

贝莱斯芽胞杆菌HN-2的鉴定及对芒果炭疽菌的抑菌活性研究

王雨, 谭峥, 韦丹丹, 缪卫国, 刘文波, 靳鹏飞*

(海南大学植物保护学院/热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海口 570228)

摘要: 菌株 HN-2 为本实验室分离得到的一株生防细菌, 通过采用形态学观察结合现代分子生物学的手段鉴定生防菌 HN-2 为贝莱斯芽胞杆菌 *Bacillus velezensis*, 以芒果炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz 作为靶标, 其发酵上清液的正丁醇萃取粗提物的活性最好, 抑菌圈大小为 20.93 mm, 半最大效应浓度(EC₅₀)为 70.62 μg/mL。通过飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)数据结合基因检测的结果分析发现, 正丁醇提取物中主要活性成分为脂肽类物质, 其中含有表面活性素(surfactin)、伊枯草菌素(iturins)和泛革素(fengycin)等。通过显微观察发现正丁醇粗提物可以造成芒果炭疽病菌菌丝扭曲、膨大、畸形, 从而抑制芒果炭疽病菌的生长, 菌株 HN-2 正丁醇提取物处理后的芒果 15 d 内未出现芒果炭疽病病状, 对芒果果实具有较好的保护作用。贝莱斯芽胞杆菌 HN-2 的主要活性物质为脂肽类物质, 其对植物病原真菌有较好的防治效果, 具有进一步深入研究和开发应用的潜力。

关键词: 贝莱斯芽胞杆菌; 脂肽类化合物; 抑菌活性; 芒果炭疽菌; EC₅₀

中图分类号: S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261(2020)02-0220-11

Identification of *Bacillus* HN-2 and Analysis of Its Antifungal Properties

WANG Yu, TAN Zheng, WEI Dandan, MIAO Weiguo, LIU Wenbo, JIN Pengfei*

(Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Ministry of Education /College of Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The strain HN-2 was isolated from soil. Through morphological, physiological and biochemical characteristics identification, phylogenetic tree analysis of 16S rDNA sequence and specific PCR detection, the strain was identified to be *Bacillus velezensis*. The n-butanol extract, ammonium sulfate precipitation extract and acidification extract of *B. velezensis* HN-2 demonstrated strong antifungal activity against *C. gloeosporioides*, with the diameters of inhibition zone of 20.93 ± 0.3 mm, 12.82 ± 0.3 mm and 13.57 ± 0.3 mm, respectively. The EC₅₀ value of n-butanol extract was 70.62 μg/mL. Mass spectrum analysis showed that lipopeptide was the main active substance of the strain HN-2, consisting of surfactin, fengycin and iturin. The mycelia of *C. gloeosporioides* treated with n-butanol extract were distorted, swollen and deformed. Application of n-butanol can reduce the development of *C. gloeosporioides* on the punctured epidermis of mango. It could be concluded that *B. velezensis* HN-2 had strong antifungal activity and the main antifungal substance was lipopeptide.

Key words: *Bacillus velezensis*; lipopeptide; antifungal activity; *Colletotrichum gloeosporioides*; EC₅₀

化学农药是防治病虫害的重要手段, 但化学农药的长期大量使用产生了诸多问题, 如病菌和害虫抗药性的不断增强, 对人畜安全构成一定威胁, 这些问题促使人们亟待寻找一种对人类和环境友好, 并具良好防治效果的新策略^[1], 因此生物防治成为一个非常有潜力的发展方向。生物防治是利用生物来抑制病原物

收稿日期: 2020-01-22

基金项目: 国家自然科学基金(31960552); 海南省青年科技英才创新计划(QCXM201903); 海南大学校内科研启动经费(KYQD(ZR)1842);

海南自然科学基金(2016CXTD002); 国家重点研发计划(2018YFD0201105); 海南省重点研发计划(ZDYF2016208, ZDYF2018240)

作者简介: 王雨, 硕士研究生, E-mail: 15383468897@163.com; *通信作者, 博士, 讲师, E-mail: jiepengfei@hainu.edu.cn。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.02.007

生长发育及其侵染过程的一种方法,这种方法可以减少农药残留,对环境友好,近年来倍受重视。芽胞杆菌 *Bacillus* 是一种革兰氏阳性细菌,其生长繁殖迅速,可以有效定殖在植物根际,能产生多种活性代谢物质^[2]。目前应用于生物防治的芽胞杆菌主要包括解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*、枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*、贝莱斯芽胞杆菌 *Bacillus velezensis* 和苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* 等^[3]。2006年 Wang 等^[4]将贝莱斯芽胞杆菌确定为解淀粉芽胞杆菌的后期异形体,通过表型和系统聚类分析发现,它们与枯草芽胞杆菌亚种和解淀粉芽胞杆菌最高相似性达 90%^[5]。

芽胞杆菌培养液通常采用酸沉淀分离、有机溶剂提取、分级沉淀、脱色吸附的方法分离脂肽类化合物^[6]。姬婧媛等^[7]对枯草芽胞杆菌 E1R-j 发酵液中分离的活性物质进行了鉴定其主要成分为 fengycins。刘宇帅等^[8]则从一株解淀粉芽胞杆菌的发酵液中分离纯化得到有强烈抗真菌尖孢镰刀菌活性的脂肽类物质。韦丹丹等^[9]将解淀粉芽胞杆菌 HAB-2 正丁醇提取物涂抹在杧果上,观察发现该粗提物对杧果炭疽菌有较强的防效。生防芽胞杆菌合成脂肽类抗生素的途径分为核糖体途径和非核糖体途径,非核糖体途径由合成基因和调节基因控制,其中 *sfp* 基因编码的 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶尤为重要,如模式菌株 *B. subtilis* 168 仅含有 *sfp* 基因,*sfp* 基因由于长期传代导致一个碱基错配,因此不能产生脂肽类物质^[10,11]。芽胞杆菌内大部分脂肽类物质是由非核糖体途径合成,而一般大分子物质如酶类、蛋白质等物质是通过核糖体途径合成^[12]。

本试验从土壤中分离得到生防菌 HN-2,通过形态学和分子生物学手段对生防菌 HN-2 进行鉴定,提取分析生防菌 HN-2 的抑菌活性物质,对抑菌物质的抑菌活性和合成调控方面进行探究,为明确抑菌物质组成及抑菌机理提供理论基础,进而为生防菌的应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

菌株 HN-2 为本实验室从土壤中分离保存,杧果炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz 由本实验室提供保存。

固体 LB 培养基:蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,琼脂粉 16 g,氯化钠 10 g, ddH₂O 1000 mL, pH 7.0~7.2; 液体 LB 培养基:固体 LB 培养基中不加琼脂粉; PDA 固体培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 16 g,蒸馏水 1000 mL; CMC 液体培养基:羧甲基纤维素钠 15 g,酵母粉 1 g,硝酸铵 1 g,磷酸二氢钾 1 g,七水合硫酸镁 0.5 g,蒸馏水 1000 mL。

