

周 英, 张 岩, 伍辉军, 等. 生防芽孢杆菌菌株的分子鉴定及拮抗功能研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 118–120.

生防芽孢杆菌菌株的分子鉴定及拮抗功能研究

周 英^{1,2}, 张 岩¹, 伍辉军¹, 司宏明¹, 张玉栋¹, 高学文¹

(1. 南京农业大学植物保护学院/农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室, 江苏南京 210095;

2. 苏州农业职业技术学院, 江苏苏州 215008)

摘要:采用 16S rDNA 基因序列分析法对笔者所在实验室分离的芽孢杆菌 B3、G1 和 G4 菌株进行鉴定, 构建系统发育树。结果表明: G1 菌株与枯草芽孢杆菌模式菌株 168 聚类在一起, 说明 G1 菌株为枯草芽孢杆菌; B3、G4 菌株与解淀粉芽孢杆菌模式菌株 FZB42 聚类在一起, 表明它们为解淀粉芽孢杆菌。平板拮抗活性检测试验结果表明: B3、G1 和 G4 菌株对油菜菌核病菌和水稻白叶枯病菌具有良好的抑菌活性, 其中 B3 菌株对油菜菌核病菌的抑制作用较明显, 平均抑菌圈面积为 2.01 cm², G4 菌株对水稻白叶枯病菌的抑制作用较明显, 平均抑菌圈面积为 3.14 cm²。MALDI-TOF-MS 分析结果表明, 菌株 G4 能够产生表面活性素、伊枯草菌素和泛草素 3 种脂肽类化合物, 说明 G4 的拮抗活性与脂肽化合物的合成及分泌有关。

关键词:芽孢杆菌; 分子鉴定; 拮抗活性; 脂肽类化合物

中图分类号: S482.2⁺92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0118-03

芽孢杆菌(*Bacillus* spp.) 是自然界广泛存在的一类革兰氏阳性细菌, 在土壤生态系统中占有重要地位, 由于它们可以形成芽孢, 具有很强的环境适应性和环境友好性, 被广泛应用于农业、工业、医药、卫生、环保等领域。作为新型微生物肥料和生物农药, 芽孢杆菌可以显著促进植物生长, 有效防治植物病害, 提高植物抗逆性^[1-3]。对芽孢杆菌菌株进行分离鉴定是生物农药和生物肥料研发的基础, 传统的鉴定方法仅基于表型特征和理化反应, 存在特异性差、准确性低等缺点, 随着分子生物学技术的发展, 基于 16S rDNA 序列的鉴定方法已成为微生物种类和遗传多样性分析的一种新型分析手段^[4-7]。本研究对实验室保存的芽孢杆菌菌株在分子水平上进行鉴定, 通过平板拮抗活性筛选和脂肽类化合物检测研究其抑菌功能和机制, 为进一步研究该菌株的遗传背景、菌株间的亲缘关系以及生防机理提供基础数据, 同时为生物农药的研发提供菌株资源。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及培养条件

枯草芽孢杆菌模式菌株 168(*Bacillus subtilis* 168)、芽孢杆菌 G1、芽孢杆菌 G4 和芽孢杆菌 B3 等菌株由南京农业大学生防与细菌分子生物实验室保存。芽孢杆菌 168、G1、G4、B3 在 37 ℃ 下于 LB 培养基上生长。蓝白斑筛选平板为 LB/Amp/IPTG/X-gal, 其中 Amp 含量为 100 μg/mL、IPTG 含

量为 24 μg/mL、X-gal 含量为 20 μg/mL。

1.2 主要试剂及仪器

Taq 酶、dNTP、pMD18-T 载体、蛋白酶 K、限制性内切酶购于 TaKaRa 公司, 凝胶回收试剂盒购自 V-gene 公司, 质粒试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司, 引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。OTC-200 型 PCR 仪(美国 MJResearch 公司), 紫外透射反射分析仪(上海康华生化仪器制造厂), Bio-RAD 凝胶成像仪。

