J]. *动物营养学报*, 2014, 26(4): 863-867.
- [40] 张雪娇, 石晶晶, 常娜, 等. 河北省冬小麦赤霉病拮抗细菌的分离与鉴定[J]. *作物杂志*, 2017(2): 157-162.