仪器设备:SW-CJ-2D 超净工作台(上海博迅实业有限公司)、HIRAYAMA 高压灭菌锅(平山制作所株式会社)、HYQ-45 振荡培养箱(深圳汇诚科技有限公司)、CT9612 PCR 仪(北京百泰克生物技术有限公司)。

1.2 菌株 HN-2 的鉴定

1.2.1 菌株的形态观察 在超净台中用无菌接种环挑取菌株 HN-2,接种于 100 mL 的 LB 液体培养基中,28 °C、180 r/min 振荡培养 48 h,后在 LB 固体培养基划线培养,观察菌落形态特征、菌株扫描电镜观察,以及革兰氏染色^[13]。

1.2.2 分子生物学鉴定 从划线培养的 LB 固体培养基平板上挑取菌株 HN-2 单菌落,接种到 100 mL LB 液体培养基中,28 °C、200 r/min 振荡培养过夜,10000 r/min 离心 30 s,收集菌体,参考 Aidlab 细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA。

16S rDNA 分析:25 μL 反应体系中含有 27F 引物 1.0 μL,1492R 引物 1.0 μL,菌液 1.0 μL,2×*taq* PCR Master MIX 酶 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR 扩增条件为:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s、50 °C 复性 30 s、72 °C 延伸 90 s,循环 35 次; 72 °C 终延伸 10 min。根据 PCR 产物测序结果(测定委托生工生物股份有限公司完成),Blast 进行比对,MEGA 7.0 构建系统发育树。

特异性引物鉴定:以菌株 HN-2 DNA 为模板,根据 β-甘露聚糖酶基因(*gumG* 或 *ydhT*) 的差异分别以 Bsu-man、Bli-man、Bam-man 三种特异性引物(表 1)进行基因克隆^[14]。PCR 扩增条件为:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s、50 °C 复性 30 s、72 °C 延伸 90 s,循环 35 次; 72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产

表 1 特异性 PCR 引物
Table 1 Primers for Specific PCR

菌种名 Strain	引物 Primers	序列 Sequence (5'—3')	PCR 片段大小 PCR Amplification (bp)
枯草芽胞杆菌 <i>B. subtilis</i>	Bsu-man-1F Bsu-man-1R'	CAGGCTCACACTTGTCTTG TGAACACAGTCCTGGGTTAG	1287
地衣芽胞杆菌 <i>B. licheniformis</i>	Bli-man-1F Bli-man-1R	AGCCATGGATATTAATAAC TATTCCTTACAATAAGACG	1278
解淀粉芽胞杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>	Bam-man-1F Bam-man-1R	TCGGTTTCACATCCTTCATC TTTGTGACGCGTGTCTTCTG	1275

物上样于含有 GelRed 染料的琼脂糖凝胶电泳中, 观察结果。

1.3 活性测试

1.3.1 提取菌株 HN-2 脂肽类物质 菌株 HN-2 接种于 LB 液体培养基中, 置 28 °C、180 r/min 培养 48 h 后, 10000 r/min 离心 10 min, 去菌体, 得到 HN-2 发酵上清液^[15]。

正丁醇萃取法: 用正丁醇有机溶剂对 HN-2 发酵上清液按照 1:1 的比例进行萃取, 得到上层正丁醇萃取液, 旋转蒸发后冷冻干燥得到正丁醇粗提物^[16]。

硫酸铵饱和沉淀法: 取菌株 HN-2 发酵离心上清液, 缓慢加入硫酸铵直至饱和, 于 4 °C 下静置过夜, 10000 r/min、4 °C 离心 30 min, 进行干燥得 HN-2 脂肽粗提物^[17]。

酸沉淀法: 取菌株 HN-2 发酵离心上清液, 6 mol/L HCl 调 pH 至 2.0, 于 4 °C 下静置过夜, 10000 r/min 离心 10 min, 进行干燥得 HN-2 脂肽粗提物^[18]。

1.3.2 杧果炭疽病菌孢子悬浮液平板 杧果炭疽病菌接种于装有 100 mL CMC 液体培养基的三角瓶中, 置 28 °C 下 180 r/min 培养 3~5 d, 用四层灭菌纱布过滤培养液除去菌丝, 即得孢子悬浮液。取 PDA 固体培养基加热溶解冷却至 40 °C, 将培养基与孢子悬浮液以 1:1 的比例混匀, 倒平板, 用于各类提取物的活性测试^[19]。

1.3.3 以杧果炭疽菌作为靶标进行活性测试 用硫酸铵饱和沉淀法、酸沉淀法、正丁醇萃取得到的粗提物溶解于去离子水中, 至终浓度为 50 mg/mL, 滴加 10 μ L 在直径为 6 mm 的滤纸片上, 滤纸片干燥后对称放置在杧果炭疽病菌孢子悬浮液平板距离中央 2.5 cm 处, 以在平板中央位置滴加 10 μ L 无菌水为对照, 每个处理重复 3 次, 28 °C 培养 48 h 用游标卡尺测量抑菌圈直径 (mm)。

菌株 HN-2 发酵液正丁醇提取物对杧果炭疽菌半最大效应浓度 (EC₅₀) 试验^[20]: 分别将 100 μ L 各浓度的 HN-2 发酵液正丁醇粗提取物加到 10 mL 已经融化冷却到 50 °C 的 PDA 固体培养基中, 至终浓度为 10、20、50、100、250 和 500 μ g/mL, 混匀, 倒平板。将活化后的杧果炭疽菌接种到平板上, 以不添加菌株 HN-2 正丁醇提取物 PDA 培养平板为对照, 每个处理重复 3 次, 当不添加菌株 HN-2 正丁醇提取物的对照组杧果炭疽病菌菌长至整个培养皿的 2/3 时测量抑菌圈直径 (mm)。

1.4 脂肽类化合物鉴定

飞行时间质谱 MALDI-TOF-MS 鉴定: LDI-TOF-MS 串联飞行时间质谱, 在 337 nm 下氮气保护下激发光源解吸附电离, 基质 α -氰-4-羟肉桂酸 (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid), 工作溶液为 α -氰-4-羟肉桂酸的饱和溶液, 溶剂为包含 0.1% 三氟乙酸的 70% 乙腈水溶液。将 1 μ L 正丁醇粗提物溶液置于靶板上, 其上覆盖 1 μ L 基质溶液, 自然风干, 然后进行测试。

1.5 脂肽类化合物相关基因分析

以菌株 HN-2 基因组 DNA 为模板, 分别用 16 对引物 PCR 扩增 *srfA*、*ituA*、*ituB*、*ituC*、*ituD*、*fenB*、*fenD*、*bamC*、*qk*、*sboA*、*yndj*、*sfp*、*ituA*、*mycB*、*fenB*、*lpa* 等脂肽类化合物合成相关基因 (表 2), 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 60 s, 52 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。PCR 扩增产物电泳回收后进行 TA 克隆、转化, 结果利用 Blast 与数据库 NCBI 进行序列相似性分析, 用 MEGA 7.0 构建系统发育树。