1.3 芽孢杆菌基因组提取

CTAB/NaCl 溶液: 4.1 g NaCl 溶解于 80 mL 水, 缓慢加入 10 g CTAB, 加水至 100 mL。其他试剂: 氯仿-异戊醇混合液(体积比为 24:1), 酚-氯仿-异戊醇混合液(体积比为 25:24:1), 异丙醇, 70% 乙醇, TE, 10% SDS, 蛋白酶 K (20 mg/mL 液剂或粉剂), 5 mol/L NaCl, 3 mol/L NaAc。

1.4 16S rDNA 序列分析鉴定

16S rDNA 扩增引物: 正向引物 27F(5'-AGAGTTTGATC-MTGGCTCAG-3'), 反向引物 1492R(5'-GGYTACCTTGT-TACGACTT-3')。PCR 扩增条件: 95 ℃ 4 min; 94 ℃ 1 min, 50 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 34 个循环; 72 ℃ 10 min。将 16S rDNA 扩增产物回收纯化送到上海英俊生物技术有限公司测序, 所得序列通过 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 BLAST 比对, 通过 MEGA 4 软件对芽孢杆菌及模式菌序列进行系统发育分析。

1.5 芽孢杆菌 B3、G4 平板拮抗活性检测

1.5.1 对油菜菌核病菌的平板拮抗活性检测 以油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*) 为指示菌, 用纸碟法检测芽孢杆菌 B3、G4 菌株的抑菌活性。具体方法如下: 使用打孔器从活化的菌核病菌上打取直径为 7 mm 的菌碟, 接种在新的 PDA 平板中央, 在中央及距中央 2.5 cm 处呈“十”字形分布的 4 个接种点放置直径为 4 mm 的滤纸片, 在滤纸片中央滴加 B3、G4 菌液各 5 μL, 对照不接种测试菌、用无菌水代替, 每个处理重复 3 次, 放入 26 ℃ 恒温培养箱中培养 2~3 d 后, 取出观

收稿日期: 2013-10-14

基金项目: 国家“863”计划(编号: 2012AA101504); 国家公益性行业(农业)科研专项(编号: 201303015)。

作者简介: 周 英(1978—), 女, 江苏无锡人, 硕士, 讲师, 主要从事园林、园艺植物保护技术研究。Tel: (0512) 66098569; E-mail: 17401034@qq.com。

通信作者: 高学文, 博士, 教授, 主要从事分子植物病理学和植物病害生物防治研究。Tel: (025) 84395268; E-mail: gaoxw@njau.edu.cn。

测并记录抑菌结果。

1.5.2 对水稻白叶枯病菌的平板拮抗活性检测 以水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)为指示菌,在 NA 培养基上 28 ℃ 过夜培养,待平板上长出单菌落后,挑取少许接种到 NA 液体培养基中,28 ℃ 振荡培养 24 ~ 48 h 后,按照 1 : 30 的体积比加入冷却到 50 ℃ 左右的 NA 液体培养基中混匀,制成含菌平板;在距离中心 2.5 cm 处“十”字垂直放置 4 个直径为 4 mm 的滤纸片,吸取待测菌液 5 μ L 接种于滤纸片上,对照不接种测试菌、用无菌水代替,每个处理重复 3 次,置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 2 ~ 3 d 后,观察并记录结果。

1.6 G4 菌株脂肽类化合物粗提物的制备和分析

将 G4 菌株首先接种于 LB 培养基中过夜培养,第 2 天将菌株转接入含有 Landy 培养基的三角瓶中,在 30 ℃、200 r/min 条件下培养 38 h。培养结束后,将培养物离心取上清液,在上清液中加入 6 mol/L HCl 调 pH 值至 2.0,然后轻微搅动 2 h 或过夜。离心收集沉淀,加入甲醇后用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0,再用甲醇抽提 2 次并将抽提液合并,获得脂肽类化合物粗提物。利用基质协助激光解吸离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析 G4 菌株 Landy 发酵产生的脂肽类化合物种类,基质为 α -氰-4-羟肉桂酸(α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid)。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌不同菌株 16S rDNA 序列分析鉴定