表 2 扩增基因及引物序列
Table 2 PCR detection of antibiotic biosynthesis genes from strain HN-2

序号 Number	基因名称 Gene	引物 Primers	序列 Sequence (5'—3')	PCR 片段大小 Amplification (bp)
1	<i>srfA</i>	110F 110R	GTTCT CGCAG TCCAG CAGAAG GCCGA GCGTA TCCGT ACCGAG	308
2	<i>ituA</i>	ituA1F ituA1R	TGCCA GACAG TATGA GGCAG CATGC CGTAT CCACT GTGAC	885
3	<i>ituB</i>	bamB1F bamB1R	AAGAA GGC GT TTTTC AAGCA CGACA TACAG TTCTC CCGGT	508
4	<i>ituC</i>	ituCF1 ituCF3	TTCAC TTTTG ATCTG GCGAT CGTCC GGTAC ATTTT CAC	575
5	<i>ituD</i>	ituD2F ituD2R	GATGC GATCT CCTTG GATGT ATCGT CATGT GCTGC TTGAG	647
6	<i>fenB</i>	fenB1F fenB1R	TACCT ATCGC AATGT CGTGT CTTCG ATTTC TAACA GCCGC	767
7	<i>fenD</i>	fenDF1 fenDR1	CCTGC AGAAG GAGAA GTGAAG TGCTC ATCGT CTTCG GTTTC	293
8	<i>bamC</i>	bamC2F bamC2R	CTGGA AGAGA TGCCG CTTAC AAGAG TGCGT TTTCT TCGGA	850
9	<i>qk</i>	qk1F qk1R	CTTAA ACGTC AGAGG CGGAG ATTGT GCAGC TGCTT GTACG	704
10	<i>sboA</i>	sbo1R sbo1F	TCGGT TTGTA AACTT CAACT GC GTCCA CTAGA CAAGC GGCTC	334
11	<i>yndj</i>	147F 147R	CAGAG CGACA GCAAT CACAT TGAAT TTCGC TCCGC TTATC	212
12	<i>sfp</i>	sfpF sfpR	ATGAAGATTTACGGAATTA TTATAAAAGCTCTTCGTACG	675
13	<i>ituA</i>	ituAF ituAR	ATGTATACCAGTCAATTCC GATCCGAAGCTGACAATAG	1100
14	<i>mycB</i>	mycBF mycBR	ATGTCGGTGTATAAAAATCAAGTAACG TTAGCACGCCAGCAGTTCCTATTGA	2024
15	<i>fenB</i>	fenBF fenBR	CTATAGTTTGTGACGGCTC CAGCACTGGTCTTTGTGCGA	1400
16	<i>lpa</i>	lpa14F lpa14R	GAAAATTTACGGAGTATATATGGACCGC TTATAACAGCTTTCATACGTTTTCATCTCATTGT	675

1.6 杧果果实表面防效试验

选取新鲜大小均匀, 用灭菌水清洗过的表皮绿色未成熟杧果, 在其中的一边涂抹菌株 HN-2 正丁醇提取物 (终浓度 10 mg/mL), 另一边只涂抹无菌水, 再用无菌接种针轻轻刺破表皮, 每边接入 3 块新鲜的杧果炭疽菌菌饼 (直径为 6 mm)。对照组为涂抹灭菌水和只接种 PDA 培养基饼的杧果, 每组 3 个处理, 每次处理重复 3 次。在 25 °C 下恒温保湿 4 d, 通过观察并记录杧果果实感病情况, 对正丁醇粗提物造成杧果炭疽病菌菌丝的变化进行显微观察。杧果病害程度及其保鲜度采用五分制标准, 保鲜程度五分制标准为: 1, 绿色果皮; 2, 果皮黄色面积小于 25%; 3, 果皮黄色面积为 26%~50%; 4, 果皮黄色面积为 51%~75%; 5, 果皮黄色面积为 76%~100%。病害程度: 1, 无任何病斑; 2, 果皮病斑面积小于 25%; 3, 果皮病斑面积为 26%~50%; 4, 果皮病斑面积为 51%~75%; 5, 果皮病斑面积为 76%~100%。

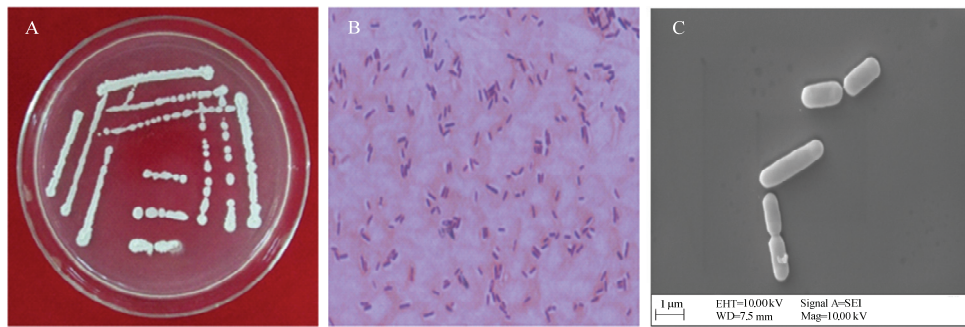
1.7 数据统计与分析

试验数据统计分析采用 SPSS 19.0 软件和 Excel 软件, 差异显著性检验法采用 Duncan 氏新复极差法。

2 结果与分析

2.1 形态学鉴定

LB 培养基上, 菌株 HN-2 菌落呈乳白色, 不规则状, 边缘呈锯齿状, 不透明, 菌落扁平, 表面湿润, 边缘微起皱褶。在显微镜观察下, 经过革兰氏染色呈显紫色, 即革兰氏阳性菌。扫描电镜观察, 呈杆状,



A: HN-2 菌株菌落 Gram staining of strain HN-2; B: HN-2 菌株革兰氏染色 Flagellum staining of strain HN-2; C: HN-2 菌株扫描电镜 Observation of strain HN-2 in SEM

图 1 菌株 HN-2 形态学鉴定

Fig. 1 Microscopic of stain HN-2

两端钝圆，大小约 $(1.2\sim 2.2)\ \mu\text{m}\times(0.5\sim 0.7)\ \mu\text{m}$ ，细胞膜光滑，细胞饱满。

2.2 分子生物学鉴定结果

2.2.1 16S rDNA 分析 PCR 扩增后，呈现出一条单一的条带，经测序得到该条带大小为 1612 bp，Blast 比对分析，与解淀粉芽胞杆菌 (KJ123707.1) 和枯草芽胞杆菌 (FN869038.1) 的同源性均达到 99%。系统发育树显示，菌株 HN-2 与贝莱斯芽胞杆菌位于同一分支，依据同源性比对数据及系统发育树位置 (图 2)，又结合贝莱斯芽胞杆菌是解淀粉芽胞杆菌的后期异型体，最终确认菌株 HN-2 为贝莱斯芽胞杆菌。

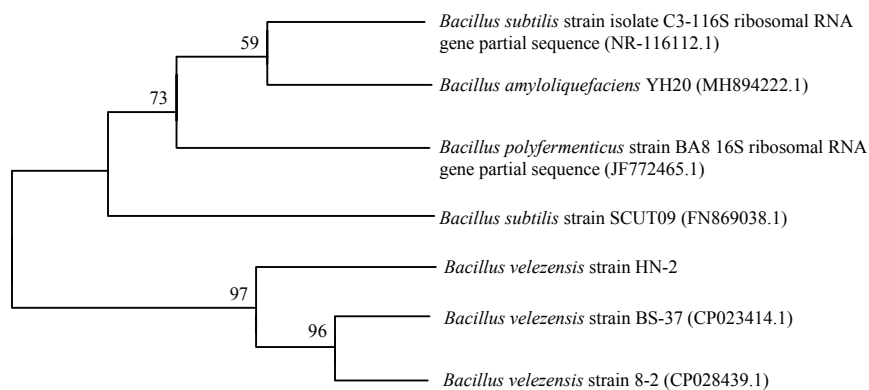


图 2 菌株 HN-2 16S rDNA 生物进化树

Fig. 2 PCR Phylogenetic tree of the 16S rDNA from strain HN-2

2.2.2 分析特异性引物鉴定 琼脂糖凝胶电泳结果未检测出 Bsu-man-1 F/R、Bli-man-1 F/R 引物的目的条带，Bam-man-1 F/R 引物扩增出 1275 bp 左右条带 (图 3)。经测序 Blast 比对，与解淀粉芽胞杆菌 (JN382250.1) 同源性为 99%。

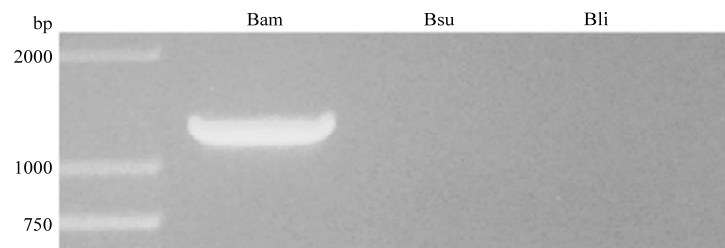


图 3 β -甘露聚糖酶基因特异 PCR 检测

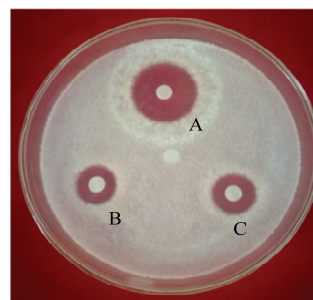
Fig. 3 Specific PCR detection of the β -mannanase genes

2.3 不同提取物的抑菌活性比较

通过滤纸片法测试菌株 HN-2 提取物 (50 mg/mL) 对芒果炭疽菌的抑菌活性结果发现, 正丁醇提取物抑菌圈直径为 20.93 mm、硫酸铵沉淀提取物抑菌圈直径为 12.82 mm 和酸沉淀脂肽类提取物抑菌圈直径为 13.57 mm (图 4); 正丁醇提取物活性较好, 通过生长速率法测试其 EC_{50} 值为 70.62 $\mu\text{g/mL}$ (图 5)。

2.4 飞行时间质谱分析脂肽类化合物结果

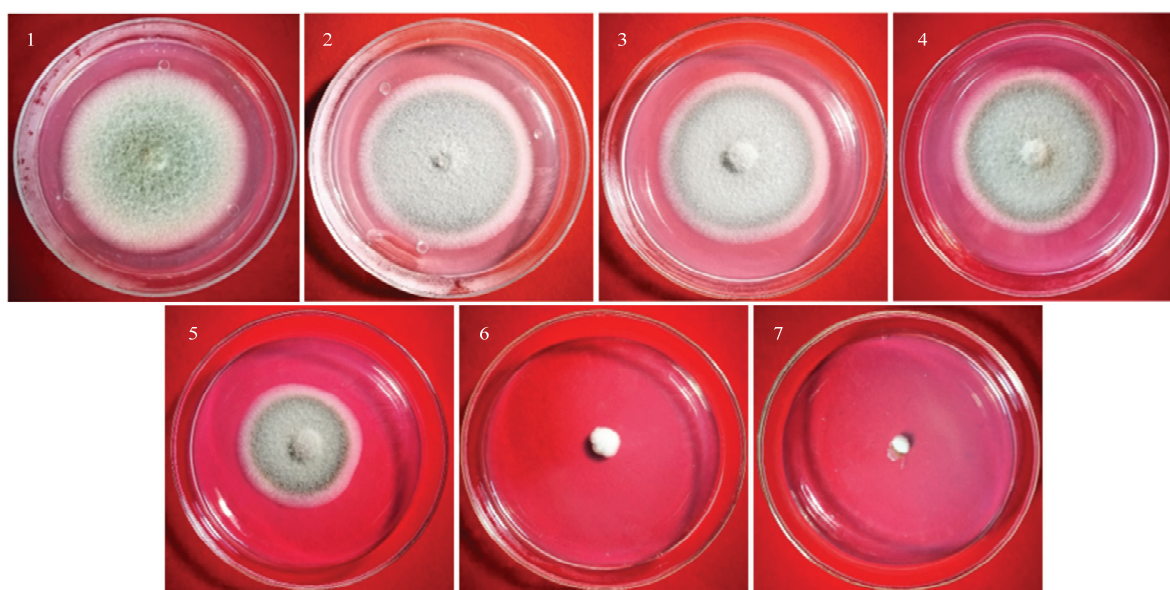
根据飞行时间质谱检测得到分子量的结果进行比对, 产生的脂肽类物质有 C14-IturinA、C15-IturinA、C15-IturinB、C14-Mycosubtilin、C15-Mycosubtilin、C14-BacillomycinF、C16-BacillomycinD、



A: 正丁醇萃取 N-butanol extract; B: 酸沉淀 Acid precipitation lipopeptide extract; C: 硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate precipitation

图 4 不同提取物对芒果炭疽菌的抑制能力

Fig. 4 The antifungal activities of the extract by different methods



1: 0 $\mu\text{g/mL}$; 2: 10 $\mu\text{g/mL}$; 3: 20 $\mu\text{g/mL}$; 4: 50 $\mu\text{g/mL}$; 5: 100 $\mu\text{g/mL}$; 6: 250 $\mu\text{g/mL}$; 7: 500 $\mu\text{g/mL}$