提取芽孢杆菌 B3、G1、G4 菌株基因组 DNA,并以其为模板,扩增 16S rDNA 片段,结果扩增到大小约为 1500 bp 的

PCR 特异性条带,与枯草芽孢杆菌 16S rDNA 的理论值基本相符(图 1)。将测序结果在 NCBI 中与 GenBank 中已知序列进行 BLAST 比对,结果表明:G1 菌株的 16S rDNA 与枯草芽孢杆菌菌株 168 的同源性为 100%;菌株 B3、G4 与解淀粉芽孢杆菌菌株 FZB42 的同源性为 99%。目前,B3 菌株的 16S rDNA 序列已经登录到了 GenBank 上,登录号为 EF492885。

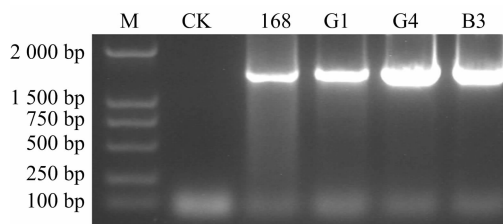


图1 芽孢杆菌 16S rDNA 的 PCR 产物电泳结果

2.2 芽孢杆菌菌株的系统发育分析

在 16S rDNA 序列分析的基础上,应用 MEGA 4 软件对这些序列进行分析,构建了系统发育树。从图 2 可以看出,G1 菌株与枯草芽孢杆菌模式菌株菌株 168 聚类在一起,说明 G1 菌株为枯草芽孢杆菌,B3、G4 菌株与解淀粉芽孢杆菌模式菌株 FZB42 聚类在一起,表明它们为解淀粉芽孢杆菌。

2.3 芽孢杆菌菌株对油菜菌核病菌和水稻白叶枯病菌的平板拮抗活性

试验结果(图 3)表明,芽孢杆菌 B3、G4 菌株均能够明显抑制油菜菌核病菌和水稻白叶枯病菌的生长。其中,B3 菌株对油菜菌核病菌的抑制较明显,G4 对水稻白叶枯病菌的抑制较明显,B3、G4 菌株对油菜菌核病菌的平均抑菌圈面积分别