图 5 不同浓度正丁醇提取物对芒果炭疽病原真菌的抑制作用

Fig. 5 The inhibitory effect of different concentration of n-butanol extract on the pathogenic fungi of mango anthrax

C15-SurfactinA、C16-SurfactinB 和 C15-SurfactinC, 表明菌株 HN-2 正丁醇提取物的主要成分除了表面活性素类脂肽物质 SurfactinA、SurfactinB、SurfactinC 以外, 还有伊枯草菌素 IturinA、IturinB, 杆菌抗霉素 BacillomycinD、BacillomycinF 以及抗霉枯草菌素 Mycosubtilin 等脂肽类物质 (图 6)。

2.5 菌株 HN-2 中脂肽类物质合成相关基因克隆

PCR 扩增结果显示, 贝莱斯芽胞杆菌 HN-2 中具有脂肽类物质合成基因 *ituA* (885 bp)、*ituB*、*ituC*、*ituD*、*fenD* 和 *yndj*, 调控基因 *fenB*、*ituA* (1100 bp) 和 *lpa*。Blast 比对结果表明, 菌株 HN-2 的合成基因组中 *ituA* 基因片段 (885 bp) 与枯草芽胞杆菌 ZKO (KT781920.1) 同源性达到 99%, *ituB* 基因片段 (508 bp) 与枯草芽胞杆菌 ZKO (KT781920.1) 同源性达到 99%, *ituC* 基因片段 (575 bp) 与枯草芽胞杆菌 ZKO (KT781920.1) 同源性达到 98%, *ituD* 基因片段 (647 bp) 与解淀粉芽胞杆菌 B5 (KP860321.1) 同源性达到 99%, *fenB* 基因片段 (767 bp) 与解淀粉芽胞杆菌 96-79 (EU882342.1) 同源性达到 99%, *fenD* 基因片段 (293 bp) 与解淀粉芽胞杆菌 JK6 (KR149329.1) 同源性达到 99%, *yndj* 基因片段 (212 bp) 与解淀粉芽胞杆菌 JK6 (KR149336.1) 同源性达到 100%; 菌株 HN-2 调控基因组中含有 *ituA* 基因 (1100 bp) 与解淀粉芽胞杆菌 96-82 (EU882345.1) 同源性达到 98%, *lpa* 基因 (675 bp) 与枯草芽胞杆菌 B3 (AY040867.1) 同源性达到 98% (图 7)。

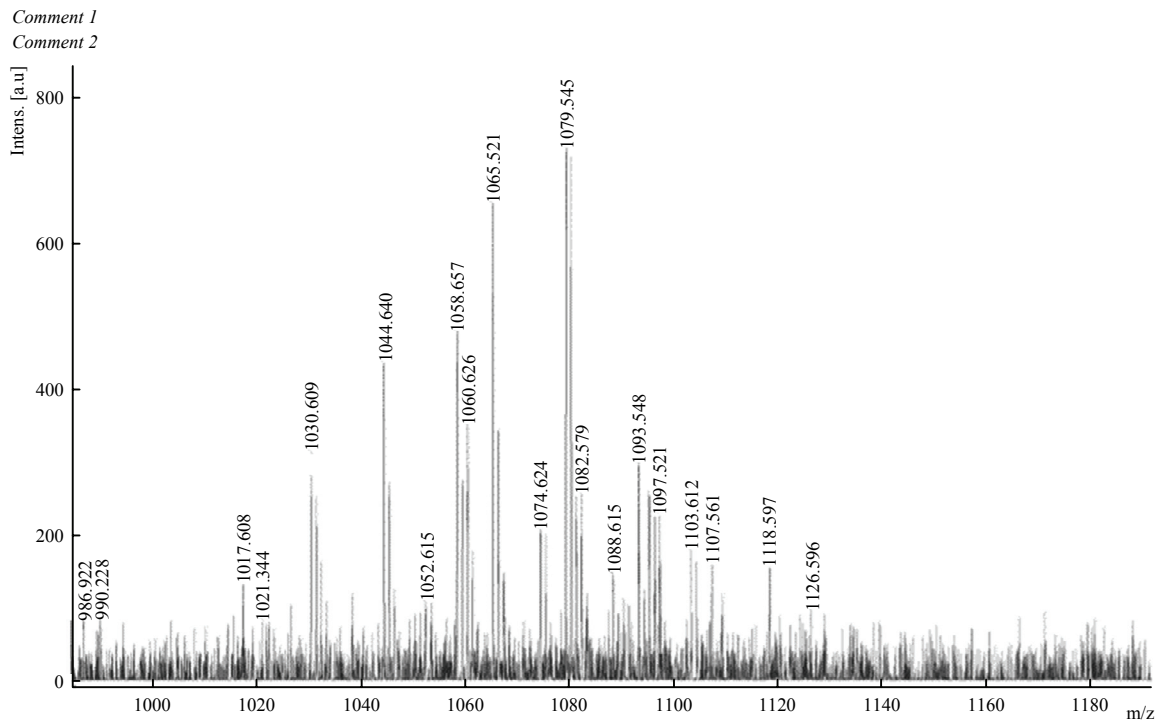
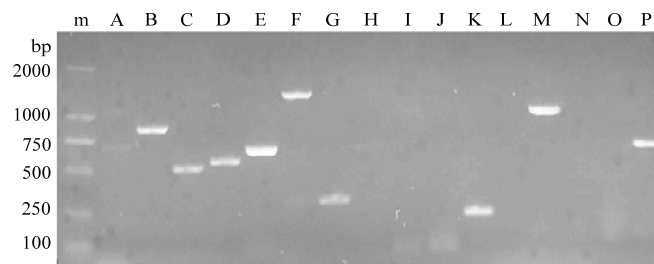


图 6 飞行时间质谱

Fig. 6 MALDI-TOF-MS



m: 2000 Marker A: *srfN*; B: *ituA*; C: *ituB*; D: *ituC*; E: *ituD*; F: *fenB*; G: *fenD*; H: *bamC*; I: *qk*; J: *sboA*; K: *yndj*; L: *sfp*; M: *ituA* 调节基因 Regulatory gene; N: *mycB* 调节基因 Regulatory gene; O: *fenB* 调节基因 Regulatory gene; P: *lpa* 调节基因 Regulatory gene

图 7 菌株 HN-2 脂肽类物质合成相关基因和合成功能基因 PCR 扩增

Fig. 7 Agarose gel-electro phoresis of PCR products for antibiotic biosynthesis genes and the function genes from strain HN-2

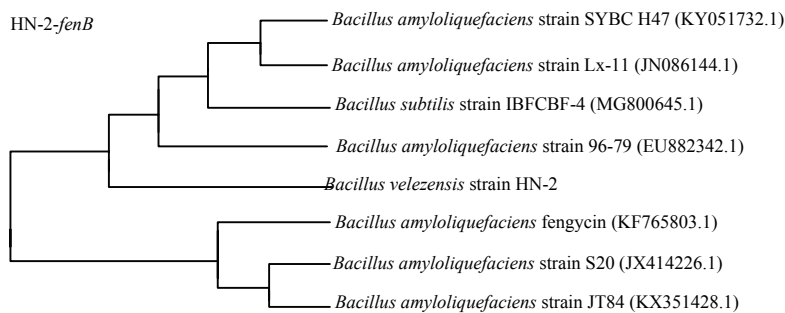
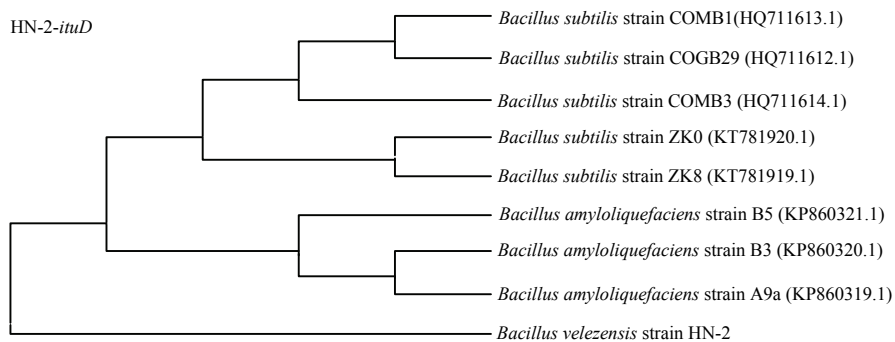
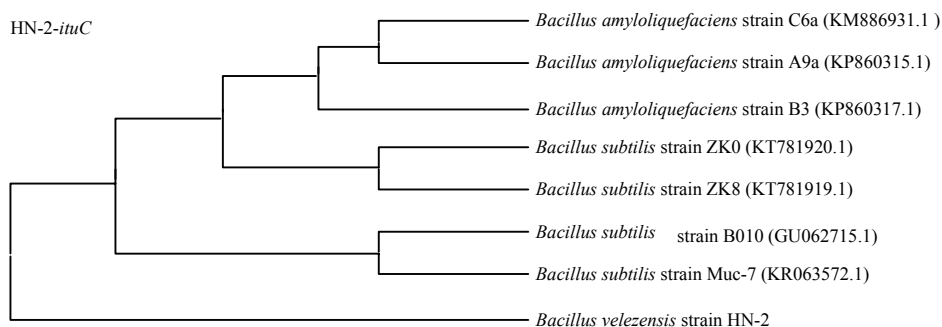
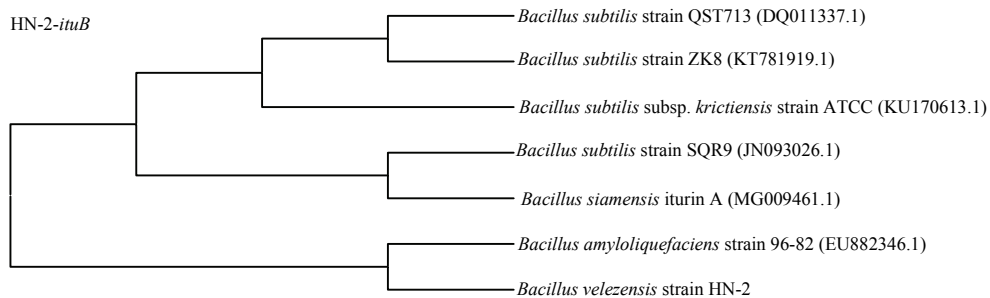
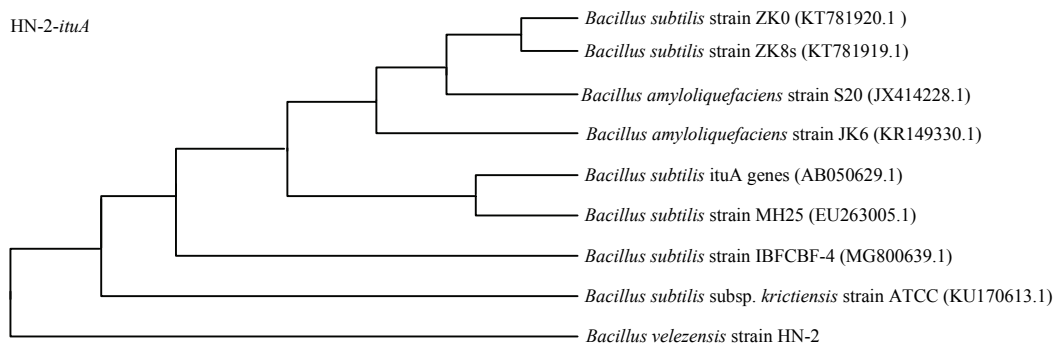
结合各个基因系统发育树, 菌株 HN-2 基因组上含有产生脂肽类物质的基因, 缺少 *sfp* 基因, 但能代谢产生脂肽类物质, 推测菌株 HN-2 中的 *lpa* 基因可以代替 *sfp* 基因的作用合成脂肽类物质 (图 8)。

2.6 菌株 HN-2 正丁醇提取物对杧果炭疽病菌菌丝影响

通过显微观察发现对照组 (图 9A) 杧果炭疽病菌菌丝生长正常, 菌丝粗细均匀; 经 HN-2 正丁醇提取物 (图 9B) 处理过的病菌菌丝畸形扭曲, 菌丝稀疏细小, 局部有膨大断裂现象, 说明正丁醇提取物对杧果炭疽病菌菌丝有明显的抑制作用。

2.7 菌株 HN-2 正丁醇提取物对杧果表面防效作用

只涂抹无菌水和只接种 PDA 固体培养基的杧果, 果实形态正常, 未出现腐烂变黑, 无任何病斑 (图 10A、B)。只接种杧果炭疽菌的杧果发病严重, 表现为菌丝蔓延, 果实腐烂表面变黄变黑, 病斑面积大于 50%, 属四级病害 (图 10C 右); 经菌株 HN-2 发酵液正丁醇粗提物涂抹处理的杧果表面菌丝没有蔓延, 果实形态正常, 未出现腐烂变黑症状, 病斑面积小于 25%, 属二级轻微病害 (图 10C 左)。说明 HN-2 正丁醇粗提物对杧果炭疽菌有明显的抑制作用。