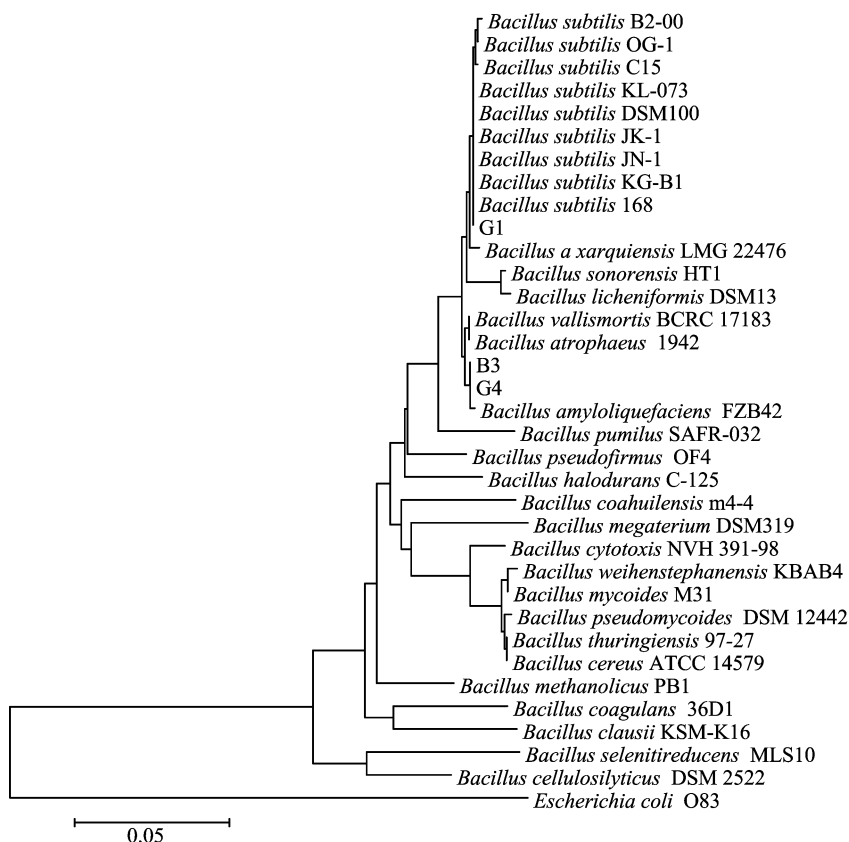
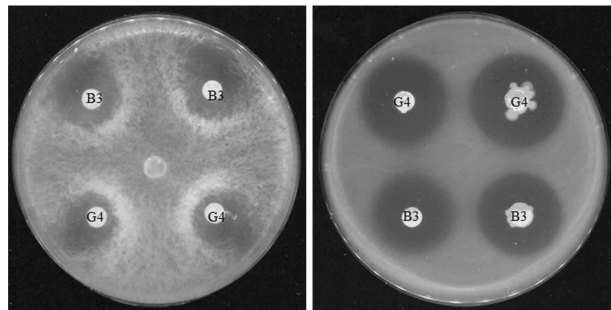


图2 基于 16S rDNA 序列构建的芽孢杆菌系统发育树

为 2.01、1.54 cm², 对水稻白叶枯病菌的平均抑菌圈面积分别为 1.78、3.14 cm², 差异显著性分析结果表明各处理抑菌圈面积在 0.05 水平与对照有显著差异。



A. 油菜菌核病菌

B. 水稻白叶枯病菌

图3 拮抗芽孢杆菌的筛选

2.4 芽孢杆菌 G4 菌株产生脂肽化合物的 MALDI-TOF-MS 分析

通过 Landy 发酵后获得 G4 菌株脂肽化合物, 对脂肽化合物粗提物进行 MALDI-TOF-MS 分析, 结果(图 4)表明, 菌株 G4 在 m/z 为 200 ~ 2 000 的范围内可以产生伊枯草菌素(bacillomycins D)、表面活性素(surfactin)和泛草素(fengycin)3 种脂肽类化合物。

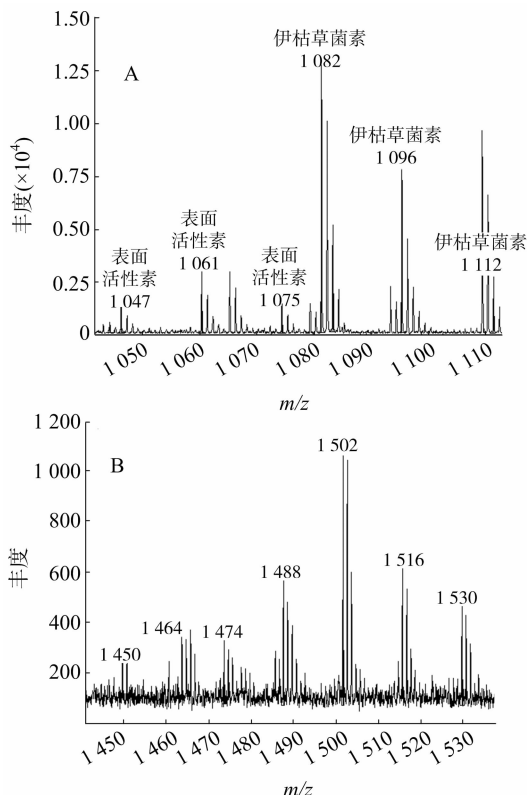


图4 G4菌株产生的伊枯草菌素、表面活性素(A)和泛草素(B)的MALDI-TOF-MS检测结果

3 讨论与结论

16S rRNA/DNA 碱基测序分子生物学技术已成为普遍接受的方法, 扩增 16S rDNA 序列使用通用引物容易获得扩增片段, 且大小适中, 序列能够体现不同菌属之间的差异。目