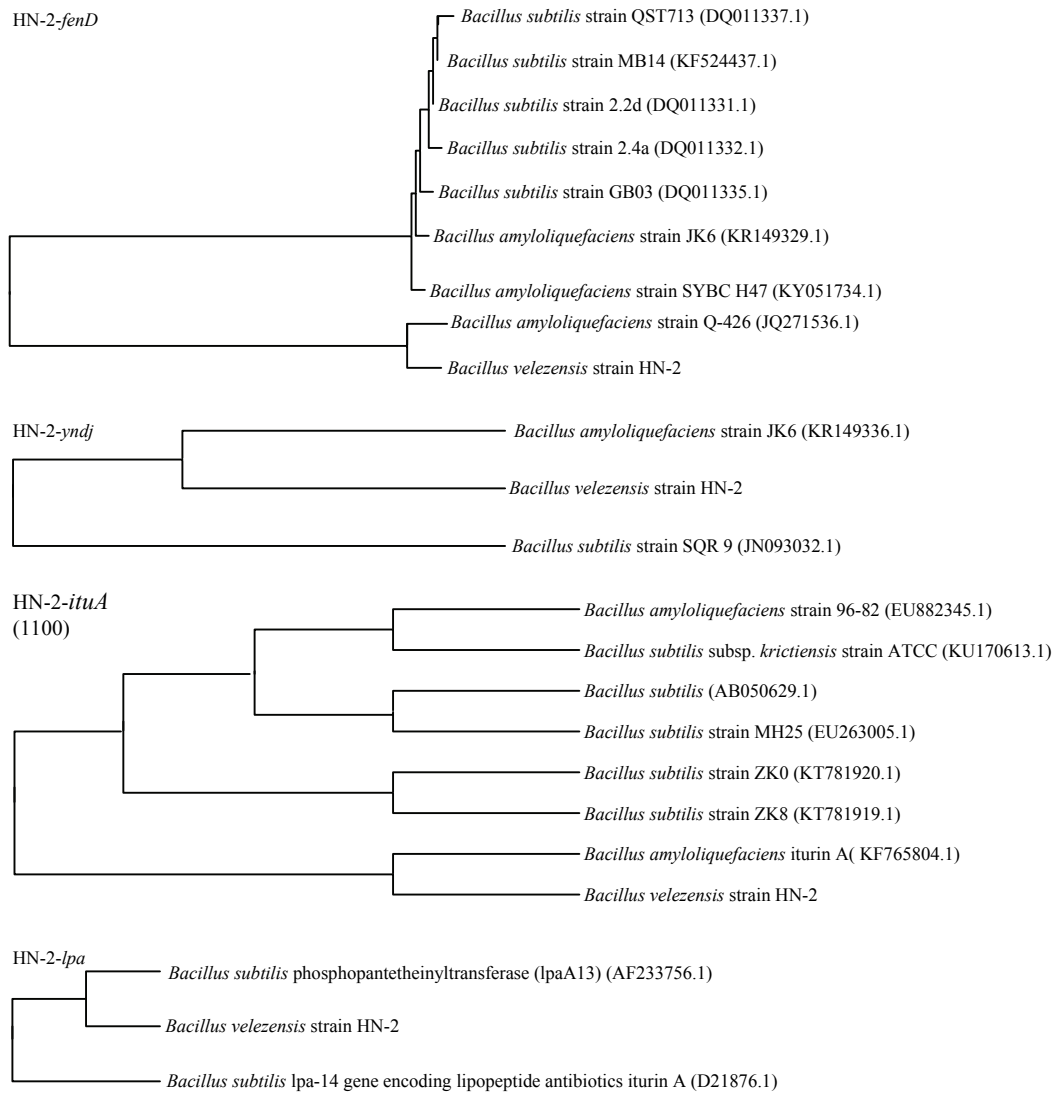
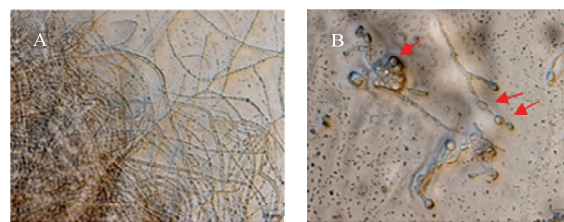


图 8 菌株 HN-2 脂肽类物质合成相关基因系统发育树

Fig. 8 Phylogenetic tree for synthesis of lipopeptide from HN-2



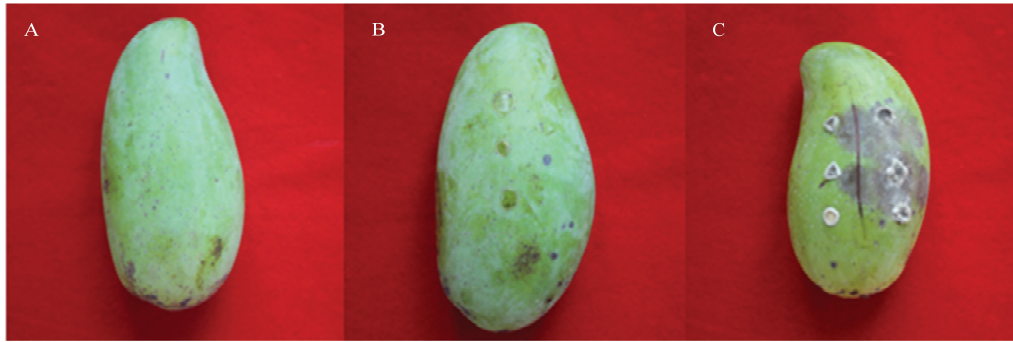
A: 正常菌丝形态 Normal mycelia; B: 正丁醇处理菌丝形态 Treated mycelia

图 9 菌株 HN-2 正丁醇粗提物对杧果炭疽病菌菌丝的影响

Fig. 9 Effects of n-butanol extract of strain HN-2 on the mycelium of *C. gloeosporioides*

3 讨论

贝莱斯芽胞杆菌作为一种有高效的生防细菌具有广泛的应用前景。由于贝莱斯芽胞杆菌与解淀粉芽胞杆菌以及枯草芽胞杆菌同源性较高,本研究利用形态学、16S rDNA、特异性引物 PCR 和系统进化树鉴定菌株 HN-2 为贝莱斯芽胞杆菌。



A: 涂抹无菌水无处理对照组 No treatment control group was applied with sterile water; B: 只接种 PDA 固体培养基对照组 Only PDA solid medium control group was inoculated; C: 左边涂抹 HN-2 正丁醇提取物并接种, 右边涂抹无菌水并接种 Smear sterile water and inoculate on the right side with bacteria apply HN-2 n-butanol extract and inoculate with bacteria on the left side

图 10 菌株 HN-2 提取物对芒果炭疽病菌在芒果果实上的抑制作用

Fig. 10 The inhibition of the extract of strain HN-2 against *C. gloeosporioides* Penz on mango