前, 很多研究采用 16S rDNA 测序方法来鉴定芽孢杆菌的种属, 其准确性有待探讨, 如采用 16S rDNA 测序方法就无法将 *Pseudomonas fulva* 和 *Pseudomonas straminea* 区分开^[8]。近年来, *gyrB* 基因序列分析已应用于芽孢杆菌属细菌的分类鉴定中, 特别是在 16S rDNA 序列分析较难区分的芽孢杆菌组群中^[9-10], 也有研究采用 MALDI-TOF-MS 质谱方法作进一步鉴定。本研究采用 16S rDNA 测序方法对生防菌株进行鉴定, G1 菌株与枯草芽孢杆菌模式菌株 168 聚类在一起, 说明 G1 菌株为枯草芽孢杆菌, B3、G4 菌株与解淀粉芽孢杆菌模式菌株 FZB42 聚类在一起, 表明它们为解淀粉芽孢杆菌。

B3、G4 对油菜菌核病菌和水稻白叶枯病菌的平板拮抗试验结果表明, B3、G4 可以形成清楚明显的抑菌圈, 其中 G4 对水稻白叶枯病菌的抑制效果较明显。MALDI-TOF-MS 分析结果表明, G4 菌株可以产生伊枯草菌素、表面活性素和泛草素 3 种脂肽类化合物, 推测 G4 菌株的抑菌活性与其产生有抑菌活性的脂肽类化合物密切相关。本研究通过 MALDI-TOF-MS 对 G4 菌株产生的脂肽类化合物进行分析鉴定, 为其生防机理提供解释, 同时分离和纯化 G4 菌株产生的脂肽类化合物可能作为新型生物杀菌剂, 为开发防治水稻白叶枯病的生物农药提供资源。

参考文献:

- [1] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(4): 845-857.
- [2] Peypoux F, Bonmatin J M, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 51(5): 553-563.
- [3] Romero D, de Vicente A, Rakotoaly R H, et al. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca* [J]. *Molecular Plant - Microbe Interactions*, 2007, 20(4): 430-440.
- [4] 刘 鹏, 魏亚东, 崔铁军. Biolog 系统和 16S rDNA 序列分析方法在植物病原细菌鉴定中的应用[J]. *植物检疫*, 2006, 20(2): 86-87.
- [5] Bosshard P P, Santini Y, Grütter D, et al. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 31(2): 173-182.
- [6] Minamino M, Sakaguchi I, Naka T, et al. Bacterial ceramides and sphingophospholipids induce apoptosis of human leukaemic cells[J]. *Microbiology*, 2003, 149(8): 2071-2081.
- [7] Lee I M, Bartoszyk I M, Gundersen-Rindal D E, et al. Phylogeny and classification of bacteria in the genera *Clavibacter* and *Rathayibacter* on the basis of 16S rRNA gene sequence analyses[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1997, 63(7): 2631-2636.
- [8] 韦草宏, 陈文新, 朱铭莪. 陕甘宁地区根瘤菌的 16S rDNA PCR-RFLP 分析[J]. *农业生物技术学报*, 2000, 8(4): 333-336.
- [9] Bavykin S G, Lysov Y P, Zakhariev V, et al. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(8): 3711-3730.
- [10] 谢永丽, 徐志伟, 马莉贞, 等. 青海北山林场桦树根围芽孢杆菌分子鉴定及其拮抗活性分析[J]. *植物保护学报*, 2012, 39(3): 246-252.