桑建伟等^[21]研究表明, 大孔树脂抽提法提取解淀粉芽胞杆菌 BEB17 对香蕉枯萎病菌的抑制率可达 80.75%, Foc4 菌丝几乎都膨大扭曲; 周瑚等^[22]研究表明特基拉芽胞杆菌 JN-369 对稻瘟病菌具有显著抑制作用, 对菌丝生长的抑制率达 80.46%; 本研究中菌株 HN-2 正丁醇提取物活性测定 EC_{50} 为 70.62 $\mu\text{g/mL}$, 抑菌圈直径为 20.93 mm, 具备更强的抑菌能力, 抑菌物质同样可以造成病原菌菌丝的变形, 抑制菌丝生长, 从而影响病原真菌的繁殖, 对芒果果实起到防效作用。大量研究表明, 脂肽类物质在拮抗菌的抑菌效果中充当了重要角色, 汪澈等^[23]研究表明枯草芽胞杆菌 B9601-Y2 抑菌活性物质为蛋白质类活性物质; 张雯等^[24]发现枯草芽胞杆菌 BS08 其抑菌活性物质为表面活性素和伊枯草菌素。本式验中菌株 HN-2 除表面活性素、伊枯草菌素以外, 还可以产生杆菌抗霉素以及抗霉枯草菌素, 后续试验将对脂肽类物质进行进一步分离研究。

模式菌株 168 仅含有 *sfp* 基因, 不能产生脂肽类物质。在解淀粉芽胞杆菌 HAB-6 中, 具有脂肽类物质的合成基因有 *yndj*、*srfa*、*ituD*、*fenD*、*ituC* 和调控基因有 *fenB*、*lpa-14*、*sfp*、*mycB*、*ituA*, 发现能够产生脂肽类物质^[25]; 枯草芽胞杆菌 RP24 中 *lpa* 基因序列与现有数据库中的 *lpa* 基因的同源性为 98%^[26], 也产生了脂肽类物质。本试验中贝莱斯芽胞杆菌 HN-2 缺乏调控基因 *sfp* 含有 *lpa* 基因, 且能产生脂肽类物质, 这说明菌株 HN-2 中 *lpa* 基因能代替 *sfp* 基因合成脂肽类物质, 并且产生的脂肽类物质具有很强的抑菌活性。

菌株 HN-2 能够产生高效的抑菌活性物质, 且能有效抑制芒果炭疽菌菌丝生长, 证明该菌株是可用于防治芒果炭疽菌的潜在菌株, 具有较高的研究价值和应用价值, 在产品的开发方面有很大的优势。但菌株 HN-2 产生抑菌活性物质的机理尚不明确, 需进一步研究及探索, 后续将在前期试验基础上, 对活性粗提物的有效成分以及抑菌机理进行深入研究, 为芽胞杆菌生防菌和生防药剂的应用提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] Fernando W G D, Nakkeeran S, Zhang Y, et al. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals[J]. Crop Protection, 2007, 26(2): 100-107.
- [2] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽胞杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97-103.
- [3] 程亮, 游春平, 肖爱萍. 拮抗细菌的研究进展[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(5): 732-737.
- [4] Wang L T, Lee F L, Tai C J, et al. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(1): 191-195.
- [5] 蔡高磊, 张凡, 欧阳友香, 等. 贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)研究进展[J]. 北方园艺, 2018(12): 162-167.
- [6] 吕应年, 杨世忠, 牟伯中. 脂肽的分离纯化与结构研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32(1): 67-73.
- [7] 姬婧媛, 杨洁, 高小宁, 等. 植物内生枯草芽胞杆菌 E1R-j 脂肽类化合物的分离鉴定及抑菌作用[J]. 农药学报, 2015, 17(2): 172-178.
- [8] 刘宇帅, 张杰, 钟瑾, 等. 解淀粉芽胞杆菌 TF28 抗菌脂肽芬芥素的分离鉴定及抑菌作用[J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(10): 20-29.
- [9] 韦丹丹, 缪卫国, 孙茜茜, 等. 解淀粉芽胞杆菌 HAB-2 抑制芒果炭疽菌的活性成分分析[J]. 果树学报, 2018, 35(10): 1253-1261.

- [10] 刘丽霞. Surfactin 合成酶相关基因研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [11] 邓建良. 解淀粉芽胞杆菌 YN-1 抑制植物病原真菌活性物质研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [12] Zhao H, Shao D, Jiang C, *et al.* Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(15): 5951-5960.
- [13] 黄元桐, 崔杰. 革兰氏染色三步法与质量控制[J]. *微生物学报*, 1996, 36(1): 76-79.
- [14] 刘勇, 李辉, 李金霞, 等. 特异 PCR 方法对枯草芽胞杆菌群的鉴定区分[J]. *饲料工业*, 2010, 31(4): 52-54.
- [15] 杨琦瑶, 索雅丽, 郭荣君, 等. 枯草芽胞杆菌 B006 对黄瓜枯萎病菌和辣椒疫霉病菌的抑制作用及其抗菌组分分析[J]. *中国生物防治学报*, 2012, 28(2): 235-242.
- [16] 别小妹, 陆兆新. 影响枯草芽胞杆菌 *fmbR* 菌株抗菌物质提取的主要因子[J]. *南京农业大学学报*, 2005(4): 126-129.
- [17] 于婷, 尚玉珂, 李艳芳, 等. 短小芽胞杆菌 BSH-4 抗菌物质的提取及其特性[J]. *植物保护学报*, 2009, 36(1): 65-69.
- [18] 孙卉, 师俊玲. 枯草芽胞杆菌 CCTCC M207209 抗扩展青霉特性研究-活性物质的提取, 稳定性与应用[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2010, 38(1): 201-208.
- [19] 胡美姣, 李敏, 杨凤珍, 等. 两种杧果炭疽病菌生物学特性的比较[J]. *西南农业学报*, 2005, 28(3): 306-310.
- [20] 陈鸿申, 龚会琴, 蒲忠禄, 等. 球孢白僵菌对羊角月牙藻生长的抑制效果[J]. *贵州农业科学*, 2018, 46(1): 52-55.
- [21] 桑建伟, 杨扬, 陈奕鹏, 等. 内生解淀粉芽胞杆菌 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.
- [22] 周瑚, 邹秋霞, 胡玲, 等. 特基拉芽胞杆菌 JN-369 的分离鉴定及其抑菌物质分析[J]. *农药学报*, 2019, 21(1): 52-58.
- [23] 汪澈, 何月秋, 张永庆. 枯草芽胞杆菌 B9601-Y_2 抑菌蛋白活性及产生条件的研究[J]. *植物病理学报*, 2005, 35(1): 30-36.
- [24] 张雯, 卞丹, 沈燕秋, 等. 枯草芽胞杆菌抑菌活性物质鉴定, 抑菌特性及发酵条件优化[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(12): 105-115.
- [25] 王皓楠, 靳鹏飞, 康迅, 等. 解淀粉芽胞杆菌 HAB-6 抑菌物质及其相关基因的分析[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(4): 79-83.
- [26] Grover M, Nain L, Singh S B, *et al.* Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24[J]. *Current Microbiology*, 2010, 60(2): 99-106.